

Universidad Nacional de Córdoba

Doctorado en Ciencias Químicas



---

# Espectroscopia de Disociación Multifotónica IR de agregados iónicos entre bases del ADN y $H^+$ , $Ag^+$ y $Ba^{2+}$

---

Autor:

Andrés Felipe Cruz Ortiz

Director:

Dr. Gustavo A. Pino

Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba

Departamento de Fisicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas

Centro láser de Ciencias Moleculares

Universidad Nacional de Córdoba

2020



## Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
-------------------------	---

ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
------------------------	------

NOMENCLATURA Y ACRÓNIMOS .....	X
--------------------------------	---

## Capítulo 1

### Introducción general

1.1	ÁCIDOS NUCLEICOS: UNA VISIÓN GENERAL.....	3
1.2	COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS .....	3
1.2.1	Bases, nucleósidos y nucleótidos .....	4
1.2.2	Estructura primaria .....	6
1.2.3	Estructura secundaria y terciaria del ADN.....	7
1.2.3.1	Pares de bases canónicos.....	7
1.2.3.2	Pares de bases no canónicos.....	9
1.2.3.2.1	Efectos de la interacción entre las bases del ADN y cationes (metálicos y H <sup>+</sup> ) sobre sus propiedades estructurales y de reactividad.....	10
1.2.3.3	Plegamientos no canónicos: Implicancias a nivel biológico.....	13
1.3	¿POR QUÉ ESTUDIAR LAS BASES DEL ADN EN FASE GASEOSA? .....	17
1.4	OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS .....	19
1.5	REFERENCIAS .....	21

## Capítulo 2

### Fundamentos y metodología

2.1	ESPECTROMETRÍA DE MASAS: DESCRIPCIÓN GENERAL.....	31
2.2	FUENTE DE IONES: IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI).....	32
2.2.1	Mecanismo de generación de iones en fase gaseosa por ESI.....	33
2.3	ANALIZADORES DE MASAS: MULTIPOLOS LINEALES, CELDAS DE COLISIÓN Y TRAMPAS IÓNICAS. ....	34
2.3.1	Multipolos lineales: Cuadrupolo lineal .....	35
2.3.2	Trampas Iónicas y Celdas de Colisión .....	36
2.3.2.1	Trampa Iónica Cuadrupolar (QIT) .....	37
2.3.2.2	Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (FT-ICR).....	40
2.4	ESPECTROMETRÍA DE MOVILIDAD IÓNICA DIFERENCIAL (DIMS) .....	43
2.5	ESPECTROSCOPIA DE DISOCIACIÓN MULTIFOTÓNICA IR (DMFIR).....	47
2.6	SISTEMAS EXPERIMENTALES .....	50
2.6.1	Espectrómetro de masas híbrido 7T FT-ICR (BrukerApexQe) .....	50
2.6.2	Espectrometría movilidad iónica diferencial acoplada a espectrometría de masas en tándem (DIMS MS/MS) .....	52
2.6.4	Láser de Electrones Libres (FEL).....	54
2.6.4	Láser de CO <sub>2</sub> .....	56
2.7	CÁLCULOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA .....	56

2.7.1	Aproximación de Born-Oppenheimer .....	57
2.7.2	Superficie de Energía Potencial (SEP) .....	58
2.7.3	Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) .....	60
2.7.4	Superficie de energía potencial corregida por el método de <i>Counterpoise</i> 61	
2.7.5	Efectos del solvente: Modelo del Continuo Polarizable (PCM) .....	62
2.8	REFERENCIAS .....	64

### Capítulo 3

#### Caracterización estructural del par de bases (Citosina<sup>•••</sup>Guanina)H<sup>+</sup> aislado en fase gaseosa

3.1	INTRODUCCIÓN .....	73
3.2	METODOLOGÍA.....	75
3.2.1	Detalles Experimentales .....	75
3.2.1.1	Espectrometría de masas en tándem ESI-FT-ICR y Espectroscopia DMFIR.....	75
3.2.1.2	Espectrometría de Movilidad Iónica Diferencial (DIMS)(MS/MS).76	
3.2.2	Detalles Computacionales .....	76
3.2.3	Nomenclatura .....	77
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
3.3.1	Espectrometría de masas en tándem MS/MS CID .....	79
3.3.2	Espectrometría de Movilidad Iónica Diferencial (DIMS-MS/MS).....	80
3.3.3	Espectroscopia DMFIR de las soluciones A y B.....	83
3.3.4	Resultados teóricos y asignación estructural .....	85
3.4	CONCLUSIONES .....	97
3.5	REFERENCIAS .....	98

### Capítulo 4

#### Caracterización estructural de los complejos [Guanina]Ag<sup>+</sup> y [Citosina<sup>•••</sup>Guanina]Ag<sup>+</sup> aislados en fase gaseosa

4.1	INTRODUCCIÓN .....	109
4.2	METODOLOGÍA.....	111
4.2.1	Detalles Experimentales .....	111
4.2.2	Detalles computacionales .....	112
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
4.3.1	Caracterización estructural de los complejos [GAg] <sup>+</sup> y [CGAg] <sup>+</sup> .....	114
4.3.1.1	Complejo [GAg] <sup>+</sup> .....	115
4.3.1.2	Complejo [CGAg] <sup>+</sup> .....	120
4.4	CONCLUSIONES .....	126
4.5	REFERENCIAS .....	128

## Capítulo 5

### Interacción entre citosina y Ba<sup>2+</sup>: estructura y reactividad

5.1	INTRODUCCIÓN .....	137
5.2	METODOLOGÍA.....	138
5.2.1	Detalles Experimentales .....	138
5.2.2	Detalles computacionales .....	139
5.2.3	Nomenclatura .....	140
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	141
5.3.1	Espectrometría de masas FT-ICR.....	141
5.3.2	Espectroscopia de DMFIR del complejo [C <sub>(-H)</sub> -Ba] <sup>+</sup> .....	142
5.3.3	Espectroscopia de DMFIR del complejo [C <sub>(-H)</sub> -Ba-C] <sup>+</sup> .....	143
5.3.4	Resultados teóricos .....	145
5.3.5	Comparación del espectro DMFIR con los espectros IR calculados para los isómeros del complejo [C <sub>(-H)</sub> -Ba] <sup>+</sup> .....	154
5.3.6	Comparación del espectro DMFIR con los espectros IR calculados para los isómeros del complejo [C <sub>(-H)</sub> -Ba-C] <sup>+</sup> .....	158
5.4	CONCLUSIONES .....	162
5.5	REFERENCIAS .....	163

## Capítulo 6

### Conclusiones y perspectivas

6.1	CONCLUSIONES .....	173
6.2	PERSPECTIVAS.....	176

## Agradecimientos



## Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Estructura química de las cinco nucleobases del ADN.....	<b>4</b>
<b>Figura 1.2.</b> Conformaciones adoptadas por el azúcar, respecto a la base y al grupo fosfato.....	<b>6</b>
<b>Figura 1.3.</b> Estructura primaria bidimensional de una simple hebra.....	<b>7</b>
<b>Figura 1.4.</b> Pares de bases canónicos tipo WC.....	<b>8</b>
<b>Figura 1.5.</b> Representación tridimensional de la estructura de doble hélice tipo B, A, Z.....	<b>9</b>
<b>Figura 1.6.</b> Representación esquemática de los pares de bases mediados por metales (PBMM).....	<b>10</b>
<b>Figura 1.7.</b> Apareamientos no canónicos junto a sus correspondientes plegamientos no canónicos.....	<b>11</b>
<b>Figura 1.8.</b> Perfiles de energía potencial para las reacciones de TP entre pares WC....	<b>13</b>
<b>Figura 1.9.</b> Ciclo termodinámico modelo.....	<b>18</b>
<b>Figura 2.1.</b> Esquema del proceso de formación de iones en fase gaseosa por ESI.....	<b>33</b>
<b>Figura 2.2.</b> Esquema de un cuadrupolo lineal.....	<b>35</b>
<b>Figura 2.3.</b> Esquema de una trampa iónica cuadrupolar (QIT-3D).....	<b>37</b>
<b>Figura 2.4.</b> Esquema general y funcionamiento de una celda ICR hiperbólica.....	<b>41</b>
<b>Figura 2.5.</b> Eventos de excitación en la celda del analizador ICR.....	<b>42</b>
<b>Figura 2.6.</b> Esquema DIMS autónomo y con detector por MS.....	<b>44</b>
<b>Figura 2.7.</b> Representación esquemática del modelo de absorción multifotónica IR...	<b>47</b>
<b>Figura 2.8.</b> Esquema general espectrómetro de masas 7T FT-ICR.....	<b>50</b>
<b>Figura 2.9.</b> Esquema general dispositivo DIMS-QIT.....	<b>52</b>

<b>Figura 2.10.</b> Esquema básico del funcionamiento de un FEL.....	<b>55</b>
<b>Figura 3.1.</b> Espectro MS/MS-CID del ion $[CGH]^+$ .....	<b>79</b>
<b>Figura 3.2.</b> Espectros DIMS del ion $[CGH]^+$ .....	<b>81</b>
<b>Figura 3.3.</b> Espectro MS/MS-DMFIR del ion $[CGH]^+$ .....	<b>83</b>
<b>Figura 3.4.</b> Espectros DMFIR de las soluciones A y B.....	<b>84</b>
<b>Figura 3.5.</b> Estructuras más estables del par protonado $[CGH]^+ HooH^+$ y $WCH^+$ .....	<b>87</b>
<b>Figura 3.6.</b> Espectros DMFIR del ion $[CGH]^+$ de las soluciones A y B junto a los espectros simulados para las estructuras más estables.....	<b>88</b>
<b>Figura 3.7.</b> Espectros DMFIR del ion $[CGH]^+$ de las soluciones A y B junto a los espectros simulados para las estructuras menos estables.....	<b>90</b>
<b>Figura 3.8.</b> Superficie de energía potencial esquemática a lo largo de la coordenada para la reacción de TP en el par $HooH^+$ .....	<b>92</b>
<b>Figura 3.9.</b> Superficie de energía potencial esquemática a lo largo de la coordenada para la reacción de TP en el par WC.....	<b>93</b>
<b>Figura 3.10.</b> Distribución de especies $[C]$ , $[G]$ , $[CH]^+$ y $[GH]^+$ .....	<b>94</b>
<b>Figura 4.1.</b> Representación de un triplex estabilizado por $Ag^+$ .....	<b>110</b>
<b>Figura 4.2.</b> Espectros de masas de los iones $[GAg]^+$ y $[CGAg]^+$ aislados y después de la fragmentación por DMFIR.....	<b>113</b>
<b>Figura 4.3.</b> Estructuras de G neutra consideradas en este estudio.....	<b>115</b>
<b>Figura 4.4.</b> Espectro DMFIR del ión padre $[GAg]^+$ junto a los espectros calculados para las estructuras de menor energía.....	<b>117</b>
<b>Figura 4.5.</b> Espectro DMFIR del ión padre $[CGAg]^+$ junto a los espectros calculados para las estructuras de menor energía.....	<b>123</b>
<b>Figura 4.6.</b> Energías de disociación de los pares de bases tipo Hoogsteen mediado por $H^+$ y $Ag^+$ .....	<b>125</b>
<b>Figura 5.1.</b> Espectro de masas FT-ICR de la mezcla Citosina/ $BaCO_3$ 1.0 mM.....	<b>141</b>

<b>Figura 5.2.</b> Espectro MS/MS del complejo $[C_{(-H)}-Ba]^+$ .....	<b>142</b>
<b>Figura 5.3.</b> Espectro DMFIR del complejo $[C_{(-H)}-Ba]^+$ .....	<b>143</b>
<b>Figura 5.4.</b> Espectro MS/MS del complejo $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ .....	<b>144</b>
<b>Figura 5.5.</b> Espectro DMFIR del complejo $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ .....	<b>144</b>
<b>Figura 5.6.</b> Comparación espectro experimental DMFIR del complejo $[C_{(-H)}-Ba]^+$ con los espectros IR calculados para los cinco isómeros de menor energía.....	<b>155</b>
<b>Figura 5.7.</b> Comparación espectro experimental DMFIR del complejo $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ entre $1150-1800\text{ cm}^{-1}$ con los espectros IR calculados para los cinco isómeros de menor energía.....	<b>159</b>
<b>Figura 6.1.</b> Comparación del espectro DMFIR de $[CH]^+$ , producto de la fotofragmentación del ion padre de $[CGH]^+$ con los isómeros de $CKA(1)N3H^+$ , $CEA(1)O7H^+$ , $CEI(1)_{anti}$ .....	<b>177</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 3.1.</b> Poblaciones relativas de los isómeros 1 y 2 obtenidas por DIMS para las soluciones A y B, junto a las contribuciones relativas de los fragmentos de $[\text{CH}]^+$ y $[\text{GH}]^+$ para cada isómero obtenidas por DIMS-MS/MS.....	<b>82</b>
<b>Tabla 3.2.</b> Energías relativas (EE), con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^\circ_{298\text{K}}$ ) para los isómeros del par protonado $[\text{CGH}]^+$ .....	<b>86</b>
<b>Tabla 3.3.</b> Afinidades protónicas de las bases y el par Watson-Crick .....	<b>95</b>
<b>Tabla 4.1.</b> Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^\circ_{298\text{K}}$ ) para los isómeros del complejo $[\text{GAg}]^+$ .....	<b>116</b>
<b>Tabla 4.2.</b> Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^\circ_{298\text{K}}$ ) para los isómeros $[\text{CGAg}]^+$ .....	<b>121</b>
<b>Tabla 5.1.</b> Isómeros de menor energía de C neutra y sus correspondientes aniones...	<b>146</b>
<b>Tabla 5.2.</b> Distribución de cargas NBO para los cinco isómeros de $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$ de menor energía.....	<b>148</b>
<b>Tabla 5.3.</b> Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^\circ_{298\text{K}}$ ) para los isómeros $[\text{C}_{(-\text{H})}-\text{Ba}]^+$ .....	<b>149</b>
<b>Tabla 5.4.</b> Momentos dipolares ( $\mu$ ), energías relativas considerando la corrección de la energía de punto cero ( $\Delta E+\text{ZPE}$ ), en fase gaseosa y acuosa de los cinco isómeros más estables de $[\text{C}_{(-\text{H})}-\text{Ba}]^+$ .....	<b>150</b>
<b>Tabla 5.5.</b> Distribución de cargas NBO para los tres isómeros menor energía de $[\text{C}_{(-\text{H})}-\text{Ba}]^+$ .....	<b>150</b>

**Tabla 5.6.** Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G_{298K}^{\circ}$ ) para los isómeros  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ ..... **152**

**Tabla 5.7.** Momentos dipolares ( $\mu$ ), energías relativas considerando la corrección de la energía de punto cero ( $\Delta E+ZPE$ ), en fase gaseosa y acuosa de los cinco isómeros más estables de  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ .....**153**

**Tabla 5.8.** Distribución de las cargas NBO para los dos isómeros de menor energía de  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ ..... **154**

## Nomenclatura y Acrónimos

**ADN:** Acido desoxirribonucleico.

**A:** Adenina.

**C:** Citosina.

**CID:** Disociación inducida por colisiones.

**CV:** Voltaje de compensación.

**DIMS:** Espectrometría de movilidad iónica diferencial.

**DFT:** Teoría del funcional de la densidad.

**DMFIR:** Disociación Multifotónica IR.

**ESI:** Ionización por electrospray.

**FTICR:** Resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier.

**FEL:** Láser de electrones libres.

**GGA:** Aproximación de gradiente generalizado.

**G:** Guanina.

**HF:** Hartree-Fock.

**IEM:** Modelo de evaporación de iones.

**IVR:** Redistribución intramolecular de energía vibracional.

**LDA:** Aproximación de densidad local.

**MALDI:** Desorción/ionización láser asistida por matriz.

**MS:** Espectrometría de masas.

*m/z:* Relación masa/carga.

**RF:** Radiofrecuencia.

**SEP:** Superficie de energía potencial.

**SCRF:** Campo de reacción autoconsistente.

**SV:** Voltaje de separación.

**PCM:** Modelo continuo polarizable.

**PBMM:** Pares de bases mediados por metales.

**QIT:** Trampa iónica cuadrupolar.

**T:** Timina.

**TOF:** Tiempo de vuelo.

**U:** Uracilo.

**ZPE:** Energía del punto cero.





# Universidad Nacional de Córdoba

## *Resumen*

INFIQC (CONICET-UNC)

Departamento de Fisicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas

Centro Láser de Ciencias Moleculares

UNC

Doctorado en Ciencias Químicas

### **Estructura y espectroscopia de agregados iónicos entre cationes (protón y metálicos) y moléculas de interés biológico**

**Por: Andrés Felipe Cruz Ortiz**

Las interacciones intermoleculares entre las bases del ADN desempeñan un papel fundamental en la formación y estabilización de la estructura de doble hélice del ADN. En particular, las interacciones por puente de hidrógeno son responsables del reconocimiento molecular entre las bases de ADN, por lo que cada base en su forma canónica interactúa específicamente con su base complementaria, es decir, citosina con guanina y adenina con timina ( $C\equiv G$  y  $A=T$ ), formando pares de bases *canónicos*, formalmente conocidos como pares de Watson-Crick (WC).

La interacción entre cationes metálicos y/o ( $H^+$ ) 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, gracias a la flexibilidad estructural que presenta el ADN, puede presentar propiedades estructurales muy diversas, con un amplio abanico de potenciales en los campos de la nanotecnología y biomedicina, resulta intrigante conocer las propiedades estructurales de estos sistemas, sin embargo todavía no se conoce el mecanismo molecular que regula la formación y estabilización de este tipo de estructuras.

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 estructurales de los agregados generados.

Para obtener información molecular detallada acerca del problema planteado, se eligieron sistemas modelo, simplificados y 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 contexto, los sistemas químicos más relevantes empleados fueron las bases del ADN/ARN, interaccionando con  $H^+$ ,  $Ag^+$  y  $Ba^{2+}$ . Para obtener información acerca de la estructura de los agregados estudiados se utilizó la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), espectroscopía de disociación multifotónica IR, en complemento con cálculos de estructura electrónica.



ESCUELA DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
República Argentina

En la Ciudad de Córdoba, a los 16 días del mes de abril de 2020, siendo las 10:00 horas, se hacen presente mediante videoconferencia el Químico **ANDRES FELIPE CRUZ ORTIZ (PASAPORTE AP736896)** y la Comisión Evaluadora de la Tesis de Doctorado designada por Resolución del HCD integrada por: Dr. Alejandro Granados, Dr. Marcos A. Villarreal, Dr. Maximiliano Rossa y el Dr. Mauricio Federico Erben, en carácter de Evaluador Externo, a los efectos de la evaluación final del trabajo de Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas sobre el tema: "**Espectroscopía de disociación multifotónica IR de agregados iónicos entre bases del ADN y  $H^+$ ,  $Ag^+$  y  $Ba^{2+}$** ", realizado en el Dpto. de Fisicoquímica/INFIQC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, bajo la Dirección del Dr. Gustavo A. Pino.

La Comisión de Tesis ha considerado previamente que el Químico **ANDRES FELIPE CRUZ ORTIZ** ha cumplimentado con los requerimientos estipulados en los Art. 2º y 26º del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias Químicas (Ord. 1/13 HCD), a saber:

- Aprobar curso/s de Formación General
- Aprobar curso/s de Formación Docente
- Aprobar cursos de Doctorado de Formación Específica
- Realizar tareas docentes de grado

Por lo antes expuesto, verificada la identidad del Químico **ANDRES FELIPE CRUZ ORTIZ** y contando con la imagen y sonido de los participantes de la defensa de tesis, se da comienzo a la exposición oral por videoconferencia a los fines de respetar las medidas de confinamiento sanitario ordenado por las autoridades de la Nación Argentina en el contexto de la pandemia por COVID-19 (DNU 297/2020 y 325/2020).

### DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

El Químico **ANDRES FELIPE CRUZ ORTIZ** ha efectuado la exposición oral de su Tesis en el día de la fecha, presidida por el Dr. Guillermo Montich, Miembro de la Comisión de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, a fin de convalidar dicho acto.

Por todo lo expuesto, esta Comisión Evaluadora aconseja al Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Químicas que se otorgue al Químico **ANDRES FELIPE CRUZ ORTIZ** el título de DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS, con la calificación de: **SOBRESALIENTE.**-----

La Dra. Lilián E. Canavoso, Directora de la Escuela de Posgrado, firma un ejemplar de la presente.

Dra. Lilián E. Canavoso  
Escuela de Posgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba

**ES COPIA FIEL**



# **Capítulo 1**

---

## **Introducción General**

---



En este primer capítulo se presenta una revisión general de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los sistemas estudiados en este trabajo de tesis. En los capítulos destinados a los distintos sistemas estudiados se presentan los respectivos antecedentes y una discusión más detallada de cada sistema en particular.

En primer lugar, se presenta una breve descripción de la estructura y conformación de los ácidos nucleicos. Luego, se tratan las interacciones intermoleculares que dan lugar a la formación y estabilización de la estructura de doble hélice del ADN (ácido desoxi-ribonucleico), en esta misma línea se discuten brevemente los efectos de la interacción entre el ADN y cationes (metálicos y  $H^+$ ), sobre sus propiedades estructurales y de reactividad. Finalmente, se presentan los objetivos y organización de la tesis.

## **1.1 Ácidos Nucleicos: Una visión general**

Desde la elucidación de la estructura de doble hélice del ADN por Watson y Crick,<sup>[1]</sup> con importantes contribuciones de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins,<sup>[2,3]</sup> se acepta que nuestro material genético se construye a partir de cuatro nucleobases diferentes: citosina (C), guanina (G), adenina (A) y timina (T). Estas cuatro bases forman dos pares de bases de tipo Watson-Crick;  $C \equiv G$  y  $T = A$  mediante la formación de tres y dos puentes de hidrogeno con su base complementaria, respectivamente. La relación 1:1 de las bases que forman cada par fue dilucidada por E. Chargaff,<sup>[4]</sup> incluso antes de que se conociera la información estructural sobre cómo las bases se organizan para permitir una copia fiel de la información genética. La secuencia de estas cuatro bases establece lo que hoy se conoce como la capa de información genética en el ADN, que consta de elementos reguladores y codificadores de proteínas.<sup>[5]</sup>

## **1.2 Composición y estructura de los ácidos nucleicos**

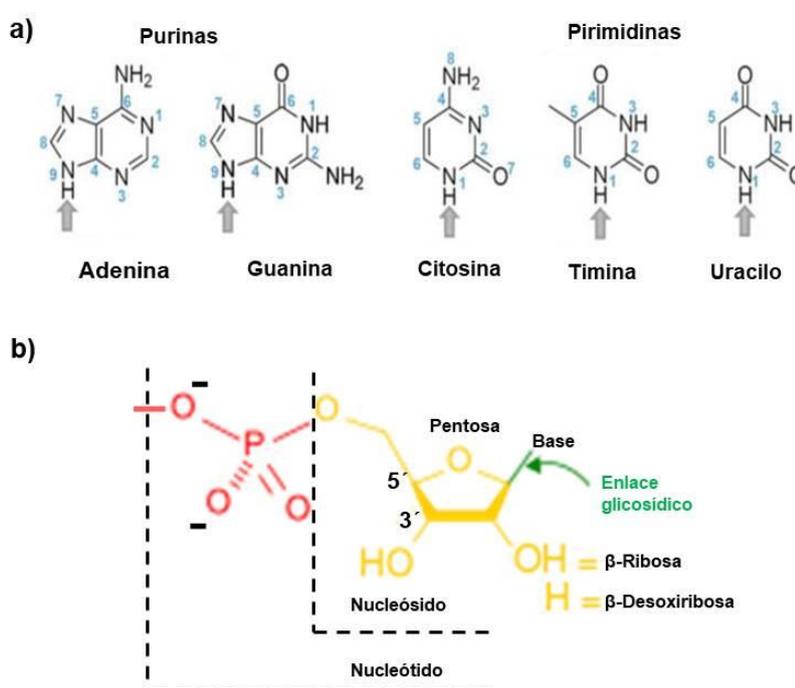
La composición de los ácidos nucleicos determina su estructura y su función. Los ácidos nucleicos han estado vinculados desde su descubrimiento con importantes funciones a nivel biológico, sobre todo en la preservación del código genético en los seres vivos,<sup>[5,6]</sup> gracias a las interacciones específicas entre las unidades básicas que

los conforman. En ese sentido, las propiedades de reconocimiento molecular son producto de la flexibilidad estructural que le confieren los componentes fundamentales de los ácidos nucleicos.

### 1.2.1 Bases, nucleósidos y nucleótidos

Los ácidos nucleicos son polímeros cuyas unidades monoméricas son los nucleótidos, a partir de las cuales se conforman las estructuras primarias, secundarias, terciarias y de orden superior de dichos ácidos. Los nucleótidos están compuestos de tres sub-unidades enlazadas entre sí: un grupo fosfato, un azúcar y una de las cinco nucleobases, como se muestra en la Figura 1.1.<sup>[7,8]</sup>

Las nucleobases (en adelante nos referimos a éstas como bases), constituyen el componente principal de los nucleótidos, pues son las responsables de las propiedades de reconocimiento molecular y por tanto en ellas se alberga la información genética de todas las secuencias de aminoácidos empleadas para la síntesis de proteínas.



**Figura 1.1:** a) Estructura química de las cinco bases canónicas. En celeste se muestra la numeración establecida y con la flecha se indica el punto de unión con el azúcar, b) esquema nucleósidos y nucleótidos.

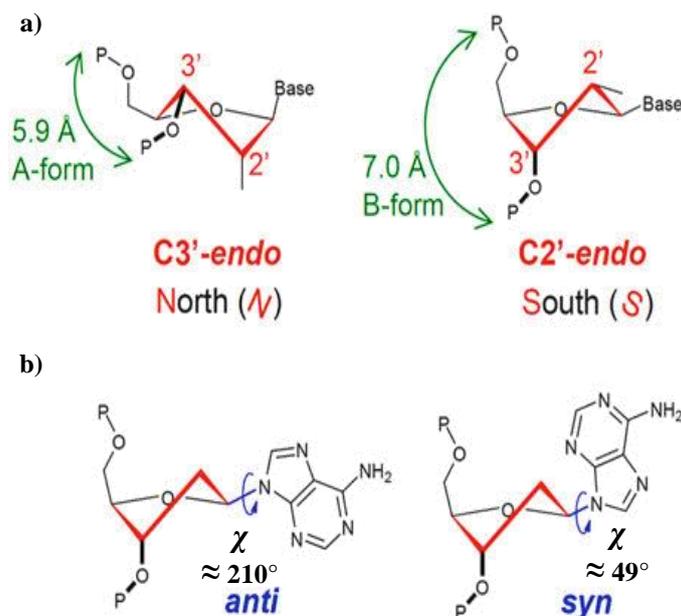
---

Las bases son moléculas heterocíclicas aromáticas que se dividen en dos grupos: las bases derivadas de la pirimidina: T y C, y las bases derivadas de la purina: A y G. La timina se reemplaza por uracilo (U) en los ácidos ribonucleicos (ARN). Todas estas pueden adoptar diferentes estructuras de acuerdo a la tautomerización alrededor de los grupos ceto (K) y amino (A). En ese sentido, se ha encontrado que las bases en su forma canónica adoptan una estructura KA. En la Figura 1.1a se muestran las estructuras de estas cinco bases en su forma canónica y la numeración estándar empleada.

Por su parte, los nucleósidos (Figura 1.1b) están constituidos por una base a la cual se le une mediante un enlace glicosídico una pentosa, que es una  $\beta$  D-ribosa para ARN o una  $\beta$  2'-desoxirribosa para ADN. La unión de al menos un grupo fosfato a un nucleósido, mediante un enlace fosfoéster da lugar a la formación de un nucleótido, los cuales, como se mencionó anteriormente constituyen las unidades monoméricas que conforman los ácidos nucleicos.

La unión fosfoéster se produce a través de los grupos hidroxilo que ocupan las posiciones 3' ó 5' del azúcar y el grupo fosfato. El grupo fosfato es el responsable de la acidez de los nucleótidos, ya que a pH fisiológico se encuentra completamente desprotonado.

Si consideramos la estructura tridimensional de los nucleótidos la complejidad estructural es mucho mayor. La pentosa puede adoptar las configuraciones C2' *endo* y C3' *endo*, de acuerdo con la orientación respecto del grupo fosfato (Figura 1.2a). Adicionalmente, en torno del enlace glicosídico (C—N) las bases pueden presentar dos conformaciones diferentes: la conformación *syn* es aquella en la que la ribosa está eclipsando la base y la *anti* es aquella en la que el azúcar está en posición opuesta a la base (Figura 1.2b). En la forma C2'-*endo*, la conformación *anti* es energéticamente favorable.<sup>[9]</sup> Sin embargo, también se ha encontrado que puede existir la conformación *syn*, dependiendo del entorno. En la conformación C3'-*endo*, debido a que la base se encuentra en una posición axial respecto al azúcar, la conformación *syn* está fuertemente desfavorecida por razones estéricas, por lo que se encuentra preferiblemente la forma *anti*.<sup>[9-11]</sup>

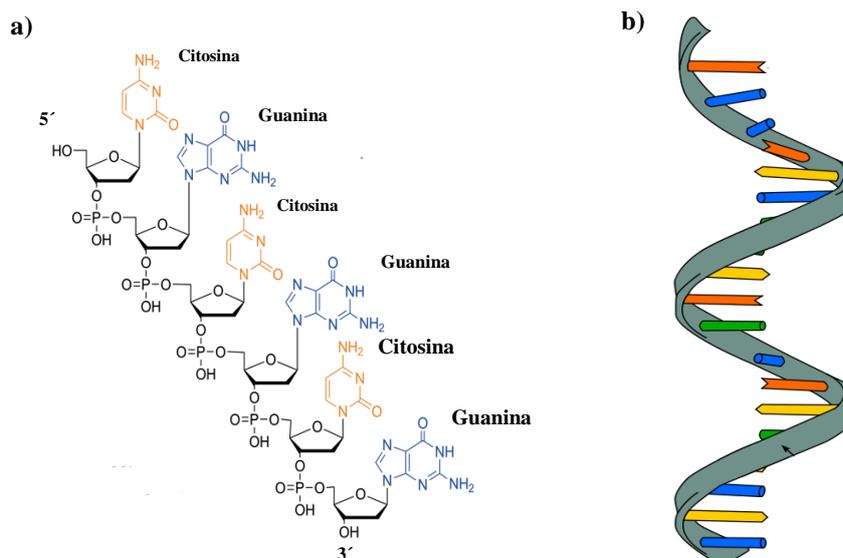


**Figura 1.2:** a) Conformaciones adoptadas por el azúcar, respecto al grupo fosfato b) Estructuras *anti* o *syn* en función del ángulo de enlace glicosídico ( $\chi$ ), ilustrada con adenosina en la conformación C2'-endo.

## 1.2.2 Estructura primaria

Los ácidos nucleicos son oligonucleótidos unidos a través de los grupos fosfato, que por una parte se enlazan con el OH del C3' de la pentosa de un nucleótido y por otra con el OH del C5' de la pentosa de otro nucleótido. Al enlace que se forma se le denomina fosfodiéster (Figura 1.3). La estructura primaria de los ácidos nucleicos adopta una conformación de simple hélice, donde las bases se apilan una encima de la otra.<sup>[12]</sup>

En los ácidos nucleicos se puede hablar de dos comportamientos diferenciados. El azúcar y los fosfatos se conservan en la estructura y cumplen un importante papel a nivel estructural y funcional, mientras que las bases tienen un papel principalmente funcional al modular específicamente las interacciones de reconocimiento molecular entre los ácidos nucleicos. En adelante nos centramos principalmente en las propiedades y parámetros estructurales del ácido desoxirribonucleico (ADN).



**Figura 1.3:** a) Estructura primaria bidimensional de una simple hélice de ADN de 5'-CGCGCG-3', b) Modelo tridimensional de una simple hélice de ADN.

### 1.2.3 Estructura secundaria y terciaria del ADN

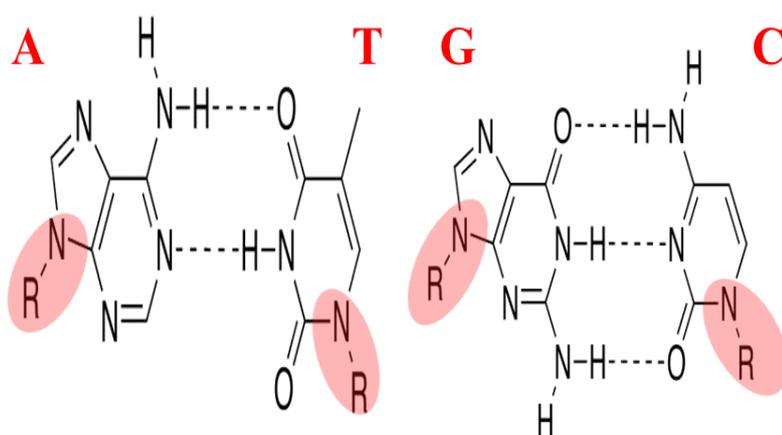
El reconocimiento molecular entre las bases que constituyen los oligonucleótidos, da lugar a la formación de la estructura secundaria del ADN. Así, la secuencia de una de las hélices (estructura primaria), define automáticamente la secuencia de la cadena complementaria, que se dispone de manera antiparalela a la primera hélice (estructura secundaria). La estructura de doble hélice propuesta por Watson y Crick (WC)<sup>[1]</sup>, se convirtió desde su descubrimiento en el modelo más ampliamente aceptado.

#### 1.2.3.1 Pares de bases canónicos

El modelo de doble hélice propuesto por WC<sup>[1]</sup>, se basa en la consideración de que las bases pueden unirse de forma específica, producto de las interacciones por puente de hidrogeno que éstas pueden formar con sus bases complementarias, por lo que las bases de purina y pirimidina se mantienen unidas por puentes de hidrógeno específicos, denominados comúnmente como pares de bases canónicos. Teniendo en cuenta las relaciones estequiométricas entre las bases (ley de Chargaff),<sup>[4]</sup> WC establecieron que la A se une a la T mediante dos puentes de hidrogeno (A=T),

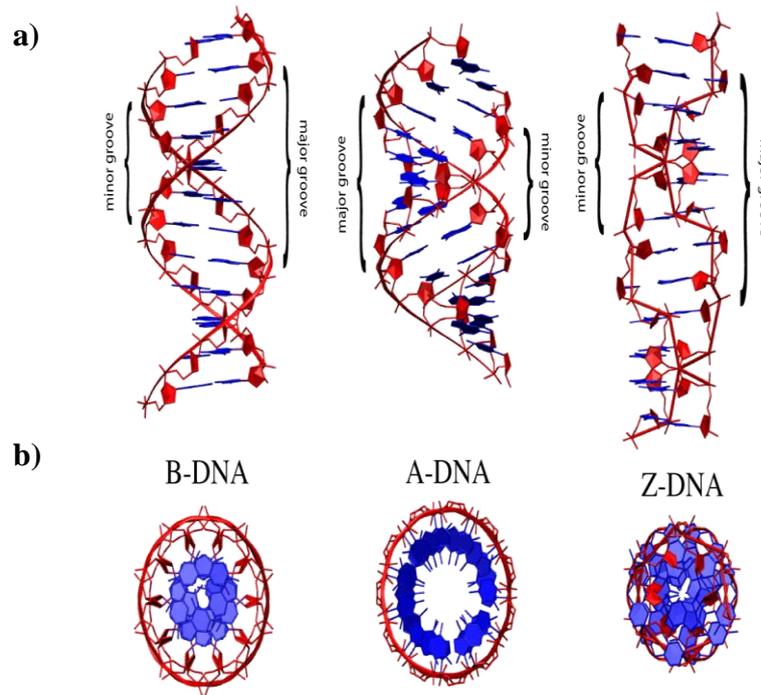
mientras que las bases C y G se unen por tres puentes de hidrógeno (C≡G), a través de los átomos de nitrógeno y oxígeno (N-H···N y N-H···O).

En la Figura 1.4 se muestra un esquema de los pares de bases formados por las estructuras de las bases en su forma canónica, es decir, A=T (KA=KA) y C≡G (KA=KA). El reconocimiento base-base mediante apareamientos WC es clave en procesos de replicación, transcripción y transducción, por lo que el estudio detallado de las estructuras que lo conforman es de gran interés a nivel biológico.



**Figura 1.4:** Pares de bases canónicos del tipo WC, entre A=T y C≡G en círculos rojos se señala el sitio de unión con el azúcar.

El plegamiento tridimensional que adoptan las cadenas de nucleótidos unidas por pares de bases canónicos define la estructura terciaria del ADN. En efecto, dicho plegamiento está condicionado por la interacción entre los pares de bases y la conformación de los demás constituyentes de los oligonucleótidos ( $\beta$ -Desoxirribosa y fosfato). Las cadenas giran alrededor de un eje común formando una espiral doble conocida como doble hélice. De manera que la estructura de doble hélice del ADN puede adoptar distintas conformaciones que a su vez cumplen diferentes funciones a nivel biológico. Entre las estructuras terciarias más conocidas se encuentran las dobles hélices A, B y Z (Figura 1.5), las cuales se diferencian principalmente por la conformación *anti* o *syn* que adoptan el azúcar y la base (Figura 1.2b) y la conformación del azúcar respecto al grupo fosfato (C2'-*endo* y C3'-*endo*).<sup>[9,10,13-16]</sup> En condiciones fisiológicas se ve favorecida la doble hélice B, descubierta por WC, sin embargo, en fase gaseosa se ha encontrado que puede ocurrir la transición B→A.<sup>[11]</sup>



**Figura 1.5:** Representación tridimensional de la estructura de doble hélice tipo B, A, Z: a) vista lateral, b) vista superior, en la cual se aprecian diferencias estructurales entre cada una de ellas. Las estructuras A y B son dextrógiras, mientras que la Z es levógira.

Gracias a la flexibilidad estructural que presentan los componentes del ADN, este puede adoptar conformaciones tridimensionales distintas a las propuestas inicialmente por WC. Dichas conformaciones son estabilizadas por la formación de pares de bases no canónicos.

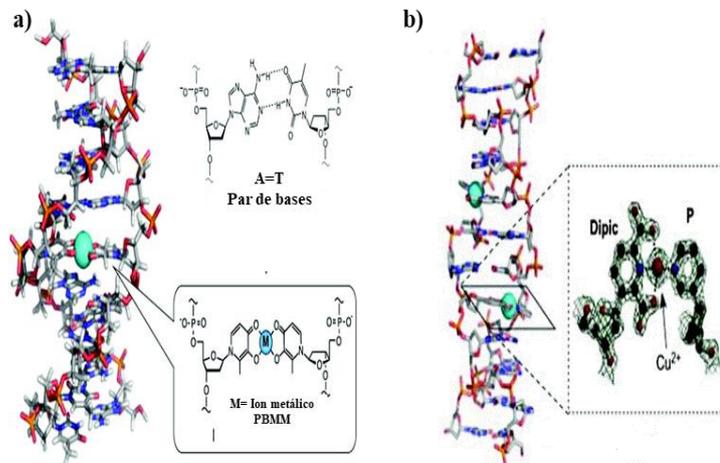
### 1.2.3.2 Pares de bases no canónicos

El apareamiento canónico entre las bases del ADN a menudo se considera únicamente en términos de las interacciones por puente de hidrogeno propuestas por WC (Figura 1.4), pero es posible una gran cantidad de otros arreglos, que conducen a la formación de pares de bases no canónicos. Aunque en condiciones fisiológicas se favorecen ampliamente las estructuras de doble hélice, estabilizadas por apareamientos canónicos, existen una serie de factores que pueden alterar dicha estabilidad, entre los que se encuentran; la composición de la secuencia, la tautomerización de las bases,<sup>[17,18]</sup> interacción con ligandos y/o cationes presentes en el medio<sup>[19-21]</sup> y la modificación química de las bases, por lo que el esquema de interacción canónico puede ser modificado y en consecuencia el apareamiento entre las bases puede ocurrir de múltiples formas.<sup>[22]</sup> En adelante, nos centramos en los

efectos que tiene sobre las propiedades estructurales y de reactividad, la interacción entre las bases del ADN y cationes (metálicos y/o  $H^+$ ).

### 1.2.3.2.1 Efectos de la interacción entre las bases del ADN y cationes (metálicos y $H^+$ ) sobre sus propiedades estructurales y de reactividad

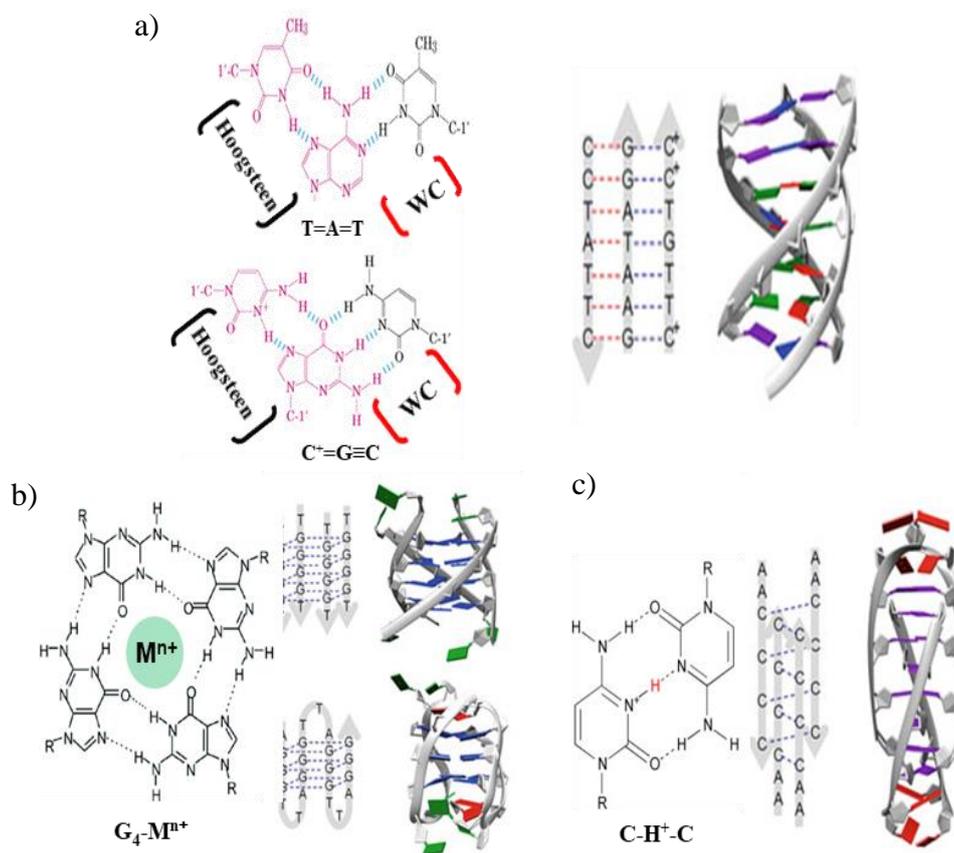
Los metales pueden interactuar de forma específica y en sitios bien definidos dentro del ADN, en particular, los metales se unen a las bases en los sitios involucrados en la formación de los pares de bases WC, dando lugar a los comúnmente denominados pares de bases mediados por metal (PBMM), como se muestra en la Figura 1.6.<sup>[22-24]</sup> Este concepto se basa en la modificación de las interacciones, por puente de hidrogeno del par de bases tipo WC, por nuevas interacciones no canónicas, que conducen a la formación y estabilización de pares de bases no canónicos. Por otro lado, este concepto representa una alternativa para la expansión del código genético y potenciales aplicaciones en nanotecnología, pues se ha encontrado que los PBMM podrían impartir propiedades magnéticas o conductoras a la nanoestructuras basadas en ADN.<sup>[22,24]</sup>



**Figura 1.6:** a) Representación esquemática de los pares de bases mediados por metales (PBMM), b) Estructura de doble hélice del ADN conteniendo un PBMM.

Las bases del ADN son excelentes ligandos que coordinan a través de sus átomos de N y O, los cuales exponen sitios de unión bien definidos principalmente para cationes mono y divalentes. La interacción con cationes (metálicos y  $H^+$ ) favorece la formación y estabilización de pares de bases no canónicos. Incluso, bajo determinadas condiciones estos pares no canónicos mediados por cationes pueden ser

más estables que los pares de bases canónicos del tipo WC. Una década después de que Watson y Crick descubrieran la estructura de doble hélice del ADN, Hoogsteen (Hoo)<sup>[25]</sup> encontró un apareamiento entre las bases distinto al propuesto por WC<sup>[1]</sup> (Figura 1.7a). Este tipo de apareamiento se puede formar entre A y T a pH neutro, y entre C y G a pHs ácidos ya que una de las dos bases debe encontrarse protonada.<sup>[26,27]</sup>



**Figura 1.7:** Apareamientos no canónicos junto a sus correspondientes plegamientos no canónicos, a) Hoogsteen y triplex, b) G:G y G-cuadruplex, c) C-H<sup>+</sup>-C mismatch e *i-motif*. Imagen tomada de la referencia [47].

Sin embargo, se ha encontrado que en presencia de Ag<sup>+</sup> es posible encontrar apareamientos de tipo Hoo entre C y G en condiciones de pH neutro, ya que el catión metálico ocupa la posición del H<sup>+</sup> y sirve como puente entre las dos bases, formando el apareamiento tipo Hoo.<sup>[28,29]</sup> Los pares de bases tipo Hoo están vinculados con la formación y estabilización del triplex de ADN, como se discutirá en la siguiente sección.

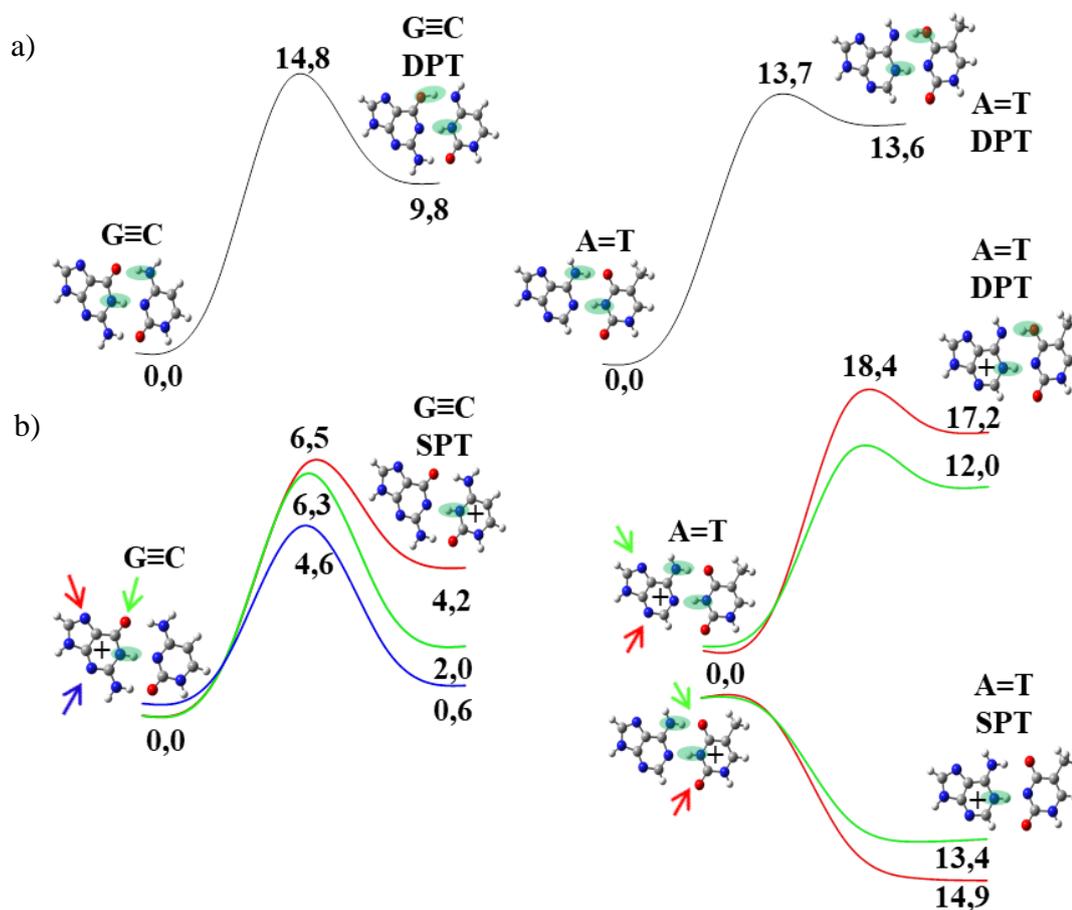
Por otro lado, en secuencias de ADN con abundancia de G y en presencia de cationes mono y divalentes se han encontrado pares de bases del tipo G:G, responsables de estabilizar estructuras de orden superior del tipo G-Cuadruplex (Figura 1.7b).<sup>[30-33]</sup>

Finalmente, en secuencias ricas en citosina es posible encontrar apareamientos del tipo *i-motif* (Figura 1.7c), en el cual dos citosinas se aparean mediadas por un H<sup>+</sup>, por lo que este tipo de apareamiento se ve favorecido principalmente en condiciones ácidas.<sup>[34-37]</sup> Sin embargo, al igual que para los apareamientos tipo Hoo<sup>[28,29]</sup> se ha encontrado que en presencia de cationes metálicos es posible encontrar apareamientos del tipo *i-motif* a pH neutro.<sup>[38-40]</sup>

Como se mencionó anteriormente la interacción con cationes tiene fuertes efectos sobre las propiedades de reconocimiento molecular entre las bases, pues se ha encontrado que los sitios de mayor afinidad por los cationes son aquellos involucrados en la formación de los puentes de hidrógeno responsables de la estabilización de los pares de bases canónicos tipo WC.<sup>[36-41]</sup> Además, se ha establecido que las propiedades de reactividad de las bases se pueden ver modificadas por la interacción con cationes. Particularmente, se ha prestado especial atención a los procesos de protonación/desprotonación de las bases. Por un lado, porque este tipo de reacciones ocurre frecuentemente en numerosas reacciones enzimáticas que involucran segmentos del ADN. Por otro lado, la protonación/desprotonación de las bases favorece los procesos de tautomerización en éstas y como consecuencia se forman pares de bases entre tautómeros raros (pares de bases no canónicos) que a su vez están vinculados con efectos mutagénicos.

En 1963, Löwdin<sup>[17]</sup> propuso que los procesos de transferencia de protones (TP) intermolecular dentro del par de bases de WC (Figura 1.8a) podría dar lugar a mutaciones puntuales por la formación de tautómeros raros. Si el error se mantiene durante el proceso de replicación, se puede introducir una mutación puntual en el ADN.<sup>[42,43]</sup> Sin embargo, las barreras de energía de activación para la reacción de TP entre las bases neutras son del orden de 14-15 kcal/mol,<sup>[44]</sup> por lo cual a temperatura ambiente, este proceso solo puede tener lugar mediante efecto túnel. Cuando una de las bases adquiere una carga extra (interacción con radiación ionizante, protonación/desprotonación, interacción con cationes metálicos), la barrera de

activación para dicha reacción disminuye considerablemente (Figura 1.8b), como consecuencia de un fortalecimiento de las interacciones por puente de hidrogeno aumentando la probabilidad de que ocurra la TP. [44-46]



**Figura 1.8:** Perfiles de energía potencial para las reacciones de TP (kcal/mol) entre los pares WC. a) Pares de bases AT y CG neutras, b) Pares de bases AT y CG protonadas. Las flechas indican los sitios de protonación en las bases y en círculos verdes se indican los  $H^+$  que se transfieren. Imagen tomada de la referencia [39].

### 1.2.3.3 Plegamientos no canónicos: Implicancias a nivel biológico

Como se mencionó en la sección anterior, la formación de pares de bases no canónicos es fuertemente dependiente de factores externos (Sección 1.2.3.2). Estos pares no canónicos inducen la estabilización de plegamientos no canónicos de una gran diversidad estructural, de los cuales en la sección precedente se mencionaron

tres de los más conocidos ya que presentan mayor relevancia a nivel biológico por estar vinculados directamente con una serie de enfermedades congénitas y por sus potenciales aplicaciones biomédicas.

De estas tres estructuras no canónicas, el triplex de ADN<sup>[48-50]</sup> (Figura 1.7a) está constituido por 3 cadenas de oligonucleótidos, de las cuales dos se encuentran apareadas de la forma de doble hélice de WC, mientras que la tercera se une mediante un apareamiento tipo Hoo, formando una triple hélice.<sup>[25]</sup> En secuencias constituidas principalmente por A y T, se pueden encontrar triplex en condiciones de pH fisiológico. Sin embargo, en estas condiciones se ve ampliamente favorecida la estructura canónica de doble hélice.

Por su parte, en secuencias de ADN ricas en C y G la formación de los triplex de ADN está además condicionada por el pH del medio, pues se requiere que la C o G de la tercera cadena de oligonucleótidos se encuentre protonada en el N3 o N7, respectivamente (Figura 1.7a), favoreciendo la formación del apareamiento tipo Hoo. La protonación de cualquiera de las dos bases no ocurre significativamente a pH > 6 lo que representa una limitación intrínseca para la formación y estabilización de este tipo de estructuras en condiciones de pH fisiológico. Sin embargo, recientemente se ha informado que la interacción con cationes metálicos, particularmente Ag<sup>+</sup>, favorece la formación y estabilización de triplex de ADN en dichas condiciones.<sup>[29]</sup>

Los triplex de ADN generalmente se han encontrado vinculados a factores de transcripción, sitios de ADN dañados<sup>[51]</sup> y/o formando complejos ADN-proteína.<sup>[52]</sup> Por lo que se ha demostrado que pueden estar involucrados en el desarrollo de enfermedades como la Ataxia de Friedreich's<sup>[53]</sup> y otras enfermedades encontradas en humanos.<sup>[54]</sup> Nikolova *et al*<sup>[55-57]</sup> demostraron que en algunas secuencias de ADN los apareamientos tipo Hoo existen como especies transitorias que están presentes en equilibrio térmico con pares de bases canónicos de WC. Esta observación abre un nuevo paradigma, pues sugiere que la doble hélice del ADN tiene la capacidad de alternar entre los pares de bases de WC y Hoo, por lo que también puede codificar para pares de Hoo transitorios como una forma de expandir el código genético.

