

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS
“ESTUDIO TEÓRICO/EXPERIMENTAL DE LA
REACTIVIDAD INTRÍNSECA (POR TRANSFERENCIA
PROTÓNICA) DE LOS DERIVADOS METILADOS DEL
URACILO”

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN FÍSICA

ELABORADA POR:

JULIO RUBÉN BARRIOS LLACUACHAQUI

ASESOR:

Dr. JUAN ZENON DÁVALOS PRADO

CO-ASESOR:

Dr. JOSEP MARÍA OLIVA-ENRICH

LIMA – PERÚ

2022

Con mucho amor a mi abuelita Apolonia Salazar Rojas.

Con muchísimo amor abuelita, te dedicó este trabajo.

Te extraño muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Dr. Juan Dávalos Prado y mi co-asesor, Dr. Josep María Oliva, por permitir mi formación académica en el laboratorio a cargo, compartir sus conocimientos y experiencias, y sobre todo su paciencia y tolerancia. Cabe resaltar que este trabajo de maestría se realizó en el Laboratorio de Química Física “Rocasolano” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, España. Agradezco infinitamente la oportunidad que se me dio de realizar una estancia de investigación por tres meses en su laboratorio, una experiencia única en mi vida. Mi más sincero agradecimiento.

Al coordinador de la maestría, Dr. Héctor Loro, por tomarse el tiempo en las coordinaciones de este programa y su sincera amistad. Al programa de Becas de Maestría de la UNI-Convenio N° 167-2015 – Fondecyct UNI, por el apoyo económico brindado durante los estudios de maestría.

A mis amigos de la maestría por soportar estos dos años de la maestría mi presencia y aun así siempre estar. Por las horas que pasamos en clase compartiendo conocimientos y consejos de vida. Porque más que amigos, se convirtieron en mi familia. Por todo eso y mucho más. ¡Gracias!

A mi familia en general que son parte muy importante en mi desarrollo personal y profesional. A mis primos hermanos y primos gracias por el apoyo que me han dado, los quiero mucho. A mis tíos en general que han estado presente durante mi crecimiento en esta vida académica, les agradezco infinitamente todo el apoyo y cariño que me han brindado. Esta es una manera de demostrarle mi agradecimiento y cariño.

Por último, y por supuesto lo más importante en mi vida, A MIS PADRES. Tengo tanto que agradecerles que un par de líneas no es suficiente. Gracias por apoyarme estos años de vida académica, sin lugar a duda, jamás hubiese podido lograr concluir estudios de maestría sin su apoyo. Gracias por alentar mis sueños y por hacer todo lo posible para que los cumpla. LOS AMO Y LES ESTARÉ AGRADECIDO TODA MI VIDA.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
CAPITULO I.	1
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	1
1.1 <i>Objetivo general</i>	1
1.2 <i>Objetivos específicos</i>	1
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	2
CAPITULO II.	3
ANTECEDENTES Y GENERALIDADES	3
2.1 ESTADO DEL ARTE DE LOS DERIVADOS METILADOS DE URACILO	3
2.2 AFINIDAD PROTÓNICA, BASICIDAD Y ENTROPÍA DE PROTONACIÓN EN FASE GASEOSA.....	4
CAPÍTULO III.	6
QUÍMICA COMPUTACIONAL	6
3.1 TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD (DFT).....	6
3.1.1 <i>Funcional de Intercambio-Correlación</i>	8
3.1.2 <i>Funcional B3LYP</i>	9
3.2 CONCEPTOS IMPORTANTES.	9
3.2.1 <i>Optimización de la geometría</i>	9
3.3 PROGRAMA Y CLÚSTERES.	11
CAPÍTULO IV.	12
PARTE EXPERIMENTAL	12
4.1 COMPUESTOS ESTUDIADOS	12
4.2 TÉCNICA EXPERIMENTAL UTILIZADA.....	12
4.2.1 <i>Espectrometría de masas</i>	12
4.2.1.1 Elementos de la espectrometría de masas	13
4.2.1.2 Disociación Inducida por Colisión (CID).....	16
4.2.1.3 Espectrómetro de masas triple cuadrupolo (TQ-MS).....	16
4.2.1.4 Método Cinético extendido de Cooks (EKCM)	17
4.2.1.5 Procedimientos de medida.	19
4.2.1.6 Compuestos de referencia. Valores termoquímicos.....	19
4.2.1.7 Condiciones experimentales del Espectrómetro de masas.....	20
CAPÍTULO V.	22
RESULTADOS Y DISCUSIONES:	22
5.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES	22
5.1.1 <i>Determinación de la afinidad protónica, basicidad y la entropía de protonación de los derivados metilados de uracilo (1, 2, y 3)</i>	22
5.2 RESULTADOS COMPUTACIONALES	31
5.2.1 <i>Análisis conformacional de 1, 2, y 3</i>	31
5.2.2 <i>Análisis conformacional de las moléculas protonadas de 1, 2 y 3</i>	31
5.2.4 <i>Análisis del potencial electrostático molecular (MEP) de 1, 2 y 3</i>	35
5.2.5 <i>Análisis del potencial electrostático molecular (MEP) del anión más estable de 1, 2 y 3</i>	38

5.2.6 Análisis de la distribución de carga NBO de 1, 2 y 3 y sus respectivos aniones más estables.	40
5.2.7 Determinación de la afinidad protónica, basicidad y entropía de protonación de 1, 2, y 3.	41
5.2.8 Características estructurales y energéticas de moléculas neutras y protonadas.	41
CAPÍTULO VI.	46
CONCLUSIONES	46
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	47
ANEXO	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Compuestos estudiados y sus características.....</i>	12
Tabla 2. <i>Valores termoquímicos en fase gas de las bases de referencia.....</i>	20
Tabla 3. <i>Condiciones experimentales generales del ESI.</i>	20
Tabla 4. <i>Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 1.....</i>	20
Tabla 5. <i>Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 2.....</i>	21
Tabla 6. <i>Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 3.....</i>	21
Tabla 7. <i>Valores de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ de los productos CID de los heterodímeros de 1 y seis bases de referencia, obtenidos a diferentes E_{cm}.....</i>	22
Tabla 8. <i>Valores de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ de los productos CID de los heterodímeros de 2 y cuatro bases de referencia, obtenidos a diferentes E_{cm}.</i>	22
Tabla 9. <i>Valores de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ de los productos CID de los heterodímeros de 3 y cinco bases de referencia, obtenidos a diferentes E_{cm}.....</i>	23
Tabla 10. <i>Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 1.....</i>	26
Tabla 11. <i>Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 2.....</i>	27
Tabla 12. <i>Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 3.....</i>	27
Tabla 13. <i>Resultados experimentales obtenidos de la PA, GB y $\Delta_p S^0$ de 1, 2 y 3.</i>	30
Tabla 14. <i>Parámetros energéticos de obtenidos a nivel de teoría B3LYP / 311++G(3df,2p).</i>	31
Tabla 15. <i>Parámetros energéticos de obtenidos a nivel de teoría B3LYP / 311++G(3df,2p).</i>	35
Tabla 16. <i>Resultados experimentales obtenidos de la PA, GB y $\Delta_p S^0$ de 1, 2 y 3.....</i>	41
Tabla 17. <i>Estabilidad termodinámica [$\Delta_f H_m^0(g)$], valores de afinidad protónica (PA) y basicidad (GB) de derivados de uracilo metilado y 5,6-dihidro uracilo. Todos los valores en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.....</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del 1,5-dimetil uracilo (1), 5,6-dimetil uracilo (2) y 5,6-dihidro-6-metil uracilo (3).....	3
Figura 2. Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TQ Varian/Agilent MS-320. Foto tomada por Julio Barrios (2019).....	13
Figura 3. Representación esquemática de un sistema de básico de espectrometría de masas	13
Figura 4. Esquema de una fuente de ionización por electro-spray (ESI).	14
Figura 5. Diagrama de un analizador cuadrupolar	15
Figura 6. Esquema del espectrómetro triple cuadrupolo (TQ) del IQFR-CSIC	17
Figura 7. Esquema de la disociación del heterodímero $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$	18
Figura 8. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs E_{cm} para 1	23
Figura 9. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs E_{cm} para 2	24
Figura 10. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs E_{cm} para 3.....	24
Figura 11. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs $(PA_{ref(i)} - PA_{ref}^{avg})$ de 1.....	25
Figura 12. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs $(PA_{ref(i)} - PA_{ref}^{avg})$ de 2.....	25
Figura 13. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs $(PA_{ref(i)} - PA_{ref}^{avg})$ de 3.....	26
Figura 14. Gráfico de temperatura efectiva (T_{eff}/K) vs energía CID, E_{cm} de 1.....	27
Figura 15. Gráfico de intercepción en Y vs negativo de la pendiente de 1.	28
Figura 16. Gráfico de temperatura efectiva (T_{eff}/K) vs energía CID, E_{cm} de 2.....	28
Figura 17. Gráfico de intercepción en Y vs negativo de la pendiente de 2.....	29
Figura 18. Gráfico de temperatura efectiva (T_{eff}/K) vs energía CID, E_{cm} de 3.....	29
Figura 19. Gráfico de intercepción en Y vs negativo de la pendiente de 3	30
Figura 20. Geometría del conformero más estable de 1, 2, y 3 al nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2p).	31
Figura 21. Geometría molecular de los conformeros protonados más estable de $1H^+$ al nivel de teoría B3LYP/ 6-311++G(3df,2p)..	32
Figura 22. Geometría molecular de los conformeros protonados más estable de $2H^+$ al nivel de teoría B3LYP/ 6-311++G(3df,2p)..	33
Figura 23. Geometría molecular de los conformeros protonados más estable de $3H^+$ al nivel de teoría B3LYP/ 6-311++G(3df,2p)..	34
Figura 24. Mapa de superficie molecular en 3D de 1, 2 y 3.....	37
Figura 25. Mapa de superficie molecular en 3D de 1_aH^+ , 2_aH^+ y 3_aH^+	39
Figura 26. Distribución de carga de NBO (en unidades electrónicas) para las formas neutras (izquierda) y protonadas (derecha) más estables calculadas al nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2p).	40
Figura 27. Distribución Geometría molecular para los derivados de uracilo metilado neutros (izquierda) y protonados (derecha) más estables, optimizados en el nivel de teoría B3LYP / 6-311++ G (3df, 2p). Distancias interatómicas en Å.	45

LISTA DE SIMBOLOS Y ACRONIMOS

1	1,5-dimetiluracilo
2	5,6-dimetiluracilo
3	5,6-dihidro-6-metiluracilo
EKM	Método cinético extendido
PA	Afinidad Protónica
GB	Basicidad
DFT	Teoría del funcional de la densidad
$\Delta_p S^0$	Entropía de protonación
MS	Espectrometría de masas
ESI	Electro-spray
CID	Disociación inducida por colisión
EKCM	método cinético extendido de Cooks
MEP	potencial electrostático molecular
HF	Hartree-Fock

RESUMEN

En esta Tesis se estudia tanto experimental como teóricamente las propiedades intrínsecas de la reactividad química, por transferencia protónica, de derivados de uracilo metilados.

Se determinaron experimentalmente, aplicando el Método Cinético Extendido de Cooks (EKM) mediante espectroscopía de masas TQ con fuente por electrospray (ESI), la afinidad protónica (*PA*) y basicidad (*GB*, entre paréntesis) en fase gaseosa del 1,5-dimetiluracilo (**1**) ; 5,6-dimetiluracilo (**2**) y 5,6-dihidro-6-metiluracilo (**3**), respectivamente en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $890.0 \pm 8.4(857.4 \pm 8.4)$; $896.2 \pm 8.4(861.4 \pm 8.4)$ y $856.0 \pm 8.4(829.1 \pm 8.4)$. Los resultados de la estructura electrónica de los compuestos estudiados fueron racionalizados y discutidos utilizando cálculos DFT (Density Funcional Theory) mecanocuánticos con el funcional B3LYP y la base de cálculo 6-311++G(3df,2p). Se encontraron que los tautómeros protonados más estables corresponden a estructuras del tipo “enol” y los valores calculados de *PA* y *GB* son consistentes y reproducen bien (desviación $< 6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) los valores experimentales determinados.

Palabras clave: Uracilo Metilado, Método Cinético Extendido, B3LYP, Afinidad protónica, Basicidad.

ABSTRACT

In this thesis, both experimental and theoretical properties of intrinsic chemical reactivity, by proton transfer, of uracil-methyl derivatives have been studied. Experimental Proton Affinity (*PA*) and basicity (*GB*, in brackets) in the gas phase of 1,5-dimethyluracil (**1**) ; 5,6-dimethyluracil (**2**) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (**3**), respectively in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 890.0 ± 8.4 (857.4 ± 8.4); 896.2 ± 8.4 (861.4 ± 8.4) and 856.0 ± 8.4 (829.1 ± 8.4). These values have been obtained applying the Cooks Kinetic Method (EKM) using TQ mass spectrometry with Electrospray Source (ESI). The results of the electronic structure of the studied compounds were rationalized and discussed using DFT (Density Functional Theory) quantum-mechanic methodology with the functional B3LYP and the 6-311++G(3df,2p) basis set calculations. The most stable protonated tautomers were found to have “enol”-type structure and the calculated values of *PA* and *GB* are consistent and reproduce very well (deviation $< 6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) the corresponding experimental values.

Keywords: Methylated-uracil, Extended Kinetic Method, B3LYP, Proton Affinity, Basicity

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Estudio teórico-experimental de propiedades intrínsecas (en fase gaseosa) de la reactividad química por transferencia protónica de los derivados metilados 1,5-dimetil uracilo (**1**), 5,6-dimetil uracilo (**2**) y 5,6-dihidro-6-metil uracilo (**3**).

1.2 Objetivos específicos

- Determinar experimentalmente, la afinidad protónica (PA), basicidad (GB) y la entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) de **1**, **2** y **3** aplicando el método cinético extendido de Cooks (EKM), a resultados obtenidos en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS-TQ) con fuente de ionización por electrospray (ESI).
- Determinar computacionalmente, utilizando la metodología mecano-cuántica DFT (Density Functional Theory) con el funcional B3LYP con base 6-311++G(3df,2p), propiedades estructurales y de estabilidad termodinámica de las especies propuestas. Cuantificar la afinidad protónica (PA), la basicidad (GB) y la entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) de **1**, **2** y **3**.
- Analizar y dilucidar la consistencia de los resultados obtenidos.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El conocimiento teórico/experimental de propiedades intrínsecas en fase gas de los derivados de uracilo metilados es clave para dilucidar y entender su actividad biológica. En este sentido nuestra investigación se basa en la determinación de propiedades intrínsecas (en fase gaseosa) de la reactividad química por transferencia protónica como afinidad protónica (PA), basicidad (GB) y entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) que contribuirá a un mejor conocimiento de los distintos procesos en los que interviene y que no han sido suficientemente explorados al menos desde el punto de vista de la ciencia básica. En general se sabe que estos compuestos en estudio (neutros o protonados) juega un papel importante en funciones bioquímicas, sin embargo, la literatura apenas recoge información experimental al respecto. Por otra parte, cabe resaltar que se determinó estas propiedades intrínsecas en fase gas utilizando espectrometría de masas, una técnica más bien analítica pero lo suficiente versátil como para obtener resultados como los obtenidos en este trabajo. Los resultados experimentales son contrastados con cálculos computacionales utilizando metodologías mecano-cuánticas como el DFT, tan poderosas a otras del tipo *ab initio* con la ventaja de ser más versátiles como ahorrar el tiempo de cálculo.

CAPITULO II.

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

2.1 Estado del arte de los derivados metilados de uracilo.

El 1,5-dimetil uracilo [$C_6H_8N_2O_2$, **1**], 5,6-dimetil uracilo [$C_6H_8N_2O_2$, **2**] y 5,6-dihidro-6-metil uracilo [$C_5H_8N_2O_2$, **3**] son compuestos orgánicos pertenecientes a la familia de los uracilos (ver **Figura 1**).

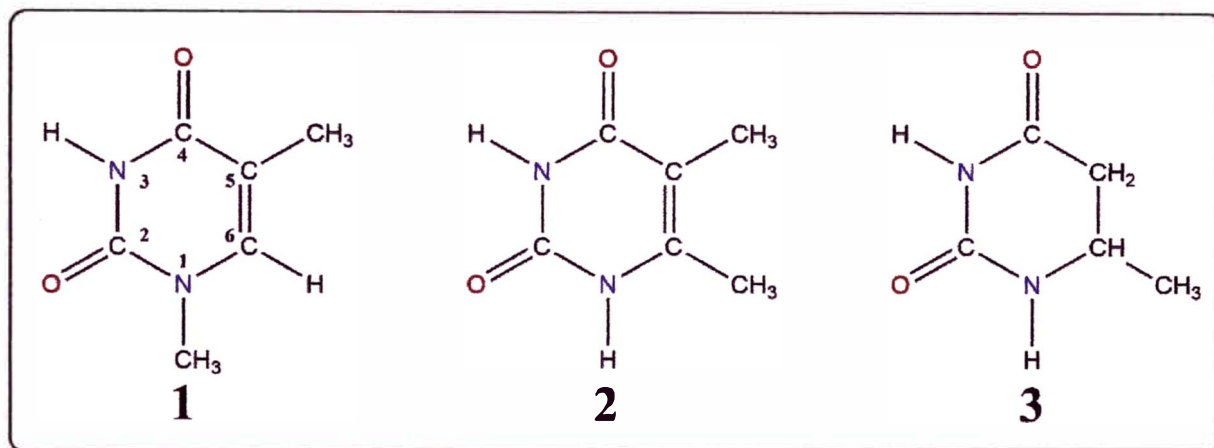


Figura 1. Estructura molecular del 1,5-dimetil uracilo (**1**), 5,6-dimetil uracilo (**2**) y 5,6-dihidro-6-metil uracilo (**3**).

El uracilo es una de las principales nucleobases con gran importancia en bioquímica, biología molecular y medicina.^[1] Este es una de las bases de pirimidina del ARN, en el ADN se reemplaza por la timina (5-metil uracilo) que es su derivado metilado.^[2] Por lo tanto, la influencia de la metilación en la estructura y propiedades de las nucleobases, como el uracilo, puede ser crucial, particularmente en los sistemas biológicos. Por ejemplo, los uracilos 5-sustituidos tienen una importancia médica considerable, como el 5-fluorouracilo anticancerígeno^[3] y el 3'-azido-3'-desoxitimidina anti-VIH^[4].

Otra interesante investigación está relacionada con las propiedades ácido/base de nucleobases, debido a que las interacciones del enlace de hidrogeno en par de bases están controlados por la capacidad aceptor/donador de protones de los grupos carbonilo/amino. La espectrometría de masas con fuente de ionización suave como ESI es una de las herramientas experimentales más adecuadas empleadas para caracterizar las propiedades ácido/base en fase gaseosa de moléculas biológicamente importantes, que

son moléculas multifuncionales. Las mediciones se basan en disociaciones competitivas de iones heterodímeros unidos a protones (el método cinético desarrollado por Cooks y col.^[5 y 6]) que producen moléculas protonadas (o desprotonadas) en sus sitios más básicos (o ácidos). Solo en algunos casos han sido posible obtener mediciones de sitios menos básicos/ácidos en moléculas multifuncionales.^[7]

Salpin y col.^[8 y 9] estudió usando espectroscopia de disociación de fotones múltiples por infrarrojos (IRMPD), las estructuras de fase gaseosa de derivados de uracilo protonados similares a los compuestos en estudio en este trabajo. En esta investigación se concluyen que los tautómeros protonados más estables generados en sus condiciones experimentales corresponden a las estructuras enol, donde ambos grupos ceto se convierten en grupos hidroxilo mediante la unión y la transferencia de protones de los grupos N-H vecinos.

2.2 Afinidad Protónica, Basicidad y Entropía de Protonación en Fase Gaseosa.

La afinidad protónica (*PA*) y la basicidad (*GB*) de un ion en estudio (BH^+) está relacionado con la reacción 1 en fase gaseosa:



La afinidad protónica de B se define como el cambio de entalpía (ΔH) del proceso en la reacción 1, y la basicidad en fase gaseosa de BH^+ se define como el correspondiente cambio de energía libre de Gibbs (ΔG).^[10] Cabe resaltar que estas propiedades moleculares se utilizan para describir la capacidad de una molécula para aceptar un protón.

Por otro lado, la entropía de protonación se suele calcular como la diferencia en entropías absolutas entre sus formas protonadas y neutras,^[11] es decir se puede calcular según la siguiente ecuación:

$$\Delta_p S^\circ(\text{B}) = S^\circ(\text{BH}^+) - S^\circ(\text{B}) \quad (2)$$

Usando la relación termodinámica clásica $\Delta G_T^\circ = \Delta H_T^\circ - T\Delta S_T^\circ$, una relación entre estos parámetros es:

$$GB(\mathbf{B}) = PA(\mathbf{B}) - 298[S_{298}^{\circ}(\mathbf{H}^{+}) + S_{298}^{\circ}(\mathbf{B}) - S_{298}^{\circ}(\mathbf{BH}^{+})] \quad (3)$$

En consecuencia, reemplazando la ecuación 2 en 3 conduce a la siguiente ecuación:

$$GB(\mathbf{B}) = PA(\mathbf{B}) - 298[S_{298}^{\circ}(\mathbf{H}^{+}) - \Delta S_{298}^{\circ}(\mathbf{B})] \quad (4)$$

donde, $S_{298}^{\circ}(\mathbf{H}^{+})$ es la entropía traslacional de un mol de protones ($108.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, si se considera como un gas monoatómico ideal a 298 K).^[12 y 13]

Es importante puntualizar que en la literatura no se reporta valor experimental relacionado a las propiedades moleculares como afinidad protónica (PA), la basicidad (GB) y la entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) de derivados de uracilo metilados (**1**, **2** y **3**) estudiados en este trabajo de Tesis de Maestría; por tanto, los valores experimentales que se obtiene en este trabajo son inéditos y fueron publicados en la revista International Journal of Mass Spectrometry^[14] (ver **ANEXO**).

CAPÍTULO III.

QUÍMICA COMPUTACIONAL

La Química Computacional (QC) es un campo de investigación importante y dinámica dentro de la química. Cubriendo el espectro completo de las ciencias moleculares desde una perspectiva *In Silico*, que se mantiene a la vanguardia y tiene una gran importancia en los últimos desarrollos tecnológicos.^[15] En particular, la química computacional es una herramienta poderosa para predecir las propiedades moleculares.^[16] En este trabajo se utilizó la metodología de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

3.1 Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

DFT es una teoría de la mecánica cuántica utilizada en física y química para investigar la estructura electrónica (principalmente el estado fundamental) de los sistemas de muchos cuerpos, en particular átomos, moléculas y fases condensadas. Con esta teoría, las propiedades de un sistema de muchos electrones se pueden determinar mediante el uso de funcionales, es decir, funciones de otra función, que en este caso es la densidad de electrones espacialmente dependiente.

Por lo tanto, el nombre de la DFT proviene del uso de funcionales de la densidad electrónica. DFT es uno de los métodos más populares y versátiles disponibles en química y física computacional.^[17]

La función de onda electrónica depende de $3n$ variables: las coordenadas \mathbf{x} , \mathbf{y} , y \mathbf{z} de cada electrón. La densidad electrónica total $\rho(\mathbf{r})$, relacionada con la probabilidad de que un electrón esté presente en una ubicación específica, depende de solo tres variables: las posiciones \mathbf{x} , \mathbf{y} , y \mathbf{z} en el espacio. Debido a que $\rho(\mathbf{r})$ es más simple que la función de onda y también es observable, podría ofrecer una forma más directa de obtener la energía molecular.

El teorema de la existencia de Hohenberg-Khon^[18] prueba justo esto. Existe un funcional único tal que

$$E[\rho(\mathbf{r})] = E_{elec} \quad (5)$$

donde E_{elec} es la energía electrónica exacta. Además, demostraron que la densidad electrónica obedece el teorema variacional. Esto significa que, dada una densidad de electrones específica, su energía será mayor o igual que la energía exacta. Estos dos teoremas constituyen la base de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). La esperanza es que la evaluación de la ecuación de la ecuación 5 podría ser más fácil que los métodos *ab initio* tradicionales debido a la dependencia de variable más simple.

Antes de continuar con una explicación de cómo esto se traduce en poder calcular las propiedades de una molécula, debemos definir el término funcional. Una función matemática es aquella que relaciona una cantidad escalar con otra cantidad escalar, es decir, $y = f(x)$. Una funcional matemática relaciona una función con una cantidad escalar y se denota entre corchetes, es decir, $y = F[f(x)]$. En la ecuación 5, la función $\rho(\mathbf{r})$ depende de las coordenadas espaciales, y la energía depende de los valores (es funcional) de $\rho(\mathbf{r})$.

Para resolver la energía mediante el método DFT, Khon y Sham^[19] propusieron que la funcional tiene la forma

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T_e[\rho(\mathbf{r})] + V_{ne}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] + E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] \quad (6)$$

donde V_{ne} , es el termino de atracción nucleo-electrón, es

$$V_{ne}[\rho(\mathbf{r})] = \sum_j^{nucleos} \int \frac{Z_j}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_k|} \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (7)$$

y V_{ee} , es el termino clásico de repulsión electrón-electrón, es

$$V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (8)$$

La clave real, sin embargo, es la definición del primer término de la ecuación 6. Khon y Sham lo definieron como la energía cinética de los electrones que no interactúan, cuya densidad es la misma que la densidad de los electrones reales, los verdaderos electrones que interactúan. El último término (E_{xc}) se llama funcional de intercambio-correlación, y es un término general que considera todos los demás aspectos del sistema verdadero.

