

ENSAYO DE COMPUESTOS CON NÚCLEO DE FENILENVINILENO COMO
MATRICES MALDI

HERNANDO FABIAN ALONSO ROSALES SOLANO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

ENSAYO DE COMPUESTOS CON NÚCLEO DE FENILENVINILENO COMO
MATRICES MALDI

HERNANDO FABIAN ALONSO ROSALES SOLANO

Trabajo de Grado para optar el título de
QUÍMICO

Directora

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA MONTAÑEZ, PhD.

Co-Directora

LAURA JULIANA CASTELLANOS GARCÍA, Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

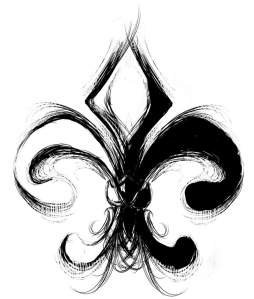
ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

“Who am I to say that these things might not be forever?”

John Green; *The fault in our stars*



Agradecimientos

Agradecemos al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS por el apoyo económico al proyecto “Desarrollo de una matriz para espectrometría de masas MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) basada en sistemas tipo fenilenvinileno”, mediante recursos de la convocatoria 569 de 2012, proyecto No. 8812.

Deseamos agradecer especialmente al profesor Cesar Sierra de la Universidad Nacional de Colombia, y a Brian Castro, uno de sus estudiantes, por las moléculas de fenilenvinileno y terpiridinas, y por sus aportes fundamentales en el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, queremos agradecer a la profesora Marta Niño, Universidad Industrial de Santander, por su donación de ftalocianina, a Jenny Bueno, por facilitarnos péptidos sintéticos en los ensayos preliminares del proyecto y a Maribel Castañeda, ICP, por los patrones de PAHs.

Contenido

Introducción

1. Marco teórico	15
1.1 MALDI	15
1.2 Parámetros experimentales en MALDI-MS	17
1.3 Formación primaria de iones	21
1.4 Reacciones secundarias de ionización	25
2. Metodología	30
2.1 Reactivos	30
2.2 Equipos	31
2.3 Determinación de coeficientes de absorción molar	33
2.4 Análisis de reflectancia difusa	33
2.5 Caracterización MS de los fenilenvinilenos	33
2.6 Técnicas de preparación de la muestra	34
2.7 Efecto de protonación y cationización	34
2.8 Ionización de compuestos policíclicos aromáticos	35
3. Discusión de resultados	36
3.1 Comportamiento espectroscópico de los fenilenvinileno	36
3.2 Caracterización MS de los fenilenvinilenos	39
3.3 Efecto de la técnica de preparación de la muestra	47
3.4 Efecto de la protonación y cationización	51
3.5 Ionización de compuestos policíclicos aromáticos	59
4. Conclusiones	72
5. Recomendaciones	73
6. Divulgación de resultados	74
Referencias	75
Bibliografía	84

Lista de figuras

Fig. 1	Esquema de una fuente de ionización MALDI	16
Fig. 2	Espectro MALDI MS de angiotensina II con ToF en modo lineal y en modo reflectrón.	18
Fig. 3.	Matrices MALDI más comunes	20
Fig. 4	Esquema de los mecanismos de fotoionización de matriz	23
Fig. 5	Matrices MALDI introducidas para ionización por transferencia electrónica	29
Fig. 6	Estructuras de las moléculas empleadas como matrices y analitos	32
Fig. 7	Aspecto de las muestras de reflectancia difusa en el porta-muestra	33
Fig. 8	Absorbancia a 355 nm de las soluciones de matriz	36
Fig. 9	Espectros de absorción UV-Vis de CHCA, Fv-OH, Fv-Cl y Fv-COOH	38
Fig. 10	Espectros de reflectancia difusa de Fv-OH, Fv-Cl y Fv-COOH	39
Fig. 11	Espectros MALDI-MS de Fv-OH a diferentes fluencias de láser	40
Fig. 12	Acercamiento entre 575–600 Da en los espectros MALDI-MS de Fv-OH	41
Fig. 13	Espectros MALDI-MS de Fv-Cl a diferentes fluencias de láser	43
Fig. 14	Acercamiento entre 404–422 Da en los espectros MALDI-MS de Fv-Cl	43
Fig. 15	Espectros MALDI-MS en modo positivo de Fv-COOH a diferentes fluencias de láser	46

Fig. 16 Espectros MALDI-MS en modo negativo de Fv-COOH a diferentes fluencias de láser	46
Fig. 17 Espectros MALDI-MS de una solución de péptidos sintéticos con diferentes matrices usando la técnica TL	48
Fig. 18 Efecto de la fluencia del láser en la resolución de las señales más intensas de la figura 17	50
Fig. 19 Efecto de la fluencia del láser en la relación señal-ruido de las señales más intensas de la figura 17	51
Fig. 20 Espectros MALDI-MS de Fv-OH con diferentes cantidades de ácido	53
Fig. 21 Espectros MALDI-MS de péptidos sintéticos con diferentes ácidos usando CHCA como matriz	54
Fig. 22 Efecto de la fluencia del láser en el aspecto de Fv-OH	55
Fig. 23 Espectros MALDI-MS de 'péptidos' usando Fv-OH como matriz y diferentes agentes cationizantes	56
Fig. 24 Espectros MALDI-MS de 'péptidos' usando Fv-Cl como matriz y diferentes agentes cationizantes	57
Fig. 25 Espectros MALDI-MS de péptidos usando CHCA como matriz y diferentes agentes cationizantes	58
Fig. 26 Espectros MALDI-MS de terpiridinas sin matriz adicional	60
Fig. 27 Espectros MALDI-MS de terpiridinas usando CHCA como matriz	61
Fig. 28 Espectros MALDI-MS de terpiridinas usando Fv-OH como matriz	62
Fig. 29 Espectros MALDI-MS de terpiridinas usando Fv-Cl como matriz	63

Fig. 30 Acercamientos en el rango del ion cuasi-molecular protonado de terpiridinas	64
Fig. 31 Espectros MALDI-MS de PAHs empleando diferentes matrices	65
Fig. 32 Estructuras de los PAHs en la mezcla observados por MALDI-MS	67
Fig. 33 Acercamiento en el rango del catión radical para cada señal de PAH observada	68
Fig. 34 Relación señal–ruido de PAHS con su respectivo error estadístico empleando diferentes matrices	70
Fig. 35 Relación señal–ruido de las terpiridinas con su respectivo error estadístico empleando diferentes matrices	71
Fig. 36 Relación señal–ruido de las señales de la ftalocianina con su respectivo error estadístico empleando diferentes matrices	71

Lista de tablas

Tabla 1 Longitudes de onda, duraciones de pulso y energías de un fotón para láseres en MALDI	17
Tabla 2 Valores experimentales y calculados de energías de ionización de matrices MALDI	24
Tabla 3 Componentes del estándar analítico de PAHs	31
Tabla 4 Absortividades molares a 355 nm para soluciones de diferentes matrices	36
Tabla 5 Estructuras de fragmentos y aductos de las matrices Fv-OH, Fv-Cl y Fv-COOH	44
Tabla 6 Comparación de relación señal-ruido de los analitos con diferentes matrices	69

Resumen

TÍTULO: ENSAYO DE COMPUESTOS CON NÚCLEO DE FENILENVINILENO COMO MATRICES MALDI*

AUTOR: HERNANDO FABIAN ALONSO ROSALES SOLANO**

PALABRAS CLAVE: Matrices MALDI, MALDI, Espectrometría de Masas, Fenilenvinileno, Ionización por transferencia de carga

Se probó el desempeño de tres moléculas con núcleo de fenilenvinileno y diferentes grupos funcionales como matrices MALDI. Inicialmente, se determinaron los máximos de absorción en solución y en fase sólida en el rango ultravioleta—visible. En ambos casos se obtuvieron características de absorción y coeficientes de absorción molar comparables a la matriz de referencia, ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, CHCA.

Se caracterizaron las moléculas por medio de espectrometría de masas, MS, y se encontró que forman primordialmente cationes radicales, en lugar de cationes protonados, como es común para matrices MALDI. Se probaron tres de las técnicas de preparación de muestra más usuales usando una mezcla de péptidos sintéticos como analito. De ellas cuáles se escogió la técnica *thin layer*, debido a su amplia versatilidad con los solventes. Se realizaron ensayos para formar aductos de fenilenvinilenos con hidrógeno y cationes metálicos usando concentraciones de ácidos y sales más altas que las usuales para MALDI. En ninguno de éstos se obtuvieron los aductos fenilenvinileno–hidrógeno o fenilenvinileno–catión esperados, por lo cuál se desechó la ionización por vía de transferencia protónica.

Sin embargo, fue posible desorber e ionizar algunos compuestos aromáticos, como terpiridinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y una ftalocianina. De las moléculas probadas, Fv–Cl mostró el mejor desempeño MALDI con buena repetitividad, comparable a la matriz de referencia.

*Proyecto de grado

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

Abstract

TITLE: TESTING OF PHENYLVINYLENE COMPOUNDS AS MALDI MATRICES*

AUTHOR: HERNANDO FABIAN ALONSO ROSALES SOLANO**

KEYWORDS: MALDI Matrices, MALDI, Mass Spectrometry, Phenylvinylenes, Charge Transfer Ionization

The performance of three phenylvinylene-based molecules bearing different chemical functionalities as MALDI matrices was tested. Initially, UV-visible absorption máxima from solution and solid-phase were acquired. For both cases, spectra showed characteristic strong absorption and high molar absorption coefficients, comparable to the reference matrix, α -cyano-4-hidroxicinnamic acid, CHCA.

Phenylvinylene molecules were characterized by mass spectrometry, MS, and it was found, they produced radical cations instead of protonated cations, as it is common for MALDI matrices. Three of the most usual sample preparation techniques were tested using a mixture of synthetic peptides as analyte. From these, 'thin layer technique' was chosen due to its versatility with solvents. Some experiments were carried out to try to form phenylvinylene adducts with protons and metallic cations using higher than usual concentrations of acidic and salt solutions. In any case, phenylvinylene-proton or phenylvinylene-cation adducts were not obtained, and proton-transfer ionization was discarded.

Nonetheless, it was possible to desorb and ionize aromatic compounds, such as terpyridines, polycyclic aromatic hydrocarbons and a phthalocyanine. From the tested molecules, Fv-Cl showed the best MALDI performance with good repetitivity, comparable to the reference matrix.

*Degree Project

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Tutor: Marianny Yajaira Combariza Montañez, PhD. Co-tutor: Laura Juliana Castellanos García, Chemist

Introducción

Desde los inicios de la técnica de ionización/desorción láser asistida por matriz, MALDI, un número reducido de matrices han sido introducidas, reconocidas y empleadas por los usuarios de la técnica. El proceso empleado para el descubrimiento de nuevas matrices consistió tradicionalmente en sintetizar y probar decenas de compuestos orgánicos. Sin embargo, avances novedosos en la elucidación de los mecanismos de ionización y el conocimiento adquirido sobre la relación estructura—desempeño de las matrices MALDI constituyen una base para el diseño racional de nuevas matrices.

Los núcleos de fenilvinileno tienen una estructura altamente conjugada, que puede ser modificada para alterar sus propiedades optoelectrónicas. Esto, sumado a otras propiedades como el coeficiente de absorción molar y la formación de cristales bien comportados, son razones por las cuáles estas moléculas son atractivas para el desarrollo de matrices MALDI novedosas.

En este proyecto se plantea evaluar el desempeño MALDI de tres moléculas con núcleo de fenilvinileno (Fv) para la ionización de péptidos y/o compuestos orgánicos policondensados. Adicionalmente, el desempeño de la matriz de FV se compara con una matriz de referencia típica en análisis MALDI-MS.

1. Marco teórico

1.1 MALDI

El desarrollo^{1, 2} de las técnicas de ionización MALDI, desorción-ionización láser asistida por matriz por sus siglas en inglés, y ESI, ionización por electro-nebulización, permitió la simplificación del análisis de compuestos no volátiles de alto peso molecular. La técnica MALDI se basa en el uso de moléculas orgánicas, conocidas como matrices, que absorben radiación ultravioleta permitiendo la desorción e ionización de compuestos de alto peso molecular. Debido a que la ionización MALDI es un método de ionización suave es ampliamente usado para el análisis de biomoléculas termolábiles de alto peso molecular particularmente: péptidos^{3, 4, 5}, proteínas^{3, 6, 7}, oligonucleótidos⁸ y oligosacáridos. Algunos polímeros sintéticos^{9, 10, 11} también hacen parte del objeto de estudio de MALDI, y mediante esta técnica es posible determinar su polidispersidad y distribución de peso molecular.

Durante el mecanismo de ionización MALDI, un analito es suspendido o embebido en una matriz que absorbe radiación a la longitud de trabajo del láser, típicamente en la región UV. Cuando el láser es disparado a la superficie, la matriz promueve el acoplamiento eficiente de la radiación láser en la fase condensada con los analitos. Los analitos son vaporizados con poca o ninguna fragmentación y posteriormente, son extraídos por un potencial eléctrico y dirigidos al espectrómetro de masas, como se muestra en la figura 1.

El láser ocasiona dos fenómenos: desorción e ionización. Durante el proceso de desorción se producen iones y neutrales. La relación molar entre neutrales a iones es del orden de 10^4 – 10^5 según Mowry¹², por lo tanto se puede considerar a los iones como una especie minoritaria y en una primera aproximación, la formación de iones es una mínima perturbación en todo el proceso de desorción. Debido a esta característica, ambos procesos, tanto de desorción e ionización, son tratados independientemente.

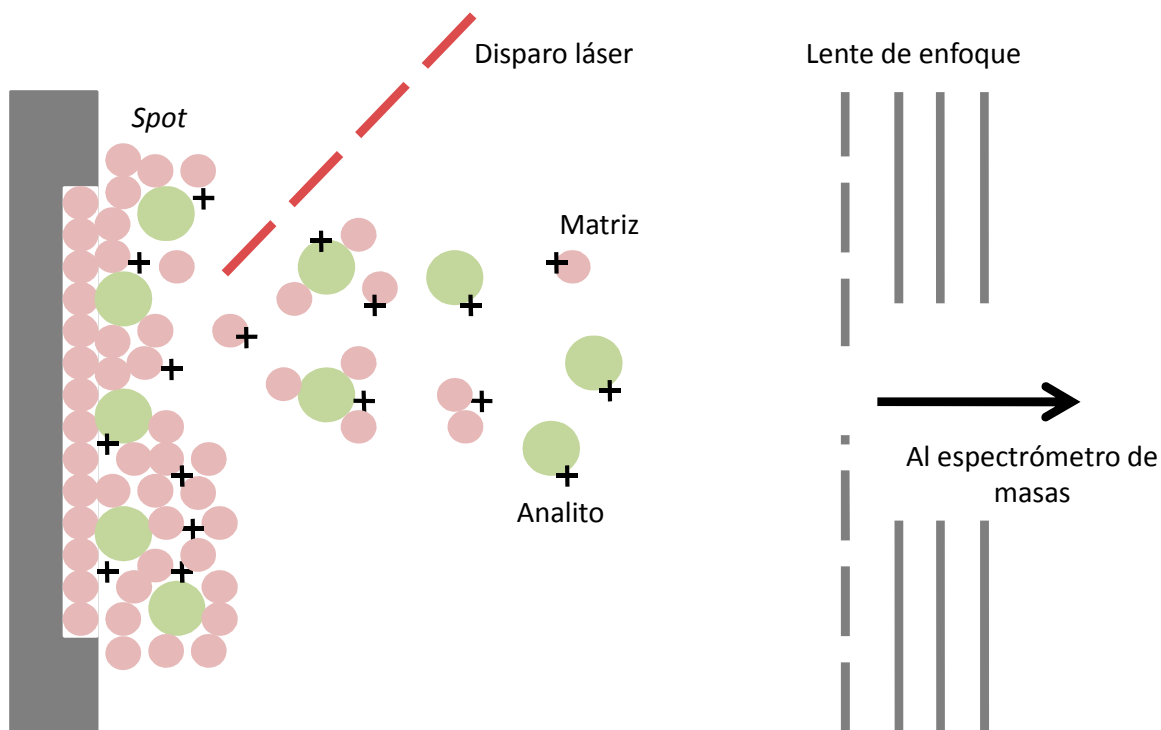


Figura 1. Esquema de una fuente de ionización MALDI.

El disparo del láser desorbe de la superficie una *nube* de neutrales, iones y agregados de moléculas, que reaccionarán entre sí de acuerdo con su camino-medio-libre (*mean free path*). Vertes¹³ usó un modelo hidrodinámico para describir el rápido calentamiento de un sólido cerca de su superficie seguida por sublimación rápida y la expansión de la nube vaporizada. Johnson¹⁴ sugirió un mecanismo de presión pulsada en el que la vaporización bajo la superficie genera un gradiente de presión en el sólido que proyecta las moléculas a la fase gaseosa. Recientemente Knochenmuss¹⁵, usando simulación de dinámica molecular calculó la temperatura, presión y velocidad de las moléculas durante la vaporización y sus resultados respaldan ambos mecanismos. Se considera que el proceso de desorción está bastante bien entendido, mientras la formación de iones se encuentra aún en estudio.

1.2 Parámetros experimentales en MALDI-MS

La longitud de onda del láser es una de las variables más influyentes¹⁶ en la ionización MALDI, ya que determina la matriz que se debe usar. La longitud de onda más usada es 337 nm que corresponde al láser de nitrógeno, pero el armónico del láser de estado sólido Nd:YAG, a 355 nm, se ha vuelto popular. Para MALDI en el rango visible se usan láseres de colorantes como el Coumarine-Blue, y en IR-MALDI son típicamente empleados los láseres de Er:YAG y dióxido de carbono. En la tabla 1 se muestran las longitudes de onda, la energía de un fotón para cada fuente y la duración promedio del pulso de las diferentes fuentes comerciales. Aunque los espectros obtenidos por UV-MALDI e IR-MALDI son similares, los mecanismos de ionización difieren. La ionización en UV-MALDI se ha estudiado más ampliamente que IR-MALDI.

Láser	Long. de onda	Energía de fotón, eV	Duración del pulso
Nitrógeno	337 nm	3.68	<1 ns
Nd:YAG x 3	355 nm	3.49	5 ns
Nd:YAG x 4	266 nm	4.66	5 ns
Er:YAG	2.94 μm	0.42	85 ns
CO ₂	10.6 μm	0.12	100 ns

Tabla 1. Longitudes de onda, duraciones de pulso y energías de un fotón para láseres en MALDI.

La duración del pulso tiene muy poca influencia en el espectro MALDI. Este factor indica que el proceso de desorción/ionización está determinado por la energía aplicada a la muestra por el pulso láser (la fluencia¹⁷, J/cm²), en lugar del flujo de energía (irradiancia, W/cm²). Las fluencias típicas empleadas están en el rango 30-50 mJ/cm².

Debido a la naturaleza pulsada de los láseres, MALDI se acopla típicamente con analizadores de tiempo de vuelo, ToF, donde se aprovecha su amplísimo rango de masas. Claramente, las configuraciones del espectrómetro tienen influencia en el espectro MALDI obtenido. Parámetros como el tiempo de espera (*delay time*), voltajes de aceleración, presión residual o el uso de un reflectrón, afectarán

características del espectro como abundancia, ruido o resolución. En la figura 2, se puede ver el incremento en la resolución del ion cuasi-molecular de angiotensina II, cuando se usa el reflectrón.

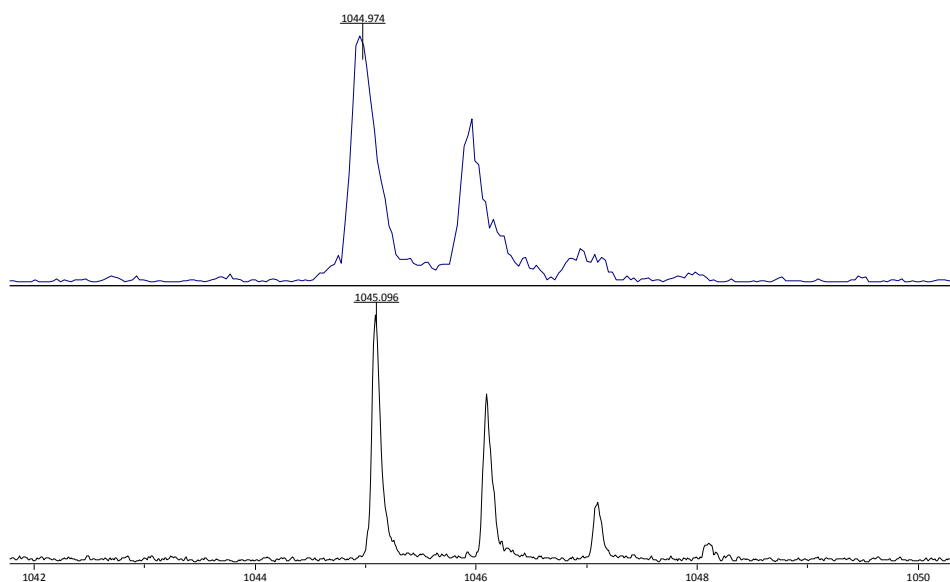


Figura 2. Espectro MALDI MS de angiotensina II con ToF lineal (arriba) y reflectrón (abajo).

Por último, una de las variables más influyentes en el espectro MALDI es la matriz empleada. Los analitos generalmente son co-cristalizados con un exceso de la matriz, para obtener una *pseudo*-solución sólida. En la figura 3 se muestran las estructuras químicas, nombres triviales y abreviaturas de las matrices MALDI más comunes. Generalmente, son compuestos orgánicos derivados de ácidos carboxílicos aromáticos como ácido benzoico, ácido cinámico¹⁸ y ácido nicotínico. La técnica MALDI es ampliamente reconocida por sus muchas aplicaciones, su versatilidad radica en el uso de varios tipos de moléculas orgánicas como matrices; por ejemplo, la 3-aminoquinolina, 3AQ, es una buena matriz para el estudio de polisacáridos; la 2,4,6-trihidroxiacetofenona es útil para el estudio de oligonucleótidos; y el ditranol es una matriz típica para cationización de polímeros por su baja afinidad hacia el catión Na⁺.

Moléculas con diversas funcionalidades y estructuras han sido empleadas como matrices MALDI. Fitzgerald⁸ diseñó matrices básicas derivadas de pirimidinas, piridinas y anilinas sustituidas. Por otra parte, Beavis¹⁹ introdujo el ácido 2,5-dihidroxibenzóico, DHB, que aún mantiene su popularidad como matriz para proteínas de elevado peso molecular (<10 kDa). Varias de estas matrices pueden ser usadas como matrices en IR-MALDI, aunque el glicerol y el ácido succínico¹⁹ son las principales matrices para este método. Otra propiedad importante de una matriz MALDI es su capacidad para inducir fragmentación, que en muchas aplicaciones sería un proceso indeseable. Matrices populares como el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, CHCA, ácido sinapínico, SA y DHB han sido estudiadas y comparadas en cuanto a la propiedad de inducir fragmentación, y son clasificadas como “calientes” o “frías”. Esta característica tiene que ver con la cantidad de energía liberada durante el proceso de ionización del analito.

El uso de matrices MALDI sólidas acarrea dos problemas significativos. El primero, es que no siempre es posible solubilizar analitos y matrices en el mismo solvente y, por lo tanto, obtener una muestra homogénea. Ello conlleva al segundo problema, presencia de *puntos-dulces*, puntos en los que se concentra el analito y se genera una distribución no-homogénea del analito en la superficie. Estos problemas se pueden reducir durante la preparación de la muestra, usando un método de preparación adecuado. Mediante la escogencia cuidadosa del método se puede además mejorar la resolución, reproducibilidad o la cantidad de ruido del espectro MALDI^{20, 21, 21}.

A finales de la década de los 90, se usaron análogos líquidos de las matrices que se disolvían en un líquido viscoso (glicerol) con ayuda de un agente solubilizante²². Este tipo de matrices híbridas, que emulan el experimento de Tanaka², lograron un aumento en la reproducibilidad “disparo-a-disparo” (*shot-to-shot*), por su capacidad de auto-recuperación, típica de estos líquidos viscosos. Posteriormente, Armstrong²³ utilizó líquidos iónicos como matrices que mostraron una significativa

disminución del ruido químico producido por la matriz, y mayor estabilidad en el vacío por su reducida presión de vapor.

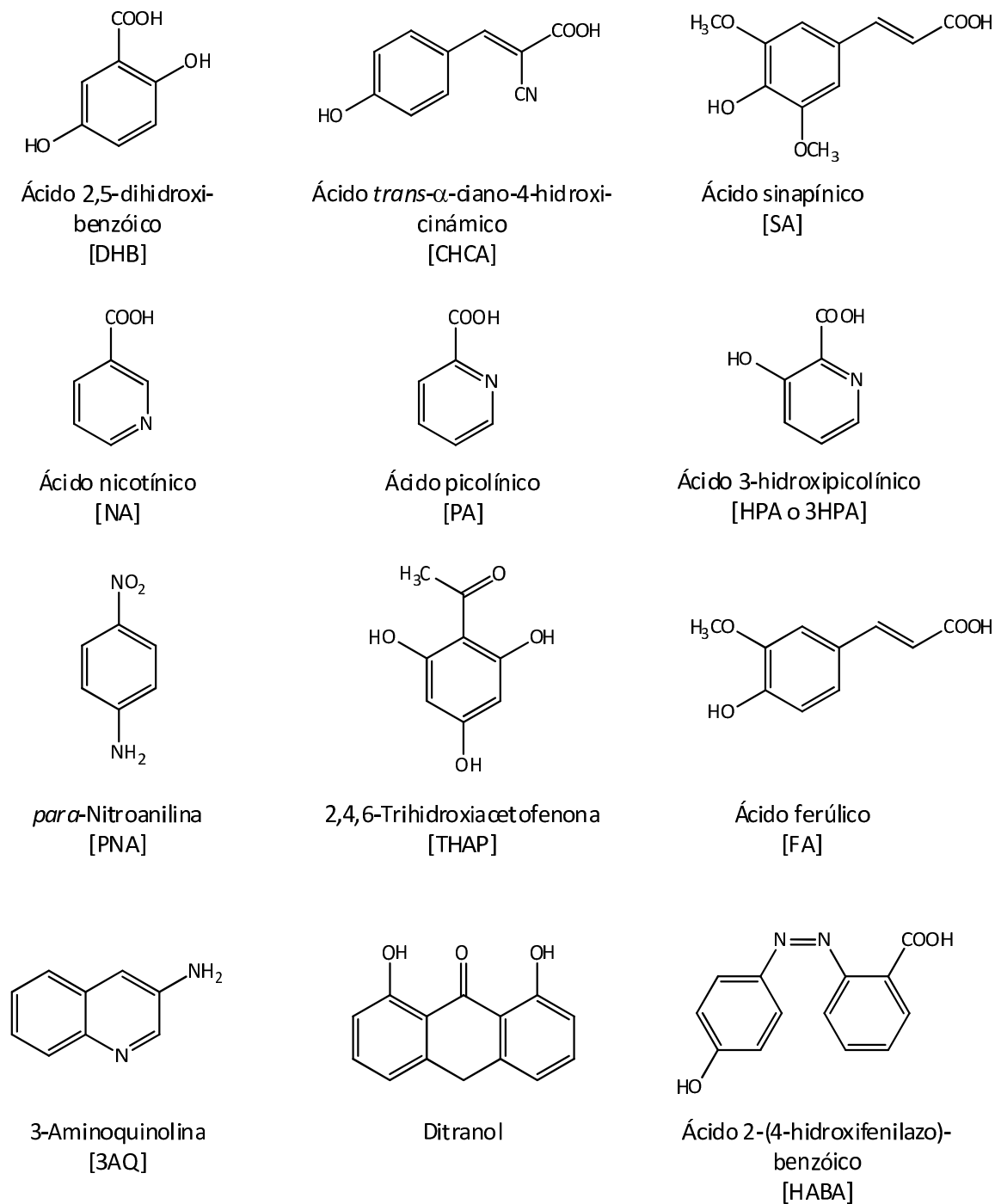


Figura 3. Matrices MALDI más comunes.