Actualmente, no está completamente claro qué papel juegan estas estructuras en la célula. Se piensa que pueden estar implicadas en los procesos de regulación

---

---

transcripcional o en la inhibición de ciertas enzimas.<sup>[58-60]</sup> Por otro lado, una de las aplicaciones más prominentes de los triplex de ADN es su potencial uso como agente terapéutico.<sup>[60]</sup> Las aplicaciones de estas estructuras se basan en bloquear la transcripción de ciertos genes de forma específica mediante la unión de una tercera cadena a la doble hélice de ADN.

Otro tipo de estructura de orden superior en el ADN que se puede formar a partir de la protonación de la citosina es el plegamiento del tipo (*i-motif*) encontrado principalmente en material genético rico en C. Especialmente a pHs ácidos, estas estructuras podrían describirse como C-Cuádruplex (Figura 1.7c)<sup>[30]</sup> con dos secuencias de oligonucleótidos paralelas también unidas en una orientación antiparalela por pares de bases C-H<sup>+</sup>-C. Dado que estas estructuras son estables a pH ácido, pueden actuar como nanointerruptores en función del pH.<sup>[61-64]</sup> Sin embargo, se ha encontrado que en presencia de Ag<sup>+</sup> y otros cationes monovalentes se pueden formar estructuras del tipo *i-motif* a pH fisiológico.<sup>[35]</sup>

Recientemente se informó la presencia de estructuras de tipo *i-motif* en células humanas,<sup>[65]</sup> estas estructuras están presentes en algunas regiones que están relacionadas con la regulación genética; es decir, con la parte del ADN que funciona como un interruptor y hace que algunos genes se ‘enciendan’ o ‘apaguen’ y, por tanto, se pongan en marcha determinados mecanismos moleculares. El fallo, o la simple desregulación, de estos mecanismos suele tener fuertes consecuencias a nivel biológico.

Finalmente, las estructuras de los cuádruplex ricos en G y C son fundamentalmente diferentes. En secciones de material genético con abundancia de G y en presencia de cationes mono o divalentes, se han encontrado plegamientos no canónicos del tipo G-Cuádruplex (Figura 1.7b).<sup>[66]</sup> En un G-cuádruplex cada G está comprometida en cuatro interacciones por puente de hidrógeno a través de sus caras Hoo y WC, de modo que las guaninas están relacionadas por un eje de rotación cuádruple y son casi coplanares. Las cuatro cadenas alternan entre orientaciones paralelas y antiparalelas y los residuos G en capas adyacentes alternan entre las conformaciones *syn* y *anti*.<sup>[66]</sup>

Los G-cuádruplex tienen una gran relevancia biológica.<sup>[67-69]</sup> Durante los últimos años, se ha observado la presencia de estas estructuras *in vivo*, y la existencia de secuencias ricas en guaninas tanto en el telómero, como en secuencias promotoras.<sup>[70,71]</sup> Actualmente, se consideran potenciales dianas terapéuticas capaces de inhibir tanto la actividad como la expresión de ciertas proteínas.<sup>[72]</sup> Por ejemplo, la estabilización de los cuádruplex de secuencias teloméricas, mediante la adición de ligandos, es capaz de inhibir la formación de la telomerasa; complejo proteína-ADN que está presente en aproximadamente el 80% de las líneas celulares asociadas al cáncer.<sup>[73]</sup> Por otro lado, la formación de cuádruplex en regiones promotoras de oncogenes afecta la expresión de proteínas fundamentales para las células cancerosas. Por ello, el desarrollo de nuevos ligandos y modificaciones químicas, que estabilicen este tipo de estructuras, es de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos.

En este contexto, los estudios detallados a nivel molecular de los procesos de interacción entre las bases del ADN y cationes (metálicos y  $H^+$ ) son de gran importancia para una mejor comprensión de la química biológica del ADN. Sin embargo, los tautómeros raros y los sitios de protonación/cationización específicos dentro de los pares son muy difíciles de detectar pues existen de manera transitoria, en baja abundancia e involucran movimientos sutiles de protones que son difíciles de visualizar, por lo que se requieren experimentos muy sofisticados y que demandan mucho tiempo y en ocasiones es difícil obtener una caracterización estructural detallada.

En ese sentido, teniendo en cuenta que la diversidad estructural que puede presentar la macromolécula de ADN, así como sus propiedades de reconocimiento molecular están fuertemente ligadas a las propiedades estructurales y de reactividad de las bases, el estudio en fase gaseosa de las bases y sus interacciones, nos permite comprender las propiedades intrínsecas que conducen a la formación/estabilización de las estructuras de orden superior en el ADN. Una vez que tales propiedades se mapean para bases aisladas, uno puede esperar extrapolar a sistemas más complejos, incluidos segmentos de ADN más grandes y evaluar las contribuciones del solvente.

### 1.3 ¿Por qué estudiar las bases del ADN en fase gaseosa?

En fase condensada muchas de las propiedades de las bases pueden ser enmascaradas por la interacción con el solvente y otras moléculas presentes en el medio. Los estudios en fase gaseosa proporcionan un enfoque reduccionista para el estudio de las bases del ADN involucradas directamente en la formación de las estructuras de doble hélice canónica y otros plegamientos no canónicos. Las condiciones de vacío brindan entornos libres de colisiones, por lo que proporcionan información sobre las propiedades intrínsecas de las moléculas individuales, que permiten comprender las relaciones causa-efecto de los daños observados en el ADN asociados a enfermedades o bien para potenciar las aplicaciones biomédicas.

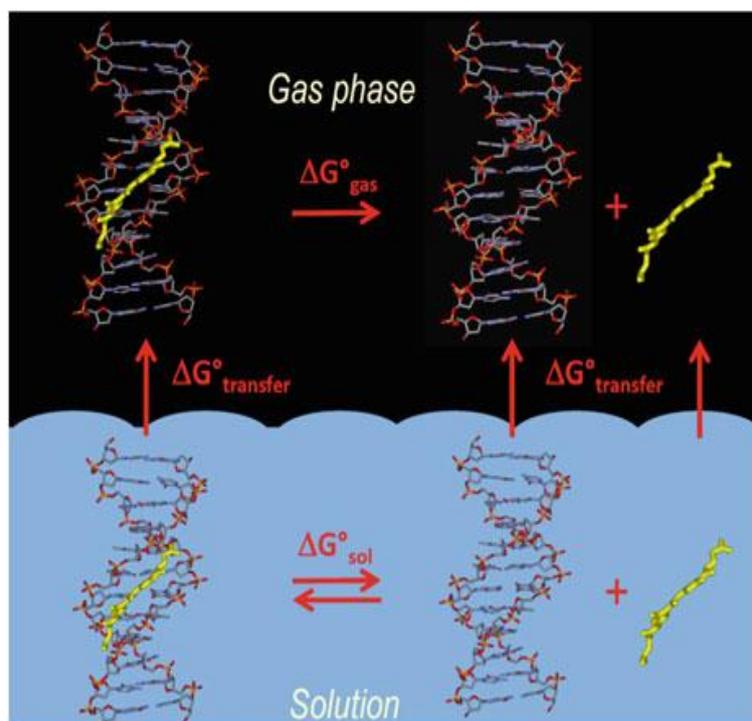
Las moléculas en solución, desde el punto de vista termodinámico se encuentran como un ensamble canónico, por lo que pueden intercambiar energía con el entorno, mientras que en fase gaseosa la energía del sistema se encuentra bien definida, pues las moléculas se consideran en un ensamble microcanónico que no intercambia energía con el entorno. La energía de una molécula dada es la suma de su energía traslacional, energía rotacional, energía vibracional, energía electrónica y energía nuclear, en consecuencia la distribución de la energía de una determinada molécula puede llevarse a cabo de diversas maneras.<sup>[47, 74,75,76]</sup>

La ventaja clave de los estudios en fase gaseosa es que cuando se tienen en cuenta todos los factores que contribuyen a la acumulación de energía interna o la disipación de la misma, podemos estudiar la estructura y la reactividad de un sistema energéticamente bien definido. Las colisiones, la absorción/emisión de fotones, la unión de electrones de energía cinética conocida, el desprendimiento de electrones cuya energía cinética se puede medir, y la fragmentación son fenómenos que están todos unidos por el principio de conservación de energía.<sup>[47]</sup> Con el conocimiento y control de todos los eventos que afectan la distribución de energía interna en moléculas o iones en la fase gaseosa, es posible estudiar la reactividad de biomoléculas aisladas con un alto nivel de detalle.

Como se mencionó anteriormente, algunas de las propiedades intrínsecas de los sistemas estudiados pueden ser enmascaradas por los efectos del solvente,<sup>[76]</sup> por lo tanto resulta de gran interés el estudio de sistemas aislados. En un enfoque

reduccionista, las interacciones pueden estudiarse una a la vez. Esto ha motivado durante mucho tiempo el estudio en fase gaseosa de las bases del ADN y los complejos que estas pueden formar. La filosofía del enfoque reduccionista consiste en que primero se deben comprender las propiedades de los bloques de construcción para sentar las bases de arquitecturas moleculares más complejas, y por lo tanto caracterizar las propiedades de las moléculas aisladas ayudará a comprender sus propiedades en entornos más complejos.<sup>[47]</sup>

En ese sentido, los estudios de sistemas aislados en fase gaseosa nos permiten una comparación directa con las simulaciones de la mecánica cuántica. De hecho, aislar los efectos del solvente de los efectos de interacciones puramente intermoleculares es un enfoque muy común para predecir las energías libres de interacción de las moléculas en general,<sup>[47]</sup> lo que implica la consideración de un ciclo termodinámico a fin de obtener las propiedades fisicoquímicas del sistema (Figura 1.9).



**Figura 1.9:** Ciclo termodinámico modelo. Se representa la unión de un ligando a una doble hélice canónica de ADN en ambas fases. Imagen tomada de la referencia [47].

La contribución de las diferencias en la energía libre de transferencia de cada componente generalmente se estima por la diferencia en el área de superficie

accesible al solvente (SASA) en cada componente, y este SASA calculado se escala bien con la contribución por solvatación a la energía libre de reacción en solución. Las interacciones intermoleculares, también llamadas interacciones intrínsecas, pueden calcularse mucho más fácilmente en la fase gaseosa que en solución, además las mediciones en fase gaseosa son la única forma de verificar esos cálculos experimentalmente.<sup>[42]</sup>

Adicionalmente, si la estructura de la fase gaseosa no ha cambiado demasiado en comparación con las estructuras que se forman en la solución de la que provienen o si los cambios se producen de manera predecible, en última instancia, es posible utilizar métodos en fase gaseosa para obtener información sobre la estructura de las especies presentes en la solución.

#### **1.4 Objetivos y organización de la tesis**

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados en las secciones anteriores, el objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar en fase gaseosa y desde un punto de vista reduccionista la interacción entre las bases del ADN mediada por cationes metálicos y  $H^+$ . Estos estudios tienen como propósito comprender los efectos de estas interacciones sobre las propiedades estructurales y de reactividad de las bases, que conducen a la formación de pares no canónicos, responsables de estabilizar los plegamientos no canónicos en el ADN. En consecuencia, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudiar el efecto de la protonación sobre las propiedades estructurales y de reactividad en el par CG.
- II. Evaluar el efecto de la sustitución del  $H^+$  por un catión monovalente ( $Ag^+$ ), sobre las propiedades estructurales del par CG.
- III. Estudiar la naturaleza de las interacciones entre un catión divalente ( $Ba^{2+}$ ) y C y evaluar el efecto sobre las propiedades de la C y su homodímero.

Este trabajo de tesis está estructurado en 6 capítulos. En el capítulo 1 se presentan algunas generalidades de los ácidos nucleicos, con énfasis en la estructura

y composición de los constituyentes del ADN y las consecuencias de la interacción de esta molécula con cationes.

En el capítulo 2 se presenta una descripción detallada de cada uno de los componentes que integran los dispositivos experimentales empleados en esta tesis para desarrollar los objetivos planteados, como así también de la metodología teórica empleada para contribuir a la interpretación de los resultados experimentales.

En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos del estudio en fase gaseosa del par protonado  $[\text{CGH}]^+$  en función del pH de la solución, mediante (MS/MS) acoplada a espectroscopia DMFIR.

En el capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos sobre la caracterización estructural de los agregados iónicos  $[\text{GAg}]^+$  y  $[\text{CGAg}]^+$ , utilizando la misma metodología experimental

En el capítulo 5 se aborda el estudio de la interacción entre C y  $\text{Ba}^{2+}$  y en particular la estructura y estabilidad de los complejos  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$ , mediante (MS/MS) acoplada a espectroscopia DMFIR.

Finalmente, en el capítulo 6 se integran las conclusiones obtenidas para cada sistema estudiado, a partir de las cuales se derivan algunas perspectivas de trabajo en sistemas relacionados.

---

---

## 1.5 Referencias

- [1]. Watson, J. D.; Crick, F. H. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nat.* 1953, 171, 737–738.
- [2]. Franklin, R.E.; Gosling, R. G. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nat.* 1953, 171, 740-741.
- [3]. Wilkins, M. H. F.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R. Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nat.* 1953, 171, 738-740.
- [4]. Elson, D.; Chargaff, E. On the desoxyribonucleic acid content of sea urchin gametes. *Experientia.* 1952, 8, 143-145.
- [5]. Diehl, A. G.; Boyle, A. P. Deciphering ENCODE. *Trends Genet.* 2016, 32, 238-249.
- [6]. Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarthy, M. 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.* 1944, 79:137, 158-164
- [7]. Neidle, S. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure.* Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [8]. Schneider, B.; Berman, H.M. BASICS OF NUCLEIC ACID STRUCTURE Concepts, Tools, and Archives. In J. Sponer y F. Lankas. *Computational Studies of RNA and DNA.* Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2006.
- [9]. Gelbin, A.; Schneider, B.; Clowney, L.; Hsieh, S. Olson, W. K.; Berman, H. M. Geometric Parameters in Nucleic Acids : Sugar and Phosphate Constituents. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118:519, 529,
- [10]. Haschemeyer, A.E.V.; Rich, A. Nucleoside conformations: an analysis of steric barriers to rotation about the glycosidic bond. *J. Mol. Biol.* 1967, 27, 369-384.

- [11]. Grasby, J.A.; Neidle, S. Blackburn, GM.; Gait, MJ.; Loakes, D.; Williams D.M, Egli, M.; Flavell, M.; Flavell, A.; Pyle, AM. (2006) In: Blackburn GM, Gait MJ, Loakes D, Williams DM (eds) *Nucleic acids in chemistry and biology*, 3rd edn. RSC Publishing.
- [12]. Sponer, J.; Sponer, J.E.; Mladek, A.; Jurecka, P.; Banas, P.; Otyepka, M. Nature and magnitude of aromatic base stacking in DNA and RNA: quantum chemistry, molecular mechanics, and experiment. *Biopol.* 2013, 99, 978–988.
- [13]. Dickerson, R.E.; Drew, H.R.; Conner, B.N.; Wing, R.M.; Fratini, A.V.; Kopka, M.L. The Anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science.* 1982, 216, 475-485.
- [14]. Quintana, J.R.; Grzeskowiak, K.; Yanagi, K.; Dickerson, R.E. Structure of a B-DNA decamer with a central T-A step: C-G-A-T-T-A-A-T-C-G. *J. Mol. Biol.* 1992, 225, 379-395.
- [15]. Wang, A.H.J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; Crawford, J.L.; van Boom, J.H.; van der Marel, G.A.; A Rich. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nat.* 1979, 282, 680-686.
- [16]. Wang, A.H.J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; Crawford, J.L.; van Boom, J.H.A Rich. Left-handed double helical DNA: variations in the backbone conformation. *Science.* 1981, 211, 171-176.
- [17]. Löwdin, P. O. Proton Tunneling in DNA and its Biological Implications. *Rev. Mod. Phys.* 1963, 35:724-732.
- [18]. Brovarets, O.O.; Hovorun, D.M. Tautomeric transition between wobble A·C DNA base mispair and Watson–Crick-like A·C\* mismatch: microstructural mechanism and biological significance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17, 15103-15110.
- [19]. Johannsen, S.; Megger, N.; Böhme, D.; Sigel, R.K.O.; Müller, J. Solution Structure of a DNA Double Helix With Consecutive Metal-Mediated Base Pairs. *Nat. Chem.* 2010, 2, 229-234.

- [20]. Pramanik, S.; K, Nakamura.; K, Usui.; Nakano, S.; Saxena, S.; Matsui, J.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N. Thermodynamic Stability of Hoogsteen and Watson–Crick Base Pairs in the Presence of Histone H3-Mimicking Peptide. *Chem. Commun.* 2011, 47, 2790–2792.
- [21]. Tateishi-Karimata, H.; Nakano, M.; Sugimoto, N. Comparable Stability of Hoogsteen and Watson–Crick Base Pairs in Ionic Liquid Choline Dihydrogen Phosphate. *Sci. Rep.* 2015, 4, 3593/1–3593/7.
- [22]. Hirao, I.; Kimoto, M.; Yamashige, R. Natural versus artificial creation of base pairs in DNA: origin of nucleobases from the perspectives of unnatural base pair studies. *Acc Chem Res.* 2012, 45(12), 2055-65.
- [23]. Miyake, Y.; Togashi, H.; Tashiro, M.; Yamaguchi, H.; Oda, S.; Kudo, M.; Tanaka, Y.; Kondo, Y.; Sawa, R.; Fujimoto, T.; Machinami, T. Mercury II -Mediated Formation of Thymine-HgII-Thymine Base Pairs in DNA Duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2172-2173.
- [24]. Takezawa, Y.; Shionoya, M. Metal-Mediated DNA Base Pairing: Alternatives to Hydrogen-Bonded Watson-Crick Base Pairs. *Acc. Chem. Res.* 2012, 45, 2066-2076.
- [25]. Hoogsteen, K. The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex Between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crystallogr.* 1963, 16, 907–916.
- [26]. Colominas, C.; Luque, F.J.; Orozco, M. Tautomerism and Protonation of Guanine and Cytosine. Implications in the Formation of Hydrogen-Bonded Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 6811-6821
- [27]. Han, S.Y.; Lee, S.H.; Chung, J.; Oh, H. B. Base-Pair Interactions in the Gas-Phase Proton-Bonded Complexes of C<sup>+</sup>G and C<sup>+</sup>GC. *J. Chem. Phys.* 2007, 127, 245102/1-245102/10.
- [28]. Megger, D.A.; Fonseca Guerra, C.; Bickelhaupt, F.M.; Müller, J. Silver(I)-mediated Hoogsteen-type base pairs. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105 (11), 398-404.

- [29]. Toshihiro, I.; Tatsuaki, I.; Norie, A.; Anthony, W.W.; Akinori, J. Silver Ion Unusually Stabilizes the Structure of a Parallel-Motif DNA Triplex. *J. Am. Chem Soc.* 2009, 131, 3826–3827
- [30]. Davis, J.T. G-quartets 40 years later: from 50-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew Chem Int Ed.* 2004, 43:668–698
- [31]. Gabelica, V.; Frederic, R.; De Pauw, E.; Lemaire, J.; Gillet, J-C.; Pouilly, J-C.; Lecomte, F.; Gregoire, G.; Schermann, J-P.; Desfrancois, C. Infrared Signature of DNA G-Quadruplexes in the Gas Phase *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, (6), 1810-1811
- [32]. Bugaut, A.; Murat, P.; Balasubramanian, S. An RNA Hairpin to G-Quadruplex Conformational Transition. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 19953–19956.
- [33]. Zhang, D.; Huang, T.; Lukeman, P. S.; Paukstelis, P.J. Crystal structure of a DNA/Ba<sup>2+</sup> G quadruplex containing a water-mediated C-tetrad. *Nucleic. Acids. Res.* 2014, 42(21), 13423-13429.
- [34]. Gueron, M.; Leroy, J.L The i-motif in nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol.* 2000, 10, 326–33.
- [35]. Gehring, K.; Leroy, J.-L.; Gueron, M. A Tetrameric DNA Structure with Protonated Cytosine Cytosine Base Pairs. *Nat.* 1993, 363, 561–565.
- [36]. Yang, B.; Rodgers, M.T.; 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.* 2013, 136, 282-290.
- [37]. Féraud, G.; Berdakin, M.; Dedonder, Claude.; Jovet, C.; Pino, G.A. Excited States of Proton-Bound DNA/RNA Base Homodimers: Pyrimidines. *J. Phys. Chem. B.* 2015, 119, 6, 2219-2228.
- [38]. Day, H. A.; Huguin, C.; Waller, Z. A. E. Silver Cations Fold I-Motif at Neutral pH. *Chem. Commun.* 2013, 49, 7696–7698.

- [39]. Berdakin, M.; Steinmetz, V.; Maitre, P.; Pino, G.A. Gas Phase Structure of Metal Mediated (Cytosine)<sub>2</sub>Ag<sup>+</sup> Mimics the Hemiprotonated (Cytosine)<sub>2</sub>H<sup>+</sup> Dimer in i-Motif Folding. *J. Phys. Chem. A.* 2014, 118, 3804–3809.
- [40]. Gao, J.; Berden, G.; Rodgers, M. T.; Oomens, J. Interaction of Cu<sup>+</sup> with cytosine and formation of i-motif-like C–M<sup>+</sup>–C complexes: alkali versus coinage metals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, 18, 7269–7277.
- [41]. Burda, J.V.; Šponer, J.; Hobza, P. Ab initio study of the interaction of guanine and adenine with various mono- and bivalent cations (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>; Cu<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Au<sup>+</sup>; Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>; Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Hg<sup>2+</sup>). *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 7250–7255.
- [42]. Srivastva, R. The role of proton transfer on mutation. *Front. Chem.* 2019, 7, 536–553
- [43]. Florián, J.; Leszczyński, J. Spontaneous DNA Mutations Induced by Proton Transfer in the Guanine·Cytosine Base Pairs: An Energetic Perspective. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 12, 3010–3017.
- [44]. Bertran, J.; Blancafort, L.; Noguera, M.; Sodupe, M. Proton Transfer in DNA Base Pairs. In *Computational Studies of RNA and DNA*; Sponer, J., Lankas, F., Eds.; Springer: The Netherlands, 2006.
- [45]. Rein, R.; Harris, F.E. Proton tunneling in radiation-induced mutation. *Science.* 1964, 146, 649–650.
- [46]. de Vries, M.S.; Nir, E.; Kleineremanns, K. Pairing of Isolated Nucleic-Acid Bases in the Absence of the DNA Backbone. *Nat.* 2000, 408, 949–951.
- [47]. Gabelica, V. Introduction: Nucleic Acids Structure, Function, and Why Studying Them In Vacuo, in V. Gabelica. *Nucleic Acids in the Gas Phase*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2014.
- [48]. Arnott, S.; Bond, P.J.; Selsing, E.; Smith, P. J.C. Models of triple-stranded polynucleotides with optimised stereochemistry. *Nucleic Acids Res.* 1976, 10, 2459–2470.

- [49]. Chandrasekaran, R.; Giacometti, A.; Arnott, S. Structure of poly (dT).poly (dA).poly (dT). *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2000, 17, 1011–1022.
- [50]. Chandrasekaran, R.; Giacometti, A.; Arnott, S. Structure of poly (U).poly (A).poly (U). *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2000, 17, 1023–1034.
- [51]. Shanmugam, G.; Kozekov, I. D.; Guengerich, F. P.; Rizzo, C. J.; Stone, M. P. Structure of the 1,N2-ethenodeoxyguanosine adduct opposite cytosine in duplex DNA: Hoogsteen base pairing at pH 5.2. *Chem. Res. Toxicol.* 2008, 21, 1795–1805.
- [52]. Kitayner, M.; Rozenberg, H.; Rohs, R.; Suad, O.; Rabinovich, D.; Honig, B.; Shakked, Z. Diversity in DNA recognition by p53 revealed by crystal structures with Hoogsteen base pairs. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2010, 17, 423–429.
- [53]. Gacy, A. M.; Goellner, G. M.; Spiro, C.; Chen, X.; Gupta, G.; Bradbury, E. M.; Dyer, R. B.; Mikesell, M. J.; Yao, J. Z.; Johnson, A. J.; Richter, A.; Melancon, S. B.; McMurray, C. T. GAA Instability in Friedreich's Ataxia Shares a Common, DNA-Directed and Intraallelic Mechanism with Other Trinucleotide. Diseases. *Mol. Cell.* 1998, 1, 583–593.
- [54]. Mirkin, S.M. Expandable DNA Repeats and Human Disease. *Nat.* 2007, 447, 932–940
- [55]. Nikolova, E. N.; Kim, E.; Wise, A. A.; O'Brien, P. J.; Andricioaei, I.; Al-Hashimi, H. M. Transient Hoogsteen base pairs in canonical duplex DNA. *Nat.* 2011, 470, 498.
- [56]. Ivey, H. S.; Gottardo, F. L.; Nikolova, E. N.; Al-Hashimi, H. M. Widespread Transient Hoogsteen Base Pairs in Canonical Duplex DNA with Variable Energetics. *Nat. Commun.* 2014, 5, 4786/1–4786/8.
- [57]. Nikolova, E.N.; Gottardo, F.L.; Al-Hashimi, H.M. Probing Transient Hoogsteen Hydrogen Bonds in Canonical Duplex DNA Using NMR Relaxation Dispersion and Single-Atom Substitution. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 3667–3670.
- [58]. Jain, A.; Wang, G.; Vasquez, M.K. DNA triple helices: Biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie.* 2018, 148, 139-155

- [59]. Brázdová, M.; Tichý, V.; Helma, R.; Bažantová, P.; Polášková, A.; Krejčí, A.; Petr, M.; Navrátilová, L.; Tichá, O.; Nejedlý, K.; Bennink, M.L.; Subramaniam, V.; Bábková, Z.; Martínek, T.; Lexa, M.; Adámik, M. p53 Specifically Binds Triplex DNA In Vitro and in Cells. *PLoS ONE*. 2011, 11(12): 167439/1-167439/25
- [60]. Buske, F.A.; Mattick, J.S.; Bailey, T.L. Potential in vivo roles of nucleic acid triple-helices. *RNA Biology*. 2011, 8, 3, 427-439.
- [61]. Shi, L.; Peng, P.; Du, Y.; Li, T. Programmable i-motif DNA folding topology for a pH-switched reversible molecular sensing device. *Nucleic Acids Res*. 2017, 45(8), 4306–4314.
- [62]. Idili, A.; Vallée-Bélisle, A.; Ricci, F. Programmable pH-Triggered DNA Nanoswitches. *J. Am. Chem. Soc*. 2014, 136, 16, 5836-5839.
- [63]. Chandrasekaran, A.R.; Zavala, J.; Halvorsen, K. Programmable DNA Nanoswitches for Detection of Nucleic Acid Sequences. *ACS Sens*. 2016, 1(2), 120–123.
- [64]. Lieblein, A.L.; Krämer, M.; Dreuw, A.; Fürtig, Boris.; Schwalbe, H. The Nature of Hydrogen Bonds in Cytidine...H<sup>+</sup>...Cytidine DNA Base Pairs. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2012, 51, 4067 –4070
- [65]. Langley, D.B.; Schofield, P.; Moye, A.L.; Rouet, R.; Hughes, W.E.; Bryan, T.M.; Dinger, M.E.; Christ, D. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nat. Chem*. 2018, 10, 631-637
- [66]. Parkinson, G.N.; Lee, M.P.H.; Neidle, S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nat*. 2002, 417, 876–880.
- [67]. Wells, R.D. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem Sci*. 2007, 32, 271–278.
- [68]. Subhajyoti, D.; Michor, F. DNA secondary structures and epigenetic determinants of cancer genome evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2011, 18, 950–955.
- [69]. Sarkies, P.; Reams C.; Simpson, L.J.; Sale, J.E. Epigenetic instability due to defective replication of structured DNA. *Mol Cell*. 2010, 40, 703–713.

[70]. De Cian, A.; Lacroix, L.; Douarre, C.; Temime-Smaali, N.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L. Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie*. 2008, 90, 131-140.

[71]. Paeschke, K.; Simonsson, T.; Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H. J. Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nat Struct Mol Biol*. 2005, 12, 847-860.

[72]. Arthanari, H.; Bolton, P. H. Functional and dysfunctional roles of quadruplex DNA in cells. *Chem. Biol*. 2001, 8, 221-228.

[73]. Neidle, S. The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2009, 19, 239-250.

[74]. Dunbar, R.C.; McMahon, T.B. Activation of unimolecular reactions by ambient blackbody radiation. *Science*. 1998, 279, 194–197.

[75]. Vékey, K. Internal energy effects in mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom*. 1996, 31, 445–463.

[76]. Hashem, Y.A.P. Nucleic acid solvation: from outside to insight. *Curr Opin Struct Biol*. 2007, 17,325–333.



# **Capítulo 2**

---

## **Fundamentos y Metodología**

---



El desarrollo de este trabajo de tesis implica la aplicación de diversas técnicas basadas principalmente en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) acopladas a espectroscopía de Disociación Multifotónica IR (DMFIR), lo que nos permite en principio obtener información detallada a nivel molecular de la naturaleza de las interacciones entre las bases del ADN y cationes (metálicos y/o protón). El complemento de las técnicas anteriormente mencionadas con cálculos de estructura electrónica nos permite realizar la caracterización estructural de los complejos iónicos entre las bases y dichos cationes.

La espectroscopia de DMFIR se basa en la fragmentación de los iones aislados en fase gaseosa, a partir de la absorción de múltiples fotones de radiación IR de alta potencia. Las intensidades de los fragmentos producidos como consecuencia de la DMFIR y la de los iones padres remanentes son monitoreadas mediante espectrometría de masas. Por tal motivo, en el presente capítulo se describen los fundamentos y principios de funcionamiento de las partes que constituyen los espectrómetros de masas empleados en este trabajo, así como también los esquemas experimentales. Además, se hace una breve revisión de los fundamentos que subyacen la espectroscopia DMFIR y se describen los láseres IR empleados. Finalmente, se presenta una breve descripción de los métodos de cálculo utilizados para determinar las estructuras de los complejos iónicos estudiados.

## **2.1 Espectrometría de masas: Descripción general**

La espectrometría de masas (MS) representa una herramienta muy eficiente y versátil al momento de obtener información a nivel estructural en diversas áreas de la química. La MS ha desempeñado un papel cada vez más importante en las ciencias químicas, gracias al desarrollo que se ha alcanzado en las metodologías de vaporización e ionización suave, análisis de masas y detección, que le confieren a la técnica una alta sensibilidad y precisión, lo que permite que la MS tenga una amplia gama de aplicaciones, particularmente en el estudio de sistemas con relevancia biológica. Existen en la actualidad una gran cantidad de aplicaciones de la MS, desde el estudio de sistemas biológicos<sup>[1-4]</sup> hasta la detección y cuantificación de contaminantes presentes en el ambiente.<sup>[5,6]</sup> En ese sentido, la MS es ampliamente utilizada para la secuenciación de aminoácidos en proteínas<sup>[7,8]</sup> y caracterización de ácidos nucleicos.<sup>[9,10]</sup>

El diseño básico de un espectrómetro de masas consta de tres componentes principales: La fuente de iones, un analizador de masas y un detector, los cuales se describirán por separado en las siguientes secciones. Los analizadores de masas son operados frecuentemente en condiciones de alto vacío de manera que la trayectoria de los iones no se vea perturbada por colisiones no deseadas.

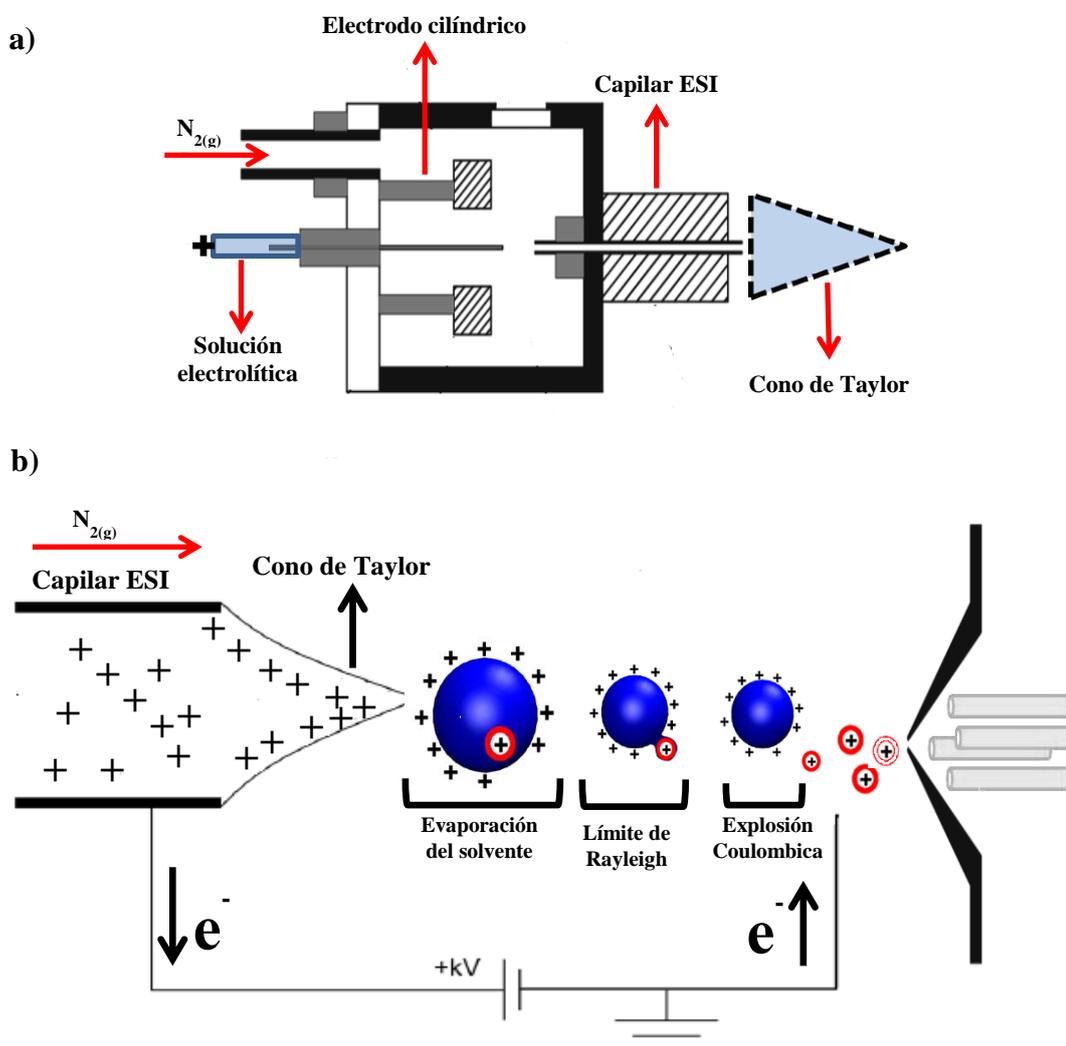
### **2.5 Fuente de Iones: Ionización por Electrospray (ESI)**

La ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés) representa una fuente de iones versátil y eficiente, de manera que su desarrollo ha permitido estudiar sistemas de relevancia a nivel biológico mediante MS,<sup>[12]</sup> por lo que en el año 2002 fue galardonado con el nobel de química John B. Fenn<sup>[13]</sup>, junto a K. Tanaka y K. Wüthrich, quienes desarrollaron la técnica de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI). ESI se considera un método de ionización suave, por lo que es posible generar iones en fase gaseosa altamente cargados, conservando las propiedades estructurales de las especies que se forman en solución. La ionización por ESI permite vaporizar especies poco volátiles y térmicamente lábiles<sup>[12,14]</sup> que van desde especies orgánicas e inorgánicas, hasta macromoléculas<sup>[15]</sup> y complejos formados por interacciones no covalentes.<sup>[16]</sup>

En la Figura 2.1a se muestra un esquema básico de una fuente ESI con flujo de gas coaxial. En términos generales por ESI los iones se crean al cargar eléctricamente una corriente de una solución electrolítica que contiene el analito de interés, que a su vez fluye a través de un capilar a presión atmosférica, lo que resulta en la emisión de iones moleculares producto de la vaporización del solvente en las gotas altamente cargadas que se forman; la solución electrolítica que contiene el analito de interés se infunde a través de una jeringa hacia un capilar metálico, a velocidades entre uno y varios cientos de  $\mu\text{L min}^{-1}$ . La aguja se fija a un potencial eléctrico de entre 2 y 5 kV con respecto a un electrodo cilíndrico que la rodea, lo que conduce a la formación de un fino roció de gotas altamente cargadas (cono de Taylor), por la acción de los altos campos eléctricos, que además permiten superar las fuerzas de tensión superficial del líquido y emitir gotas altamente cargadas.

### 2.2.1 Mecanismo de generación de iones en fase gaseosa por ESI

El mecanismo por el cual se generan los iones se puede dividir en tres etapas: formación del rocío de gotas altamente cargadas (cono de Taylor), reducción del tamaño de las gotas y por último la evaporación completa del solvente, que produce iones libres en fase gaseosa (Figura 2.1b). Para el proceso de formación del cono de Taylor, los iones presentes en la solución se mueven por la acción de un contraelectrodo hacia la punta de la aguja, donde se acumulan y se forman gotas altamente cargadas que contienen el analito de interés.



**Figura 2.1:** Fuente de iones. a) Esquema básico de una fuente ESI, b) Esquema general del proceso de formación de iones en fase gaseosa por ESI, en modo positivo.

El proceso de reducción del tamaño de las gotas se inicia en el cono de Taylor, que se encuentra a la salida del capilar, por la expansión de las gotas contra una

corriente de  $N_2$  seco donde la evaporación del solvente puede ocurrir por el calentamiento en el módulo que contiene el capilar, o por colisiones con el  $N_2$  seco (Figura 2.1). A medida que se evapora el solvente las gotas adquieren una mayor densidad de carga (alrededor de  $10^6 \text{ V m}^{-1}$ ), lo que permite superar las fuerzas de tensión superficial del líquido y emitir gotas altamente cargadas (límite Rayleigh).<sup>[17]</sup> Las gotas en el límite de Rayleigh producen sucesivamente gotas de menor tamaño y altamente cargadas a través de *explosiones Coulómbicas*. Los eventos repetidos de evaporación/*explosión* finalmente producen pequeñas gotas con radios de unos pocos nanómetros.

En la actualidad aún se debate sobre cuál es el mecanismo que mejor representa la forma en que se obtienen los iones en fase gaseosa por la desolvatación de las gotas altamente cargadas. Recientemente, Konermann *et. al.*<sup>[18]</sup> presentaron una revisión de los mecanismos por los cuales se forman los iones en fase gaseosa. Los analitos de bajo peso molecular siguen el modelo de evaporación de iones (IEM, por sus siglas en inglés), mientras que el modelo de residuo cargado (CRM, por sus siglas en inglés) se aplica a especies más grandes.<sup>[18]</sup> Las especies estudiadas en el presente trabajo de tesis no exceden las 500 u.m.a, por lo que en adelante se hará referencia al IEM.<sup>[19]</sup> En este modelo, el aumento en la densidad de carga superficial como resultado de la evaporación del solvente produce una repulsión de Coulomb que excede la adhesión de la especie cargada a la superficie de la gota y, por lo tanto, algunos iones son expulsados de la superficie.<sup>[20,21]</sup> Finalmente, los iones libres de solvente son transferidos al analizador de masas a través de un colimador y una serie de lentes electrostáticas.

### **2.3 Analizadores de masas: Multipolos lineales, celdas de colisión y trampas iónicas.**

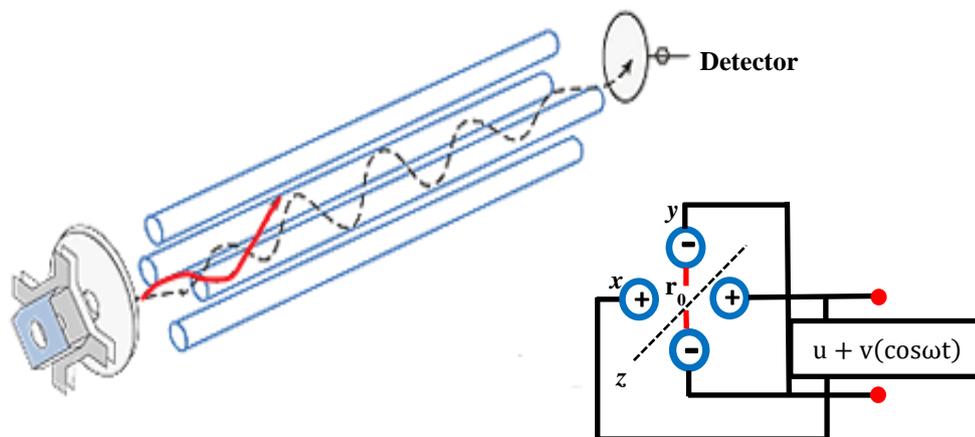
Durante el desarrollo de esta tesis se emplearon diferentes arreglos experimentales, compuestos por diversos analizadores de masas, los cuales son descritos en detalle a continuación.

### 2.3.1 Multipolos lineales: Cuadrupolo lineal

El analizador de cuadrupolo lineal se considera un instrumento dinámico, pues las trayectorias de los iones están influenciadas por un conjunto de fuerzas dinámicas dependientes del tiempo. De manera que, de acuerdo a la estabilidad en las trayectorias de los iones que se mueven a través de campos eléctricos oscilantes es posible separar los iones según sus relaciones  $m/z$ .

Un cuadrupolo lineal está constituido por cuatro electrodos cilíndricos o hiperbólicos, dispuestos de forma colineal en el eje  $z$ , a lo largo del cual los iones se mueven por la acción de campos eléctricos (Figura 2.2). A cada par de electrodos se les aplica un potencial eléctrico ( $\Phi_0$ ) que está compuesto por una fase continua ( $U$ ) y una fase alterna de radiofrecuencia ( $V$ ) con una frecuencia  $\omega$ , de forma tal que el potencial total aplicado ( $\Phi_0$ ) puede escribirse como:

$$\Phi_0 = U + V \cos(\omega t) \quad \text{Donde } t = \text{tiempo} \quad (2.1)$$



**Figura 2.2:** Esquema de un cuadrupolo lineal, en el que se indican los ejes de coordenadas  $(x,y,z)$ , radio la circunferencia interna del cuadrupolo y los pares de electrodos conectados al mismo potencial.

Los iones acelerados a lo largo del eje  $z$  entran en el espacio entre los electrodos, manteniendo su velocidad a lo largo de este eje. Así, los iones que se mueven en el eje  $z$  experimentan fuerzas atractivas y repulsivas de acuerdo a su carga; los iones de carga opuesta son atraídos hacia los electrodos, mientras que los de igual carga son repelidos. Bajo este principio, los iones pueden recorrer todo el cuadrupolo sin colisionar contra los electrodos, siempre que durante el trayecto a lo

largo el eje  $z$  la amplitud del movimiento de los iones sea menor que  $2r_0$  (donde  $r_0$  es el radio de la circunferencia interna del cuadrupolo).<sup>[11]</sup>

El movimiento de los iones al interior del dispositivo cuadrupolar es descrito mediante la solución de las ecuaciones del movimiento (2.2 y 2.3) comúnmente denominadas como ecuaciones de Mathieu,<sup>[22]</sup> que han sido tratadas en detalle,<sup>[23,24]</sup> por lo que su desarrollo no se discutirá aquí. Las ecuaciones relevantes se presentan de forma resumida a continuación:

$$\frac{d^2x}{d\tau^2} + (a_x + 2q_x \cos(2\tau))x = 0 \quad (2.2)$$

$$\frac{d^2y}{d\tau^2} + (a_y + 2q_y \cos(2\tau))y = 0 \quad (2.3)$$

$$\text{Donde } \tau = \frac{\omega t}{2}$$

Donde los parámetros de atrapamiento de Mathieu  $a$  y  $q$  son dependientes de la relación  $m/z$  del ión y de las condiciones experimentales de  $U$ ,  $V$  y  $\omega$ . Estos parámetros se obtienen a partir de las ecuaciones (2.4) y (2.5).

$$a_x = -a_y = \frac{4eU}{mr_0^2 \omega^2} \quad (2.4)$$

$$q_x = -q_y = \frac{2eV}{mr_0^2 \omega^2} \quad (2.5)$$

De manera que para unas determinadas condiciones de  $U$ ,  $V$  y  $\omega$ , la trayectoria de los iones de determinada  $m/z$  será estable a lo largo del eje  $z$  hasta llegar al detector o pasar hacia otro analizador de masas en el caso de arreglos experimentales de espectrometría de masas en tándem.

Los fundamentos y el principio de funcionamiento de los multipolos lineales de mayor orden (hexapolos, octápolos) han sido ampliamente revisados<sup>[24]</sup> y en términos generales resultan similares a los descritos anteriormente para el multipolo cuadrupolar. Sin embargo, solo los cuadrupolo lineales pueden ser empleados como filtros de masas para aislar un ion en específico.

### 2.3.2 Trampas Iónicas y Celdas de Colisión

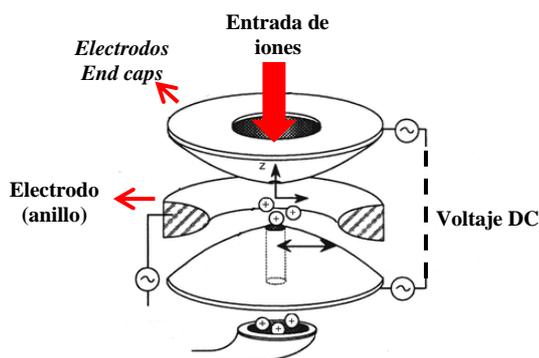
El principio del funcionamiento de una trampa iónica se basa en la superposición de la fase continua ( $U$ ) y la fase alterna ( $V$ ) que componen el potencial

eléctrico ( $\Phi$ ) que se aplica sobre las trampas, por lo que las trayectorias de los iones de un amplio rango de relaciones  $m/z$  son estabilizadas. Los iones son confinados a lo largo del eje  $z$  por la acción de un par de electrodos de alto voltaje que se ubican a la entrada y la salida del multipolo, los cuales crean un pozo de energía potencial en el que los iones quedan atrapados.

Si se hace ingresar un gas inerte (generalmente Ar o He) a la trampa iónica, ésta funciona como celda de colisión, pues el ion aislado puede ser termalizado y/o fragmentado por disociación inducida por colisiones con el gas (CID, del inglés collision-induced-dissociation), en función de la energía de colisión, que a su vez es un parámetro que depende del potencial de la radiofrecuencia (RF). Adicionalmente, las trampas iónicas y/o celdas de colisión pueden ser modificadas, de manera que se pueda hacer ingresar una fuente de radiación que, luego de la absorción de fotones por parte del ion atrapado se produce su fragmentación. Seguir los canales de fragmentación del ión en función de la energía de los fotones, constituye uno de los desarrollos más destacados de la espectroscopia moderna y se discute en detalle más adelante.

### 2.3.2.1 Trampa Iónica Cuadrupolar (QIT)

Las trampas iónicas cuadrupolares de tipo Paul (QIT)<sup>[26-28]</sup> están constituidas por un electrodo angular, y dos electrodos hiperbólicos ubicados a la entrada y la salida del multipolo como se esquematiza en la Figura 2.3.



**Figura 2.3:** Esquema de una trampa iónica Cuadrupolar (QIT-3D)

De manera similar al funcionamiento de un cuadrupolo lineal, a la QIT se le aplica un potencial eléctrico ( $\Phi$ ) compuesto por una fase continua ( $U$ ) y una fase

alterna (V). La superposición de U con V, produce un campo cuadrupolar tridimensional (3D) en el que los iones de un amplio intervalo de relaciones  $m/z$  quedan atrapados en una trayectoria estable de 3D. Así los iones pueden quedar atrapados durante un largo período de tiempo.<sup>[27]</sup>

Al igual que en los multipolos lineales, la solución de las ecuaciones de Mathieu permiten determinar las condiciones en las que los iones de una determinada relación  $m/z$  presentan trayectorias estables. Sin embargo, en la QIT el movimiento de los iones bajo la influencia de los potenciales aplicados ocurre en tres dimensiones,  $x$ ,  $y$ , y  $z$ . Pero gracias a la simetría cilíndrica de la trampa ( $x^2+y^2 = r^2$ ) las ecuaciones pueden ser expresadas en coordenadas  $z$  y  $r$ . Las ecuaciones del movimiento dentro de la QIT son similares a las encontradas para el cuadrupolo lineal (ecuaciones 2.2 y 2.3).

Por otro lado, la QIT puede ser configurada para ser empleada como un espectrómetro de masas de amplio rango y alta resolución. En este tipo de espectrómetros se pueden producir trayectorias estables para iones de una determinada relación  $m/z$ , en función de los parámetros U, V,  $\omega$  y  $\Omega$  (donde  $\omega$  y  $\Omega$  corresponden a la frecuencia del campo RF, de los electrodos hiperbólicos y el anillo, respectivamente). Los iones que presenten trayectorias inestables colisionaran con los electrodos o serán expulsados de la trampa en forma aleatoria. En efecto, una QIT puede ser empleada como analizador de masas de diversas maneras. A continuación se describen brevemente los procedimientos más usados y que tienen una relación directa con los experimentos realizados en el presente trabajo de tesis.

### ❖ **Análisis de masas por eyección de iones en el límite de estabilidad:**

En este caso, todo el intervalo de  $m/z$  de interés se encuentra confinado en la QIT, luego se anula el potencial de los electrodos ubicados a la entrada y a la salida del multipolo 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 relación  $m/z$  a partir de los parámetros de Mathieu para la QIT, que se detallan brevemente a continuación. En ausencia de voltaje de la fase continua (U), el parámetro  $a_z = 0$

(ver la ecuación 2.4, análoga para la QIT), mientras que el parámetro  $q_z$  para una QIT está dado por la ecuación 2.6

$$q_z = \frac{8zeV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2} \quad (2.6)$$

$$\beta_z = \sqrt{a_z + \frac{q_z^2}{2}} \quad \text{Donde } \beta_z = \text{Parámetro de estabilidad} \quad (2.7)$$

Dado que la frecuencia  $\omega$  es un valor fijo,  $r_0$  y  $z_0$  son constantes que dependen del diseño de la QIT, de acuerdo a la ecuación 2.6  $q_z$  aumentará con el incremento de  $V$  y disminuirá con el aumento  $m$ . Se ha establecido que si  $q_z$  alcanza un valor de 1,408, el ión alcanza el límite de estabilidad (Aproximadamente 1,0). Una vez alcanzado este límite, un ligero aumento de  $V$  hará que este ion tenga una trayectoria inestable, y será expulsado de la trampa en la dirección del eje  $z$ , lo que permite analizar los iones presentes en la trampa.

#### ❖ **Análisis de masas por eyección resonante:**

En una trampa ideal, el movimiento de los iones en el plano radial que contiene al anillo y en el plano axial que contiene los electrodos hiperbólicos, ubicados a la entrada y la salida del multipolo, pueden considerarse mutuamente independientes; cada uno con una frecuencia característica asociada a la relación  $m/z$  del ion. La aplicación de un campo de RF con una frecuencia resonante con el movimiento axial de los iones produce la eyección de éstos.

Si consideramos que la frecuencia secular a la que oscila un ion en la trampa 3D está dada por la ecuación 2.8, y como el valor máximo que puede alcanzar  $\beta$  para una trayectoria estable es 1,0, la frecuencia secular máxima de un ion será la mitad de la frecuencia fundamental.

$$f_z = \frac{\beta_z v}{2} \quad (2.8)$$

Donde  $v$ : Frecuencia fundamental para un determinado ion

Como se mencionó anteriormente el parámetro de estabilidad  $\beta_z$  incrementa a medida que  $q_z$  incrementa, por lo que es posible calcular el valor de  $V$  (ecuación 2.6)

que se aplicará para que los iones de una determinada relación  $m/z$  oscilen a una frecuencia seleccionada. Si se aplica un voltaje de RF con una frecuencia  $f_z$  a los electrodos ubicados a la entrada y salida del multipolo, los iones resonarán a lo largo del eje  $z$  incrementando la amplitud de sus oscilaciones. Si la amplitud del campo de RF aplicado es suficiente, las oscilaciones del ion serán tan grandes que sus trayectorias se verán desestabilizadas y los iones serán expulsados de la QIT. Así para obtener el espectro de masa se escanea la amplitud de la RF de manera que los iones puedan ser eyectados secuencialmente de la trampa.

El empleo de la QIT como una trampa de iones, permite confinar al interior de ésta un ion con una determinada relación  $m/z$ . Ahora los iones aislados y atrapados en la QIT (durante el tiempo necesario para estudiar el ion de interés), pueden ser analizados por diferentes metodologías que entre las más ampliamente usadas se encuentran: disociación inducida por colisiones (CID)<sup>[29]</sup> y disociación inducida por fotones (PID del inglés photo-induced-dissociation) con láseres de alta potencia (UV y/o IR). Los fragmentos generados por CID o PID pueden ser analizados en la misma QIT como se describió en la sección anterior, o pueden ser expulsados por la aplicación de un campo (U) en los electrodos y transferidos hacia un segundo analizador de masas, donde pueden ser caracterizados los iones/fragmentos que se producen luego de excitar al ion.

### **2.3.2.2 Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (FT-ICR)**

El espectrómetro de masas de Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (FT-ICR) ofrece el mayor poder de resolución y precisión de masas entre todos los tipos de espectrómetros que se pueden encontrar actualmente en el mercado.<sup>[30,31]</sup> El espectrómetro de masas FT-ICR está constituido principalmente por una trampa de iones (tipo Penning), un imán que crea un campo magnético dentro de la trampa, un sistema de formación y transporte de iones al interior de la trampa, y finalmente el sistema de detección y análisis de datos. El componente principal de un espectrómetro de masas FT-ICR corresponde a la trampa iónica de tipo Penning (ICR) en la cual los iones son analizados en función de su frecuencia de rotación producida por la acción de un campo magnético (frecuencia

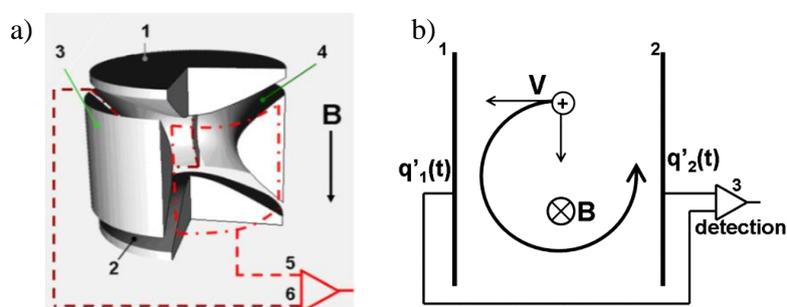
ciclotrónica).<sup>[32]</sup> En los espectrómetros FT-ICR modernos, se utilizan imanes superconductores para crear un campo magnético de alta intensidad .