El procedimiento de Kohn-Sham consiste en resolver los orbitales que minimizan la energía, lo que reduce el conjunto de ecuaciones pseudo-eigenvalores.

$$\hat{h}_i^{KS} \chi_i = \epsilon_i \chi_i \quad (9)$$

Los orbitales de Kohn-Sham son separables por definición (los electrones que describen son no interactuantes).

Aunque el teorema de Hohenberg-Kohn demuestra la existencia de un funcional que relaciona la densidad de electrones con la energía, no ofrece orientación sobre la forma de ese funcional. El verdadero problema es el término de intercambio-correlación. No hay forma de derivar este término, por lo que se han propuesto una serie de funcionales diferentes, que conducen a muchas metodologías DFT.^[20]

3.1.1 Funcional de Intercambio-Correlación

La funcional de intercambio-correlación generalmente se escribe como una suma de dos componentes, una parte de intercambio y una parte de correlación. Esta es una suposición que no tenemos forma de saber si es verdad o no. Estos componentes funcionales generalmente se escriben en términos de una densidad de energía ϵ .

$$E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] = E_x[\rho(\mathbf{r})] + E_c[\rho(\mathbf{r})] = \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_x[\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r} + \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_c[\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r} \quad (10)$$

Perdew^[21 y 22] ha descrito una jerarquía de tratamientos aproximados del término de intercambio-correlación como “La escalera de Jacob”. La escalera se basa en la teoría de Hartree-Fock aquí en la tierra, y llega al cielo, donde se encuentra el funcional exacto.

En el camino hay cinco peldaños, cada uno de los cuales define un conjunto de suposiciones hechas al crear una expresión de intercambio-correlación.

El primer peldaño comprende la aproximación de densidad local (LDA), que supone que el valor de ϵ_x podría determinarse sólo a partir del valor de la densidad. Un ejemplo simple de LDA es el tratamiento de Dirac de un gas de electrones uniforme, que da

$$\epsilon_x^{LDA} = -C_x \rho^{1/3} \quad (11)$$

Esto puede extenderse a la aproximación de densidad de spin local (LSDA) para aquellos casos donde las densidades α y β no son iguales. El método χ_α de Slater es una

forma a escala de la ecuación 11, y a menudo los términos “LSDA” y “Slater” se usan indistintamente.

Funcionales de correlación local fueron desarrollados por Vosko y col.^[23] que implican una serie de términos y factores de escala empíricos. Las versiones más populares se llaman VWN y VWN5. La combinación de un intercambio local y una densidad de energía de correlación local es el método SVWN.

Para hacer mejoras sobre el LSDA, uno debe suponer que la densidad no es uniforme. El enfoque que se adoptado es desarrollar funciones que dependen no solo de la densidad electrónica sino también de las derivadas de la densidad. Esto constituye la aproximación de gradiente generalizada (GGA) y es el segundo peldaño en la escalera de Jacob. El tercer peldaño, es el funcional meta-GGA, incluye una dependencia del Laplaciano de la densidad ($\nabla^2\rho$) o de la densidad de energía cinética del orbital (τ). El cuarto peldaño, las funcionales híbridas o hiper-GGA, incluye una dependencia del intercambio exacto (HF). Finalmente, el quinto peldaño incorpora los orbitales desocupados de Kohn-Sham.

3.1.2 Funcional B3LYP

El método DFT dominante para la década de 1990 y hasta la década de 2000 es el funcional híbrido B3LYP^[24 y 25], que incluye el funcional de intercambio de Becke junto con el funcional de correlación LYP:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a)E_X^{LSDA} + aE_X^{HF} + bE_X^B + (1 - c)E_C^{LSDA} + cE_C^{LYP} \quad (12)$$

Las tres variables ($a=0.20$, $b=0.72$ y $c=0.81$) son el origen del “3” en el acrónimo. Dado que estas variables son aptas para reproducir los datos experimentales, B3LYP (y todos los demás métodos híbridos) contienen cierto grado de naturaleza “semiempírico”.

3.2 Conceptos importantes.

3.2.1 Optimización de la geometría.

El primer paso para realizar un cálculo de química cuántica es seleccionar un método apropiado. La nomenclatura para designar el método es “Funcional / conjunto

base”, por ejemplo, B3LYP / 6-31+G(d), lo que significa que la energía se calcula utilizando el funcional B3LYP con el conjunto base 6-31+G(d).

El procedimiento general en la optimización de la geometría es comenzar con una conjetura de la geometría molecular y luego cambiar sistemáticamente las posiciones de los átomos de tal manera que la energía disminuya, continuando, variando las posiciones hasta que se logre la energía mínima, es decir, obtener la superficie de energía potencial (PES). El cálculo de todos los gradientes de energía con respecto a las posiciones de los núcleos ofrecerá orientación en qué direcciones mover los átomos. Las segundas derivadas de la energía con respecto a las coordenadas atómicas proporcionan la curvatura de la superficie, que se puede utilizar para determinar qué tan lejos debe ajustarse cada coordenada. La colección de estas segundas derivadas se llama matriz Hessiana, donde cada elemento H_{ij} se define como

$$H_{ij} = \frac{\partial^2 E}{\partial q_1 \partial q_2} \quad (13)$$

donde q_i es una coordenada atómica (por ejemplo, la coordenada-y del séptimo átomo).

Para obtener una optimización de la geometría eficiente, se requiere la primera y segunda derivadas de las energías con respecto a las coordenadas atómicas. El cálculo de estas derivadas siempre lleva más tiempo que la evaluación de la misma energía. Además, la expresión analítica de la primera y segunda derivada no está disponible para algunos métodos. Un procedimiento menos costoso es evaluar las primeras derivadas y luego hacer una conjetura sobre las segundas derivadas, que pueden actualizarse numéricamente a medida que se evalúa cada nueva geometría.

El criterio para determinar si una estructura ha sido optimizada es que cualquier mínimo de energía local tendrá todos sus gradientes iguales a cero. La práctica típica es establecer un valor pequeño pero distinto de cero como el gradiente máximo aceptable.

La prueba del gradiente por sí sola no es suficiente para definir un mínimo de energía local. Las estructuras donde el gradiente desaparece se conocen como puntos críticos, alguno de los cuales pueden ser mínimos locales. Los elementos diagonales de la

matriz Hessiana, llamados valores propios, identifican la naturaleza del punto crítico. Seis de estos valores propios tendrán valores cercanos a cero y corresponderán a los tres grados de libertad de traslación y rotación. Si todos los valores propios restantes son positivos, la estructura es un mínimo local. Un estado de transición se caracteriza por tener uno y solo un valor propio negativo de la matriz diagonal Hessiana. Calcular la matriz Hessiana completa y precisa, puede confirmar la naturaleza del punto crítico, ya sea un mínimo local, un estado de transición o algún otro punto de silla de orden superior.

La geometría molecular es menos sensible al método computacional que a su energía. Como la optimización de la geometría puede llevar mucho tiempo computacionalmente, a menudo una estructura molecular se optimiza utilizando un método a un nivel de cálculo inferior, y luego se va aumentando a un nivel de cálculo más preciso según sea necesario.

3.3 Programa y clústeres.

Los cálculos químicos cuánticos se llevaron a cabo utilizando el paquete Gaussian 16^[26]. Las geometrías de los compuestos en estudio, tanto la molécula neutra como sus iones protonados, se optimizaron utilizando el funcional B3LYP de Lee-Yang-Parr^[27] con el conjunto base 6-311++G(3df,2p).

Los clústeres que se utilizaron en este trabajo de investigación son: LADON e HIDRA del Instituto de Química Física Rocasolano – CSIC y de TRUENO del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid. España.

CAPÍTULO IV.

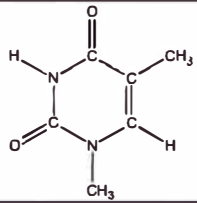
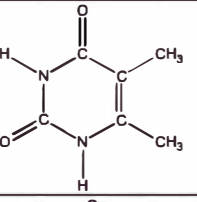
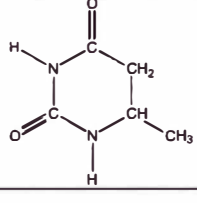
PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se divide en dos secciones: compuestos estudiados y técnica experimental utilizada (espectrometría de masas).

4.1 Compuestos estudiados

En la **Tabla 1** se indican algunas características de los compuestos estudiados. Para el desarrollo de la parte experimental, estos fueron previamente secados al vacío a una temperatura de 40°C y se utilizaron sin purificación alguna.

Tabla 1. Compuestos estudiados y sus características.

Compuesto	Estructura	Compañía	CAS
1,5 – dimetil uracilo, [1]		Sigma – Aldrich	4160 – 72 – 9
5,6 – dimetil uracilo, [2]		Sigma – Aldrich	26305 – 13 – 5
5,6 – dihidro – 6 – metil uracilo, [3]		Sigma – Aldrich	2434 – 49 – 3

4.2 Técnica experimental utilizada

Se utilizó la técnica de espectrometría de masas en el Instituto de Química Física Rocasolano- CSIC, Madrid. España.

A continuación, describimos esta técnica.

4.2.1 Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas, más conocido por su acrónimo en inglés MS (Mass Spectrometry), es una técnica experimental que permite el estudio de moléculas y átomos en fase gas, previa ionización, mediante la determinación de su relación masa y carga (m/z).^[28] La espectrometría de masas tiene una gran relevancia en muchos campos de la

química, física y biología debido a que presenta características importantes como: alta sensibilidad, versatilidad, grandes límites de detección.^[29]

Espectrómetro de masas utilizado en este trabajo: Se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TQ Varian/Agilent MS-320 (ver **Figura 2**).



Figura 2. Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TQ Varian/Agilent MS-320. Foto tomada por Julio Barrios (2019).

4.2.1.1 Elementos de la espectrometría de masas

Todo espectrómetro de masas consta al menos de los siguientes elementos: fuente de ionización, analizador de masas, detector y sistema de vacío (ver **Figura 3**).

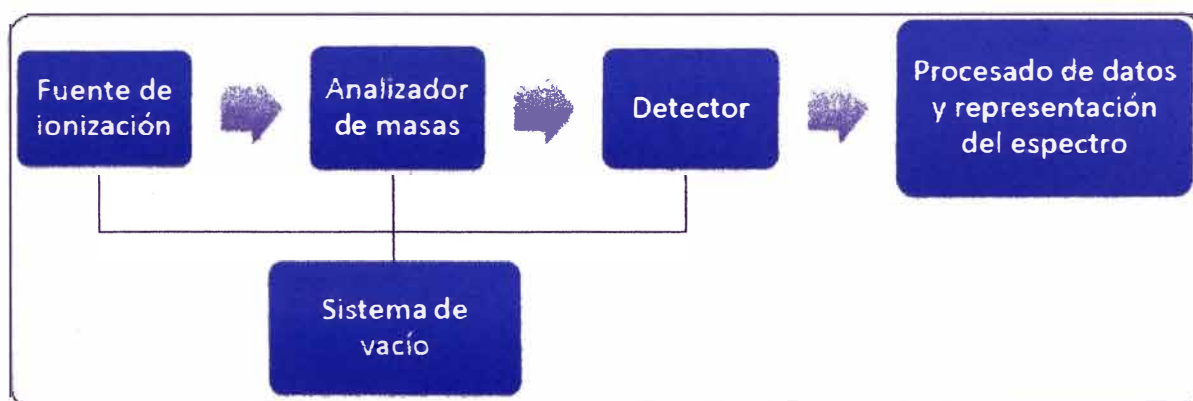


Figura 3. Representación esquemática de un sistema de básico de espectrometría de masas.^[30]

a) Fuentes de Ionización

Son dispositivos que convierten moléculas neutras en iones aislados (fase gas).

Se puede presentar diferentes métodos de ionización. A continuación, será descrita en detalle el electro-spray (ESI) que ha sido utilizada en este trabajo de investigación.

a.1) Fuente de ionización por electro-spray (ESI)

En esta fuente es necesario que la muestra esté disuelta a baja concentración en un disolvente volátil y polar. Esta disolución es nebulizada en una cámara en presencia de un gas de nebulización inerte (generalmente N_2 o aire) y convertida en microgotas. Las moléculas del disolvente están polarizadas por la presencia de un campo eléctrico del sistema.^[32] Un flujo de aire caliente a contracorriente favorece la vaporización del disolvente, reduciéndose el diámetro de las gotas hasta alcanzar su radio crítico o límite de Raleigh.^[33] Cuando se excede el límite, la densidad de carga de la esfera es lo suficientemente alta para que la repulsión electrostática resultante provoque la denominada explosión culombiana.^[34] Al final de este proceso, una gran parte de las moléculas quedan cargadas y desolvatadas (ver **Figura 4**). Lo habitual es encontrar iones con carga +1 ó -1, es decir, que hayan ganado o perdido un protón. No obstante, pueden formarse aductos con Na^+ o K^+ (contaminantes usuales) y en el caso de moléculas suficientemente grandes, estas pueden ser multicargadas.

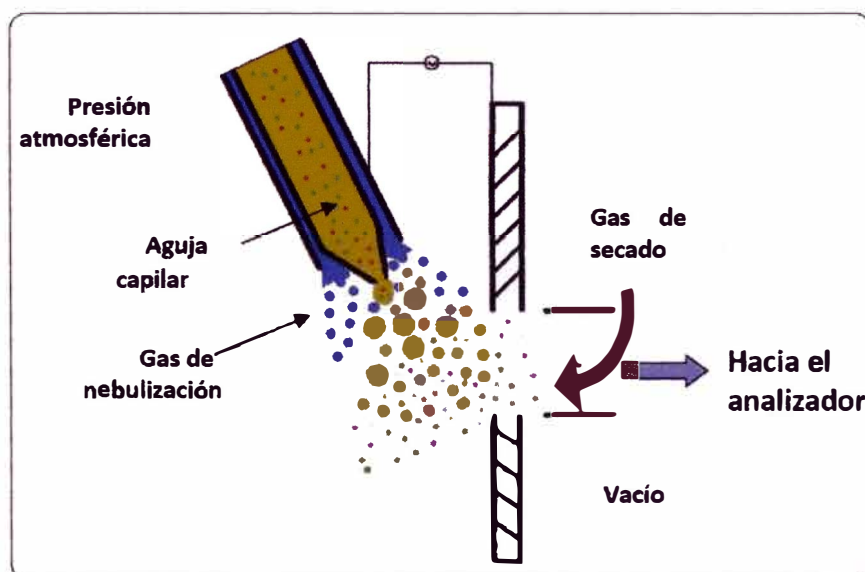


Figura 4. Esquema de una fuente de ionización por electro-spray (ESI).^[30]

b) Analizadores de Masas

Una vez generados los iones y ya en fase gaseosa necesitan ser discriminados de acuerdo con su relación masa-carga (m/z), para este propósito el analizador de masas se vale de la aplicación de campos eléctricos y magnéticos.^[35] Existe una variedad considerable de analizadores, entre ellos destacan; el de tiempo de vuelo (TOF), sector magnético (B), trampa de iones (IT) y analizadores cuadrupolo (Q). Se describe a continuación este último que ha sido utilizado en el trabajo de tesis.

b.1) Analizador Cuadrupolar

El analizador cuadrupolar está formado por 4 barras metálicas de sección circular o hiperbólica.^[36] Estas barras son dispositivos de forma exactamente rectas y paralelas tal como se muestra en la **Figura 5**. Al ingresar los iones al cuadrupolo experimentarán fuerzas en la dirección x e y (considerando la dirección z paralela a las barras), oscilando de un lado a otro, de tal manera que solo iones con una relación m/z dentro de un rango del potencial preestablecido tendrán una trayectoria que les permite atravesar todo el dispositivo cuadrupolar. Los otros iones no serán detectados y saldrán de este dispositivo.^[28]

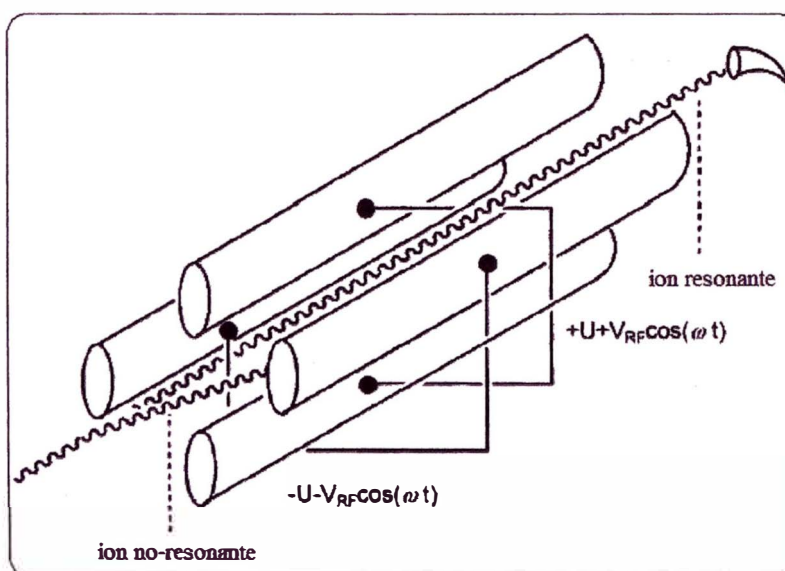


Figura 5. Diagrama de un analizador cuadrupolar.^[28]

c) Detectores

La función de los detectores es revelar la presencia de partículas cargadas (iones)

en forma de señales electrónicas que convenientemente amplificadas, discriminadas y tratadas serán registradas en forma de espectros. Diversos dispositivos son usados como detectores, alguno de ellos está basados en la medición de la corriente eléctrica producida cuando los iones impactan en el detector y otros en la medición de la corriente generada por iones secundarios.^[31]

d) Sistema de vacío

Para que los iones generados en la fuente puedan ser transportados hasta el detector sin sufrir excesivas colisiones con moléculas de aire, es necesario que estén en un sistema de alto vacío con presiones comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-11} mbar. Para llegar a estas condiciones de vacío se utilizaron bombas rotatorias (vacío inferior a 10^{-3} mbar) y bombas turbo-moleculares (vacío entre 10^{-10} – 10^{-11} mbar).

e) Procesamiento de datos

El funcionamiento de los espectrómetros de masa está controlado por software específicos que se pueden resumir en 3 funciones básicas: control del espectrómetro, adquisición y procesamiento de datos e interpretación de datos. Una vez que la muestra es introducida, todas las funciones restantes están controladas por un computador. Esto incluye la calibración y la optimización de las señales del detector.

4.2.1.2 Disociación Inducida por Colisión (CID)

La información de la estructura de una muestra es obtenida a partir de un ion por medio de la disociación inducida por colisión (CID) utilizando un gas de colisión.^[37] Es decir, los iones son seleccionados como iones precursores y luego se dirigen a una cámara de colisión, dónde interactúan con moléculas de gas (nitrógeno o argón) para generar fragmentos.^[38]

4.2.1.3 Espectrómetro de masas triple cuadrupolo (TQ-MS)

TQ-MS es un arreglo "tándem", se puede observar el diseño en la **Figura 6**.

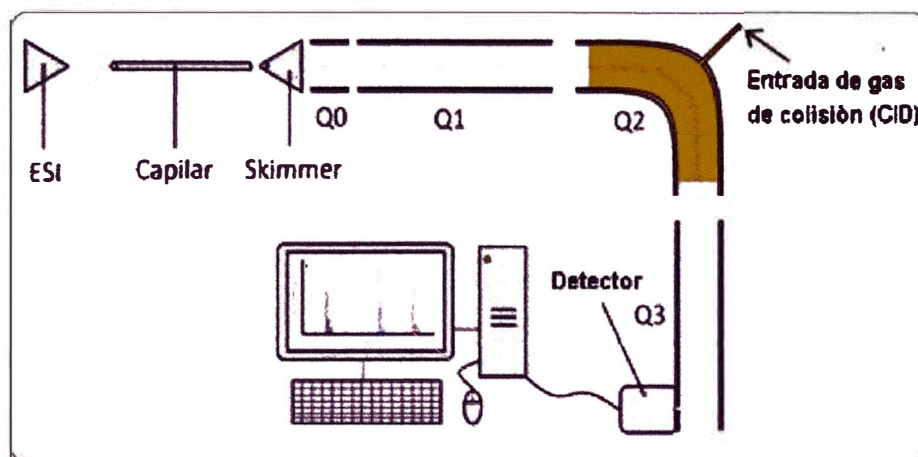


Figura 6. Esquema del espectrómetro triple cuadrupolo (TQ) del IQFR-CSIC.

El primer cuadrupolo (Q1) selecciona los iones precursores después de que han sido ionizados mediante ESI. Después estos iones son llevados a una celda de colisión (Q2), este cuadrupolo trabaja a una presión de 10^{-1} mBar debido a la presencia de un gas de colisión. Al finalizar, el tercer cuadrupolo (Q3) proporciona un medio para analizar todos los productos que emergen de Q2.

4.2.1.4 Método Cinético extendido de Cooks (EKCM)

EKCM es una nueva versión del método cinético original desarrollado por Cooks.^[39] En esta metodología se toma en cuenta efectos entrópicos en la disociación competitiva del heterodímero catiónico (caso basicidad) $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$ generado en fase gaseosa y formado por la muestra B. Luego, los compuestos de referencia $B_{ref(i)}$ cuyas PA y GB son conocidas. B y $B_{ref(i)}$ están unidos por un enlace de hidrógeno (H) y el heterodímero resultante es fragmentado por Colisión Inducida (CID)^[40] en la celda de colisión del espectrómetro de masas, produciendo cationes protonados BH^+ de la muestra y de la referencia $B_{ref(i)}H^+$ a través de dos canales competitivos de disociación, con constantes de velocidad k y k_i , respectivamente (ver **Figura 7**).

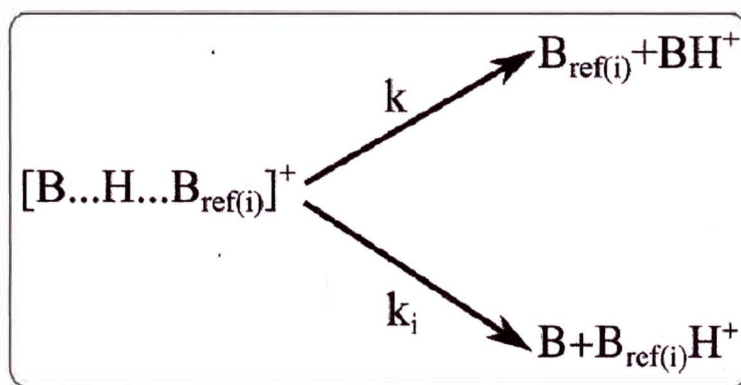


Figura 7. Esquema de la disociación del heterodímero $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$.

Si asumimos que no existe ninguna barrera de activación reversibles, la afinidad protónica (PA) de la muestra estudiada B y de las referencias $PA_{ref(i)}$ están relacionadas por la ecuación 14,

$$\ln\left(\frac{k}{k_i}\right) = \ln\frac{[BH^+]}{[B_{ref(i)}H^+]} = -\frac{(PA_{ref(i)} - PA_{ref}^{avg})}{RT_{eff}} + \left[\frac{(PA_{ref(i)} - PA_{ref}^{avg})}{RT_{eff}} - \frac{\Delta(\Delta S^0)}{R}\right] \quad (14)$$

donde PA_{ref}^{avg} es el promedio de la afinidad protónica de los compuestos de referencia, T_{eff} es una temperatura efectiva relacionada con la energía de excitación disociativa de los heterodímeros $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$ y R es la constante universal de los gases. El término $\Delta(\Delta S^0)$ puede ser expresado como la diferencia de las entropías de dos bases, $\Delta(\Delta S^0) = \Delta_p S^0 - \Delta_p S_{ref}^{avg}$. Tenemos 3 variables no conocidas en la ecuación 14 (PA , RT_{eff} y $\Delta_p S^0$). Estos valores se pueden obtener a partir del análisis de dos conjuntos de gráficos termocinéticos.

El primer conjunto lo constituye gráficos lineales de $\ln\left(\frac{k}{k_i}\right)$ vs $PA_{ref(i)} - PA_{ref}^{avg}$ contruidos a partir de datos experimentales obtenidos de la fragmentación de los heterodímeros $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$ a distintas energías de colisión E_{CM} . Teniendo en cuenta la ecuación completa 14, a cada recta le podemos asociar una pendiente igual a $-1/RT_{eff}$ y un punto de corte con el eje $-Y$ igual a la expresión final entre corchetes. Estos últimos valores (corte eje $-Y$) se representan en función de aquellos que corresponden a $1/RT_{eff}$ para obtener el segundo gráfico termocinético, el cual está asociado a la expresión entre corchetes de la ecuación 14. El ajuste lineal de esta representación nos proporciona una pendiente igual

a ($PA_{\text{ref}(i)} - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}}$), y un punto de corte con el eje $-E$ igual a $\Delta(\Delta S^\circ)/R$. Por otra parte, la basicidad (GB) de la especie estudiada se deriva la ecuación 15.

$$GB = PA - T(\Delta_p S^\circ) \quad (15)$$

donde $T = 298.15$ K, es la temperatura de referencia.