Posteriormente, Armstrong²⁴ introdujo líquidos iónicos basados en matrices MALDI convencionales. Estos líquidos iónicos son preparados con pares iónicos entre matrices convencionales (CHCA, DHB o SA) y una base orgánica (tributilamina, piridina o 1-metilimidazol), de modo que garanticen un estado de liquidez bajo condiciones de vacío²⁵.

1.3 Formación primaria de iones

Los modelos que describen la formación de iones en MALDI han sido estudiados principalmente para la ionización UV-MALDI y, especialmente, para iones positivos. Estos iones pueden ser: cationes radicales, iones *pseudo*-moleculares protonados, e iones *pseudo*-moleculares cationizados. En la figura 4 se muestra un diagrama de los mecanismos propuestos por Ehring, Karas y Hillenkamp²⁶ para la foto-formación de iones de matrices en MALDI. Se describen tres momentos principales: la excitación de las moléculas, la foto-ionización de excitones y las reacciones foto-químicas. Los mecanismos de excitación propuestos son mancomunación (*pooling*) de energía (ruta A) y excitación multi-fotónica en uno o dos pasos (rutas C y B, respectivamente), que producen una molécula en un alto grado de excitación, excitón. La ionización del excitón puede ocurrir por pérdida o ganancia de un electrón, para dar un catión o un anión radical, aunque ambos procesos ocurren. Finalmente, por reacciones ion-molécula, se obtienen los iones de matrices observados en los espectros de masas.

Uno de los modelos más aceptados es la ionización multi-fotónica de una sola molécula, la cual resulta en la formación de un catión radical y emisión de un electrón, ecuación 1. Este proceso corresponde a las rutas B y C de la figura 4. Debido a las fluencias empleadas en MALDI y a la duración del estado excitado (unos pocos nanosegundos), es poco probable que ocurra una ionización con más de tres fotones, por lo cual sólo se consideran procesos de ionización multi-fotónica de hasta dos fotones, ecuación 2. La foto-ionización por esta vía, ocurre desde un estado excitado, causado por el primer fotón. Se pueden observar

cationes radicales de la matriz si ésta tiene un potencial de ionización, PI, bajo, y el catión radical producido es *muy* estable.



Experimentalmente no se han determinado los potenciales de ionización (PI) de las matrices MALDI en estado sólido o de grandes agregados de moléculas de la matriz. En su lugar, hay estimados basados en cálculos o mediciones de los PIs para moléculas aisladas. Karbach²⁷ utilizó un primer láser para excitar un gran número de moléculas de DHB, aumentando la población del estado S₁, y un segundo láser para ionizarlas. A partir de una curva de eficiencia de fotoionización del segundo láser, logró obtener valores experimentales de PI para el DHB aislado, el dímero de DHB y para el aducto DHB:H₂O, con cuantías de 8.05 eV, 7.93 eV, y 7.78 eV, respectivamente. Bourcier²⁸ determinó los valores de PI para un grupo de matrices MALDI usando DFT (Density Functional Theory) con el funcional B3LYP y una base tipo 6-311++G(2d,2p), obteniendo datos con errores cercanos al 2% en comparación con los valores experimentales. Los cálculos teóricos proveen valores confiables de los potenciales de ionización. Según estos resultados, se puede predecir que la ionización en *bulk*, será más fácil para el DHB usando dos fotones de un láser de nitrógeno (7.36 eV). En la tabla 2 se muestran los PIs de varias matrices comunes en MALDI, la mayoría de los cuales han sido calculados usando herramientas de química computacional.

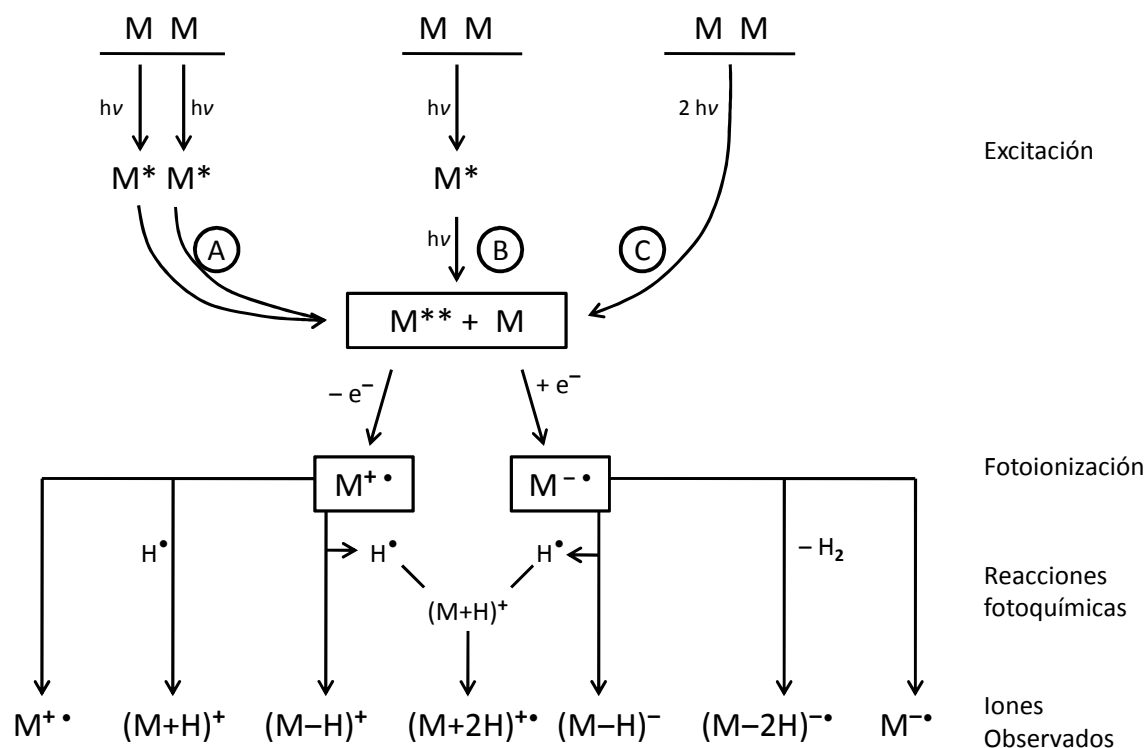
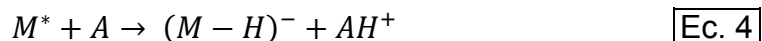


Figura 4. Esquema de los mecanismos de fotoionización de matriz.

Fuente: Ehring, Karas y Hillenkamp²⁶

Además de la fotoionización, la transferencia de protón en el estado excitado (ESPT, Excited State Proton Transfer) es un segundo modelo aceptado. Una molécula de matriz excitada por un fotón, ecuación 3, tendrá una acidez mayor a la molécula en su estado basal. Algún analito cercano u otra molécula de matriz aceptarán un protón lábil antes de la relajación de la matriz, ecuaciones 4 y 5.



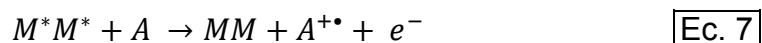
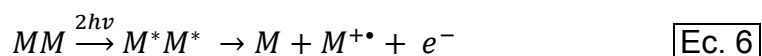
El protón lábil puede provenir tanto del carboxilo como de un hidroxilo en posición *orto* al grupo ácido, como DHB o 3-HPA. El rol de los hidroxilos aromáticos en transferencia de protones al analito se dio a entender por los experimentos de

Karas²⁹, en los que la derivatización de grupos hidroxilos disminuyó la eficiencia de ionización de algunas matrices.

Matriz	PI exp, eV	PI calc, eV
2,5DHB	8.05 ²⁷	7.86 ²⁸
NA	9.38 ²⁸	9.21 ²⁸
3HPA	-	8.95 ²⁸
HABA	-	8.32 ³⁰
SA	-	7.72 ³⁰
THAP	-	8.44 ³⁰
CHCA	-	8.50 ³⁰

Tabla 2. Valores experimentales y calculados de potenciales de ionización de matrices MALDI. Ver estructuras en la figura 3.

Otro modelo que explica la formación de iones de la matriz es el conocido como *pooling*. En este modelo, dos o más moléculas son excitadas fotónicamente y mancomunan su energía para dar un catión radical o una molécula de altísima energía, mientras las demás se relajan, ecuación 6. Este mecanismo corresponde a la ruta A de la figura 4. Este modelo es atractivo porque explica cómo pueden darse procesos energéticos en un sólido excitado, además es plausible, porque existen fuertes interacciones entre cromóforos empaquetados estrechamente. También se considera la posibilidad de ionización de un analito por mancomunación de energía de moléculas de matriz excitadas, ecuación 7.



Este modelo de *pooling* es respaldado por los resultados de Ehring y Sundqvist³¹, quienes observaron que la luminiscencia de DHB, FA y 3HPA se apantalla a densidades de excitación que corresponden al umbral MALDI. Esto se puede

interpretar como la aniquilación de excitones, ya que dos moléculas excitadas reaccionan entre sí. Posteriormente, Lüdemann³² obtuvo resultados similares en los que se propone que la despoblación de los estados excitados es causada por aniquilación entre excitones. Allwood y Dyer³³ estudiaron para algunas matrices comunes varios parámetros foto-físicos, como rendimiento cuántico y tasas de decaimiento de singuletes, y los relacionaron con su comportamiento en MALDI. Una de sus observaciones se trata de que matrices con rendimientos cuánticos bajos (alrededor de 0.4) son mejores durante la desorción por direccionar la energía de manera no-radiativa.

1.4 Reacciones secundarias de ionización

Aunque la desorción continúa durante un tiempo después del pulso láser, los iones observados parecen ser generados rápidamente. La velocidad que alcanzan los iones del analito dependen de la matriz, técnica de preparación de muestra y del *delay time*. Las velocidades están en el rango de 200–500 m/s, según Glückmann y Karas³⁴. Considerando su velocidad, la densidad y el volumen de la nube, el camino medio libre (*mean free path*) de los analitos es bastante corto, y la tasa de colisiones muy alta, por lo que se han de generar iones por reacciones secundarias en la nube.

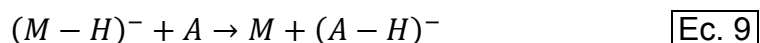
Básicamente, hay tres tipos de reacciones secundarias que pueden ocurrir: reacciones de transferencia protónica, reacciones de cationización y reacciones de transferencia electrónica. La reacción que ocurra y su alcance dependen de parámetros fisicoquímicos tanto de la matriz como de los analitos involucrados.

Algunos analitos neutros como péptidos y proteínas tienen afinidades protónicas más bien altas, típicamente de 900 kJ/mol, e incluso mayores. Harrison³⁵ ha reseñado métodos y valores de afinidad protónica para varios aminoácidos. Las afinidades protónicas de matrices están entre 850 y 900 kJ/mol.^{36, 37, 38, 39} Es de esperar que en la nube ocurran reacciones eficientes de transferencia de protones

de la matriz protonada, MH^+ , hacia los analitos, ecuación 8. Si la reacción de protonación es muy exotérmica, debido a una gran diferencia de afinidades protónicas matriz-analito, aumenta la probabilidad de fragmentación de los analitos.



Si se espera que el analito tenga una baja afinidad protónica, es preferible hacer mediciones de iones negativos y utilizar matrices más básicas⁸. En este caso, un anión primario deprotonado de la matriz puede abstraer eficientemente protones de un analito neutro, generando un analito deprotonado, ecuación 9. Este tipo de ionización es común también para péptidos, proteínas y otras moléculas de interés biológico.

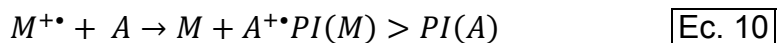


En los espectros de masas es común encontrar señales de aductos formados por el analito e iones ubicuos como Na^+ y K^+ . La formación de aductos de analito con estos metales puede complicar el análisis cuando otras señales son prominentes (por ejemplo, especies protonadas), o muy útil cuando otras señales son débiles. Particularmente, en el análisis de polímeros se agregan intencionalmente sales de estos metales para mejorar las señales.

En los casos en que la afinidad protónica de un analito no supera a aquella de la matriz, no se observará un ion pseudo-molecular protonado. Sin embargo, si el analito tiene una afinidad catiónica más alta que la de la matriz, y tal catión está presente en una cantidad considerable, se han de observar aductos de analito cationizado. Una de las matrices más empleadas para el análisis de polímeros es el ditranol, porque tiene una de las afinidades hacia Na^+ más bajas, 150 kJ/mol. También es común el uso de plata y/o cobre como agentes cationizantes de polímeros, porque éstos crean complejos— π con los electrones de los orbitales— d de los metales mediante un enlace de retro-donación electrónica. Sherrod⁴⁰

empleó nanopartículas de plata como matriz con el objetivo de ionizar selectivamente olefinas de interés biológico.

El tipo de reacción más simple ion–molécula matriz–analito, es la transferencia de un electrón del analito a un catión radical de la matriz; sin embargo, es la menos observada, porque requiere una condición muy específica: el potencial de ionización, PI , del analito debe ser menor que el de la matriz, como muestra la ecuación 10. Este requerimiento fisicoquímico fue propuesto y evaluado por Macha⁴¹, y estudiado de nuevo por Hotelling³⁰.



No es frecuente observar cationes radicales de péptidos debido a sus altos PI s. Adicionalmente, las matrices MALDI típicas tienen PI s relativamente bajos. De los aminoácidos cuyos PI s son conocidos, el del triptófano es el único menor al PI del DHB. Únicamente Vertes⁴² logró observar cationes radicales para péptidos cíclicos muy específicos en un experimento similar a MALDI. Los primeros en reportar cationes radicales en MALDI fueron Juhasz y Costello⁴³, quienes usaron matrices no-convencionales para la época: ditranol y 9-nitroantraceno; y emplearon técnicas de preparación diferentes para ionizar los oligo-metalocenos empleados como analitos. Los experimentos de control excluyeron la foto-ionización directa del analito. Srinivasan⁴⁴ obtuvo cationes radicales de porfirinas, metaloporfirinas y ftalocianinas empleando 1,4-benzoquinona como matriz. Ulmer⁴⁵ introdujo DCTB (ver figura 5) como matriz para ionizar derivados de fullerenos, posteriormente Streletskii⁴⁶ empleó DCTB (entre otras matrices) para analizar, en modo negativo, derivados fluorados de fullerenos que generaron aniones radicales. Uno de los resultados más interesantes de McCarley⁴⁷, usando antraceno- d_{10} como matriz, fue que no se obtuvo ningún aducto ($A+D$), sino exclusivamente cationes radicales de analitos para ferrocenos o metalocenos. Este grupo propuso un mecanismo de absorción resonante de dos fotones. Pryzbilla⁴⁸ ideó una técnica de preparación de muestra para analizar PAHs insolubles, pulverizando sus analitos con TCNQ a

la relación matriz–analito adecuada y suspendiendo esta mezcla en un líquido que no los solubilizara. Boutaghou⁴⁹ es el autor más reciente en introducir una matriz, 9,10-difenilantraceno, para la formación de cationes radicales de porfirinas.

Este tipo de formación de iones es importante para analitos con bajos potenciales de ionización. En la figura 5, se muestran las estructuras, abreviaturas y algunos potenciales de ionización de las matrices reportadas para la ionización de analitos por transferencia electrónica.

Las matrices de transferencia electrónica se ‘diferencian’ de las matrices de transferencia protónica, en que poseen una estructura con mayor conjugación, con el objetivo de estabilizar eficientemente un sistema con carga formal y de capa abierta, es decir, con un electrón desapareado. Macha⁵⁰, empleó algunos PAHs de bajo peso molecular, como antraceno, perileno, y acenafteno, para ionizar ferrocenos y otros analitos

El análisis de PAHs es de gran importancia debido a que se ha demostrado que son carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos en humanos. Sus efectos adversos y las técnicas comunes de análisis han sido reseñadas por el U.S. Department of Health and Human Services⁵¹. Los PAHs tienen origen en crudos de petróleo y depósitos de carbón, y se presentan en algunos alimentos⁵², en aguas para consumo y residuales⁵³, en suelos⁵⁴ y en aire. El análisis y caracterización de PAHs de bajo y mediano peso molecular en muestras biológicas y muestras ambientales se ha hecho principalmente por GC/MS, GC-FT-IR, GC/FID, HPLC/UV, HPLC/DAD, entre otras técnicas. Actualmente, no hay métodos estándares para el análisis de PAHs de alto peso molecular, >1500 Da, pero hay un incremento en la investigación relacionada con este requerimiento analítico.

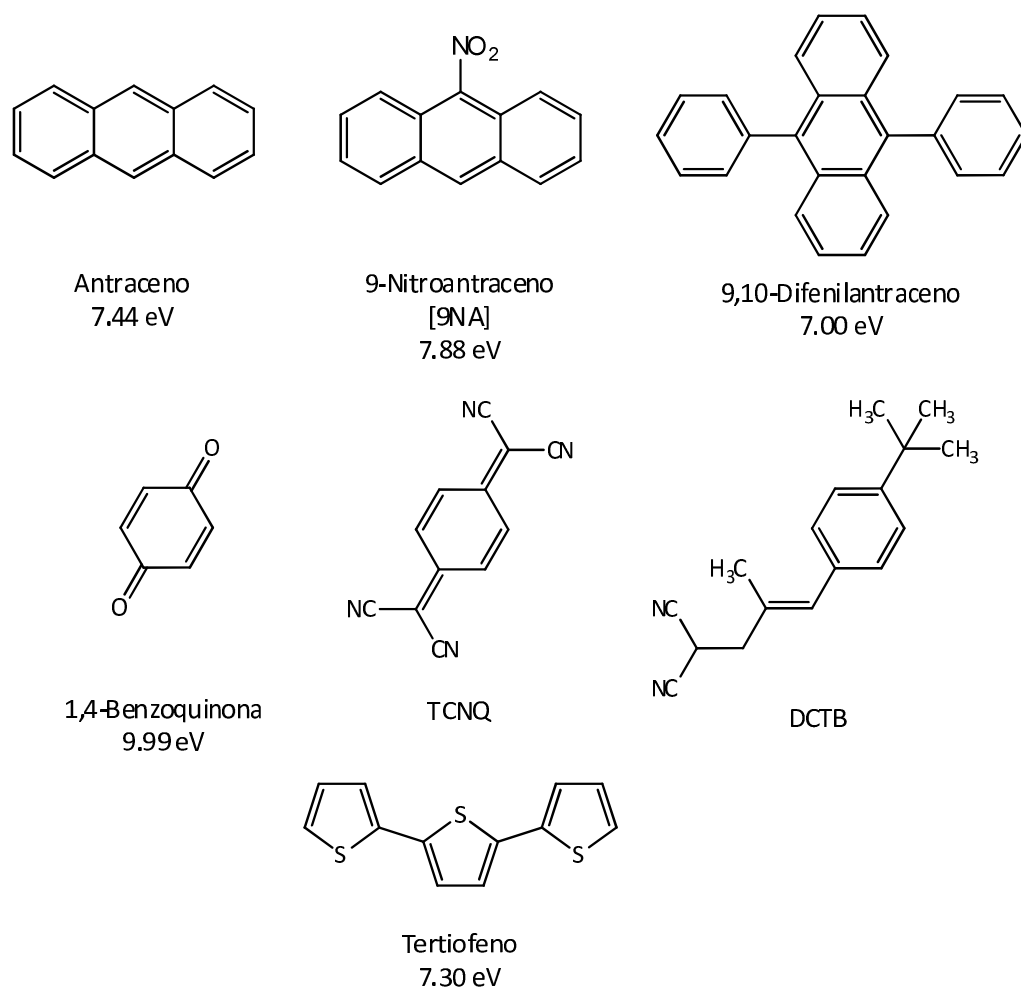


Figura 5. Matrices MALDI introducidas para ionización por transferencia electrónica.

Cuando se aumenta el número de núcleos en un compuesto aromático policíclico, se espera que su PI disminuya, y su peso molecular aumente. Utilizar PAHs de bajo peso molecular como matriz MALDI para PAHs pesados constituye una estrategia útil, pero que puede introducir interferencias por su semejanza química. Se propone, a largo plazo, emplear fenilenvinilenos como matriz MALDI para ionizar PAHs de mediano peso molecular y una muestra modelo de un asfalto.

2. Metodología

2.1 Reactivos

Los fenilenvinilenos empleados como matrices, y las terpiridinas empleadas como analitos fueron sintetizadas en el Grupo de Investigación en Macromoléculas de la Universidad Nacional de Colombia, grupo que lidera el Profesor Cesar A. Sierra. La ftalocianina de cobalto fue sintetizada en la Universidad Industrial de Santander, en el grupo de investigación de la Profesora Marta Niño. Se empleó un estándar analítico de PAHs de Supelco. Cada analito en el estándar se encuentra en una concentración de 2000 µg/mL en la tabla 3 se especifican sus componentes. En la figura 6 se muestran las estructuras de los fenilenvinilenos y analitos empleados, junto con la abreviatura de cada uno.

Como matriz de referencia en ensayos con péptidos y terpiridinas se empleó el ácido *trans*- α -ciano-4-hidroxicinámico, CHCA, de Sigma–Aldrich. Para ensayos con analitos susceptibles a ionización por transferencia electrónica, se empleó antraceno, de Merck.

Se utilizó una mezcla equimolar (63 µM en buffer Tris·HCl, pH 7.4) de cuatro péptidos sintéticos con masas en el rango 1420–2070 Da para hallar los parámetros más favorables de la ionización de biomoléculas, durante los experimentos preliminares. En todos los casos en que se empleó la solución de péptidos como muestra de analitos, la relación matriz–analito se estableció alrededor de 1000:1. Estos péptidos fueron donados por Jenny Bueno, Química, M.Sc, del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología. Se emplearon solventes grado analítico, y agua desionizada de 18.2 m Ω ·cm.

Analito	CAS	Formula	PM, g/mol	PI, eV⁵⁵
Acenafteno	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀	154.21	7.76
Acenaftileno	208-96-8	C ₁₂ H ₈	152.19	8.22
Antraceno	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	178.23	7.47
Benzo[a]antraceno	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	228.29	7.56
Benzo[a]pireno	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252.31	7.41
Benzo[b]fluoranteno	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	252.31	-
Benzo[ghi]perileno	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂	276.33	7.15
Benzo[k]fluoranteno	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	252.31	-
Criseno	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	228.28	7.59
Dibenz[a,h]antraceno	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	278.35	7.38
Fluoranteno	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	202.26	7.95
Fluoreno	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀	166.22	7.93
Indeno[1,2,3-cd]pireno	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	276.33	-
Naftaleno	91-20-3	C ₁₀ H ₈	128.17	8.12
Fenantreno	65-01-8	C ₁₄ H ₁₀	174.23	7.92
Pireno	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	202.25	7.41

Tabla 3. Componentes del estándar analítico de PAHs

2.2 Equipos

Los espectros de absorción UV-Vis se realizaron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC de doble canal, con lámparas de deuterio y tungsteno. En las mediciones en modo *full scan* se realizó un barrido espectral de 200–700 nm, a velocidad de escaneo media y *slit* de 1.0 nm. Se empleó una celda de cuarzo de camino óptico de 1.0 cm. Para los espectros en modo reflectancia difusa se empleó el aditamento adecuado y sulfato de bario, BaSO₄, como blanco. Se realizó un barrido espectral de 200–700 nm, a velocidad de escaneo media y *slit* de 1.0 nm.

Las mediciones MALDI MS fueron realizadas usando un espectrómetro de masas Bruker UltrafleXtreme, con analizador de tiempo de vuelo, ToF, en modo reflectrón. Se empleó un target MTP 384 target plate ground steel T F, de Bruker. Se utilizó un láser de 355 nm, de estado sólido de Nd:YAG en su tercer armónico, que produce pulsos de 5ns con una tasa de repetición de 1000 Hz. El tiempo de retardo (*delay time*) fue 100 ns, el voltaje de extracción de la cámara, -25 kV, y el

voltaje de enfoque -22.5 kV, en modo positivo. El análisis de los espectros se realizó con el programa flexAnalysis, de Bruker.