La espectrometría de masas FT-ICR se fundamenta en la ley de Lorentz, que establece que los iones que se mueven en un campo magnético homogéneo  $B$  experimentan una fuerza que es perpendicular a su velocidad ( $v$ ). Así, los iones que ingresan a la celda ICR interactúan con el campo  $B$  que se encuentra en dirección perpendicular a la trayectoria inicial de los iones, los cuales giran con fases arbitrarias en el plano perpendicular a dicho campo con frecuencias cercanas a la frecuencia del ciclotrón. El movimiento de los iones a través del campo magnético  $B$  describe una trayectoria circular de radio  $r_m$  (descrito por la ecuación 2.9) debida a las fuerzas de Lorentz. A partir del  $r_m$  de los iones se puede obtener la frecuencia del ciclotrón ( $\omega$ ), descrita por la ecuación 2.10.

$$r_m = \frac{mv}{qB} \quad \text{Donde } q = ze \quad (2.9)$$

$$\omega = \frac{zeB}{m} \quad (2.10)$$

Por lo tanto, el movimiento de los iones en el interior de una celda ICR depende solo de la relación  $m/z$  de cada ion y de la fuerza del campo magnético  $B$ , que se mantiene constante. En función de los parámetros anteriormente descritos los iones pueden ser atrapados, analizados y detectados en la celda ICR, que está constituida por tres pares de electrodos, que junto con el campo magnético se utilizan para atrapar, excitar y detectar los iones (Figura 2.4).



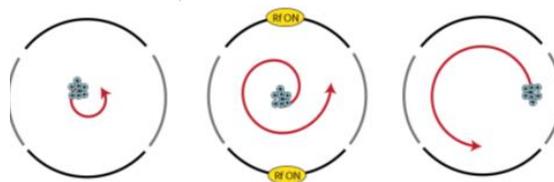
**Figura 2.4:** a) Esquema general de una celda ICR hiperbólica; 1 y 2 electrodos de captura, 3 y 4 electrodos de excitación, 5 y 6 electrodos de detección b) Principio de la medición de la señal en una celda ICR;  $q'_1(t)$  y  $q'_2(t)$  carga de imagen inducida por los iones

Los iones son atrapados en la celda ICR mediante una combinación de campos magnéticos y eléctricos. De manera que los iones que ingresan a la celda y experimentan el fuerte campo magnético  $B$ , quedan atrapados en la dirección radial. Para evitar que los iones se muevan libremente en la dirección axial (fuera de la celda), se aplica un pequeño potencial eléctrico a dos electrodos de captura en cada extremo de la trampa (electrodos 1 y 2, Figura 2.4a). Esto atrapa a los iones dentro de la celda, donde teóricamente podrían almacenarse indefinidamente.<sup>[32]</sup>

El análisis de los iones de acuerdo a su relación  $m/z$  (ecuación 2.10), se realiza mediante la medición de la frecuencia ciclotrónica ( $\omega$ ), la cual es específica para cada ion. Inicialmente, los iones atrapados, compuestos por un amplio rango de relaciones  $m/z$ , tienen una pequeña cantidad de energía cinética y describen trayectorias de pequeños radios de giro ciclotrón. La excitación de los iones a un radio de ciclotrón más grande los acerca lo suficiente a los electrodos de detección, por lo que los iones pueden ser detectados.

Los procesos de excitación y detección de los iones ocurren de manera sincronizada y se detallan a continuación:

La excitación de los iones se lleva a cabo mediante la aplicación de una onda de RF a las placas de excitación de la celda ICR (electrodos 3 y 4, Figura 2.4a). Cuando la frecuencia de la señal de RF está en resonancia con la frecuencia ciclotrónica de un ion con una determinada relación  $m/z$ , éstos son acelerados y por tanto se produce un aumento en el radio de giro, dando como resultado un movimiento en forma de espiral, tal como se observa en la Figura 2.5.<sup>[33-35]</sup> Los iones cuya frecuencia de ciclotrón es diferente de la RF aplicada no se ven afectados y permanecen en el centro de la celda. Al escanear la RF, es posible excitar simultáneamente todos los diferentes iones dentro de la celda. Cuando se apaga la señal de RF, la excitación se completa y los iones permanecerán en un radio de giro detectable. Luego de producirse la excitación se registra el decaimiento de corriente producido en el par de electrodos detectores durante un periodo de tiempo (Figura 2.4b).



**Figura 2.5:** Eventos de excitación en la celda del analizador ICR.

La detección de los iones dentro de la celda ICR, se basa en la medición de la carga imagen que los mismos generan al moverse cerca de los electrodos de detección (5 y 6 Figura 2.4a).<sup>[36]</sup> La carga imagen es una corriente alterna entre las dos placas de detección que es inducida por cada paquete de iones individual al pasar repetidamente a su frecuencia ciclotrónica característica. La señal se amplifica y se almacena en la computadora como una función de respuesta a la corriente en el dominio del tiempo, denominada decaimiento de inducción libre (FID, por sus siglas en inglés). La señal se convierte al dominio de las frecuencias por la aplicación de la transformada de Fourier.<sup>[37]</sup> Finalmente, las frecuencias obtenidas son características de cada ion de acuerdo a su relación de  $m/z$ , según la ecuación 2.10, de manera que las frecuencias son convertidas a relaciones de  $m/z$ .

Por otro lado, la celda ICR puede ser configurada como una trampa de iones, en la cual se pueden aislar iones de una única relación  $m/z$  y confinarlos por el tiempo necesario para ser analizados por diferentes metodologías. El procedimiento se basa en la aplicación de una onda de RF a los electrodos de excitación, lo suficientemente grande para excitar los iones que no sean de interés, hasta que alcanzan un radio de ciclotrón superior a las dimensiones de la celda ICR donde colisionarán con uno de los electrodos de detección y posteriormente se neutralizarán, dejando solo iones de interés dentro de la celda.

## 2.4 Espectrometría de movilidad iónica diferencial (DIMS)

La espectrometría de movilidad iónica diferencial (DIMS, por sus siglas en inglés), representa una herramienta muy eficiente para identificar y separar mezclas de isómeros. A diferencia de las técnicas de espectrometría de movilidad iónica (IMS), en las cuales los iones son separados en función de su sección eficaz de colisión con moléculas de gas en campos eléctricos bajos, en DIMS los iones son separados en función de su movilidad iónica diferencial en campos eléctricos

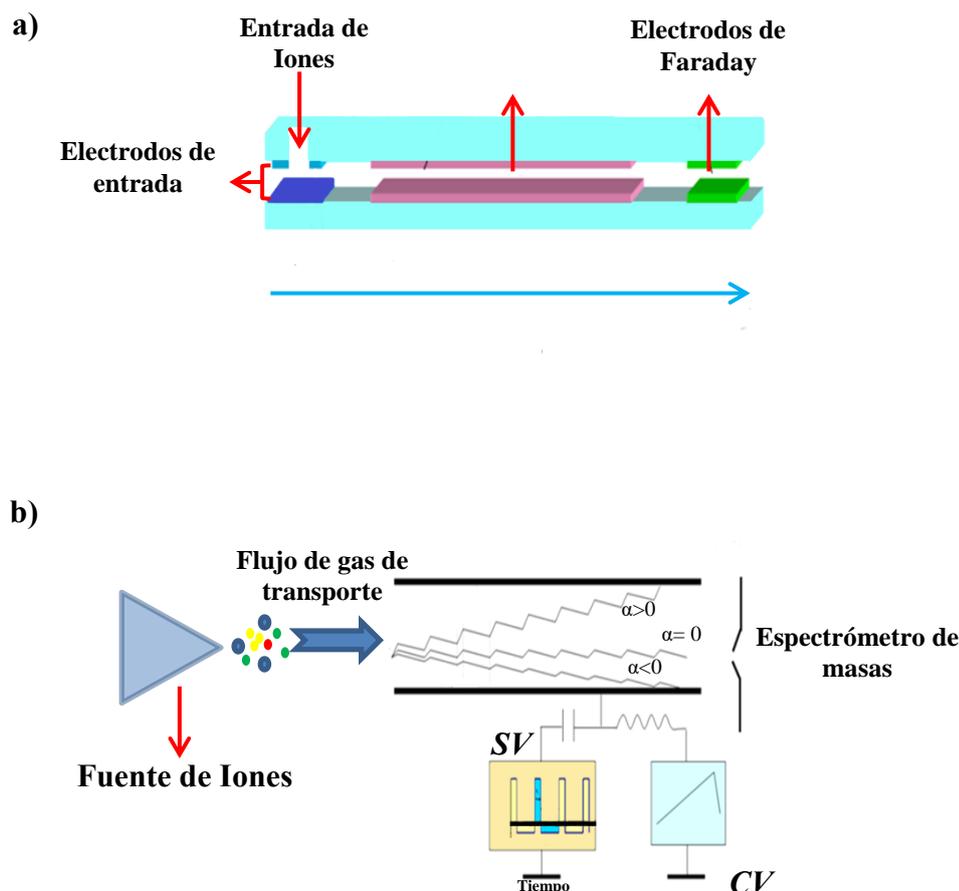
alternos bajos y altos. La separación de los iones se basa en la relación no lineal que existe entre la movilidad de los iones y el campo eléctrico. A su vez, la movilidad diferencial de un ion depende de una serie de propiedades fisicoquímicas que incluyen la masa, la forma, el centro de masa, el momento dipolar y los efectos de la formación de agregados moleculares por la interacción entre iones y moléculas de gas neutro durante el proceso de separación.<sup>[37]</sup>

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se empleó DIMS acoplada a MS/MS para identificar y separar la mezcla de isómeros que se forma por la interacción entre las bases C y G con H<sup>+</sup> (Capítulo 3), por lo que a continuación se presenta una breve descripción de los principios fisicoquímicos que subyacen a la técnica.

La separación de los iones por DIMS ocurre en un espacio entre dos electrodos planos aislados eléctricamente, dispuestos de forma paralela, como se muestra en la Figura 2.6. En una de las configuraciones que puede adoptar DIMS (Figura 2.6a), los iones que atraviesan el espacio entre los electrodos pueden ser detectados por la adición de un par de electrodos de detección (placas de Faraday). Otra alternativa es emplear la MS para detectar los iones que son separados por DIMS. En este último caso se puede considerar que DIMS funciona como un pre-filtro para espectrometría de masas.

En la celda DIMS los iones se desplazan axialmente entre los electrodos, transportados por un flujo de gas, típicamente a presión atmosférica. La aplicación de una corriente asimétrica alterna de alto voltaje a los electrodos DIMS, genera un campo eléctrico, el cual induce un movimiento radial a las trayectorias de los iones con una velocidad promedio ( $v$ ) dada por la Ecuación (2.11). Cuando el campo eléctrico es bajo, el coeficiente de movilidad iónica es un valor constante en un amplio intervalo de intensidades de campo, típicamente denominado como constante de movilidad iónica a campo bajo ( $K(0)$ ), lo que constituye el principio de la separación de los iones en dispositivos convencionales de IMS.

$$v(t) = K(t)E(t) \quad \text{Donde; } \begin{matrix} K = \text{Coeficiente de Movilidad iónica} \\ E = \text{Energía del campo eléctrico} \end{matrix} \quad (2.11)$$



**Figura 2.6:** Imagen modificada de la referencia [38]. a) Sensor DIMS autónomo, con electrodos de Faraday como detectores. b) Esquema DIMS con un espectrómetro de masas como detector de iones, y representación de la forma de onda asimétrica, donde las áreas integradas de voltaje/tiempo debajo de las porciones de campo bajo y alto dentro de cada período son las mismas (áreas celestes).

Por su parte, cuando se trabaja a campos eléctricos altos de manera que la relación entre la energía del campo ( $E$ ) y la densidad del gas de transporte ( $N$ ) sea suficientemente alta ( $E/N > 10$  Townsends),<sup>[38]</sup> la movilidad de los iones cambia respecto a lo observado a campos bajos. Así, los iones con la misma movilidad de campo bajo pueden tener una movilidad de campo alto sustancialmente diferente debido a los cambios en la naturaleza de las interacciones ion-molécula. En consecuencia, la movilidad de los iones se vuelve un parámetro dependiente del campo y varía de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del ion<sup>[37]</sup> y sus respuestas a los campos altos. La diferencia en la movilidad de los iones a campo alto y bajo, permite separar los iones en función de sus propiedades fisicoquímicas y constituye las bases de DIMS. La movilidad de los iones puede ser expresada según la ecuación

(2.12). Por su parte, la función de movilidad diferencial, denominada alfa ( $\alpha$ ), puede expresarse generalmente como la diferencia normalizada entre las movilidades de campo alto y bajo, como se muestra en la ecuación (2.13).

$$K\left(\frac{E}{N}\right) = K(0) \left[ 1 + \alpha \left(\frac{E}{N}\right) \right] \quad (2.12)$$

$$\alpha\left(\frac{E}{N}\right) = \frac{K\left(\frac{E}{N}\right) - K(0)}{K(0)} \quad (2.13)$$

En una celda DIMS, los iones están expuestos a condiciones alternas de campos altos y bajos mediante la aplicación de una RF en forma de onda asimétrica a los electrodos paralelos como se muestra en la Figura 2.6b. Cada período de la RF expone al ion a un campo alto durante un período corto, para forzar el movimiento del ion hacia uno de los electrodos, seguido de un campo bajo de polaridad opuesta durante un período más largo, que invierte su trayectoria con la misma fuerza neta.

Si un ion tiene la misma movilidad de campo alto y bajo ( $\alpha=0$ ), se moverá en una trayectoria "zig-zag" por la línea central de la celda sin golpear ninguno de los electrodos, como se muestra en la Figura 2.6b. Sin embargo, todos los iones exhiben algún grado de  $\alpha>0$  o  $\alpha<0$ , de modo que la trayectoria neta se desvía del centro hasta que los iones colisionan contra uno u otro electrodo en donde se neutralizan antes de llegar al detector. Para evitar esta colisión y neutralización del ión se aplica un voltaje DC a los electrodos, denominado voltaje de compensación ( $CV$ ), con el propósito de estabilizar la trayectoria de los iones a lo largo del espacio entre los electrodos y éstos puedan ser detectados a la salida de la celda DIMS o transferidos a un MS. Cuando el  $CV$  se fija en el valor apropiado para contrarrestar la movilidad diferencial única de un ion en particular, un haz de iones continuo para esa única especie logra pasar al detector. Este modo de operación es similar en concepto a configurar un filtro de masa cuadrupolar para que pase un ion de una masa particular, solo que en este caso se selecciona el ion con movilidad diferencial característica.<sup>[38]</sup>

Por otro lado, el  $CV$  puede ser aplicado en forma de rampa, de manera que es posible hacer pasar secuencialmente paquetes de iones que tienen un valor específico de  $CV$ , el cual es a su vez una medida directa de la movilidad diferencial de los distintos iones bajo cualquier conjunto particular de condiciones experimentales, y es

el principal parámetro empleado para controlar la trayectoria de un ion a través de una celda DIMS.

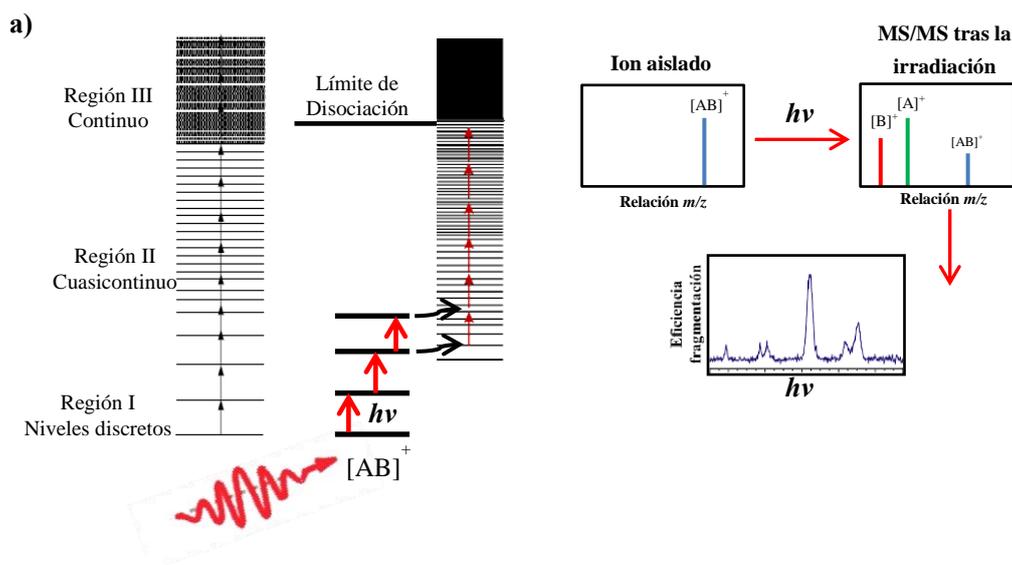
De esta forma, durante un experimento típico de DIMS, se fija el voltaje alterno para producir la desviación de las trayectorias y se barre el valor del *CV* que las corrige, mientras se detectan los iones que pasan al detector a cada valor de *CV*. El gráfico de la intensidad de iones en función del *CV* es equivalente a un cromatograma en el cual la separación de los iones es debido a sus diferentes movilidades diferenciales, lo cual es una característica de cada estructura particular y por lo tanto permite separar isómeros de una misma especie.

## 2.5 Espectroscopia de Disociación Multifotónica IR (DMFIR)

En el proceso de DMFIR, la energía del campo electromagnético absorbida por la molécula a través de un modo vibracional activo se transforma en energía interna de la misma, y si esta energía supera la barrera de energía umbral, se puede producir la disociación ó fotofragmentación de la molécula. En consecuencia, la espectroscopia de DMFIR implica que se produzca la absorción de múltiples fotones en el intervalo IR, de manera tal que secuencialmente se incremente la energía almacenada en los modos vibracionales de la molécula hasta alcanzar el límite de disociación. La fragmentación observada no es estado específica, es decir, independientemente del modo vibracional que sea excitado, la fragmentación se produce generalmente por el canal de fragmentación de mínima energía, como consecuencia del proceso de redistribución intramolecular de energía vibracional (IVR, por sus siglas en inglés).<sup>[40,41]</sup>

En los procesos de DMFIR la formación de las especies excitadas y su posterior fragmentación no es instantánea sino que implica varias etapas que han sido descritas en una serie de modelos cualitativos que explican este proceso.<sup>[42,43]</sup>

El modelo de Bloembergen,<sup>[42]</sup> unánimemente aceptado hoy en día, divide el sistema de niveles vibro-rotacionales de un ion (o molécula) en tres zonas que presentan un comportamiento característico diferente de acuerdo a la densidad de estados vibracionales y su respuesta frente a la absorción de la radiación (Figura 2.7): la de los estados discretos (región I), la del cuasicontinuo intramolecular (región II) y el continuo (región III).



**Figura 2.7:** Representación esquemática del modelo de absorción multifotónica IR a) Proceso que desencadena la fragmentación de un ión, b) Obtención de un espectro de DMFIR acoplando un láser IR sintonizable y un sistema de espectrometría de masas.

La Región I corresponde a los niveles de baja energía vibracional, donde los niveles son discretos. En esta zona gobiernan las leyes cuánticas de forma que, desde un nivel dado, sólo son posibles las transiciones permitidas por las reglas de selección vibro-rotacionales ( $\Delta v = \pm 1$ ,  $\Delta J = \pm 1$ ). A medida que ascendemos en la energía vibracional del modo considerado, la separación entre niveles disminuye debido a la anarmonicidad vibracional, provocando una pérdida de resonancia con la frecuencia de la transición fundamental a la cual se encuentra sintonizado el láser IR. De esta forma, para las intensidades láser utilizadas habitualmente ( $1-100 \text{ MW cm}^{-2}$ ), solo sería posible que el ion absorbiera un único fotón IR de manera resonante. Sin embargo, existen diversos mecanismos que, para moléculas con una elevada densidad de estados vibracionales (moléculas de más de 3 ó 4 átomos), compensan el efecto de la anarmonicidad, permitiendo que la absorción de energía IR continúe.

Algunos de los mecanismos responsables de la compensación de la anarmonicidad son, (1) el ensanchamiento por potencia, (2) la absorción multifotónica concertada y (3) la compensación rotacional.<sup>[44,45]</sup> Para que el proceso de compensación rotacional ocurra eficientemente el experimento debe realizarse a presiones suficientemente altas, para que la distribución poblacional se reestablezca por medio de transferencia de energía colisional, proceso conocido como “llenado

del hueco rotacional”. En los sistemas empleados en el presente trabajo de tesis puede descartarse este mecanismo, pues como se mencionó anteriormente la presión alcanzada en la celda ICR, donde ocurre la fragmentación, es aproximadamente  $10^{-9}$  Torr. Sin embargo, para el tamaño de los sistemas estudiados en esta tesis, la importancia de los mecanismos de compensación de la anarmonicidad es mucho menor, pues se sabe que al aumentar los grados de libertad del ion su densidad de estados será grande a bajas energías, por lo que la absorción del primer fotón lleva al sistema directamente a la región II.

La región II, denominada como zona del cuasicontinuo se caracteriza por una alta densidad de estados vibracionales, de manera tal que se cumple la condición de que el ancho de banda del láser ( $\Delta\omega$ ) es mayor que la densidad de estados a una determinada energía ( $\rho(E)$ ):

$$\Delta\omega > \frac{1}{\rho(E)}$$

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. Para los sistemas estudiados en el presente trabajo de tesis, siempre se cumple esta condición en la región espectral estudiada, para la cual el ancho de banda del láser es aproximadamente  $10 \text{ cm}^{-1}$ .

Finalmente, el ion alcanza la región III del continuo en la cual la resonancia no es requerida. En esta región se produce la fragmentación del ion. De esta forma, siempre que se cumpla la condición de resonancia para la absorción del primer fotón, se puede alcanzar la región del continuo y producir la fragmentación del ión.

Por lo tanto, la DMFIR constituye un método indirecto para medir los espectros IR de iones, mediante lo que comúnmente se denomina espectroscopia de “acción”. Tales enfoques de espectroscopía de "acción" son mucho más sensibles que las mediciones de absorción directa y, por lo tanto, son muy adecuados para el estudio de muestras de baja densidad, como en el caso de iones en fase gaseosa. En ese sentido, las trampas iónicas tipo Pening (ICR) ofrecen condiciones de ultra alto vacío ( $\sim 10^{-9}$  Torr) ideales para minimizar la relajación por colisiones, excelente

manipulación de iones y tiempos de captura prolongados (100 ms a 5 s) para largos tiempos de irradiación.<sup>[46,47]</sup>

### 2.6 Sistemas experimentales

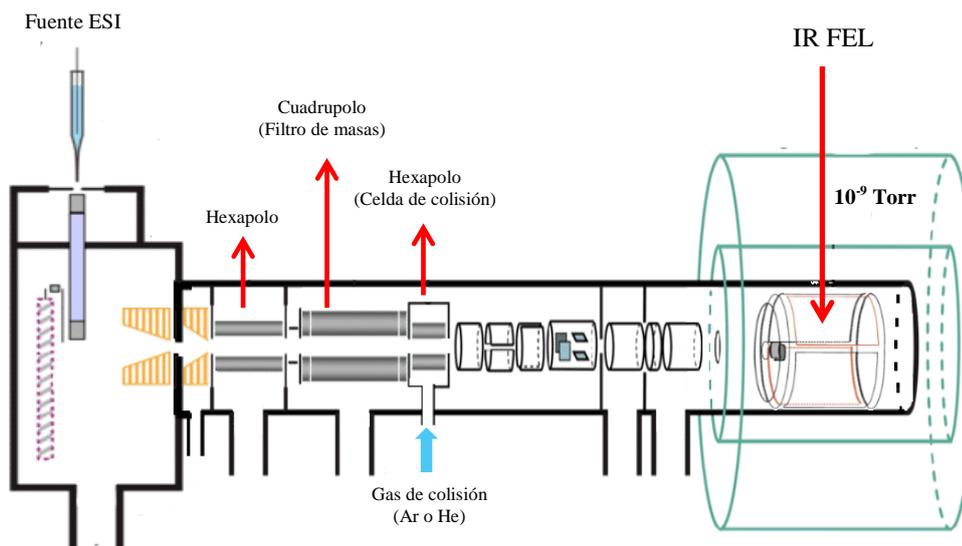
Los resultados experimentales de esta tesis fueron obtenidos en el Centro Láser IR de Orsay (CLIO) que pertenece al Laboratorio de Química Física de la Universidad de Paris-Sud (Orsay – Francia) donde se encuentran instaladas una serie de facilidades para la realización de experimentos de DMFIR. Este centro cuenta con un láser de electrones libres (FEL, del inglés Free Electron Laser)<sup>[48,49]</sup> cuyo cañón de electrones se encuentra optimizado para que el láser emita en la región comprendida entre los 900 y 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Además en CLIO se encuentran disponibles otros sistemas láseres que fueron empleados ocasionalmente, principalmente el láser de  $\text{CO}_2$ .<sup>[50,51]</sup>

Estos láseres se encuentran acoplados a un espectrómetro de masas 7T FT-ICR híbrido y un espectrómetro de masas BrukerEsquire 3000+ equipado con un sistema para realizar DIMS-MS/MS, los cuales fueron utilizados para el desarrollo de este trabajo.

#### 2.6.1 Espectrómetro de masas híbrido 7T FT-ICR (BrukerApexQe)

El espectrómetro de masas 7T FT-ICR (BrukerApexQe) instalado en el Centro Laser Infrarrojo d'Orsay (CLIO)<sup>[52]</sup> cuenta con una fuente ESI y fue utilizado para realizar los experimentos de MS/MS-CID y espectroscopia DMFIR, para los agregados iónicos formados a partir de la interacción entre las bases del ADN y cationes ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Ba}^{2+}$ ). El espectrómetro fue modificado de manera que sea posible hacer ingresar un haz de fotones provenientes del IR FEL, que permite inducir la fragmentación de los iones como se detalló anteriormente (sección 2.5).

En términos generales el espectrómetro de masas 7T FT-ICR corresponde a un ensamble de MS/MS en el espacio y tiempo, sus partes constituyentes se esquematizan en la Figura 2.8. El equipo está constituido por una fuente de iones ESI, una serie de multipolos lineales que cumplen diferentes funciones, una celda de Resonancia Ciclotrónica de Iones y un imán superconductor de 7 Teslas.



**Figura 2.8:** Esquema general espectrómetro de masas 7T FT-ICR instalado en CLIO, empleado para realizar los experimentos de espectroscopia DMFIR.

Los experimentos de espectroscopia DMFIR y MS/MS-CID ocurren en una serie de pasos que se describen brevemente a continuación: los iones generados en la fuente ESI son guiados a través de un capilar, por medio de una serie de lentes electrostáticas hacia una primera trampa de iones hexapolar, donde son desacelerados y pueden ser acumulados por algunos ms.<sup>[52]</sup> Una vez que son acumulados suficientes iones, éstos son extraídos de forma pulsada hacia un cuadrupolo lineal, que funciona como filtro de masa, donde puede ser seleccionado el ion que nos interese estudiar mediante la expulsión de las otras especies, por medio de la aplicación de un campo de RF resonante. Los iones seleccionados en masa pasan hacia un segundo hexapolo que está configurado como una celda de colisión y en el cual los iones son acumulados y termalizados usando un flujo de argón de alta pureza. Además, en esta etapa es posible realizar los experimentos de MS/MS, pues puede producirse la fragmentación del ion seleccionado, mediante CID modificando los potenciales aplicados a la trampa hexapolar y a los *skimmers*, que funcionan como guía de iones.

Un ion aislado y termalizado es finalmente atrapado en la celda ICR del espectrómetro FT-ICR. En CLIO la celda 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.<sup>[52]</sup> Si la

energía del fotón es resonante con la transición fundamental de un modo vibracional activo del ion se produce la absorción del primer fotón, lo que desencadena el proceso de absorción multifotónica hasta superar el umbral de disociación del ion, siguiendo los mecanismos anteriormente descritos (sección 2.5). La disociación resultante del ion conduce a una disminución de la intensidad del ion padre y la aparición de iones hijos de menor relación  $m/z$ , los cuales son detectados en el mismo espectrómetro de masas. La fracción de iones que sufre una disociación unimolecular está relacionada con la eficiencia en la absorción de luz a una determinada frecuencia láser. En otras palabras, el rendimiento de la fotodisociación en función de la longitud de onda del láser está relacionado con el espectro vibracional del ion.

Para la obtención de un espectro, se varía la energía del fotón incidente y se registra la intensidad del ion 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 ( $eff$ ), de acuerdo a la ecuación (2.14).

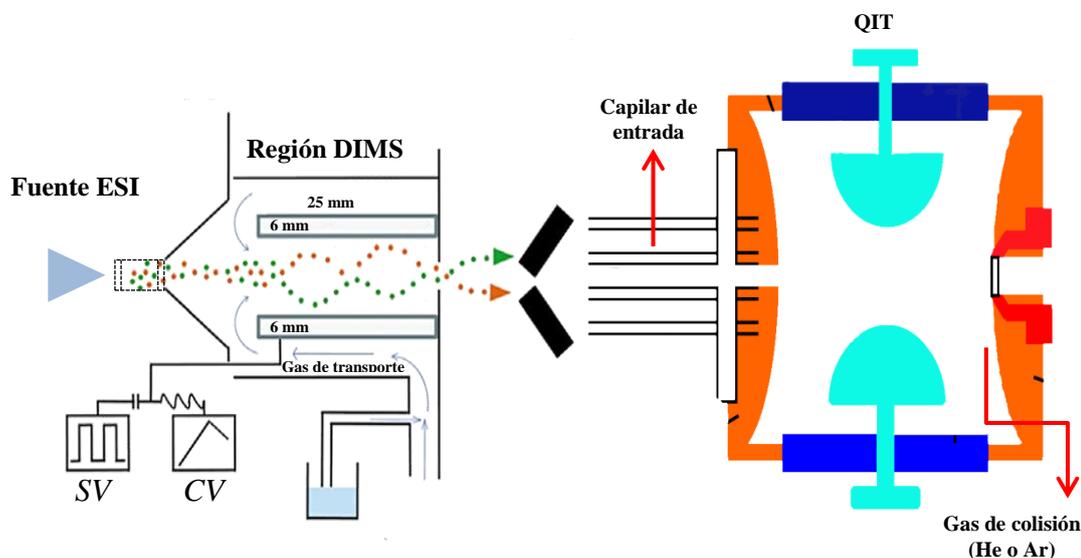
$$eff(h\nu) = -Ln\left(\frac{I_p(h\nu)}{[I_p(h\nu) + \sum I_{frag}(h\nu)]}\right) \quad (2.14)$$

Donde  $I_p(h\nu)$  y  $I_{frag}(h\nu)$ , corresponden a la intensidad del ion padre y los fragmentos en función de la longitud de onda ( $h\nu$ ), respectivamente. Así, un gráfico de la  $eff(h\nu)$  vs  $h\nu$  proporciona información del espectro de DMFIR, análogo a un espectro de absorción IR.

### **2.6.2 Espectrometría movilidad iónica diferencial acoplada a espectrometría de masas en tándem (DIMS MS/MS)**

Los experimentos DIMS-MS/MS fueron realizados empleando una trampa iónica cuadrupolar modificada (Bruker Esquire 3000+) equipada con una fuente ESI. El dispositivo DIMS se encuentra acoplado a la salida de la fuente, de manera que los iones producidos a partir de las soluciones, sean transportados a través de la celda de DIMS, donde son separados los diferentes isómeros. A su vez, el dispositivo DIMS se encuentra acoplado a la entrada de la QIT que se configura como

espectrómetro de MS/MS. En la Figura 2.9 se presenta un esquema general del dispositivo experimental instalado en CLIO.



**Figura 2.9:** Esquema general del dispositivo DIMS-QIT. *SV*: Voltaje de separación; *CV*: Voltaje de compensación. La QIT funciona como espectrómetro MS/MS configurada en el tiempo. Así la QIT funciona como detector DIMS, trampa de iones y celda de colisión.

En el capítulo 3 del presente trabajo de tesis se presentan los resultados de los experimentos DIMS-MS/MS, para los pares de bases protonados que se forman a partir de la interacción entre citosina/guanina y  $H^+$ , por lo que, a continuación se detalla brevemente el procedimiento experimental y las condiciones empleadas.

Un voltaje de 4 kV es aplicado a la fuente ESI para generar los iones, los cuales pasan a la celda DIMS donde son transportados axialmente por una corriente de gas portador a una presión atmosférica entre los dos electrodos. Como se explicó en la sección 2.4, la separación espacial de los iones se basa en sus oscilaciones radiales inducidas por un campo eléctrico de radio frecuencia asimétrica aplicada en los dos electrodos. Para el proceso de la separación por DIMS se emplea una forma de onda bisinusoidal (aproximadamente una onda cuadrada, Figura 2.9) generada mediante la aplicación de una forma de onda sinusoidal de 1.7MHz a uno de los electrodos DIMS y una segunda forma de onda sinusoidal en el segundo armónico, con un desplazamiento de fase de aproximadamente  $90^\circ$ , y al 50% de la amplitud de la primera forma de onda sinusoidal.<sup>[53,54]</sup>

La aplicación un voltaje de compensación (*CV*) a uno de los electrodos, permite la transferencia de los iones de interés a través de la celda DIMS en función de su movilidad iónica diferencial. Los iones filtrados por DIMS se transfieren a través de un capilar a la QIT donde son atrapados y acumulados por el tiempo que requiera el experimento. Finalmente, los espectros DIMS son obtenidos de acuerdo a la intensidad de los iones en función del *CV*.

El *CV* puede ser ajustado de manera que ingrese al espectrómetro de masas un único isómero con el propósito de estudiar su proceso de fragmentación. Una vez que el isómero seleccionado ha sido atrapado en la QIT, puede ser fragmentado por DMFIR o CID. En el caso de los experimentos DIMS-MS/MS (CID), se utilizó He como gas de colisión y el voltaje de colisión se ajustó a 0,2 V.

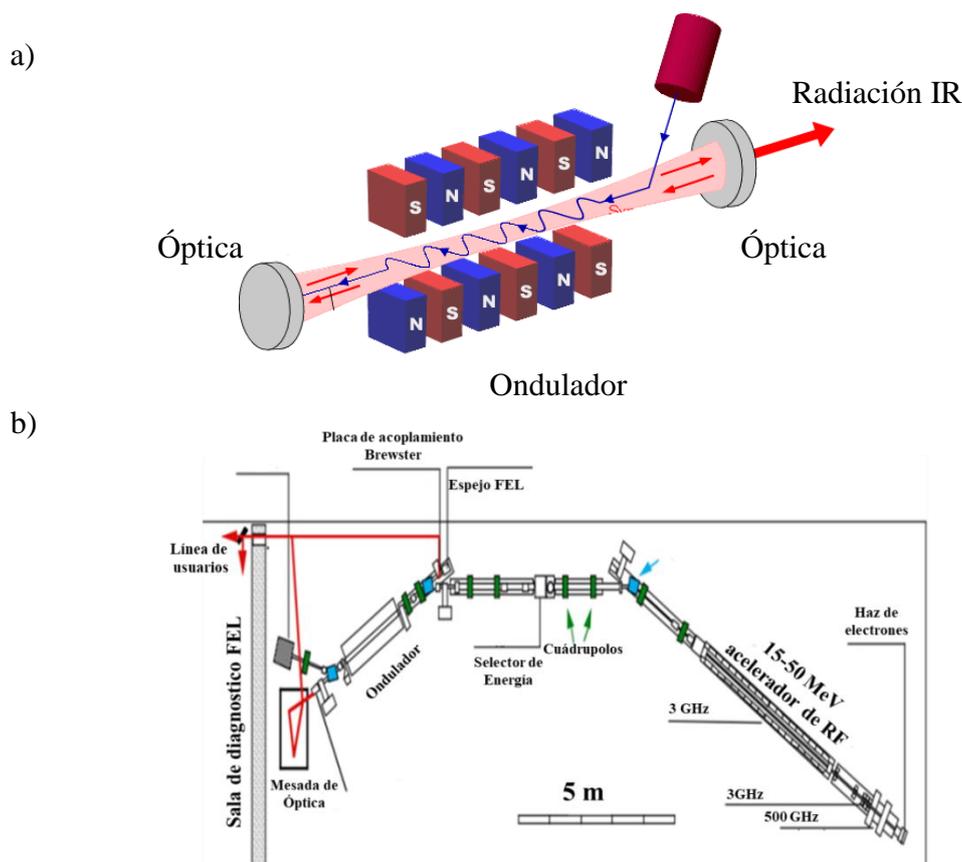
### **2.6.4 Láser de Electrones Libres (FEL)**

El principio del funcionamiento de un láser de electrones libres y la teoría que sustenta su desarrollo, resulta bastante compleja y una explicación detallada supera los objetivos de este trabajo de tesis. Sin embargo, 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 lo que vale la pena describir brevemente su funcionamiento.

El principio de un FEL ha sido revisado en detalle<sup>[48,49]</sup> y por lo tanto aquí solo se discutirán aspectos fundamentales. 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 energías 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, emitirán radiación al oscilar en un campo magnético periódico generado por una serie de electroimanes ensamblados linealmente, sección del equipo que se conoce como ondulator. La radiación emitida por los electrones en el ondulator es almacenada en una cavidad óptica tal que 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.

En la Figura 2.10 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de un FEL. 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  $36,8\text{ mJ/pulso}$ . El perfil temporal del pulso láser está constituido por un "macro-pulso" de  $8\text{ }\mu\text{s}$  y una frecuencia de  $25\text{ Hz}$ . Cada macro-pulso está a su vez constituido por  $500$  micro-pulsos de alrededor de  $5\text{ ps}$  de duración, separados cada  $16\text{ ns}$  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  $10\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 2.10:** a) Esquema básico del funcionamiento de un láser de electrones libres.  
b) Plano esquemático del FEL instalado en CLIO.

### 2.6.4 Láser de CO<sub>2</sub>

En CLIO se encuentra disponible un láser continuo de CO<sub>2</sub> ( $\lambda=943 \text{ cm}^{-1}$ ) de alta potencia que puede acoplarse al FEL para optimizar el proceso de fragmentación. El funcionamiento de un láser de CO<sub>2</sub> ha sido ampliamente descrito en bibliografía.<sup>[50,51]</sup>

### 2.7 Cálculos de estructura electrónica

La asignación estructural de los iones aislados en fase gaseosa se basó en la comparación de los espectros de DMFIR determinados experimentalmente con los espectros IR monofotónicos simulados mediante cálculos de estructura electrónica. En este punto es importante destacar que la naturaleza de los procesos DMFIR y los espectros calculados son diferentes, por un lado la espectroscopia DMFIR implica la absorción de múltiples fotones IR, por su parte los espectros simulados implican la absorción lineal de un único fotón IR, por lo que la intensidad de las transiciones observadas en un espectro DMFIR no son exactamente reproducidas por los espectros calculados. El modelado estructural mediante cálculos de mecánica cuántica permite además obtener información sobre las propiedades electrónicas y termodinámicas de los sistemas en estudio. En general, los cálculos de estructura electrónica se fundamentan en la solución aproximada de la ecuación de Schrödinger (ecuación 2.15),<sup>[55]</sup> que describe el comportamiento de las partículas subatómicas.

$$\left\{ \frac{-h^2}{8\pi m} \nabla^2 + V(r, t) \right\} \Psi(r, t) = \frac{ih}{2\pi} \frac{\partial \Psi(r, t)}{\partial t} \quad (2.15)$$

$$\text{Donde } \nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial^2 x^2} + \frac{\partial^2}{\partial^2 y^2} + \frac{\partial^2}{\partial^2 z^2}$$

Considerando que una molécula es un sistema de N núcleos descritos por un conjunto de coordenadas R y n electrones que a su vez están descritos por un conjunto de r coordenadas, es posible describir las propiedades del sistema a partir de la función de onda total  $\Psi_{\text{tot}}(r, R)$ . De manera que ahora podemos escribir la ecuación de Schrödinger como:

$$\hat{H}\Psi_{\text{tot}}(r, R) = E\Psi_{\text{tot}}(r, R) \quad (2.16)$$

Para sistemas moleculares de muchos átomos, ésta ecuación no puede ser resuelta de forma exacta, por lo que se recurre a una serie de aproximaciones que se comentan brevemente en esta sección

### 2.7.1 Aproximación de Born-Oppenheimer

La aproximación de Born-Oppenheimer, permite simplificar la ecuación de Schrödinger separando las componentes electrónica y nuclear del sistema, pues se considera al movimiento nuclear como una constante, respecto al movimiento electrónico. En otras palabras, los electrones se mueven en una superficie de energía potencial (SEP) generada por los núcleos en una dada posición. Esta aproximación nos permite escribir la función de onda total  $\Psi_{tot}(r,R)$  como un producto entre la función de onda electrónica  $\Psi_{el}$  y la nuclear  $\chi_N$  como:

$$\Psi_{tot}(r, R) = \Psi_{el}(r, R)\chi_N(R) \quad (2.17)$$

Ahora podemos escribir el Hamiltoniano molecular como:

$$\hat{H} = T_N + T_e + V_{Ne} + V_{NN} + V_{ee} \quad (2.18)$$

Donde los dos primeros términos corresponden a la energía cinética asociada a los núcleos y electrones, respectivamente. Mientras que los otros tres términos corresponden a la energía potencial asociada a las interacciones de Coulomb (atractivas/repulsivas) entre núcleos y electrones. Ahora podemos reescribir el Hamiltoniano separando los términos asociados a los electrones y los núcleos, si consideramos una posición fija de los núcleos, por lo que el problema se reduce al Hamiltoniano electrónico que se puede escribir como:

$$\hat{H}_{tot} = T_e + V_{Ne} + V_{ee} \quad (2.19)$$

$$\text{Donde } V_{Ne} = \sum_{A=1}^N \sum_{i=1}^n \frac{Z_A}{r_{iA}}$$

$$V_{ee} = \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n \frac{1}{r_{ij}}$$

Luego, la ecuación de Schrödinger (2.16) puede escribirse en términos del Hamiltoniano electrónico

$$\hat{H}_{el}\Psi_{el}(r, R) = E_{el}(R)\Psi_{el}(r, R) \quad (2.20)$$

Por lo tanto podemos obtener la energía electrónica total del sistema para una posición fija de los núcleos a partir de la ecuación:

$$E_{el}^{tot}(R) = E_{el}(R) + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.21)$$

$$\text{Donde } E_{el}(R) = \frac{\int \Psi_{el}(r, R) \hat{H}_{el} \Psi_{el}(r, R)}{\int \hat{H}_{el} \Psi_{el}(r, R) \Psi_{el}(r, R) \delta\tau}$$

Donde el último término de la ecuación (2.21) corresponde a la interacción entre los núcleos, el cual es constante para una coordenada nuclear fija, según la aproximación de Born-Oppenheimer.

### 2.7.2 Superficie de Energía Potencial (SEP)

Una vez conocida la función de onda electrónica  $\Psi_{el}(r, R)$ , la ecuación de Schrödinger nuclear que satisface la función de onda nuclear  $\chi_N(R)$  puede ser resuelta. En términos generales, a partir de los cálculos de mecánica cuántica es posible obtener  $E_{el}^{tot}(R)$  en función de las coordenadas nucleares (R). La geometría de una molécula no lineal con N núcleos está dada por 3N-6 coordenadas nucleares independientes y la energía electrónica es función de tales coordenadas. Por lo tanto, la SEP puede obtenerse a partir de la resolución de la ecuación de Schrödinger electrónica para muchas configuraciones nucleares

El término de la contribución electrónica en la ecuación de Schrödinger (2.20) continúa siendo irresoluble de forma exacta para sistemas de más de un electrón, debido al término de repulsión interelectrónica, por lo que solo podemos obtener soluciones aproximadas al problema electrónico. Una aproximación a la solución de la función de onda electrónica es la de *Hartree-Fock (HF)*,<sup>[56]</sup> que considera tratar a los electrones uno por uno moviéndose en el campo promedio generado por todos los otros electrones. La función de onda electrónica  $\Psi_{el}(r, R)$  puede ser expresada como

un determinante de Slater<sup>[57]</sup> de la forma  $|\Phi_1(1), \Phi_2(2) \dots \Phi_n(n)|$  generado a partir de los orbitales moleculares  $\Phi_i(x_i)$  que describen a un electrón del sistema molecular.

Para las moléculas, las funciones de onda monoeléctricas corresponden a orbitales moleculares, los cuales a su vez se obtienen como una combinación lineal de orbitales atómicos (CLOA). En consecuencia, la energía electrónica del sistema puede ser calculada en función de los OAs a partir de la solución de las ecuaciones de *HF*.<sup>[56]</sup> La solución de estas ecuaciones se obtiene por un método variacional iterativo denominado método de campo autoconsistente, (*SCF*, *Self-Consistent Field*) y da como resultado un conjunto de orbitales moleculares y sus respectivas energías. Los orbitales moleculares pueden escribirse como:

$$\varphi_i = \sum_{n=1}^K c_{\mu i} \Phi_n \quad \text{Donde } \begin{array}{l} c_{\mu i} = \text{Coeficientes de expansión OM} \\ \Phi_n = \text{Conjunto de funciones de base} \end{array} \quad (2.22)$$

Las funciones de base que se usan actualmente en los cálculos computacionales son construidas como una combinación lineal de funciones primitivas de la forma:

$$\Phi_n = \sum_p d_{\mu p} g_p \quad (2.23)$$

Reescribiendo la ecuación (2.22), un orbital molecular se puede expresar como:

$$\varphi_i = \sum_{n=1}^K c_{\mu i} \left( \sum_p d_{\mu p} g_p \right) \quad (2.24)$$

Los cálculos por el método de *HF* presentan una limitación implícita y es que no incluyen el término de la correlación electrónica, es decir, que no se incluye de forma explícita la interacción electrón-electrón. Sin embargo, la aproximación de *HF* es usada como punto de partida para métodos de cálculo más sofisticados que incluyen términos de energía de correlación ( $\mathcal{E}_c$ ).

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se empleó principalmente la teoría del funcional de la densidad (DFT) por lo que se describe brevemente a continuación.

### 2.7.3 Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

Los principios de la teoría del funcional de la densidad (DFT) han sido ampliamente descritos en bibliografía.<sup>[58-60]</sup> En términos generales DFT se fundamenta en los teoremas de Hohenberg y Kohn,<sup>[61]</sup> que establecen que la energía electrónica del estado fundamental es un funcional de la densidad electrónica, y dicha energía ha de ser un mínimo para la densidad exacta del estado fundamental. En ese sentido, para un sistema de  $N$  electrones, el potencial externo  $v(r)$  determina completamente el Hamiltoniano del sistema y de aquí su energía, función de onda y demás propiedades. Para un  $v(r)$  dado se puede definir el funcional de la energía como:

$$\begin{aligned} E_0[\rho(r)] \\ = F[\rho_0] + \int v(r)\rho_0 dr \end{aligned} \quad (2.25)$$

El funcional  $F[\rho_0]$ , definido como  $T[\rho_0] + V[\rho_0]$  (términos de energía cinética y energía potencial interacción  $e^-e^-$ ) es independiente del potencial externo  $v(r)$ . El segundo teorema de Hohenberg y Kohn establece que la densidad electrónica del estado fundamental es aquella que minimiza  $E_0[\rho(r)]$ .

$$T[\rho'(r)] + V[\rho'(r)] + \int \rho'(r)v(r)dr \geq E_0[\rho_0] \quad (2.26)$$

Donde  $\rho'(r)$  es una función de prueba que cumple  $\int \rho'(r) = N$ . Sin embargo, el problema hasta aquí es que no se conoce la forma exacta del  $F[\rho_0]$ , por lo que hace falta emplear otras aproximaciones. Kohn y Sham (KS),<sup>[62]</sup> propusieron un modelo que considera un sistema de referencia ficticio de  $N$  electrones no interactuantes. Esto significa que tal sistema puede estar representado por un determinante de Slater cuyos elementos son funciones que representan a los electrones del sistema (orbitales). Éste sistema experimenta la acción de un potencial  $v(r)$ , de manera que la densidad electrónica del sistema de referencia es igual a la del sistema real. Aplicando las aproximaciones del método de KS, el funcional de la densidad electrónica aproximado se puede escribir como:

$$F[\rho_0] = T_s[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1) + \rho(r_2)}{r_{1,2}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho] \quad (2.27)$$

Donde el primer término  $T_s[\rho]$  corresponde a la energía cinética del sistema no interactuante, el segundo término es la expresión clásica de la energía de repulsión electrostática y el último término  $E_{xc}[\rho]$  corresponde al funcional de la energía de correlación e intercambio. A partir de las ecuaciones autoconsistentes de KS podemos obtener la energía y orbitales de KS y si conocemos el funcional  $E_{xc}[\rho]$ , es posible calcular la energía del estado fundamental a partir de la ecuación:

$$E_0 = - \int v_{xc}(r)\rho(r)dr - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \langle \theta_i^{KS}(r) | \nabla_i^2 | \theta_i^{KS} \rangle + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1) + \rho(r_2)}{r_{1,2}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho] \quad (2.28)$$

Ahora solo resta conocer el funcional de la energía de correlación e intercambio  $E_{xc}[\rho]$  para lo cual se han desarrollado una serie de funcionales que permiten obtener este término de forma aproximada. El desarrollo de tales funcionales se basa principalmente en las aproximaciones de densidad local (LDA) y de gradiente generalizado (GGA).<sup>[63]</sup> Para los cálculos realizados en el presente trabajo se emplearon los funcionales híbridos B3LYP<sup>[64]</sup> y M06-2X<sup>[65]</sup> basados en las aproximaciones de LDA y GGA, pues se ha demostrado que estos proporcionan buenos resultados en la descripción de las propiedades moleculares de los sistemas estudiados.

#### 2.7.4 Superficie de energía potencial corregida por el método de *Counterpoise*

Los cálculos para los sistemas iónicos ( $[\text{CGH}]^+$ ,  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  y  $[\text{CGAg}]^+$ ) fueron realizados sobre SEPs corregidas por el método de *counterpoise* (CP). La razón de realizar los cálculos de esta manera radica en el hecho de que se ha informado que en el caso de sistemas con muchas formas isoméricas y con barreras de energía potencial bajas para su interconversión, no es suficiente con realizar la corrección por superposición de bases (BSSE) sólo a la energía calculada, sino que es necesario optimizar la geometría sobre una SEP corregida por CP. Se ha mostrado que para complejos débilmente enlazados por puentes de H esto lleva a geometrías más precisas que las calculadas sobre una SEP sin la corrección por CP debido a la topografía de la misma.<sup>[66,67-]</sup> En tal sentido, por ejemplo para el dímero de agua y los

cálculos con los funcionales B3LYP y M06-2X sobre una SEP corregida por CP reproduce los parámetros geométricos determinados experimentalmente de forma más precisa que el cálculo sin la corrección.<sup>[68-69]</sup>

Puesto que en este trabajo se realiza la comparación de espectros de DMFIR con espectros IR calculados, es necesario que estos últimos sean tan precisos como sea posible, para lo cual es importante usar el mejor método disponible para la optimización de las estructuras. En tal sentido, todas las optimizaciones se llevaron a cabo con los funcionales mencionados sobre SEP corregidas por CP.

El principio del método es simple: los subsistemas no se tratan en sus propios conjuntos de bases, sino en los conjuntos de bases de todo el complejo.<sup>[69]</sup> En otras palabras, la metodología se basa en separar los dímeros en sus respectivos monómeros (fragmentos) y calcular sus energías de forma individual, luego la corrección de CP para cada fragmento es la diferencia entre la energía de ese fragmento en su propia base y la calculada en base a todo el grupo, en la geometría que adopta el fragmento en el dímero.

### **2.7.5 Efectos del solvente: Modelo del Continuo Polarizable (PCM)**

En los modelos continuos de solvatación el solvente está caracterizado por un medio continuo sin estructura que se polariza por efecto del soluto provocando una respuesta electrostática que afecta a la energía, la estructura y las propiedades del soluto.<sup>[70,71]</sup> Uno de los métodos más ampliamente usados para describir el efecto del solvente es el modelo del continuo polarizable (PCM, por sus siglas en ingles).<sup>[72,73]</sup>

En el PCM, el solvente es tratado como un dieléctrico continuo infinito, mientras que el soluto se localiza en una cavidad molecular obtenida en términos de esferas entrelazadas, localizadas alrededor de cada átomo del soluto, y así se garantiza que la cavidad mantiene la estructura real de la molécula.

Si bien los estudios espectroscópicos realizados en esta tesis fueron todos de especies en fase gaseosa, las mismas son originalmente formadas en una solución, a partir de la cual se generan los iones en fase gaseosa mediante una fuente ESI (sección 2.2.1). Por este motivo, además de los cálculos de energías relativas en la fase gaseosa, se calculó la estabilidad de las distintas especies e isómeros en solución

considerando el efecto del solvente mediante PCM. El objeto de estos cálculos es determinar el efecto del solvente sobre la estabilidad relativa de distintos isómeros, y en qué medida las estructuras más estables en solución son mantenidas en la fase gaseosa.