4.2.1.5 Procedimientos de medida.

1/ Se preparó soluciones madre de los compuestos en estudio (**1**, **2** y **3**) y los compuestos de referencia (diferentes para cada compuesto ver sección 4.2.1.6) a una concentración de $\sim 10^{-3}$ M.

2/ Se mezclaron en proporciones de volumen apropiado ($\sim 1:1$) y se diluyeron adicionalmente con metanol para llegar a una concentración final de $\sim 10^{-4}$ M.

3/ Las soluciones se inyectaron directamente en la fuente de ionización ESI en modo positivo, a velocidades de flujo de $10 \mu\text{L}/\text{min}$.

4/ La temperatura del gas de secado y los disolventes se optimizaron para promover la formación de señales más intensas de los cationes heterodiméricos unidos a protones $[\text{B}\cdots\text{H}\cdots\text{B}_{\text{ref}(i)}]^+$.

5/ Los cationes son separados en el primer cuadrupolo, luego son sometidos a disociación inducida por colisión (utilizando argón como gas de colisión) en el segundo cuadrupolo y los fragmentos resultantes se analizaron en el tercer cuadrupolo.

6/ El centro de energía de masa (E_{cm}) se calculó como: $E_{\text{cm}} = E_{\text{lab}}[m/(M+m)]$, donde E_{lab} es la energía cinética iónica en el marco del laboratorio, m es la masa del gas de colisión y M es la masa del ion heterodimérico.

4.2.1.6 Compuestos de referencia. Valores termoquímicos

En la **Tabla 2** se describen los parámetros termoquímicos de las bases de referencias utilizadas para determinar la afinidad protónica de los derivados metilados de uracilo (**1**, **2**, y **3**).

Tabla 2. Valores termoquímicos en fase gas de las bases de referencia.^[41]

Base de referencia, $B_{ref(i)}$		PA $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	GB $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta_p S^0$ $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
$i = 1$	2,4-dimetil-3-pentanona	850.2 ± 8.4	820.5 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 2$	p-nitroanilina	866.1 ± 8.4	834.3 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 3$	Propiofenona	867.3 ± 8.4	835.5 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 4$	Uracilo	872.8 ± 8.4	841.8 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 5$	1,2,3-triazol	879.5 ± 8.4	847.3 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 6$	Anilina	882.4 ± 8.4	850.6 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 7$	N-metilacetamida	888.7 ± 8.4	857.7 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 8$	Pirazol	894.1 ± 8.4	860.6 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 9$	m-toluidina	895.8 ± 8.4	864.0 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 10$	Indazol	900.8 ± 8.4	869.0 ± 8.4	98.4 ± 8.4
$i = 11$	Ciclopropilamina	904.6 ± 8.4	869.9 ± 8.4	98.4 ± 8.4

4.2.1.7 Condiciones experimentales del Espectrómetro de masas

En la **Tabla 3**, **4**, **5**, y **6** se describe las condiciones experimentales del espectrómetro de masas utilizados para la formación de los heterodímeros $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$, $B = 1, 2, \text{ y } 3$ y $B_{ref(i)} =$ Base de referencia.

Tabla 3. Condiciones experimentales generales del ESI.

Gas nebulizante		"Housing" camara		Potenciales, V			
Gas	N_2	Temperatura, °C	100	"Shield"	600	Capilar	21

Tabla 4. Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de **1**.

$B_{ref(i)}$	Gas nebulizante (N_2)	Gas de secado	Potencial
	Presión psi	Temperatura °C	Aguja V
$i = 5$	25	125	3000
$i = 6$	15	200	3800
$i = 7$	15	200	3300
$i = 8$	25	125	3300
$i = 9$	15	150	3100
$i = 11$	25	125	3300

Tabla 5. Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 2.

B_{ref(t)}	Gas nebulizante (N₂)	Gas de secado	Potencial
	<u>Presión</u> psi	<u>Temperatura</u> °C	<u>Aguja</u> V
i = 7	25	125	3000
i = 8	15	200	3800
i = 9	15	200	3300
i = 10	25	125	3300

Tabla 6. Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 3.

B_{ref(t)}	Gas nebulizante (N₂)	Gas de secado	Potencial
	<u>Presión</u> psi	<u>Temperatura</u> °C	<u>Aguja</u> V
i = 1	25	125	3000
i = 2	15	200	3800
i = 3	15	200	3300
i = 4	25	125	3300
i = 6	15	200	3300

CAPÍTULO V.

RESULTADOS Y DISCUSIONES:

5.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES

5.1.1 Determinación de la afinidad protónica, basicidad y la entropía de protonación de los derivados metilados de uracilo (1, 2, y 3).

En la **Tabla 7, 8, y 9** se reportan los valores del logaritmo natural de la relación de intensidades de los productos CID de los heterodímeros $[B_{ref(i)}H^+]$ de **1, 2, y 3** respectivamente.

Tabla 7. Valores de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ de los productos CID de los heterodímeros de **1** y seis bases de referencia, obtenidos a diferentes E_{cm} .

$\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$								
E_{cm}/eV $B_{ref(i)}$	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50
5	1.436	1.322	1.171	1.054	0.937	0.863	0.709	0.668
6	0.683	0.586	0.474	0.361	0.262	0.171	0.039	- 0.065
7	- 0.085	0.020	0.142	0.201	0.306	0.426	0.486	0.567
8	- 0.913	- 0.754	- 0.685	- 0.594	- 0.525	- 0.454	- 0.369	- 0.237
9	- 0.644	- 0.632	- 0.683	- 0.675	- 0.753	- 0.823	- 0.809	- 0.839
11	- 1.294	- 1.116	- 0.952	- 0.860	- 0.808	- 0.624	- 0.593	- 0.459

Tabla 8. Valores de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ de los productos CID de los heterodímeros de **2** y cuatro bases de referencia, obtenidos a diferentes E_{cm} .

$\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$							
E_{cm}/eV $B_{ref(i)}$	1.25	1.75	2.00	2.25	2.50	3.00	3.75
7	1.148	1.184	1.018	0.899	0.996	0.861	0.548
8	0.223	0.272	0.191	0.089	0.027	- 0.185	- 0.384
9	- 0.606	- 0.742	- 0.694	- 0.702	- 0.827	- 0.968	- 1.059
10	- 3.305	- 3.275	- 3.203	- 3.056	- 3.038	- 2.566	- 2.392

Tabla 9. Valores de $\ln[\text{BH}^+] / [\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+]$ de los productos CID de los heterodimeros de 3 y cinco bases de referencia, obtenidos a diferentes E_{cm} .

		$\ln[\text{BH}^+] / [\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+]$						
E_{cm}/eV $\text{B}_{\text{ref}(i)}$	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75
1	2.539	2.428	2.435	2.408	2.309	2.248	2.296	2.298
2	-0.448	-0.076	-0.029	-0.012	0.283	0.216	0.514	0.535
3	-0.779	-0.661	-0.672	-0.621	-0.517	-0.500	-0.458	-0.110
4	-0.825	-0.627	-0.501	-0.324	-0.231	-0.131	0.030	0.180
6	-5.655	-5.099	-4.568	-4.572	-3.556	-4.001	-3.417	-3.287

En la **Figura 8, 9, y 10** se representan los valores descritos en la **Tabla 7, 8, y 9** para **1, 2, y 3** respectivamente.

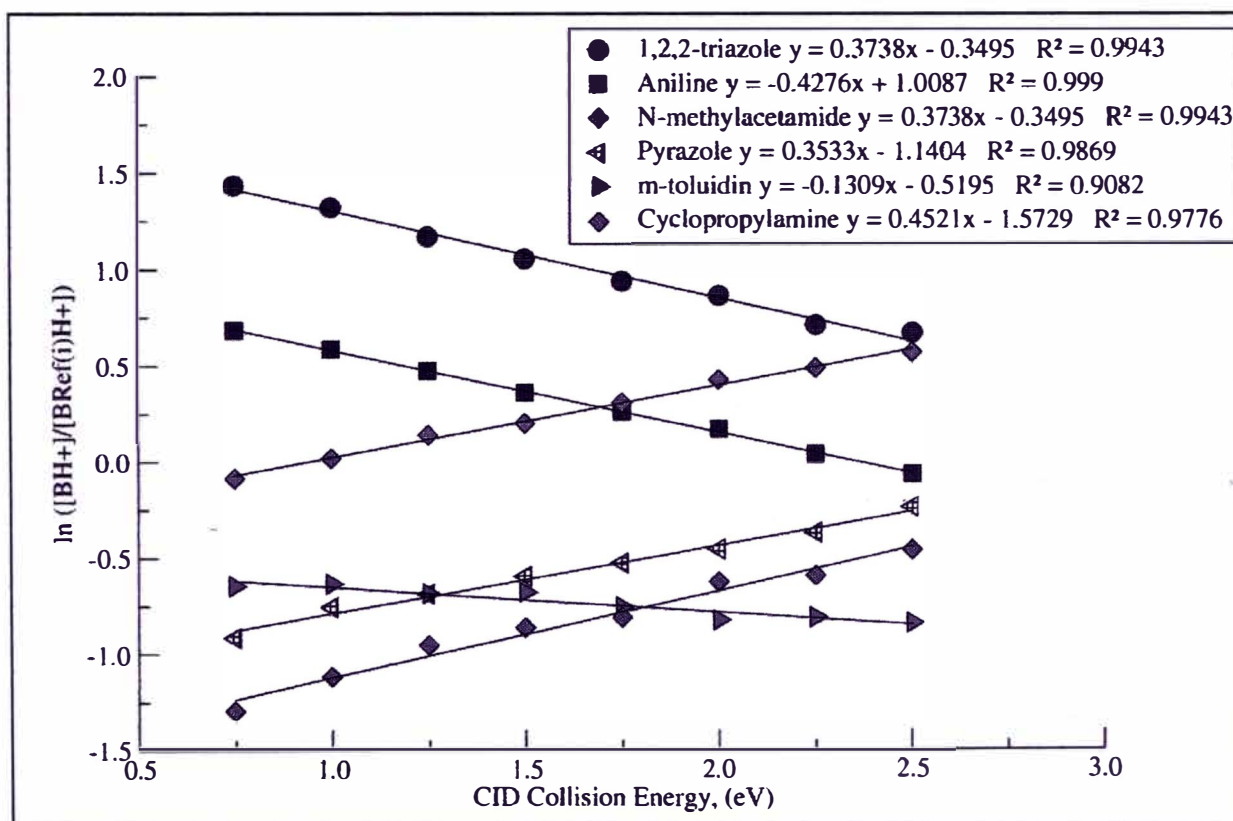


Figura 8. Gráfico de $\ln[\text{BH}^+] / [\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+]$ vs E_{cm} para 1.

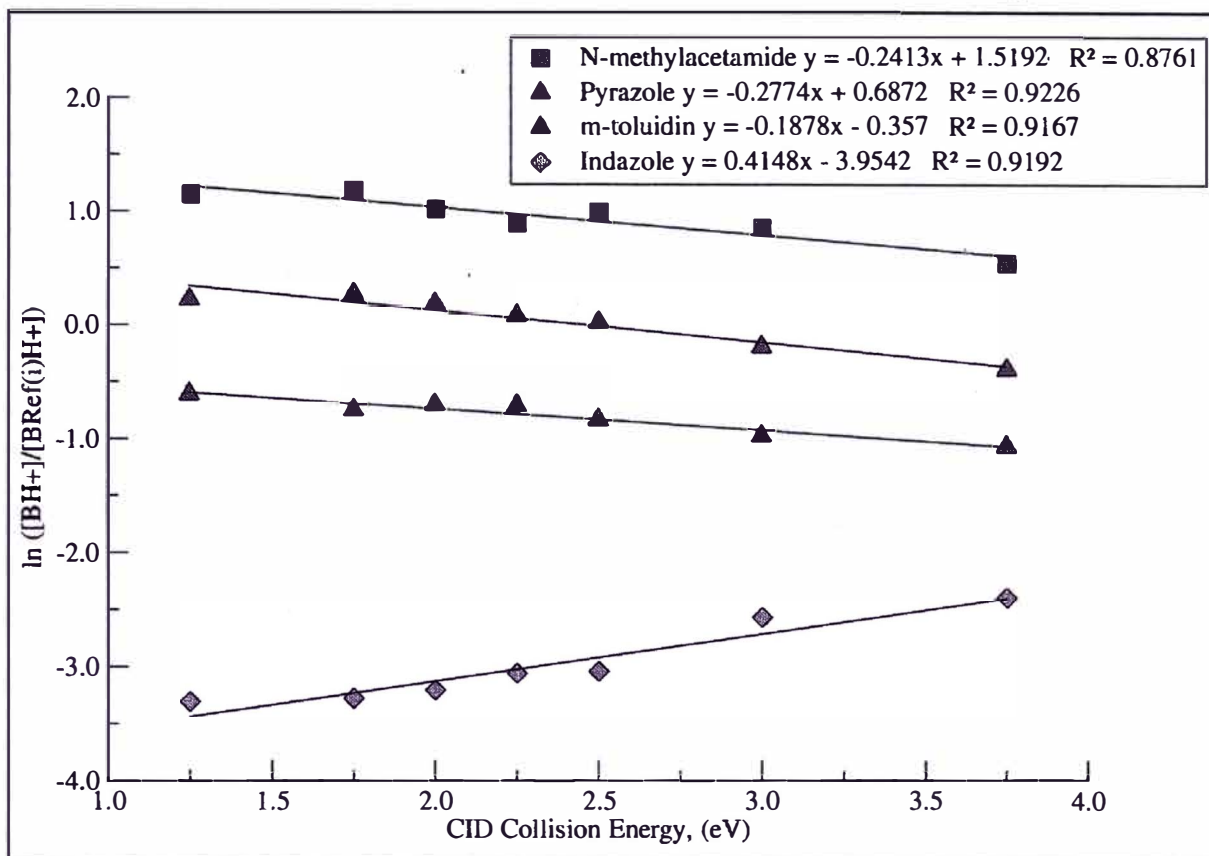


Figura 9. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs E_{cm} para 2.

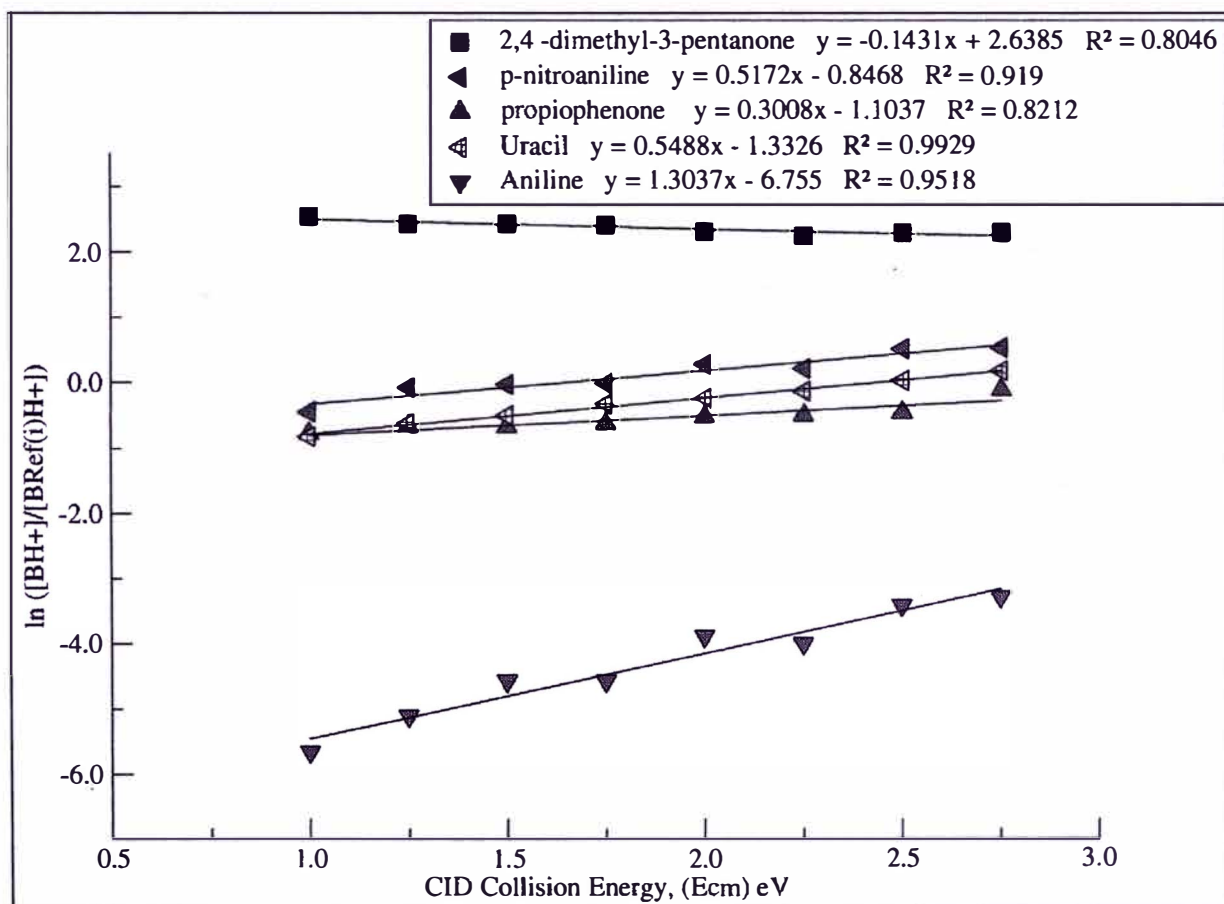


Figura 10. Gráfico de $\ln[BH^+] / [B_{ref(i)}H^+]$ vs E_{cm} para 3.

En la **Figura 11, 12, y 13** se representan el primer conjunto termocinético de gráficos lineales de $\ln[\text{BH}^+] / [\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+] \text{ vs } (PA_{\text{ref}(i)} - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}})$.

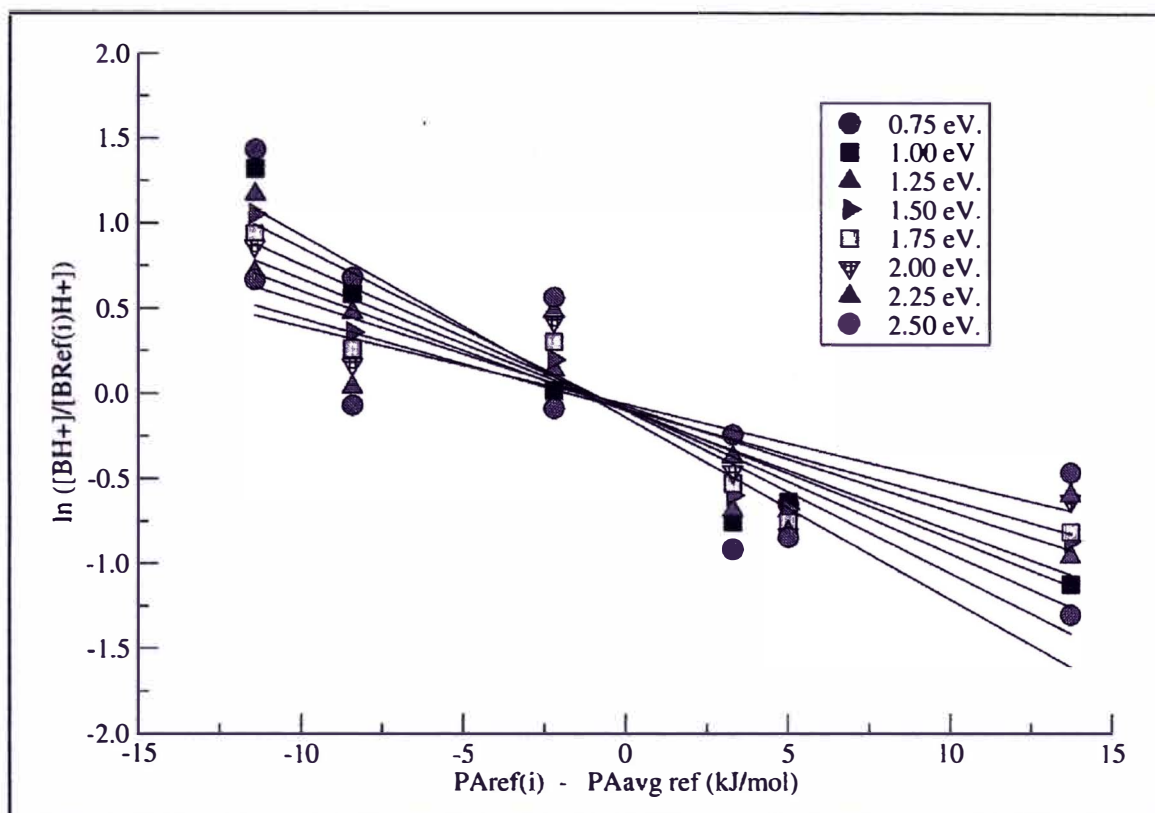


Figura 11. Gráfico de $\ln[\text{BH}^+] / [\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+] \text{ vs } (PA_{\text{ref}(i)} - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}})$ de 1.

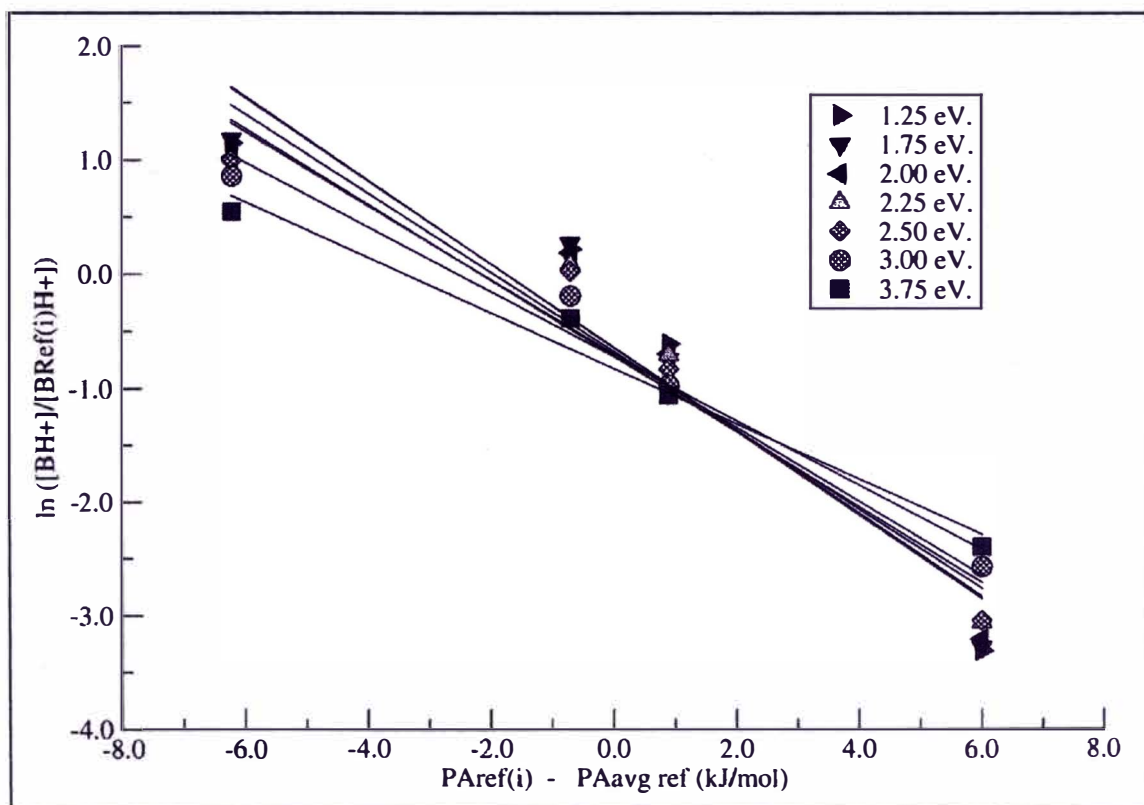


Figura 12. Gráfico de $\ln[\text{BH}^+] / [\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+] \text{ vs } (PA_{\text{ref}(i)} - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}})$ de 2.

