

**MAPEO DE METABOLITOS SOBRE LA SUPERFICIE DE HOJAS DE CAFÉ  
MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES-MALDI**

**KAREN TATIANA HERNÁNDEZ OSORIO**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2016**

**MAPEO DE METABOLITOS SOBRE LA SUPERFICIE DE HOJAS DE CAFÉ  
MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES-MALDI**

**KAREN TATIANA HERNÁNDEZ OSORIO**

**Trabajo de grado para optar por el título de  
Químico**

**Directora**

**MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA**

**Química, PhD.**

**Codirector**

**JEFERSON VALENCIA DÁVILA**

**Químico**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2016**

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN .....	18
1. OBJETIVOS.....	20
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2. MARCO TEÓRICO .....	21
2.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	21
2.2 IONIZACIÓN POR DESORCIÓN LÁSER ASISTIDA POR UNA MATRIZ (Matrix Assited Laser Desorption Ionization, MALDI).....	23
2.3 IONIZACIÓN EN MALDI .....	24
2.4 ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO ( <i>TOF</i> ).....	26
2.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES ( <i>IMS, Imaging Mass Spectrometry</i> ) .....	28
2.6 CLASIFICACIÓN Y FUNCIÓN DE LÍPIDOS EN PLANTAS.....	31
2.6.1 Lípidos simples. ....	32
2.6.2 Lípidos compuestos. ....	33
2.6.3 Lípidos derivados.....	35
2.7 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN PLANTAS .....	36
2.8 ESPECTROMETRÍA DE IMÁGENES EN PLANTAS.....	38
3. METODOLOGÍA .....	41
3.1 REACTIVOS .....	41
3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	42
3.2.1 Extracción con cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) /metanol (MeOH) por el método de Folch. ....	42
3.2.2 Extracción de lípidos usando hexano. ....	43
3.2.3 Extracción de lípidos de las hojas de café usando metanol. ....	43
3.2.4 Espectrometría de masas MALDI: .....	44

3.2.4.1 Preparación de la muestra. ....	44
3.2.4.2 Espectrometría de masas de imágenes-MALDI. ....	46
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	50
4.1 ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR MALDI-TOF/MS. ....	50
4.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES (IMS) - MALDI DE HOJAS DE CAFÉ DE LA ESPECIE <i>COFFEA ARABICA</i> .....	60
5. CONCLUSIONES .....	73
6. DIVULGACION DE RESULTADOS .....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	84
ANEXOS .....	95

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema General De Los Componentes De Un Espectrómetro De Masas. <sup>15</sup>	21
Figura 2. Proceso de formación de iones primarios en MALDI mediante el modelo de fotoexcitación/“pooling”. [19]	25
Figura 3. Analizador de tiempo de vuelo (TOF) lineal [14]	27
Figura 4. Analizador de tiempo de vuelo (TOF) reflectrón [24]	27
Figura 5. Adquisición de una imagen por espectrometría de masas MALDI. a) Sección de tejido cubierta con una matriz MALDI. b) Adquisición de espectros de masas por cada pixel o coordenada x, y sobre el tejido y c) generación de imágenes de los diferentes iones detectados con sus respectivos valores m/z. La abundancia de los iones se representa en la imagen por un gradiente de color.	29
Figura 6. Representación esquemática de los modos de adquisición de una imagen por MALDI IMS TOF/MS El láser se desplaza punto a punto a través de un tamaño de un paso definido que determina la resolución espacial de la imagen. [28]	30
Figura 7. Clasificación de lípidos según su estructura	31
Figura 8. Estructura general de un cérido y ácido graso. R <sub>1</sub> y R <sub>2</sub> cadenas hidrocarbonadas.	32
Figura 9. Ruta biosintética de oxilípinas en plantas por medio de reacciones enzimáticas y no enzimáticas que inician con la conversión de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico (18: 3), (18:2). Divinil éter sintasa (DES); lipoxigenasa (LOX); alfa-dioxigenasa (alfa-DOX); hidroperóxido liasa (HPL); epoxi alcohol sintasa (EAS); peroxigenasa (PXG); aleno óxido sintasa	

(AOS), R = CH <sub>2</sub> (CH) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ; R <sub>1</sub> = (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO <sub>2</sub> H;	R <sub>2</sub> y R <sub>3</sub> =	
(CH) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> . [35]		33
Figura 10. Estructura general de un diacilglicerol y un glicerofosfolípido. X: cabeza polar R <sub>1</sub> y R <sub>2</sub> cadenas hidrocarbonadas		34
Figura 11. Estructura general de los flavonoides		36
Figura 12. Estructura básica de un esteroles		36
Figura 13. Protocolo para la extracción de lípidos usando cloroformo/metanol.		42
Figura 14. Protocolo para la extracción de lípidos usando hexano		43
Figura 15. Protocolo para la extracción de lípidos utilizando metanol		44
Figura 16. (a) Partes típicas en una hoja de café y (b) cortes de la hoja seleccionados para el análisis por MALDI-MSI.		46
Figura 17. Protocolo de preparación del tejido para MALDI-IMS		47
Figura 18. Proceso de adquisición de imágenes por MALDI MSI.		49
Figura 19. Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con cloroformo: metanol usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) ácido alfa linolénico (m/z 277.210); b) ácido-9S-hidroperoxi-10E-12Z-octadecadienoico (m/z 311.201); c) ácido-9-oxo-11R-15S-dihidroxi-2,3-dinor-13E-prostenoico (m/z 325.218); d) 11-deoxi-prostagladina F1a (m/z 339.232); e) ácido (9R, 13R)-1a, 1b-dinor-10,11-dihidro-12-oxo-15-fitoenoico (m/z 265.192); f) ácido colneleico m/z 293.226); g) ácido 9-oxo-11S,15S-dihidroxi-13E-prostaenoico (m/z 353.247).		52
Figura 20. Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con cloroformo:metanol usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) vitamina D3 (m/z 473.378) b) PI(12:0/19:1(9Z)) (m/z 793.509); c) PG(18:3(6Z,9Z,12Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) (m/z 815.487); d) Lonchocarpenin (m/z 447.175); e) PG (14:1(9Z)/0:0) (m/z 453.226); f) PG (12:0/14:0) (m/z 637.354); g) 5Z,7E,22E,24E)-(1S,3R)-27-nor-9,10-seco-5,7,10(19),22,24-colestapentaene-1,3,26-triol (m/z 397.272); h)		

PG(18:1(9Z)/18:3(6Z,9Z,12Z) (m/z 769.480); i) PI(12:0/22:4(7Z,10Z,13Z, 16Z)) (m/z 829.529). 54

Figura 21. Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) ácido palmítico (m/z 255. 249); b) ácido alfa-linolénico (m/z 277.223); c) ácido esteárico (m/z 283.203); d) ácido-9S-hidroperoxi-10E-12Z-octadecadienoico (m/z 311.190); e) ácido-9-oxo-11R-15S-dihidroxi-2,3-dinor-13E- prostenoico (m/z 325. 238); f) 11-deoxi-prostagladina F1a (m/z 339.256). 56

Figura 22. Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) ácido 11-Deoxo-glicirretínico (m/z 455.353); b) Vitamina D3 (m/z 473.286); c) Lonchocarpenin (m/z 447.168); d) PG(14:1(9Z)/0:0) (m/z 453.226); e) PG (12:0/14:0) (m/z 637.3); f) PI(12:0/19:1(9Z)) (m/z 793.470); g) PI (22:1 (11Z)/0:0) (m/z 653.395); h) PG(12:0/16:0) (m/z 665.442); i) PG(12:0/18:3(6Z,9Z,12Z)) (m/z 687.437); j) PG(14:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)) (m/z 769.501). 57

Figura 23. Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando DMAN como matriz. Los metabolitos identificados son a) hesperetina (m/z 301.075); b) (E)- 1-[2,4-dihidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil]-3-fenil-2,1-propenona (m/z 307.128); c) 5,7-dihidroxi-6-metoxi-8-fenilflavona (m/z 353.137); d) 5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2butenil)-6-isobutiril-4-fenilcoumarin (m/z 421.132); e) Lonchocarpenin (m/z 447.193); f) [(S)- 2-(3,4-dimetoxifenil)-3,4-dihidro-7-hidroxi-2H-1-benzopiran-5-il] beta -D-glucopiranósido (m/z 463.148). 58

Figura 24. Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando 1,5-DAN como matriz. Los metabolitos identificados son como matriz la, ácido 11-hesperedin (m/z 609. 189); b, 5-O-metileriodictiol-7-glucosil-(1->4)-galactósido (m/z 625.185);

c, isovitexin-7,2"-di-O-glucósido ( <i>m/z</i> 755.242); d, 5,7,3"- trihidroxi-4-metoxiflavona-7-galactosil-(1->2)-[ramnosil-(1->6)] glucósido ( <i>m/z</i> 771.236).	59
Figura 25. MALDI-IMS de una hoja de café (base y parte media) usando DMAN como matriz. Las imágenes representan la distribución espacial y la abundancia relativa de las siguientes moléculas deprotonadas: a) ácido 10-ceto-mirístico ( <i>m/z</i> 241.190), b) ácido palmítico ( <i>m/z</i> 255.222), c) ácido montánico ( <i>m/z</i> 423.427) y d) ácido melísico ( <i>m/z</i> 451.498). El color blanco representa la máxima abundancia relativa mientras que el color negro se asigna para señales con baja abundancia.	61
Figura 26. Estructura y función de la cutícula en plantas. <sup>71</sup>	62
Figura 27. MALDI-IMS de una hoja de café (base y parte media) usando 1,5-DAN como matriz. Las imágenes representan la distribución espacial y la abundancia relativa de las siguientes moléculas deprotonadas: a) flavonoide <i>m/z</i> 433.131; b) PG(14:1(9Z)/0:0) <i>m/z</i> 453.230; c) PA(16:0/21:0) <i>m/z</i> 703.572; d) (PG(18:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)) <i>m/z</i> 827.618; e) (PI(14:0/22:0)) <i>m/z</i> 865.589. El color blanco representa la máxima abundancia relativa mientras que el color negro se asigna para señales con baja abundancia.	64
Figura 28. MALDI-IMS de una hoja de café (parte media y base) usando AA como matriz. Las imágenes representan la distribución espacial y la abundancia relativa de las siguientes moléculas deprotonadas: a) ácido graso <i>m/z</i> 297.240 b) fosfatidato (PA) <i>m/z</i> 493.358 c) flavonoide glucosilado con <i>m/z</i> 497.136 d) flavonoide glucosilado con <i>m/z</i> 519.163 e) flavonoide glucosilado con <i>m/z</i> 535.150, f) fosfatidato (PA) <i>m/z</i> 645.399, g) fosfatidato (PA) <i>m/z</i> 673.443, h) fosfatidato (PA) <i>m/z</i> 687.466. El color blanco representa la máxima abundancia relativa mientras que el color negro se asigna para señales con baja abundancia.	67
Figura 29. Sección transversal de una hoja con sus respectivas partes.[76].....	68
Figura 30. Estructura general de un flavonoide .....	68

Figura 31. Los fosfolípidos (PA) actúan como mensajeros secundarios en los procesos de señalización inducidos por la planta contra un agente patógeno. ....70

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Clasificación de los glicerofosfolípidos según su cabeza polar.....	34
Tabla 2. Estructura química de las matrices MALDI y sus masas monoisotópicas exactas.....	41
Tabla 3. Valores de pKa para las matrices MALDI empleadas.....	50
Tabla 4. Señales asignadas en MALDI-IMS en modo ion negativo usando DMAN como matriz.....	63
Tabla 5. Señales asignadas en MALDI-IMS en modo ion negativo usando la matriz 1,5-DAN. ....	66
Tabla 6. Señales asignadas en MALDI IMS-TOF/MS en modo ion negativo usando 9-AA como matriz.....	70

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Señales asignadas del extracto lipídico obtenido con cloroformo: metanol (2:1 %v/v) utilizando dman, 9-AA Y 1,5-DAN como matrices en modo ion negativo .....	96
ANEXO B. señales asignadas del extracto lipídico obtenido con cloroformo: metanol (2:1 %v/v) utilizando dman, 9-AA Y 1,5-DAN como matrices en modo ion negativo. ....	97
ANEXO C. Señales asignada del extracto lipídico obtenido con metanol utilizando dman y 1,5-dan como matrices en modo ion negativo.....	98
ANEXO D. Señales asignada del extracto lipídico obtenido con metanol utilizando dman y 1,5-dan como matrices en modo ion negativo.....	99
ANEXO E. Patrón isotópico experimental y teórico de la señal correspondiente al ion [M-H] <sup>-</sup> con <i>m/z</i> 637.386 [M-H] <sup>-</sup> .....	100
ANEXO F. Patrón isotópico experimental y teórico de la señal correspondiente al ion [M-H] <sup>-</sup> con <i>m/z</i> 793.486 [M-H] <sup>-</sup> .....	101
ANEXO G. Patrón isotópico experimental y teórico de la señal correspondiente al ion [M-H] <sup>-</sup> con <i>m/z</i> 447.180 [M-H] <sup>-</sup> .....	102
ANEXO H. Patrón isotópico experimental y teórico de la señal correspondiente al ion [M-H] <sup>-</sup> con <i>m/z</i> 255.232 [M-H] <sup>-</sup> .....	103
ANEXO I. Patrón isotópico experimental y teórico de la señal correspondiente al ion [M-H] <sup>-</sup> con <i>m/z</i> 277.216 [M-H] <sup>-</sup> . ....	104
ANEXO J. Patrón isotópico experimental y teórico de la señal correspondiente al ion [M-H] <sup>-</sup> con <i>m/z</i> 325.201 [M-H] <sup>-</sup> .....	105
ANEXO K. Maldi-ims de una hoja de café (parte media y base) correspondiente a los picos característicos de la matriz a) 9-aa ( <i>m/z</i> 193.099) y b) 1,5-dan ( <i>m/z</i> 157.052) como iones [M-H] <sup>-</sup> .....	106

ANEXO L. Patrón isotópicos experimentales de las señal identificas en los extractos de cloroformo: metanol (2:1), hexano y metanol como iones [M-H] <sup>-</sup> ....	107
Anexo m. Póster congreso.....	110

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

9-AA: 9-aminoacridina

1,5-DAN: 1,5-Diaminonaftaleno

DMAN: 1,8-Bis (dimetil) aminonaftaleno

MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization*

IMS: *Imaging Mass Spectrometry*

MS: *Mass Spectrometry*

TOF: *Time Of Flight*

PA: Fosfatidato

PG: Fosfatidil glicerol

PI: Fosfatidil inositol

PS: Fosfatidil serina

PC: Fosfatidil colina

PE: Fosfatidil etanolamina

## RESUMEN

**TITULO:** “MAPEO DE METABOLITOS SOBRE LA SUPERFICIE DE HOJAS DE CAFÉ MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES-MALDI”\*

**AUTORES:** KAREN TATIANA HERNÁNDEZ OSORIO\*

**PALABRAS CLAVES:** MALDI, espectrometría de masas de imágenes, lípidos, hojas de café, 9-AA, 1,5-DAN, DMAN.

### DESCRIPCIÓN:

Metabolitos de bajo peso molecular tales como fosfolípidos, ácidos grasos, flavonoides y glicerolípidos, son componentes estructurales de las membranas celulares vegetales, ayudan a prevenir la deshidratación y actúan como moléculas señalizadores para activar los mecanismos de defensa en la planta. La espectrometría de masas de imágenes acoplada a una fuente de ionización MALDI (MALDI-IMS), permitió obtener la distribución espacial y temporal de metabolitos de bajo peso molecular que pueden estar involucrados en los mecanismos de defensa de la planta *Coffea arabica* contra patógenos como la roya.

En este estudio, se realizó la extracción de metabolitos de hojas de café sanas (*Coffea arabica*) usando metanol, hexano y una mezcla de cloroformo/metanol; los extractos fueron analizados por MALDI-TOF. Los resultados de la identificación de los extractos lipídicos mostraron una selectividad de las matrices hacia la identificación de cierto tipo de lípidos. Por ejemplo, la matriz 1,5-Diaminonaftaleno (1,5-DAN) permitió la identificación de lípidos tipo fosfatidil glicerol (PG), fosfatidil inositol (PI) y flavonoides. Por otro lado, las matrices 9-aminoacridina (9-AA) y 1,8-bis (dimetilamino) naftaleno (DMAN) fueron selectivas hacia la identificación de ácidos grasos, oxilipinas, fosfolípidos y vitamina D3. La distribución espacio-temporal de metabolitos sobre las hojas de café sanas (*coffea arabica*) e intactas se realizó por espectrometría de masas de imágenes MALDI (MALDI-IMS) empleando las tres matrices básicas: 9-AA, 1,5-DAN y DMAN. Los metabolitos identificados como ácido fosfatidato (PA), fosfatidil glicerol y fosfatil inositol se encuentran distribuidos por toda la superficie de la sección de la hoja analizada, mientras que los ácidos grasos y los flavonoides se acumulan principalmente en las venas centrales y en los extremos. Todos los metabolitos identificados por MALDI-MS y MALDI-IMS fueron detectados como moléculas deprotonadas [M-H]<sup>-</sup> gracias a una reacción ácido-base de Brønsted-Lowry.

---

\* Trabajo de grado

\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Ph.D. Marianny Yajaira Combariza

## ABSTRACT

**TITLE:** “MAPPING OF METABOLITES ON THE SURFACE OF COFFEE LEAVES BY MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION, MASS SPECTROMETRY IMAGING (MALDI MSI-TOF/MS)”\*

**AUTHORS:** KAREN TATIANA HERNÁNDEZ OSORIO\*\*

**KEY WORDS:** MALDI, imaging mass spectrometry, lipids, coffee leaves, 9-AA, 1,5-DAN, DMAN.

**DESCRIPTION:**

Low molecular weight metabolites such as phospholipids, fatty acids, flavonoids and glycerolipids are structural components of the plant cell wall. These molecules help to prevent dehydration and act like signaling molecules to activate the defense mechanisms on the plants.

Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (MALDI-IMS) provide the spatial and temporal distribution of low molecular weight metabolites, which could be involved in defense mechanisms against pathogens like the rust on *Coffea Arabica* plants.

In this contribution, we carried out the extraction of metabolites from healthy coffee leaves using methanol, hexane, and a mixture of chloroform/methanol. In the analysis of lipid extracts, it was possible to determine some matrix selectivity towards the ionization of specific lipids. For instance, the matrix 1,5-diamino naphthalene (1,5-DAN) allowed the identification of phospholipids such as phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycerol (PG), and flavonoids. On the other hand, 9-aminoacridrind (9-AA) and 1,8-bis(dimethylamino) naphthalene (DMAN) selectively ionized fatty acids, oxylipins, phospholipids and Vitamin D3. The spatial distribution of metabolites over healthy and intact coffee leaves was performed by MALDI IMS using the three basic matrices: 9-AA, 1,5-DAN y DMAN. The results showed that metabolites identified as phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylglycerol (PG) are distributed over the whole leaves sections whereas the fatty acids and flavonoids are mainly accumulating in the vein. All metabolites by MALDI-MS and MALDI-IMS were detected as deprotonated molecules  $[M-H]^-$  through a Brönsted-Lowry reaction.

---

\* Degree work

\*\* Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Ph.D. Marianny Yajaira Combariza

## INTRODUCCIÓN

El café es el producto más comercializado en el mundo, después del petróleo. La producción mundial de café se concentra en cultivos de las especies arábica y la robusta. Las primeras plantaciones de café se establecieron en Etiopía y la península Árabe, de donde posteriormente las plantas fueron llevadas a América latina y Asia. La especie arábica, que se caracteriza por su buen aroma, sabor y calidad, se cultiva en Colombia y representa el 60% de la producción mundial. La especie robusta, por otra parte, se caracteriza por su sabor amargo, mayor contenido de cafeína y resistencia a las enfermedades.[1]

El rendimiento de los cultivos de café en Colombia está determinado no solo por las condiciones agroclimáticas del cultivo, sino también por su susceptibilidad a enfermedades. La Roya de cafeto, causada por el hongo *Hemileia Vastatrix*, es una enfermedad que afecta a las plantaciones de café a nivel mundial. Esta enfermedad genera una disminución en la productividad del cultivo ocasionando cuantiosas pérdidas económicas para la industria del café. En Colombia la producción de café paso de 12.6 millones de sacos de 60 Kg en 2007 a 7.7 millones de sacos en 2012.[2] Esta enfermedad se caracteriza por provocar la caída de las hojas de forma prematura, debido a una reducción de su capacidad fotosintética lo que debilita la planta hasta causar su muerte.<sup>3</sup> Aunque existe abundante información bioquímica y molecular sobre el progreso de la enfermedad en las hojas de café, toda esta información proviene de análisis bioquímicos, genéticos y fisicoquímicos de material vegetal homogeneizado, es decir, no intacto.

La identificación directa de metabolitos en hojas de café es útil para hacer seguimiento espacio-temporal de sustancias específicas que se producen, o se inhiben, cuando la planta reacciona a procesos infecciosos. En el caso de la roya del café, muchos de estos metabolitos son de tipo lipídico de acuerdo a resultados

de Cenicafe que no han sido publicados. Los lípidos son químicamente diversos y cumplen múltiples funciones biológicas: actúan como componentes estructurales de las membranas celulares vegetales y son moléculas señalizadoras que participan en los mecanismos de defensa en la planta. Consecuentemente, es importante el desarrollo de metodologías analíticas que permitan el mapeo de este tipo de moléculas sobre la superficie de tejidos vegetales (hojas, flores, frutos, raíces, semillas, etc). [4,5,6,7]

La espectrometría de masas de imágenes (*Imaging Mass Spectrometry*, IMS) es una técnica analítica novedosa que permite mostrar la distribución espacial y la abundancia relativa de metabolitos sobre tejidos animales y vegetales intactos. [8,9,10,11] La técnica cuenta con una buena resolución espacial y no requiere ningún tipo de extracción, purificación o separación previa de los analitos de interés. [12,4] Existen reportes sobre la aplicación de IMS para determinar la distribución espacial de metabolitos en hojas de plantas de especies como el berro de Thale (*Arabidopsis thaliana*) [6,5], la palmera datilera (*Phoenix sp.*) [5], y en hojas de maíz (*Zea mays* L). [13] Sin embargo, hasta el momento no existe una publicación relacionada con la distribución espacial de metabolitos en hojas de café. Por esta razón, en asocio con el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafe) desarrollamos una metodología experimental basada en IMS, utilizando un equipo MALDI-TOF, para determinar la distribución espacial de lípidos sobre la superficie de hojas de café sanas de la especie *Coffea arabica*. El desarrollo de este tipo de aplicaciones es importante porque sienta las bases para realizar el seguimiento de metabolitos expresados o inhibidos en las hojas de café durante las diferentes fases de la enfermedad. Por otra parte, el análisis espacio-temporal de la composición del material vegetal puede también relacionarse con información genética, transcriptómica y proteómica de la planta para establecer las rutas metabólicas asociadas a esta enfermedad.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología analítica por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS en modo ion negativo, para obtener la distribución espacial de metabolitos presentes en la superficie de hojas de café.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar una metodología analítica, basada en MALDI-TOF/MS, para identificar moléculas de interés como lípidos, en *target* y en la superficie de la hoja de café.

Diseñar una metodología para la preservación y recubrimiento (con matriz apropiada) de las hojas de café.

Obtener las imágenes con la distribución espacial de los lípidos presentes en la superficie de la hoja de café.

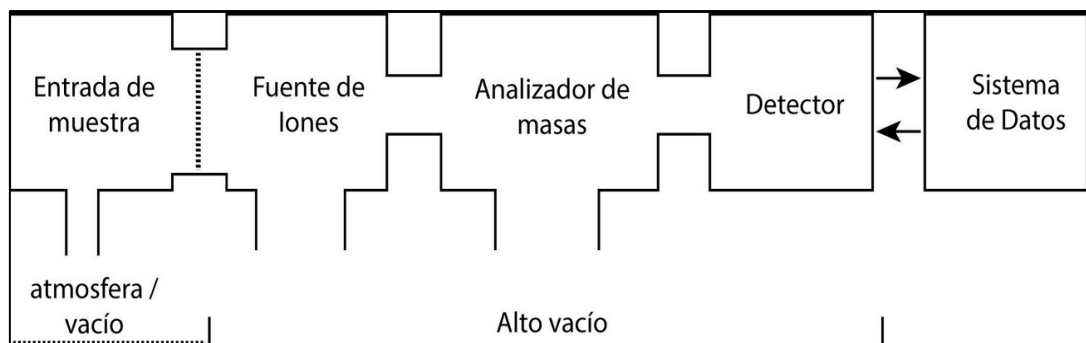
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite identificar la composición elemental, la estructura y la masa monoisotópica de moléculas orgánicas e inorgánicas, por medio de la formación de especies cargadas o iones que son clasificados de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ).

