

USO DE FENILENVINILENOS COMO MATRICES MALDI PARA PROCESOS  
DE DECAIMIENTO EN LA FUENTE DE PÉPTIDOS MODELO.

JUDITH RAQUEL RAMÍREZ GRANADOS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2015

USO DE FENILENVINILENOS COMO MATRICES MALDI PARA PROCESOS  
DE DECAIMIENTO EN LA FUENTE DE PÉPTIDOS MODELO.

JUDITH R. RAMÍREZ GRANADOS

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
QUÍMICO

DIRECTORA:

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA, Ph. D. EN QUÍMICA.

CODIRECTORA:

LAURA JULIANA CASTELLANOS GARCÍA, QCA.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2015

Maïs Jésus, sans tenir compte de ces paroles, dit au chef de la synagogue: Ne crains pas, crois seulement.

**Marc 5:36**

## AGRADECIMIENTOS

---

Gracias a Dios por hacer posible este logro, por rodearme de las personas indicadas que me brindaron su apoyo a lo largo de la carrera y que fueron un segundo hogar para mí. A mi familia, principalmente, mis padres Santos Ramírez y Bárbara Granados, quienes me motivaron a continuar. Agradezco a Dios porque me permitió compartir y disfrutar este proceso con mi compañero y mejor amigo Gerson Moreno.

Gracias al departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e innovación COLCIENCIAS por el apoyo económico brindado al proyecto “Desarrollo de una Matriz para espectrometría de masas MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), basada en sistemas tipo fenilenvinileno”.

Gracias al grupo de investigación GIFTEX, a la dirección y confianza de la profesora Yajaira Combariza y a la guía de Laura Castellanos.

## CONTENIDO

---

INTRODUCCIÓN .....	16
1.MARCO TEÓRICO .....	18
1.1.MALDI.....	18
1.1.1.Ionización primaria. ....	18
1.1.2.Ionización secundaria .....	20
1.2.ANÁLISIS ISD .....	21
1.2.1.Fragmentación de péptidos y proteínas. ....	21
1.2.2.Matrices MALDI .....	23
1.2.3.Matrices usadas para ISD.....	24
2.METODOLOGÍA .....	26
2.1.REACTIVOS .....	26
2.2.EQUIPOS .....	27
2.3.EXPERIMENTAL .....	27
2.3.1.Propiedades fisicoquímicas de los FV .....	27
2.3.2.Espectroscopía UV-Vis.....	28
2.3.3.Reflectancia difusa .....	28
2.3.4.Absortividad molar.....	28
2.3.5.Espectroscopía de fluorescencia. ....	29
2.4.ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	29
2.4.1.MALDI-ISD.....	29
2.4.2.Evaluación de FV como matrices ISD. ....	31
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
3.1.PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS .....	32
3.1.1.Solubilidad. ....	32
3.1.2.Espectroscopía UV-Vis.....	33
3.1.3.Reflectancia difusa .....	35
3.1.4.Absortividad molar.....	36

3.1.5.Espectroscopía de fluorescencia .....	39
3.2.Espectrometría de masas.....	41
3.2.1.Matrices convencionales .....	41
3.2.2.Evaluación de FV como matrices. ....	58
4.CONCLUSIONES.....	63
5.RECOMENDACIONES .....	65
REFERENCIAS .....	66
BIBLIOGRAFÍA .....	71
ANEXOS .....	76

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Esquema de fotoexcitación por <i>pooling</i> y <i>hopping</i> . Figura tomada de: Knochenmuss [15].....	19
Figura 2. Transferencia de protones mediada por clusters. Figura tomada de: Knochenmuss [15].....	20
Figura 3. Nomenclatura de los iones de péptidos y proteínas. Figura adaptada de [23]. .....	23
Figura 4. Espectros de absorción UV-Vis de FV-H, FV-Me y FV-OMe, después de A.30 min y B. 2 horas de ultrasonido. ....	34
Figura 5. Espectros de reflectancia difusa de FV-H, FV-Me y FV-OMe.....	35
Figura 6. Absorbancia a $\lambda=355$ nm de FV-H, FV-Me y FV-OMe a diferentes concentraciones, después de A. 30 min A y B. 2 horas de ultrasonido. ....	37
Figura 7. Área de fluorescencia frente absorbancia de: A. FV-Me y B. FV-OMe...	39
Figura 8. Estructura peptídica de la insulina de páncreas porcino [45].....	41
Figura 9. Espectros de masas MALDI de insulina en un rango de masas de $m/z$ 1000 a 6000 empleando como matriz: A: CHCA; B: 1,5-DAN; C: súper DHB. ....	42
Figura 10. Espectros de masas MADLI-SD de insulina, empleando como matriz CHCA. ....	43
Figura 11. Espectro de masas MALDI-SD de insulina en un rango de masas de $m/z$ 1000 a 2200 empleando como matriz CHCA. Los iones SD son asignados de acuerdo con la nomenclatura [25]. ....	44
Figura 12. Acercamiento en el rango $m/z$ 2030 a 3000 del espectro de masas MADLHSD de insulina, empleando como matriz 1,5-DAN, a 55 y 60% de atenuación de láser. ....	45
Figura 13. Acercamiento en el rango $m/z$ 1100 a 6000 del espectro de masas MALDI-SD de insulina, empleando como matriz 1,5-DAN. Asignación de las señales principales.....	47

Figura 14. Acercamiento en el rango $m/z$ 1150 a 2700 del espectro de masas MALDI-HSD de insulina, empleando como matriz 1,5-DAN. Los iones ISD son asignados de acuerdo con la nomenclatura [25].	48
Figura 15. Espectro de masas MALDI-ISD de insulina, empleando sDHB como matriz, con supresión de señales por debajo de $m/z$ 500.	49
Figura 16. Acercamiento en el rango $m/z$ 1000 a 2100 del espectro de masas MALDI-HSD de insulina, empleando como matriz sDHB. Los iones ISD son asignados de acuerdo a la nomenclatura [25].	50
Figura 17. Estructura peptídica del Citocromo C de corazón bovino [45].	51
Figura 18. Espectros de masas MALDI-ISD de citocromo C, empleando como matriz: A. 1,5-DAN y B. súper DHB, en un rango de $m/z$ 1100 a 6000.	52
Figura 19. Acercamiento en el rango $m/z$ 500 a 3000 del espectro de masas MADLHSD de Citocromo C, empleando como matriz sDHB. Los iones ISD son asignados de acuerdo a la nomenclatura [25].	53
Figura 20. Acercamiento en el rango $m/z$ 3205 a 3280 del espectro de masas MADLHSD de Cc, empleando como matriz 1.5-DAN, a 55 y 60% de potencia de láser.	54
Figura 21. Espectro MALDI-HSD de Citocromo C, usando 1.5-DAN como matriz. Asignación de aminoácidos en la secuencia.	57
Figura 22. Acercamiento en el rango $m/z$ 369 a 373 del espectro de masas MALDI-ISD de Insulina, empleando como matriz FV-H, en ACN:agua, 0.1% TFA, a 40% de potencia de láser.	58
Figura 23. Espectro de masas MALDI de insulina, empleando FV-Me como A: matriz, y su respectivo B. blanco, al 30% de potencia de láser. Acercamiento en el rango de $m/z$ 100 a 800.	59
Figura 24. . Asignación de las señales principales en el espectro de masas de FV-Me a 30 % de potencia de láser.	60
Figura 25. Espectro de masas MALDI de A. insulina, empleando FV-OMe como matriz, y B. su respectivo blanco, a 40% de potencia láser. Acercamiento en el rango de $m/z$ 100 - 900.	61

Figura 26. Incremento de las señales A.  $m/z$  149 y B.  $m/z$  403, al emplear FV-OMe como matriz e insulina como analito. .... 61

Figura 27. Espectro de masas de FV-OMe a 40 % de potencia de láser.  
Asignación de las señales principales ..... 62

## LISTA DE TABLAS

---

Tabla 1. Estructuras y masas moleculares de los fenilenvinilenos. ....	26
Tabla 2. Relaciones molares analito: matriz. ....	30
Tabla 3. Solubilidades de las moléculas FV en THF. ....	32
Tabla 4. Absortividades molares de FV-Me y FV-OMe en DMSO a $\lambda=355$ nm. ....	38
Tabla 5. Rendimientos cuánticos de fluorescencia radiativos/no radiativos de los FV. ....	40
Tabla 6. Pérdida de resolución de señales de insulina usando 1,5-DAN como matriz a 55 y 60 % de potencia de láser. ....	46
Tabla 7. Porcentaje de cobertura de la insulina empleando como matriz CHCA, 1,5-DAN y sDHB. ....	50
Tabla 8. Pérdida de resolución de señales de Citocromo C usando 1,5-DAN como matriz a 55 y 60 % de potencia de láser. ....	54
Tabla 9. Número de señales y cobertura del Cc, variando el tiempo de extracción de iones. ....	55

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

---

1,5-DAN: 1,5- Diaminonaftaleno

2,5-DHB: ácido 2,5-dihidróxibenzoico

ACN: Acetonitrilo

Cc: Citocromo C

CHCA: Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico

DHPT: [(2,3,4,5-tetrakis) (3', 4'-dihidroxifenil)-tiofeno]

DMFA: N-N Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

FV: Fenilenvinileno

FV-H: E,E-2,5-(Dimetoxi)-1,4-bis-[2-(4-carboxifenil) etenil] benceno

ISD: *In Source Decay*

MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization.*

MS: *Mass Spectrometry*

TFA: Ácido trifluoroacético

THF: Tetrahidrofurano

## RESUMEN

---

TÍTULO: USO DE FENILENVINILENOS COMO MATRICES MALDI PARA PROCESOS DE DECAIMIENTO EN LA FUENTE DE PÉPTIDOS MODELO\*

AUTOR: JUDITH RAQUEL RAMÍREZ GRANADOS\*\*

PALABRAS CLAVES: Espectrometría de Masas MALDI. Matrices MALDI, Decaimiento en la fuente (ISD).

Con el objetivo de determinar el desempeño de una serie de moléculas tipo fenilenvinileno (FV) como matrices MALDI de decaimiento en la fuente (ISD) para la ionización de péptidos modelo, se realizaron pruebas espectroscópicas y de espectrometría de masas a tres moléculas de fenilenvinileno. Las propiedades espectroscópicas de los FV se compararon con los valores registrados para matrices MALDI convencionales. Las absorptividades molares a 355 nm para estos sistemas presentaron resultados superiores a la matriz de referencia CHCA, lo que implica una mayor capacidad de interacción de las moléculas FV con el láser MALDI.

Los estudios de espectrometría de masas (EM) MALDI-ISD realizados a la insulina y al citocromo c con matrices convencionales mostraron mejores resultados para la matriz 1,5-DAN. Con esta molécula se pudo determinar una mayor cobertura en la secuenciación de los aminoácidos del péptido/proteína en comparación al sDHB y al CHCA.

La fragmentación de péptidos y proteínas por ISD transcurre a través de un proceso radicalario, en donde la matriz brinda hidrogeno radical para iniciar la fragmentación en la fuente. Los FV estudiados registran la pérdida de un radical OH en el espectro de masas. Se buscó aprovechar esta capacidad para inducir la fragmentación de péptidos y proteínas modelo. Sin embargo, la reactividad de los radicales OH es muy baja en comparación con la de los radicales H y los resultados arrojaron que no se indujo fragmentación en péptidos y proteínas usando matrices FV por ISD.

---

\*Proyecto de grado

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, PhD. Co-director: Laura Juliana Castellanos García, Química.

## ABSTRACT

---

**TITLE:** USE OF PHENYLVINYLENE AS MALDI MATRICES FOR IN SOURCE DECAY PROCESSES OF MODEL PEPTIDES

**AUTHOR:** JUDITH RAQUEL RAMÍREZ GRANADOS

**KEYWORDS:** MALDI Mass Spectrometry, MALDI matrices, MALDI, In source decay (ISD).

Spectroscopic and mass spectrometry tests were performed in three phenylenevinylene (PV) molecules in order to determine their performance as In Source Decay (ISD) MALDI matrices for the ionization of model peptides. The spectroscopic properties of PVs were compared with those reported for conventional MALDI matrices. Molar absorptivities at 355 nm are higher for PVs than CHCA reference matrix, this fact implies a higher interaction between PVs with MALDI Nd:YAG laser wavelength.

Mass spectrometry experiments MALDI-ISD with different conventional ISD matrices, showed better results using 1,5-DAN. Experiments were performed using insulin and cytochrome C. 1,5-DAN allowed to increase the amino acid sequence coverage of insulin and cytochrome C compared to sDHB and CHCA.

MALDI-ISD is performed through a radical mediated mechanism, in which the ISD matrix gives radical hydrogen to begin the In-Source fragmentation. The PVs studied showed radical OH loss in the mass spectrometry spectrum. We used this property to induced ISD peptides and proteins fragmentation, however radical OH reactivity is very low compared with the reactivity of H radicals. Results showed that no ISD fragmentation can be induced in peptides and proteins using FV matrices.

---

\*Degree Project

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de Química. Advisor: Marianny Yajaira Combariza Montañez, PhD.  
Co-Advisor: Laura Juliana Castellanos García, Chemist.

## INTRODUCCIÓN

---

*Bottom up* y *top-down* son métodos usados en la secuenciación de péptidos y proteínas por espectrometría de masas (EM). En el procedimiento *bottom up* se realiza una digestión de la muestra con proteasas específicas, seguido de un análisis por EM. En la metodología *top-down*, se induce la fragmentación de la proteína por EM con aproximaciones como decaimiento en la fuente (*-in source decay-ISD*) y se reconstruye su secuencia desde los extremos terminales N- y C- [1,2]. Aunque la aproximación *bottom up* se emplea con mayor regularidad, la metodología *top-down* ha ganado gran acogida, ya que permite una mejor caracterización de las isomorfias y modificaciones post-traduccionales de la proteína, con la ventaja adicional de disminuir la posible contaminación cruzada al reducirse la manipulación de la muestra [3,4].

ISD es una técnica usada en EM MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*), donde se promueve la fragmentación de macromoléculas como péptidos/proteínas en la fuente de ionización MALDI [2]. Este proceso se realiza bajo condiciones experimentales específicas como altas fluencias de láser y el uso de matrices “calientes”<sup>i</sup> de tal manera que la matriz pueda inducir fragmentación vía radicalaria (producción de radicales) o por dinámicas de expansión

En estas últimas se producen abundantes colisiones de analito-matriz donde se incita la transferencia exotérmica de protones desde la matriz hacia las macromoléculas. Una de las principales ventajas de ISD radica en que las rupturas en la secuencia de aminoácidos se dan casi específicamente en los enlaces N-C $\alpha$  [5], lo cual disminuye la complejidad del espectro y favorece el

---

<sup>i</sup>Matriz “caliente”: Término acuñado por *Karas* y colaboradores para denotar una matriz que es propensa a inducir un alto grado de fragmentación de proteínas [6].

análisis. Por el contrario, para técnicas como PSD (*Post Source Decay*), donde el rompimiento de enlaces no es específico, se dificulta el análisis espectral y no es posible la identificación de modificaciones post-traduccionales [7].

Actualmente, se conocen muy pocas matrices para realizar fragmentación ISD de péptidos/proteínas. Las más empleadas son moléculas ácidas y de bajo peso molecular [8,9], que causan interferencias espectrales, ya que se generan señales de aductos que solapan las señales del analito en masas bajas, entorpeciendo su análisis.

En resultados previos obtenidos dentro del proyecto “Desarrollo de una matriz para espectrometría de Masas MALDI basada en sistemas tipo fenilvinileno”, financiado por COLCIENCIAS, se demostraron las excelentes propiedades optoelectrónicas y la aplicabilidad de los fenilvinilenos (FV) como matrices MALDI en procesos de transferencia electrónica [10]. En los espectros MALDI de algunos de los FV estudiados en el proyecto se observó la pérdida de radicales OH<sup>•</sup>, que se postuló, podrían ser aprovechados para promover fragmentación ISD en péptidos/proteínas. Basados en estas observaciones, se seleccionaron tres moléculas con núcleo FV, que se investigaron como posibles matrices MALDI-ISD. El trabajo de investigación inició con el análisis de las propiedades espectroscópicas de las moléculas seleccionadas, seguido por pruebas de EM bajo condiciones ISD utilizando como analitos péptidos modelo. Los resultados obtenidos en EM para los FV fueron comparados con el desempeño de tres matrices convencionales de ISD-MALDI como el 1,5-DAN, CHCA y sDHB.

## 1. MARCO TEÓRICO

---

### 1.1. MALDI

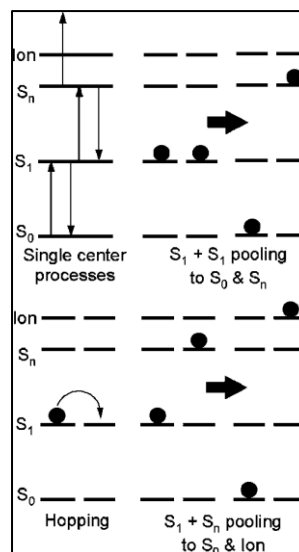
MALDI es un método de ionización que se caracteriza por el uso de una matriz orgánica, con capacidad de absorber radiación (UV o IR), para promover la desorción e ionización de moléculas no volátiles como proteínas, péptidos, polímeros y macromoléculas [11]. El método surgió como una variante “suave” de la ablación láser, porque genera una disminución en la fragmentación de los analitos en comparación con otras técnicas de ionización [12]. El proceso de desorción e ionización en MALDI inicia con la interacción de una fuente de radiación coherente (láser) con la muestra, que contiene la matriz y el analito cocrystalizados, para promover procesos de absorción, calentamiento, expansión, ablación, e ionización, entre otros.

Aunque el mecanismo de ionización MALDI no se encuentra completamente descrito, en los últimos años se han propuesto varios modelos que intentan explicarlo, estos involucran una amplia variedad de procesos fisicoquímicos. De manera general, en estos mecanismos siempre se supone un proceso de ionización primaria seguido por una ionización secundaria. Los modelos más aceptados en la actualidad son el de fotoionización y el de agregados o “clúster”.

**1.1.1. Ionización primaria.** Ehring y colaboradores propusieron en 1992 el primer modelo de ionización fotoquímica [13]; en el cual las moléculas de la matriz son fotoionizadas por la interacción directa de la matriz con el láser. Los estados excitados móviles de las moléculas se conocen como excitones. Existe la posibilidad de generar fotoexcitación en dos moléculas cercanas al primer estado excitado singulete ( $S_1$ ), si las funciones de onda de estas moléculas interactúan significativamente, este sistema acoplado ( $S_1+S_1$ ) puede redistribuir su energía de diferentes maneras [14]. Cuando una de las moléculas del sistema acoplado

retorna a su estado basal promueve la excitación de la molécula vecina a niveles energéticos mayores, este fenómeno se conoce como pooling. Es posible que la molécula que se encuentre en un estado energético superior interaccione con otra molécula en su estado excitado ( $S_1$ ), lo que conduce a la ionización de la molécula del estado energético superior. La transferencia de energía por estados excitados móviles entre moléculas es un fenómeno muy común que se conoce como hopping. De esta forma, la gran cantidad de energía acumulada en el sistema y la absorción multifotónica son responsables de la ionización de las moléculas de la matriz [15].

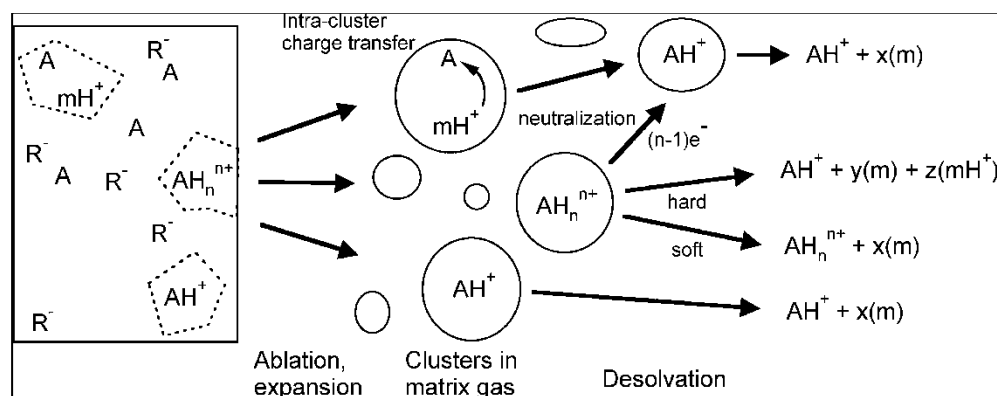
**Figura 1. Esquema de fotoexcitación por *pooling* y *hopping*. Figura tomada de: Knochenmuss [15]**



Por otra parte, la ionización por *clústeres* o agregados se basa en la evidencia de que algunos analitos como péptidos, proteínas y nucleótidos se encuentran precargados al realizarse la co-cristalización con la matriz [15, 16]. Los iones preformados son separados de sus respectivos contraiones durante los procesos de ionización secundarios que se llevan a cabo en una fase densa formada en la superficie de la muestra por la acción del láser.