## 2.8 Referencias

- [1]. Nilsson, T.; Mann, M.; Aebersold, R.; Yates, J.R.; Bairoch, A.; Bergeron, J.J.M. *Nature. Methods* 2010, 7, 681.
- [2]. Aebersold, R.; Goodlett, D. R. *Mass Spectrometry in Proteomics. Chem. Rev.* 2001, 101, 2, 269-296
- [3]. EDITORIAL. The path of biomolecular mass spectrometry into open research. *Nature Comm.* 2019, 10, 4029, 1-2
- [4]. Breuker, K.; Jin, M.; Han, X.; Honghai, J.; F.W, McLafferty. Top-down identification and characterization of biomolecules by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2008, 19, 1045-1055.
- [5]. A.T. Lebedev. *Environmental Mass Spectrometry. Ann. Rev. Anal. Chem.* 2013, 6, 163-189
- [6]. Susan D. Richardson. *Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. Anal. Chem.* 2012, 842, 747-778
- [7]. Pang, X.; Jia, C.; Chen, Z.; Li, L. Structural characterization of monomers and oligomers of D-amino acid-containing peptides using T-wave ion mobility mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2017, 28(1), 110–118.
- [8]. Nilsson, J.; Brinkmalm, G.; Ramadan, S.; Gilborne, L.; Noborn, Fredrik.; Kaj, B.; Wallin, Anders.; Svensson, Johan.; Mohamed, A.; A-R, Xuefei Huang.; Göran L. Synthetic standard aided quantification and structural characterization of amyloid-beta glycopeptides enriched from cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Sci. Rep.* 2019, 95522/1-95522/13
- [9]. Schürch, S. Characterization of nucleic acids by tandem mass spectrometry - The second decade (2004-2013): From DNA to RNA and modified sequences. *Mass Spectrom Rev.* 2016, 35(4), 483-523
- [10]. Banoub, J.H.; Newton, R.P.; Esmans, E.; Ewing, D.F.; Mackenzie, G. Recent developments in mass spectrometry for the characterization of

---

nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids. *Chem Rev.* 2005, 105, 1869–1915

[11]. Gross, J. H.. *Mass Spectrometry*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2004.

[12]. Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F. *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*. *Science*. 1989, 246, 64-71.

[13]. Fenn, J. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2003, 42, 3871-3880.

[14]. Amad, M. H.; Cech, N.B.; Jackson, G.S.; Enke, C.G.. *Importance of Gas-Phase Proton Affinities in Determining the Electrospray Ionization Response for Analytes and Solvents*. *J. Mass. Spectrom.* 2000, 789:784-789,

[15]. Ruotolo, B.; Giles, K.; Campuzano, I.; Sandercock, A.M.; Bateman, R.H.; Robinson, C.J.: *Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water*. *Science*. 2005, 310,1658–1661.

[16]. Rosu, F.; Pirotte, S.; De Pauw, E.; Gabelica, V. *Positive and negative-mode ESI-MS and MS-MS for studying drug-DNA complexes*. *Int. Journal. of Mass Spectrometry*. 2006, 253, 156–171.

[17]. Rayleigh, L. *Philos. Mag.* 1882, 14, 184.

[18]. Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A.D.; Vahidi, S. *Anal.Chem.* 2013, 85,1 2–9.

[19]. Iribarne, J.V.; Thomson, B.A.J. *Chem. Phys.* 1976, 64, 2287-2294.

[20]. Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F. *Electrospray ionization principles* Whitehouse CM (1990).

[21]. Fenn, J.B. *Ion formation from charged droplets—roles of geometry, energy, and time*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993, 4(7), 524–535

[22]. Mathieu, E. *Me´moire sur le mouvement vibratoire d’une membrane de forme elliptique*. *Math Pure Appl.* 1868, 13,137.

- [23]. March, R.E.; Todd, J.F.J. *Quadrupole ion trap mass spectrometry*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.2005.
- [24]. Campbell, R.. *Theorie Générale de l'Equation de Mathieu*. Paris: Masson. 1955.
- [25]. Douglas, D.J.; Frank, A.J.; Mao, D. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2005, 24, 1-29.
- [26]. Paul, W.; Steinwedel, H.S. US Patent, 2939952.1960
- [27]. Paul, W. *Angew. Chem.*1990, 29, 7, 739-748.
- [28]. Stafford, G.C.; Kelley, P.E.; Syka, J.E. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. 1984, 60, 85-98.
- [29]. March, R.E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J Mass spectrom.*1997, 32, 351-369.
- [30]. Comisarow, M.B.; Marshall, A.G. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 1974, 25(2), 282–283.
- [31]. Bogdanov, B.; Smith, R.D. Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and bottom up. *Mass Spectrom Rev.* 2005, 24(2), 168–200.
- [32]. Marshall, A.; Hendrickson, C.; Jackson, G.S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom. Rev.* 1998, 17, 1–35.
- [33]. Guan, S.; Marshall, A.G. Ion traps for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Principles and design of geometric and electric configurations. *Int J Mass Spectrom Ion Processes*. 1995, 146:261–296.
- [34]. Comisarow, M.B.; Marshall, A.G. The Early Development of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Spectroscopy. *J. Mass Spectrom.* 1996, 31, 581-585.
- [35]. Nikolaev, E.N.; Kostyukevich, Y. I.; Vladimirov, G.N. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR) mass spectrometry: theory and simulations. *Mass Spectrom. Rev.* 2016, 35, 219–258.

- [36]. Comisarow, M.B. Fundamental aspects of FT-ICR and applications to chemistry. *Hyperfine Interact.* 1993, 81, 171–178.
- [37]. Shvartsburg, A.A. *Differential Ion Mobility Spectrometry: Nonlinear Ion Transport and Fundamentals of FAIMS*. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2008.
- [38]. Schneider, B.B.; Nazarov, E.G.; Londry, F.; Vouros, P.; Covey, T.R. Differential mobility spectrometry/mass spectrometry; history, theory, design optimization, simulations, and applications. *Mass Spectrom. Rev.* 2016, 35, 687–737
- [39]. de Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass spectrometry: Principles and Applications*. Chichester, John Wiley & Sons. 2007.
- [40]. Schermann, J.P. *Spectroscopy and Modelling of Biomolecular Building Blocks*. Elsevier, Oxford, 2008.
- [41]. Polfer, N.C. Infrared multiple photon dissociation spectroscopy of trapped ions. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 2211–2221.
- [42]. Black, J. G.; Yablonovitch, E.; Bloembergen, N.; Mukamel, S. *Phys. Rev. Lett.* 1977, 38, 1131-1142.
- [43]. Ambartzumian, R. V.; Letokhov, V. S, *Chemical and Biochemical Applications of Lasers*, Vol. 3, C. B. Moore (Ed.), Academic Press (1977).
- [44]. Toselli, B. M. *Estudio de Procesos por Excitación Vibracional*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 1986.
- [45]. Berdakin, M. *Interacción de cationes con bases del ADN: Estudio de sus propiedades espectroscópicas y caracterización estructural*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. 2015
- [46]. Fridgen, T. D. Infrared consequence spectroscopy of gaseous protonated and metal ion cationized complexes. *Mass Spectrom Rev.* 2009, 28, 586 – 607.
- [47]. Eyle, J.R. Infrared multiple photon dissociation spectroscopy of ions in penning traps. *Mass Spectrom Rev.* 2009, 28, 448– 467.

- [48]. Lemaire, P.; Boissel, M.; Heninger, G.; Mauclaire, G.; Bellec, H.; Mestdagh, A.; Simon, S.L.; Caer, J-M.; Ortega, F.; Maitre, P. *Phys. Rev. Lett.* 2002, 89, 273002-273009.
- [49]. Oepts, D.; van der Meer, A. F. G.; van Amersfoort, P. W. *Infrared Phys. Technol.* 1995, 36, 297–308.
- [50]. Patel, C.K.N.. Continuous-Wave Laser Action on Vibrational-Rotational Transitions of CO<sub>2</sub>, *Phys Rev.* 1964, 136,1187–1193.
- [51]. Hecht, J. *The laser guidebook*. McGraw-Hill Education; Edición United States. 1986.
- [52]. Bakker, J.M.; Besson, T.; Lemaire, J.; Scuderi, D.; Maitre, P. Gas-Phase Structure of a  $\pi$ -Allyl–Palladium Complex: Efficient Infrared Spectroscopy in a 7 T Fourier Transform Mass Spectrometer. *J. Phys. Chem. A.* 2007, 111, 51, 13415-13422.
- [53]. Isenberg, S.L.; Armistead, P.M.; Glish, G.L. Optimization of peptide separations by differential ion mobility spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2014, 25, 1592–1599
- [54]. Hernández, O.; Isenberg, S.; Steinmetz, V.; Glish, G.L.; Maitre, P. Probing Mobility-Selected Saccharide Isomers: Selective Ion–Molecule Reactions and Wavelength-Specific IR Activation. *J. Phys. Chem. A.* 2015,119, 6057–6064.
- [55]. Levine, I.N. *Química Cuántica*. 5<sup>a</sup> edición. 2001.
- [56]. Helgaker, T.; Jorgensen, P.; Olsen, J. *Molecular electronic-structure theory*. John Wiley & Sons: 2014.
- [57]. Slater, J. C. Molecular Energy Levels and Valence Bonds. *Phys. Rev.* 1931, 38, 1109-1144.
- [58]. Kohn, W.; Becke, A.D.; Parr, R. G. Density Functional Theory of Electronic Structure. *J. Phys. Chem. A.* 1996, 100, 12974-12980.

- [59]. Jensen, F. Introduction to Computational Chemistry. John Wiley & Sons Ltd: The Atrium, Southern Gate, Chichester, 2007.
- [60]. Koch, W.; Holthausen, M. A Chemist's Guide to Density Functional Theory. Wiley-VCH Verlag GmbH. 2001.
- [61]. Hohenberg, P.; Kohn, W. Phys. Rev. B. 1964, 136, 864-872.
- [62]. Kohn, W.; Sham, L.J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects, Phys. Rev. 1965, 140, 1133-1140
- [63]. Parr, R.G., Yang, W. Density-functional Theory of Atoms and Molecules Oxford University Press, New York. 1989.
- [64]. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. Phys. Rev. B.1988, 37, 785–789.
- [65]. Zhao, Y.; Truhlar, D. G.. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. Theor. Chem. Acc. 2008, 120, 215-241.
- [66]. Neugebauer, J.I.; Scheffler, M. On the Accuracy of DFT for Describing Hydrogen Bonds: Dependence on the Bond Directionality. J. Phys. Chem. A. 2004,108, 26 5692-5698.
- [67]. Hobza, P.; Havlas, Z. Counterpoise corrected potential energy surfaces of simple H-bonded systems. Theor. Chem. Acc. 1998, 99, 372-377.
- [68]. Wieczorek, R.; Haskamp, L.; Dannenberg, J. J.. Molecular Orbital Calculations of Water Clusters on Counterpoise-Corrected Potential Energy Surfaces. J. Phys. Chem. A. 2004, 108, 32, 6713-6723.
- [69]. Plumley, J.A.; Dannenberg, J.J. A Comparison of the Behavior of Functional/Basis Set Combinations for Hydrogen-Bonding in the Water Dimer with Emphasis on Basis Set Superposition Error. J. Comput. Chem. 2011, 32, 1519–1527.

[70]. Tomasi, J.; Persico, M. Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chem. Rev.* 1994, 947, 2027-2094.

[71]. Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Implicit solvation models: equilibria, structure, spectra, and dynamics. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2161.

[72]. Cossi, M.; Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J. Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. *J. Chem. Phys. Lett.* 1996, 255, 327-337.

[73]. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* 2005, 105, 2999-3093.



# Capítulo 3

---

**Caracterización estructural del par  
de bases (Citosina··Guanina)H<sup>+</sup>  
aislado en fase gaseosa**

---



### 3.1 Introducción

Las interacciones intermoleculares entre las bases del ADN desempeñan un papel fundamental en la formación y estabilización de la estructura de doble hélice del ADN. En particular, las interacciones por puente de hidrógeno son responsables del reconocimiento molecular entre los pares de bases del ADN, por lo que cada una en su forma canónica interactúa específicamente con su base complementaria, de acuerdo al siguiente esquema: citosina con guanina y adenina con timina (C≡G y A=T), formando pares de bases canónicos, formalmente conocidos como pares de Watson-Crick (WC)<sup>[1]</sup> (ver Figura 1.4 en capítulo 1).

Como también se explicó en el capítulo 1, una década después de que Watson y Crick (WC) descubrieran la estructura de doble hélice del ADN<sup>[1]</sup>, Hoogsteen (Hoo)<sup>[2]</sup> informó una estructura cristalina en la que el par de bases tenía una geometría diferente de la reportada por WC. El mismo año 1963, Löwdin propuso que una reacción de transferencia de protones (TP) intra o intermolecular dentro del par de WC podría dar lugar a mutaciones puntuales por formación de tautómeros raros de las bases.<sup>[3]</sup>

Las barreras de energía de activación para los procesos de TP entre las bases del ADN son del orden de 14-16 kcal/mol.<sup>[4]</sup> Por lo tanto, a temperatura ambiente, estos procesos solo pueden ocurrir por efecto túnel. Sin embargo, se ha encontrado que las barreras de energía para los procesos de TP son fuertemente reducidas por ionización o protonación del par de bases (ver Figura 1.8b en capítulo 1).<sup>[4-6]</sup>

La presencia de protones (H<sup>+</sup>) en el medio favorece la protonación de las bases del ADN, lo que induce la formación de pares de bases no canónicos, responsables de la estabilización de estructuras de orden superior del tipo triplex y C-cuádruplex (*i-motif*), conocidas formalmente como plegamientos no canónicos.<sup>[7-9]</sup> En particular, se ha encontrado que la protonación de citosina induce la formación de apareamientos tipo Hoogsteen<sup>[10]</sup> e *i-motif*<sup>[11]</sup> mediados por protón (ver Figura 1.7a y c en capítulo 1). Estas especies protonadas desempeñan un papel importante en muchos procesos biológicos, ya que pueden alterar la estructura de doble hélice (dúplex) del ADN y comprometer las propiedades de reconocimiento molecular, fundamentales para la estabilidad del código genético.<sup>[12]</sup>

Los apareamientos canónicos de tipo WC son más estables que los no canónicos de tipo Hoo a pH fisiológico. Sin embargo, se ha demostrado que bajo condiciones específicas sus estabildades pueden ser comparables o incluso invertidas.<sup>[13-15]</sup>

Los tríplex estabilizados por apareamientos tipo Hoo están involucrados en el desarrollo de enfermedades, como en el caso de la ataxia de Friedreich<sup>[16]</sup> y otras enfermedades.<sup>[17]</sup> También se ha demostrado que la formación de tríplex puede inducir mutaciones en sitios genómicos específicos en células somáticas de ratones adultos.<sup>[18]</sup>

Recientemente, se observaron pares de bases tipo Hoo transitorios dentro de la doble hélice canónica del ADN y específicamente unidos a factores de transcripción y sitios dañados.<sup>[15,19,20]</sup> Esta observación abre un nuevo paradigma, pues sugiere que la doble hélice del ADN también puede codificar pares de bases tipo Hoo transitorios como una forma de expandir el código genético más allá del alcanzado en base al modelo de pares de bases canónicos propuesto por WC.<sup>[1, 19, 20]</sup>

En este contexto, resulta de gran interés el estudio detallado a nivel molecular de las interacciones intermoleculares involucradas en el proceso de apareamiento entre las bases del ADN protonadas, con el propósito de mejorar la comprensión de la química del ADN. Estos estudios a nivel molecular tienen la dificultad de que los tautómeros raros y los sitios específicos de protonación dentro de los pares de bases son difícilmente detectables por la complejidad de los sistemas biológicos. En consecuencia, se requieren experimentos muy sofisticados y que demandan mucho tiempo para caracterizar estructuralmente estas especies, entre ellos se ha empleado la cristalografía de rayos X,<sup>[21]</sup> o experimentos de relajación nuclear de RMN.<sup>[19]</sup> Adicionalmente, se han reportado muchos estudios a nivel teórico, tanto de los procesos de protonación de las nucleobases como de la naturaleza de las interacciones entre las bases protonadas,<sup>[4,10,12,22,23]</sup> los cuales requieren datos experimentales en fase gaseosa para validar su veracidad y universalidad.

Los últimos avances en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) aplicada a sistemas de interés biológico<sup>[24]</sup> y su reciente acoplamiento a la espectroscopía IR y UV han permitido estudiar pequeños complejos no covalentes de moléculas de interés biológico unidas a protones y/o cationes metálicos.<sup>[6,25-37]</sup> En este sentido,

hasta el momento se han caracterizado las cinco bases protonadas de ADN<sup>[33-36]</sup> y los homodímeros de piridina hemiprotonada<sup>[11,37,38]</sup>. Por otro lado, el acoplamiento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con la movilidad iónica diferencial, que se basa en las diferentes interacciones de los iones con un gas *buffer* a una presión cercana a la atmosférica (sección 2.6.2),<sup>[39]</sup> permite la separación de especies isoméricas que luego pueden ser investigadas por MS/MS.<sup>[40]</sup>

En este contexto, en el presente capítulo se presentan los resultados de la aplicación de una metodología basada en MS/MS acoplada a espectroscopía DMFIR para el estudio de los efectos de la protonación, sobre las propiedades estructurales del par protonado [CGH]<sup>+</sup>, ya sea en la forma Watson-Crick protonado (WCH)<sup>+</sup> o Hoogsteen protonado (HooH<sup>+</sup>).

Los iones [CGH]<sup>+</sup> generados mediante ESI se caracterizaron por MS/MS, espectroscopía de DMFIR y DIMS en complemento con cálculos de estructura electrónica. Los resultados presentados a continuación demuestran que éste es un método muy rápido y versátil para clasificar los pares de bases de tipo WCH<sup>+</sup> y HooH<sup>+</sup> y determinar el sitio específico de protonación en los heterodímeros.

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Detalles Experimentales

#### 3.2.1.1 Espectrometría de masas en tándem ESI-FT-ICR y Espectroscopia DMFIR

Todos los reactivos (Sigma-Aldrich) se usaron sin purificación adicional. Se prepararon 2 soluciones equimolares de citosina y guanina (400 µM) utilizando una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O milliQ 1:1 como solvente. La primera de las soluciones (Solución A) presentó un pH de 5,8; mientras que en el caso de la segunda solución (Solución B), el pH se disminuyó hasta 3,2 mediante la adición gota a gota de CH<sub>3</sub>COOH. Las soluciones fueron vaporizadas e ionizadas mediante una fuente ESI acoplada al espectrómetro de masas híbrido 7T FT-ICR, Bruker Apex Qe<sup>[41]</sup> disponible en CLIO y modificado para acoplar al FEL como se describió en detalle en la sección 2.6.1 del capítulo 2 del presente trabajo de tesis.

En ambas soluciones el ión  $[\text{CGH}]^+$  ( $m/z$  263,1) fue aislado en la interfaz cuadrupolar del espectrómetro de masas. Posteriormente, los iones fueron transferidos a una trampa hexapolar, donde se acumularon, termalizaron y en algunos casos se fragmentaron por CID a  $1,0 \times 10^{-3}$  mbar de Ar y 0,5 V. En otros casos, los iones padres termalizados fueron extraídos hacia la celda de ICR, donde interactúan con radiación IR proveniente del FEL (CLIO)<sup>[42]</sup> y fueron fragmentados por DMFIR en el intervalo de  $1100\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$ , asistida o no por un láser de  $\text{CO}_2$ .<sup>[43]</sup> Los espectros de DMFIR se obtuvieron como la eficiencia de fragmentación (*eff*), en función de la frecuencia del láser, calculada de acuerdo con la ecuación (2.14).

### 3.2.1.2 Espectrometría de Movilidad Iónica Diferencial (DIMS)-(MS/MS)

La espectrometría de movilidad iónica ha sido empleada para explorar los diversos isómeros del par  $[\text{CGH}]^+$  y el acoplamiento con la espectrometría de masas en tándem nos permitió obtener información de los patrones de fragmentación de los diferentes isómeros que se forman en ambas soluciones. Se utilizó un espectrómetro de masas Bruker Esquire 3000+ modificado<sup>[44]</sup>, disponible en CLIO. Las condiciones experimentales y de funcionamiento fueron descritas en detalle en la sección 2.6.2 del capítulo 2. Para la detección de los distintos isómeros presentes en las soluciones A y B, se barrió el voltaje de compensación (VC) entre -1 y 4 V. Se utilizó  $\text{N}_2$  para la desolvatación y como gas portador DIMS. El voltaje de dispersión se ajustó a 1800 V. En el caso de los experimentos DIMS-MS/MS (CID), se usó He como gas de colisión y el voltaje de colisión se estableció en 0,2 V.

### 3.2.2 Detalles Computacionales

Todos los cálculos para los diferentes isómeros  $\text{WCH}^+$  y  $\text{HooH}^+$  del par  $[\text{CGH}]^+$  se realizaron a nivel de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) con el paquete de programas Gaussian 09 Revisión E. 01<sup>[45]</sup>. La SEP del complejo  $[\text{CGH}]^+$  se exploró a nivel M06-2X utilizando el conjunto de bases 6-311G++(d,p). Todas las optimizaciones de la geometría se realizaron en SEPs corregidas por el método de counterpoise<sup>[46]</sup>, ya que para SEP relativamente planas, este método proporciona parámetros geométricos más precisos y, por lo tanto, frecuencias vibracionales más realistas.

Los cálculos de los espectros IR monofotónicos para cada uno de los mínimos locales encontrados en la SEP se realizaron al mismo nivel de teoría. Las frecuencias vibracionales se corrigieron con un factor de 0,983, recomendado para el nivel de teoría empleado.<sup>[36,47]</sup> Para una mejor comparación con los espectros DMFIR, las frecuencias calculadas fueron convolucionadas con perfiles gaussianos considerando un ancho de banda de 10 cm<sup>-1</sup> que corresponde al ancho de banda del IR-FEL en la región espectral estudiada (1100–1900 cm<sup>-1</sup>).

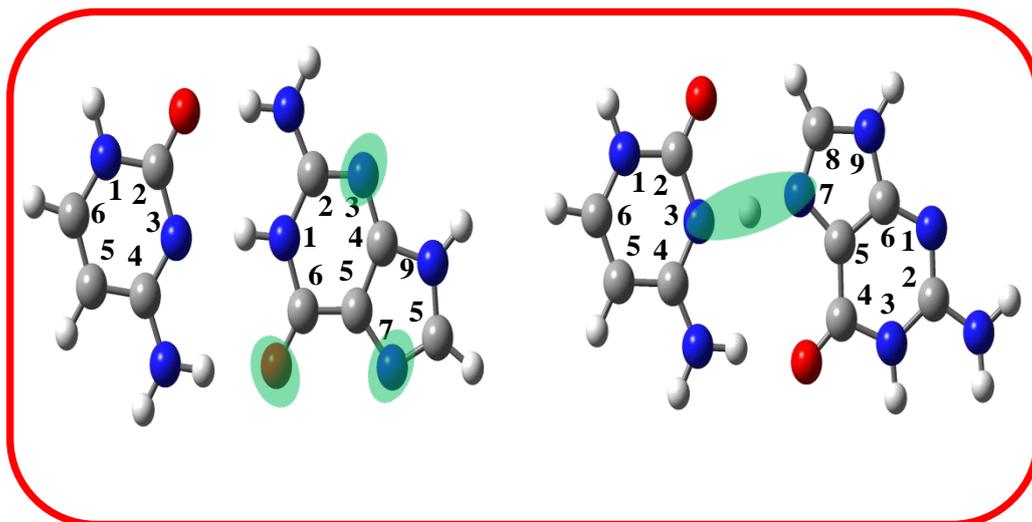
Las energías libres de Gibbs estándar relativas para los diferentes isómeros WCH<sup>+</sup> y HooH<sup>+</sup> del par protonado [CGH]<sup>+</sup>, incluyendo las correcciones de ZPE se calcularon a 298 K y con el mismo nivel de teoría. Esta temperatura es comparable a la alcanzada por los iones en el proceso de termalización por colisiones con Ar en la trampa hexapolar del 7T FT-ICR<sup>[41,43,48]</sup>.

Finalmente, el efecto del solvente sobre la estabilidad de los diferentes isómeros WCH<sup>+</sup> y HooH<sup>+</sup> del complejo [CGH]<sup>+</sup> se evaluó mediante el método de campo de reacción autoconsistente (SCRF, por sus siglas en inglés). En particular, se empleó el modelo continuo polarizable dieléctrico (D-PCM)<sup>[49]</sup> y agua como solvente.

### 3.2.3 Nomenclatura

Tanto C como G pueden existir en diversas formas tautoméricas y por lo tanto pueden dar lugar a la formación de múltiples estructuras. Además, teniendo en cuenta que tanto G como C presentan varios sitios de protonación, la diversidad estructural que se obtiene es mucho más amplia que en el caso de los pares de bases neutras. Por lo tanto, a lo largo del capítulo adoptamos una nomenclatura sistemática y suficientemente explícita, de manera que facilite la interpretación de la estructura molecular a partir del nombre asignado para cada isómero.

En el presente capítulo centramos la atención en las estructuras WCH<sup>+</sup> y HooH<sup>+</sup> (Esquema 3.1) que resultan representativas por sus implicancias a nivel biológico. Sin embargo, es necesario considerar también la formación de otro tipo de estructuras a partir de la interacción entre las bases y H<sup>+</sup>.



**Esquema 3.1:** Estructuras tipo WC (panel izquierdo) y Hoogsteen (panel derecho). En círculos verdes se muestran los posibles sitios de protonación del par WC y la posición del  $H^+$  en el par Hoo.

Las bases C y G libres presentan procesos de tautomerización alrededor de los grupos  $C=O$  y  $NH_2$ , en consecuencia existen principalmente en conformaciones ceto (K), enol (E), amino (A) e imino (I). La nomenclatura empleada a lo largo del capítulo contempla las formas tautoméricas de las bases y la posición donde se ubica el H en los heteroátomos (1 o 3 en C y 7 o 9 en G). Por ejemplo, en el Esquema 3.1 la citosina ceto-amino con el H en el N1 se escribe como CKA(1), por su parte la guanina ceto-amino con el H sobre el N9 se escribe como GKA(9). En el caso de las bases protonadas, independientemente del sitio de protonación se mencionan como  $[GH]^+$  y  $[CH]^+$ .

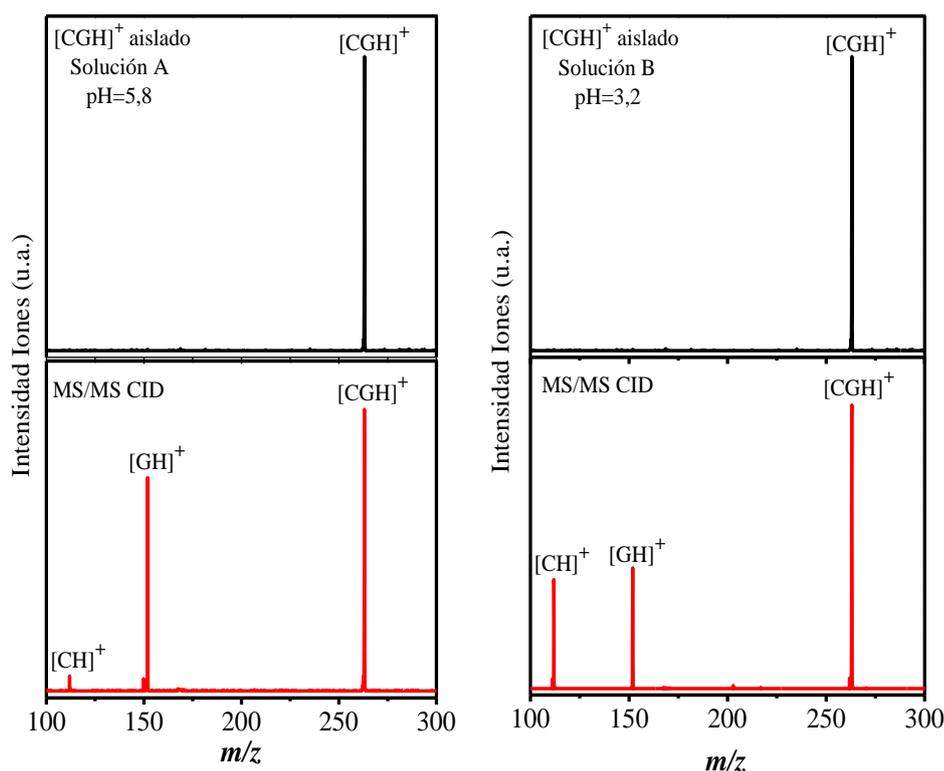
Las estructuras tipo  $WCH^+$  del par  $[CGH]^+$  presentan varios sitios de protonación (señalados en círculos verdes en el Esquema 3.1). Así para las estructuras de tipo  $WCH^+$  se indica el átomo que se encuentra protonado, por ejemplo, la estructura  $WCH^+$  protonada en el N7, N3 u O6 de G se nombran como  $WC N(7)GH^+$ ,  $WC N(3)GH^+$  y  $WC O(6)GH^+$ , respectivamente. Mientras que en los isómeros tipo  $HooH^+$  sus estructuras difieren únicamente en que el  $H^+$  se ubique preferentemente sobre el N(3) de C o sobre el N(7) de G dando lugar a las estructuras  $Hoo N(3)CH^+$  y  $Hoo N(7)GH^+$ , respectivamente. Finalmente, las estructuras que no corresponden a las de tipo  $WCH^+$  o  $HooH^+$  se nombran de acuerdo a la conformación de cada una de las bases y la posición que se protona, así por ejemplo el par formado

por la interacción entre GKA(9) y CKA(1) protonada N(3) se nombra como GKA(9)-CKA(1)N(3)H<sup>+</sup>.

### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Espectrometría de masas en tándem MS/MS CID

Se aisló el ión padre [CGH]<sup>+</sup> de ambas soluciones (A y B), cuyos MS se muestran en los paneles superiores de la Figura 3.1. Estos iones padres fueron fragmentados por CID en la trampa hexapolar del FT-ICR y los correspondientes MS/MS se muestran en los paneles inferiores de la Figura 3.1. Los MS/MS muestran que en ambas soluciones los iones hijos formados por CID fueron [CH]<sup>+</sup> y [GH]<sup>+</sup>. Sin embargo, las intensidades relativas observadas en el patrón de fragmentación dependen significativamente de la solución utilizada para preparar el ión padre.



**Figura 3.1:** Espectros de masas (MS) del ión [CGH]<sup>+</sup> aislado, antes de la fragmentación (paneles superiores) producidos a partir de la solución A (izquierda) y la solución B (derecha), y después de la fragmentación por CID en la trampa hexapolar (paneles inferiores).

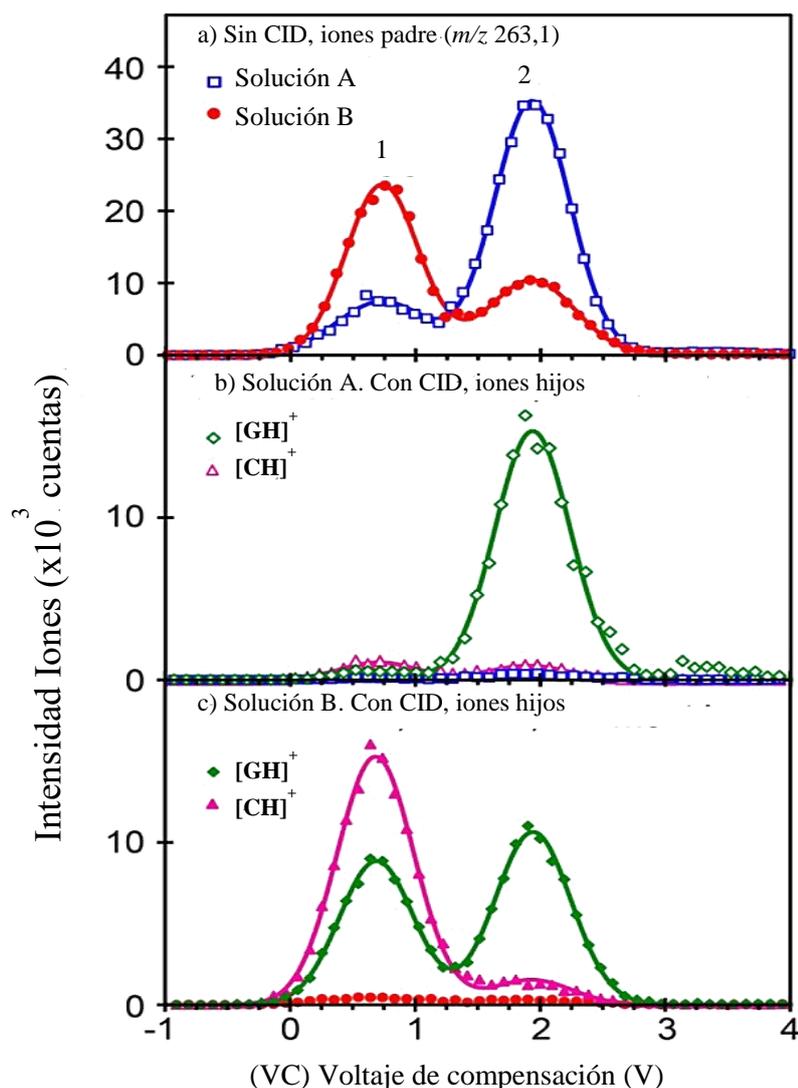
Se observa que para la solución A (pH = 5,8), la fragmentación del ión padre  $[\text{CGH}]^+$  conduce principalmente al fragmento  $m/z$  152 correspondiente a  $[\text{GH}]^+$  (89,2%), con una pequeña contribución del fragmento  $m/z$  112 correspondiente a  $[\text{CH}]^+$  (10,8%) (panel inferior izquierdo Figura 3.1), mientras que en el caso de la solución B (pH = 3,2), ambos fragmentos  $m/z$  152  $[\text{GH}]^+$  y  $m/z$  112  $[\text{CH}]^+$  se detectaron a intensidades similares;  $[\text{GH}]^+$  (47%) y  $[\text{CH}]^+$  (53%) (panel inferior derecho Figura 3.1). Los diferentes patrones de fragmentación observados sugieren que pueden existir diferentes isómeros en cada solución y que su población relativa depende del pH.

### 3.3.2 Espectrometría de Movilidad Iónica Diferencial (DIMS-MS/MS)

Con el propósito de evaluar esta hipótesis, se realizaron experimentos de DIMS para separar los isómeros del ión  $[\text{CGH}]^+$  ( $m/z$  263,1) y posteriormente caracterizar los patrones de fragmentación específicos de cada isómero, mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS), para las soluciones A y B.

Los espectros DIMS registrados para las soluciones A y B se muestran en la Figura 3.2. En el panel a, se observa la intensidad del ion padre  $[\text{CGH}]^+$   $m/z$  263,1 en función del Voltaje de Compensación (VC). Los datos experimentales fueron ajustados a funciones gaussianas para una mejor visualización de los resultados. Para ambas soluciones, se observan dos picos centrados a  $\text{VC1} = (0,76 \pm 0,07)\text{V}$  y  $\text{VC2} = (1,92 \pm 0,07)\text{V}$ .

Los espectros DIMS mostrados en la Figura 3.2.a proporcionan evidencia de la formación de una mezcla de dos isómeros de  $[\text{CGH}]^+$  que coexisten en ambas soluciones, denominados isómero 1 ( $\text{VC1} = 0,76 \text{ V}$ ) e isómero 2 ( $\text{VC2} = 1,92 \text{ V}$ ), producidos en proporciones significativamente diferentes y dependientes del pH de la solución de partida. Para la solución A, las poblaciones relativas de los isómeros 1 y 2 fueron  $(10 \pm 5) \%$  y  $(90 \pm 5) \%$ , respectivamente; mientras que en la solución B estas poblaciones fueron  $(70 \pm 5) \%$  y  $(30 \pm 5) \%$ , respectivamente (Tabla 3.1).



**Figura 3.2:** a) Espectros DIMS del ión padre [CGH]<sup>+</sup> ( $m/z$  263,1) generado a partir de la solución A (cuadrados abiertos azules) y la solución B (círculos rellenos de color rojo). b) y c) espectros DIMS-MS/MS generados a partir de CID del ión padre [CGH]<sup>+</sup> con un voltaje de colisión 0,2 V y He como gas *buffer* producidos a partir de la solución A (pH = 5,8) y la solución B (pH = 3,2), respectivamente. Los símbolos  $\diamond$  y  $\triangle$  corresponden a los fragmentos [GH]<sup>+</sup> y [CH]<sup>+</sup> para la solución A, a su vez  $\blacklozenge$  y  $\blacktriangle$  representan los iones hijos [GH]<sup>+</sup> y [CH]<sup>+</sup> para la solución B.

En los paneles b y c de la Figura 3.2 se muestran los espectros DIMS-MS/MS determinados siguiendo la intensidad de los iones hijos obtenidos por CID, para las soluciones A y B, respectivamente. Los rendimientos de fragmentación reportados en la Tabla 3.1 son los promedios de ambas soluciones a cada VC. En los dos casos se seleccionaron en masa los iones [CGH]<sup>+</sup> de  $m/z$  263,1 y se fragmentaron por CID. Para el isómero 2 que aparece a un VC2 = 1,92 V se observan los fragmentos de

$[\text{GH}]^+$  y  $[\text{CH}]^+$  con contribuciones relativas de  $(91 \pm 3) \%$  y  $(9 \pm 3) \%$ , respectivamente. Mientras que para el isómero 1 que aparece a  $\text{VC1} = 0,76 \text{ V}$ , se observan los mismos dos fragmentos de  $[\text{GH}]^+$  y  $[\text{CH}]^+$  pero con contribuciones relativas de  $(34 \pm 2) \%$  y  $(66 \pm 2) \%$ , respectivamente.

**Tabla 3.1.** Poblaciones relativas (P.R.) de los isómeros 1 y 2 obtenidas por DIMS para las soluciones A y B, junto a las contribuciones relativas de los fragmentos de  $[\text{CH}]^+$  y  $[\text{GH}]^+$  para cada isómero obtenidas por DIMS-MS/MS.

	Solución A P.R. (u.a.)	Solución B P.R. (u.a.)	Fragmentos	
			$[\text{CH}]^+$ (u.a.)	$[\text{GH}]^+$ (u.a.)
Isómero 1	0,10	0,70	0,66	0,34
Isómero 2	0,90	0,30	0,09	0,91

Los espectros DIMS-MS/MS (CID) que se muestran en los paneles b y c de la Figura 3.2 proporcionan evidencia de los diferentes patrones de fragmentación, que presentan estos dos isómeros. En efecto, el isómero 2 ( $\text{VC2} = 1,92 \text{ V}$ ) es el más abundante en la solución A (90 %), y a su vez fragmenta principalmente a  $[\text{GH}]^+$  (91 %). En contraste, el isómero 1 ( $\text{VC1} = 0,76 \text{ V}$ ) es el más abundante (70 %) bajo condiciones más ácidas como en el caso de la solución B ( $\text{pH} = 3, 2$ ) y por su parte, este isómero fragmenta principalmente a  $[\text{CH}]^+$  (66 %).

Por lo tanto, las contribuciones totales de los fragmentos  $[\text{GH}]^+$  y  $[\text{CH}]^+$  a los espectros de MS/MS del ión padre  $[\text{CGH}]^+$  obtenido a partir de las soluciones A y B sin selección DIMS (Figura 3.2a), vienen dadas por la contribución parcial de ambos isómeros a cada fragmento, de acuerdo a las ecuaciones:

$$[\text{CH}]_{total}^+(A) = [\text{CH}^+]_1 \times (\text{P.R.})_1 + [\text{CH}^+]_2 \times (\text{P.R.})_2 \quad (3.1)$$

$$[\text{GH}]_{total}^+(A) = [\text{GH}^+]_1 \times (\text{P.R.})_1 + [\text{GH}^+]_2 \times (\text{P.R.})_2 \quad (3.2)$$

$$[\text{CH}]_{total}^+(B) = [\text{CH}^+]_1 \times (\text{P.R.})_1 + [\text{CH}^+]_2 \times (\text{P.R.})_2 \quad (3.3)$$

$$[\text{GH}]_{total}^+(B) = [\text{GH}^+]_1 \times (\text{P.R.})_1 + [\text{GH}^+]_2 \times (\text{P.R.})_2 \quad (3.4)$$

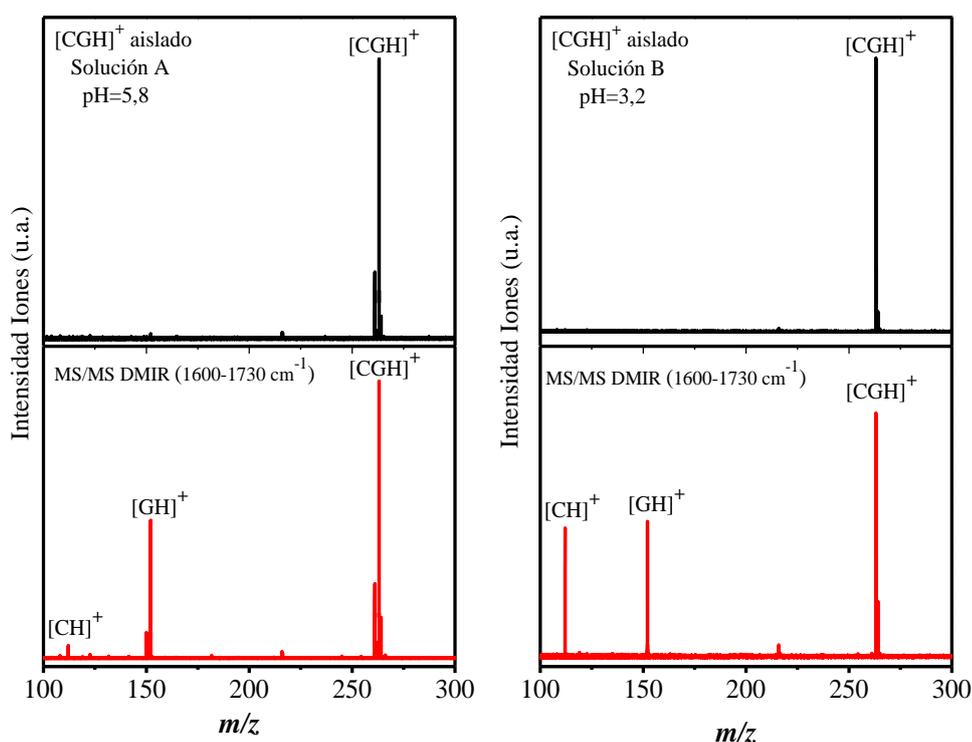
Considerando la solución A, las contribuciones totales de  $[\text{GH}]^+$  y  $[\text{CH}]^+$  son  $(85 \pm 9) \%$  y  $(15 \pm 7) \%$ , respectivamente. De la misma manera, las contribuciones

totales de [GH]<sup>+</sup> y [CH]<sup>+</sup> en la solución B, son (51 ± 8) % y (49 ± 5) %, respectivamente

### 3.3.3 Espectroscopia DMFIR de las soluciones A y B

Para obtener mayor información a nivel estructural y asignar las correspondientes estructuras de los isómeros 1 y 2, cuya población depende del pH, registramos los espectros DMFIR del ión padre [CGH]<sup>+</sup> (*m/z* 263,1), aislado a partir de las soluciones A y B en el espectrómetro de masas 7T FT-ICR.

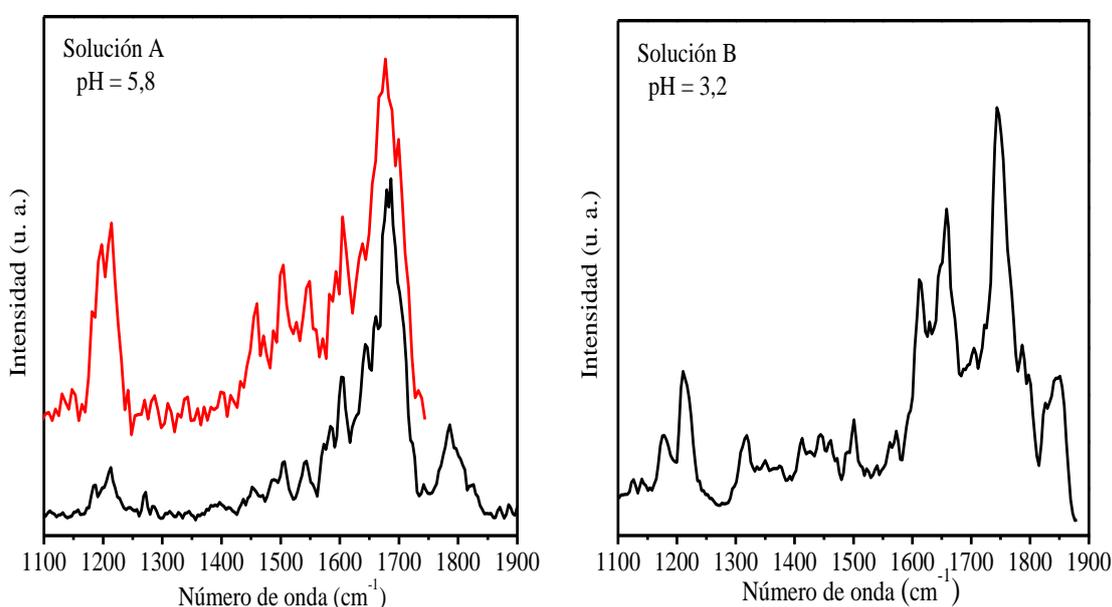
La fragmentación del ión [CGH]<sup>+</sup> después de la irradiación con fotones IR-FEL, conduce principalmente a los fragmentos de [GH]<sup>+</sup> y [CH]<sup>+</sup> (Figura 3.3), con los mismos rendimientos que la fragmentación por CID.



**Figura 3.3:** Espectro MS/MS del par [CGH]<sup>+</sup> aislado, antes de la fragmentación (paneles superiores) producido a partir de la solución A (izquierda) y la solución B (derecha) y después de la fragmentación por DMFIR integrados en el intervalo espectral 1600–1730 cm<sup>-1</sup> (paneles inferiores).

Los espectros DMFIR para las soluciones A y B se obtuvieron de acuerdo a la ecuación (2.14), considerando los dos canales de fragmentación observados, es decir, la pérdida C y/o G neutra, evidenciada por la detección de los fragmentos de  $[\text{GH}]^+$  y  $[\text{CH}]^+$

En la Figura 3.4 se muestran los espectros DMFIR registrados entre  $1100\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$  para las soluciones A y B. En los espectros se observan características espectrales notablemente diferentes, lo cual indica que a pesar de la coexistencia de ambos isómeros en las dos soluciones, sobresalen características espectrales del ión más abundante en cada una.



**Figura 3.4:** Espectros DMFIR de las soluciones A (lado izquierdo) y B (lado derecho) entre  $1100\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de las soluciones A y B (negro) fueron irradiados con fotones IR del FEL por 250 ms. El espectro que se muestra en rojo (panel izquierdo) se registró con 500 ms de irradiación.

Resultan particularmente notables las diferencias observadas en las regiones comprendidas entre  $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ , donde se esperan las frecuencias de los modos de flexión del grupo  $\text{NH}_2$  y de estiramiento de los enlaces  $\text{C}\text{--}\text{N}$  y por encima de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , donde se espera la absorción de los modos correspondientes a los estiramientos de los enlaces  $\text{C}=\text{O}$  de G y C. La asignación de las estructuras para los isómeros mayoritarios presentes en las soluciones A y B se basa en la comparación del espectro DMFIR con los espectros de absorción IR monofotónica de todas las

posibles estructuras que pueden surgir del par protonado [CGH]<sup>+</sup>, principalmente los pares de bases canónicos WCH<sup>+</sup> y no canónicos HooH<sup>+</sup>.

### 3.3.4 Resultados teóricos y asignación estructural

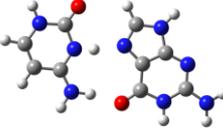
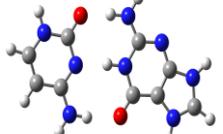
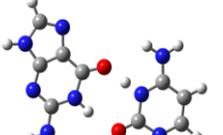
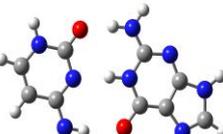
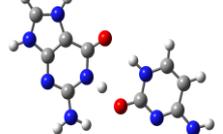
La diversidad estructural que presentan las bases que conforman el par protonado [CGH]<sup>+</sup> es muy amplia. En ese sentido, se ha encontrado mediante estudios experimentales y teóricos<sup>[50-55]</sup> que la citosina neutra existe principalmente en 4 formas tautoméricas que dan lugar a 6 estructuras de mínima energía,<sup>[53-56]</sup> entre las cuales las estructuras CKA(1) y CEA *anti*, coexisten en fase gaseosa y en solución. Por su parte, la guanina puede existir en múltiples configuraciones, de acuerdo con la tautomerización en los grupos ceto y amino, y se han encontrado 8 estructuras de mínima energía por debajo de 7 kcal/mol,<sup>[56,57]</sup> entre las cuales, GKA(9), GKA(7) y GEA(9) se encuentran prácticamente degeneradas en energía en fase gaseosa, por lo que se pueden encontrar poblaciones significativas de estos isómeros en fase gaseosa.

Además, si consideramos que la protonación de las bases puede ocurrir en múltiples sitios de C y G, la complejidad estructural que se obtiene es muy amplia. Así, los tautómeros más abundantes de [CH]<sup>+</sup> corresponden a las estructuras KA y EA protonadas en N(3),<sup>[35,59]</sup> mientras que para [GH]<sup>+</sup> los tautómeros más abundantes corresponden a las estructuras KA (GKA(9)) protonadas en N(7)<sup>[59]</sup> (ver detalles de numeración y nomenclatura en Sección 3.2.3 del presente capítulo). En ese sentido, realizamos los cálculos para todas las posibles estructuras que puede adoptar el ión [CGH]<sup>+</sup>. En la Tabla 3.2 presentamos los resultados para las estructuras con energías relativas por debajo de 12 kcal/mol, en fase gaseosa y en fase acuosa. Las demás estructuras no fueron tenidas en cuenta en este estudio para la asignación estructural porque se encuentran muy por encima del mínimo global de energía.

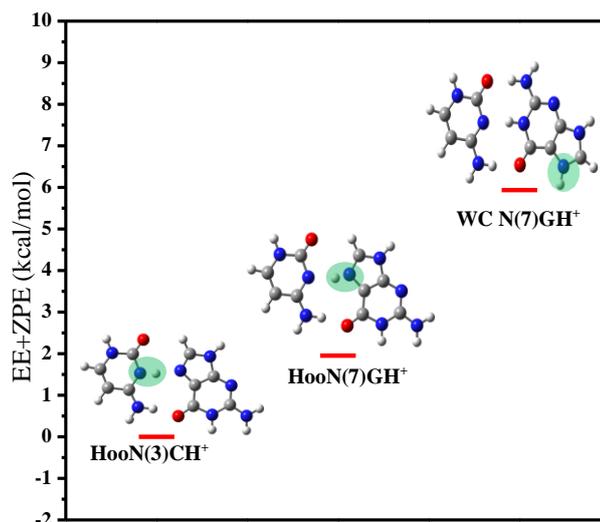
Los isómeros más estables del par protonado [CGH]<sup>+</sup>, corresponden a las estructuras tipo HooH<sup>+</sup>: HooN(3)CH<sup>+</sup> y Hoo N(7)GH<sup>+</sup>. Mientras que el segundo mínimo local corresponde a una estructura tipo WCH<sup>+</sup> protonada en N(7) de GKA(9) que se encuentra a 5,68 y 2,82 kcal/mol por encima del mínimo global en fase gaseosa y en solución acuosa, respectivamente. Como se esperaba, el par de bases

WC se protona preferentemente en el N(7) de G, que presenta una mayor afinidad protónica que la C en los sitios de protonación disponibles dentro del par WC.

**Tabla 3.2.** Energías relativas (EE), con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^{\circ}_{298K}$ ) en fase gaseosa y la corrección de las energías relativas considerando el efecto del solvente , a nivel M06-2X/6-311G++ (d,p)

Estructura	Fase gaseosa			D-PCM (agua)		
	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^{\circ}_{298K}$ (kcal/mol)	P.R	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^{\circ}_{298K}$ (kcal/mol)	P.R
	0	0	1	0	0	1
<b>Hoo N(3)CH<sup>+</sup></b>						
	1,95	1,88	0,04	2,09	1,65	0,06
<b>Hoo N(7)GH<sup>+</sup></b>						
	5,68	5,96	4,25x10 <sup>-5</sup>	2,82	4,37	6,23x10 <sup>-4</sup>
<b>WC N(7)GH<sup>+</sup></b>						
	6,45	6,88	8,99x10 <sup>-6</sup>	5,18	4,88	2,62x10 <sup>-4</sup>
<b>GKA(9)-CKA(1) N(3)H<sup>+</sup></b>						
	10,73	10,02	4,47x10 <sup>-8</sup>	11,97	12,44	7,51x10 <sup>-10</sup>
<b>WC O(6)GH<sup>+</sup></b>						
	11,39	10,95	9,30x10 <sup>-9</sup>	7,80	8,30	8,17x10 <sup>-7</sup>
<b>GKA(9)N(7)H<sup>+</sup>- CKA(1)</b>						

En adelante nos centraremos en los isómeros Hoo N(3)CH<sup>+</sup>, Hoo N(7)GH<sup>+</sup> y WC N(7)GH<sup>+</sup> (Figura 3.5), que además de ser los más estables, representan estructuras de gran relevancia a nivel biológico, los demás isómeros WCH<sup>+</sup> se encuentran muy por encima del mínimo global, por lo que la población de estos isómeros se espera que sea muy baja. Sin embargo, fueron también considerados para la asignación estructural.