Un espectrómetro de masas está compuesto por una fuente de ionización (a presión atmosférica o a alto vacío), un analizador de masas y un detector que operan en alto vacío (Figura 1). [14]

**Figura 1.** Esquema general de los componentes de un espectrómetro de masas[15]



En la fuente o cámara de ionización se forman iones del analito (positivos o negativos) dependiendo del mecanismo de operación de la fuente. Hay que mencionar, además, que la fuente de ionización de los analitos se puede dividir en dos categorías: ionización por desorción o ionización por fase gaseosa. En el primer caso, la muestra se transforma directamente en iones gaseosos, este tipo de fuentes se utilizan para tratar muestras no volátiles y térmicamente inestables. En

el segundo caso, primero se volatiliza y después se ioniza en fase gaseosa. Adicionalmente, estas fuentes de ionización se pueden clasificar en “suaves” y “fuertes”, con respecto a los procesos de ionización fuertes estos se producen por colisión con electrones acelerados de alta energía (ionización por impacto electrónico EI) que pueden causar la fragmentación de la molécula. A su vez, los procesos de ionización suaves producen poca fragmentación de la moléculas, entre estos encontramos la ionización química (CI), que consiste en colisionar la muestra con los iones producidos al bombardear un gas reactivo con electrones, desorción por campo (FD) que usa como agente ionizante un electrodo de elevada potencia, desorción e ionización por láser asistida por una matriz (MALDI), ionización por electro-nebulización (ESI), desorción por plasma (PD), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) y fuentes de bombardeo con átomos rápidos (FAB). [14,15]

Dependiendo del proceso de ionización se pueden formar diversos tipos de especies cargadas en la fuente tales como moléculas protonadas  $[M + H]^+$  o deprotonadas  $[M - H]^-$ , iones moleculares de tipo catión o anión radical ( $M^+$ ,  $M^-$ ), aductos, clusters e incluso fragmentos del analito si la ionización es “fuerte”. Las especies cargadas, generadas en la cámara de ionización, son introducidas en el analizador de masas y separadas de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ) por medio de campos eléctricos, magnéticos, cuadrupolares y en un tubo de vuelo. Una vez separados en el analizador los iones alcanzan el detector que convierte el flujo de iones en una señal eléctrica que se amplifica y almacena para generar una corriente iónica o abundancia en función de la relación  $m/z$  de los iones; la representación gráfica de la abundancia versus los valores  $m/z$  se conoce como espectro de masas.

## 2.2 IONIZACIÓN POR DESORCIÓN LÁSER ASISTIDA POR UNA MATRIZ (Matrix Assited Laser Desorption Ionization, MALDI)

MALDI es una técnica de ionización suave que permite la formación de iones intactos del analito en fase gaseosa. En esta técnica se hace incidir una fuente de radiación pulsada (láser) sobre una mezcla del analito con una matriz orgánica (molécula de bajo peso molecular y alta absortividad molar a la longitud de onda del láser) cuya función es asistir en los procesos de desorción e ionización del analito (Figura 2). Tradicionalmente, la matriz se mezcla en exceso (por ejemplo 1000:1 hasta 1000000:1) con el analito cuando se quieren producir moléculas protonadas o cationes radicales del analito. Sin embargo, en procesos en los que se persigue producir moléculas deprotonadas del analito se utilizan cantidades equimolares de matriz: analito. La razón para el uso de esta relación molar radica en el tipo de proceso de deprotonación que sucede en fase líquida, reacción tipo Bronsted-Lowry, donde la matriz -de alta basicidad- “secuestra” un protón del analito preformando aniones en fase líquida que permanecen en la fase sólida (debido a la presencia de la matriz) y que luego son desorbidos a la fase gaseosa.[16]

La preparación de la muestra en MALDI, sobre una superficie sólida metálica, se realiza a través de diferentes métodos como: “*dried droplet*”, “*thin layer*”, y “*double layer*”. [17] En el método “*dried droplet*” se preparan soluciones individuales de la matriz y el analito y posteriormente se mezclan volúmenes iguales de ambas soluciones. La mezcla resultante se homogeneiza y se adiciona en un portamuestras metálico donde se deja secar a temperatura ambiente. Con el método “*thin layer*” la solución que contiene la matriz se deposita primero en el portamuestras metálico y una vez se ha secado, se aplica la solución que contiene el analito. Con este método de preparación pueden obtenerse tamaños homogéneos de los cristales de la matriz mejorando la resolución del espectro de masas y el límite de detección de los analitos.[18] Finalmente, la preparación de muestra por el método “*double layer*”, representa una combinación de los dos

métodos mencionados anteriormente. En este caso, primero se deposita la solución de la matriz y posteriormente una mezcla de matriz/analito.

### **2.3 IONIZACIÓN EN MALDI**

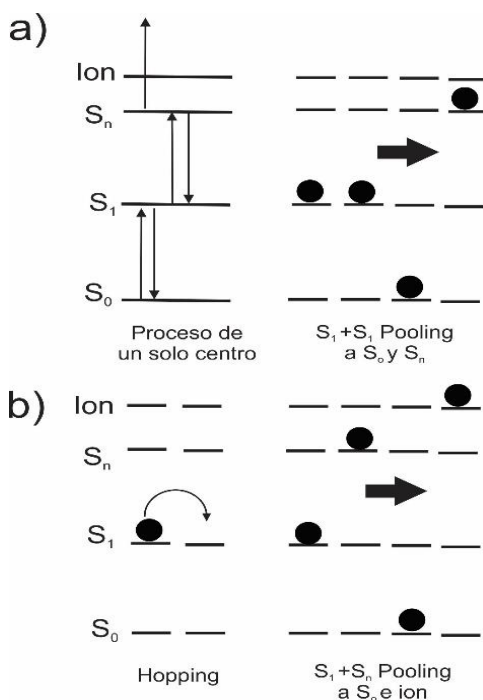
En la fuente de ionización MALDI es posible formar diferentes especies cargadas tales como: moléculas protonadas y deprotonadas, aniones y cationes radicales, y iones aductos de sodio y potasio.<sup>15</sup> El proceso de formación de iones en MALDI se divide en dos etapas: una ionización primaria y una ionización secundaria. La formación de iones primarios es un proceso rápido ( $10^{-9}$  s) cuyo mecanismo es aún motivo de debate dentro de la comunidad científica.[19] Por otro lado, la ionización secundaria transcurre en una escala de tiempo mayor ( $5-10 \times 10^{-9}$  s) y consiste en reacciones ion (matriz) - molécula (analito) en fase gaseosa del material que se desorbe de la fase sólida. A diferencia de la ionización primaria, existe consenso sobre el proceso de transferencia de carga en esta etapa que se sustenta por fenómenos termodinámicos y cinéticos bien definidos.[20,21]

Para explicar la formación inicial de iones en MALDI, se han propuesto hasta el momento dos mecanismos: el mecanismo de formación de “clusters” propuesto por Karas [21] y el mecanismo de “fotoexcitación/pooling” por Knochenmuss [22]. En el primer mecanismo se postula la desorción de clusters formados por iones que fueron preformados en solución y permanecen cargados en fase sólida. Cuando se genera el fenómeno de desorción de la fase sólida, los iones que aun forman parte de los clusters sufren reducciones sucesivas de carga para generar finalmente iones monocargados libres en fase gaseosa. Además, se ha propuesto que los iones del analito pueden producirse de forma alternativa por reacción con iones de la matriz dentro del cluster en fase sólida, por lo que no necesariamente se produce una ionización por interacciones ion (matriz)-molécula (analito) en fase gaseosa.

Por otro lado, el mecanismo conocido como “fotoexcitación/pooling” propone una combinación entre migración de la energía electrónica en la matriz y su

concentración en un proceso conocido como “pooling”. La ionización de la matriz inicia con la fotoexcitación de dos moléculas adyacentes, al primer estado excitado. Si ocurre un solapamiento de sus funciones de onda, las moléculas redistribuyen la energía de dos formas: se mantienen en el primer estado excitado ( $S_1:S_1$ ) o toda la energía de excitación se deposita en una molécula ( $S_n:S_0$ ). La mayoría de las matrices MALDI tienen energías de ionización superiores a tres fotones UV, por lo que el pooling tipo  $S_1 + S_1$  no conduciría a la formación de iones (figura 2a). Sin embargo, el “pooling” de estados excitados  $S_1$  con un estado  $S_n$  (conocido como excitón) es suficiente para la ionización de la matriz (figura 2b). [19]

**Figura 2.** Proceso de formación de iones primarios en MALDI mediante el modelo de fotoexcitación/“pooling”. [19]



\*Excitón: son pseudo-partículas que interaccionan entre sí a través de fuerzas coulumbianas y tiene la capacidad de moverse a través de un cristal transportando energía de excitación electrónica, pero no de carga. [19,20]

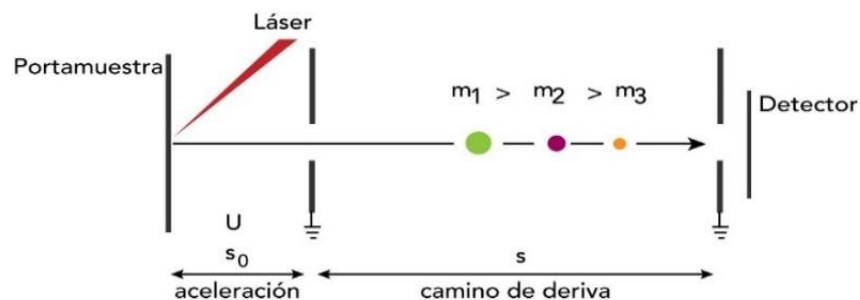
## 2.4 ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO (TOF)

El analizador de masas de tiempo de vuelo o “TOF” por sus siglas en inglés, consiste en un tubo de longitud conocida que permite la separación de los iones en función de su velocidad y el tiempo que tardan en viajar desde la fuente de ionización, generalmente MALDI, hasta el detector (Figura 3). [23]

Los iones generados en la fuente de ionización son acelerados por la aplicación de un pulso eléctrico de tal forma que la energía cinética del paquete de iones es aproximadamente la misma para todas las especies, de acuerdo con la relación  $E_e = qV = E_c = mv^2/2$ . Consecuentemente, la velocidad de los iones de una misma masa es inversamente proporcional a su relación  $m/z$ , lo que se traduce en que los iones más “pesados” tengan menor velocidad que los “livianos” y viceversa.

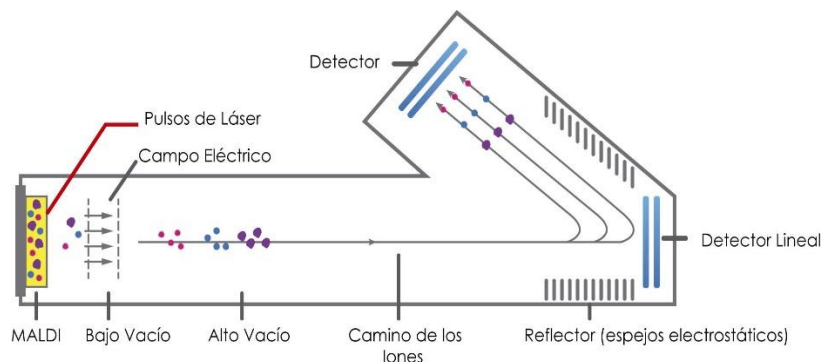
Los procesos de formación y aceleración de iones en el equipo MALDI-TOF resultan en inherente dispersión energética, angular y temporal que pueden afectar seriamente la resolución del espectro de masas. Por esta razón los instrumentos MALDI-TOF cuentan con estrategias para disminuir estas dispersiones antes del pulso de aceleración y después del desplazamiento en tubo. Por ejemplo, la técnica de *Pulsed Ion Extraction* (PIE) [14] permite corregir las distribuciones temporales después de la formación de los iones, pero antes del pulso de aceleración; mientras el mecanismo de reflectrón, que se aplica después de la separación de los iones en el tubo de vuelo, permite corregir las distribuciones de energía cinética de los iones con la misma relación  $m/z$ . [14]

**Figura 3.** Analizador de tiempo de vuelo (TOF) lineal [14]



Típicamente, el analizador TOF tiene tres modos de operación: lineal, reflectrón y tándem (equipos híbridos). En modo lineal, los iones viajan describiendo una trayectoria lineal desde el analizador hacia el detector, mientras que en el modo reflectrón se aplica un campo electrostático para compensar la diferencia en energía cinética de iones con el mismo valor  $m/z$ . De esta manera, los iones mayores energías cinéticas serán retrasados y alcanzados por los iones con menores energías haciendo que todos los iones de la misma relación  $m/z$  alcancen el detector al mismo tiempo (Figura 4). Por otro lado, el modo de operación tándem permite seleccionar un ion específico y fragmentarlo con el fin de elucidar la estructura química de la molécula.

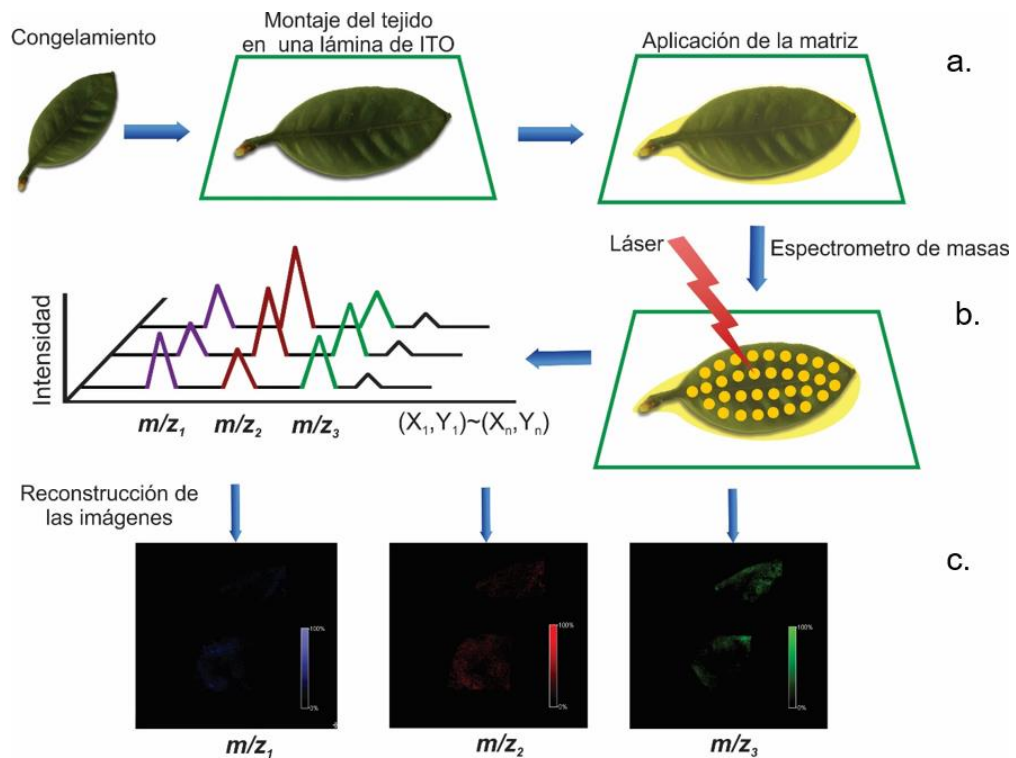
**Figura 4.** Analizador de tiempo de vuelo (TOF) reflectrón [24]



## **2.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES (IMS, *Imaging Mass Spectrometry*)**

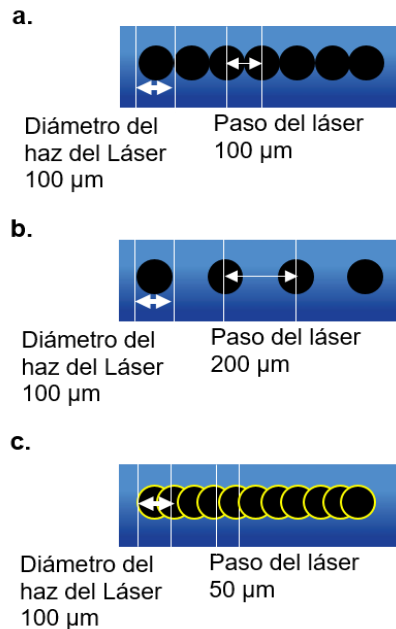
Existe en la actualidad una poderosa metodología emergente para estudiar la distribución de moléculas en sistemas biológicos mediante el análisis directo de cortes micrométricos de tejidos llamada Espectrometría de Masas de Imágenes (*Imaging Mass Spectrometry*, IMS). La generación de imágenes mediante MS se basa en el uso de metodologías de ionización por desorción, como MALDI, para generar imágenes bidimensionales de la composición molecular de un tejido. [25,26,27] El origen de la generación de imágenes por espectrometría de masas se remonta a principios de la década de los 60s. La metodología básica comprende la obtención de una sección delgada de material a analizar (tejido animal o vegetal) el cual se cubre con una fina capa de matriz orgánica con alta capacidad de absorción de fotones en la región UV. Una vez la muestra está recubierta con la matriz se transfiere a la cámara de ionización de espectrómetro de masas para su análisis. En IMS las imágenes son adquiridas en dos dimensiones. El proceso inicia seleccionando el área del tejido que se desea analizar y la resolución espacial que se asocia con el número de píxeles, y la calidad de la imagen. De esta manera, se define previamente el paso del láser creando un patrón de rejilla bidimensional sobre el tejido conformado por puntos denominados píxeles, los cuales corresponden a la separación entre cada disparo del láser (figura 5a). Posteriormente, cada pixel se posiciona para ser impactado por el láser produciendo la desorción e ionización de los analitos. [28] Los iones resultantes se transfieren al analizador de masas TOF y se adquiere un espectro de masas por cada pixel o punto con coordenada x, y sobre el tejido (figura 5b). Finalmente, los espectros de masas obtenidos por cada punto se superponen y cada uno de los iones detectados puede representarse de forma individual sobre la imagen, usando un gradiente de colores que indica la abundancia del ion sobre el tejido (figura 5c). [27,29]

**Figura 5.** Adquisición de una imagen por espectrometría de masas MALDI. a) Sección de tejido cubierta con una matriz MALDI. b) Adquisición de espectros de masas por cada pixel o coordenada x, y sobre el tejido y c) generación de imágenes de los diferentes iones detectados con sus respectivos valores m/z. La abundancia de los iones se representa en la imagen por un gradiente de color.



La adquisición de una imagen se puede realizar usando tres modos de operación. En el primero la distancia entre cada punto de aplicación del láser es igual al diámetro del haz del láser (figura 6a). En el segundo modo de operación, el muestreo se realiza usando un paso mayor (figura 6b) y finalmente el tercero es un sobre muestreo donde el paso del láser se hace mínimo (figura 6c).

**Figura 6.** Representación esquemática de los modos de adquisición de una imagen por MALDI IMS TOF/MS El láser se desplaza punto a punto a través de un tamaño de un paso definido que determina la resolución espacial de la imagen. [28]



En la espectrometría de masas de imágenes MALDI la resolución espacial depende o está influenciada por los siguientes parámetros:

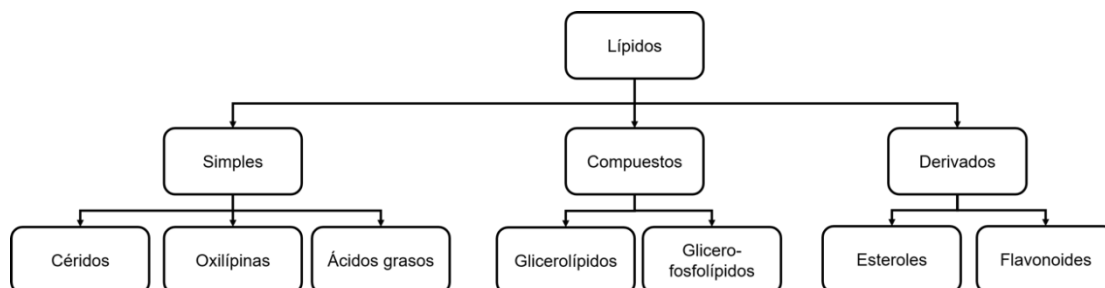
- El diámetro del haz del láser y su movimiento durante la etapa de muestreo, el hardware del espectrómetro de masas y la sensibilidad del instrumento. [30]
- El tamaño y la forma de los cristales de la matriz. [30]
- La aplicación de la matriz: Es un parámetro importante ya que esta co-cristaliza e ioniza los analitos, así mismo se debe mantener la integridad del tejido y evitar la deslocalización de las moléculas de interés. [30]

## 2.6 CLASIFICACIÓN Y FUNCIÓN DE LÍPIDOS EN PLANTAS

Las plantas son una fuente de nutrientes para muchos organismos, tales como bacterias, hongos, insectos y vertebrados. [31] Las plantas han desarrollado una variedad de estructuras (espinas, pared celular) y defensas químicas para detectar organismos invasores y detenerlos antes de que causen graves daños. Como parte de su arsenal químico la planta sintetiza, por ejemplo, compuestos lipídicos que cumplen roles como: precursores biosintéticos de compuestos cuticulares (ácidos grasos, céridos) útiles para la protección de hojas y frutos, captación de luz solar y participación en procesos de transporte de electrones. Estos compuestos son además componentes esenciales de las membranas celulares y también están implicados en los procesos de defensa de la planta pues actúan como mensajeros secundarios en procesos de señalización.

Dependiendo de su estructura los lípidos se clasifican en 3 categorías: simples, compuestos y derivados tal y como se observa en la Figura 7.

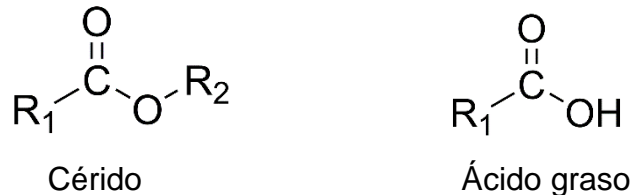
**Figura 7.** Clasificación de lípidos según su estructura



**2.6.1 Lípidos simples.** Los lípidos simples incluyen céridos, oxilipinas y ácidos grasos. Los céridos son ésteres de ácidos grasos, formados por un ácido graso y un alcohol monohidroxilado.[32] En plantas cumplen funciones de protección, aislamiento y lubricación de las hojas, tallos y frutos. Por otra parte, los ácidos grasos poseen en su estructura un ácido carboxílico unido a una cadena alquílica formada por átomos de carbono e hidrógeno. La función principal de estas moléculas es la señalización y modulación de las funciones de proteínas. Adicionalmente, la diversidad de los ácidos grasos radica en la longitud de la cadena alquílica hidrofóbica y la presencia de dobles enlaces en configuración cis-trans así como grupos funcionales.[33] En la Figura 8 se muestran las estructuras generales de céridos y ácidos grasos.

La figura 8 muestra la estructura general de un cérido y ácido graso.

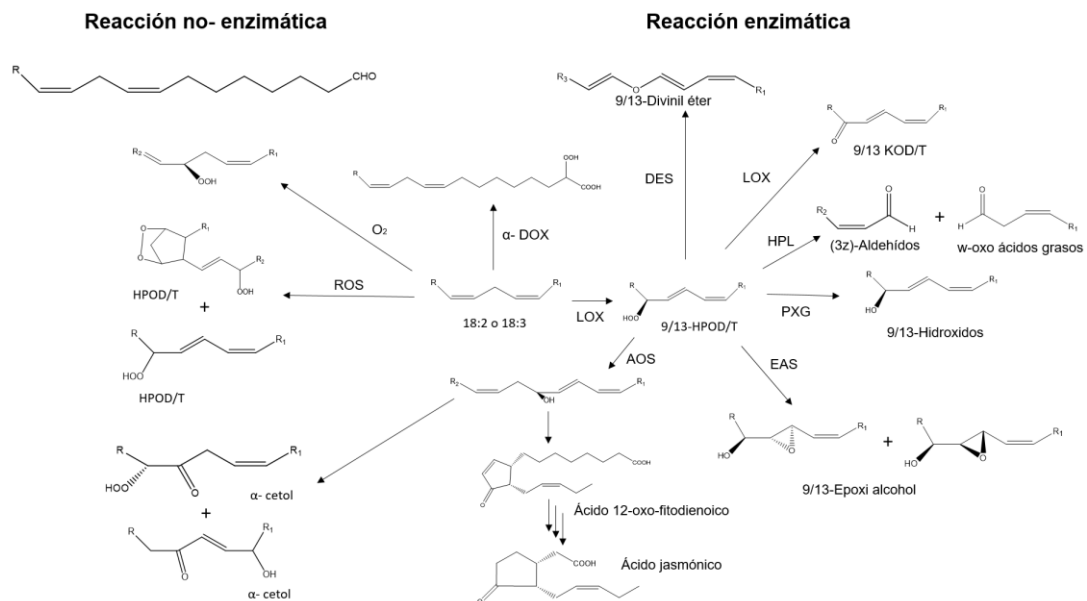
**Figura 8.** Estructura general de un cérido y ácido graso. R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> cadenas hidrocarbonadas.



