

DESARROLLO DE UNA MATRIZ PARA ESPECTROMETRÍA DE MASAS
MALDI BASADA EN SISTEMAS TIPO FENILENVINILENO Y ÁCIDOS
ACRÍLICOS

LAURA JULIANA CASTELLANOS GARCÍA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA

2015

DESARROLLO DE UNA MATRIZ PARA ESPECTROMETRÍA DE MASAS
MALDI BASADA EN SISTEMAS TIPO FENILENVINILENO Y ÁCIDOS
ACRÍLICOS

LAURA JULIANA CASTELLANOS GARCÍA

Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en Química

Director

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA

Química, Ph.D.

Codirector

CRISTIAN BLANCO TIRADO

Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2015

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1 MARCO TEÓRICO	18
1.1 MARCO CONCEPTUAL	18
1.1.1 Espectrometría de masas MALDI	18
1.1.2 Mecanismo de ionización MALDI	19
1.1.3 Formación primaria de iones	20
1.1.4 Reacciones secundarias de ionización	21
1.2 ESTADO DEL ARTE	23
2 METODOLOGÍA	27
2.1 CÁLCULOS COMPUTACIONALES	27
2.1.1 Cálculos de potencial de ionización	27
2.1.2 Cálculos de afinidad protónica	28
2.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	28
2.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visible	28
2.2.2 Absortividad molar	29
2.2.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia	29
2.3 EXPERIMENTOS MALDI FV	30
2.3.1 Espectrometría de masas MALDI	30
2.3.2 Espectros LDI de los FV	31

2.3.3	Experimentos de protonación de los FV	32
2.3.4	Experimentos de cationización de los FV	32
2.3.5	Ionización de péptidos por transferencia protónica	33
2.3.6	Curvas de aparición de iones de los FV	33
2.3.7	Mediciones de autoejecución	33
2.3.8	Ionización de naftopireno usando matrices FV	34
2.3.9	Ionización de analitos modelo por TE	35
2.3.10	Ionización de analitos lábiles por TE	36
3	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE FENILENVINILENOS Y ÁCIDOS ACRÍLICOS	37
3.1	CÁLCULOS DE PI	38
3.1.1	Potenciales de ionización PAH	38
3.1.2	Potenciales de ionización FV	41
3.1.2.1	Potencial de ionización de FV sintetizados	41
3.1.2.2	Potencial de ionización de fenilenvinilenos candidatos	44
3.1.3	Potenciales de ionización AA	50
3.2	CÁLCULOS DE AP DE AA	52
4	PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE ÁCIDOS ACRÍLICOS Y FENILENVINILENOS	57
4.1	FV Y AA SINTETIZADOS	58
4.2	ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE	58
4.3	ABSORTIVIDAD MOLAR	65
4.4	RENDIMIENTO CUANTICO	68
5	ESTUDIO DE LA IONIZACIÓN MALDI CON MATRICES DE FENILENVINILENO	71

5.1	ESPECTROS LDI DE LOS FV	72
5.2	PROTONACIÓN Y CATIONIZACIÓN	74
5.3	CURVAS DE APARICIÓN DE IONES DE LA MATRIZ	76
5.4	IONIZACIÓN DEL NAFTOPIRENO USANDO MATRICES FV	80
5.5	IONIZACIÓN DE ANALITOS MODELO POR TE	87
5.5.1	Porfirina de Cobalto	87
5.5.2	Rubreno	91
5.5.3	Coroneno	95
5.5.4	Ftalocianina de zinc	98
5.5.5	Ftalocianina	99
5.6	LÍMITES DE DETECCIÓN	102
5.7	IONIZACIÓN DE ANALITOS LÁBILES	103
5.7.1	Porfirina Ph-Ni[ET-Py]	103
5.7.2	Porfirina Ni[Bu-Ph]	110
5.7.3	Porfirina [ET-Py]	113
6	CONCLUSIONES	115
7	DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	118
	REFERENCIAS	119

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Valores de PI para los PAH	39
Tabla 2	Valores de PI, HF, EPT y NIST para los PAH	40
Tabla 3	Valores de PI para los FV sintetizados	42
Tabla 4	Valores de PI para los isómeros de FV	45
Tabla 5	Valores de PI para los FV candidatos	48
Tabla 6	Valores de PI para los AA	51
Tabla 7	Valores de AP para los AA en los diferentes sitios de protonación	53
Tabla 8	Valores de AP para la serie de AA	56
Tabla 9	λ_{max} y corrimientos característicos de los FV	63
Tabla 10	λ_{max} y corrimientos característicos de los AA	65
Tabla 11	ϵ_{355nm} de los FV y algunas moléculas de referencia	67
Tabla 12	ϵ_{355nm} de los AA	67
Tabla 13	Límites de detección usando matrices FV	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de formación primaria de iones	21
Figura 2	Reacciones secundarias mediadas por agregados	22
Figura 3	Estructura de las moléculas de FV sintetizadas	59
Figura 4	Estructura de las moléculas de AA sintetizadas	60
Figura 5	Espectros de absorción UV-vis de los FV	62
Figura 6	Espectros de absorción UV-vis de los AA	64
Figura 7	Curvas de ϵ_{355nm} de los FV	66
Figura 8	Curvas de ϵ_{355nm} de los AA	68
Figura 9	Rendimiento cuántico de fluorescencia de los FV	69
Figura 10	Espectros de masas de los FV	73
Figura 11	Espectros de masas de las matrices MALDI tradicionales	75
Figura 12	Espectros del FV-Cl a diferentes energías del láser	77
Figura 13	Curvas de aparición de iones de los FV, abundancia	78
Figura 14	Curvas de aparición de iones de los FV, evaluación de S/N.	79
Figura 15	Espectros de masas del NP en LDI y con matrices FV	81
Figura 16	PI calculados de los FV y el NP	83
Figura 17	Variación de S/N para el NP con matrices FV	85
Figura 18	Estructura de los analitos de transferencia electrónica	88
Figura 19	Variación de S/N de la porfirina de cobalto con matrices FV	88

Figura 20	Espectros de masas de la porfirina de cobalto con matrices FV	90
Figura 21	Curvas de aparición de iones para la porfirina de cobalto	91
Figura 22	Variación de S/N del rubreno con matrices FV	92
Figura 23	Espectro de masas del rubreno con FV-CN	93
Figura 24	Curvas de aparición de iones para el rubreno	94
Figura 25	Variación de S/N del coroneno con matrices FV	96
Figura 26	Espectro de masas del coroneno en LDI y con FV-CN	97
Figura 27	Curvas de aparición de iones para el coroneno	98
Figura 28	Variación de S/N de la ftalocianina de zinc con matrices FV . .	100
Figura 29	Espectros de masas de la ftalocianina de zinc en LDI y FV-CN	100
Figura 30	Variación de S/N de la ftalocianina con matrices FV	101
Figura 31	Espectro de masas de la ftalocianina con FV-CN y FV-Cl . . .	101
Figura 32	Estructuras de los analitos lábiles	104
Figura 33	Curva de aparición de iones para el ión molecular Ph-Ni(ET-Py)	106
Figura 34	Espectros de masas de Ph-Ni(ET-Py) en LDI y con FV-Cl . . .	108
Figura 35	Curva de sobrevivencia de iones del Ph-Ni(ET-Py)	109
Figura 36	Curva de aparición de iones para el ión molecular del Ni(Bu-Ph)	111
Figura 37	Espectros de masas de Ni(Bu-Ph) en LDI y con FV-Cl	112
Figura 38	Curva de sobrevivencia de iones del Ni(Bu-Ph)	112
Figura 39	Curva de aparición de iones para el ión molecular del ET-Py .	114
Figura 40	Curva de sobrevivencia de iones del ET-Py	114

LISTA DE ABREVIATURAS

9,10-DPA 9,10-difenilantraceno

AA Ácido Acrílico

AP Afinidad Protónica

ACN Acetonitrilo

CHCA Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

DCTB trans-2-[3-(4-tert-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno manolonitrilo

DFT Density Functional Theory

DHB Ácido 2,5-dihidroxibenzóico

DMF N,N-Dimetilformamida

DMSO Dimetilsulfóxido

EPT Electron Propagator Theory

FV Fenilenvinileno

HF Hartree Fock

HOMO Highest Occupied Molecular Orbital

LDI Laser Desorption Ionization

MALDI Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

NP Naftopireno

PAH Polycyclic Aromatic Hydrocarbon

PI Potencial de Ionización

TE Transferencia Electrónica

TFA Trifluoroacetic Acid

THF Tetrahidrofurano

TOF Time of Flight

OLED Organic Light-emitting Diode

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE UNA MATRIZ PARA ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI BASADA EN SISTEMAS TIPO FENILENVINILENO Y ÁCIDOS ACRÍLICOS*

AUTOR: LAURA JULIANA CASTELLANOS GARCÍA†

PALABRAS CLAVE: ESPECTROMETRÍA DE MASAS, FENILENVINILENOS, MATRICES MALDI.

DESCRIPCIÓN:

La espectrometría de masas MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) es una de las técnicas analíticas más útiles en la caracterización de macromoléculas como proteínas, péptidos, polímeros, entre otros. El proceso MALDI está mediado por una matriz orgánica, la cual asiste en la ionización y desorción de los analitos. A la fecha, existen varios problemas asociados al uso de matrices MALDI tradicionales, como la interferencia en la caracterización de analitos de bajo peso molecular debido a la presencia de señales de clusters de la matriz a masas bajas, la formación de aductos matriz-analito, y la especificidad hacia la ionización de analitos básicos.

Los fenilvinileno y ácidos acrílicos son moléculas orgánicas con alta conjugación electrónica, que presentan altas absorptividades molares en la región cercana a la empleada en la ionización MALDI. En este proyecto, se desarrollaron nuevas matrices MALDI basadas en sistemas tipo fenilvinileno y ácidos acrílicos. Para orientar la síntesis de las nuevas matrices se utilizó una aproximación de diseño racional, utilizando cálculos de estructura electrónica, que permitieron predecir a priori algunas propiedades fisicoquímicas de las moléculas candidatas como los potenciales de ionización y las afinidades protónicas. Se seleccionaron las estructuras que presentaron las mejores características, y se procedió a su síntesis y caracterización. Las moléculas candidatas fueron sintetizadas por el Grupo de Investigación en Macromoléculas, de la Universidad Nacional de Colombia. Posteriormente, estas moléculas se evaluaron como matrices MALDI, usando una serie de analitos modelo. Adicionalmente, las matrices propuestas se compararon con matrices MALDI tradicionales como el CHCA y el DCTB. Este trabajo de tesis se enmarcó dentro del macroproyecto "Desarrollo de una matriz para espectrometría de masas MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) basada en sistemas tipo fenilvinileno" financiado por COLCIENCIAS mediante la convocatoria 569 de 2012.

*Trabajo de grado

†Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Marianny Yajaira Combariza, Química

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF A MASS SPECTROMETRY MALDI MATRIX BASED ON PHENYLENEVINYLENES AND ACRILIC ACID COMPOUNDS[‡]

AUTHOR: LAURA JULIANA CASTELLANOS GARCÍA[§]

KEYWORDS: MALDI MATRICES, PHENYLENEVINYLENES, MASS SPECTROMETRY.

DESCRIPTION

MALDI Mass Spectrometry (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) is one of the most useful analytical techniques in the characterization of macromolecules such as proteins, peptides, polymers, among others. The MALDI process is mediated by an organic matrix, which assists in the desorption and ionization of the analytes. There are several problems associated with the use of traditional MALDI matrices, such as interference in the characterization of analytes of low molecular weight, the formation of matrix-analyte adducts, and the bias toward basic analytes. In recent years MALDI matrices research has focused on the development of matrices that avoid the formation of clusters in the low mass region, and also in more acidic matrices that allow protonation of basic analytes, which are usually inaccessible.

Phenylenevinylenes and acrylic acids are organic molecules with high electron conjugation, and molar absorptivities close to the wavelengths used in MALDI. Rational design was used to guide the synthesis of the new matrices. The use of electronic structure calculations, like ionization potential and proton affinity, allowed to predict some physicochemical properties of potential candidates. Molecules that presented the best features were selected, and their synthesis and characterization was performed. Candidate molecules were synthesized by Macromolecules Research Group, at the National University of Colombia UNAL. Finally, these MALDI matrices were tested using a series of model analytes. Additionally, results were compared with traditional MALDI matrices, like CHCA and DCTB. This thesis is framed within the research project "Development of a matrix for MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) based on phenylenevinylene type molecules" funded by COLCIENCIAS by 569 grant of 2012.

[‡]Mastery Thesis

[§]Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Marianny Yajaira Combariza, Química

INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas MALDI es una de las técnicas analíticas más empleadas en el estudio de macromoléculas, como péptidos, proteínas y polímeros, entre otros [1]. En la técnica MALDI se requiere el uso de una matriz orgánica para absorber la radiación del láser y asistir la ionización y desorción los analitos de la muestra sólida [1–3]. A pesar del amplio uso de la técnica, el tipo de matrices usadas ha permanecido invariable desde hace más de 30 años [4, 5]. La investigación en nuevas matrices MALDI ha estado limitada al uso de análogos estructurales de las matrices tradicionales, como el ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico [4], el ácido 2,5-dihidroxibenzoico [6] y el ácido sinapínico [5].

El peso molecular de las matrices MALDI tradicionales varía entre 100 y 200 Da. Durante el proceso de ionización la matriz forma agregados y aductos que se observan en la región de masas bajas (de m/z 100 a 600). Estos iones generan interferencias que impiden el uso de la técnica MALDI para el análisis de analitos de bajo peso molecular como aminoácidos, alcaloides, carbohidratos, compuestos organometálicos entre otros [7, 8]. Para solucionar el problema de la superposición, algunos autores proponen el desarrollo de matrices con pesos moleculares por encima de 600 Da [9], o el uso de matrices de bajo peso molecular con diferentes patrones de interferencia en masas bajas, con el objetivo de evitar la superposición de las señales de un analito específico [7].

La mayoría de las matrices desarrolladas para MALDI corresponden a moléculas que permiten reacciones de transferencia protónica como el CHCA, DHB, ácido sinapínico, entre otros. Sin embargo, muy pocas matrices de transferencia electrónica han sido

propuestas. Entre los pocos ejemplos se destaca el 9-nitroantraceno [10], 9,10-difenilantraceno [11] y el trans-2-[3-(4-tert-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno (DCTB) [12]. Se han determinado varios inconvenientes asociados al uso de estas matrices, como la presencia de gran número de clusters en la región de masas bajas del DCTB y el 9-nitroantraceno [13], y la reactividad del DCTB con aminas alifáticas [14].

A pesar de las dificultades mencionadas, las matrices de transferencia electrónica tienen un gran potencial para el análisis de moléculas con bajo potencial de ionización, como hidrocarburos policíclicos aromáticos, compuestos organometálicos como porfirinas y ftalocianinas, entre otros [15, 16]. Por lo tanto el desarrollo de nuevas matrices de transferencia electrónica constituye una importante área de investigación en MALDI, con el potencial de expandir significativamente la aplicabilidad de esta técnica.

En este trabajo de investigación se propuso el desarrollo de nuevas matrices MALDI basadas en estructuras de tipo fenilvinileno (FV) y ácidos acrílicos (AA) para la ionización de analitos modelo. A través de un proceso de diseño racional y caracterización espectroscópica se escogieron un conjunto de moléculas candidatas basadas en estructuras tipo FV y AA y se comprobó su viabilidad como matrices efectivas de transferencia electrónica y protónica. Las moléculas de FV mostraron potenciales de ionización que oscilan entre 6,89 y 7,96 eV, dependiendo de los sustituyentes asociados al esqueleto de FV. Se determinó que los sustituyentes electroattractores proveen FV con altos valores de potencial de ionización, que son ideales para efectuar la ionización de analitos modelo. Por otro lado los cálculos computacionales de la serie de AA mostraron menor afinidad protónica en sustituyentes con sustitución α -CN.

La caracterización espectroscópica de los FV mostró muy buenos resultados, ya que se encontraron moléculas con absortividades molares muy superiores a las reportadas para el CHCA y DCTB a la longitud de onda del láser de 355 nm. Los valores de absortividad molar para los derivados de AA mostraron que la presencia de la funcionalidad α -CN es indispensable para aumentar la absortividad molar a 355 nm. Finalmente, los exper-

imientos de ionización de analitos modelo mostraron que las moléculas de FV permiten realizar procesos de transferencia electrónica muy eficientemente. Se determinaron aumentos de hasta 57 veces en la señal del analito usando matrices FV en comparación a la señal sin matriz. Adicionalmente, los FV fueron usados en el análisis de analitos lábiles obteniéndose a bajas energías del láser que es posible evitar la fragmentación del analito en un 100%

1 MARCO TEÓRICO

1.1 MARCO CONCEPTUAL

La técnica de desorción/ionización láser (LDI) fue introducida en los años 60, algunas moléculas como sales orgánicas de bajo peso molecular y moléculas orgánicas con propiedades absorptivas son fácilmente detectables por ésta técnica; sin embargo, la ionización de biomoléculas era prácticamente imposible por LDI [1]. En la década de los años 80, Michael Karas y Koichi Tanaka investigaron simultáneamente la ionización LDI asistida por matriz (MALDI). Karas trabajó en la co-cristalización del analito con una matriz orgánica para la ionización de analitos de bajo peso molecular [17] y Tanaka investigó el efecto de usar polvo fino de cobalto como matriz en la ionización de analitos de alto peso molecular. En 1998 Tanaka logró por primera vez ionizar analitos con pesos moleculares por encima de los 10.000 Da [18]. A partir de ese momento, MALDI se ha desarrollado como una técnica de ionización suave que ha permitido la caracterización de macromoléculas.

1.1.1 Espectrometría de masas MALDI

El proceso de ionización MALDI es comparativamente simple. Inicialmente, un pulso del láser se enfoca en una pequeña zona de la muestra, que está compuesta principal-

mente de los analitos co-cristalizados con una matriz que absorbe radiación a la longitud de onda de trabajo del láser [3, 19]. Tanto LDI como MALDI emplean la absorción de luz en una capa fina de muestra sólida, la longitud de onda del láser empleado comprende láseres de ultravioleta e infrarrojo. Mediante ciertos procesos que se describirán más adelante, se genera una nube densa de iones y moléculas neutras posterior a la irradiación de la muestra y los iones son extraídos y enfocados hacia el analizador de masas [1]. MALDI se acopla típicamente con analizadores de tiempo de vuelo (TOF), y debido al amplio rango de masas de estos analizadores, es posible la caracterización de macromoléculas. En la caracterización de analitos de masas por debajo de los 20.000 Da es posible usar un analizador TOF en modo reflectrón, el cual modifica la trayectoria lineal de los iones, incrementando considerablemente la resolución de las señales.

1.1.2 Mecanismo de ionización MALDI

Como se mencionó anteriormente, la etapa inicial del mecanismo MALDI ocurre por el impacto del láser sobre la superficie de los cristales de la matriz. El láser ocasiona dos fenómenos: (1) desorción e (2) ionización, que para efectos prácticos se pueden tratar independientemente. El disparo del láser desorbe de la superficie una nube de moléculas neutras y cargadas en forma de agregados, que reaccionan entre sí, y están sujetos a un proceso de expansión adiabática en la cual hay eliminación de solvente, rompimiento de agregados, reacciones de transferencia de protones o cationes, entre muchos otros fenómenos [1, 2, 20, 21]. La relación molar entre especies neutras e iones es del orden de 10^4 a 10^5 [1, 22], por lo tanto, la formación de iones en la nube se puede considerar un fenómeno minoritario.

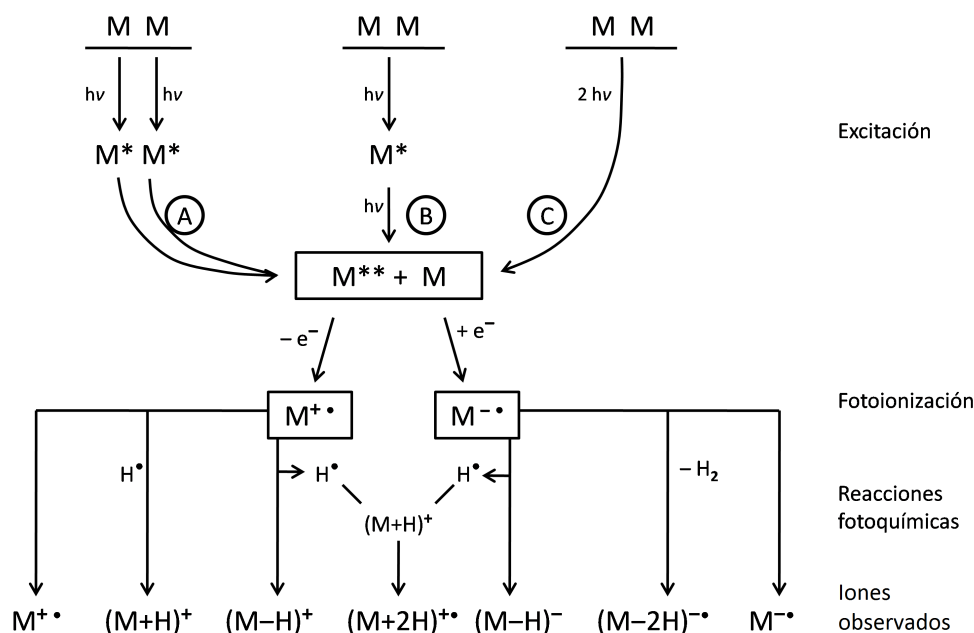
Existen algunos modelos que permiten explicar el fenómeno de desorción. En 1991, se propuso un mecanismo de presión pulsada (debido a la naturaleza pulsada del láser

MALDI) en el cual se genera vapor bajo la superficie del cristal, lo que causa un gradiente de presión en el sólido que permite transferir las moléculas a fase gaseosa [23]. En 1993, un modelo hidrodinámico permitió describir el calentamiento instantáneo de un sólido seguido de un proceso de sublimación, expansión y enfriamiento de la nube de vapor [24]. En 2010, el uso de un método fotofísico de dinámica molecular permitió calcular la temperatura, presión y velocidad de las moléculas durante la vaporización, los resultados obtenidos confirmaron los modelos descritos previamente [25]. La idea general del proceso de expansión adiabática se ha unificado y el mecanismo de desorción se considera muy bien descrito. Entre tanto el mecanismo de formación de iones en MALDI es un tema en debate. A la fecha, algunas teorías han sido aceptadas por la comunidad científica, sin embargo, ninguno de los modelos existentes permiten explicar en su totalidad el mecanismo de ionización MALDI. Es usual encontrar en la literatura que el mecanismo de formación de iones se presenta en dos procesos separados: (1) la formación primaria de iones y (2) las reacciones secundarias de ionización [1, 19, 20].

1.1.3 Formación primaria de iones

La formación primaria de iones de la matriz transcurre a través de un mecanismo conjunto en donde se pueden distinguir tres fenómenos fundamentales: (1) excitación, (2) fotoionización y (3) reacciones fotoquímicas, como se observa en la **Figura 1** [26]. Es usual observar en los espectros MALDI de la matriz: iones protonados, iones deprotonados, iones cationizados y cationes radicales [2, 3, 19]. La formación de cada una de estas especies depende de las condiciones experimentales y las propiedades intrínsecas de la matriz, como: potencial de ionización, afinidad protónica, entre otros [26]. La excitación de las moléculas de la matriz puede alcanzarse por varias rutas descritas en la **Figura 1**, las cuales son: (1) ionización multifotónica de un paso (ruta C), (2)

Figura 1: Mecanismo de formación primaria de iones. Donde M = Matriz MALDI. Figura tomada de: Hillenkamp [26].

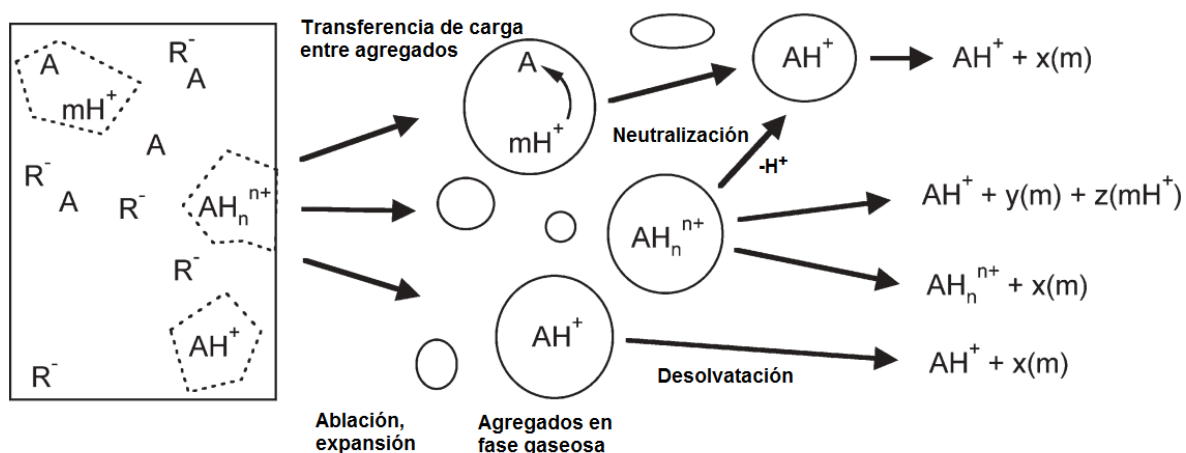


ionización multifotónica de dos pasos (ruta B) o (3) ionización por un proceso mancomunado de energía o *pooling* (Ruta A) [26]. Es importante resaltar, que a las frecuencias empleadas en MALDI, solo se consideran procesos de ionización multifotónicos de hasta dos fotones [2, 19]. Como producto del proceso de excitación obtenemos una molécula en un estado excitado (M^{**}) y una molécula en su estado basal (M). Posteriormente, puede ocurrir otro evento de *pooling* en el cual la molécula en un estado excitado superior M^{**} puede interactuar con otra molécula en estado excitado M^* para rendir un ión M^+ y una molécula en su estado basal [2].

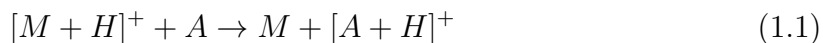
1.1.4 Reacciones secundarias de ionización

Una vez formados los iones primarios de la matriz, estos son susceptibles a reaccionar con las moléculas del analito. Estas reacciones son mediadas por agregados formados en la

Figura 2: Reacciones secundarias mediadas por agregados. Donde A=Analito, m=Matríz, R=Contra-ión genérico. Figura tomada de Knochenmuss [2]



nube de iones, durante el proceso de expansión adiabática. La **Figura 2** permite observar la formación de agregados propuesta por Knochenmuss [2], donde ocurren además procesos de desolvatación, neutralización, entre otros fenómenos. Las reacciones más comunes, que se llevan a cabo en los agregados corresponden a reacciones de transferencia protónica, reacciones de cationización y reacciones de transferencia electrónica. El tipo de reacción dominante depende de parámetros fisicoquímicos, tanto de la matriz como de los analitos involucrados. Las reacciones más comunes en MALDI son reacciones de transferencia protónica entre un ión protonado de la matriz $[M + H]^+$ y un analito neutro $[A]$ para rendir un ion protonado del analito $[A + H]^+$ y una molécula neutra de la matriz $[M]$, tal como se observa en la Ecuación 1.1.



Algunos analitos como péptidos y proteínas en su estado neutro tienen afinidades protónicas mayores de los 900 kJ/mol. Los valores de afinidad protónica de refer-

encia para una serie de aminoácidos han sido reportados por Harrison [27], y respaldan los valores asociados a los péptidos. Las afinidades protónicas de las matrices MALDI convencionales se encuentran entre los 850 kJ/mol y 900 kJ/mol [28–30]. Debido a la diferencia en afinidad protónica entre los péptidos y la matriz, se espera que en fase gaseosa ocurra una transferencia de protón desde la matriz protonada hacia el analito neutro, en el caso de aquellos analitos con mayores afinidades protónicas que la matriz.

1.2 ESTADO DEL ARTE

Las investigaciones sobre nuevas matrices de MALDI en modo positivo se basan principalmente en modificaciones de las matrices de uso común como el CHCA, DHB y ácido sinapínico. A partir de estas moléculas modelo, se han generado estructuras con diferentes sustituyentes que conservan los grupos funcionales ácidos, pero que presentan diferentes grados de modificación estructural [8, 31, 32]. Estas matrices derivadas conservan las propiedades de cristalización y conjugación electrónica de las matrices originales, lo cual las hace aptas para la desorción y ionización de compuestos en MALDI. El estudio de los mecanismos de cristalización de estas moléculas, por medio de difracción de rayos X, señala que la presencia de puentes de hidrógeno, enlaces dipolo-dipolo e interacciones π - π favorecen la cristalización de las moléculas susceptibles a ser consideradas como matrices de MALDI [31].

Reportes recientes acerca de nuevas matrices MALDI en modo positivo incluyen la modificación de algunas estructuras tradicionales, como las propuestas por Hopfgartner y colaboradores [7]. En este trabajo, se sintetizaron análogos estructurales del CHCA con dos y tres anillos fusionados. Esta innovación modifica el patrón de interferencia de la matriz a masas bajas permitiendo la caracterización de algunos analitos de bajo

peso molecular. Recientemente, Schinkovitz y colaboradores [33], propusieron el uso de diferentes estructuras basadas en anillos de tiofeno para la ionización selectiva de alcaloides, las cuales están desligadas estructuralmente de las matrices MALDI tradicionales. Zongxiu y colaboradores [9] sintetizaron una molécula totalmente novedosa, que corresponde al 2,3,4,5-tetrakis(3',4'-dihidroxiifenil)tiofeno, la cual tiene un peso molecular superior a 500 Da. Esta molécula es efectiva en la ionización de una gran serie de analitos de bajo peso molecular al no presentar ninguna señal en la zona del espectro correspondiente a masas bajas.

Adicionalmente, se ha investigado el uso de soluciones de baja volatilidad como posibles matrices MALDI [34]. Estas matrices se componen de una sustancia con alta absorción en el UV embebida en un líquido de baja volatilidad como el glicerol. Las nuevas matrices líquidas permiten evitar algunos efectos superficiales característicos de matrices sólidas, como la baja reproducibilidad pulso por pulso y el desgaste de la matriz en un punto específico. La condición para desarrollar este tipo de matrices líquidas es contar con una sustancia que posea absorción en el UV y que se pueda disolver en el líquido de baja volatilidad. En algunos casos es posible aumentar considerablemente la solubilidad de la sustancia con absorción en el UV mediante el uso de agentes que ayuden en el proceso de disolución; el uso de estos agentes se favorece, si hay formación de pares ácido-base entre la sustancia usada como matriz de MALDI y los ayudantes de disolución [34].

Se ha reportado el uso de varias moléculas como matrices de transferencia electrónica, la mayoría de ellas son compuestos aromáticos conjugados como el trans-2-[3-(4-terbutilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB) y el 9-nitroantraceno. Chait y colaboradores [16] obtuvieron señales de cationes radicales de ftalocianinas, porfirinas y arreglos multiporfirínicos usando 1,4-benzoquinona como matriz de transferencia

electrónica; por otro lado, Boltalina y colaboradores [10, 15] estudiaron la ionización de fluorofullerenos sintéticos en modo negativo usando 9-nitroantraceno y observaron en el espectro LDI pérdidas considerables de fluor en los fullerenos fluoro-sustituídos. Adicionalmente, Drewello y colaboradores [13], realizando el mismo experimento en modo positivo encontraron dos problemas fundamentales asociados al uso del 9-nitroantraceno como matriz. El primero se relaciona con una reacción de transferencia de oxígeno de la matriz al analito; y el segundo se asocia a la presencia de una cantidad abundante de clusters formados por interacciones $\pi - \pi$ en la región de m/z 220 a 880, interfiriendo con el análisis de analitos de bajo peso molecular.

En el 2000, Luftmann y colaboradores [12] introdujeron la matriz de transferencia electrónica más usada a la fecha, que se conoce comúnmente como DCTB, y es útil en la ionización de derivados de fullereno, [10, 12] polímeros [10, 35], porfirinas [16, 36], entre otros [37]. Las ventajas del DCTB sobre matrices como el 9-nitroantraceno se deben a las bajas fluencias requeridas para la formación de iones de la matriz y su habilidad para prevenir la fragmentación de analitos lábiles [12, 13, 16]. Sin embargo, se ha determinado que el DCTB puede formar aductos con analitos que contienen grupos amino. El carbono adyacente a los grupos de di-ciano metileno en el DCTB puede actuar como un electrófilo con aminas alifáticas primarias y secundarias formando iminas [14], y dificultando el análisis de estos analitos. Recientemente se reportó el uso del 9,10-difenilantraceno (9,10-DPA) como matriz MALDI para la ionización de analitos como la clorofila y el retinol [11]. El 9,10-DPA ha sido ampliamente empleado como OLED [38] y como reactivo en la disociación por transferencia electrónica [39]. No obstante, las propiedades del 9,10-DPA (potencial de ionización 7,0 eV y ϵ_{355nm} de $7.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [11], no son superiores a las reportadas para matrices de transferencia electrónica como el DCTB (potencial de ionización 8,2 eV [40] y ϵ_{355nm} de $33.980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [12])

A la fecha, los sistemas fenilvinileno (FV) han estado ausentes de los reportes científicos sobre nuevas matrices para MALDI. Este hecho representa una gran oportunidad para generar nuevo conocimiento con alto potencial tecnológico. El grupo de investigación en macromoléculas de la Universidad Nacional de Colombia, dirigido por el profesor Cesar Sierra, ha sintetizado un gran número de sistemas FV con propiedades optoelectrónicas finamente ajustadas según las necesidades fisicoquímicas de la aplicación tecnológica a desarrollar. Es así, como sistemas oligoméricos FV multicromofóricos han mostrado gran eficiencia en procesos de transferencia de energía [41, 42]; como fotocatalizadores de reacciones orgánicas, y como película activa en emisores de luz para tecnologías OLED. Los sistemas FV también han mostrado valores de absorptividad molar superiores a los $27.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y capacidad para formar estructuras cristalinas estables [43]. Todo lo anterior sugiere que los sistemas FV tienen gran potencial como matrices efectivas en MALDI.