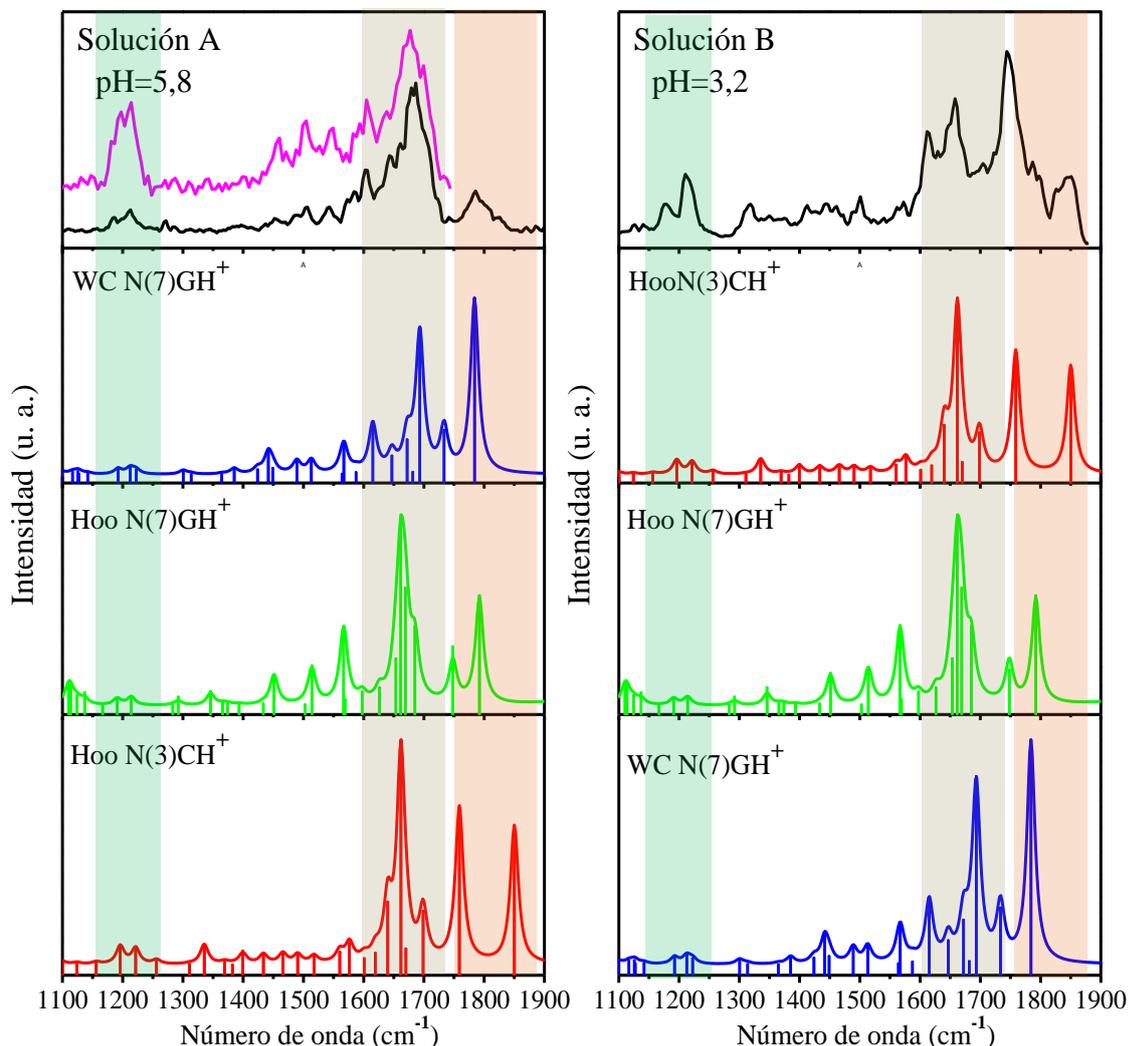


**Figura 3.5:** Estructuras más estables del par protonado de [CGH]<sup>+</sup> HooH<sup>+</sup> y WCH<sup>+</sup> en fase gaseosa, calculadas a nivel M06-2X/6-311G++ (d,p). Las marcas verdes indican la posición del H<sup>+</sup>.

Los espectros DMFIR de los iones [CGH]<sup>+</sup> producidos a partir de las soluciones A y B se muestran en la Figura 3.6, junto con los espectros de absorción IR monofotónica simulados para los isómeros más estables considerados en este estudio (Figura 3.5).

Los espectros vibracionales IR calculados para los isómeros Hoo N(3)CH<sup>+</sup>, Hoo N(7)GH<sup>+</sup> y WC N(7)GH<sup>+</sup> están en muy buena concordancia con estudios teóricos previamente reportados por otros grupos.<sup>[10,23]</sup> Se observan tres regiones de los espectros vibracionales IR de especial interés para la discusión, las cuales se encuentran resaltadas en barras de colores traslúcidos en la Figura 3.6. La región de los modos de estiramiento del enlace C=O (1700–1900 cm<sup>-1</sup>) presenta características espectrales diferentes para los iones [CGH]<sup>+</sup> producidos a partir de las soluciones A

y B, por lo que es considerada una región diagnóstico del tipo de isómero presente en la fase gaseosa.



**Figura 3.6:** Espectros DMFIR del ión padre  $[CGH]^+$  ( $m/z$  263,1) (paneles superiores) producidos a partir de irradiación de la solución A (izquierda) y la solución B (derecha) con la radicación IR-FEL por un período de 250 ms. El espectro en la línea rosa (panel superior izquierdo) se registró con un tiempo de irradiación de IR-FEL de 500 ms. Los paneles inferiores muestran los espectros vibracionales calculados a nivel M06-2X/6-311G++ (d,p) para los isómeros más estables: el isómero WC N(7)GH<sup>+</sup> (azul) y los isómeros de Hoo N(3)CH<sup>+</sup> (rojo) y Hoo N(7)GH<sup>+</sup> (verde).

El espectro IR asociado con el ión  $[CGH]^+$  obtenido a partir de la solución A presenta una banda a  $1786\text{ cm}^{-1}$  que es asignada al modo de estiramiento del enlace C=O de  $[GH]^+$  en el isómero WC N(7)GH<sup>+</sup> (calculada a  $1784\text{ cm}^{-1}$ ). En el caso de la solución B, la banda centrada en  $1848\text{ cm}^{-1}$  es asignada al modo de estiramiento del

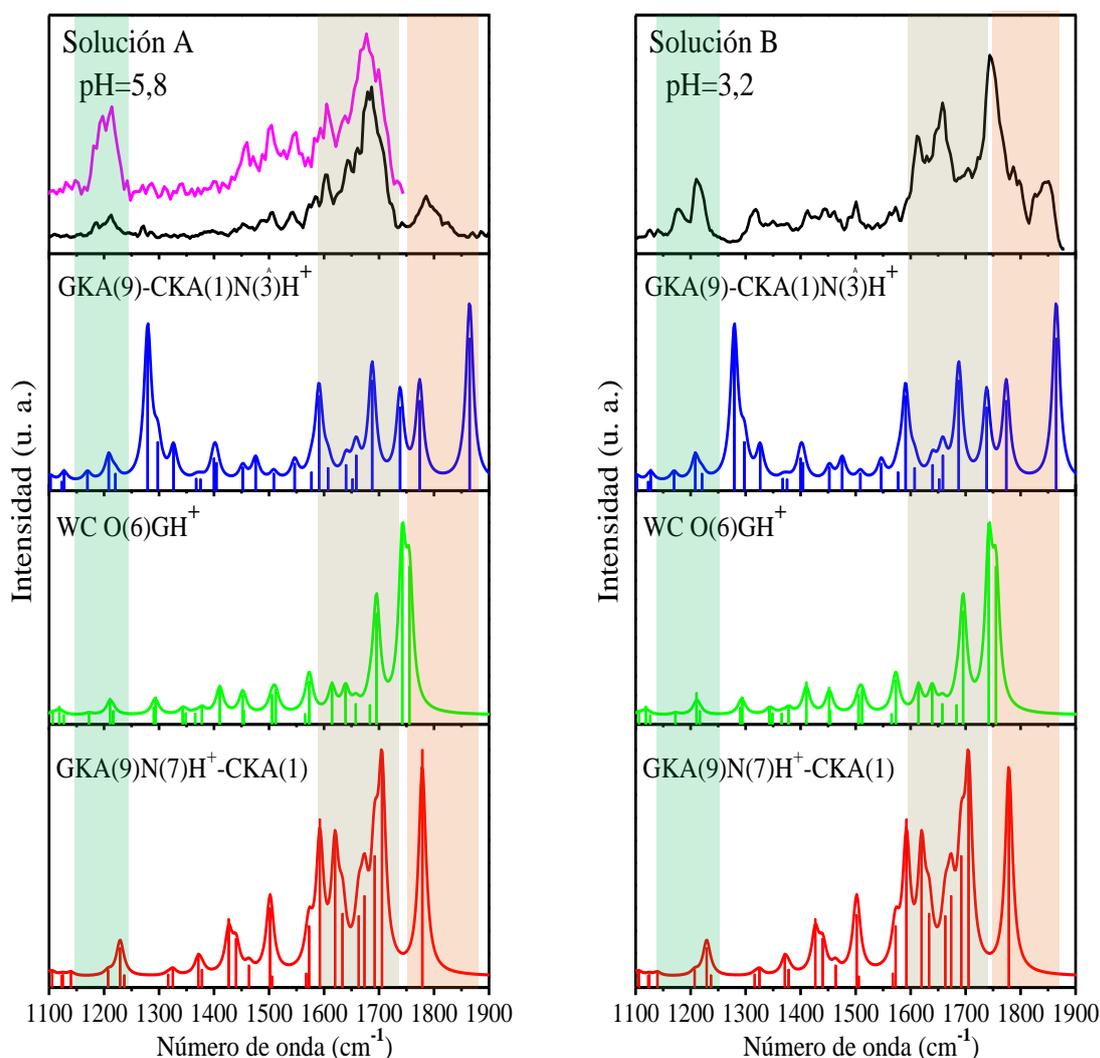
enlace C=O de [CH]<sup>+</sup> en el isómero Hoo N(3)CH<sup>+</sup> (calculada a 1850 cm<sup>-1</sup>), que a su vez es el único de los tres isómeros con una banda de absorción IR predicha entre 1800–1900 cm<sup>-1</sup>. La banda fuerte que se observa a 1743 cm<sup>-1</sup> en el espectro DMFIR del ión [CGH]<sup>+</sup> obtenido a partir de la solución B, también podría asignarse a una banda de absorción IR del isómero Hoo N(3)CH<sup>+</sup> calculada en 1753 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al modo de estiramiento del enlace C=O de G.

Cabe señalar, sin embargo, que la contribución de otros isómeros al espectro DMFIR de la solución B no se puede excluir. Por ejemplo, el isómero Hoo N(7)GH<sup>+</sup> presenta una banda calculada a 1748 cm<sup>-1</sup> (modo de estiramiento del enlace C=O de C) que también podría contribuir a la fuerte banda que se observa en el espectro DMFIR a 1743 cm<sup>-1</sup>. Además, esta banda es asimétrica, y presenta dos hombros desplazados hacia el azul entre 1786-1797 cm<sup>-1</sup> que podrían asignarse al modo de estiramiento C=O de [GH]<sup>+</sup> en el isómero Hoo N(7)GH<sup>+</sup> (calculada a 1790 cm<sup>-1</sup>) y/o al modo de estiramiento C=O de [GH]<sup>+</sup> (calculada a 1784 cm<sup>-1</sup>) para el isómero WC N(7)GH<sup>+</sup>.

Las asignaciones espectrales en la región de los modos de flexión del grupo amino NH<sub>2</sub> y de estiramiento del enlace C–N del anillo piridínico (1600–1700 cm<sup>-1</sup>) son consistentes con las asignaciones en la región de los modos de estiramiento C=O. En el caso del espectro DMFIR, obtenido a partir de la solución A, la banda intensa observada a 1687 cm<sup>-1</sup> coincide muy bien con la banda del isómero WC N(7)GH<sup>+</sup>, calculada a 1692 cm<sup>-1</sup>. En el caso del espectro DMFIR, obtenido a partir de la solución B, se observa un pico doble a 1658 cm<sup>-1</sup> y 1614 cm<sup>-1</sup>, que podrían asignarse a los modos de flexión del grupo NH<sub>2</sub> calculados a 1662 cm<sup>-1</sup> y 1663 cm<sup>-1</sup> para los isómeros Hoo N(3)CH<sup>+</sup> y Hoo N(7)GH<sup>+</sup>, respectivamente, confirmando la presencia de estas estructuras en la solución B.

En la Figura 3.7 se presenta la comparación del espectro DMFIR con los espectros vibracionales IR calculados para los demás isómeros que se muestran en la Tabla 3.2, lo que nos permitió descartar la presencia de poblaciones relevantes de estos isómeros en las soluciones A y B. Por un lado, las estructuras WC O(6)GH<sup>+</sup> y GKA(9)N(7)H<sup>+</sup>-CKA(1) presentan energías libres de Gibbs estándar relativas muy por encima del mínimo global, por lo que la población relativa de estos isómeros, suponiendo una distribución de Maxwell-Boltzman, es muy baja. Por su parte, la

estructura  $\text{GKA(9)-CKA(1)N(3)H}^+$  a pesar de presentar una energía relativa comparable con la estructura  $\text{WC N(7)GH}^+$ , a pH alto (Solución A) no se forma una población significativa de este isómero, pues la formación de esta estructura implica la protonación inicial de C, por lo que se esperaría a pH ácido, donde compite con los procesos de formación de las estructuras  $\text{HooH}^+$  que se ven ampliamente favorecidas luego de la protonación de la nucleobase, como se discutirá más adelante.



**Figura 3.7:** Espectros DMFIR del ión padre  $[\text{CGH}]^+$  ( $m/z$  263,1) (paneles superiores) producidos a partir de irradiación de la solución A (izquierda) y la solución B (derecha) con la radiación IR-FEL por un período de 250 ms. El espectro en la línea rosa (panel superior izquierdo) se registró con un tiempo de irradiación de IR-FEL de 500 ms. Los paneles inferiores muestran los espectros vibracionales calculados a nivel M06-2X/6-311G++(d,p)  $\text{GKA(9)-CKA(1)N(3)H}^+$  (azul),  $\text{WC O(6)GH}^+$  (verde) y  $\text{GKA(9)N(7)H}^+-\text{CKA(1)}$  (rojo)

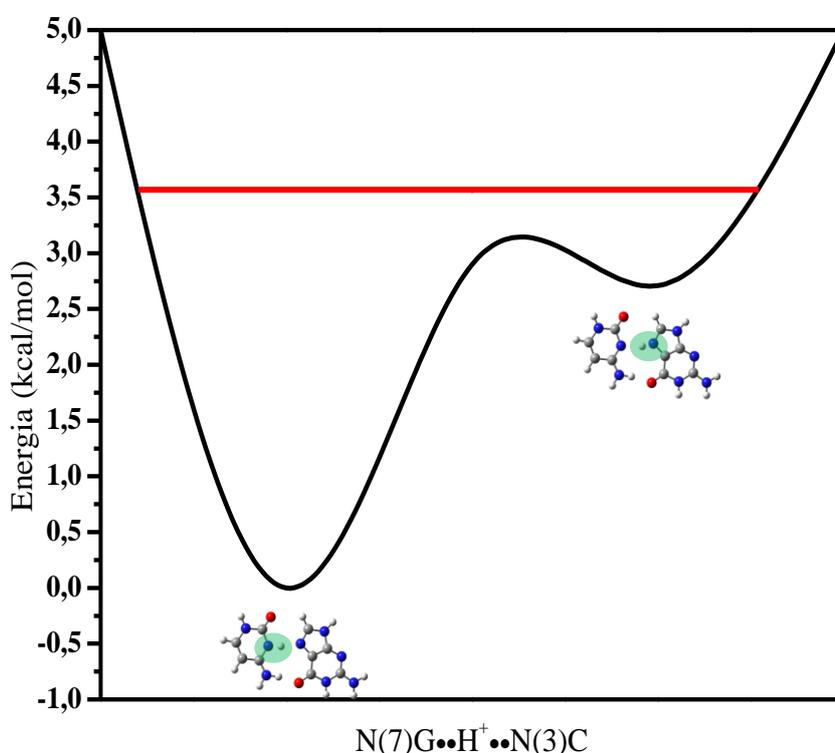
Por otro lado, no se encuentra un buen acuerdo entre los espectros IR calculados para estos isómeros y los espectros DMFIR experimentales obtenidos a partir de las soluciones A y B, como se muestra en la Figura 3.7. Particularmente las bandas de diagnóstico para las soluciones A y B observadas a 1786 y 1848 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, no se ajustan muy bien con la banda calculada a 1864 cm<sup>-1</sup> para el isómero GKA(9)-CKA(1)N(3)H<sup>+</sup>. En consecuencia, el análisis termodinámico y estructural nos permitió descartar la presencia de una población significativa de las estructuras GKA(9)-CKA(1) N(3)H<sup>+</sup>, WC O(6)GH<sup>+</sup> y GKA(9)N(7)H<sup>+</sup>-CKA(1) en las soluciones A y B.

Finalmente, el espectro DMFIR del ión [CGH]<sup>+</sup> producido a partir de la solución B muestra un doble pico en la región de bajas frecuencias. El pico que se observa a 1182 cm<sup>-1</sup> se correlaciona con el pico calculado a 1194 cm<sup>-1</sup> para el isómero Hoo N(3)CH<sup>+</sup>, mientras que el pico más intenso observado a 1217 cm<sup>-1</sup> puede ser asignado a la suma de los modos vibracionales calculados a 1220 cm<sup>-1</sup> para el isómero Hoo N(3)CH<sup>+</sup> y a 1214 cm<sup>-1</sup> para el isómero Hoo N(7)GH<sup>+</sup> (Figura 3.6).

La espectroscopia DMFIR en el intervalo de 1100–1900 cm<sup>-1</sup>, en complemento con cálculos de estructura electrónica permitió realizar la asignación estructural de los dos isómeros identificados por DIMS. Una estructura tipo WCH<sup>+</sup>, más precisamente WC N(7)GH<sup>+</sup> fue asignada al isómero 1 del ión [CGH]<sup>+</sup> que se forma preferentemente en la solución A (pH = 5,8). En el caso del isómero 2, que se forma preferentemente en la solución B (pH = 3,2), el análisis anterior sugiere que se deben considerar las dos estructuras tipo HooH<sup>+</sup>, con el H<sup>+</sup> unido a N(3)C o N(7)G. Sin embargo, esto contrasta con el consenso general respecto a la estructura del par de bases HooH<sup>+</sup> que ubican al H<sup>+</sup> exclusivamente sobre el N(3)C.

En este caso, se considera que los dos isómeros HooH<sup>+</sup> coexisten en un doble pozo de energía potencial y se encuentran acoplados entre ellos por el movimiento del H<sup>+</sup> a lo largo de la coordenada N(7)G–H<sup>+</sup>–N(3)C como se muestra en la Figura 3.8. Las frecuencias para el movimiento del H<sup>+</sup> entre ambas bases (coordenada de reacción) son 2526 cm<sup>-1</sup> y 2008 cm<sup>-1</sup> para los isómeros Hoo N(3)CH<sup>+</sup> y Hoo N(7)GH<sup>+</sup>, respectivamente. Estas dos estructuras se encuentran conectadas a través de una barrera de mínima energía de 2,96 kcal/mol, calculada a nivel M06-2X/6-311G++(d,p). La ZPE a lo largo de la coordenada para la transferencia de

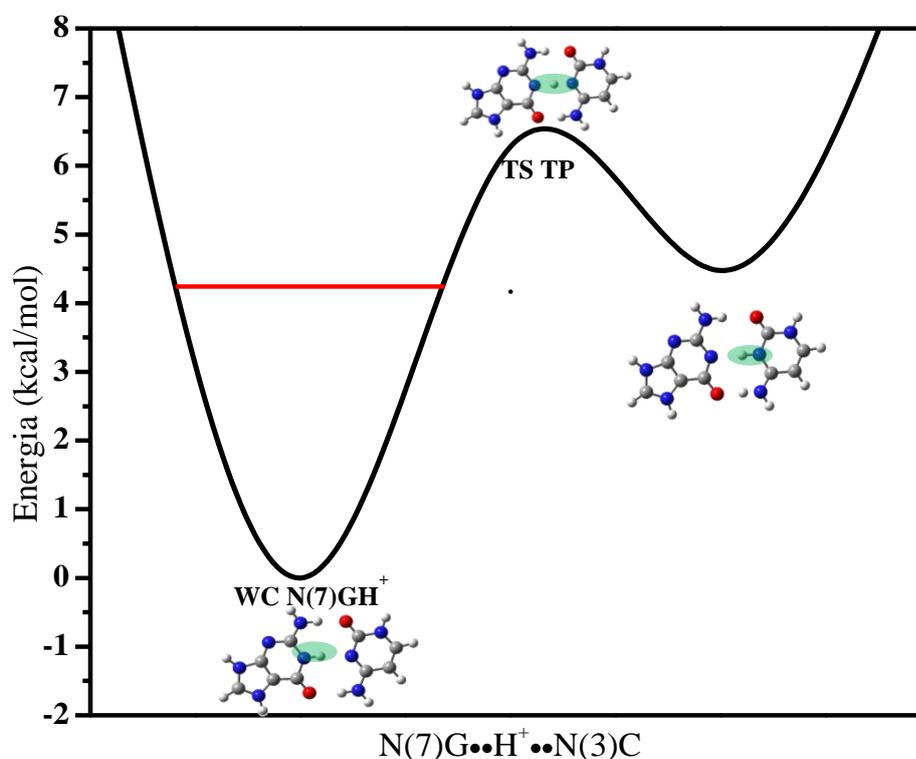
$H^+$  entre las bases se calcula como  $1/2 h\nu$ , donde  $\nu$  es la frecuencia a lo largo de dicha coordenada. Considerando las frecuencias mencionadas anteriormente, la ZPE se ubica a 0,66 kcal/mol por encima de la barrera de energía para la transferencia de protón (TP), como se muestra en la Figura 3.8. Por lo tanto, ya que el estado vibracional fundamental para esta coordenada se encuentra por encima de la barrera de energía, la función de onda correspondiente a este estado se encuentra deslocalizada sobre ambos mínimos, indicando que ambos isómeros  $HooH^+$  coexisten en su estado fundamental, independientemente de la temperatura del sistema.



**Figura 3.8:** Superficie de energía potencial esquemática a lo largo de la coordenada de reacción para la transferencia de protón (TP) entre las bases dentro del isómero  $HooH^+$ . La línea roja horizontal indica el estado vibracional fundamental correspondiente a la ZPE a lo largo de la coordenada de reacción, calculada a nivel M06-2X//6-311G ++ (d, p).

Por su parte el isómero WC  $N(7)GH^+$  presenta una barrera de energía de 5,8 kcal/mol para la transferencia de  $H^+$  desde el N(1)G hacia el N(3)C calculada a nivel M06-2X/6-311G++(d,p) (Figura 3.9). Sin embargo, a diferencia de lo que se observa para los pares de bases tipo  $HooH^+$  la ZPE en la coordenada de reacción se encuentra por debajo de la barrera de energía, por lo que el  $H^+$  no se mueve libremente entre las

bases y permanece unido preferentemente a G. En consecuencia, a la temperatura a la que se realizan los experimentos no se espera la coexistencia de distintos isómeros WCH<sup>+</sup>.

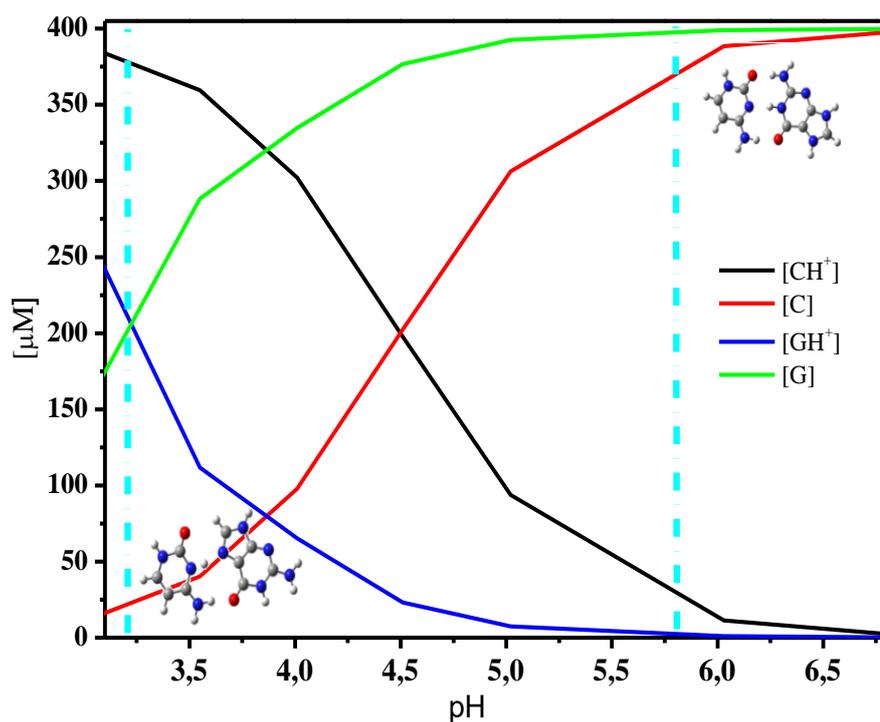


**Figura 3.9:** Superficie de energía potencial esquemática a lo largo de la coordenada de reacción para la transferencia de protón (TP) entre las bases dentro del isómero WCH<sup>+</sup>. La línea roja horizontal indica el estado vibracional fundamental correspondiente a la ZPE a lo largo de la coordenada de reacción, calculada a nivel M06-2X//6-311G ++ (d, p).

En resumen, los resultados de DMFIR y DIMS proporcionan evidencia de un cambio en la población de isómeros del par protonado [CGH]<sup>+</sup> en fase gaseosa con el cambio del pH de las soluciones a partir de las cuales se los genera. A pH = 5,8 (solución A), la especie más abundante es un isómero WCH<sup>+</sup> mientras que a un pH = 3,2 (solución B), los isómeros tipo HooH<sup>+</sup> son los dominantes. Por lo tanto, nos permite sugerir que la población de isómeros WCH<sup>+</sup> y HooH<sup>+</sup> observada en la fase gaseosa, representa la población de isómeros que se forma en solución, lo que indica que estas estructuras se mantienen durante la vaporización del solvente en la fuente de ionización suave (ESI), lo cual ha sido también informado para otros sistemas como los complejos de Timidina-Na [ThdNa]<sup>+</sup>.<sup>[61]</sup>

Considerando que los isómeros  $\text{HooH}^+$  son termodinámicamente más estables que el isómero  $\text{WCH}^+$ , tanto en fase gaseosa como en solución (Tabla 3.2), de acuerdo a los cálculos de estructura electrónica resulta difícil entender que partiendo de una solución a  $\text{pH} = 5,8$  se forme preferentemente el segundo de ellos. Sin embargo, se sabe que la formación de los pares tipo  $\text{HooH}^+$  requiere la protonación de una de las dos bases, bien sea en el N(3) de C ( $\text{pKa} = 4,5$ ) o en el N(7) de G ( $\text{pKa} = 3,3$ ).<sup>[60]</sup>

En la Figura 3.10 se muestra la distribución de especies (C, G,  $\text{CH}^+$  y  $\text{GH}^+$ ) calculada para una solución de citosina  $400 \mu\text{M}$  y guanina  $400 \mu\text{M}$  en función del pH. A partir de este gráfico se observa que en la solución A ( $\text{pH} = 5,8$ ) predominan las bases C y G neutras, por lo cual preferentemente se forma el par WC neutro y la formación del par tipo  $\text{HooH}^+$  no compete eficientemente debido a la baja concentración de bases protonadas a este pH.

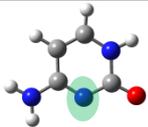
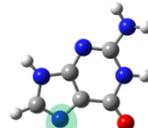
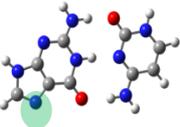
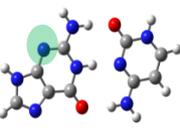
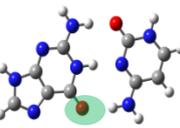


**Figura 3.10:** Distribución de especies [C] (rojo), [G] (verde),  $[\text{CH}]^+$  (negro) y  $[\text{GH}]^+$  (azul), calculadas a partir de los  $\text{pKa}$  de las nucleobases informados en la referencia [60] con el programa kintekus [67].

Así la estructura WC se mantiene durante el proceso de vaporización por ESI, y gracias a la concentración de protones que provienen de la mezcla  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

probablemente se protona en la posición disponible del dímero con mayor afinidad protónica (N(7)G) (ver Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Afinidades protónicas de las bases C y G y del par WC, calculado a nivel M06-2X//6-311G++(d,p). En círculos verdes se señalan los sitios de protonación.

Estructuras	Afinidad Protónica (kcal/mol)
 <b>CKA(1)</b>	228,4 <sup>a</sup>
 <b>GKA(9)</b>	229,5 <sup>a</sup>
 <b>WC N(7)G</b>	242,0
 <b>WC N(3)G</b>	230,3
 <b>WC O(6)G</b>	233,5

<sup>a</sup> Datos obtenidos de la referencia [62].

Luego, tras la fragmentación por CID o DMFIR del isómero 1 (WC N(7)GH<sup>+</sup>), obtenido preferentemente en la solución A, el fragmento más abundante observado es [GH]<sup>+</sup> (91 ± 3) % (Figuras. 3.1 y 3.3), ya que la fragmentación para producir [CH]<sup>+</sup> requiere de un proceso de transferencia de H<sup>+</sup> y/o una isomerización previa a uno de los isómeros de HooH<sup>+</sup>. Esta isomerización implica un reordenamiento

nuclear muy grande que incluye la disociación de dos enlaces H del isómero WC N(7)GH<sup>+</sup> y la rotación del resto de [GH]<sup>+</sup> para obtener el isómero Hoo N(7)GH<sup>+</sup>, proceso que está desfavorecido entrópicamente. Se han llevado a cabo experimentos utilizando irradiación con el IR-FEL a plena potencia e irradiación simultánea con el láser de CO<sub>2</sub>, pero no se observaron cambios en el patrón de fragmentación. Por lo tanto, parece que la velocidad de isomerización es más lenta que la velocidad de disociación directa a [GH]<sup>+</sup>, que implica simplemente una ruptura del enlace y como consecuencia, el fragmento [CH]<sup>+</sup> se observa con solo (9 ± 3) % de rendimiento.

En la solución B (pH = 3,2), la concentración de H<sup>+</sup> conduce a la protonación de N(3)C (pKa = 4,5) y N(7)G (pKa = 3,3)<sup>[60]</sup> como se muestra en la Figura 3.10. Bajo estas condiciones se favorece la formación de los isómeros tipo HooH<sup>+</sup> que son termodinámicamente más estables que el isómero WCH<sup>+</sup>. En consecuencia, se convierten en las estructuras más pobladas en la solución B. Nuestros resultados son consistentes con reportes anteriores<sup>[14,15]</sup> que sugieren que a pH ácido se forman estructuras de orden superior en el ADN (triplex), estabilizadas por pares de bases de tipo Hoogsteen. La estructura tipo HooH<sup>+</sup> se mantiene durante el proceso de vaporización por ESI y la presencia de los dos isómeros Hoo N(3)CH<sup>+</sup> y Hoo N(7)GH<sup>+</sup>, es evidenciada por las características espectrales en las que se observan bandas IR diagnósticas de ambos isómeros en el espectro de DMFIR. Además, la ZPE a lo largo de la coordenada de reacción para la transferencia de H<sup>+</sup> entre C y G se ubica por encima de la barrera de energía para este proceso, lo que garantiza que ambos isómeros coexistan en el estado fundamental (Figura 3.8).

Finalmente, aunque el patrón de fragmentación (MS/MS) de la solución B muestra las mismas intensidades de los iones hijos [GH]<sup>+</sup> y [CH]<sup>+</sup>, los experimentos MS/MS-CID con selección de isómeros por medio de DIMS indican que en el caso de los isómeros HooH<sup>+</sup>, el fragmento [CH]<sup>+</sup> es dos veces más abundante que el fragmento [GH]<sup>+</sup> (Figura 3.2). Esto es contraintuitivo ya que la afinidad protónica de N(7)GKA(9) (229,46 kcal/mol) es mayor que la afinidad protónica de N(3)CKA(1) (228,36 kcal/mol) (Tabla 3.3).<sup>[62]</sup> Sin embargo, este patrón de disociación anómalo ya ha sido observado previamente <sup>[63,64]</sup>, sugiriendo que el método cinético de Cook's<sup>[65,66]</sup> para determinar la afinidad protónica de C y G no es adecuado para este tipo de sistemas.

### 3.4 Conclusiones

En este capítulo se mostraron los resultados de la caracterización estructural del par de bases protonado [CGH]<sup>+</sup> mediante MS/MS acoplado a CID, DIMS y DMFIR en complemento con cálculos de estructura electrónica a nivel DFT. Las principales conclusiones obtenidas a partir de estos resultados son:

1. Los isómeros del par de bases protonado [CGH]<sup>+</sup>, WC N(7)GH<sup>+</sup> o Hoo N(3)CH<sup>+</sup> y Hoo N(7)GH<sup>+</sup> pueden prepararse preferencialmente en las soluciones de distintos pHs y aislarse en fase gaseosa mediante DIMS, ya que su estructura se conserva durante el proceso de vaporización por ESI. Esto puede ser relevante para el estudio experimental de la estructura y las reacciones de TP dentro de los pares de bases, relevantes en mutaciones puntuales del ADN como lo sugirió Löwdin en 1963<sup>[3]</sup>.
2. Los patrones DIMS-MS/MS (CID) y las huellas dactilares DMFIR de cada isómero permiten su asignación inequívoca. Se espera que esto sea aplicable como una metodología fácil y versátil basada en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en complemento con espectroscopia DMFIR para determinar la existencia de pares de HooH<sup>+</sup> asociados a enfermedades y mutaciones, en muestras reales.
3. La dinámica detallada que rige los procesos de transferencia de protones debe considerarse cuidadosamente en la aplicación del método cinético de Cook's para la determinación de las afinidades protónicas de estas bases.
4. Se encontró que la presencia de una alta concentración de protones favorece la formación y estabilización de pares de bases no-canónicos de tipo HooH<sup>+</sup> involucrados en la formación de estructuras orden superior en el ADN. Además, se encontró que las estructuras Hoo N(3)CH<sup>+</sup> y Hoo N(7)GH<sup>+</sup> coexisten en fase gaseosa y en solución.

### 3.5 Referencias

- [1]. Watson, J. D.; Crick, F. H, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nat.* 1953, 171, 737–738.
- [2]. Hoogsteen, K. The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex Between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crystallogr.* 1963, 16, 907–916.
- [3]. Löwdin, P. O.; Proton Tunneling in DNA and its Biological Implications. *Rev. Mod. Phys.* 1963, 35, 724–732.
- [4]. Bertran, J.; Blancafort, L.; Noguera, M.; Sodupe, M. Proton Transfer in DNA Base Pairs. In *Computational Studies of RNA and DNA*; Sponer, J., Lankas, F., Eds.; Springer: The Netherlands, 2006.
- [5]. de Vries, M.S.; Nir, E.; Kleinermanns, K. Pairing of Isolated Nucleic-Acid Bases in the Absence of the DNA Backbone. *Nat.* 2000, 408, 949–951.
- [6]. Feketeová, L.; Chan, B.; Khairallah, G.N.; Steinmetz, V.; Maitre, P.; Radom, L.; O’Hair, R. A, Watson–Crick Base Pair Radical Cation as a Model for Oxidative Damage in DNA. *J. Phys. Chem. Lett.* 2017, 8, 3159–3165.
- [7]. Nikolova, E. K.; Wise, A.A.; O’Brien, P.J.; Andricioaei, I.; Al-Hashimi, H.M. Transient Hoogsteen base pairs in canonical duplex DNA. *Nat.* 2011, 470, 498-502.
- [8]. Da, J.; Mukherjee. S.; Mitra, A.; Bhattacharyya, D. Non-Canonical Base Pairs and Higher Order Structures in Nucleic Acids: Crystal Structure Database Analysis. *J. Biomol. Struct. and Dyn.* 2006, 24, 149-161.
- [9]. Gehring, K.; Leroy, J-L., Guéron, M.A. tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nat.* 1993, 363, 561–565.

- [10]. Han, S. Y.; Lee, S. H.; Chung, J.; Oh, H. B. Base-Pair Interactions in the Gas-Phase Proton-Bonded Complexes of C<sup>+</sup>G and C<sup>+</sup>GC. *J. Chem. Phys.* 2007, 127, 245102/1-245102/10.
- [11]. Yang, B.; Rodgers, M. T. 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.* 2013, 136, 282-290.
- [12]. Arcella, A.; Portella, G.; Orozco, M. Structure of Nucleic Acids in the Gas Phase. In *Nucleic Acids in the Gas Phase*; Gabelica, V., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2014; Chapter 3, 55–76.
- [13]. Pramanik, S.; Nakamura, K.; Usui, K.; Nakano, S.; Saxena, S.; Matsui, J.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N. Thermodynamic Stability of Hoogsteen and Watson–Crick Base Pairs in the Presence of Histone H3-Mimicking Peptide. *Chem. Commun.* 2011, 47, 2790–2792.
- [14]. Tateishi-Karimata, H.; Nakano, M.; Sugimoto, N. Comparable Stability of Hoogsteen and Watson–Crick Base Pairs in Ionic Liquid Choline Dihydrogen Phosphate. *Sci. Rep.* 2015, 4, 3593/1–3593/7.
- [15]. Alvey, H. S.; Gottardo, F. L.; Nikolova, E. N.; Al-Hashimi, H. M. Widespread Transient Hoogsteen Base Pairs in Canonical Duplex DNA with Variable Energetics. *Nat. Commun.* 2014, 5, 4786/1–4786/ 8.
- [16]. Gacy, A. M.; Goellner, G. M.; Spiro, C.; Chen, X.; Gupta, G.; Bradbury, E. M.; Dyer, R. B.; Mikesell, M. J.; Yao, J. Z.; Johnson, A. J.; Richter, A.; Melancon, S. B.; McMurray, C. T. GAA Instability in Friedreich’s Ataxia Shares a Common, DNA-Directed and Intraallelic Mechanism with Other Trinucleotide Diseases. *Mol. Cell.* 1998, 1, 583–593.
- [17]. Mirkin, S. M. Expandable DNA Repeats and Human Disease. *Nat.* 2007, 447, 932–940.

- [18]. Vasquez, K. M.; Narayanan, L.; Glazer, P. M. Specific Mutations Induced by Triplex-Forming Oligonucleotides in Mice. *Science*. 2000, 290, 530–533.
- [19]. Nikolova, E. N.; Kim, E.; Wise, A. A.; O'Brien, P. J.; Andricioaei, I.; Al-Hashimi, H. Transient Hoogsteen Base Pairs in Canonical Duplex DNA. *Nat*. 2011, 470, 498–502
- [20]. Honig, B.; Rohs, R. Flipping Watson and Crick. *Nat*. 2011, 470, 472–473.
- [21]. Nair, D. T.; Johnson, R. E.; Prakash, S.; Prakash, L.; Aggarwal, A. K. Replication by Human DNA Polymerase- $\beta$  Occurs by Hoogsteen Base-Pairing. *Nat*. 2004, 430, 377–380.
- [22]. Lin, Y.; Wang, H.; Gao, S.; Schaefer, H. F., III Hydrogen- Bonded Proton Transfer in the Protonated Guanine-Cytosine ( $\text{GC}^+\text{H}$ )<sup>+</sup> Base Pair. *J. Phys. Chem. B* 2011, 115, 11746–11756.
- [23]. Bende, A.; Muntean, C. M. The Influence of Anharmonic and Solvent Effects on the Theoretical Vibrational Spectra of the Guanine-Cytosine Base Pairs in Watson-Crick and Hoogsteen Configurations. *J. Mol. Model.* 2014, 20, 2113/1–2113/12.
- [24]. *Nucleic Acids in the Gas Phase*; Gabelica, V., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2014.
- [25]. Berdakin, M.; Féraud, G.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvét, C.; Pino, G. A. 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.* 2014, 5, 2295–2301
- [26]. Gao, J.; Berden, G.; Rodgers, M. T.; Oomens, J. Interaction of  $\text{Cu}^+$  with Cytosine and Formation of i-Motif-Like C–M<sup>+</sup>–C Complexes: Alkali versus Coinage Metals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, 18, 7269–7277.
- [27]. Rodgers, M. T.; Armentrout, P. B. Cationic Noncovalent Interactions: Energetics and Periodic Trends. *Chem. Rev.* 2016, 116, 5642–5687.

- [28]. Taccone, M.; Féraud, G.; Berdakin, M.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvét, C.; Pino, G. A. Communication: UV Photoionization of Cytosine Catalyzed by Ag<sup>+</sup>. *J. Chem. Phys.* 2015, 143, 1103-1108
- [29]. Nosenko, Y.; Menges, F.; Riehn, C.; Niedner-Schatteburg, G. Investigation by Two-Color IR Dissociation Spectroscopy of Hoogsteen-type Binding in a Metalated Nucleobase Pair Mimic. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, 15, 8171–8178.
- [30]. Power, B.; Haldys, Violette.; Salpin, J-Y.; Fridgen, T.D. Structures of [M(Ura-H)(Ura)]<sup>+</sup> and [M(Ura-H)(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>+</sup> (M = Cu, Zn, Pb; n = 1-3) Complexes in the Gas Phase by IRMPD Spectroscopy in the Fingerprint Region and Theoretical Studies. *Int. J. Mass Spectrom.* 2018, 429, 56-65.
- [31]. Yang, B.; Wu, R.R.; Polfer, N.C.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M.T. IRMPD action spectroscopy of alkali metal cation-cytosine complexes: effects of alkali metal cation size on gas phase conformation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013 24, 1523-1533,
- [32]. Salpin, J-Y.; Haldys, V.; Guillaumont, S.; Tortajada, J.; Hurtado, M.; Lamsabh, A.M. Gas-Phase Interactions between Lead (II) Ions and Cytosine: Tandem Mass Spectrometry and Infrared Multiple-Photon Dissociation Spectroscopy Study. *Chem Phys Chem.* 2014, 15, 2959 – 2971.
- [33]. Berdakin, M.; Féraud, G.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvét, C.; Pino, G. A. Excited States of Protonated DNA/RNA Bases. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 10643–10650
- [34]. Pedersen, S. Ø.; Støchkel, K.; Byskov, C. S.; Baggesen, L. M.; Nielsen, S. B. Gas-Phase Spectroscopy of Protonated Adenine, Adenosine 5'-Monophosphate and Monohydrated Ions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, 15, 19748–19752.
- [35]. Salpin, J. Y.; Guillaumont, S.; Tortajada, J.; MacAleese, L.; Lemaire, J.; Maitre, P. Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *Chem Phys Chem.* 2007, 8, 2235–2244.

- [36]. Berdakin, M.; Steinmetz, V.; Maitre, P.; Pino, G.A.. On the  $\text{Ag}^+$ -cytosine interaction: the effect of microhydration probed by IR optical spectroscopy and density functional theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17, 25915—25924.
- [37]. Féraud, G.; Berdakin, M.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvet, C.; Pino, G. A. Excited States of Proton-Bound DNA/RNA Base Homodimers: Pyrimidines. *J. Phys. Chem. B* 2015, 119, 2219–2228.
- [38]. Yang, B.; Rodgers, M. T. 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.* 2014, 136, 282–290.
- [39]. Laphorn, C.; Pullen, F.; Chowdhry, B. Z. Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry (IMS-MS) of Small Molecules: Separating and Assigning Structures to Ions. *Mass Spectrom. Rev.* 2013, 32, 43–71.
- [40]. Hoaglund-Hyzer, C. S.; Li, J.; Clemmer, D. E. Mobility Labeling for Parallel CID of Ion Mixtures. *Anal. Chem.* 2000, 72, 2737–2740.
- [41]. Bakker, J.M.; Besson, T.; Lemaire, J.; Scuderi, D.; Maitre, P. Gas-Phase Structure of a  $\pi$ -Allyl-Palladium Complex: Efficient Infrared Spectroscopy in a 7 T Fourier Transform Mass Spectrometer. *J. Phys. Chem. A.* 2007, 111, 13415-13422.
- [42]. Prazeres, R.; Glotin, F.; Insa, C.; Jaroszynski, D. A.; Ortega, J. M. Two-colour operation of a Free-Electron Laser and applications in the mid-infrared. *Eur. Phys. J. D* 1998, 3, 87-93.
- [43]. Sinha, R. K.; Nicol, E.; Steinmetz, V.; Maitre, P. Gas phase structure of microhydrated  $[\text{Mn}(\text{ClO}_4)]^+$  and  $[\text{Mn}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$  ions probed by infrared spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21, 758–772.
- [44]. Hernández, O.; Isenberg, S.; Steinmetz, V.; Glish, G. L.; Maitre, P. Probing Mobility-Selected Saccharide Isomers: Selective Ion–Molecule Reactions and Wavelength-Specific IR Activation. *J. Phys. Chem. A.* 2015, 119, 6057-6064.
- [45]. 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, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013..

[46] Plumley, J. A.; Dannenberg, J. J. A comparison of the behavior of functional/basis set combinations for hydrogen-bonding in the water dimer with emphasis on basis set superposition error. *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 1519–1527.

[47]. Alecu, I. M.; Zheng, I.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. Computational Thermochemistry: Scale Factor Databases and Scale Factors for Vibrational Frequencies Obtained from Electronic Model Chemistries. *J. Chem. Theory Comput.* 2010, 6, 2872–2887.

[48]. W. A, Donald.; G. N, Khairallah.; R. A. J, O’Hair. The Effective Temperature of Ions Stored in a Linear Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013, 24, 811-815.

[49]. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R.. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* 2005, 105, 2999-3093.

[50]. de Vries M.S. (2014) Gas-Phase IR Spectroscopy of Nucleobases. In: Rijs A., Oomens J. (eds) Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules. Topics in Current Chemistry, vol 364. Springer, Cham..

[51]. Nir, E.; Müller, M.; Grace, L.I.; de Vries, M.S. REMPI spectroscopy of cytosine. *Chem. Phys. Lett.* 2002, 355, 59 – 64.

[52]. Feyer, V.; Plekan, O.; Richter, R.; Coreno, M.; de Simone, M.; Prince, .K.C.; Trofimov, A.B.; Zaytseva, I.L.; Schirmer, J. Tautomerism in Cytosine and Uracil: A

Theoretical and Experimental X-ray Absorption and Resonant Auger Study. *J. Phys. Chem. A.* 2010, 114, 10270–10276.

[53]. Trygubenko, S.A.; Bogdan, T.V.; Rueda, M.; Orozco, M.; Luque, F.J.; Sponer, J.; P. Slavicek.; P. Hobza. Correlated ab initio study of nucleic acid bases and their tautomers in the gas phase, in a microhydrated environment and in aqueous solution Part 1. Cytosine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4, 4192 – 4203.

[54]. Kosenkov, D.; . Kholod, Y.; Gorb, L.; Shishkin, O.; Hovorun, D. M.; Mons, M.; Leszczynski, J.; Ab Initio Kinetic Simulation of Gas-Phase Experiments: Tautomerization of Cytosine and Guanine. *J. Phys. Chem. B.* 2009, 113, 6140 – 6150.

[55]. Luo, Q.; Li, J.; Li, Q.S.; Kim, S.; .Wheeler, S.E.; Xie, Y.; Schaefer III, H. F. Electron affinities of the radicals derived from cytosine *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, 7, 861-865.

[56]. Mazzuca, D.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. A theoretical study on tautomerization processes of dehydrated and monohydrated cytosine. *J. Molec. Struc. THEOCHEM.* 2007, 811, 161–167.

[57]. Plekan, O.; V, Feyer.; Richter,.; M,Coreno.; G,Vall-llosera.; K. C, Prince.; A. B, Trofimov.; Zaytseva, I.L.; Moskovskaya, T.E.; Evgeniy, V.; Gromov, O.; Jochen S.. An Experimental and Theoretical Core-Level Study of Tautomerism in Guanine *J. Phys. Chem. A.* 2009, 113, 9376–9385

[58]. Nir, E.; de Vries, M.S.. Guanine tautomerism revealed by UV–UV and IR–UV hole burning spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 2001, 115, 10, 8 4604-4611

[59]. Colominas, C.; Luque, F.J.; Orozco, M.. Tautomerism and Protonation of Guanine and Cytosine. Implication in the Formation of Hydrogen-Bonded Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 6811 – 6821.

[60]. Verdolino, V.; Cammi, R.; Munk, B.H.; Schlegel, H.B. Calculation of pKa Values of Nucleobases and the Guanine Oxidation Products Guanidinohydantoin and Spiroiminodihydantoin using Density Functional Theory and a Polarizable Continuum Model. *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112, 16860 – 16873.

- [61]. Zhu, Y.; Roy, H.A.; Cunningham, N.A.; Strobehn, S. F.; Gao, J.; Munshi, M.U.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M.T.. IRMPD Action Spectroscopy, ER-CID Experiments, and Theoretical Studies of Sodium Cationized Thymidine and 5-Methyluridine: Kinetic Trapping During the ESI Desolvation Process Preserves the Solution Structure of [Thd+Na]<sup>+</sup>. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, 28, 2423-2437.
- [62]. Chandra, A. K.; Nguyen, M. T.; Uchimaru, T.; Zeegers-Huyskens, T., 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. Phys. Chem. A.* 1999, 103, 8853-8860.
- [63]. Park, J.J.; Lee, C.S.; Han, S.Y., Proton Transfer Accounting for Anomalous Collision-Induced Dissociation of Proton-Bound Hoogsteen Base Pair of Cytosine and Guanine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2018, 29, 2368-2381
- [64]. Seon, Y.; Han, S.Y.; Jo, S.; Oha, H.B., An Anomalous Dissociation of Protonated Cluster Ions of DNA Guanine-Cytosine Base-Pair. *Mass Spec. Lett.* 2011, 2, 73-75.
- [65]. Cooks, R. G.; Koskinen, J.T.; Thomas, P.D. The Kinetic Method of Making Thermochemical Determinations. *J. Mass Spectrom.* 1999, 34, 85-92.
- [66]. Di Donna, L.; Napoli, A.; Sindona, G.; Athanassopoulos, C.A., Comprehensive Evaluation of the Kinetic Method Applied in the Determination of the Proton Affinity of the Nucleic Acid Molecules. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15, 1080-1086.
- [67]. Ianni, J.C. Kintecus, Windows Version 5.5; 2015, Available at: [www.kintecus.com](http://www.kintecus.com).





# Capítulo 4

---

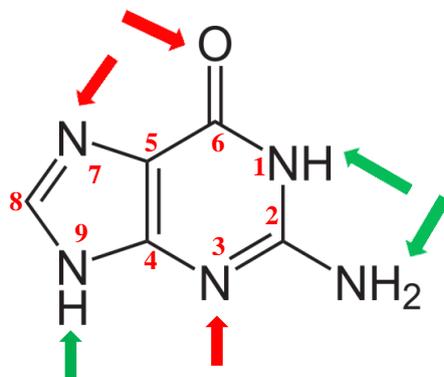
**Caracterización estructural de los  
complejos [Guanina]Ag<sup>+</sup> y  
[Citosina⋯Guanina]Ag<sup>+</sup> aislados  
en fase gaseosa**

---



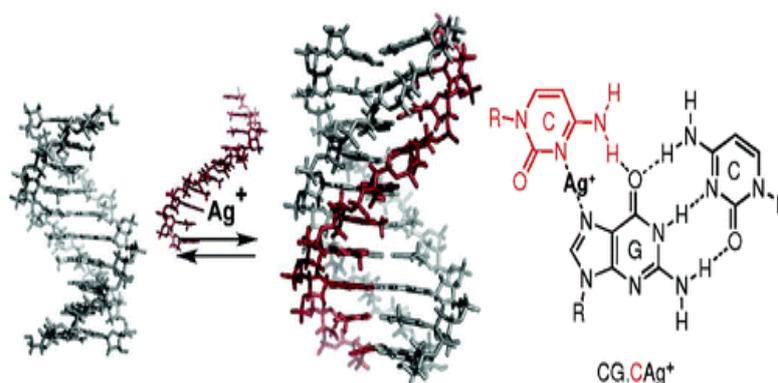
## 4.1 Introducción

La guanina (G) puede formar estructuras de orden superior en el ADN a partir de las interacciones por puente de hidrógeno e interacciones con cationes metálicos, gracias a las características estructurales que le confieren los dos grupos donores (N1H, N9H y NH<sub>2</sub>) y aceptores (N7, N3 y C=O) de hidrógeno (Esquema 4.1).<sup>[1-3]</sup> En consecuencia, se ha encontrado que la G interactúa de forma específica con cationes (metálicos y H<sup>+</sup>), lo que favorece la formación de pares de bases no canónicos, responsables de estabilizar plegamientos no canónicos en el ADN, como los triplex<sup>[4,5]</sup> y G-cuádruplex<sup>[6,7]</sup> (Figura 1.7 en capítulo 1).



**Esquema 4.1:** Estructura y numeración de la guanina en su forma canónica GKA(9), las flechas rojas y verdes indican los sitios de interacción por puente de hidrógeno. Las flechas verdes indican los grupos donores de H, mientras que las flechas rojas indican los grupos aceptores de H.

Los triplex de ADN estabilizados por cationes metálicos han despertado recientemente el interés de la comunidad científica, ya que presentan prominentes aplicaciones en el campo de la nanotecnología<sup>[8,9]</sup> y la biomedicina,<sup>[10,11]</sup> gracias a sus propiedades de reconocimiento molecular. Los triplex de ADN son frecuentemente empleados en el diseño de sistemas para el etiquetado de secuencias específicas, la regulación de la expresión génica y la construcción de nanoestructuras basadas en esta macromolécula. Más interesante aún, se ha encontrado que la limitación intrínseca de la dependencia del pH<sup>[12,13]</sup> que presentan los triplex formados por C y G puede ser superada en presencia de Ag<sup>+</sup> (Figura 4.1),<sup>[5,14]</sup> que resulta singularmente interesante ya que este catión se une específicamente a las bases del ADN y le confiere propiedades fotofísicas particulares.



**Figura 4.1:** Representación de un triplex estabilizado por  $\text{Ag}^+$ . Imagen tomada de la referencia [5].

En ese sentido, el estudio detallado a nivel molecular de la naturaleza de la interacción entre C, G y  $\text{Ag}^+$  es de gran interés, ya que permite comprender los factores que favorecen la formación de pares de bases de tipo Hoo mediados por metal, responsables de estabilizar los triplex de C y G en condiciones de pH fisiológico.