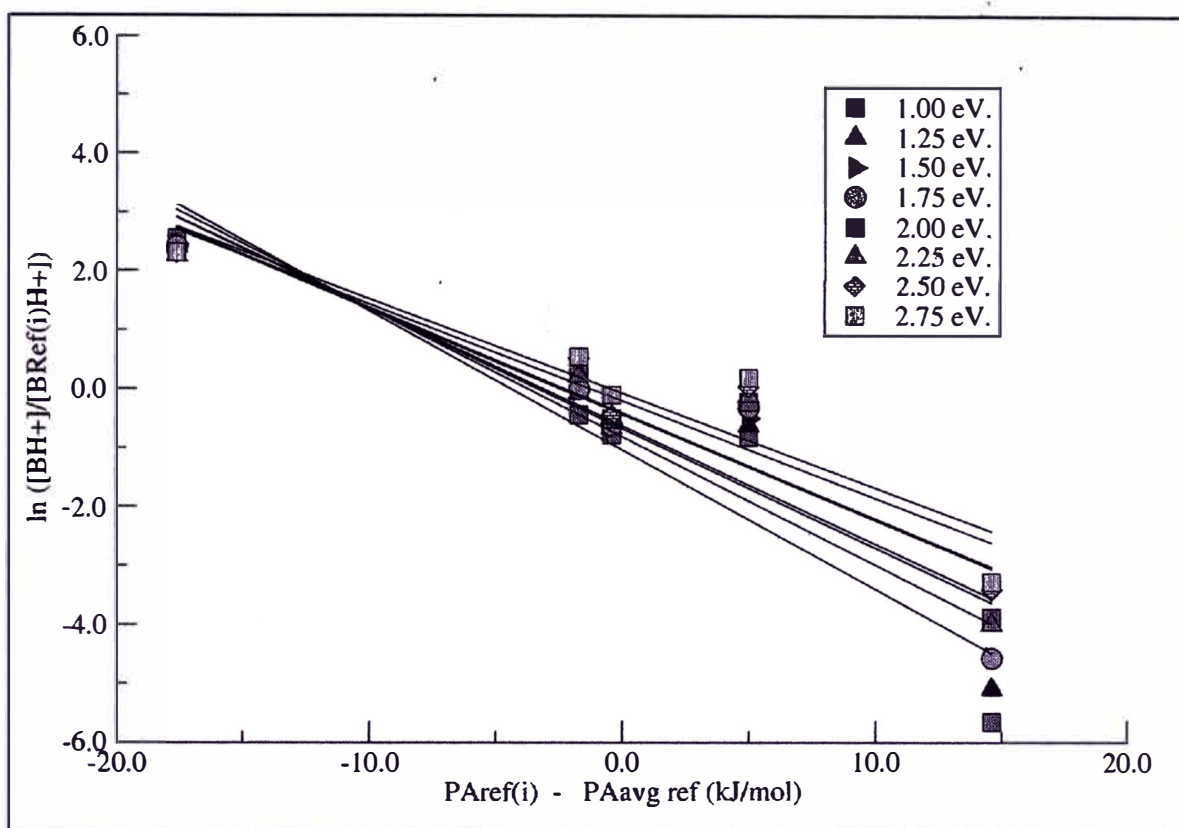


Figura 13. Gráfico de $\ln[\text{BH}^+]/[\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+]$ vs $(\text{PA}_{\text{ref}(i)} - \text{PA}_{\text{ref}}^{\text{avg}})$ de 3.

En la **Tabla 10**, **11**, y **12** se reportan parámetros como (pendiente, intercepción en el eje Y, calidad de ajuste R^2) de los ajustes lineales de las rectas obtenidas en el primer conjunto termocinético de gráficos para **1**, **2**, y **3** respectivamente (ver **Figura 11**, **12**, y **13**).

Tabla 10. Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de **1**.

E_{cm}/eV	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50
Pendiente	- 0.107	- 0.095	- 0.085	- 0.076	- 0.070	- 0.061	- 0.053	- 0.045
Intercepción en Y	- 0.136	- 0.096	- 0.089	- 0.086	- 0.097	- 0.074	- 0.089	- 0.061
R^2	0.917	0.919	0.901	0.887	0.850	0.735	0.660	0.516
T_{eff}/K	1125.3	1260.5	1420.9	1584.4	1716.1	1961.4	2263.5	2645.6

Tabla 11. Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 2.

E_{cm}/eV	1.25	1.75	2.00	2.25	2.50	3.00	3.75
Pendiente	-0.367	-0.369	-0.349	-0.326	-0.334	-0.285	-0.245
Intercepción en Y	-0.089	-0.640	-0.672	-0.692	-0.711	-0.714	-0.822
R^2	0.914	0.922	0.912	0.916	0.941	0.974	0.978
T_{eff}/K	328.0	325.5	344.9	368.6	360.2	422.1	491.7

Tabla 12. Condiciones experimentales del ESI para cada referencia de 3.

E_{cm}/eV	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75
Pendiente	-0.237	-0.218	-0.203	-0.201	-0.179	-0.179	-0.165	-0.160
Intercepción en Y	-1.034	-0.807	-0.667	-0.624	-0.408	-0.434	-0.207	-0.077
R^2	0.893	0.887	0.898	0.879	0.887	0.868	0.871	0.866
T_{eff}/K	508.3	552.3	592.9	599.6	670.6	670.6	729.6	749.7

En la **Figura 14** y **15** se representan parámetros descritos en la **Tabla 10**. En particular la **Figura 14** describe el segundo conjunto de datos termocinéticos que permiten cuantificar la afinidad protónica (PA) y la entropía ($\Delta_p S^0$) de 1.

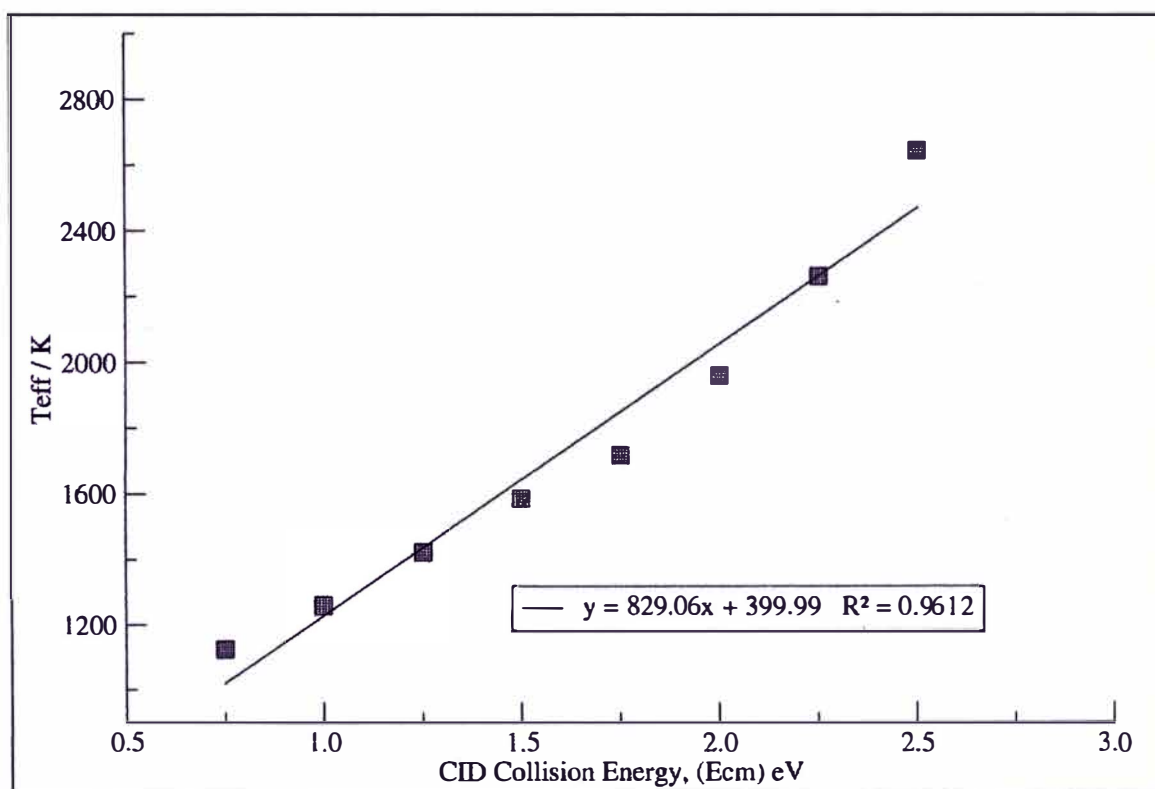


Figura 14. Gráfico de temperatura efectiva (T_{eff}/K) vs energía CID, E_{cm} de 1.

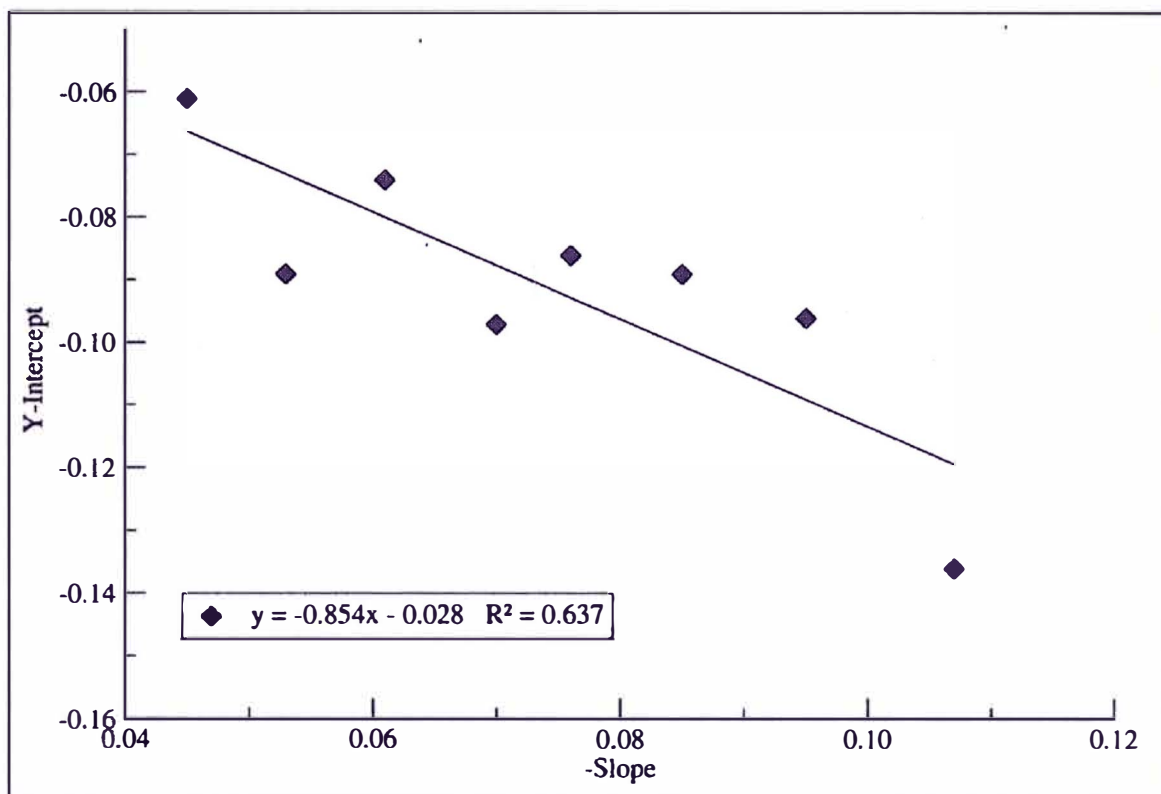


Figura 15. Gráfico de intercepción en Y vs negativo de la pendiente de 1.

En la **Figura 16** y **17** se representan parámetros descritos en la **Tabla 11**. En particular la **Figura 16** describe el segundo conjunto de datos termocinéticos que permiten cuantificar la afinidad protónica (PA) y la entropía ($\Delta_p S^0$) de **2**.

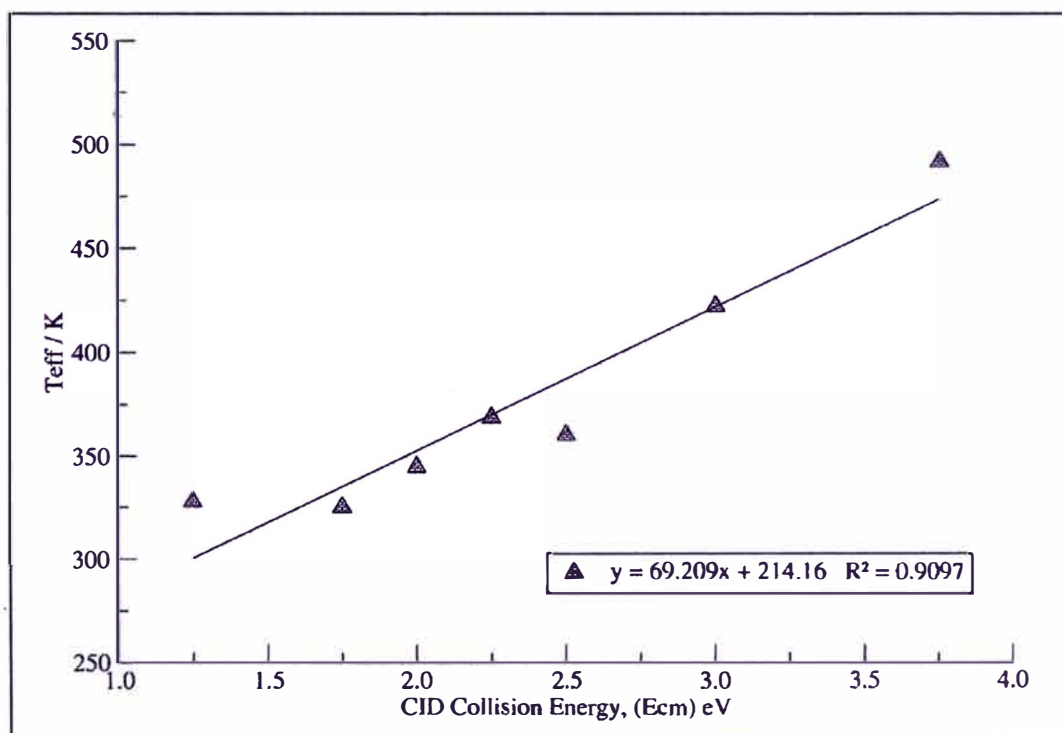


Figura 16. Gráfico de temperatura efectiva (T_{eff}/K) vs energía CID, E_{cm} de 2.

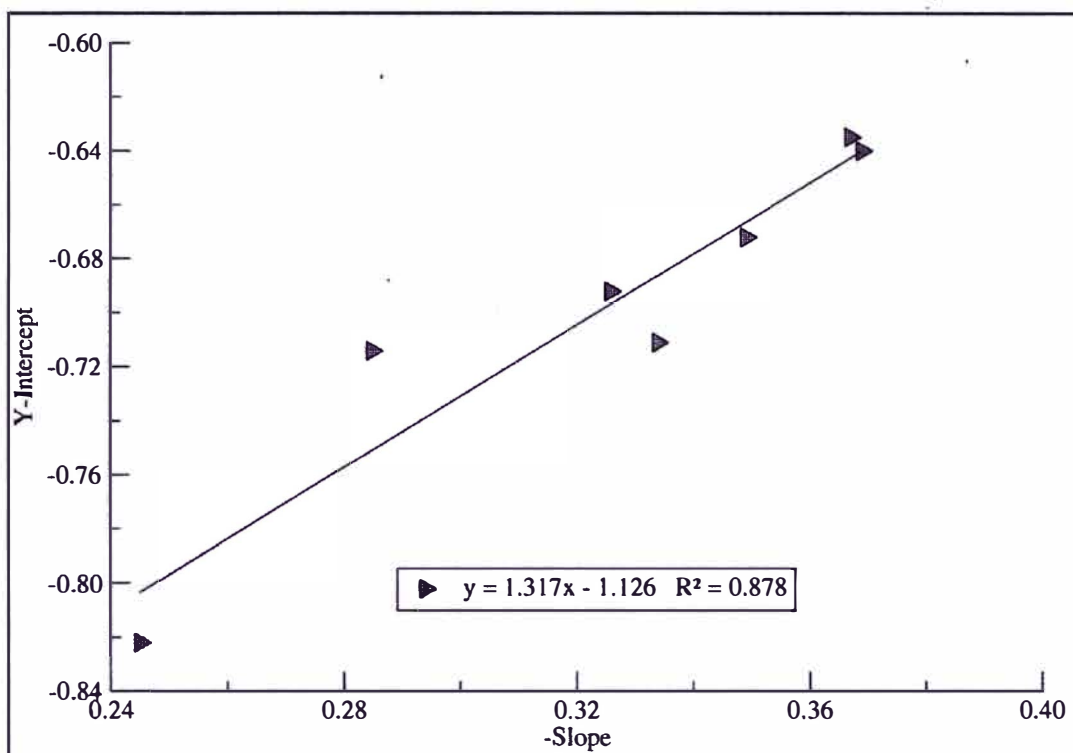


Figura 17. Gráfico de intercepción en Y vs negativo de la pendiente de 2.

En la **Figura 18** y **19** se representan parámetros descritos en la **Tabla 12**. En particular la **Figura 18** describe el segundo conjunto de datos termocinéticos que permiten cuantificar la afinidad protónica (PA) y la entropía ($\Delta_p S^0$) de 3.

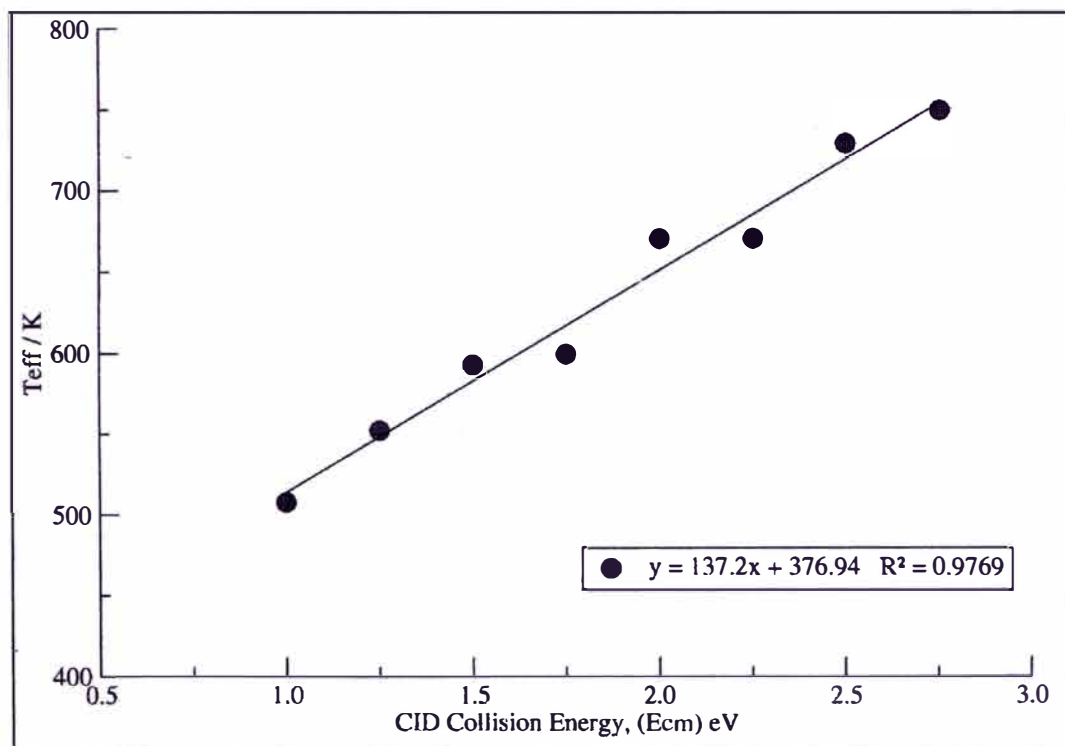


Figura 18. Gráfico de temperatura efectiva (T_{eff}/K) vs energía CID, E_{cm} de 3.

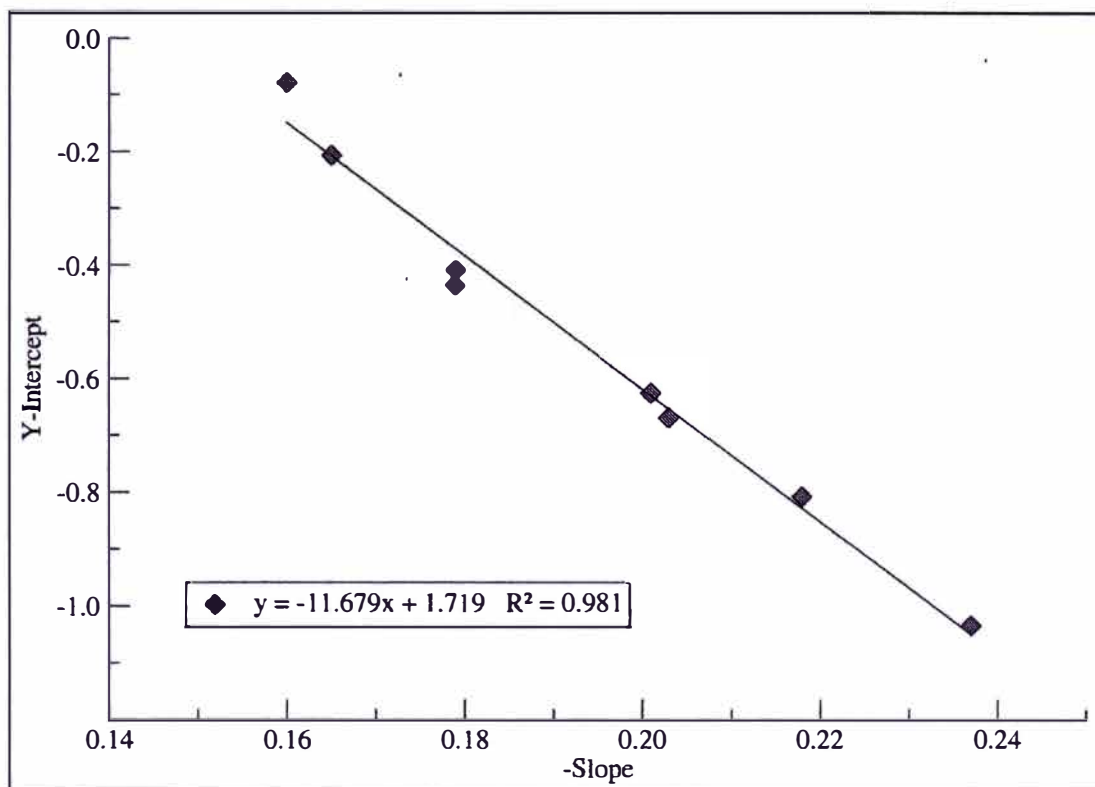


Figura 19. Gráfico de intercepción en Y vs negativo de la pendiente de 3.

En la **Tabla 13** reportamos los valores energéticos de la afinidad protónica (PA), basicidad (GB) y la entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) de **1**, **2** y **3**, aplicando el método EKCM.

Tabla 13. Resultados experimentales obtenidos de la PA , GB y $\Delta_p S^0$ de **1**, **2** y **3**.

Compuesto	PA $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	GB $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta_p S^0$ $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
1,5 – dimetil uracilo, [1]	890.0 ± 8.4	857.4 ± 8.4	109.2 ± 8.4
5,6 – dimetil uracilo, [2]	896.2 ± 8.4	861.4 ± 8.4	116.7 ± 8.4
5,6 – dihidro – 6 – metil uracilo, [3]	856.0 ± 8.4	829.1 ± 8.4	90.2 ± 8.4

5.2 RESULTADOS COMPUTACIONALES

5.2.1 Análisis conformacional de 1, 2, y 3.

Se determinó el conformero más estable para 1, 2, y 3 (Ver Figura 20). Los cálculos computacionales a niveles B3LYP/ 6-311++G(3df,2p) nos dan información de energía total a 0 K, entalpías a $T = 298.15$, energía libre de Gibbs a $T = 298.15$ K (ver Tabla 14).

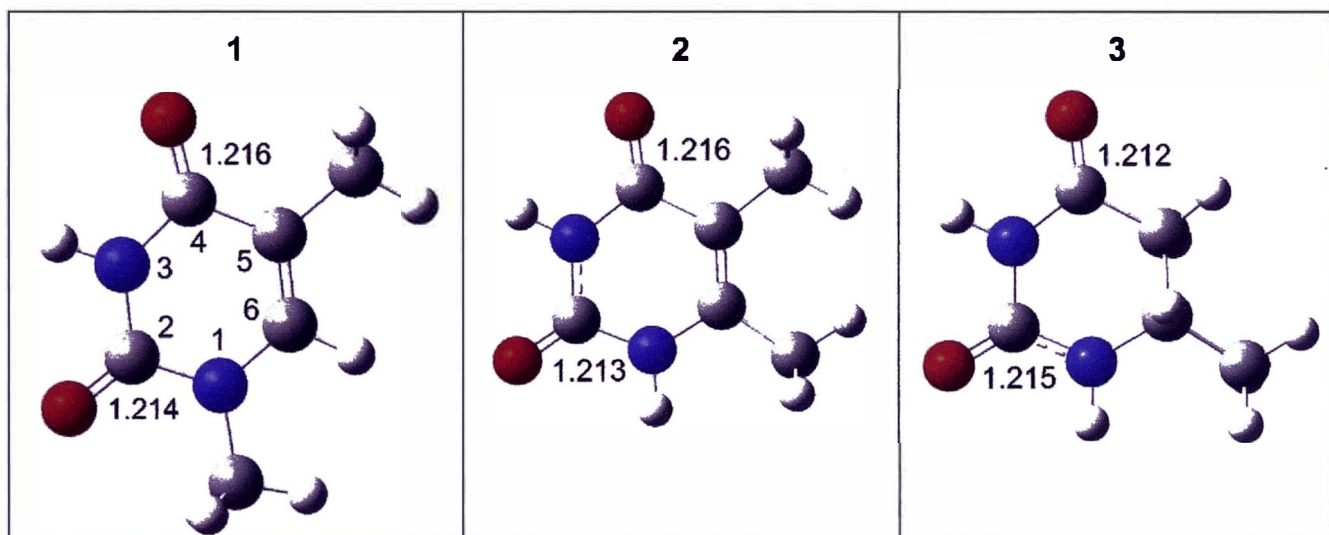


Figura 20. Geometría del conformero más estable de 1, 2, y 3 al nivel de teoría B3LYP/ 6-311++G(3df,2p).