2 METODOLOGÍA

2.1 CÁLCULOS COMPUTACIONALES

2.1.1 Cálculos de potencial de ionización

Se calculó el PI de una serie de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), fenilvinileno (FV), y ácidos acrílicos (AA) usando el método Hartree Fock (HF), como primera aproximación. Como segunda aproximación se usó el método del propagador electrónico (*Electron Propagator Theory* ó EPT) con el mismo conjunto base. El cálculo HF se inició con la optimización de geometría HF, posteriormente usando la aproximación de Koopmans [44, 45] se realizó el cálculo de los orbitales moleculares y se tomó el valor de la energía del HOMO como el valor del PI. Los cálculos EPT son cálculos de punto sencillo (*single point*), por lo que se requiere una optimización geométrica inicial, para la cual se tomó la geometría optimizada HF para alimentar el script EPT, siguiendo la metodología reportada por Ortiz [46, 47]. Posteriormente se calculó el valor de energía del HOMO a nivel EPT, que corresponde a la energía de ionización de las moléculas. Adicionalmente, debido a la gran cantidad de electrones que caracterizan los átomos de yodo, los cálculos de moléculas yodadas se realizaron usando el pseudopotencial LANL2DZ para los átomos de yodo y el conjunto base 6-311G(d,p) para los demás átomos, tal como se especifica en el método de Filimonov [48].

2.1.2 Cálculos de afinidad protónica

Los cálculos de afinidad protónica de la serie de AA se realizaron usando teoría del funcional de la densidad (*Density functional theory* ó DFT). Se usó el funcional B3LYP y el conjunto base 6-311G(2d,2p), según el método para el cálculo de afinidad protónica de matrices MALDI propuesto por Hoppilliard y Bourcier [49]. El cálculo se realizó en fase gaseosa, restando la diferencia energética entre la estructura optimizada del neutral y la estructura optimizada de la molécula protonada. En los derivados de AA que contienen más de un sitio de protonación, se calculó la afinidad protónica para cada uno de los respectivos sitios de protonación. En los cálculos de los derivados yodados de los AA, se usó el pseudopotencial LANL2DZ para los átomos de yodo como se especificó anteriormente. Todos los cálculos teóricos se realizaron usando el programa de química computacional GAUSSIAN 09 [50].

2.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

2.2.1 Espectroscopia ultravioleta-visible

Se prepararon soluciones equimolares de 12,5 μM de los FV y de 100 μM de los AA en dimetilsulfóxido (DMSO) y tetrahidrofurano (THF), respectivamente. Se realizó un barrido espectral de cada una de las soluciones entre 200 a 700 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401C de doble canal, usando DMSO como blanco.

2.2.2 Absortividad molar

El coeficiente de absortividad molar (ε) para cada molécula se determinó a partir de la pendiente de la curva linealizada en la gráfica de absorbancia vs concentración. Se empleó la ecuación de Beer–Lambert para soluciones diluidas, tal como se muestra en la Ecuación 2.1, donde A corresponde a la absorbancia, b al camino óptico de la celda, C a la concentración molar de la solución y ε al coeficiente de absorción molar a la longitud de onda específica de la medición (355 nm).

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad (2.1)$$

Se prepararon una serie de diluciones de cada compuesto en DMSO en el rango de 2 a 25 μM para la serie de FV, y en el rango de 5 μM a 9 mM, para la serie de AA. La absorbancia de cada una de las soluciones se midió a 355 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401C de doble canal. Se emplearon celdas de cuarzo de 10 mm de camino óptico. Se usó DMSO como blanco en la celda de referencia.

2.2.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se calcularon empleando la Ecuación 2.2, donde los subíndices x y ST denotan la muestra y el estándar, respectivamente; Φ corresponde al rendimiento cuántico de fluorescencia, m es la pendiente al graficar el área de emisión fluorescente vs absorbancia y η es el índice de refracción del solvente [51], tanto de la muestra como de las sustancias referencia.

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left(\frac{m_x}{m_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{ST}^2} \right) \quad (2.2)$$

Inicialmente se realizó un proceso de calibración, determinando el rendimiento cuántico del sulfato de quinina usando antraceno como estándar; y viceversa. Después de calibrar con los compuestos estándar, se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los FV, calculándolos con respecto a los fluoróforos de referencia. Se prepararon soluciones diluidas de los FV en dimetilformamida (DMF) de concentraciones entre 2 y 20 μM . Como fluoróforos de referencia se usaron antraceno y sulfato de quinina. Las soluciones de antraceno se prepararon en etanol, mientras las de sulfato de quinina se prepararon en H_2SO_4 0,1 M. Los rendimientos cuánticos de estas moléculas se encuentran ampliamente reportados en la literatura para los solventes anteriormente especificados [51]. La absorbancia de cada una de las soluciones se midió, a 355 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401C de doble canal utilizando celdas de cuarzo de 10 mm de camino óptico. Posteriormente, se tomó el espectro de emisión de fluorescencia de cada solución entre 360 nm y 700 nm, empleando 355 nm como longitud de onda de excitación. Estas mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM 40 usando una celda de cuarzo con camino óptico de 10 mm.

2.3 EXPERIMENTOS MALDI FV

2.3.1 Espectrometría de masas MALDI

Para todos los experimentos MALDI y LDI se usó un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF Bruker Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA). El instrumento está equipado con un láser Smart Beam de Nd:YAG (355 nm), con frecuencia de 1

kHz y una salida máxima de energía de aproximadamente $85 \mu\text{J}$ por disparo, un pulso de duración de 6 ns con ancho de spot de $10 \mu\text{m}$ a $100 \mu\text{m}$, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En general los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 3.000 en modo reflectrón usando voltaje de aceleración de 25 kV, con un pulso de extracción de 100 ns. La calibración del equipo en el rango de masas especificado se realizó usando las señales del CHCA y la serie de péptidos estándar: leucina-enkefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). El perfil de energía por pulso del láser se midió usando un medidor de atenuación PowerMax Wand USB (Coherent, Santa Clara, USA). Todos los resultados de medición de la energía por pulso del láser se determinaron a partir del promedio de diez mediciones.

2.3.2 Espectros LDI de los FV

Inicialmente, se prepararon soluciones saturadas de los FV en diferentes solventes: ACN:H₂O (2:1, v/v), metanol, acetonitrilo, acetona y THF. Se escogió THF como solvente de trabajo debido a que los FV son más solubles en este solvente y se obtiene una capa delgada y uniforme de la matriz en la superficie del portamuestras ó *target* de MALDI. El grosor de la película matriz:analito tiene gran impacto sobre la apariencia del espectro pues la formación de capas gruesas de la matriz causa dispersión espacial de los iones, pérdida de resolución y contaminación de la fuente. Para los experimentos LDI se prepararon soluciones 2,5 mM de cada FV en THF (grado analítico, Merck). 1 μL de la solución (2,5 nmoles) se aplicó sobre la superficie del *target* MALDI y se dejó secar en la cabina de extracción. Los espectros LDI (*Laser Desorption Ionization*) de iones positivos se adquirieron en modo reflectrón, haciendo un barrido en la región de m/z 180 a 2000. Se utilizaron energías de láser 5% por encima del umbral de ionización

para cada FV, con el fin de reducir la fragmentación y aumentar la resolución. Cada espectro reportado corresponde a la sumatoria de 2.000 espectros individuales, en 4 adquisiciones de 500 disparos.

2.3.3 Experimentos de protonación de los FV

Los experimentos de protonación se realizaron utilizando soluciones de ácido trifluoroacético (TFA), fórmico y acético en ACN:H₂O (2:1, v/v). Se usaron dos concentraciones de cada uno de los tres ácidos estudiados: 5 y 10% para el TFA, 10 y 30%, para el ácido fórmico, 30 y 60%, para el ácido acético. Se prepararon soluciones saturadas de los FV en los solventes ACN:H₂O (2:1, v/v) acidificados con la cantidad de ácido correspondiente. Posteriormente, se aplicó 1 μ L de la solución del FV sobre el *target* y se dejó secar.

2.3.4 Experimentos de cationización de los FV

Se prepararon soluciones saturadas de los FV en ACN:H₂O (2:1, v/v). Se escogieron los cationes más usados en los procesos de cationización en MALDI [52] y se usaron las sales disponibles en el laboratorio. Se prepararon soluciones 30 mM de AgBF₄, LiOH, Na₂CO₃ y KCl en agua desionizada. Se mezclaron iguales volúmenes de ambas soluciones, tanto las soluciones del FV como las soluciones de cationización, la mezcla se agitó en el vortex a 1500 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se aplicó 1 μ L de la solución en el *target* y se dejó secar.

2.3.5 Ionización de péptidos por transferencia protónica

Se prepararon soluciones saturadas de la matriz (FV) en THF con 0.1% de TFA. Como analito se usó una mezcla equimolar de los péptidos: leucina-encefalina, bradiquinina, bombesina y substrato de renina en THF (0,1% TFA). Se mezclaron volúmenes iguales de solución de la matriz y el analito, la mezcla resultante se agitó a 1500 rpm durante 15 min y se aplicó 1 μ L de la mezcla sobre el *target* y se dejó secar.

2.3.6 Curvas de aparición de iones de los FV

Para construir las curvas de aparición de iones se tomaron los espectros de cada matriz variando la energía por pulso del láser entre 0,14 y 2,5 μ J por pulso. Cada espectro corresponde a la sumatoria de 2.000 espectros individuales acumulados, adquiridos usando el método de autoejecución que se describe a continuación. Para las mediciones se usó el equipo MALDI-TOF descrito en las secciones anteriores. En la determinación de las curvas de aparición de iones se tomaron 5 espectros por cada valor de energía por pulso (se usaron energías de: 0,14, 0,17, 0,22, 0,27, 0,34, 0,40, 0,47, 0,59, 0,72, 0,88, 1,09, 1,33, 1,61, 1,93 y 2,32 μ J/pulso) con el fin de determinar el promedio y el error asociado a la medición.

2.3.7 Mediciones de autoejecución

Se considera que en condiciones MALDI normales puede existir una variabilidad de las señales hasta de un 30%. Por lo tanto dos señales que difieran en menos de 30%, en términos de la relación señal ruido no pueden considerarse significativamente diferentes. Con el objetivo de asegurar una toma de datos imparcial se usó un método de autoeje-

cución en MALDI que está incluido en el software FlexControl (Bruker, Billerica, USA) del instrumento. El método de autoejecución usa un algoritmo de muestreo aleatorio en el cual el láser emite 10 pulsos en las mismas coordenadas espaciales, posteriormente el láser se mueve a otra posición aleatoria y emite otros 10 pulsos más, el proceso continúa hasta que se completan la cantidad de pulsos requeridos, en este caso 500. Cuando se suman los resultados de los 500 pulsos el programa realiza una autoevaluación del espectro en términos de relación señal ruido y resolución de las señales en un rango de masas definido (relación señal ruido mayor a 100, resolución mayor a 100 en el rango de masas de m/z 100 a 3.000). Si el espectro de 500 pulsos cumple los parámetros especificados en el método se adiciona al espectro final, si no cumple con los parámetros, el programa realiza otra adquisición aleatoria y autoevalúa el nuevo espectro, hasta completar 4 adquisiciones de 500 pulsos que corresponden a 2.000 espectros. Después de 30 intentos fallidos el programa aborta el proceso de adquisición. El análisis de los datos se realizó usando el software FlexAnalysis (Bruker, Billerica, MA, USA). El software reporta automáticamente la relación señal ruido, abundancia y resolución, entre otros parámetros.

2.3.8 Ionización de naftopireno usando matrices FV

Se prepararon soluciones 2,5 mM de cada una de las matrices FV en THF. Las soluciones de FV-COOH, FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃ se sometieron a ultrasonido durante dos horas, las otras matrices FV se sometieron a ultrasonido por 30 minutos. Se preparó una solución stock de naftopireno (NP) 2,5 mM y se diluyó hasta obtener soluciones 0,25 mM, 25 μ M, 2,5 μ M y 0,25 μ M. Posteriormente se mezclaron iguales volúmenes de la solución de la matriz con la solución correspondiente del analito, para rendir mezclas en relaciones molares analito:matriz 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Las mezclas del

analito con la matriz se agitaron a 1500 rpm durante 15 minutos y posteriormente se aplicó 1 μL de esta solución en el target de MALDI.

2.3.9 Ionización de analitos modelo por TE

Se prepararon soluciones 2,5 mM de cada una de las matrices de FV en THF. Las soluciones de FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃ se sometieron a ondas de ultrasonido durante dos horas para asegurar la disolución efectiva de los FV en el solvente. Las moléculas FV-CN, FV-Cl y DCTB (usado como matriz de referencia) se sometieron a ultrasonido durante 30 min. Se usaron 5 analitos diferentes que corresponden a: porfirina de cobalto, rubreno, coroneno, ftalocianina de zinc, y ftalocianina.

Se prepararon soluciones 2,5 mM de cada uno de los analitos en THF y se hicieron tres diluciones de concentraciones 25, 5 y 2,5 μM de cada uno de los analitos, con el objetivo de obtener relaciones molares analito:matriz de 1:100, 1:500, y 1:1000, respectivamente. Las muestras se prepararon usando el método de gota seca ó *dried droplet*, por lo tanto, se mezclaron 15 μL de la matriz (2,5 mM), con 15 μL del analito (en cada una de las tres concentraciones estudiadas) y se mezclaron en el vortex 15 min a 1500 rpm.

Se aplicaron cinco puntos o *spots* de cada muestra, para cada uno de los analitos, a cada una de las relaciones molares analizadas. Para la adquisición automática de los espectros de masas se usó el método de autoejecución previamente descrito. Se tomaron los espectros de masas en el rango de m/z 100 a 2.000. Cada espectro corresponde a 2.000 espectros, tomados en 4 adquisiciones de 500 disparos cada una. Las gráficas de barras en las que se varió la relación molar, se realizaron a una energía por pulso de láser fija de 0,88 μJ , cada valor corresponde a un valor promedio de cinco adquisiciones. Las curvas de aparición de iones se construyeron variando la energía del láser de 0,4 a

1,33 μJ , tomando cinco espectros por cada valor de energía por pulso para cada matriz, el valor central corresponde al valor promedio con el respectivo error estándar de la media.

2.3.10 Ionización de analitos lábiles por TE

Se prepararon soluciones 2,5 mM de cada una de las matrices de FV en THF, y se sometieron a ultrasonido como se explicó anteriormente. Se usaron 3 analitos lábiles modelo de asfalteno, sintetizados en la universidad de Calgary. Se prepararon soluciones 2,5 mM de cada uno de los analitos en THF y se hicieron tres diluciones de concentraciones 25 μM , 2,5 μM y 0,25 μM de cada uno de los analitos, con el objetivo de obtener relaciones molares analito:matriz de 1:10, 1:100, y 1:1000, respectivamente. Las muestras se prepararon usando el método de gota seca ó *dried droplet*, por lo tanto, se mezclaron 15 μL de la matriz (2,5 mM), con 15 μL del analito (en cada una de las tres concentraciones estudiadas) y se mezclaron en el vortex durante 15 min a 1500 rpm. Se aplicaron cinco *spots* de cada muestra, para cada uno de los analitos, a cada una de las relaciones molares. Para la adquisición automática de los espectros de masas se usó el método de autoejecución previamente descrito. Se tomaron los espectros de masas en el rango de m/z 100 a 3.000. Cada espectro corresponde a 2.000 espectros, tomados en 4 adquisiciones de 500 disparos cada una. Las curvas de aparición y sobrevivencia de iones se construyeron variando la energía del láser de 0,4 μJ a 2,88 μJ , tomando cinco espectros por cada valor de energía por pulso para cada matriz, el valor central corresponde al valor promedio con el respectivo error estándar de la media.

3 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE FENILENVINILENOS Y ÁCIDOS ACRÍLICOS

En este capítulo, se reportan los cálculos computacionales de algunas propiedades físicoquímicas de estructuras de FV y AA. Las propiedades calculadas corresponden a los PI y AP de una serie de FV y AA en fase gaseosa. Adicionalmente, se calcularon estas propiedades para una serie de analitos de PAH. La determinación del PI (teórico) de las moléculas candidatas y los analitos modelo es fundamental para determinar si los procesos de transferencia electrónica con los analitos modelo son energéticamente favorables. De la misma manera se realizaron cálculos de AP para moléculas susceptibles a ser usadas como matrices de transferencia protónica, ya que en MALDI el proceso de transferencia protónica solo es posible si la AP del analito es mayor que la de la matriz. Los cálculos de PI se llevaron a cabo usando la aproximación de Koopmans en fase gaseosa. Con el objetivo de comparar el efecto de la correlación electrónica, los cálculos de PI se realizaron por Hartree-Fock (HF) y *Electron Propagator Theory* (EPT). Se observó, que los valores EPT son más cercanos a los valores experimentales reportados en la base de datos NIST para la serie de PAH. Los cálculos EPT provéen un valor más exacto del PI, debido a que se incluye correlación electrónica en el metodo de cálculo. Los cálculos de afinidad protónica se realizaron en fase gaseosa usando DFT.

3.1 CÁLCULOS DE PI

Los primeros resultados de los cálculos de PI arrojaron que se requiere en promedio 12 veces más capacidad de cómputo para los cálculos EPT en comparación a los cálculos HF. Debido al costo computacional de los cálculos EPT, se decidió calcular los valores EPT de moléculas ya sintetizadas, y usar los cálculos HF como un sistema predictivo para estructuras de FV susceptibles a ser sintetizadas, que corresponden a un número mayor de estructuras en referencia a las estructuras sintetizadas. Los cálculos realizados se dividieron en tres grupos principales, que corresponden a: hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), fenilvinileno (FV) y ácidos acrílicos (AA).

3.1.1 Potenciales de ionización PAH

Como se especificó anteriormente es indispensable determinar los valores de PI de la matriz y el analito, con el objetivo de predecir si los procesos de transferencia electrónica en fase gaseosa son favorables. Iniciaremos el análisis de los cálculos de potencial de ionización con la serie de PAH debido a que estos valores experimentales se encuentran ampliamente reportados en la literatura y esto nos permite correlacionar los valores calculados con los valores experimentales. Las estructuras y los valores de PI calculados tanto por HF como por EPT con propagador de tercer orden se encuentran reportados en la **Tabla 1**.

La **Tabla 1** muestra la diferencia entre los valores HF y EPT. Con el objetivo de determinar cual de los valores provee una mejor aproximación se deben comparar

Tabla 1: Valores de PI para los PAH

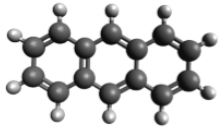
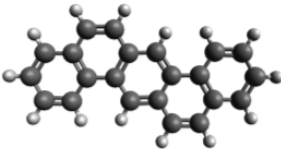
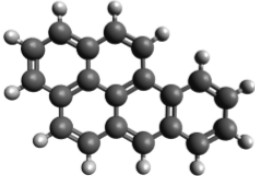
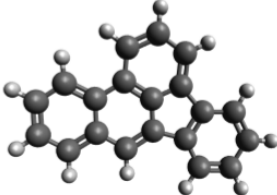
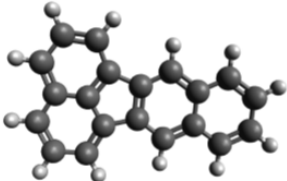
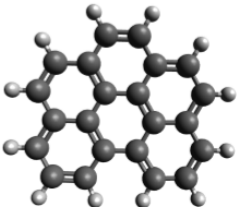
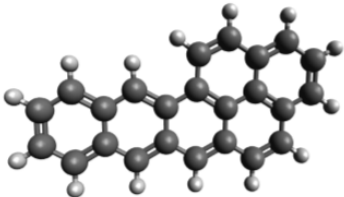
PAH	Estructura	PI HF	PI EPT
Antraceno		7,17	7,42
Dibenz[a,h]Antraceno		7,31	7,44
Benzo[a]Pireno		6,91	7,18
Benzo[b]Fluoranteno		7,70	7,81
Benzo[k]Fluoranteno		7,31	7,46
Benzo[ghi]Perileno		6,95	7,23
Nafto[2,3-a]Pireno		6,61	6,89

Tabla 2: Valores de PI, HF, EPT y NIST para los PAH

Molecula	HF	EPT		NIST	Error HF		Error EPT	
	P0 [eV]	P2 [eV]	P3 [eV]	[eV]	[eV]	[%]	[eV]	[%]
Antraceno	7,17	6,95	7,42	7,43	0,26	3,54	0,01	0,20
Dibenz[a,h]Antraceno	7,31	6,91	7,44	7,39	0,08	1,13	0,05	0,64
Benzo[a]Pireno	6,91	6,64	7,18	7,12	0,21	3,02	0,06	0,79
Benzo[b]Fluoranteno	7,70	7,25	7,81	7,80	0,10	1,25	0,01	0,18
Benzo[k]Fluoranteno	7,31	6,94	7,46	7,48	0,17	2,31	0,02	0,33
Benzo[ghi]Perileno	6,95	6,67	7,23	7,17	0,22	3,11	0,06	0,83
Nafto[2,3-a]pireno	6,61	6,34	6,89	6,82	0,21	3,01	0,07	1,08

estos valores con los valores de PI reportados. Tanto los valores calculados por HF como por EPT corresponden al PI de la transición vertical en fase gaseosa, tomando la geometría de la molécula neutra. La espectroscopia fotoelectrónica es el método ideal para la determinación experimental de los potenciales de ionización vertical, por esta razón los cálculos obtenidos se compararon con los valores experimentales de PI reportados en la base de datos NIST [53].

La **Tabla 2** muestra de forma más detallada los valores obtenidos tanto por HF como por EPT a los niveles de perturbación P0, P2 y P3 con el mismo conjunto base 6-311G(d,p). La teoría del propagador electrónico EPT permite realizar cálculos de correlación electrónica a partir de perturbaciones que pueden ser de varios ordenes P0, P2, P3 y difieren en el número de ecuaciones que describen estas perturbaciones, siendo las perturbaciones de tercer orden P3 las que más se acercan al resultado exacto al incluir más terminos perturbativos [46]. El nivel de cálculo HF es una aproximación de campo medio, y no tiene en cuenta la correlación electrónica en los cálculos, por lo tanto tiene orden de perturbación zero y se conoce como P0.

En la **Tabla 2** se pueden observar los porcentajes de error asociados al cálculo HF y EPT, en referencia a los valores NIST [53], que corresponden a valores determinados

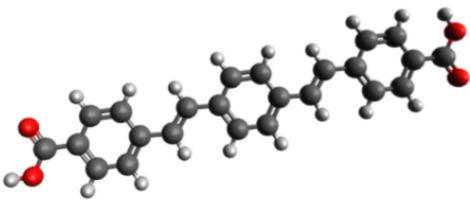
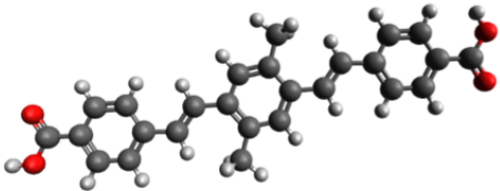
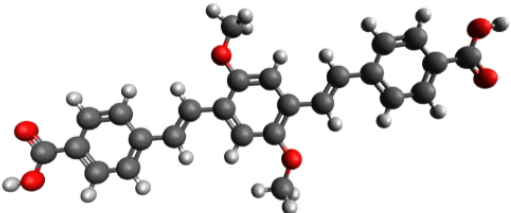
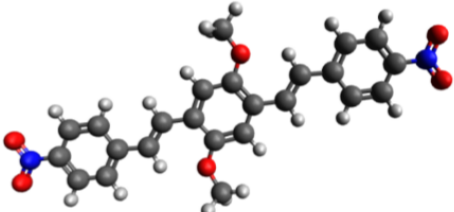
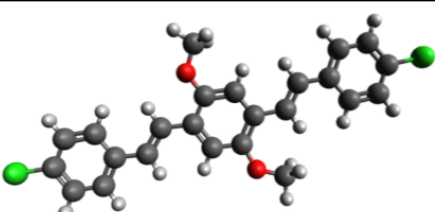
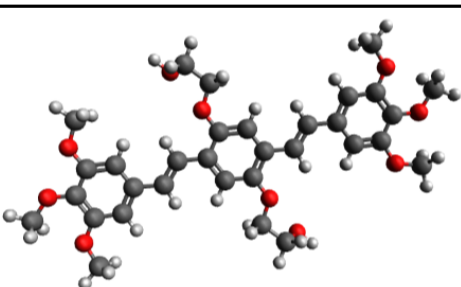
experimentalmente por espectroscopia fotoelectrónica. El error reportado del cálculo EPT se calcula usando el valor P3 en comparación con el valor NIST. Se encuentra que el error en el cálculo de HF en comparación al valor experimental oscila entre 1,13% a 3,54%, mientras el error asociado al valor EPT oscila entre 0,18% a 1,08%. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que un aumento en el orden perturbativo hace que los valores se acerquen más al valor real [46, 47]. Los cálculos EPT de tercer orden son los más exactos y proveen la mejor descripción posible del potencial de ionización con el menor error asociado.

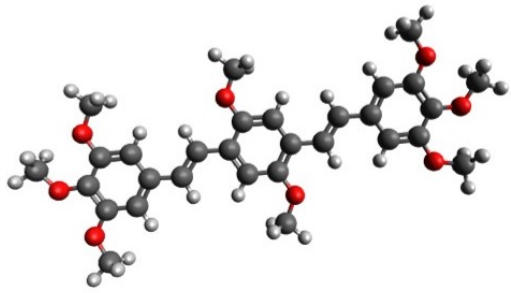
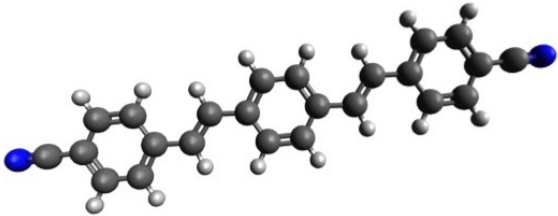
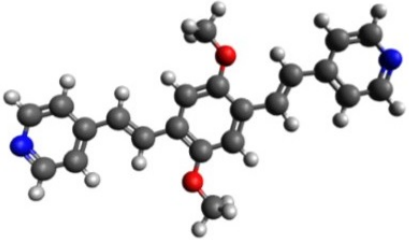
3.1.2 Potenciales de ionización FV

3.1.2.1 Potencial de ionización de FV sintetizados

Las estructuras de los FV sintetizados y los valores de PI determinados por EPT y HF se observan en la **Tabla 3**. Se encuentra que los valores HF difieren ampliamente de los valores EPT. No es posible hacer una correlación de estos valores con valores experimentales ya que los PI de transiciones verticales de los FV no se encuentran reportados en la literatura. Por otro lado, se encontró en la base de datos NIST el valor del PI correspondiente al estilbena, el cual posee un fenilo y un puente vinilo menos que el esqueleto de FV. El valor NIST reportado para el PI del estilbena corresponde a 7,70 eV [53], los valores calculados HF y EPT corresponden a 7,63 eV y 7,71 eV, respectivamente. Se encontró que para el estilbena el valor EPT es más exacto que el valor HF, al igual que para la serie de PAH.

Tabla 3: Valores de PI para los FV sintetizados

Fenilenvinileno	Estructura	PI HF	PI EPT
FV-COOH		7,77	7,78
FV-COOH-CH ₃		7,85	7,80
FV-COOH-OCH ₃		7,41	7,29
FV-NO ₂		7,70	7,60
FV-Cl		7,46	7,39
FV-OH		7,25	7,08

Fenilenvinileno	Estructura	PI HF	PI EPT
FV-OCH ₃		7,03	6,88
FV-CN		7,94	7,96
FV-PYR		7,47	7,38

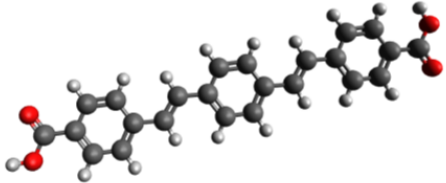
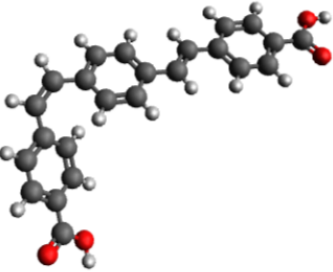
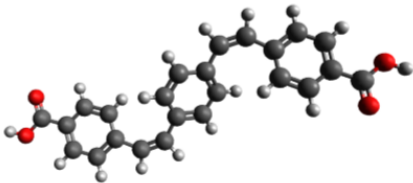
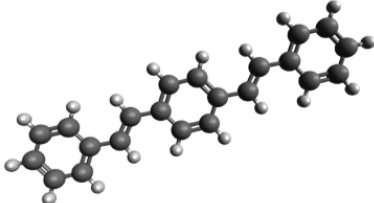
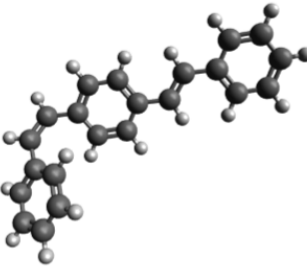
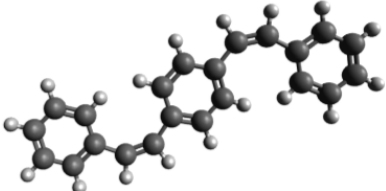
La **Tabla 3** muestra que algunos de los FV sintetizados poseen PI que alcanzan valores de 7,9 eV, lo que permite realizar procesos de transferencia electrónica efectivos a PAH, que poseen PI en el orden de 6,0 eV a 7,8 eV, y a porfirinas y ftalocianinas que poseen PI en el orden de 6,0 eV a 7,5 eV. La **Tabla 3** muestra que los PI de los FV sintetizados pueden variar entre 6,8 eV hasta 7,9 eV, la variación en el PI de los FV sintetizados está en el orden de 1 eV. Estas variaciones se deben a los diferentes sustituyentes de la estructura de los FV. Según la **Tabla 3** las estructuras con sustituyentes electroattractores como el FV-COOH, FV-CN y FV-NO₂, presentan los PI mas altos de la serie, por otro lado las estructuras con sustituyentes electrodonadores como los grupos -OCH₃ y -CH₃, presentan los PI mas bajos. La donación de densidad electrónica por parte de los grupos electrodonadores permite estabilizar el catión radical resultante por la pérdida del electrón. Por lo tanto, el PI es menor en estructuras con grupos electrodonadores.

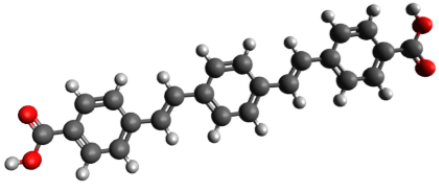
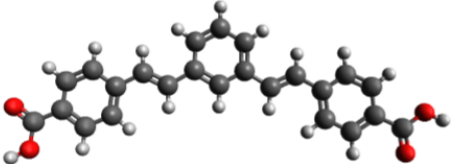
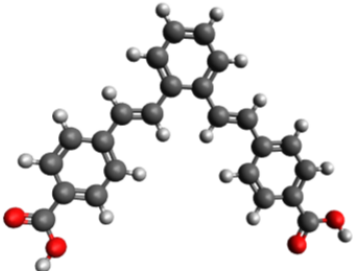
3.1.2.2 Potencial de ionización de fenilenvinilenos candidatos

Se calculó el potencial de ionización a una serie de fenilenvinilenos candidatos con el objetivo de guiar la síntesis de los FV hacia la búsqueda de estructuras con alto PI. Inicialmente se variaron las conformaciones de dos estructuras de fenilenvinileno que corresponden a FV-COOH y F-H, se realizó el cálculo a los isómeros geométricos trans-trans, trans-cis y cis-cis. Posteriormente se variaron las posiciones de sustitución y se realizó el cálculo de los isómeros estructurales orto, meta y para de las estructuras FV-COOH, tal como se observa en la **Tabla 4** y se encontró en el análisis de estas moléculas que el potencial de ionización no se afecta considerablemente entre isómeros geométricos ni isómeros estructurales.