**1.1.2. Ionización secundaria** La desorción en los procesos primarios de ionización genera una nube densa de agregados (pluma), en donde los iones primarios reaccionan con los analitos para formar los iones secundarios observados en el espectro de masas [17]. La pluma se expande en el espacio adiabáticamente y bajo estas condiciones se producen colisiones que pueden resultar en transferencia de protones, cationes o electrones [14], tal como se muestra en el siguiente esquema:

**Figura 2. Transferencia de protones mediada por clusters. Figura tomada de: Knochenmuss [15].**



En el proceso de expansión de los agregados desorbidos, las colisiones se hacen menos frecuentes y la expansión se detiene al alcanzar la presión de la fuente o al extraer los iones [18]. Aunque poco se sabe del porqué algunas matrices son adecuadas para el análisis de ciertas sustancias, algunas características son importantes a la hora de la selección de la matriz, a saber:

- 1) Solubilidad. La solubilidad de la matriz en una variedad de solventes permite que la elección del solvente esté enfocada en la solubilidad del analito.
- 2) Absortividad molar. Una alta absortividad molar a la longitud de onda de trabajo del láser permite una mayor absorción de energía por parte de la matriz, y favorece los procesos primarios de ionización [19].

- 3) Reactividad. La matriz en sí misma debe ser químicamente inerte con respecto al analito. Matrices, que modifican covalentemente al analito, no deben ser usadas [20].

Algunos de los factores que determinan la fragmentación de un péptido, como la insulina bovina, están directamente relacionados con las condiciones del análisis, como: la matriz usada, el tiempo de extracción de iones y la fluencia del láser [14].

## 1.2. ANÁLISIS ISD

Durante el proceso de desorción/ionización se puede producir la fragmentación del analito en la fuente, este proceso es conocido como ISD. Esta fragmentación se da rápidamente después del disparo láser y antes de la extracción de los iones. Los fragmentos obtenidos, al aplicar esta metodología, pueden proporcionar la secuencia primaria de C- y N- terminal para péptidos de tamaño moderado [1]. Este decaimiento de iones en MALDI se ha convertido en un método de rutina para obtener información de la estructura primaria de péptidos y para caracterizar proteínas [21] y está ligado a la matriz empleada.

**1.2.1. Fragmentación de péptidos y proteínas.** Actualmente se han estandarizado metodologías para el análisis de péptidos y proteínas basadas en EM que permiten elucidar o confirmar las secuencias primarias que los constituyen:

Bottom-up: es un método convencional para la fragmentación de péptidos o proteínas que posteriormente se someten a un análisis complementario [1]. Este procedimiento consta de tres pasos principales y se puede explicar de la siguiente manera:

- 1) Determinación del peso molecular con la mayor exactitud posible.

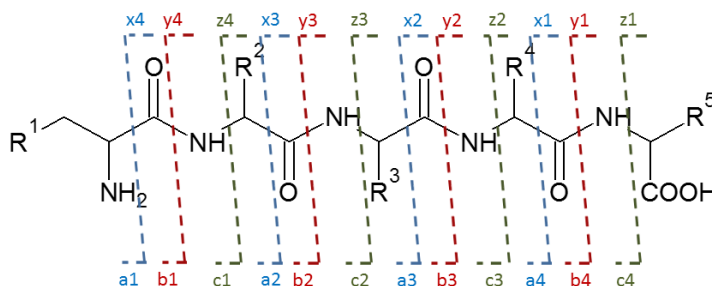
- 2) Digestión de la proteína usando proteasas específicas sobre una secuencia que se presume o se conoce.
- 3) Los péptidos obtenidos del paso anterior son fragmentados en el espectrómetro de masas. Aquí se determinan la identidad de la proteína o las posibles variaciones en la secuencia original de aminoácidos.

Esta técnica presenta diversas limitantes, entre las que se encuentran cierta dificultad para aislar el péptido N- terminal y C-terminal por posibles variaciones como modificaciones postraduccionales o rearrreglos internos debido a los codones de terminación [22].

Top-down: se utiliza para la caracterización de proteínas de manera selectiva sin involucrar pasos de digestión previa al análisis. Partiendo de la proteína intacta estándar, se generan los fragmentos N- terminal y C-terminal, que son analizados por espectrometría de masas [23]. Una de las ventajas de esta técnica es la simplificación en la preparación de muestra y la reducción de tiempo que requiere realizar la digestión de la proteína, además, la posible contaminación cruzada por manipulación se reduce sustancialmente en comparación a la metodología *bottom up*.

Takayama [24] propuso en el año 2001 el modelo de fragmentación MALDI-ISD más aceptado actualmente. Según Takayama, la fragmentación inicia con la transferencia de un hidrógeno desde la matriz excitada a los átomos del oxígeno carbonílico de la columna peptídica del analito. La adición de hidrógeno conduce a la formación de fragmentos por el rompimiento de diferentes enlaces dentro de la cadena peptídica [24]. Dependiendo del enlace que se rompe, en qué fragmento es retenida la carga y el número de aminoácidos que componen el péptido, se asigna la nomenclatura característica a los fragmentos, tal como se muestra a continuación [25]:

**Figura 3. Nomenclatura de los iones de péptidos y proteínas. Figura adaptada de [23].**



**1.2.2. Matrices MALDI** En 1985 Hillenkamp y colaboradores [26] postularon la hipótesis de que las matrices sufrían un proceso de ablación por su capacidad de absorber energía y, consecuentemente, permitían la desorción del analito de la superficie. Posteriormente, en 1988 Koichi Tanaka y colaboradores [27] lograron la ionización de moléculas con relaciones  $m/z$  superiores a 10.000 Da. Las investigaciones de Tanaka se basaron en el uso del “método del metal ultrafino más matriz líquida”, que promovía la ionización de los analitos usando polvo fino de cobalto junto a glicerina en solventes orgánicos. Ese mismo año, Hillenkamp y Karas [28] determinaron que las matrices orgánicas originalmente desarrolladas por ellos poseían la habilidad de generar iones en proteínas con altos pesos moleculares.

Gracias a este descubrimiento, MS-MALDI es en la actualidad una herramienta útil en la investigación en áreas como la bioquímica, donde se utiliza rutinariamente para el análisis de péptidos y oligonucleótidos [28], secuenciación e identificación de proteínas, análisis de lípidos y carbohidratos [5]. Adicionalmente, la técnica de generación de imágenes por EM, basada en la ionización MALDI, se aplica actualmente en el área de análisis de tejidos para el estudio de la distribución espacial y temporal tanto de pequeñas moléculas (lípidos, fármacos, hormonas, metabolitos) como de macromoléculas (proteínas, carbohidratos). Por otra parte, MALDI también se aplica en el análisis de polímeros porque facilita la

determinación de unidades monoméricas, además, es particularmente útil para estudio de oligómeros cíclicos [29].

**1.2.3. Matrices usadas para ISD.** Actualmente, se conoce una gran variedad de compuestos aplicables como matrices MALDI. Dentro de estas moléculas se encuentran: el ácido 2,5-dihydroxibenzoico (2,5-DHB) y algunos derivados como el ácido  $\alpha$ -cianohidroxicinámico (CHCA o HCCA); ácido nicotínico, ácido sinapínico (SA) y el 1,5-diaminonaftaleno (DAN). Se ha determinado, que el 2,5-DHB es una de las matrices más usadas en la técnica MALDI ISD [30]. Recientemente se ha encontrado que el 1,5-DAN posee un desempeño superior al del 2,5-DHB, ya que esta matriz permite un aumento de la cobertura de la secuencia peptídica y de la capacidad de donación de hidrógeno [21, 24]. A pesar de esto, su uso no ha sido tan generalizado como el de las matrices anteriormente mencionadas. Algunos hallazgos importantes se han encontrado con derivados del 1,5-DAN, específicamente, con el 5-amino-1-naftol en el análisis de péptidos fosforados.

La combinación de matrices es una segunda opción usada hoy en día para mejorar la calidad de los espectros además de que poseen aplicabilidad universal [31, 32]. Pocas matrices se han desarrollado para permitir la disminución de ruido de fondo en relaciones  $m/z$  bajas. Recientemente, se reportó una nueva matriz que actúa de manera selectiva con una amplia variedad de aminas de bajo peso molecular. Esta matriz conocida como DHPT [2, 3, 4, 5-teatrakis (3', 4'-dihydroxifenil)-tiofeno] presenta alta sensibilidad y eliminación del ruido de fondo para el rango bajo de  $m/z$  [33].

Por otra parte, los fenilvinileno son moléculas con alto grado de conjugación electrónica y que presentan interesantes propiedades ópticas, las cuales son corroboradas en la concordancia de los espectros de fotoluminiscencia y electroluminiscencia, es decir, no importa si la excitación de estos sistemas se hace por medio de fotones o electrones, el resultado espectral es similar [34, 35]

Los polímeros derivados de estos compuestos tienen una valiosa aplicabilidad en el desarrollo de materiales electrónicos tales como [36]:

- Diodos orgánicos emisores de luz (OLED).
- Celdas solares
- Quimiosensores

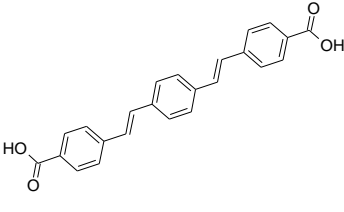
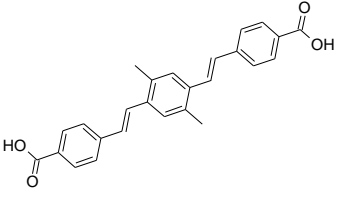
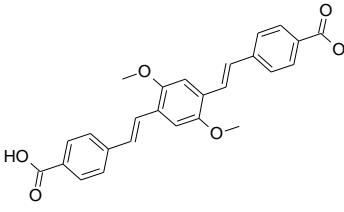
Ya que las eficiencias cuánticas no radiativas de estas estructuras son bastante altas [36] y sus cualidades ópticas presentan numerosos beneficios, estos sistemas se consideraron como posibles matrices MALDI.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 REACTIVOS

Los FV fueron sintetizados en el grupo de investigación de Macromoléculas de la Universidad Nacional dirigido por el profesor Cesar Sierra (Véase **Tabla 1**). La insulina, el citocromo C y las moléculas de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA); 1,5-diaminonaftaleno (1,5-DAN); ácido 2-hidróxi-5-metoxibenzoico y ácido 2,5-dihidroxibenzóico (2,5-DHB) se compraron a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Los solventes tetrahidrofurano (THF), dimetil sulfóxido (DMSO), acetonitrilo (ACN) y N,N-dimetilformamida (DMF); se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos fueron de grado analítico y se usaron sin ningún tipo de purificación previa.

**Tabla 1.** Estructuras y masas moleculares de los fenilenvinilenos.

<b>FV-COOH (FV-H)</b>	<b>FV-COOH-CH<sub>3</sub> (FV-Me)</b>	<b>FV-COOH-OCH<sub>3</sub> (FV-OMe)</b>
		
$C_{24}H_{18}O_4$	$C_{26}H_{22}O_4$	$C_{26}H_{22}O_6$
<b>Masa monoisotópica</b>		
370.1205	398.1518	430.1416

## **2.2. EQUIPOS**

Para determinar las propiedades ópticas de las moléculas de FV se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) de doble canal, equipado con una celda de cuarzo con 1,0 cm de camino óptico. Para la determinación del espectro de reflectancia difusa, se usó el mismo equipo con el aditamento de una esfera de integración ISR-603.

Los experimentos de rendimiento cuántico de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia, marca PTI, modelo QM 40 (Horiba Scientific, Birmingham, EU), se usó una celda de cuarzo con camino óptico de 1,0 cm.

Los experimentos EM-MALDI se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas MALDI Bruker Ultraflexreme con analizador de tiempo de vuelo (TOF), (Bruker, Billerica, Estados Unidos); equipado con un láser de estado sólido Nd:YAG de longitud de onda de 355 nm, en su tercer armónico, con pulsos de 6 ns y frecuencia de repetición de 1000 Hz. El tiempo de retardo empleado en la extracción de los iones fue de 100 ns y el voltaje de extracción corresponde a 25 kV.

## **2.3. EXPERIMENTAL**

### **2.3.1. Propiedades fisicoquímicas de los FV**

**2.3.1.1 Solubilidad.** Se pesó alrededor de 1mg de cada uno de los FV y, posteriormente se adicionaron volúmenes específicos de THF de forma secuencial. En cada adición de solvente se sometió cada muestra a 30 min de ultrasonido en un baño Branson 2510 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Estados Unidos) (130W, 40kHz); este procedimiento se repitió hasta obtener una solución. La solubilidad se determinó por duplicado. Este solvente se empleó como una alternativa a las soluciones de ACN/agua usadas regularmente en la preparación de matrices MALDI.

**2.3.2. Espectroscopía UV-Vis.** Para determinar el espectro UV-Vis, se prepararon soluciones 15  $\mu\text{M}$  de cada uno de los FV en DMSO. Las soluciones se depositaron en una celda de cuarzo con camino óptico de 1,0 cm y se usó DMSO como blanco en la celda de referencia. Se realizó un barrido espectral de longitud de onda desde  $\lambda=200$  hasta  $\lambda=700$  nm. Para obtener el valor de  $\lambda_{\text{máx}}$  se determinó la primera derivada de los espectros. Este procedimiento se realizó por duplicado.

**2.3.3. Reflectancia difusa.** La toma de espectros de reflectancia difusa se realizó con el objetivo de establecer la longitud de onda máxima de absorción de los FV en estado sólido. La determinación de  $\lambda_{\text{máx}}$  en fase sólida representa una mayor aproximación a las condiciones empleadas en MALDI.

Para determinar la longitud de onda de máxima absorción se pesó alrededor de 1mg de cada uno de los fenilvinileno, que se maceraron con 400 mg de sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ) durante 5 min. El polvo obtenido se depositó de manera uniforme y compacta sobre el porta muestras, se realizó un barrido espectral desde  $\lambda=200$  hasta  $\lambda=700$  nm con un *slit* de 1.0 nm, utilizando  $\text{BaSO}_4$  como referencia.

**2.3.4. Absortividad molar.** Para calcular la absortividad molar de cada uno de los FV, se prepararon soluciones equimolares de los FV con concentraciones desde 2 hasta 20  $\mu\text{M}$  en DMSO. Se empleó DMSO como blanco en la celda de referencia. Se usó un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401C de doble canal a una longitud de onda de 355 nm y celdas de cuarzo con camino óptico de 1,0 cm. Este procedimiento se realizó por duplicado. Los coeficientes de absortividad molar para cada molécula se hallaron usando la ecuación de Beer-Lambert para diluciones. Los valores obtenidos a esta longitud de onda se linealizaron para establecer las respectivas pendientes, con lo que se determinó la absortividad molar.

**2.3.5. Espectroscopía de fluorescencia.** Para determinar el rendimiento cuántico radiativo de las matrices propuestas, se dispusieron soluciones con concentraciones equimolares desde 2 hasta 20  $\mu\text{M}$  en DMF. Como sustancias de referencia se usaron soluciones de antraceno en etanol y soluciones de sulfato de quinina en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M (agua desionizada Tipo I).

Se determinó la absorbancia de cada solución a  $\lambda=355$  nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401C de doble canal, usando como referencia el respectivo solvente. Se empleó una celda de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico.

La emisión de fluorescencia se determinó en un espectrofotómetro de fluorescencia, marca PTI, modelo QM 40, que se ajustó a una longitud de onda de excitación de 355 nm y se monitoreó la emisión de fluorescencia en el rango de  $\lambda=360$  a  $\lambda=700$  nm. Se empleó una celda de cuarzo con camino óptico de 1,0 cm. Por medio de la relación de emisión radiativa y no radiativa, se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia [37].

## **2.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**2.4.1. MALDI-MSD, matrices convencionales.** Para determinar la capacidad de los FV como matrices MALDI, se decidió comparar el comportamiento de estas moléculas, con el comportamiento de las matrices MALDI convencionales. Para esto, se dispusieron 3 matrices convencionales: CHCA, 1,5-DAN y súper DHB, y se usaron las metodologías previamente establecidas para MSD [21, 38, 39].

El CHCA y el 1,5-DAN; se prepararon a saturación en solución de ACN/agua 1/1, 0.1% TFA; esta solución se agitó por 5 min a 1500 rpm. Posteriormente y con el objetivo de precipitar los cristales de la matriz no disueltos, el 1,5-DAN se centrifugó durante 20 s. Debido a la inestabilidad en solución de esta matriz, se preparó poco antes de usarse (aprox. 30 min).

Para la preparación del súper DHB, se pesaron 1mg de 2,5-DHB y 1 mg de ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico. Se disolvieron por separado en solución ACN/agua 1/1, 0.1% TFA, y se agitaron durante 5 min a 1500 rpm. Posteriormente, se mezclaron en una relación 9:1, respectivamente.

Como analitos se usó insulina y Citocromo C. Se prepararon inicialmente soluciones *stock* de 1000 ppm de estos analitos y, posteriormente, se disolvieron con agua grado HPLC, hasta tener concentraciones de  $1 \times 10^{-2}$  y  $2 \times 10^{-2}$  mM, respectivamente.

El citocromo C (Cc), al igual que la Insulina, se mezclaron en relaciones volumétricas iguales con cada una de las matrices convencionales nombradas anteriormente, lo cual corresponde a las relaciones molares que se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Relaciones molares analito: matriz.

<b>Matriz</b>	<b>Insulina:Matriz</b>	<b>Cc:Matriz</b>
1,5 DAN	1:12600	1:6300
CHCA	1:10600	1:5300
SDHB	1:11700	1:5800

Para el análisis MALDI, se dispusieron entre 0.5 y 1  $\mu$ L por *spot*. El *target* se dejó secar en la cabina de extracción.

Aunque no se hizo una medición exacta del umbral de aparición de iones de las matrices de referencia CHCA, sDHB y 1,5-DAN, la energía de láser a la que se sometió cada matriz se determinó observando de forma cualitativa la aparición de señales del analito respecto al blanco. Para cada matriz, el láser se utilizó bajo las siguientes condiciones de atenuación:

- CHCA: 45%
- 1,5-DAN: 55 y 60%
- Súper DHB: 60%

**2.4.2. Evaluación de FV como matrices ISD.** Las matrices: FV-COOH (FV-H), FV-COOH-CH<sub>3</sub> (FV-Me) y FV-COOH-OCH<sub>3</sub> (FV-OMe) se disolvieron hasta alcanzar una concentración de 10 mM, con los solventes:

- Acetonitrilo (ACN)/ agua (2:1, v/v, 0.01% TFA)
- THF (0.01% TFA)

Se preparó una solución *stock* de insulina a 1000 ppm (0.17 mM), y se mezcló con cada uno de los FV en relaciones molares analito-matriz: 1:600, 1:6000, 1:60000 y 1:600000. Estas soluciones se sometieron a 15 min de ultrasonido en un baño Brason 2510 (40 kHz, 130 W); posteriormente, se depositaron entre 0,5 y 1  $\mu$ L por *spot* de la mezcla en el *target* y se dejó secar en la cabina de extracción.

El MALDI se operó en modo de reflectrón positivo, en un rango de masas de  $m/z$  100 a 6500. Con cada una de las matrices, se probaron diferentes atenuaciones de láser y se determinaron finalmente dos, con las que se obtuvieron las señales más abundantes. El tratamiento de los espectros, se realizó con el programa FlexAnalysis de Bruker; teniendo en cuenta que el principal parámetro para asignación de picos fue una relación S/N  $\geq 6$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

---

#### 3.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

3.1.1. **Solubilidad.** En la Tabla 3 se reportan las solubilidades promedio para cada molécula.