En primer lugar, las propiedades estructurales y fotofísicas de C neutra han sido ampliamente caracterizadas mediante estudios experimentales<sup>[15,16]</sup> y teóricos,<sup>[17,18]</sup> a partir de los cuales se ha demostrado que en fase gaseosa esta molécula puede existir como una combinación de formas cetó-amino (KA) y enol-amino (EA) en equilibrio tautomérico. Por su parte, la G presenta una gran diversidad estructural,<sup>[18]</sup> principalmente se han encontrado poblaciones significativas de los tautómeros cetó-amino (KA(9) y KA(7)) y los rotámeros (*anti* o *syn*) enol-amino (EA(9)).<sup>[16-24]</sup>

A pesar de que es posible encontrar una gran variedad de tautómeros de las bases,<sup>[18]</sup> los estudios experimentales y teóricos sugieren que los cationes interactúan principalmente con las bases en su forma canónica. Para la C, se ha reportado que los cationes alcalinos<sup>[25,26]</sup> interactúan principalmente en N3, mientras que para la  $\text{Ag}^+$ <sup>[27]</sup> y  $\text{Cu}^+$ <sup>[28]</sup> se ha encontrado que además interactúa parcialmente con el grupo C=O formando estructuras bidentadas entre el N3 y O de CKA(1). Además, la caracterización estructural de los complejos  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ <sup>[29,30]</sup> y  $[\text{C}_2\text{M}]^+$  ( $\text{M}=\text{Li}^+, \text{Na}^+, \text{K}^+$  y  $\text{Cu}^+$ )<sup>[28]</sup> reveló que las estructuras imitan un apareamiento de tipo *i-motif*, similar al encontrado en los dímeros de C hemiprotonada  $\text{C}-\text{H}^+-\text{C}$ <sup>[31]</sup> (Figura 1.7c en capítulo

1). Por su parte, para GKA(9) se ha encontrado que los cationes metálicos se unen a través del N7 y O.<sup>[32-36,38]</sup>

En el capítulo 3 de este trabajo de tesis se presentaron los resultados de la caracterización estructural del par HooH<sup>+</sup> que se forma a pH ácido (pH = 3,2).<sup>[39]</sup> Sin embargo, debe enfatizarse que, aunque existe una fuerte evidencia indirecta de la formación triplex estabilizados por metales a pH fisiológico,<sup>[5,14,39]</sup> no se dispone de una caracterización estructural directa del par Hoo mediado por metales.

Como se mencionó anteriormente, la naturaleza de las interacciones entre C y Ag<sup>+</sup> fue extensamente estudiada en la tesis del Dr. Berdakin y se caracterizaron las estructuras del complejo [CAg]<sup>+[27]</sup> y el homodímero [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+[29,30]</sup>. En este contexto, con el propósito de determinar si la interacción con Ag<sup>+</sup> favorece la formación del par de bases CG del tipo Hoo, en el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en el marco de una estrategia *bottom-up* para la caracterización estructural y energética de los complejos [GAg]<sup>+</sup> y [CGAg]<sup>+</sup>, en fase gaseosa, mediante espectrometría de masas en tándem acoplada a espectroscopia DMFIR, en complemento con cálculos de estructura electrónica.

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Detalles Experimentales

Los iones fueron generados en una fuente ESI a partir de dos soluciones en una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O milliQ 1:1. La primera de las soluciones (I) contenía 300 μM de AgNO<sub>3</sub> y 370 μM de G. La segunda solución (II) contenía cantidades equimolares de G y C (370 μM) + 300 μM de AgNO<sub>3</sub>.

Para llevar a cabo los experimentos de espectroscopia DMFIR se empleó el espectrómetro de masas 7T FT-ICR<sup>[40]</sup> (descrito en la sección 2.6.1). Inicialmente, los iones [GAg]<sup>+</sup> y [CGAg]<sup>+</sup> fueron aislados en la interfaz cuadrupolar del 7T FT-ICR, a partir de las soluciones (I) y (II), respectivamente. Una vez aislados los iones de interés, estos son transferidos hacia la trampa hexapolar donde fueron acumulados y termalizados por colisiones con Ar. Finalmente, los iones termalizados fueron transferidos por un sistema de lentes electrostáticas hacia la celda de ICR, en donde fueron fragmentados por DMFIR en el intervalo de 1200–1850 cm<sup>-1</sup> con el FEL,

asistido por un láser de CO<sub>2</sub>. Los iones [GAg]<sup>+</sup> se irradiaron por 3 s con fotones IR-FEL y durante 7 ms con el láser de CO<sub>2</sub> para mejorar la eficiencia de fragmentación. Por su parte, los iones de [CGAg]<sup>+</sup> se irradiaron por 820 ms con fotones del IR FEL y 6 ms con el láser de CO<sub>2</sub>. Los espectros DMFIR se obtuvieron como la eficiencia de fragmentación (*eff*), en función de la frecuencia del láser, calculada de acuerdo con la ecuación (2.14).

#### 4.2.2 Detalles computacionales

Todos los cálculos para los diferentes isómeros de los complejos de [GAg]<sup>+</sup> y [CGAg]<sup>+</sup> se realizaron a nivel DFT con Gaussian 09 Revisión E. 01.<sup>[41]</sup> Las geometrías fueron optimizadas empleando el funcional híbrido de correlación e intercambio B3LYP<sup>[42]</sup> y el conjunto de bases 6-311G++(d,p) para los átomos de C, H, O, N, mientras que para Ag<sup>+</sup> se usó el pseudo-potencial de core efectivo SDD.<sup>[43]</sup> Todas las optimizaciones para los complejos [GAg]<sup>+</sup> y [CGAg]<sup>+</sup> se realizaron sobre SEPs corregidas por el método de counterpoise.<sup>[44]</sup>

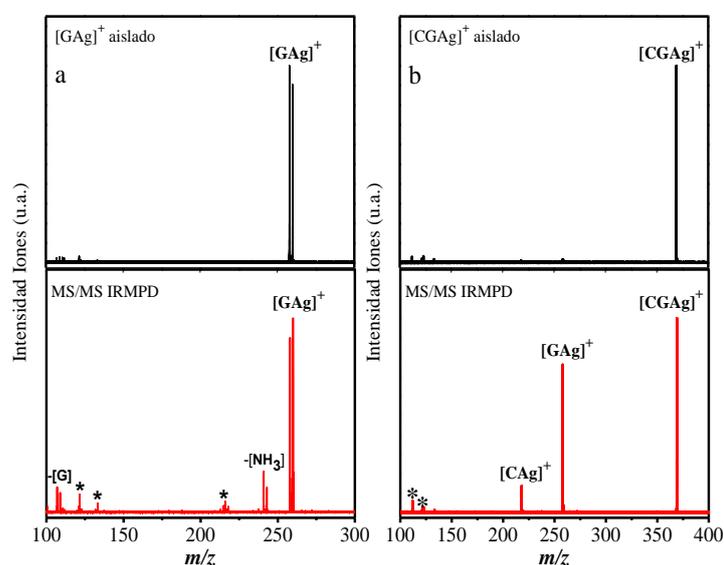
Los cálculos de los espectros de absorción monofotónica IR para cada uno de los mínimos locales encontrados en la SEP se realizaron al mismo nivel de teoría. Las frecuencias de vibración se corrigieron con un factor de 0,98 considerado el valor más apropiado para el nivel de teoría empleado.<sup>[29,45]</sup> Para una mejor comparación con los espectros de DMFIR, el espectro calculado fue convolucionado con perfiles gaussianos suponiendo un ancho de banda de 10 cm<sup>-1</sup>, que corresponde al ancho de banda del IR-FEL en la región espectral estudiada.

Las energías libres de Gibbs estándar relativas ( $\Delta G_{\text{rel}}^{\circ}$ ) para los diferentes isómeros de los complejos [GAg]<sup>+</sup> y [CGAg]<sup>+</sup>, incluyendo las correcciones de ZPE se calcularon a 298 K con el mismo nivel de teoría. Esta temperatura es comparable a la establecida para colisiones múltiples con Ar en la trampa de iones hexapolar del espectrómetro de masas híbrido 7T FT-ICR.<sup>[39,40,46]</sup> Finalmente, el efecto del solvente sobre la estabilidad de los diferentes isómeros de los complejos [GAg]<sup>+</sup> y [CGAg]<sup>+</sup> se evaluó mediante el método de campo de reacción autoconsistente (SCRf, por sus siglas en inglés). En este trabajo utilizamos el modelo continuo polarizable (PCM)<sup>[47]</sup> y agua como solvente.

Los detalles respecto a la nomenclatura empleada han sido descritos en capítulos anteriores. Aquí los números entre paréntesis indican el tautómero de la base, por ejemplo GKA(9), corresponde a G en su estado tautomérico K(ceto) A(amino) con un H en el N(9). Mientras que los sitios de interacción con la Ag<sup>+</sup> se indican sin paréntesis, por ejemplo GKA(9)N7Ag<sup>+</sup>, indica que el catión Ag<sup>+</sup> interacciona con el N7 de la G en su estado KA, con un H en el N(9)

### 4.3 Resultados y discusión

Los espectros de masas obtenidos luego de aislar los iones [GAg]<sup>+</sup> y [CGAg]<sup>+</sup> de  $m/z= 257,95$  y  $369,01$  respectivamente, se muestran en los paneles superiores de las Figuras 4.2a y 4.2b. De acuerdo al patrón isotópico característico de Ag (<sup>107</sup>Ag (51,8%) y <sup>109</sup>Ag (49,2%)), los complejos formados pueden identificarse sin ambigüedad. Para el complejo [GAg]<sup>+</sup> se observan en el espectro de masas los dos isótopos de la Ag, posiblemente como consecuencia de un error en el aislamiento. Por su parte, para el complejo [CGAg]<sup>+</sup> se aisló un único ion padre correspondiente al isótopo de <sup>107</sup>Ag.



**Figura 4.2:** Espectros de masas de los iones a) [GAg]<sup>+</sup> y b) [CGAg]<sup>+</sup> aislados (panel superior), y después de la fragmentación por DMFIR en el rango espectral 1600–1730 cm<sup>-1</sup> (paneles inferiores).

Por un lado, la fragmentación del complejo  $[\text{GAg}]^+$  después de la irradiación con fotones IR-FEL en resonancia con un modo activo del ión conduce principalmente a la pérdida de  $\text{NH}_3$ , produciendo el fragmento  $[\text{C}_5\text{H}_2\text{N}_4\text{O-Ag}]^+$  ( $m/z$  241,9) como se muestra en la Figura 4.2a (panel inferior), este canal ya ha sido observado previamente por CID y DMFIR para el complejo formado entre cisplatino y guanina.<sup>[34,48]</sup> Adicionalmente, en el espectro MS/MS se observa el ion  $\text{Ag}^+$ , como consecuencia de la pérdida de G neutra. Finalmente, los fragmentos señalados con \* en la Figura 4.2a no presentan dependencia con la longitud de onda del láser, por lo tanto no son considerados como productos de fotofragmentación; es posible que su presencia se deba a procesos de fragmentación por colisiones o recombinación de fragmentos.

Por su parte, en la Figura 4.2b (panel inferior) se observa que la fragmentación del complejo  $[\text{CGAg}]^+$  después de la irradiación con fotones IR-FEL en resonancia con un modo activo del ion padre, produce principalmente los fragmentos de  $[\text{CAg}]^+$  y  $[\text{GAg}]^+$  en una relación 14(%):86(%), como consecuencia de la pérdida de G y C neutras, respectivamente. De acuerdo a los resultados presentados en el capítulo 3, el patrón de fragmentación observado, es equivalente al obtenido para la fragmentación del par protonado  $[\text{CGH}]^+$ , en el cual se observan los fragmentos de  $[\text{CH}]^+$  y  $[\text{GH}]^+$ .<sup>[39]</sup> Finalmente, no se observó dependencia con la longitud de onda del láser para los fragmentos señalados con \* en la Figura 4.2b, por lo que no son considerados como productos de la fragmentación.

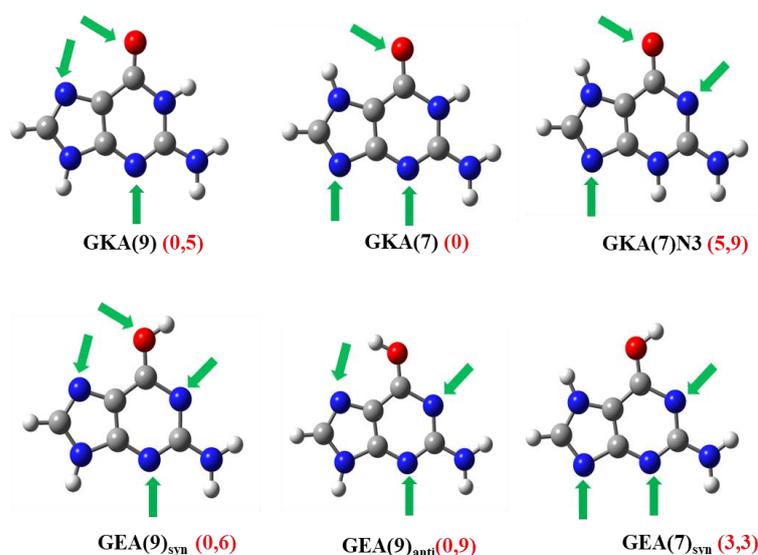
Para obtener los espectros DMFIR de los complejos  $[\text{GAg}]^+$  y  $[\text{CGAg}]^+$ , se consideraron los dos canales de fragmentación observados y se calculó la eficiencia de fragmentación (*eff*) en función de la longitud de onda del láser ( $1200\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$ ), de acuerdo a la ecuación (2.14).

### 4.3.1 Caracterización estructural de los complejos $[\text{GAg}]^+$ y $[\text{CGAg}]^+$

La asignación estructural de los complejos  $[\text{GAg}]^+$  y  $[\text{CGAg}]^+$  se basa en la comparación de los espectros DMFIR con los espectros de absorción IR simulados para las posibles estructuras que pueden adoptar.

#### 4.3.1.1 Complejo [GAg]<sup>+</sup>

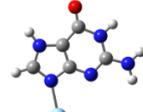
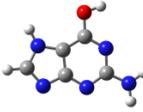
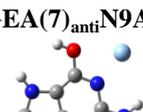
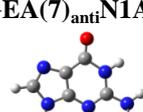
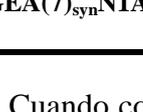
En la Figura 4.3 se muestran las estructuras de los 6 tautómeros de G que se encuentran por debajo de 6 kcal/mol, de acuerdo a los datos reportados previamente<sup>[16-24]</sup> y que fueron considerados en este estudio. Además se indican los sitios con mayor densidad de carga negativa donde se espera que interactúe la Ag<sup>+</sup> para formar los complejos [GAg]<sup>+</sup>.



**Figura 4.3:** Estructuras de la G neutra consideradas en este estudio. Las flechas verdes indican los sitios de interacción con la Ag<sup>+</sup>, los tautómeros EA pueden adoptar una conformación *anti* o *syn* en función de la orientación del H del grupo OH. En paréntesis se muestran las energías relativas de los tautómeros en kcal/mol, tomados de la referencia [17].

En la tabla 4.1 se presentan los resultados obtenidos para las estructuras del complejo [GAg]<sup>+</sup>. Los cálculos indican que el mínimo global corresponde a [GKA(9)N7Ag]<sup>+</sup>, una estructura plana en la cual el catión Ag<sup>+</sup> se une al N7 del tautómero KA(9) de G. Mientras que el segundo mínimo se encuentra a 8,2 kcal/mol por encima del mínimo global y corresponde al isómero [GKA(7)N9Ag]<sup>+</sup>, en el cual la Ag<sup>+</sup> se une al N9 del tautómero KA(7) de G. Los N7 y N9 de los tautómeros GKA(9) y GKA(7), respectivamente, son los que presentan mayor afinidad por cationes metálicos.<sup>[32-35]</sup> Los resultados son consistentes con los reportados por Russo *et al.*<sup>[35]</sup> para los cationes Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> que se unen a la G a través del N7. El tautómero GKA(9) se ve fuertemente estabilizado por la interacción con Ag<sup>+</sup> respecto a los demás tautómeros de G (Figura 4.3).<sup>[17]</sup>

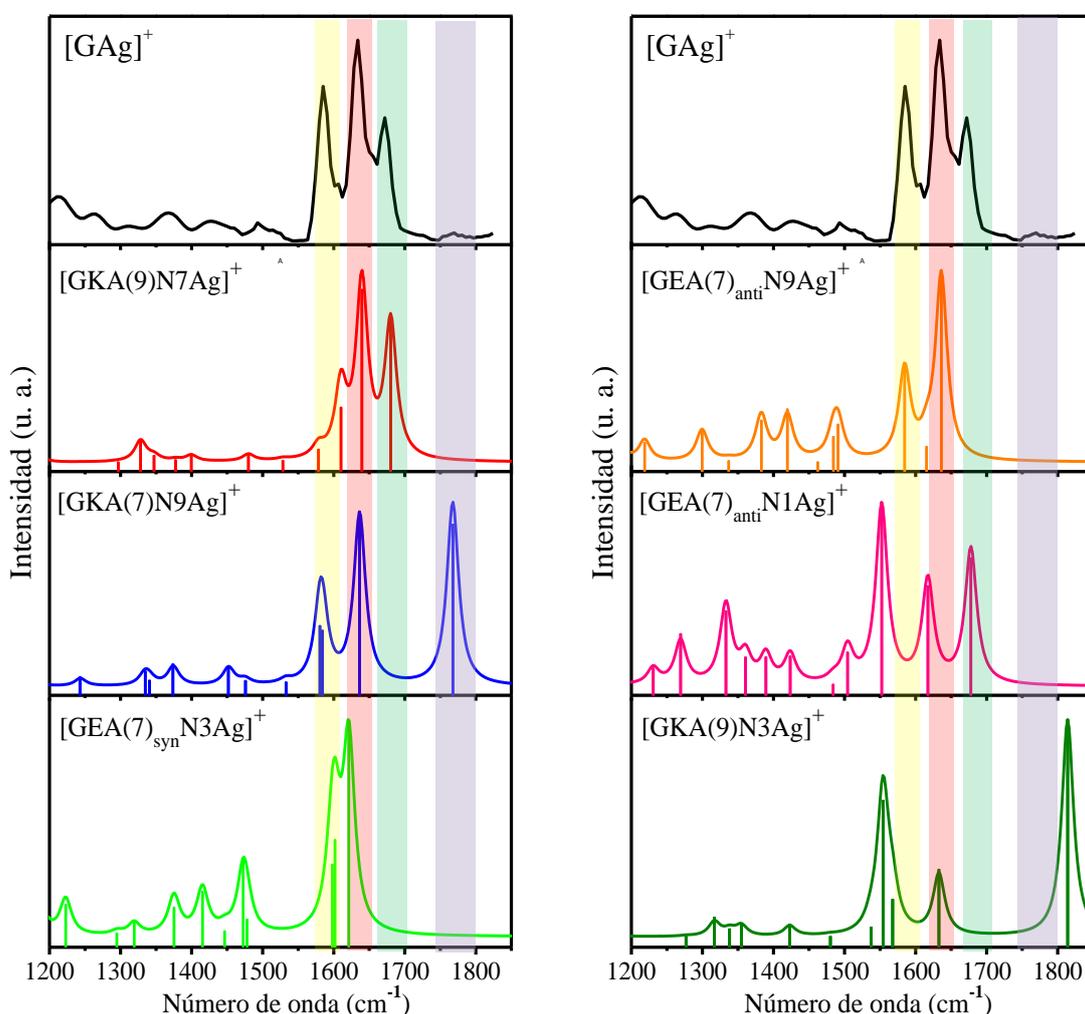
**Tabla 4.1.** Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^\circ_{298K}$ ) para los isómeros del complejo  $[GAg]^+$  en fase gaseosa y la corrección de las energías relativas considerando el efecto del solvente (PCM). Las poblaciones relativas (P.R) se calcularon suponiendo una distribución de Maxwell-Boltzmann, considerando que la temperatura de los iones es  $\approx 298$  K.[46]

Estructura	Fase gaseosa			PCM (agua)		
	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.
 [GKA(9)N7Ag] <sup>+</sup>	0	0	1	0	0	1
 [GKA(7)N9Ag] <sup>+</sup>	8,10	8,10	$1,14 \times 10^{-6}$	0,73	0,83	0,24
 [GKA(7)N9Ag] <sup>+</sup>	10,80	10,71	$1,3 \times 10^{-8}$	9,66	9,89	$5,4 \times 10^{-8}$
 [GEA(7) <sub>syn</sub> -N3Ag] <sup>+</sup>	19,08	18,64	$2,13 \times 10^{-14}$	11,20	10,80	$1,19 \times 10^{-8}$
 [GEA(7) <sub>anti</sub> -N9Ag] <sup>+</sup>	27,57	27,50	$6,77 \times 10^{-21}$	15,10	14,92	$1,14 \times 10^{-11}$
 [GEA(7) <sub>anti</sub> -N1Ag] <sup>+</sup>	30,67	30,50	$4,27 \times 10^{-23}$	13,04	13,04	$2,73 \times 10^{-10}$
 [GKA(9)N3Ag] <sup>+</sup>	33,10	33,80	$1,62 \times 10^{-25}$	15,20	16,57	$7,03 \times 10^{-13}$
 [GEA(7) <sub>syn</sub> -N1Ag] <sup>+</sup>						

Cuando consideramos el efecto del solvente de forma implícita el isómero con mayor momento dipolar ( $[GKA(7)N9Ag]^+$ ;  $\mu = 3.96$  D) se ve fuertemente estabilizado en solución, volviéndose prácticamente isoenergético con el mínimo

global, por lo que se espera que en la solución se forme una población significativa de este isómero.

El espectro DMFIR del complejo [GAg]<sup>+</sup> registrado entre 1200–1850 cm<sup>-1</sup> se presenta en la Figura 4.4, junto a los espectros calculados para los seis isómeros de menor energía presentados en la Tabla 4.1. En él se observan tres características espectrales bien definidas (señaladas en barras de color) en la región de 1550–1700 cm<sup>-1</sup>, una serie de bandas de menor intensidad a menores frecuencias (1200–1500 cm<sup>-1</sup>), mientras que a 1769 cm<sup>-1</sup> se distingue una banda de baja intensidad.



**Figura 4.4:** Espectro DMFIR del ión padre [GAg]<sup>+</sup> ( $m/z$  257,95) (paneles superiores) obtenidos a partir de la solución I, por irradiación con fotones IR-FEL durante un período de 3s más 7 ms de irradiación con el láser de CO<sub>2</sub>. Los paneles inferiores muestran los espectros vibracionales calculados a nivel B3LYP/6-311G++(d,p)//SDD para los isómeros de menor energía presentados en la Tabla 4.1.

La comparación del espectro DMFIR del complejo  $[\text{GAg}]^+$  con los espectros simulados para los seis isómeros de menor energía permitió realizar la asignación de las estructuras que se forman a partir de la interacción entre G y  $\text{Ag}^+$ .

De acuerdo a esta comparación, la banda más intensa localizada a  $1634\text{ cm}^{-1}$ , asignada al modo de flexión del grupo  $\text{NH}_2$ , podría corresponder a cualquiera de los tres isómeros más estables (columna izquierda en la Figura 4.4). Sin embargo, el isómero  $[\text{GEA}(7)_{\text{syn}}\text{N3Ag}]^+$  es muy poco estable y sus poblaciones tanto en fase gaseosa como en solución son despreciablemente bajas para ser considerado como responsable de dicha banda. El resto de isómeros mostrados en la columna derecha de la Figura 4.4 son aún menos estables que el anterior por lo que tampoco se considerarán en la asignación.

Por lo tanto, solo quedan los isómeros  $[\text{GKA}(9)\text{N7Ag}]^+$  y  $[\text{GKA}(7)\text{N9Ag}]^+$  como posibles candidatos para la asignación del espectro DMFIR observado. En el caso del isómero  $[\text{GKA}(7)\text{N9Ag}]^+$  su estabilidad en la fase gaseosa conduce a una baja población del mismo. Sin embargo, en solución se espera que su población sea aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de la población del isómero  $[\text{GKA}(9)\text{N7Ag}]^+$ . Por lo tanto, el confirmar su presencia en la fase gaseosa sería una evidencia directa de que la vaporización por ESI conserva la memoria de la composición y estructuras existentes en la solución.

En tal sentido, puede considerarse que la banda intensa que se observa a  $1672\text{ cm}^{-1}$  en el espectro DMFIR y el hombro que se observa a  $1607\text{ cm}^{-1}$  son bandas diagnósticas de la presencia del isómero  $[\text{GKA}(9)\text{N7Ag}]^+$  ya que no están presentes en el otro isómero. Estas bandas corresponden al modo de estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  (calculada a  $1680\text{ cm}^{-1}$ ) y al estiramiento  $\text{C}-\text{N}$  (calculada a  $1610\text{ cm}^{-1}$ ) para este isómero.

Del mismo modo, la banda intensa observada a  $1585\text{ cm}^{-1}$  y la banda débil observada a  $1769\text{ cm}^{-1}$  en el espectro DMFIR se consideran diagnósticas de la presencia del isómero  $[\text{GKA}(7)\text{N9Ag}]^+$  ya que no se corresponden con ninguna de las bandas del otro isómero. La banda que se observa en el espectro DMFIR a  $1585\text{ cm}^{-1}$  es calculada a  $1584\text{ cm}^{-1}$  para el isómero  $[\text{GKA}(7)\text{N9Ag}]^+$  y corresponde a los modos de deformación del anillo en el plano, mientras que la banda observada a

1769 cm<sup>-1</sup> es calculada a 1768 cm<sup>-1</sup> corresponde al modo de estiramiento del grupo C=O del mismo isómero.

La intensidad de esta banda en el espectro DMFIR no se reproduce adecuadamente por el espectro IR monofotónico calculado. Sin embargo, es bien conocido que, en general, el modo C=O libre no se acopla adecuadamente con los otros modos vibracionales, lo cual dificulta la absorción multifotónica IR cuando el láser es sintonizado en la frecuencia de este modo, y como consecuencia los rendimientos de fragmentación son muy bajos conduciendo a bandas DMFIR de muy baja intensidad.<sup>[29,39,50]</sup>

Las frecuencias de los modos de estiramiento del grupo C=O para los dos isómeros [GKA(9)N7Ag]<sup>+</sup> (1680 cm<sup>-1</sup>) y [GKA(7)N9Ag]<sup>+</sup> (1768 cm<sup>-1</sup>) presentan grandes corrimientos uno con respecto al otro, como así también respecto a los correspondientes tautómeros GKA(9) (1790 cm<sup>-1</sup>) y GKA(7) (1730 cm<sup>-1</sup>) libres, debido a las diferentes interacciones del catión Ag<sup>+</sup> con el grupo C=O en ambos isómeros.

En el isómero [GKA(9)N7Ag]<sup>+</sup>, el corrimiento de la frecuencia del C=O (1680 cm<sup>-1</sup>) hacia el rojo con respecto a la de GKA(9) (1790 cm<sup>-1</sup>) libre resulta razonable pues el catión Ag<sup>+</sup> unido al N7 interactúa parcialmente con el O de aquel grupo (d N7–Ag<sup>+</sup> 2,29 Å y O–Ag<sup>+</sup> 2,42 Å) disminuyendo la densidad de carga en el enlace C=O y produciendo un aumento en su distancia de enlace de 1,213 Å en GKA(9) libre a 1,240 Å en el complejo con Ag<sup>+</sup>.

En el caso del isómero [GKA(7)N9Ag]<sup>+</sup> esta banda se encuentra desplazada hacia el azul (1768 cm<sup>-1</sup>) respecto a la GKA(7) libre (1730 cm<sup>-1</sup>). En este caso el corrimiento es mucho menos pronunciado que en el caso anterior debido a que el catión Ag<sup>+</sup> se encuentra en el lado opuesto al grupo C=O evitando cualquier tipo de interacción entre ambos. El corrimiento débil observado hacia el azul puede ser debido a una redistribución de la densidad de carga por la presencia del catión Ag<sup>+</sup> en las cercanías del tautómero GKA(7), lo cual fortalece el enlace C=O produciendo un acortamiento del mismo desde 1,222 Å en GKA(7) libre a 1,207 Å en el complejo con Ag<sup>+</sup>.

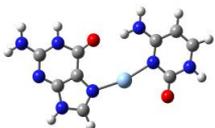
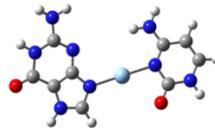
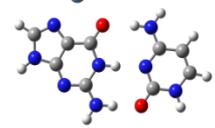
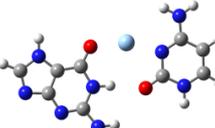
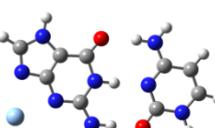
El análisis energético y estructural de los complejos de  $[GAg]^+$  presentados en la Tabla 4.1, nos permite descartar la presencia de los isómeros;  $[GEA(7)_{syn}N3Ag]^+$ ,  $[GEA(7)_{anti}N9Ag]^+$ ,  $[GEA(7)_{anti}N1Ag]^+$ ,  $[GKA(9)N3Ag]^+$  y  $[GEA(7)_{syn}N1Ag]^+$ . En primer lugar, porque estas estructuras se encuentran muy por encima en energía, respecto del mínimo global y por lo tanto las poblaciones relativas esperadas son despreciables tanto en fase gaseosa como en solución. En segundo lugar, los espectros calculados para estas estructuras difieren significativamente del espectro DMFIR (Figura 4.4). En consecuencia, la asignación del espectro DMFIR se realizó considerando los isómeros  $[GKA(9)N7Ag]^+$  y  $[GKA(7)N9Ag]^+$  para los cuales se encontraron bandas características que confirman su presencia.

Como se mencionó anteriormente y se muestra en la Tabla 4.1, la población de equilibrio calculada en la fase gaseosa para el isómero  $[GKA(7)N9Ag]^+$  a la temperatura de trabajo es despreciable frente a la del isómero  $[GKA(9)N7Ag]^+$ . Sin embargo, su población de equilibrio en solución es considerablemente mayor debido a la estabilización preferencial de este isómero por el solvente. El hecho de que el isómero  $[GKA(7)N9Ag]^+$  haya sido observado en la fase gaseosa permite sugerir que la vaporización por ESI conserva la memoria de la composición y estructuras existentes en la solución, como se observó en capítulos anteriores.

#### 4.3.1.2 Complejo $[CGAg]^+$

La búsqueda de las estructuras que se pueden formar a partir de la interacción entre la C y G en presencia de  $Ag^+$ , se basó en la consideración de las estructuras más estables encontradas para el complejo  $[GAg]^+$ , para el cual en los dos isómeros observados la G se encuentra en su forma tautomérica KA, como así también en lo que se conoce de trabajos previos sobre la interacción de C con  $Ag^+$ .<sup>[27,29]</sup> En este último caso se observó que CKA(1) interacciona de forma específica con  $Ag^+$  en N3 y O. En ese sentido, en el presente capítulo centramos el interés particularmente en la posibilidad de formación de estructuras de tipo WC y Hoo, teniendo en cuenta las consideraciones del párrafo anterior, ya que estas estructuras están involucradas en la estabilización de plegamientos no canónicos del ADN. En la Tabla 4.2 se presentan los resultados obtenidos para las posibles estructuras de tipo Hoo y WC que se pueden formar en presencia de  $Ag^+$ .

**Tabla 4.2.** Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE), y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^{\circ}_{298K}$ ) para los isómeros [CGAg]<sup>+</sup> en fase gaseosa, y la corrección de las energías relativas considerando el efecto del solvente (PCM). Las poblaciones relativas (P.R) se calcularon suponiendo una distribución de Maxwell-Boltzmann, considerando que la temperatura de los iones es  $\approx 298$  K[39,40,46].

Estructura	Fase gaseosa			PCM (agua)		
	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^{\circ}_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^{\circ}_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.
 Hoo[C-Ag-G] <sup>+</sup>	0	0	1	0	0	1
 Hoo[C-Ag-G*] <sup>+</sup>	7,29	5,85	5,12x10 <sup>-5</sup>	2,43	1,50	7,90x10 <sup>-2</sup>
 WC[CKA(1)GKA(9)N7Ag] <sup>+</sup>	17,31	17,43	1,64x10 <sup>-13</sup>	10,00	10,47	2,05x10 <sup>-8</sup>
 WC [CKA(1)GKA(7)OAg] <sup>+</sup>	17,44	17,21	2,38x10 <sup>-13</sup>	9,03	8,96	2,66x10 <sup>-7</sup>
 WC[CKA(1)GKA(7)N3Ag] <sup>+</sup>	22,45	22,39	3,79x10 <sup>-17</sup>	11,82	11,03	8,10x10 <sup>-9</sup>
 WC[CKA(1)OAgGKA(7)] <sup>+</sup>	24,54	25,03	4,39x10 <sup>-19</sup>	17,15	17,23	2,26x10 <sup>-13</sup>

Los cálculos indican que el mínimo global corresponde al isómero tipo Hoo [C-Ag-G]<sup>+</sup>, una estructura plana en la cual el catión Ag<sup>+</sup> se sitúa en medio de las bases en la forma KA a través de los N(3)C y N(7)G en acuerdo con los resultados de

cálculos reportados por Müller *et al.*<sup>[49]</sup> Esta estructura es equivalente a la encontrada en el capítulo 3 para el par [CGH]<sup>+</sup> a pH = 3,2,<sup>[39]</sup> en el cual el H<sup>+</sup> ocupaba el lugar de Ag<sup>+</sup>. A diferencia de lo observado en el par [CGH]<sup>+</sup> en el cual el H<sup>+</sup> se encuentra deslocalizado entre las dos bases dando lugar a dos mínimos uno con el H<sup>+</sup> sobre N(3)C y otro con el H<sup>+</sup> sobre N(7)G, la interacción con Ag<sup>+</sup> estabiliza fuertemente una única estructura en la cual el catión Ag<sup>+</sup> se encuentra equidistante entre ambas bases (dN7G—Ag<sup>+</sup>=2,14 Å y dN3C—Ag<sup>+</sup>=2,15Å), por lo tanto se espera que el par de bases tipo Hoo mediado por Ag<sup>+</sup> sea más rígido que el correspondiente par mediado por H<sup>+</sup>.

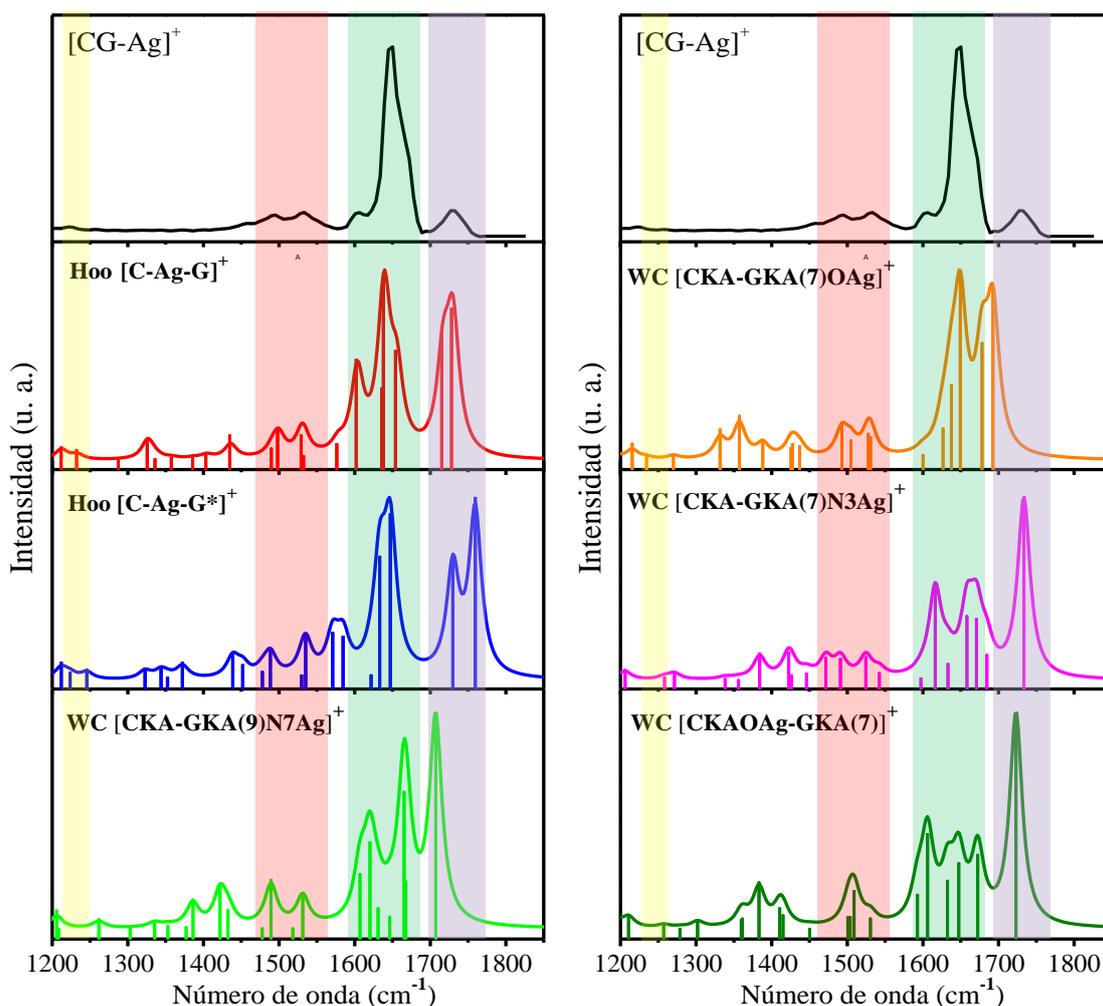
La segunda especie más estable corresponde al isómero Hoo inverso [C-Ag-G\*]<sup>+</sup> (\*indica que la interacción se produce entre el N(9)G y N(3)C) en el cual la G se encuentra en la forma K(7) y en consecuencia el catión Ag<sup>+</sup> se une al N9, por lo tanto la formación del par tipo Hoo se da a través de N(9)G—Ag<sup>+</sup>—N(3)C. Esta estructura se encuentra 7,29 kcal/mol por encima del mínimo y es ligeramente asimétrica. La pérdida de estabilidad en el isómero Hoo [C-Ag-G\*]<sup>+</sup>, se produce como consecuencia de la pérdida de la interacción por puente de hidrogeno entre el grupo NH<sub>2</sub> de C y el C=O de G. Por otro lado, el análisis estructural y energético de la sección anterior permite sugerir que la interacción por el N9 de la G es ligeramente desfavorable frente a la interacción a través del N7.

El momento dipolar del isómero Hoo [C-Ag-G\*]<sup>+</sup> (μ=7,86 D) es mayor que el momento dipolar del isómero Hoo [C-Ag-G]<sup>+</sup> (μ=5,57 D), por lo cual como era de esperarse, el isómero Hoo [C-Ag-G\*]<sup>+</sup> es más fuertemente estabilizado por el solvente que el isómero Hoo [C-Ag-G]<sup>+</sup>.

El isómero WC[CKA(1) GKA(9)N7Ag]<sup>+</sup> es el más estable dentro los isómeros tipo WCAg<sup>+</sup>. Sin embargo, se encuentra 17 kcal/mol por encima del mínimo global (Tabla 4.2). En términos generales, la diferencia de energía entre los isómeros tipo WCAg<sup>+</sup> y los isómeros HooAg<sup>+</sup> es mayor que la diferencia de energía entre los WCH<sup>+</sup> y los HooH<sup>+</sup> estudiados en el capítulo 3.<sup>[39]</sup> En ese sentido, las poblaciones relativas de los isómeros WCAg<sup>+</sup> son despreciables respecto a las de los isómeros HooAg<sup>+</sup>, tanto en fase gaseosa como en solución (Tabla 4.2).

El espectro DMFIR del complejo [CGAg]<sup>+</sup> registrado entre 1200 y 1850 cm<sup>-1</sup> se presenta en la Figura 4.5, junto a los espectros calculados para los isómeros

presentados en la Tabla 4.2. En él se observan tres características espectrales bien definidas: una banda de intensidad media en la región espectral donde se esperan los modos de estiramiento del grupo C=O (1700–1750 cm<sup>-1</sup>), una banda intensa y asimétrica centrada a 1648 cm<sup>-1</sup> con un hombro a 1603 cm<sup>-1</sup> en la región espectral donde se esperan los modos de flexión del grupo NH<sub>2</sub> (1600–1700 cm<sup>-1</sup>) y finalmente, una serie de bandas de menor intensidad a menores frecuencias (1450–1550 cm<sup>-1</sup>).



**Figura 4.5:** Espectro DMFIR del ión padre [CGAg]<sup>+</sup> ( $m/z$  369,02) (paneles superiores) obtenidos a partir de la solución II, por irradiación con fotones IR-FEL durante un período de 820 ms más 6 ms de irradiación con el láser de CO<sub>2</sub>. Los paneles inferiores muestran los espectros vibracionales calculados a nivel B3LYP/6-311G++(d,p)//SDD para los isómeros de menor energía presentados en la Tabla 4.2.

Al igual que en el caso del complejo de  $[\text{GAg}]^+$ , se descartan de la asignación los isómeros  $\text{WCAg}^+$  en primer lugar, porque estas estructuras se encuentran muy por encima en energía, respecto del mínimo global y por lo tanto las poblaciones relativas esperadas son despreciables tanto en fase gaseosa como en solución y en segundo lugar, porque los espectros calculados para estas estructuras difieren significativamente del espectro DMFIR del complejo  $[\text{CGAg}]^+$  (Figura 4.5).

El isómero Hoo  $[\text{C-Ag-G}^*]^+$  cuya población es despreciable en fase gaseosa y dos órdenes de magnitud menor que la del isómero Hoo  $[\text{C-Ag-G}]^+$  en fase acuosa, no presenta ninguna banda característica en el espectro de DMFIR, tal como el desdoblamiento de la banda correspondiente a los grupos  $\text{C=O}$  de C y G, lo cual no nos permite aseverar su presencia.

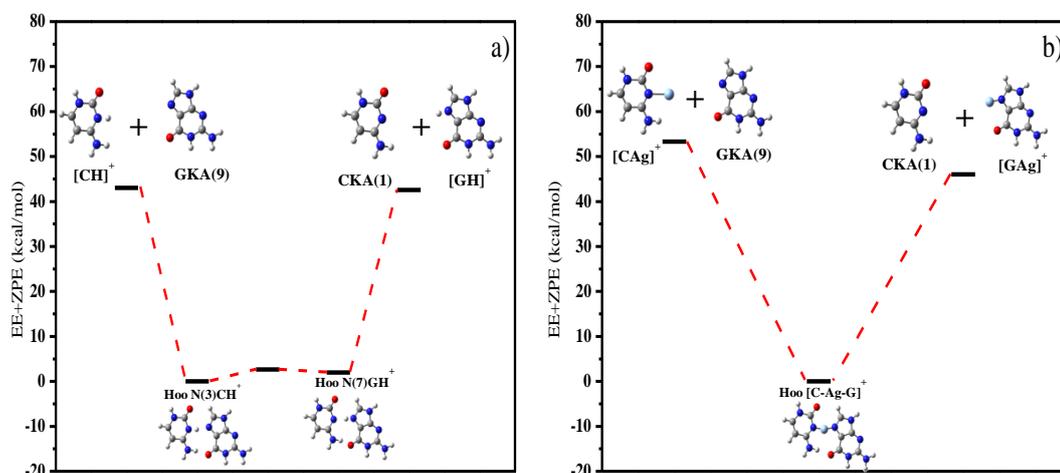
En contraste con lo observado para el complejo  $[\text{GAg}]^+$ , todas las bandas del espectro de DMFIR del par  $[\text{CGAg}]^+$  pueden ser asignadas considerando sólo el isómero más estable Hoo  $[\text{C-Ag-G}]^+$ . El espectro calculado para el isómero Hoo  $[\text{C-Ag-G}]^+$  está en muy buen acuerdo con el espectro DMFIR, incluso los detalles finos del espectro son muy bien reproducidos y no es necesario considerar otro isómero para realizar la asignación espectral.

La banda ancha observada entre  $1700$  y  $1750\text{ cm}^{-1}$  y centrada a  $1730\text{ cm}^{-1}$  es asignada a los estiramientos  $\text{C=O}$  de  $\text{CKA}(1)$  y  $\text{GKA}(9)$  del isómero Hoo  $[\text{C-Ag-G}]^+$  cuyas frecuencias son calculadas a  $1728$  y  $1715\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Asimismo, en la región comprendida entre  $1660$  y  $1630\text{ cm}^{-1}$  se observan dos bandas calculadas a  $1653$  y  $1638\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a los modos de flexión de los grupos  $\text{NH}_2$  para  $\text{CKA}(1)$  y  $\text{GKA}(9)$ , respectivamente. La convolución de estas dos bandas, con un ancho espectral de  $10\text{ cm}^{-1}$ , da como resultado una única banda centrada a  $1643\text{ cm}^{-1}$  que se ajusta muy bien a la observada en el espectro de DMFIR a  $1645\text{ cm}^{-1}$ . El hombro que aparece en el espectro DMFIR a  $1603\text{ cm}^{-1}$  es asignado al modo de estiramiento del enlace  $\text{C-N}$  de  $\text{GKA}(9)$ , cuya frecuencia es calculada a  $1601\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, las bandas débiles que se observan en el espectro DMFIR entre  $1450$ – $1550\text{ cm}^{-1}$  son asignadas a las deformaciones en el plano de los anillos de ambas bases.

Las frecuencias correspondientes a los modos de estiramiento de los enlaces  $\text{C=O}$  para  $\text{CKA}(1)$  ( $1728\text{ cm}^{-1}$ ) y para  $\text{GKA}(9)$  ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ) en el isómero

[C-Ag-G]<sup>+</sup> se encuentran desplazadas hacia menores frecuencias respecto a las frecuencias asignadas a los modos de estiramiento C=O calculadas para los isómeros tipo HooH<sup>+</sup> (1848 cm<sup>-1</sup> C=O CKA(1) y 1750 cm<sup>-1</sup> C=O GKA(9)) formados a partir de la interacción entre la C/G y H<sup>+</sup> (capítulo 3).<sup>[39]</sup> El desplazamiento del C=O tanto de C, como de G, resulta razonable, pues producto de la interacción con el catión Ag<sup>+</sup> se observa una disminución de la densidad de carga en el enlace C=O para C y G, produciendo un aumento en la distancia de enlace, desde 1.200Å (dC=O (C)) y 1,213Å (dC=O (G)), hasta 1,216Å (dC=O (C)) y 1,226Å (dC=O (G)) para el isómero Hoo [C-Ag-G]<sup>+</sup>.

La fragmentación del complejo HooAg<sup>+</sup> (Figura 4.2b) conduce principalmente a los fragmentos de [GAg]<sup>+</sup> (86%) y [CAg]<sup>+</sup> (14%), en contraste con lo observado para el isómero HooH<sup>+</sup> (pH=3,2),<sup>[37]</sup> estudiado en el capítulo 3, el cual fragmenta a [CH]<sup>+</sup> (66%) y [GH]<sup>+</sup> (34%). Dicho comportamiento puede ser explicado a partir de la comparación de las energías de disociación de los isómeros HooAg<sup>+</sup> y HooH<sup>+</sup> (Figura 4.6).



**Figura 4.6:** Energías de disociación de los pares de bases tipo Hoogsteen. a) HooH<sup>+</sup> y b) HooAg<sup>+</sup>.

En el caso del par protonado HooH<sup>+</sup> ambos canales de fragmentación son casi isoenergéticos (43,5 kcal para [CH]<sup>+</sup> + GKA(9) y 42,53 kcal/mol para [GH]<sup>+</sup> + CKA(1)), por lo cual, los rendimientos de cada fragmento están determinados por la

estabilidad relativa de los isómeros  $\text{HooH}^+$  ( $\text{Hoo N(3)CH}^+$  y  $\text{Hoo N(7)GH}^+$ ), siendo el isómero con el  $\text{H}^+$  sobre el  $\text{N(3)C}$  el más estable y por lo tanto el rendimiento observado para el fragmento  $[\text{CH}]^+$  es mayor que el de  $[\text{GH}]^+$ .

Por su lado, la diferencia de energía entre los dos canales de fragmentación (53,5 kcal/mol para  $[\text{CAg}]^+ + \text{GKA(9)}$  y 46,0 kcal/mol para  $[\text{GAg}]^+ + \text{CKA(1)}$ ) del par  $\text{HooAg}^+$  es mayor que en el caso del par  $\text{HooH}^+$  y además el par  $\text{HooAg}^+$  presenta un único isómero, en el cual el catión  $\text{Ag}^+$  se encuentra equidistante entre ambas bases, por lo que el rendimiento de los ambos fragmentos está determinado por la energética del proceso de fragmentación, siendo más favorable el canal de formación de  $[\text{GAg}]^+ + \text{CKA(1)}$  y en consecuencia, este fragmento se observa mayoritariamente.

Los isómeros  $\text{WCAg}^+$  no son observados, a diferencia de los isómeros  $\text{WCH}^+$  que se observan preferencialmente a  $\text{pH} = 5,8$ .<sup>[39]</sup> En primer lugar, como se discutió anteriormente los isómeros  $\text{WCAg}^+$  son mucho menos estables ( $>17\text{kcal/mol}$ ) que los isómeros  $\text{HooAg}^+$ , en contraste con los isómeros  $\text{WCH}^+$  que se encuentran ligeramente por encima (5,3 kcal/mol) de los isómeros  $\text{HooH}^+$ . En segundo lugar, de acuerdo a las conclusiones obtenidas en el capítulo 3 el isómero  $\text{WCH}^+$  es formado por la protonación del par WC neutro en la fuente ESI ( $\text{pH} = 5,8$ ), mientras que para el caso de los complejos  $\text{WCAg}^+$ , la concentración de iones  $\text{Ag}^+$  presentes en la solución es lo suficientemente alta, por lo que se une a las bases en las posiciones de mayor afinidad bloqueando las interacciones que dan lugar al par WC y en consecuencia favoreciendo la formación de los pares tipo  $\text{HooAg}^+$ .

#### 4.4 Conclusiones

En el contexto de la búsqueda de las condiciones que favorecen la estabilización de triplex compuestos por C y G en condiciones fisiológicas, los resultados presentados en este capítulo representan un avance significativo en el propósito de comprender las propiedades intrínsecas de las bases que favorecen la formación de pares de bases no canónicos. La fuerte estabilidad del isómero  $\text{Hoo}$   $[\text{C-Ag-G}]^+$  frente a las estructuras  $\text{WCAg}^+$ , permite explicar porque en presencia de  $\text{Ag}^+$  se favorece fuertemente la formación de triplex  $\text{CGCAg}^+$  en condiciones de  $\text{pH}$  fisiológico.<sup>[4,5]</sup>

Los resultados presentados en el presente capítulo son evidencia de la interacción específica entre el catión Ag<sup>+</sup> y las bases del ADN, particularmente C y G. La caracterización estructural mediante espectroscopia DMFIR de iones aislados en fase gaseosa, en complemento con cálculos de estructura electrónica, nos permitió obtener las siguientes conclusiones:

1. La interacción con Ag<sup>+</sup> induce una fuerte estabilización en el tautómero de GKA(9), frente a los demás tautómeros (Figura 4.3). En ese sentido, la estructura asignada para el complejo [GAg]<sup>+</sup> corresponde al isómero [GKA(9)N7Ag]<sup>+</sup>, en el cual el catión Ag<sup>+</sup> interactúa simultáneamente con los átomos de N7 y O, lo que confirma la alta afinidad que presenta este esquema de interacción hacia los cationes metálicos predicha teóricamente por otros autores.<sup>[32-36,38]</sup> La formación y estabilización de este tipo de estructuras es de gran interés, ya que se encuentran vinculadas a muchos procesos relevantes a nivel biológico, entre ellos la formación de pares de bases de tipo Hoo y el mecanismo de acción del cisplatino.
2. Se encontró que la interacción con Ag<sup>+</sup> favorece ampliamente la formación de pares de bases no canónicos de tipo HooAg<sup>+</sup>, responsables de estabilizar los triplex de ADN, vinculados a muchos procesos de relevancia a nivel biológico.

## 4.5 Referencias

- [1]. Fukushima, K.; Iwahashi, H. 1:1 Complex of guanine quartet with alkali metal cations detected by electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Commun.* 2000, 11, 895–896.
- [2]. Koch, K. J. T.; Aggerholm, S. C.; Cooks, R.G. Clustering of nucleobases with alkali metals studied by electrospray ionization tandem mass spectrometry: implications for mechanisms of multistrand DNA stabilization. *J. Mass Spectrom.* 2002, 37, 676–686.
- [3]. Meyer, M.; Brand, M.; Sühnel, J. Are Guanine Tetrads Stabilized by Bifurcated Hydrogen Bonds?. *J. Phys. Chem. A.* 2001, 105, 8223–8225.
- [4]. Potaman, V.N.; Soyfer, V.N. Divalent metal cations upon coordination to the N7 of purines differentially stabilize the PyPuPu DNA triplex due to unequal Hoogsteen-type hydrogen bond. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1994, 11, 1035-1052.
- [5]. Toshihiro I.; Tatsuaki, I.; Norie, A.; Anthony, W.W.; Akinori, J. Silver Ion Unusually Stabilizes the Structure of a Parallel-Motif DNA Triplex. *J. Am. Chem Soc.* 2009, 131, 3826–3827.
- [6]. Guschlbauer, W.; Chantot, J.F.; Thiele, D.J. Four-stranded nucleic acid structures 25 years later: from guanosine gels to telomer DNA. *Biomol. Struct. Dyn.* 1990, 8, 491-511.
- [7]. Gabelica, V.; Rosu, F.; De Pauw, E.; Lemaire, J.; Gillet, J-C.; Pouilly, J-C.; Lecomte, Frederic.; Gregoire, G.; Schermann, J-P.; Desfrancois, C. Infrared Signature of DNA G-Quadruplexes in the Gas Phase. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, (6), 1810-1811.
- [8]. Luo, Y.; Li, R.; Wang, J.; Zhang, M.; Zou, L.; Ling, L. An Ag<sup>+</sup>-stabilized triplex DNA molecular switch controlled hybridization chain reaction. *Science China Chemistry.* 2017, 60(12), 1575–1580.
- [9]. Zhu, D.; Zhu, J.; Zhu, Y.; Wang, L.; Jiang, W. Sensitive detection of transcription factors using an Ag<sup>+</sup>-stabilized self-assembly triplex DNA molecular switch. *Chem. Commun.* 2014, 50(95), 14987–14990.