El análisis de los valores de PI de los isómeros geométricos del FV-COOH (ver **Tabla 4**), mostró que el valor de PI varía de 7,77 eV a 7,63 eV entre el isómero de mayor y menor valor de PI del FV-COOH, es decir entre el isómero trans-trans y el isómero cis-trans. La diferencia entre ambos potenciales de ionización es de 0,14 eV, el cambio en el PI es pequeño en comparación con el cambio en el PI al efectuar diversas sustituciones sobre el esqueleto de FV, como al adicionar otros grupos sustituyentes. Por otro lado, los valores correspondientes al PI de los isómeros del FV-H varían entre 7,09 a 7,39 eV para el isómero trans-trans y el isómero cis-cis, respectivamente, lo que corresponde a una variación de 0,3 eV, que es una modificación pequeña del valor de PI entre estos isómeros. Adicionalmente, se determinó la variación en el valor del PI entre los isómeros estructurales orto, meta y para del FV-COOH, se encontró que el valor de PI oscila entre 7,79 eV y 7,61 eV, para los isómeros meta- y para-, respectivamente, lo que corresponde a una pequeña variación de 0,18 eV entre el isómero de mayor y menor PI.

Tabla 4: Valores de PI para los isómeros de FV

Fenilvinilenos Candidatos	Estructura	PI HF
FV-COOH Trans-Trans		7.77
FV-COOH Cis-Trans		7.63
FV-COOH Cis-Cis		7.72
FV-H Trans-Trans		7.09
FV-H Cis-Trans		7.19
FV-H Cis-Cis		7.39

Fenilvinileno Candidatos	Estructura	PI HF
FV-COOH-Para		7.61
FV-COOH-Meta		7.79
FV-COOH-Orto		7.73

Los valores de PI no se modifican considerablemente entre isómeros geométricos o estructurales. Los cambios de PI entre isómeros estructurales y geométricos solo permiten variaciones en el PI de máximo 0,3 eV. Por otro lado, mediante la sustitución del esqueleto de FV con diferentes grupos funcionales, es posible hacer modificaciones en el PI mayores a 1 eV, tal como se determinó en los cálculos de la **Tabla 3** y **Tabla 5**. Concluimos que sintetizar isómeros estructurales o geométricos de una misma molécula no es una forma efectiva de modificar el potencial de ionización. Adicionalmente, la síntesis de estructuras tipo cis-cis y cis-trans es problemática debido a que se requiere un cambio en la ruta de síntesis, se debe pasar de una síntesis de Heck (con rendimientos de 50% a 80%) a realizar una reacción de Wittig, la cual genera porcentajes de rendimiento no mayores al 15%, esto debido a la tensión estérica imperante en las estructuras cis-cis y cis-trans, lo cual dificulta la reacción de síntesis.

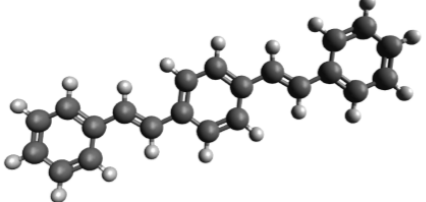
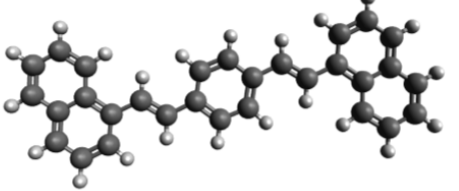
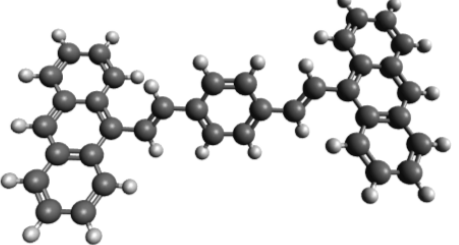
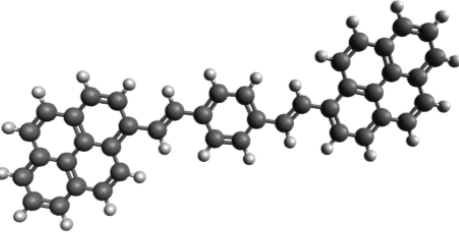
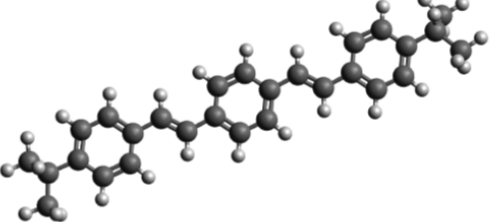
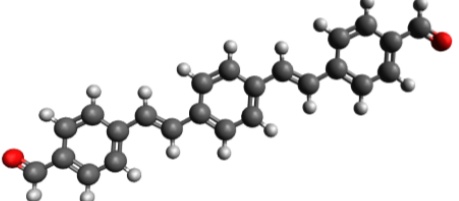
La **Tabla 5** muestra una serie de FV candidatos con diferentes grupos sustituyentes. La primera estructura FV-H corresponde a la estructura primaria del FV sin sustituir, y posee un valor de PI de 7,09 eV, las siguientes tres estructuras FV-Naftaleno, FV-Antraceno, y FV-Pireno corresponden a derivados de FV policíclicos de anillo fusionado, se observa como a medida de que se aumenta la conjugación electrónica se disminuye el PI, debido a que es más fácil generar estructuras resonantes que permitan estabilizar el catión radical resultante.

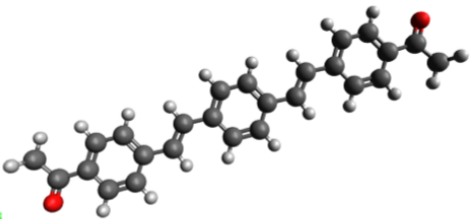
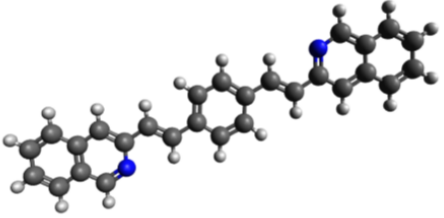
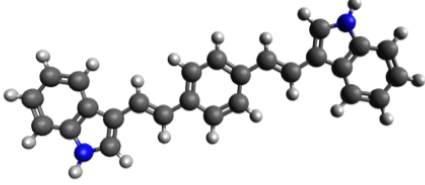
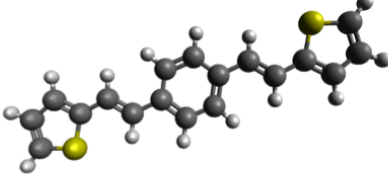
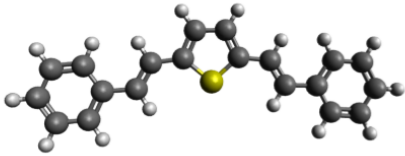
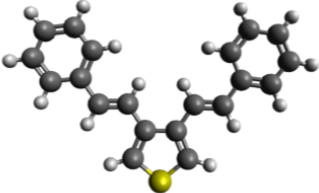
Sin embargo, los valores de PI para las tres estructuras de anillo fusionado son muy pequeños para poder ser consideradas como estructuras candidatas a ser matrices MALDI, ya que idealmente se espera que las moléculas candidatas posean potenciales de ionización por encima de 7,5 eV. El rango de PI de las estructuras calculadas esta en el orden de 6,33 eV a 6,78 eV, y no se cumple el criterio anteriormente expuesto.

Las estructuras FV-Isopropilo, FV-CHO y FV-Acetilo, se diferencian en las sustituciones en los carbonos 4 y 4', se encuentra que los sustituyentes electrodonadores como el isopropilo disminuyen el PI en comparación con el esqueleto de FV (FV-H). Los grupos electroattractores de densidad electrónica como el aldehído y acetilo permiten aumentar el PI en cerca de 0,5 eV, en comparación con el potencial de ionización del núcleo de FV sin sustituir.

Por otro lado, se estudió el efecto de usar heterociclos como componentes del FV, como se observa en las estructuras de FV-Quinolina, FV-Indol, FV-Tiofeno, y FV-Estiriltiofeno, se encontró que ninguna de estas sustituciones provee una estructura con el potencial de ionización requerido para ser usada como matriz MALDI.

Tabla 5: Valores de PI para los FV candidatos

Fenilvinilenos Candidatos	Estructura	PI HF
FV-H		7,09
FV-Naftaleno		6.78
FV-Antraceno		6.36
FV-Pireno		6.33
FV-Isopropilo		6.92
FV-CHO		7,55

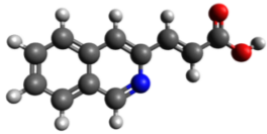
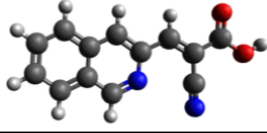
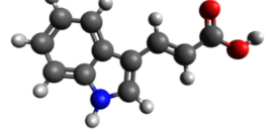
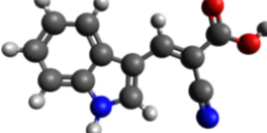
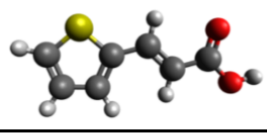
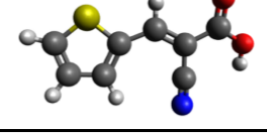
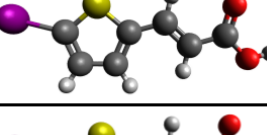
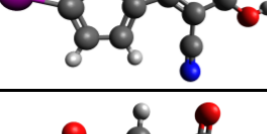
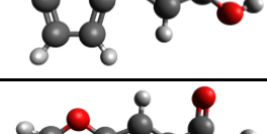
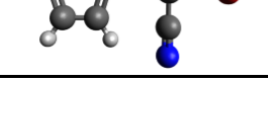
Fenilvinileno Candidatos	Estructura	PI HF
FV-Acetilo		7.47
FV-Quinolina		6.91
FV-Indol		6.43
FV-Tiofeno		7.08
FV-Estiriltiofeno-1		7.00
FV-Estiriltiofeno-2		7.37

3.1.3 Potenciales de ionización AA

La **Tabla 6** muestra los potenciales de ionización calculados para la serie de AA. En el caso específico de los AA se busca que el potencial de ionización sea lo más alto posible con el objetivo de que en las etapas iniciales de interacción de la matriz con el láser no se formen cationes radicales y se permita el paso de la especie neutra a fase gaseosa. Es necesario que se obtengan moléculas neutras de forma inicial para que posteriormente puedan ser protonadas en el cluster y permitan realizar la transferencia del proton al péptido o proteína. Si se forman predominantemente cationes radicales en la primera etapa del mecanismo MALDI, se disminuye la probabilidad de formar la especie protonada, ya que en condiciones MALDI es poco probable termodinámicamente que un catión radical estable sea protonado. Se requiere que el potencial de ionización de los AA se encuentre por encima de los 8,0 eV, con el objetivo de evitar la formación de cationes radicales y promover la formación del neutral de la matriz en fase gaseosa.

En la **Tabla 6** se observa que todos los AA, excepto el AA-Indol, presentan potenciales de ionización por encima de 8,0 eV. Adicionalmente, se observa en todos los casos que la presencia del grupo CN en el carbono alfa aumenta el PI del derivado de AA, en comparación con su contraparte sin grupo CN; por ejemplo, el AA-Indol tiene un PI de 7,52 eV, al introducir un grupo ciano en la posición alfa de la α - β -insaturación la molécula tendrá un PI de 8,03 eV, es decir el PI aumenta en 0,51 eV, al adicionar el grupo ciano. El aumento en el PI al adicionar grupos CN en una molécula se debe a la naturaleza electroattractora de los grupos CN, los cuales causan electrodeficiencia en la estructura electrónica del sistema conjugado, haciendo más difícil la formación del catión radical y por lo tanto aumentando el valor del PI. El aumento del PI al adicionar grupos CN en la α - β -insaturación ocurre con todos los demás derivados -CN analizados, tal como se puede observar en la **Tabla 6**

Tabla 6: Valores de PI para los AA

Ácido Acrílico	Estructura	PI HF
AA-Quinolina		8.01
AA-CN-Quinolina		8.35
AA-Indol		7.52
AA-CN-Indol		8.03
AA-Tiofeno		8.67
AA-CN-Tiofeno		9.07
AA-I-Tiofeno		8,60
AA-CN-I-Tiofeno		8,74
AA-Furano		8,48
AA-CN-Furano		8,96

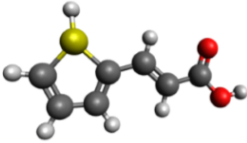
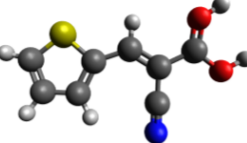

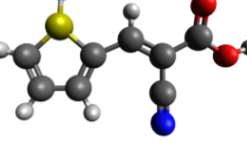
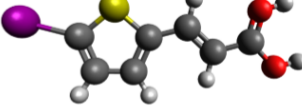
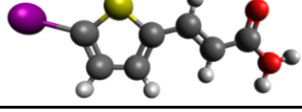
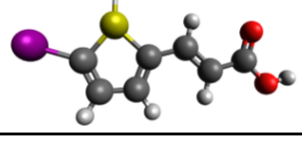
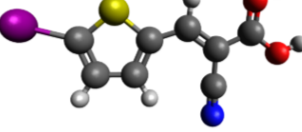
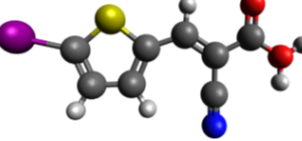
3.2 CÁLCULOS DE AP DE AA

Los valores de afinidad protónica calculados para los diferentes sitios de protonación en la serie de AA se encuentran en la **Tabla 7**. Para los cálculos se consideraron tres sitios principales de protonación a saber: el oxígeno del carbonilo, el oxígeno del grupo hidroxilo y el heteroátomo del ciclo. El valor de AP para cada una de las moléculas estudiadas corresponde al mayor valor determinado en los sitios más probables de protonación. Por ejemplo en el caso de la AA-Quinolina los valores son: 207,64 kcal/mol para el oxígeno del carbonilo, 200,99 kcal/mol para el oxígeno del hidroxilo y 226,85 kcal/mol para el nitrógeno heterocíclico. Por lo tanto el valor de la AP para la AA-Quinolina es de 226,85 kcal/mol, ya que corresponde al mayor valor de los tres valores calculados. Los valores calculados en el sitio más probable de protonación se encuentran tabulados en la tabla **Tabla 8**.

Considerando como molécula de referencia el CHCA, con afinidad protónica de 199 a 201 kcal/mol [8], el valor calculado para el CHCA (201,02 kcal/mol) difiere entre 1 y 2 kcal/mol de los valores experimentales reportados. Teniendo en mente el desarrollo de matrices MALDI con mejor desempeño que el CHCA, es entonces necesario que entre otras características las moléculas candidatas presenten AP menores que la del CHCA (<200 kcal/mol). Esto debido a que una menor AP asegura que la transferencia protónica desde la matriz hasta el analito este más favorecida termodinámicamente durante el proceso MALDI. De la serie de moléculas estudiadas, solo dos presentaron afinidades protónicas inferiores a 200 kcal/mol y estas corresponden al AA-CN-I-Tiofeno y AA-CN-Furano, ambas poseen sustitución CN en la α - β -insaturación. Los grupos CN crean una deficiencia electrónica en el carbono α , disminuyendo la disponibilidad electrónica en el oxígeno del carbonilo para realizar el enlace con el protón libre.

Tabla 7: Valores de afinidad protónica para la serie de AA en los diferentes sitios de protonación

Molécula	Estructura	AP [kcal/mol]
CHCA H en el carbonilo		201,02
AA-Quinolina H en el carbonilo		207,64
AA-Quinolina H en el hidroxilo		200,99
AA-Quinolina H en el nitrógeno heterocíclico		226,85
AA-Indol H en el carbonilo		214,69
AA-Indol H en el hidroxilo		206,92
AA-Indol H en el nitrógeno heterocíclico		195,52
AA-Tiofeno H en el carbonilo		208,26
AA-Tiofeno H en el hidroxilo		198,39

Molécula	Estructura	AP [kcal/mol]
AA-Tiofeno H en el azufre heterocíclico		175,82
AA-CN-Tiofeno H en el carbonilo		208,07
AA-CN-Tiofeno H en el hidroxilo		187,96
AA-CN-Tiofeno H en el azufre heterocíclico		166,62
AA-I-Tiofeno H en el carbonilo		208,61
AA-I-Tiofeno H en el hidroxilo		199,95
AA-I-Tiofeno H en el azufre heterocíclico		175,53
AA-CN-I-Tiofeno H en el carbonilo		199,08
AA-CN-I-Tiofeno H en el hidroxilo		186,56

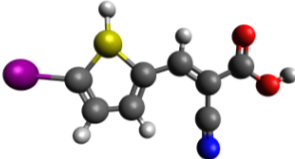
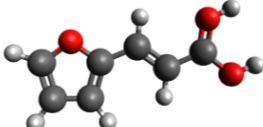
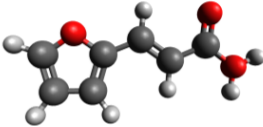
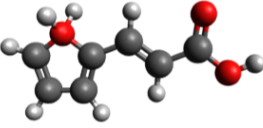
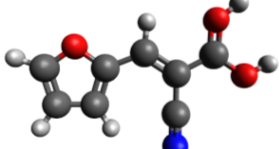
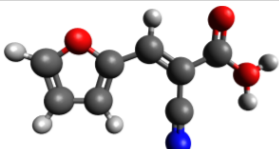

Molécula	Estructura	AP [kcal/mol]
AA-CN-I-Tiéfeno H en el azufre heterocíclico		170,06
AA-Furano H en el carbonilo		208,24
AA-Furano H en el hidroxilo		197,97
AA-Furano H en el oxígeno heterocíclico		166,59
AA-CN-Furano H en el carbonilo		197,96
AA-CN-Furano H en el hidroxilo		184,13
AA-CN-Furano H en el oxígeno heterocíclico		159,80

Tabla 8: Valores de AP para la serie de AA

Molécula	Sitio preferente de protonación	AP [kcal/mol]
CHCA	Oxígeno del carbonilo	201,02
AA-Quinolina	Nitrógeno del heterocíclico	226,85
AA-Indol	Oxígeno del carbonilo	214,69
AA-Tiofeno	Oxígeno del carbonilo	208,26
AA-CN-Tiofeno	Oxígeno del carbonilo	208,07
AA-I-Tiofeno	Oxígeno del carbonilo	208,61
AA-CN-I-Tiofeno	Oxígeno del carbonilo	199,08
AA-Furano	Oxígeno del carbonilo	208,24
AA-CN-Furano	Oxígeno del carbonilo	197,96

4 PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE ÁCIDOS ACRÍLICOS Y FENILENVINILENOS

En este capítulo se analiza el comportamiento espectroscópico de ocho moléculas de fenilenvinileno FV, y de seis derivados de AA usados como matrices para la ionización MALDI por transferencia electrónica y protónica, respectivamente. El análisis espectroscópico realizado comprende la determinación de los espectros UV-vis en solución, ϵ a 355nm, y rendimientos cuánticos de fluorescencia a esta misma longitud de onda. Los espectros UV-vis determinan la longitud de onda de máxima interacción entre la radiación UV-vis y las moléculas estudiadas. El cálculo de ϵ permite estimar cuantitativamente la capacidad de interacción de las moléculas con la radiación del láser MALDI de 355 nm, y permite la comparación de estos valores con los reportados para matrices MALDI de referencia, como el DCTB y el CHCA. La determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia da un estimado confiable de los procesos cuánticos no radiativos que ocurren por interacción de las moléculas de FV con el láser MALDI. Se determinó que el máximo de los espectros UV-vis de la mayoría de los FV es muy cercano a la longitud de onda de 355 nm, y que las ϵ de algunos FV son superiores a las reportadas para las matrices MALDI tradicionales. Los espectros UV-vis de los AA mostraron que la sustitución de los grupos $-\text{CN}$ en el carbono alfa de la $\alpha - \beta$ insatu-

ración tiene un efecto batocrómico sobre el núcleo de AA, que acerca la absorción de las moléculas con sustitución $-\text{CN}$ a 355 nm. Las propiedades espectroscópicas de esta serie de moléculas se correlacionó con su estructura, lo cual permite predecir cuáles presentaran mejor comportamiento como matrices MALDI a la luz de las teorías propuestas acerca de su mecanismo.

4.1 FV Y AA SINTETIZADOS

Las estructuras de FV y AA se sintetizaron en el Laboratorio de Macromoléculas de la Universidad Nacional. La **Figura 3** y **Figura 4** muestran los ocho FV y los seis AA estudiados como matrices MALDI de transferencia electrónica y protónica.

4.2 ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE

En MALDI-UV la producción de iones de la matriz depende considerablemente de las propiedades ópticas de la matriz y de la longitud de onda del láser [54, 55]. Los instrumentos comerciales de MALDI permiten la atenuación de la energía del láser, pero operan a valores de longitud de onda fijos de 337 y 355 nm para láser de N_2 y Nd:YAG, respectivamente; por lo tanto el diseño racional de matrices MALDI implica necesariamente que la longitud de onda de máxima absorción de la matriz sea lo más cercana posible a estos valores.

En la literatura en encuentran algunos reportes de las propiedades ópticas y fotoluminiscentes de algunos oligo FV [43, 56–58]. En general, se encuentra que los tipos de sustituyentes y su posición en el núcleo de FV influye fuertemente en sus propiedades ópticas [56, 57, 59, 60]. Típicamente, la presencia de grupos alquil o alcoxi en el anillo

Figura 3: Estructura de las moléculas de FV sintetizadas

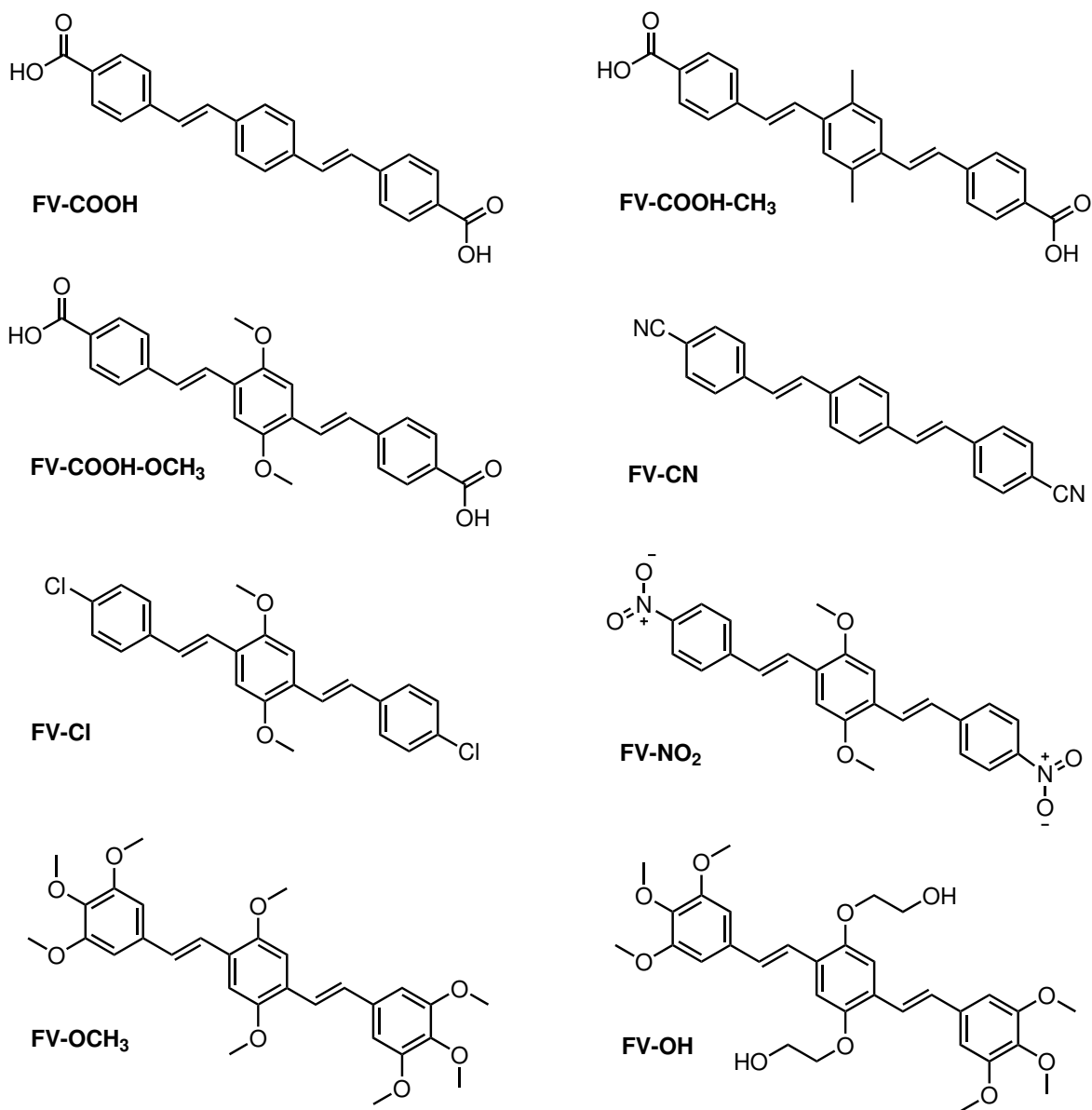
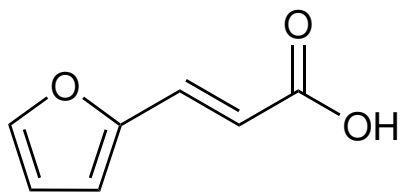
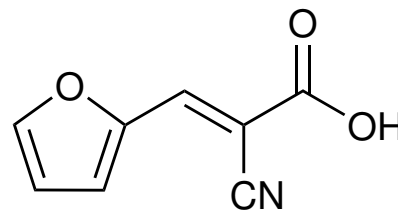


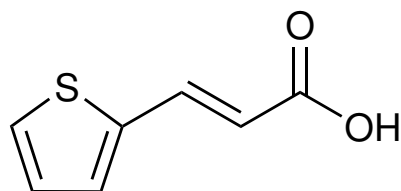
Figura 4: Estructura de las moléculas de AA sintetizadas



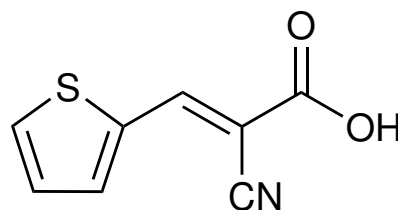
AA-Furano



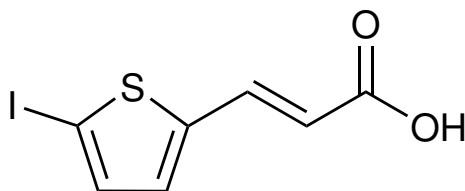
AA-CN-Furano



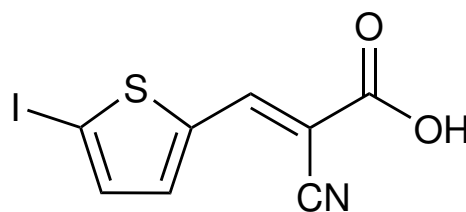
AA-Tiofeno



AA-CN-Tiofeno



AA-I-Tiofeno

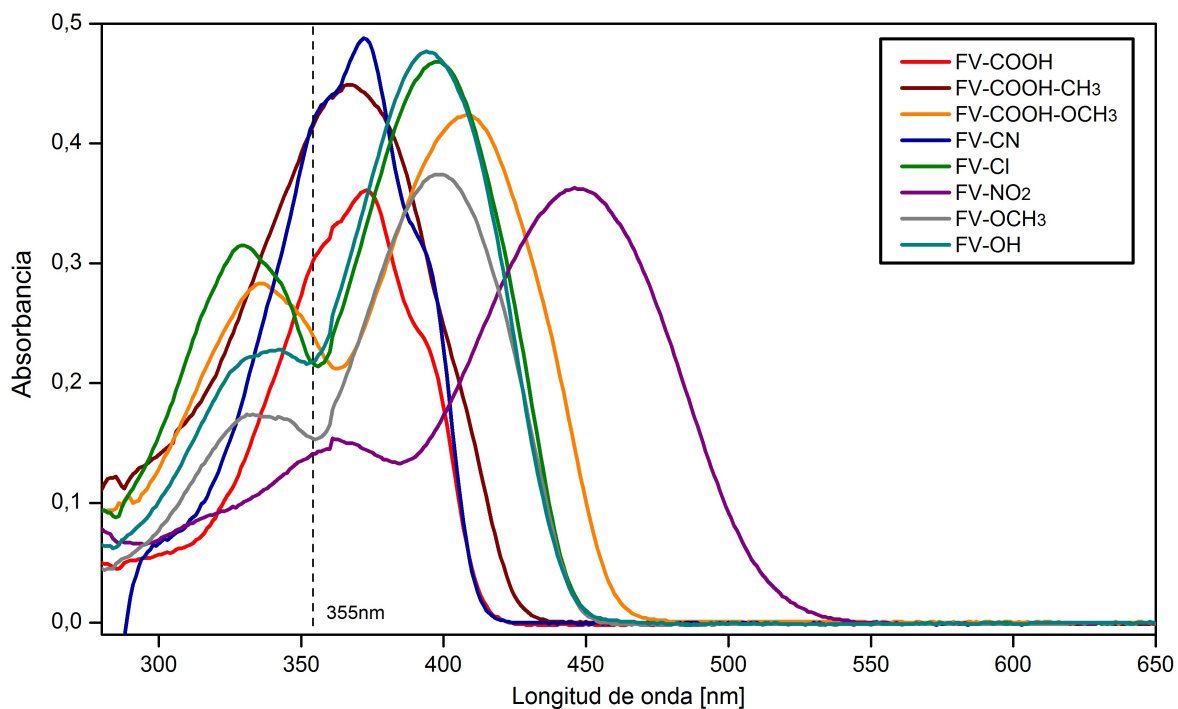


AA-CN-I-Tiofeno

central mejora la solubilidad de estas moléculas en solventes polares [56, 61]; mientras, que la presencia de estos sustituyentes en los anillos periféricos induce corrimientos en la absorción UV-vis y en la emisión de fluorescencia. En esta investigación se utilizó el 1,4-diestiril benceno (núcleo de FV) como estructura modelo a la que se introdujeron grupos electrodonadores ($-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$, y $-\text{OC}_2\text{H}_4\text{OH}$) en la unidad fenileno central, y grupos tanto electrodonadores ($-\text{OCH}_3$) como electroattractores ($-\text{Cl}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{CN}$) en los anillos periféricos. Para algunas de las estructuras estudiadas, específicamente FV-COOH, FV-COOH- CH_3 , FV-Cl, FV- NO_2 , FV-OH y FV- OCH_3 , ya se ha reportado el mecanismo de síntesis y algunas propiedades optoelectrónicas [42, 43, 62–64].

La **Figura 5** muestra los espectros de absorción UV-vis para la serie de FV. De acuerdo con los reportes de la literatura los FV exhiben dos bandas de absorción características en el rango de 300 a 390 nm y 320 a 520 nm [56, 60]. La presencia y posición de varios grupos funcionales en el núcleo de FV causa desplazamientos en las longitudes de onda de máxima absorción, iniciando por el corrimiento al azul en las bandas de absorción del FV-COOH- CH_3 (a 367 nm) y terminando con el corrimiento al rojo en las bandas del FV- NO_2 (a 447 nm). Con respecto a la longitud de onda de 355 nm, todos los FV estudiados presentan un corrimiento batocrómico, tal como se puede observar en la **Figura 5**, en donde la línea punteada corresponde a la longitud de onda de 355 nm. Con el objetivo de estudiar el efecto de la sustitución del núcleo de FV (1,4-diestirilbenceno) con los diversos grupos funcionales usados en este estudio, se calculó el corrimiento efectivo en el máximo de la longitud de onda como la diferencia entre el máximo de absorción experimental de cada FV en comparación con el máximo de absorción reportado para el FV de referencia o 1,4-diestirilbenceno [60], usando la Ecuación 4.1.