**Tabla 3.** Solubilidades de las moléculas FV en THF.

Molécula	Peso [mg]	Volumen total adicionado [ml]	Concentración [mM]	Concentración promedio [mM]
FV-H	1,20	250	0,013	< 10 $\mu$ M
FV-Me	1,10	1,25	2,01	1,93
	1,25	1,365	1,86	
FV-OMe	1,10	0,305	8,38	7,80
	1,14	0,325	7,22	

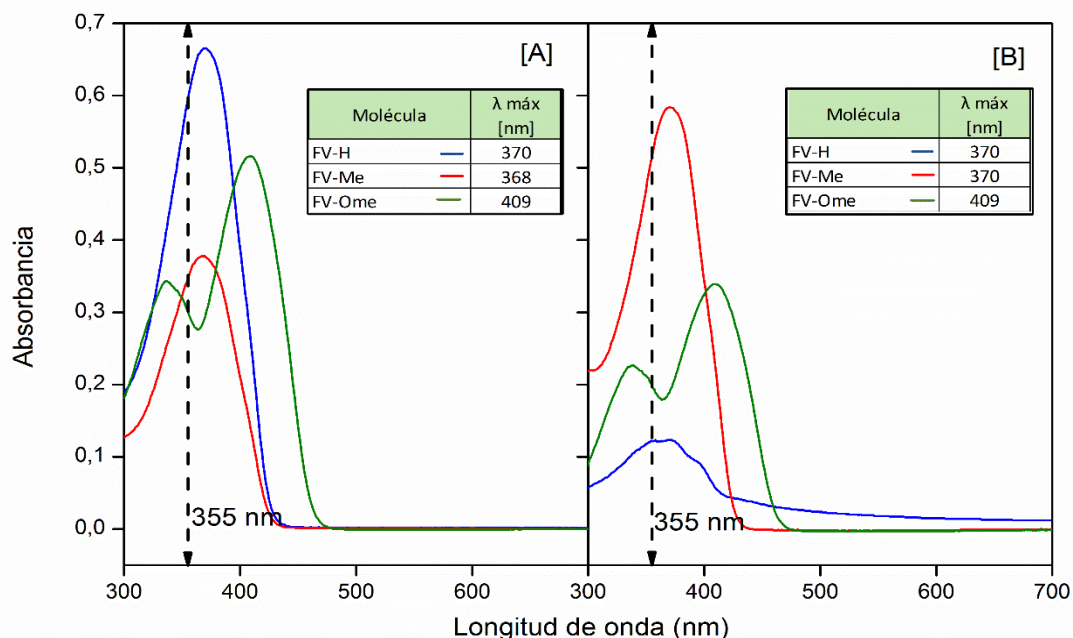
La molécula FV-H presentó poca solubilidad en THF comparada el FV-OMe, debido a que se observó menor cantidad de sobrenadante. La baja polaridad de la molécula FV-H restringe la interacción con el solvente, que es moderadamente polar, por el contrario, los sustituyentes metoxilo incrementan la interacción con el solvente principalmente por la presencia de los átomos de oxígeno. Es importante resaltar que la baja solubilidad del FV-H, es una limitante en la preparación de muestras para EM-MALDI, dado que las matrices deben solubilizarse perfectamente para posteriormente ser mezcladas con el analito en solución. Si las moléculas de la matriz no se solubilizan, esto implica que existirán cristales preformados de la matriz en solución y no permitirán la co-cristalización de las

moléculas de la matriz con las moléculas del analito. Se ha demostrado la importancia de la formación de cristales de analito-matriz ya que estos favorecen la formación de puentes de hidrógeno y facilitan la reacción de transferencia de hidrógenos de la matriz al analito [38, 39]. Los sustituyentes metilo y metoxilo permiten aumentar la estabilidad en THF del sistema conjugado pues confieren a la molécula cierta polaridad e inducen interacciones polares con el solvente. La molécula FV-OMe, presenta la mayor solubilidad en THF, lo que probablemente favorecería la co-cristalización de analito con esta matriz.

**3.1.2. Espectroscopía UV-Vis.** En los primeros experimentos UV-Vis, las muestras se sometieron a 30 min de ultrasonido, transcurrido este tiempo aún se observaban algunos cristales de los FV en la mezcla, es decir, no hubo una total dilución de las tres moléculas, lo cual se apreció especialmente con el FV-H. Como no se obtuvo una dilución completa de las muestras, no se pudo asegurar la concentración de las mismas a estas condiciones iniciales.

Los espectros de absorción UV-Vis usando 30 min de ultrasonido, se muestran en la **Figura 4**. Para determinar el  $\lambda_{\text{máx}}$ , se calculó la primera derivada del espectro. Se observó, que los valores determinados se aproximan a la longitud de onda empleada en MALDI ( $\lambda=355$  nm), los FV estudiados, FV-H, FV-Me y FV-OMe, presentaron corrimientos de: 15, 13 y 54 nm, respectivamente, en referencia a la longitud de onda de  $\lambda=355$  nm.

Figura 4. Espectros de absorción UV-Vis de FV-H, FV-Me y FV-OMe, después de A.30 min y B. 2 horas de ultrasonido.



Durante la segunda serie de experimentos las soluciones se sometieron a 2 horas de ultrasonido para asegurar la completa disolución de cada uno de los FV. Sin embargo, los espectros de esta segunda serie muestran que el espectro del FV-H cambia considerablemente (**Figura 4B**), lo que indica un cambio de concentración al asistir la preparación con ultrasonido durante 2 horas.

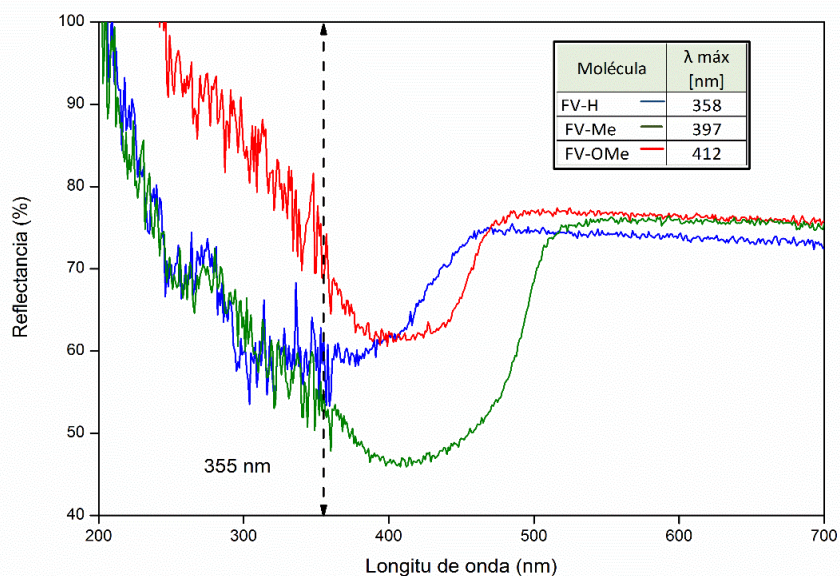
Las tres moléculas presentan una banda ancha de absorción que corresponde a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Como el sistema es altamente conjugado, la densidad electrónica provoca un ensanchamiento de las bandas de los espectros de absorción por la superposición de los niveles de energía vibracionales modificados por el solvente y las transiciones electrónicas básicas [40]. Adicionalmente, en el espectro del FV-OMe se observa una banda de menor intensidad que corresponde a las transiciones electrónicas  $n \rightarrow \sigma^*$  [41].

El mayor corrimiento batocrómico de la serie de FV se puede observar para el FV-OMe. Se ha reportado que un aumento en la planaridad de los sistemas FV

conduce a corrimientos batocrómicos, ya que la conjugación de las nubes electrónicas en moléculas planares es máxima y se requiere mucha menor energía para realizar transiciones electrónicas en estos sistemas planares [41]. Los FV con grupos metoxilo centrales han reportado ser altamente planares, ya que pueden formar enlaces intramoleculares de hidrógeno, por lo tanto la molécula de FV-OMe, presenta el corrimiento batocrómico más drástico de la serie.

**3.1.3. Reflectancia difusa.** En la Figura 5 se presentan los espectros de reflectancia difusa para la serie de FV, se observa que los tres compuestos estudiados exhiben un decaimiento de reflectancia desde una longitud de onda de 277 hasta 520 nm, esto se traduce en una alta absorbancia en este rango, donde se tendría una cobertura a la longitud de onda empleada en MALDI. Los máximos de absorción en fase sólida de los FV presentan corrimientos hacia el rojo de: 3, 42 y 57 nm para el FV-H, FV-Me y FV-OMe, respectivamente, en referencia a la longitud de onda de 355 nm.

**Figura 5. Espectros de reflectancia difusa de FV-H, FV-Me y FV-OMe.**

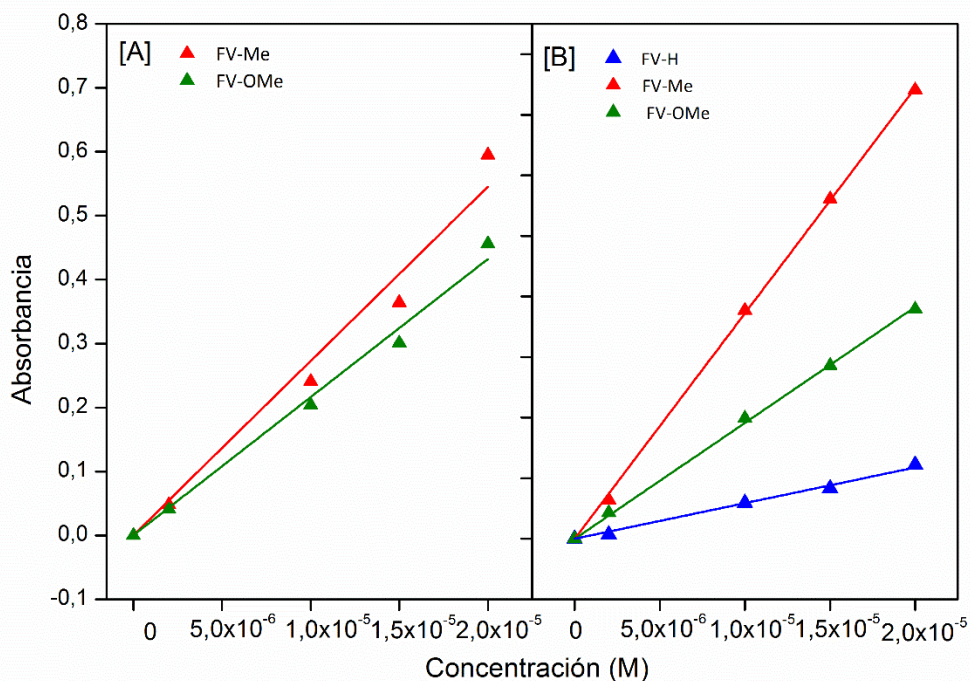


Debido a que las moléculas tienen mayor restricción de movimiento en estado sólido, los niveles de energía vibracionales se superponen con las transiciones electrónicas fundamentales, lo cual se traduce en un ensanchamiento de las bandas de absorción en comparación con el de absorción UV-Vis.

Al comparar los espectros de reflectancia difusa (estado sólido) con los obtenidos para absorción UV-Vis (solución), se observan en estos últimos desplazamientos de los  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción; este corrimiento puede ser explicado por el medio en el que se encuentra la molécula, ya que un aumento en la polaridad del solvente de manera general, produce un desplazamiento hipsocrómico (azul) de las transiciones electrónicas  $n \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \sigma^*$ , como es el caso de las moléculas con sustituyentes metilo y metoxilo; mientras que para las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  se produce un desplazamiento batocrómico (rojo), como se observó para el FV-H. Con las mediciones de absorbancia en fase líquida y sólida, se puede observar que los sistemas FV exhiben una fuerte interacción con fotones de  $\lambda = 355 \text{ nm}$  [35].

**3.1.4. Absortividad molar.** La primera metodología de preparación de soluciones consistió en someter las diluciones a 30 min de ultrasonido; con estas soluciones se construyeron las curvas de absortividad molar graficadas en la Figura 6A Durante la segunda metodología de preparación, las diluciones se introdujeron al ultrasonido por un tiempo de 2 horas, para asegurar su completa disolución. Los valores de absorbancia adquiridos para cada concentración se linealizaron, como se muestra en la Figura 6B.

**Figura 6. Absorbancia a  $\lambda=355$  nm de FV-H, FV-Me y FV-OMe a diferentes concentraciones, después de A. 30 min A y B. 2 horas de ultrasonido.**



La **Tabla 4** muestra los coeficientes de absorptividad molar obtenidos después de aplicar la ecuación de Lambert-Beer a  $\lambda=355$  nm para las dos metodologías. Los datos obtenidos para la segunda preparación presentan un valor  $R^2$  más cercano a 1 y corresponden a tiempos que aseguran completa disolución de la muestra. Sin embargo, la determinación del valor del absorptividad molar del FV-H representa un desafío. Cuando las moléculas de FV-H se someten a 30 min de ultrasonido, no se presenta dilución considerable de la muestra, y si se aumentan los tiempos en el ultrasonido a 2 horas, se observa una mejor disolución, pero a su vez, debido a la energía del ultrasonido se aprecia degradación de la molécula de FV-H, tal como se observa en la **Figura 4B**. Es por esta razón que no es posible tener certeza del valor de absorptividad molar determinado para el FV-H.

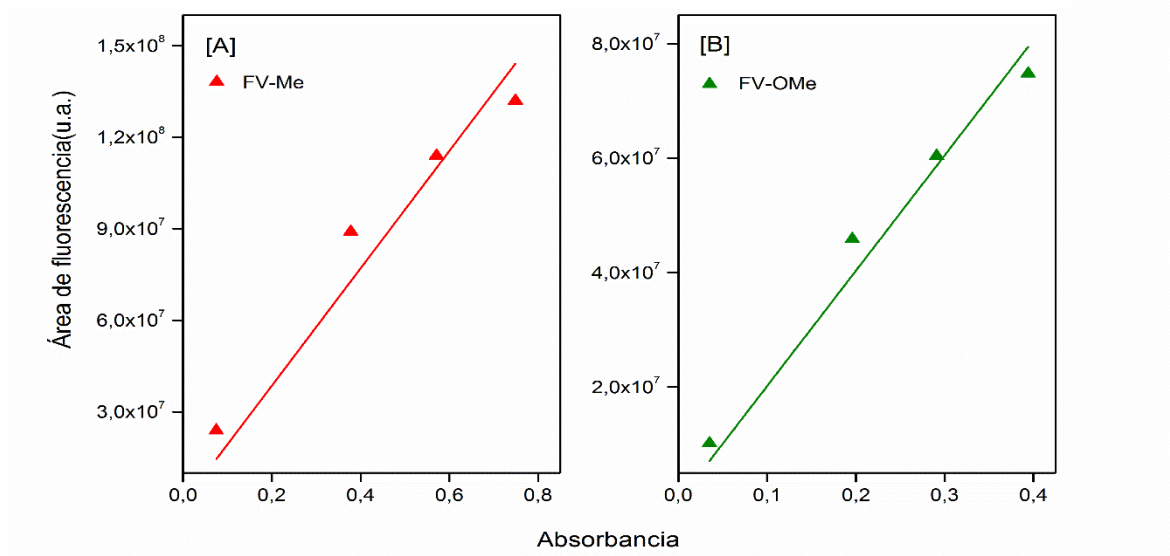
**Tabla 4.** Absortividades molares de FV-Me y FV-OMe en DMSO a  $\lambda=355$  nm.

Molécula	Corrida N°	$\epsilon_{355}$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	R <sup>2</sup>
<b>FV-H</b>	<b>2</b>	5.883	0,9966
FV-Me	<b>1</b>	27.251	0,9873
	<b>2</b>	37.219	0,9998
<b>FV-OMe</b>	<b>1</b>	21.614	0,9954
	<b>2</b>	19.130	0,9995

El valor  $\epsilon_{355}$  registrado para la matriz CHCA es de 15849 ( $M^{-1} cm^{-1}$ ) [10]. En comparación con la matriz de referencia, los valores de absortividad molar presentaron un incremento de 135% para el FV-Me y de 21% para el FV-OMe, al someter las muestras a 2 horas de ultrasonido. Las altas absortividades molares que exhibieron los FV indican que la energía suministrada por los fotones del láser puede ser eficientemente absorbida principalmente por estos sistemas conjugados, favoreciendo la formación de iones primarios y agregados en el proceso MALDI. Sin embargo, los valores de absortividad molar no están necesariamente ligados con la eficiencia de producción de iones de analito en EM-MALDI, ya que estos dependen de los procesos termodinámicos que ocurren en las reacciones secundarias de ionización. Por ejemplo, a una longitud de onda de 377 nm, el 2,6-DHB, tiene una absortividad molar de 700  $M^{-1}cm^{-1}$  y el 2,5-DHB, exhibe una absortividad molar de 4250  $M^{-1}cm^{-1}$ ; aunque la absortividad molar del 2,6-DHB es mucho menor que la del 2,5-DHB, ambas matrices presentan espectros de masas similares con una eficiencia de producción de iones idéntica en el espectro de masas final [42].

3.1.5. **Espectroscopía de fluorescencia.** En la Figura 7 se muestra la relación que se obtuvo entre el área fluorescente de emisión  $Y$  la absorbancia para los FV. Este tratamiento también se realizó para las sustancias de referencia (Anexo A).

Figura 7. Área de fluorescencia frente absorbancia de: A. FV-Me y B. FV-OMe.



Una vez linealizada y determinada la pendiente para cada sustancia, se aplicó la siguiente ecuación [37]:

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left( \frac{m_x}{m_{ST}} \right) \left( \frac{n_x^2}{n_{ST}^2} \right)$$

Donde  $\Phi$  indica el rendimiento cuántico de fluorescencia,  $m$  indica la pendiente y  $n$  el índice de refracción, Los subíndices  $x$  y  $ST$  hacen referencia a la muestra y a la sustancia estándar, respectivamente.

Inicialmente, se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia para el antraceno, con respecto al sulfato de quinina, y se repitió el procedimiento para el sulfato de quinina, con respecto al antraceno. En ambos casos se obtuvo un error menor de 5% a los valores reportados en la literatura [43] (Anexo B). Una vez

determinados estos rendimientos cuánticos de fluorescencia, se tomaron como referencia para calcular los valores de los FV, los cuales se reportan en la **Tabla 5**

**Tabla 5.** Rendimientos cuánticos de fluorescencia radiativos/no radiativos de los FV.

Muestra	$\phi$ Radiativo			$\phi$ No Radiativo
	Antraceno	S. quinina	Promedio	
FV-Me	0,38	0,39	0,39	0,61
FV-OMe	0,40	0,41	0,40	0,60

Gran parte de la energía absorbida por la matriz es disipada mediante procesos de relajación térmica que incrementan la temperatura del sistema [43], este factor es importante para inducir la desorción térmica de agregados de la matriz y favorecer los procesos de ionización primaria.

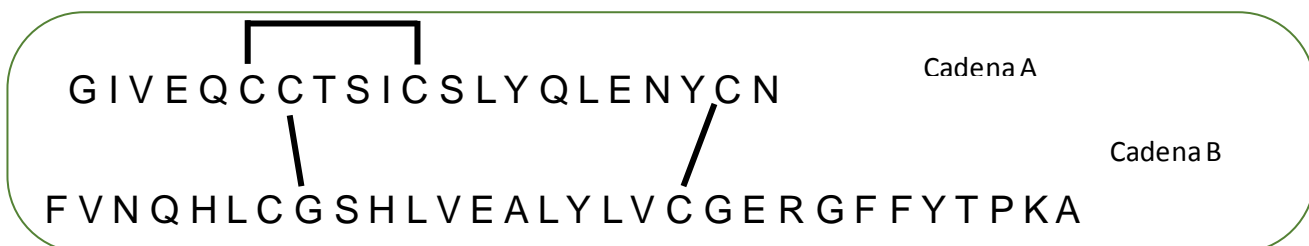
Se han reportado un rendimiento cuántico radiativo de ( $\Phi_R$ ) de 0,082 ( $\Phi_{NR} = 0.918$ ) y altas velocidades de decaimiento no radiativo ( $\Phi_{NR}$ ) para películas de CHCA [43]; al parecer, el alto rendimiento cuántico no radiativo es uno de los factores que influyen la baja potencia de láser requerida para inducir la desorción de iones en esta molécula. Para el 1,5-DAN se reporta un rendimiento cuántico radiativo de 0,55 ( $\Phi_{NR} = 0.45$ ), es decir un  $\Phi_{NR}$  mucho menor que el reportado para el CHCA, por lo tanto se requiere una mayor energía del láser para inducir procesos de desorción con esta matriz [44]. Para el FV-Me y el FV-OMe se determinó una disminución de 30 y 27%, respectivamente, en el rendimiento cuántico no radiativo en comparación con el valor registrado para el 1,5-DAN; por lo que se sugiere que se requiere menor energía del láser para la desorción de moléculas de FV.

## 3.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

### 3.2.1. Matrices convencionales

3.2.1.1. Análisis de la insulina. La insulina (**Figura 8**), consta de dos cadenas peptídicas unidas mediante dos puentes disulfuro intercatenarios y un enlace disulfuro intracatenario. La fragmentación *in silico*<sup>ii</sup> de este péptido se realizó con las cadenas A y B separadas y con la secuencia de aminoácidos completa.

Figura 8. Estructura peptídica de la insulina de páncreas porcino [45]



Se utilizó la base de datos del *Institute for System Biology: Proteomic tools* [46], para obtener la secuencia de fragmentos iónicos monoisotópicos teóricos para la cadena completa de la insulina (Anexo C). La asignación de señales se realizó teniendo en cuenta los iones  $a/x^-$ ,  $b/y^-$  y  $c/z^-$  que se pueden producir por la fragmentación del analito; en el análisis no se reportan iones  $w^-$ , correspondientes a las cadenas laterales de la secuencia de aminoácidos, por ser poco comunes en fragmentación ISD [47].