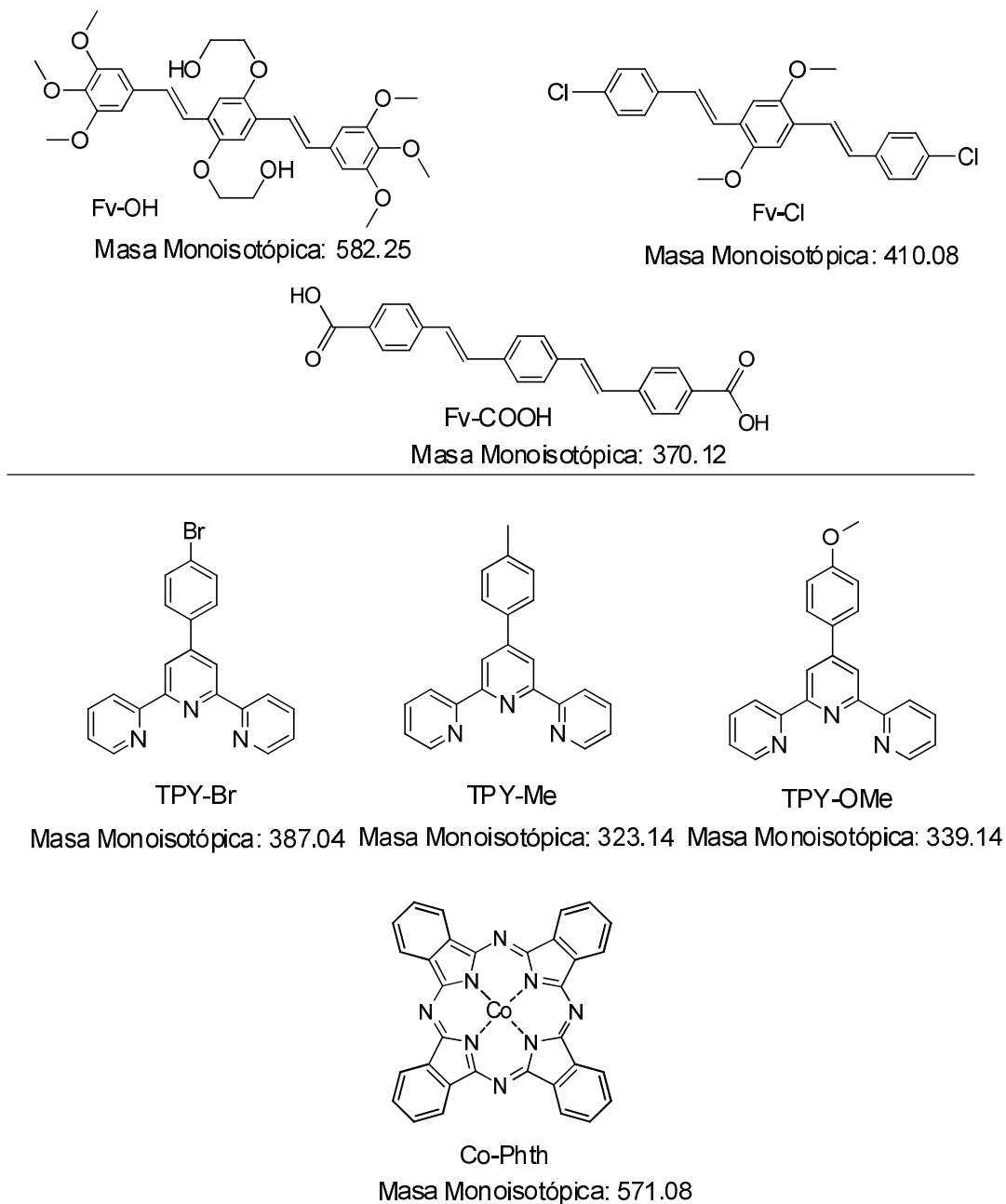


Figura 6. Estructuras de las moléculas empleadas como matrices y algunos analitos.

Los espectros mostrados corresponden a la sumatoria de 2000 espectros individuales, acumulados. Se presentan los espectros en modo positivo, a menos que se indique lo contrario. La fluencia del láser se ajustó 5–10% sobre el umbral de ionización.

2.3 Determinación de los coeficientes de absorción molar

Se preparó una serie de diluciones de las matrices (CHCA, Fv–OH y Fv–Cl) en acetonitrilo, ACN. Se midió la absorbancia de cada solución a 355 nm. Para algunas soluciones se realizó un barrido espectral entre 200–700 nm. El coeficiente de absorción molar de cada molécula se obtuvo teniendo en cuenta la ecuación de Beer-Lambert para soluciones diluidas.

2.4 Análisis de reflectancia difusa

Sobre un círculo de cinta doble faz, de 25 mm de diámetro aproximadamente, se depositaron y esparcieron alrededor de 3 mg de matriz de fenilenvinileno hasta obtener una capa uniforme. A cada muestra se le determinó el espectro UV-Vis en modo de reflectancia. El aspecto de las muestras que se obtuvieron, y el porta-muestras empleado se muestran en la figura 7.



Figura 7. Aspecto de las muestras para reflectancia difusa en el porta-muestra.

2.5 Caracterización MS de fenilenvinilenos

Se prepararon soluciones saturadas de las moléculas Fv–OH y Fv–Cl en tetrahidrofurano, THF. De esta solución se aplicaron 0.5-1 μ L en el target de MALDI y se dejó secar la cabina de extracción. Se probaron otros solventes

(acetona, metanol, acetonitrilo, agua), pero no hubo variación significativa en los espectros obtenidos. Se empleó THF debido a su alta volatilidad y a la alta uniformidad de las muestras obtenidas.

2.6 Técnicas de preparación de la muestra

Se probaron tres de los métodos más comunes de preparación de muestras: *dried droplet*, *thin layer* y *sándwich method*. Como analito se empleó una mezcla equimolar de péptidos sintéticos.

- Técnica *Dried Droplet (DD)*: Se preparó una solución saturada de la matriz en ACN-H₂O (2:1, v/v, 0.01 % TFA). A su vez, se preparó una solución de analito en H₂O (0.01% ácido fórmico, FA). Se mezclaron iguales volúmenes de solución de matriz y de analito en un tubo eppendorf. De esta mezcla se aplicó 0.5-1.0 µL en el target, y se dejó secar en la cabina de extracción.
- Técnica *Thin Layer (TL)*: Se preparó una solución de matriz por debajo de la saturación en un solvente de rápida evaporación, como acetona o THF. Se aplicaron 0.5 µL de esta solución en el target. Sobre el *spot*, se aplicó 1 µL de la solución de analito. Posteriormente, se dejaron secar las muestras en la cabina de extracción.
- Técnica *Sándwich Method (SM)*: Sobre una muestra preparada por *thin layer* se agregaron 0.5 µL de solución concentrada de la matriz.

2.7 Efecto de protonación y cationización

2.7.1 Experimentos de protonación

En MALDI es usual agregar una pequeña cantidad de ácido para favorecer la protonación de péptidos y proteínas. Se prepararon soluciones (v/v) de ácido en agua desionizada a dos niveles de concentración. Para el ácido trifluoroacético (TFA) se prepararon al 5 y 10%. Para el ácido fórmico (FA), al 10 y 30%. Y para el ácido acético (HAc), al 30 y 60%. Como analito se empleó la mezcla equimolar de

péptidos sintéticos. Se prepararon las muestras por TL, añadiendo 1.0 μL de las soluciones de ácido. Se dejaron secar las muestras en la cabina de extracción.

2.7.2 Experimentos de cationización

Como alternativa a la protonación, se realizaron los ensayos de cationización. Se prepararon soluciones de AgBF_4 (14.2 mM), LiOH (52.1 mM), $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (11.1 mM) y KCl (24 mM) en agua desionizada, a concentraciones empleadas usualmente en MALDI. Se empleó LiOH , puesto que no se contaba con una sal de litio en el laboratorio. Como analito se empleó la mezcla equimolar de péptidos sintéticos. Se prepararon las muestras por la técnica DD para asegurar homogenización de los cationes metálicos en la muestra.

2.8 Ionización de compuestos policíclicos aromáticos

Se aplicaron 0.7 μL de solución de matriz en THF sobre el target, y se dejó secar. Sobre este spot se aplicó 1.0 μL de solución de analitos policíclicos aromáticos, siguiendo el método TL. Sobre éste *spot* se aplicó 1.0 μL de solución de analitos policíclicos aromáticos. Se dejó secar en la cabina de extracción. Como experimentos de control se aplicó 1.0 μL de solución de analitos sobre el target y se dejó secar. Como matrices de referencia se empleó CHCA, y antraceno en algunos casos. Las relaciones matriz–analito estaban en el rango 100:1–500:1, en todos los experimentos.

3. Resultados y discusión

3.1 Comportamiento espectroscópico de las matrices

Los coeficientes de absorptividad molar a 355 nm para las matrices se muestran en la tabla 4, y las curvas de absorbancia se muestran en la figura 8. Se determinaron los coeficientes de absorción molar para cada sustancia, con base en la ecuación de Beer–Lambert, usando soluciones muy diluidas. Los coeficientes de absorción molar de los fenilenvinilenos están en el mismo orden de magnitud que la matriz de referencia, o sea, absorben eficientemente/fuertemente la radiación del láser. La molécula Fv–COOH no se disolvió en acetonitrilo.

Matriz	CHCA	Fv–OH	Fv–Cl
ϵ_{355} $L mol^{-1} cm^{-1}$	15 849	11 513	13 918
R^2	0.9907	0.9995	0.9991

Tabla 4. Absorptividades molares a 355 nm para soluciones de diferentes matrices.

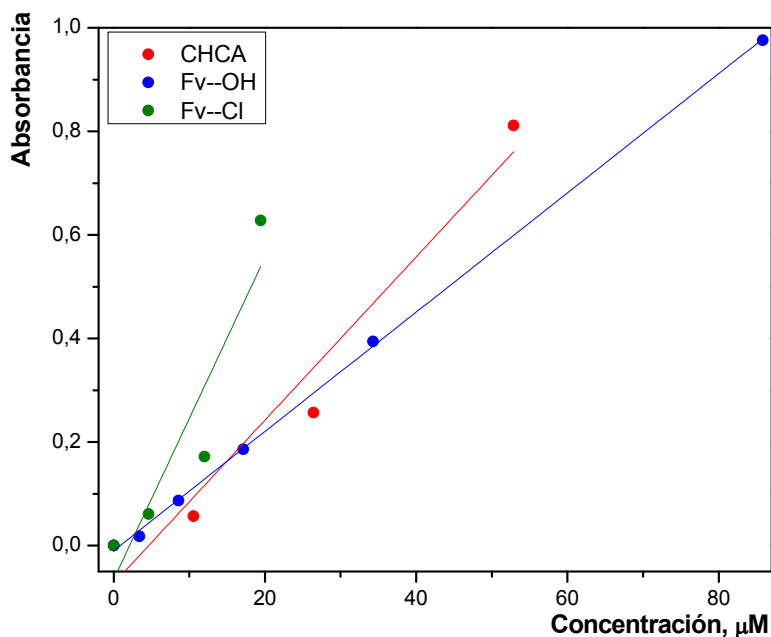


Figura 8. Absorbancia a 355 nm de las soluciones de matriz.

En la figura 9 se muestra el espectro de absorción UV-Vis para las matrices evaluadas. Se nota que CHCA tiene su máximo de absorción muy cerca a la longitud de onda de trabajo del láser, de allí su señal más intensa y la alta absorptividad. Sin embargo, a la misma concentración las moléculas Fv-Cl y Fv-OH, presentan una absorptividad mayor.

Los máximos de absorción de los fenilvinilenos se encuentran cerca de 355 nm; sin embargo, este máximo está desplazado a longitudes de onda menores (340 nm para Fv-OH, 307 nm para Fv-Cl; 293 nm para Fv-COOH). A pesar de esto, exhiben una absorptividad molar comparable a la del CHCA a 355 nm. Su alta absorptividad se atribuye a su núcleo de fenilvinileno, que con tres anillos aromáticos y dos puentes vinilo, permite una deslocalización efectiva de los electrones π , más eficiente en Fv-OH que en Fv-Cl. Las bandas de absorción más intensas en estos fenilvinilenos corresponden a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$.

Soltwisch⁵⁶ obtuvo para el CHCA un coeficiente de 11 200 L mol⁻¹ cm⁻¹, midiendo la absorción de una lámina delgada de CHCA sólido en BaSO₄. Allwood⁵⁷ obtuvo coeficientes de absorción molar del orden de 10⁵ para varias matrices MALDI, empleando láminas *muy* delgadas (alrededor de 100 μ m) obtenidas por sublimación de la matriz. Éstos resultados demuestran que los fenómenos de absorción de radiación láser son más intensos en estado sólido. El proceso de absorción en estado sólido se asemeja más al experimento MALDI que la absorción en solución diluida.

Mediante el análisis por reflectancia difusa (RD) se observó el comportamiento de las matrices en estado sólido en presencia de radiación UV-Vis, ver figura 10. No fue posible comparar en éste experimento las matrices de fenilvinileno con la matriz de referencia, CHCA, debido al alto costo que representa disponer de tal cantidad de CHCA. Los resultados de RD muestran una banda ancha, típica en muestras sólidas, debido a las interacciones inter-moleculares (apilamiento- π y

restricciones de movilidad, principalmente) que ocurren a altas *concentraciones*. Los pozos de mínima reflectancia corresponden a bandas de máxima absorción. Las moléculas de fenilvinileno tienen una alta absorción en el rango 360–480 nm, como se observa en el recuadro.

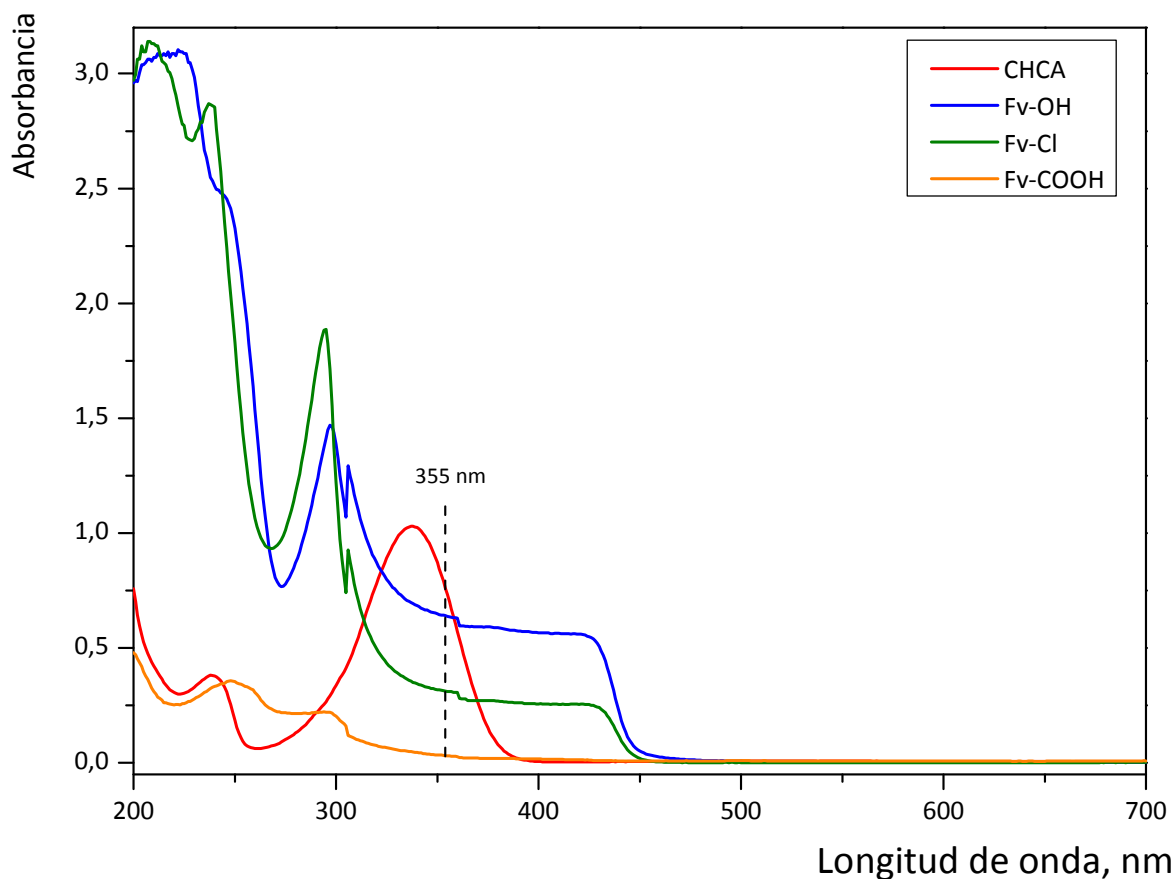


Figura 9. Espectros de absorción UV-Vis para CHCA, Fv-OH, Fv-Cl y Fv-COOH. Concentraciones en el rango 4–12 μM .

Al igual que Allwood⁵⁸, se obtienen señales con un gran ancho de banda, que se traducirá en una absorción eficiente de los fotones del láser por absorción en el rango de la banda. Lamentablemente, no es posible predecir el desempeño de una molécula como matriz MALDI basándose únicamente en la absorción de radiación, por ejemplo los isómeros 3,5 y 2,6-DHB tienen bajo desempeño en MALDI^{59, 60, 61, 62} presumiblemente porque no son capaces de formar un aducto

con un protón en estado excitado estabilizado por enlaces de hidrógeno intra-moleculares.

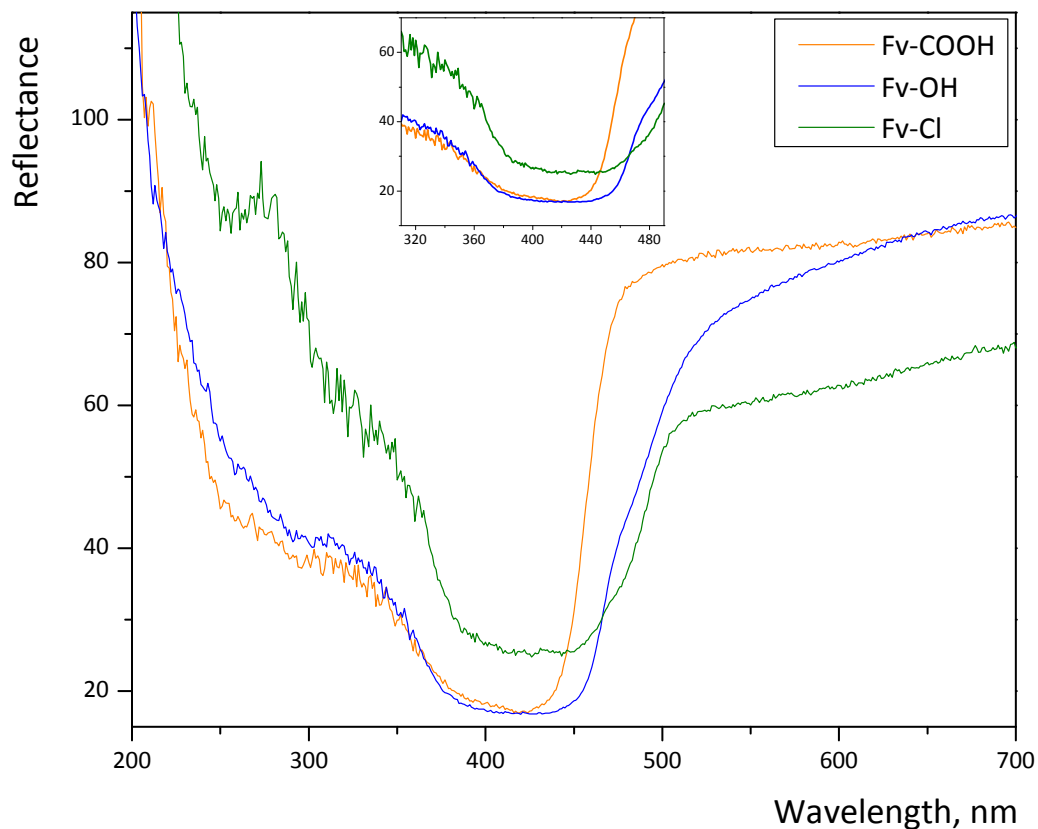


Figura 10. Espectros de reflectancia difusa para Fv-OH, Fv-Cl, Fv-COOH.

3.2 Caracterización MS de fenilenvinilenos

Es importante resaltar que no se utilizó ninguna matriz adicional para los espectros mostrados. La alta absorción *per sé* de las moléculas con núcleo de fenilenvinileno (como oligómeros⁶³) hace posible que absorban radiación láser eficientemente.

Fv-OH

El espectro de masas (rango de masas 100-800 Da) de la molécula Fv-OH en modo positivo a diferentes fluencias de laser se muestra en la figura 11. A la mínima fluencia, umbral de ionización, alrededor de 4%, se detectó únicamente el ion m/z 582, correspondiente al catión radical de Fv-OH. La masa nominal de Fv-OH es 582 Da.

Los cationes radicales con alta abundancia (generalmente iones pico de base, *base ion peak*) son comunes para oligómeros y polímeros de fenilvinileno⁶⁴. Usualmente en MALDI se obtienen iones debidos a transferencia protónica, $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$, por esta razón es interesante observar un catión radical como el ion principal del espectro para los fenilvinilenos estudiados.

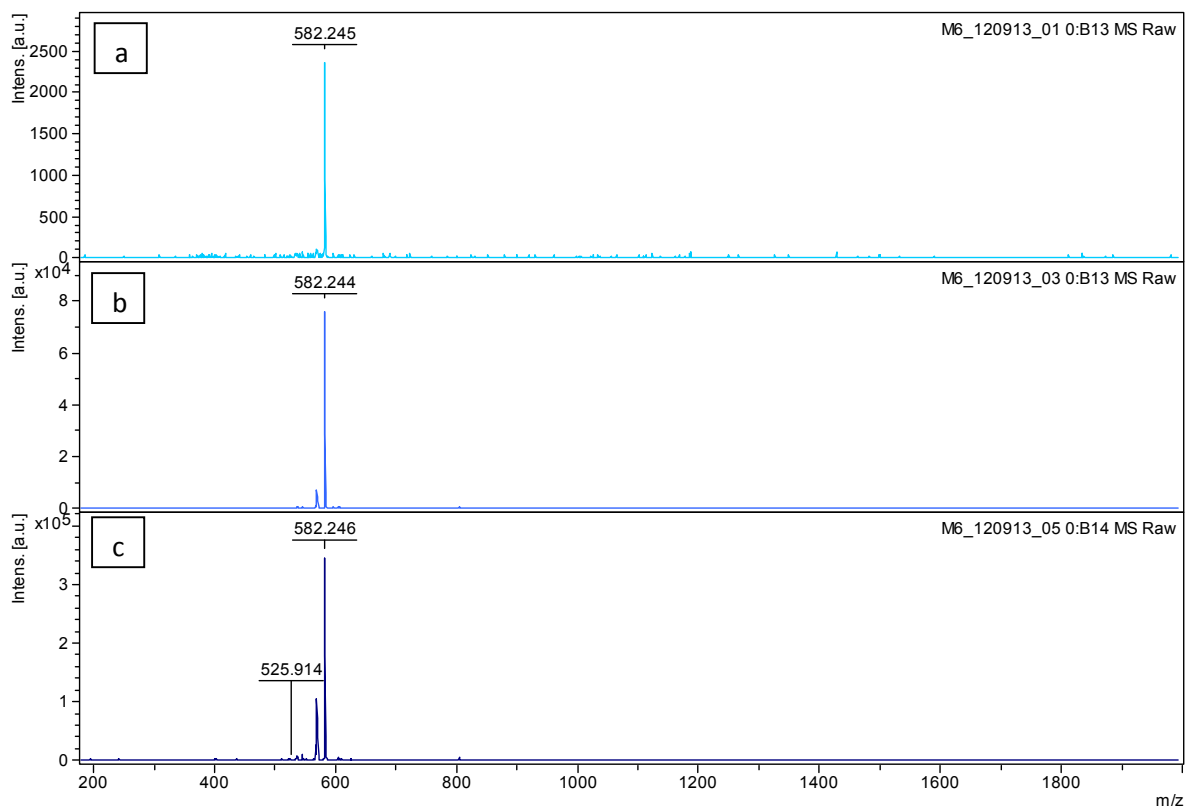


Figura 11. Espectros MALDI-MS de Fv-OH a diferentes fluencias de láser. (a) 5 % (b) 15 % (c) 25 %.

A medida que se aumenta la fluencia del láser, se incrementa tanto el número de señales en el espectro como la abundancia de éstas, tal como se muestra en las figuras 11b y 11c. Las señales que aparecen en el espectro a tales fluencias (> 25 %) de laser corresponden a fragmentos y aductos. Para algunas de las señales que aparecen en fluencias más altas del umbral de ionización se propusieron estructuras, ver tabla 5, que se ajustan a su composición elemental. Estas señales corresponden a fragmentos que pueden generarse por reacciones

uni o bi-moleculares en la *nube* (adaptación de la palabra inglesa '*plume*'). El número de reacciones y fragmentaciones en la nube aumenta con la fluencia del láser, debido a un aumento en la cantidad de energía depositada por unidad de área y a la desorción de una mayor cantidad de material.

Un acercamiento a la zona característica del ion molecular (m/z 582) permite observar el cambio en las proporciones de las relaciones isotópicas con el aumento del láser. A la fluencia más baja del láser, solo se observa el catión radical de la molécula junto con sus correspondientes picos isotópicos (M , 100%; $M+1$, 32%; $M+2$, 4.7%) como se observa en la figura 12, en completo acuerdo con el patrón calculado (M , 100%; $M+1$, 35%; $M+2$, 8%).