Figura 5: Espectros de absorción UV-vis de los FV



$$\text{Corrimiento} = | \lambda_{\max} FV_{\text{derivado}} - \lambda_{\max} FV_{\text{referencia}} | \quad (4.1)$$

Los valores de los máximos de absorción, determinados mediante la derivada de espectro y los corrimientos asociados se observan en la **Tabla 9**. Es posible establecer una tendencia al examinar los valores de la longitud de onda de máxima absorción para los espectros de la serie de FV, claramente la presencia de los grupos electroattractores como $-\text{NO}_2$, y $-\text{Cl}$ en los fenilos terminales (posiciones R_2) producen un corrimiento batocrómico de 66 y 18 nm, respectivamente, con respecto al máximo de absorción para el esqueleto del FV (1,4-diésterilbenceno, 381 nm). Este corrimiento es debido probablemente a un incremento en la longitud de la conjugación efectiva de las nubes π en el estado excitado, como se ha reportado previamente [57, 60]. La presencia de grupos alcoxi con capacidad electrodonadora media, induce también un corrimiento al rojo

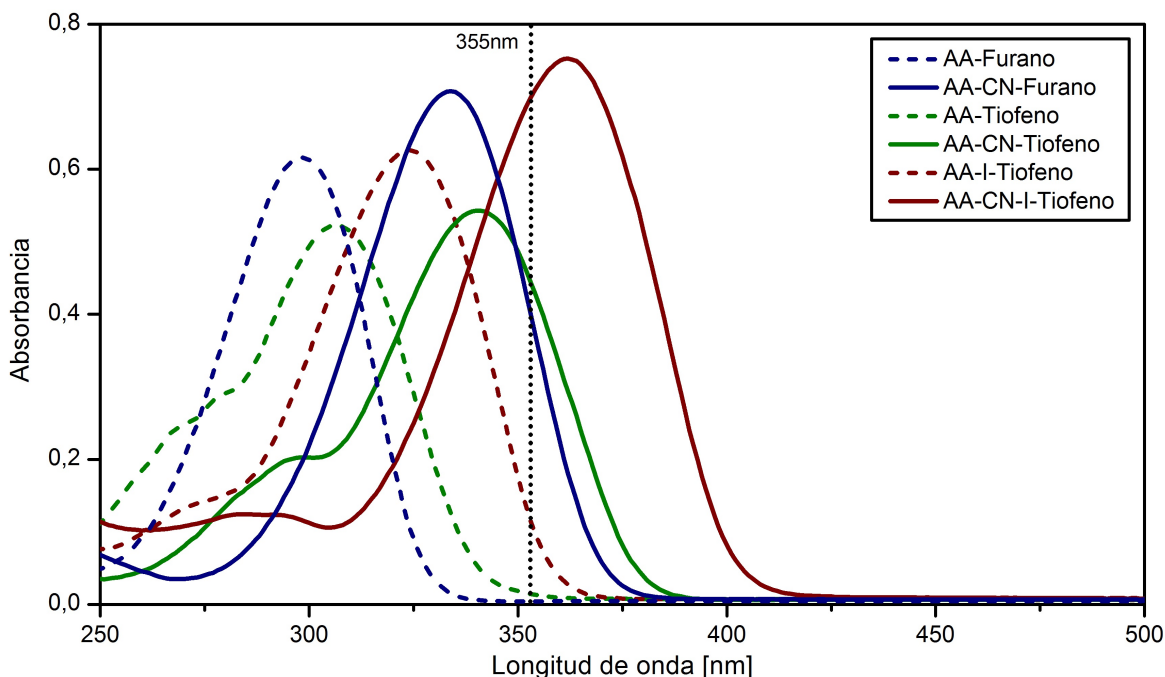
en la banda de máxima absorción que corresponde a 17 y 14 nm para las estructuras FV-OCH₃ y FV-OH. Por otro lado, la presencia de grupos –COOH y -CN en los anillos laterales causa un corrimiento hipsocrómico (al azul) en el máximo de absorción de 6, 9, y 14 nm para el FV-COOH, FV-CN y FV-COOH-CH₃, respectivamente. Los corrimientos al azul en general se atribuyen a sustituyentes que previenen la planarización, mediante la reducción de la longitud de la conjugación π en el estado excitado [57, 60]. Las moléculas FV-COOH-CH₃ y FV-CN son los FV que presentan valores de λ_{max} más cercanos a la longitud de onda de 355 nm.

Tabla 9: λ_{max} y corrimientos característicos de los FV

Molécula	λ_{max} [nm]	Corrimiento respecto al núcleo de FV 381 nm [nm]		Corrimiento respecto al láser de Nd:YAG 355 nm [nm]	
FV-COOH-CH ₃	367	Hipsocrómico	14	Batocrómico	12
FV-CN	372	Hipsocrómico	9	Batocrómico	17
FV-COOH	375	Hipsocrómico	6	Batocrómico	20
FV-OH	395	Batocrómico	14	Batocrómico	39
FV-OCH ₃	398	Batocrómico	17	Batocrómico	43
FV-Cl	399	Batocrómico	18	Batocrómico	44
FV-COOH-OCH ₃	408	Batocrómico	27	Batocrómico	53
FV-NO ₂	447	Batocrómico	66	Batocrómico	91

Los espectros UV-vis de los AA estudiados se muestran en la **Figura 6**. La línea punteada de la figura corresponde a la longitud de onda de 355 nm. Las bandas de absorción de los AA corresponden a transiciones $\pi - \pi^*$ al interior de los anillos aromáticos y la $\alpha - \beta$ insaturación. La serie de AA es muy interesante ya que corresponde a tres moléculas de ácido acrílico y sus respectivos análogos que difieren en la presencia del grupo -CN en el carbono alfa (ver **Figura 4**). La **Figura 6** muestra en líneas punteadas los espectros de las moléculas AA-Furano, AA-Tiofeno y AA-I-Tiofeno, por su parte las líneas solidas corresponden a los espectros UV-vis de estas mismas moléculas, pero que poseen sustitución -CN en el carbono alfa y corresponden a AA-CN-Furano, AA-CN-Tiofeno y AA-CN-I-Tiofeno.

Figura 6: Espectros de absorción UV-vis de los AA. Las líneas solidas representan los AA con grupo -CN, las líneas punteadas representan su contraparte sin el grupo -CN.



Se calculó la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los AA mediante la derivada del espectro de absorción, los datos se encuentran tabulados en la **Tabla 10**. A partir de la **Figura 6** y la **Tabla 10** es posible concluir que la sustitución de los grupos -CN en la posición alfa causa corrimientos hacia el rojo en las tres moléculas estudiadas con respecto a las moléculas no sustituidas en el carbono alfa de la $\alpha - \beta$ insaturación. Por ejemplo, al sustituir AA-Furano con el grupo -CN para formar el AA-CN-Furano el máximo en el espectro de absorción se corre 36 nm hacia el rojo. En el caso del AA-CN-Tiofeno con respecto al AA-Tiofeno el corrimiento hacia el rojo es de 34 nm, y para el AA-CN-I-Tiofeno es de 38 nm. En general existe un corrimiento batocrómico promedio de 36 nm cuando se introduce un grupo -CN en la posición alfa de la estructura de los AA. La **Tabla 10** muestra a su vez que los derivados -CN presentan λ_{max} más cercanas a la longitud de onda de 355 nm.

Tabla 10: λ_{max} y corrimientos característicos de los AA

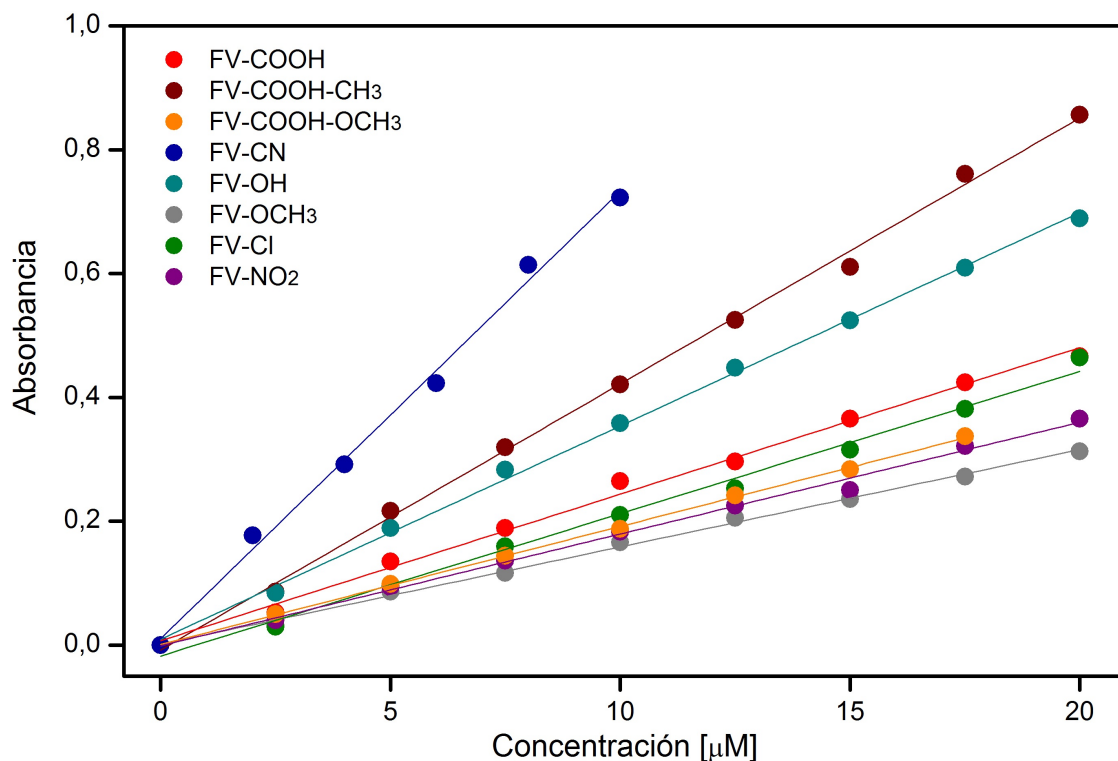
Molécula	λ_{max} [nm]	Corrimiento con respecto al láser de Nd.YAG 355 nm [nm]	
AA-Furano	298	Hipsocrómico	57
AA-Tiofeno	306	Hipsocrómico	49
AA-I-Tiofeno	324	Hipsocrómico	31
AA-CN-Furano	334	Hipsocrómico	21
AA-CN-Tiofeno	340	Hipsocrómico	15
AA-CN-I-Tiofeno	362	Batocrómico	7

4.3 ABSORTIVIDAD MOLAR

En la **Figura 7** se muestran las curvas de ϵ obtenidas para los FV. A partir de las curvas se determinaron los coeficientes de ϵ a 355 nm, valores que se encuentran reportados en la **Tabla 11**. Los datos obtenidos son precisos debido a que el coeficiente de correlación (R^2) de la linealización de todas las curvas fue superior a 0,99. La determinación de las ϵ a 355 nm permite la comparación entre la capacidad de absorción de la serie de FV y las matrices MALDI estándar como el DCTB y el CHCA. Los valores experimentales obtenidos de ϵ_{355nm} para el CHCA ($15.490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el DCTB ($30.144 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) son similares a los valores reportados en la literatura [12, 54].

Todos los derivados de FV, con excepción del FV-OCH₃, tienen valores de ϵ_{355nm} por encima del valor del CHCA ($>15.490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), por otro lado el FV-CN, FV-COOH-CH₃ y el FV-OH poseen valores de ϵ_{355nm} mayores que los valores correspondientes al DCTB ($>30.144 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Cuantitativamente, en comparación con el CHCA y DCTB, el incremento en la ϵ_{355nm} del FV-CN corresponde a 366% y 140%, respectivamente. Con base en estos resultados es posible concluir que la capacidad de absorción de fotones del FV-CN es superior a las matrices tradicionales.

Figura 7: Curvas de ϵ_{355nm} de los FV



La formación primaria de iones en UV-MALDI generalmente se entiende en términos del modelo de fotoexcitación y *pooling*. Debido a que la transferencia electrónica en UV-MALDI requiere la fotoexcitación/fotoionización de la matriz, las propiedades optoelectrónicas de la matriz juegan un papel crucial en la generación primaria de iones a través de procesos de excitación, migración y concentración de energía [65].

Se ha reportado que el aumento de la ϵ de la matriz a la longitud de onda de trabajo de laser conduce a un aumento considerable en la cantidad de iones de la matriz y el analito que se detectan [6]. En una matriz con alta ϵ la densidad energética en la superficie de la muestra se puede incrementar, debido a la absorción eficiente de fotones, lo que producirá más iones primarios de la matriz [66, 67] que serán usados para la formación de iones del analito.

Tabla 11: ϵ_{355nm} de los FV y algunas moléculas de referencia

Molécula	$\epsilon_{355nm} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
FV-CN	72.242
FV-COOH-CH₃	42.499
FV-OH	33.728
FV-COOH	22.987
FV-Cl	22.655
FV-COOH-OCH₃	19.336
FV-NO₂	17.637
FV-OCH₃	15.482
CHCA	15.490
DCTB	30.144
Antraceno	4.993

Con relación a las propiedades de ϵ para la serie de AA, se encontró que existe una amplia diferencia entre los derivados de AA y sus contrapartes con grupo -CN. Las curvas y los valores de ϵ_{355nm} para estas moléculas se observan en la **Figura 8** y en la **Tabla 12**. Los espectros UV-vis (**Figura 6**) muestran que la presencia del grupo α -CN ocasiona un corrimiento batocrómico en la longitud de onda de máxima absorción de los AA, acercándolos a la longitud de onda del láser (355 nm). Los valores de ϵ_{355nm} siguen esta misma tendencia. Mientras las ϵ_{355nm} de los AA sin grupos -CN oscilan entre 2.583 y 51 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, las ϵ_{355nm} de los derivados con -CN aumentan considerablemente con valores entre 25.398 y 12.845 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. De estas moléculas solo el AA-CN-I-Tiofeno (25.398 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) presenta una absorptividad mayor a la del CHCA (15.490 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Tabla 12: ϵ_{355nm} de los AA

Molécula	$\epsilon [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
AA-CN-I-Tiofeno	25.398
AA-CN-Tiofeno	14.440
AA-CN-Furano	12.845
AA-I-Tiofeno	2.583
AA-Tiofeno	81
AA-Furano	51

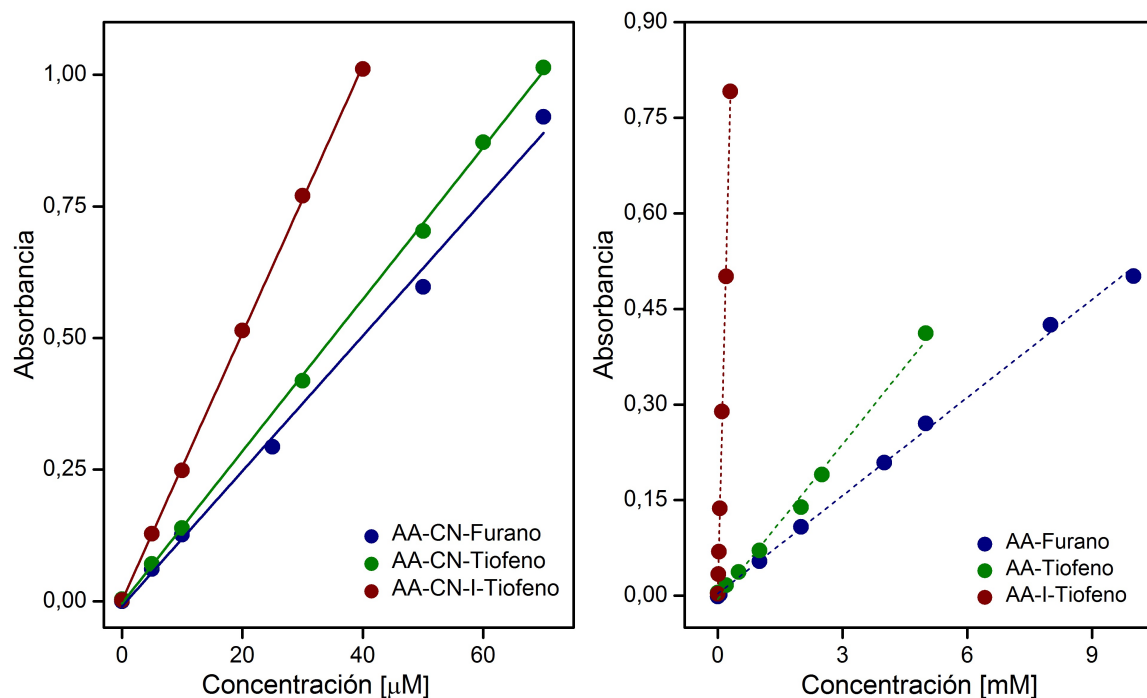


Figura 8: Curvas de ϵ_{355nm} de los AA

4.4 RENDIMIENTO CUANTICO

Tal como se especificó en la metodología, inicialmente se realizó una calibración del método, determinando el rendimiento cuántico del sulfato de quinina usando antra-ceno como estándar; y viceversa. Los valores obtenidos experimentalmente de ambos estándares concuerdan con los valores reportados en la literatura, con un error menor al 5%. Después de la calibración con los compuestos estándar se procedió a determinar los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los FV, con respecto a cada fluoróforo de referencia. Los valores de rendimiento cuántico radiativo y no radiativo para los FV y las moléculas de referencia se reportan en la **Figura 9**

Los decaimientos cuánticos de fluorescencia, tanto radiativos (Φ_R) como no-radiativos (Φ_{NR}), de la serie de FV dependen de la estructura molecular del derivado. En comparación con el núcleo de 1,4-diestirilbenceno, reportado como altamente fluorescente

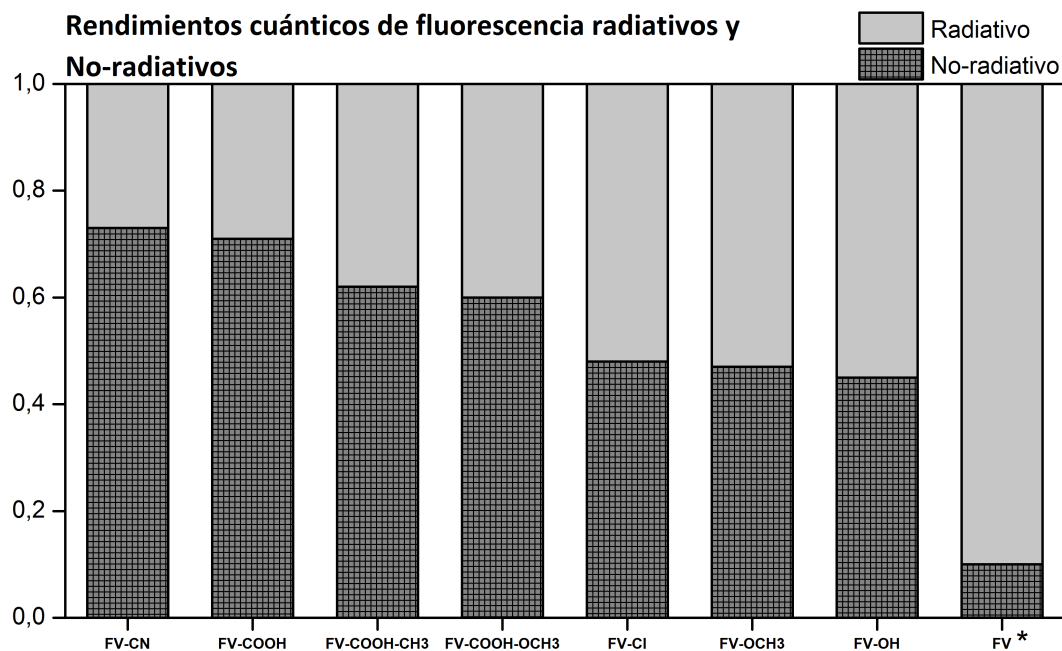


Figura 9: Φ_R y Φ_{NR} para los FV a 355 nm. *FV=1,4-diestirilbenceno.

en solución ($\Phi_R=0,9$) [60], los derivados estudiados presentan una dramática reducción en los valores de fluorescencia tal y como se observa en la **Figura 9**. El FV-CN y los FV ácidos (FV-COOH, FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃) exhiben valores de Φ_R de 0,27, 0,29 y 0,38, 0,40, respectivamente. Estas moléculas experimentan la reducción más significativa del rendimiento cuántico radiativo de todos los FV analizados. Los bajos valores de Φ_R , o altos valores de Φ_{NR} , se atribuyen mayoritariamente a una severa deformación de la estructura planar de los FV [56, 60]. Bajos valores de Φ_R promueven un camino de relajación predominantemente térmico, un efecto importante durante el proceso de desorción en MALDI debido a que se relaciona con el calentamiento, expansión e incremento en la desorción de la matriz asociado con un mejoramiento en la liberación de iones a la fase de gas [66, 67]. Desde el punto de vista de la espectrometría de masas ambos rendimientos cuánticos (tanto radiativos Φ_R como no radiativos Φ_{NR}) son importantes dependiendo del tipo de analito a ser ionizado. En analitos lábiles, si el camino de relajación de la matriz es predominantemente térmico, se puede favorecer

la fragmentación del analito. En analitos no-lábiles las matrices con mayor rendimiento cuántico no radiativo son ideales debido a que se mejora la liberación de iones a fase gaseosa. Una reducción de la longitud de conjugación π efectiva y la disminución de la planaridad en las estructuras FV-CN, FV-COOH, FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃ explica las observaciones de bajos valores de Φ_R y los corrimientos hipsocrómicos en el espectro UV-vis de estos derivados.

Por otro lado, las moléculas FV-Cl, FV-OCH₃ y FV-OH exhiben Φ_R de 0,52, 0,53, y 0,55, casi equivalentes a Φ_{NR} . A pesar de que hay una reducción de Φ_R para esas estructuras en comparación con el núcleo de 1,4-diestirilbenceno, aparentemente la presencia de los grupos -Cl y -OCH₃ no interfieren considerablemente con la planaridad del sistema. Algunas observaciones hechas por Sierra [43] y Heller [60] indican la posibilidad de la formación de puentes intramoleculares de hidrógeno en los análogos FV-OH y FV-OCH₃, que involucran el oxígeno en las unidades -OH y -OCH₃ del anillo central con los hidrógenos de los grupos vinílicos adyacentes. Estos enlaces de hidrógeno mantienen la planaridad del sistema, lo que permite explicar porque los valores de Φ_R no cambian tan drásticamente. Adicionalmente, un incremento en la longitud de la conjugación π efectiva y un incremento en la planaridad del FV-Cl, FV-OCH₃ y FV-OH explica los altos valores de Φ_R y el corrimiento batocrómico en el espectro UV-vis para estos derivados de FV. Finalmente, debido a que el FV-NO₂, presenta una longitud de onda de máxima absorción muy corrida al rojo (447 nm), esta molécula no mostró emisión fluorescente a la longitud de onda de excitación de 355 nm; por esta razón el valor de Φ_R para este derivado no se incluye en la **Figura 9**.

5 ESTUDIO DE LA IONIZACIÓN MALDI CON MATRICES DE FENILENVINILENO

En esta sección se reporta el desempeño de la serie de FV como matrices MALDI. El análisis de los espectros MALDI-TOF de las moléculas puras o en presencia de ácidos o cationes metálicos demuestra que no es posible obtener moléculas de FV protonadas o sus aductos con cationes metálicos. Al someter los FV a las condiciones del experimento MALDI siempre se observa la formación de cationes radicales. Consecuentemente los derivados de FV no son efectivos en procesos de ionización que requieran transferencia o abstracción protónica, como los comúnmente observados en la ionización de péptidos. Adicionalmente, en este capítulo se reportan las curvas de aparición de iones a diferentes energías por pulso del láser para cada uno de los FV. Debido a que los espectros MALDI de las matrices FV, exhiben únicamente formación del catión radical de la matriz, los iones moleculares de FV resultan ser efectivos en procesos de ionización por transferencia electrónica. Los FV se utilizaron en la ionización de analitos con tendencia a formar cationes radicales, como las moléculas con estructura de anillo fusionado, porfirinas y ftalocianinas. Se observó que las matrices FV realizan un proceso de transferencia electrónica efectivo a los analitos modelo, y que este proceso depende de la energía de ionización del derivado FV y de sus características optoelectrónicas. El derivado FV-CN exhibe el mejor desempeño como matriz MALDI pues permite au-

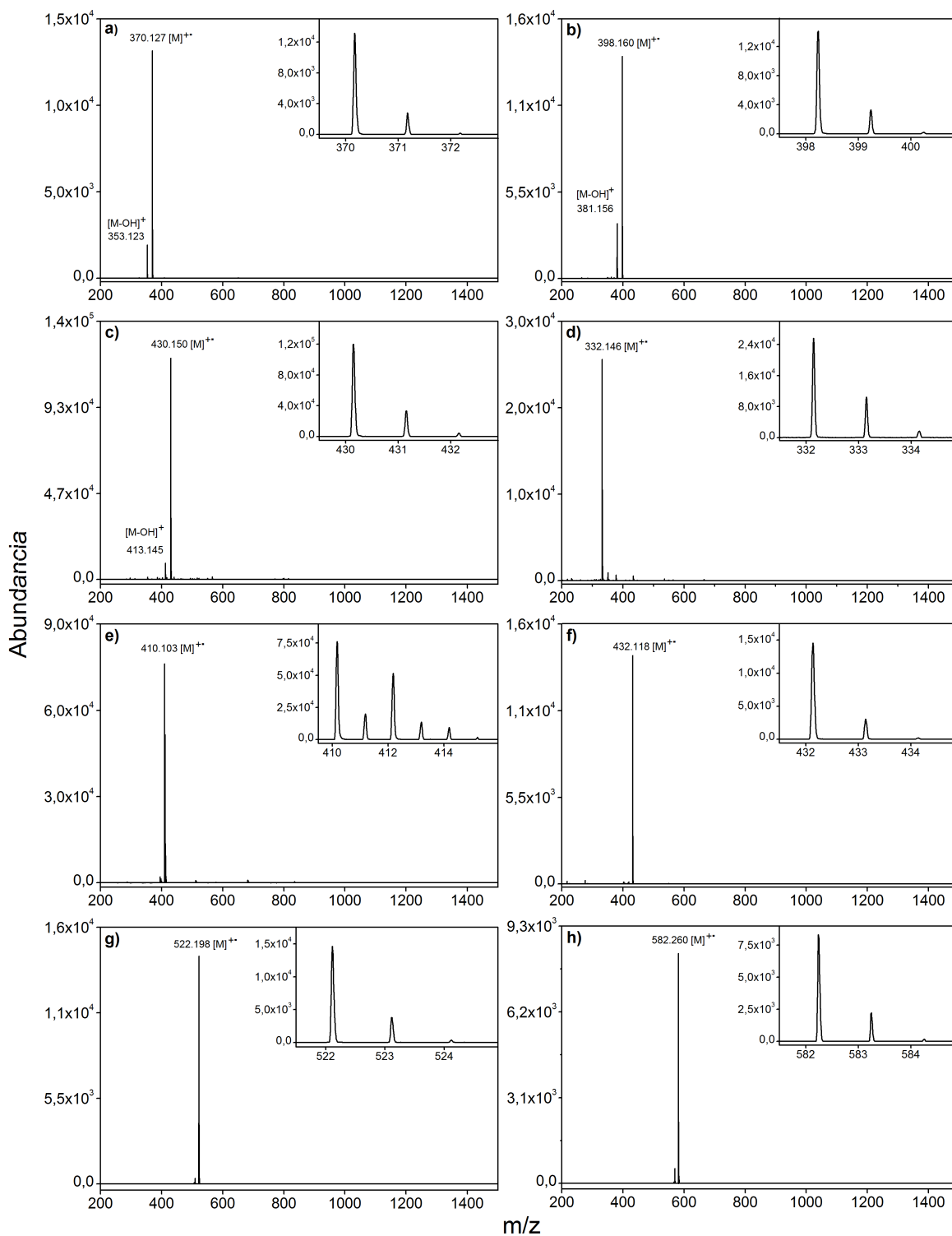
mentos en la señal de hasta 56 veces, en comparación con la señal sin matriz o LDI. A su vez, el uso de la matriz FV-CN disminuye considerablemente el límite de detección del analito que en la mayoría de los casos alcanza valores de 2,5 fmol usando matriz FV-CN. Se determinó adicionalmente que el uso de las matrices FV evita considerablemente la fragmentación de analitos lábiles como estructuras modelo de asfaltenos, con sobrevivencias que alcanzan el 100% para los iones monisotópicos de estos analitos usando FV-Cl.

5.1 ESPECTROS LDI DE LOS FV

La **Figura 10** muestra los espectros de masas LDI de la serie de FV estudiados, usando 2,5 nmol de cada compuesto en *target*. Los espectros de masas poseen pocas señales pues no se observan agregados tal y como sucede con matrices tradicionales como el CHCA, antraceno, 9-nitroantraceno y DCTB (ver **Figura 11**). El ion más abundante en los espectros de masas de los FV corresponde en todos los casos al catión radical M^+ , como se observa en la **Figura 10**.

Los FV ácidos FV-COOH, FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃ se caracterizan por la pérdida del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y formación del catión $[\text{M-OH}]^+$ de baja abundancia. El FV-COOH (**Figura 10a**) exhibe las señales en m/z 370 y 353 correspondientes al ion molecular M^+ y el fragmento $[\text{M-OH}]^+$, respectivamente. Un comportamiento similar se observa en los espectros del FV-COOH-CH₃ (**Figura 10b**) y el FV-COOH-OCH₃ (**Figura 10c**) en donde se observa el catión radical M^+ en m/z 398 y 430 respectivamente, y la pérdida del radical hidroxilo para formar el catión $[\text{M-OH}]^+$ en m/z 381 y 413, respectivamente.

Figura 10: Espectros de masas de los FV. a) FV-COOH, b) FV-COOH-CH₃, c) FV-COOH-OCH₃, d) FV-CN, e) FV-Cl, e) FV-NO₂, f) FV-OCH₃ y g) FV-OH



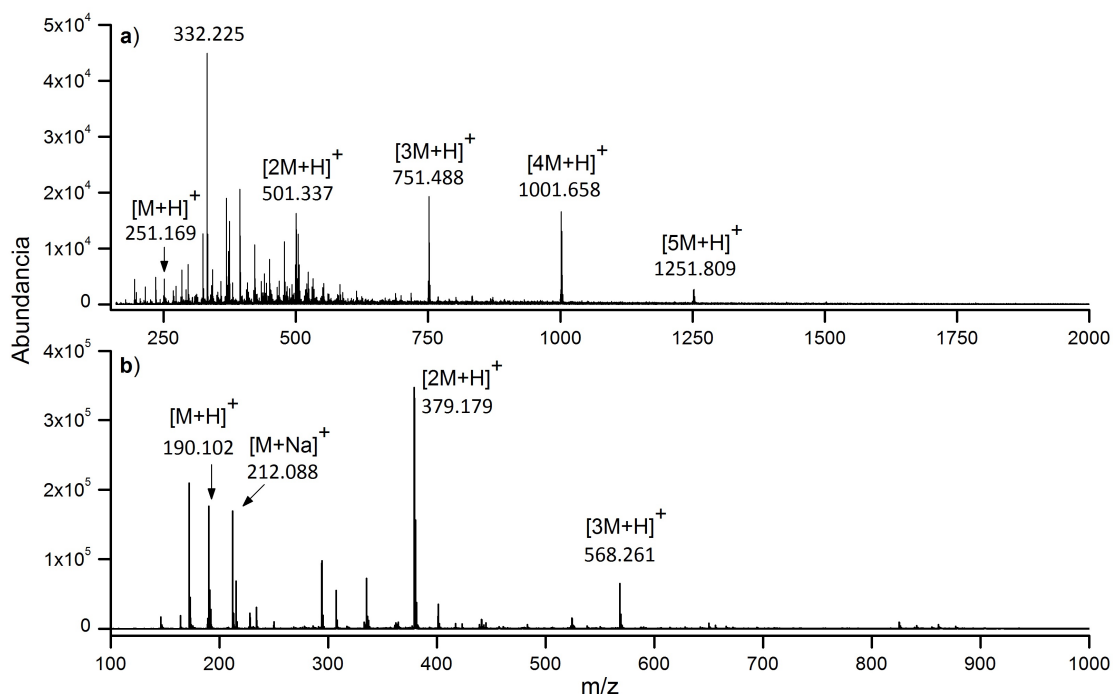
Por otro lado, los derivados FV-CN, FV-Cl, FV-NO₂, FV-OCH₃ y FV-OH (**Figuras 10 d,e,f,g,h**), no exhiben fragmentación y se observan principalmente los cationes radicales en m/z 332, 410, 432, 582 y 522, respectivamente. Los patrones isotópicos de todos los FV coinciden con los patrones isotópicos calculados. Las señales de los espectros de los FV no evidencian la formación de agregados, o de oligómeros en fase gaseosa.

Las matrices de transferencia electrónica tradicionales en MALDI como el DCTB y el 9-nitroantraceno muestran una formación extensiva de aductos en MALDI, lo cual interfiere con el análisis de analitos de bajo peso molecular [10, 15]. Los espectros del DCTB en modo positivo muestran no solo la formación del catión radical, sino a su vez los aductos $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, entre otras señales, las cuales dominan el espectro en masas bajas [12] tal como se observa en la **Figura 11**. Por otro lado, el 9-nitroantraceno produce aductos por $\pi - \pi$ *stacking*, que se detectan en el rango de m/z 200 a 800 [15]. Por su parte los FV, pueden ser potencialmente usados en la caracterización de analitos de bajo y alto peso molecular, ya que no presentan interferencia en ninguna de estas regiones del espectro.

5.2 PROTONACIÓN Y CATIONIZACIÓN

El mecanismo de ionización MALDI de transferencia protónica implica el paso de la matriz (M) a fase gaseosa y la formación en fase gaseosa de un aducto $[M+H]^+$. Es indispensable que la matriz posea una afinidad protónica baja, que permita la formación de la especie $[M+H]^+$ y la posterior transferencia del protón al analito [2]. En el análisis de los espectros de masas se observó que los FV presentan señales debidas exclusivamente a la formación del catión radical M^+ . Con el objetivo de observar si es posible la formación de moléculas protonadas de los FV, se realizaron experimentos

Figura 11: Espectros de masas de las matrices MALDI tradicionales. a) DCTB, b) CHCA



en los cuales los FV se cristalizaron en presencia de ácidos orgánicos como fuente de protones. En todos los casos los espectros de masas obtenidos en los experimentos de acidificación, variando el tipo y la concentración del ácido, son iguales a los de las muestras a las que no se les agregó ácido. Se concluye que incluso en condiciones ácidas extremas no es posible formar el ión protonado de los FV o $[M+H]^+$. Esta característica implica que existe poca viabilidad para el uso de matrices FV como matrices de transferencia protónica.