Tabla 14. Parámetros energéticos de obtenidos a nivel de teoría B3LYP / 311++G(3df,2p).

Compuesto	E_0 Hartree	G_{298} Hartree	H_{298} Hartree
1,5 – dimetil uracilo, [1]	-493.486679	-493.521857	-493.476155
5,6 – dimetil uracilo, [2]	-493.498281	-493.533700	-493.487615
5,6 – dihidro – 6 – metil uracilo, [3]	-455.382351	-455.415226	-455.373230

5.2.2 Análisis conformacional de las moléculas protonadas de 1, 2, y 3.

Se determinó los conformeros más estables para las moléculas protonadas de 1, 2, y 3 (ver Figura 21, 22, y 23). Los cálculos computacionales a niveles B3LYP/ 6-311++G(3df,2p) nos dan información de energía total a 0 K, entalpías a $T = 298.15$, energía libre de Gibbs a $T = 298.15$ K y su respectiva población conformacional (ver Tabla 15).

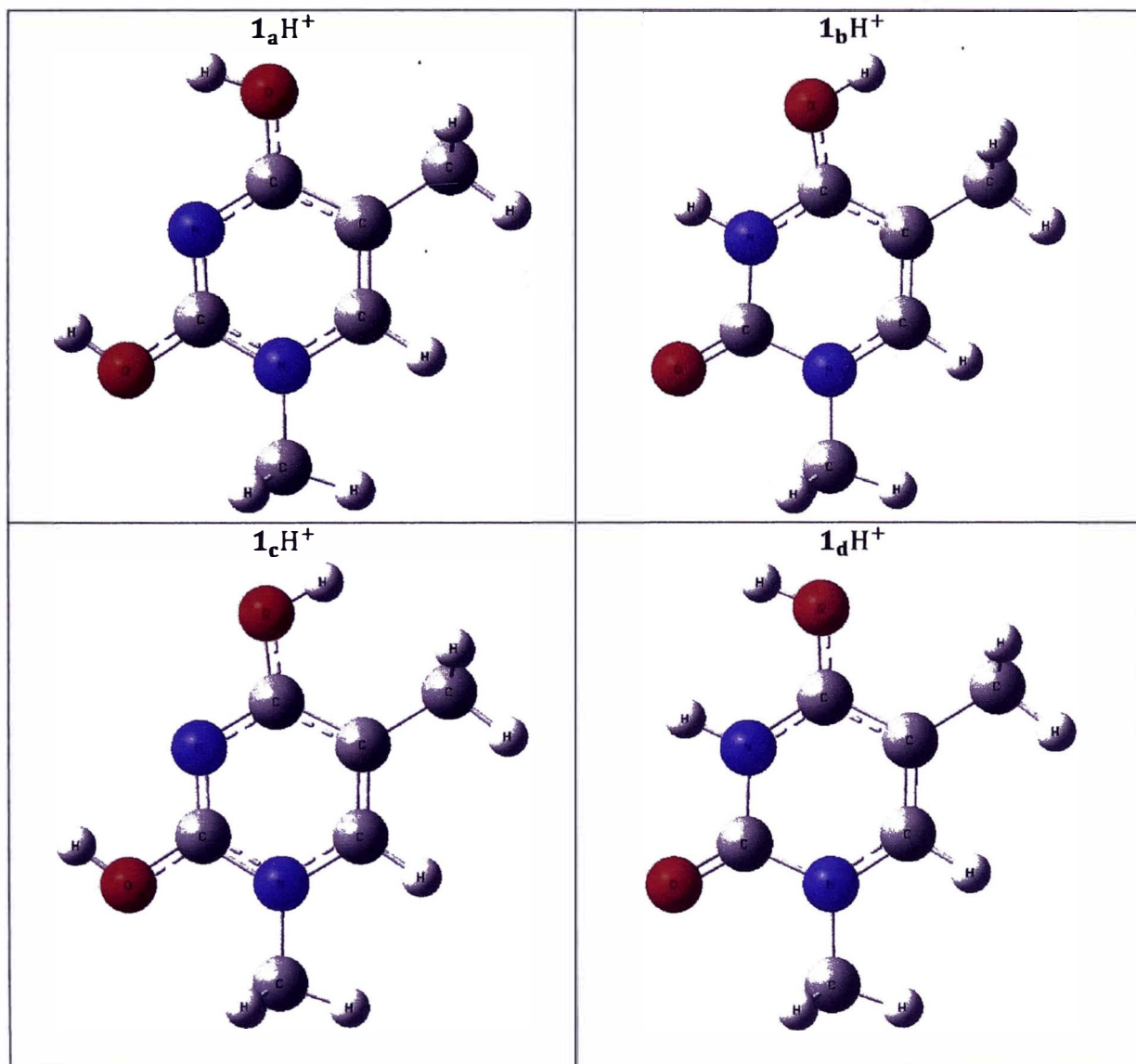


Figura 21. Geometría molecular de los conformeros protonados más estable de $1H^+$ al nivel de teoría B3LYP/ 6-311++G(3df,2p).

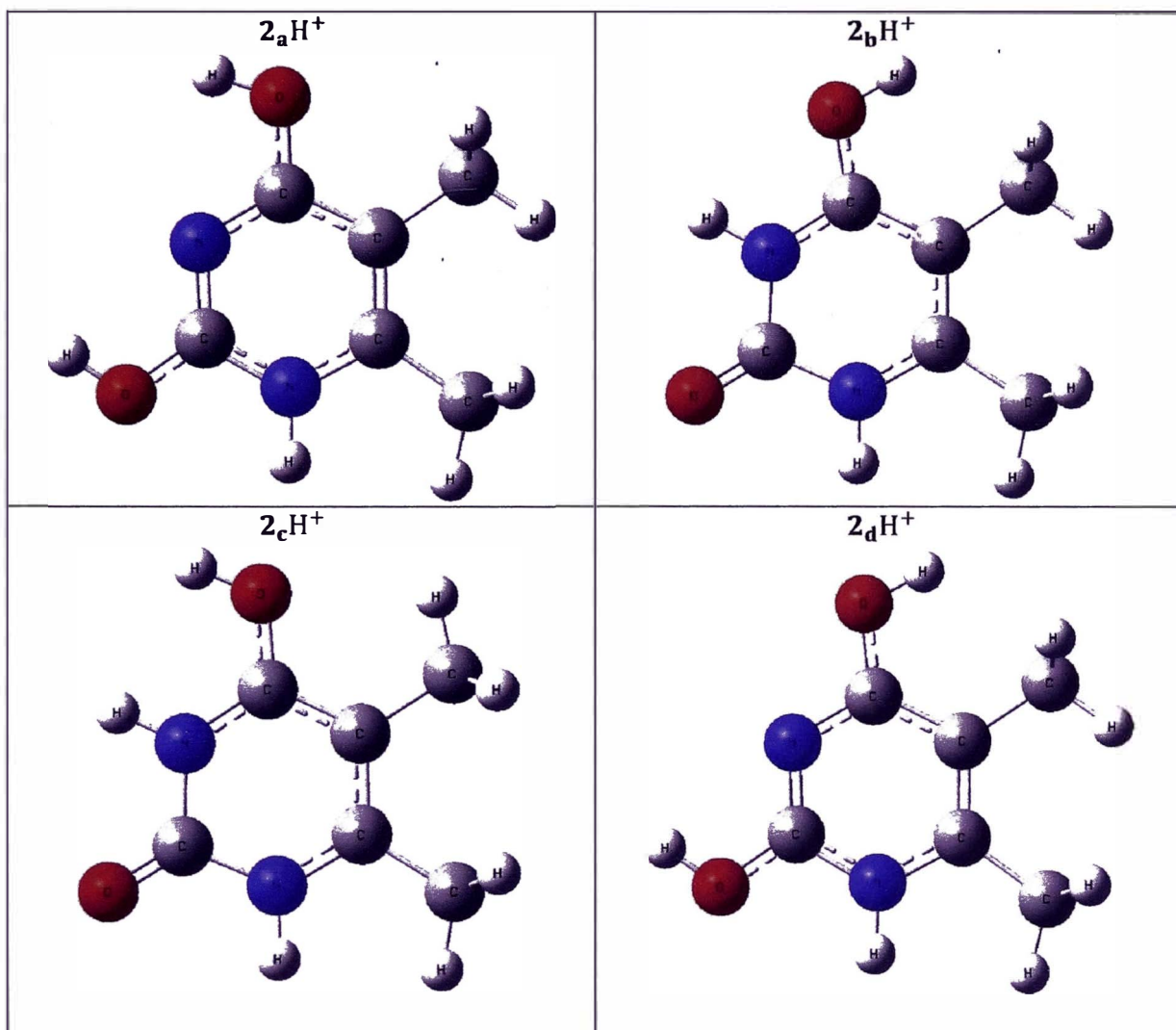


Figura 22. Geometría molecular de los conformeros protonados más estable de $2H^+$ al nivel de teoría B3LYP/ 6-311++G(3df,2p).

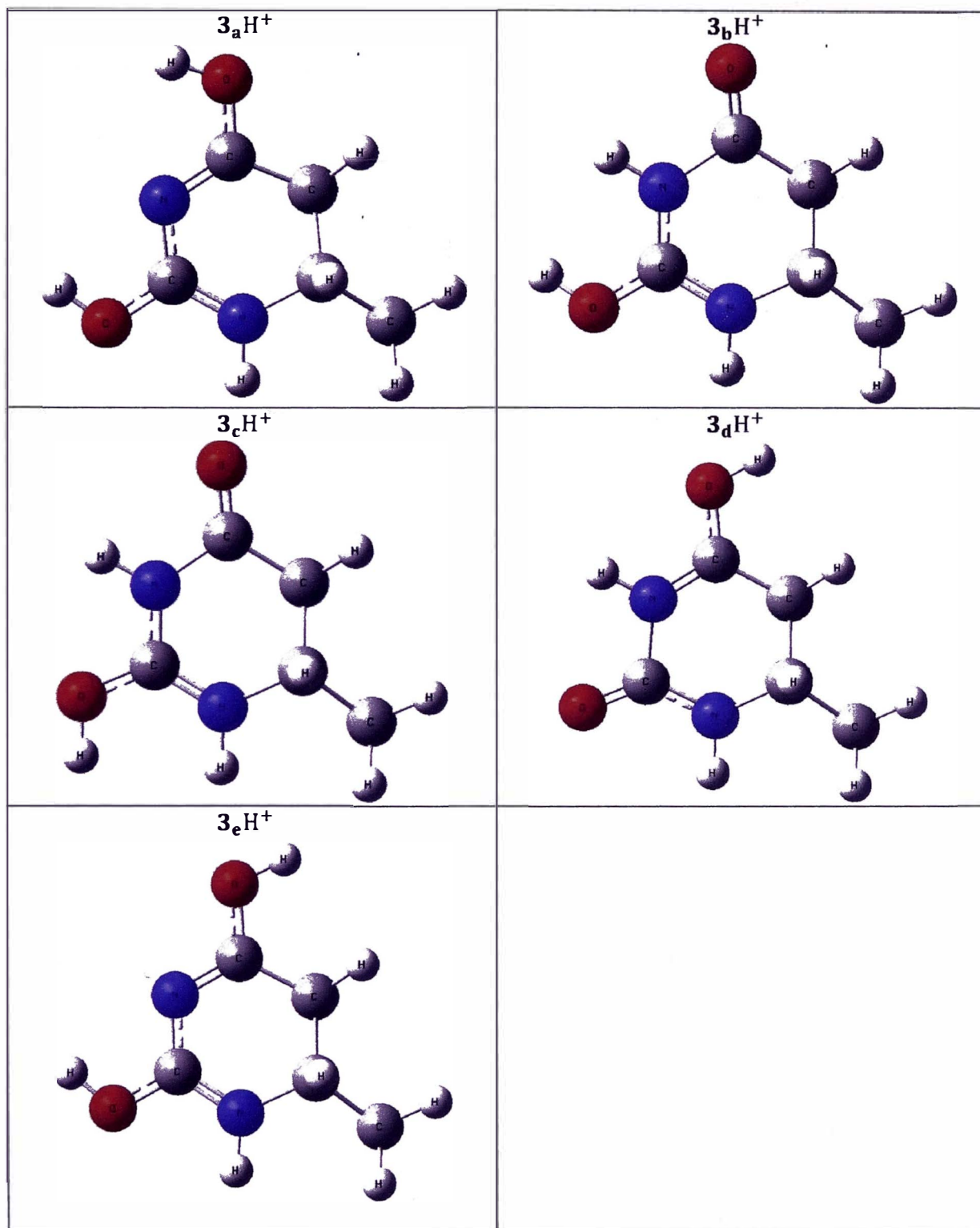


Figura 23. Geometría molecular de los conformeros protonados más estable de 3H^+ al nivel de teoría B3LYP/ 6-311++G(3df,2p).

Tabla 15. Parámetros energéticos de obtenidos a nivel de teoría B3LYP / 311++G(3df,2p).

Compuesto Protonado	Conformero Protonado	E_0	G_{298}	H_{298}	<i>Población</i>
		Hartree	Hartree	Hartree	%
1H⁺	1_aH⁺	-493.825636	-493.859967	-493.815215	90.6
	1_bH⁺	-493.823221	-493.857808	-493.812634	9.2
	1_cH⁺	-493.819040	-493.853305	-493.808625	0.1
	1_dH⁺	-493.819035	-493.853733	-493.808355	0.1
2H⁺	2_aH⁺	-493.837656	-493.872611	-493.827035	91.0
	2_bH⁺	-493.835365	-493.870398	-493.824665	8.7
	2_cH⁺	-493.831503	-493.867148	-493.820626	0.3
	2_dH⁺	-493.830697	-493.865363	-493.820129	< 0.1
3H⁺	3_aH⁺	-455.708723	-455.741474	-455.699546	50.8
	3_bH⁺	-455.707982	-455.741040	-455.698471	32.1
	3_cH⁺	-455.707399	-455.740446	-455.697889	17.1
	3_dH⁺	-455.701602	-455.734548	-455.692264	< 0.1
	3_eH⁺	-455.701315	-455.734110	-455.692088	< 0.1

5.2.4 Análisis del potencial electrostático molecular (MEP) de 1, 2 y 3.

Se ha encontrado que el potencial electrostático molecular es una herramienta útil en el análisis de las estructuras moleculares con su relación de propiedades fisicoquímicas que incluye biomoléculas.^[42] Además, el MEP está asociado con la densidad electrónica y es un descriptor adecuado para el propósito de comprender sitios para reacciones nucleofílicas y electrofílicas junto con interacciones de enlaces de hidrógeno.^[43]

En la **Figura 24**, se muestra los mapas de MEP de 1, 2, y 3 dibujados usando el programa de visualización Gauss View 5.0. Los valores diversificados del potencial electrostático se demuestran mediante colores diversificados, es decir, los colores azul, verde y rojo muestran las regiones del potencial electrostático más positivo, la región de potencial cero y las regiones del potencial electrostático más negativo, respectivamente. El potencial disminuye en el orden de azul > cian > verde > amarillo > naranja > rojo.

En MEP, el potencial electrostático positivo (regiones cian y azul) se relacionó con la

repulsión de un protón por los núcleos, mientras que el potencial electrostático negativo (rojo y amarillo) se relacionó con la atracción de un protón por la densidad electrónica agregada en la molécula.

Como puede verse en la **Figura 24**, el potencial electrostático negativo (regiones roja y amarilla) se encuentran principalmente sobre los átomos de oxígeno que son los sitios más reactivos para un ataque electrofílico, mientras que el potencial electrostático positivo (regiones cian y azules) está alrededor de los átomos de hidrógeno que son los sitios más reactivos para un ataque nucleofílico.

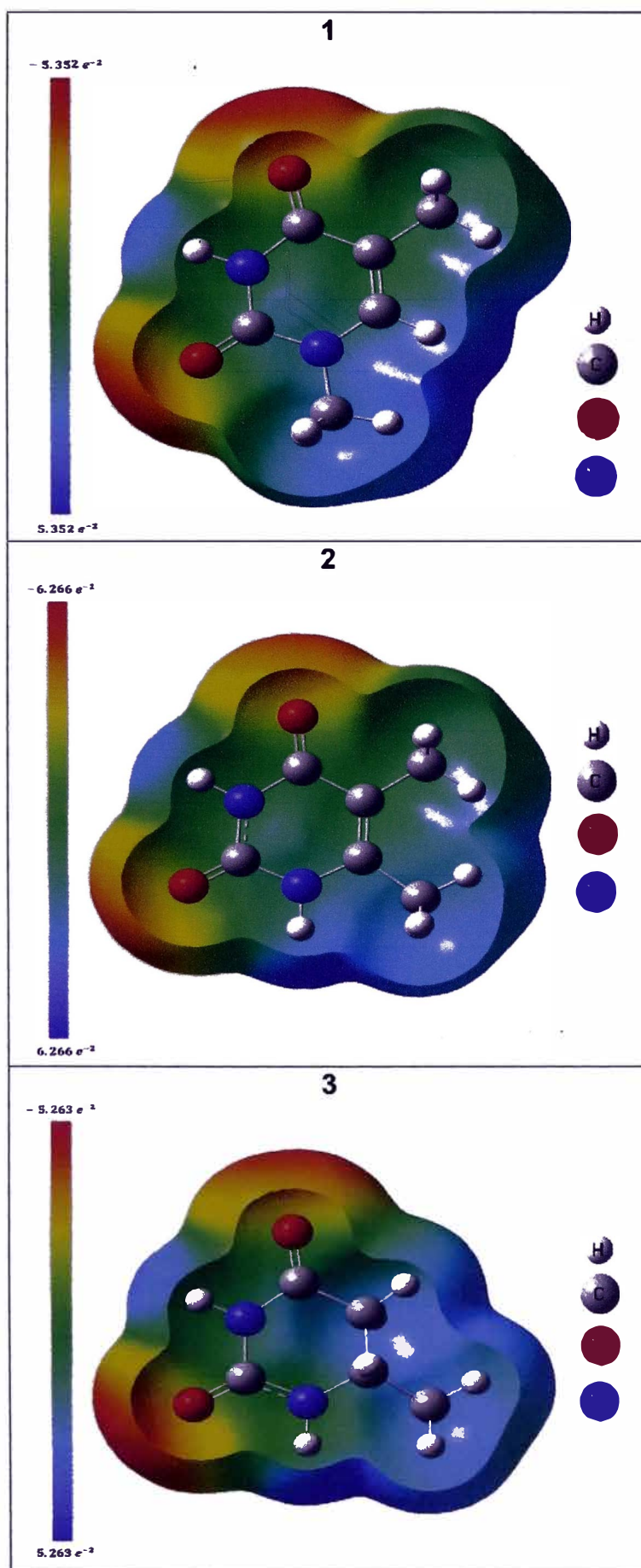


Figura 24. Mapa de superficie molecular en 3D de 1, 2 y 3.

5.2.5 Análisis del potencial electrostático molecular (MEP) del anión más estable de 1, 2 y 3.

En la **Figura 25**, se muestra los mapas de MEP de 1_aH^+ , 2_aH^+ y 3_aH^+ dibujados usando el programa de visualización **Gauss View 5.0**.

Como puede verse en la **Figura 23**, potencial electrostático positivo (regiones cian azules) está alrededor de todos los átomos de la molécula debido a que esta molécula protonada ya no va a presentar sitios más reactivos para un ataque electrofílico.

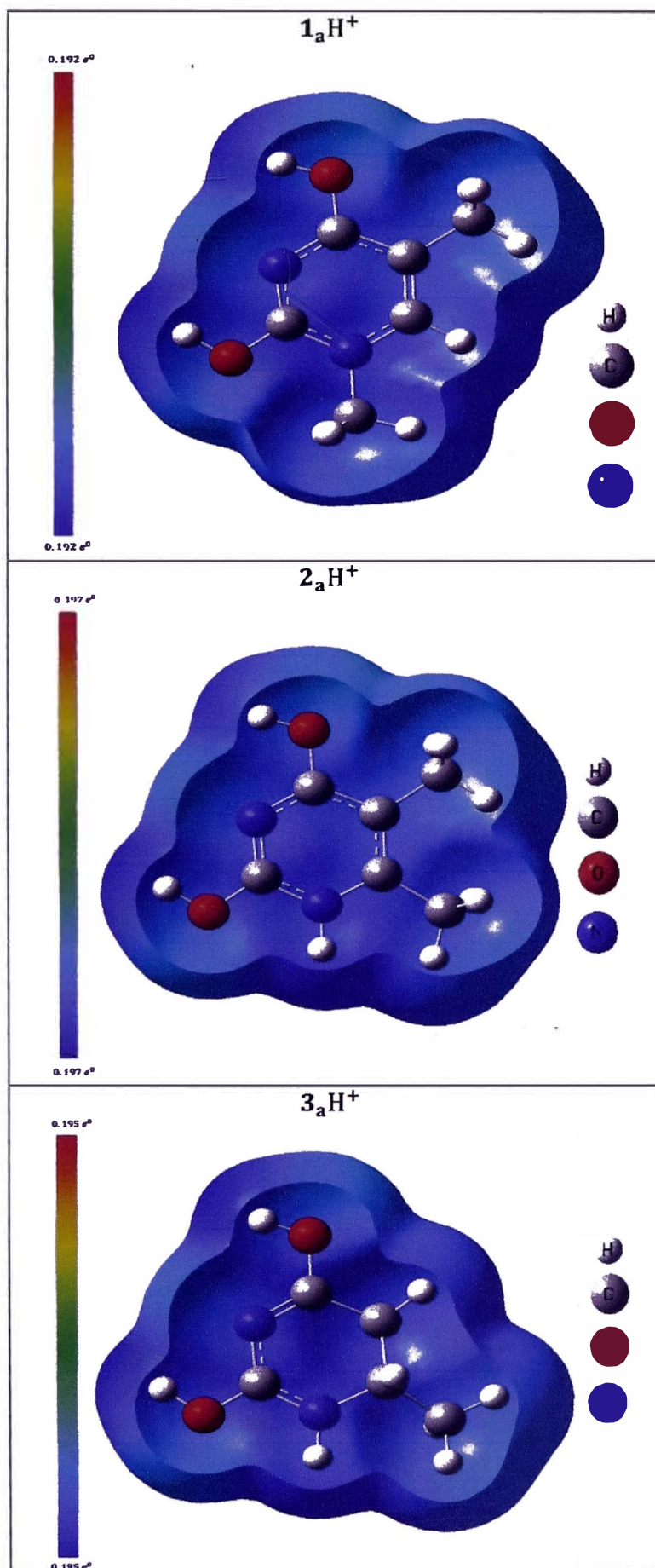


Figura 25. Mapa de superficie molecular en 3D de $1_a H^+$, $2_a H^+$ y $3_a H^+$.

5.2.6 Análisis de la distribución de carga NBO de 1, 2 y 3 y sus respectivos aniones más estables.

En la Figura 26, se muestra la distribución de carga NBO de 1, 2, y 3 (neutros) y 1_aH^+ , 2_aH^+ y 3_aH^+ (protonados) dibujados usando el programa de visualización Gauss View 5.0.

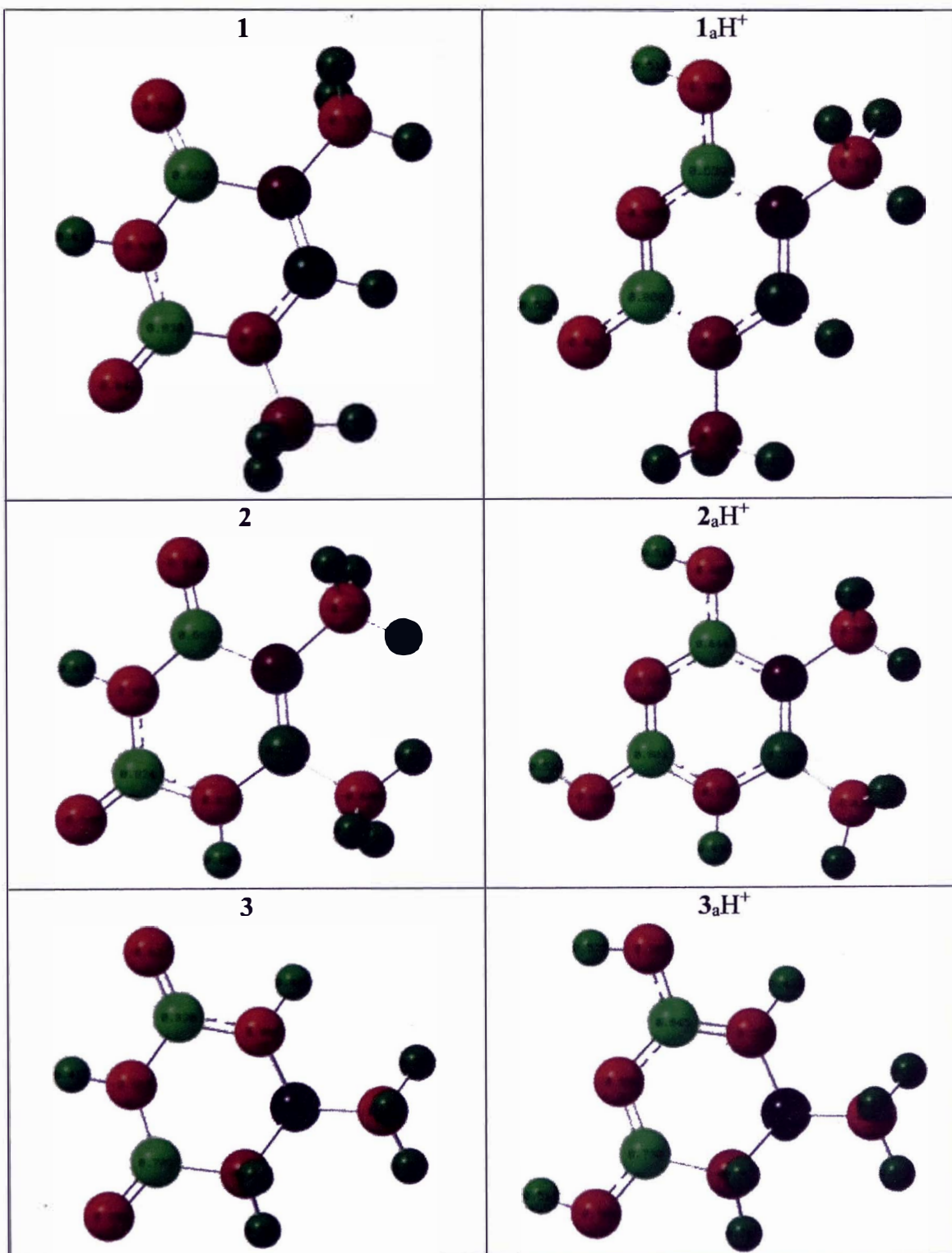


Figura 26. Distribución de carga de NBO (en unidades electrónicas) para las formas neutras (izquierda) y protonadas (derecha) más estables calculadas al nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2p).