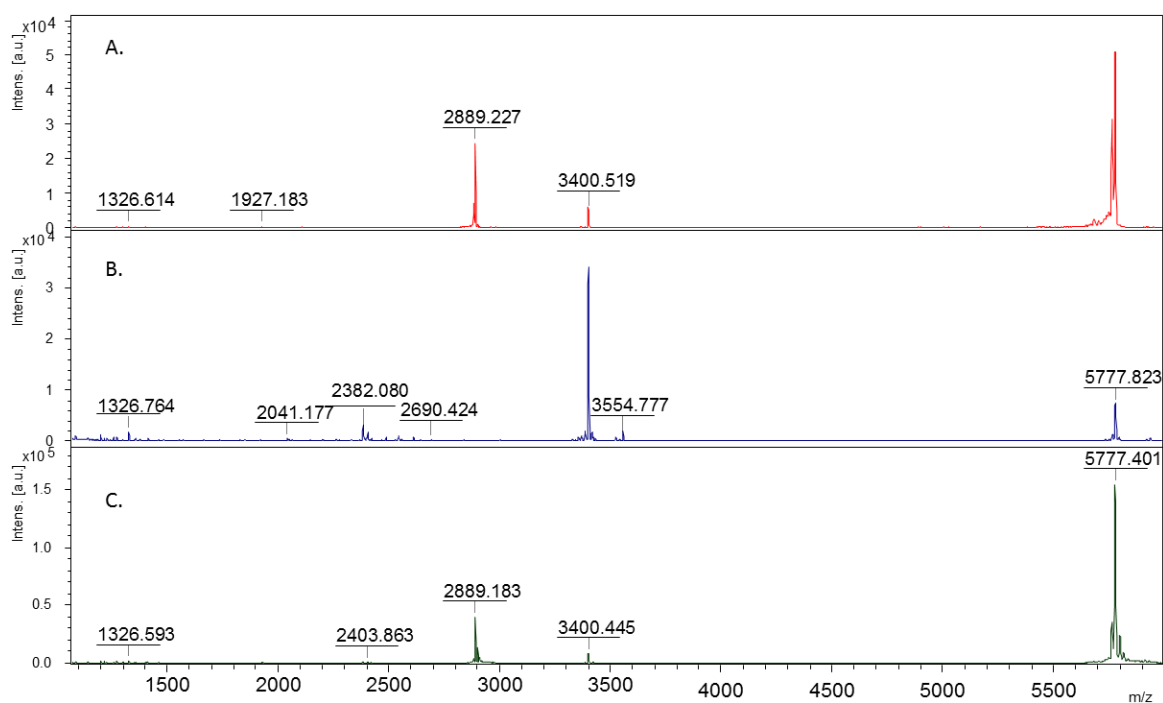
Con las tres matrices convencionales seleccionadas para realizar ISD, se determinaron las señales correspondientes al analito en los espectros de masas por comparación con los respectivos blancos empleando las atenuaciones de láser indicadas. En el espectro de masas se observaron señales con abundancias

<sup>ii</sup> The System Biology: Fragment Ion Calculator. Disponible en:  
<http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>

significativas por encima de  $m/z$  1000, las señales observadas por debajo de este valor, en su mayoría, corresponden a aductos formados por la matriz que entorpecen la determinación de señales de analito; por esta razón, no se tuvieron en cuenta durante el análisis.

En la **Figura 9** se muestran los espectros de masa de la insulina obtenidos al usar las matrices: CHCA [A]; 1,5-DAN [B]; y súper DHB [C] en experimentos ISD.

**Figura 9. Espectros de masas MALDI de insulina en un rango de masas de  $m/z$  1000 a 6000 empleando como matriz: A: CHCA; B: 1,5-DAN; C: súper DHB.**

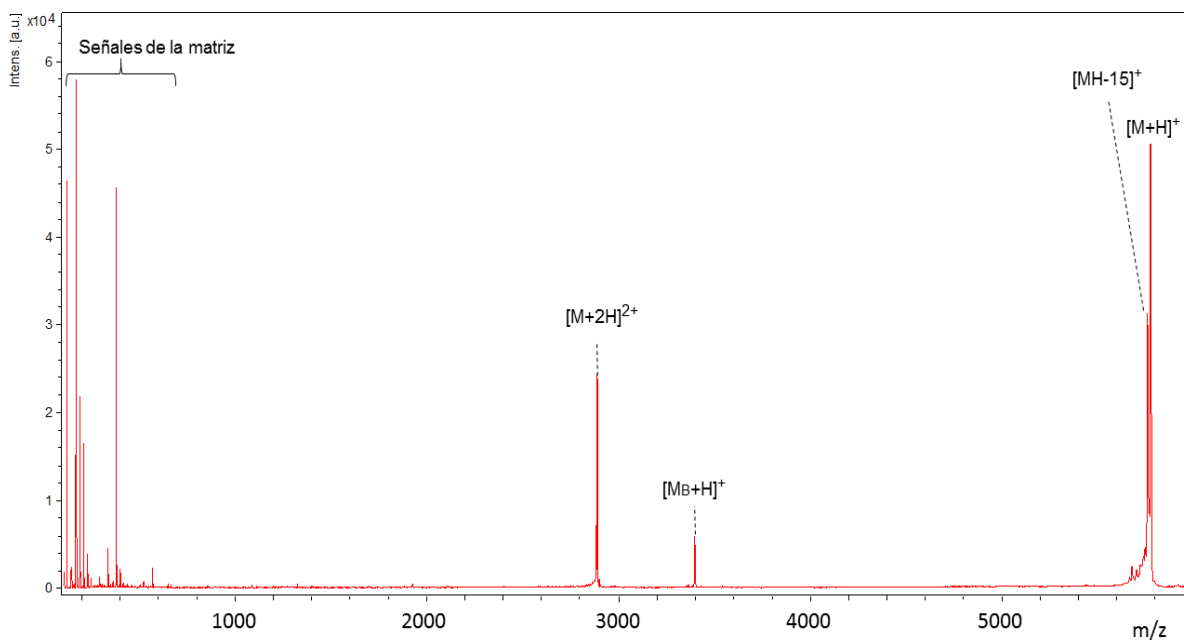


Cada espectro se describe a continuación teniendo en cuenta que los subíndices A y B, hacen referencia a las respectivas cadenas de la insulina, el símbolo asterisco indica fragmentos no identificados.

En la **Figura 10** se muestra la asignación de las principales señales observadas en el espectro MALDI de la insulina empleando CHCA como matriz, correspondientes a la molécula protonada  $[M+H]^+$  en  $m/z$  5777, a la pérdida de, 15

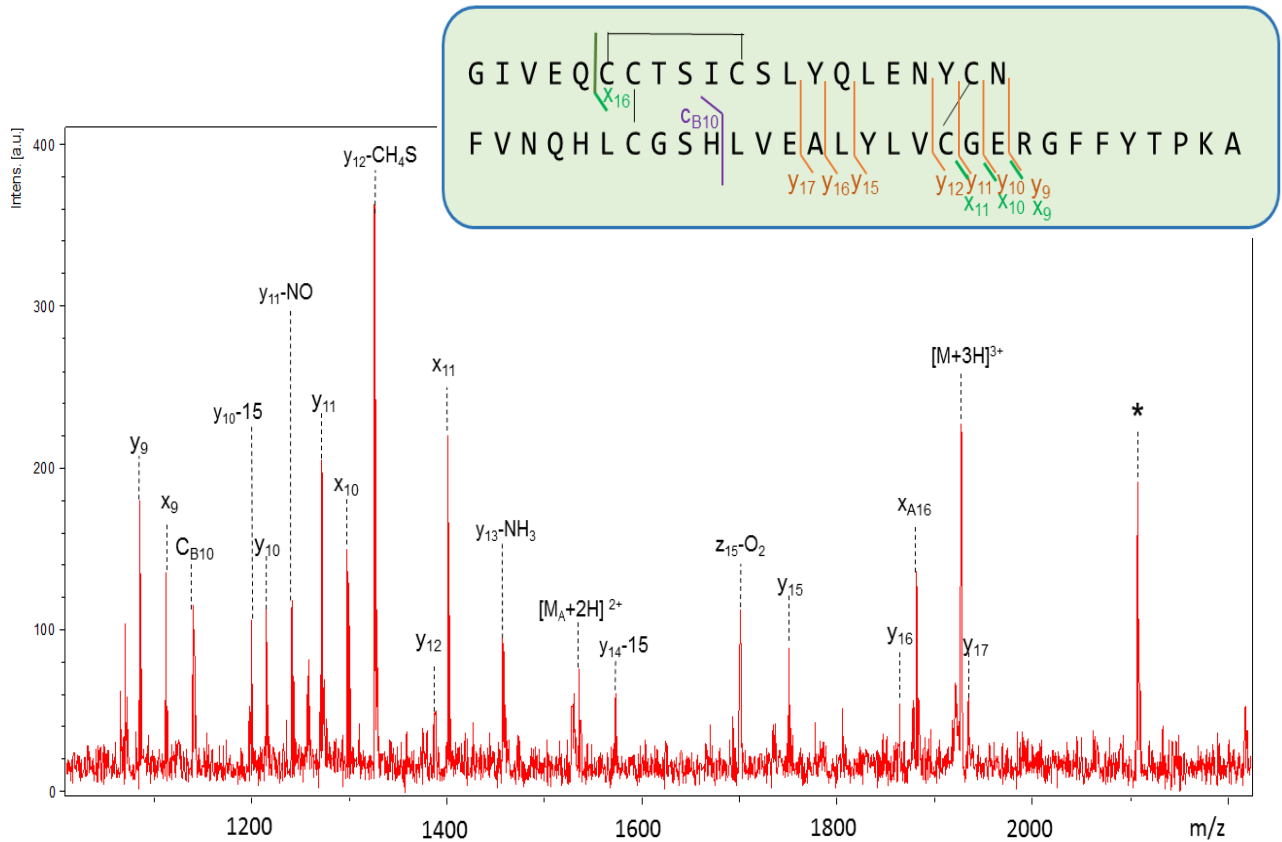
unidades en  $m/z$  5762, a la molécula doblemente protonada  $[M+2H]^{2+}$  en  $m/z$  2889 y a la cadena B protonada  $[M_B+H]^+$  en  $m/z$  3400.

**Figura 10. Espectros de masas MADLI-ISD de insulina, empleando como matriz CHCA.**



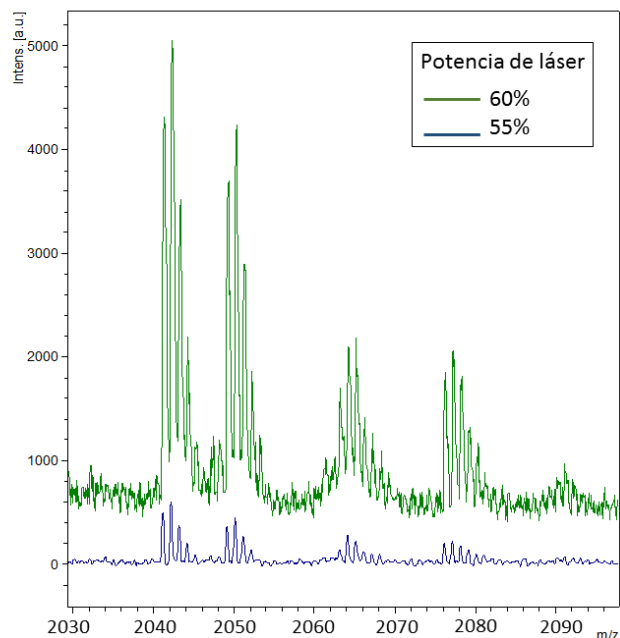
Para poder apreciar los fragmentos producto del proceso ISD se realizó un acercamiento al espectro en la región comprendida entre  $m/z$  1000 y 2200, como se observa en la **Figura 10**. Se pueden observar mayoritariamente iones  $y^-$ , con pérdidas de moléculas neutras como  $CH_4$  y  $NH_3$ , estas pérdidas son regularmente observadas en EM [48]. La pérdida de  $CH_4-S$  del ion  $y_{12}$ , puede ser posible debido a que en esta posición se encuentra uno de disulfuro intracatenario de la insulina. Se identificaron 24 señales con un error promedio de masa de 48 ppm, y se estimó una cobertura de secuencia del 23%.

Figura 11. Espectro de masas MALDI-MS/MS de insulina en un rango de masas de  $m/z$  1000 a 2200 empleando como matriz CHCA. Los iones MS/MS son asignados de acuerdo con la nomenclatura [25].



Con la matriz 1,5-DAN se emplearon dos atenuaciones de láser diferentes, el análisis de los fragmentos se realizó con los resultados obtenidos con atenuación de 55%. Aunque usando 60% de atenuación se observó un aumento en la abundancia relativa de los iones, hubo un incremento considerable de la línea base, como se observa en la **Figura 12**.

**Figura 12.** Acercamiento en el rango  $m/z$  2030 a 3000 del espectro de masas MADLI-MS de insulina, empleando como matriz 1,5-DAN, a 55 y 60% de atenuación de láser.



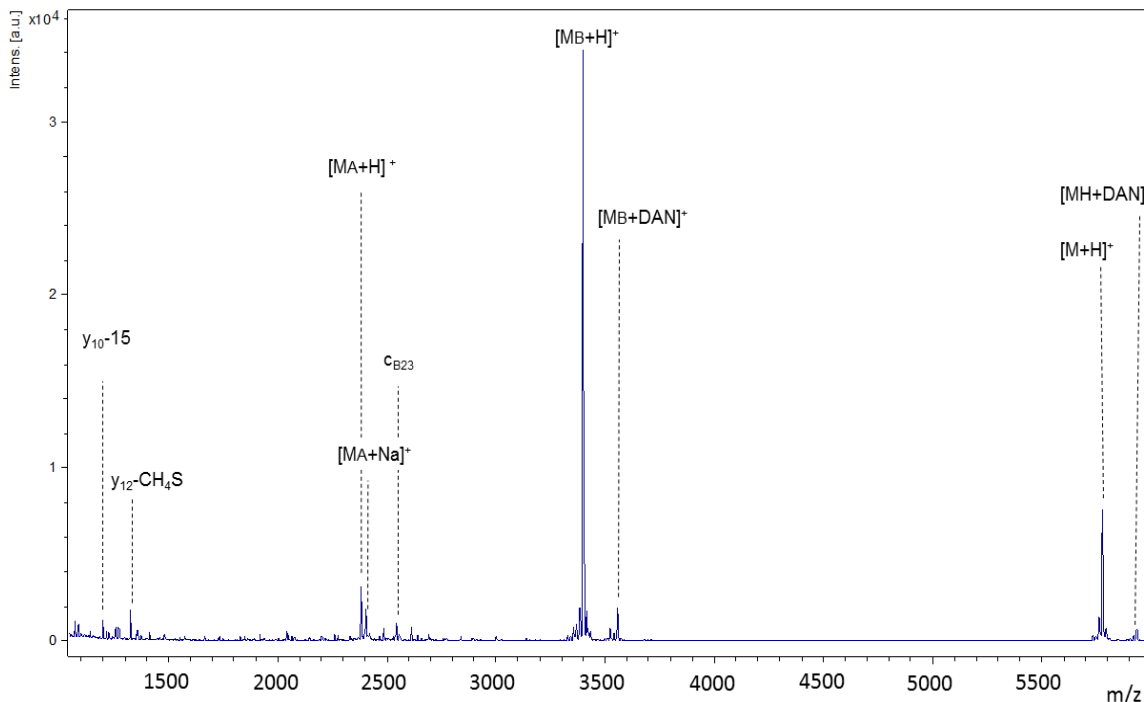
La disminución en la atenuación del láser se traduce en un aumento de la energía suministrada a la muestra y, por consiguiente, en mayor ablación de iones de la matriz lo que incrementa el ruido. Con relación a esta observación, se ha demostrado para el DHB que el volumen de ablación a altas fluencias de láser aumenta lentamente, mientras que la producción de iones aumenta en un factor exponencial ( $n= 4,5$ ) [49]. Al aumentar la ablación de la superficie, no solamente son generados iones de la matriz o del analito en interés, también se favorece la formación de aductos con impurezas, lo que contribuye con la pérdida de resolución en el espectro. En este caso particular, se determinó la pérdida de resolución para 5 señales en  $m/z$  bajo y 5 señales en  $m/z$  alto al aumentar la potencia del láser como se observa en la **Tabla 6**. Los datos de resolución se obtuvieron con el programa FlexAnalysis de Bruker.

**Tabla 6.** Pérdida de resolución de señales de insulina usando 1,5-DAN como matriz a 55 y 60 % de potencia de láser.

<i>m/z</i>	Resolución de las señales		Pérdida de resolución (55%-60%)	Pérdida porcentual %
	Potencia de láse			
	55%	60%		
1200	5336	2889	2447	45,9
1326	5514	3174	2340	42,4
1849	6062	3188	2874	47,4
2403	25284	5529	19755	78,1
2041	6555	4044	2511	38,3
3385	24079	7032	17047	70,8
3421	7028	3804	3224	45,9
3430	7556	2822	4734	62,7
3522	7659	2263	5396	70,5
3539	6742	6060	682	10,1

El espectro de masas ISD para la insulina, con 1,5-DAN como matriz, se observa en la **Figura 13**, donde los picos más abundantes corresponden al ion molecular de la cadena B protonada  $[M_B+H]^+$  en *m/z* 3400 y el ion molecular de la secuencia completa  $[M+H]^+$  en *m/z* 5777.

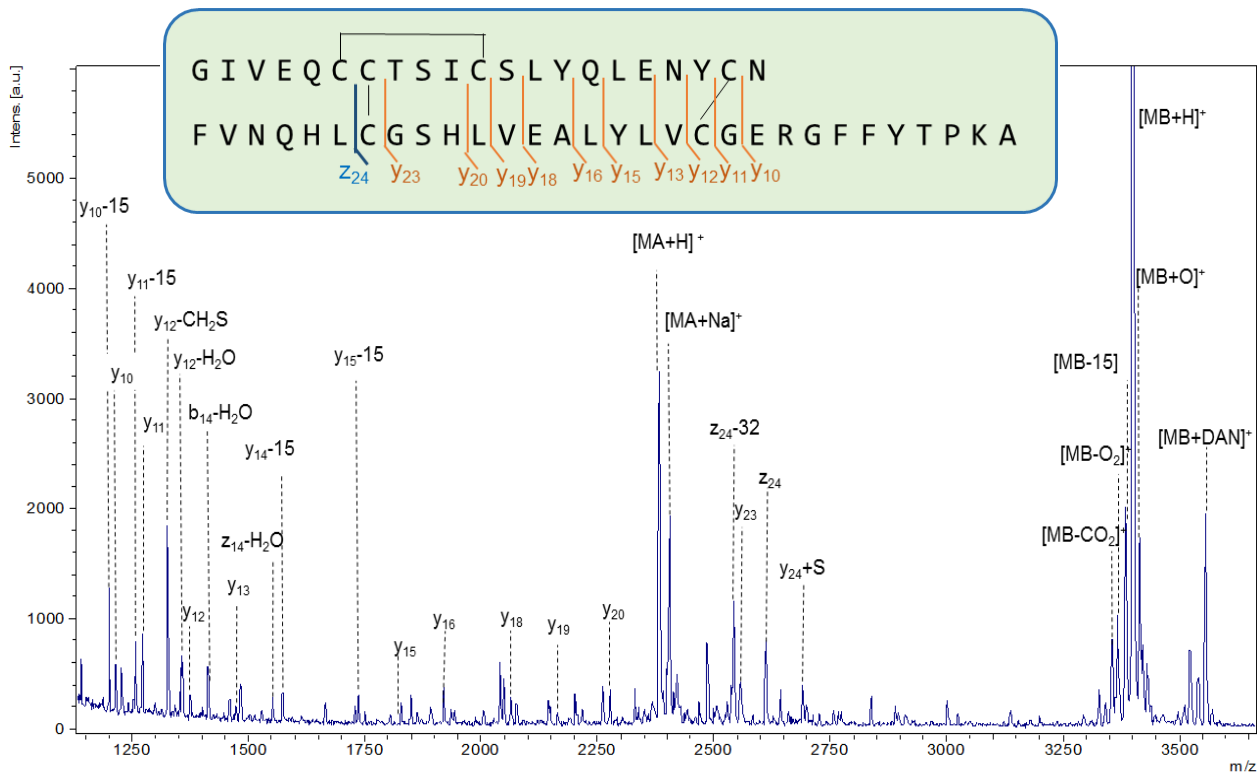
**Figura 13. Acercamiento en el rango  $m/z$  1100 a 6000 del espectro de masas MALDI-MS de insulina, empleando como matriz 1,5-DAN. Asignación de las señales principales.**



Se decidió suprimir las señales por debajo de  $m/z$  500, ya que correspondían en su mayoría a fragmentos de la matriz. Los picos pertenecientes a la insulina, se registraron en un rango de masas de  $m/z$  1150 a 2700, como se muestra en la **Figura 14**.