Por otra parte algunas matrices MALDI pueden ionizar analitos, como polímeros, carbohidratos y algunas macromoléculas, mediante un mecanismo de transferencia catiónica [52, 68]. El proceso de transferencia catiónica es análogo al de transferencia protónica; para que la transferencia ocurra la matriz debe adquirir un catión en fase gaseosa y transferirlo al analito. Para los experimentos de cationización se usaron los cationes

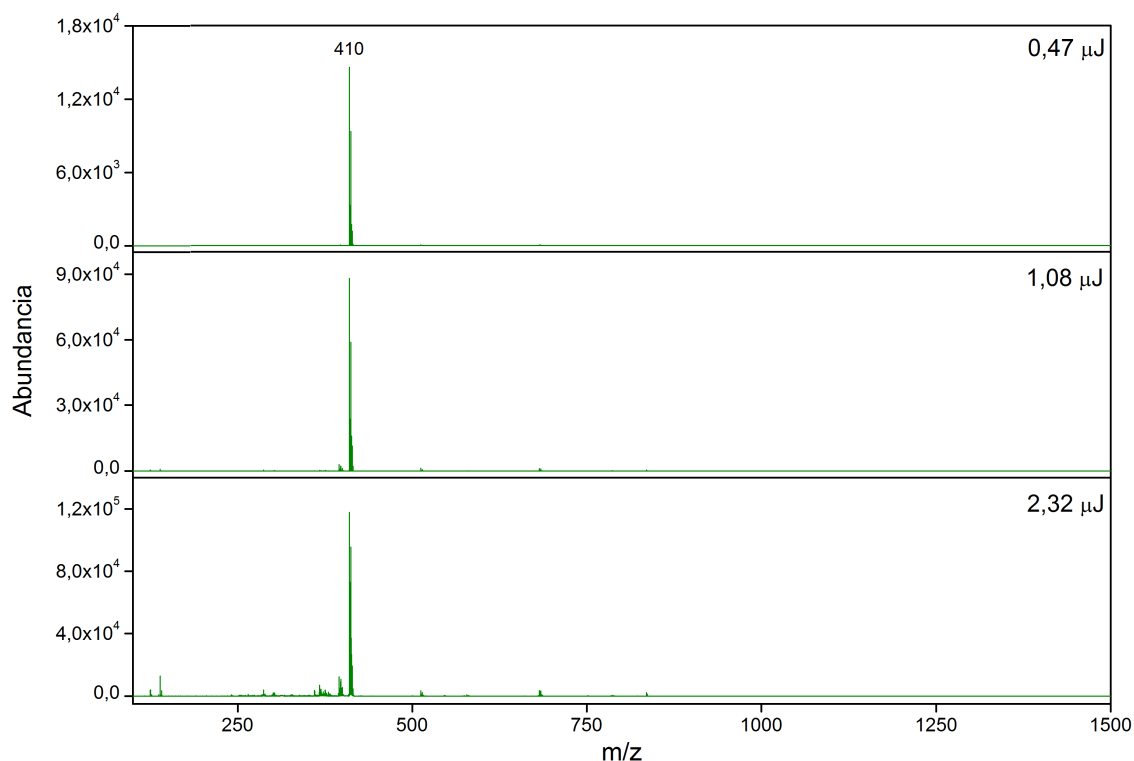
Na^+ , K^+ , Li^+ y Ag^+ , tal y como se describe en la sección experimental. En los experimentos de cationización con los FV no se observaron iones correspondientes a moléculas cationizadas. De acuerdo con estos resultados es posible afirmar que los FV estudiados no se pueden utilizar como matrices de transferencia protónica o catiónica.

5.3 CURVAS DE APARICIÓN DE IONES DE LA MATRIZ

En esta sección se discute el efecto del cambio de la energía por pulso del láser en la apariencia general de los espectros de masas de los FV. Para simplificar la discusión se presentan los datos para el FV-Cl pues los resultados son similares a los obtenidos con los demás derivados. En la **Figura 12** se muestran los espectros de masas del FV-Cl en modo positivo, utilizando energía por pulso de 0,47, 1,08 y 2,32 μJ . A medida que se aumenta la energía por pulso del láser, se incrementa la abundancia del ión molecular (en el caso del FV-Cl el ión en m/z 410). En el caso específico del FV-Cl, la abundancia del ión molecular aumenta de $1,6 \times 10^4$ (0,47 μJ) a $1,2 \times 10^5$ (2,32 μJ). Sin embargo, usos de valores superiores a 0,47 μJ por pulso provocan la aparición de fragmentos y agregados de la matriz.

En la **Figura 13** se observan las curvas de aparición de los iones moleculares de los FV. Para la construcción de la curva se varió la energía por pulso del láser y se observó su efecto sobre la abundancia de la señal del ion molecular M^+ para cada FV. En las curvas se considera la especie M^+ que corresponde a la señal más abundante de los espectros de masas de los FV y adicionalmente, en procesos de transferencia electrónica, es la responsable de la ionización del analito. En los experimentos se utilizó la misma cantidad de cada derivado de FV y de la matriz de referencia DCTB (2,5 nmol en

Figura 12: Espectros del FV-Cl a diferentes energías del láser

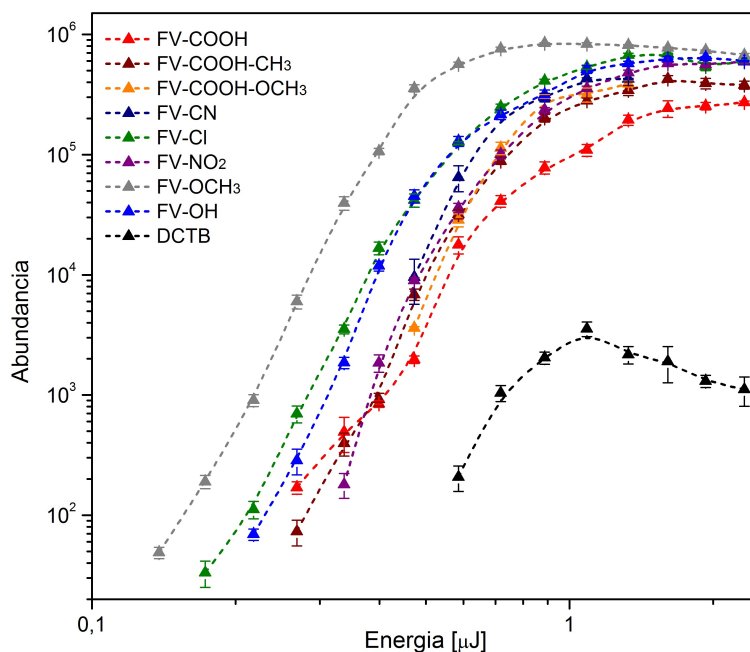


target); la energía por pulso del láser se incrementó de 0,14 a 2,4 μJ.

La energía de aparición para una matriz MALDI se define como la energía por pulso requerida para obtener una señal con relación señal ruido $S/N > 3$. Bajo las mismas condiciones experimentales se puede observar, en la **Figura 13**, que las energías de aparición de los FV son mucho más bajas que las de el DCTB. Las moléculas FV-OCH₃, FV-Cl y FV-OH exhiben energías de aparición de 0,14, 0,17 y 0,22 μJ, respectivamente, mientras el FV-COOH-CH₃, FV-COOH y FV-NO₂ muestran energías de aparición más altas de 0,27, 0,27 y 0,34 μJ, respectivamente.

Bajo las condiciones experimentales usadas la energía de aparición del DCTB corresponde a 0,58 μJ. En MALDI se recomienda usar energías de trabajo, para las matrices, de dos a tres veces su potencial de aparición. Las energías de aparición de los FV son extremadamente bajas, en comparación con la matriz estándar DCTB, por lo tanto

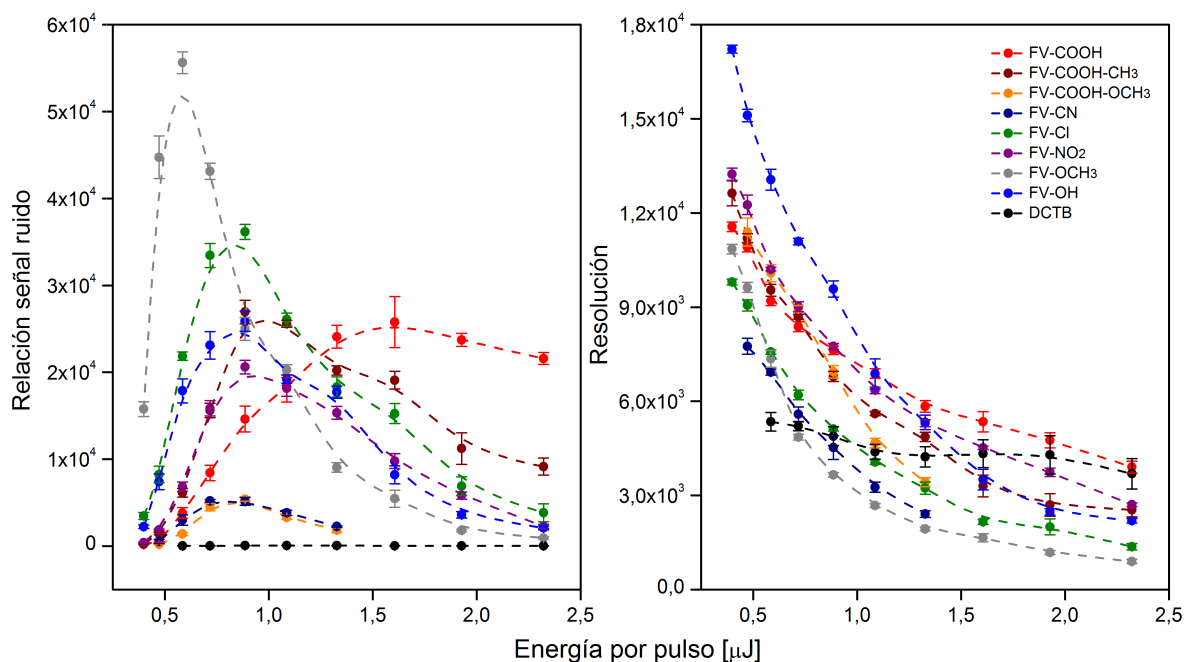
Figura 13: Curvas de aparición de iones de los FV evaluando la abundancia



el desarrollo de aplicaciones analíticas con estas matrices requerirá menor energía del láser. El uso de bajas energías es beneficioso, no sólo porque se disminuye la contaminación de las superficies internas del equipo y se aumenta la vida útil del láser, sino porque se mejoran los resultados en términos de sensibilidad y resolución.

Por encima de las energías de aparición la abundancia de iones crece rápidamente con el incremento de la energía del láser y posteriormente su crecimiento se detiene, probablemente debido a la saturación del detector [69], tal como se observa en la **Figura 13**. La sección lineal en la curva de aparición de iones puede ajustarse a una función del tipo $Y \sim H^m$ donde Y corresponde a la abundancia del ion, H es la energía del láser y m es un parámetro que depende del desempeño de la matriz [69]. Para los FV usados el valor de m varía de 5,5 a 9,5; mientras que para el DCTB m corresponde a 4,5. Un alto valor de m, implica una alta producción de iones al aumentar la energía del láser. Claramente bajo condiciones experimentales idénticas, los FV no solo tienen la habilidad de absorber energía del láser más eficientemente, a su vez producen mucho

Figura 14: Curvas de aparición de iones de los FV evaluando los parámetros de relación señal ruido y resolución



más iones en comparación al DCTB.

La **Figura 14** muestra la evolución de la relación señal ruido (S/N) y la resolución de la señal del catión radical de la serie de los FV a medida que se aumenta la energía del láser. Según lo esperado el valor de S/N se incrementa considerablemente y alcanza un máximo en cerca de dos a tres veces por encima de las energías de aparición de las señales para cada uno de los FV, a partir de este punto, a medida que se aumenta la energía del láser el valor de S/N disminuye.

Como se puede observar en la **Figura 13** la abundancia aumenta con la energía del láser o permanece constante, por lo tanto la disminución del valor de S/N se debe únicamente a un aumento en el ruido espectral, producido por los procesos de fragmentación de la matriz a altas energías de láser. Los derivados de FV exhiben valores máximos de S/N a $0,59 \mu\text{J}$ (S/N: 55.600) para el FV-OCH₃, $0,89 \mu\text{J}$ (S/N: 25.900) para el FV-OH, $0,80 \mu\text{J}$ (S/N: 38.000) para el FV-Cl, $0,89 \mu\text{J}$ (S/N: 20.600) para el FV-NO₂, $0,89 \mu\text{J}$ (S/N:

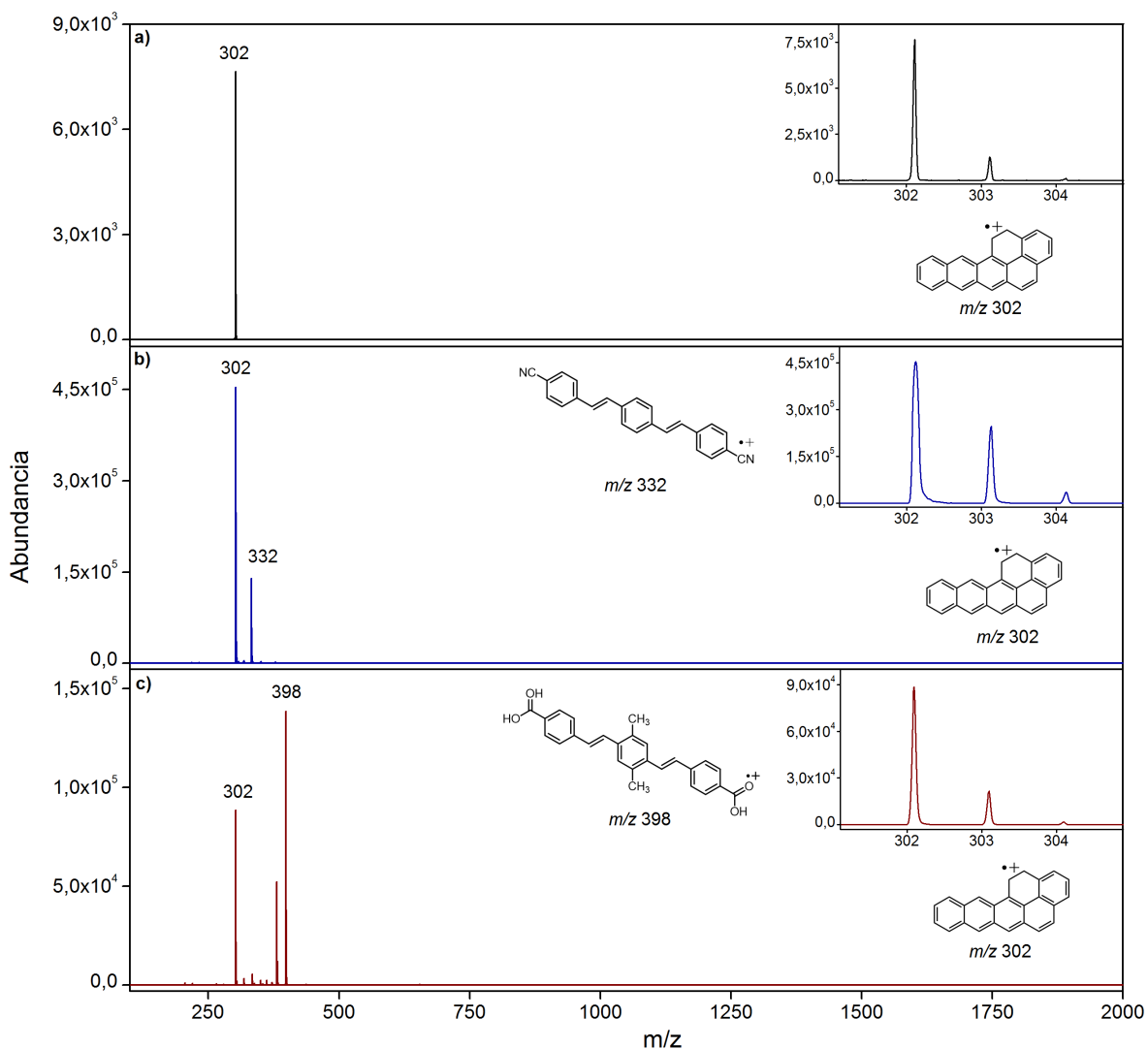
26.900) para el FV-COOH-CH₃ y 1,61 μ J (S/N: 25.781) para el FV-COOH. Para el DCTB un valor máximo de S/N: 74,5 se observó a 1,09 μ J. Por otro lado, el aumento de la energía del láser promueve una disminución en la resolución de las señales debido a un incremento en el ensanchamiento temporal, espacial y de distribución de energía cinética.

5.4 IONIZACIÓN DEL NAFTOPIRENO USANDO MATRICES FV

Debido a que los FV se ionizan formando cationes radicales, se decidió usar como analito una molécula susceptible a ionización por transferencia electrónica: el nafto[2,3-a]pireno (naftopireno, NP). Los análisis se realizaron utilizando relaciones molares analito:matriz 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. A primera vista se observó un aumento considerable de la señal del NP, en comparación con el experimento LDI, al usar algunos de los FV. La **Figura 15** muestra los espectros de masas para el NP sin matriz (LDI) y con matriz FV-CN y FV-COOH-CH₃ usando 25 pmol de NP en *target*.

Se encontró que la molécula en si misma se ioniza sin necesidad de matriz (**Figura 15a**), sin embargo el uso de matriz aumenta considerablemente la señal del analito, como se puede observar en la **Figura 15b** y **Figura 15c**. La abundancia de la señal del NP aumenta de 8×10^3 en LDI a $4,8 \times 10^5$ y $9,5 \times 10^4$ usando FV-CN y FV-COOH-CH₃, respectivamente, esto corresponde a un incremento en la abundancia de 56 y 11 veces, en comparación con la señal LDI. Estos resultados demuestran inequívocamente que con las matrices FV-CN y FV-COOH-CH₃ es posible realizar la ionización por transferencia electrónica del NP.

Figura 15: Espectros de masas del NP (12,5 pmol, 1,3 μJ por pulso, relación molar analito:matriz 1:100). a) Espectro LDI, b) Espectro del NP usando FV-CN como matriz, c) Espectro del NP usando FV-COOH-CH₃ como matriz. Los espectros de la derecha corresponden a un acercamiento a la señal en m/z 302 correspondiente al catión radical del NP



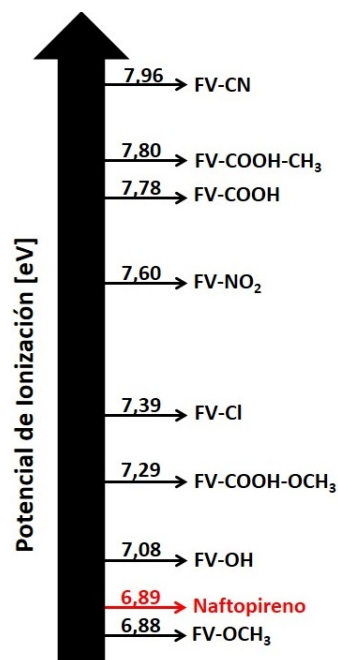
Se ha determinado que los procesos de transferencia electrónica en fase gaseosa ocurren mediante un mecanismo de dos pasos, donde inicialmente la matriz (M) se fotoioniza para producir un catión radical de acuerdo a la Ecuación 5.1, y posteriormente el catión radical de la matriz sufre un proceso de transferencia electrónica con el analito (A), para producir un catión radical del analito y un neutral de la molécula de la matriz de acuerdo a la Ecuación 5.2 [2, 66].



Limbach y colaboradores [67] postularon que la formación del catión radical del analito solamente ocurre si la energía de recombinación de la matriz excede a la energía de recombinación del analito. Aproximando la energía de recombinación de la matriz y el analito al PI vertical, se debe cumplir el criterio $PI_M > PI_A$ para que los procesos de transferencia electrónica sean favorables a la formación del catión radical del analito. Adicionalmente, los autores observaron que las abundancias de iones del analito están directamente relacionadas con las diferencias de PI entre la matriz y el analito; con diferencias más altas se genera un proceso de transferencia electrónica más favorable [66, 67]. Por lo tanto, la determinación del PI de las matrices y los analitos es fundamental para las aplicaciones analíticas en MALDI de transferencia electrónica.

La **Figura 16** muestra los PI de las matrices FV y el analito de NP. Se observa que el FV-CN puede realizar un proceso de transferencia electrónica eficiente con el NP, ya que se cumple la condición $PI_{FV-CN} > PI_{NP}$, esto mismo ocurre para las matrices que tienen potencial de ionización por encima de 6,89 eV que corresponde al PI del NP. Por otro lado, la molécula FV-OCH₃ no puede realizar un proceso de transferencia

Figura 16: Cálculos EPT del potencial de ionización de los FV y el NP. El valor calculado para el NP es 6,89 eV por EPT, el valor reportado en la NIST corresponde a 6,82 eV



electrónica efectivo para la ionización del NP, ya que $PI_{NP} > PI_{FV-OCH_3}$, en este caso la matriz de FV-OCH₃ actúa suprimiendo la señal del NP, ya que termodinámicamente es más probable la formación del catión radical del FV-OCH₃ y el neutral del NP.

Las matrices de transferencia electrónica en MALDI poseen valores altos de PI, sin embargo los PI no pueden ser tan altos, que el proceso de fotoionización no ocurra a condiciones MALDI. Comúnmente los valores de PI para matrices comerciales de MALDI de transferencia electrónica varían de 7,0 eV para el 9,10-difenilantraceno [11] a 8,22 eV para el DCTB [66]. Los cálculos realizados indican que el PI para la serie de FV varía entre 6,88 eV para el FV-OCH₃, hasta 7,96 eV para el FV-CN. Los altos valores de PI del FV-CN y FV-COOH-CH₃ permiten el uso de estas moléculas en reacciones de transferencia electrónica.

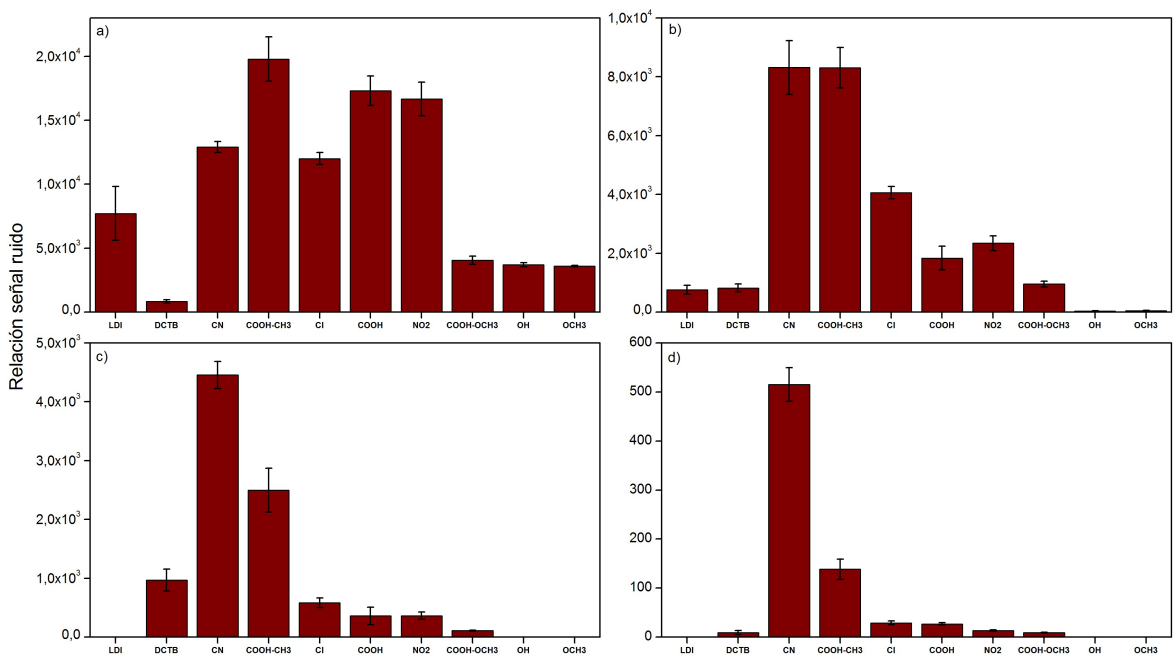
La **Figura 17** muestra el cambio en la relación señal ruido del catión radical del NP

(m/z 302) mediante el uso de la serie de matrices FV y la matriz estándar DCTB. Usando una relación molar analito:matriz de 1:10 (125 pmol de NP en target, **Figura 17a**) se observa un enriquecimiento en la señal del ion molecular del NP, en referencia al espectro LDI, de 56%, 68%, 116%, 124% y 157% con las matrices FV-Cl, FV-CN, FV-NO₂, FV-COOH y FV-COOH-CH₃, respectivamente. El incremento en S/N correlaciona perfectamente con las diferencias en potencial de ionización entre el analito y la matriz. Diferencias de 0,58, 1,1, 0,78, 0,96 y 0,98 eV entre el NP y el FV-Cl, FV-CN, FV-NO₂, FV-COOH y FV-COOH-CH₃, respectivamente, aseguran un proceso eficiente de transferencia electrónica.

Las moléculas FV-COOH-OCH₃, FV-OH y FV-OCH₃ no permiten el aumento de S/N del NP debido probablemente a los bajos valores de PI de 7,29, 7,09 y 6,88 eV, los cuales son muy cercanos al valor del NP (6,89 eV calculado por EPT y 6,82 eV el reportado por la base de datos NIST [53]) previniendo una transferencia electrónica efectiva y la formación del catión radical del analito. Con el DCTB la S/N para el NP corresponde solamente al 8.1% de la señal con LDI.

A una relación matriz analito de 1:100 (12,5 pmol de NP en target) se observó un aumento en S/N del ion molecular NP, con respecto al experimento LDI de 141, 208, 434, 993 y 994% con FV-COOH, FV-NO₂, FV-Cl, FV-COOH-CH₃, y FV-CN, respectivamente. Con el FV-COOH-OCH₃ se registró un aumento del 25% que está en el rango de error de MALDI, por lo tanto se considera que la señal permanece invariable. Se observaron valores de S/N mucho menores que la señal por LDI al usar FV-OH y FV-OCH₃ como matrices, esto implica que la señal LDI fue suprimida por el uso de las matrices FV-OCH₃ y FV-OH. El valor del PI del FV-OCH₃ es menor al del NP y el del FV-OH es muy cercano al valor del NP, lo que no permitiría un proceso de transferencia electrónica favorable a la formación del catión radical del analito. No se

Figura 17: Variación de la relación señal ruido para la señal del NP (m/z 302) usando MALDI con la serie de FV a diferente relación molar analito:matriz a). 1:10 (125 pmol de NP); b). 1:100 (12,5 pmol de NP); c). 1:1000 (1,25 pmol de NP); d). 1:10000 (125 fmol NP).



observó un enriquecimiento de S/N con DCTB, y su desempeño es comparable con el observado en LDI.

Con una relación analito:matriz de 1:1000 (1,25 pmol de NP en target) se registraron relaciones S/N promedio para el ion molecular del NP de 361, 364, 583, 2.487 y 4.455 con FV-COOH, FV-NO₂, FV-Cl, FV-COOH-CH₃, y FV-CN, respectivamente. No se detectó señal del analito cuando se usó FV-OH y FV-OCH₃ como matrices, debido a la razón anteriormente mencionada. Para el DCTB el promedio de S/N para el NP es 967, más alto que para el FV-COOH, FV-NO₂ y FV-Cl. Sin embargo, el S/N promedio para el NP con FV-CN y FV-COOH-CH₃ es todavía 4,6 y 2,5 veces mayor que para el DCTB. Con una relación analito:matriz de 1:1000 (125 fmol de NP en target) se observó una relación S/N promedio de 13, 27, 29, 138 y 512 para el ion molecular del NP usando FV-NO₂, FV-Cl, FV-COOH, FV-COOH-CH₃ y FV-CN, respectivamente. No se detectaron señales del analito cuando se usaron los derivados de FV-OH y FV-OCH₃ como matrices. La relación S/N para el NP con DCTB es 9, esto corresponde a un incremento en las señales de 1,4, 3,0, 3,2, 15,3 y 57 veces cuando se usa FV-NO₂, FV-Cl, FV-COOH, FV-COOH-CH₃ y FV-CN.

A modo de resumen, se determinó que tres de los ocho derivados de FV (FV-NO₂, FV-Cl, FV-COOH) tienen desempeños comparables a las matrices de MALDI de transferencia electrónica tradicionales como el DCTB, y que el FV-CN y el FV-COOH-CH₃ se destacan como firmes candidatos para procesos de transferencia electrónica en MALDI. Una combinación de sus propiedades fisicoquímicas como el máximo de absorción UV cercano a 355 nm, alta absorptividad molar a 355 nm, los potenciales de ionización más altos de la serie y alta eficiencia de decaimiento no radiativo, hacen del FV-CN y el FV-COOH-CH₃ las moléculas con mayor potencial en la serie para el estudio de procesos de transferencia electrónica.

5.5 IONIZACIÓN DE ANALITOS MODELO POR TE

Los experimentos MALDI de ionización por transferencia electrónica del NP mostraron que es posible realizar procesos de transferencia electrónica usando algunos derivados de FV. Con base en los resultados preliminares con el NP se seleccionaron los derivados FV-CN, FV-COOH-CH₃, FV-Cl y FV-COOH-OCH₃ como matrices MALDI para estudiar un nuevo set de analitos. Las moléculas FV-OCH₃, FV-OH, FV-COOH y FV-NO₂ se eliminaron debido a diversas causas. Por ejemplo, el FV-OCH₃ y FV-OH no son adecuados como matrices MALDI de transferencia electrónica debido a su bajo potencial de ionización. Por otra parte, a pesar de que las moléculas FV-COOH y FV-NO₂ poseen un potencial de ionización relativamente alto, propiedades como baja solubilidad (FV-COOH) y baja absortividad molar a la longitud de onda del láser (FV-NO₂) limitan su aplicación como matrices MALDI. Como analitos modelo se escogieron los compuestos que se observan en la **Figura 18**.

5.5.1 Porfirina de Cobalto

En la **Figura 19** se observa la gráfica de variación de la relación S/N del catión radical de la porfirina de cobalto (m/z 791) usando FV-CN, FV-COOH-CH₃, FV-COOH-OCH₃, FV-Cl y DCTB como matrices, a diferentes relaciones molares analito:matriz. Para cada matriz se usó un código de colores y los datos con el mismo color corresponden a datos del analito tomados con la misma matriz. Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado a una energía por pulso de láser de 0,88 μ J, el valor de S/N reportado corresponde al promedio de las cinco mediciones.

Figura 18: Estructura de los analitos de transferencia electrónica y su masa monoisotópica. a) Porfirina de cobalto (m/z 791.21), b) Rubreno (m/z 532.22) c) Coroneno (m/z 300.09), d) Ftalocianina de zinc (m/z 576.08), e) Ftalocianina (m/z 514.17 m/z)

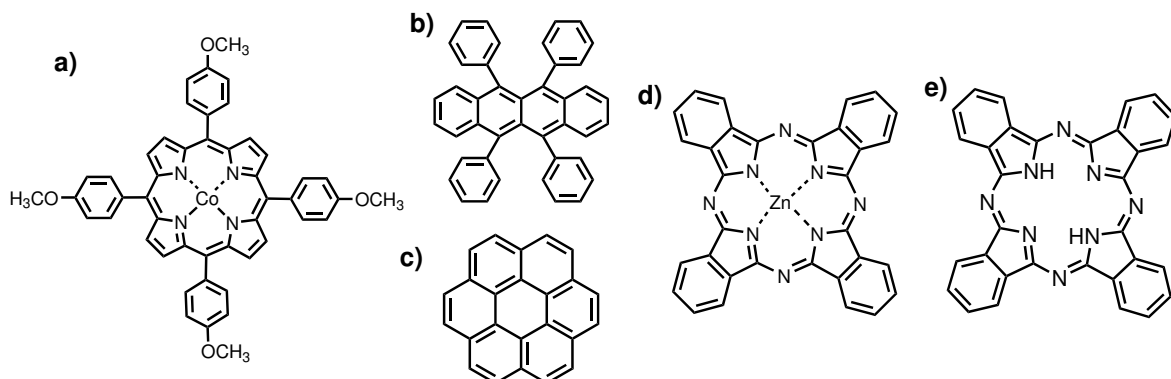
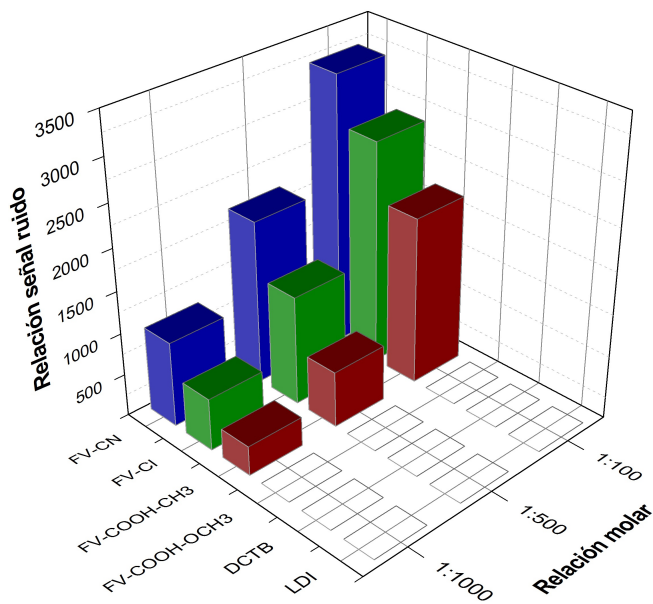


Figura 19: Relación señal-ruido del catión-radical de la porfirina de cobalto (m/z 791), usando diferentes matrices MALDI FV a diferentes relaciones molares analito:matriz. Los datos se tomaron a energía del láser de 0,88 μ J.