Las oxilipinas son compuestos derivados de la oxidación del ácido linoléico (18:2) y el ácido alfa-linolénico (18:3) por una ruta biosintética enzimática o por auto-oxidación (Figura 9).[34] Estas moléculas actúan como señalizadores que conducen a la inducción de genes específicos en la planta y regulan el crecimiento y desarrollo. También, están implicadas en la determinación del sexo en órganos reproductivos, en la defensa ante el estrés biótico y abiótico y en la programación de la muerte celular. Adicionalmente, son compuestos antimicrobianos, anti-insecticidas y anti-fúngicos.[35,36] Como se observa en la Figura 9, la formación de oxilipinas

comienza con la conversión de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico (18:3) y el ácido linoleico (18:2) a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. En las reacciones no enzimáticas los ácidos grasos solo se pueden transformar en ácidos grasos hidroxilados por la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Por otro lado, en las reacciones enzimáticas la conversión de los ácidos grasos comienza con las enzimas lipoxigenasa (LOX) y alfa-dioxigenasa (Alfa-DOX), que forma ácido graso hidroperóxido que es metabolizado por otras enzimas para producir epoxy alcoholes, hidróxidos, ceto de ácidos grasos, ácido jasmónico, etc.

**Figura 9.** Ruta biosintética de oxilípinas en plantas por medio de reacciones enzimáticas y no enzimáticas que inician con la conversión de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linolénico (18: 3), (18:2). Divinil éter sintasa (DES); lipoxigenasa (LOX); alfa-dioxigenasa (alfa-DOX); hidroperóxido liasa (HPL); epoxy alcohol sintasa (EAS); peroxigenasa (PXG); aleno óxido sintasa (AOS), R =  $CH_2(CH)_2CH_3$ ;  $R_1 = (CH_2)_7CO_2H$ ;  $R_2$  y  $R_3 = (CH)_2CH_3$ . [35]

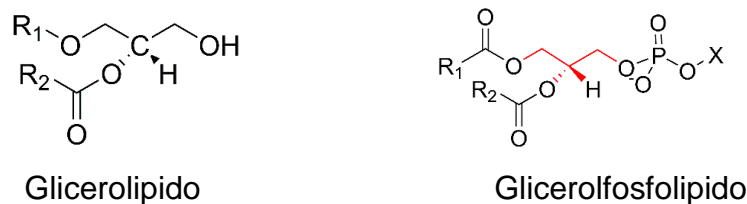


**2.6.2 Lípidos compuestos.** Los lípidos compuestos incluyen glicerolípidos y glicerofosfolípidos. Los glicerolípidos resultan de la esterificación de ácidos grasos

con glicerol y su diversidad depende de la cadena radical y de la posición del enlace. Los glicerolípidos más conocidos son: monoacil (MG), diacil (DG) y triacilgliceroles (TG). Además, pueden contener una o más moléculas de azúcar unidos al glicerol por medio de un enlace glicosídico como los digalactosil-diacil-gliceroles que se encuentran en membranas vegetales.[33]

Por otra parte, los glicerofosfolipidos son moléculas esenciales de las membranas celulares, están involucrados en la proliferación, apoptosis, metabolismo celular y pueden actuar como mensajeros secundarios. Estas especies contienen una molécula de glicerol, dos ácidos grasos, un grupo fosfato y una cabeza polar, que puede ser una base nitrogenada, un glicerol, o un inositol con un enlace fosfodiéster. La diversidad de los glicerofosfolípidos depende de la cabeza polar del ácido fosfórico.[33]

**Figura 10.** Estructura general de un diacilglicerol y un glicerofosfolípido. X: cabeza polar R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> cadenas hidrocarbonadas

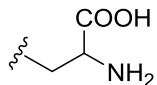
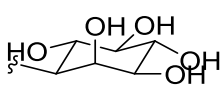
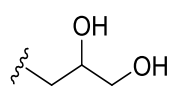


La tabla 1 muestra los diferentes tipos de fosfolípidos presentes en plantas

Tabla 1. Clasificación de los glicerofosfolípidos según su cabeza polar.

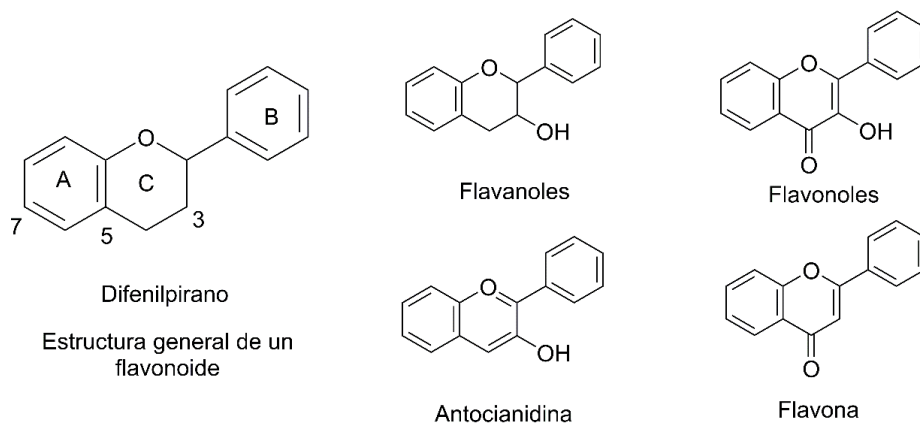
GLICEROFOSFOLÍPIDO	CABEZA POLAR	ABREVIATURA
<b>Fosfatidato</b>	R: H	PA
<b>Fosfatidil colina</b>	R: Colina 	PC
<b>Fosfatidil etanolamina</b>	R: Etanolamina 	PE

Tabla 1. (Continúa)...

<b>Fosfatidil serina</b>	R: Serina 	PS
<b>Fosfatidil inositol</b>	R: Inositol 	PI
<b>Fosfatidil glicerol</b>	R: Glicerol 	PG

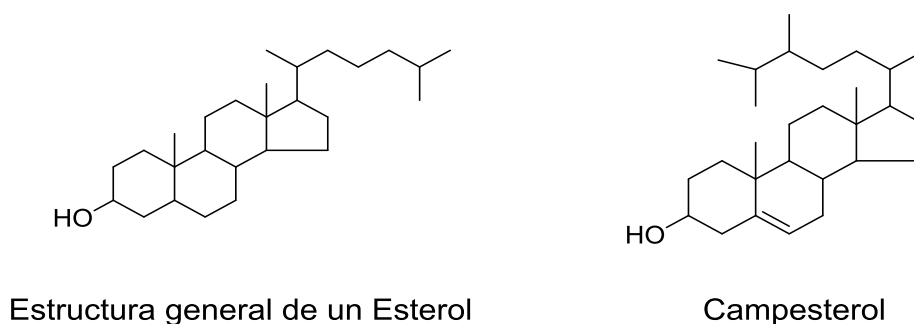
**2.6.3 Lípidos derivados.** Los lípidos derivados están conformados por los flavonoides y esteroides. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que se caracterizan por poseer en su estructura un esqueleto de difenilpiranos (C6-C3-C6) como muestra la figura 11, compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico).[37] Dependiendo de sus características estructurales se pueden clasificar en: flavanoles que poseen un grupo –OH en la posición 3 del anillo C, en flavonoles que tienen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en la posición 3 del anillo C, en flavonas que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3, y las antocianidinas que tienen unido el grupo -OH en posición 3. Además, poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.[38] Estas moléculas cumplen funciones como el transporte de la hormona auxina implicada en el crecimiento de las plantas, resistencia a la fotooxidación UV, pigmentación para atraer polinizadores a las flores, crecimiento, defensa ante los herbívoros y patógenos.[39]

**Figura 11.** Estructura general de los flavonoides



Por otro lado, los esteroides tienen en su estructura un ciclo-pentano-perhidrofenantreno con 17 átomos de carbono que forman cuatro anillos (figura 12). Pueden contener dobles enlaces en diferentes posiciones del anillo, distintos grupos radicales y cadenas laterales largas.[40] El campesterol, estigmasterol y sitosterol son los esteroides más abundantes en las plantas.[41]

**Figura 12.** Estructura básica de un esteroide



## 2.7 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN PLANTAS

La revisión de la literatura científica, en relación con la extracción de lípidos en plantas, señala tres métodos principales. El primero consiste en extracción con

cloroformo-metanol (método de Folch) en el cual inicialmente se forma un sistema monofásico con el agua del tejido que desintegra la estructura de las membranas y extrae los lípidos de los tejidos para obtener especies polares y neutrales. Posteriormente, a la mezcla se adiciona una solución salina con el fin de formar dos fases en las cuales se concentran los compuestos polares (superior) y no polares (inferior). Con este método se ha reportado la extracción de fosfolípidos, triacilgliceroles y galactolípidos como mono-galactosil-diacil-glicerol (MGDG) y di-galactosil-diacil-glicerol (DGDG). [42, 43,44 ,45]

El segundo método de extracción consiste en mezclar el material vegetal con hexano por dos o más días a temperatura ambiente y con agitación ocasional. La mezcla se somete a reflujo, con hexano fresco, durante una hora para re-extraer los lípidos. Con este método se reporta que dependiendo del tiempo de contacto y de la temperatura del reflujo es posible extraer triacilgliceroles y reducir la extracción de fosfolípidos.[46] Con este proceso de extracción se han detectado especies como colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*), repollo (*Brassica olearacea*), rábano (*Rhaphanus sativus*) y puerro (*Chrysanthemum coronarium alium tuberosum*).[47] Además, se reporta que de la planta *Salicornia ramosissima* se han extraído ácidos grasos saturados e insaturados, alcoholes, esteroides, alcanos, terpenos y compuestos aromáticos.[48]

El tercer procedimiento se utiliza para la extracción selectiva de moléculas como flavonoides usando solventes como etanol, metanol, acetato de etilo y sus mezclas. El metanol ha sido reportado como el solvente más eficiente para extraer polifenoles de bajo peso molecular.[49]

## 2.8 ESPECTROMETRÍA DE IMÁGENES EN PLANTAS

La IMS se considera hoy por hoy como una herramienta emergente en el estudio de tejidos vegetales, pues permite el análisis de la distribución espacial de macromoléculas (proteínas) y metabolitos en la superficie de hojas o en secciones transversales de material vegetal (semillas, ramas, etc.). Aunque su uso es aún limitado existen interesantes ejemplos de estudios que incluyen mapeo de metabolitos en la superficie de hojas, caracterización de la translocación de metabolitos solubles en plantas y el seguimiento de patrones de proteínas/metabolitos en secciones transversales de cereales. [50,51,52,53,54,55,56]

Particularmente, en el análisis de lípidos, con esta técnica se ha reportado la visualización simultánea de lípidos neutros, glicolípidos, ácidos grasos, flavonoides y fosfolípidos en hojas, flores, tallos y semillas. [57,8]

Así mismo, usando IMS se han identificado ceras esterificadas en hojas de berro de Thale (*Arabidopsis thaliana*) y de palmera datilera (*Phoenix sp*) en modo ion positivo utilizando LiDHB (2,5-dihidroxibenzoato de litio) como matriz en acetona/diclorometano (9:1), en donde se han detectado múltiples aductos (estos hacen más compleja la identificación y análisis de los espectros) de iones de sodio, litio y potasio. En cuanto a las hojas de *Phoenix sp* se ha observado una distribución homogénea de iones de aductos de litio de ceras esterificadas sobre el tejido. Por último, en la superficie dorsal de las hojas de *Arabidopsis Thaliana* se ha observado una mayor acumulación de las ceras esterificadas sobre el área de la hoja y menor abundancia sobre la sección del pecíolo.[5]

Por ejemplo, matrices básicas como la 9-AA (9-aminoacridina), se han usado para determinar la distribución de glucosinolatos en hojas de *Arabidopsis thaliana* en modo ion negativo. Los resultados muestran que los glucosinolatos se concentran

en la vena central y en la parte exterior de la hoja en comparación con la superficie del tejido.[58] Este tipo de biomoléculas están implicadas en la defensa de la planta contra los animales herbívoros.

Por otra parte, se han empleado las matrices 1,5-DAN (1,5-diaminonaftaleno) y 9-AA en modo ion negativo para la identificación espacial de flavonoides glicosilados y no glicósidos en hojas de maíz. Estos metabolitos se observaron en células epidérmicas de la capa exterior de la hoja, lo cual es consistente con su función como filtros UV y defensa contra patógenos.[13] También, se detectó sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDQ) con una distribución en forma de anillos sobre toda la sección del tejido lo cual coincide con el patrón de distribución de las células fotosintéticas que rodean los haces vasculares.

Adicionalmente, se han identificado fitoalexinas tales como: resveratrol, viniferina y pterostilbeno (compuestos tóxicos producidos por la planta contra patógenos) en hojas de uva. Estas moléculas se detectaron en modo ion positivo utilizando la matriz DHB. Sin embargo, la distribución de estos metabolitos no es homogénea sobre la superficie de la hoja, se encuentra una acumulación sobre las venas y en el tejido del parénquima relacionada con la síntesis de estas moléculas bajo condiciones de estrés por radiación UV. Por otra parte, cuando la hoja de uva (*Cabernet sauvignon*) se infecta con el hongo *Plasmopara viticola* se observó una distribución espacial diferente en relación al resveratrol y la viniferina. Por último, sobre el sitio de infección solo se observó la acumulación de resveratrol, un compuesto menos tóxico para el hongo.[54]

En los estudios anteriores se identificaron diferentes tipos de lípidos implicados en la defensa de la planta, utilizando MALDI-IMS en modo ion negativo y positivo. La distribución espacial indica la presencia de estos metabolitos solo en regiones específicas de la hoja. Adicionalmente, en la literatura no se encuentra ningún reporte sobre la aplicación de la espectrometría de masas MALDI imágenes en

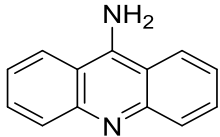
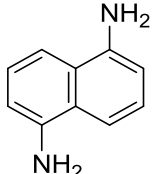
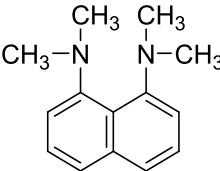
hojas de café. Por esta razón, una identificación espacial de los lípidos presentes sobre la superficie de hojas de café, permitirá identificar los metabolitos implicados en la defensa de la planta y diseñar nuevas estrategias que permitan mitigar enfermedades como la roya. Además, usando espectrometría de masas MALDI-imágenes, es posible determinar la distribución espacial y temporal de los metabolitos que se sobre-expresan o inhiben a lo largo del desarrollo del hongo.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 REACTIVOS

Las Hojas de café sanas pertenecientes a la especie *Coffea arabica* fueron suministradas por el centro nacional de investigación del café, CENICAFÉ. Las hojas fueron conservadas a temperatura ambiente y se mantuvieron en un recipiente cerrado con presencia de luz y bajo un ambiente húmedo. Las matrices MALDI: 9-aminoacridina (9-AA), 1,5 diaminonaftaleno (1,5-DAN) y la 1,8-Bis (dimetil) aminonaftaleno conocida como esponja protónica (DMAN) fueron adquiridas en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). La tabla 1, muestra la estructura química y la masa monoisotópica exacta de cada una de las matrices. Los solventes metanol (CH<sub>3</sub>OH), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y acetonitrilo (ACN) de grado HPLC fueron adquiridos en Merck (Alemania).

**Tabla 2.** Estructura química de las matrices MALDI y sus masas monoisotópicas exactas.

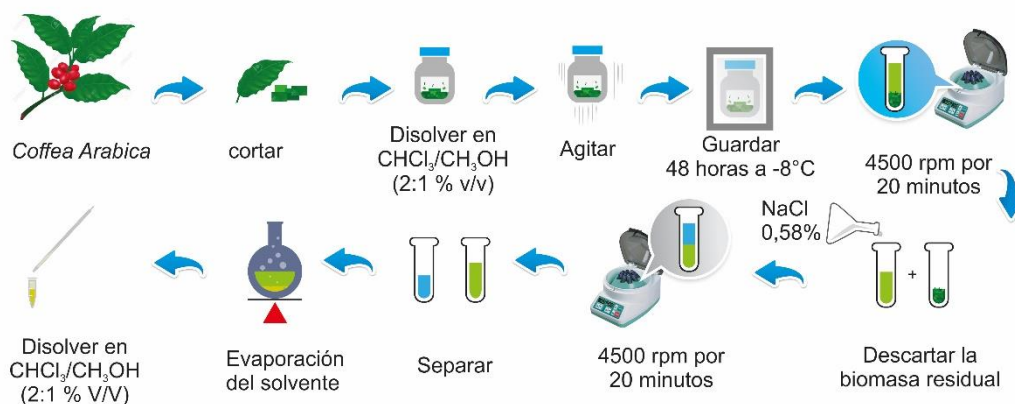
Matriz	Masa monoisotópica	Formula molecular	Estructura
<b>9-Aminoacridina (9-AA)</b>	194.084398	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	
<b>1,5-diaminonaftaleno (1,5-DAN)</b>	158.084398	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	
<b>1,8-Bis (dimetil) aminonaftaleno (DMAN)</b>	214.146998	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	

## 3.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Dependiendo de la polaridad de los analitos de interés se realizaron las siguientes extracciones en las hojas de café.

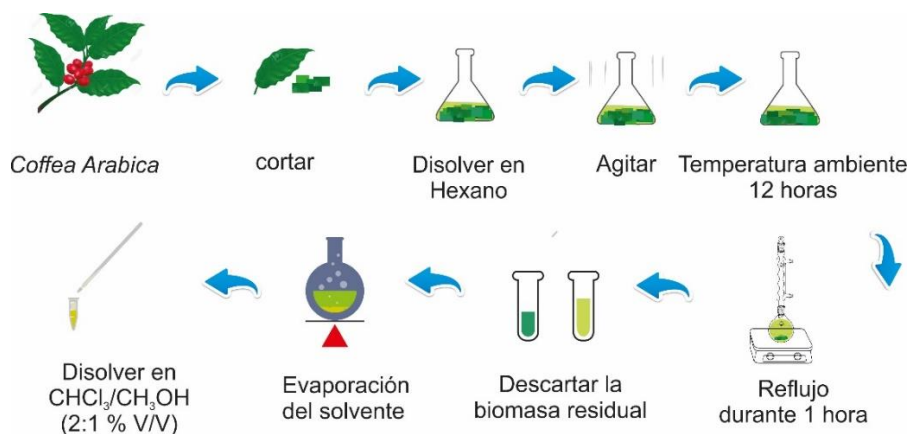
**3.2.1 Extracción con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) /metanol (MeOH) por el método de Folch.** Para este procedimiento se usó 1 g de hojas de café, previamente lavadas y cortadas, que se adicionaron a una solución de cloroformo: metanol (2:1 v/v). La mezcla se agitó en un vortex (Bechmark), a 1000 rpm durante 1 minuto, y se almacenó en un recipiente oscuro por 48 horas a 8°C para favorecer la extracción de los lípidos y evitar una posible degradación de las moléculas. La mezcla se centrifugó para retirar la biomasa residual y se extrajo el sobrenadante, el cual se mezcló con una solución de cloruro de sodio (NaCl, 0,58 %) durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó nuevamente para separar las fases, los lípidos permanecen disueltos en la fase más densa (CHCl<sub>3</sub>). Finalmente, el solvente se eliminó por rotovaporación a una temperatura de 60 °C durante 15 minutos para obtener el extracto lipídico concentrado que se almacenó a -20°C hasta el análisis por espectrometría de masas.

**Figura 13.** Protocolo para la extracción de lípidos usando cloroformo/metanol.



**3.2.2 Extracción de lípidos usando hexano.** A 1g de hojas de café, previamente cortadas y lavadas con agua desionizada (MilliQ <18 MΩ/cm), se adicionaron 15 mL de hexano. La mezcla se almacenó por 12 horas y posteriormente se sometió a reflujo durante 1 hora. La biomasa residual se descartó y la solución hexano/lípidos se concentró para obtener un extracto final que se almacenó a -20°C.

**Figura 14.** Protocolo para la extracción de lípidos usando hexano



**3.2.3 Extracción de lípidos de las hojas de café usando metanol.** 1 g de hojas de café previamente lavadas y cortadas se adicionaron a un recipiente con 30 mL de metanol. La mezcla resultante fue sometida a ultrasonido (Branson 3800) a una frecuencia de 40 kHz por 30 minutos a temperatura ambiente. El extracto lipídico fue concentrado en un rotovaporador y disuelto en 1 mL de metanol.

**Figura 15.** Protocolo para la extracción de lípidos utilizando metanol



Debido a que no hay reportes específicos de lípidos en hojas de café, se realizó un análisis de los extractos por MALDI-TOF con el fin de identificar qué tipos de lípidos están presentes, determinar la energía por pulso del láser y la matriz adecuada para ionizar estos metabolitos en modo ion negativo.

### 3.2.4 Espectrometría de masas MALDI:

**3.2.4.1 Preparación de la muestra.** Todos los extractos lipídicos aislados usando cloroformo: metanol (2:1) y hexano, se re-disolvieron en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 % v/v) y los extractos obtenidos con metanol nuevamente en este solvente a una concentración de 10000 ppm. Todas las matrices MALDI utilizadas se prepararon a una concentración de 500 ppm. Las matrices 9-AA fue disuelta en metanol mientras que las matrices 1,5-DAN y DMAN fueron disueltas en una mezcla de acetonitrilo/agua a 50:50 % v/v y 75:25 % v/v, respectivamente. Se mezclaron volúmenes iguales de los extractos lipídicos y las soluciones de las matrices por 10 minutos a 1000 rpm en un vórtex (Beckmark). Finalmente, 1 $\mu$ L de la mezcla se depositó en una porta muestras metálico de acero inoxidable y se dejó secar por 30 minutos (*dried droplet*).

## Espectrometría de masas MALDI-TOF

Para el análisis de los lípidos extraídos de las hojas de café se utilizó un espectrómetro de masas MALDI ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipado con un láser de Nd:YAG de 355 nm y acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) operado en modo ion negativo y reflectrón. Las condiciones de la fuente de ionización MALDI fueron: fuente 1: 19.99 kV, fuente dos: 17.98 kV, lentes: 6 kV, reflectron uno: 21.20 kV, reflectron dos: 10.78 kV.

La calibración del instrumento se realizó utilizando una solución estándar de ftalocianinas y la matriz 1,5-diaminonaftaleno (1,5-DAN) en acetonitrilo/agua (50:50 % v/v), en el rango de 100 a 1500 Da.

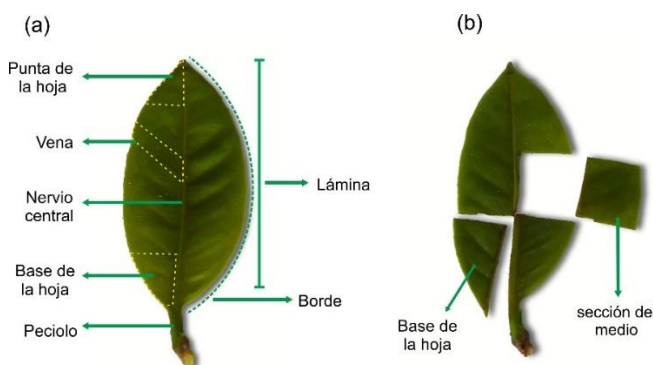
Los espectros de masas corresponden a la sumatoria de 4000 espectros adquiridos en 8 pulsos de 500 disparos. Las señales obtenidas en el espectro de masas con relación S/N >15 y abundancia relativa mayor al 10% fueron exportadas a la base de datos LIPID MAPS<sup>1</sup> con la cual se realizó la identificación de las especies iónicas detectadas de acuerdo con su valor  $m/z$  y el patrón isotópico de las moléculas. Por otra parte, la base de datos KNAPSACK (<http://kanaya.naist.jp>) permitió, mediante la fórmula molecular corroborar si los lípidos asignados previamente en el LIPID MAPS corresponden a una especie de origen vegetal.

---

<sup>1</sup> LIPIDMAPS. Definition Tools. Disponible en: <http://www.lipidmaps.org/tools/index.html>

**3.2.4.2 Espectrometría de masas de imágenes-MALDI.** Se tomó una hoja de café de la especie *Coffea arabica* y se lavó con abundante agua desionizada (MilliQ <18 MΩ/cm) para eliminar impurezas adheridas en la superficie (Figura 16a). Después, se realizó dos cortes irregulares correspondientes a las secciones de la base y la mitad de la hoja (figura 16b) para evitar la saturación de la cámara de ionización, asegurar el vacío y mantener estables los voltajes del espectrómetro. Los cortes del tejido vegetal fueron congelados de forma gradual utilizando hielo seco, para ser puestos sobre una cinta conductora de carbono adherida previamente a un portaobjetos de vidrio impregnado de óxido de indio y estaño (ITO). Finalmente, la placa de vidrio con las secciones de la hoja fue sometida a un proceso de liofilización (Labconco) durante 10 horas con el objetivo de asegurar deshidratación del tejido y adherencia completa a la cinta (Figura 17).