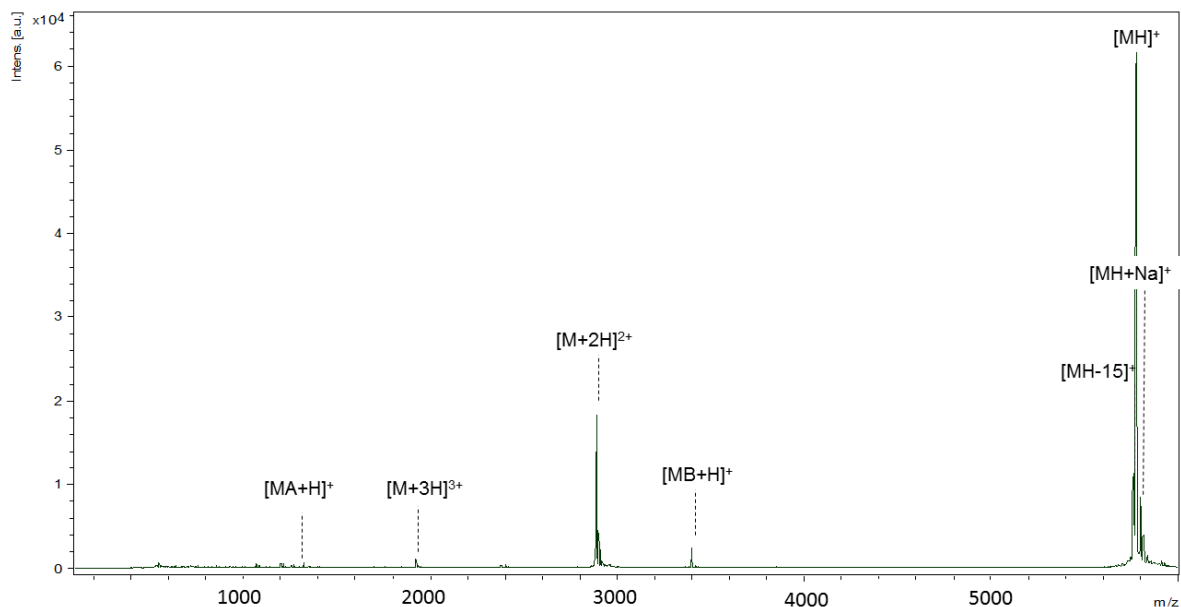
En el acercamiento del espectro tomado usando 1,5-DAN se pueden observar, por ejemplo, pérdidas de H<sub>2</sub>O o la formación de aductos con sodio. El desempeño del 1,5-DAN como matriz ISD, fue superior al obtenido con el CHCA, ya que se identificaron 31 señales y se estimó una cobertura de 25%, con un error de masa promedio de 53 ppm. Se puede observar que con esta matriz se obtiene un mayor número de señales, principalmente iones  $y$ -.

Figura 14. Acercamiento en el rango  $m/z$  1150 a 2700 del espectro de masas MALDI-MS/MS de insulina, empleando como matriz 1,5-DAN. Los iones ISD son asignados de acuerdo con la nomenclatura [25].



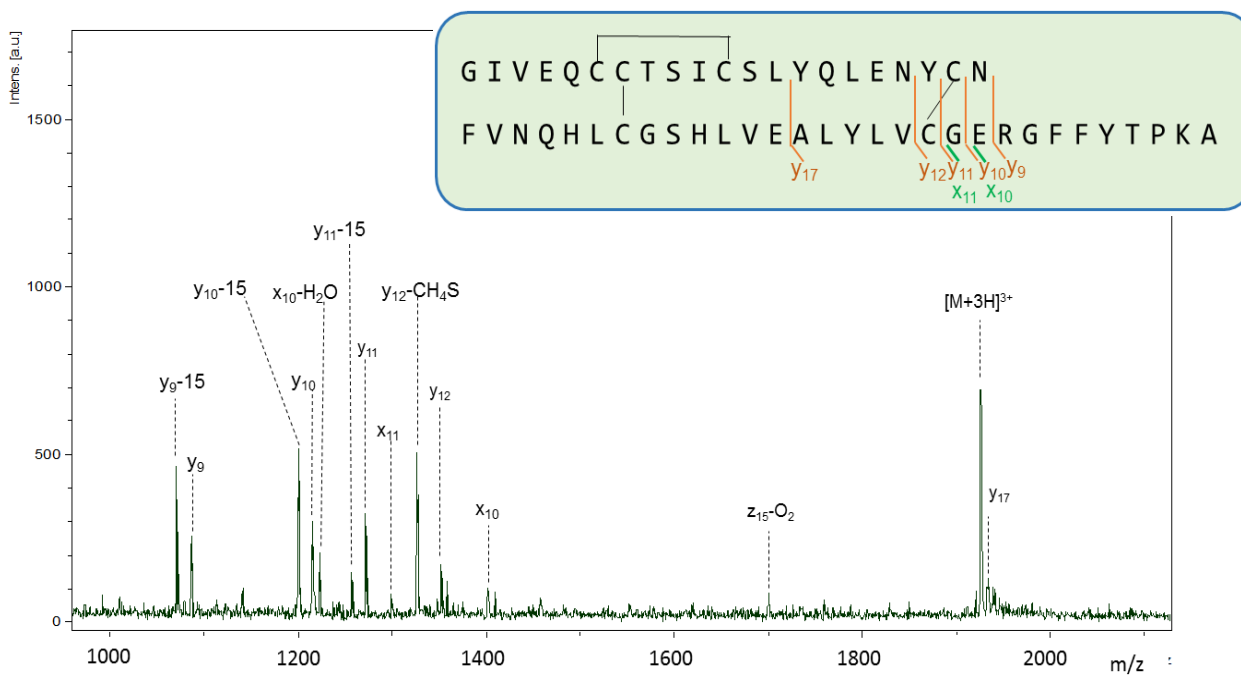
Al emplear la matriz sDHB, se pudieron distinguir señales del analito por encima de  $m/z$  1000. La adquisición de este espectro de masas se realizó con supresión de señales por debajo de  $m/z$  500, (Véase **Figura 15**). Los picos principales corresponden al ion molecular protonado  $[M+H]^+$  en  $m/z$  5777 y al ion molecular doblemente protonado  $[M+2H]^{2+}$  en  $m/z$  2889.

**Figura 15.** Espectro de masas MALDI-MS de insulina, empleando sDHB como matriz, con supresión de señales por debajo de  $m/z$  500.



En la **Figura 16** se observa la asignación de las señales correspondientes al espectro ISD de la insulina, usando sDHB como matriz, se realizó en el rango de  $m/z$  1000 a 2100. En este caso sólo se pudieron identificar 14 señales, correspondientes a una cobertura del 14%, siendo esta la menor de todas; para este espectro se determinó un error de masa promedio de 55 ppm. La comparación de los resultados obtenidos con las tres matrices convencionales en términos de la cobertura peptídica (Véase **Tabla 7**), la distribución isotópica y la caracterización de las cadenas A y B, empleando insulina como analito, permite concluir que los mejores resultados se obtuvieron al usar 1.5-DAN.

**Figura 16.** Acercamiento en el rango  $m/z$  1000 a 2100 del espectro de masas MALDI-MS/MS de insulina, empleando como matriz sDHB. Los iones MS/MS son asignados de acuerdo a la nomenclatura [25].



**Tabla 7.** Porcentaje de cobertura de la insulina empleando como matriz CHCA, 1,5-DAN y sDHB.

Matriz	Cobertura %
CHCA	23
1,5-DAN	25
sDHB	10

3.2.1.2. Análisis del Citocromo C. Adicionalmente, las tres matrices convencionales se probaron con Citocromo C (Cc), una proteína transportadora de electrones que posee un peso molecular de 12 kDa, con una secuencia de 105 aminoácidos [45] (Véase **Figura 17**).

**Figura 17. Estructura peptídica del Citocromo C de corazón bovino [45].**

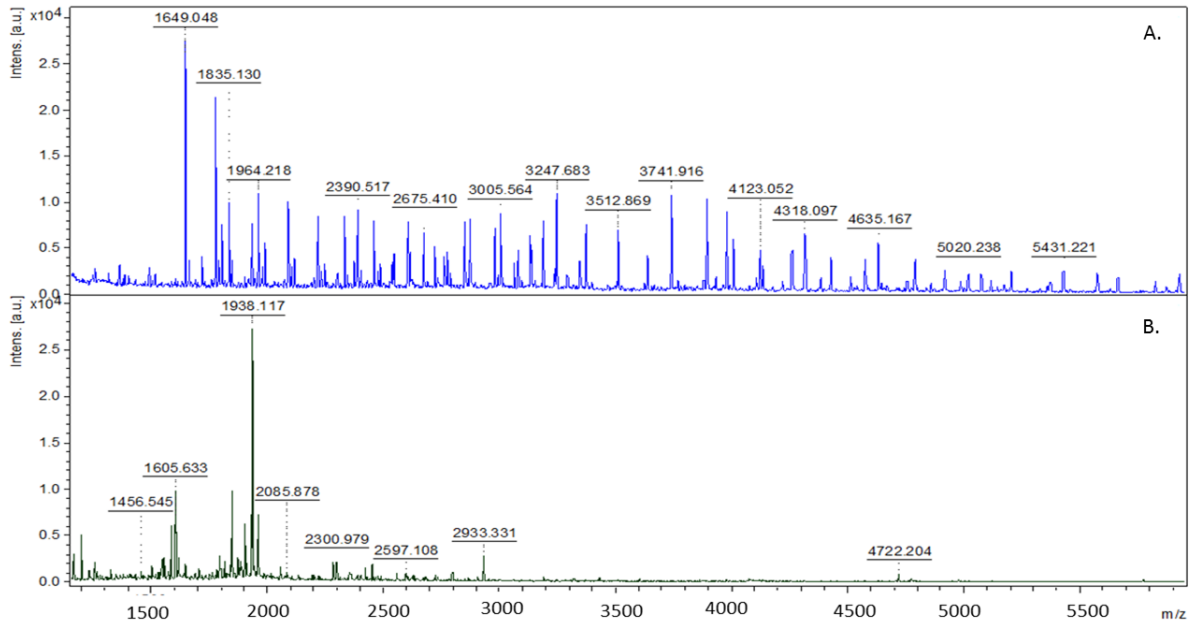
Hemo

MGDVEKGKKI FVQKCAQCHT VEKGGKHKTG PNLHGLFGRK TGQAPGFSYT DANKNKGITW  
GEETLMEYLE NPKKYIPGTK MIFAGIKKKG EREDLIAYLK KATNE

Con la base de datos del *Institute for System Biology: Proteomic tools* [46], se obtuvo la tabla de fragmentos iónicos monoisotópicos para la cadena completa del Cc (Anexo D). Teniendo en cuenta esta tabla de iones, se realizó la asignación de señales en el espectro de manera que se obtuviera la mínima diferencia posible entre la masa teórica y la experimental.

Con CHCA como matriz, no se observaron diferencias significativas entre el blanco y la muestra, incluso cuando se aumentó la potencia del láser por encima de 50%, por esto no se reportó este espectro. Los espectros de masas ISD del Cc, al utilizar 1,5-DAN y sDHB como matrices, se pueden observar en la **Figura 18**.

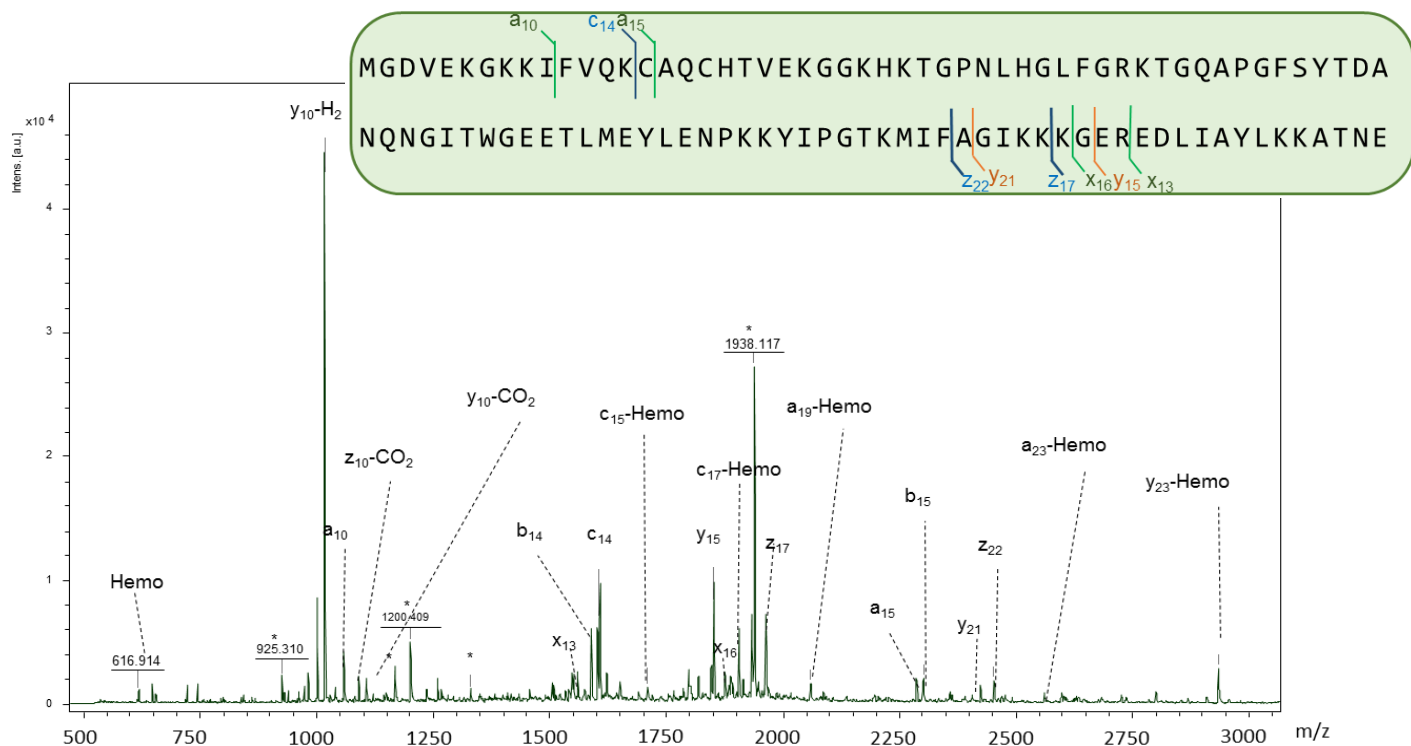
**Figura 18. Espectros de masas MALDI-MS de citocromo C, empleando como matriz: A. 1,5-DAN y B. súper DHB, en un rango de  $m/z$  1100 a 6000.**



Para el análisis del Citocromo C no se hizo búsqueda del ion molecular, solamente se tomaron en cuenta los fragmentos que se ubicaron fundamentalmente en el rango de  $m/z$  700 a 6000. Para determinar las señales correspondientes al analito, se realizó una comparación con el respectivo blanco y se examinaron las señales diferentes.

En la **Figura 19** se muestran las señales principales del Cc, usando sDHB como matriz, en un rango de masas de  $m/z$  500 a 3000. Para este espectro se identificaron 22 señales y se determinó una cobertura del 8%, con un error de masa promedio de 80 ppm. Se puede ver la baja cobertura obtenida con esta matriz, además de un error de masa considerablemente alto para MALDI-MS.

Figura 19. Acercamiento en el rango  $m/z$  500 a 3000 del espectro de masas MADLI- $ISD$  de Citocromo C, empleando como matriz sDHB. Los iones  $ISD$  son asignados de acuerdo a la nomenclatura [25].

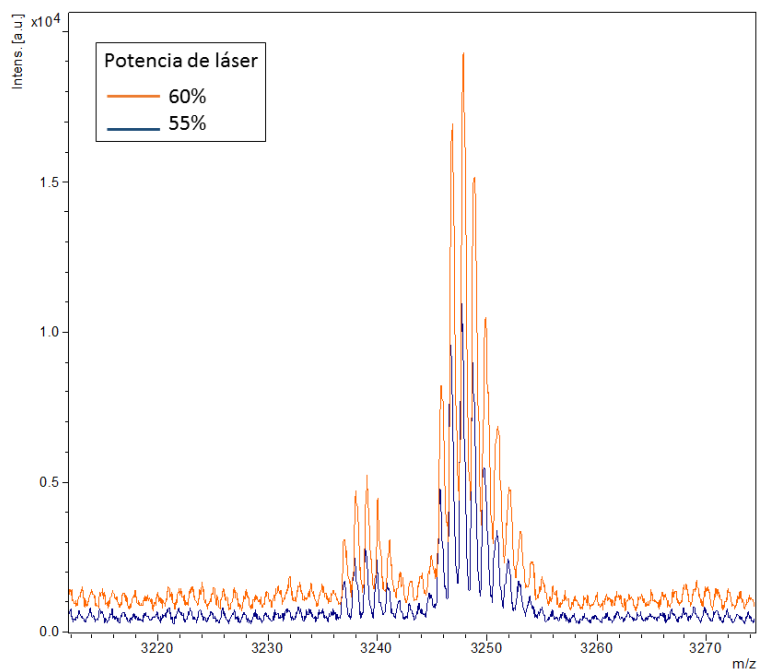


Con el 1,5-DAN se emplearon dos atenuaciones de láser: 55 y 60%. El análisis de señales de la muestra se hizo con los datos obtenidos a 55% de láser, ya que para una potencia mayor, se presentó mayor levantamiento de la línea base, como se muestra en la **Figura 20**. Se pudo observar también disminución para las relaciones S/N, por ejemplo para la señal  $m/z$  3247, se obtiene una relación S/N de 34,1 al 55% del láser; mientras que esta misma señal presentó una disminución de 35,3% de la relación S/N a una atenuación de láser del 60% (S/N=11.4). Adicionalmente, se determinó la pérdida de resolución en 5 señales de la región  $m/z$  baja y 5 señales de la región  $m/z$  alta (Véase **Tabla 8**).

**Tabla 8.** Pérdida de resolución de señales de Citocromo C usando 1,5-DAN como matriz a 55 y 60 % de potencia de láser.

<i>m/z</i>	Resolución de las señales		Pérdida de resolución (55%-60%)	Pérdida porcentual %
	Potencia de láse			
	55%	60%		
1649	5643	4613	1040	18,4
1664	6067	4243	1824	30,1
1718	4422	4054	368	8,3
1778	6026	4642	1384	23,0
1793	7221	4813	2408	33,3
3081	9149	6226	2923	31,9
3247	8463	6014	2449	28,9
3741	9204	8408	796	8,6
3895	9550	8100	1450	15,2
4009	9528	8455	1073	11,3

**Figura 20.** Acercamiento en el rango *m/z* 3205 a 3280 del espectro de masas MADLI-ISD de Cc, empleando como matriz 1.5-DAN, a 55 y 60% de potencia de láser.



En 1997 Brown y colaboradores [32] analizaron los factores que influyen la fragmentación generada en MALDI; dentro de estos factores se mencionan los tiempos de extracción. Se realizaron variaciones en este parámetro, buscando mejorar los resultados obtenidos con la matriz 1,5-DAN, ya que fue la matriz con la que se obtuvieron mejores resultados.

Los tiempos de extracción usados fueron los siguientes: 10, 30, 60, 100, 150, 200 y 250 ns (Anexo E). En la toma de los espectros se suprimieron las señales por debajo de  $m/z$  1000 para evitar la saturación de la fuente y el detector. Teniendo en cuenta los criterios mencionados en la **Tabla 5**, se determinó que el mejor tiempo de extracción de iones fue de 150 ns, ya que se registró el mayor número de señales, correspondientes a una cobertura de 66% (Véase **Tabla 9**).

**Tabla 9.** Número de señales y cobertura del Cc, variando el tiempo de extracción de iones.

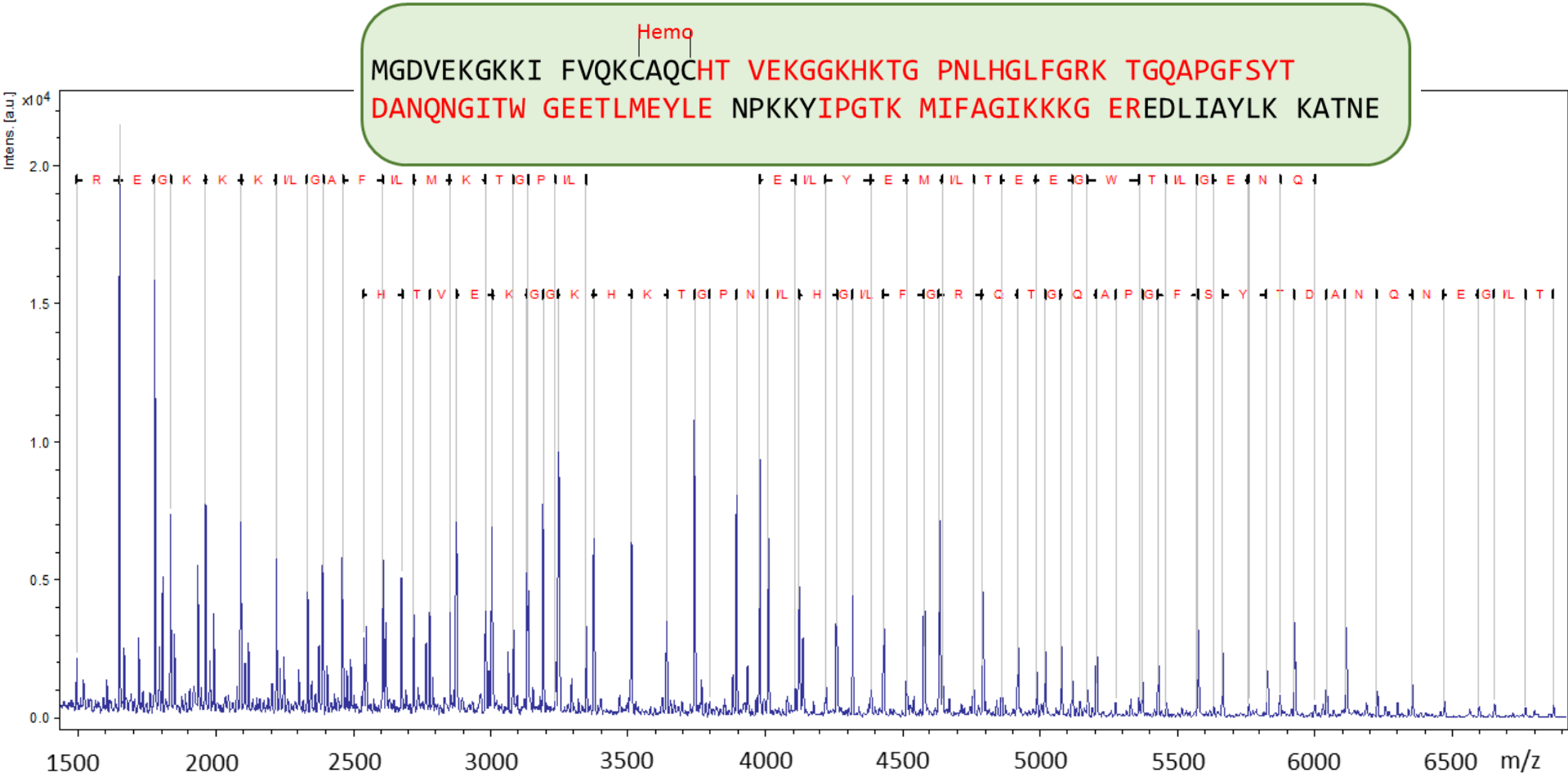
Tiempo [ns]	Número de señales	Cobertura %
10	52	21
30	78	31
60	101	37
100	137	48
150	141	66
200	124	49
250	120	43

El espectro de masas ISD obtenido a 150 ns se muestra en la **Figura 21**, donde se realiza la asignación de aminoácidos correspondiente de la secuencia del citocromo C. Al emplear esta matriz, se determinó una cobertura del 66%, con una precisión de masa de 100 ppm. Aunque los espectros fueron muy similares, se presentaron cambios en la tolerancia de masa, es decir, para poder asignar más aminoácidos al espectro se requeriría aumentar la exactitud de masa, saliendo de

los parámetros convencionales para MALDI-MSD [50]. En MALDI-MSD, es común observar resoluciones de 5000 a 8000 [51] y una exactitud de masa de 50 ppm [51].