En la **Figura 19** se observa la ausencia de señales del analito en los experimentos LDI, y en los experimentos MALDI empleando DCTB y FV-COOH-OCH₃ para todas las relaciones molares analito:matriz. Sin embargo, mediante el uso de las matrices FV-CN, FV-Cl y FV-COOH-CH₃ es posible observar señal de la porfirina de cobalto a relaciones molares 1:100, 1:500 y 1:1000. La matriz FV-CN permite obtener el mayor valor de S/N entre todas las relaciones molares estudiadas. La **Figura 20** muestra la apariencia final del espectro de masas usando las matrices FV-CN, FV-Cl y FV-COOH-CH₃ en relación molar de analito:matriz de 1:500. A la derecha de los tres espectros se encuentra un acercamiento a la señal de m/z 791 correspondiente al catión radical de la porfirina de cobalto. La señal de la porfirina con FV-CN exhibe una abundancia del orden de 1.5×10^5 , por otro lado, las abundancias del catión radical del analito con matrices FV-Cl y FV-COOH-CH₃ alcanzan valores de $6,5 \times 10^4$ y 3.8×10^4 , respectivamente. Consecuentemente se observa un incremento de 2 y 4 veces en la señal de la porfirina con FV-CN en comparación con el FV-Cl y el FV-COOH-CH₃, respectivamente.

Adicionalmente, se construyeron curvas de aparición de iones para la señal del catión radical del analito (m/z 791) a diferentes energías del láser con la serie de matrices FV. Se evaluaron los parámetros: S/N, abundancia y resolución. Las gráficas correspondientes se pueden observar en la **Figura 21**. En términos de S/N se determinó que a bajas energías de láser hay un aumento exponencial en el valor S/N de los iones del analito, lo que correlaciona con las curvas de aparición de iones de la matriz, donde un aumento en la energía del láser permite aumentar la desorción de iones de la matriz, y por lo tanto la aparición de iones del analito por reacciones secundarias en la nube de iones. Sin embargo, cuando las energías del láser son muy altas se induce fragmentación de los iones del analito y la matriz, lo que conduce a un aumento en el ruido, y por lo tanto a una disminución en el valor de S/N. La gráfica de abundancia posee un compor-

Figura 20: Espectros de masas de la porfirina de cobalto (analito:matriz 1:500) usando a) FV-CN, b) FV-Cl y c) FV-COOH-CH₃ como matrices. Los espectros de la derecha corresponden a un acercamiento en la región de m/z 791. Los datos se tomaron a energía de láser de 0,88 μ J

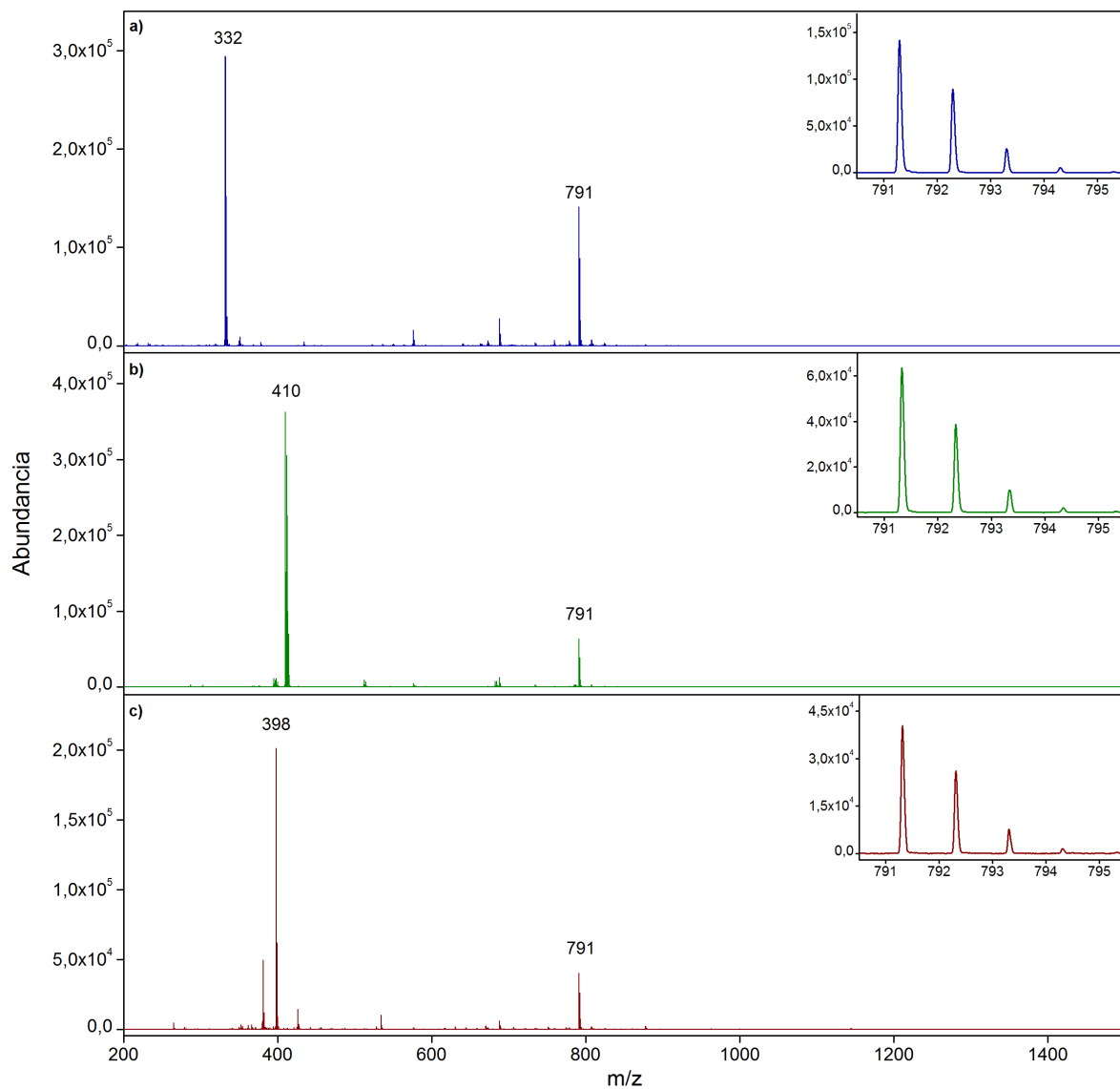
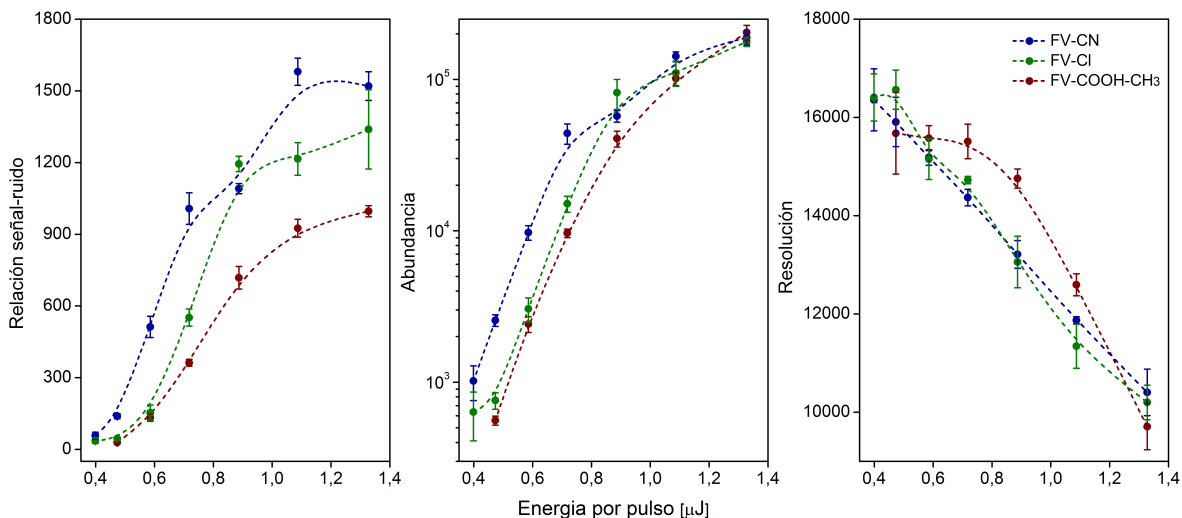


Figura 21: Curvas de aparición de iones para la señal m/z 791 que corresponde al catión radical de la porfirina de cobalto. Se evaluaron los parámetros: relación señal-ruido, abundancia y resolución. Se usó relación analito:matriz 1:500.

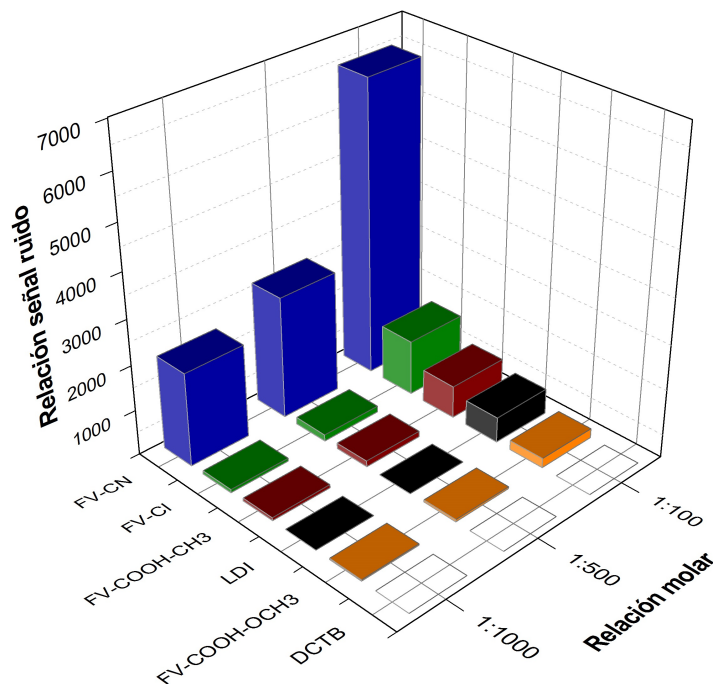


tamiento exponencial, igual al reportado por Dreisewerd [69] y correlaciona con la curva de aparición de iones de la matriz. La gráfica de resolución muestra como disminuye la resolución cuando se aumenta la energía del láser. Un aumento en la energía del láser implica mayor desorción de iones del analito, ya sea por formación directa del ion del analito o por procesos secundarios de ionización en los cuales intervienen moléculas de la matriz. El aumento en la cantidad de iones del analito en una nube muy densa de iones crea dispersión en las energías de los iones, lo que se traduce en una disminución de la resolución.

5.5.2 Rubreno

El rubreno es un hidrocarburo policíclico aromático sustituido (ver **Figura 18b**) que posee una masa monoisotópica de 532 Da y un potencial de ionización de 6,41 eV [53]. Se realizó un seguimiento a la variación de S/N del ión m/z 532 con la serie de FV y los resultados se observan en la **Figura 22**. Los FV proveen valores de S/N superiores a los

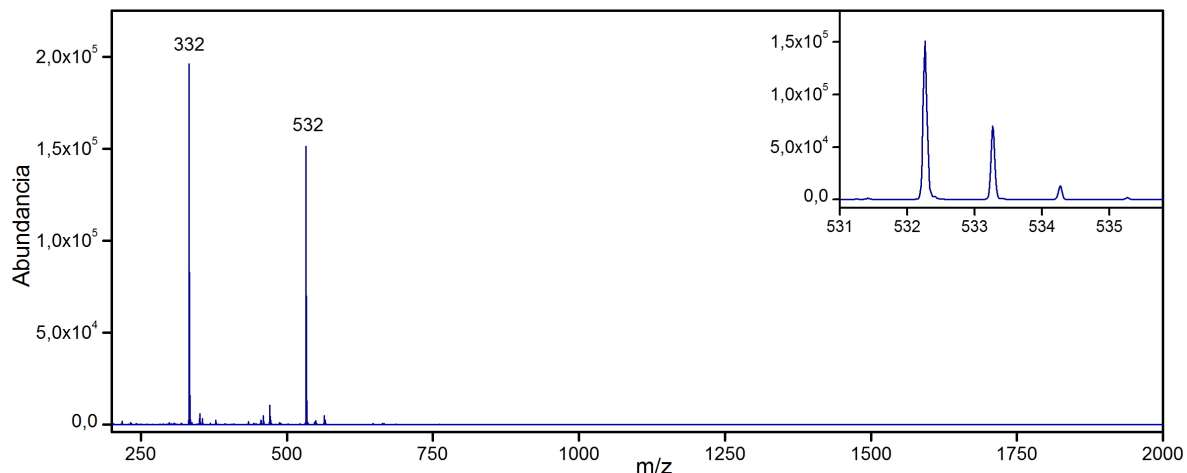
Figura 22: Relación señal-ruido del catión radical del rubreno (m/z 532), usando diferentes matrices MALDI FV a diferentes relaciones molares analito:matriz. Los datos se tomaron a energía de láser de $0,88 \mu\text{J}$



determinados con LDI, el cual presentó señal únicamente a relación molar 1:100. No fue posible obtener señal del analito usando DCTB como matriz. Debido a que el rubreno posee un potencial de ionización de $6,41 \text{ eV}$, es posible realizar procesos de transferencia electrónica usando la serie de moléculas FV, ya que el PI de estas moléculas oscila entre $7,96 \text{ eV}$ a $7,29 \text{ eV}$, y se cumple la condición $PI_M > PI_A$ (M=Matriz, A=Analito). En relación molar 1:100, se observa un valor de S/N de 6.498 para el rubreno usando FV-CN, por otro lado, sin usar matriz o en modo LDI se observa un valor de S/N de 558. Mediante el uso de la matriz FV-CN se encuentra un aumento en el valor de S/N de 11 veces con respecto a la señal en LDI. En relación molar 1:500 no se observa señal del rubreno en LDI, y usando FV-CN como matriz MALDI se observa un valor de S/N de 2.693.

La **Figura 23** muestra el espectro de masas del rubreno usando FV-CN como matriz en

Figura 23: Espectro de masas del rubreno (analito:matriz 1:500) usando FV-CN como matriz. El espectro de la derecha corresponde a un acercamiento en la región de m/z 532. Los datos se tomaron a energía del láser de $0,88 \mu\text{J}$

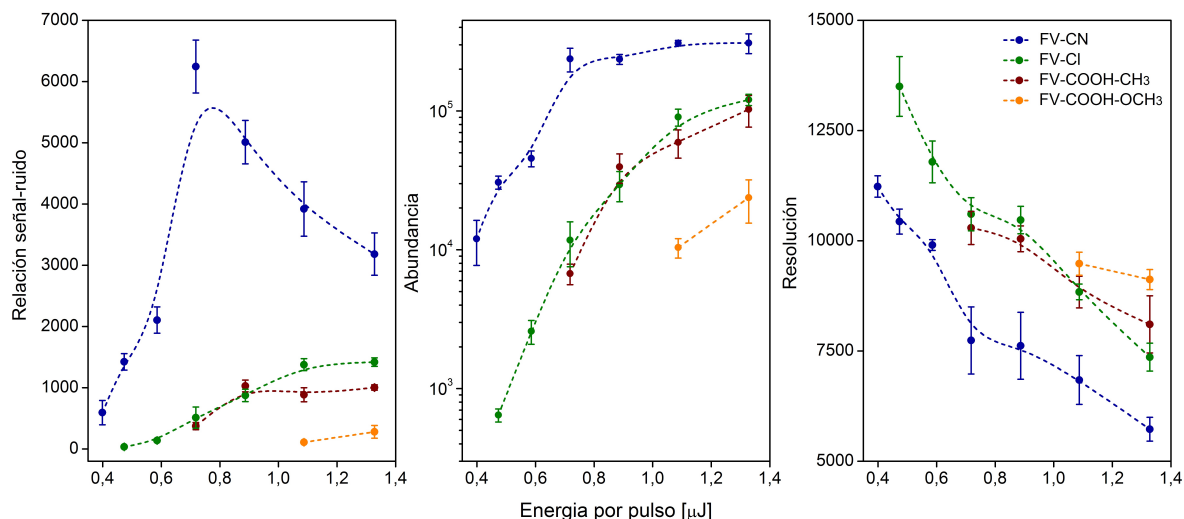


relación molar 1:500. No se muestran los espectros en LDI ya que a esta concentración (2,5 pmol en *target*) el rubreno no es detectable. En el espectro se observa que a pesar de que hay una molécula de rubreno por 500 moléculas de FV-CN, las abundancias de las señales tanto del rubreno como de la matriz FV-CN son muy similares, lo cual es una prueba cualitativa del proceso de transferencia electrónica. Se observa que el rubreno alcanza abundancias del orden de $1,5 \times 10^5$, mientras en LDI no se observa señal alguna.

Se construyeron las gráficas correspondientes a las curvas de aparición de iones de la señal del catión radical del rubreno, las cuales se muestran en la **Figura 24**. Las mejores señales y abundancias se obtienen usando FV-CN como matriz, y poca señal se obtiene con FV-Cl, FV-COOH-OCH₃ y FV-COOH-CH₃, estas curvas refuerzan los resultados encontrados en la figura de barras (ver **Figura 22**), donde se muestra un aumento considerable del valor de relación señal-ruido, usando FV-CN como matriz.

La curva del cambio del valor S/N del rubreno usando FV-CN como matriz a diferentes energías del láser (**Figura 24**) muestra como inicialmente ocurre un crecimiento rápido

Figura 24: Curvas de aparición de iones para la señal m/z 532 que corresponde al catión-radical del rubreno. Se evaluaron los parámetros: relación señal-ruido, abundancia y resolución. Se usó relación analito:matriz 1:500.



del valor de S/N, conforme se aumenta la energía del láser hasta alcanzar un máximo a una energía de 0,88 μJ , a energías más altas ocurre una disminución del parámetro de relación señal ruido.

A partir de la gráfica de abundancia se observa que por encima de 0,88 μJ existe un crecimiento muy leve del valor de abundancia conforme se aumenta la energía del láser. Es posible concluir que la disminución del parámetro S/N se debe mayoritariamente al aumento del ruido, ya que la abundancia del ion permanece prácticamente invariable por encima de energías de láser de 0,88 μJ .

El aumento en el ruido se debe a procesos de fragmentación de la matriz y el analito que ocurren a altas energías del láser (en el caso de los FV estas corresponden a energías mayores a 0,88 μJ). Este fenómeno descrito es análogo al reportado para la curva de aparición de iones de la matriz, donde por encima de energías de 0,88 μJ se observa fragmentación extensiva. La curva de resolución muestra una disminución de la resolución conforme se aumenta la energía del láser.

5.5.3 Coroneno

El coroneno es un PAH (ver **Figura 18c**) que posee una masa monoisotópica de 300 Da y un potencial de ionización de 7,29 eV [53]. La **Figura 25** muestra la variación del valor de S/N de los experimentos realizados con coroneno y la serie de matrices FV. En la **Figura 25** se observa que solo se obtuvo ionización efectiva del coroneno usando FV-CN como matriz, esto ocurre debido a que el PI del coroneno es bastante alto (7,29 eV) y el PI de algunas matrices como el FV-COOH-OCH₃ (7,29 eV) y el FV-Cl (7,39 eV) no es suficientemente alto como para permitir un proceso de transferencia electrónica efectivo, ya que la diferencia de PI entre el coroneno y el FV-COOH-OCH₃ y FV-Cl es 0 y 0,1 eV, respectivamente.

Por otro lado, el FV-CN (7,96 eV) posee un PI que es 0,67 eV mayor que el PI del coroneno, lo cual permite termodinámicamente realizar el proceso de transferencia electrónica. A pesar de que el FV-COOH-CH₃ (7,8 eV) tiene un PI que es 0,51 eV mayor que el del coroneno, la transferencia electrónica no es muy efectiva. Es posible que la baja solubilidad de la matriz FV-COOH-CH₃ no permita una correcta co-cristalización con los analitos y por lo tanto dificulte la transferencia electrónica en fase gaseosa.

Los espectros de masas en relación molar 1:500 (2,5 pmol del analito en *target*) a 0,88 μ J muestran que el coroneno presenta señal en LDI a estas condiciones, sin embargo la señal es muy baja y se observa una gran cantidad de ruido (ver **Figura 26a**). En LDI, la señal del coroneno presenta un valor de S/N de 91 (abundancia de 480), mediante el uso de la matriz FV-CN (ver **Figura 26b**) se obtiene un valor de S/N de 2.300 (abundancia $2,4 \times 10^5$), lo que implica que el valor S/N del coroneno con matriz FV-CN es 25 veces mayor que el valor de S/N sin matriz.

Figura 25: Relación señal-ruido del catión radical del coroneno (m/z 300), usando diferentes matrices MALDI FV a diferentes relaciones molares analito:matriz. Los datos se tomaron a energía del láser de $0,88 \mu\text{J}$

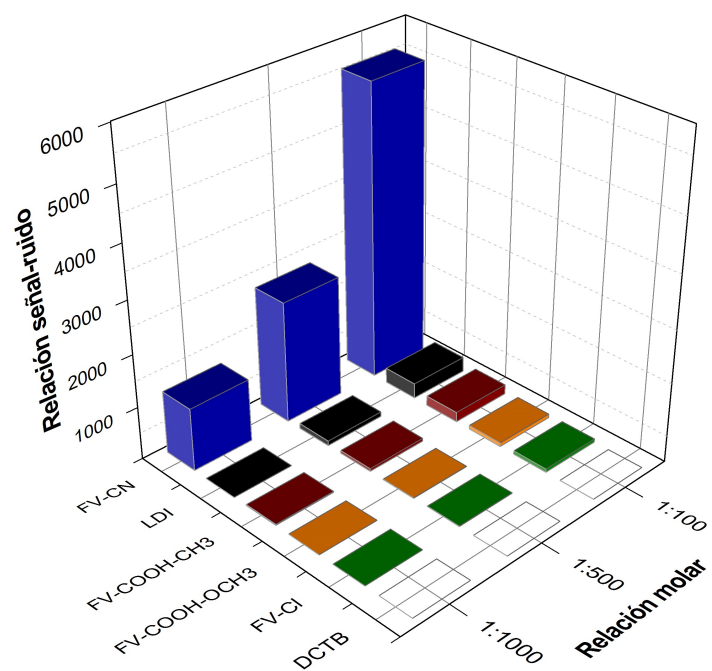
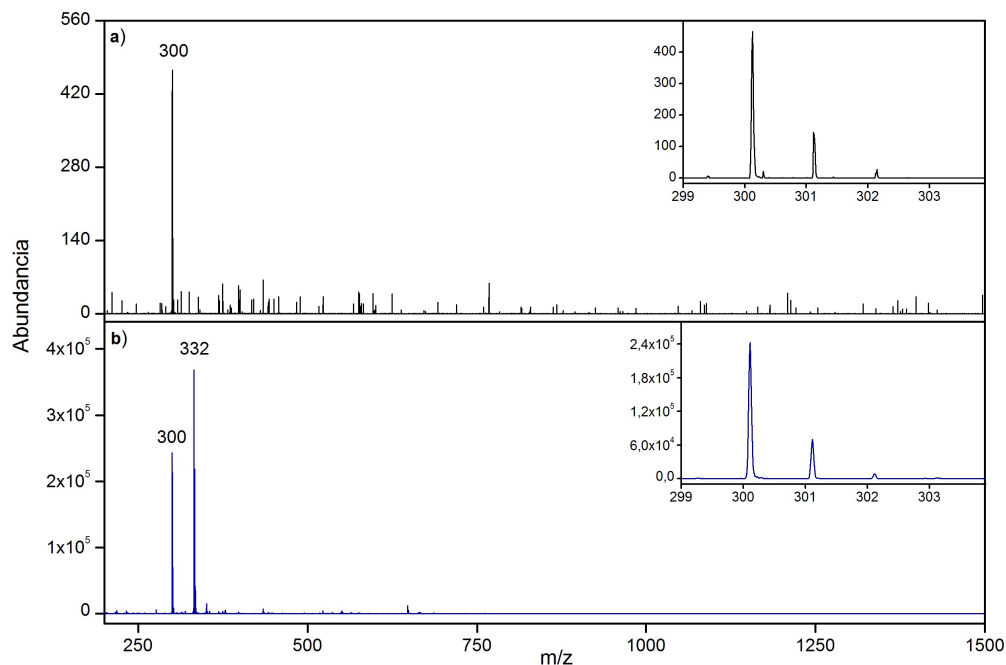
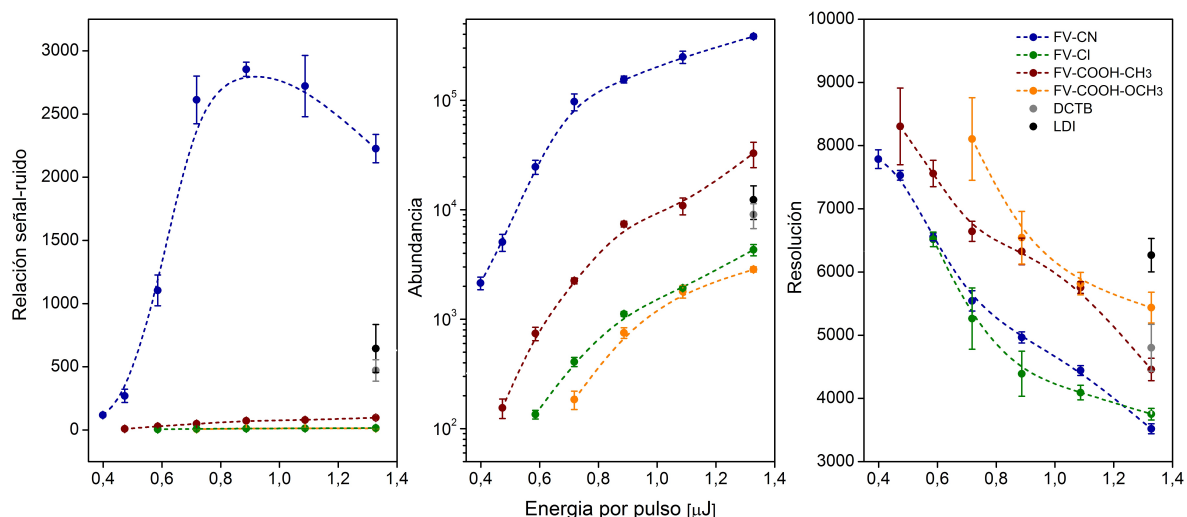


Figura 26: Espectros de masas del coroneno (analito:matriz 1:500) usando a) LDI, b) FV-CN. Los espectros de la derecha corresponden a un acercamiento en la región de m/z 300. Los datos se tomaron a energía de láser de $0,88 \mu\text{J}$



Las curvas de aparición de iones del coroneno, muestran un máximo valor de S/N a $0,88 \mu\text{J}$ de energía. Las curvas muestran indiscutiblemente que se obtiene una mejor señal del coroneno usando FV-CN como matriz y que se observa poca abundancia de iones con otras matrices. En estas graficas se observa algo interesante con respecto a la señal LDI y con DCTB. La **Figura 27** está construida a $0,88 \mu\text{J}$, que en la escala relativa del láser MALDI corresponde a 20% del láser, a esta energía del láser no se observa señal LDI y usando DCTB como matriz, sin embargo la curva de aparición de iones se realizó hasta valores de energía de $1,33 \mu\text{J}$ (30% en escala relativa del láser), y a esta energía a la misma concentración se observa señal del analito sin matriz y con DCTB, los cuales son los dos puntos que aparecen al final de la **Figura 27**. A energías más altas se observa señal en LDI y con DCTB, sin embargo a estas energías las matrices FV no funcionan correctamente porque se generan señales muy abundantes de la matriz que pueden saturar el detector y catalizar la fragmentación de los analitos.

Figura 27: Curvas de aparición de iones para la señal m/z 300 que corresponde al catión radical del coroneno. Se evaluaron los parámetros: relación señal-ruido, abundancia y resolución. Se usó relación analito:matriz 1:500.



En otras palabras el rango de energías de trabajo ideales para las matrices FV (0,8 μJ o 20% en escala relativa) es diferente al rango de trabajo de matrices como el CHCA, DCTB y DHB, que funcionan apenas a energías por encima de 1.5 μJ (por encima de 30% del láser en escala relativa). Trabajar a energías de láser mucho menores representa una ventaja muy grande para las matrices FV, debido a que permiten aumentar los tiempos de vida del láser, generan menor contaminación de la fuente y a menor energía del láser, la fragmentación de analitos lábiles se disminuye considerablemente.

5.5.4 Ftalocianina de zinc

La ftalocianina de zinc usada en esta serie de experimentos corresponde a la estructura especificada en la **Figura 18.d**. Esta molécula posee un potencial de ionización de 7,37 eV [53] y una masa monoisotópica de 576 Da. La variación del valor de S/N de este analito se observa en la **Figura 28**. El PI de este analito (7,37 eV) no permite que matrices como el FV-COOH-OCH₃ (7,29 eV) y el FV-Cl (7,39 eV) puedan realizar

procesos de transferencia electrónica a este compuesto, ya que los PI de estas matrices están muy cercanos o están por debajo del PI del analito. Sin embargo, el uso de una matriz con alto PI como el FV-CN (7,96 eV) permite aumentar la señal del analito considerablemente. En relación molar 1:500, la señal LDI presenta un valor de S/N 1.242, por otro lado, mediante el uso del FV-CN, este valor aumenta hasta 3.067, lo que corresponde a un aumento de más del doble del valor en referencia a la señal en LDI.

La **Figura 29** muestra los espectros de masas en relación molar 1:500, se contrasta el espectro LDI con el espectro usando FV-CN. Se encuentra que el espectro LDI rinde buena señal y que la abundancia del ion m/z 576 corresponde a 1×10^4 , por otro lado mediante el uso de matriz FV-CN la señal posee una abundancia de $2,4 \times 10^5$, lo que corresponde a un aumento de 24 veces la señal con respecto a la señal LDI. Adicionalmente, los espectros de la derecha de la **Figura 29** muestran que se conserva el patrón isotópico del ión molecular, con respecto al patrón isotópico calculado. Cuando se usan matrices de naturaleza ácida como el CHCA, los patrones isotópicos de los analitos no se conservan debido a que estas matrices pueden protonar los analitos de porfirina, y ocurre una superposición de los patrones isotópicos del catión radical y el ion protonado del analito [16].

5.5.5 Ftalocianina

La ftalocianina corresponde a la estructura mostrada en la **Figura 18e**. Esta molécula posee un potencial de ionización de 7,36 eV [53] y masa monosiotópica de 514 Da. La **Figura 30** muestra que no se observa la señal correspondiente del catión radical m/z 514 usando LDI o DCTB.