**Figura 16.** (a) Partes típicas en una hoja de café y (b) cortes de la hoja seleccionados para el análisis por MALDI-MSI.



Para el análisis por espectrometría de masas se utilizaron soluciones de tres matrices MALDI a una concentración de 10000 ppm. La matriz 9-AA se disolvió en metanol y las matrices 1,5-DAN y DMAN se disolvieron en acetonitrilo:agua (75:25 v/v). La aplicación de la matriz sobre el tejido vegetal se realizó bajo condiciones

controladas utilizando un dispersor conocido comercialmente como Imageprep™ (Bruker Daltonics, Alemania). Este proceso se realizó en tres ciclos, cada uno compuesto por tres etapas: dispersión de la matriz, incubación y secado. El proceso de incubación, el porcentaje de humedad en el tejido y el espesor de la capa de la matriz aplicada son parámetros importantes que deben modificarse para asegurar la ionización de los metabolitos de interés. Finalmente, la placa de vidrio con las hojas adheridas fue almacenada al vacío en un desecador para completar el ciclo de secado de la matriz y preservar la muestra antes del análisis por espectrometría de masas.

**Figura 17.** Protocolo de preparación del tejido para MALDI-IMS



El análisis por espectrometría de masas de imágenes MALDI se realizó en un analizador de tiempo de vuelo (Bruker, Daltonics Billerica MA, USA) acoplado a una fuente de ionización MALDI operada en modo ion negativo con un láser de Nd:YAG de 355 nm y una frecuencia de 1000 Hz. Las condiciones de la fuente de ionización

MALDI fueron: fuente de ionización uno y dos fueron de 19.99 kV y 17.74 kV, respectivamente. El reflectrón uno fue operado a: 20.98 kV y el reflector dos a 10.62 kV. Los lentes fueron operados a 5.50 kV.

La calibración del instrumento se realizó utilizando una solución estándar de ftalocianinas y la matriz 1,5-diaminonaftaleno (1,5-DAN) en acetonitrilo/agua (50:50 % v/v), en el rango de 100 a 1500 Da que se aplicó sobre la cinta conductora previamente adherida a la lámina de ITO.

La energía del láser fue optimizada para cada matriz ajustando un valor umbral de 50%(2.66  $\mu\text{J/pulso}$ ) para la 9-AA, 40%(1.79  $\mu\text{J/pulso}$ ) para la 1,5-DAN y 60% (3.92  $\mu\text{J/pulso}$ ) para la DMAN.

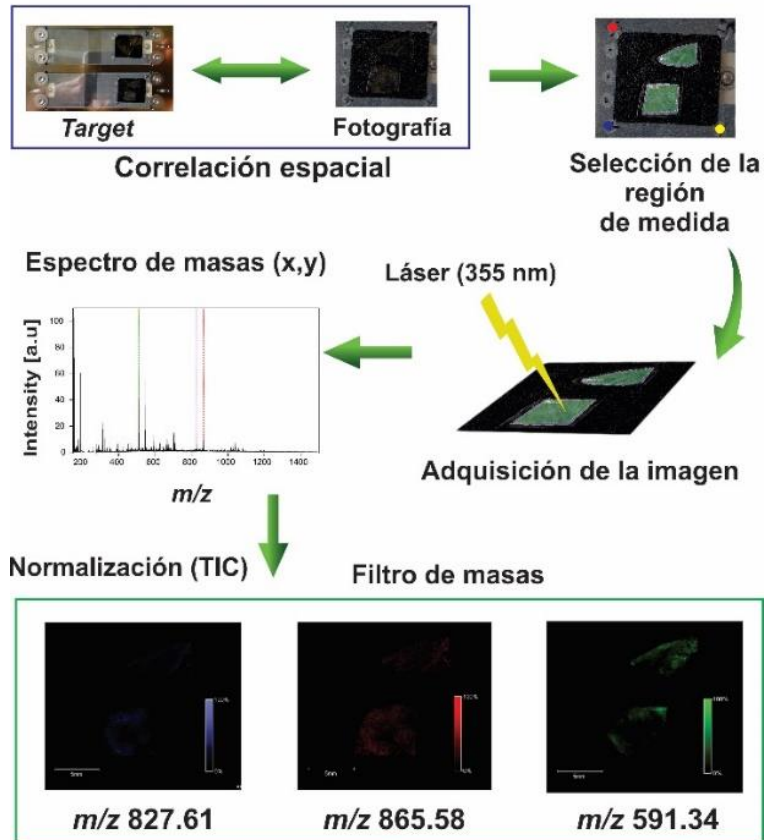
Los espectros de masas fueron adquiridos con el analizador de tiempo de vuelo operado en modo reflectrón en un rango de 100-1500  $m/z$ . Se usaron 100 disparos de láser de forma aleatoria y automática y se acumularon 100 espectros de masas por cada punto. El modo de adquisición de la imagen se realizó con un paso del láser de 100  $\mu\text{m}$  para un valor de 10000 pixeles/ $\text{cm}^2$ .

Los espectros de masas obtenidos fueron recalibrados y normalizados aplicando el método TIC (Total Ion Current). El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el software FLEXIMAGING (Bruker Daltonics, Alemania). Los experimentos mostraron espectros con una buena relación señal a ruido y se observaron señales correspondientes a iones deprotonados  $[\text{M-H}]^-$ .

En la figura 18 se muestra el proceso para la obtención de una imagen en MALDI. Inicialmente se realiza una correlación espacial de la fotografía con la posición que posee la muestra en el *target*. Posteriormente, en el software Fleximaging se verifica la posición de la muestra y se determina la región de medida, luego se obtiene el espectro de masas correspondiente para cada pixel y se adquieren las imágenes.

**Figura 18.** Proceso de adquisición de imágenes por MALDI MSI.

**Espectrometría de masas de imágenes ( Fleximaging )**



## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 4.1 ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR MALDI-TOF/MS.

En el análisis del extracto lipídico obtenido con cloroformo/metanol utilizando 9-AA, 1,5-DAN y DMAN como matrices, se identificaron exclusivamente moléculas deprotonadas  $[M - H]^-$ , en la región de  $m/z$  de 200 a 900, correspondientes a moléculas de fosfolípidos, ácidos grasos, oxilipinas, vitamina D3 y un flavonoide no glucosilado. Las moléculas 9-AA, 1,5-DAN y DMAN son bases fuertes con la capacidad de abstraer protones de moléculas ácidas. En espectrometría de masas MALDI se ha reportado que el uso de estas estructuras, como matrices, permite la estabilización de los aniones tanto en fase líquida como sólida, lo que permite asimismo su transferencia a la fase gaseosa una vez se aplica la radiación láser. [59,60,61,62,63] La tabla 3 muestra los valores de  $pK_a$  para cada matriz.

**Tabla 3.** Valores de  $pK_a$  para las matrices MALDI empleadas

<b>Matriz</b>	<b><math>pK_a</math></b>
<b>9-AA</b>	9.99
<b>1,5-DAN</b>	9.47
<b>DMAN</b>	12.1

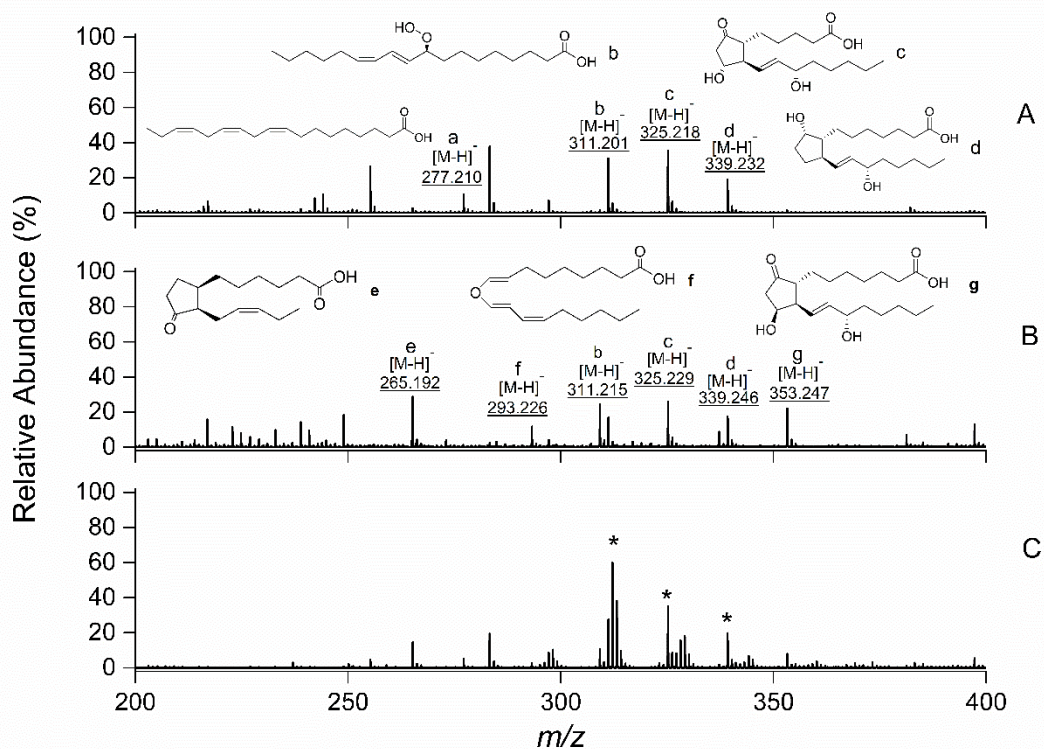
En el espectro de masas del extracto lipídico obtenido con cloroformo-metanol tomado con la matriz 1,5-DAN se asignaron fórmulas moleculares con una relación  $m/z$  mayor a 400 debido a que esta matriz posee señales en el rango de masas bajo que interfieren en el análisis como muestra figura 19 en su inciso (C).

La matriz DMAN, a diferencia del 1,5-DAN, no forma iones moleculares, clusters o aductos en la región de masas bajas lo que permite observar analitos de bajo peso

molecular (figura 19A). Esta matriz se caracteriza por su alta basicidad (pKa 12.1) [59] lo que promueve reacciones eficientes de deprotonación de tipo Bronsted-Lowry con analitos ácidos.[16] La DMAN recibe el protón para formar un catión bastante estable lo que evita señales interferentes en el espectro de masas cuando el instrumento opera en modo ion negativo. La mayor basicidad del DMAN le permite la formación de moléculas deprotonadas de analitos como el ácido alfa-linolénico y el ácido-9S-hidroperoxi-10E-12Z-octadecadienoico (figura19B) que poseen un pKa de 4.77 y 4.68, respectivamente.

En contraste con la DMAN, el espectro de masas obtenido con la 9-AA (figura 19B) muestra una señal característica de la matriz correspondiente a la molécula deprotonada en  $m/z$  193.105. Sin embargo, los lípidos identificados con esta matriz se encuentran en un rango de masas de  $m/z$  250 a 800 donde no se presentan interferencias asociadas con la matriz.

**Figura 19.** Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con cloroformo: metanol usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) ácido alfa linolénico (m/z 277.210); b) ácido-9S-hidroperoxi-10E-12Z-octadecadienoico (m/z 311.201); c) ácido-9-oxo-11R-15S-dihidroxi-2,3-dinor-13E-prostenoico (m/z 325.218); d) 11-deoxi-prostagladina F1a (m/z 339.232); e) ácido (9R, 13R)-1a, 1b-dinor-10,11-dihidro-12-oxo-15-fitoenoico (m/z 265.192); f) ácido colneleico m/z 293.226); g) ácido 9-oxo-11S,15S-dihidroxi-13E-prostaenoico (m/z 353.247).



\* Señales correspondiente a iones de la matriz 1,5-DAN

\*\*Los errores en ppm para la asignación de cada una de las señales en los espectros A, B y C de la figura 19 se muestran en el anexo A.

Cuando se compara el espectro de masas MALDI del extracto lipídico obtenido con las matrices DMAN y 9-AA, se identifica la presencia de señales comunes correspondientes a metabolitos como las oxilipinas detectadas en la región de m/z

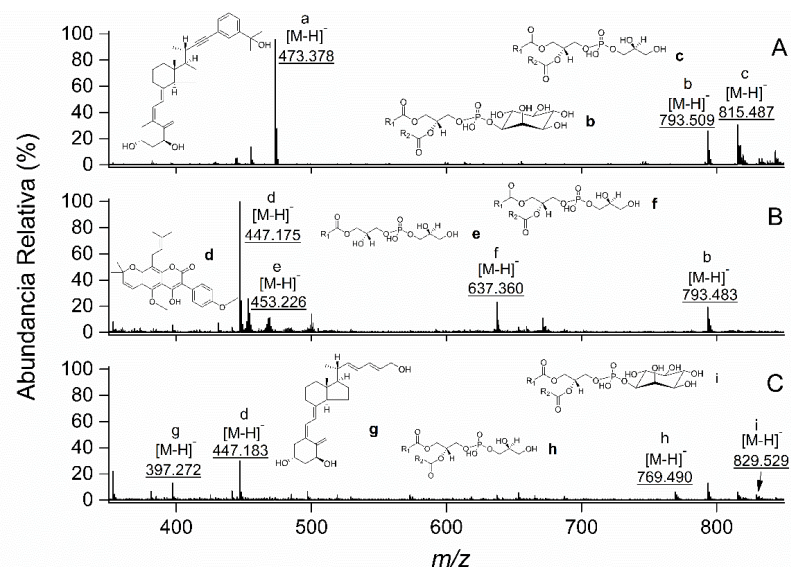
260 a 400. Sin embargo, se observó que la 9-AA tiene mayor selectividad hacia la ionización de oxilipinas que poseen un anillo en su estructura. En contraste, la matriz DMAN permitió la identificación del ácido graso alfa-linolénico, previamente reportado en hojas de café de la especie *Coffea arabica*, *Canephora Pierre*, *Ebracteolata*, *Excelsa cheval*, *Liberica* entre otras.[64]

En plantas, los ácidos grasos y las oxilipinas están implicados en los procesos de defensa contra patógenos. Además, se ha demostrado que los ácidos grasos libres sirven para repeler ciertas especies de insectos y actúan como moléculas señalizadoras. Adicionalmente, se ha observado que estos compuestos pueden regular la esporulación, desarrollo de la estructura sexual y colonización de patógenos. Por ejemplo, el ácido colneleico con  $m/z$  en 293.226 identificado en los extractos de cloroformo-metanol utilizando 9-AA (figura 19B) también se ha reportado en la hoja de papa[65] cuando la planta es atacada por hongos o virus.[66] Por otra parte, el ácido 9S-hidroperoxi-10E,12Z-octadecadienoico (9S-HpODE) con  $m/z$  311.201 (figura 19 A,B) y el ácido graso alfa-linolénico con  $m/z$  277.210, también identificados en los extractos, promueven la producción de esporas y mitocoxinas de hongos en la planta incluso en baja concentración.[35]

Por lo que se refiere al espectro de masas del extracto lipídico obtenido con cloroformo-metanol combinado con las tres matrices MALDI en el rango de  $m/z$  350 a 850 (figura 20), se observaron principalmente señales correspondientes a fosfolípidos tipo glicerol (PG) e inositol (PI) que se extraen fácilmente cuando se usa la mezcla de cloroformo-metanol. Estas moléculas han sido detectadas por MALDI-TOF/MS en modo ion negativo gracias a su carácter ácido, con valores de pKa de 2.5 y 2.9 para PI y PG, respectivamente.<sup>67</sup> De esta manera, la matrices DMAN, 9-AA y 1,5-DAN que posee un carácter básico, puede tomar un protón ácido para formar moléculas deprotonados de los analitos  $[M - H]^-$ . Estas especies se caracterizan por tener una cabeza polar unida a un grupo fosfato. Además, pueden estabilizar la carga negativa en el grupo fosfato, debido a la presencia de oxígenos

que forman un doble enlace con el átomo de fósforo. Adicionalmente, estos metabolitos en las plantas actúan como mensajeros secundarios y son los componentes principales de la membrana celular. Por último, en los tejidos vegetales los PG tiene una mayor proporción en comparación con otros fosfolípidos porque es el único que se encuentra con la clorofila y está implicado en los procesos de fotosíntesis. En hojas de café estas especies han sido reportadas.[64]

**Figura 20.** Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con cloroformo:metanol usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) vitamina D3 ( $m/z$  473.378) b) PI(12:0/19:1(9Z)) ( $m/z$  793.509); c) PG(18:3(6Z,9Z,12Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) ( $m/z$  815.487); d) Lonchocarpenin ( $m/z$  447.175); e) PG (14:1(9Z)/0:0) ( $m/z$  453.226); f) PG (12:0/14:0) ( $m/z$  637.354); g) 5Z,7E,22E,24E)-(1S,3R)-27-nor-9,10-seco-5,7,10(19),22,24-colestapentaene-1,3,26-triol ( $m/z$  397.272); h) PG(18:1(9Z)/18:3(6Z,9Z,12Z)) ( $m/z$  769.480); i) PI(12:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)) ( $m/z$  829.529).



*\*\*Los errores en ppm para la asignación de cada una de las señales en los espectros A, B y C de la figura 20 se muestran en el anexo B.*

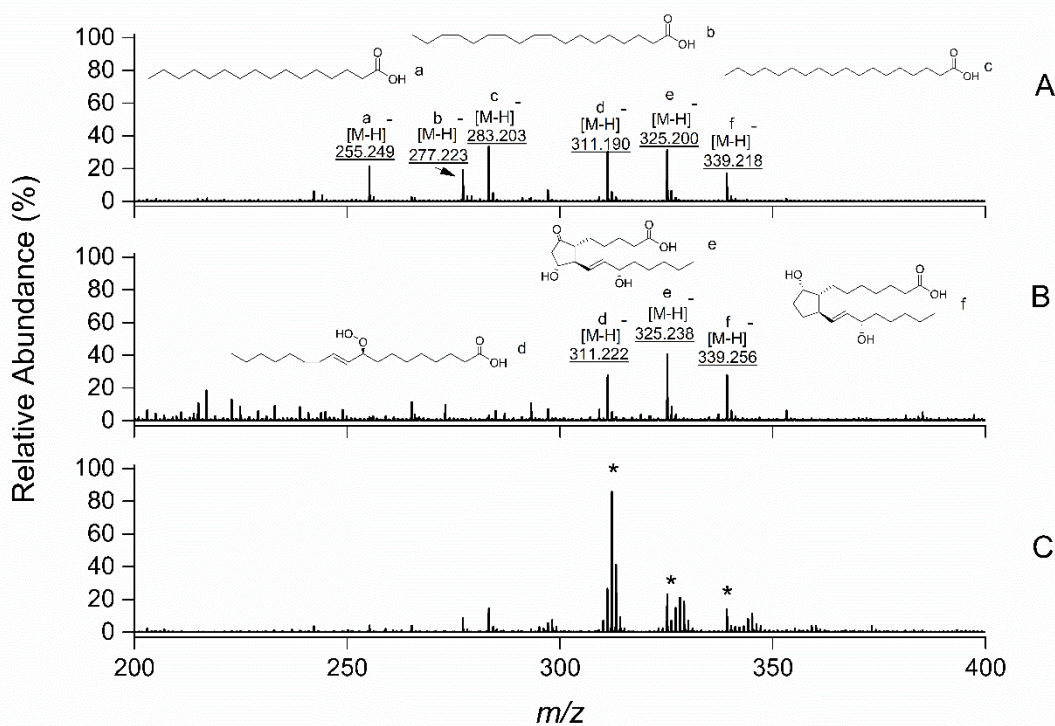
En el espectro anterior dos moléculas de tipo vitamina D3 fueron detectadas con la matriz 9-AA y DMAN como moléculas deprotonadas  $[M - H]^-$  con  $m/z$  de 397.272 y 473.378, respectivamente. La vitamina D3 se ha identificado en hojas de *lycopersicon esculentum*, *Solanum lycopersium*, *Solanum glaucophyllum* Desf., *Cestrum diurnum* L y en *Nicotiana glauca* Graham. No obstante, la función que cumplen esta molécula en plantas aún no es clara.<sup>68</sup> Adicionalmente, se ha reportado que este metabolito se han extraído utilizando cloroformo.

Así mismo, al comparar los espectros obtenidos con la 9-AA y la 1,5-DAN se observa la detección, con ambas matrices, de un flavonoide no glicosilado con  $m/z$  en 447.175.

Otro solvente utilizado para la extracción de los lípidos en hojas de café es el hexano, que tiene la capacidad de extraer lípidos apolares, ligeramente polares y especies polares como fosfolípidos.[46,47,48] En el extracto lipídico obtenido con hexano, utilizando DMAN, 9-AA Y 1,5-DAN como matrices MALDI en modo ion negativo, fue posible identificar compuestos en la región de masas bajas y altas.

En la Figura 21 se observan los espectros de masas MALDI del extracto de hexano en el intervalo de masas bajas,  $m/z$  200 a 400. En el espectro de masas se observa que con la matriz 1,5-DAN no se identificaron metabolitos debido a la presencia de señales características de la matriz (figura 21C). Además, en estos espectros es posible identificar oxilipinas con las matrices DMAN y 9-AA, que se identificaron con cloroformo-metanol. Adicionalmente, el espectro de masas de la matriz DMAN se observa la presencia de otros tipos de ácidos grasos como el palmítico ( $m/z$  255.249) y el esteárico ( $m/z$  283.203), los cuales han sido reportados en hojas de café[64] y han sido previamente ionizados utilizando esta matriz.[59,60] Estos ácidos grasos son comunes en tejidos vegetales y se caracterizan por ser ligeramente polares debido a que en su estructura poseen largas cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas.

**Figura 21.** Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) ácido palmítico ( $m/z$  255.249); b) ácido alfa-linolénico ( $m/z$  277.223); c) ácido esteárico ( $m/z$  283.203); d) ácido-9S-hidroperoxi-10E-12Z-octadecadienoico ( $m/z$  311.190); e) ácido-9-oxo-11R-15S-dihidroxi-2,3-dinor-13E-prostenoico ( $m/z$  325.238); f) 11-deoxi-prostagladina F1a ( $m/z$  339.256).



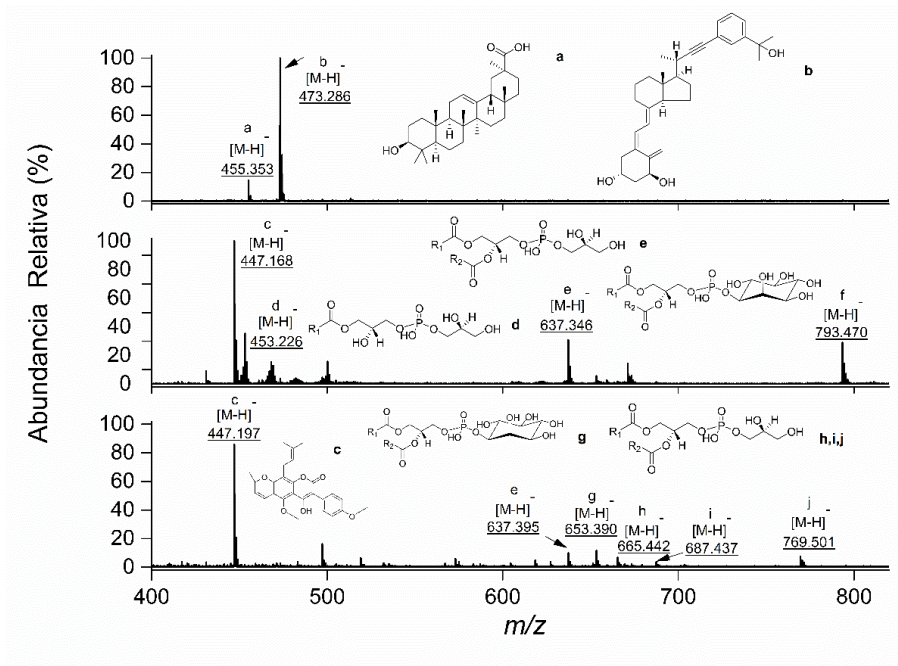
\* Señales correspondiente a iones de la matriz 1,5-DAN

\*\*Los errores en ppm para la asignación de cada una de las señales en los espectros A, B de la figura 21 se muestran en el anexo B.

En el rango de  $m/z$  400 a 800 en los extractos lipídicos con hexano que se muestra en la figura 22, se identificaron metabolitos de tipo PI con  $m/z$  en 793.470 y 653.390 y PG con  $m/z$  453.226; 637.346, 665.442; 687.437 y 769.501 con las matrices 9-AA, y 1,5-DAN. Además, se observó una abundancia menor de estos metabolitos con la

matriz 9-AA y se identificó con la matriz DMAN un tri-terpeno y vitamina D3 con una relación  $m/z$  de 455.353 y 473.286, respectivamente.