5.2.7 Determinación de la afinidad protónica, basicidad y entropía de protonación de 1, 2, y 3.

El valor de la PA , GB , y $\Delta_p S^0$ de **1**, **2**, y **3**, se obtienen de las siguientes reacciones



La expresión de PA es,

$$PA(1,2 \text{ ó } 3) = -\Delta H(\text{ec. 16, 17 y 18 respectivamente}) \quad (19)$$

La expresión de GB es,

$$GB(1,2 \text{ ó } 3) = \Delta_p G^\circ(\text{ec. 16, 17 y 18 respectivamente}) \quad (20)$$

En la **Tabla 16** reportamos los valores energéticos de la afinidad protónica (PA), basicidad (GB) y la entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) de 1, 2 y 3, aplicando métodos computacionales.

Tabla 16. Resultados computacionales obtenidos de la PA , GB y $\Delta_p S^0$ de **1**, **2** y **3** obtenidos a nivel de teoría B3LYP / 311++G(3df,2p).

Compuesto	$\frac{PA}{\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}}$	$\frac{GB}{\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}}$	$\frac{\Delta_p S^0}{\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}}$
1,5 – dimetil uracilo, [1]	895.8	860.5	118.4
5,6 – dimetil uracilo, [2]	896.6	863.7	110.3
5,6 – dihidro – 6 – metil uracilo, [3]	861.3	832.1	97.8

5.2.8 Características estructurales y energéticas de moléculas neutras y protonadas.

La geometría optimizada de los confórmeros **1** y **2** muestra la planaridad del anillo de seis miembros que contiene nitrógeno (anillo de pirimidina), mientras que en **3** hay un elevamiento considerable en la parte C5-C6-N1 (ver **Figura 27**). Los confórmeros más estables protonados $1_a H^+$, $2_a H^+$ y $3_a H^+$, corresponden a formas dienol (ver **Figura 27**). En todos los casos, los hidrógenos unidos a los átomos de O2 y O4 están orientados hacia la posición N3 adyacente. La distribución de NBO mostró que tanto para las formas neutras como protonadas, la carga negativa se concentra particularmente en los átomos O2 y O4

de los correspondientes grupos carbonilo, que son sitios preferenciales de protonación (ver **Figura 26**).

La contribución a la correspondiente población conformacional de 1_aH^+ y 2_aH^+ es casi del 91% (ver **Tabla 15**), mientras que la contribución de los otros conformeros menos estables es bastante pequeña, ya que tienen altas diferencias energéticas en relación con los más estables (mayores de $6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). En el caso de $3H^+$, la contribución a la población total de 3_aH^+ es casi del 51%. Este conformero es solo $2.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ más estable que 3_bH^+ , que es una forma cetogénica protonada con O2 (ver **Figura 23**) y su contribución a la población es de casi el 32%. La rotación del grupo hidroxilo en 3_bH^+ alrededor del enlace C2-OH conduce a la estructura 3_cH^+ . Este conformero es $1.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ menos estable que 3_bH^+ y su contribución a la población total es casi del 17%. El resto de conformeros considerados no son cuantitativamente relevantes, ya que presentan altas diferencias de entalpía con respecto a 3_aH^+ (superiores a $19 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

1 y su forma protonada 1_aH^+ son, entre 33 y $40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, menos estables que los correspondientes conformeros **2** y 2_aH^+ (ver **Tabla 17**). Estos resultados confirman que, tanto para las formas neutras como protonadas, la metilación en la posición C6 de los anillos heterocíclicos es entálpicamente más favorable que la metilación en las posiciones C5 o N1. Esta propiedad también se da para la 5,6-dihidrotimina (**56dHthym**, metilada en la posición C5) y su conformero **3** (metilado en la posición C6), ya que tanto la forma neutra **56Hthym** y su forma protonada son casi $12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ menos estable que los correspondientes **3** y 3_aH^+ (ver **Tabla 17**).

Tabla 17. Estabilidad termodinámica [$\Delta_f H_m^0(\text{g})$], valores de afinidad protónica (*PA*) y basicidad (*GB*) de derivados de uracilo metilado y 5,6-dihidro uracilo. Todos los valores en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

	Uracilo (U)	Timina (Thym)	6-metil uracilo (6MeU)	1,5-dimetil uracilo, 1	5,6-dimetil uracilo, 2
$\Delta_f H_m^0(\text{g})$ neutro	-298.1 ± 0.6 ¹	-337.6 ± 0.9 ¹	-347.5 ²	-343.2 ³	-376.2 ± 2.6 ⁴
$\Delta_f H_m^0(\text{g})$ Protonado ⁵	365.4 ± 8.4 ⁶	317.7 ± 8.4 ⁶	304.0 ⁷	303.1 ⁷	263.8 ± 8.8 ⁶
<i>PA</i>	872.7 ⁸	880.9 ⁸	884.4 ⁸	890.0 ± 8.4 ⁹	896.2 ± 8.4 ⁹
<i>GB</i>	841.7 ⁸	850.0 ⁸	854.3 ⁸	857.4 ± 8.4 ⁹	861.4 ± 8.4 ⁹
	5,6-dihidro uracilo (56dHU)	5,6-dihidro-5- metil uracilo (56dHthym)	5,6-dihidro-6- metil uracilo, 3		
$\Delta_f H_m^0(\text{g})$ neutro	-377.4 ¹⁰	-396.2 ± 1.2 ¹¹	-408.3 ± 1.2 ¹¹		
$\Delta_f H_m^0(\text{g})$ Protonado ⁵	307.5 ⁷	283.5 ⁷	271.9 ± 8.5 ⁶		
<i>PA</i>	851.3 ¹²	856.6 ¹³	856.0 ± 8.4 ⁹		
<i>GB</i>	822.9 ¹²	828.8 ¹³	829.1 ± 8.4 ⁹		

¹ Tomado de [1]. ² Determinado mediante reacciones isodésmicas: timina \rightarrow 6MeU; 6MeU+CH₄ \rightarrow uracilo + CH₃CH₃; 6MeU + CH₃CH₃ \rightarrow 2 + CH₄. ³ Determinado mediante una reacción isodésmica: 1 + NH₃ \rightarrow 2 + H₂NCH₃ + CH₄. ⁴ Tomado de [44]. ⁵ Determinado a partir de la ec. 1 teniendo en cuenta $\Delta_f H_m^0(\text{H}^+, \text{g}) = 1536.246 \pm 0.04 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. ⁶ Valor puramente experimental, deducido a partir de la *PA*. ⁷ Determinado al nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2p). ⁸ Valor experimental tomado de la base de datos NIST [41]. ⁹ Este paper. ¹⁰ Determinado mediante reacciones isodésmicas, 56dHU + CH₃CH₃ \rightarrow 3 + CH₄; 56dHU + CH₃CH₃ \rightarrow 56dHthym + CH₄. ¹¹ Tomado de [45]. ¹² Valor medio de los cálculos teóricos al nivel B3LYP/6-311++G(3df,2p) y reacción isodésmica, 56dHUH⁺ + 3 \rightarrow 3H⁺ + 56dHU. ¹³ Valor medio de los cálculos teóricos al nivel B3LYP/6-311++G(3df,2p) level y reacción isodésmica, 56dHthymH⁺ + 3 \rightarrow 3H⁺ + 56dHthym

Es importante mencionar que los valores de *PA* están relacionados con la estabilidad de especies tanto neutras como protonados. Así, de acuerdo con nuestros resultados y también con los reportados en la literatura, encontramos que la metilación del uracilo afecta poco a las propiedades de basicidad o afinidad protónica de sus derivados metilados, aunque es posible establecer el siguiente orden (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), *PA* (uracilo) = $872.7 < PA$ (timina) = $880.9 < PA$ (6 – metil uracilo, 6MeU) = $884.4 < PA$ (1) = $890.0 \pm 8.4 < PA$ (2) = 896.2 ± 8.4 . Esta tendencia se mantiene para la *PA* de confórmeros 1, 2 y 1,3-dimetil uracilo ($PA = 894 \pm 13 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), ya que se mantiene la siguiente relación, PA (1) $< PA$ (1,3 dimetil uracilo) $< PA$ (2). Por otro lado, la metilación

en la posición C6 o C5 del 5,6-dihidro uracilo (**56dHU**, $PA = 851.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), prácticamente no afecta las propiedades de basicidad de los isómeros **3** o **56dHthym** ($PA = 856.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), ya que se puede notar que $PA(\mathbf{56dHU}) < PA(\mathbf{56dHthym}) \approx PA(\mathbf{3})$.

Estos resultados muestran que la metilación de uracilo y 5,6-dihidro uracilo (**56dHU**) tiene poco efecto sobre las afinidades de protones. Del mismo modo, la metilación de estos compuestos también tiene poco efecto sobre la acidez.

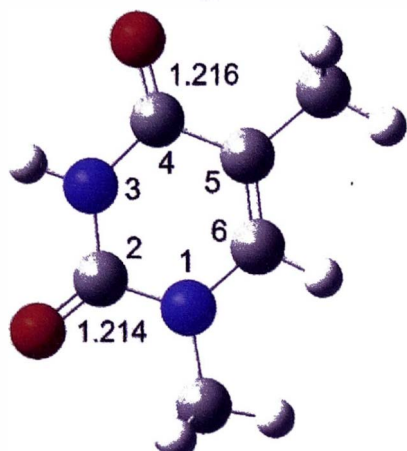
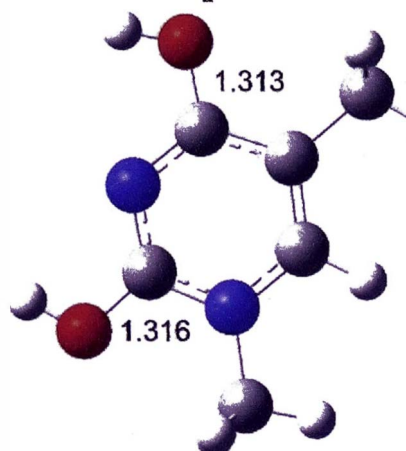
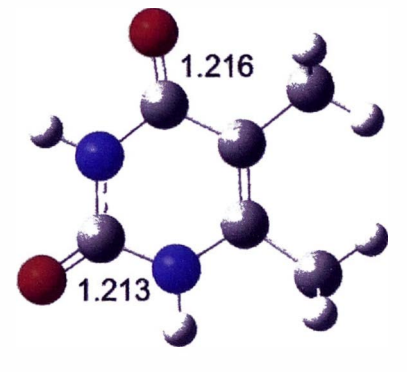
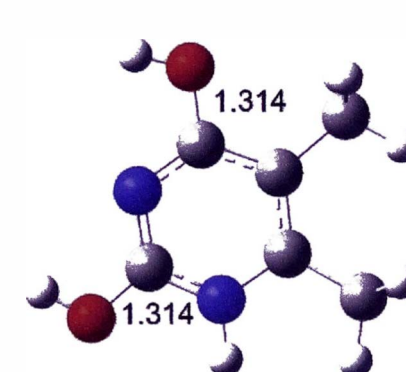
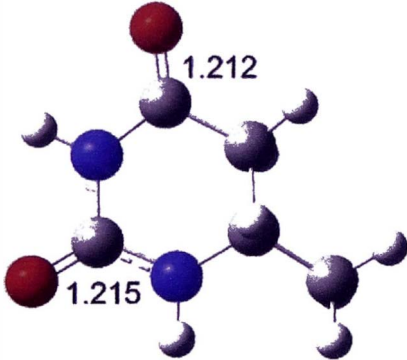
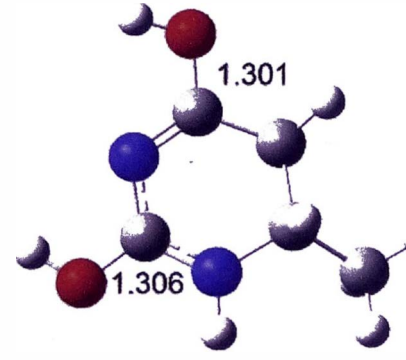
NEUTRA	PROTONADA
<p style="text-align: center;">1</p> 	<p style="text-align: center;">1_aH⁺</p> 
<p style="text-align: center;">2</p> 	<p style="text-align: center;">2_aH⁺</p> 
<p style="text-align: center;">3</p> 	<p style="text-align: center;">3_aH⁺</p> 

Figura 27. Distribución Geometría molecular para los derivados de uracilo metilado neutros (izquierda) y protonados (derecha) más estables, optimizados en el nivel de teoría B3LYP / 6-311 ++ G (3df, 2p). Distancias interatómicas en Å.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES

El trabajo teórico/experimental desarrollado para determinar propiedades energéticas y de reactividad molecular por transferencia protónica de los derivados de uracilo metilado; 1,5-dimetil uracilo (**1**), 5,6-dimetil uracilo (**2**) y 5,6-dihidro-6-metil uracilo (**3**), permitió cuantificar:

- Experimentalmente mediante el método cinético extendido (EKM),

- afinidad protónica (*PA*) de **1**, **2**, y **3** iguales a $890.0 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $896.2 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $856.0 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente.

- basicidad (*GB*) de **1**, **2**, y **3** iguales a $857.4 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $861.4 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $829.1 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente.

- entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) de **1**, **2** y **3** iguales a $109.2 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $116.7 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $90.2 \pm 8.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente.

- Computacionalmente mediante metodologías DFT (B3LYP).

- afinidad protónica (*PA*) de **1**, **2**, y **3** iguales a $895.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $896.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $861.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente.

- basicidad (*GB*) de **1**, **2**, y **3** iguales a $860.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $863.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $832.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente.

- entropía de protonación ($\Delta_p S^0$) de **1**, **2**, y **3** iguales a $118.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $110.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $97.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente.

- Finalmente es de mencionar que la metodología computacional usada (B3LYP) permitió confirmar la consistencia de los resultados experimentales, siendo destacable la excelente concordancia entre los valores experimentales y teóricos. Además, demostró que los tautómeros protonados más estables corresponden a las estructuras enol.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- [1]. Emel'yanenko, V., Verevkin, S., & Notario, R. (2015). Thermochemistry of uracil and thymine revisited. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 129-135.
- [2]. Carell, T., Brandmayr, C., Hienzsch, A., Müller, M., Pearson, D., Reiter, V., & Wagner, M. (2012). Structure and Function of Noncanonical Nucleobases. *Angewandte Chemie*, 7110–7131.
- [3]. Seley-Radtke, K., & Yates, M. (2018). The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral research*, 66-86.
- [4]. Resetar, A., & Spector, T. (1989). Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine: Human and rat enzyme specificity. *Biochemical Pharmacology*, 1389-1393.
- [5]. Cooks, R., & Kruger, G. (1977). Intrinsic basicity determination using metastable ions. *Journal of the American Chemical Society*, 1279-1281.
- [6]. McLuckey, S., Cameron, D., & Cooks, R. (1981). Proton affinities from dissociations of proton-bound dimers. *Journal of the American Chemical Society*, 1313-1317.
- [7]. Guerrero, A., Baer, T., Chana, A., González, J., & Dávalos, J. (2013). Gas Phase Acidity Measurement of Local Acidic Groups in Multifunctional Species: Controlling the Binding Sites in Hydroxycinnamic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 9681-9690.
- [8]. Salpin, J.-Y., Guillaumont, S., Tortajada, J., MacAleese, L., Lemaire, J., & Maitre, P. (2007). Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *ChemPhysChem*, 2235-2244.
- [9]. Salpin, J.-Y., Haldys, V., Steinmetz, V., León, E., Yáñez, M., & Montero-Campillo, M. (2018). Protonation of methyluracils in the gas phase: The particular case of 3-methyluracil. *International Journal of Mass Spectrometry*, 47-55.
- [10]. Moser, A., Range, K., & York, D. (2010). Accurate proton affinity and gas-phase basicity values for molecules important in biocatalysis. *J. Phys. Chem. B*, 13911-13921.
- [11]. Bouchoux, G., Desaphy, S., Bourcier, S., Malosse, C., & Biboum, R. (2008). Gas-Phase Protonation Thermochemistry of Arginine. *J. Phys. Chem. B*, 3410-3419.
- [12]. Bouchoux, G. (2017). Gas phase basicities of polyfunctional molecules. Part 6: Cyanides and isocyanides. *Mass Spectrom. Rev.*, 533-564.
- [13]. Bouchoux, G. (2007). Gas-phase basicities of polyfunctional molecules. Part 1: Theory and methods. *Mass Spectrom. Rev.*, 776-835.
- [14]. Dávalos-Prado, J. Z., Megias-Perez, R., Ros, F., Ruiz, R., Barrios-Llacuachaqui, J. R. (2021). Gas phase proton affinity and basicity of methylated uracil-derivatives. *International Journal of Mass Spectrometry*, 1-7.
- [15]. Solà, M., De Proft, F., & Bickelhaupt, M. (2019). Special Collection: Computational Chemistry. *ChemistryOpen*, 814-816.
- [16]. Cuevas, G., & Cortés, F. (2003). *Introducción a la Química Computacional*. México: Fondo de Cultura Económica.
- [17]. Grobas, P. (2018). Constantes de acidez y potenciales red-ox de compuestos derivados. Tesis de Bachillerato. Universidad de La Coruña.
- [18]. Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B*, 864-871.

- [19]. Kohn, W., & Sham, L. (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.*, 1133-1138.
- [20]. Bachrach, S. (2014). *Computational Organic Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- [21]. Perdew, J., & Schmidt, K. (2001). Jacob's ladder of density functional approximations for the exchange-correlation energy. *AIP-Press: Melville*, 1-20.
- [22]. Perdew, J., & Schmidt, K. (2005). Jacob's ladder of density functional approximations for the exchange-correlation energy. *J. Chem. Phys.*, 1-9.
- [23]. Vosko, S., Wilk, L., & Nusair, M. (1980). Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can. J. Phys.*, 1200-1211.
- [24]. Becke, A. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 5648-5652.
- [25]. Stephens, P., Devlin, F., Chabalowski, C., & Frisch, M. (1994). Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys. Chem.*, 11623-11627.
- [26]. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., et al., (2016). Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [27]. Lee, C., Yang, W., & Parr, R. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 785-789.
- [28]. Downard, K. (2004). *Mass spectrometry: a foundation course*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- [29]. Dass, C. (2007). *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- [30]. González, F. (2015). Energética e interacciones de especies sencillas y macromoleculares con interés fundamental, biológico y tecnológico. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
- [31]. Smith, R. (2004). *Understanding mass spectra: a basic approach*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- [32]. Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., & Whitehouse, C. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 64-71.
- [33]. Rayleigh, L. (1882). On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine Series 5*, 184-186.
- [34]. Fernández de la Mora, J. (1996). On the Outcome of the Coulombic Fission of a Charged Isolated Drop. *Journal of Colloid and Interface Science*, 209-218.
- [35]. Carlos, L. (2018). Procesos de protonación y su influencia en la fragmentación de isómeros orgánicos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Ingeniería.
- [36]. De Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons.
- [37]. Levsen, K., & Schwarz, H. (1983). Gas-phase chemistry of collisionally activated ions. *Mass Spectrometry Reviews*, 77-148.
- [38]. Shukla, A., & Futrell, J. (1993). Collisional activation and dissociation of polyatomic ions. *Mass Spectrometry Reviews*, 211-255.

- [39]. Cooks, R., & Wong, P. (1998). Kinetic Method of Making Thermochemical Determinations: Advances and Applications. *American Chemical Society*, 379-386.
- [40]. Cody, R., Burnier, R., & Freiser, B. (1982). Collision-induced dissociation with Fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 96-101.
- [41]. NIST Chemistry Webbook In Linstrom, P. J.; Mallard, W.G., Eds.; NIST Standard Reference Database Number 69; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, 20899 (Retrieved June 22, 2019).
- [42]. Nataraja, A., Balachandran, V., Karthick, T., Karabacak, M., & Atace, A. (2012). FT-Raman, FT-IR, UV spectra and DFT and ab initio calculations on monomeric and dimeric structures of 3,5-pyridinedicarboxylic acid. *Journal of Molecular Structure*, 1-14.
- [43]. Scrocco, E., & Tomasi, J. (1978). Electronic Molecular Structure, Reactivity and Intermolecular Forces: An Euristic Interpretation by Means of Electrostatic Molecular Potentials. *Advances in Quantum Chemistry*, 115-193.
- [44]. Notario, R., Emel'yanenko, V., Roux, M. V., Ros, F., Verevkin, S. P., Chickos, J. S. & Liebman, J. F. (2013). Thermochemistry of Uracils. Experimental and Computational Enthalpies of Formation of 5,6-Dimethyl-, 1,3,5-Trimethyl-, and 1,3,5,6-Tetramethyluracils. *J. Phys. Chem. A*, 244-251.
- [45]. Amaral, L., Szturner, P., & Ribeiro da Silva, M. A. V. (2013). Enthalpies of formation of 5,6-dihydro-5-methyluracil and 5,6-dihydro-6-methyluracil. *J. Chem. Thermodyn.*, 187-192.

ANEXO

Incluye la publicación, posters y ponencia oral obtenidos con los resultados de la presente Tesis de Maestría

PUBLICACIÓN CIENTÍFICA

- Dávalos-Prado, J. Z., Megias-Perez, R., Ros, F., Ruiz, R., & Barrios-Llacuachaqui, J. R.(2021). **Gas phase proton affinity and basicity of methylated uracil-derivatives.** *International Journal of Mass Spectrometry*, 1-7.

PÓSTER

- Barrios, J., & Dávalos, J. (2020). **Gas phase proton affinity of methylated uracil-derivatives.** *Programa de Maestría en Física Convenio N° 167-CONCYTEC-UNI PROMOCIÓN 2018-2020*, Lima-Perú.

- Barrios, J., & Dávalos, J. (2019). **Gas phase proton affinity of methylated uracil-derivatives.** *XVIII Meeting of Physics* , Lima-Perú.

PONENCIA ORAL

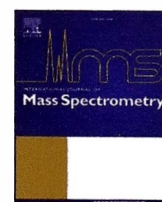
- Barrios, J., & Dávalos, J. (2020). **Gas phase proton affinity of methylated uracil-derivatives.** *I Congreso Internacional y III Congreso Latinoamericano en Química, Física y Biología Computacional*, Arequipa – Perú.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Mass Spectrometry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijms

Gas phase proton affinity and basicity of methylated uracil-derivatives

Juan Z. Dávalos-Prado^{a,*}, Roberto Megias-Perez^a, Francisco Ros^b, Ronald Ruiz^c,
Julio R. Barrios-Llacuachaqui^{d,**}

^a Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC. c/Serrano, 119, E-28006, Madrid, Spain^b Instituto de Química Médica, CSIC, Juan de la Cierva 3, E-28006, Madrid, Spain^c Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Jr. Río Chepén 290, El Agustino, Peru^d Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Peru

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2021

Received in revised form

9 September 2021

Accepted 29 September 2021

Available online 2 October 2021

Keywords:

Methylated-uracil

Extended kinetic method

B3LYP

Proton affinity

Basicity

ABSTRACT

The gas phase proton affinity (PA) and basicity (GB) of methylated uracil derivatives have been evaluated experimentally by the Extended Kinetic Method (EKM) using ES1-TQ mass spectrometry. The experimental PA values, in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, for 1,5-dimethyluracil (890.0 ± 8.4), 5,6-dimethyluracil (896.4 ± 8.4) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (856.0 ± 8.4) were in the same order as those determined theoretically by calculations performed at the B3LYP/6-311++G(3df,2p) level of theory. From the results, it can be concluded that most stable protonated tautomers correspond to the enol structures. Furthermore, it should be noted that the methylation of uracil and 5,6-dihydrouracil has little effect on the proton affinity and basicity of their corresponding methylated derivatives.