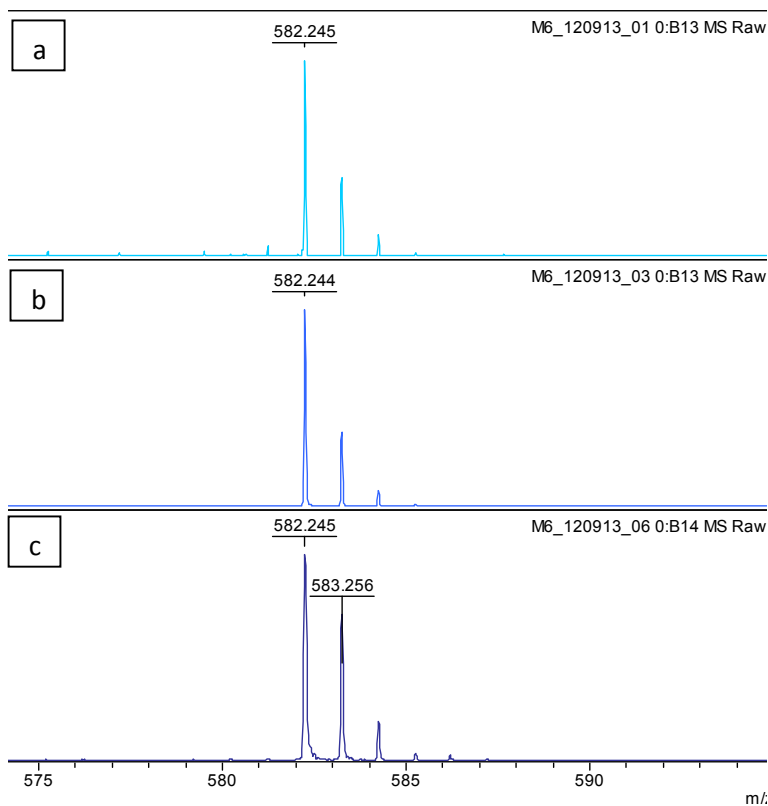


Figura 12. Acercamiento entre 575 – 600 Da en los espectros MALDI-MS de Fv-OH. Diferentes fluencias de láser: (a) 5%, (b) 15% y (c) 25%.

En las figuras 12b y 12c se observa como aumenta la abundancia de las señales isotópicas de M+1 y M+2 al incrementar la fluencia del láser. La abundancia relativa de M+1 con respecto a M es de alrededor de 80%, pero la contribución debida a ^{13}C es sólo 36%. Tal cambio en la contribución isotópica puede darse por dos motivos. Uno, en una nube más densa aumenta la protonación de la molécula debido a reacciones ion-molécula entre especies más energéticas. O, dos, ocurre una saturación porque se supera el rango lineal del detector, como se supone por la alta abundancia de las señales

Fv-Cl

El espectro de masas de la molécula Fv-Cl se muestra en la figura 13. A la fluencia umbral, 2%, se detectó la señal a m/z 410 que corresponde al catión radical de Fv-Cl. Con el aumento de la fluencia del láser se induce la fragmentación de los iones así como su abundancia. Las estructuras propuestas de algunos fragmentos y aductos formados a fluencias superiores al umbral de ionización se muestran en la tabla 5.

La molécula Fv-Cl presenta un patrón isotópico particular debido a la presencia de dos átomos de cloro en su estructura. En esta molécula confluyen diferentes probabilidades de distribución isotópica de los isótopos ^{35}Cl y ^{37}Cl . En la figura 14a se observa este patrón isotópico particular para el ion m/z 410. El patrón isotópico experimental (M, 100%; M+1, 32%; M+2, 74%; M+3, 23%; M+4, 12%; M+5, 4%) tiene una alta concordancia con el patrón isotópico calculado (M, 100%; M+1, 26.4%; M+2, 68.5%; M+3, 17.4%; M+4, 13%, M+5, 3%), para fluencias bajas de láser.

Al igual que ocurre con Fv-OH, en cuanto se incrementa la fluencia del láser, ocurre un aumento en las señales M+1 y superiores, que no corresponde con la contribución isotópica de la molécula. La molécula Fv-Cl no tiene obvios sitios donde pueda ocurrir la protonación, por lo cual se descarta el modelo propuesto de protonación en fase gaseosa por especies de alta energía. El aumento de las

señales se atribuye a saturación del detector. Resultados similares se han obtenido con 2,5-DHB⁴⁷ y con ditranol⁴³, ya que a pesar de que estas matrices poseen sitios obvios de protonación, en ocasiones se observan cationes radicales.

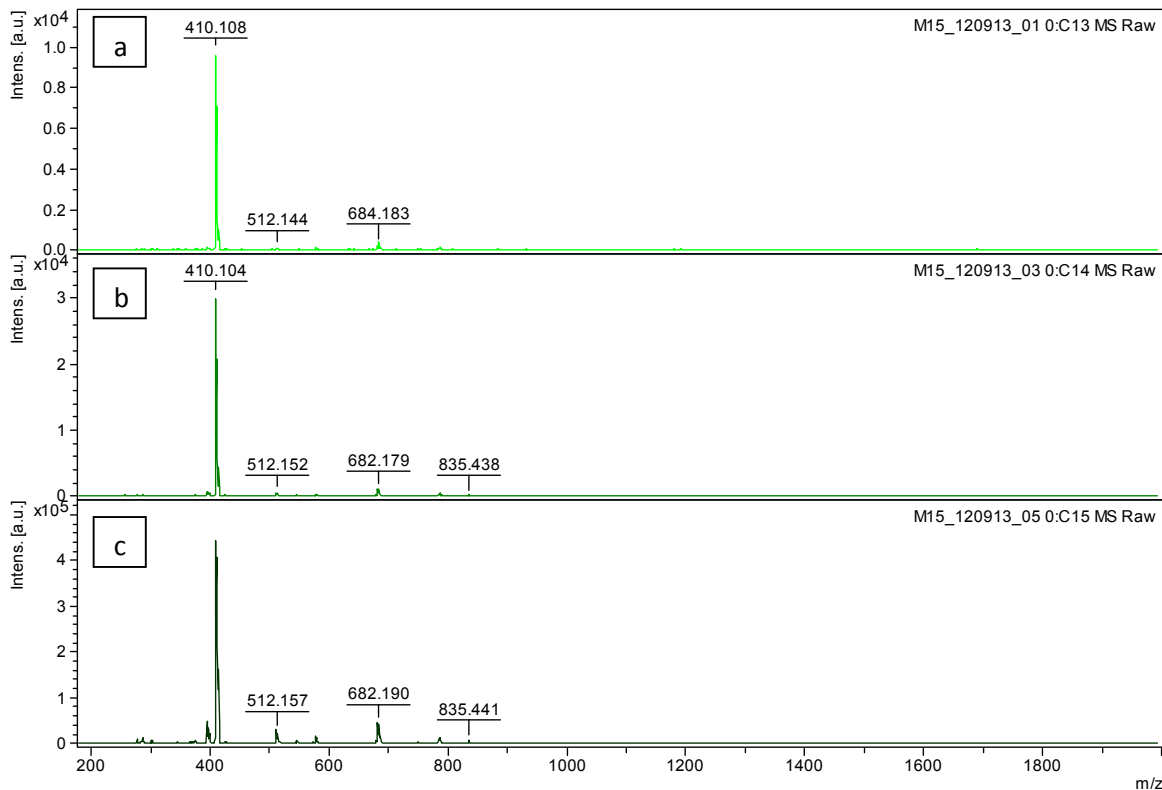


Figura 13. Espectros MALDI-MS de Fv-CI a diferentes fluencias de láser. (a) 10 % (b) 15 % (c) 25 %.

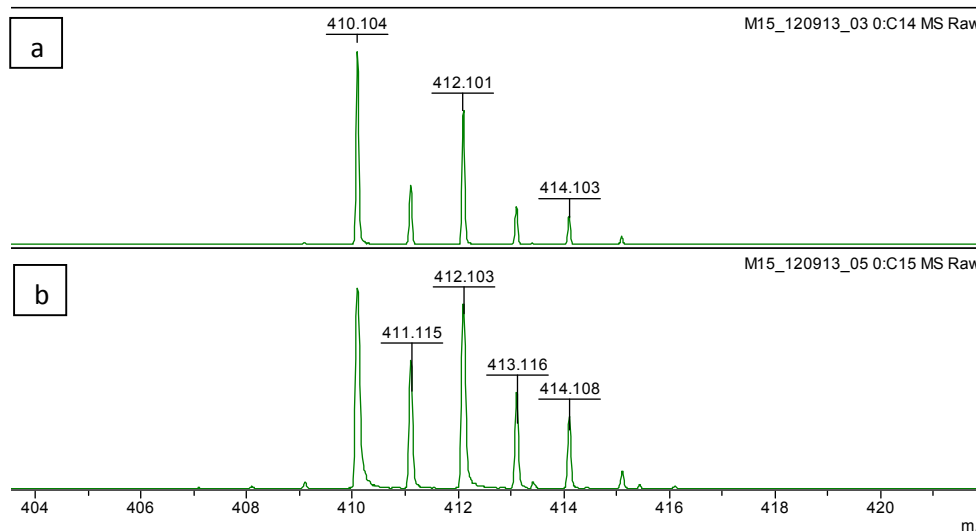


Figura 14. Acercamiento entre 404– 422 Da en los espectros MALDI-MS de Fv-CI. Diferentes fluencias de láser: (a) 10% y (b) 30%.

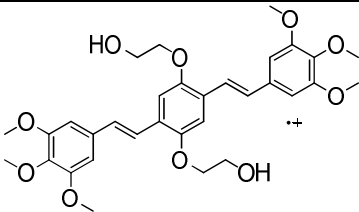
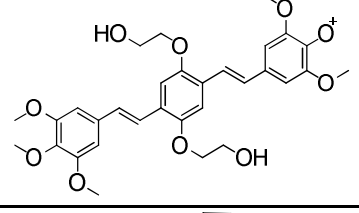
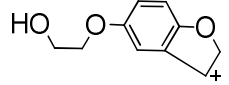
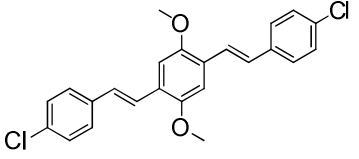
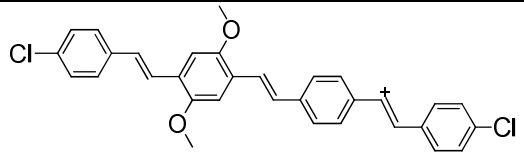
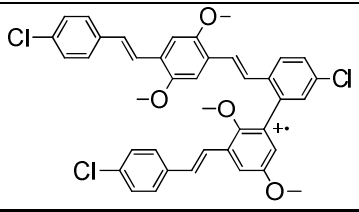
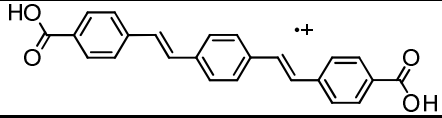
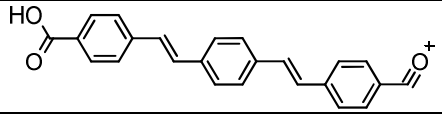
Muestra	m/z, Da	–	Estructura propuesta
Fv-OH	582	M ⁺	
	567	[M-CH ₃] ⁺	
	179	–	
Fv-Cl	410	M ⁺	
	512	[M+102] ⁺	
	682	[2M-138] ⁺	
Fv-COOH	370	M ⁺	
	353	[M-OH] ⁺	

Tabla 5. Estructuras de fragmentos y aductos de las matrices Fv-OH, Fv-Cl y Fv-COOH.

Fv-COOH

El espectro de masas en modo positivo para Fv-COOH se muestra en la figura 15. Se observa, como ion pico de base, al catión radical en m/z 370. Con el aumento de la fluencia del láser, se incrementa la abundancia de las señales. La fragmentación más típica de esta molécula corresponde a la pérdida de un radical hidroxilo, en m/z 355.

El espectro de masas en modo negativo, figura 16, es un poco más interesante, en cuanto se observa tanto el anión radical, m/z 370, como el ion cuasi-molecular deprotonado, m/z 369. Las abundancias de ambas señales son similares, incluso a bajas fluencias de láser, por lo que no son debidas ni a la saturación del detector ni a contribuciones isotópicas de m/z 369. La vida media del ion deprotonado es suficientemente larga para ser detectado, por ello esta molécula podría usarse para la ionización de péptidos por transferencia protónica en modo negativo, en donde los péptidos actúan transfiriendo un protón a la matriz y se cargan negativamente. Los procesos de ionización generan diferentes tipos de iones. Aquellos iones con tiempos de vida media relativamente largos son detectados, dependiendo de las condiciones del equipo, principalmente de la polaridad del voltaje de extracción. Se cree que el anión radical, se forma por intercambio electrónico entre dos moléculas de Fv-COOH excitadas, como ocurre entre PAHs⁶⁵ durante desorción/ionización láser.

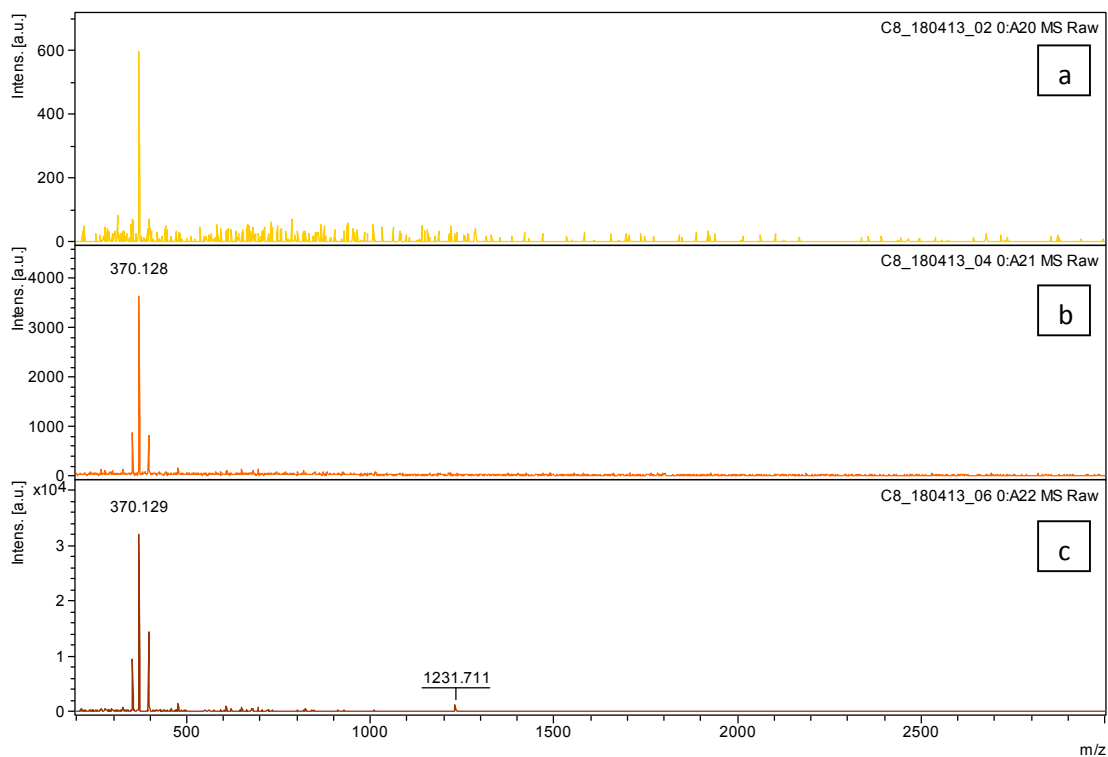


Figura 15. Espectros MALDI-MS en modo positivo de Fv-COOH a diferentes fluencias de láser. (a) 10%, (b) 20 % y (c) 30%.

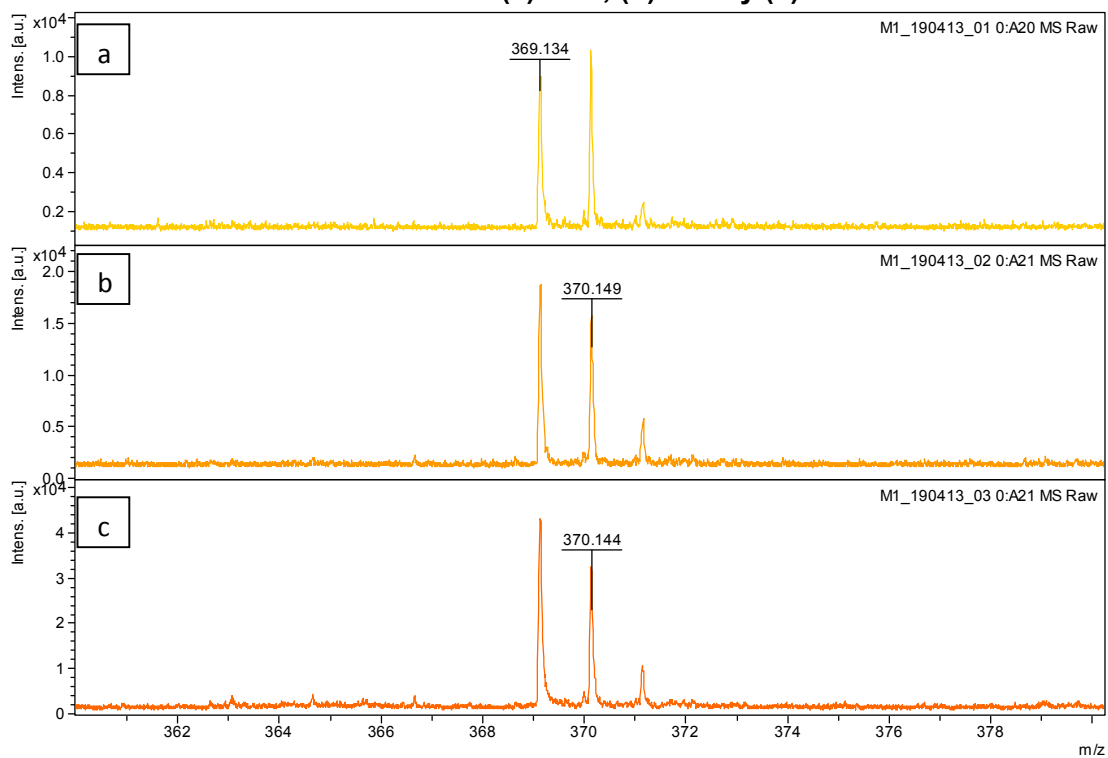


Figura 16. Espectros MALDI-MS en modo negativo de Fv-COOH a diferentes fluencias de láser. (a) 15%, (b) 20 % y (c) 25%.

3.3 Efecto de la técnica de preparación de la muestra

Las muestras preparadas por DD muestran cristales de gran tamaño, distribuidas al azar en el *spot*, probablemente debido al movimiento de cristales primarios (efectos Marangoni) durante la cristalización. Tanto las muestras preparadas por DD y SM son gruesas, al contrario de las muestras delgadas que se obtienen por TL. No hay variaciones en cuanto al número de señales que se obtienen para diferentes técnicas.

En la técnica TL, debido a la formación de *mini*-cristales por la rápida evaporación de solvente, se obtuvo una distribución más uniforme de analito en el *spot* y se invirtió menos tiempo en la búsqueda de señales intensas, los llamados "*puntos dulces*". Adicionalmente, la técnica TL es mucho más versátil que las demás, ya que no requiere que la matriz y el analito sean solubles en el mismo solvente.

En la gráfica 17 se observan los espectros de masas obtenidos con cada matriz en los experimentos de ionización, para la técnica TL a fluencia del láser de 20%. En la figura 17c, donde se usa la matriz de referencia CHCA, se pueden observar las señales características de la mezcla de péptidos. Éstas se observan en la región superior a los 1000 Da y corresponden a la mezcla de péptidos empleada como analito. En los experimentos con las matrices Fv-OH y Fv-Cl no se evidenció ninguna señal referente a los péptidos estudiados.

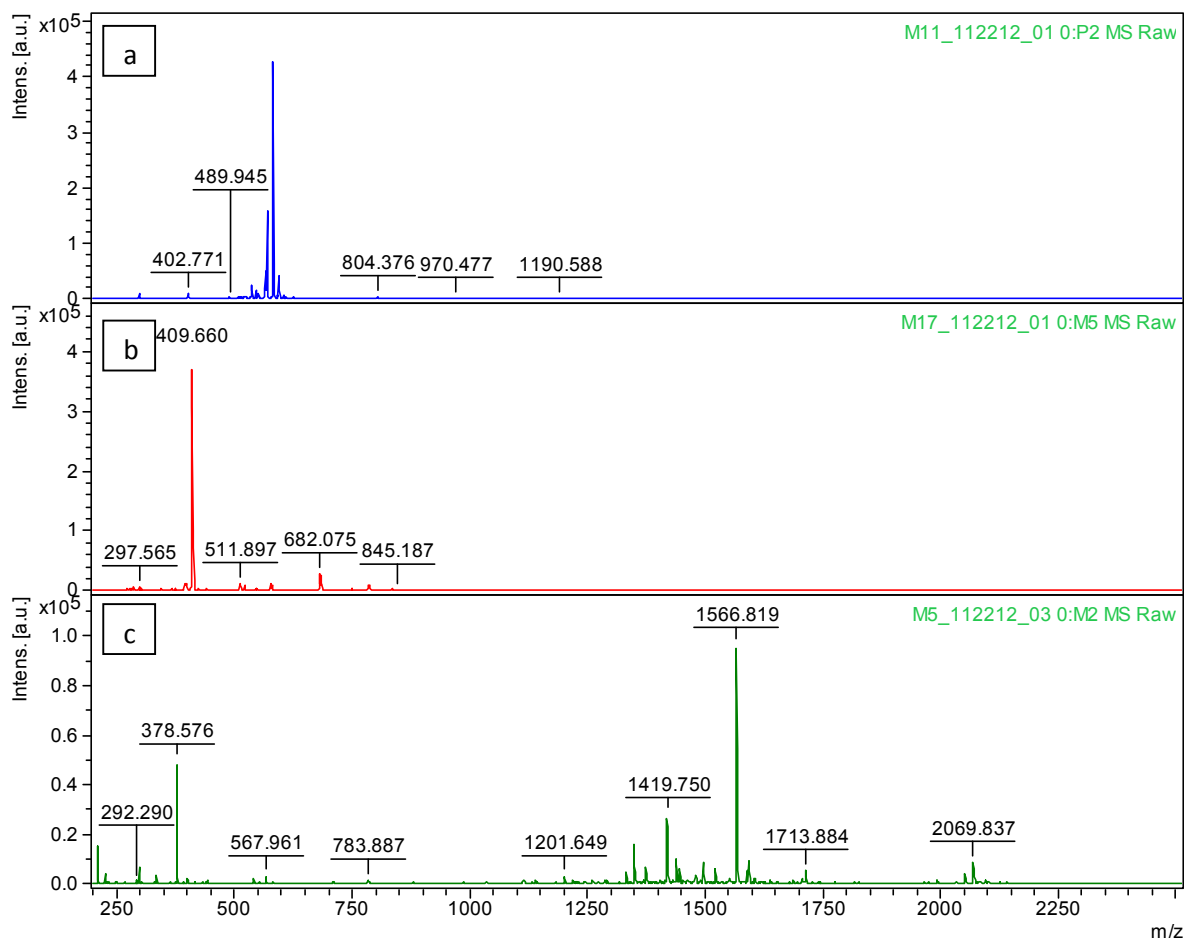


Figura 17. Espectros MALDI-MS de una solución de péptidos sintéticos con diferentes matrices usando la técnica TL a 25% de fluencia de láser. (a) CHCA, (b) Fv-OH and (c) Fv-Cl.

La ausencia de las señales de los péptidos se puede atribuir a varias razones. Principalmente, si no hay formación de un aducto matriz-protón será menos probable la formación de un aducto analito-protón. Se ha determinado que la mayoría de las matrices MALDI actúa tomando un protón del medio, incluyéndolo en su estructura. Este aducto matriz-protón es altamente ácido y tiene una afinidad protónica muy baja, y, por lo tanto, puede donar eficientemente un protón al péptido o a la proteína que se quiera ionizar. El hecho de que no se observen aductos matriz-protón indica que no se está cumpliendo el requerimiento de formar esta especie altamente reactiva, y, por lo tanto, no se llevará a cabo un proceso de transferencia protónica.

En los péptidos es menos probable que ocurra la transferencia electrónica de los analitos a la matriz para generar un catión radical del péptido. Para que ocurra este proceso, es necesario que los potenciales de ionización, PIs, de los péptidos sean menores que el PI de las matrices. Los PIs de los péptidos son usualmente muy altos para ser alcanzados con la fluencia del láser usual en la técnica MALDI. La longitud de absorción de un enlace peptídico está en el rango 190-230 nm⁶⁶. La formación de un catión radical es un proceso de alto costo energético, y la deslocalización de la carga no es tan efectiva, debido a la estructura saturada del *backbone* peptídico. El triptófano, debido al indol en su cadena lateral, es el único aminoácido esencial con un potencial de ionización de 7.2 eV, el cual es menor que el de una matriz convencional, como el DHB^{67,68}. En consecuencia no se esperan señales que correspondan a cationes radicales de péptidos, productos de transferencia electrónica de la matriz al péptido.

Con respecto al comportamiento de la resolución de las señales más intensas obtenidas con cada matriz, la dependencia de la fluencia del láser se observa en la figura 18. Con todas las técnicas de preparación de muestra especificados (TL, DD, SM) se obtuvieron altas resoluciones (del orden de $10^3 - 10^4$), debido al uso del analizador de tiempo de vuelo en modo reflectrón. Adicionalmente, se puede observar cómo la resolución de las señales disminuye con el aumento de la fluencia del láser, esta disminución en la resolución se debe principalmente al aumento del ancho de la señal, de acuerdo con lo reportado por Ingendoh⁶⁹. Todas las técnicas mostraron buenos resultados en cuanto a la abundancia de las señales que se producen a bajas fluencias del láser. El efecto de desorción se incrementa a altas fluencias del láser y gran cantidad de moléculas son desorbidas, lo que causa un efecto superficial en la resolución temporal, es decir, algunos iones pueden retardarse y eso causa que el pico se ensanche y haya un detrimento significativo en la resolución. Este efecto se ve reflejado también en la disminución de la relación señal-ruido (S/N ratio) a altas fluencias de láser para las señales de la matriz (figura 19a y 19b), por aumento en el ruido químico generado

por el láser. Debido a la rápida cristalización de la matriz mediante la técnica TL es posible aumentar la reproducibilidad *intra-spot* respecto a los demás métodos. La alta reproducibilidad causa una reducción en el tiempo de búsqueda de puntos dulces (*sweet spots*) en comparación con DD y SM.