- [10]. Hao, P.; Xiaolei, Z.D.; Zhu, Q.H. Functional DNA Nanostructures for Theranostic Applications. *Acc. Chem. Res.* 2014, 472, 550-559
- [11]. Yunfang, X.; Lin, L.; Xiaojun, Z.; Guangfeng, W. Label-free electrochemiluminescent detection of transcription factors with hybridization chain reaction amplification. *RSC Adv.* 2016, 6, 37681-37688
- [12]. Singleton, S. F.; Dervan, P. B. Influence of pH on the Equilibrium Association Constants for Oligodeoxyribonucleotide-Directed Triple Helix Formation at Single DNA Sites. *Biochemistry.* 1992, 31, 10995–11003.
- [13]. Moser, H.E.; Dervan, P. B. Sequence-Specific Cleavage of Double Helical DNA by Triple Helix Formation. *Science.* 1987, 238, 645–650
- [14]. Swasey, S. M.; Leal, L. E.; Lopez-Acevedo, O.; Pavlovich, J.; Gwinn, E. G. Silver (I) as DNA glue: Ag<sup>+</sup>-mediated guanine pairing revealed by removing Watson-Crick constraints. *Scientific Reports.* 2015, 5(1), 10163/1-10163/9.
- [15]. Choi, M.Y.; Dong, F.; Miller, R.E. Multiple tautomers of cytosine identified and characterized by infrared laser spectroscopy in helium nanodroplets: probing structure using vibrational transition moment angles. *Phil Trans R Soc A.* 2005, 363, 393–413.
- [16]. de Vries, M.S. (2014) Gas-Phase IR Spectroscopy of Nucleobases. In: Rijs, A.; Oomens, J. (eds) *Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules. Topics in Current Chemistry*, vol 364. Springer, Cham.
- [17]. Boldissar, S.; de Vries, M. S. How nature covers its bases. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018, 20(15), 9701–9716.
- [18]. Shukla, M. K.; Leszczynski, J. Tautomerism in nucleic acid bases and base pairs: a brief overview. *WIREs Comput. Mol Sci.* 2013, 3, 637-649.
- [19]. Gorb, L.; Kaczmarek, A.; Gorb, A.; Sadlej, A.J.; Leszczynski, J. Thermodynamics and kinetics of intramolecular proton transfer in guanine. Post Hartree–Fock study. *J Phys Chem B.* 2005, 109:13770–13776.

- [20]. Nir, E.; Janzen, C.; Imhof, P.; Kleinermanns, K.; de Vries, M.S. Guanine tautomerism revealed by UV-UV and IR-UV hole burning spectroscopy. *J Chem Phys.* 2001, 115, 4604–4611.
- [21]. Choi, MY.; Miller, RE. Four tautomers of isolated guanine from infrared laser spectroscopy in helium nanodroplets. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 7320–7328.
- [22]. Leszczynski, J. The potential energy surface of guanine is not flat: an ab initio study with large basis sets and higher order electron correlation contributions. *J Phys Chem A.* 1998, 102, 2357–2362.
- [23]. Mons, M.; Piuzzi, F.; Dimicoli, I.; Gorb, L.; Leszczynski, J. Near-UV resonant two-photon ionization spectroscopy of gas phase guanine: Evidence for the observation of three rare tautomers. *J. Phys. Chem. A.* 2006, 110 (38), 10921–10924.
- [24]. Alonso, J. L.; Pena, I.; Lopez, J. C.; Vaquero, V. Rotational Spectral Signatures of Four Tautomers of Guanine. *Angew. Chem. Int Edit.* 2009, 048 (33), 6141–6143.
- [25]. Yang, B.; Wu, R.R.; Polfer, N.C.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M.T. IRMPD Action Spectroscopy of Alkali Metal Cation–Cytosine Complexes: Effects of Alkali Metal Cation Size on Gas Phase Conformation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013, 24, 10, 1523–1533.
- [26]. Yang, B.; Rodgers, M.T. Alkali metal cation binding affinities of cytosine in the gas phase: revisited. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 16110–16120
- [27]. Berdakin, M.; Steinmetz, V.; Maitre, P.; Pino, G.A. On the  $\text{Ag}^+$ –cytosine interaction: the effect of microhydration probed by IR optical spectroscopy and density functional theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17, 25915–25924.
- [28]. Gao, J.; Berden, G.; Rodgers, M.T.; Oomens, J. Interaction of  $\text{Cu}^+$  with cytosine and formation of i-motif-like  $\text{C}-\text{M}^+-\text{C}$  complexes: alkali versus coinage metals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, 18, 7269–7277.
- [29]. Berdakin, M.; Steinmetz, V.; Maitre, P.; Pino, G.A. Gas Phase Structure of Metal Mediated  $(\text{Cytosine})_2\text{Ag}^+$  Mimics the Hemiprotonated  $(\text{Cytosine})_2\text{H}^+$  Dimer in i-Motif Folding. *J. Phys. Chem. A.* 2014, 118, 3804–3809

[30]. Berdakin, M.; Féraud, G.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvet, C.; Pino, G.A., Effect of Ag<sup>+</sup> on the Excited-State Properties of a Gas-Phase (Cytosine)<sub>2</sub>Ag<sup>+</sup> Complex: Electronic Transition and Estimated Lifetime. *J. Phys. Chem. Lett.* 2014, 5, 2295–2301.

[31]. Yang, B.; Rodgers, M.T. 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.* 2013, 136, 282-290.

[32]. Koch, K.J.; Aggerholm, T.; Nanita, S.C.; Cooks, R.G. Clustering of nucleobases with alkali metals studied by electrospray ionization tandem mass spectrometry: implications for mechanisms of multistrand DNA stabilization. *J. Mass Spectrom.* 2002, 37(6), 676-686

[33]. Burda, J. V.; Sponer, J.; Hobza, P. Ab Initio Study of the Interaction of Guanine and Adenine with Various Mono- and Bivalent Metal Cations (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>; Cu<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Au<sup>+</sup>; Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup>). *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 7250–7255

[34]. Chiavarino, B.; Crestoni, M.E.; Fornarini, S.; Scuderi, Debora.; Salpin, J-Y. Interaction of Cisplatin with Adenine and Guanine: A combined IRMPD, MS/MS, and Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 4, 1445-1455

[35]. Russo, N.; Toscano, M.; Grand, A. Bond Energies and Attachments Sites of Sodium and Potassium Cations to DNA and RNA Nucleic Acid Bases in the Gas Phase. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 42. 10272-10279.

[36]. Zhu, Y.; Hamlow, L.A.; He, C.C.; Lee, J.K.; Gao, J.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M.T. Gas-Phase Conformations and N-Glycosidic Bond Stabilities of Sodium Cationized 2'-Deoxyguanosine and Guanosine: Sodium Cations Preferentially Bind to the Guanine Residue. *J. Phys. Chem. B.* 2017, 121, 4048–4060

[37]. Potaman, V. N.; Soyfer, V. N. Divalent Metal Cations upon Coordination to the N7 of Purines Differentially Stabilize the PyPuPu DNA Triplex due to Unequal Hoogsteen-type Hydrogen Bond Enhancement. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1994, 11(5), 1035–1040.

[38]. Azargun, M.; Jami-Alahmadi, Y.; Fridgen, T.D. The intrinsic stabilities and structures of alkali metal cationized guanine quadruplexes. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2017, 19(2), 1281–1287.

[39]. Cruz-Ortiz, A.F.; Rossa, M.; Berthias, F.; Berdakin, M.; Maitre, P.; Pino, G.A.. Fingerprints of Both Watson–Crick and Hoogsteen Isomers of the Isolated (Cytosine-Guanine)H<sup>+</sup> Pair. *J. Phys. Chem. Lett.* 2017, 8 (22), 5501–5506.

[40]. Bakker, J.M.; Besson, T.; Lemaire, J.; Scuderi, D.; Maitre, P. Gas-Phase Structure of a  $\pi$ -Allyl–Palladium Complex: Efficient Infrared Spectroscopy in a 7 T Fourier Transform Mass Spectrometer. *J. Phys. Chem. A.* 2007, 111, 51, 13415-13422.

[41]. 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, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

[42]. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 5648–5652.; Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.* 1988, 37, 785 – 789.

[43]. Andrea, D.; Haussermann, U.; Dolg, M.; Stoll, M.; Preuss, H. Energy-Adjusted ab Initio Pseudopotentials for the Second and Third Row Transition Elements. *Theor. Chim. Acta.* 1990, 77, 123–141

- [44]. Plumley, J.A.; Dannenberg, J.J. A comparison of the behavior of functional/basis set combinations for hydrogen-bonding in the water dimer with emphasis on basis set superposition error. *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 1519–1527.
- [45]. Halls, M.D.; Velkovski, J.; Schlegel, H. B. 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.* 2001, 105, 413–421.
- [46]. Donald, W.A.; Khairallah, G.N.; O’Hair, R.A.J. The Effective Temperature of Ions Stored in a Linear Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013, 24:811-815.
- [47]. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* 2005, 105 2999-3093.
- [48]. Franska, M.; Franski, Rafa.; Schroeder, G.; Springer, A.; Beck, S.; Linscheid, M. Electrospray ionization mass spectrometric study of purine base-cisplatin complexes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 970–974.
- [49]. Megger, D. A.; Fonseca Guerra, C.; Bickelhaupt, F. M.; Müller, J. Silver(I)-mediated Hoogsteen-type base pairs. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105(11), 1398–1404.
- [50]. Salpin, J-Y.; Guillaumont, S.; Tortajada, Jeanine.; MacAleese, L.; Lemaire, J.; Maitre, P. Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *Chem Phys Chem.* 2007, 8 ,2235–2244





# Capítulo 5

---

## Interacción entre Citosina y $\text{Ba}^{2+}$ : Estructura y reactividad

---



## 5.1 Introducción

Como ya se discutió en capítulos anteriores los cationes metálicos juegan un papel fundamental en muchos procesos biológicos.<sup>[1-3]</sup> En particular, en el ADN estos cationes están vinculados a la formación/estabilización de plegamientos no canónicos (G-Cuadruplex, Triplex y C-Cuadruplex).<sup>[4-17]</sup>

La interacción entre las bases del ADN y cationes monovalentes ha sido ampliamente estudiada. En el caso particular de C es bien conocido que los cationes monovalentes (H<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Cu<sup>+</sup> y Ag<sup>+</sup>)<sup>[18-26]</sup> interactúan de forma específica con los átomos N3 y O de la base.

Por otro lado, a pesar de la abundancia de cationes divalentes en los sistemas biológicos, se sabe muy poco acerca de las estructuras que resultan de su interacción con las bases de ADN. Para citosina, los esfuerzos se han centrado en describir la naturaleza de las interacciones [CM]<sup>2+</sup> (M = Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>) mediante cálculos de estructura electrónica.<sup>[27-31]</sup> Sin embargo, estos cálculos solo han considerado la interacción de los cationes divalentes con citosina neutra. Recientemente, se utilizó MS/MS acoplada a espectroscopia DMFIR para estudiar las estructuras que surgen de la interacción entre bases del ADN y cationes metálicos divalentes.<sup>[32-38]</sup>

Uracilo (U) ha sido la base más estudiada y se han caracterizado las estructuras de los complejos [U<sub>(-H)</sub>-M]<sup>+</sup> (M=Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>),<sup>[32,33]</sup> [U<sub>(-H)</sub>-M(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>+</sup> (n=1-3) y [U<sub>(-H)</sub>-M-U]<sup>+</sup> (M = Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>),<sup>[34-37]</sup> mientras que para T y C solo se ha estudiado su interacción con Pb<sup>2+</sup><sup>[32, 38]</sup> (donde [U<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> o [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> indican que la base se encuentra desprotonada). En todos los casos se observó que la interacción entre cationes divalentes y las bases (U, T, C) conduce a la formación de complejos monocargados, producto de la desprotonación de la nucleobase. Además, el sitio de desprotonación depende en gran medida del catión metálico que interactúa con la nucleobase. En ese sentido, se encontró, por ejemplo, que U se desprotona en N3 cuando interactúa con metales alcalinotérreos, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>,<sup>[32-37]</sup> mientras que la interacción con Cu<sup>2+</sup> conduce a la desprotonación de N1.<sup>[33]</sup>

En el caso de las interacciones entre C y cationes divalentes, actualmente sólo hay un trabajo experimental reportado por Salpin *et al.*<sup>[38]</sup> en el cual se informa que la interacción de esta base con  $\text{Pb}^{2+}$  conduce principalmente a la desprotonación en N1 o N8 del grupo  $\text{NH}_2$  (ver Figura 1.1a). En consecuencia, la interacción con el catión se produce principalmente entre los átomos N1 y O o N8 y N3, formando complejos de  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Pb}]^+$  dicoordinados.

Bajo este contexto, resulta evidente que la interacción de las nucleobases con cationes divalentes representa un interesante objeto de estudio, pues a diferencia de lo observado con cationes monovalentes, los cambios estructurales inducidos por los divalentes son muy diversos ya que pueden modificar tanto los sitios de desprotonación como las posiciones de interacción de la nucleobase, en función de la naturaleza del ion metálico.

En este contexto, en el presente capítulo se presentan los resultados del estudio de la interacción entre C y  $\text{Ba}^{2+}$ , con el propósito de compararlos con los efectos de la interacción de ésta base con  $\text{Pb}^{2+}$ <sup>[38]</sup> y evaluar si el sitio de desprotonación y la posición de interacción dependen de la naturaleza del catión divalente, como ocurre para el U.

En consecuencia, se llevó a cabo un estudio experimental y teórico, mediante MS/MS acoplada a espectroscopia de DMFIR en combinación con cálculos de estructura electrónica a nivel DFT, para obtener información a nivel molecular sobre la naturaleza de la interacción de C con  $\text{Ba}^{2+}$  y las estructuras que resultan como consecuencia de la misma.

## 5.2 Metodología

### 5.2.1 Detalles Experimentales

Todos los reactivos (Sigma-Aldrich) se usaron sin purificación previa. Se preparó una solución de citosina y  $\text{BaCO}_3$  en concentraciones iguales (1,0 mM) utilizando una mezcla de MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  milliQ 1:1 como solvente. Esta solución se vaporizó e ionizó mediante una fuente (ESI) acoplada al espectrómetro de masas híbrido 7T FT-ICR,<sup>[39]</sup> descrito en detalle en la sección 2.6.1 del capítulo 2 del presente trabajo de tesis.

Para obtener información a nivel estructural de los complejos monocargados, resultantes de la interacción entre C y Ba<sup>2+</sup>, se aislaron los iones [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> de *m/z* 247,94 y 358,97, respectivamente, en la interfaz cuadrupolar del espectrómetro de masas 7T FT-ICR. Posteriormente, los iones fueron transferidos a la trampa hexapolar, donde se acumularon y termalizaron por colisiones con un gas *buffer* (Ar), finalmente los iones termalizados fueron extraídos hacia la celda de ICR, donde fueron fragmentados por DMFIR en el intervalo de 1150–1800 cm<sup>-1</sup> utilizando el FEL de (CLIO),<sup>[40]</sup> con la ayuda de un láser de CO<sub>2</sub>.<sup>[41]</sup> El funcionamiento de los sistemas láser empleados se presenta en detalle en el capítulo 2, sección 2.6.3 del presente trabajo de tesis.

Los iones [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> se irradiaron durante 200 ms con fotones IR-FEL. Adicionalmente, el complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> fue irradiado durante 5 ms con el láser de CO<sub>2</sub>. Los espectros DMFIR se obtuvieron como la eficiencia de fragmentación (*eff*), calculada de acuerdo con la ecuación (2.14), en función de la frecuencia del láser.

## 5.2.2 Detalles computacionales

Todos los cálculos para los diferentes isómeros de los complejos [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> se realizaron a nivel DFT con el programa Gaussian 09 Revisión E. 01.<sup>[42]</sup> Las geometrías fueron optimizadas empleando el funcional híbrido de correlación e intercambio B3LYP<sup>[43]</sup> y el conjunto de bases 6-311G ++ (d, p) para los átomos de C, H, O, N, mientras que para Ba<sup>2+</sup> se utilizó el pseudo potencial de core efectivo ECP46MDF desarrollado por Lim *et al.*<sup>[44]</sup> Todas las optimizaciones se realizaron en SEPs corregidas por el método de counterpoise.<sup>[45]</sup>

Los cálculos de los espectros de absorción IR monofotónica para cada uno de los mínimos locales encontrados en la SEP se realizaron al mismo nivel de teoría. Las frecuencias vibracionales se corrigieron con un factor de 0,97 considerado el valor más apropiado para el nivel de teoría empleado.<sup>[46]</sup> Para una mejor comparación con los espectros DMFIR, el espectro calculado fue convolucionado con perfiles gaussianos suponiendo un ancho de banda de 10 cm<sup>-1</sup> que corresponde al ancho de banda del IR-FEL en la región espectral estudiada (1150–1800 cm<sup>-1</sup>).

Con el fin de obtener más información sobre la naturaleza de las interacciones en los complejos  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  se realizó un estudio de la distribución de las cargas de Orbitales Naturales de Enlace (NBO, por sus siglas en inglés), a partir del Análisis de Población Natural (NPA, por sus siglas en inglés) con el programa NBO 3.1<sup>[47]</sup> implementado como una subrutina del paquete de programas Gaussian 09 Revisión. E.OI.<sup>[42]</sup>

Las energías libres de Gibbs estándar relativas ( $\Delta G_{\text{rel}}^{\circ}$ ) para los diferentes isómeros de los complejos  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$ , incluyendo las correcciones por ZPE se calcularon a 298 K y con el mismo nivel de teoría. Esta temperatura es comparable a la establecida para colisiones múltiples con Ar en la trampa de iones hexapolar del espectrómetro de masas híbrido 7T FT-ICR.<sup>[48]</sup>

Finalmente, el efecto del solvente sobre la estabilidad de los diferentes isómeros de los complejos  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  se evaluó mediante el método de campo de reacción autoconsistente (SCRf). En este trabajo utilizamos el modelo continuo polarizable (PCM)<sup>[49]</sup> y la constante dieléctrica del  $\text{H}_2\text{O}$  como representación del solvente.

### 5.2.3 Nomenclatura

Como se mencionó en capítulos previos, la molécula de citosina puede existir en diversas formas tautoméricas. Considerando que además se desprotona para formar aniones de  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$ , los cationes metálicos pueden interactuar en diversos sitios del anión. Por lo tanto, a lo largo del capítulo se adopta una nomenclatura sistemática y explícita, de manera que facilite la interpretación de la estructura molecular a partir del nombre asignado para cada isómero, tanto de C y  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$  como de los complejos  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  formados a partir de la interacción con  $\text{Ba}^{2+}$ .

Para el caso de los tautómeros de C, se utilizan las letras A, E, K, I, para indicar los grupos funcionales Amino, Enol, Ceto e Imino, respectivamente y (1) o (3) para indicar la posición del H en los N-heterocíclicos, tal como se hizo en los capítulos precedentes (ver Figura 1.1a)

Para los aniones  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$  KI o EI, los grupos imino o enol pueden adoptar la conformación *anti* o *syn* con respecto al N3 (ver Tabla 5.1), que se indican en

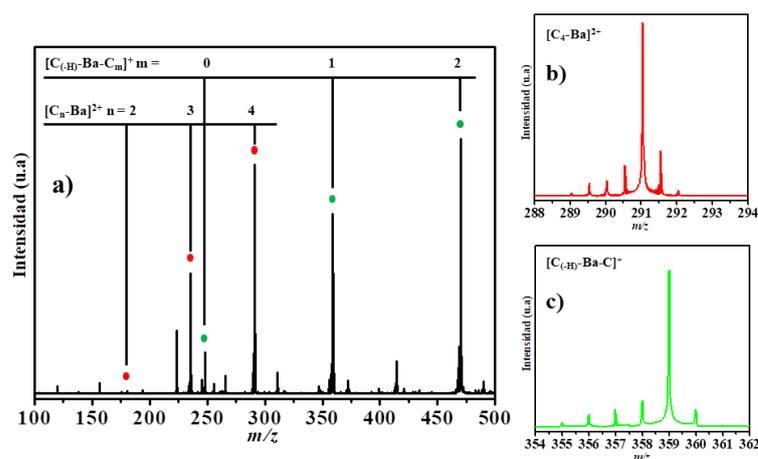
subíndice. Así por ejemplo, el anión  $[C_{(-H)}KI(3)_{anti}]^-$ , corresponde a citosina desprotonada que se encuentra en su forma ceto-imino con un H en N3 y el grupo imino se encuentra en orientación *anti* respecto a N3.

Para los complejos  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  se conserva la nomenclatura de los aniones y seguido de un guión (-) se indican los átomos de  $[C_{(-H)}]^-$  que interactúan directamente con Ba<sup>2+</sup>. Por ejemplo, el isómero  $[C_{(-H)}KAN1O-Ba]^+$ , corresponde a la C desprotonada en su forma KA, que interactúa con el catión Ba<sup>2+</sup> a través de los átomos N1 y O. Finalmente, para los complejos de  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$  se conserva la nomenclatura empleada para los complejos de  $[C_{(-H)}-Ba]^+$ , agregando un guión que indica el sitio de unión con la otra C, que es nombrada como se mencionó anteriormente.

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Espectrometría de masas FT-ICR

El espectro de masas de la solución de Citosina/BaCO<sub>3</sub> muestra dos progresiones de masas principales correspondientes a iones doblemente cargados  $[C_n-Ba]^{2+}$  con n = 2, 3 y 4 y a iones monocargados  $[C_{(-H)}-Ba-C_m]^+$  con m = 0, 1 y 2 como se muestra en la Figura 5.1, identificados inequívocamente a partir del patrón isotópico de Ba. En las Figuras 5.1b y c, se muestran los patrones isotópicos para los complejos  $[C_4-Ba]^{2+}$  y  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ , respectivamente.

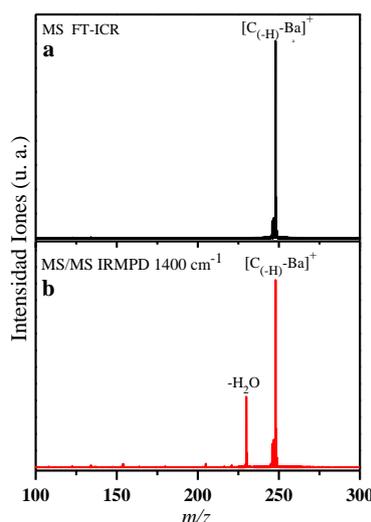


**Figura 5.1:** a) Espectro de masas FT-ICR de la mezcla Citosina/BaCO<sub>3</sub> 1,0 mM, b) Ampliación del patrón isotópico del complejo  $[C_4-Ba]^{2+}$ , c) Ampliación del patrón isotópico del complejo  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ .

La formación de complejos monocargados implica la desprotonación de una de las citosinas ( $[C_{(-H)}]^-$ ) que interactúa con  $Ba^{2+}$ , como se observó anteriormente para otros cationes divalentes.<sup>[38,50]</sup> Considerando el  $pK_{a2}$  (12,15)<sup>[51]</sup> para la desprotonación de C, en la solución Citosina/ $BaCO_3$  (pH = 8,2) existe un 1% de  $[C_{(-H)}]^-$  que resulta suficiente para la formación de los complejos monocargados. Los iones correspondientes a los complejos  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  y  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$  se aislaron y se registraron sus espectros DMFIR en el intervalo espectral de 1150–1800  $cm^{-1}$ .

### 5.3.2 Espectroscopia de DMFIR del complejo $[C_{(-H)}-Ba]^+$

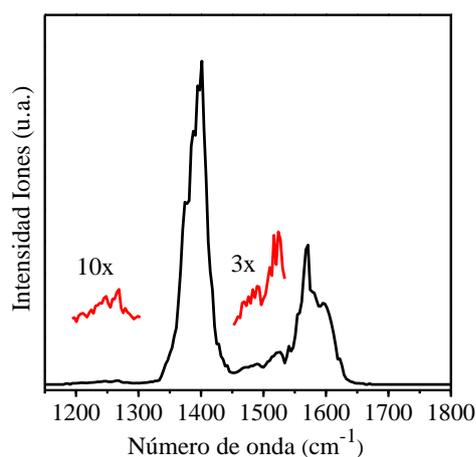
La fragmentación del complejo  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  después de la irradiación con fotones IR-FEL en resonancia con un modo activo del ión conduce principalmente a la pérdida de  $H_2O$ , produciendo el fragmento  $[C_4H_2N_3-Ba]^+$  ( $m/z$  229,9) como se muestra en la Figura 5.2.



**Figura 5.2:** Espectro MS/MS del complejo  $[C_{(-H)}-Ba]^+$ . a) Espectro de masas del ión aislado, b) Espectro de MS/MS luego de irradiar con IR-FEL sintonizado a 1400  $cm^{-1}$ .

La pérdida de  $HNCO$  es un canal de fragmentación insignificante ( $< 1\%$ ), en contraste con los resultados obtenidos a partir de DMFIR de complejos formados entre la  $[C_{(-H)}]^-$  y otros cationes divalentes,<sup>[38,50]</sup> donde la pérdida de  $HNCO$  resulta el canal principal. En consecuencia, consideramos únicamente la pérdida de  $H_2O$  como canal de fragmentación para obtener el espectro DMFIR (Figura 5.3) del complejo  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  de acuerdo a la ecuación (2.14).

En el espectro se observa una banda ancha e intensa centrada a 1401 cm<sup>-1</sup> en la región de los modos de deformación del anillo en el plano. Además, se observa una banda ancha de menor intensidad en la región de los modos de flexión del grupo NH<sub>2</sub> entre 1530–1630 cm<sup>-1</sup>. Esta banda exhibe un perfil asimétrico con un máximo a 1570 cm<sup>-1</sup>, un pico de menor intensidad a 1604 cm<sup>-1</sup> y tres hombros a 1554, 1582 y 1622 cm<sup>-1</sup>. Finalmente, algunas bandas de menor intensidad son observadas en las regiones 1450–1530 cm<sup>-1</sup> y 1200–1300 cm<sup>-1</sup>.



**Figura 5.3:** Espectro DMFIR del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup>. En rojo se muestran las ampliaciones del espectro entre 1200–1300 cm<sup>-1</sup> y 1450–1530 cm<sup>-1</sup>.

### 5.3.3 Espectroscopia de DMFIR del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup>

La fragmentación del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> con fotones IR-FEL conduce a la pérdida de C neutra como el principal canal de fragmentación, produciendo el fragmento de [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> (*m/z* 247,9), como se muestra en la Figura 5.4. La pérdida de la base neutra es el canal de fragmentación de menor energía de este complejo y también ha sido observado en fragmentación por DMFIR del complejo relacionado [U<sub>(-H)</sub>-M-U]<sup>+</sup> (M= Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>)<sup>[34,36]</sup> para el cual se ha informado que el principal canal de fragmentación es la pérdida de U neutro.

Además, se detectó el fragmento iónico [C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>-Ba]<sup>+</sup> con una intensidad muy baja, correspondiente a la pérdida de [CH<sub>2</sub>O]. Por lo tanto, se consideraron los dos canales de fragmentación para obtener el espectro DMFIR de acuerdo con la ecuación (2.14).



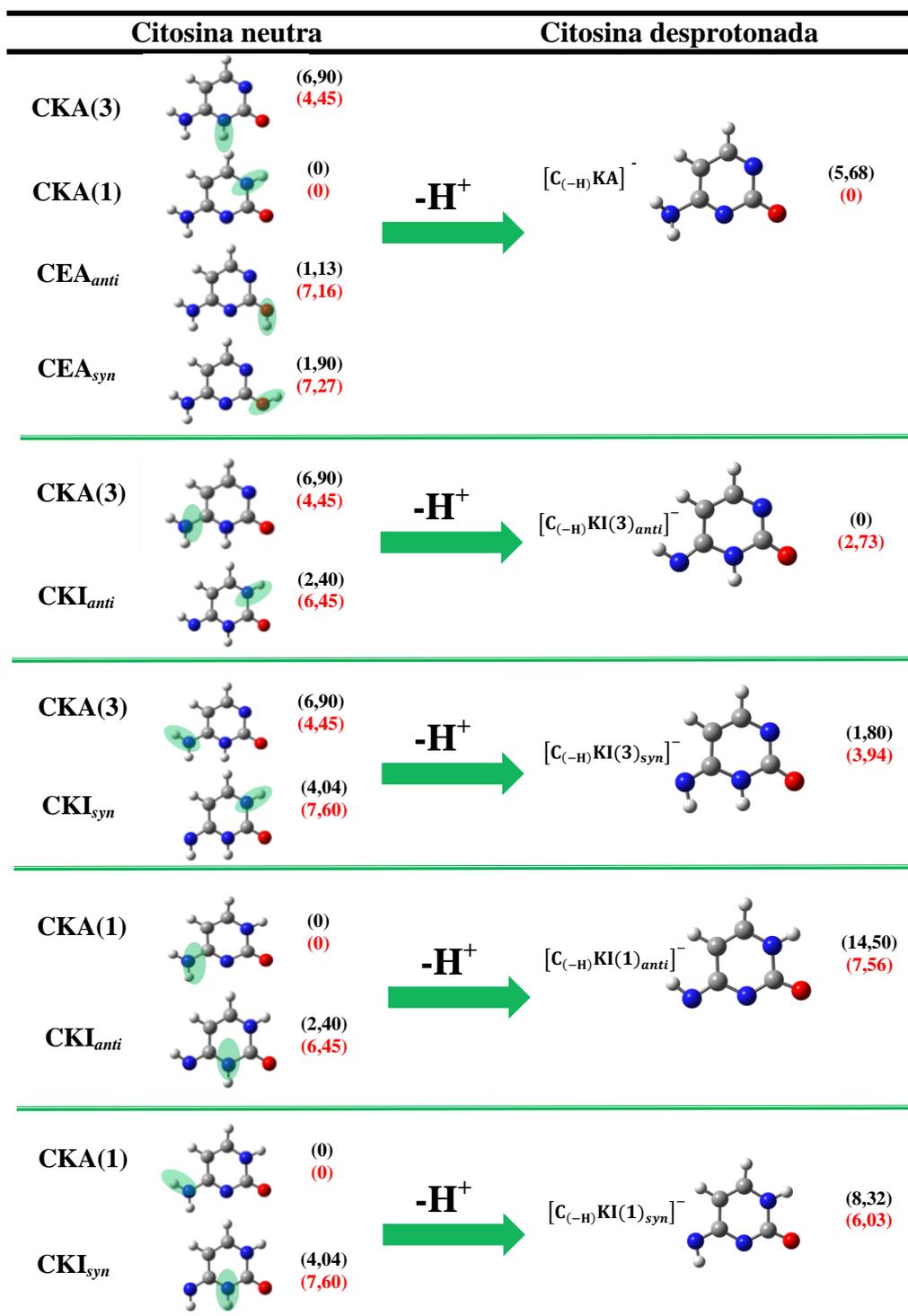
### 5.3.4 Resultados teóricos

Para obtener más información sobre la estructura de los complejos [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> y la naturaleza de las interacciones entre C, [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> y Ba<sup>2+</sup>, realizamos cálculos de estructura electrónica en el estado fundamental a nivel DFT como se menciona en la sección 5.2.2. La molécula de C neutra tiene una gran variedad de tautómeros que se han caracterizado por varios métodos experimentales y teóricos.<sup>[52-57]</sup> Como se discutió en el capítulo 3, se ha establecido que la citosina existe en cuatro formas tautoméricas: las formas cetó-amino (CKA(1) y CKA(3)), enol-amino (CEA<sub>anti</sub> y CEA<sub>syn</sub>), cetó-imino (CKI<sub>anti</sub> y CKI<sub>syn</sub>) y enol-imino (CEI(1)<sub>anti</sub>, CEI(1)<sub>syn</sub>, CEI(3)<sub>anti</sub> y CEI(3)<sub>syn</sub>) la nomenclatura empleada se detalló en la sección 5.2.3.

Luego, se calculó la energía de los seis isómeros de la C neutra para validar el método utilizado. Nuestros resultados están de acuerdo con informes anteriores de cálculos a nivel DFT y MP2,<sup>[55-58]</sup> en los cuales se ha demostrado que el isómero CKA(1) y los isómeros CEA<sub>anti</sub> son los más estables en fase gaseosa, mientras que en solución los isómeros más estables son los tautómeros KA (CKA(1) y CKA(3))

Los isómeros de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> que surgen a partir de la desprotonación de los átomos N1, N3, N8 u O de los diferentes tautómeros de C fueron calculados al mismo nivel de teoría y comparados con resultados previos reportados en la literatura. En la Tabla 5.1 se presentan los aniones de menor energía que pueden surgir a partir de la desprotonación de las seis estructuras de menor energía de C neutra. Nuestros cálculos indican que los aniones de menor energía en fase gaseosa son los tautómeros cetó-imino [C<sub>(-H)</sub>KI(3)<sub>anti</sub>]<sup>-</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KI(3)<sub>syn</sub>]<sup>-</sup>, que surgen a partir de la desprotonación del N8 del tautómero de citosina neutra CKA(3) o de la desprotonación del N1 de los tautómeros CKI<sub>syn</sub> y CKI<sub>anti</sub>, respectivamente. Mientras que, la desprotonación de CKA(1) o CKA(3) y CEA<sub>anti/syn</sub> conducen al isómero cetó-amino [C<sub>(-H)</sub>KA]<sup>-</sup> de citosina desprotonada el cual, en fase gaseosa, está 5,68 kcal/mol por encima del mínimo global (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Isómeros de menor energía de C neutra y los correspondientes aniones que se forman luego de la desprotonación de los átomos que se indican en círculos verdes. Los números en paréntesis indican las energías relativas con ZPE calculadas a nivel B3LYP/6-311G ++(d,p) para C y  $[C_{(-H)}]^-$  en fase gaseosa (negro) y en fase acuosa, modelo PCM (rojo)



En la Tabla 5.1 se muestran las energías relativas de los isómeros de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> más estables y por lo tanto los más relevantes para la interpretación de la estructura molecular y la naturaleza de las interacciones con el ion metálico Ba<sup>2+</sup>. Cabe destacar que las energías relativas calculadas para los diferentes aniones están en concordancia con las determinadas previamente por Vázquez *et al.*<sup>[59]</sup> a nivel MP2/6-311+G(2d,p). Más recientemente Zhu *et al.*<sup>[60]</sup> encontraron evidencia experimental, por medio de ESI acoplada a espectroscopia fotoelectrónica con mapeo por imágenes de alta resolución, de la presencia de los aniones [C<sub>(-H)</sub>KI(3)*anti*]<sup>-</sup>, [C<sub>(-H)</sub>KI(3)*syn*]<sup>-</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KA]<sup>-</sup> en fase gaseosa.

En contraste, cuando se considera el efecto del solvente de forma implícita en los cálculos, como se menciona en la sección 5.2.2, el isómero [C<sub>(-H)</sub>KA]<sup>-</sup> se convierte en la estructura más estable de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup>, mientras que los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KI(3)*anti*]<sup>-</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KI(3)*syn*]<sup>-</sup> se encuentran ahora ligeramente por encima del mínimo como se puede observar en la Tabla 5.1.

Recientemente, se informó que de todos los isómeros de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup>, el isómero [C<sub>(-H)</sub>KA]<sup>-</sup> presenta la mayor afinidad para formar complejos con agua<sup>[61]</sup> consistente con los resultados presentados aquí. El cambio en la estabilidad relativa de los isómeros de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> como consecuencia de la solvatación es debido al alto momento dipolar del isómero [C<sub>(-H)</sub>KA]<sup>-</sup> ( $\mu = 7,5$  D) con respecto a los momentos dipolares de los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KI(3)*anti*]<sup>-</sup> ( $\mu = 4,0$  D) y [C<sub>(-H)</sub>KI(3)*syn*]<sup>-</sup> ( $\mu = 1,9$  D).

Los 5 aniones de menor energía en la fase gaseosa y acuosa se consideraron como precursores de los complejos que pueden formarse a partir de la interacción entre Ba<sup>2+</sup> y los átomos con mayor densidad de carga negativa de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup>. En la Tabla 5.2 se muestra la distribución de cargas de los distintos átomos de los cinco isómeros más estables de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> determinadas a partir de los cálculos de Orbitales Naturales de Enlace (NBO). Se espera que los átomos con mayor densidad de carga negativa (N1, N3, O2 y N8) presenten una mayor afinidad por el ión Ba<sup>2+</sup> y por lo tanto formen complejos más estables.

**Tabla 5.2.** Distribución de cargas NBO para los cinco isómeros de  $[C_{(-H)}]^-$  de menor energía. En negrita se resaltan los átomos con mayor densidad de carga negativa en cada isómero.

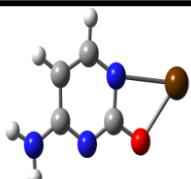
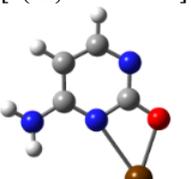
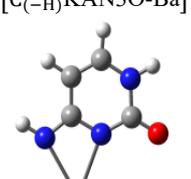
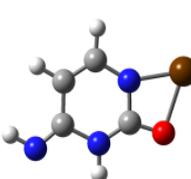
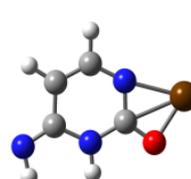
Átomo	$[C_{(-H)}KA]^-$	$[C_{(-H)}KI(3)_{anti}]^-$	$[C_{(-H)}KI(3)_{syn}]^-$	$[C_{(-H)}KI(1)_{anti}]^-$	$[C_{(-H)}KI(1)_{syn}]^-$
<b>N1</b>	<b>-0,607</b>	<b>-0,654</b>	<b>-0,657</b>	<b>-0,649</b>	<b>-0,651</b>
<b>C2</b>	0,732	0,773	0,772	0,760	0,762
<b>O7</b>	<b>-0,712</b>	<b>-0,719</b>	<b>-0,720</b>	<b>-0,743</b>	<b>-0,745</b>
<b>N3</b>	<b>-0,650</b>	<b>-0,646</b>	<b>-0,662</b>	<b>-0,661</b>	<b>-0,700</b>
<b>C4</b>	0,405	0,415	0,414	0,381	0,382
<b>N8</b>	<b>-0,823</b>	<b>-0,834</b>	<b>-0,818</b>	<b>-0,775</b>	<b>-0,806</b>
<b>C5</b>	-0,472	-0,450	-0,417	-0,365	-0,333
<b>C6</b>	0,080	0,074	0,068	0,029	0,022

La optimización de la geometría de los complejos  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  se realizó sin ningún tipo de restricción de simetría y sobre SEP corregidas por el método de counterpoise. En la Tabla 5.3 se muestran las energías relativas de los isómeros más estables del complejo  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  en un intervalo de 16 kcal/mol en fase gaseosa y la correspondiente energía corregida por el efecto del solvente (PCM), los demás isómeros presentaron energías relativas muy altas, por lo que no fueron tenidos en cuenta para el análisis de los resultados.

El isómero más estable del complejo  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  ya sea en fase gaseosa o acuosa nombrado como  $[C_{(-H)}KAN1O-Ba]^+$  corresponde a una estructura plana en la cual el  $Ba^{2+}$  interactúa simultáneamente con los átomos N1 y O de  $[C_{(-H)}KA]^-$ , formando una estructura dicoordinada.

Aunque el mínimo global corresponde al mismo isómero tanto en la fase gaseosa como en la acuosa, el solvente reduce la diferencia de energía entre los distintos isómeros, cambiando sustancialmente las estabilidades relativas. Los isómeros más estabilizados por el solvente son aquellos con el momento dipolar más alto, como se muestra en la Tabla 5.4. Debido a la estabilización por el solvente el isómero  $[C_{(-H)}KAN3O-Ba]^+$  que es la tercera estructura más estable en la fase gaseosa se convierte en la segunda estructura más estable en solución, casi isoenergético con el mínimo global  $[C_{(-H)}KAN1O-Ba]^+$ , mientras que en fase gaseosa la segunda estructura más estable corresponde al isómero  $[C_{(-H)}KI(1)_{anti}N3N8-Ba]^+$ , este último es el mismo orden de energía que el reportado para los complejos de  $[C_{(-H)}-Pb]^+$ .<sup>[38]</sup>

**Tabla 5.3.** Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^\circ_{298K}$ ) para los isómeros del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> en fase gaseosa y la corrección de las energías relativas considerando el efecto del solvente (PCM). Las poblaciones relativas se calcularon suponiendo una distribución de Maxwell-Boltzmann, considerando que la temperatura de los iones es  $\approx 298$  K.

Estructura	Fase gaseosa			PCM (agua)		
	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.
 [C <sub>(-H)</sub> KAN1O-Ba] <sup>+</sup>	0	0	1	0	0	1
 [C <sub>(-H)</sub> KAN3O-Ba] <sup>+</sup>	7,35	7,15	5,71x10 <sup>-6</sup>	0,57	0,26	0,65
 [C <sub>(-H)</sub> KI(1) <i>anti</i> N3N8-Ba] <sup>+</sup>	5,35	5,36	1,17x10 <sup>-4</sup>	7,33	7,05	6,76x10 <sup>-6</sup>
 [C <sub>(-H)</sub> KI(3) <i>anti</i> N1O-Ba] <sup>+</sup>	12,98	13,01	2,68x10 <sup>-10</sup>	5,56	5,38	1,13x10 <sup>-4</sup>
 [C <sub>(-H)</sub> KI(3) <i>syn</i> N1O-Ba] <sup>+</sup>	15,28	15,92	2,11x10 <sup>-12</sup>	8,77	8,88	3,07x10 <sup>-7</sup>

**Tabla 5.4.** Momentos dipolares ( $\mu$ ), energías relativas considerando la corrección de la energía de punto cero ( $\Delta E+ZPE$ ), en fase gaseosa y acuosa de los cinco isómeros más estables de  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  y sus respectivas energías de solvatación, calculadas a nivel B3LYP/6-311 G++(d, p)//ECP46MDF

Isómero	$(\Delta E+ZPE)_{gas}$ kcal/mol	$(\Delta E+ZPE)_{H_2O}$ kcal/mol	$\Delta E_{solv}$ kcal/mol	$\mu_{gas}$ (D)
$[C_{(-H)}KAN10-Ba]^+$	0	0	-119,16	7,8
$[C_{(-H)}KI(1)_{anti}N3N8-Ba]^+$	5,36	7,34	-117,18	6,6
$[C_{(-H)}KAN30-Ba]^+$	7,35	0,57	-125,94	10,6
$[C_{(-H)}KI(3)_{anti}N10-Ba]^+$	12,98	5,57	-126,58	11,9
$[C_{(-H)}KI(3)_{syn}N10-Ba]^+$	15,92	8,77	-126,32	12,4

Se realizó el análisis de distribución de las cargas NBO, para las tres estructuras de menor energía de los complejos  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  y se compararon con las obtenidas para los correspondientes isómeros de  $[C_{(-H)}]^-$  y los resultados se muestran en la Tabla 5.5. En los tres casos, la carga en el átomo de Ba se encuentra entre +1,84 y +1,86, lo que demuestra que hay una muy pequeña transferencia de carga desde  $[C_{(-H)}]^-$  hacia el catión de  $Ba^{2+}$  sugiriendo que la interacción entre estos dos grupos es principalmente electrostática.

**Tabla 5.5.** Distribución de cargas NBO para los tres isómeros menor energía de  $[C_{(-H)}-Ba]^+$ .

Átomo	$[C_{(-H)}KA]^-$	$[C_{(-H)}KAN10-Ba]^+$	$[C_{(-H)}KAN30-Ba]^+$	$[C_{(-H)}KI(1)_{anti}]^-$	$[C_{(-H)}KI(1)_{anti}N3N4-Ba]^+$
N1	-0,607	-0,826	-0,524	-0,649	-0,593
C2	0,732	0,738	0,733	0,760	0,795
O7	-0,712	-0,917	-0,926	-0,743	-0,634
N3	-0,650	-0,561	-0,806	-0,661	-0,883
C4	0,405	0,451	0,446	0,381	0,442
N8	-0,823	-0,730	-0,763	-0,775	-1,019
C5	-0,472	-0,347	-0,359	-0,365	-0,364
C6	0,080	0,105	0,137	0,029	0,126
Ba		1,845	1,843		1,864

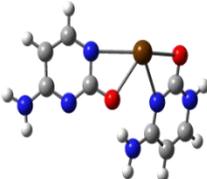
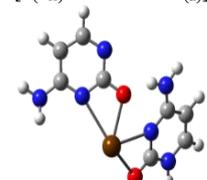
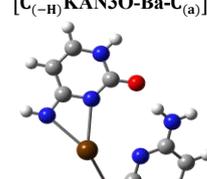
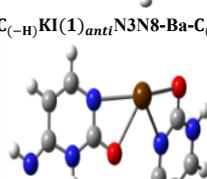
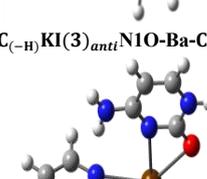
Así mismo, se encontró que la interacción con Ba<sup>2+</sup> induce una ligera polarización en [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup>, como lo demuestra la disminución en la carga parcial sobre los átomos N1, N3, O y N8 coordinados directamente a Ba<sup>2+</sup>, en comparación con sus respectivas cargas en el anión [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> libre (ver Tabla 5,5). Los resultados concuerdan con los obtenidos en fase gaseosa para los complejos [C<sub>(-H)</sub>-Pb]<sup>+</sup> y [U<sub>(-H)</sub>-Pb]<sup>+</sup>,<sup>[32,38,62]</sup> aunque en estos complejos, la transferencia de carga de la nucleobase al ión metálico es mayor, lo que indica una interacción mutua más covalente. Por un lado, esto es esperable ya que el radio iónico de Ba<sup>2+</sup> (149 Å) es mayor que el radio iónico de Pb<sup>2+</sup> (133 Å) y se espera que al aumentar el radio iónico del metal disminuye la transferencia de carga desde la nucleobase.<sup>[27,38]</sup> Por otro lado, los cationes de metales de transición tienen una mayor capacidad que los cationes alcalinos y alcalinotérreos para coordinar covalentemente diferentes ligandos. Recientemente se ha informado que los complejos [U<sub>(-H)</sub>-M-U]<sup>+</sup> (con M= Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) presentan principalmente interacciones electrostáticas.<sup>[36]</sup>

La búsqueda de las geometrías más estables de los complejos [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> se basó en la consideración de la interacción entre catión de Ba<sup>2+</sup> de los cinco isómeros de menor energía de [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> y los átomos N1, N3, O y N8 de los seis tautómeros de menor energía de C neutra, presentados en la Tabla 5.1. En tal sentido, se encontró que la dicoordinación de Ba<sup>2+</sup> a los átomos N3 y O de C neutra en su forma canónica CKA(1), conduce a los cinco isómeros más estables de [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> presentados en la Tabla 5.6, mientras que los otros sitios de interacción conducen a estructuras menos estables que no fueron consideradas en el análisis subsiguiente.

Los complejos más estables de [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> presentan como característica en común una estructura tetracoordinada, en la que el Ba actúa como átomo central, mientras que [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> y C se encuentran en diferentes planos. Cabe destacar que no se encontró ninguna estructura plana en fase gaseosa ni en fase acuosa, contrario a lo encontrado para los complejos monocargados de citosina neutra con H<sup>+</sup> ([C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>),<sup>[9]</sup> metales alcalinos<sup>[17]</sup> ([C<sub>2</sub>M]<sup>+</sup> M=Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>) y de transición<sup>[16,17]</sup> ([C<sub>2</sub>M]<sup>+</sup> M=Ag<sup>+</sup> y Cu<sup>+</sup>), los cuales, imitan la estructura tipo *i-motif* responsable de estabilizar plegamientos de orden superior en el ADN. Sin embargo, se sabe que cuanto mayor sea el tamaño del catión metálico, la estructura de los complejos se vuelve menos simétrica, como consecuencia de un debilitamiento de las interacciones por puente de hidrógeno entre los grupos NH<sub>2</sub> y C=O entre ambas C<sup>[9,16,17,21]</sup> responsables de

mantener la planaridad del sistema. En este escenario, se espera que el radio iónico grande de Ba<sup>2+</sup> favorezca la pérdida de planaridad de los complejos [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup>.

**Tabla 5.6.** Energías relativas con corrección por la energía del punto cero (EE+ZPE) y energías libres de Gibbs estándar relativas calculadas a 298 K ( $\Delta G^\circ_{298K}$ ) para los isómeros del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> en fase gaseosa y la corrección de las energías relativas considerando el efecto del solvente (PCM). Las poblaciones relativas (P.R) se calcularon suponiendo una distribución de Maxwell-Boltzmann, considerando que la temperatura de los iones es  $\approx 298$  K.

Estructura	Fase gaseosa			PCM (agua)		
	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.	EE+ZPE (kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{298K}$ (kcal/mol)	P.R.
 [C <sub>(-H)</sub> KAN10-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	0	0	1	0	0	1
 [C <sub>(-H)</sub> KAN30-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	5,29	2,27	1,35x10 <sup>-4</sup>	1,11	0,81	0,25
 [C <sub>(-H)</sub> KI(1) <i>anti</i> N3N8-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	10,88	12,96	3,31x10 <sup>-10</sup>	7,80	4,87	2,68x10 <sup>-4</sup>
 [C <sub>(-H)</sub> KI(3) <i>anti</i> N10-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	12,89	6,18	2,92x10 <sup>-5</sup>	5,48	4,45	5,43x10 <sup>-4</sup>
 [C <sub>(-H)</sub> KI(3) <i>syn</i> N10-Ba-C <sub>(s)</sub> ] <sup>+</sup>	15,58	15,27	6,34x10 <sup>-12</sup>	6,81	10,91	9,99x10 <sup>-9</sup>

Los cálculos indican que los cinco isómeros de menor energía, se encuentran dentro de un intervalo de 15,6 y 7,8 kcal/mol en fase gaseosa y en solución, respectivamente. El mínimo global en ambas fases corresponde al isómero [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba-C<sub>(a)</sub>]<sup>+</sup>, en el cual Ba<sup>2+</sup> del complejo [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba]<sup>+</sup> interactúa con los átomos N3 y O de C neutra. Entre las diferentes conformaciones que puede adoptar este isómero, la conformación anti es ampliamente favorecida debido a la estabilización adicional inducida por la formación del puente de hidrogeno (NH<sup>+</sup>••O=C) entre el grupo NH<sub>2</sub> de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> y el C=O de C neutra. Consecuentemente, e independiente de la orientación conformacional inicial de C y [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup>, todas las estructuras evolucionan espontáneamente, durante la optimización, hacia la conformación anti.

Consistentemente, con los resultados obtenidos para los isómeros de [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup>, se encontró que las estructuras del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> más estabilizadas por el efecto del solvente son aquellas con un mayor momento dipolar ( $\mu$ ), como se muestra en la Tabla 5.7.

**Tabla 5.7.** Momentos dipolares, energías relativas considerando la corrección de la energía de punto cero ( $\Delta E + ZPE$ ) en fase gaseosa y acuosa de los cinco isómeros más estables de [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup>, y sus respectivas energías de solvatación calculadas a nivel B3LYP/6-311 G++(d, p)//ECP46MDF

Isómero	$\Delta E + ZPE_{\text{gas}}$ (kcal/mol)	$\Delta E + ZPE_{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal/mol)	$\Delta E_{\text{solv}}$ (kcal/mol)	$\mu_{\text{gas}}$ (D)
[C <sub>(-H)</sub> KAN1O-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	0	0	-82,78	4,0
[C <sub>(-H)</sub> KAN3O-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	5,29	1,11	-86,96	5,69
[C <sub>(-H)</sub> KI(1) <i>anti</i> N3N8-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	10,88	7,80	-85,86	3,51
[C <sub>(-H)</sub> KI(3) <i>anti</i> N1O-Ba-C <sub>(a)</sub> ] <sup>+</sup>	12,89	5,48	-90,19	9,28
[C <sub>(-H)</sub> KI(3) <i>anti</i> N1O-Ba-C <sub>(s)</sub> ] <sup>+</sup>	15,58	6,81	-91,55	10,00

En ese sentido, el isómero [C<sub>(-H)</sub>KAN3O-Ba-C<sub>(a)</sub>]<sup>+</sup> que en fase gaseosa se encuentra 5,2 kcal/mol por encima del isómero más estable, en solución se encuentra

prácticamente degenerado con el mínimo global de energía. De igual forma, los isómeros en la forma ceto-imino  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KI}(3)_{\text{anti}}\text{N1O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KI}(3)_{\text{anti}}\text{N1O-Ba-C}_{(\text{s})}]^+$  que presentan un alto momento dipolar son fuertemente estabilizados en fase acuosa.

El análisis NBO de las dos estructuras de menor energía de los complejos de  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  (Tabla 5.8) revela que la carga sobre Ba en ambos casos es +1,86. Esto indica que, al igual que en el caso de los complejos de  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$ , existe una muy pequeña transferencia de carga desde las nucleobases hacia el ion  $\text{Ba}^{2+}$  y por lo tanto, la interacción es principalmente electrostática, tanto con  $\text{CKA}(1)$ , como con  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA}]^-$ .

**Tabla 5.8.** Distribución de las cargas NBO para los dos isómeros de menor energía de  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$ .