© 2021 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Uracil is a pyrimidine nitrogenous base that is part of nucleic acids. Unlike other nucleobase, which are found in both DNA and RNA, uracil is only in RNA, whereas in DNA is in its methylated form (thymine). Since nucleobases play a prominent role on the cell biology, the study of the structure of nucleobases such as uracil and thymine and their physicochemical properties has led to the development of new compounds with a structure based on 5-substituted uracils, compounds with relevant application on medicine. Among these new compounds are 5-fluorouracil [1], widely used in oncology treatments or 5'-azido-5-deoxythymine [2], an antiviral used for the treatment of AIDS. On the other hand, 5,6-dihydrouracil (rare pyrimidine base) and its derivatives are related to biological processes such as the transfer loop in RNAs [3,4]. Some of them also show biological activity, including anti-tumor [5], antiretroviral [6] or adrenergic blocking properties [7].

Another interesting research topic is related to the acid/base

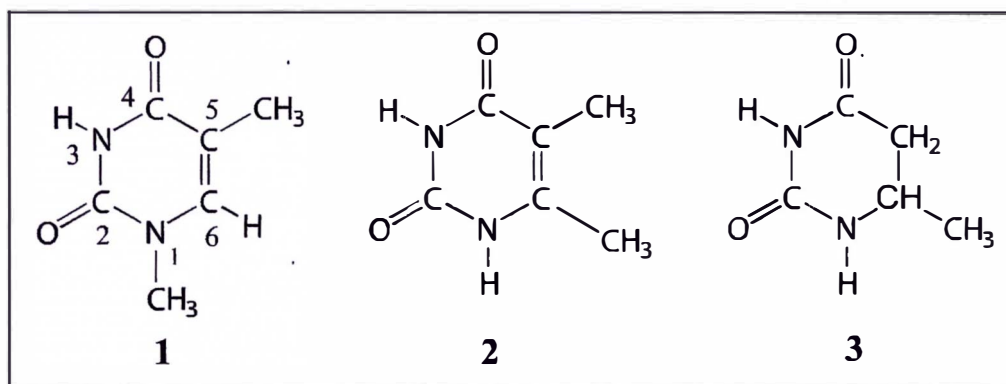
properties of nucleobases, as hydrogen-bond interactions in base pairs are controlled by the proton acceptor/donor capacity of carbonyl/amino groups. Proton transfer is a ubiquitous process in chemistry and biology, and is perhaps one of the most important biochemical pathways of life itself [8]. In this context, the development of mass spectrometry techniques has allowed the development of methods to determine the acid/base properties of small compounds. So far, some applications to the study of protonated uracil derivatives have been published. Salpin et al. [9] and Rodgers et al. [10], using infrared multiple-photon dissociation (IRMPD) spectroscopy, concluded that the most stable protonated uracil tautomers generated under their experimental conditions correspond to enol structures, in which both keto groups are converted to hydroxyl groups by proton binding and proton transfer from the neighboring NH groups. However, other approaches as the kinetic method (KM) developed by Cooks et al. [11,12] have not been applied to determine the acid/base properties of uracil derivatives. This method is based on competitive dissociations of proton-bound heterodimeric ions, which produce protonated (or deprotonated) molecules at their most basic (or acidic) sites.

This work aims to determine for the first time in the following uracil-methylated derivatives 1,5-dimethyl uracil (**1**); 5,6-dimethyl uracil (**2**) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (**3**) (structures shown in Scheme 1) the experimental thermochemical gas-phase

* Corresponding author.

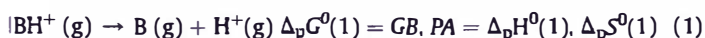
** Corresponding author.

E-mail addresses: jdavalos@iqf.csic.es (J.Z. Dávalos-Prado), jbarriosl@uni.pe (J.R. Barrios-Llacuachaqui).



Scheme 1. Structure of 1,5-dimethyl uracil (1), 5,6-dimethyl uracil (2) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (3).

protonation quantities, such as proton affinity PA , basicity GB and protonation entropy $\Delta_p S^0$. The gas-phase basicity of a base B , $GB(B)$, is defined as the Gibbs free-energy change for reaction (1):



The corresponding enthalpy and entropy changes for this reaction are denominated gas-phase proton affinity (PA) and protonation entropy, ($\Delta_p S^0$). The consistency of the experimental results has been evaluated using DFT methodology at B3LYP/6-311++G(3df,2p) level of theory. It is interesting to note that, despite the interest in uracil derivatives, all this information was not available until now.

2. Methodology

2.1. Materials and instrumentation

2.1.1. Materials

Although 1,5-dimethyl uracil [1, $C_6H_8N_2O_2$, CAS 4160-72-9]; 5,6-dimethyl uracil [2, $C_6H_8N_2O_2$, CAS 2434-49-3] and 5,6-dihydro-6-methyluracil [3, $C_5H_8N_2O_2$, CAS 2434-49-3] are already commercial products, these were synthesized in our laboratory. The reference compounds $B_{ref(i)}$ were purchased from Sigma-Aldrich and Alfa Aesar and used without further purification. These compounds were chosen on the basis of the similar GB value to that estimated for 1, 2 and 3 [13].

2.1.2. General

The experiments were carried out on a triple quadrupole mass spectrometer Agilent/Varian 320 equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Stock solutions ($\sim 10^{-3}$ M, in methanol) of sample studied (B) and the desired reference compound ($B_{ref(i)}$) were mixed in a $\sim 1:1$ vol ratio. After that, the mixture was diluted with methanol to reach a concentration of $\sim 10^{-4}$ M. The solutions were infused directly into the ESI ionization source in the positive mode, at flow rates of 10 μ L/min. The experimental ESI conditions (drying gas temperature, nebulizing gas and needle potential) were optimized in order to promote the formation of an intensive signal for the heterodimeric proton-bound cations $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$. Table S2, S3 and S4 show the different experimental ESI conditions used in each experiment performed in the study. The heterodimeric cations were isolated in the first quadrupole, subjected to collision induced dissociation (CID) in the second quadrupole and the resulting fragments were analyzed in the third quadrupole. The CID experiments were performed using argon as collision gas (0.2 mTorr) at various kinetic energies of the ion in the collision cell. The center of mass energy (E_{cm}) was calculated as: $E_{cm} = E_{lab} m /$

$(M + m)$ where E_{lab} is the ion kinetic energy of the ions in the laboratory frame, m is the mass of the collision gas and M is the mass of the heterodimeric cluster ion.

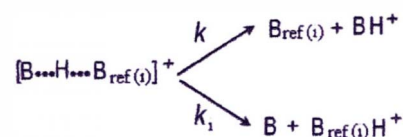
2.2. Extended kinetic method (EKM)

EKM [14–22] is an improved version of the Cooks kinetic method (KM) [11,12] that takes into account entropic effects in the competitive dissociations of heterodimeric cations (clusters) bound to protons of selected mass $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$ generated in the gas phase, where B is the uracil-derivative (1, 2 and 3), $B_{ref(i)}$ is a set of reference compounds with known GB values. The clusters $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$ are fragmented by CID to produce the corresponding monomeric cations BH^+ and $B_{ref(i)}H^+$, through two competitive dissociation channels with rate constants k and k_i , respectively. If secondary fragmentation is negligible, the abundance ratio of these fragments is equal to the ratio of the rate constants, k and k_i (see Scheme 2).

With the assumption that there are no inverse activation energy barriers, the proton affinity PA of the studied sample are related by a linear equation (2). The statistical procedure has been developed by Armentrout [16], and is expressed as,

$$\ln \left(\frac{k}{k_i} \right) = \ln \frac{[BH^+]}{[B_{ref(i)}H^+]} = - \frac{(PA_{ref(i)} - PA_{ref}^{avg})}{RT_{eff}} + \left[\frac{PA - PA_{ref}^{avg}}{RT_{eff}} - \frac{\Delta(\Delta S^0)}{R} \right] \quad (2)$$

where PA_{ref}^{avg} is the average proton affinity of the reference compounds; T_{eff} is an "effective temperature" [23,24] related to the excitation energy of the dissociating $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$ heterodimers. The entropic term $\Delta(\Delta S^0)$ can be expressed as the difference in the protonation entropies of the two bases [25,26], $\Delta(\Delta S^0) \approx \Delta_p S^0 - \Delta_p S^0_{ref(i)}$. If the reference compounds have similar protonation entropies, the last term can be replaced by the corresponding average entropy, as $\Delta(\Delta S^0) \approx \Delta_p S^0 - \Delta_p S^0_{ref}^{avg}$. We now have



Scheme 2. Collision-induced dissociations of $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$.

three unknown variables in eq. (2) (PA , RT_{eff} and $\Delta_p S^0$). These quantities can be obtained for each case from two sets of thermo-kinetic plots based on equation (2). The first set is the linear plot of $\ln(k/k_i)$ vs $(PA_{\text{ref}(i)} - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}})$ using data collected from a series of experiments under different collision energies. The resulting plots give a series of straight lines characterized by a slope equal to $-1/RT_{\text{eff}}$ and a Y-intercept including terms expressed in brackets in the eq. (2). In the second thermo-kinetic plot, the values of the intercepts obtained in the first graph are plotted against $1/RT_{\text{eff}}$ values (obtained previously). The new graph produces a second straight line with a slope given by $(PA - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}})$ and an intercept given by $-\Delta(\Delta S^0)/R$. Finally, the gas-phase basicity GB of the studied sample is obtained from the equation, $GB = PA - T(\Delta_p S^0)$ where $T = 298.15$ K.

2.3. Computational details

Quantum chemistry calculations were carried out using the Gaussian 16 package [27]. The geometries of the studied compounds, both of the neutral molecule and its protonated ions, were optimized by using the 3-parameter Becke and Lee-Yang-Parr (B3LYP) functional [28,29], with 6-311++G(3df,2p) basis set without symmetry restrictions. The harmonic vibrational frequencies and NBO charge distributions were also calculated at the same level without scaling. The level of theory employed in the present work is expected to provide consistent results for the acid/base studies [30]. It is important to mention that for the conformational analysis, the Spartan 14 package was used as starting program, generating conformers with optimized-geometries at B3LYP/6-31G(d,p) level of theory.

The PA and GB values of methyl-uracil derivatives were calculated as the population-weighted thermal average of the thermochemical quantities of, in particular, their protonated conformers. The thermally weighted of the protonation entropies were obtained from $\Delta_p S^0 = \sum_i x_i(S^0)_i - R \sum_i x_i \ln x_i$ where x_i are the mole fractions of the various conformers. The second term is the entropic contribution of the conformers mixture.

3. Results and discussions

3.1. Experimental proton affinity PA of **1**, **2** and **3**

For 1,5-dimethyl uracil (**1**), six compounds with GB s ranging from 847.3 to 869.9 kJ mol^{-1} (see Supplementary Information) were chosen as references: 1,2,3-triazole, aniline, N-methylacetamide, pyrazole, *m*-toluidine and cyclopropylamine. The CID branching ratio of the product ions was recorded at eight collision energies E_{cm} , from 0.75 to 2.5 eV. The corresponding thermokinetic plots of the first set $\ln([\text{BH}^+]/[\text{B}_{\text{ref}(i)}\text{H}^+])$ vs $(PA_{\text{ref}(i)} - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}})$ are presented in Fig. 1 (left). $PA_{\text{ref}}^{\text{avg}}$, the average of set proton affinities of reference bases is 890.8 ± 8.4 kJ mol^{-1} . We decided to consider 8.4 kJ mol^{-1} [or 2 kcal/mol] as the accuracy of this average value, in accordance with the NIST recommendations [13]. The proton affinity PA of **1** was obtained from the second set of thermokinetic plot, which was generated from Y-intercept values obtained from the first set of the plots against the corresponding negative slopes $1/RT_{\text{eff}}$ (Fig. 1-right). The linear regression with a least-squares fit of the data points gives a straight line with a slope of $(PA - PA_{\text{ref}}^{\text{avg}})$ and an intercept of $-\Delta(\Delta S^0)/R$ (see Supplementary Information). The thermochemical derived results, shown as experimental values in Table 1 are: $PA(\mathbf{1}) = 890.0 \pm 8.4$ kJ mol^{-1} , $\Delta_p S^0(\mathbf{1}) = 109.2 \pm 8.4$ $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ and $GB(\mathbf{1}) = 857.4 \pm 9.3$ kJ mol^{-1} .

Four compounds with GB s ranging from 857.7 to 869.0 kJ mol^{-1} (N-methylacetamide, pyrazole, *m*-toluidine, cyclopropylamine) were chosen as references ($PA_{\text{ref}}^{\text{avg}} = 894.9 \pm 8.4$ kJ mol^{-1}) for the GB measurement of 5,6-dimethyl uracil (**2**). The CID branching ratio of the product ions was recorded at seven collision energies (E_{cm}), from 1.25 to 3.75 eV (See Supplementary Information) and the results were analyzed in the same way as for **1** and are depicted in Fig. 1. The derived thermochemical results, reported as experimental values in Table 1, are: $PA(\mathbf{2}) = 896.2 \pm 8.4$ kJ mol^{-1} , $\Delta_p S^0(\mathbf{2}) = 116.7 \pm 8.4$ $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ and $GB(\mathbf{2}) = 861.4 \pm 8.4$ kJ mol^{-1} .

For **3**, five compounds with GB s ranging from 820.5 to 850.6 kJ mol^{-1} (2,4-dimethyl-3-pentanone, *p*-nitroaniline, propiophenone, uracil and aniline) were chosen as references ($PA_{\text{ref}}^{\text{avg}} = 867.8 \pm 8.4$ kJ mol^{-1}). The CID branching ratio of the product ions was recorded at eight collision energies (E_{cm}), from 1.0 to 2.75 eV (See Supplementary Information). The results were analyzed in the same way as for **1** and **2** (See Fig. 1). The thermochemical values derived are: $PA(\mathbf{3}) = 856.0 \pm 8.4$ kJ mol^{-1} , $\Delta_p S^0(\mathbf{3}) = 90.2 \pm 8.4$ $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ and $GB(\mathbf{3}) = 829.1 \pm 8.4$ kJ mol^{-1} which are given in Table 1.

3.2. Structural and energetic features of neutral and protonated molecules

The most stable conformer of the various neutral uracil derivatives, both in the gas and solid phases, is the canonical 2,4-diketo tautomer [31]. The optimized geometry of the **1** and **2** tautomers show the planarity of the nitrogen containing six-membered ring (pyrimidine ring), while in **3** it is considerable puckering in the C5–C6–N1 part (See Fig. 2). The most stable protonated $\mathbf{1}_a\text{H}^+$, $\mathbf{2}_a\text{H}^+$ and $\mathbf{3}_a\text{H}^+$ conformers, correspond to dienol forms (Fig. 2) that are comparable to uracil and thymine protonated cations [32]. In all cases, the hydrogens attached to O2 and O4 atoms are oriented towards the adjacent N3 position. NBO charge distribution shown that for both neutral and protonated forms, the negative charge is concentrating particularly on atoms O2 and O4 of corresponding carbonyl groups, which are preferential sites of protonation (See Supporting Information).

The contribution to the corresponding conformational population of $\mathbf{1}_a\text{H}^+$ and $\mathbf{2}_a\text{H}^+$ is almost 91% (See Table S12 Supporting Information), while the contribution of the other less stable tautomers is rather small, as they have high energetic differences relative to the more stable ones (greater than 6 kJ mol^{-1}). In the case of $\mathbf{3H}^+$, the contribution to the total population of $\mathbf{3}_a\text{H}^+$ is almost 51%. This tautomer is only 2.8 kJ mol^{-1} more stable than $\mathbf{3}_b\text{H}^+$, which is O2–protonated keto form (See Figure S9) and its contribution to the population is almost 32%. Rotation of the hydroxyl group in $\mathbf{3}_b\text{H}^+$ around the C2–OH bond leads to the $\mathbf{3}_c\text{H}^+$ structure. It is 1.6 kJ mol^{-1} less stable than $\mathbf{3}_b\text{H}^+$ and its contribution to the total population is almost 17%. The rest of the tautomers considered are not quantitatively relevant, as they have high difference enthalpies with respect to $\mathbf{3}_a\text{H}^+$ (higher than 19 kJ mol^{-1}).

1 and its protonated form $\mathbf{1}_a\text{H}^+$ are, between 33 and 40 kJ mol^{-1} , less stable than the corresponding tautomers **2** and $\mathbf{2}_a\text{H}^+$ (See Table 2). These results confirm that, for both neutral and protonated forms, methylation at the C6-position of the heterocycle rings is enthalpically more favorable than methylation in C5- [33] or N1 positions. This property is also given for 5,6-dihydrothymine (**56dHthym**, methylated in C5-position) and its tautomer **3** (methylated at the C6-position), since both the neutral form **56dHthym** and its protonated form are almost 12 kJ mol^{-1} less stable than the corresponding **3** and $\mathbf{3}_a\text{H}^+$ (See Table 2).

It is important to mention that the PA values are related to the stability of both neutral and protonated species. Thus, in agreement

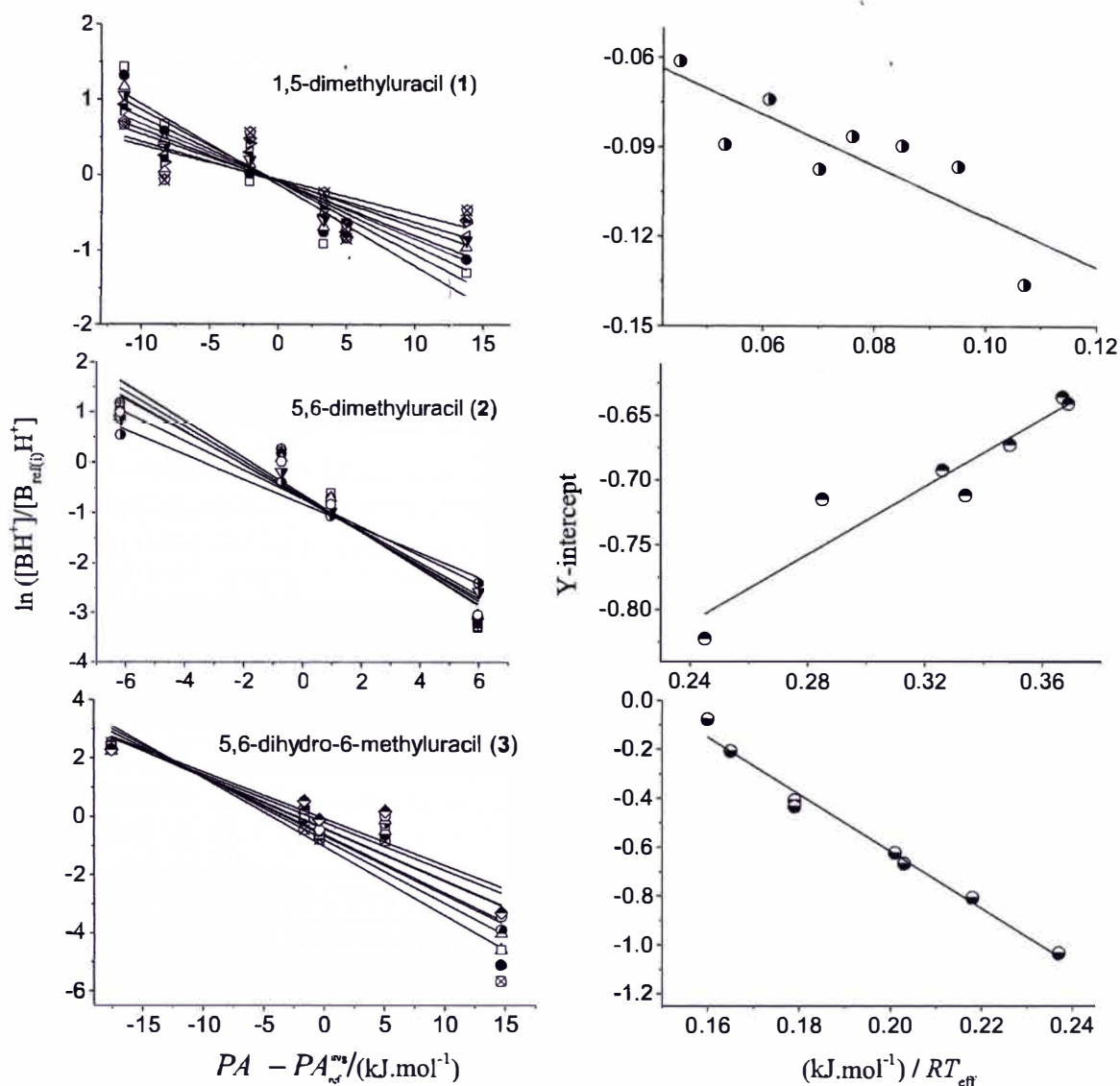


Fig. 1. First (left) and second (right) sets of thermokinetic plots using data of CID dissociation of heterodimers $[B \cdots H \cdots B_{ref(i)}]^+$, where $B = 1, 2$ and 3 ; $B_{ref(i)}$ = reference compounds.

Table 1

Experimental and theoretical values of protonation thermochemical quantities, in the Gas Phase, of methyl-uracil-derivatives.

COMPOUND	Experimental, EKM			Calculated, B3LYP/6-311++G(3df,2p).		
	GB/kj·mol ⁻¹	PA/kj·mol ⁻¹	$\Delta_p S^0 / J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$	GB/kj·mol ⁻¹	PA/kj·mol ⁻¹	$\Delta_p S^0 / J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
1,5-dimethyluracil [1]	857.4 ± 8.4	890.0 ± 8.4	109.2 ± 8.4	860.5	895.8	118.4
5,6-dimethyluracil [2]	861.4 ± 8.4	896.2 ± 8.4	116.7 ± 8.4	863.7	896.6	110.3
5,6-dihydro-6-methyluracil [3]	829.1 ± 8.4	856.0 ± 8.4	90.2 ± 8.4	832.1	861.3	97.8

with our results and also with those reported in the literature, we find that uracil methylation affects rather little the basicity or proton affinity properties of its methylated derivatives, although it is possible to establish the following order (in $kJ \cdot mol^{-1}$), $PA(uracil) = 872.7 < PA(thymine) = 880.9 < PA(6-methyl\ uracil, 6MeU) = 884.4 < PA(1) = 890.0 \pm 8.4 < PA(2) = 896.2 \pm 8.4$. This trend holds for the PA of tautomers **1**, **2** and 1,3-dimethyluracil ($PA = 894 \pm 13\ kJ\ mol^{-1}$) [36], as the following relationship holds, $PA(1) < PA(1,3\ dimethyluracil) < PA(2)$. On the other hand, methylation at the C6 or C5 position of 5,6-dihydrouracil (**56dHU**,

$PA = 851.3\ kJ\ mol^{-1}$, Table 2), practically does not affect the basicity properties of the isomers **3** or **56dHthym** ($PA = 856.6\ kJ\ mol^{-1}$, Table 2), since one can notice that $PA(56dHU) < PA(56dHthym) = PA(3)$.

These results show that methylation of uracil and 5,6-dihydrouracil (**56dHU**) has little effect on proton-affinities. Similarly, the methylation of these compounds also has little effect on acidities [37].