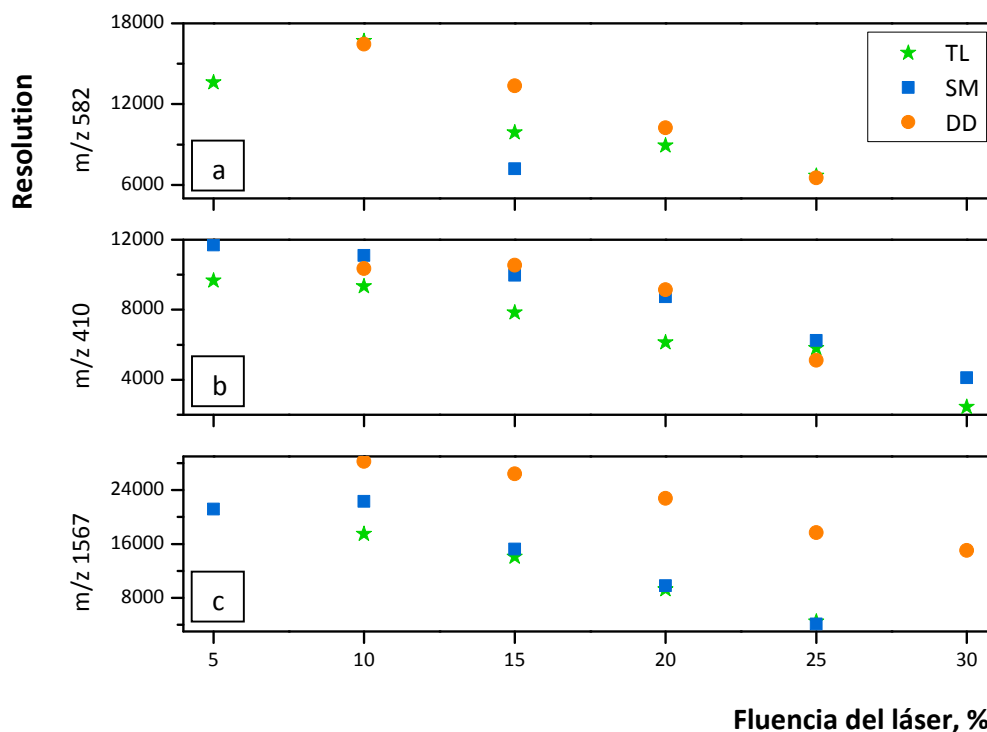


Figura 18. Efecto de la fluencia del láser en la resolución de las señales más intensas de la figura 17. (a) Fv-OH, (b) Fv-Cl y (c) un péptido usando CHCA.

Debido a la rápida cristalización de la matriz mediante la técnica TL es posible aumentar la reproducibilidad *intra-spot* respecto a los demás métodos. La alta reproducibilidad causa una reducción en el tiempo de búsqueda de puntos dulces (*sweet spots*) en comparación con DD y SM.

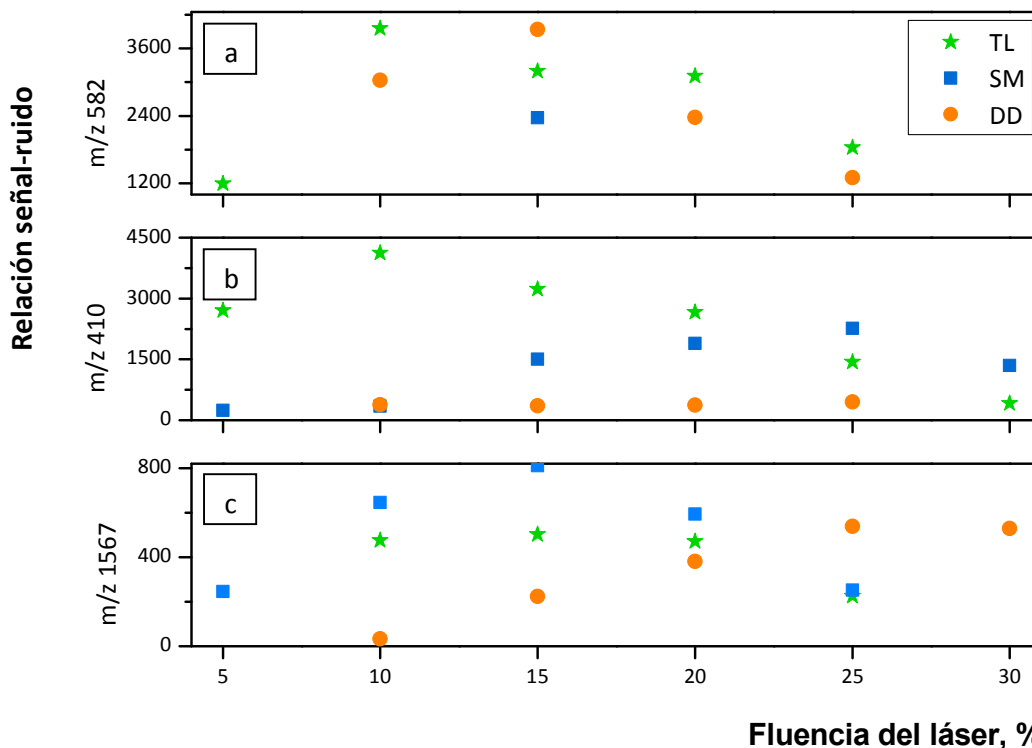


Figure 19. Efecto de la fluencia del láser en la relación señal–ruido para las señales más intensas de la figura 17. (a) Fv–OH, (b) Fv–Cl y (c) un péptido usando CHCA.

3.4 Efecto de la protonación y cationización

A pesar de que el Fv–OH no mostró protonación en el grupo hidroxilo en condiciones normales, se intentó realizar la protonación del oxígeno del hidroxilo en condiciones ácidas fuertes, usando: ácido trifluoroacético, ácido fórmico y ácido acético, en diferentes concentraciones según se especificó en la sección ‘Metodología’. También se intentó cationizar el grupo hidroxilo con diversos cationes metálicos.

Los espectros de masas obtenidos en los experimentos de acidificación de la matriz Fv–OH son idénticos a los espectros de las muestras en que se agregó una cantidad mínima de ácido. Tampoco se observan diferencias significativas entre los espectros con los diferentes ácidos y concentraciones empleadas, ver figura 20. Se observa que únicamente en condiciones ácidas *extremas* (para MALDI), como en el caso de usar ácido acético al 60%, figura 20f, la contribución que hay

sobre la señal en m/z 583 es mínima. Utilizar una cantidad tan grande de ácido para protonar levemente al Fv-OH acarrearía problemas para el análisis de moléculas de interés biológico.

En el caso del CHCA, ver figura 21, la fragmentación de los péptidos se incrementa cuando se aumenta la acidez del ácido añadido (los valores de pKa de los ácidos TFA, FA y ácido acético son 0.23, 3.77 y 4.76, respectivamente). Al parecer, la alta concentración de ácido induce la hidrólisis ácida de los péptidos antes de la evaporación del solvente. Se observa un leve incremento en la abundancia de algunas señales al usar concentraciones altas de ácido debido al mayor número de iones pre-formados en fase condensada. La desorción de iones pre-formados es otro de los mecanismos de obtención de señales.

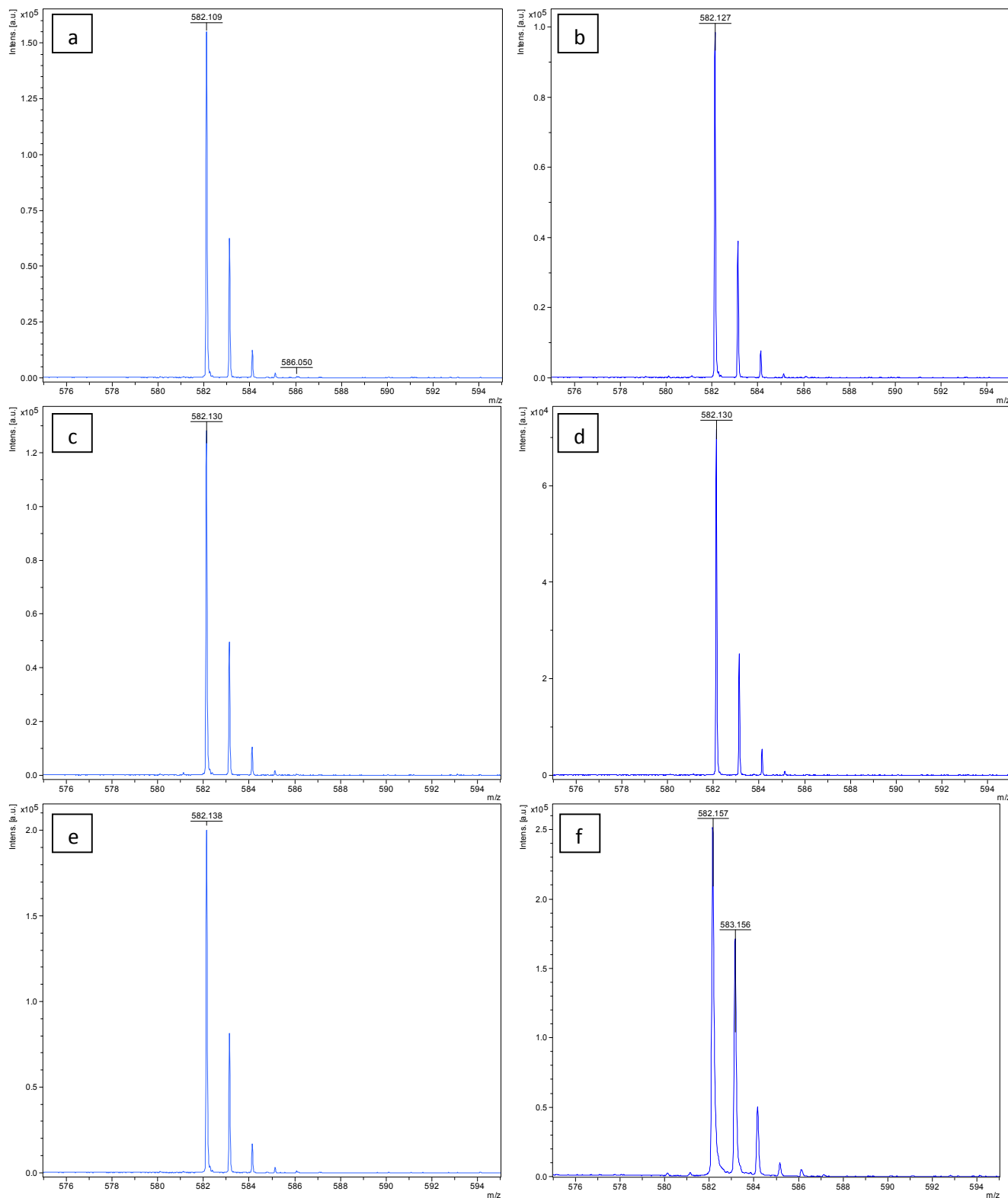


Figura 20. Espectros MALDI-MS de Fv-OH con diferentes cantidades de ácido. (a) TFA 5%, (b) TFA 10%, (c) FA 10%, (d) FA 30%, (e) HAc 30% y (f) HAc 60%.

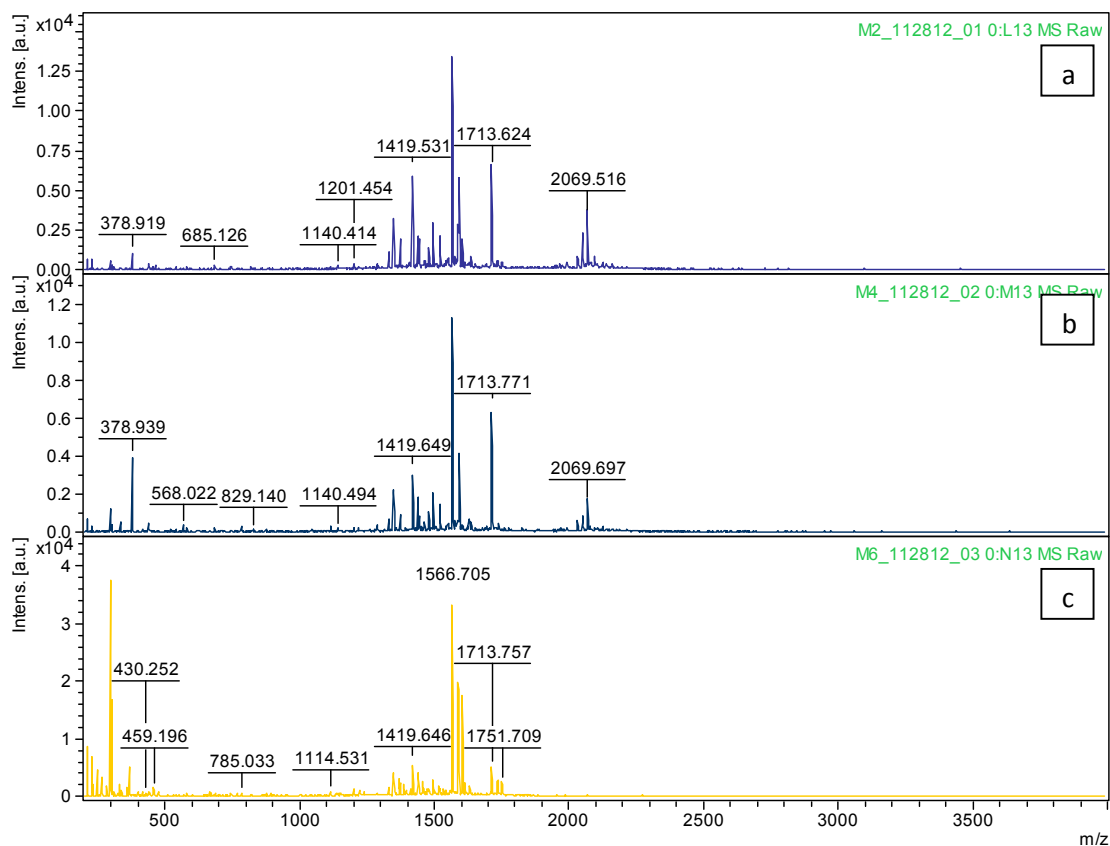


Figura 21. Espectros MALDI-MS de péptidos con diferentes ácidos usando CHCA como matriz. Fluencia de láser a 25%. (a) TFA (b) FA (c) ácido acético.

No hay incremento en la abundancia de la señal M+1 para Fv-OH a bajas fluencias, sin importar la cantidad de ácido que se agregue. Sin embargo, se sigue observando incremento de la abundancia de las señales isotópicas cuando se incrementa la fluencia del láser, ver figura 22. En la figura 22a se puede observar el patrón isotópico calculado del catión radical en color gris, y el patrón isotópico experimental en líneas para una fluencia de láser de 25%, donde aún se ve un buen acuerdo. En la figura 22b, se observa la deformación de la señal del catión radical para altísimas abundancias de la señal (alrededor de 10⁵), cuando se usó una fluencia del láser de 50%. También se puede observar la composición isotópica calculada de color naranja y la composición isotópica obtenida experimentalmente en líneas. Es obvia la incongruencia entre el patrón isotópico calculado con el experimental para altas fluencias de láser. Con este resultado se

descarta definitivamente la formación de iones cuasi-moleculares protonados por reacciones bimoleculares a altas fluencias de láser.

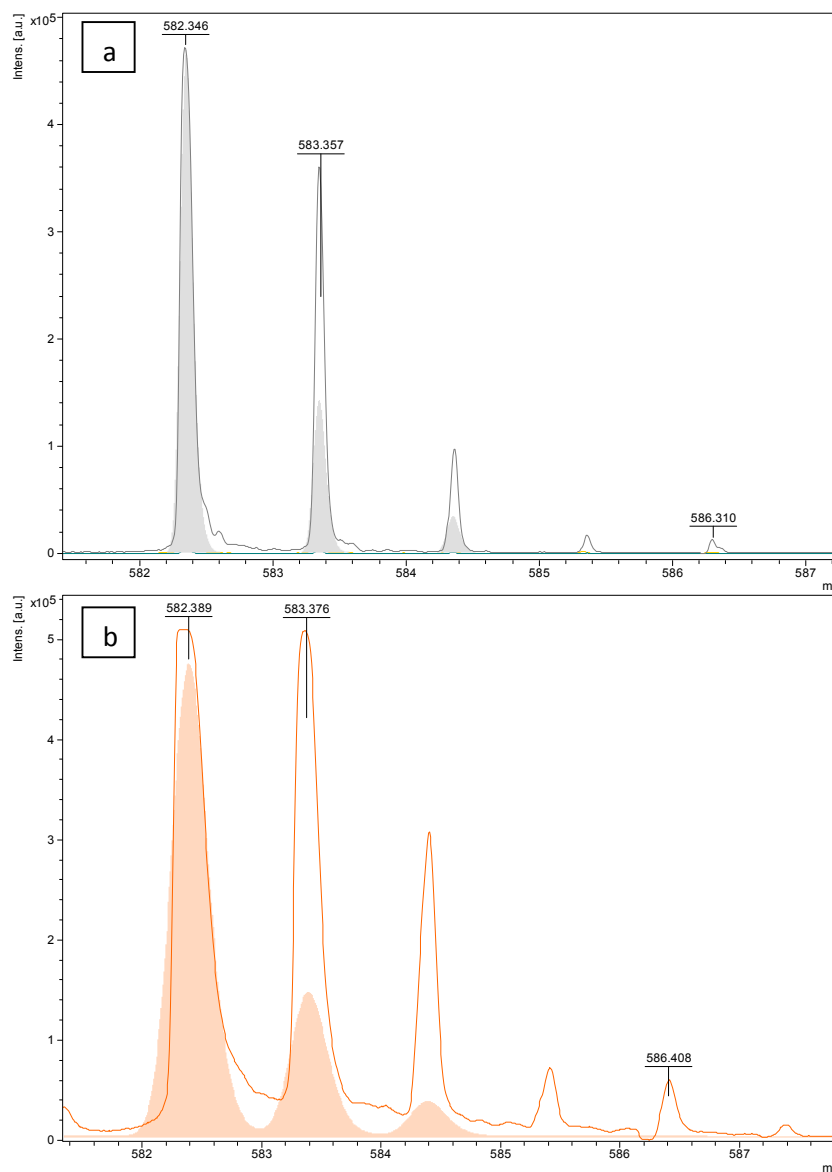


Figura 22. Efecto de la fluencia del láser en la contribución isotópica del catión radical de Fv-OH. Fluencia del láser (a) 25% (b) 50%.

Con las matrices de fenilenvinileno no se observó ningún ión correspondiente a la adición de un catión metálico a la estructura, sin importar el método de preparación de la muestra empleado ni la especie iónica utilizada. En la figura 23 se observan los espectros de masas del Fv-OH junto con los péptidos usando

diferentes sales. En la figura 24, se muestran los espectros de masas para Fv–Cl, en los que tampoco se observaron aductos con cationes. Sin importar el catión utilizado, no fue posible obtener ninguna señal de los péptidos modelos con ningún método de preparación de la muestra.

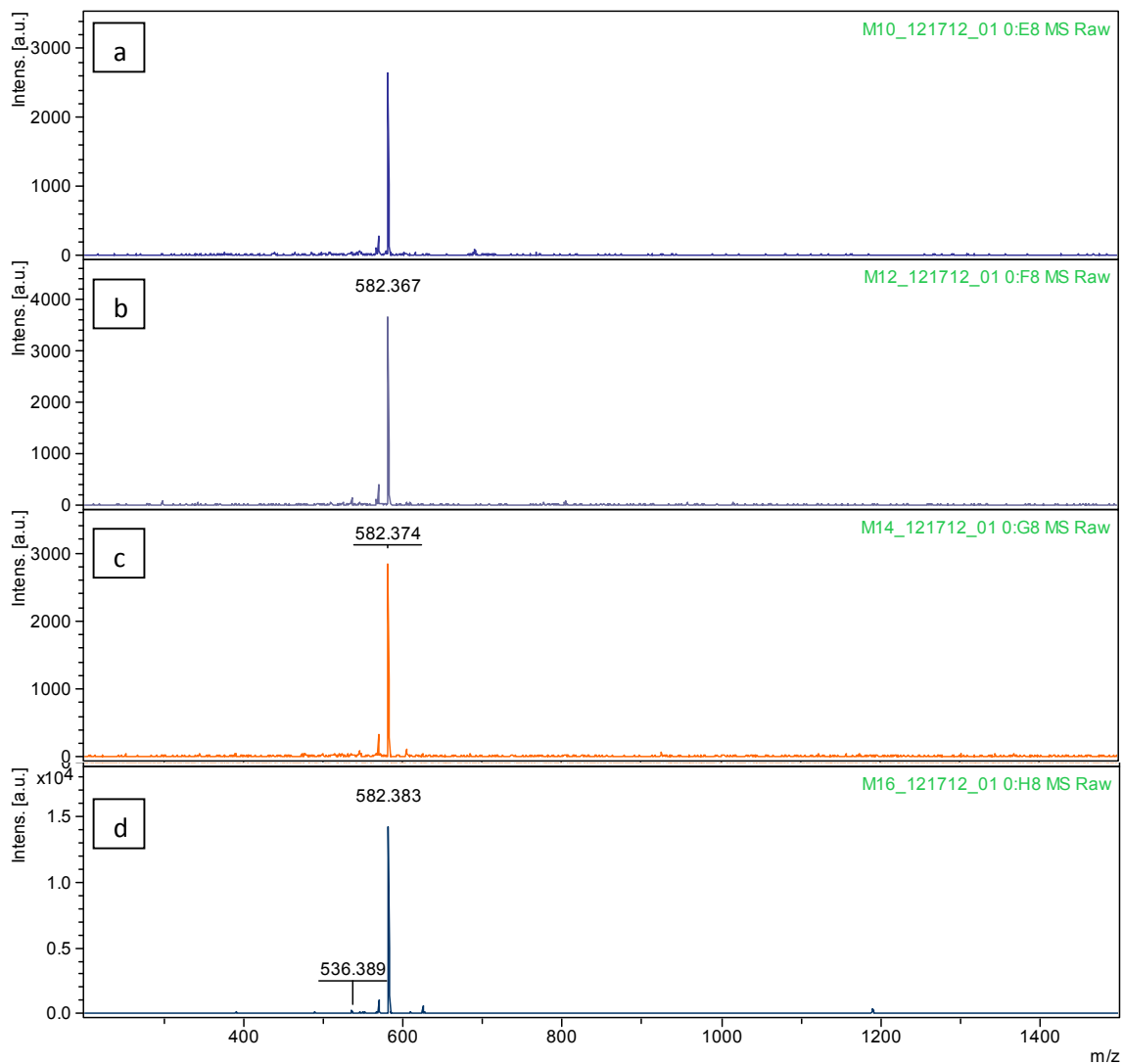


Figura 23. Espectro MALDI-MS de ‘péptidos’ usando Fv–OH como matriz y diferentes agentes cationizantes. (a) AgBF₄, (b) LiOH, (c) Na₂C₂O₄ y (d) KCl. Modo positivo.

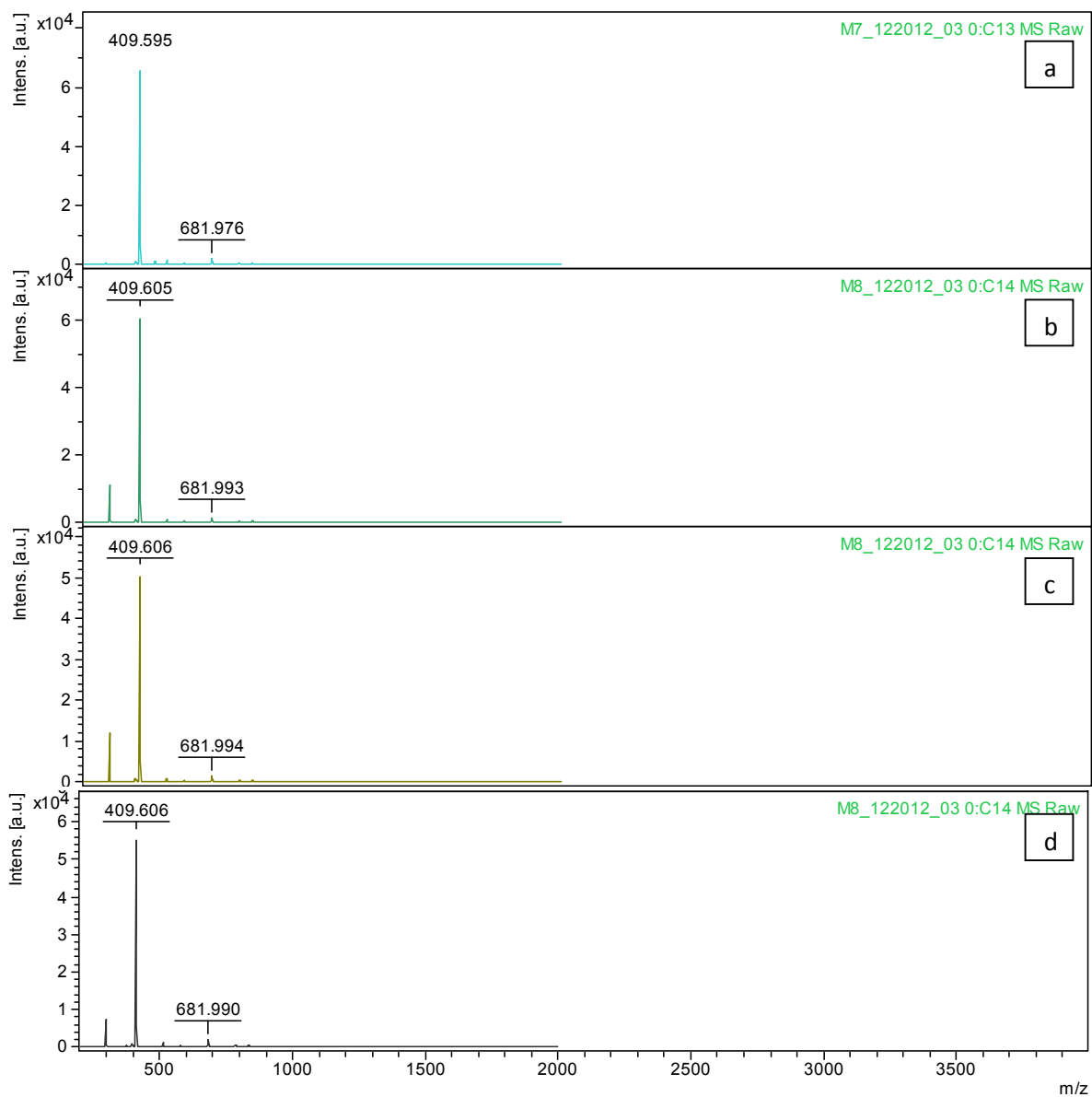


Figura 24. Espectro MALDI-MS de 'péptidos' usando Fv-Cl como matriz y diferentes agentes cationizantes. (a) AgBF₄, (b) LiOH, (c) Na₂C₂O₄ y (d) KCl.