**Figura 22.** Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando A) DMAN, B) 9-AA y C) 1,5-DAN como matrices. Los metabolitos identificados son a) ácido 11-Deoxo-glicirretínico ( $m/z$  455.353); b) Vitamina D3 ( $m/z$  473.286); c) Lonchocarpenin ( $m/z$  447.168); d) PG(14:1(9Z)/0:0) ( $m/z$  453.226); e) PG (12:0/14:0) ( $m/z$  637.3); f) PI(12:0/19:1(9Z)) ( $m/z$  793.470); g) PI (22:1(11Z)/0:0) ( $m/z$  653.395); h) PG(12:0/16:0) ( $m/z$  665.442); i) PG(12:0/18:3(6Z,9Z,12Z)) ( $m/z$  687.437); j) PG(14:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)) ( $m/z$  769.501).



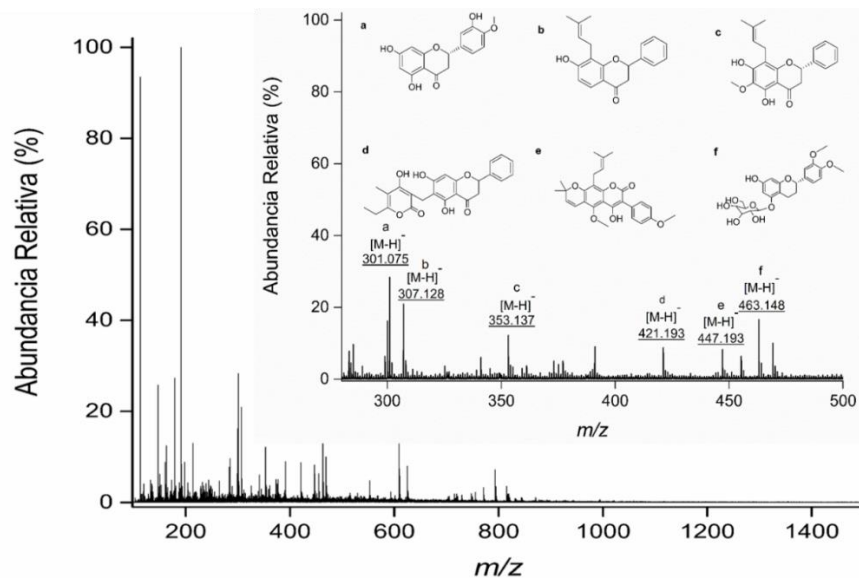
**\*\***Los errores en ppm para la asignación de cada una de las señales en los espectros A, B y C de la figura 22 se muestran en el anexo B.

Al comparar los metabolitos identificados en el extracto lipídico obtenido con cloroformo/metanol y hexano (figura 19 y figura 21), es posible sugerir que con este último solvente se favorece la extracción de ácidos grasos como el ácido esteárico

y el palmítico, así como también triterpenos, los cuales son detectados usando la DMAN como matriz en el rango de masas bajo. Por otra parte, las moléculas detectadas de PI y PG se pudieron detectar en las dos extracciones utilizando las matrices 1,5-DAN Y 9-AA.

En cuanto a la extracción realizada con metanol, los espectros lipídicos se encontraron flavonoides glucosilados y no glucosilados como moléculas deprotonadas utilizando las matrices DMAN y 1,5-DAN en un rango de  $m/z$  de 300 a 800. Con respecto a la matriz 9-AA no se identificaron este tipo de metabolitos debido a que los errores de  $m/z$  eran elevados.

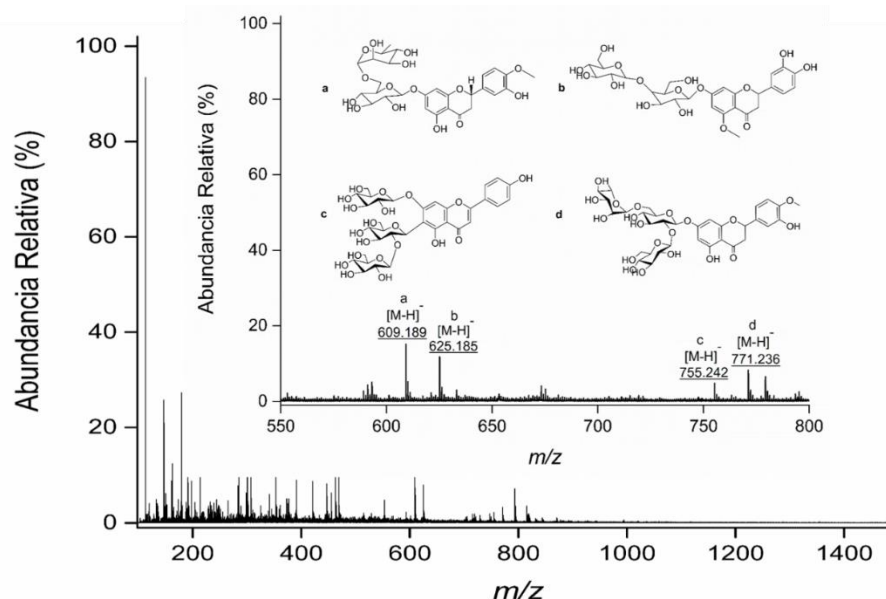
**Figura 23.** Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando DMAN como matriz. Los metabolitos identificados son a) hesperetina ( $m/z$  301.075); b) (E)- 1-[2,4-dihidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil]-3-fenil-2,1-propenona ( $m/z$  307.128); c) 5,7-dihidroxi-6-metoxi-8-fenilflavona ( $m/z$  353.137); d) 5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2butenil)-6-isobutiril-4-fenilcoumarin ( $m/z$  421.132); e) Lonchocarpenin ( $m/z$  447.193); f) [(S)- 2-(3,4-dimetoxifenil)-3,4-dihidro-7-hidroxi-2H-1-benzopiran-5-il] beta-D-glucopiranosido ( $m/z$  463.148).



\*\*Los errores en ppm para la asignación de cada una de las señales del espectro de la figura 23 se muestran en el anexo c.

En la figura anterior la matriz DMAN permitió la identificación de flavonoides en un rango de masas 300 a 470  $m/z$ . Por otro lado, con la matriz 1,5-DAN fueron detectados flavonoides con una relación  $m/z$  mayor a 600 (figura 24). Estos metabolitos identificados no presentaron una abundancia relativa mayor al 40% en estos espectros analizados. En la siguiente figura se muestra el espectro de masas del extracto lipídico obtenido con metanol utilizando como matriz 1,5-DAN.

**Figura 24.** Espectros de masas MALDI en modo ion negativo del extracto lipídico obtenido con hexano usando 1,5-DAN como matriz. Los metabolitos identificados son como matriz la, ácido 11-hesperedin ( $m/z$  609.189); b, 5-O-metileriodictiol-7-glucosil-(1->4)-galactósido ( $m/z$  625.185); c, isovitexin-7,2"-di-O-glucósido ( $m/z$  755.242); d, 5,7,3"-trihidroxi-4-metoxiflavona-7-galactosil-(1->2)-[ramnosil-(1->6)] glucósido ( $m/z$  771.236).



\*\*Los errores en ppm para la asignación de cada una de las señales del espectro de la figura 24 se muestran en el anexo c

En conclusión, con estos procesos de extracción con cloroformo: metanol, hexano y metanol se extrajeron selectivamente lípidos presentes en las hojas de café dependiendo de su polaridad. Adicionalmente, la observación de estos metabolitos

en MALDI en modo ion negativo es dependiente de la matriz; por ejemplo, matrices como 9-AA y DMAN se muestran selectividad hacia ciertos tipos de lípidos, como ácidos grasos, oxilipinas y vitamina D3. Por otra parte, con las matrices 9-AA, 1,5-DAN y DMAN se observaron fosfolípidos de tipo PG y PI. Y los flavonoides glicosilados fueron detectados por las matrices DMAN Y 1,5-DAN como moléculas deprotonadas  $[M-H]^-$ . Estos iones del tipo  $[M-H]^-$  se producen mediante una reacción de Bronsted-Lowry en la que se trasfiere un protón de los analitos a las matrices que poseen un carácter básico.

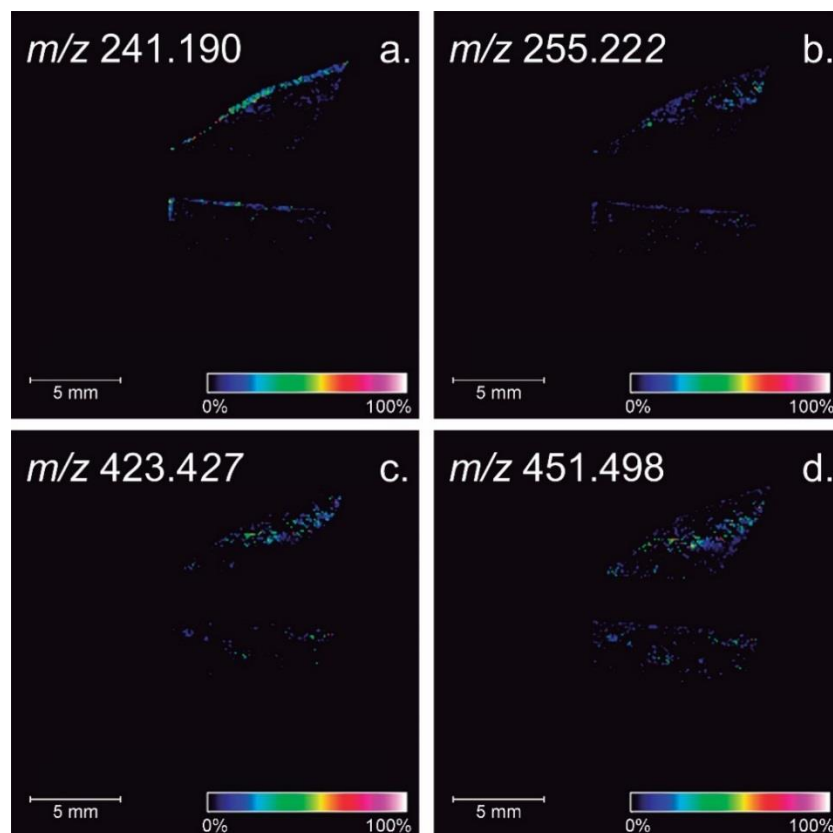
#### **4.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES (IMS) - MALDI DE HOJAS DE CAFÉ DE LA ESPECIE *COFFEA ARABICA***

Considerando las observaciones de la sección anterior, donde es evidente que cada matriz tiene la capacidad de ionizar selectivamente metabolitos particulares en los extractos lipídicos, se utilizaron todas las matrices para realizar las imágenes de las hojas de café. Inicialmente, cuando se realizó el recubrimiento de la muestra con la matriz se observó una distribución uniforme de cristales sobre la superficie, lo que se traduce en una uniformidad en las señales típicas de la matriz en los espectros de masas MALDI en modo negativo (para el 1,5-DAN y la 9-AA). Cabe resaltar que la matriz DMAN no presenta señales características en modo negativo, por lo cual la uniformidad en la distribución de esta matriz sobre la muestra se evaluó visualmente.

En la Figura 25 se muestra la imagen obtenida para dos secciones correspondientes a la base y a la parte media de una hoja de café usando DMAN como matriz. El análisis de la imagen revela la presencia de ácidos grasos principalmente; la identidad de estas señales fue confirmada contrastando el patrón isotópico teórico y experimental de las moléculas deprotonadas  $[M - H]^-$ . Estos compuestos han sido reportados en la cutícula de las hojas de café de acuerdo con investigaciones

previas utilizando espectrometría de masas.[69] Los ácidos a) 10-ceto-mirístico ( $m/z$  241.190) y b) palmítico ( $m/z$  255.222) muestran una mayor presencia en la parte exterior de la hoja y sobre la vena central. Por otra parte, el c) ácido montánico ( $m/z$  423.427) y d) melísico ( $m/z$  451.498), están distribuidos de manera heterogénea sobre el tejido vegetal, exhibiendo mayor acumulación en la parte exterior de la hoja.

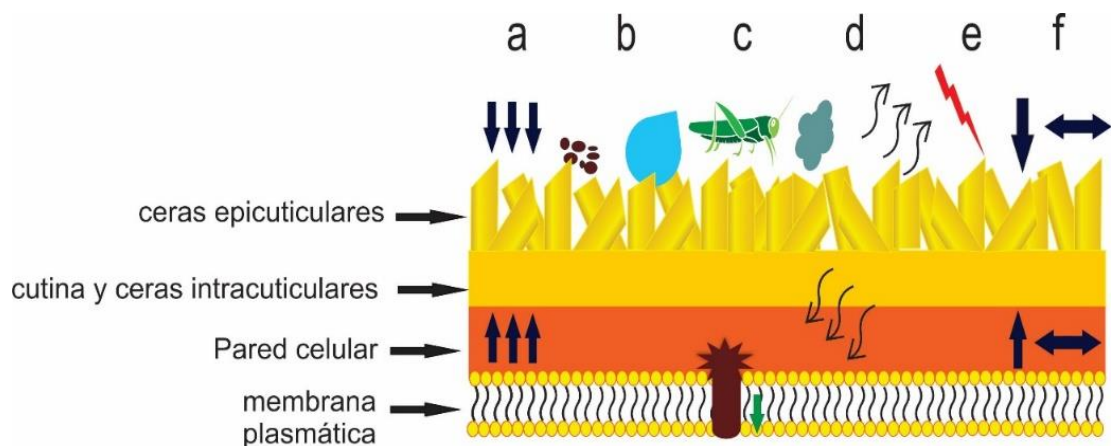
**Figura 25.** MALDI-IMS de una hoja de café (base y parte media) usando DMAN como matriz. Las imágenes representan la distribución espacial y la abundancia relativa de las siguientes moléculas deprotonadas: a) ácido 10-ceto-mirístico ( $m/z$  241.190), b) ácido palmítico ( $m/z$  255.222), c) ácido montánico ( $m/z$  423.427) y d) ácido melísico ( $m/z$  451.498). El color blanco representa la máxima abundancia relativa mientras que el color negro se asigna para señales con baja abundancia.



Estos ácidos grasos hacen parte de la cutícula de la hoja, una capa protectora que se encuentra en la superficie más externa de las hojas y cumple funciones tales

como la reducción de la pérdida de agua actuando como barrera hidrofóbica. Adicionalmente, la cutícula protege a la hoja contra plagas y patógenos, provee soporte mecánico, permite la difusión de gases como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y oxígeno (O<sub>2</sub>), y controla los cambios de temperatura.<sup>70,71,72</sup> La figura 26 muestra en detalle la estructura y función de la cutícula de las plantas, conformada por las ceras epicuticulares en la parte más exterior, la cutina y ceras intracuticulares.

**Figura 26.** Estructura y función de la cutícula en plantas.<sup>71</sup>

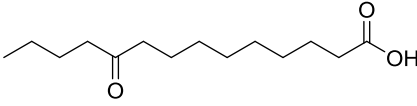
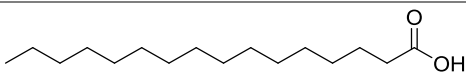
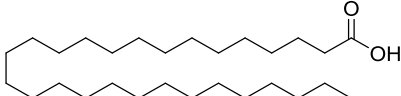
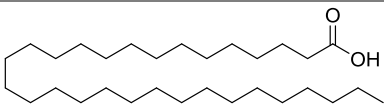


Por otra parte, la tabla 4 muestra los metabolitos identificados en la superficie de las dos secciones de la hoja de café usando DMAN como matriz. La asignación de las señales se hizo utilizando la base de datos LIPID MAPS.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> LIPIDOMICS GATEWAY.  
<http://www.lipidmaps.org/tools/index.html>

Definición Tools. Disponible en:

**Tabla 4.** Señales asignadas en MALDI-IMS en modo ion negativo usando DMAN como matriz.

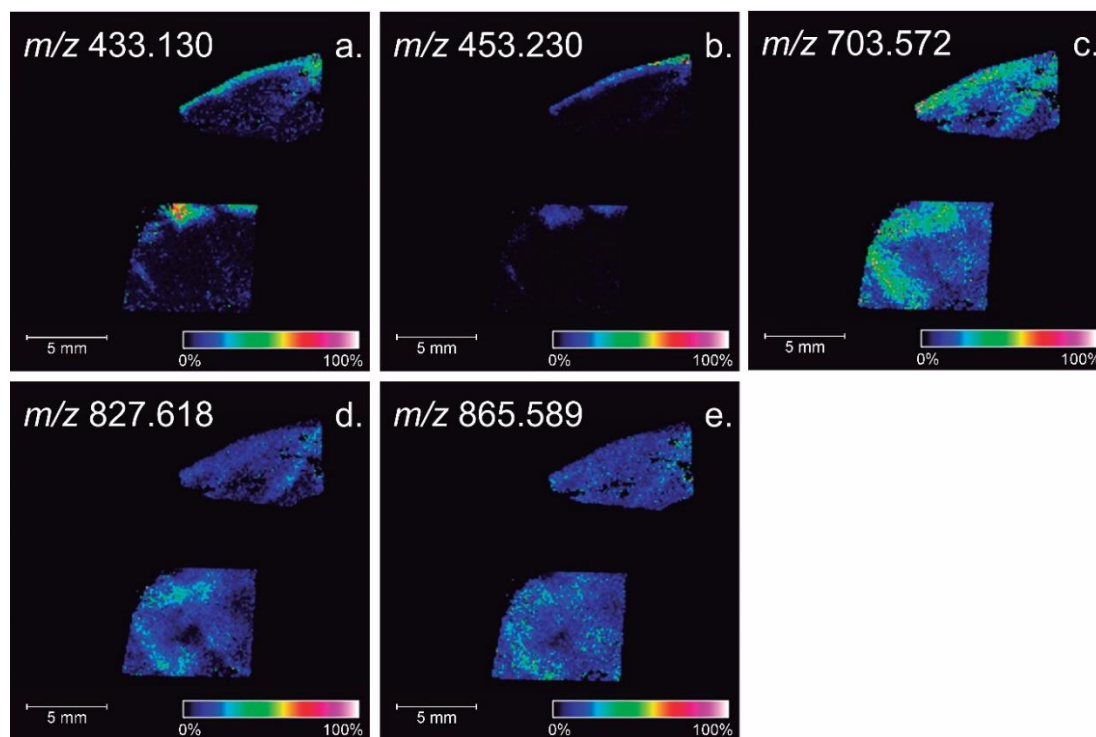
	<i>m/z</i>	Formula química y estructura
a	241.190	 $C_{14}H_{25}O_3$ 10-ceto-mirístico
b	255.222	 $C_{16}H_{31}O_2$ ácido palmítico
c	423.427	 $C_{28}H_{55}O_2$ ácido montánico
d	451.498	 $C_{30}H_{59}O_2$ ácido melísico

\*Los lípidos fueron identificados usando la base de datos LIPID MAPS ([http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm\\_bulk\\_search.php](http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm_bulk_search.php)) y su patrón isotópico.

Como resultado, se observó que con la aplicación de la matriz DMAN en los extractos lipídicos y en el tejido los lípidos de tipo de ácido graso (moléculas de bajo peso molecular) fueron ionizados selectivamente. Debido a que esta matriz se caracteriza por su alta basicidad (pKa 12.1), generando la deprotonación de las moléculas a través de una reacción de Bronsted-Lowry.

En la Figura 27 se muestra la imagen obtenida para dos secciones correspondientes a la base y a la parte media de una hoja de café usando 1,5-DAN como matriz.

**Figura 27.** MALDI-IMS de una hoja de café (base y parte media) usando 1,5-DAN como matriz. Las imágenes representan la distribución espacial y la abundancia relativa de las siguientes moléculas deprotonadas: a) flavonoide  $m/z$  433.131; b) PG(14:1(9Z)/0:0)  $m/z$  453.230; c) PA(16:0/21:0)  $m/z$  703.572; d) (PG(18:1(9Z)/22:2(13Z,16Z))  $m/z$  827.618; e) (PI(14:0/22:0))  $m/z$  865.589. El color blanco representa la máxima abundancia relativa mientras que el color negro se asigna para señales con baja abundancia.



El análisis de la imagen revela la presencia de moléculas de tipo a) flavonoide en  $m/z$  433.131 que se acumula sobre el borde exterior de la sección de la base de la hoja y sobre la vena central, b) fosfatidil glicerol (PG(14:1(9Z)/0:0)) en  $m/z$  453.230 que presentó una mayor acumulación en la sección externa y sobre la vena central de la hoja, además con la especie c) fosfatidato (PA(16:0/21:0)) con  $m/z$  703.572, d) fosfatidil glicerol (PG(18:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)) con  $m/z$  827.618 y e) fosfatidil

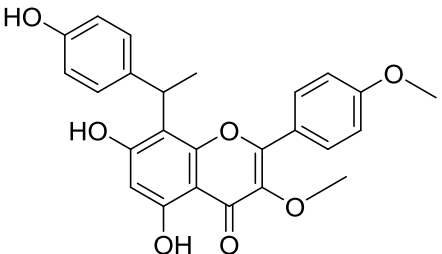
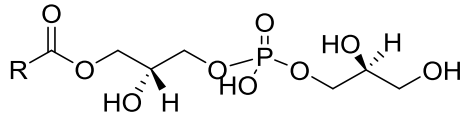
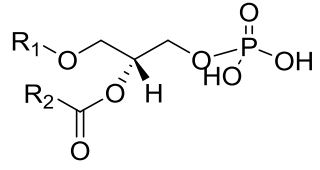
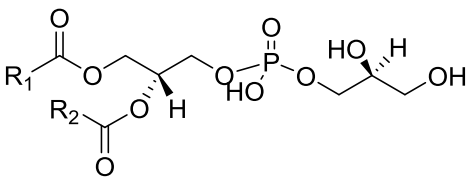
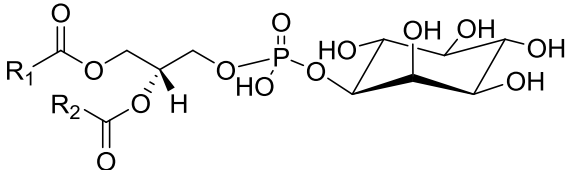
inositol (PI(14:0/22:0)) con  $m/z$  865.589 se observó una distribución homogénea sobre las secciones del tejido analizadas.

Este tipo de fosfolípidos hacen parte de la membrana plasmática de las células formando una bicapa lipídica en la que la cabeza hidrófila se orienta hacia el citosol mientras que la cola hidrófoba lo hace hacia la parte interior. Además, el fosfatidilglicerol es el único fosfolípido en plantas que se localiza en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Por otra parte, los fosfatidil inositoles pueden formar derivados a través de la fosforilación estereo selectiva de los grupos hidróxido que posee el anillo inositol.[73] Estas moléculas se localizan en el plasma de las membranas y su función es la señalización y regulación intracelular de calcio así como la transcripción de genes, fosforilación de proteínas y edición del ARN. Además, estas moléculas sirven como anclaje para proteínas extracelulares a la membrana plasmática.

Finalmente, con el 1,5-DAN fue posible identificar fosfolípidos y flavonoides en la superficie de hojas de café en la región por encima de  $m/z$  400. Sin embargo, a diferencia del DMAN de la sección anterior, el 1,5-DAN genera señales interferentes en el rango de  $m/z$  200 a 400 razón por la cual se dificulta la identificación de metabolitos de bajo peso molecular.

En la tabla 5, se muestran los analitos identificados en la superficie de las dos secciones de la hoja usando la matriz 1,5-DAN que se analizó anteriormente.

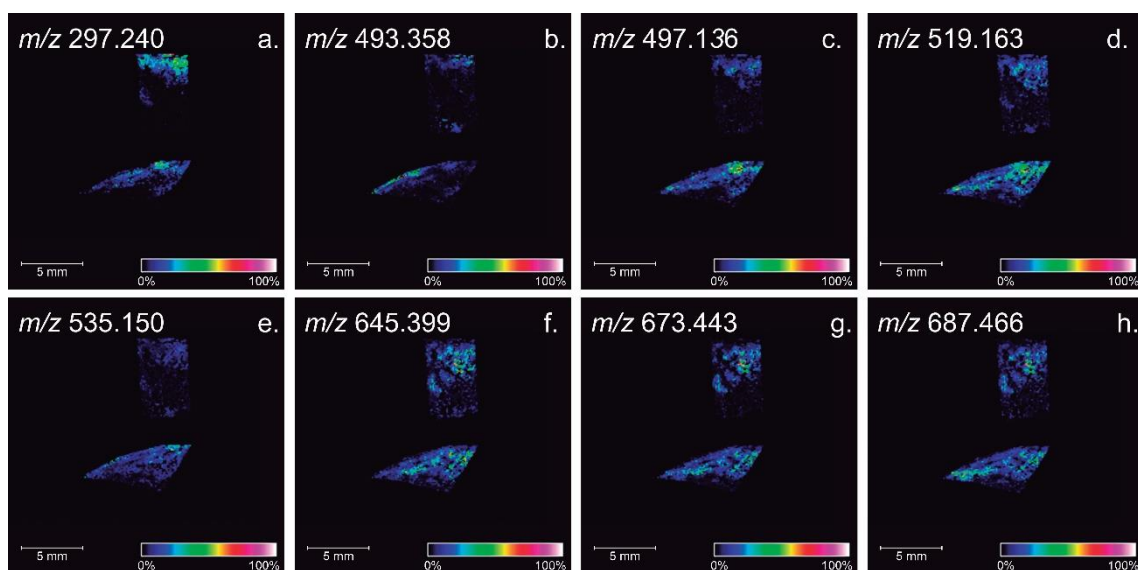
**Tabla 5.** Señales asignadas en MALDI-IMS en modo ion negativo usando la matriz 1,5-DAN.