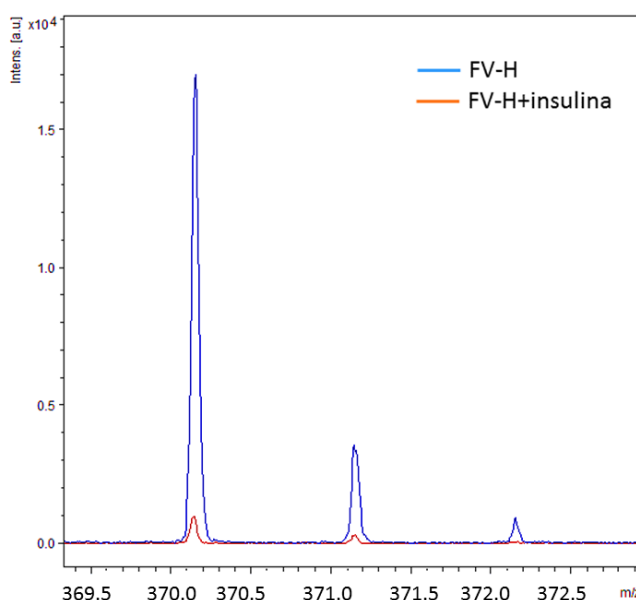
Demeure y colaboradores [21], probaron en el 2007 la capacidad de donación de hidrógeno de algunas matrices usando spirooxazinas, con lo que obtuvieron el siguiente orden de capacidad de donación de hidrógeno de mayor a menor: ácido picolínico (PA) > 1,5-DAN > 2,5-DHB > ácido sinapínico (SA) > CHCA. Tres años después, correlacionaron la habilidad de las matrices con la promoción de fragmentos vía radicalaria [5], las matrices se pudieron organizar en orden creciente según su habilidad de reducción de la siguiente manera: 1,5-DAN > 2,5-DHB >> CHCA. Sakakura y colaboradores [51] demostraron en ese mismo año esta misma capacidad, usando vasopresina como analito y obtuvieron los mismos resultados. Se puede concluir entonces, que la capacidad donadora de hidrógenos está ligada a la fragmentación MSD. Para el caso de las tres matrices estudiadas se observó un aumento en la formación de fragmentos con la molécula 1,5-DAN, por el contrario, al emplear CHCA como matriz la producción de fragmentos fue casi nula.

Figura 21. Espectro MALDI-MS de Citocromo C, usando 1.5-DAN como matriz. Asignación de aminoácidos en la secuencia.



3.2.2. **Evaluación de FV como matrices.** El análisis del desempeño de la molécula FV-H como matriz usando la insulina, no registró resultados del analito a 30 ni a 40% de atenuación del láser para ninguna de las dos preparaciones usadas: ACN/agua 2:1, 0.1% TFA; y THF. Particularmente, en esta molécula se observó una disminución de la intensidad de las señales al adicionar el analito sin aparición de nuevas señales (Véase Figura 22).

**Figura 22.** Acercamiento en el rango  $m/z$  369 a 373 del espectro de masas MALDI-MS de Insulina, empleando como matriz FV-H, en ACN:agua, 0.1% TFA, a 40% de potencia de láser.



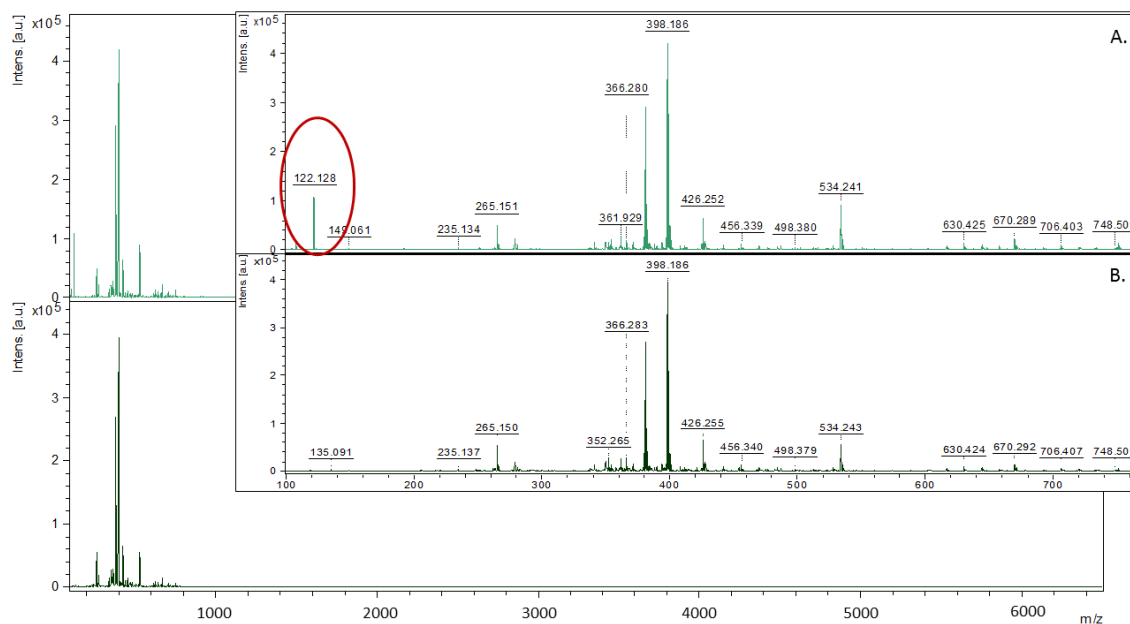
La baja  
matrices

solubilidad de las  
representa una

limitante en la co-cristalización con el analito, siendo este un factor importante para llevar a cabo el primer paso de formación de iones en MALDI [52, 53]. Debido a esto las asignaciones de las señales para las matrices FV-Me y FV-OMe se realizaron en solución de THF.

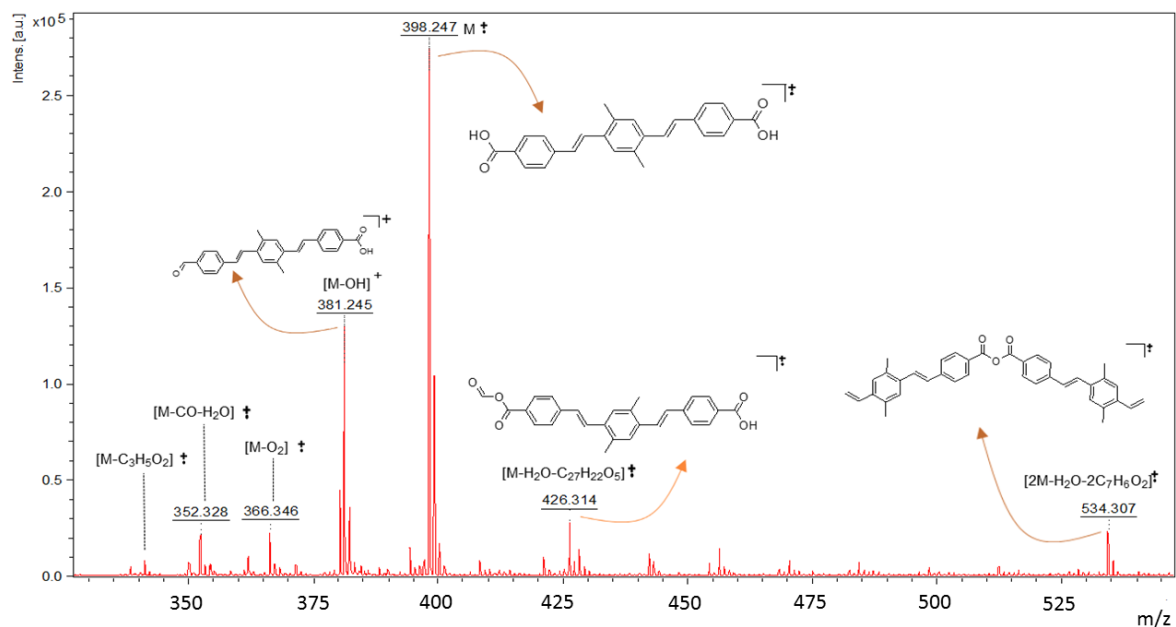
Al emplear el FV-Me como matriz, se pudo observar una nueva señal en  $m/z$  122 para la relación 1:600, sin embargo, esta señal es derivada del ácido carboxílico (Véase **Figura 23**).

**Figura 23.** Espectro de masas MALDI de insulina, empleando FV-Me como A: matriz, y su respectivo B. blanco, al 30% de potencia de láser. Acercamiento en el rango de  $m/z$  100 a 800.



En la **Figura 24** se realiza la asignación de señales principales a fragmentos del FV-Me, donde la señal más abundante corresponde al catión radical de la molécula en  $m/z$  398, además se observa la pérdida de 17 unidades correspondientes al radical hidróxilo en  $m/z$  381, como ya se había reportado para estas moléculas a bajas fluencias de láser [10].

**Figura 24. . Asignación de las señales principales en el espectro de masas de FV-Me a 30 % de potencia de láser**



Para el FV-OMe, se presentó una aparente aparición de nuevas señales en la solución ACN/agua a 40% de potencia láser, en una relación volumétrica 1:6000 analito-matriz, estas señales corresponden a  $m/z$  149 y 403 como se muestra en la **Figura 25**, sin embargo, al realizar un acercamiento en cada señal, se puede observar que no son señales nuevas, estas señales también se pueden observar en el respectivo blanco con menores abundancias relativas (Véase **Figura 26**). La señal  $m/z$  149 corresponde a ftalato.

Figura 25. Espectro de masas MALDI de A. insulina, empleando FV-OMe como matriz, y B. su respectivo blanco, a 40% de potencia láser. Acercamiento en el rango de  $m/z$  100 - 900.

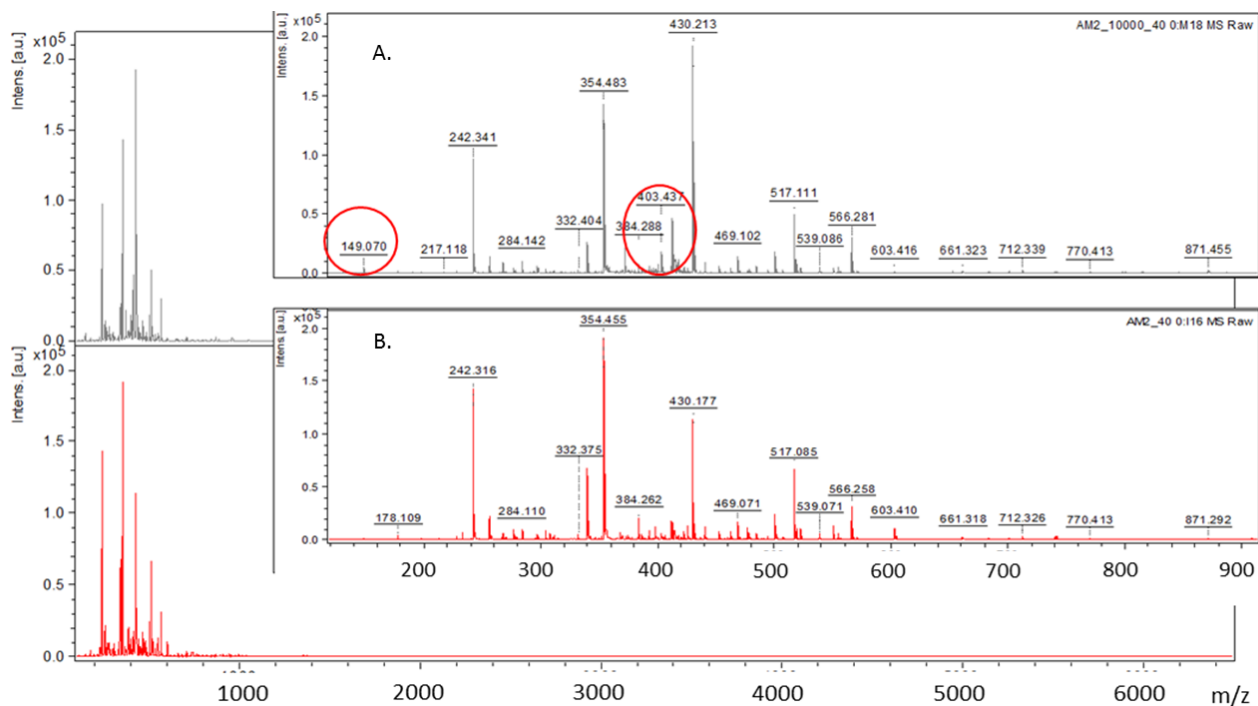
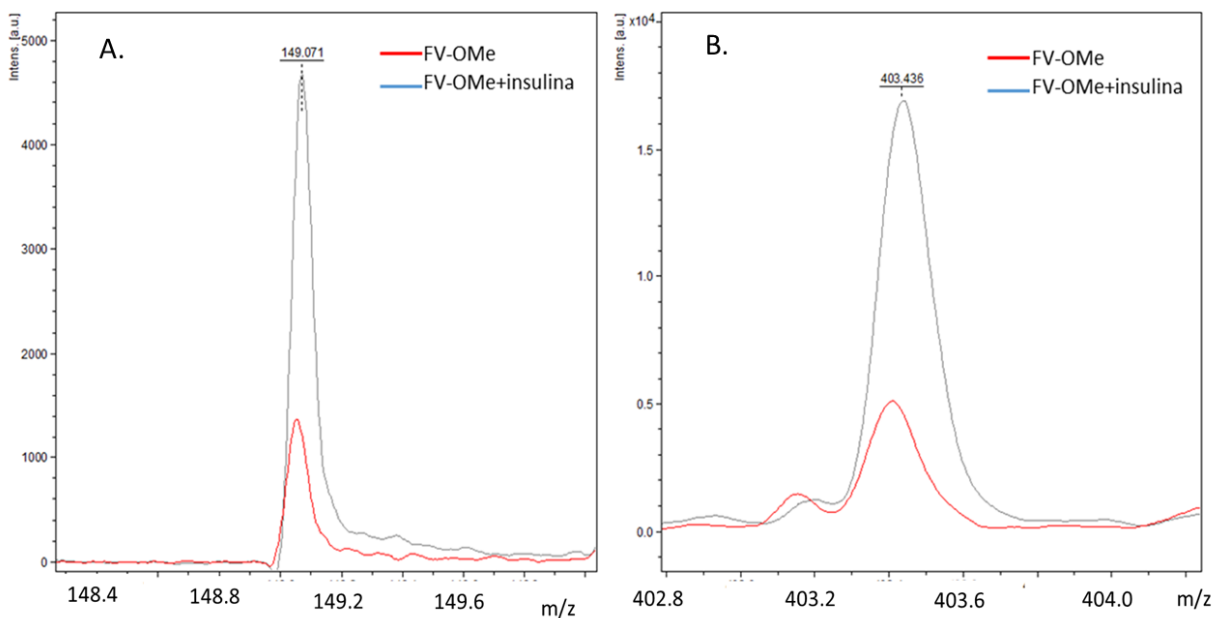
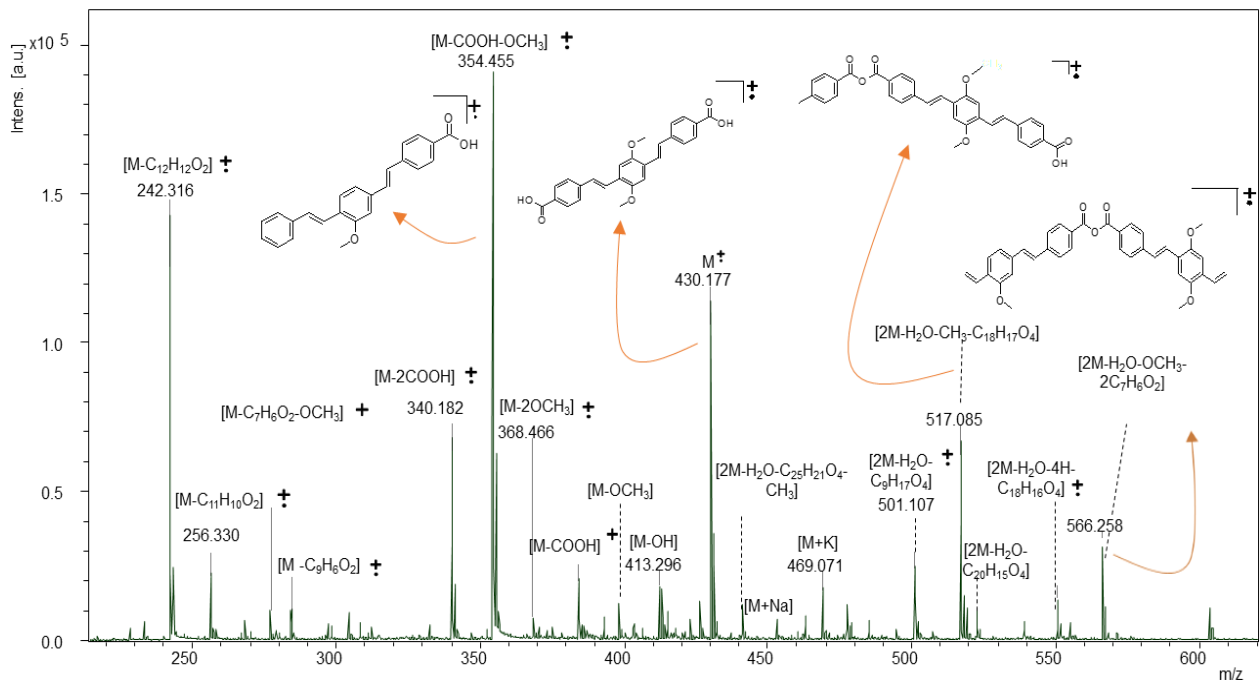


Figura 26. Incremento de las señales A.  $m/z$  149 y B.  $m/z$  403, al emplear FV-OMe como matriz e insulina como analito.



Las fragmentaciones registradas fueron inducidas por el exceso de energía suministrada por acción del láser. Las señales principales de la molécula FV-OMe se pueden asignar como se propone en la **Figura 27**, con pérdidas típicas observadas en MALDI. En este caso el ion de mayor abundancia ( $m/z$  354), corresponde a la posible pérdida de un grupo carboxilo y un grupo metoxilo, debido a que los grupos funcionales  $\text{CH}_3\text{O}^+$  activan el sistema conjugado del FV, por lo que se promueve la pérdida de  $-\text{COOH}$  radicalario y un grupo metoxilo, logrando así una forma más estable de la molécula.

**Figura 27. Espectro de masas de FV-OMe a 40 % de potencia de láser. Asignación de las señales principales**



El análisis del Cc, usando FV como matrices, se descartó, debido al deficiente desempeño observado con la insulina. La prueba de desempeño de los FV como matrices MALDI-ISD no arrojó buenos resultados en comparación a las matrices convencionales, ya que no fue posible inducir la fragmentación del respectivo analito.