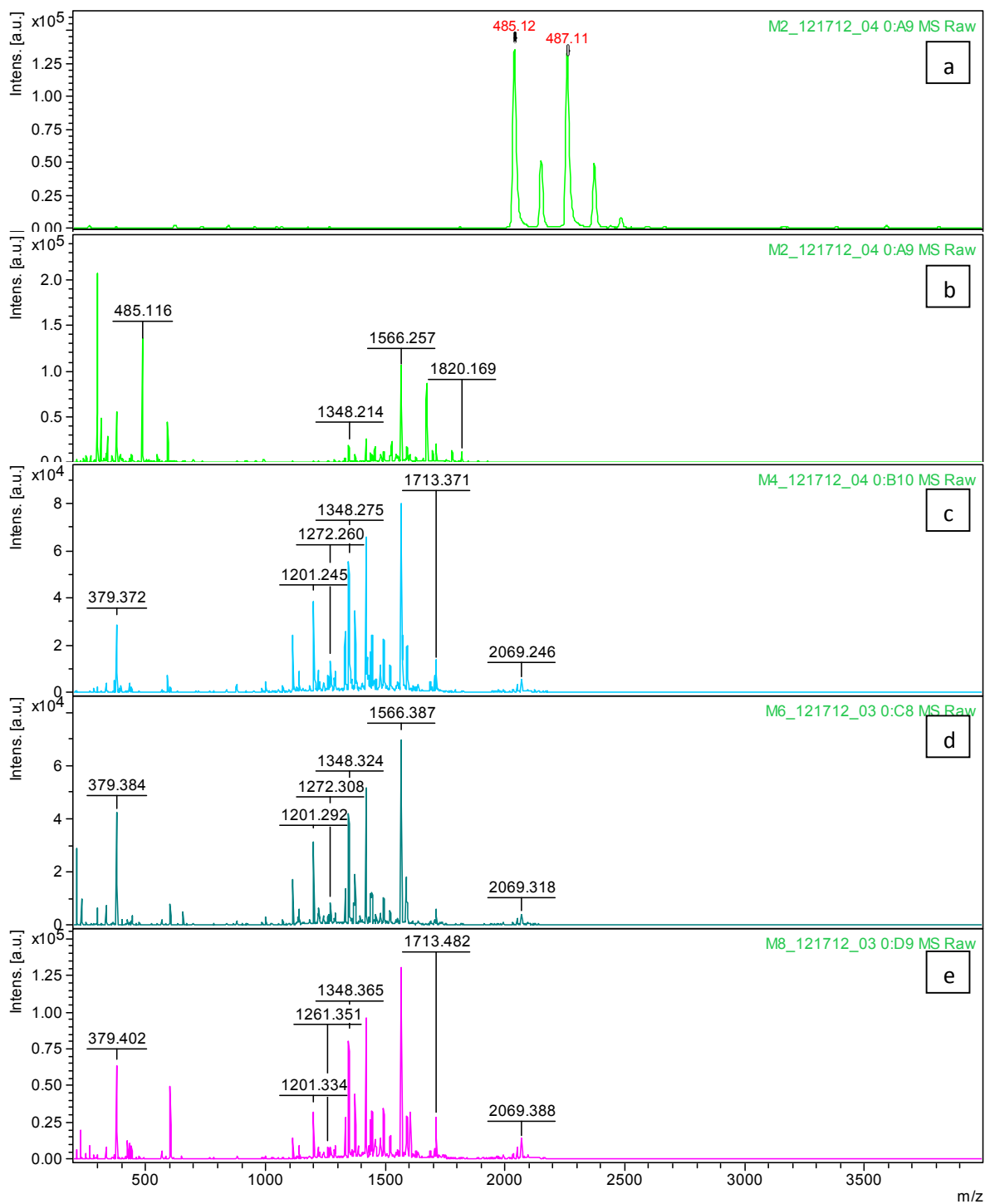


Figura 25. Espectro MALDI-MS de péptidos usando CHCA como matriz y diferentes agentes cationizantes. (a) Aducto de plata (b) AgBF_4 , (c) LiOH , (d) $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ y (e) KCl .

Con CHCA fue posible obtener un aducto de plata, $[2M+\text{Ag}]^+$, cuando se empleó AgBF_4 . Las señales a m/z 485 y m/z 487 corresponden al aducto $[2M+\text{Ag}]^+$ y

tienen relación de abundancias 1:1 aproximadamente, debida a la contribución isotópica de la plata, ver figura 25a. Sin embargo, no se observaron aductos de CHCA con otros cationes, ni aductos analito-cación, como se observa en las figuras 25b-e.

3.5 Ionización de compuestos policíclicos aromáticos

Debido a que las matrices Fv-OH y Fv-Cl no mostraron la capacidad de ionizar péptidos y proteínas, por mecanismos de transferencia protónica, se procedió a probar las moléculas de Fv en la ionización de compuestos policíclicos aromáticos, los cuales se ionizan por transferencia electrónica, mayoritariamente. Los experimentos de control con las terpiridinas mostraron que éstas pueden formar iones sin necesidad de matriz adicional, pero su umbral de ionización está por encima del 30% de fluencia de láser. Además, como se observa en sus espectros de masas, figura 26, se generan primordialmente fragmentos y aductos. La fragmentación de analitos es un rasgo común para moléculas con múltiples anillos aromáticos, cuando no se agrega matriz. Al igual que lo observado por Juhasz⁴³, el uso de matriz es necesario para la desorción eficiente de los analitos y para evitar su excesiva fragmentación.

Se pueden distinguir en la figura 26 a los iones cuasi-moleculares protonados de TPY-Br, en m/z 388 y m/z 390, correspondientes al ion mono-isotópico, con ⁷⁹Br, y la contribución isotópica de ⁸¹Br, respectivamente. En las figura 26b y 26c, no se observan con abundancia significativa los iones cuasi-moleculares protonados de TPY-Me y TPY-OMe, en m/z 324 y m/z 340, respectivamente; pero los aductos con sodio son los iones pico-de-base, en m/z 346 y m/z 362, respectivamente. Iones ubicuos como sodio o potasio son encontrados generalmente en MS sin que hayan sido añadidos intencionalmente.

Los espectros MS de las terpiridinas con CHCA como matriz se muestran en la figura 27. En todos ellos se observan los iones cuasi-moleculares protonados

como iones pico-de-base. Para las terpiridinas TPY–Me y TPY–OMe se observan también aductos con sodio.

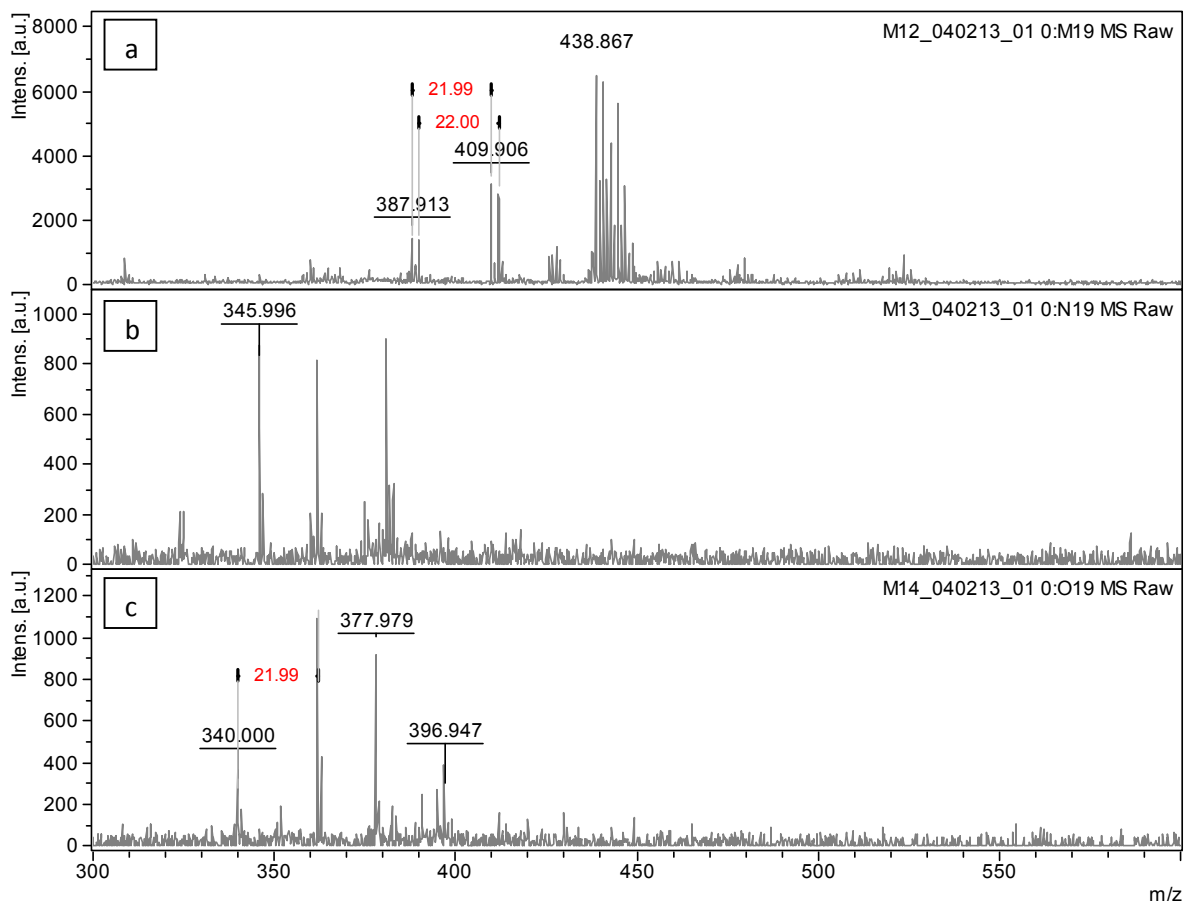


Figura 26. Espectro MALDI-MS de terpiridinas sin ningún aditivo. (a) TPY–Br, (b) TPY–Me y (c) TPY–OMe.

Se observaron los iones cuasi-moleculares protonados de las terpiridinas usando Fv–OH y Fv–Cl como matrices, ver figuras 28 y 29. Es mucho más probable que la protonación ocurra entre moléculas de terpiridinas, dada su alta concentración en el *spot*, o por abstracción de un protón del solvente. Además, porque se observó que el Fv–OH no pudo ser protonado al agregar distintas cantidades de ácido. La matriz, en cambio, actúa como un buen agente desorbente, disminuyendo la fluencia umbral de ionización de 30% (terpiridinas sin matriz) a 10% con las matrices de fenilenvinileno. La desorción de las moléculas de

terpiridina se puede dar por vía térmica, durante la relajación no-radiativa de los fenilenvinilenos.

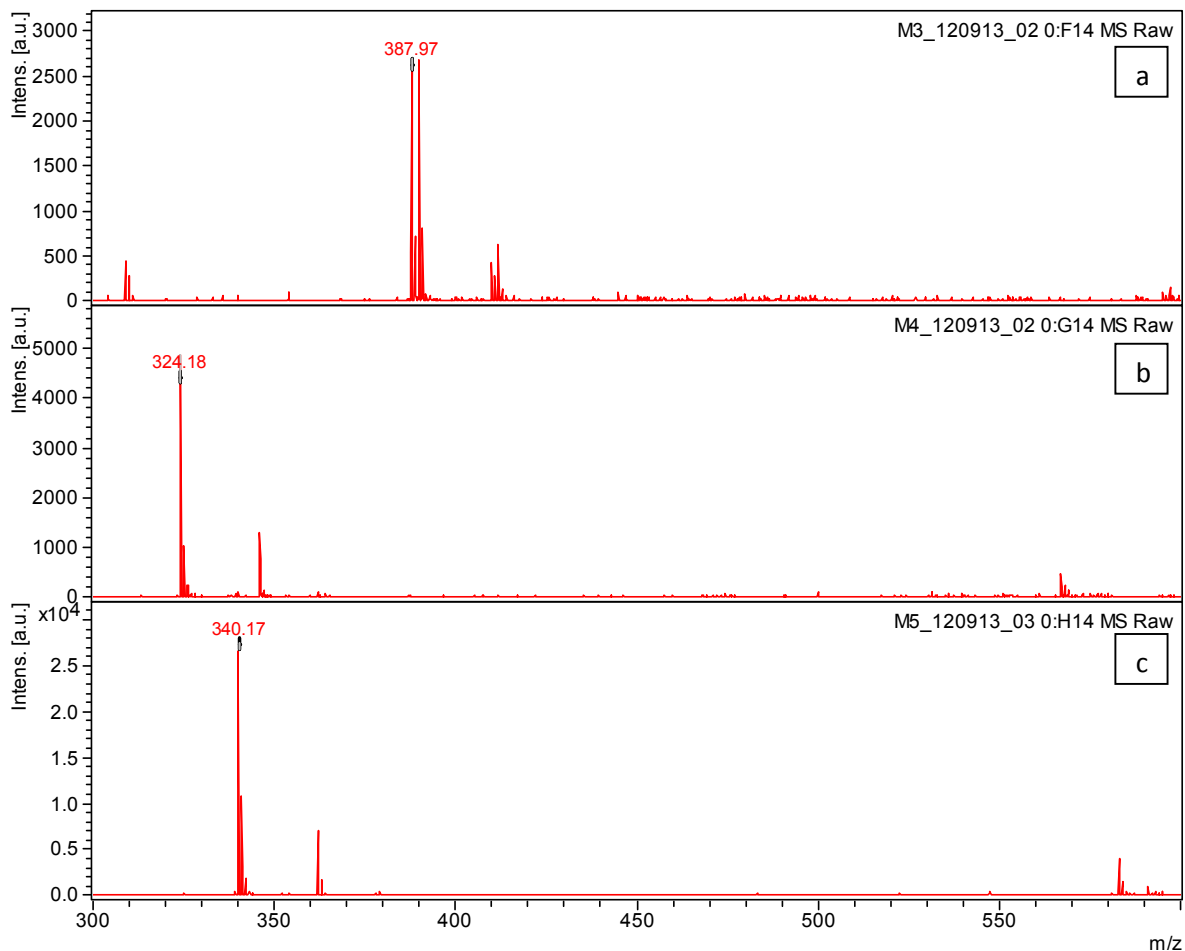


Figura 27. Espectros MALDI-MS de terpiridinas usando CHCA como matriz. (a) TPY-Br, (b) TPY-Me y (c) TPY-OMe. Fluencia de láser a 20%.

La relación matriz-analito empleada para las terpiridinas se encontraba alrededor de 100:1, dentro del rango de trabajo de moléculas orgánicas con estructuras similares⁵⁰. Los analitos que no absorben resonantemente la radiación del láser, como péptidos o carbohidratos, requieren una relación matriz-analito mayor. No se logra observar el efecto de supresión de matriz (MSE) que ocurre a altas concentraciones de analito, tanto para ionización protónica⁷⁰ como para ionización electrónica⁷¹. El aumento de la abundancia de las señales de analito se logró con

un aumento de la fluencia de láser, a expensas de mucho ruido químico por la fragmentación de la matriz, estos resultados no se muestran.

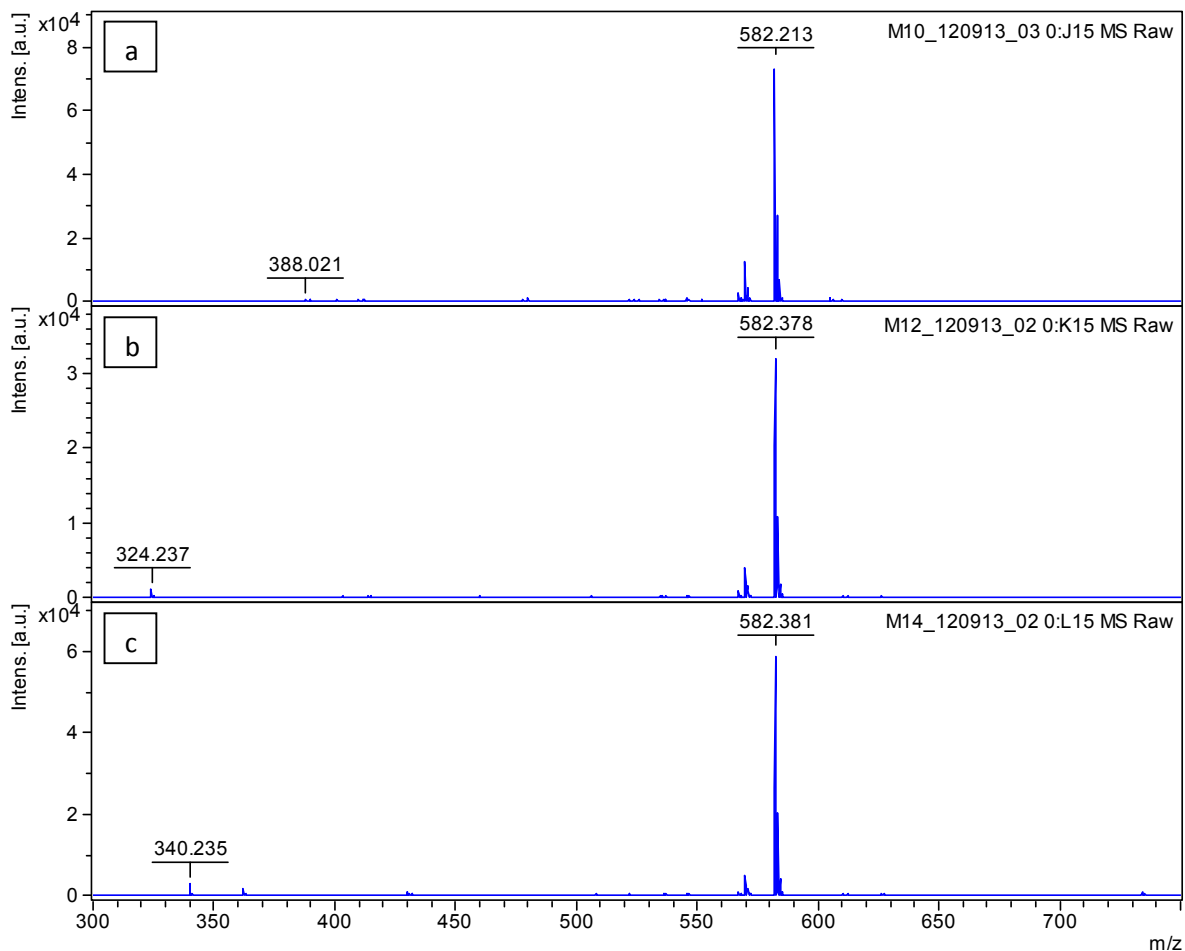


Figura 28. Espectros MALDI-MS de terpiridinas usando Fv-OH como matriz. (a) TPY-Br, (b) TPY-Me y (c) TPY-OMe. Fluencia de láser a 20%.

En la figura 30 se muestra un acercamiento al rango de masas en el que está el ion cuasi-molecular protonado de cada terpiridina con cada matriz empleada. La molécula Fv-Cl tuvo un desempeño superior al de la matriz de referencia con TPY-Br, y comparable con las otras terpiridinas, TPY-Me y TPY-OMe. Por otra parte, con la matriz Fv-OH se observaron las señales características de las terpiridinas, sin embargo, el Fv-OH no mostró un mejoramiento en las señales de estos analitos.

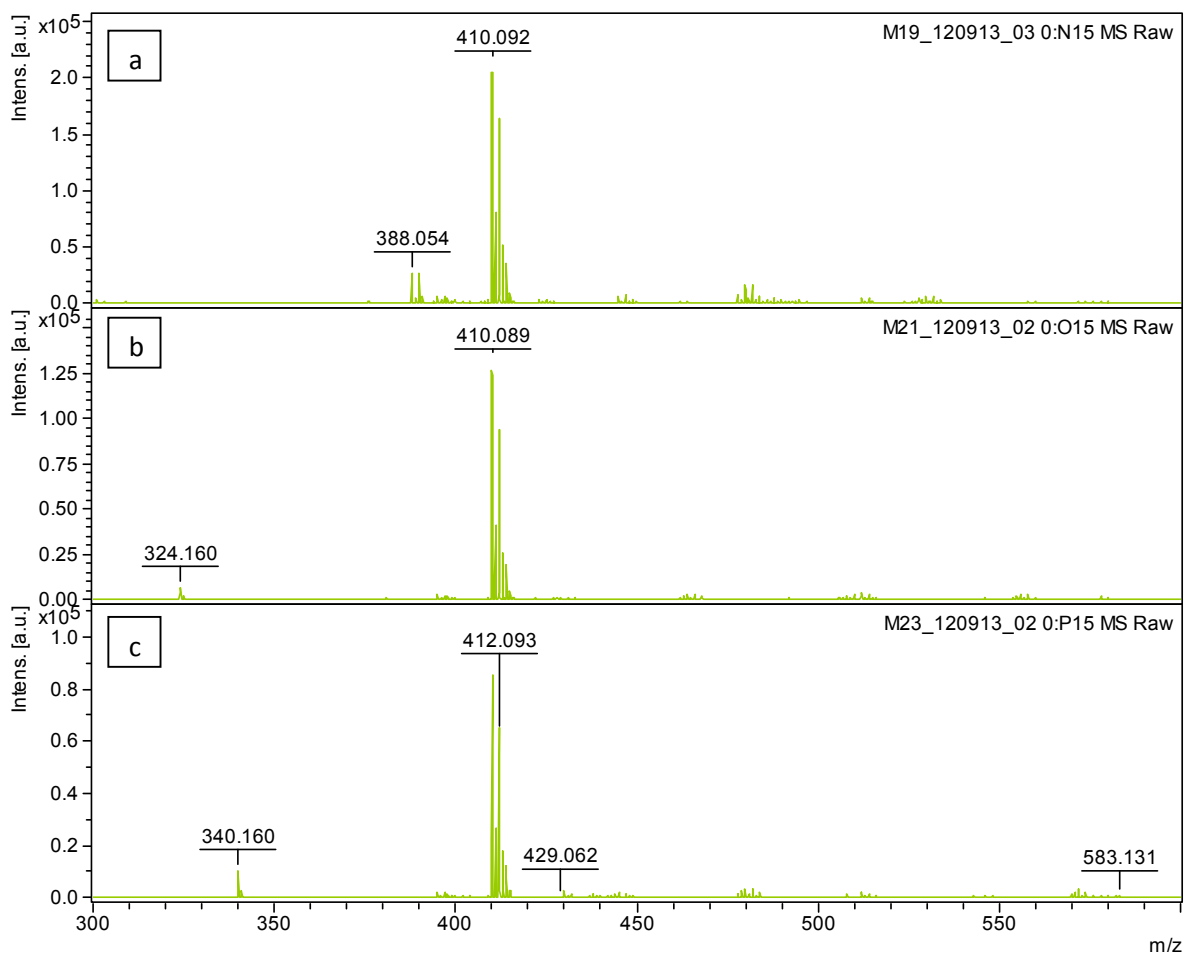


Figura 29. Espectros MALDI-MS de terpiridinas usando Fv-Cl como matriz. (a) TPY-Br, (b)TPY-Me y (c) TPY-OMe. Fluencia de láser a 20%.

El interés en el estudio de los hidrocarburos aromáticos condensados, PAHs, se concentra en su efecto adverso para la salud humana y en su carácter de contaminantes ambientales atmosféricos. Su comportamiento físico, espectroscópico y foto-físico se ha estudiado intensivamente para los compuestos más livianos⁵⁵. Debido a su estructura aromática conjugada, estos compuestos absorben luz ultravioleta, y, por tanto, pueden ser ionizados sin necesidad de matriz adicional, pero algunos de ellos pueden ser foto-disociados⁷². Por ello, se comparó la ionización de una mezcla de PAHs con diferentes matrices. En la figura 31 se muestran los espectros de masas de una mezcla estándar de PAHs

empleando diferentes matrices. Se señalan las señales correspondientes a los PAHs en el rango 228–278 Da.

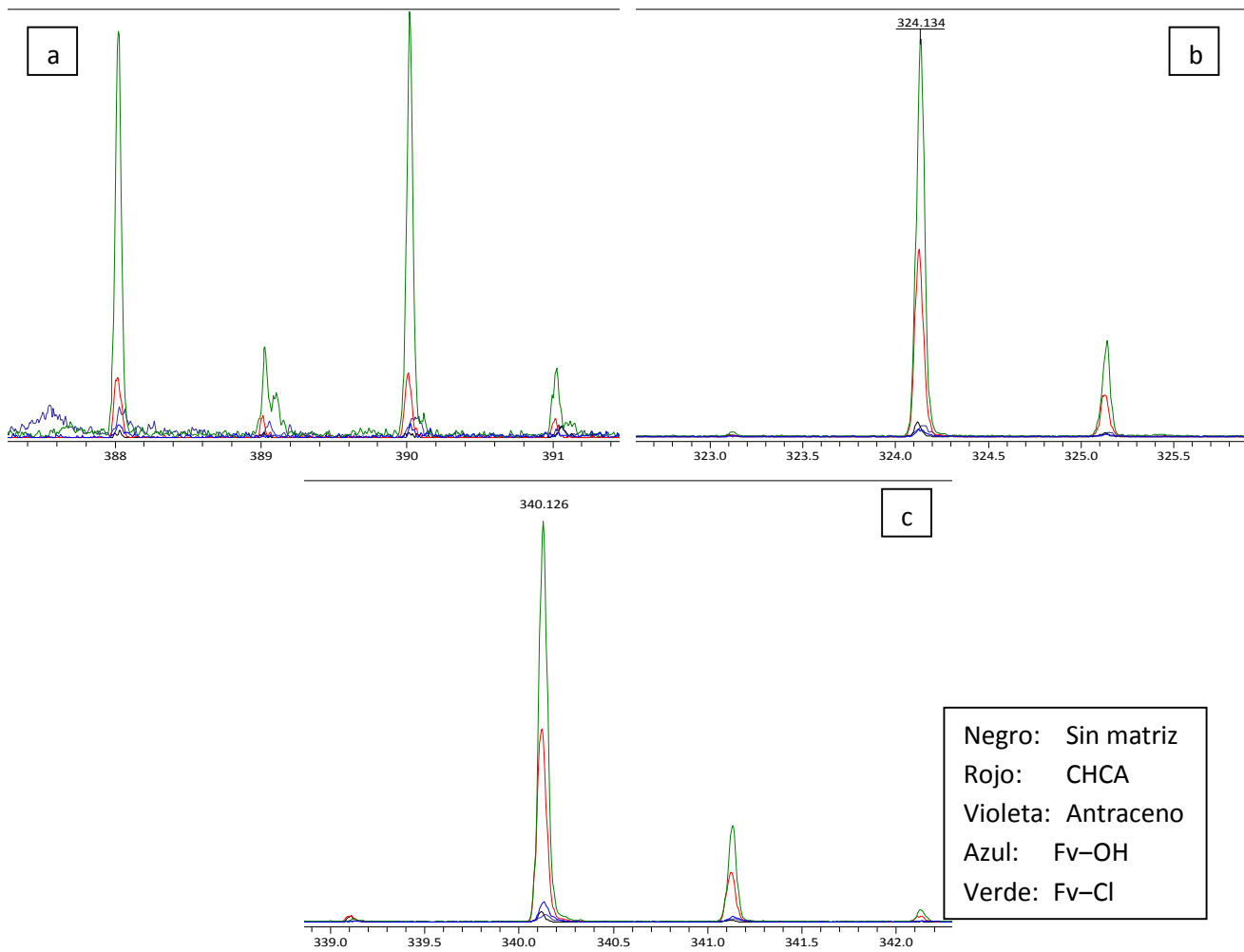


Figura 30. Acercamientos en el rango del ion quasi-molecular protonado de terpiridinas. (a) TPY-Br, (b) TPY-Me y (c) TPY-OMe.