	<i>m/z</i>	Formula química y estructura
a	433.130	 <p style="text-align: center;">C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>O<sub>7</sub> 5,7-dihidroxi-8-[1-(4-hidroxyfenil)etil]-3metoxi-2-(-4metoxifenil)-4-cromenona</p>
b	453.230	 <p style="text-align: center;">C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>9</sub>P PA(14:1(9Z)/0:0)</p>
c	703.572	 <p style="text-align: center;">C<sub>40</sub>H<sub>80</sub>O<sub>7</sub>P PA(16:0/21:0)</p>
d	827.618	 <p style="text-align: center;">C<sub>46</sub>H<sub>84</sub>O<sub>10</sub>P PG(18:1(9Z)/22:2(13Z,16Z))</p>
e	865.589	 <p style="text-align: center;">C<sub>45</sub>H<sub>86</sub>O<sub>13</sub>P PI(14:0/22:0)</p>

\*Los lípidos fueron identificados usando la base de datos LIPID MAPS ([http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm\\_bulk\\_search.php](http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm_bulk_search.php)) y su patrón isotópico.

En la figura 28 se muestra la imagen obtenida para dos secciones correspondientes a la base y a la parte media de una hoja de café usando 9-AA como matriz. La cual permite observar la distribución espacial de flavonoides glucosilados, lípidos de tipo fosfatidato (PA) y un ácido graso oxigenado sobre las dos secciones de tejido.

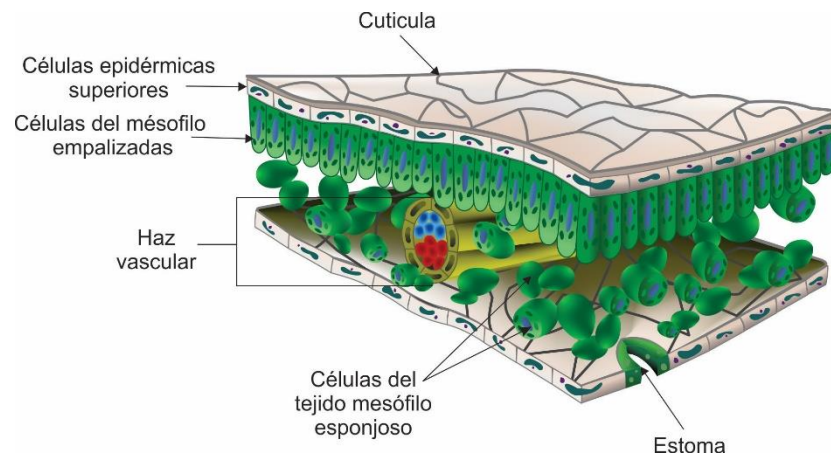
**Figura 28.** MALDI-IMS de una hoja de café (parte media y base) usando 9-AA como matriz. Las imágenes representan la distribución espacial y la abundancia relativa de las siguientes moléculas deprotonadas: a) ácido graso  $m/z$  297.240 b) fosfatidato (PA)  $m/z$  493.358 c) flavonoide glucosilado con  $m/z$  497.136 d) flavonoide glucosilado con  $m/z$  519.163 e) flavonoide glucosilado con  $m/z$  535.150, f) fosfatidato (PA)  $m/z$  645.399, g) fosfatidato (PA)  $m/z$  673.443, h) fosfatidato (PA)  $m/z$  687.466. El color blanco representa la máxima abundancia relativa mientras que el color negro se asigna para señales con baja abundancia.



La matriz 9-AA permitió la identificación espacial del ácido a) 10-oxo-octadecanoico ( $m/z$  297.240), observándose la acumulación de este en las dos secciones del tejido sobre el margen de la hoja. Con respecto a los flavonoides glucosilados con valores  $m/z$  de c) 497.136, d) 519.163 y e) 535.150 se ubicaron principalmente en el interior

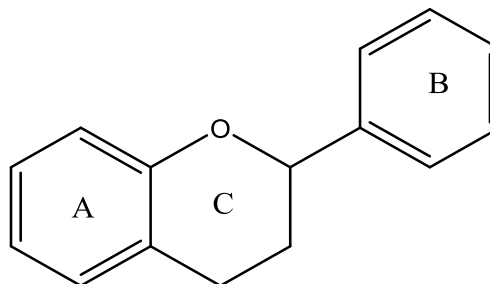
de la hoja; la literatura reporta que estos compuestos hacen parte del tejido mesófilo esponjoso y en las células de empalizada. Además, se ha reportado que también se ubican en la cutícula o en superficies externas de órganos en la planta.[64 ,74,75] Como se muestra la figura 29.

**Figura 29.** Sección transversal de una hoja con sus respectivas partes.[76]



Esta ubicación está asociada con la función que cumplen como filtros ultravioleta (UV)<sup>77</sup> para proteger las células epidérmicas y también pueden actuar como antioxidantes, atrapando radicales libres, mediante transferencia de un protón del anillo A y B (figura 30).[78,79]

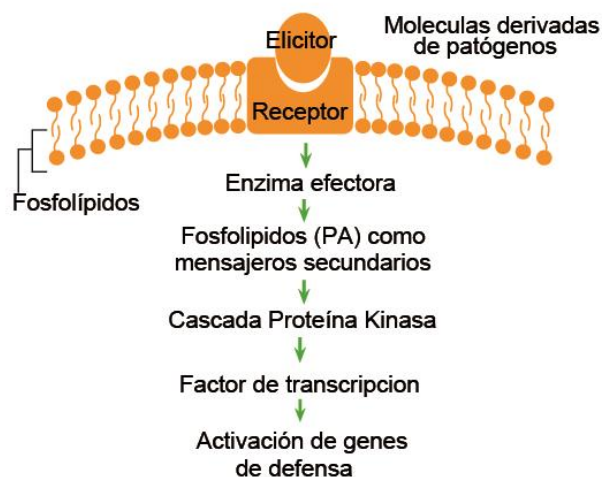
**Figura 30.** Estructura general de un flavonoide



También se ha reportado que los flavonoides en la superficie tienen la capacidad de evitar el crecimiento de hongos[42] y participan en el mecanismo de defensa que activa la planta contra patógenos en una reacción de hipersensibilidad. Los flavonoides se acumulan en el sitio de infección y a través de una reacción de oxidación y polimerización con otros compuestos de la pared celular (carbohidratos, proteínas) producen lignina, causando rigidez en la pared celular y evitando la entrada de patógenos a la célula.[80]

Finalmente, la 9-AA permite la observación de fosfatidatos en *f*) PA(12:0/20:1(11Z)) con  $m/z$  645.399, *g*) PA(12:0/22:1(11Z))  $m/z$  673.443, *h*) PA(13:0/22:1(11Z)) con  $m/z$  687.466 sobre el tejido vegetal, mostrando una distribución homogénea sobre las dos secciones. Sin embargo, el fosfatidato en *b*) fosfatidato (PA)  $m/z$  493.358 no mostró una distribución homogénea. Estas moléculas son los principales componentes estructurales de las membranas y su función es actuar como mensajeros secundarios en los procesos de defensa cuando la planta se somete a un estrés biótico y abiótico.[81,82] En el momento en que una planta es atacada por un insecto, hongo o microbio activa sus mecanismos de defensa, los cuales inician con el reconocimiento del patógeno a través de una molécula receptora enlazado a un elicitor. Posteriormente, el receptor activa indirecta o directamente un mensajero secundario específico (fosfolípido), y seguidamente este mensajero activa una proteína quinasa para generar una cascada quinasa.[81,83] Estos a su vez, permiten la activación de la transcripción de genes relacionados con la defensa (figura 31).

**Figura 31.** Los fosfolípidos (PA) actúan como mensajeros secundarios en los procesos de señalización inducidos por la planta contra un agente patógeno.[82]



En la tabla 6, se muestran los analitos identificados en la superficie de las dos secciones de la hoja usando la matriz 9-AA que se analizó anteriormente.

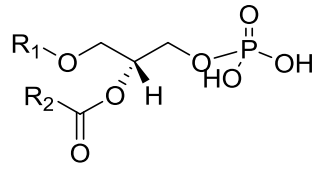
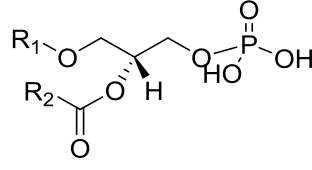
**Tabla 6.** Señales asignadas en MALDI IMS-TOF/MS en modo ion negativo usando 9-AA como matriz.

	<i>m/z</i>	Formula química y estructura
a	297.240	 $C_{18}H_{33}O_3$ ácido 10-oxo-octadecanoico
b	493.358	 $C_{25}H_{40}O_7P$ PA(22:0/0:0)

Tabla 5. (Continúa)...

c	497.136	
		C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>
		5-hidroxi-2- (4-hidroxiifenil) -8,8-dimetil-3-[(2S,3S,5R)-3,4,5-trihidroxi-6-metoxi-2-oxanil]oxipirano[2,3-h]-4-cromenona
d	519.163	
		C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>
		[(2R,3S,6S)-6-[5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxiifenil)-6-metoxi-4-oxo-3-cromenil]oxi-3,4,5-trihidroxi-2-oxanil]metilacetato
e	535.150	
		C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>
		5-dihidroxi-3,6,7-trimetoxi-2-[4-metoxi-3-[(2S,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-2-oxanil]-oxifenil]-4-cromenona
f	645.399	
		C <sub>35</sub> H <sub>67</sub> O <sub>8</sub> P
		PA(12:0/20:1(11Z))

Tabla 5. (Continúa)...

g	673.443	 <p style="text-align: center;">C<sub>37</sub>H<sub>70</sub>O<sub>8</sub>P PA(12:0/22:1(11Z))</p>
h	687.466	 <p style="text-align: center;">C<sub>38</sub>H<sub>72</sub>O<sub>8</sub>P PA(13:0/22:1(11Z))</p>

\*Los lípidos fueron identificados usando la base de datos LIPID MAPS ([http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm\\_bulk\\_search.php](http://www.lipidmaps.org/tools/ms/lm_bulk_search.php)) y su patrón isotópico.

Los fosfolípidos de tipo PA detectados con la matriz 9-AA se caracterizan por tener dos cargas negativas a pH fisiológico.[84] Sin embargo, este tipo de moléculas fueron detectadas como iones [M-H]<sup>-</sup> gracias a que la matriz le transfiere un protón al analito, esto se ha reportado en estudios recientes.[85]

Los resultados obtenidos en MALDI-IMS muestran que las matrices al igual que en target tienen cierta preferencia hacia la ionización de ciertos tipos de lípidos. Con la matriz DMAN solo se observó la distribución de ácidos grasos, con la matriz 1,5-DAN se detectaron flavonoides y fosfolípidos de tipo PA, PG, PI. Por último, con la matriz 9-AA se detectaron flavonoides y fosfolípidos de tipo fosfatidato (PA). Adicionalmente, se observó que los metabolitos identificados no poseen la misma distribución sobre el tejido y que su distribución depende de la función que cumplan en la planta.

## 5. CONCLUSIONES

Las moléculas básicas 9-AA, 1,5-DAN y DMAN tienen la capacidad de ionizar metabolitos con protones ácidos mediante una reacción de Brønsted-Lowry, donde el analito transfiere un protón a la matriz y se detecta como una molécula deprotonada  $[M - H]^-$  en modo ion negativo.

Mezclas complejas de metabolitos polares, extraídos de hojas de café, se analizaron empleando diferentes matrices. Cuando se utilizan el DMAN y la 9-AA como matrices MALDI es posible observar moléculas deprotonadas de ácidos grasos, oxilípinas, vitamina D3 y fosfolípidos; con el 1,5-DAN se observan exclusivamente fosfolípidos.

La técnica MALDI-IMS permite determinar la localización espacial de metabolitos polares como fosfolípidos, ácidos grasos y flavonoides presentes en la sección media y la base de hojas de café (*Coffea arabica*).

La identificación de metabolitos en hojas de café mediante MALDI IMS-TOF/MS está influenciado por el tipo de matriz que recubre la superficie del tejido vegetal. Mientras la matriz DMAN permite detectar ácidos grasos como iones deprotonados, el 1,5-DAN permite la identificación de flavonoides, fosfatidil gliceroles (PG), fosfatidatos (PA) y fosfatidil inositol (PI). Por otra parte, la matriz 9-AA permite observar la distribución espacial de fosfatidatos (PA), ácidos grasos, flavonoides glucosilados y no glucosilados.

Los fosfolípidos tipo PI, PA, y PG se distribuyen uniformemente por toda la superficie de las secciones de la hoja analizadas, mientras que los ácidos grasos y los flavonoides se acumulan principalmente en la vena y en los extremos de las hojas.

## 6. DIVULGACION DE RESULTADOS

Los resultados de este proyecto fueron presentados en forma de posters en el 32° Congreso Latinoamericano de Química realizado en Concepción, Chile durante los días 19 a 22 de enero de 2016, y en la 64<sup>th</sup> Conferencia Anual de la ASMS (American Society for Mass Spectrometry) realizada en San Antonio, Texas, USA durante los días 5 a 9 de junio de 2016. Se anexan copias de los posters (ver sección anexos).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CAFÉ DE COLOMBIA. Historia del café. Recuperado el 12 de Julio de 2016 en:  
[http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre\\_el\\_cafe/el\\_cafe/el\\_cafe/](http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_cafe/)
- [2] THE ECONOMIST. Roya flushed. Julio de 2114. Recuperado el 24 de Julio del 2016 en: <http://www.economist.com/news/americas/21608642-how-colombia-fought-fungus-roya-flushed>.
- [3] SENASICA. Ficha Técnica No . 40 Roya Del Cafeto Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica LANREF - CP. **2013**, No. 40, 27.
- [4] GOTO-INOUE, N.; Hayasaka, T.; Zaima, N.; Setou, M. Imaging Mass Spectrometry for Lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2011**, 1811 (11), 961–969.
- [5] VRKOSLAV, V.; Muck, A.; Cvacka, J.; Svatos, A. MALDI Imaging of Neutral Cuticular Lipids in Insects and Plants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, 21 (2), 220–231.
- [6] SHROFF, R.; SCHRAMM, K.; JESCHKE, V.; NEMES, P.; VERTES, A.; GERSHENZON, J.; SVATOŠ, A. Quantification of Plant Surface Metabolites by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry Imaging: Glucosinolates on Arabidopsis Thaliana Leaves. *Plant J.* **2015**, 81 (6), 961–972.
- [7] KORTE, A. Development of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry Imaging ( MALDI- MSI ) for Plant Metabolite Analysis, Iowa State University, 2014.
- [8] DONG, Y.; Li, B.; MALITSKY, S.; ROGACHEV, I.; AHARONI, A.; KAFTAN, F.; Svatoš, A.; Franceschi, P. Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Front. Plant Sci.* **2016**, 7 (February), 60.
- [9] CERRUTI, C. D.; Benabdellah, F.; Laprévotte, O.; Touboul, D.; Brunelle, A.

- MALDI Imaging and Structural Analysis of Rat Brain Lipid Negative Ions with 9-Aminoacridine Matrix. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (5), 2164–2171.
- [10] MCDONNELL, L. A.; HEEREN, R. M. A. Imaging Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26* (4), 606–643.
- [11] RUBAKHIN, S. S.; JURCHEN, J. C.; MONROE, E. B.; SWEEDLER, J. V. Imaging Mass Spectrometry: Fundamentals and Applications to Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10* (12), 823–837.
- [12] GEMPERLINE, E.; Li, L. MALDI-MS-Assisted Molecular Imaging of Metabolites in Legume Plants. In *Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules*; He, L., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2015; pp 29–40.
- [13] KORTE, A. R.; Lee, Y. J. MALDI-MS Analysis and Imaging of Small Molecule Metabolites with 1,5-Diaminonaphthalene (DAN). *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49* (8), 737–741.
- [14] GROSS, J. *Mass Spectrometry*; Springer, B., Ed.; 2004; pp 1–12.
- [15] MATTA, A.; Ralhan, R.; DeSouza, L. V.; Siu, K. W. M. Mass Spectrometry-Based Clinical Proteomics: Head-and-Neck Cancer Biomarkers and Drug-Targets Discovery. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29* (6), 945–961.
- [16] SHROFF, R.; Rulísek, L.; Doubsky, J.; Svatos, A. Acid-Base-Driven Matrix-Assisted Mass Spectrometry for Targeted Metabolomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (25), 10092–10096.
- [17] SAMPLE PREPARATION. 21 de Junio del 2010. Recuperado el 30 de Julio del 2016 en: <http://www.sdstate.edu/sites/default/files/chem/mass-spec/tutorials/upload/Maldi-Sample-Preparation.pdf>.
- [18] MALDI-TOF. Recuperado el 30 de Julio del 2016 en: [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/RelatedContent/Files/1314735988470/litdoc18114403AA\\_20110830232018.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1314735988470/litdoc18114403AA_20110830232018.pdf)
- [19] KNOCHENMUSS, R. Ion Formation Mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, *131* (9), 966.
- [20] MOLIN, L.; SERAGLIA, R.; DANI, F. R.; MONETI, G.; TRALDI, P. The Double Nature of 1,5-Diaminonaphthalene as Matrix-Assisted Laser

- Desorption/ionization Matrix: Some Experimental Evidence of the Protonation and Reduction Mechanisms. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (20), 3091–3096.
- [21] KARAS, M.; KRÜGER, R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 427–440.
- [22] LIN, H.-Y.; SONG, B.; Lu, I.-C.; HSU, K.-T.; LIAO, C.-Y.; LEE, Y.-Y.; TSENG, C.-M.; LEE, Y.-T.; Ni, C.-K. Is Energy Pooling Necessary in Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28* (1), 77–82.
- [23] GUILHAUS, M. Special Feature: Tutorial. Principles and Instrumentation in Time-of-Flight Mass Spectrometry. Physical and Instrumental Concepts. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30* (11), 1519–1532.
- [24] CLEMIS, E. J. Quantitation of Spatially-Localized Protein in Tissue Samples Using MALDI-MRM Imaging, University of Victoria, 2012.
- [25] SVATOŠ, A. Mass Spectrometric Imaging of Small Molecules. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (8), 425–434.
- [26] GRASSL, J.; Taylor, N. L.; Millar, a H. Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation Mass Spectrometry Imaging and Its Development for Plant Protein Imaging. *Plant Methods* **2011**, *7* (1), 21.
- [27] RÖMPP, A.; Spengler, B. Mass Spectrometry Imaging with High Resolution in Mass and Space. *Histochem. Cell Biol.* **2013**, *139* (6), 759–783.
- [28] SIMMONS, D. a; Technologies, M. D. S. A. Improved MALDI-MS Imaging Performance Using Continuous Laser Rastering. *Tech. Note, MDS Anal. Technol.* **2008**.
- [29] RUBAKHIN, S. S.; Jurchen, J. C.; Monroe, E. B.; Sweedler, J. V; Rubakhin, S.; Sweedler, J. *Keynote Review: Imaging Mass Spectrometry: Fundamentals and Applications to Drug Discovery*; 2005; Vol. 10.
- [30] APPLICATION, B. D. MALDI Imaging of Proteins at 20µm Resolution on the ultrafleXtreme.
- [31] Freeman. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores.

*Plant Heal. Instr.* **2008**.

- [32] WAXES AND OTHER ESTERS. Recuperado el 15 de julio del 2016 en: <http://www.cyberlipid.org/wax/wax0001.htm>.
- [33] FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL, A. H.; MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R. H.; RUSSELL, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; et al. A Comprehensive Classification System for Lipids. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 839–861.
- [34] IMBUSCH, R.; MUELLER, M. J. Formation of Isoprostane F2-like Compounds (Phytosteranes F1) from  $\alpha$ -Linolenic Acid in Plants. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28* (5), 720–726.
- [35] CHRISTENSEN, S. A.; KOLOMIETS, M. V. The Lipid Language of Plant-Fungal Interactions. *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48* (1), 4–14.
- [36] GÖBEL, C.; FEUSSNER, I. Methods for the Analysis of Oxylipins in Plants. *Phytochemistry* **2009**, *70* (13–14), 1485–1503.
- [37] MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los Flavonoides: Propiedades Y Acciones Antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **2002**, *17* (6), 271–278.
- [38] IWASHINA, T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J. Plant Res.* **2000**, *113* (3), 287–299.
- [39] LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; Cardinali, A.; Amendola, V. *Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants against Fungal Pathogens and Insects*; Filippo Imperato, Ed.; Bari, Italy, 2006; Vol. 661.
- [40] STEROIDS. Recuperado el 23 de Abril del 2016 en: <http://www.cyberlipid.org/simple/simple0008.htm>
- [41] BENVENISTE, P. BIOSYNTHESIS AND ACCUMULATION OF STEROLS. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55* (1), 429–457.
- [42] VIELER, A.; Wilhelm, C.; Goss, R.; Süß, R.; Schiller, J. The Lipid Composition of the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* and the Diatom *Cyclotella Meneghiniana* Investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *150* (2), 143–155.

- [43] AXELSSON, M.; GENTILI, F. A Single-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *PLoS One* **2014**, *9* (2), e89643.
- [44] CEQUIER-SÁNCHEZ, E.; RODRÍGUEZ, C.; RAVELO, A. G.; ZÁRATE, R. Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (12), 4297–4303.
- [45] CHRISTIE, W. W. *PREPARATION OF LIPID EXTRACTS FROM TISSUES*; Invergowrie, Dundee, 1993.
- [46] CYBERLIPID. Special Procedures. Extraction of all lipids with a mixture of hexane/isopropanol. Recuperado el 12 de Agosto del 2016 en: <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0006.htm#4>.
- [47] NODA, M.; TANAKA, M.; SETO, Y.; AIBA, T.; Oku, C. Occurrence of Cholesterol as a Major Sterol Component in Leaf Surface Lipids. *Lipids* **1988**, *23* (5), 439–444.
- [48] ISCA, V. M. S.; SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A.; Silva, H.; Silva, A. M. S. Lipophilic Profile of the Edible Halophyte *Salicornia Ramosissima*. *Food Chem.* **2014**, *165*, 330–336.
- [49] DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15* (10), 7313–7352.
- [50] ARAÚJO, P.; FERREIRA, M. S.; DE OLIVEIRA, D. N.; PEREIRA, L.; SAWAYA, A. C. H. F.; Catharino, R. R.; Mazzafera, P. Mass Spectrometry Imaging: An Expeditious and Powerful Technique for Fast in Situ Lignin Assessment in Eucalyptus. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (7), 3415–3419.
- [51] KASPAR, S.; PEUKERT, M.; SVATOS, A.; Matros, A.; Mock, H. P. MALDI-Imaging Mass Spectrometry - An Emerging Technique in Plant Biology. *Proteomics* **2011**, *11* (9), 1840–1850.
- [52] ZHANG, H.; CHA, S.; YEUNG, E. S. Colloidal Graphite-Assisted Laser Desorption/Ionization MS and MS N of Small Molecules. 2. Direct Profiling and MS Imaging of Small Metabolites from Fruits. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (17), 6575–6584.