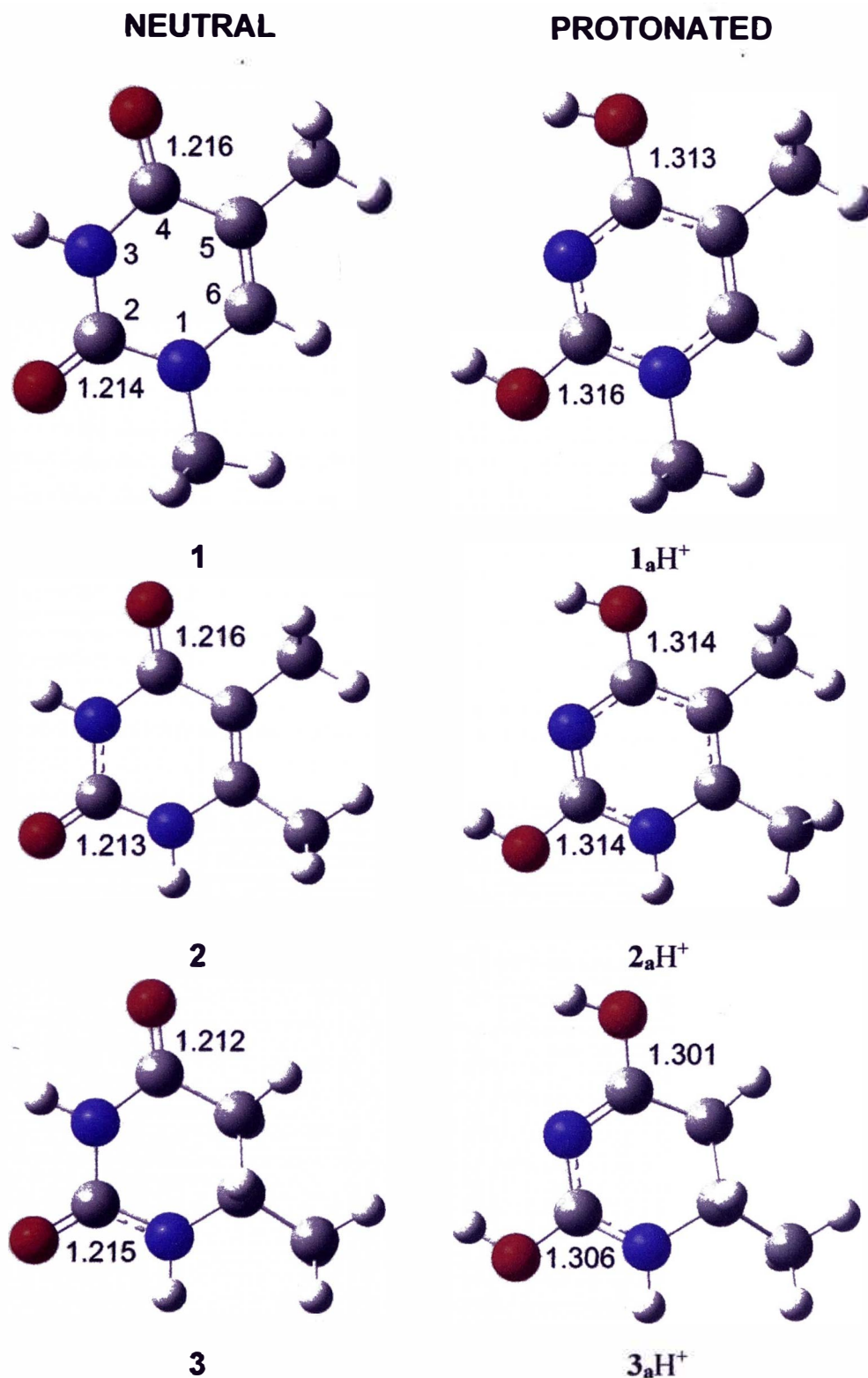


Fig. 2. Molecular geometry for the most stable neutral (left) and tautomer protonated (right) methylated-uracil derivatives, optimized at B3LYP/6-311++G(3df,2p) level of theory. Interatomic distances in Å. 1 = 1,5-dimethyl uracil, 2 = 5,6-dimethyl uracil and 3 = 6-methyl-5H-uracil.

4. Conclusions

We have carried out the experimental determination of the gas phase basicities *GB*s and proton affinities *PA*s of methylated uracil (and 5,6-dihydrouracil) derivatives by the Extended Kinetic

Method (EKM) using an ESI-TQ mass spectrometer. The *PA* (between brackets, *GB* values) of 1,5-dimethyluracil (1); 5,6-dimethyluracil (2) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (3) were determined, respectively in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 890.0 ± 8.4 (857.4 ± 8.4), 896.2 ± 8.4 (861.4 ± 8.4) and 856.0 ± 8.4 (829.1 ± 8.4). We found

Table 2Thermodynamical stability [$\Delta_f H_m^0(g)$], Proton Affinity PA and Basicity GB values of methylated uracil and 5,6 dihydrouracil derivatives. All values in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

	Uracil (U)	Thymine (Thym)	6-methyl uracil (6MeU)	1,5-dimethyl uracil, 1	5,6-dimethyl uracil, 2
$\Delta_f H_m^0(g)$ neutral	-298.1 ± 0.6^a	-337.6 ± 0.9^a	-347.5^b	-343.2^c	-376.2 ± 2.6^d
$\Delta_f H_m^0(g)$ Protonated ^c	365.4 ± 8.4^i	317.7 ± 8.4^i	304.0^g	303.1^g	263.8 ± 8.8^i
	872.7^h	880.9^h	884.4^h	890.0 ± 8.4^i	896.2 ± 8.4^i
	841.7^h	850.0^h	854.3^h	857.4 ± 8.4^i	861.4 ± 8.4^i
	5,6-dihydrouracil (56dHU)	5,6-dihydro-5-methyluracil (56dHthym)	5,6-dihydro-6-methyluracil, 3		
$\Delta_f H_m^0(g)$ neutral	-377.4^j	-396.2 ± 1.2^k	-408.3 ± 1.2^k		
$\Delta_f H_m^0(g)$ Protonated ^c	307.5^g	283.5^g	271.9 ± 8.5^i		
PA	851.3^l	856.6^m	856.0 ± 8.4^i		
GB	822.9^l	828.8^m	829.1 ± 8.4^i		

^a Taken from Ref. [34].^b Determined using isodesmic reactions: thymine \rightarrow 6MeU; 6MeU + CH₄ \rightarrow uracil + CH₃CH₃; 6MeU + CH₃CH₃ \rightarrow 2 + CH₄.^c Determined using isodesmic reaction: 1 + NH₃ \rightarrow 2 + H₂NCH₃ + CH₄.^d Taken from Ref. [35].^e Determined from eq. (1) taking into account $\Delta_f H_m^0(\text{H}^+, g) = 1536.246 \pm 0.04 \text{ kJ mol}^{-1}$.^f Purely experimental value, deduced from corresponding PA.^g Determined at B3LYP/6-311++G(3df,2p) level of theory.^h Experimental values taken from NIST DataBase [13].ⁱ This paper.^j Determined using isodesmic reactions, 56dHU + CH₃CH₃ \rightarrow 3 + CH₄; 56dHU + CH₃CH₃ \rightarrow 56dHthym + CH₄.^k Taken from Ref. [33].^l Average value from theoretical calculations at B3LYP/6-311++G(3df,2p) level and isodesmic reaction, 56dHUH⁺ + 3 \rightarrow 3H⁺ + 56dHU.^m Average value from theoretical calculations at B3LYP/6-311++G(3df,2p) level and isodesmic reaction, 56dHthymH⁺ + 3 \rightarrow 3H⁺ + 56dHthym.

very good agreement between the experimental and the calculated values, the latter at the B3LYP/6-311++G(3df,2p) level of theory.

The most stable conformers of the studied compounds correspond to the canonical 2,4-diketo tautomers, while their most stable protonated tautomers correspond to enolic structures. Our results confirm that for both neutral and protonated forms, methylation at the C6-position is enthalpically more favorable than methylation at the C5- or N1- positions of the heterocycle rings. We have found that methylation of uracil, and 5,6-dihydrouracil, affect rather little the proton-affinities of their methylated derivatives. Furthermore we can establish for uracil derivatives, the following order, $PA(\text{uracil}) < PA(\text{thymine}) < PA(6\text{-methyl uracil}) < PA(1) < PA(2)$. Methylation at C6 or C5 position of 5,6-dihydrouracil affects the proton affinity even less of the corresponding derivatives, since it is fulfilled, $PA(5,6\text{-dihydrouracil}) < PA(5,6\text{-dihydrothymine}) \approx PA(3)$.

Author statement

All data in this article is available by contacting the corresponding authors.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work is dedicated to Dra Pilar Jiménez Sierra (Thermochemistry Lab, IQFR-CSIC). The support of the Spanish AEI under Project PID2019-111677RB-I00 is gratefully acknowledged.

JRBL acknowledges the support from the Peruvian funding agencies OGI-VRI-UNI (Oficina de Gestión de Investigación-Vice-rectorado de Investigación U.N.I.) and CONCYTEC-Master scholarship grant N° 167-2015-FONDECYT-UNI.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2021.116720>.

References

- [1] M.K. Yates, K.L. Seley-Radtke, The evolution of antiviral nucleoside analogues: a review for chemists and non-chemists Part II: complex modifications to the nucleoside scaffold, *Antivir Res.* 162 (2019) 5–21.
- [2] I.D. Borri, H.-Y. Hung, K. Qian, C.-H. Chen, S.L. Morris-Natschke, K.-H. Lee, Anti-AIDS agents 88. Anti-HIV conjugates of botulin and betulinic acid with AZT prepared via click chemistry, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 1987–1989.
- [3] R.W. Holley, J. Appgar, G.A. Everett, J.T. Madison, M. Marquisee, S.H. Merrill, J.R. Penswick, A. Zamir, Structure of a ribonucleic acid, *Science* 147 (1965) 1462–1465.
- [4] L. Łapiński, M.J. Nowak, D.C. Bienko, D. Michalska, Vibrational spectra of 5,6-dihydrouracil: An experimental matrix isolation, solid state and theoretical study, *Phys Chem Chem Phys.* 4 (2002) 1123–1128.
- [5] D.J.T. Porter, J.A. Harrington, M.R. Almond, G.T. Lowen, T. Spectol, (R)-5-Fluoro-5,6-dihydrouracil: kinetics of oxidation by dihydropyrimidine dehydrogenase and hydrolysis by dihydropyrimidine aminohydrolase, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 775–779.
- [6] R.W. Buckheit Jr., T.L. Hartman, K.M. Watson, S.-G. Chung, E.-H. Cho, Comparative evaluation of the inhibitory activities of a series of pyrimidinedione congeners that inhibit human immunodeficiency virus types 1 and 2, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2007) 225–236.
- [7] M. Eltze, R. Boer, M.C. Michel, P. Hein, R. Testa, W.-R. Ulrich, N. Kolassa, K.H. Sanders, In vitro and in vivo uroselectivity of B8805-033, an antagonist with high affinity at prostatic α_{1A} vs. α_{1B} and α_{1D} adrenoceptors, *Nahrung-Schmiedeburg's Arch. Pharmacol.* 363 (2001) 649–662.
- [8] A. Golan, K.B. Bravaya, R. Kudirka, O. Kostko, S.R. Leone, A.I. Krylov, M. Ahmed, Ionization of dimethyluracil dimers leads to facile proton transfer in the absence of hydrogen bonds, *Nat Chem* 4 (2012) 323–329.
- [9] J.-Y. Salpin, V. Haldys, V. Steinmetz, E. León, M. Yáñez, M.M. Montero-Campillo, Protonation of methyluracils in the gas phase: the particular case of 3-methyluracil, *Int. J. Mass Spectrom.* 429 (2018) 47–55.
- [10] Y.-w. Nei, T.E. Akinyemi, J.D. Steill, J. Oomens, M.T. Rodgers, Infrared multiple photon dissociation action spectroscopy of protonated uracil and thioracils: effects of thio-keto-substitution on gas-phase conformation, *Int. J. Mass Spectrom.* 297 (2010) 139–151.
- [11] R.G. Cooks, T.L. Kruger, Intrinsic basicity determination using metastable ions, *J. Am Chem Soc* 99 (1977) 1279–1281.
- [12] S.A. McLuckey, D. Cameron, R.G. Cooks, Proton affinities from dissociations of proton-bound dimers, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1313–1317.
- [13] P. J. Linstrom, W. G. Mallard, eds. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69.
- [14] X. Cheng, Z. Wu, C. Fenselau, Collision energy dependence of proton-bound

- dimer dissociation: entropy effects, proton affinities, and intramolecular hydrogen-bonding in protonated peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4844–4848.
- [15] B.A. Cerda, C. Wedemiotis, Li, Na⁺, and K⁺ binding to the DNA and RNA nucleobases. Bond energies and attachment sites from the dissociation of metal ion-bound heterodimers, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11884–11892.
- [16] P.B. Armentrout, Entropy measurements and the kinetic method: a statistically meaningful approach, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 371–379.
- [17] X. Zheng, G. Cooks, Thermochemical determination by the kinetic method with direct entropy correction, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 9939–9946.
- [18] K.M. Ervin, Microcanonical analysis of the kinetic method. The meaning of the “apparent entropy”, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 435–452.
- [19] L. Drahos, K. Vekey, Entropy evaluation using the kinetic method: is it feasible? *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 1025–1042.
- [20] K.M. Ervin, P.B. Armentrout, Systematic and random errors in ion affinities and activation entropies from the extended kinetic method, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1004–1015.
- [21] L. Drahos, C. Peltz, K. Vekey, Accuracy of enthalpy and entropy determination using the kinetic method: are we approaching a consensus? *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1016–1024.
- [22] G. Bouchoux, Gas-phase basicities of polyfunctional molecules. Part 1: theory and methods, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 775–835.
- [23] K.M. Ervin, Microcanonical analysis of the kinetic method: the meaning of the “effective temperature”, *Int. J. Mass Spectrom.* 195–196 (2000) 271–284.
- [24] L. Drahos, K. Vekey, How closely related are the effective and the real temperature, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 79–84.
- [25] J. Ren, J.P. Tan, R.T. Harper, Gas-phase Acidities of cysteine-polyalanine peptides I: $a_{3,4}$ CSH and HSCA_{3,4}, *J. Phys. Chem. A* 113 (2009) 10903–10912.
- [26] S. Mukherjee, J. Ren, Gas-phase Acid-base properties of melamine and cyanuric acid, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21 (2010) 1720–1729.
- [27] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, et al., Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [28] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [29] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [30] J.Z. Dávalos, A. Guerrero, R. Herrero, P. Jimenez, A. Chana, J.L.M. Abboud, C.F.R.A.C. Lima, L.M.N.B.F. Santos, A.F. Lago, Neutral, ion gas-phase energetics and structural properties of hydroxybenzophenones, *J. Org. Chem.* 75 (2010) 2564–2571.
- [31] T. Lukmanov, S.P. Ivanov, E.M. Khamitov, S.L. Khursan, Relative stability of keto-enol tautomers in 5,6-substituted uracils: ab initio, DFT and PCM study, *Comp. Theor. Chem.* 1023 (2013) 38–45.
- [32] S.Ø. Pedersen, C.S. Byskov, F. Turecek, S.B. Nielsen, Structures of protonated thymine and uracil and their monohydrated gas-phase ions from ultraviolet action spectroscopy and theory, *J. Phys. Chem. A* 118 (2014) 4256–4265.
- [33] L.M.P.F. Amaral, P. Sztermei, M.A.V. Ribeiro da Silva, Enthalpies of formation of 5,6-dihydro-5-methyluracil and 5,6-dihydro-6-methyluracil, *J. Chem. Thermodyn.* 64 (2013) 187–192.
- [34] V.N. Emel'yanenko, S.P. Verevkin, R. Notario, Thermochemistry of uracil and thymine revisited, *J. Chem. Thermodyn.* 87 (2015) 129–135.
- [35] R. Notario, V.N. Emel'yanenko, M.V. Roux, F. Ros, S.P. Verevkin, J.S. Chickos, J.F. Liebman Thermochemistry of Uracils, Experimental and computational enthalpies of formation of 5,6-dimethyl-, 1,3,5-trimethyl-, and 1,3,5,6-tetramethyluracils, *J. Phys. Chem. A* 117 (2013) 244–251.
- [36] S. Gronert, W.Y. Feng, F. Chew, W. Wu, The gas phase acid/base properties of 1,3-dimethyluracil, 1-methyl-2-pyridone, and 1-methyl-4-pyridone: relevance to the mechanism of orotidine-5 α -monophosphate decarboxylase, *Int. J. Mass Spectrom.* 195–196 (2000) 251–258.
- [37] M.A. Kurinovich, J.K. Lee, The acidity of uracil and uracil analogs in the gas phase: four surprisingly acidic sites and biological implications, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 985–995.



XVIII Meeting of Physics Lima

August 15th - 16th, 2019, Faculty of Sciences, National University of Engineering (UNI), Lima, Perú.



Gas phase proton affinity of methylated uracil-derivatives

J.R. Barrios^{1(*)} and J.Z. Dávalos²

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima - Perú

²Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid - España

*E-mail: jbarrios1@uni.pe

1. Summary

Experimental studies on the gas phase proton affinity (PA) and Basicity (GB) of methylated uracil derivatives are reported in this work. The experimental values of PA and GB (between brackets) of 1,5-dimethyluracil (**1**) ; 5,6-dimethyluracil (**2**) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (**3**), respectively in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 890.0 ± 8.4 (857.4 ± 8.4) ; 896.2 ± 8.4 (861.4 ± 8.4) y 856.0 ± 8.4 (829.1 ± 8.4) were determined by Extended Kinetic Method (EKM) using an ESI-TQ mass spectrometry.

2. Introduction

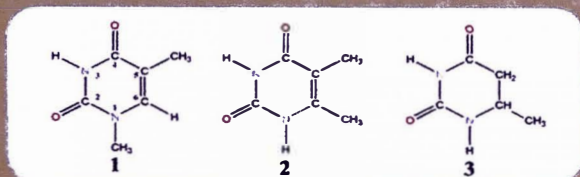
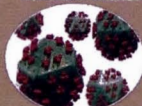
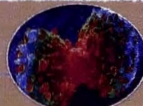


Figure 1. Structure of 1,5-dimethyl uracil (1), 5,6-dimethyl uracil (2) y 5,6-dihydro-6- methyl uracil (3).



ANTI-AIDS

ANTI-CANCER



3. Experimental Methodology

Mass Spectrometry (MS)

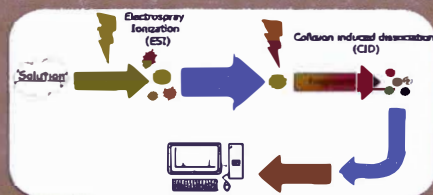


Figure 2. Mass Spectrometry - Varian / Agilent

Extended Kinetic Method (EKM):

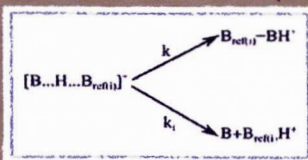


Figure 5. Scheme of the dissociation of the heterodimer $[B \cdots H \cdots B_{ref(t)}]^+$

$$\ln\left(\frac{k}{k_1}\right) = \ln\left[\frac{[BH^+]}{[B_{ref(t)}H^+]}\right] = -\frac{(PA_{ref(t)} - PA_{ref}^{avg})}{RT_{eff}} + \left[\frac{(PA - PA_{ref}^{avg})}{RT_{eff}} - \frac{\Delta(\Delta S^\ddagger)}{R}\right]$$

4. Results

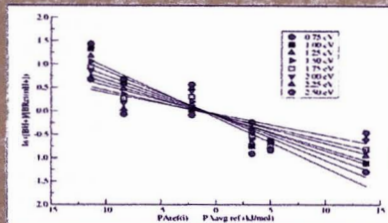


Figure 7. Plots of $\ln([BH^+]/[B_{ref(t)}H^+])$ of CID products of heterodimer $[B \cdots H \cdots B_{ref(t)}]^+$ vs collision center of mass energies E_{cm} .

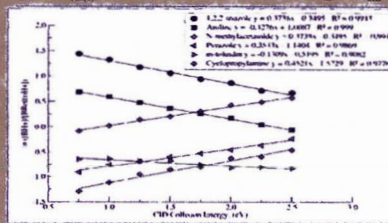


Figure 8. Plots of $\ln([BH^+]/[B_{ref(t)}H^+])$ vs $PA_{ref(t)} - PA_{avg,ref(t)}$ from dissociation of $[B \cdots H \cdots B_{ref(t)}]^+$ at eight collision energies E_{cm} .

Table 4. Experimental values of protonation thermochemical quantities, in the Gas Phase, of methyl-uracil-derivatives.

Compound	PA [kJ mol ⁻¹]	GB [kJ mol ⁻¹]	ΔS [‡] [J mol ⁻¹ K ⁻¹]
1,5-dimethyl uracil, 1	890.0 ± 8.4	857.4 ± 8.4	109.2 ± 8.4
5,6-dimethyl uracil, 2	896.2 ± 8.4	861.4 ± 8.4	116.7 ± 8.4
5,6-dihydro-6- methyl uracil, 3	856.0 ± 8.4	829.1 ± 8.4	90.2 ± 8.4

5. Conclusion

In this work, it is determined the proton affinity of three derivatives of uracil, where it obtained experimental results by Extended Kinetic Method (EKM) using ESI triple quadrupole mass spectrometry.

References

- [1]. Seley-Radtke, K., & Yates, M. (2018). The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral research*, 66-86.
- [1]. Seley-Radtke, K., & Yates, M. (2018). The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral research*, 66-86.
- [2]. Salpin, J., Guillaumont, S., Tortajada, J., MacAleese, L., Lemaire, J., & Maitre, P. (2007). Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *ChemPhysChem*, 2235-2244.
- [3]. Downard, K. (2004). *Mass spectrometry: a foundation course*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- [4]. Cooks, R., & Wong, P. (1998). Kinetic Method of Making Thermochemical Determinations: Advances and Applications. *American Chemical Society*, 379-386.



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FÍSICA CONVENIO Nro 167-CONCYTEC-UNI PROMOCIÓN 2018-2020

ENERO 22, 2020
FACULTAD DE CIENCIAS, UNI



Gas phase proton affinity of methylated uracil-derivatives

J.R. Barrios^{1(*)} and J.Z. Dávalos²

¹Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima - Perú

²Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Madrid - España

*E-mail: jbarriosl@uni.pe

SUMMARY

Theoretical and experimental studies on the gas phase proton affinity (PA) and Basicity (GB) of methylated uracil derivatives are reported in this work. The experimental values of PA and GB (between brackets) of 1,5-dimethyluracil (1); 5,6-dimethyluracil (2) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (3), respectively in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 890.0 ± 8.4 (857.4 ± 8.4); 896.2 ± 8.4 (861.4 ± 8.4) and 856.0 ± 8.4 (829.1 ± 8.4) were determined by Extended Kinetic Method (EKM) using an ESI-TQ mass spectrometry. These results are in good agreement with calculations performed at the B3LYP/6-311++G(3df,2p) level of theory, which shown that most stable protonated tautomers correspond to the enol structures.

INTRODUCTION

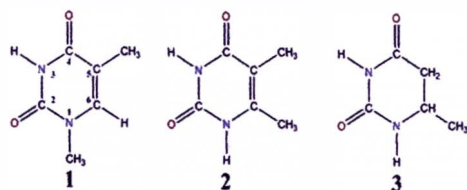
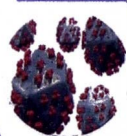
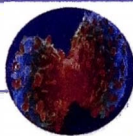


Figure 1. Structure of 1,5-dimethyl uracil (1), 5,6-dimethyl uracil (2) y 5,6-dihydro-6-methyl uracil (3).



ANTI-AIDS

ANTI-CANCER



GOAL

Theoretical and experimental studies of structural properties in the gas phase of 1,5-dimethyl uracil (1), 5,6-dimethyl uracil (2) and 5,6-dihydro-6-methyluracil (3).

RESULTS

Table 1. Experimental and computational results.

COMPOUND	Experimental, EKM		Calculated, B3LYP/6-311++G(3df,2p)			
	PA	GB	PA	GB	A ₅ ⁺	
	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	
1,5-dimethyluracil [1]	890.0 ± 8.4	890.0 ± 8.4	109.2 ± 8.4	895.8	860.5	118.4
5,6-dimethyluracil [2]	896.2 ± 8.4	896.2 ± 8.4	116.7 ± 8.4	896.6	863.7	110.3
5,6-dihydro-6-methyluracil [3]	856.0 ± 8.4	856.0 ± 8.4	90.2 ± 8.4	861.3	832.1	97.8

CONCLUSION

In this work, it has been determined the Proton Affinity of three uracil-derivatives, obtained experimentally (EKM-mass spectrometry) and supported using DFT calculations (B3LYP/6-311++G(3df,2p))

EXPERIMENTAL Mass Spectrometry (MS)

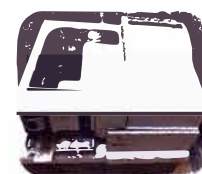
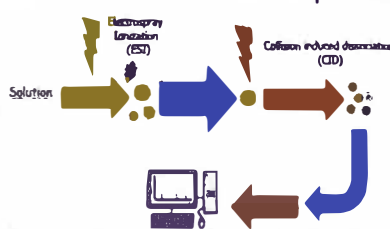


Figure 2. TOF/Mass Spectrometry - Varian / Agilent.

Extended Kinetic Method (EKM):

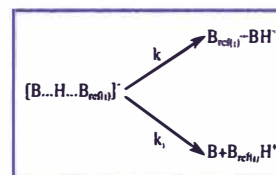


Figure 3. Scheme of the dissociation of the heterodimer $[B\cdots H\cdots B_{ref(t)}]^+$

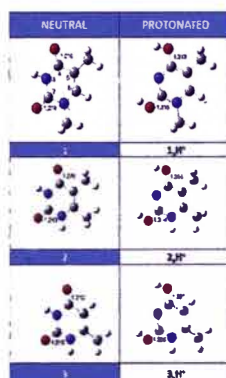


Figure 4. Geometría de los conformeros más estable de los aniones de 1,2 y 3 al nivel de teoría B3LYP/6-311++G(3df,2p).

COMPUTATIONAL

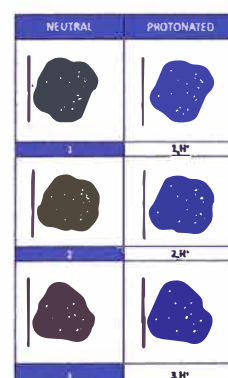


Figure 5. ESP map for the most stable neutral (left) and tautomer protonated (right) methylated-uracil derivatives.

REFERENCES

- [1]. Seley-Radtke, K., & Yates, M. (2018). The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral research*, 66-86.
- [2]. Salpin, J., Guillaumont, S., Tortajada, J., MacAleese, L., Lemaire, J., & Maitre, P. (2007). Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *ChemPhysChem*, 2235-2244.
- [3]. Downard, K. (2004). *Mass spectrometry: a foundation course*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- [4]. Cooks, R., & Wong, P. (1998). Kinetic Method of Making Thermochemical Determinations: Advances and Applications. *American Chemical Society*, 379-386.