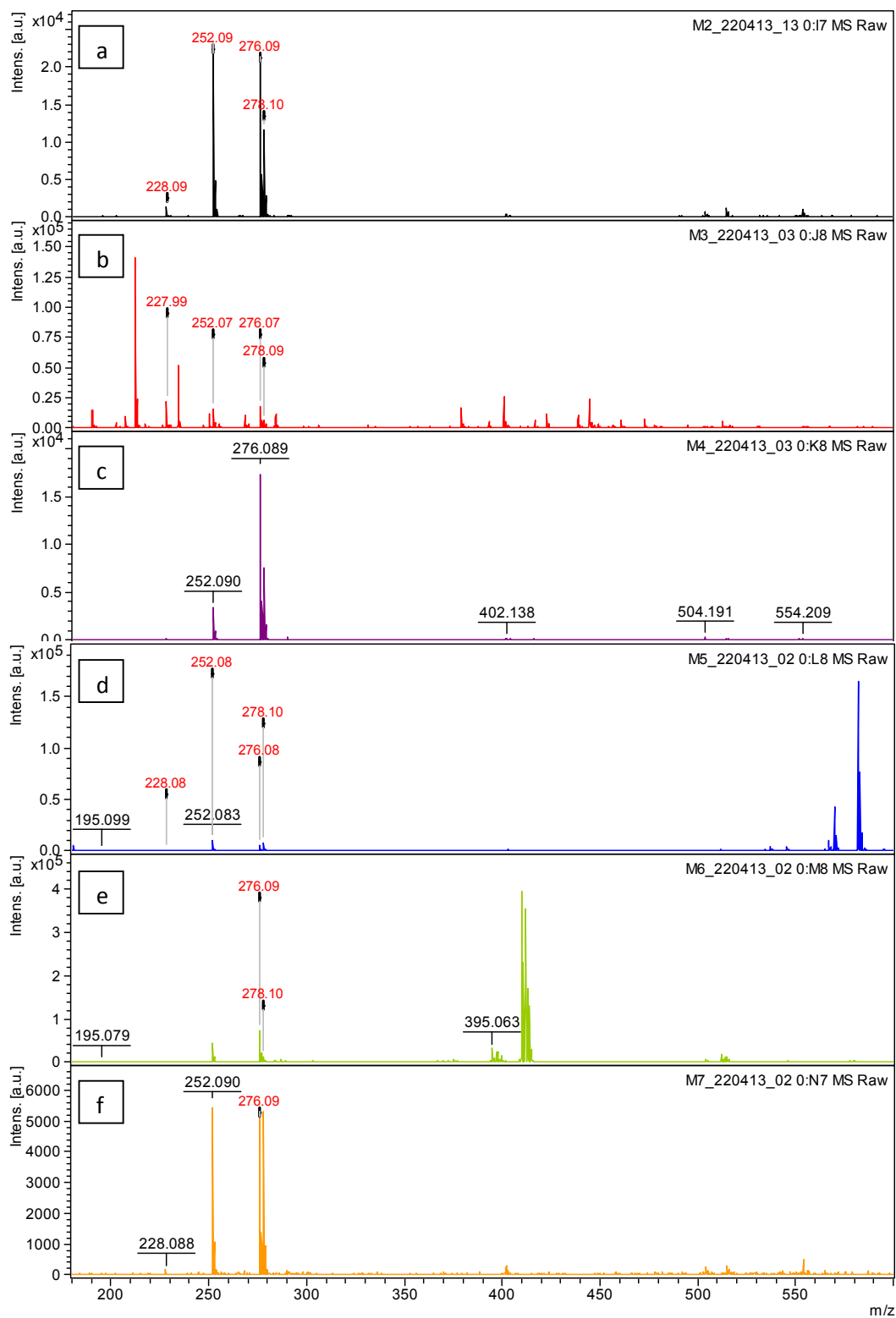


Figura 31. Espectro MALDI-MS de PAHs empleando diferentes matrices. (a) Sin matriz, (b) CHCA, (c) antraceno, (d) Fv-OH, (e) Fv-Cl y (f) Fv-COOH.

Los iones de PAHs observados son cationes radicales, que corresponden a las estructuras con más anillos fusionados. Cuanto más conjugada sea la estructura, más localizados están los dobles enlaces, y menor es el potencial de ionización. Por esta razón, es más fácil llevar a cabo la ionización de estas moléculas. Señales correspondientes a compuestos de cuatro a seis anillos son los que se observan principalmente en los espectros MALDI. Sus potenciales de ionización están en el rango 7.10–7.59 eV, para los PIs conocidos. En cambio, los analitos más livianos, con menos de tres anillos, tienen PIs en el rango 7.76–8.22 eV, y no son ionizados. Es un requerimiento que la matriz tenga PI mayor que los analitos para que ocurra transferencia electrónica.

En las figuras 31a y 31c, puede ocurrir transferencia electrónica de los analitos más pesados, con PIs *bajos*, hacia los más livianos, con PIs *altos*. O también es posible que ocurra fotoionización directa de los componentes más pesados, figura 32, porque sus PIs son cercanos a la energía de dos fotones del láser de Nd:YAG, 7.33 eV.

Se ha propuesto y observado⁷³ que matrices típicas para transferencia protónica, como CHCA, tienen mecanismos de ionización primarios en los que se forman cationes radicales, sin embargo, debido a que no es ni la única ruta ni la ruta mayoritaria, no se observan señales de los PAHs con abundancia significativa, figura 31b.

En los casos de los fenilenvinilenos, figuras 31d–f, se observan las señales en el espectro, con baja abundancia comparada con la de los cationes radicales de Fv–OH y Fv–Cl a 582 Da y 410 Da, respectivamente. Sin embargo, en la figura 33, se pueden comparar cada señal con las diferentes matrices.

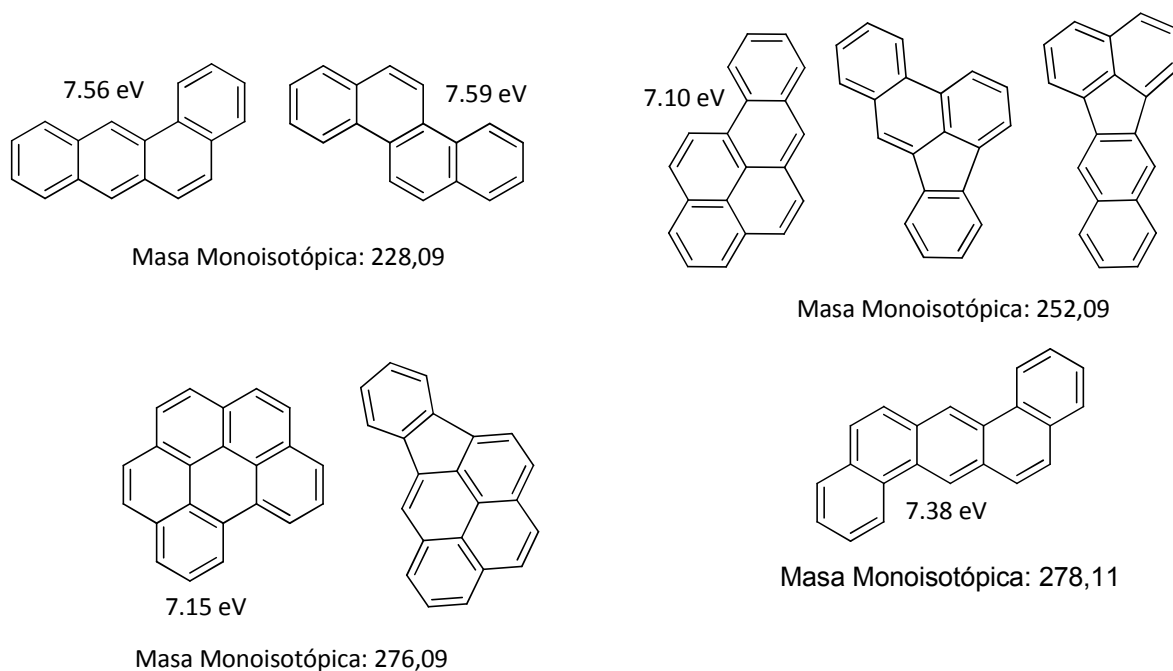


Figura 32. Estructuras de los PAHs de la mezcla observados en MALDI-MS.

En casi todas se observa que Fv–Cl excedió las abundancias de los iones de las muestras sin matriz y con antraceno como matriz, en las que se obtuvieron señales predominantes de PAHs. El antraceno es una matriz comúnmente usada en la ionización de analitos por transferencia electrónica. En el caso de la figura 33d, las señales de dibenz[*a,h*]antraceno obtenidas con Fv–Cl y sin matriz son casi iguales, por lo que se considera que el efecto de la matriz no es significativo.

Los seis grupos metoxilo unidos al núcleo de fenilvinileno en el Fv–OH, aumentan la planaridad del sistema. Este aumento en la planaridad del fenilvinileno, reduce el *band-gap*^{73, 74, 75}, y puede causar un detrimento en el PI de la molécula. El pobre desempeño de Fv–OH se atribuye a un bajo potencial de ionización, menor que el de muchas de las moléculas ionizadas de la mezcla de PAHs. Su función como matriz ocurriría principalmente en la desorción de analitos, por procesos de relajación no–radiativos, es decir, por desorción térmica. Tanto el antraceno como en Fv–OH tienen estructuras muy planas, en las que la adhesión intermolecular se debe principalmente a fuerzas de apilamiento– π . La desorción térmica de estas matrices, está direccionada a sobreponer el apilamiento– π .

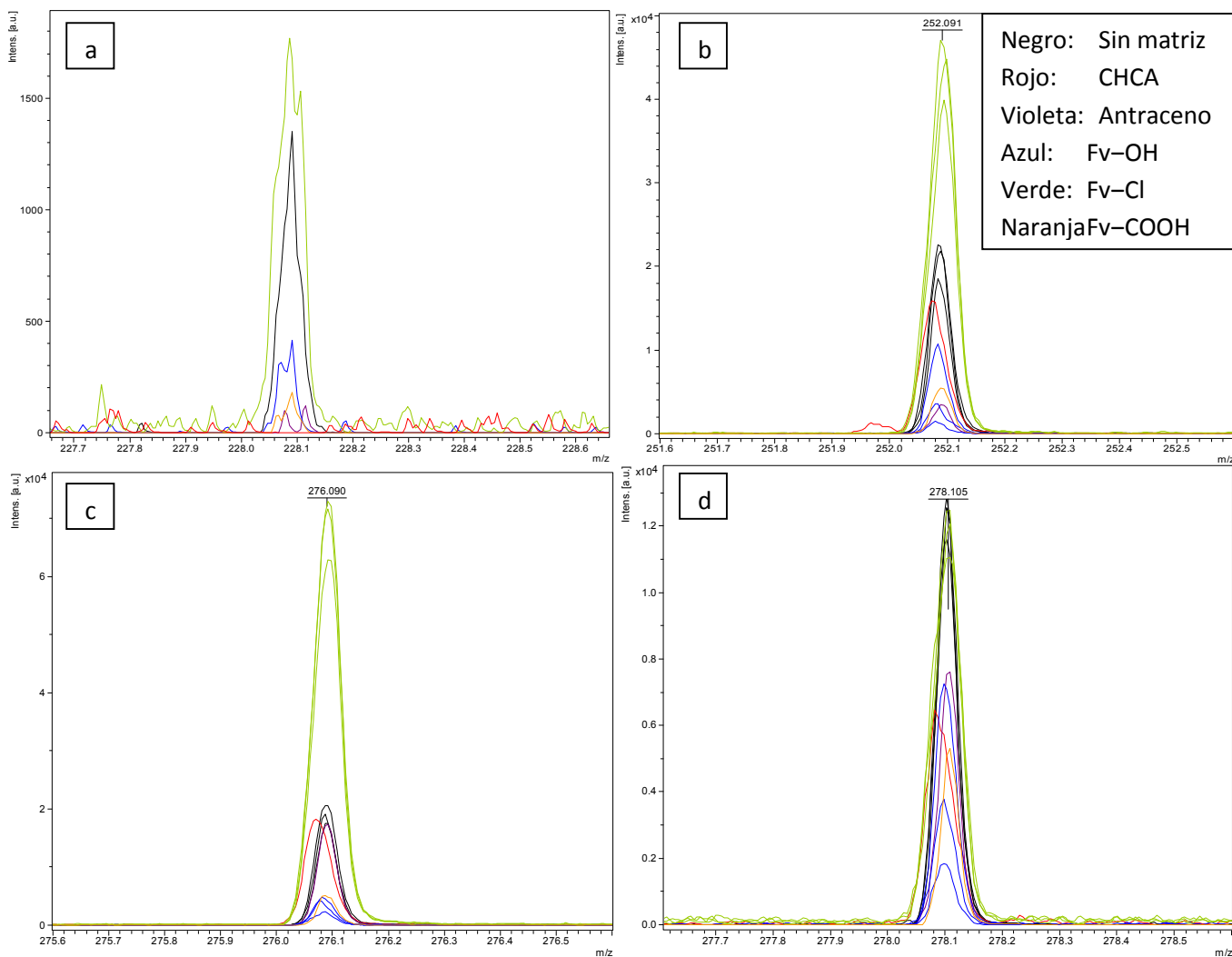


Figura 33. Acercamientos en el rango del catión radical para cada señal de PAH observada. (a) 228 Da, (b) 252 Da, (c) 276 Da y (d) 278 Da.

Los resultados de todas las moléculas empleadas como analitos se encuentran resumidos en la tabla 6, comparando la relación señal–ruido de cada analito obtenida con diferentes matrices. La relación señal–ruido mostrada corresponde al promedio de tres mediciones, y cada medición es la sumatoria de 2000 espectros individuales. Hay celdas vacías, ya sea porque no se realizaron los experimentos de ionización de analitos con la matriz indicada o porque no se detectó ninguna señal.

Las celdas en las que no se agregó el error estándar de la media, la señal correspondiente sólo se detectó en uno de los tres espectros incluidos. Los resultados de la tabla 6, se resumen gráficamente en las figura 34-36.

Las señales observadas en los experimentos con la ftalocianina de cobalto, corresponden al catión radical en m/z 571, y a un fragmento en m/z 557. La relación señal–ruido promedio de estas señales sin utilización de matriz supera a los casos en que si se empleó una matriz.

Analito	m/z	Sin matriz	CHCA	Antraceno	Fv–OH	Fv–Cl	Fv–COOH
PAHs	228	17,7±4,8	-	-	8,1	34,4±0,5	-
	252	278,0±58,4	135,0±35,7	158,8±7,4	115,7±62,0	390,9±10,5	148,7±9,8
	276	175,8±44,6	198,1±26,5	84,6±2,6	179,6±21,3	544,7±4,7	44,3±3,4
	278	445,2±10,9	255,9±7,3	256,7±20,6	292,4±35,3	468,6±2,6	228,4±16,4
TPY–Br	388	38,3±10,8	34,1±6,8	-	18,7±1,0	457,9±6,3	-
	390	34,0±9,7	33,9±8,6	-	15,0±1,4	454,0±6,5	-
TPY–Me	324	6,3	73,3±19,3	-	13,6±3,7	394,8±42,8	-
TPY–OMe	340	9,0	1435,8±353,4	-	78,6±15,9	772,9±78,7	-
Co–Phth	557	641,2±76,8	172,2±12,9	-	1515,7±20,7	1948,9±26,3	-
	571	726,3±26,3	86,0±2,2	-	1024,9±30,0	963,3±24,3	-

Tabla 6. Comparación de relación señal–ruido de los analitos con diferentes matrices.

Las señales observadas en los experimentos con la ftalocianina de cobalto, corresponden al catión radical en m/z 571, y a un fragmento en m/z 557. La utilización de matrices Fv–OH y Fv–Cl supera a los casos en que no se empleó una matriz.

Tanto en las figuras 34-36 como en la tabla 6, se muestra que los errores estándar de los promedios son bajos, comparables con los obtenidos con las matrices de referencia, particularmente para las señales correspondientes a cationes radicales de los PAHs (228, 252, 276 y 278 Da), a los iones cuasi-moleculares protonados de las terpiridinas (388, 390, 324 y 340 Da) y a las señales de la ftalocianina (557 y 571). En la gráfica 34, se observa que las barras de error están en el rango del marcador empleado para indicar el promedio. Las moléculas de fenilenvinileno (y el método de preparación de la muestra empleado, TL) tienen resultados con buena repetitividad, una característica deseable para MALDI-MS.

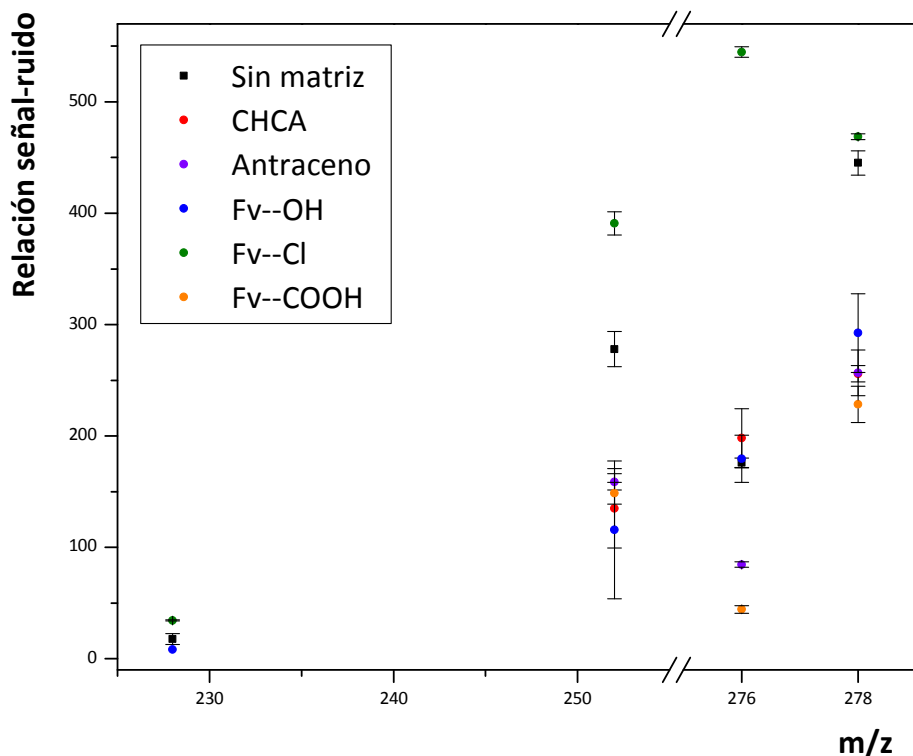


Figura 34. Relación señal–ruido de los PAHs con su respectivo error estadístico empleando diferentes matrices.

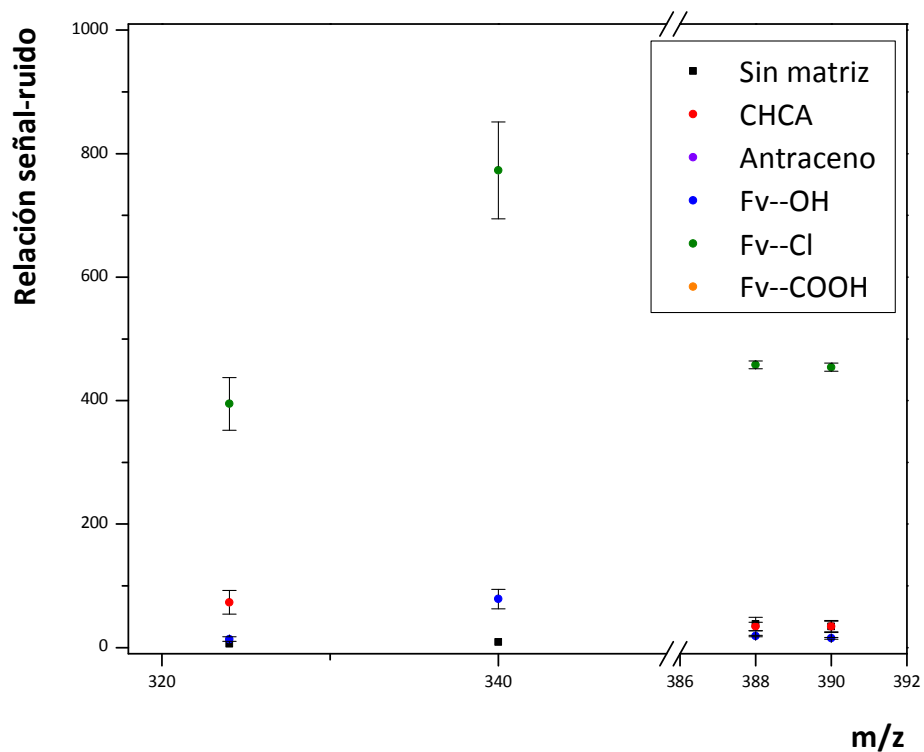


Figura 35. Relación señal-ruido de las terpiridinas con su respectivo error estadístico empleando diferentes matrices.

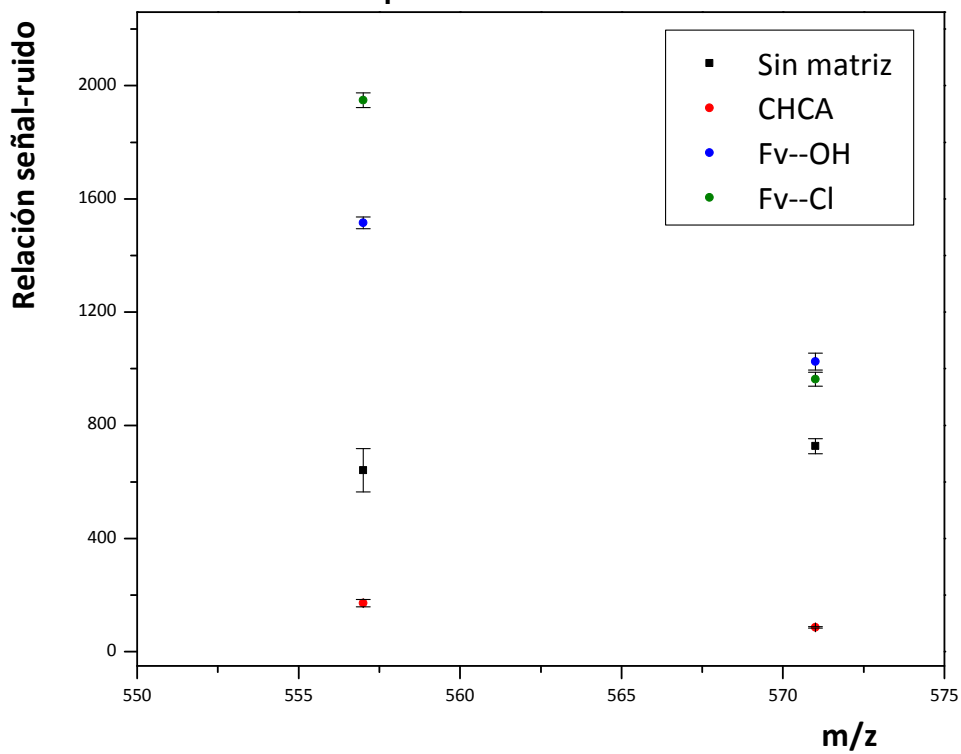


Figura 36. Relación señal-ruido de las señales de la ftalocianina de cobalto con su respectivo error estadístico empleando diferentes matrices.

4. Conclusiones

- Las moléculas de fenilvinileno presentan absorción resonante en la longitud de onda del láser, con coeficientes de absorción molar comparables a matrices típicas de MALDI. Las propiedades espectroscópicas en solución y en estado sólido hacen que el núcleo de fenilvinileno sea prometedor para el desarrollo de nuevas matrices MALDI.
- La técnica de preparación de la muestra no tiene un marcado efecto en algunos parámetros de los espectros obtenidos con fenilvinilenos, en comparación con la matriz de referencia, CHCA. Sin embargo, la técnica de preparación de muestra *thin layer* mostró una amplia versatilidad en cuanto a la polaridad de los solventes y, por consiguiente, su aplicación a diversos analitos.
- A pesar que la ionización de los fenilvinilenos es casi exclusivamente por formación de cationes radicales, los fenilvinilenos pueden asistir la ionización de terpiridinas durante el proceso de desorción.
- La molécula Fv–Cl tuvo un desempeño comparable a matrices tradicionales en la ionización por intercambio electrónico. Estas moléculas pueden ser empleadas para ionización selectiva de compuestos policíclicos aromáticos de acuerdo con su potencial de ionización.