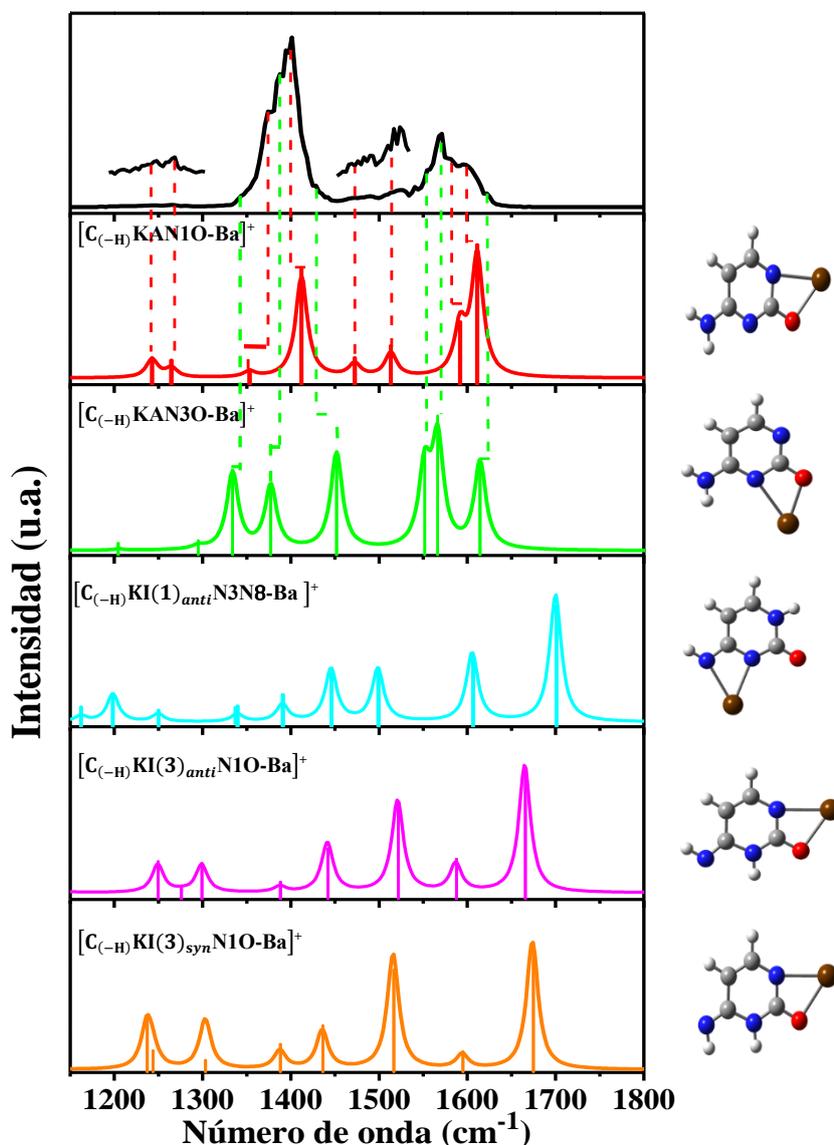
Átomo	CKA(1)	Isómero $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$	Isómero $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$	Isómero $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$	Isómero $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$
		$[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba}]^+$	$[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$	$[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba}]^+$	$[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$
N(1)	-0,598	-0,826	-0,579	-0,524	-0,578
C(2)	0,777	0,738	0,782	0,733	0,783
O(2)	-0,625	-0,917	-0,757	-0,926	-0,762
N(3)	-0,600	-0,561	-0,734	-0,806	-0,737
C(4)	0,444	0,451	0,478	0,446	0,478
N(4)	-0,760	-0,730	-0,714	-0,763	-0,709
C(5)	-0,373	-0,347	-0,333	-0,359	-0,331
C(6)	0,104	0,105	0,116	0,137	0,116
Ba		1,845	1,859	1,843	1,857

### 5.3.5 Comparación del espectro DMFIR con los espectros IR calculados para los isómeros del complejo $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$

Para obtener información estructural acerca de los isómeros que se forman a partir de la interacción entre  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$  y  $\text{Ba}^{2+}$ , se calcularon los espectros vibracionales de absorción IR monofotónica para las estructuras de menor energía del complejo  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$ , que se muestran en la Tabla 5.3, y se compararon con el espectro experimental de DMFIR del mismo.

La comparación del espectro experimental con los calculados para los isómeros de menor energía se muestra en la Figura 5.6. La asignación de las bandas observadas en el espectro experimental se basa en su comparación con los espectros calculados. Las bandas débiles observadas en el espectro DMFIR a 1247 y 1268  $\text{cm}^{-1}$

son asignadas a la combinación de los modos de deformación del anillo en el plano, calculadas a 1242 y 1264 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, para el isómero [C<sub>(-H)</sub>KAN10-Ba]<sup>+</sup>.



**Figura 5.6:** Comparación del espectro experimental DMFIR del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba]<sup>+</sup> entre 1150–1800 cm<sup>-1</sup> con los espectros de absorción IR monofotónicos calculados para los cinco isómeros de menor de este complejo, a nivel B3LYP/6-311G++(d,p)//ECP46MDF.

La banda ancha e intensa centrada a 1401 cm<sup>-1</sup> es asignada al modo de estiramiento del enlace C=O, acoplado con la deformación del anillo en el plano, la cual es calculada a 1412 cm<sup>-1</sup> para el isómero [C<sub>(-H)</sub>KAN10-Ba]<sup>+</sup>. Sin embargo, el ancho y la intensidad de esta banda sugieren la presencia de varias transiciones que absorben en esta región espectral, probablemente pertenecientes a isómeros diferentes. Los dos hombros observados en el espectro DMFIR a 1341 y 1374 cm<sup>-1</sup> se asignan a los

modos de respiración del anillo calculados en 1334 y 1353  $\text{cm}^{-1}$  para los isómeros  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba}]^+$ , respectivamente. El hombro que aparece a 1387  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro DMFIR puede ser asignado al estiramiento del  $\text{C}=\text{O}$ , acoplado a una deformación del anillo en el plano, calculado a 1377  $\text{cm}^{-1}$  para el isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba}]^+$ , mientras que el hombro que aparece a 1429  $\text{cm}^{-1}$  es asignado a los modos de estiramiento de los enlaces  $\text{C2-N1}$  y  $\text{N3-C4}$  para esta misma estructura. El grupo de bandas débiles observadas entre 1460 y 1530  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro DMFIR están en buen acuerdo con las frecuencias calculadas (1472 y 1513  $\text{cm}^{-1}$ ) para los modos de respiración en anillo de  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$  en el isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba}]^+$ .

En el espectro de DMFIR se observa una banda ancha e intensa, entre 1535–1635  $\text{cm}^{-1}$ , que consta de dos picos principales en 1570 y 1604  $\text{cm}^{-1}$  y tres hombros en 1554, 1582 y 1622  $\text{cm}^{-1}$ , lo que sugiere la contribución de varias transiciones en esta región espectral. La asignación de las bandas que aparecen en esta región espectral nos permitió sugerir la presencia de los isómeros  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba}]^+$ . El pico intenso observado a 1570  $\text{cm}^{-1}$  es asignado a la combinación de los modos de estiramiento ( $\text{C4-C5} + \text{C2-N1}$ ) y el modo de flexión del grupo  $\text{NH}_2$ , del isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba}]^+$  calculado a 1566  $\text{cm}^{-1}$ . Este isómero está ligeramente por encima en energía del mínimo global en fase acuosa, pero es el tercer isómero más estable en la fase gaseosa (Tabla 5.3). Adicionalmente, la característica espectral observada a 1604  $\text{cm}^{-1}$  es asignada al modo de flexión del grupo  $\text{NH}_2$ , del isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba}]^+$  calculada a 1612  $\text{cm}^{-1}$ . Finalmente, los hombros observados a 1554 y 1622  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los modos de estiramiento de los enlaces  $\text{C5-C6}$  y  $\text{N3-C4}$  y al modo de flexión del grupo  $\text{NH}_2$ , del isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba}]^+$  calculados a 1551 y 1614  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente; mientras que el hombro observado a 1582  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la combinación de los modos de estiramiento ( $\text{C5-C6}$ ) y flexión del grupo  $\text{NH}_2$ , del isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba}]^+$  calculado a 1591  $\text{cm}^{-1}$ .

Los modos de estiramiento del enlace  $\text{C}=\text{O}$  en los isómeros  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba}]^+$  (calculado a 1412  $\text{cm}^{-1}$ ) y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba}]^+$  (calculado a 1377  $\text{cm}^{-1}$ ) se encuentran fuertemente desplazados hacia menores frecuencias con respecto al estiramiento del  $\text{C}=\text{O}$  en  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$  (calculado a 1591  $\text{cm}^{-1}$ ). La gran

disminución en la frecuencia vibracional de este modo es debida al incremento en la masa reducida del mismo, como consecuencia de un fuerte acoplamiento con el catión Ba<sup>2+</sup> que induce una fuerte polarización del C=O, de acuerdo con la comparación de las cargas entre la [C<sub>(-H)</sub>KA]<sup>-</sup> y sus correspondientes complejos (ver Tabla 5.5). En efecto, se observa un debilitamiento del enlace C=O, producto de esta interacción, evidenciado por el alargamiento de la distancia de enlace C—O, desde 1,238 Å en [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> libre, a 1,307 Å y 1,310 Å en los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KAN3O-Ba]<sup>+</sup>, respectivamente.

La asignación del espectro DMFIR, luego de su comparación con los espectros calculados para los diferentes isómeros, nos permitió identificar la presencia de los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KAN3O-Ba]<sup>+</sup>, que a su vez son las estructuras más estables en fase acuosa. De hecho, la ausencia de la banda más prominente del isómero [C<sub>(-H)</sub>KI(1)<sub>anti</sub>N3N8-Ba]<sup>+</sup>, correspondiente al modo de estiramiento del enlace C=O, calculada a 1701 cm<sup>-1</sup>, nos permite desestimar la presencia de este isómero, que es la segunda estructura más estable en la fase gaseosa y que ha sido encontrada previamente en complejos análogos [C<sub>(-H)</sub>-Pb]<sup>+</sup>.<sup>[38]</sup> Los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KI(3)<sub>anti</sub>N1O-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KI(3)<sub>anti</sub>N1O-Ba]<sup>+</sup> se encuentran a energías muy por encima del mínimo global (en ambas fases) y no se observan bandas características en el espectro DMFIR, por lo cual no son tenidos en cuenta.

Como se observa en la Tabla 5.3, las poblaciones relativas esperadas para los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba]<sup>+</sup>, [C<sub>(-H)</sub>KAN3O-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KI(1)<sub>anti</sub>N3N8-Ba]<sup>+</sup> en fase gaseosa son; 1,0; 5,71 x 10<sup>-6</sup> y 1,17 x 10<sup>-4</sup>, respectivamente. Mientras que las correspondientes poblaciones relativas en solución son 1,0; 0,65; 6,76 x 10<sup>-6</sup>. El hecho de que experimentalmente se observen los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KAN3O-Ba]<sup>+</sup> como mayoritarios permite sugerir que la población observada en la fase gaseosa se parece más a la población de isómeros que se forma en solución, lo que indica que los isómeros se forman en la solución y estas estructuras se mantienen durante la vaporización suave del solvente en la fuente de ESI, como se ha observado previamente en otros trabajos para los complejos de [CGH]<sup>+</sup> y Timidina-Na [Thd-Na]<sup>+</sup>.<sup>[12, 63]</sup>

A diferencia de lo observado para el complejo  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  en el cual se desprotona exclusivamente N1 de C, en el caso de los complejos  $[C_{(-H)}-Pb]^{+[38]}$  se encontró que la interacción con el  $Pb^{2+}$  ocurre a través de los átomos N1-O y N3-N8 de  $[C_{(-H)}]^-$ , indicando que la desprotonación tiene lugar tanto en N1 como en N8. La diferencia observada entre ambos complejos permite concluir que el sitio de desprotonación y el esquema de interacción dependen de la naturaleza del metal, como ya se había observado previamente para U con diversos metales divalentes.<sup>[33-37]</sup>

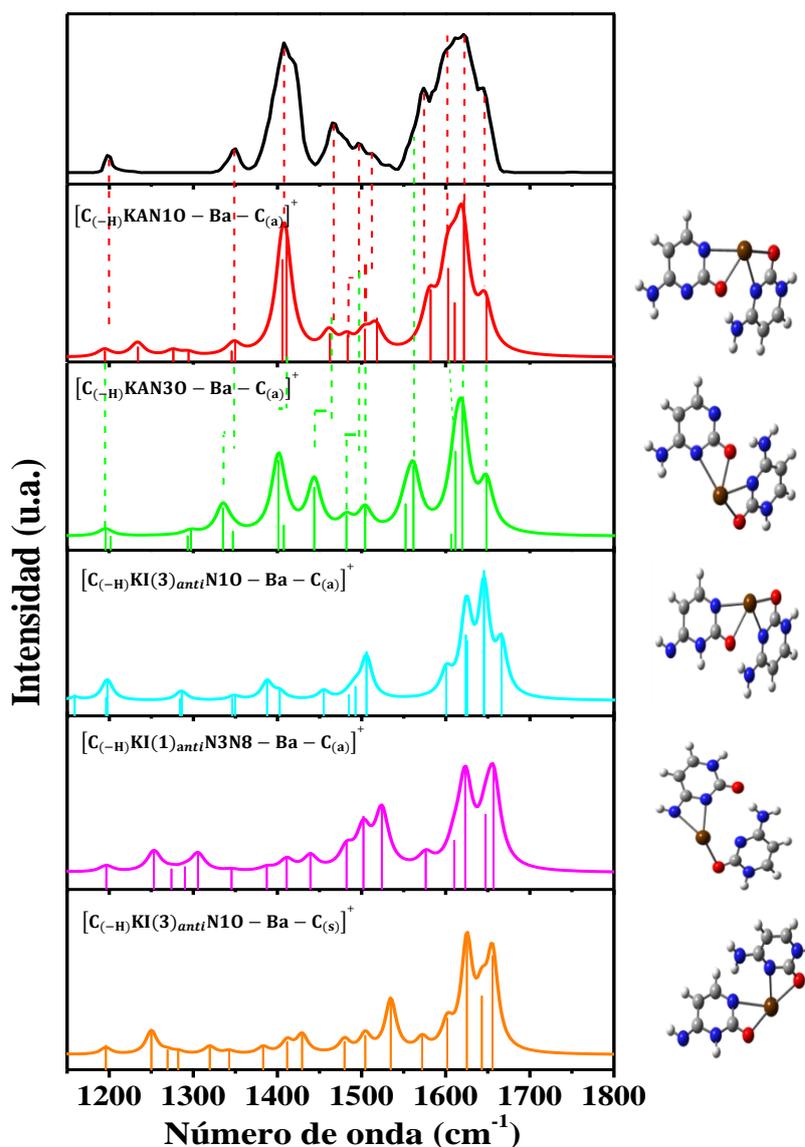
### 5.3.6 Comparación del espectro DMFIR con los espectros IR calculados para los isómeros del complejo $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$

Se calcularon los espectros vibracionales para los cinco isómeros de menor energía del complejo  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$  mostrados en la Tabla 5.6 y se compararon con el correspondiente espectro DMFIR, como se muestra en la Figura 5.7. Todo el espectro DMFIR puede asignarse a las transiciones calculadas para los isómeros más estables  $[C_{(-H)}KAN1O-Ba-C_{(a)}]^+$  y  $[C_{(-H)}KAN3O-Ba-C_{(a)}]^+$  incluso los detalles finos que se observan en el espectro DMFIR son muy bien reproducidos.

Aunque todos los demás isómeros tienen bandas de absorción en la misma región, especialmente entre  $1700$  y  $1550\text{ cm}^{-1}$ , el espectro podría asignarse completamente considerando el isómero más estable. Sin embargo, las bandas que se observan en el espectro calculado para el isómero  $[C_{(-H)}KAN3O-Ba-C_{(a)}]^+$  también se ajustan a las del espectro experimental DMFIR. Además, este isómero es el segundo más estable en ambas fases. En efecto, es casi isoenergético con el mínimo global en fase acuosa ( $1,11\text{ kcal/mol}$ ) y, por lo tanto, no se puede descartar su presencia en la solución. Por su parte, los isómeros KI (ver Tabla 5.6)  $[C_{(-H)}KI(3)_{anti}N1O-Ba-C_{(a)}]^+$ ,  $[C_{(-H)}KI(3)_{anti}N1O-Ba-C_{(s)}]^+$  y  $[C_{(-H)}KI(1)_{anti}N3N8-Ba-C_{(a)}]^+$  se encuentran significativamente más altos en energía, ya sea en fase gaseosa o en solución. Por lo tanto, se espera una población muy baja de estos isómeros a la temperatura experimental de aproximadamente  $298\text{ K}$  (Tabla 5.6)..

En ese sentido, son particularmente notables la intensidad relativa de la banda del espectro DMFIR que aparece a  $1466\text{ cm}^{-1}$  y la asimetría de la banda intensa que

aparece a 1407 cm<sup>-1</sup>, las cuales no se reproducen adecuadamente en el espectro calculado para el isómero [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba-C<sub>(a)</sub>]<sup>+</sup>.



**Figura 5.7:** Comparación del espectro experimental DMFIR del complejo [C<sub>(-H)</sub>-Ba-C]<sup>+</sup> entre 1150–1800 cm<sup>-1</sup> con los espectros IR calculados para los cinco isómeros de menor a nivel B3LYP/6-311G++(d, p)//ECP46MDF.

La intensidad particularmente alta de la banda 1466 cm<sup>-1</sup> en relación a las otras bandas cercanas podría racionalizarse como el solapamiento de las bandas calculadas a 1462 cm<sup>-1</sup> y 1443 cm<sup>-1</sup>, para los modos de estiramiento de los enlaces N1–C1 y N3–C4 de [C<sub>(-H)</sub>]<sup>-</sup> en los isómeros [C<sub>(-H)</sub>KAN1O-Ba-C<sub>(a)</sub>]<sup>+</sup> y [C<sub>(-H)</sub>KAN30-Ba-C<sub>(a)</sub>]<sup>+</sup>, respectivamente.

La asimetría de la banda intensa observada a  $1407\text{ cm}^{-1}$  con un hombro a  $1421\text{ cm}^{-1}$  se podría explicar considerando la presencia de las bandas calculadas a  $1401\text{ cm}^{-1}$  para el isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$  y  $1405\text{ cm}^{-1}$  para el isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$ . En ambos isómeros, esta transición es asignada a los modos de deformación del anillo en el plano, asociado a los modos de estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{N3}-\text{C4}$  para la  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$ .

Por lo tanto, estas dos observaciones podrían ser consideradas como diagnóstico de la presencia del isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$  junto al isómero mayoritario  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$ .

El resto de las transiciones en la región espectral comprendida entre  $1300-1450\text{ cm}^{-1}$  son asignadas principalmente a los modos de deformación del anillo en el plano para los dos isómeros de menor energía. La banda que se observa a  $1348\text{ cm}^{-1}$  en el espectro DMFIR es calculada a  $1350$  y  $1335\text{ cm}^{-1}$  para los isómeros  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$ , respectivamente; y es asignada a los modos de balanceo de los enlaces  $\text{C6}-\text{H}$  y  $\text{N8}-\text{H}$  de  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$ .

La banda a  $1496\text{ cm}^{-1}$  en el espectro DMFIR es calculada a  $1484$  y  $1482\text{ cm}^{-1}$  para los dos isómeros de menor energía, respectivamente y corresponde a la combinación de los modos de estiramiento del enlace  $\text{N3}-\text{C2}$  y de flexión del grupo  $\text{NH}_2$  de  $\text{CKA}(1)$ . Por otro lado, la banda débil que es observada a  $1513\text{ cm}^{-1}$  en el espectro DMFIR es calculada a  $1504\text{ cm}^{-1}$  para ambos isómeros y es asignada a los modos de estiramiento de los enlaces  $\text{N1}-\text{C6} + \text{C4}-\text{C5}$  acoplados al modo de flexión del grupo  $\text{NH}_2$ .

Finalmente, la región espectral entre  $1545-1700\text{ cm}^{-1}$  exhibe una banda ancha e intensa compuesta por varias transiciones.

El hombro que se observa en el espectro DMFIR a  $1565\text{ cm}^{-1}$ , es asignado a la combinación de los modos de estiramiento  $\text{C5}-\text{N3}$  y flexión del grupo  $\text{NH}_2$  para  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$ , cuya frecuencia calculada a  $1561\text{ cm}^{-1}$  se observa únicamente en el espectro simulado para el isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN3O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$ .

El hombro que se observa a  $1600\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo de flexión del grupo  $\text{NH}_2$  de  $[\text{C}_{(-\text{H})}]^-$  en los isómeros  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KAN1O-Ba-C}_{(\text{a})}]^+$  y

$[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA-N3OBa-C}_{(\text{a})}]^+$ , cuyas frecuencias son calculadas a 1603 y 1611 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

El pico intenso observado a 1622 cm<sup>-1</sup> es muy bien reproducido en los espectros calculados de los isómeros  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA-N1OBa-C}_{(\text{a})}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA-N3OBa-C}_{(\text{a})}]^+$  cuyas frecuencias calculadas son 1622 y 1620 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Esta banda es asignada a la combinación de los modos de estiramiento de los enlaces C=O y C5—C6 de CKA(1). Como es esperable, la frecuencia de estiramiento del enlace C=O de CKA(1), calculada a 1715 cm<sup>-1</sup> para la molécula libre, se encuentra desplazada hacia menores frecuencias como consecuencia del debilitamiento de este enlace, que resulta de la interacción directa con Ba<sup>2+</sup>, lo cual es evidenciado por un ligero alargamiento de la distancia de enlace C=O desde 1,216 Å en CKA(1) libre a 1,249 Å en los dos isómeros más estables del complejo  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$ .

El hombro que aparece a 1645 cm<sup>-1</sup>, en la región de mayores frecuencias, es asignado a la frecuencia de la flexión del grupo NH<sub>2</sub> de CKA(1), la cual es calculada a 1649 y 1648 cm<sup>-1</sup> para los isómeros  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA-N1OBa-C}_{(\text{a})}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA-N3OBa-C}_{(\text{a})}]^+$ , respectivamente.

Por lo tanto, el espectro DMFIR del complejo  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  puede asignarse considerando una mezcla de los dos isómeros más estables. A pesar de que el isómero  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA-N3OBa-C}_{(\text{a})}]^+$  es el segundo más estable tanto en fase gaseosa como en solución, la población esperada para esta especie en fase gaseosa es despreciable y no se esperaría que tenga algún aporte significativo al espectro DMFIR. Sin embargo, la población de este isómero en solución es comparable a la del isómero más estable y se espera observar aportes de ambas especies al espectro experimental, como se mostró en los párrafos precedentes. Por lo tanto, al igual que en el caso del complejo  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$ , las estructuras encontradas en fase gaseosa para el complejo  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  representan la composición de las mismas en la solución de partida, indicando una vez más que su estructura se mantiene tras la vaporización en la fuente suave de ESI.

## 5.4 Conclusiones

En este capítulo se presentaron los resultados de la caracterización estructural, mediante espectroscopia DMFIR en complemento con cálculos de estructura electrónica de los complejos que se forman a partir de la interacción entre citosina y  $\text{Ba}^{2+}$ . Las conclusiones presentadas a continuación muestran que el estudio de las propiedades estructurales que se obtienen a partir de la interacción entre las bases del ADN y cationes divalentes, representa un interesante objeto de estudio, pues los cambios estructurales inducidos por estos son muy diversos y pueden modificar significativamente las propiedades de reconocimiento molecular entre las bases, así como favorecer la formación y estabilización de especies aniónicas de las bases.

1. Se encontró que la interacción entre citosina y  $\text{Ba}^{2+}$ , da lugar a complejos monocargados, estabilizando principalmente el anión  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{KA}]^-$ . Adicionalmente, la comparación con los resultados encontrados para los complejos  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Pb}]^+$ ,<sup>[38]</sup> sugiere que el sitio de desprotonación depende de la naturaleza del catión, y por lo tanto el esquema de interacción puede ser modificado en función de las propiedades del catión metálico.
2. Se caracterizaron las estructuras de los complejos monocargados  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba}]^+$  y  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$ . Las estructuras encontradas en la fase gaseosa, para ambos complejos, corresponden a las generadas en solución, consistentemente con lo que observamos para los sistemas estudiados en los capítulos 3 y 4 del presente trabajo de tesis.
3. Las estructuras encontradas para los complejos  $[\text{C}_{(-\text{H})}\text{-Ba-C}]^+$  no corresponden a pares de bases no canónicos de tipo *i-motif*, como sucede para los complejos formados a partir de la interacción entre citosina y cationes monovalentes.

## 5.5 Referencias

- [1]. Watson, J. D.; Crick, F. H. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953, 171, 737–738.
- [2]. Venner, H.; Zimmer, C. Studies on nucleic acids. VIII. Changes in the stability of DNA secondary structure by interaction with divalent metal ions. *Biopolymers*. 1966, 4, 321-335
- [3]. Takezawa, Y.; Shionoya, M. Metal-Mediated DNA Base Pairing: Alternatives to Hydrogen-Bonded Watson-Crick Base Pairs. *Acc.Chem. Res.* 2012, 45, 2066–2076
- [4]. Creze C.; Rinaldi B.; Haser R.; Bouvet P.; Gouet P. Structure of a d(TGGGGT) quadruplex crystallized in the presence of Li<sup>+</sup> ions. *ActaCrystallogr.* 2007, 63, 682–688.
- [5]. Debmalya, B.; Arachchilage, G.M.; Basu, S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. *Frontiers in Chemistry*. 2016, 4, 38-50
- [6]. Gabelica, V.; Rosu, F.; De Pauw, E.; Lemaire, J.; Gillet, J-C.; Pouilly, J-C.; Lecomte, F.; Gregoire, G.; Schermann, J-P.; Desfrancois, C. Infrared Signature of DNA G-Quadruplexes in the Gas Phase *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, (6), 1810-1811
- [7]. Guéron, M.; Leroy, J. L. The *I-Motif* in Nucleic Acids. *Curr.Opin.Struct. Biol.* 2000, 10, 326–331.
- [8]. Gehring, K.; Leroy, J.-L.; Gueron, M. A Tetrameric DNA Structure with Protonated Cytosine Cytosine Base Pairs. *Nature*. 1993, 363, 561–565.
- [9]. Yang, B.; Rodgers, M. T. 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.* 2013, 136, 282-290.
- [10]. Féraud, G.; Berdakin, M.; Dedonder, C.; Jouvét, C.; Pino, G.A. Excited States of Proton-Bound DNA/RNA Base Homodimers: Pyrimidines. *J. Phys. Chem. B* 2015, 119, 6, 2219-2228

- [11]. Hoogsteen, K. The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex Between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crystallogr.* 1963, 16, 907–916.
- [12]. Cruz-Ortiz, A.F.; Rossa, M.; Berthias, F.; Berdakin, M.; Maitre, P.; Pino, G.A. Fingerprints of Both Watson–Crick and Hoogsteen Isomers of the Isolated (Cytosine-Guanine) $H^+$  Pair *J. Phys. Chem. Lett.*, 2017, 8(22), 5501–5506
- [13]. Swasey, S.M.; Espinosa, L.; Lopez-Acevedo, O.; Pavlovich, J.; Gwinn, E. Silver (I) as DNA glue:  $Ag^+$ -mediated guanine pairing revealed by removing Watson-Crick constraints. *Sci. Rep.* 2015, 5, 10163-10172
- [14]. Day, H. A.; Huguin, C.; Waller, Z. A. E. Silver Cations Fold I-Motif at Neutral pH. *Chem. Commun.* 2013, 49, 7696–7698.
- [15]. Megger, D.A.; Fonseca Guerra, C.; Bickelhaupt, F.M.; Müller, J. Silver(I)-mediated Hoogsteen-type base pairs. *J Inorg. Biochem.* 2011, 105 (11), 398-404.
- [16]. Berdakin, M.; Steinmetz, V.; Maitre, P.; Pino, G.A. Gas Phase Structure of Metal Mediated (Cytosine) $_2Ag^+$  Mimics the Hemiprotonated (Cytosine) $2H^+$  Dimer in i-Motif Folding. *J. Phys. Chem. A.* 2014, 118, 3804–3809.
- [17]. Gao, J.; Berden, G.; Rodgers, M.T.; Oomens, J. Interaction of  $Cu^+$  with cytosine and formation of i-motif-like  $C-M^+-C$  complexes: alkali versus coinage metals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016, 18, 7269-7277.
- [18]. Salpin, J-Y.; Guillaumont, S.; Tortajada, J.; MacAleese, L.; Lemaire, J.; Maitre, P. Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *Chem Phys Chem.* 2007, 8, 2235 – 2244.
- [19]. Broquier, M.; Soorkia, S.; Pino, G.; Dedonder-Lardeux, C.; Juvet, C.; Grégoire, Gilles. Excited State Dynamics of Cold Protonated Cytosine Tautomers: Characterization of Charge Transfer, Intersystem Crossing, and Internal Conversion Processes. *J. Phys. Chem. A.* 2017, 121, 34, 6429-6439.

- [20]. Berdakin, M.; Féraud, G.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvet, C.; Pino, G.A. Excited states of protonated DNA/RNA bases. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2014, 16, 10643—10650.
- [21]. Yang, B.; Wu, R.R.; Polfer, N.C.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M.T.; IRMPD action spectroscopy of alkali metal cation-cytosine complexes: effects of alkali metal cation size on gas phase conformation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013, 24, 1523-1533.
- [22]. Prado, M.A.S.; Garcia João, E.; Martins, B.L. Theoretical study of cytosine–Mg complex. *Chemical Physics Letters.* 2006, 418, 264-267.
- [23]. Berdakin, M.; Steinmetz, V.; Maitre,P.; Pino, G.A. On the Ag<sup>+</sup>–cytosine interaction: the effect of microhydration probed by IR optical spectroscopy and density functional theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17, 25915-25924.
- [24]. Kabeláč, M.; Hobza, P. Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> Binding to All Tautomers of Adenine, Cytosine, and Thymine and the Eight Most Stable Keto/EnolTautomers of Guanine: A Correlated ab Initio Quantum Chemical Study. *J. Phys. Chem. B.* 2006 11, (029) 14515-14523.
- [25]. Yong, W.; Bin-Quan, L.; Zhiyu, Y.; Xinyue, Z.; Brandon, R.; Kent, G.; Li-Qun, G. Single Molecule Investigation of Ag<sup>+</sup> Interactions with Single Cytosine-, Methylcytosine-and Hydroxymethyl cytosine-Cytosine Mismatches in a Nanopore. *Scientific Reports.* 2014, 4, 5883-5894
- [26]. Vázquez, M.; Martínez, Ana. Theoretical Study of Cytosine–Al, Cytosine–Cu and Cytosine–Ag (Neutral, Anionic and Cationic). *J. Phys. Chem. A.* 2008 112, 1033-1039
- [27]. Kobayashi, R. Correlated Ab Initio Quantum Chemical Study of the Interaction of the Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> Ions with the Tautomers of Cytosine. *J. Phys. Chem. A.* 2012, 116 (20), 4987–4994.
- [28]. Marino, T.; Mazzuca, D.; Toscano, M.; Russo, N.; A. grand. Gas Phase Interaction of Zinc Ion With Purine and Pyrimidine DNA and RNA Bases. *Int. J. Quantum Chem.* 2007, 107, 311-317.

- [29]. Sabyasachi, B.; Debasish, M.; Deepanwita, G.; Abhijit, K.D. Density functional theory study of interaction, bonding and affinity of group IIb transition metal cations with nucleic acid bases. *Chemical Physics*. 2012, 400, 108-117.
- [30]. Rostov, I.V.; Kobayashi, R. A correlated ab initio quantum chemical study of the interaction of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions with the tautomers of cytosine in the presence of polar solvent. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013, 15, 12930-12939.
- [31]. Vázquez, M.V.; Martínez, A. Ca, Cd, Zn, and Their Ions Interacting with Cytosine: A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2007, 111(39), 9931–9939.
- [32]. Guillaumont, S.; Tortajada, J.; Salpin, J-Y.; Lamsabhi, A.M. Experimental and computational study of the gas-phase interactions between lead(II) ions and two pyrimidic nucleobases: Uracil and thymine *Int. J. Mass Spectrom.* 2005, 243, 279–293.
- [33]. Lamsabhi, A.M.; Alcamí, M.; Mó, O.; Yáñez, M.; Tortajada, J. Gas-Phase Deprotonation of Uracil– $\text{Cu}^{2+}$  and Thiouracil– $\text{Cu}^{2+}$  Complexes. *J. Phys. Chem. A*. 2006, 110, 5, 1943-1950
- [34]. Power, B.; Haldys, V.; Salpin, J-Y ; Fridgen, T.D. Structures of  $[\text{M}(\text{Ura-H})(\text{Ura})]^+$  and  $[\text{M}(\text{Ura-H})(\text{H}_2\text{O})_n]^+$  ( $\text{M} = \text{Cu}, \text{Zn}, \text{Pb}; n = 1-3$ ) Complexes in the Gas Phase by IRMPD Spectroscopy in the Fingerprint Region and Theoretical Studies. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2018, 429, 56-65.
- [35]. Power, B.; Haldys, V.; Salpin, J-Y ; Fridgen, T.D. Structures of  $[\text{M}(\text{Ura-H})(\text{H}_2\text{O})_n]^+$  ( $\text{M} = \text{Mg}, \text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}; n = 1-3$ ) complexes in the gas phase by IRMPD spectroscopy and theoretical studies. *J. Mass Spectrom.* 2016, 51, 236–244.
- [36]. Power, B.; Haldys, V.; Salpin, J-Y ; Fridgen, T.D. Structures of bare and singly hydrated  $[\text{M}(\text{Ura-H})(\text{Ura})]^+$  ( $\text{M} = \text{Mg}, \text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}$ ) complexes in the gas phase by IRMPD spectroscopy in the fingerprint region. *Int. J. Mass Spectrom.* 2015, 378, 328-335.
- [37]. Ali, O.Y.; Fridgen, T.D. Structures and Fragmentation of  $[\text{Cu}(\text{Uracil-H})(\text{Uracil})]^+$  in the Gas Phase. *Int. J. Mass Spectrom.* 2012, 233, 330–332

- [38]. Salpin, J-Y.; Haldys, V.; Guillaumont, S.; Tortajada, J.; Hurtado, M.; Lamsabhi, A.M. Gas-Phase Interactions between Lead(II) Ions and Cytosine: Tandem Mass Spectrometry and Infrared Multiple-Photon Dissociation Spectroscopy Study. *Chem Phys Chem*. 2014, 15, 2959 – 2971.
- [39]. Bakker, J.M.; Besson, T.; Lemaire, J.; Scuderi, D.; Maitre, P. Gas-Phase Structure of a  $\pi$ -Allyl–Palladium Complex: Efficient Infrared Spectroscopy in a 7 T Fourier Transform Mass Spectrometer. *J. Phys. Chem. A*. 2007, 111, 51, 13415-13422.
- [40]. Prazeres, R.; Glotin, F.; Insa, C.; Jaroszynski, D. A.; Ortega, J. M. Two-colour operation of a Free-Electron Laser and applications in the mid-infrared. *Eur. Phys. J. D*. 1998, 3, 87-93.
- [41]. Sinha, R. K.; Nicol, E.; Steinmetz, V.; Maitre, P. Gas phase structure of micro-hydrated  $[\text{Mn}(\text{ClO}_4)]^+$  and  $[\text{Mn}_2(\text{ClO}_4)_3]^+$  ions probed by infrared spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 2010, 21, 758–772.
- [42]. 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, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
- [43]. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 5648–5652.; Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*. 1988, 37, 785 – 789.

- [44]. Lim, I.S.; Stoll, H.; Schwerdtfeger, P. Relativistic small-core energy-consistent pseudopotentials for the alkaline-earth elements from Ca to Ra. *J. Chem. Phys.* 2006, 124, 034, 107
- [45]. Plumley, J.A.; Dannenberg, J.J. A comparison of the behavior of functional/basis set combinations for hydrogen-bonding in the water dimer with emphasis on basis set superposition error. *J. Comput. Chem.* 2011, 32, 1519–1527.
- [46]. Merrick, J.P. Damian,, Moran.; Radom, L. An Evaluation of Harmonic Vibrational Frequency Scale Factors. *J. Phys. Chem. A.* 2007. 111, 45, 11683-11700.
- [47]. Reed, AE.; Curtiss, LA.; Weinhold, F. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem Rev.* 1988, 88, 899–926.
- [48]. Donald, W.A.; Khairallah, G.N.; O’Hair, R.A.J. The Effective Temperature of Ions Stored in a Linear Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013, 24:811-815.
- [49]. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* 2005, 105 2999-3093.
- [50]. Franska, M. Interactions of nucleobases with alkali earth metal cation electrospray ionization mass spectrometric study. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2007, 13, 339– 346.
- [51]. Ganguly, S.; Kundu, K.K. Protonation/deprotonation energetics of uracil, thymine, and cytosine in water from e.m.f./spectrophotometric measurements. *Can. J. Chem.* 1994, 72, 1120-1126.
- [52]. de Vries, M.S. (2014) Gas-Phase IR Spectroscopy of Nucleobases. In: Rijs A., Oomens, J. (eds) *Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules. Topics in Current Chemistry*, vol 364. Springer, Cham.
- [53]. Nir, E.; Müller, M.; Grace, L.I.; de Vries, M.S.; REMPI spectroscopy of cytosine. *Chem. Phys. Lett.* 2002, 355, 59 – 64.
- [54]. Feyer, V.; Plekan, O.; Richter, R.; Coreno, M.; de Simone. M.K.; Prince, C.; Trofimov, A.B.; Zaytseva, I.L.; Schirmer, J. Tautomerism in Cytosine and Uracil: A

Theoretical and Experimental X-ray Absorption and Resonant Auger Study. *J. Phys. Chem. A*. 2010, 114, 10270–10276.

[55]. Trygubenko, S.A.; Bogdan, T.V.; Rueda, M.; Orozco, M.; Luque, F.J.; Spöner, J.; Slavicek, P.; Hobza, P. Correlated ab initio study of nucleic acid bases and their tautomers in the gas phase, in a microhydrated environment and in aqueous solution Part 1. Cytosine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4, 4192 – 4203.

[56]. Kosenkov, D.; Kholod, Y.; Gorb, L.; Shishkin, O.; Hovorun, D.M.; Mons, M.; Leszczynski, J. Ab Initio Kinetic Simulation of Gas-Phase Experiments: Tautomerization of Cytosine and Guanine. *J. Phys. Chem. B*. 2009, 113, 6140 – 6150.

[57]. Luo, Q.; Li, J.; Li, Q.S.; Kim, S.; Wheeler, S.E.; Xie, Y.; Schaefer III, H. F. Electron affinities of the radicals derived from cytosine *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, 7, 861-865.

[58]. Mazzuca, D.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. A theoretical study on tautomerization processes of dehydrated and monohydrated cytosine *Journal of Molecular Structure. Theochem.* 2007, 811, 161–167.

[59]. Vázquez M.V.; Martínez, A.; Dolgounitcheva, O.; Ortiz, J.V. Deprotonated Cytosine Anions: A Theoretical Prediction of Photoelectron Spectra. *J. Phys. Chem. A*. 2006. 110, 38, 11174-11177

[60]. Zhu, G-Z.; Chen-Hui, Q.; Lai-Sheng, W. Tautomer-Specific Resonant Photoelectron Imaging of Deprotonated Cytosine Anions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 1 – 6

[61]. Wincel, H. Microhydration of Deprotonated Nucleobases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2016, 27, 1383-1392.

[62]. Ali, O.Y.; Fridgen, T.D. Structures of electrosprayed Pb(Uracil-H)<sup>+</sup> complexes by infrared multiple photon dissociation spectroscopy. *Int. J. Mass Spectrom.* 2011, 308(2-3), 167–174.

[63]. Zhu, Y.; Roy, H.A.; Cunningham, N.A.; Strobehn, S.F.; Gao, J.; Munshi, M.U.; Berden, G.; Oomens, J.; Rodgers, M.T. IRMPD Action Spectroscopy, ER-CID Experiments, and Theoretical Studies of Sodium Cationized Thymidine and 5-

Methyluridine: Kinetic Trapping During the ESI Desolvation Process Preserves the Solution Structure of [Thd+Na]<sup>+</sup>. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2017, 28, 2423-2437

# **Capítulo 6**

---

## **Conclusiones y Perspectivas**

---



## 6.1 Conclusiones

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue el estudio de la naturaleza de las interacciones entre las bases del ADN y cationes metálicos y  $H^+$  con el propósito comprender los efectos de las mismas sobre las propiedades estructurales y la reactividad de las bases, que conducen a la formación de pares no canónicos, responsables de estabilizar plegamientos no canónicos en el ADN.

Los sistemas estudiados corresponden a los complejos iónicos  $[CGH]^+$  y  $[CGAg]^+$ , lo que nos permitió evaluar el efecto de la naturaleza del catión sobre la estructura del par CG. El otro sistema estudiado corresponde a los complejos iónicos que se forman a partir de la interacción entre C y el catión divalente  $Ba^{2+}$ .

Los sistemas estudiados representan modelos reduccionistas factibles de ser estudiados en fase gaseosa mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) acoplada a espectroscopia DMFIR. A continuación se repasan brevemente las conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis.

En el capítulo 3 se presentaron los resultados de la caracterización estructural y energética del par protonado  $[CGH]^+$ . Los experimentos de DIMS-MS/MS y de espectroscopia DMFIR evidenciaron que, en las condiciones experimentales estudiadas se forma una mezcla de los isómeros: tipo Hoogsteen ( $HooH^+$ ) y Watson-Crick ( $WCH^+$ ), cuyas poblaciones relativas dependen del pH de la solución a partir de la cual se los genera. En ese sentido, se encontró que a  $pH = 5,8$  se forma preferencialmente el isómero  $WCH^+$  ya que a ese pH las bases se encuentran principalmente en su forma neutra por lo que en la solución se forma principalmente el par WC neutro, cuya estructura se conserva tras la vaporización y es protonada en el N(7)G en la fuente ESI. Por otro lado, a  $pH = 3,2$  se forman mayoritariamente los isómeros  $HooH^+$ . A ese pH las bases C y G se encuentran principalmente protonadas, por lo que se ve favorecida la formación del apareamiento no canónico tipo  $HooH^+$ , responsable de la estabilización de los triplex de ADN.

El análisis estructural y energético reveló que en el caso de la estructura tipo  $HooH^+$  se forma una mezcla de dos isómeros ( $HooN(3)CH^+$  y  $Hoo N(7)GH^+$ ). En ambos el  $H^+$  se encuentra entre N(3) de C y N(7) de G, y difieren únicamente en la distancia de enlace entre el  $H^+$  y el N de cada base, pudiendo encontrarse más cerca

de C ( $\text{HooN(3)CH}^+$ ) o de G ( $\text{Hoo N(7)GH}^+$ ). En efecto, se encontró que ambos isómeros  $\text{HooH}^+$  coexisten en un doble pozo de energía potencial que se encuentran acoplados a través del movimiento del  $\text{H}^+$  a lo largo de la coordenada  $\text{N(7)G-H}^+-\text{N(3)C}$  y la energía de punto cero (ZPE) a lo largo de esta coordenada se encuentra por encima de la barrera de energía para la transferencia de  $\text{H}^+$  entre ambas bases. Estos resultados contrastan con el consenso general que sostiene que el  $\text{H}^+$  se une exclusivamente al  $\text{N(3)C}$ .

Los resultados obtenidos demuestran que la metodología empleada representa una herramienta rápida y eficiente para clasificar los pares de bases de tipo  $\text{WCH}^+$  y  $\text{HooH}^+$ . Se espera que esto sea aplicable como una metodología fácil y versátil basada en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en complemento con espectroscopia DMFIR para determinar la existencia de pares tipo  $\text{HooH}^+$  asociados a enfermedades y mutaciones genéticas en muestras reales.

Por su parte, en el capítulo 4 se estudiaron los complejos  $[\text{GAg}]^+$  y  $[\text{CGAg}]^+$ , mediante la misma metodología que se utilizó en el capítulo 3. En primer lugar, se encontró que la interacción entre G y el catión  $\text{Ag}^+$  induce una fuerte estabilización del tautómero  $\text{GKA(9)}$ , en el cual el catión  $\text{Ag}^+$  interacciona a través de los átomos de  $\text{N(7)}$  y  $\text{O}$  para dar lugar al isómero  $[\text{GKA(9)N7Ag}]^+$  que es el más estable de todas las posibles estructuras, tanto en fase gaseosa como en solución. Sin embargo, también se observó experimentalmente la presencia del isómero  $[\text{GKA(7)N9Ag}]^+$  donde el catión  $\text{Ag}^+$  interacciona a través de los átomos de  $\text{N(9)}$  y  $\text{N(3)}$  del tautómero  $\text{GKA(7)}$ . Éste isómero es el segundo más estable en fase gaseosa con una población relativa despreciable, mientras que en solución se encuentra ligeramente por encima del mínimo global con una población relativa calculada, comparable a la del isómero más estable.

Para el complejo iónico  $[\text{CGAg}]^+$  se encontró que se favorece ampliamente la formación de un apareamiento tipo  $\text{HooAg}^+ [\text{C-Ag-G}]^+$ , en el cual el catión  $\text{Ag}^+$  interactúa simultáneamente con  $\text{N(3)C}$  y  $\text{N(7)G}$  de manera equidistante, lo cual da lugar a la formación de un único isómero de esta estructura, a diferencia de lo observado para el par  $\text{HooH}^+$  (capítulo 3). El análisis estructural y energético reveló que los isómeros  $\text{WCAg}^+$  no se forman en las condiciones estudiadas.

Los resultados presentados en los capítulos 3 y 4 demuestran que tanto la interacción con  $H^+$  como con  $Ag^+$  conduce a la formación de apareamientos no canónicos de tipo Hoo entre C y G. Asimismo, se encontró que las propiedades estructurales son dependientes de la naturaleza del catión. En efecto, se encontró que la protonación de las bases ( $pH = 3,2$ ) favorece la formación de dos isómeros  $HooH^+$ , que a su vez coexisten en un doble pozo de energía potencial acoplado por el movimiento del  $H^+$  entre las bases. Mientras que la interacción con  $Ag^+$  favorece la formación de un único isómero  $HooAg^+$ .

En el capítulo 5 se presentó la caracterización estructural (teórica y experimental) de los complejos  $[C_{(-H)}-Ba]^+$  y  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$ , con el objeto de estudiar el efecto de la interacción de las bases con cationes divalentes sobre su estructura y reactividad.

Se encontró que la interacción con el  $Ba^{2+}$ , da lugar a la formación de complejos monocargados, estabilizando principalmente el anión  $[C_{(-H)}KA]^-$  cuya interacción con el catión metálico se da a través de los átomos N(1) o N(3) y O dando lugar a la formación de dos isómeros del complejo monocargado  $[C_{(-H)}-Ba]^+$ :  $[C_{(-H)}KAN1O-Ba]^+$  y  $[C_{(-H)}KAN3O-Ba]^+$ , respectivamente. Consistentemente con los resultados obtenidos en los capítulos 3 y 4, los isómeros observados en fase gaseosa, conservan las estructuras que se forman en solución.

Por su parte, los isómeros más estables del complejo  $[C_{(-H)}-Ba-C]^+$  presentan como característica en común una estructura tetracoordinada, en la cual el catión  $Ba^{2+}$  actúa como átomo central, mientras que  $[C_{(-H)}]^-$  y C se encuentran en diferentes planos. Cabe destacar que no se encontró ninguna estructura plana en fase gaseosa ni en solución, contrario a lo informado para los complejos monocargados de  $[C-M-C]^+$  (donde M = cationes monovalentes), en los cuales se forman estructuras planas del tipo *i-motif*.

La comparación de los resultados reportados previamente por Salpin *et al.* para el complejo  $[C_{(-H)}-Pb]^+$ , con los resultados presentados en el capítulo 5 demuestra que la naturaleza de las interacciones entre las bases del ADN y cationes divalentes, varía significativamente en función de las propiedades del catión.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis reflejan que las especies isoméricas formadas en solución mantienen su estructura cuando son transferidas a la fase gaseosa en la fuente de ESI, por lo que es posible utilizar la caracterización en la fase gaseosa para obtener información sobre la estructura de las especies presentes en la solución.

### 6.2 Perspectivas

Las perspectivas más prominentes que surgen de este trabajo están relacionadas con los resultados obtenidos en el capítulo 3 que muestran que la fragmentación del isómero  $WCH^+$  del par de bases protonado  $[CGH]^+$  genera los fragmentos  $[GH]^+$  (91%) y  $[CH]^+$  (9%). Considerando que en el par de bases el protón no se encuentra compartido por ambas bases, sino exclusivamente sobre N(7) de G, la única posibilidad de formar el fragmento  $[CH]^+$  es a través de una transferencia de  $H^+$  (PT) intermolecular entre G y C.

Por mucho tiempo se ha predicho que esta reacción puede conducir a mutaciones puntuales en el ADN y los cálculos teóricos muestran que la protonación del par WC produciría una disminución en la barrera de energía para la reacción de PT.

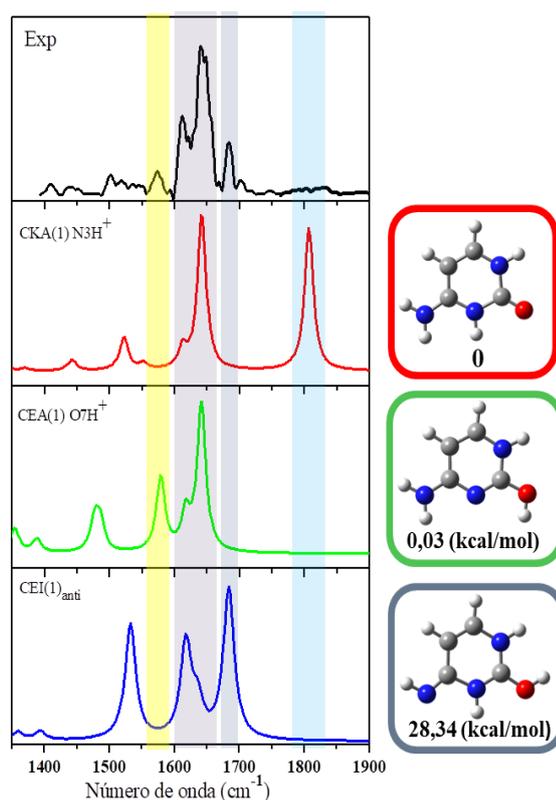
Por tal motivo, a modo de perspectiva, se espera caracterizar estructuralmente, mediante espectroscopía DMFIR, los fragmentos  $[GH]^+$  y  $[CH]^+$  producidos a partir de la fragmentación inducida por colisión (CID) o fotoinducida (PID) del par  $WCH^+$  aislado en una trampa iónica.

De manera preliminar, se comenzó a realizar la caracterización estructural del fragmento  $[CH]^+$  que se produce luego de la fotofragmentación a 266 nm del par protonado  $[CGH]^+$ , encontrando que se observan tres tautómeros de esta base protonada ( $CKA(1)N3H^+$ ,  $CEA(1)O7H^+$  y  $CEI(1)_{anti}$ ) los cuales se muestran en la Figura 6.1. La gran diversidad de isómeros de  $[CH]^+$  que se observan por espectroscopia DMFIR indica la apertura de muchos canales de isomerización y transferencia de  $H^+$  a esta energía de excitación (4,6 eV).

Se debería continuar realizando la caracterización estructural de fragmento  $[GH]^+$ , como así también sería muy interesante variar la longitud de onda de

excitación y el voltaje de colisión en el caso de los experimentos de fragmentación por CID y caracterizar ambos fragmentos bajo la distintas condiciones de fragmentación.

Finalmente, se espera también caracterizar la fragmentación del isómero  $\text{HooH}^+$  del par protonado  $[\text{CGH}]^+$ .



**Figura 6.1:** Comparación del espectro DMFIR de  $[\text{CH}]^+$ , producto de la fotofragmentación del ion padre de  $[\text{CGH}]^+$  con los isómeros de  $\text{CKA}(1)\text{N}_3\text{H}^+$ ,  $\text{CEA}(1)\text{O}_7\text{H}^+$ ,  $\text{CEI}(1)_{\text{anti}}$ .





## **Agradecimientos**

En primer lugar agradecer a la república de Argentina y todas las instituciones que me permitieron continuar con el proceso de formación académica y humana.

Al CONICET por otorgarme la beca y financiar los proyectos de los que he hecho parte a lo largo de este proceso de formación académica - científica.

A la Universidad Nacional de Córdoba, es realmente dignificante ser parte de una institución que tiene un lugar muy importante en la historia de la educación en américa latina.

A la Facultad de Ciencias Químicas y en particular al Departamento de Fisicoquímica y al INFIQC, como así también a todos los miembros de éstos que de una u otra manera hicieron parte fundamental de este proceso de formación.

A Gustavo, por hacerme parte del grupo, por su paciencia, pero sobre todo por todas sus enseñanzas. Sin duda que la rigurosidad científica con que afronta cada problema hizo posible alcanzar los objetivos propuestos para este trabajo de tesis.

A los miembros del laboratorio de Chimie Physique, Université Paris-Sud, por ofrecer sus instalaciones para llevar a cabo gran parte de los experimentos realizados durante este trabajo de tesis doctoral, así como también por la importante contribución al proceso de formación académica - científica.

A todos los miembros de la comisión asesora//evaluadora, Alejandro, Marcos y Maxi, por sus recomendaciones y seguimiento a lo largo de este proceso.

A los chicos del grupo con quienes he compartido, comparto y espero seguir compartiendo experiencias de vida.

Ahora la parte más difícil de escribir y a su vez la más importante, pues no existen palabras lo suficientemente precisas para describir lo mucho por agradecer a los afectos que se constituyen en parte de nuestro ser social. En ese camino de construcción de un ser social humanista mis padres representan son un pilar

## Agradecimientos

---

fundamental, sobre todo esa enseñanza y ese insistir en que la educación es el bien máspreciado que se puede adquirir en toda la vida. A mi hermano, Milena y la bella Emilia, pues con su tierna rebeldía enseña muchas cosas que no se aprenden en los libros. A mis abuelos y el resto de la familia, especialmente a mis tías pues en ellas encontré un ejemplo de la importancia de la educación.

Por último y no menos importante agradecer muy especialmente a Dariana por su compañía incondicional durante la parte final de este trabajo. Por acompañarme durante este proceso de vivir, porque se ha convertido en la cómplice ideal para la construcción de un mundo al alcance de nuestros sueños, parafraseando a alguien que lei alguna vez *“Es preciso soñar, pero con la condición de creer en nuestros sueños. De examinar con atención la vida real, de confrontar nuestra observación con nuestros sueños, y de realizar escrupulosamente nuestra fantasía”*. Infinitas gracias por todas esas cosas que no abarcan las palabras.