- [53] GOTO-INOUE, N.; Setou, M.; Zaima, N. Visualization of Spatial Distribution of Gamma-Aminobutyric Acid in Eggplant (*Solanum Melongena*) by Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Sci.* **2010**, 26 (7), 821–825.
- [54] BECKER, L.; CARRÉ, V.; POUTARAUD, A.; MERDINOGLU, D.; Chaimbault, P. MALDI Mass Spectrometry Imaging for the Simultaneous Location of Resveratrol, Pterostilbene and Viniferins on Grapevine Leaves. *Molecules* **2014**, 19 (7), 10587–10600.
- [55] LEE, Y. J.; PERDIAN, D. C.; Song, Z.; Yeung, E. S.; Nikolau, B. J. Use of Mass Spectrometry for Imaging Metabolites in Plants. *Plant J.* **2012**, 70 (1), 81–95.
- [56] HEARD, P. J.; FEENEY, K. A.; Allen, G. C.; Shewry, P. R. Determination of the Elemental Composition of Mature Wheat Grain Using a Modified Secondary Ion Mass Spectrometer (SIMS). *Plant J.* **2002**, 30 (2), 237–245.
- [57] BJARNHOLT, N.; Li, B.; D'Alvise, J.; Janfelt, C. Mass Spectrometry Imaging of Plant Metabolites--Principles and Possibilities. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31 (6), 818–837.
- [58] SHROFF, R.; VERGARA, F.; Muck, A.; Svatos, A.; Gershenzon, J. Nonuniform Distribution of Glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* Leaves Has Important Consequences for Plant Defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (16), 6196–6201.
- [59] JENA, D.-. Proton Sponge: A Novel and Versatile MALDI Matrix for the Analysis of Metabolites Using Mass. **2009**, 81 (19), 7954–7959.
- [60] DOUBSKY, J. Acid – Base-Driven Matrix-Assisted Mass Spectrometry for Targeted Metabolomics. **2009**.
- [61] OZERYANSKII, V. A.; Pozharskii, A. F.; Antonov, A. S.; Filarowski, A. Out-Basicity of 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene: The Experimental and Theoretical Challenge. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (15), 2360.
- [62] CALVANO, C. D.; Monopoli, A.; Ditaranto, N.; Palmisano, F. 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene/9-Aminoacridine: A New Binary Matrix for Lipid Fingerprinting of Intact Bacteria by Matrix Assisted Laser Desorption

- Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 798, 56–63.
- [63] KORTE, A. R.; Lee, Y. J. MALDI-MS Analysis and Imaging of Small Molecule Metabolites with 1,5-Diaminonaphthalene (DAN). *J. Mass Spectrom.* **2014**, 49 (8), 737–741.
- [64] MONGRAND, S.; Badoc, A.; Patouille, B.; Lacomblez, C.; Chavent, M.; Bessoule, J.-J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae Family Based on Leaf Fatty Acid Composition. *Phytochemistry* **2005**, 66 (5), 549–559.
- [65] DICARBOXILIC ACID. Recuperado el 28 de Agosto del 2016 en: <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0004.htm>.
- [66] AOCS LIPID LIBRARY. Plant Oxylipins. Mayo 22 de 2014. Recuperado el 01 de septiembre del 2016 en: <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39315>.
- [67] IONIZATION CONSTANTS OF PHOSPHOLIPIDS. Recuperado el 30 de Agosto del 2016 en: <https://avantlipids.com/tech-support/physical-properties/ionization-constants/>
- [68] JÄPELT, R. B.; JAKOBSEN, J. VITAMIN D IN PLANTS: A Review of Occurrence, Analysis, and Biosynthesis. *Front. Plant Sci.* **2013**, 4 (May), 136.
- [69] HOLLOWAY, P. J.; DEAS, A. H. B.; Kabaara, A. M. Composition of Cutin from Coffee Leaves. *Phytochemistry* **1972**, 11 (4), 1443–1447.
- [70] YEATS, T. H.; Rose, J. K. C. The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiol.* **2013**, 163 (September), 5–20.
- [71] TAFOLLA-ARELLANO, J. C.; González-León, A.; Tiznado-Hernández, M. E.; García, L. Z.; Báez-Sañudo, R. Composición, Fisiología Y Biosíntesis de La Cutícula En Plantas. *Rev. Fitotec. Mex.* **2013**, 36 (1), 3–12.
- [72] HEREDIA\*, A.; CASADO, C. G.; LAGUNA, L.; REINA, J. J.; SERRANO, J. M.; DOMINGUEZ, E. La Cutícula Vegetal: Estructura Y Funciones. *Ecología* **1998**, No. 12, 293–305.
- [73] SAUER, K.; OKKENHAUG, K. Editorial: Lipid Signaling in T Cell Development and Function. *Front. Immunol.* **2015**, 6.
- [74] OTEIZA, P. I.; ERLEJMAN, A. G.; Verstraeten, S. V; Keen, C. L.; Fraga, C. G.

- Flavonoid-Membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? *Clin. Dev. Immunol.* **2005**, *12* (1), 19–25.
- [75] MOURADOV, A.; SPANGENBERG, G. FLAVONOIDS: A Metabolic Network Mediating Plants Adaptation to Their Real Estate. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5* (November), 620.
- [76] WILLIAM G. HOLLIDAY, Whitney Crispen Hagins, A. B. Plant Structure and Function. In *Glencoe Biology, Student Edition BIOLOGY DYNAMICS OF LIFE*; McGraw-Hill, Ed.; Estados unidos, 2008.
- [77] AGATI, G.; AZZARELLO, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. *Plant Sci.* **2012**, *196*, 67–76.
- [78] AGATI, G.; BRUNETTI, C.; Di, M.; Ferrini, F.; Pollastri, S.; Tattini, M. Plant Physiology and Biochemistry Functional Roles of Flavonoids in Photoprotection: New Evidence, Lessons from the Past. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *72*, 35–45.
- [79] TREUTTER, D. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biol.* **2005**, *7* (6), 581–591.
- [80] BECKMAN, C. H. Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation in Wilt Disease Resistance and in General Defence Responses in Plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2000**, *57* (3), 101–110.
- [81] TESTERINK, C.; Munnik, T. Phosphatidic Acid: A Multifunctional Stress Signaling Lipid in Plants. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10* (8), 368–375.
- [82] LAXALT, A. M.; Munnik, T. Phospholipid Signalling in Plant Defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, *5* (4), 332–338.
- [83] MUNNIK, T. Phosphatidic Acid: An Emerging Plant Lipid Second Messenger. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6* (5), 227–233.
- [84] SCHILLER, J.; Süß, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Leßig, J.; Müller, M.; Petković, M.; Spalteholz, H.; Zschörnig, O.; Arnold, K. Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in Lipid and Phospholipid Research. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43* (5), 449–488.

- [85] PARK, K.-E.; Kim, J.-D.; Nagashima, Y.; Kako, K.; Daitoku, H.; Matsui, M.; Park, G. G.; Fukamizu, A. Detection of Choline and Phosphatidic Acid (PA) Catalyzed by Phospholipase D (PLD) Using MALDI-QIT-TOF/MS with 9-Aminoacridine Matrix. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78* (6), 981–988.

## BIBLIOGRAFÍA

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. *Plant Sci.* 2012, 196, 67–76.

AGATI, G.; BRUNETTI, C.; Di, M.; Ferrini, F.; Pollastri, S.; Tattini, M. Plant Physiology and Biochemistry Functional Roles of Flavonoids in Photoprotection: New Evidence , Lessons from the Past. *Plant Physiol. Biochem.* 2013, 72, 35–45.

APPLICATION, B. D. MALDI Imaging of Proteins at 20µm Resolution on the ultrafleXtreme.

ARAÚJO, P.; FERREIRA, M. S.; DE OLIVEIRA, D. N.; PEREIRA, L.; SAWAYA, A. C. H. F.; Catharino, R. R.; Mazzafera, P. Mass Spectrometry Imaging: An Expedient and Powerful Technique for Fast in Situ Lignin Assessment in Eucalyptus. *Anal. Chem.* 2014, 86 (7), 3415–3419.

AXELSSON, M.; GENTILI, F. A SINGLE-Step Method for Rapid Extraction of Total Lipids from Green Microalgae. *PLoS One* 2014, 9 (2), e89643.

BECKER, L.; CARRÉ, V.; POUTARAUD, A.; Merdinoglu, D.; Chaimbault, P. MALDI Mass Spectrometry Imaging for the Simultaneous Location of Resveratrol, Pterostilbene and Viniferins on Grapevine Leaves. *Molecules* 2014, 19 (7), 10587–10600.

BECKMAN, C. H. Phenolic-Storing Cells: Keys to Programmed Cell Death and Periderm Formation in Wilt Disease Resistance and in General Defence Responses in Plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000, 57 (3), 101–110.

BENVENISTE, P. BIOSYNTHESIS AND ACCUMULATION OF STEROLS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004, 55 (1), 429–457.

BJARNHOLT, N.; Li, B.; D'Alvise, J.; Janfelt, C. Mass Spectrometry Imaging of Plant Metabolites--Principles and Possibilities. *Nat. Prod. Rep.* 2014, 31 (6), 818–837.

CAFÉ DE COLOMBIA. Historia del café Recuperado el 12 de Julio del 2016 en: [http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre\\_el\\_cafe/el\\_cafe/el\\_cafe/](http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_cafe/)

CALVANO, C. D.; MONOPOLI, A.; DITARANTO, N.; Palmisano, F. 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene/9-Aminoacridine: A New Binary Matrix for Lipid Fingerprinting of Intact Bacteria by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2013, 798, 56–63.

CEQUIER-SÁNCHEZ, E.; RODRÍGUEZ, C.; RAVELO, A. G.; ZÁRATE, R. Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (12), 4297–4303.

CERRUTI, C. D.; BENABDELLAH, F.; LAPRÉVOTE, O.; TOUBOUL, D.; Brunelle, A. MALDI Imaging and Structural Analysis of Rat Brain Lipid Negative Ions with 9-Aminoacridine Matrix. *Anal. Chem.* 2012, 84 (5), 2164–2171.

CHRISTENSEN, S. A.; KOLOMIETS, M. V. The Lipid Language of Plant-Fungal Interactions. *Fungal Genet. Biol.* 2011, 48 (1), 4–14.

CHRISTIE, W. W. *PREPARATION OF LIPID EXTRACTS FROM TISSUES*; Invergowrie, Dundee, 1993.

CLEMIS, E. J. QUANTITATION of Spatially-Localized Protein in Tissue Samples Using MALDI-MRM Imaging, University of Victoria, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 2010, 15 (10), 7313–7352.

DICARBOXILIC ACID. Recuperado el 28 de Agosto del 2016 en: <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0004.htm>.

DONG, Y.; Li, B.; MALITSKY, S.; ROGACHEV, I.; Aharoni, A.; Kaftan, F.; Svatoš, A.; Franceschi, P. Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Front. Plant Sci.* 2016, 7 (February), 60.

DOUBSKY, J. Acid – Base-Driven Matrix-Assisted Mass Spectrometry for Targeted Metabolomics. 2009.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R. H.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; et al. A Comprehensive Classification System for Lipids. *J. Lipid Res.* 2005, 46, 839–861.

FREEMAN. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *Plant Heal. Instr.* 2008.

GEMPERLINE, E.; Li, L. MALDI-MS-Assisted Molecular Imaging of Metabolites in Legume Plants. In *Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules*; He, L., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2015; pp 29–40.

GÖBEL, C.; Feussner, I. Methods for the Analysis of Oxylipins in Plants. *Phytochemistry* 2009, 70 (13–14), 1485–1503.

GOTO-INOUE, N.; HAYASAKA, T.; ZAIMA, N.; Setou, M. Imaging Mass Spectrometry for Lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 2011, 1811 (11), 961–969.

GOTO-INOUE, N.; SETOU, M.; ZAIMA, N. Visualization of Spatial Distribution of Gamma-Aminobutyric Acid in Eggplant (*Solanum Melongena*) by Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Sci.* 2010, 26 (7), 821–825.

GRASSL, J.; TAYLOR, N. L.; Millar, a H. Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation Mass Spectrometry Imaging and Its Development for Plant Protein Imaging. *Plant Methods* 2011, 7 (1), 21.

GROSS, J. Mass Spectrometry; Springer, B., Ed.; 2004; pp 1–12.

GUILHAUS, M. Special Feature: Tutorial. Principles and Instrumentation in Time-of-Flight Mass Spectrometry. Physical and Instrumental Concepts. *J. Mass Spectrom.* 1995, 30 (11), 1519–1532.

HEARD, P. J.; Feeney, K. A.; Allen, G. C.; Shewry, P. R. Determination of the Elemental Composition of Mature Wheat Grain Using a Modified Secondary Ion Mass Spectrometer (SIMS). *Plant J.* 2002, 30 (2), 237–245.

HEREDIA\*, A.; CASADO, C. G.; Laguna, L.; Reina, J. J.; Serrano, J. M.; Dominguez, E. La Cuticula Vegetal : Estructura Y Funciones. *Ecologia* 1998, No. 12, 293–305.

HOLLOWAY, P. J.; DEAS, A. H. B.; Kabaara, A. M. Composition of Cutin from Coffee Leaves. *Phytochemistry* 1972, 11 (4), 1443–1447.

IMBUSCH, R.; Mueller, M. J. Formation of Isoprostane F2-like Compounds (Phytosteranes F1) from  $\alpha$ -Linolenic Acid in Plants. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 28 (5), 720–726.

IONIZATION CONSTANTS OF PHOSPHOLIPIDS. Recuperado el 30 de agosto del 2016 En:

<https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/ionization-constants/>

I

SCA, V. M. S.; SECA, A. M. L.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, H.; Silva, A. M. S. Lipophilic Profile of the Edible Halophyte *Salicornia Ramosissima*. *Food Chem.* 2014, 165, 330–336.

IWASHINA, T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J. Plant Res.* 2000, 113 (3), 287–299.

JÄPELT, R. B.; JAKOBSEN, J. Vitamin D in Plants: A Review of Occurrence, Analysis, and Biosynthesis. *Front. Plant Sci.* 2013, 4 (May), 136.

JENA, D.-. PROTON SPONGE : A Novel and Versatile MALDI Matrix for the Analysis of Metabolites Using Mass. 2009, 81 (19), 7954–7959.

KARAS, M.; KRÜGER, R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chem. Rev.* 2003, 103 (2), 427–440.

KASPAR, S.; PEUKERT, M.; SVATOS, A.; Matros, A.; Mock, H. P. MALDI-Imaging Mass Spectrometry - An Emerging Technique in Plant Biology. *Proteomics* 2011, 11 (9), 1840–1850.

KNOCHENMUSS, R. Ion Formation Mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* 2006, 131 (9), 966.

KORTE, A. Development of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry Imaging ( MALDI- MSI ) for Plant Metabolite Analysis, Iowa State University, 2014.

KORTE, A. R.; LEE, Y. J. MALDI-MS Analysis and Imaging of Small Molecule Metabolites with 1,5-Diaminonaphthalene (DAN). *J. Mass Spectrom.* 2014, 49 (8), 737–741.

KORTE, A. R.; LEE, Y. J. MALDI-MS Analysis and Imaging of Small Molecule Metabolites with 1,5-Diaminonaphthalene (DAN). *J. Mass Spectrom.* 2014, 49 (8), 737–741.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; Cardinali, A.; Amendola, V. *Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants against Fungal Pathogens and Insects*; Filippo Imperato, Ed.; Bari, Italy, 2006; Vol. 661.

LAXALT, A. M.; MUNNIK, T. Phospholipid Signalling in Plant Defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002, 5 (4), 332–338.

LEE, Y. J.; PERDIAN, D. C.; SONG, Z.; YEUNG, E. S.; Nikolau, B. J. Use of Mass Spectrometry for Imaging Metabolites in Plants. *Plant J.* 2012, 70 (1), 81–95.

LIN, H.-Y.; SONG, B.; Lu, I.-C.; HSU, K.-T.; Liao, C.-Y.; Lee, Y.-Y.; Tseng, C.-M.; Lee, Y.-T.; Ni, C.-K. Is Energy Pooling Necessary in Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014, 28 (1), 77–82.

MALDI-TOF. Recuperado el 30 de Julio del 2016 en:  
[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/RelatedContent/Files/1314735988470/litdoc18114403AA\\_20110830232018.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1314735988470/litdoc18114403AA_20110830232018.pdf)

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; Tuñón, M. J. Los Flavonoides: Propiedades Y Acciones Antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 2002, 17 (6), 271–278.

MATTA, A.; RALHAN, R.; DESOUZA, L. V.; Siu, K. W. M. Mass Spectrometry-Based Clinical Proteomics: Head-and-Neck Cancer Biomarkers and Drug-Targets Discovery. *Mass Spectrom. Rev.* 2010, 29 (6), 945–961.

MCDONNELL, L. A.; HEEREN, R. M. A. Imaging Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2007, 26 (4), 606–643.

MOLIN, L.; SERAGLIA, R.; DANI, F. R.; Moneti, G.; Traldi, P. The Double Nature of 1,5-Diaminonaphthalene as Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Matrix: Some Experimental Evidence of the Protonation and Reduction Mechanisms. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011, 25 (20), 3091–3096.

MONGRAND, S.; BADOUC, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; Chavent, M.; Bessoule, J.-J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae Family Based on Leaf Fatty Acid Composition. *Phytochemistry* 2005, 66 (5), 549–559.

MOURADOV, A.; SPANGENBERG, G. Flavonoids: A Metabolic Network Mediating Plants Adaptation to Their Real Estate. *Front. Plant Sci.* 2014, 5 (November), 620.

MUNNIK, T. PHOSPHATIDIC Acid: An Emerging Plant Lipid Second Messenger. *Trends Plant Sci.* 2001, 6 (5), 227–233.

NODA, M.; TANAKA, M.; Seto, Y.; Aiba, T.; Oku, C. Occurrence of Cholesterol as a Major Sterol Component in Leaf Surface Lipids. *Lipids* 1988, 23 (5), 439–444.

OTEIZA, P. I.; Erlejman, A. G.; Verstraeten, S. V; Keen, C. L.; Fraga, C. G. Flavonoid-Membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? *Clin. Dev. Immunol.* 2005, 12 (1), 19–25.

OZERYANSKII, V. A.; POZHARSKII, A. F.; Antonov, A. S.; Filarowski, A. Out-Basicity of 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene: The Experimental and Theoretical Challenge. *Org. Biomol. Chem.* 2014, 12 (15), 2360.

PARK, K.-E.; Kim, J.-D.; Nagashima, Y.; Kako, K.; Daitoku, H.; Matsui, M.; Park, G. G.; Fukamizu, A. Detection of Choline and Phosphatidic Acid (PA) Catalyzed by Phospholipase D (PLD) Using MALDI-QIT-TOF/MS with 9-Aminoacridine Matrix. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2014, 78 (6), 981–988.

PLANT OXYLIPINS Recuperado el 01 de Septiembre del 2016 en: <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39315>

RÖMPP, A.; SPENGLER, B. Mass Spectrometry Imaging with High Resolution in Mass and Space. *Histochem. Cell Biol.* 2013, 139 (6), 759–783.

ROYA FLUSHED. Recuperado el 14 de agosto del 2016 en: <http://www.economist.com/news/americas/21608642-how-colombia-fought-fungus-roya-flushed>.

RUBAKHIN, S. S.; JURCHEN, J. C.; MONROE, E. B.; Sweedler, J. V. Imaging Mass Spectrometry: Fundamentals and Applications to Drug Discovery. *Drug Discov. Today* 2005, 10 (12), 823–837.

RUBAKHIN, S. S.; JURCHEN, J. C.; MONROE, E. B.; Sweedler, J. V.; Rubakhin, S.; Sweedler, J. *Keynote Review: Imaging Mass Spectrometry: Fundamentals and Applications to Drug Discovery*, 2005; Vol. 10.

SAMPLE PREPARATION Recuperado el 30 de Julio del 2016 en: <http://www.sdstate.edu/sites/default/files/chem/mass-spec/tutorials/upload/Maldi-Sample-Preparation.pdf>.

SAUER, K.; OKKENHAUG, K. Editorial: Lipid Signaling in T Cell Development and Function. *Front. Immunol.* 2015, 6.

SCHILLER, J.; Süß, R.; ARNHOLD, J.; Fuchs, B.; Leßig, J.; Müller, M.; Petković, M.; Spalteholz, H.; Zschörnig, O.; Arnold, K. Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in Lipid and Phospholipid Research. *Prog. Lipid Res.* 2004, 43 (5), 449–488.

SENASICA. Ficha Técnica No . 40 Roya Del Cafeto Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica LANREF - CP. 2013, No. 40, 27.

SHROFF, R.; RULÍSEK, L.; Doubsky, J.; Svatos, A. Acid-Base-Driven Matrix-Assisted Mass Spectrometry for Targeted Metabolomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106 (25), 10092–10096.

SHROFF, R.; SCHRAMM, K.; Jeschke, V.; Nemes, P.; Vertes, A.; Gershenzon, J.; Svatoš, A. Quantification of Plant Surface Metabolites by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry Imaging: Glucosinolates on *Arabidopsis Thaliana* Leaves. *Plant J.* 2015, 81 (6), 961–972.

SHROFF, R.; VERGARA, F.; Muck, A.; Svatos, A.; Gershenzon, J. Nonuniform Distribution of Glucosinolates in Arabidopsis Thaliana Leaves Has Important Consequences for Plant Defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, *105* (16), 6196–6201.

SIMMONS, D. a; Technologies, M. D. S. A. Improved MALDI-MS Imaging Performance Using Continuous Laser Rastering. *Tech. Note, MDS Anal. Technol.* 2008.

SPECIAL PROCEDURES. Recuperado el 12 de agosto del 2016 en: <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0006.htm#4>.

STEROIDS. Recuperado el 23 de Abril del 2016. <http://www.cyberlipid.org/simple/simple0008.htm>.

SVATOŠ, A. Mass Spectrometric Imaging of Small Molecules. *Trends Biotechnol.* 2010, *28* (8), 425–434.

TAFOLLA-ARELLANO, J. C.; González-León, A.; Tiznado-Hernández, M. E.; García, L. Z.; Báez-Sañudo, R. Composición, Fisiología Y Biosíntesis de La Cutícula En Plantas. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013, *36* (1), 3–12.

TESTERINK, C.; MUNNIK, T. Phosphatidic Acid: A Multifunctional Stress Signaling Lipid in Plants. *Trends Plant Sci.* 2005, *10* (8), 368–375.

TREUTTER, D. SIGNIFICANCE of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biol.* 2005, *7* (6), 581–591.

VIELER, A.; WILHELM, C.; GOSS, R.; Süß, R.; Schiller, J. The Lipid Composition of the Unicellular Green Alga Chlamydomonas Reinhardtii and the

Diatom *Cyclotella Meneghiniana* Investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chem. Phys. Lipids* 2007, 150 (2), 143–155.

VRKOSLAV, V.; MUCK, A.; CVACKA, J.; Svatos, A. MALDI Imaging of Neutral Cuticular Lipids in Insects and Plants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21 (2), 220–231.

WAXES And Other ESTERS. Recuperado el 15 de Julio del 2016 en: <http://www.cyberlipid.org/wax/wax0001.htm>.

WILLIAM G. HOLLIDAY, WHITNEY Crispen Hagins, A. B. Plant Structure and Function. In *Glencoe Biology, Student Edition BIOLOGY DYNAMICS OF LIFE*; McGraw-Hill, Ed.; Estados unidos, 2008.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiol.* 2013, 163 (September), 5–20.

ZHANG, H.; CHA, S.; YEUNG, E. S. Colloidal Graphite-Assisted Laser Desorption/Ionization MS and MS N of Small Molecules. 2. Direct Profiling and MS Imaging of Small Metabolites from Fruits. *Anal. Chem.* 2007, 79 (17), 6575–6584.