5. Recomendaciones

- Es imperante calcular teóricamente los potenciales de ionización de éstas moléculas (matrices y analitos) para ahondar en el conocimiento sobre el mecanismo más básico de ionización por transferencia electrónica.
- Es importante trabajar con series homólogas de compuestos, tanto de matrices como de analitos, para obtener información más detallada de la relación estructura–ionización.
- Es interesante realizar estudios de ionización de péptidos con Fv–COOH, teniendo en cuenta las señales obtenidas en modo negativo, variando parámetros como el pH de la solución, el punto isoeléctrico del péptido y la relación matriz–analito.

6. Divulgación de resultados

Con los resultados parciales del proyecto, se hará una presentación en la modalidad póster en la sexagésima primera (61°) Conferencia Anual de la ASMS (American Society for Mass Spectrometry) a realizarse en Minneapolis, Minnesota, USA durante los días 9 a 13 de junio de 2013. El *abstract* ya fue aceptado por el comité científico del congreso.

Adicionalmente, se planea compilar los resultados y publicar un artículo en una revista con enfoque al área de espectrometría de masas.

Referencias

1. Hillenkamp, F.; Karas, M., Laser Desorption Ionization with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, 60 (29), 2299-2301.
2. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, 2 (8), 151-153.
3. Cohen, S. L.; Chait, B. T., Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry* **1996**, 68 (1), 31-37.
4. Krause, E.; Wenschuh, H.; Jungblut, P. R., The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Analytical Chemistry* **1999**, 71 (19), 4160-4165.
5. Wenschuh, H.; Halada, P.; Lamer, S.; Jungblut, P. R.; Krause, E., The Ease of Peptide Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: the Effect of Secondary Structure on Signal Intensity. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12 (3), 115-119.
6. Beavis, R. C.; Chait, B. T., Factors Affecting the Ultraviolet Laser Desorption of Proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, 3 (7), 233-237.
7. Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Rossel-Larsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J.; Mirgorodskaya, E.; Kroll-Kristensen, A.; Palm, L.; Roepstorff, P., Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 593-601.
8. Fitzgerald, M. C.; Parr, G. R.; Smith, L. M., Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides. *Analytical Chemistry* **1993**, 65 (3204-3211).

9. Williams, J. B.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M., Use of Liquid Matrices for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization of Polyglycols and Poly(dimethylsiloxanes). *Macromolecules* **1996**, *29* (25), 8144-8150.
10. Räder, H. J.; Spickermann, J.; Kreyenschmidt, M.; Müllen, K., MALDI-TOF mass spectrometry in polymer analytics, 2° Molecular Weight analysis of rigid-rod polymers. *Macromol. Chem. Phys* **1996**, *197*, 3285-3296.
11. Remmers, M.; Müller, B.; Martin, K.; Köhler, W.; Räder, H. J., Poly(*p*-phenylene)s. Synthesis, Optical Properties, and Quantitative Analysis with HPLC and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Macromolecules* **1999**, *32*, 1073-1079.
12. Mowry, C. D.; Murray, V. J., Simultaneous Detection of Ions and Neutrals Produced by Matrix-assisted Laser Desorption. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, *7*, 569-575.
13. Vertes, A.; Irinyi, G.; Gijbels, R., Hydrodynamic Model of Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 2389-2393.
14. Johnson, R. E.; Sundqvist, B. U. R., Laser-pulse Ejection of Organic Molecules from a Matrix: Lessons from Fast-ion-induced Ejection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, *5*, 574-578.
15. Knochenmuss, R.; Zhigilei, L. V., Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45*, 333-346.
16. Chen, X.; Carroll, J. A.; Beavis, R. C., Near-Ultraviolet-Induced Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization as a Function of Wavelength. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9* (9), 885-891.
17. Westmacott, G.; Ens, W.; Hillenkamp, F.; Dreisewerd, K.; Schürenberg, M., The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *221*, 67-81.

18. Beavis, R. C.; Chait, B. T., Cinnamic Acid Derivatives as Matrices for Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Protein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, 3 (12), 432-435.
19. Kampmeier, J.; Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Strupat, K., Investigation of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for IR and UV MALDI. Part I: UV and IR laser ablation in the MALDI process. *international Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, 176 (97), 31-41.
20. Zhang, N.; Doucette, A.; Li, L., Two-layer sample preparation method for MALDI mass spectrometric analysis of protein and peptide samples containing sodium dodecyl sulfate. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (13), 2968-2975.
21. Zheng, J.; Li, N.; Ridyad, M.; Dai, H.; Robbins, S. M.; Li, L., Simple and Robust Two-Layer Matrix/Sample Preparation Method for MALDI MS/MS Analysis of Peptides. *Journal of Proteome Research* **2005**, 4, 1709-1716.
22. Sze, E. T. P.; Chan, T. W. D.; Wang, G., Formulation of Matrix Solutions for Use in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization of Biomolecules. *American Society for Mass Spectrometry* **1998**, 9, 166-174.
23. Armstrong, D. W.; Zhang, L.-K.; He, L.; Gross, M. L., Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (15), 3679-3686.
24. Crank, J. A.; Armstrong, D. W., Towards a Second Generation of Ionic Liquid Matrices (ILMs) for MALDI-MS of Peptides, Proteins, and Carbohydrates. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20 (10), 1790-1800.
25. Fukuyama, Y., Liquid Matrices in MALDI-MS. In *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology*, Handy, S., Ed. InTech: Tennessee, USA, 1989; pp 361-374.
26. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic Molecules and Relevance for Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* **1992**, 27, 472-480.

27. Karbach, V.; Knochenmuss, R., Do Single Matrix Molecules Generate Primary Ions in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 968-974.
28. Bourcier, S.; Hoppilliard, Y., B3LYP DFT molecular orbital approach, an efficient method to evaluate the thermochemical properties of MALDI matrices. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *217* (1-3), 231-244.
29. Karas, M.; Bahr, U.; Stah-Zheng, J. R., Steps toward a more refined picture of the matrix function in UV-MALDI In *Large ions: Their vaporization, detection and structural analysis*, Baer, T.; Ng, C. Y.; Powis, I., Eds. Wiley: London, 1996; p 27.
30. Hoteling, A. J.; Nichols, W. F.; Giesen, D. J.; Lenhard, J. R.; Knochenmuss, R., 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* **2006**, *12*, 345-358.
31. Ehring, H.; Sundqvist, B. U. R., Studies of the MALDI Process by Luminescence Spectroscopy. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 1303-1310.
32. Lüdemann, H.-C.; Redmond, R. W.; Hillenkamp, F., Singlet-singlet annihilation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization studied by fluorescence spectroscopy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 1287-1294.
33. Allwood, D. A.; Dyer, P. E., Quantitative fluorescence measurements performed on typical matrix molecules in matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Chemical Physics* **2000**, *261*, 457-467.
34. Glückmann, M.; Karas, M., The Initial Ion Velocity and Its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation Method in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34* (February), 467-477.
35. Harrison, A. G., The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acides and Peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16*, 201-217.
36. Jørgensen, T. J. D.; Rahbek-Nielsen, H.; Bojesen, G., The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the

formation of multiply charged ions. *European Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *4*, 39-45.

37. Mirza, S. P.; Raju, N. P.; Vairamani, V., Estimation of the Proton Affinity Values of Fifteen Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrices under Electrospray Ionization Conditions Using the Kinetic Method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15* (3), 431-435.

38. Steenvoorden, R. J. J. M.; Breuker, K.; Zenobi, R., The Gas-Phase Basicities of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrices. *European Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *3*, 339-346.

39. Burton, R. D.; Watson, C. H.; Eyley, J. R.; Lang, G. L.; Powell, D. H.; Avery, M. Y., Proton Affinities of Eight Matrices Used for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 443-446.

40. Sherrod, S. D.; Diaz, A. J.; Russell, W. K.; Cremer, P. S.; Russell, D. H., Silver nanoparticles as selective ionization probes for analysis of olefins by mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (17), 6796-6799.

41. Macha, S. F.; McCarley, T. D.; Limbach, P. A., Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *397*, 235-245.

42. Vertes, A.; Balazs, L.; Gijbels, R., Matrix-assisted laser desorption of peptides in transmission geometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1990**, *4* (7), 263-266.

43. Juhasz, P.; Costello, C. E., Generation of Large Radical Ions from Oligometallocenes by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, *7* (5), 343-351.

44. Srinivasan, N.; Haney, C. A.; Lindsey, J. S.; Zhang, W.; Chait, B. T., Investigation of MALDI-TOF Mass Spectrometry of Diverse Synthetic Metalloporphyrins, Phthalocyanines and Multiporphyrin Arrays. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1999**, *3*, 283-291.

45. Ulmer, L.; Mattay, J.; Torres-García, H. R.; Luftmann, H., The use of 2-[(2E)-3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *52* (6), 49-52.
46. Streletskii, A. V.; Ioffe, I. N.; Kotsiris, S. G.; Barrow, M. P.; Drewello, T.; Strauss, S. H.; Boltalina, O. V., In-Plume Thermodynamics of the MALDI Generation of Fluorofullerene Anions. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 714-719.
47. McCarley, T. D.; McCarley, R. L.; Limbach, P. A., Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1998**, *70* (20), 4376-4379.
48. Przybilla, L.; Brand, J.-D.; Yoshimura, K.; Räder, H. J.; Müllen, K., MALDI-TOF Mass Spectrometry of Insoluble Giant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a New Method of Sample Preparation. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 4591-4597.
49. Boutaghou, M. N.; Cole, R. B., 9,10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47* (8), 995-1003.
50. Macha, S. F.; McCarley, T. D.; Limbach, P. a., Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *397* (1-3), 235-245.
51. ATSDR, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. HHS, Ed. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: USA, 1995.
52. Palm, L. M. N.; Carboo, D.; Yeboah, P. O.; Quasie, W. J.; Gorleku, M. A.; Darko, A., Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Present in Smoked Fish from Ghana. *Advance Journal of Food Science and Technology* **2011**, *3* (5), 332-328.
53. EPA, Methods of Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater. In *Method 610 - Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*, Environmental Protection Agency: 2012.

54. Bergknut, M. Characterization of PAH-contaminated soils focusing on availability, chemical composition and biological effects. Doctoral dissertation, Stockholm University, Sweden, 2006.
55. Dabestani, R.; Ivanov, I. N., A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, *70* (1), 10-34.
56. Soltwisch, J.; Jaskolla, T. W.; Hillenkamp, F.; Karas, M.; Dreisewerd, K., Ion Yields in UV-MALDI Mass Spectrometry as a Function of Excitation Laser Wavelength and Optical and Physico-Chemical Properties of Classical and Halogen-Substituted MALDI Matrixes. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 6567-6576.
57. Allwood, D. A.; Dreyfus, R.; Perera, I. K.; Dyer, P. E., UV Optical Absorption of Matrices Used for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 1575-1578.
58. Allwood, D. A.; Dreyfus, R.; Perera, I. K.; Dyer, P. E., Optical absorption of matrix compounds for laser-induced desorption and ionization (MALDI). *Applied Surface Science* **1997**, *109/110*, 154-157.
59. Mormann, M.; Bashir, S.; Derrick, P. J.; Kuck, D., Gas-Phase Basicities of the Isomeric Dihydrobenzoic Acids and Gas-Phase Acidities of their Radical Cations. *American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 544-552.
60. Takayama, M., In-Source Decay Characteristics of Peptides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *12*, 420-427.
61. Schiller, J.; Süß, R.; Fuchs, B.; Müller, M.; Petković, M.; Zschörnig, O.; Waschipky, The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *European Biophysics Journal* **2007**, *36*, 517-527.
62. Horneffer, V.; Dreisewerd, K.; Lüdemann, H.-C.; Hillenkamp, F.; Läge, M.; Strupat, K., Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five

positional isomers of dihydroxybenzoic acid. *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 185/186/187, 589-870.

63. Alzate, D. M., Fluorescence quantum yield in phenylenevinylene systems. *Revista Colombiana de Química* **2010**, 39 (3), 309-319.

64. Remmers, M.; Müller, B.; Martin, K.; Räder, H.-J., Poly(p-phenylene)s . Synthesis, Optical Properties, and Quantitative Analysis with HPLC and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Macromolecules* **1999**, 32, 1073-1079.

65. Balasanmugam, K.; Viswanadham, S. K.; Hercules, D. M., Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laser Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1986**, 58, 1102-1108.

66. Goldfarb, A. R.; Saidel, L. J.; Mosovich, E., The ultraviolet absorption spectra of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, 193, 397-404.

67. Campbell, S.; Beauchamp, J. L.; Rempe, M.; Lichtenberger, D. L., Correlations of lone pair ionization energies with proton affinities of amino acids and related compounds . Site specificity of protonation. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1992**, 117, 83-99.

68. Dehareng, D.; Dive, G., Vertical Ionization Energies of α -L-Amino Acids as a Function of Their Conformation : an Ab Initio Study. *International Journal of Molecular Sciences* **2004**, 5, 301-332.

69. Ingendoh, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U., Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1994**, 131 (345-354).

70. Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R., The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, 10 (March), 871-877.

71. Hoteling, A. J.; Nichols, W. F.; Giesen, D. J.; Lenhard, J. R.; Knochenmuss, R., 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* **2006**, 12 (1), 345-358.

72. Ekern, S. P.; Marshall, A. G.; Szczepanski, J.; Vala, M., Photodissociation of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbon cations. *Journal of Molecular Structure* **1998**, 102, 3498-3504.

73. Luna, C. A. Estudio teórico de la emisión de oligómeros π -conjugados (*PPV* y *PPV-OH*). Chemist, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2008.

74. Eckhardt, H.; Shacklette, K. Y. J.; Elsenbaumer, R. L., The electronic and electrochemical properties of poly(phenylene vinylenes) and poly(thienylene vinylenes): An experimental and theoretical study. *Journal of Chemical Physics* **1989**, 91, 1303-1315.

75. Cornil, J.; dos Santos, D. A.; Beljone, D.; Brédas, J. L., Electronic structure of phenylene vinylene oligomers: Influence of donor/acceptor substitutions. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, 99, 5604-5611.

Bibliografía

Allwood, D. A.; Dreyfus, R.; Perera, I. K.; Dyer, P. E., Optical absorption of matrix compounds for laser-induced desorption and ionization (MALDI). *Applied Surface Science* **1997**, 109/110, 154-157.

Allwood, D. A.; Dreyfus, R.; Perera, I. K.; Dyer, P. E., UV Optical Absorption of Matrices Used for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, 10, 1575-1578.

Allwood, D. A.; Dyer, P. E., Quantitative fluorescence measurements performed on typical matrix molecules in matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Chemical Physics* **2000**, 261, 457-467.

Alzate, D. M., Fluorescence quantum yield in phenylenevinylene systems. *Revista Colombiana de Química* **2010**, 39 (3), 309-319.

Armstrong, D. W.; Zhang, L.-K.; He, L.; Gross, M. L., Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (15), 3679-3686.

ATSDR, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. HHS, Ed. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: USA, **1995**.

Balasanmugam, K.; Viswanadham, S. K.; Hercules, D. M., Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laser Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1986**, 58, 1102-1108.

Beavis, R. C.; Chait, B. T., Cinnamic Acid Derivatives as Matrices for Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Protein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, 3 (12), 432-435.

Beavis, R. C.; Chait, B. T., Factors Affecting the Ultraviolet Laser Desorption of Proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1989**, 3 (7), 233-237.

Bergknut, M. Characterization of PAH-contaminated soils focusing on availability, chemical composition and biological effects. Doctoral dissertation, Stockholm University, Sweden, **2006**.

Bourcier, S.; Hoppilliard, Y., B3LYP DFT molecular orbital approach, an efficient method to evaluate the thermochemical properties of MALDI matrices. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 217 (1-3), 231-244.

Boutaghou, M. N.; Cole, R. B., 9,10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, 47 (8), 995-1003.

Burton, R. D.; Watson, C. H.; Eyler, J. R.; Lang, G. L.; Powell, D. H.; Avery, M. Y., Proton Affinities of Eight Matrices Used for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, 443-446.

Campbell, S.; Beauchamp, J. L.; Rempe, M.; Lichtenberger, D. L., Correlations of lone pair ionization energies with proton affinities of amino acids and related compounds . Site specificity of protonation. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1992**, 117, 83-99.

Chen, X.; Carroll, J. A.; Beavis, R. C., Near-Ultraviolet-Induced Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization as a Function of Wavelength. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, 9 (9), 885-891.

Cohen, S. L.; Chait, B. T., Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry* **1996**, 68 (1), 31-37.

Cornil, J.; dos Santos, D. A.; Beljone, D.; Brédas, J. L., Electronic structure of phenylene vinylene oligomers: Influence of donor/acceptor substitutions. *Journal of Physical Chemistry* **1995**, 99, 5604-5611.

Crank, J. A.; Armstrong, D. W., Towards a Second Generation of Ionic Liquid Matrices (ILMs) for MALDI-MS of Peptides, Proteins, and Carbohydrates. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20 (10), 1790-1800.

Dabestani, R.; Ivanov, I. N., A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, 70 (1), 10-34.

Dehareng, D.; Dive, G., Vertical Ionization Energies of α -L-Amino Acids as a Function of Their Conformation: an Ab Initio Study. *International Journal of Molecular Sciences* **2004**, 5, 301-332.

Eckhardt, H.; Shacklette, K. Y. J.; Elsenbaumer, R. L., The electronic and electrochemical properties of poly(phenylene vinylenes) and poly(thienylene vinylenes): An experimental and theoretical study. *Journal of Chemical Physics* **1989**, 91, 1303-1315.

Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F., Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic Molecules and Relevance for Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* **1992**, 27, 472-480.

Ehring, H.; Sundqvist, B. U. R., Studies of the MALDI Process by Luminescence Spectroscopy. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 30, 1303-1310.

Ekern, S. P.; Marshall, A. G.; Szczepanski, J.; Vala, M., Photodissociation of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbon cations. *Journal of Molecular Structure* **1998**, 102, 3498-3504.

EPA, Methods of Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater. In Method 610 - Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Environmental Protection Agency: **2012**.

Fitzgerald, M. C.; Parr, G. R.; Smith, L. M., Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides. *Analytical Chemistry* **1993**, 65 (3204-3211).

Fukuyama, Y., Liquid Matrices in MALDI-MS. In Applications of Ionic Liquids in Science and Technology, Handy, S., Ed. InTech: Tennessee, USA, **1989**; pp 361-374.

Glückmann, M.; Karas, M., The Initial Ion Velocity and Its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation Method in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 34 (February), 467-477.

Goldfarb, A. R.; Saidel, L. J.; Mosovich, E., The ultraviolet absorption spectra of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, 193, 397-404.

Harrison, A. G., The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acides and Peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, 16, 201-217.

Hillenkamp, F.; Karas, M., Laser Desorption Ionization with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, 60 (29), 2299-2301.

Horneffer, V.; Dreisewerd, K.; Lüdemann, H.-C.; Hillenkamp, F.; Läge, M.; Strupat, K., Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid. *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 185/186/187, 589-870.

Hoteling, A. J.; Nichols, W. F.; Giesen, D. J.; Lenhard, J. R.; Knochenmuss, R., 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* **2006**, 12, 345-358.

Hoteling, A. J.; Nichols, W. F.; Giesen, D. J.; Lenhard, J. R.; Knochenmuss, R., 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* **2006**, 12 (1), 345-358.

Ingendoh, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U., Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1994**, 131 (345-354).

Johnson, R. E.; Sundqvist, B. U. R., Laser-pulse Ejection of Organic Molecules from a Matrix: Lessons from Fast-ion-induced Ejection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, 5, 574-578.

Jørgensen, T. J. D.; Rahbek-Nielsen, H.; Bojesen, G., The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions. *European Journal of Mass Spectrometry* **1998**, 4, 39-45.

Juhasz, P.; Costello, C. E., Generation of Large Radical Ions from Oligometallocenes by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, 7 (5), 343-351.

Kampmeier, J.; Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Strupat, K., Investigation of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for IR and UV MALDI. Part I: UV and IR laser ablation in the MALDI process. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, 176 (97), 31-41.

Karas, M.; Bahr, U.; Stah-Zheng, J. R., Steps toward a more refined picture of the matrix function in UV-MALDI In Large ions: Their vaporization, detection and structural analysis, Baer, T.; Ng, C. Y.; Powis, I., Eds. Wiley: London, **1996**; p 27.

Karbach, V.; Knochenmuss, R., Do Single Matrix Molecules Generate Primary Ions in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12, 968-974.

Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R., The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, 10 (March), 871-877.

Knochenmuss, R.; Zhigilei, L. V., Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, 45, 333-346.

Krause, E.; Wenschuh, H.; Jungblut, P. R., The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Analytical Chemistry* **1999**, 71 (19), 4160-4165.

Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Rossel-Larsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J.; Mirgorodskaya, E.; Kroll-Kristensen, A.; Palm, L.; Roepstorff, P., Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 593-601.

Lüdemann, H.-C.; Redmond, R. W.; Hillenkamp, F., Singlet-singlet annihilation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization studied by fluorescence spectroscopy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, 16, 1287-1294.

Luna, C. A. Estudio teórico de la emisión de oligómeros π -conjugados (PPV y PPV-OH). Chemist, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2008**.

Macha, S. F.; McCarley, T. D.; Limbach, P. a., Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 397 (1-3), 235-245.

Macha, S. F.; McCarley, T. D.; Limbach, P. A., Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 397, 235-245.

McCarley, T. D.; McCarley, R. L.; Limbach, P. A., Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1998**, 70 (20), 4376-4379.

Mirza, S. P.; Raju, N. P.; Vairamani, V., Estimation of the Proton Affinity Values of Fifteen Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrices under Electrospray Ionization Conditions Using the Kinetic Method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, 15 (3), 431-435.

Mormann, M.; Bashir, S.; Derrick, P. J.; Kuck, D., Gas-Phase Basicities of the Isomeric Dihydroxybenzoic Acids and Gas-Phase Acidities of their Radical Cations. *American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 11, 544-552.

Mowry, C. D.; Murray, V. J., Simultaneous Detection of Ions and Neutrals Produced by Matrix-assisted Laser Desorption. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, 7, 569-575.

Palm, L. M. N.; Carboo, D.; Yeboah, P. O.; Quasie, W. J.; Gorleku, M. A.; Darko, A., Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Present in Smoked Fish from Ghana. *Advance Journal of Food Science and Technology* **2011**, 3 (5), 332-328.

Przybilla, L.; Brand, J.-D.; Yoshimura, K.; Räder, H. J.; Müllen, K., MALDI-TOF Mass Spectrometry of Insoluble Giant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a New Method of Sample Preparation. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 4591-4597.

Räder, H. J.; Spickermann, J.; Kreyenschmidt, M.; Müllen, K., MALDI-TOF mass spectrometry in polymer analytics, 2° Molecular Weight analysis of rigid-rod polymers. *Macromol. Chem. Phys* **1996**, 197, 3285-3296.

Remmers, M.; Müller, B.; Martin, K.; Köhler, W.; Räder, H. J., Poly(p-phenylene)s. Synthesis, Optical Properties, and Quantitative Analysis with HPLC and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Macromolecules* **1999**, 32, 1073-1079.

Remmers, M.; Müller, B.; Martin, K.; Räder, H.-J., Poly(p-phenylene)s . Synthesis, Optical Properties, and Quantitative Analysis with HPLC and MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Macromolecules* **1999**, 32, 1073-1079.

Schiller, J.; Süß, R.; Fuchs, B.; Müller, M.; Petković, M.; Zschörnig, O.; Waschipky, The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *European Biophysics Journal* **2007**, 36, 517-527.

Sherrod, S. D.; Diaz, A. J.; Russell, W. K.; Cremer, P. S.; Russell, D. H., Silver nanoparticles as selective ionization probes for analysis of olefins by mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, 80 (17), 6796-6799.

Soltwisch, J.; Jaskolla, T. W.; Hillenkamp, F.; Karas, M.; Dreisewerd, K., Ion Yields in UV-MALDI Mass Spectrometry as a Function of Excitation Laser Wavelength and Optical and Physico-Chemical Properties of Classical and Halogen-Substituted MALDI Matrixes. *Analytical Chemistry* **2012**, 84, 6567-6576.

Srinivasan, N.; Haney, C. A.; Lindsey, J. S.; Zhang, W.; Chait, B. T., Investigation of MALDI-TOF Mass Spectrometry of Diverse Synthetic Metalloporphyrins, Phthalocyanines and Multiporphyrin Arrays. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1999**, 3, 283-291.

Steenvoorden, R. J. J. M.; Breuker, K.; Zenobi, R., The Gas-Phase Basicities of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrices. *European Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 3, 339-346.

Streletskii, A. V.; Ioffe, I. N.; Kotsiris, S. G.; Barrow, M. P.; Drewello, T.; Strauss, S. H.; Boltalina, O. V., In-Plume Thermodynamics of the MALDI Generation of Fluorofullerene Anions. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, 109, 714-719.

Sze, E. T. P.; Chan, T. W. D.; Wang, G., Formulation of Matrix Solutions for Use in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization of Biomolecules. *American Society for Mass Spectrometry* **1998**, 9, 166-174.

Takayama, M., In-Source Decay Characteristics of Peptides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 12, 420-427.

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

Ulmer, L.; Mattay, J.; Torres-García, H. R.; Luftmann, H., The use of 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 52 (6), 49-52.

Vertes, A.; Balazs, L.; Gijbels, R., Matrix-assisted laser desorption of peptides in transmission geometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1990**, 4 (7), 263-266.

Vertes, A.; Irinyi, G.; Gijbels, R., Hydrodynamic Model of Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 2389-2393.

Wenschuh, H.; Halada, P.; Lamer, S.; Jungblut, P. R.; Krause, E., The Ease of Peptide Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: the Effect of Secondary Structure on Signal Intensity. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12 (3), 115-119.

Westmacott, G.; Ens, W.; Hillenkamp, F.; Dreisewerd, K.; Schürenberg, M., The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 221, 67-81.

Williams, J. B.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M., Use of Liquid Matrices for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization of Polyglycols and Poly(dimethylsiloxanes). *Macromolecules* **1996**, 29 (25), 8144-8150.

Zhang, N.; Doucette, A.; Li, L., Two-layer sample preparation method for MALDI mass spectrometric analysis of protein and peptide samples containing sodium dodecyl sulfate. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (13), 2968-2975.

Zheng, J.; Li, N.; Ridyard, M.; Dai, H.; Robbins, S. M.; Li, L., Simple and Robust Two-Layer Matrix/Sample Preparation Method for MALDI MS/MS Analysis of Peptides. *Journal of Proteome Research* **2005**, 4, 1709-1716.