#### 4. CONCLUSIONES

---

El análisis espectroscópico de los fenilvinileno permitió determinar la longitud de onda de máxima absorción para el FV-Me y el FV-OMe, estos valores corresponden a  $\lambda=370$  y  $409$  nm, respectivamente, que son cercanos a  $355$ nm (longitud de onda del láser Nd:YAG), con lo que se obtiene una fuerte interacción de los FV a la longitud de onda empleada en MALDI. La longitud de onda máxima de absorción determinada para el FV-H fue de  $370$ .

Las absorptividades molares de las moléculas FV-Me y FV-OMe presentaron un aumento de  $135$  y  $21\%$ , respectivamente, en comparación con la absorptividad molar registrada para el CHCA ( $15849 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); esto indica que la energía suministrada por los fotones del láser es absorbida principalmente por las moléculas de FV.

Los rendimientos cuánticos no radiativos para los sistemas FV-Me y FV-OMe fueron  $0,61$  y  $0,60$ ; estos valores son más bajos al calculado para el CHCA ( $0,918$ ), lo que indica que los procesos de relajación de estos FV son menos térmicos en comparación a la matriz de referencia.

El análisis MALDI-MSD realizado a la insulina con las matrices CHCA, 1,5-DAN y sDHB, mostró un mejor resultado al emplear 1,5-DAN como matriz, ya que se determinó una cobertura del  $25\%$ , mientras que para el súper-DHB se obtuvo una cobertura del  $10\%$ .

El 1,5-DAN también presentó un mejor desempeño como matriz MALDI-MSD en el análisis del Citocromo C, alcanzando una cobertura del  $66\%$ , mientras que para el CHCA no fue posible inducir su fragmentación. Se demostró la efectividad de estas matrices, especialmente la del 1,5-DAN teniendo en cuenta que la capacidad de donación de hidrógeno es mayor que la del DHB y CHCA.

Se demostró la importancia del tiempo de extracción de iones en la obtención de fragmentos del analito, obteniéndose un umbral en  $150$  ns. Se sugiere que este

tiempo permite que la muestra no solamente sea desorbida, sino que se lleven a cabo suficientes procesos de fragmentación de manera continua permitiendo observar los iones con mayor abundancia.

A pesar de obtener buenos resultados espectroscópicos de los sistemas FV, el desempeño de estas moléculas como matrices MALDI-MS en péptidos/proteínas es muy deficiente, inclusive variando las metodologías usadas para la preparación de muestra. Esto se debe a que no existe la posibilidad de realizar protonación por parte de estas moléculas. Los FV poseen la capacidad de perder radicales OH, sin embargo, no son suficientemente reactivos para llevar a cabo procesos secundarios de ionización e iniciar reacciones radicalarias de decaimiento en fuente.

## 5. RECOMENDACIONES

---

Para realizar estudios de espectrometría de masas MALDI, e inducir fragmentación de manera eficiente se recomienda emplear matrices que posean baja afinidad protónica respecto al analito y que pueda co-cristalizar con el mismo.

Para mejorar los resultados MALDI-MSD, se recomienda realizar variaciones en parámetros como tiempos de extracción.

## REFERENCIAS

---

- [1] Suckau, D. and Resemann, A. T3-Sequencing: Targeted Characterization of the N- and C-Termini of Undigested Proteins by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (21), 5817-5824.
- [2] Dalmaso, E., Casseñas, D. and Miller, S. Top-Down, Bottom- up. The merging of Two High Performance Technologies. *BioRadiations Laboratories*. 2009. Disponible en: [http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5908A.pdf](http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5908A.pdf). Fecha de acceso: 21 noviembre de 2013.
- [3] Xuemei, H., Aslanian, A. and Yates, J. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* **2008**, 12(5), 483–490.
- [4] Demirev, P., Feldman, A., Kowalski, P. y Lin, J. Top-Down Proteomics for rapid Identification of Intact Microorganism. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 77 (22), 7455-7461.
- [5] Demeure, K., Gabelica, V. and De Pauw, E. New Advances in the Understanding of the In-Source Decay Fragmentation of Peptides in MALDI-TOF-MS. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2010**, 21(11), 1906-1917.
- [6] Karas, M. Bahr, U.; Strupat, K.; Hillenkamp, F., Tsarbopoulos, A. and Pramanik, B. Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 675–679.
- [7] Harvey, D. Review. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 226 (1), 1–35.
- [8] Beavis, R., Chait, B. and Fales, H. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1989**, 3 (12), 432-435.
- [9] Krause, J., Stoeckli, M. and Schlunegger, U. Studies on the Selection of New Matrices for Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, 10 (15), 1927-1933.
- [10] Rosales, H. Ensayo de compuestos con un núcleo de fenilvinileno como matrices MALDI. Directora: Marianny Yajaira Combariza. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. **2013**.

- [11] Sierra, C. and Lahti, P. A Photoluminescent, Segmented Oligo-Polypheylenevinylene Copolymer with Hydrogen-Bonding Pendant Chains. *Chem. Mater.* **2004**, 16 (1), 55–61.
- [12] Hillenkamp, F. and Katalinic J. MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. Editorial Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. **2007**, 1-5.
- [13] Ehring, H., Karas, M. and Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27 (4), 472-480.
- [14] Shah, B., Kozlowski, R., Han J., and Birchers, C. Emerging Mass Spectrometry-Based Technologies for Analyses of Chromatin Changes: Analysis of Histones and Histone Modifications. Ed. *Springer*. New York, USA. **2011** 7 (73), 259-261.
- [15] Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst.* **2006**, **131** (9), 966-986.
- [16] Chang, W., Huang, L., Wang, Y., Peng, W., Chang H., Hsu, N., Yang, W. and Chen C., Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, 582 (1), 1-9.
- [17] Karas, M. and Krüger, R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (2), 427-40.
- [18] Zhigilei, L., Yingling, Y., Itina, T., Schoolcraft T. and Garrison B., Molecular dynamics Simulations of Matrix-assisted Laser Desorption—connections to Experiment. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 226 (1), 85-106.
- [19] Soltwisch, J., Jaskolla, T., Hillenkamp, F., Karas, M., and Dreisewerd, K. Ion Yields in UV-MALDI Mass Spectrometry As a Function of Excitation Laser Wavelength and Optical and Physico-Chemical Properties of Classical and Halogen-Substituted MALDI Matrixes. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (15), 6567-6576.
- [20] Dreisewerd, K. The desorption process in MALDI. *Chem Rev.* **2003**, 103 (2), 395-426.
- [21] Demeure, K., Quinton, L., Gabelica, V. and De Pauw E. Rational Selection of the Optimum MALDI Matrix for Top-Down Proteomics by In-Source Decay. *Anal Chem.* **2007**, 79 (22), 8678–8685.

- [22] Reiber, D., Grover, T. and Brown, R. Identifying Proteins Using Matrix-assisted Laser Desorption/ionization in-source Fragmentation Data Combined with Database Searching. *Anal. Chem.* **1998**, 70 (4), 673–683.
- [23] Keller, N. Top-Down Proteomics. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 76 (11), 197A-203A.
- [24] Takayama, M. N-C $\alpha$  Bond Cleavage of the Peptide Backbone via Hydrogen Abstraction. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* **2001**, 12 (9), 1044-1049.
- [25] Rossi, D. and Sinz, M (Editores). O'Hair, R. Mass Spectrometry in Drug Discovery. Chapter 4. Ion Chemistry and Fragmentation. CRC Press. New York, USA. **2002**, 105-106.
- [26] Karas, M. and Hillenkamp, F. and Bachmann. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.* **1985**, 57 (14), 2935-2939.
- [27] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, Yoshida, Y. and Yoshida, T. Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2 (8), 151-153.
- [28] Karas, M. and Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of proteins with Molecular Masses Exceeding 10.000 Da. *Anal. Chem.* **1988**, 60 (20), 2299-2301.
- [29] Hercules, D. Polymer MS-MS by MALDI: some advances and some callenges. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 392 (4), 571-573.
- [30] Chen, C. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, 624 (1), 16–36.
- [31] Laštovičková M., Chmelik J., and Bobalova J. The Combination of Simple MALDI Matrices for the Improvement of Intact Glycoproteins and Glycans Analysis. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 281 (1), 82-88.
- [32] Brown, R., Feng, J. and Reiber, D. Further Studies of in Source Fragmentation of Peptides in MALDI. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, 169 (170), 1–18.
- [33] Chen, S., Chen. L, Wang, J., Hou, J., He, Q., Liu, J., Wang, J., Xiong, S., Yang, G. y Nie, Z. 2,3,4,5-Tetrakis(3',4'-dihydroxyphenyl)thiophene: A New Matrix for the Selective Analysis of Low Molecular Weight Amines and Direct

Determination of Creatinine in Urine by MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (23), 10291-10297.

[34] Rodríguez, E. Compuestos Cruciformes y Polímeros Dendronizados Basados en Bitiofeno y Fenilvinileno. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha España. Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica. **2013**.

[35] Rodríguez, W., Sierra, C., Ochoa, C., Lahti, P. and Peón, J. Photoinduced Energy Transfer in Bichromophoric Pyrene–PPV Oligomer Systems: The Role of Flexible Donor–Acceptor Bridges. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116 (11), 3490–3503.

[36] Alzate, D., Rodríguez, R. y Sierra, C. Rendimiento cuántico de fluorescencia en sistemas fenilvinileno. *Rev. Colomb. Quím.* **2010**,39(3), 309-319.

[37] Allen, M. Measurement of Fluorescence Quantum Yields. Thermo Fisher Scientific. **2010**. Technical Note: 52019. Madison, WI, USA.

[38] Asakawa, D., Calligaris D., Smargiasso, N. and de Pauw, E. Ultraviolet Laser Induced Hydrogen Transfer Reaction: Study of the First Step of MALDI In-Source Decay Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. B.* **2013**, 117 (8), 2321–2327.

[39] Asakawa, D. and Takayama M. Fragmentation Processes of Hydrogen-Deficient Peptide Radicals in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization In-Source Decay Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116 (13), 4016-4023

[40] Skoog, D., WEST, D. y HOLLER, F. Fundamentos de. Química Analítica. 6ª ed. Madrid, McGraw-Hill, **1995**.

[41] Heller, A. Organic Liquid Scintillators. VI. Substituted Distyrylbenzenes: Scintillation Properties and Spectra of Absorption and Fluorescence. *The Journal of Chemical Physics.* **1964**, 40 (10), 2839-2851.

[42] Allwood, D. and Dyer, P. Quantitative fluorescence measurements performed on typical matrix molecules in matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Chem. Phys.*, **2000**, 261 (3), 457-467.

[43] Melhuish, W. Quantum Efficiencies of Fluorescence of Organic Substances: Effect of Solvent And Concentration Of The Fluorescent Solute. *J. Phys. Chem. A.*, **1961**, 65 (2), 229–235.

[44] Boldridge, D., Scott, G. and Spiglanin T. Intersystem Crossing and Internal Conversion from the Lowest Excited Singlet State of Diazanaphthalenes. *The J. Phys Chem.* **1982**, 86 (11), 1972-1979.

[45] Protein Data Bank (RCSB): Biological Macromolecular Structures. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Fecha de acceso: 22 de marzo 2015.

[46] The system Biology: Fragment Ion Calculator. Disponible en: <http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html> Fecha de acceso: 12 de marzo 2015.

[47] Lennon, J. and Walsh, K. Direct sequence analysis of proteins by in-source fragmentation during delayed ion extraction. *Protein Society*. **1997**, 6 (11), 2446-2453.

[48] Departamento de química de la Universidad del Estado de Michigan: Espectrometría de Masas. Disponible en: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/MassSpec/mspec.htm>. Fecha de acceso: 14 de marzo 2015.

[49] Fournier, I., Marinach, C., Tabet, J. and Bolbach, G. Irradiation effects in MALDI, ablation, ion production, and surface modifications. Part II: 2, 5-dihydroxybenzoic acid monocrystals. *JASMS*. **2003**, 14(8), 893-899

[50] Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle, A. A novel MALDI LIFT-TOF / TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem*. **2003**, 376(7), 952-65

[51] Sakakura, M., and Takayama, M. In-source decay and fragmentation characteristics of peptides using 5-aminosalicylic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *JASMS*. **2010**, 21(6), 979–88.

[52] Cole, R. (compilador-editor). *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: fundamentals, instruments, practicalities and biological applications*. Hossain, M. and Limbach P. Chapter 7: A comparison of MALDI matrices. Wiley Publications. Second Edition. New Jersey, USA. **2010**, 215-219.

[53] Asakawa, D. and Takayama, M. C $\alpha$ -C Bond Cleavage of the Peptide Backbone in MALDI In-Source Decay Using Salicylic Acid Derivative Matrices. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **2011**, 22 (7), 1224-1233.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Allen, M. Measurement of Fluorescence Quantum Yields. Thermo Fisher Scientific. **2010**. Technical Note: 52019. Madison, WI, USA.

Allwood, D. and Dyer, P. Quantitative fluorescence measurements performed on typical matrix molecules in matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Chem. Phys.*, **2000**, 261 (3), 457-467.

Alzate, D., Rodríguez, R. y Sierra, C. Rendimiento cuántico de fluorescencia en sistemas fenilvinileno. *Rev. Colomb. Quím.* **2010**, 39(3), 309-319.

Asakawa, D. and Takayama M. Fragmentation Processes of Hydrogen- Deficient Peptide Radicals in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization In-Source Decay Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116 (13), 4016-4023

Asakawa, D. and Takayama, M. C $\alpha$ -C Bond Cleavage of the Peptide Backbone in MALDI In-Source Decay Using Salicylic Acid Derivative Matrices. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, 22 (7), 1224-1233.

Asakawa, D., Calligaris D., Smargiasso, N. and de Pauw, E. Ultraviolet Laser Induced Hydrogen Transfer Reaction: Study of the First Step of MALDI In-Source Decay Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. B.* **2013**, 117 (8), 2321-2327.

Beavis, R., Chait, B. and Fales, H. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1989**, 3 (12), 432-435.

Boldridge, D., Scott, G. and Spiglanin T. Intersystem Crossing and Internal Conversion from the Lowest Excited Singlet State of Diazanaphthalenes. *The J. Phys Chem.* **1982**, 86 (11), 1972-1979.

Brown, R., Feng, J. and Reiber, D. Further Studies of in Source Fragmentation of Peptides in MALDI. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, 169 (170), 1-18.

Chang, W., Huang, L., Wang, Y., Peng, W., Chang H., Hsu, N., Yang, W. and Chen C., Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, 582 (1), 1-9.

Chen, C. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, 624 (1), 16-36.

Chen, S., Chen, L., Wang, J., Hou, J., He, Q., Liu, J., Wang, J., Xiong, S., Yang, G. y Nie, Z. 2,3,4,5-Tetrakis(3',4'-dihydroxyphenyl)thiophene: A New Matrix for the Selective Analysis of Low Molecular Weight Amines and Direct Determination of Creatinine in Urine by MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (23), 10291-10297.

Cole, R. (compilador-editor). *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: fundamentals, instruments, practicalities and biological applications*. Hossain, M. and Limbach P. Chapter 7: A comparison of MALDI matrices. Wiley Publications. Second Edition. New Jersey, USA. **2010**, 215-219.

Dalmasso, E., Casseñas, D. and Miller, S. Top-Down, Bottom- up. The merging of Two High Performance Technologies. *BioRadiations Laboratories*. 2009. Disponible en: [http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5908A.pdf](http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5908A.pdf). Fecha de acceso: 21 noviembre de 2013.

Demeure, K., Gabelica, V. and De Pauw, E. New Advances in the Understanding of the In-Source Decay Fragmentation of Peptides in MALDI-TOF-MS. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2010**, 21(11), 1906-1917.

Demeure, K., Quinton, L., Gabelica, V. and De Pauw E. Rational Selection of the Optimum MALDI Matrix for Top-Down Proteomics by In-Source Decay. *Anal Chem.* **2007**, 79 (22), 8678–8685.

Demirev, P., Feldman, A., Kowalski, P. y Lin, J. Top-Down Proteomics for rapid Identification of Intact Microorganism. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 77 (22), 7455-7461.

Departamento de química de la Universidad del Estado de Michigan: Espectrometría de Masas. Disponible en: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/MassSpec/mspec.htm>. Fecha de acceso: 14 de marzo 2015.

Dreisewerd, K. The desorption process in MALDI. *Chem Rev.* **2003**, 103 (2), 395-426.

Ehring, H., Karas, M. and Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27 (4), 472-480.

Fournier, I., Marinach, C., Tabet, J. and Bolbach, G. Irradiation effects in MALDI, ablation, ion production, and surface modifications. Part II: 2,5-dihydroxybenzoic acid monocrystals. *JASMS.* **2003**, 14(8), 893-899

Harvey, D. Review. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 226 (1), 1–35.

Heller, A. Organic Liquid Scintillators. VI. Substituted Distyrylbenzenes: Scintillation Properties and Spectra of Absorption and Fluorescence. *The Journal of Chemical Physics.* **1964**, 40 (10), 2839-2851.

Hercules, D. Polymer MS-MS by MALDI: some advances and some callenges. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 392 (4), 571-573.

Hillenkamp, F. and Katalinic J. MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. Editorial Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. **2007**, 1-5.

Karas, M. and Hillenkamp, F. and Bachmann. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.* **1985**, 57 (14), 2935-2939.

Karas, M. and Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of proteins with Molecular Masses Exceeding 10.000 Da. *Anal. Chem.* **1988**, 60 (20), 2299-2301.

Karas, M. and Krüger, R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (2), 427-40.

Karas, M. Bahr, U.; Strupat, K.; Hillenkamp, F., Tsarbopoulos, A. and Pramanik, K. B. Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 675–679.

Keller, N. Top-Down Proteomics. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 76 (11), 197A-203A.

Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst.* **2006**, **131** (9), 966-986.

Krause, J., Stoeckli, M. and Schlunegger, U. Studies on the Selection of New Matrices for Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, 10 (15), 1927-1933.

Laštovičková M., Chmelik J., and Bobalova J. The Combination of Simple MALDI Matrices for the Improvement of Intact Glycoproteins and Glycans Analysis. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 281 (1), 82-88.

Lennon, J. and Walsh, K. Direct sequence analysis of proteins by in-source fragmentation during delayed ion extraction. *Protein Society.* **1997**, 6 (11), 2446-2453.

Melhuish, W. Quantum Efficiencies of Fluorescence of Organic Substances: Effect of Solvent And Concentration Of The Fluorescent Solute. *J. Phys. Chem. A.*, **1961**, 65 (2), 229–235.

Protein Data Bank (RCSB): Biological Macromolecular Structures. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Fecha de acceso: 22 de marzo 2015.

Reiber, D., Grover, T. and Brown, R. Identifying Proteins Using Matrix-assisted Laser Desorption/ionization in-source Fragmentation Data Combined with Database Searching. *Anal. Chem.* **1998**, 70 (4), 673–683.

Rodríguez, E. Compuestos Cruciformes y Polímeros Dendronizados Basados en Bitiofeno y Fenilvinileno. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha España. Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica. **2013**.

Rodríguez, W., Sierra, C., Ochoa, C., Lahti, P. and Peón, J. Photoinduced Energy Transfer in Bichromophoric Pyrene–PPV Oligomer Systems: The Role of Flexible Donor–Acceptor Bridges. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116 (11), 3490–3503.

Rosales, H. Ensayo de compuestos con un núcleo de fenilvinileno como matrices MALDI. Directora: Marianny Yajaira Combariza. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. **2013**.

Rossi, D. and Sinz, M (Editores). O’Hair, R. Mass Spectrometry in Drug Discovery. Chapter 4. Ion Chemistry and Fragmentation. CRC Press. New York, USA. **2002**, 105-106.

Sakakura, M., and Takayama, M. In-source decay and fragmentation characteristics of peptides using 5-aminosalicylic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *JASMS.* **2010**, 21(6), 979–88.

Shah, B., Kozlowski, R., Han J., and Birchers, C. Emerging Mass Spectrometry-Based Technologies for Analyses of Chromatin Changes: Analysis f Histones and Histone Modifications. Ed. *Springer*. New York, USA. **2011** 7 (73), 259-261.

Sierra, C. and Lahti, P. A Photoluminescent, Segmented Oligo-Polypheylenevinylene Copolymer with Hydrogen-Bonding Pendant Chains. *Chem. Mater.* **2004**, 16 (1), 55–61.

Skoog, D., WEST, D. y HOLLER, F. Fundamentos de. Química Analítica. 6ª ed. Madrid, McGraw-Hill, **1995**.

Soltwisch, J., Jaskolla, T., Hillenkamp, F., Karas, M., and Dreisewerd, K. Ion Yields in UV-MALDI Mass Spectrometry As a Function of Excitation Laser Wavelength and Optical and Physico-Chemical Properties of Classical and Halogen-Substituted MALDI Matrixes. *Anal. Chem.* **2012**, 84 (15), 6567-6576.

Suckau, D. and Resemann, A. T3-Sequencing: Targeted Characterization of the N- and C-Termini of Undigested Proteins by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (21), 5817-5824.

Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle, A. A novel MALDI LIFT-TOF / TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem.* **2003**, 376(7), 952-65

Takayama, M. N-C $\alpha$  Bond Cleavage of the Peptide Backbone via Hydrogen Abstraction. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* **2001**, 12 (9), 1044-1049.

Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, Yoshida, Y. and Yoshida, T. Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2 (8), 151-153

The system Biology: Fragment Ion Calculator. Disponible en: <http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html> Fecha de acceso: 12 de marzo 2015.

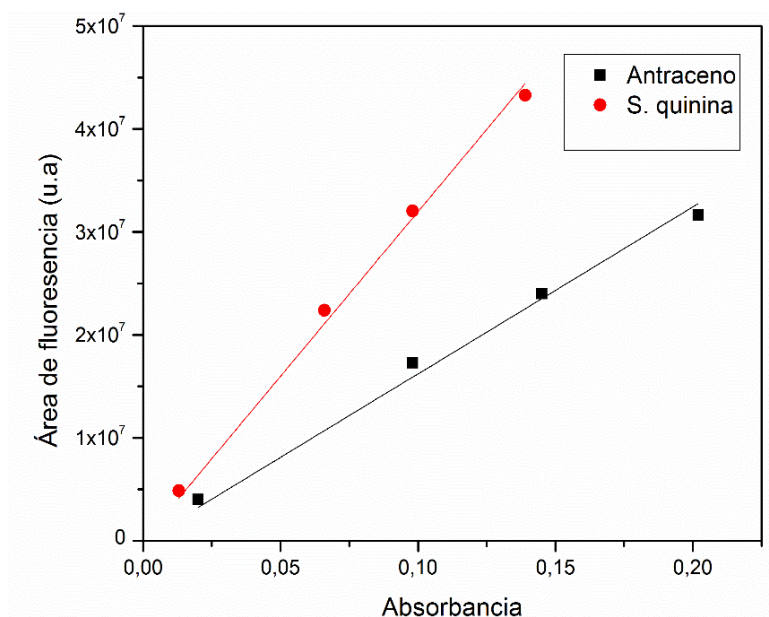
Xuemei, H., Aslanian, A. and Yates, J. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* **2008**, 12(5), 483–490.

Zhigilei, L., Yingling, Y., Itina, T., Schoolcraft T. and Garrison B., Molecular dynamics Simulations of Matrix-assisted Laser Desorption—connections to Experiment. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 226 (1), 85-106.

## ANEXOS

A. Los valores obtenidos de área fluorescente y de absorbancia para el sulfato de quinina y el antraceno (sustancias de referencia), se linealizaron (Véase **Figura 1**); y se determinó el valor de  $R^2$  (Véase **Tabla 1**).

**Figura 1.** Área de fluorescencia frente absorbancia de las sustancias de referencia: sulfato de quinina y antraceno.



**Tabla 1.** Valores de  $R^2$ , para la linealización del área de fluorescencia vs absorbancia para el sulfato de quinina y el antraceno.

Sustancia	$R^2$
Sulfato de quinina	0,99716
Antraceno	0,99842

B. La determinación de los rendimientos cuánticos radiativos en las sustancias de referencia, con porcentajes de error menores al 6%, permitieron determinar los rendimientos cuánticos radiativos y no radiativos de los sistemas FV.

**Tabla 2.** Rendimientos cuánticos de fluorescencia radiativos teóricos y experimentales del antraceno y el sulfato de quinina. Determinación del porcentaje de error

Sustancia	$\phi$ Radiativo experimental	$\phi$ radiativo teórico	% Error
Antraceno	0,286	0,27	6
Sulfato de quinina	0,509	0,54	5

C. Para poder asignar las señales obtenidas en espectrometría de masas MALDI-MSD para la insulina y el citocromo C (numeral 4), en cualquiera de las tres matrices empleadas, se realizó la fragmentación *in silico* del analito deseado. Por medio de una herramienta proteómica brindada por *institute for systems Biology*. Se tomó en consideración que el error de masa no superara los 60 ppm.

**Figura 2:** Reporte de iones teóricos de la cadena completa de insulina obtenidos con la base de datos del Institute for System Biology: Proteomic tools. Disponible en: <http://db.systemsbio.org.net:8080/proteomicsToolkit/>

D.

### Fragment Ion Calculator Results

Sequence: GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP  
KA, pI: 5.39483

#### Fragment Ion Table, monoisotopic masses

Seq	#	A	B	C	X	Y	Z	# (+1)
G	1	30.03442	58.02933	75.05588	-	5762.67133	5745.64478	51
I	2	143.11848	171.11340	188.13995	5731.62913	5705.64987	5688.62332	50
V	3	242.18690	270.18181	287.20836	5618.54507	5592.56580	5575.53925	49
E	4	371.22949	399.22440	416.25095	5519.47665	5493.49739	5476.47084	48
Q	5	499.28807	527.28298	544.30953	5390.43406	5364.45480	5347.42825	47
C	6	602.29725	630.29217	647.31872	5262.37548	5236.39622	5219.36967	46
C	7	705.30644	733.30135	750.32790	5159.36630	5133.38703	5116.36049	45
T	8	806.35412	834.34903	851.37558	5056.35711	5030.37785	5013.35130	44
S	9	893.38614	921.38106	938.40761	4955.30944	4929.33017	4912.30362	43
I	10	1006.47021	1034.46512	1051.49167	4868.27741	4842.29814	4825.27159	42
C	11	1109.47939	1137.47431	1154.50086	4755.19334	4729.21408	4712.18753	41
S	12	1196.51142	1224.50634	1241.53288	4652.18416	4626.20489	4609.17834	40
L	13	1309.59548	1337.59040	1354.61695	4565.15213	4539.17287	4522.14632	39
Y	14	1472.65881	1500.65373	1517.68028	4452.06807	4426.08880	4409.06225	38
Q	15	1600.71739	1628.71230	1645.73885	4289.00474	4263.02547	4245.99892	37
L	16	1713.80145	1741.79637	1758.82292	4160.94616	4134.96690	4117.94035	36
E	17	1842.84405	1870.83896	1887.86551	4047.86210	4021.88283	4004.85628	35
N	18	1956.88697	1984.88189	2001.90844	3918.81950	3892.84024	3875.81369	34
Y	19	2119.95030	2147.94522	2164.97176	3804.77658	3778.79731	3761.77076	33
C	20	2222.95949	2250.95440	2267.98095	3641.71325	3615.73398	3598.70744	32
N	21	2337.00241	2364.99733	2382.02388	3538.70406	3512.72480	3495.69825	31
F	22	2484.07083	2512.06574	2529.09229	3424.66114	3398.68187	3381.65532	30
V	23	2583.13924	2611.13416	2628.16070	3277.59272	3251.61346	3234.58691	29
N	24	2697.18217	2725.17708	2742.20363	3178.52431	3152.54505	3135.51850	28
Q	25	2825.24075	2853.23566	2870.26221	3064.48138	3038.50212	3021.47557	27
H	26	2962.29966	2990.29457	3007.32112	2936.42281	2910.44354	2893.41699	26
L	27	3075.38372	3103.37864	3120.40518	2799.36389	2773.38463	2756.35808	25
C	28	3178.39291	3206.38782	3223.41437	2686.27983	2660.30057	2643.27402	24
G	29	3235.41437	3263.40928	3280.43583	2583.27064	2557.29138	2540.26483	23
S	30	3322.44640	3350.44131	3367.46786	2526.24918	2500.26992	2483.24337	22
H	31	3459.50531	3487.50022	3504.52677	2439.21715	2413.23789	2396.21134	21
L	32	3572.58937	3600.58429	3617.61084	2302.15824	2276.17898	2259.15243	20
V	33	3671.65779	3699.65270	3716.67925	2189.07418	2163.09491	2146.06836	19
E	34	3800.70038	3828.69529	3845.72184	2090.00576	2064.02650	2046.99995	18
A	35	3871.73749	3899.73241	3916.75896	1960.96317	1934.98391	1917.95736	17
L	36	3984.82156	4012.81647	4029.84302	1889.92606	1863.94679	1846.92024	16
Y	37	4147.88488	4175.87980	4192.90635	1776.84199	1750.86273	1733.83618	15
L	38	4260.96895	4288.96386	4305.99041	1613.77867	1587.79940	1570.77285	14
V	39	4360.03736	4388.03228	4405.05883	1500.69460	1474.71534	1457.68879	13
C	40	4463.04655	4491.04146	4508.06801	1401.62619	1375.64692	1358.62037	12
G	41	4520.06801	4548.06293	4565.08947	1298.61700	1272.63774	1255.61119	11
E	42	4649.11060	4677.10552	4694.13207	1241.59554	1215.61628	1198.58973	10
R	43	4805.21171	4833.20663	4850.23318	1112.55295	1086.57368	1069.54713	9
G	44	4862.23318	4890.22809	4907.25464	956.45184	930.47257	913.44602	8
F	45	5009.30159	5037.29651	5054.32306	899.43037	873.45111	856.42456	7
F	46	5156.37001	5184.36492	5201.39147	752.36196	726.38269	709.35615	6
Y	47	5319.43333	5347.42825	5364.45480	605.29355	579.31428	562.28773	5
T	48	5420.48101	5448.47593	5465.50248	442.23022	416.25095	399.22440	4
P	49	5517.53378	5545.52869	5562.55524	341.18254	315.20327	298.17673	3
K	50	5645.62874	5673.62365	5690.65020	244.12978	218.15051	201.12396	2
A	51	5716.66585	5744.66077	-	116.03481	90.05555	73.02900	1

**D.Figura 3.** Reporte de iones teóricos del citocromo C, obtenidos con la base de datos del *Institute for System Biology: Proteomic tools*. Disponible en: <http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/>

### Fragment Ion Calculator Results

Sequence: **MGDVEKGGKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKGTQAPGFSY  
TDANKNKGITWGEEITLMEYLENPKKYIPGTKMIFAGIKKKGEREDLIAYL  
KKATNE.** pI: 9.51893

#### Fragment Ion Table, monoisotopic masses

Seq	#	A	B	C	X	Y	Z	# (+1)
M	1	104.05344	132.04836	149.07490	-	11697.06904	11680.04249	105
G	2	161.07490	189.06982	206.09637	11592.00782	11566.02855	11549.00201	104
D	3	276.10185	304.09676	321.12331	11534.98636	11509.00709	11491.98054	103
V	4	375.17026	403.16518	420.19172	11419.95941	11393.98015	11376.95360	102
E	5	504.21285	532.20777	549.23432	11320.89100	11294.91173	11277.88519	101
K	6	632.30782	660.30273	677.32928	11191.84841	11165.86914	11148.84259	100
G	7	689.32928	717.32419	734.35074	11063.75344	11037.77418	11020.74763	99
K	8	817.42424	845.41916	862.44571	11006.73198	10980.75272	10963.72617	98
K	9	945.51921	973.51412	990.54067	10878.63702	10852.65775	10835.63120	97
I	10	1058.60327	1086.59818	1103.62473	10750.54205	10724.56279	10707.53624	96
F	11	1205.67168	1233.66660	1250.69315	10637.45799	10611.47873	10594.45218	95
V	12	1304.74010	1332.73501	1349.76156	10490.38958	10464.41031	10447.38376	94
Q	13	1432.79867	1460.79359	1477.82014	10391.32116	10365.34190	10348.31535	93
K	14	1560.89364	1588.88855	1605.91510	10263.26259	10237.28332	10220.25677	92
C	15	1663.90282	1691.89774	1708.92428	10135.16762	10109.18836	10092.16181	91
A	16	1734.93993	1762.93485	1779.96140	10032.15844	10006.17917	9989.15263	90
Q	17	1862.99851	1890.99343	1908.01998	9961.12133	9935.14206	9918.11551	89
C	18	1966.00770	1994.00261	2011.02916	9833.06275	9807.08348	9790.05693	88
H	19	2103.06661	2131.06152	2148.08807	9730.05356	9704.07430	9687.04775	87
T	20	2204.11429	2232.10920	2249.13575	9592.99465	9567.01539	9549.98884	86
V	21	2303.18270	2331.17762	2348.20416	9491.94697	9465.96771	9448.94116	85
E	22	2432.22529	2460.22021	2477.24676	9392.87856	9366.89929	9349.87275	84
K	23	2560.32026	2588.31517	2605.34172	9263.83597	9237.85670	9220.83015	83
G	24	2617.34172	2645.33663	2662.36318	9135.74100	9109.76174	9092.73519	82
G	25	2674.36318	2702.35810	2719.38465	9078.71954	9052.74028	9035.71373	81
K	26	2802.45815	2830.45306	2847.47961	9021.69808	8995.71881	8978.69226	80
H	27	2939.51706	2967.51197	2984.53852	8893.60311	8867.62385	8850.59730	79
K	28	3067.61202	3095.60693	3112.63348	8756.54420	8730.56494	8713.53839	78
T	29	3168.65970	3196.65461	3213.68116	8628.44924	8602.46998	8585.44343	77
G	30	3225.68116	3253.67608	3270.70263	8527.40156	8501.42230	8484.39575	76
P	31	3322.73393	3350.72884	3367.75539	8470.38010	8444.40083	8427.37428	75
N	32	3436.77685	3464.77177	3481.79832	8373.32733	8347.34807	8330.32152	74
L	33	3549.86092	3577.85583	3594.88238	8259.28441	8233.30514	8216.27859	73
H	34	3686.91983	3714.91474	3731.94129	8146.20034	8120.22108	8103.19453	72
G	35	3743.94129	3771.93621	3788.96276	8009.14143	7983.16217	7966.13562	71
L	36	3857.02536	3885.02027	3902.04682	7952.11997	7926.14070	7909.11415	70
F	37	4004.09377	4032.08868	4049.11523	7839.03590	7813.05664	7796.03009	69
G	38	4061.11523	4089.11015	4106.13670	7691.96749	7665.98823	7648.96168	68
R	39	4217.21634	4245.21126	4262.23781	7634.94603	7608.96676	7591.94021	67
K	40	4345.31131	4373.30622	4390.33277	7478.84492	7452.86565	7435.83910	66
T	41	4446.35898	4474.35390	4491.38045	7350.74995	7324.77069	7307.74414	65
G	42	4503.38045	4531.37536	4548.40191	7249.70228	7223.72301	7206.69646	64
Q	43	4631.43902	4659.43394	4676.46049	7192.68081	7166.70155	7149.67500	63
A	44	4702.47614	4730.47105	4747.49760	7064.62224	7038.64297	7021.61642	62
P	45	4799.52890	4827.52382	4844.55037	6993.58512	6967.60586	6950.57931	61
G	46	4856.55037	4884.54528	4901.57183	6896.53236	6870.55309	6853.52654	60
F	47	5003.61878	5031.61369	5048.64024	6839.51089	6813.53163	6796.50508	59
S	48	5090.65081	5118.64572	5135.67227	6692.44248	6666.46322	6649.43667	58
Y	49	5253.71414	5281.70905	5298.73560	6605.41045	6579.43119	6562.40464	57
T	50	5354.76181	5382.75673	5399.78328	6442.34712	6416.36786	6399.34131	56
D	51	5469.78876	5497.78367	5514.81022	6341.29945	6315.32018	6298.29363	55
A	52	5540.82587	5568.82078	5585.84733	6226.27250	6200.29324	6183.26669	54
N	53	5654.86880	5682.86371	5699.89026	6155.23539	6129.25613	6112.22958	53
K	54	5782.96376	5810.95867	5827.98522	6041.19246	6015.21320	5998.18665	52
N	55	5897.00669	5925.00160	5942.02815	5913.09750	5887.11824	5870.09169	51
K	56	6025.10165	6053.09656	6070.12311	5799.05457	5773.07531	5756.04876	50
G	57	6082.12311	6110.11803	6127.14458	5670.95961	5644.98035	5627.95380	49
I	58	6195.20718	6223.20209	6240.22864	5613.93815	5587.95888	5570.93233	48
T	59	6296.25485	6324.24977	6341.27632	5500.85408	5474.87482	5457.84827	47
W	60	6482.33417	6510.32908	6527.35563	5399.80640	5373.82714	5356.80059	46
G	61	6539.35563	6567.35055	6584.37709	5213.72709	5187.74783	5170.72128	45
E	62	6668.39822	6696.39314	6713.41969	5156.70563	5130.72636	5113.69982	44
E	63	6797.44082	6825.43573	6842.46228	5027.66304	5001.68377	4984.65722	43
T	64	6898.48849	6926.48341	6943.50996	4898.62044	4872.64118	4855.61463	42
L	65	7011.57256	7039.56747	7056.59402	4797.57276	4771.59350	4754.56695	41
M	66	7142.61304	7170.60796	7187.63451	4684.48870	4658.50944	4641.48289	40
E	67	7271.65564	7299.65055	7316.67710	4553.44822	4527.46895	4510.44240	39
Y	68	7434.71896	7462.71388	7479.74043	4424.40562	4398.42636	4381.39981	38
L	69	7547.80303	7575.79794	7592.82449	4261.34229	4235.36303	4218.33648	37
E	70	7676.84562	7704.84054	7721.86708	4148.25823	4122.27897	4105.25242	36
N	71	7790.88855	7818.88346	7835.91001	4019.21564	3993.23637	3976.20982	35
P	72	7887.94131	7915.93623	7932.96278	3905.17271	3879.19345	3862.16690	34
K	73	8016.03627	8044.03119	8061.05774	3808.11995	3782.14068	3765.11413	33

K	73	8016.03627	8044.03119	8061.05774	3808.11995	3782.14068	3765.11413	33
K	74	8144.13124	8172.12615	8189.15270	3680.02498	3654.04572	3637.01917	32
Y	75	8307.19457	8335.18948	8352.21603	3551.93002	3525.95076	3508.92421	31
I	76	8420.27863	8448.27354	8465.30009	3388.86669	3362.88743	3345.86088	30
P	77	8517.33139	8545.32631	8562.35286	3275.78263	3249.80337	3232.77682	29
G	78	8574.35286	8602.34777	8619.37432	3178.72987	3152.75060	3135.72405	28
T	79	8675.40053	8703.39545	8720.42200	3121.70840	3095.72914	3078.70259	27
K	80	8803.49550	8831.49041	8848.51696	3020.66073	2994.68146	2977.65491	26
M	81	8934.53598	8962.53090	8979.55745	2892.56576	2866.58650	2849.55995	25
I	82	9047.62005	9075.61496	9092.64151	2761.52528	2735.54601	2718.51946	24
F	83	9194.68846	9222.68337	9239.70992	2648.44121	2622.46195	2605.43540	23
A	84	9265.72557	9293.72049	9310.74704	2501.37280	2475.39354	2458.36699	22
G	85	9322.74704	9350.74195	9367.76850	2430.33569	2404.35642	2387.32987	21
I	86	9435.83110	9463.82602	9480.85256	2373.31422	2347.33496	2330.30841	20
K	87	9563.92606	9591.92098	9608.94753	2260.23016	2234.25089	2217.22435	19
K	88	9692.02103	9720.01594	9737.04249	2132.13520	2106.15593	2089.12938	18
K	89	9820.11599	9848.11090	9865.13745	2004.04023	1978.06097	1961.03442	17
G	90	9877.13745	9905.13237	9922.15892	1875.94527	1849.96601	1832.93946	16
E	91	10006.18004	10034.17496	10051.20151	1818.92381	1792.94454	1775.91799	15
R	92	10162.28116	10190.27607	10207.30262	1689.88122	1663.90195	1646.87540	14
E	93	10291.32375	10319.31866	10336.34521	1533.78010	1507.80084	1490.77429	13
D	94	10406.35069	10434.34561	10451.37215	1404.73751	1378.75825	1361.73170	12
L	95	10519.43475	10547.42967	10564.45622	1289.71057	1263.73130	1246.70476	11
I	96	10632.51882	10660.51373	10677.54028	1176.62651	1150.64724	1133.62069	10
A	97	10703.55593	10731.55085	10748.57740	1063.54244	1037.56318	1020.53663	9
Y	98	10866.61926	10894.61417	10911.64072	992.50533	966.52606	949.49951	8
L	99	10979.70332	11007.69824	11024.72479	829.44200	803.46274	786.43619	7
K	100	11107.79829	11135.79320	11152.81975	716.35794	690.37867	673.35212	6
K	101	11235.89325	11263.88816	11280.91471	588.26297	562.28371	545.25716	5
A	102	11306.93036	11334.92528	11351.95183	460.16801	434.18875	417.16220	4
T	103	11407.97804	11435.97296	11452.99950	389.13090	363.15163	346.12508	3
N	104	11522.02097	11550.01588	11567.04243	288.08322	262.10395	245.07741	2
E	105	11651.06356	11679.05848	-	174.04029	148.06103	131.03448	1

E. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que los analitos presentaron mayor fragmentación con el 1,5-DAN. Por esta razón y teniendo en cuenta los factores que influyen en la segmentación ISD, se realizaron cambios en los tiempos de extracción de iones en la escala de nano segundos. Se observó para el caso particular del citocromo C un mejor tiempo para la obtención de iones 150 ns, (Véase **Figura 4**).

**Figura 4.** Espectros de masas MALDI-ISD del citocromo C usando 1,5-DAN como matriz realizando variación en los tiempos de extracción de iones: 10 [A], 30 [B], 60 [C], 100 [D], 150 [E], 200 [F] y 250 ns [G].