Figura 28: Relación señal-ruido del catión radical de la ftalocianina de zinc (m/z 576), usando diferentes matrices MALDI FV a diferentes relaciones molares analito:matriz. Los datos se tomaron a energía de láser de $0,88 \mu\text{J}$

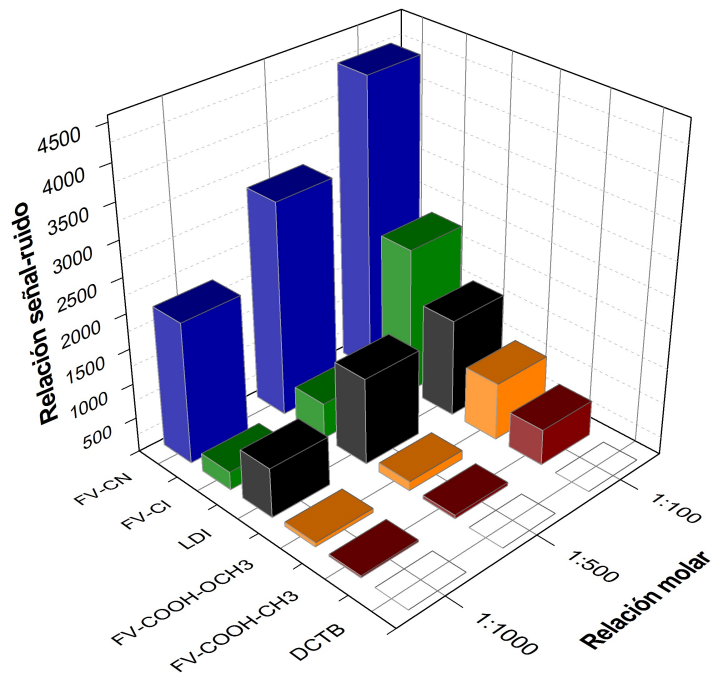


Figura 29: Espectro de masas de la ftalocianina de zinc (analito:matriz 1:500) usando a) LDI y b) FV-CN. Los espectros de la derecha corresponden a un acercamiento en la región de m/z 576. Los datos se tomaron a energía del láser de $0,88 \mu\text{J}$

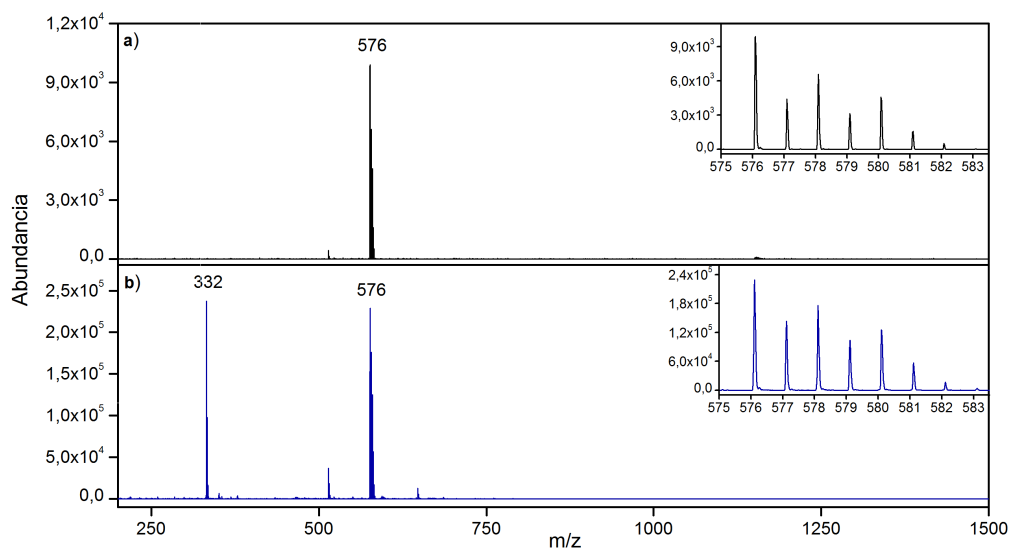


Figura 30: Relación señal-ruido del catión radical de la ftalocianina (514 m/z), usando diferentes matrices MALDI FV a diferentes relaciones molares analito:matriz. Los datos se tomaron a energía de láser de 0,88 μJ

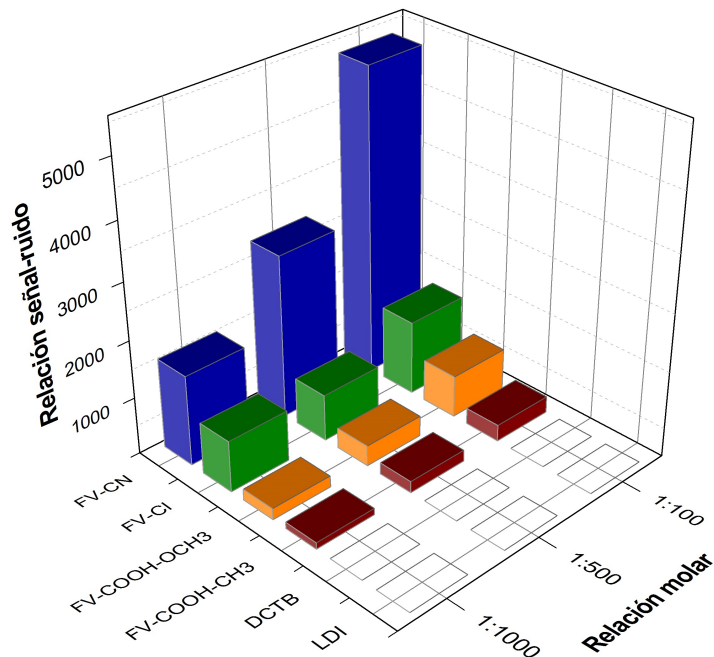
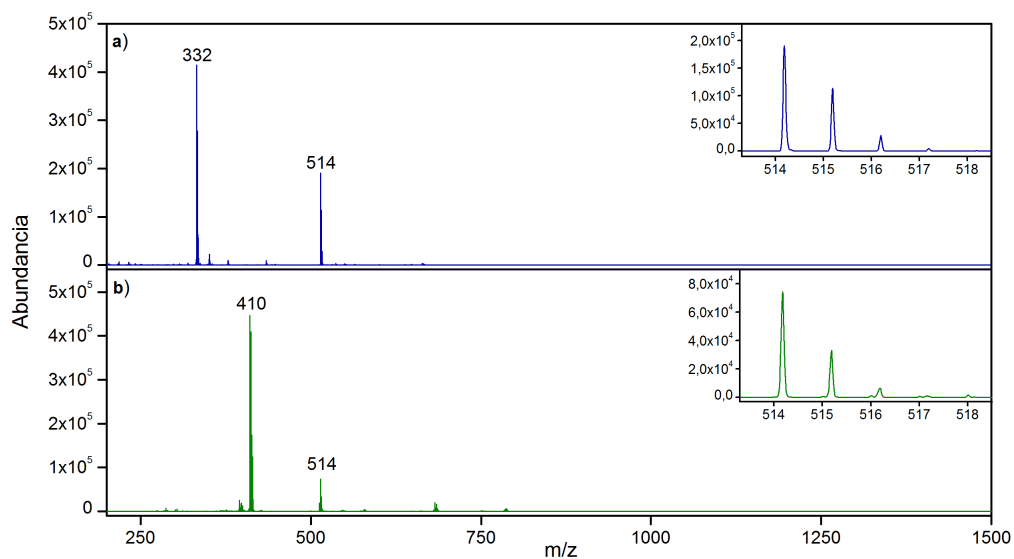


Figura 31: Espectro de masas de la ftalocianina (analito:matriz 1:500) usando a) FV-CN y b) FV-Cl. Los espectros de la derecha corresponden un acercamiento en la región de m/z 514. Los datos se tomaron a energía del láser de 0,88 μJ



La **Figura 31** muestra los espectros de masas correspondientes a la ftalocianina, usando FV-CN y FV-Cl como matrices. A relación molar 1:500 (5 pmol de analito en *target*) no se observó señal en LDI ni con DCTB, sin embargo, a estas mismas condiciones mediante el uso de la matriz FV-CN se alcanza una abundancia de iones de la señal m/z 514 de 2×10^5 . Adicionalmente, mediante el uso de la matriz FV-Cl se observa una señal en el orden de 8×10^4 , demostrándose que el proceso de transferencia electrónica se lleva a cabo eficientemente.

5.6 LÍMITES DE DETECCIÓN

Se determinaron los límites de detección para los analitos propuestos usando las matrices FV-CN, FV-Cl y FV-COOH-CH₃, los resultados se encuentran en la **Tabla 13**. Se determinó que las matrices FV permiten alcanzar menores límites de detección en comparación con los límites de detección alcanzados en LDI. De las matrices estudiadas se destaca el FV-CN, ya que en tres de los cuatro analitos estudiados fue posible detectar el ion molecular de la matriz hasta en cantidades de 2,5 fmol.

Tabla 13: Límites de detección usando matrices FV

Analito	LDI	FV-CN	FV-Cl	FV-COOH-CH ₃
Porfirina Cobalto	1,25 nmol	2,5 fmol	2,5 fmol	12,5 fmol
Rubreno	12,5 pmol	2,5 fmol	125 fmol	250 fmol
Coroneno	2,5 pmol	12,5 fmol	2,5 pmol	1,25 pmol
Ftalocianina de Zinc	125 fmol	2,5 fmol	125 fmol	1,25 pmol

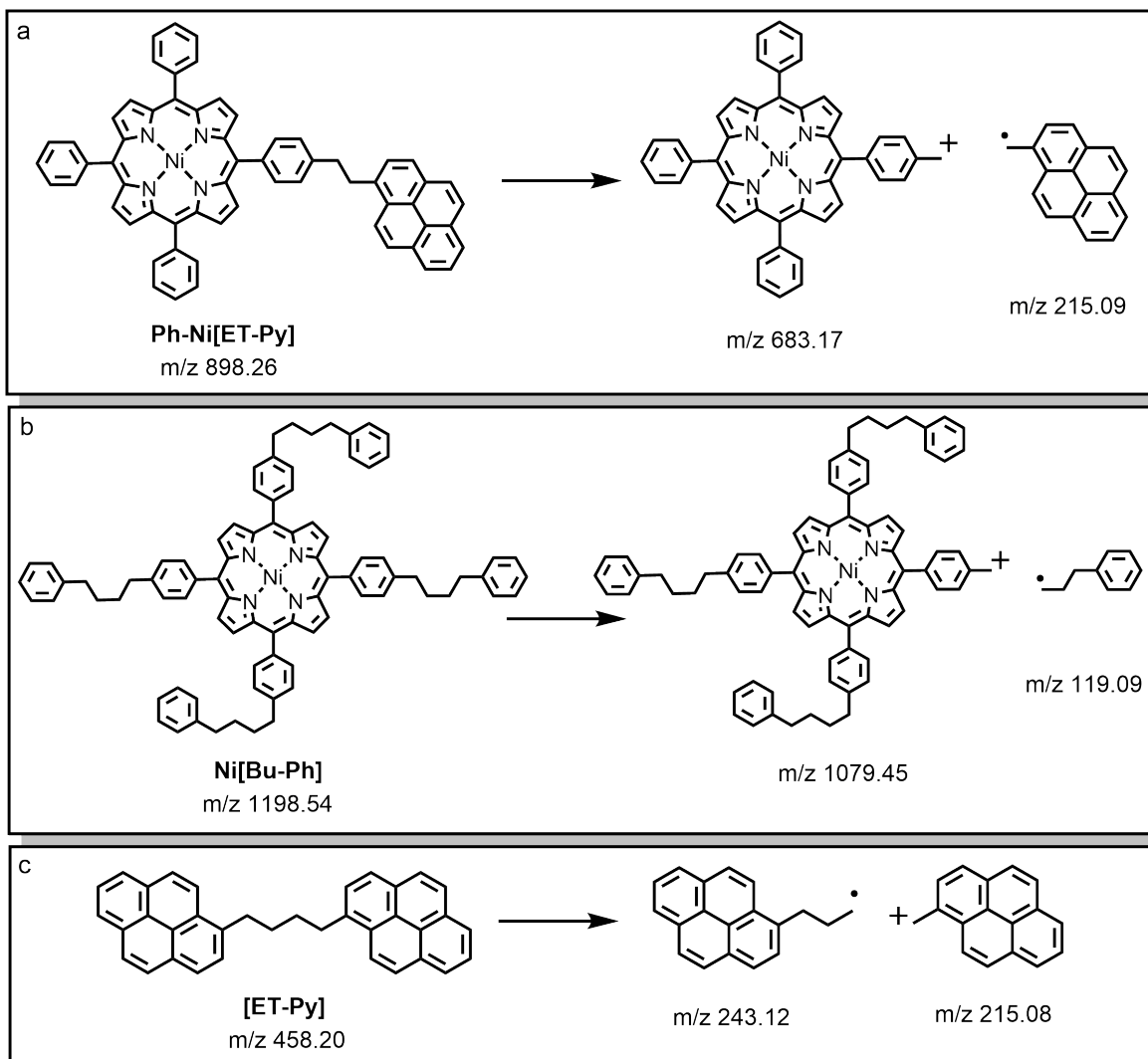
5.7 IONIZACIÓN DE ANALITOS LÁBILES

Los experimentos anteriores permitieron determinar que se requiere mucha menor energía de láser para efectuar la ionización de moléculas de fenilenvinileno, y que por lo tanto es posible ionizar analitos modelo con matrices FV a menor energía del láser. Esto tiene una implicación importante en el análisis de analitos lábiles, ya que a menor energía del láser es posible evitar la fragmentación de los analitos. Con este objetivo se usaron los derivados FV-COOH, FV-COOH-CH₃, FV-COOH-OCH₃ como matrices MALDI para el análisis de los analitos lábiles representados en la **Figura 32**. Estos analitos corresponden a estructuras modelo de asfalteno sintetizadas en la Universidad de Calgary. La **Figura 32** muestra a su vez los procesos de fragmentación más probables que sufren estas moléculas, tal como ha sido previamente reportado por Kenttämäa y colaboradores [70, 71]. Estos analitos lábiles tienden a formar inicialmente un catión radical (A^{+•}) que posteriormente se fragmenta de acuerdo con el diagrama especificado.

5.7.1 Porfirina Ph-Ni[ET-Py]

De acuerdo con la **Figura 32** la porfirina Ph-Ni[ET-Py] de masa monoisotópica m/z 898 se fragmenta formando un radical de metil pireno de masa m/z 215 y un fragmento porfirínico de masa m/z 683. En la **Figura 32** se observa que la carga correspondiente, después de la fragmentación del catión radical de masa m/z 898, se sitúa en el fragmento de porfirina m/z 683 y se forma el radical m/z 215. Sin embargo, es probable que la fragmentación del ión m/z 898 ocurra dejando la carga resultante en el fragmento de metil pireno m/z 215, y generando un radical del fragmento m/z 683. El fragmento más probable corresponde al m/z 683, pues este fragmento presenta mayor deslocalización electrónica y permite estabilizar la carga positiva más fácilmente.

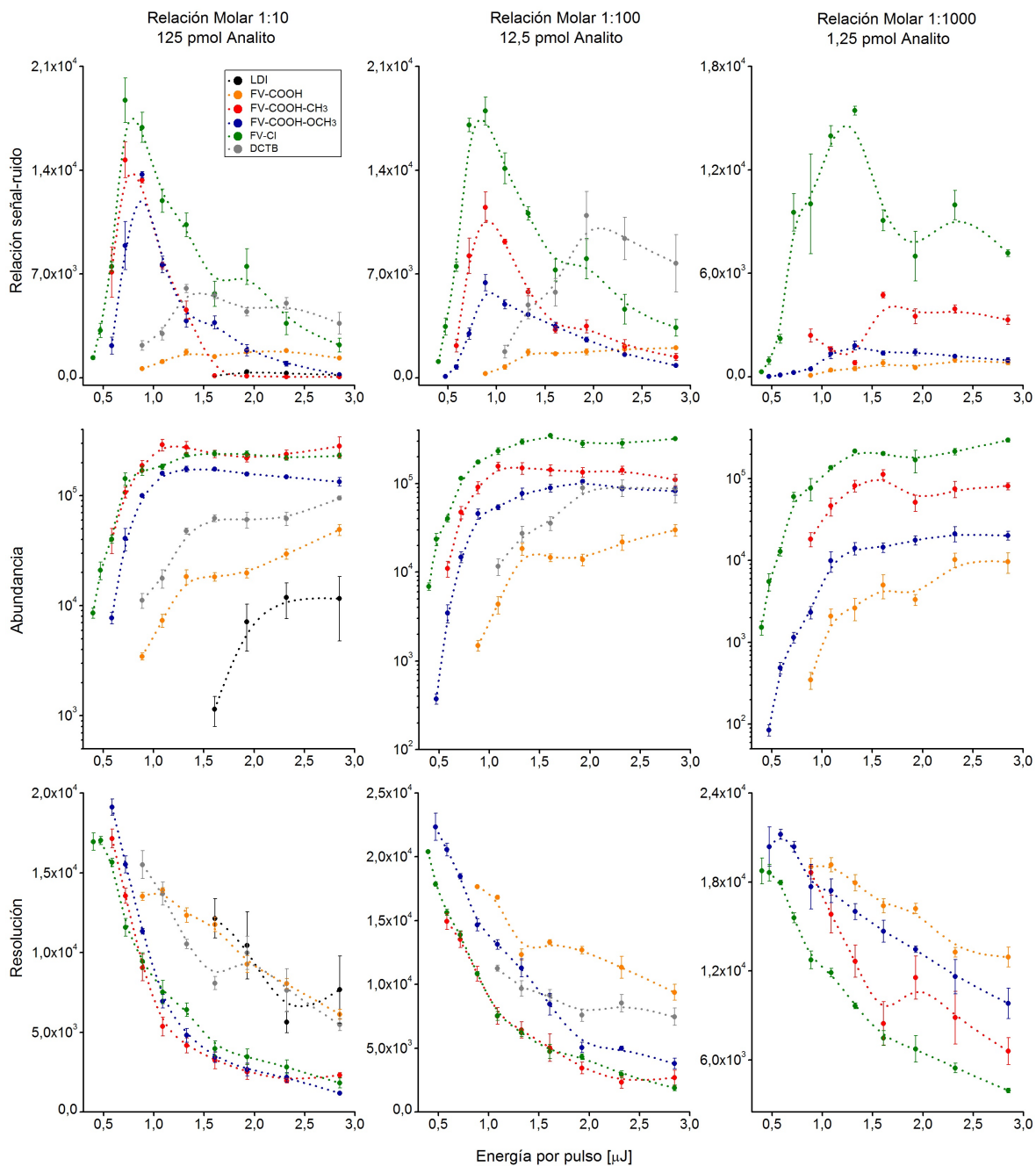
Figura 32: Analitos lábiles y sus correspondientes fragmentos, las moléculas corresponden a: a) Porfirina Ph-Ni[ET-Py], b) porfirina Ni[Bu-Ph], c) [ET-Py].



Las curvas de aparición de iones para la señal correspondiente al ion monoisotópico de la porfirina Ph-Ni[ET-Py] (m/z 898), se encuentran en la **Figura 33**. Los experimentos se realizaron variando la energía del láser de 0,33 a 2,8 μJ por pulso, utilizando relaciones molares analito:matriz de 1:10, 1:100 y 1:1000. Para cada una de estas relaciones molares se evaluaron tres parámetros diferentes que son: relación señal-ruido, abundancia y resolución. La señal del analito por LDI (sin matriz) se observó únicamente usando 125 pmol del analito en *target*, lo que corresponde a una relación molar analito:matriz de 1:10. Usando concentraciones 12,5 pmol y 1,25 pmol, la cantidad de analito es tan pequeña que no se observan señales en el espectro LDI. Esto nos permite suponer que la aparición de señales de analito a concentraciones de 12,5 pmol (relación molar 1:100) y 1,25 pmol (relación molar 1:1000) es causada por procesos de transferencia electrónica analito-matriz.

En la **Figura 33** se evaluaron los parámetros de relación señal ruido, abundancia y resolución, para el catión radical del Ph-Ni[ET-Py] (m/z 898) a diferentes relaciones molares analito:matriz (1:10, 1:100, y 1:1000). Las curvas de aparición evaluando el cambio en el valor de S/N se presentan en la primera fila de la **Figura 33**. Se observa que el valor de S/N del Ph-Ni[ET-Py] con las matrices FV-Cl, FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃ presenta un aumento exponencial, hasta alcanzar un valor máximo a 0,8 μJ por pulso. Por otro lado, el DCTB presenta valores máximos de la señal del Ph-Ni[ET-Py] a energías de láser cercanas a 1,5 μJ por pulso. Las curvas de aparición de iones de la matriz, demostraron que se requiere una menor energía del láser para ionizar los FV en comparación con la requerida para ionizar el DCTB, esto se traduce en la posibilidad de formación de iones del Ph-Ni[ET-Py] a energías mas bajas, usando matrices FV. Por encima de energías de láser por pulso de 0,8 μJ , el valor S/N del Ph-Ni[ET-Py] decrece, probablemente debido al aumento del ruido y a la fragmentación del analito.

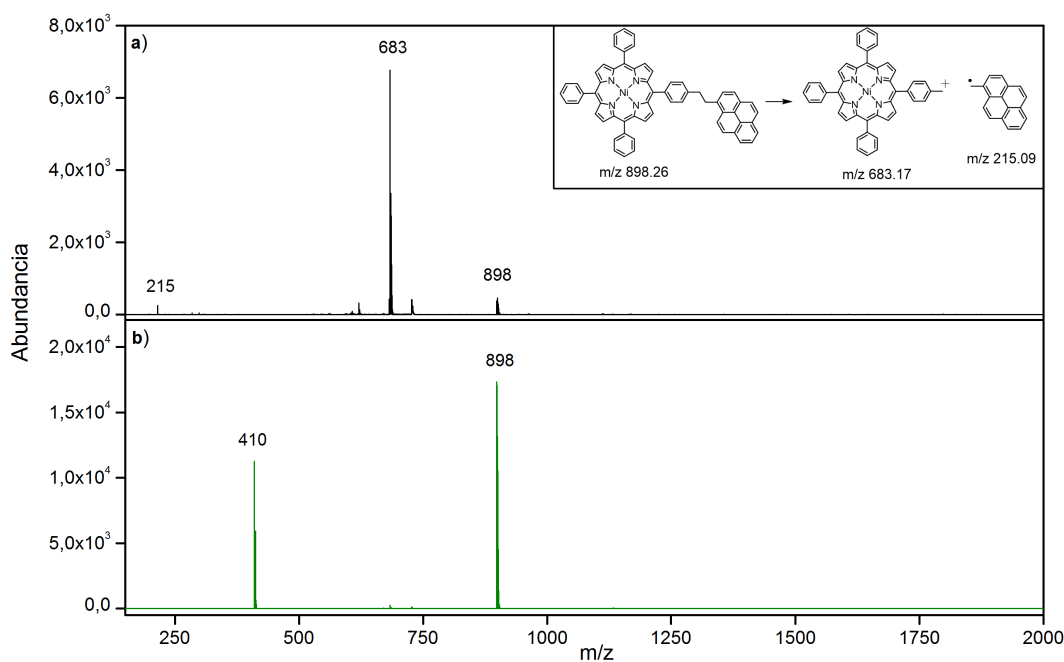
Figura 33: Curva de aparición de iones para el ión molecular del Ph-Ni[ET-Py]) (m/z 898.26) evaluando los parámetros S/N, abundancia y resolución



Los valores S/N del Ph-Ni[ET-Py] de relación 1:10, son muy similares a los valores en relación molar 1:100, mostrando que se está llevando a cabo un proceso de transferencia electrónica efectivo, ya que a pesar de que existe una dilución de diez veces más del analito en relación 1:100, con respecto a la relación molar 1:10, la señal del analito permanece prácticamente constante. Es importante recordar que la transferencia electrónica es más favorable a mayores relaciones molares debido a que el analito se encuentra totalmente cubierto por la matriz y hay una mayor probabilidad de formación de iones secundarios del analito. Las gráficas de abundancia muestran que hay un crecimiento exponencial en la abundancia del ion molecular a bajas energías y posteriormente el valor de abundancia no se modifica considerablemente, las mayores abundancias de iones se obtuvieron para la matriz FV-Cl. Las gráficas de resolución de la **Figura 33** muestran una disminución en la resolución conforme se aumenta la energía del láser.

Las curvas de aparición de la **Figura 33** permiten observar el efecto de la energía por pulso sobre descriptores analíticos como S/N, abundancia y resolución. Sin embargo todas estas observaciones se hacen con base en el catión radical del analito y no ilustran el efecto del aumento de la energía del pulso sobre la integridad del analito. Por ejemplo los espectros de masas LDI y MALDI, usando FV-Cl como matriz, de la porfirina Ph-Ni[ET-Py] presentan grandes diferencias como se observa en la **Figura 34**. En el espectro LDI (**Figura 34a**) el pico de base es el ión m/z 683 que corresponde a un catión del Ph-Ni[ET-Py] que se forma por la pérdida del radical metil pireno, mientras el ión molecular del analito en m/z 898 se observa en baja abundancia. Por otra parte en el espectro MALDI con FV-Cl, **Figura 34b**, se observa que el pico de base del espectro corresponde al catión radical de la porfirina en m/z 898, acompañado por la señal de la matriz (FV-Cl) en m/z 410. A simple vista se observa que el uso de la matriz FV-Cl evita la fragmentación del analito. Las bajas energías de aparición de

Figura 34: Espectros de masas del Ph-Ni[ET-Py] a) LDI y b) MALDI, usando FV-Cl como matriz. Relación Analito:Matriz (1:10)

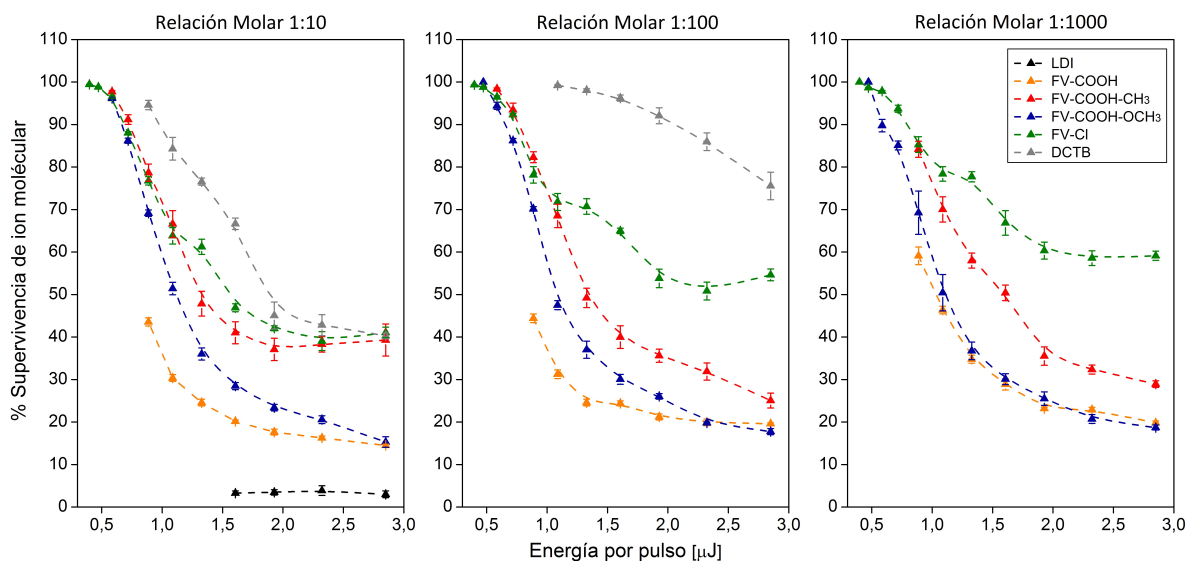


los derivados FV unidas a sus excepcionales propiedades ópticas (absortividad molar, eficiencias cuánticas (radiativas o no radiativas), etc.) hacen posible su desempeño como matrices de transferencia electrónica a bajas energías por pulso, lo que causa incremento en la sobrevivencia de los iones moleculares del analito. Es posible determinar de forma más cuantitativa el efecto de la matriz y de la energía del láser sobre la estabilidad del ión molecular mediante diagramas de sobrevivencia de iones. Para el caso del analito Ph-Ni[ET-Py] el porcentaje de sobrevivencia del ión molecular se calculó a partir de la Ecuación 5.3.

$$\%Sobrevivencia = \frac{A_{m/z898}}{A_{m/z898} + A_{m/z683} + A_{m/z215}} \times 100\% \quad (5.3)$$

Donde m/z 898 corresponde a la señal del ión molecular, m/z 683 corresponde al fragmento porfirínico y m/z 215 corresponde a la señal del fragmento de metil pireno.

Figura 35: Curva de supervivencia de iones del Ph-Ni[ET-Py] variando la energía por pulso del láser y la relación analito:matriz



Las gráficas de supervivencia de iones se observan en la **Figura 35**. A energías por pulso menores de $0,5 \mu\text{J}$, las matrices FV-Cl, FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃ permiten la detección del ión molecular de la porfirina con un porcentaje de supervivencia del 100% que implica que no se observan señales de fragmentos del analito en el espectro. Por otra parte la matriz de referencia, DCTB que tiene potenciales de aparición mucho más altos que los de los FV, también protege el analito en la región de energía por pulso adecuada para su desempeño como matriz. Sin embargo el DCTB no produce señales del analito a relaciones molares superiores a 1:100, mientras los FV, particularmente el FV-Cl y el FV-COOH-OCH₃, se desempeñan bien a altas diluciones del analito (1:1000, ver también **Figura 33**). Finalmente, es posible concluir que con el FV-Cl se alcanza mayor supervivencia y abundancia del ión molecular en comparación con la matriz de referencia DCTB.

5.7.2 Porfirina Ni[Bu-Ph]

La **Figura 36** muestra las curvas de aparición de iones para la segunda porfirina Ni[Bu-Ph]. Se realizó un seguimiento a la señal del ión molecular de este analito que corresponde a la señal m/z 1198,5. Las curvas de relación señal-ruido, abundancia y resolución siguen el comportamiento descrito anteriormente para la molécula Ph-Ni[ET-Py]. El valor de S/N máximo para la señal del Ni[Bu-Ph] se observa a un valor de energía de 0,88 μJ , usando las matrices FV-Cl, FV-COOH-CH₃ y FV-COOH-OCH₃, por otro lado la matriz de DCTB presenta valores máximos del Ni[Bu-Ph] a energía de láser de 3 μJ , es decir se requiere mucha menor energía de láser para realizar la ionización del Ni[Bu-Ph] con matrices FV. Se observa que el FV-Cl presenta el mejor rendimiento de toda la serie, en términos de aumento de la relación señal-ruido y abundancia.

La **Figura 37** muestra los espectros de masas del analito Ni[Bu-Ph] sin matriz (**Figura 37a**) y con matriz de FV-Cl (**Figura 37b**). El espectro sin matriz muestra la señal m/z 1198,5 que corresponde al catión radical de la molécula intacta, y un fragmento, que corresponde a la señal m/z 1079,5 (ver **Figura 32**). Por otro lado, el espectro del Ni[Bu-Ph] con matriz de FV-Cl muestra únicamente la señal del ión molecular intacto m/z 1198,5 y la señal de la matriz FV-Cl (m/z 410). Mediante el uso de la matriz FV-Cl es posible obtener el ión molecular intacto del Ni[Bu-Ph] con un porcentaje de sobrevivencia del 100% a bajas fluencias de láser. Con el objetivo de evaluar el cambio en la sobrevivencia del ión molecular del analito, se calculó el porcentaje de sobrevivencia del Ni[Bu-Ph] según la Ecuación 5.4.

$$\%Sobrevivencia = \frac{A_{m/z1198,5}}{A_{m/z1198,5} + A_{m/z1079,5} + A_{m/z119,09}} \times 100\% \quad (5.4)$$

Donde m/z 1198,5 corresponde a la señal del ión molecular, m/z 1079,5 al fragmento

Figura 36: Curva de aparición de iones para el ión molecular del Ni[Bu-Ph] (m/z 1198.5) evaluando los parámetros relación señal ruido, abundancia y resolución

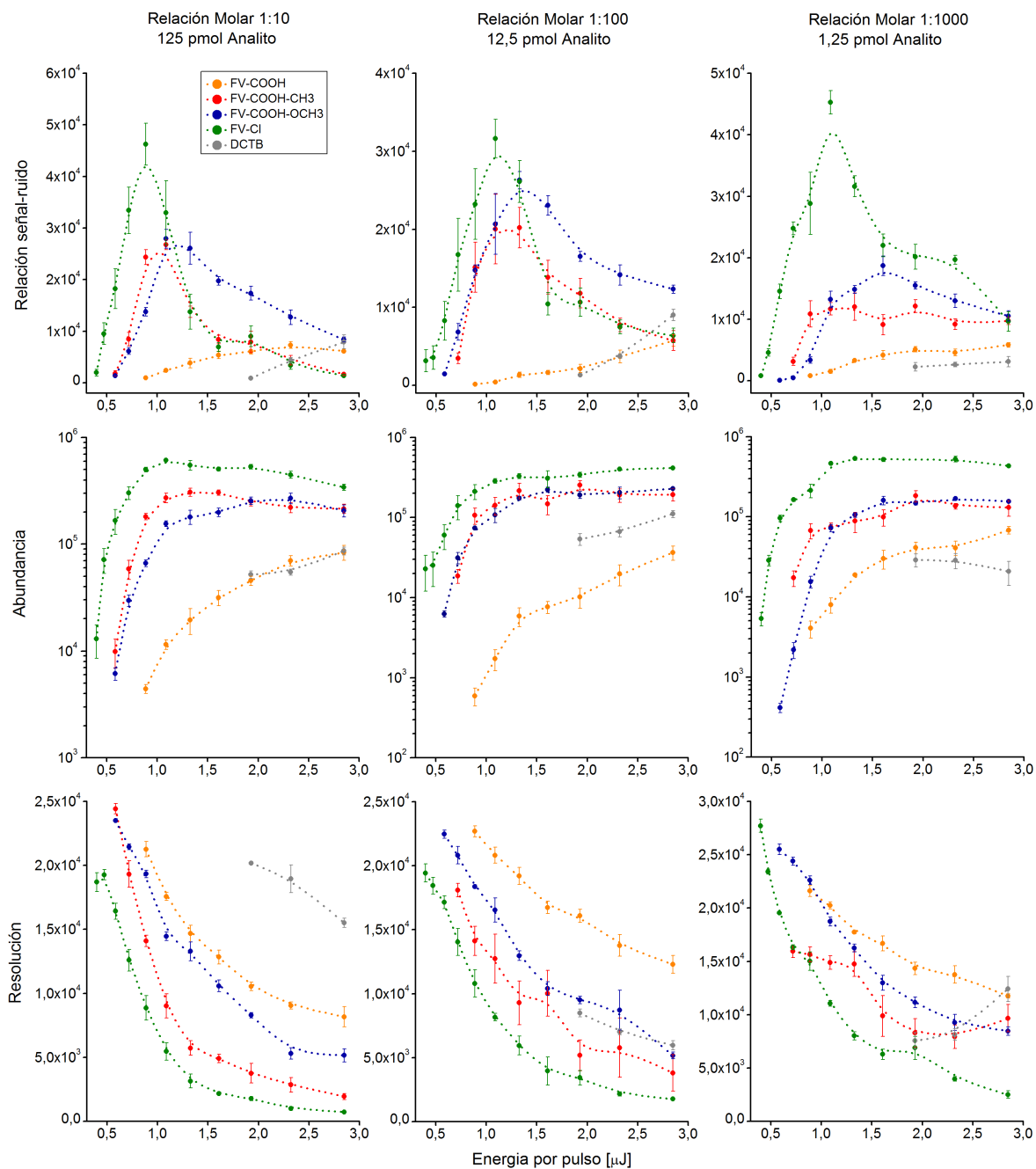


Figura 37: Espectros de masas del Ni[Bu-Ph] a) LDI y b) MALDI, usando FV-Cl como matriz. Relación Analito:Matriz (1:10)

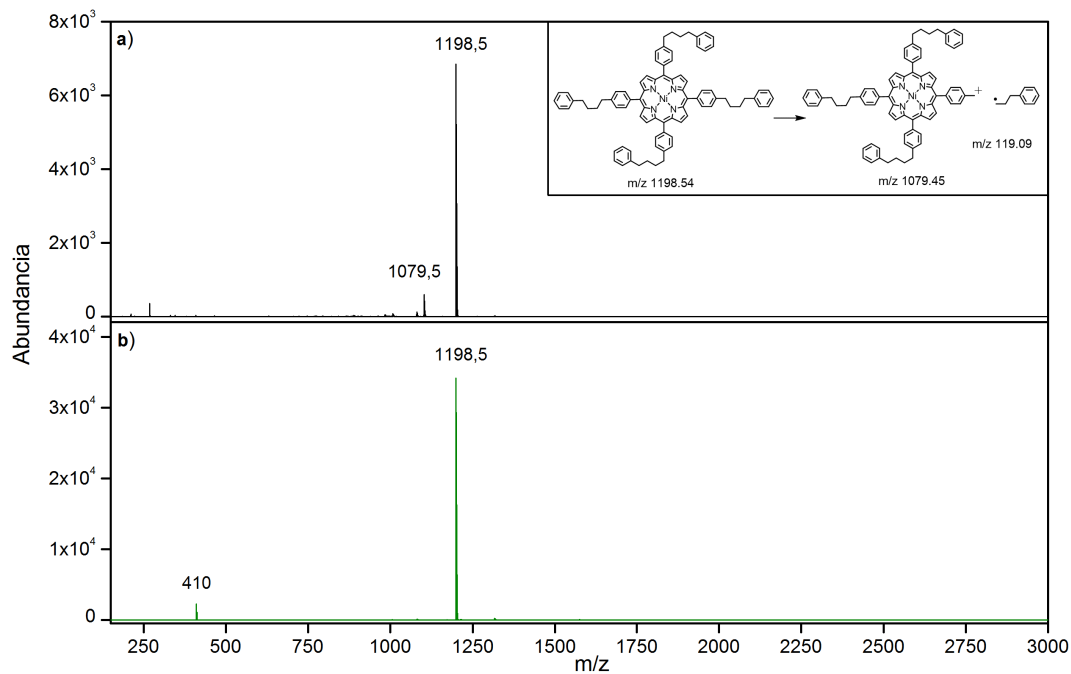
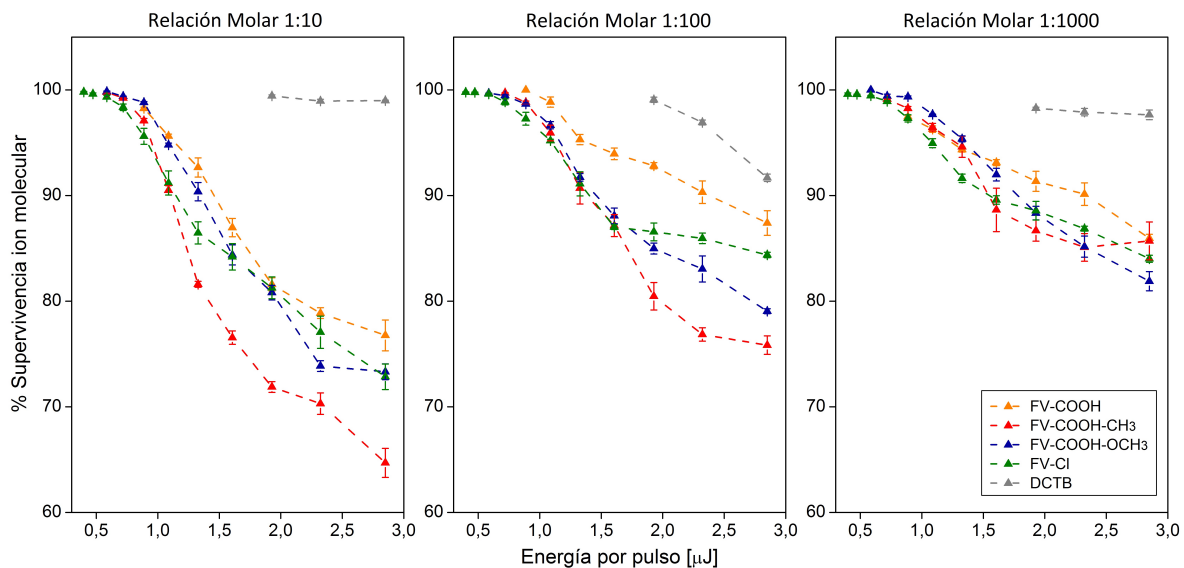


Figura 38: Curva de sobrevivencia de iones del Ni[Bu-Ph] variando la energía por pulso del láser y la relación analito:matriz



de porfirina y m/z 119,1 a la señal del fragmento de propil benceno (ver **Figura 32**). La **Figura 38** muestra que a bajas energías del láser, el FV-Cl permite conservar el ión molecular del analito intacto. Se observa que a medida que se aumenta la energía del láser ocurre un aumento en la fragmentación y por lo tanto una disminución en la sobrevivencia del ión molecular. Comparando las diferentes relaciones molares se encuentra que a medida que se aumenta la relación matriz:analito, se aumenta la protección a los analitos lábiles, ya que los porcentajes de sobrevivencia se hacen cada vez mayores, esto se debe a que un aumento en la relación analito:matriz implica un aumento en la cantidad de matriz disponible que servirá como medio para evitar una interacción directa del analito con el láser y una mayor fragmentación.

5.7.3 Porfirina [ET-Py]

La **Figura 39** muestra las curvas de aparición de iones correspondientes al analito [ET-Py]. Las curvas de aparición muestran que la ionización se efectúa principalmente usando DCTB como matriz y que la formación de iones con FV-Cl es mucho menor. Los PI calculados de las porfirinas Ph-Ni[ET-Py] y Ni[Bu-Ph] corresponden a 5,92 eV y 5,11 eV, por lo tanto el proceso de transferencia electrónica con matrices FV es efectivo ya que los FV poseen potenciales de ionización entre 7,29 eV a 7,8 eV. En el caso de la molécula [ET-Py] que tiene un PI de 7,23 eV, el proceso de transferencia electrónica con las matrices FV-COOH-OCH₃ (7,29 eV) y FV-Cl (7,39 eV) no puede considerarse efectivo. Es por esta razón que no se observa un aumento en la señal del ion molecular con FV-Cl. Sin embargo, fue posible medir el porcentaje de supervivencia de los iones del [ET-Py], (ver **Figura 40**) y se encontró que a bajas energías de láser es posible prevenir su fragmentación.

Figura 39: Curva de aparición de iones para el ión molecular del [ET-Py] (m/z 458,2) a relación molar 1:10 evaluando los parámetros: S/N, abundancia y resolución

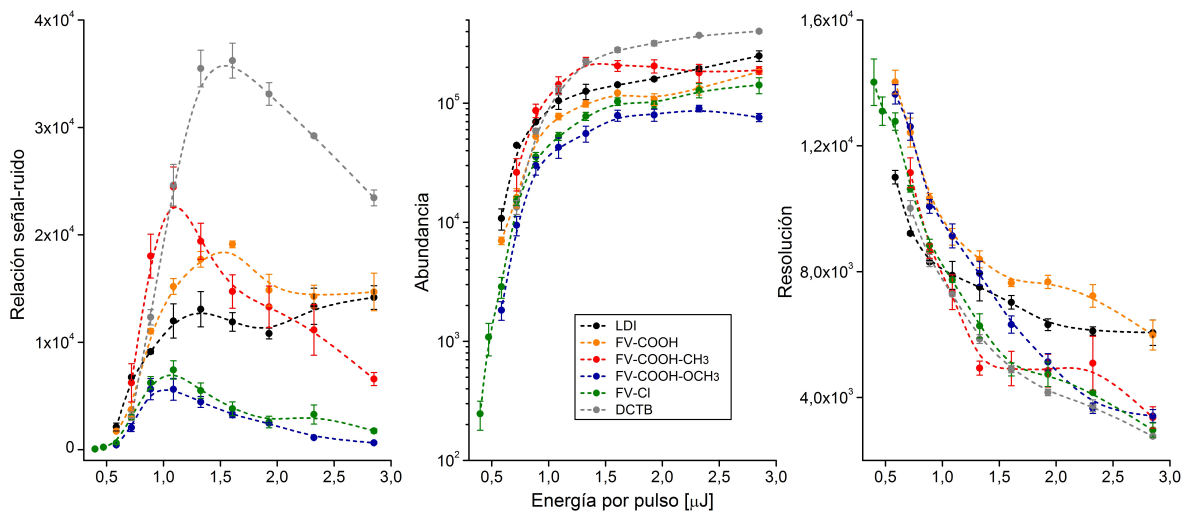
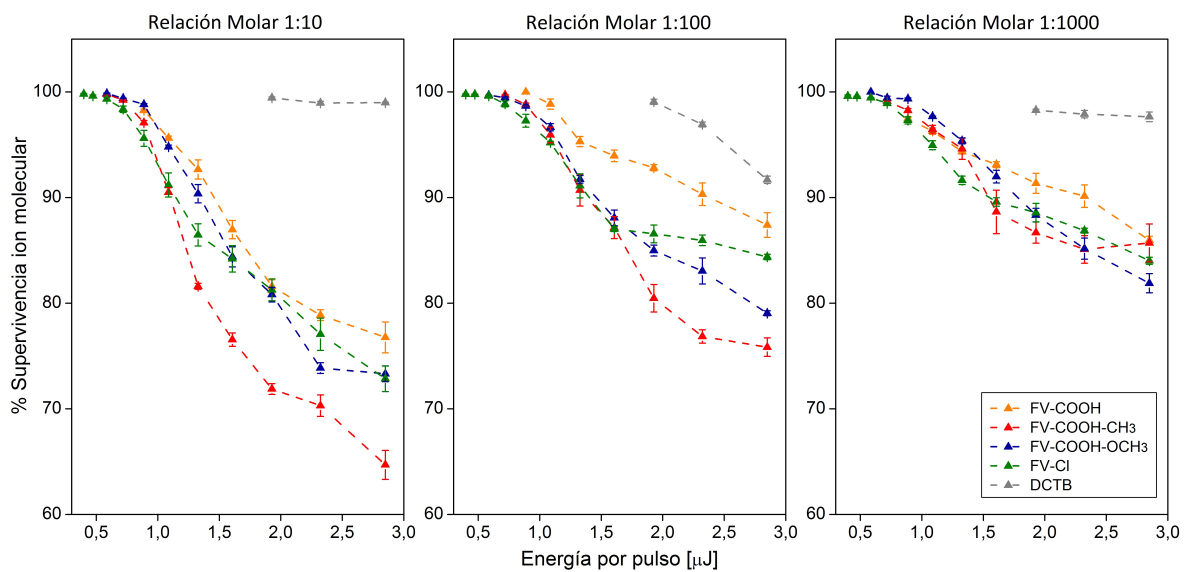


Figura 40: Curva de supervivencia de iones del [ET-Py] variando la energía por pulso del láser y la relación molar analito:matriz



6 CONCLUSIONES

Es fundamental calcular los valores de PI tanto de los analitos como de las matrices para determinar si es posible realizar un proceso de transferencia electrónica entre un analito y una matriz determinada. Los cálculos de PI de los PAH requieren el uso de métodos de correlación electrónica como EPT, que permiten calcular el PI con errores de hasta 0,07 eV (1 % de error). Métodos de no correlación, como HF, rinden valores con errores hasta de 0,26 eV (3,5 % de error) en comparación a los valores experimentales. Los cálculos de PI de los FV pueden determinarse en una buena aproximación por HF, este método rinde valores que se encuentran cerca de 0,2 eV por debajo del valor EPT. Sin embargo, los valores EPT proveen valores mucho más exactos a un costo computacional más alto.

Los valores de afinidad protónica calculados a las matrices de AA por el método DFT mostraron valores de AP superiores al CHCA (200 kcal/mol), solo dos de las matrices de AA evaluadas AA-CN-I-Tiofeno y AA-CN-furano presentaron AP menores de 200 kcal/mol. En general, los AA con sustitución α -CN presentaron valores de AP menores. Se determinó que los grupos CN generan deficiencia electrónica en el carbono alfa, disminuyendo la disponibilidad electrónica en el oxígeno del carbonilo para realizar el enlace con el protón libre, lo que se traduce en una disminución del valor de AP.

Los espectros de absorción UV-Vis permitieron determinar que el máximo de absorción

de los FV se encuentra en valores cercanos a la longitud de onda del láser MALDI (355 nm). Las moléculas de FV-COOH, FV-COOH-CH₃ y FV-CN son las moléculas que presentan absorción más cercana a esta longitud de onda, y por lo tanto poseen una mayor interacción con el láser MALDI. Esto se comprobó mediante la determinación cuantitativa de la absorptividad molar.

En general, las absorptividades molares de los FV son superiores a las determinadas para las matrices MALDI convencionales como el CHCA, el antraceno y el DCTB. Las moléculas FV-COOH-CH₃ y FV-CN presentaron las mayores absorptividades molares de la serie, tal como se predijo con los espectros UV-vis.

Las moléculas de FV-COOH-CH₃ y FV-CN presentaron los parámetros más favorables de toda la serie de FV. Estas moléculas presentan la longitud de onda más cercana a la longitud de onda del láser. Los valores de absorptividad molar para estas dos moléculas son los más altos de la serie comprobando que la interacción con el láser es máxima. Adicional a esto, presentan los decaimientos cuánticos no radiativos más altos de la serie, haciendo que su proceso de desorción sea el más favorable de la serie. Finalmente, el FV-COOH-CH₃ y FV-CN presentan los potenciales de ionización más altos de la serie de FV, permitiendo que estos FV se comporten como excelentes matrices de transferencia electrónica. Por lo tanto, FV-COOH-CH₃ y FV-CN son los candidatos más probables para ser usados como matrices MALDI.

Los derivados de AA con sustitución α -CN presentaron las longitudes de onda de máxima absorción más cercanas a 355 nm. Este efecto se observa a su vez en sus absorptividades molares. En general, la sustitución de AA con grupos α -CN permiten un corrimiento hacia la absorción UV a 355 nm y aumenta considerablemente las absorptividades molares de estas moléculas a 355 nm.

Los oligómeros de fenilenvinileno (con 3 unidades aromáticas) no son útiles como matrices de transferencia de protones o de cationes, puesto que estas estructuras no son susceptibles de protonación o cationización bajo las condiciones experimentales. El proceso de cationización (incluyendo la protonación) de la matriz es de vital importancia en la generación de iones protonados del analito. La reacción primaria de cationización de la matriz determina las reacciones secundarias por las que se han de obtener iones de los analitos.

Las estructuras de FV resultan ser muy prometedoras para la ionización de analitos por procesos de transferencia electrónica. Utilizando analitos modelo susceptibles a transferencia electrónica se comprobó que los aumentos de las señales en algunos casos son de hasta 57 veces en comparación con las señales LDI y que es posible disminuir considerablemente los límites de detección y la fragmentación de analitos modelo usando matrices FV. Esta nueva técnica de ionización es bastante útil en el análisis de hidrocarburos policíclicos aromáticos, analitos lábiles y compuestos organometálicos.

Se observó que los potenciales de aparición de las moléculas FV son bajos en comparación con los de una matriz de transferencia electrónica tradicional como el DCTB. Esto significa que cuando se utilizan los FV como matrices MALDI de transferencia electrónica las condiciones de operación del equipo -como potencia del láser – son mucho más suaves, lo que equivale no solo a incrementar la vida útil del láser y a evitar la contaminación de las superficies internas; sino también a mejorar la resolución en los espectros de masas.

7 DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de este proyecto se han presentado en seis conferencias que se especificaran a continuación

1. 61st Annual ASMS American Society for Mass Spectrometry Conference Minneapolis.

Título: Phenylenevinylene derivatives as MALDI matrices

Autores: Castellanos, L.J.; Rosales, H.; Sierra-Avila, C.A.; Blanco, C.; Combariza, M.Y.

2. 62nd Annual ASMS American Society for Mass Spectrometry Conference Baltimore, Maryland.

Título: Increased survival yields of labile molecules using new electron transfer MALDI matrices

Autores: Castellanos, L.J.; Castro, B.; Rosales, H.; Sierra-Avila, C.A.; Blanco-Tirado, C.; Combariza, M.Y.

3. 62nd Annual ASMS American Society for Mass Spectrometry Conference Baltimore, Maryland.

Título: Phenylenevinylene derivatives as MALDI matrices for electron transfer ionization of asphaltene model compounds

Autores: Castellanos, L.J.; Chacón-Patiño M.L.; Castro, B.; Sherer, A.; Tan, X.;

Tykwinski, R.R.; Gray, M.R.; Sierra-Avila, C.A.; Blanco-Tirado, C.; Combariza, M.Y.

4. 31st Congreso Latinoamericano de Química Lima, Perú.

Título: Oligo fenilenvinilenos como posibles matrices de transferencia electrónica en MALDI

Autores: Cely-Pinto, M.; Castro, B.; Castellanos, L.J.; Combariza, M.Y.; Blanco-Tirado, C.; Ochoa-Puentes, C.; Sierra-Avila, C.A.

5. V Encuentro Nacional de Químicos Teóricos y Computacionales V-ENQTC Guatapé, Antioquia

Título: Cálculos de potencial de Ionización para predecir la efectividad de sistemas tipo fenilenvinileno como matrices MALDI de transferencia electrónica

Autores: Castellanos, L.J.; Castro, B; Sierra-Avila, C.; Combariza, M.Y.; Blanco-Tirado, C.;

6. 63rd Annual ASMS American Society for Mass Spectrometry Conference St. Louis, Missouri.

El trabajo fue aprobado y se presentará en la conferencia en junio de este año

Título: Cyano-phenylenevinylene oligomer as a novel electron transfer ionization MALDI matrix **Autores:** Castellanos, L.J.; Cely, M.; Sierra-Avila, C.; Blanco-Tirado, C.; Combariza, M.Y.;

Referencias

- [1] JH Gross. *Mass spectrometry a textbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. Pag. 411-433.
- [2] R Knochenmuss. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst*, 131:966–986, 2006.
- [3] Karas M and Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem. Rev.*, 103(2):427–440, 2003.
- [4] Beavis RC, Chait BT, and Fales HM. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 3(12):432–435, 1989.
- [5] Beavis RC, Chait BT, and Standing KG. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 3(12):436–439, 1989.
- [6] Strupat K, Karas M, and Hillenkamp F. 2,5-dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 111:89–102, 1991.
- [7] Porta T, Grivet C, Knochenmuss R, Varesio E, and Hopfgartner G. Alternative

- CHCA-based matrices for the analysis of low molecular weight compounds by UV-MALDI tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 46(2):144–152, 2011.
- [8] Jaskolla TW, Lehmann WD, and Karas M. 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(34):12200–12205, 2008.
- [9] Chen S, Chen L, Wang J, Hou J, He Q, Liu J, Wang J, Xiong S, Yang G, and 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.*, 84(23):10291–10297, 2012.
- [10] Alexey V Streletskii, Ilya N Ioffe, Sotirios G Kotsiris, Mark P Barrow, Thomas Drewello, Steven H Strauss, and Olga V Boltalina. In-plume thermodynamics of the MALDI generation of fluorofullerene anions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(4):714–719, 2005.
- [11] M Nazim Boutaghou and Richard B Cole. 9, 10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(8):995–1003, 2012.
- [12] Lars Ulmer, Jochen Mattay, H Gregorio Torres-Garcia, and Heinrich Luftmann. Letter: The use of 2-[(2e)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene] malonitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 6(1):49–52, 2000.
- [13] Tracy Brown, Nigel L Clipston, Nafeesa Simjee, Heinrich Luftmann, Hartmut Hungerbühler, and Thomas Drewello. Matrix-assisted laser desorption/ionization of amphiphilic fullerene derivatives. *International Journal of Mass Spectrometry*, 210:249–263, 2001.

- [14] Xianwen Lou, Bas FM de Waal, Joost LJ van Dongen, Jef AJM Vekemans, and EW Meijer. A pitfall of using 2-[(2e)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene] malononitrile as a matrix in MALDI TOF MS: chemical adduction of matrix to analyte amino groups. *Journal of mass spectrometry*, 45(10):1195–1202, 2010.
- [15] Alexey V Streletskiy, Ilya V Goldt, Igor V Kuvychko, Ilya N Ioffe, Lev N Sidorov, Thomas Drewello, Steven H Strauss, and Olga V Boltalina. Application of 9-nitroanthracene as a matrix for laser desorption/ionization analysis of fluorinated fullerenes. *Rapid communications in mass spectrometry*, 18(3):360–362, 2004.
- [16] N Srinivasan, Carol A Haney, Jonathan S Lindsey, Wenzhu Zhang, and Brian T Chait. Investigation of MALDI-TOF mass spectrometry of diverse synthetic metalloporphyrins, phthalocyanines and multiporphyrin arrays. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 3(04):283–291, 1999.
- [17] Karas M, Bachmann D, and Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.*, 57(14):2935–2939, 1985.
- [18] Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, and Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100.000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2(8):151–153, 1988.
- [19] Zenobi R and Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 17(5):337–366, 1998.
- [20] Knochenmuss R and Zenobi R. MALDI ionization: the role of in-plume processes. *Chem. Rev.*, 103(2):441–452, 2003.

- [21] Glückmann M, Pfenninger A, Krüger R, Thierolf M, Karasa M, Horneffer V, Hillenkamp F, and Strupat K. Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes? *Int. J. Mass spectrom.*, 210:121–132, 2001.
- [22] Mowry CD and Johnston MV. Simultaneous detection of ions and neutrals produced by matrix-assisted laser desorption. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 7(7):569–575, 1993.
- [23] Johnson RE, Sundqvist B, and Ens W. Laser-pulse ejection of organic molecules from a matrix: Lessons from fast-ion-induced ejection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 5(11):574–578, 1991.
- [24] Vertes A, Irinyi G, and Gijbels R. Hydrodynamic model of matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 65(17):2389–2393, 1993.
- [25] Knochenmuss R and Zhigilei LV. Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization. *J. Mass Spectrom.*, 45(4):333–346, 2010.
- [26] 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.*, 27(4):472–480, 1992.
- [27] Harrison A. The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides. *Mass Spectrom. Rev.*, 16(4):201–217, 1997.
- [28] Mirza SP, Raju NP, and Vairamani M. Estimation of the proton affinity values of fifteen matrix-assisted laser desorption/ionization matrices under electrospray ionization conditions using the kinetic method. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 15(3):431–435, 2004.

- [29] Jørgensen TJD, Bojesen G, and Rahbæk-Nielsen H. The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions. *Eur. Mass Spectrom.*, (4):39–45, 1998.
- [30] Burton RD, Watson CH, Eyler JR, Lang GL, Powell DH, and Avery MY. Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11(5):443–446, 1997.
- [31] Qian H and Huang W. Molecular and crystal structures of two matrices for MALDI-TOF-MS: 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid and 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid. *J. Mol. Struct.*, 743(1):191–195, 2005.
- [32] Leszyk JD. Evaluation of the new MALDI matrix 4-chloro- α -cyanocinnamic acid. *J. Biomol. Tech.*, 21(2):81, 2010.
- [33] Schinkovitz A, Kenfack GT, Seraphin D, Levillain E, Dias M, and Richomme P. Selective detection of alkylphosphites MALDI-TOF: the introduction of a novel matrix molecule. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403(6):1697–1705, 2012.
- [34] Sze E, Chan TW, and Wang G. Formulation of matrix solutions for use in matrix-assisted laser desorption/ionization of biomolecules. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 9(2):166–174, 1998.
- [35] Julien De Winter, Gaëlle Deshayes, Florian Boon, Olivier Coulembier, Philippe Dubois, and Pascal Gerbaux. MALDI-TOF analysis of polythiophene: use of trans-2-[3-(4-t-butyl-phenyl)-2-methyl-2-propenylidene] malononitriledctbas matrix. *Journal of mass spectrometry*, 46(3):237–246, 2011.
- [36] M Ravi Kumar, N Prasada Raju, T Jagadeshwar Reddy, A Narahari, Maruti Janaki Ram Reddy, and M Vairamani. Evaluation of methyl 3-(4-methoxy-1-

- naphthyl)-(e)-2-propenoate and methyl 5-(4-methoxy-1-naphthyl)-(2e, 4e)-2, 4-pentadienoate as new charge-transfer matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19(21):3171–3174, 2005.
- [37] Mark F Wyatt, Bridget K Stein, and A Gareth Brenton. Characterization of various analytes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and 2-[(2 e)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene] malononitrile matrix. *Analytical chemistry*, 78(1):199–206, 2006.
- [38] Sul Ong Kim, Hyun Cheol Jung, Min-Jung Lee, Chen Jun, Yun-Hi Kim, and Soon-Ki Kwon. Synthesis and characterization of 9,10-diphenylanthracene-based blue light emitting materials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(21):5908–5916, 2009.
- [39] Joshua J Coon, John EP Syka, Jae C Schwartz, Jeffrey Shabanowitz, and Donald F Hunt. Anion dependence in the partitioning between proton and electron transfer in ion/ion reactions. *International Journal of Mass Spectrometry*, 236(1):33–42, 2004.
- [40] Yury V Vasil'ev, Olga G Khvostenko, Alexey V Streletskii, Olga V Boltalina, Sotirios G Kotsiris, and Thomas Drewello. Electron transfer reactivity in matrix-assisted laser desorption/ionization MALDI: ionization energy, electron affinity and performance of the DCTB matrix within the thermochemical framework. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(18):5967–5972, 2006.
- [41] Rodríguez-Córdoba W, Sierra CA, Ochoa-Puentes C, Lahti PM, and Peon J. Photoinduced energy transfer in bichromophoric pyrene PPV oligomer systems: The

- role of flexible donor–acceptor bridges. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(11):3490–3503, 2012.
- [42] Sierra CA and Lahti PM. A simple multichromophore design for energy transfer in distyrylbenzenes with pyrene pendants. *J. Phys. Chem. A*, 110(44):12081–12088, 2006.
- [43] Sierra CA and Lahti PM. A photoluminescent, segmented oligopolyphenylenevinylene copolymer with hydrogen-bonding pendant chains. *Chem. Mater.*, 16(1):55–61, 2004.
- [44] Attila Szabo and Neil S Ostlund. *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*. Dover Publications, New York, 1989. Pag. 380-398.
- [45] Foresman JB and Frisch A. *Exploring chemistry with electronic structure methods*. Gaussian Inc, Pittsburgh, 1996. Pag. 143-162.
- [46] Ortiz JV. Electron propagator theory: an approach to prediction and interpretation in quantum chemistry. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 3:123–142, 2012.
- [47] VG Zakrzewski, O Dolgounitcheva, and JV Ortiz. Ionization energies of anthracene, phenanthrene, and naphthacene. *The Journal of chemical physics*, 105(19):8748–8753, 1996.
- [48] AG Yurieva, O Kh Poleshchuk, and VD Filimonov. Comparative analysis of a full-electron basis set and pseudopotential for the iodine atom in DFT quantum-chemical calculations of iodine-containing compounds. *Journal of Structural Chemistry*, 49(3):548–552, 2008.

- [49] Bourcier S and Hoppilliard Y. B3LYP DFT molecular orbital approach, an efficient method to evaluate the thermochemical properties of MALDI matrices. *Int. J. Mass spectrom.*, 217(1):231–244, 2002.
- [50] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, . Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox. Gaussian 09 Revision D.01. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [51] M. W Allen. *Measurement of Fluorescence Quantum Yields. Technical Note: 52019*. Thermo Fisher Scientific, 2010.
- [52] Richard Knochenmuss, Edda Lehmann, and Renato Zenobi. Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization. *European Mass Spectrometry*, 4(6):421–426, 1998.
- [53] NIST chemistry webbook.
- [54] Jens Soltwisch, Thorsten W Jaskolla, Franz Hillenkamp, Michael Karas, and Klaus Dreisewerd. Ion yields in UV-MALDI mass spectrometry as a function of excita-

- tion laser wavelength and optical and physico-chemical properties of classical and halogen-substituted MALDI matrixes. *Analytical chemistry*, 84(15):6567–6576, 2012.
- [55] Xiangjun Chen, James A Carroll, and Ronald C Beavis. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9(9):885–891, 1998.
- [56] Fen-Tair Luo, Yu-Tai Tao, Sheng-Li Ko, Chang-Hao Chuen, and Hui Chen. Efficient electroluminescent material for light-emitting diodes from 1,4-distyrylbenzene derivatives. *Journal of Materials Chemistry*, 12(1):47–52, 2002.
- [57] Gianluca M Farinola, Antonio Cardone, Francesco Babudri, Carmela Martinelli, Francesco Naso, Giovanni Bruno, and Maria Losurdo. Fluorinated poly (p-phenylenevinylene)s: Synthesis and optical properties of an intriguing class of luminescent polymers. *Materials*, 3(5):3077–3091, 2010.
- [58] Arno Kraft, Andrew C Grimsdale, and Andrew B Holmes. Electroluminescent conjugated polymers seeing polymers in a new light. *Angew. Chem. Int. End Engl*, 37:402–428, 1998.
- [59] Cornil J, Dos Santos DA, Beljonne D, and Brédas JL. Electronic structure of phenylene vinylene oligomers: influence of donor/acceptor substitutions. *J. Phys. Chem.*, 99(15):5604–5611, 1995.
- [60] Adam Heller. Organic liquid scintillators. VI. substituted distyrylbenzenes: scintillation properties and spectra of absorption and fluorescence. *The Journal of Chemical Physics*, 40(10):2839–2851, 1964.
- [61] SC Moratti, R Cervini, AB Holmes, DR Baigent, RH Friend, NC Greenham,

- J Grüner, and PJ Hamer. High electron affinity polymers for LEDs. *Synthetic Metals*, 71(1):2117–2120, 1995.
- [62] Akeel S Saiyed, Krupa N Patel, Bola V Kamath, and Ashutosh V Bedekar. Synthesis of stilbene analogues by one-pot oxidation-wittig and oxidation-wittig–heck reaction. *Tetrahedron Letters*, 53(35):4692–4696, 2012.
- [63] Geeta S Vadehra, Brian D Wall, Stephen R Diegelmann, and John D Tovar. On-resin dimerization incorporates a diverse array of π -conjugated functionality within aqueous self-assembling peptide backbones. *Chemical Communications*, 46(22):3947–3949, 2010.
- [64] Andrés Felipe Sierra, Ricaurte Rodríguez, and César A Sierra. Síntesis estereoselectiva de un nitro derivado de fenilvinilideno mediante la reacción de heck usando fosfitos. *Revista Colombiana de Química*, 39(2):163–171, 2010.
- [65] R Knochenmuss. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of mass spectrometry*, 37(8):867–877, 2002.
- [66] Andrew J Hoteling, William F Nichols, David J Giesen, Jerome R Lenhard, and Richard Knochenmuss. Electron transfer reactions in laser desorption/ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization: factors influencing matrix and analyte ion intensities. *European Journal of Mass Spectrometry*, 12(6):345–358, 2006.
- [67] Stephen F Macha, Tracy D McCarley, and Patrick A Limbach. Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 397(1):235–245, 1999.
- [68] Michel WF Nielen. MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. *Mass Spectrometry Reviews*, 18(5):309–344, 1999.

- [69] Klaus Dreisewerd. The desorption process in MALDI. *Chemical reviews*, 103(2):395–426, 2003.
- [70] David Borton, David S Pinkston, Matthew R Hurt, Xiaoli Tan, Khalid Azyat, Alexander Scherer, Rik Tykwinski, Murray Gray, Kuangnan Qian, and Hilikka I Kenttamaa. Molecular structures of asphaltenes based on the dissociation reactions of their ions in mass spectrometry. *Energy & Fuels*, 24(10):5548–5559, 2010.
- [71] Hassan Sabbah, Amy L Morrow, Andrew E Pomerantz, Oliver C Mullins, Xiaoli Tan, Murray R Gray, Khalid Azyat, Rik R Tykwinski, and Richard N Zare. Comparing laser desorption/laser ionization mass spectra of asphaltenes and model compounds. *Energy & Fuels*, 24(6):3589–3594, 2010.