# **ANEXOS**

**ANEXO A. SEÑALES ASIGNADAS DEL EXTRACTO LIPÍDICO OBTENIDO CON  
CLOROFORMO: METANOL (2:1 %v/v) UTILIZANDO DMAN, 9-AA Y 1,5-DAN  
COMO MATRICES EN MODO ION NEGATIVO**

		Analito [M-H] <sup>-</sup>				Error [ppm]		
m/z	m/z	Fórmula	DMAN	9-AA	1,5-DAN			
<b>Experimental</b>	<b>Teórico</b>	<b>molecular</b>						
265.192	265.1809	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub>	-----	43.36	-----			
277.210	277.2173	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	24.89	-----	-----			
293.226	293.2122	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	-----	48.08	-----			
311.201	311.2228	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	69.70	23.77	-----			
325.218	325.2021	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>5</sub>	47.66	81.79	-----			
339.232	339.2541	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> O <sub>4</sub>	65.43	24.46	-----			
353.247	353.2334	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub>	-----	39.63	-----			
397.272	397.2748	C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> O <sub>3</sub>	-----	7.55	-----			
447.175	447.1813	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>6</sub>	-----	3.80	14.75			
453.226	453.2259	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub> P	-----	-----	0.22			
637.354	637.4086	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>10</sub> P	-----	-----	17.72			
769.490	769.4814	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>8</sub> P	-----	11.14	-----			
793.483	793.4873	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> O <sub>13</sub> P	6.42	-----	87.45			
815.487	815.4869	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> O <sub>10</sub> P	0.12	-----	-----			
829.529	829.4873	C <sub>43</sub> H <sub>74</sub> O <sub>13</sub> P	-----	50.15	-----			

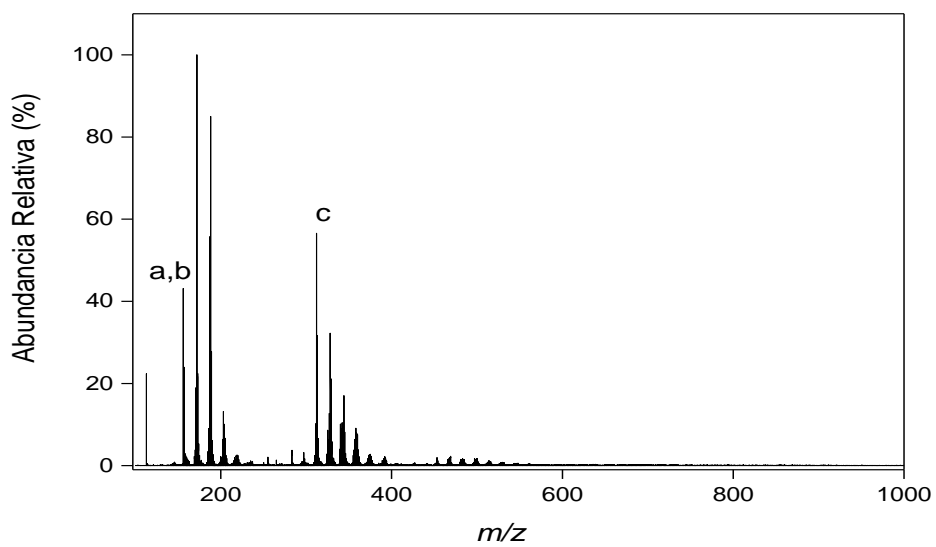
**ANEXO B. SEÑALES ASIGNADAS DEL EXTRACTO LIPÍDICO OBTENIDO CON CLOROFORMO: METANOL (2:1 %v/v) UTILIZANDO DMAN, 9-AA Y 1,5-DAN COMO MATRICES EN MODO ION NEGATIVO.**

Analito [M-H] <sup>-</sup>			Error [ppm]		
<b>m/z</b>	<b>m/z</b>	<b>Fórmula</b>	<b>DMAN</b>	<b>9-AA</b>	<b>1,5-DAN</b>
<b>Experimental</b>	<b>Teórico</b>	<b>molecular</b>			
255.248	255.2330	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>	61.51	-----	-----
277.222	277.2173	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	20.20	-----	-----
283.280	283.2643	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub>	57.19	-----	-----
311.222	311.2228	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	-----	3.85	-----
325.200	325.2021	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>5</sub>	5.53	-----	-----
339.256	339.2541	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> O <sub>4</sub>	-----	6.77	-----
447.197	447.1813	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>6</sub>	-----	35.33	29.74
453.225	453.2259	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub> P	-----	-----	0,22
455.352	455.3531	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	0.43	-----	-----
473.2855	473.3061	C <sub>32</sub> H <sub>41</sub> O <sub>3</sub>	43.52	-----	-----
637.395	637.4086	C <sub>32</sub> H <sub>62</sub> O <sub>10</sub> P	-----	19.76	21.96
653.390	653.3671	C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub> P	-----	34.43	-----
665.442	655.4399	C <sub>34</sub> H <sub>66</sub> O <sub>10</sub> P	-----	2.74	-----
687.437	687.4243	C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> O <sub>10</sub> P	-----	18.62	-----
769.501	769.4814	C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>8</sub> P	-----	25.21	-----
793.470	793.4873	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> O <sub>13</sub> P	-----	-----	21.92

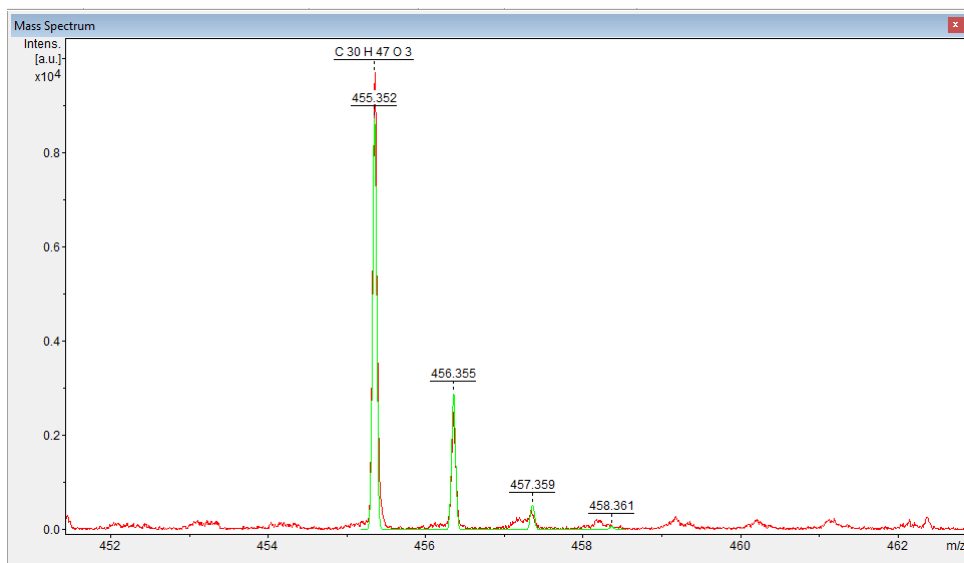
**ANEXO C. SEÑALES ASIGNADA DEL EXTRACTO LIPÍDICO OBTENIDO CON METANOL UTILIZANDO DMAN Y 1,5-DAN COMO MATRICES EN MODO ION NEGATIVO.**

Analito [M-H] <sup>-</sup>			Error [ppm]	
<b>m/z</b>	<b>m/z</b>	<b>Fórmula</b>	<b>DMAN</b>	<b>1,5-DAN</b>
<b>Experimental</b>	<b>Teórica</b>	<b>molecular</b>		
301.075	301.0718	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	11.62	-----
307.128	307.1340	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub>	19.20	-----
353.137	353.1395	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>5</sub>	6.79	-----
421.132	421.1239	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>7</sub>	29.44	-----
447.193	447.1813	C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> O <sub>6</sub>	27.72	-----
463.148	463.1610	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	27.20	-----
609.189	609.1825	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub>	-----	10.67
625.185	625.1774	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>16</sub>	-----	12.15
755.242	755.2040	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>20</sub>	-----	50.31
771.236	771.2353	C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> O <sub>20</sub>	-----	0.90

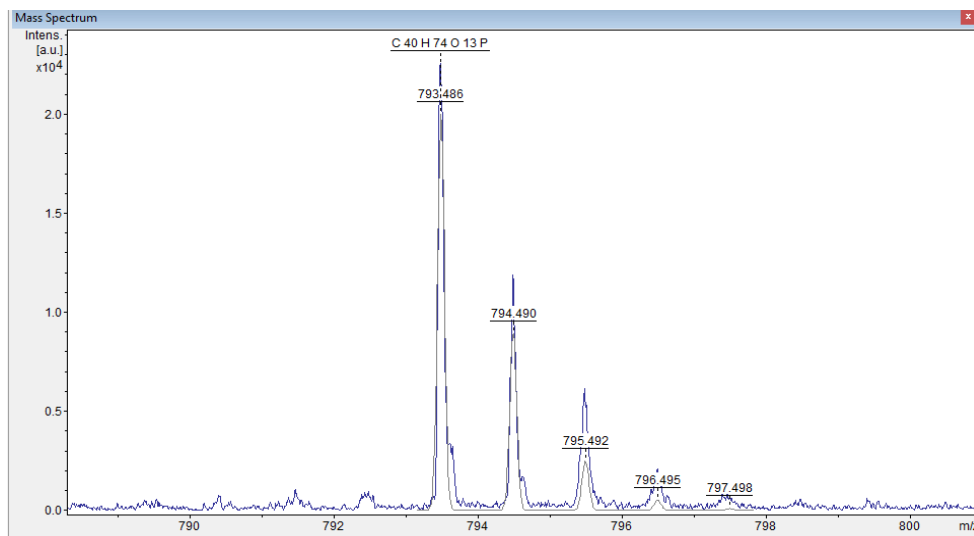
**ANEXO D. SEÑALES ASIGNADA DEL EXTRACTO LIPÍDICO OBTENIDO CON METANOL UTILIZANDO DMAN Y 1,5-DAN COMO MATRICES EN MODO ION NEGATIVO.**



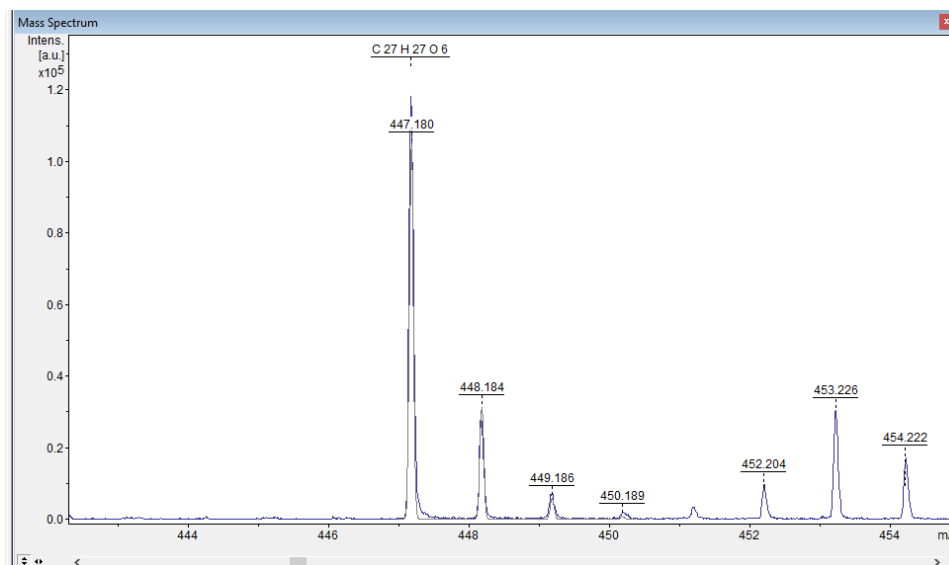
**ANEXO E. PATRÓN ISOTÓPICO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE LA SEÑAL  
CORRESPONDIENTE AL ION [M-H]<sup>-</sup> CON m/z 637.386 [M-H]<sup>-</sup>.**



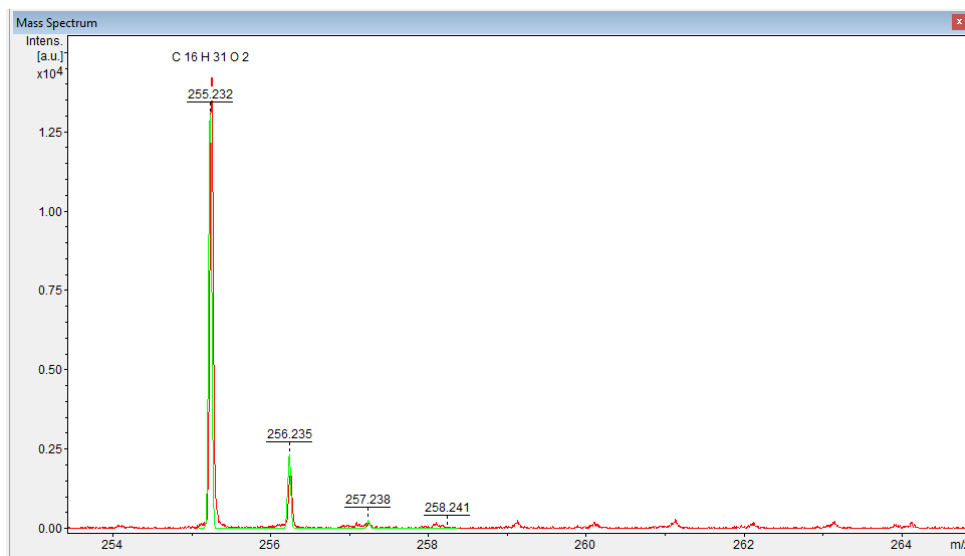
**ANEXO F. PATRÓN ISOTÓPICO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE LA SEÑAL  
CORRESPONDIENTE AL ION  $[M-H]^-$  CON  $m/z$  793.486  $[M-H]^-$ .**



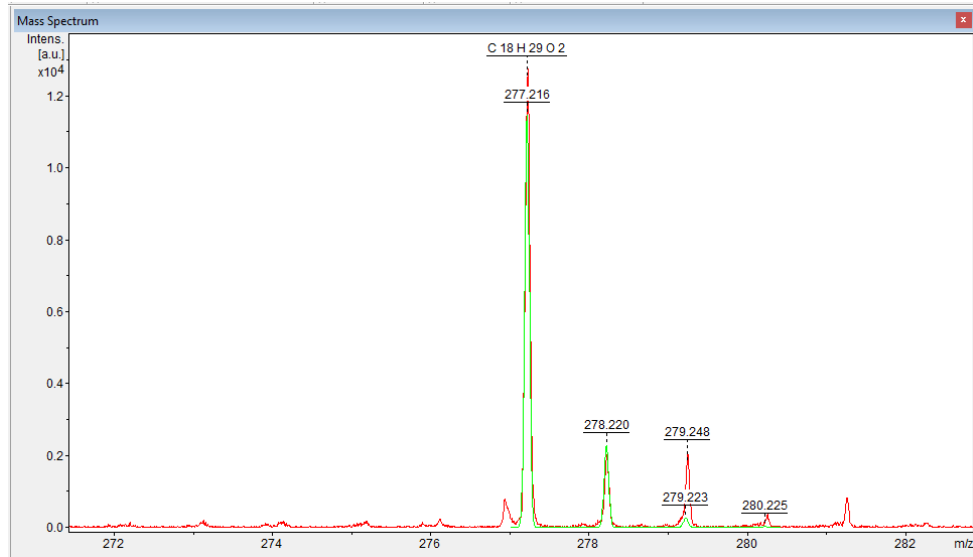
**ANEXO G. PATRÓN ISOTÓPICO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE LA SEÑAL  
CORRESPONDIENTE AL ION [M-H]<sup>-</sup> CON  $m/z$  447.180 [M-H]<sup>-</sup>.**



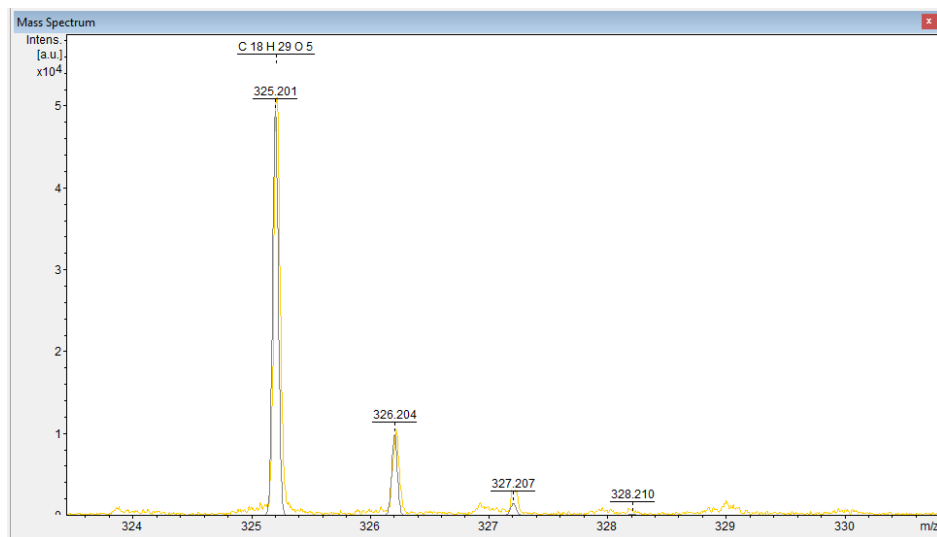
**ANEXO H. PATRÓN ISOTÓPICO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE LA SEÑAL  
CORRESPONDIENTE AL ION  $[M-H]^-$  CON  $m/z$  255.232  $[M-H]^-$ .**



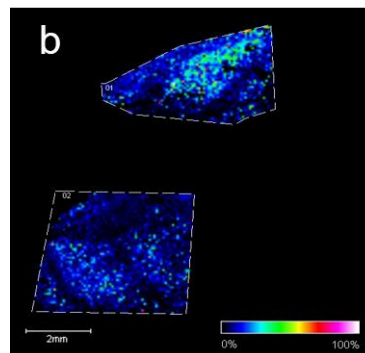
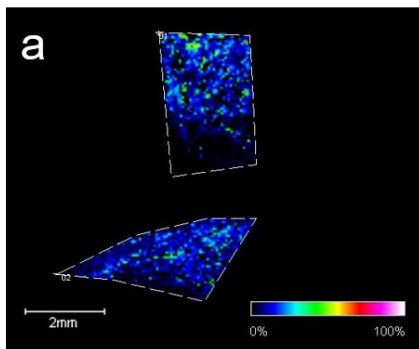
**ANEXO I. PATRÓN ISOTÓPICO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE LA SEÑAL  
CORRESPONDIENTE AL ION [M-H]<sup>-</sup> CON  $m/z$  277.216 [M-H]<sup>-</sup>.**



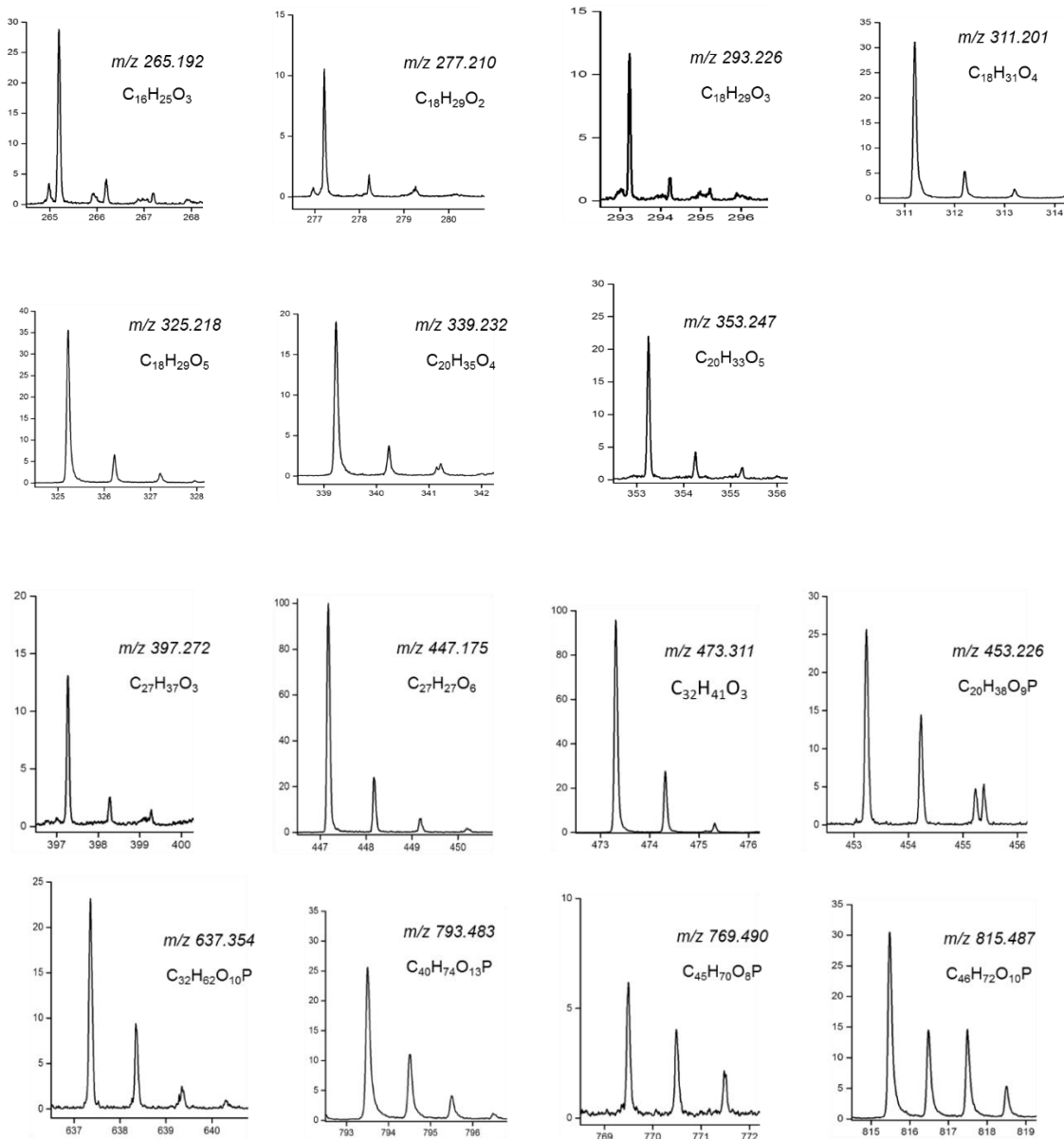
**ANEXO J. PATRÓN ISOTÓPICO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO DE LA SEÑAL  
CORRESPONDIENTE AL ION  $[M-H]^-$  CON  $m/z$  325.201  $[M-H]^-$ .**

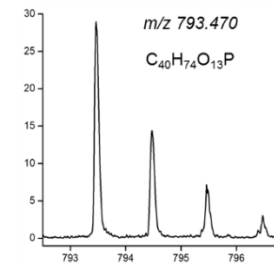
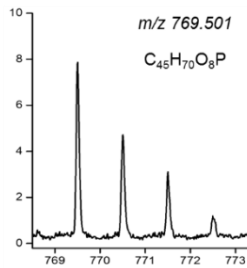
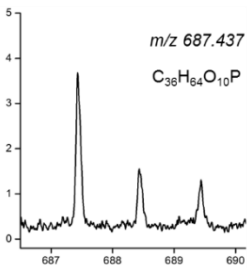
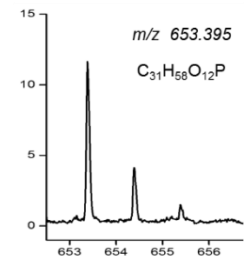
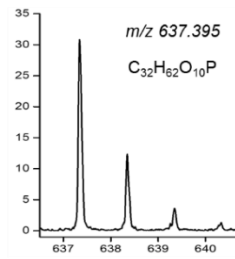
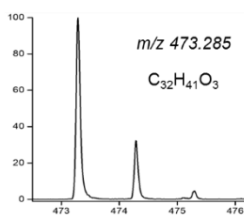
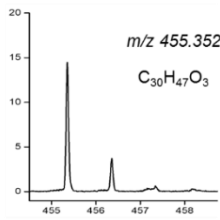
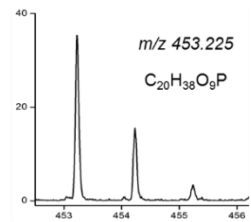
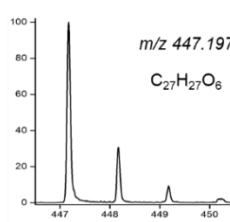
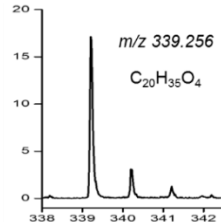
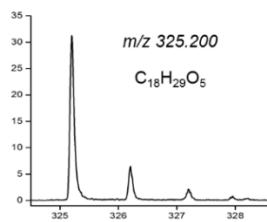
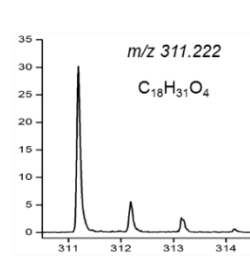
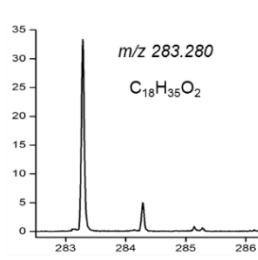
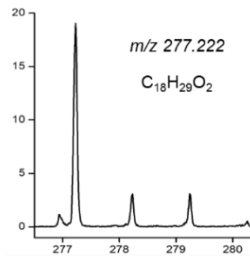
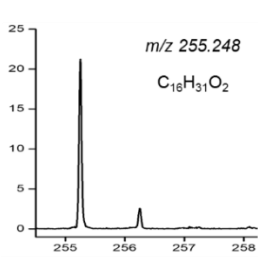


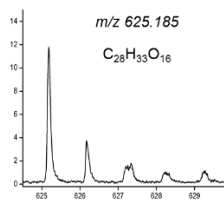
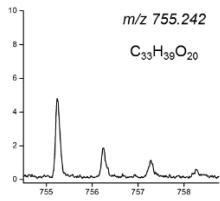
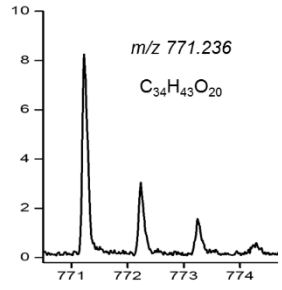
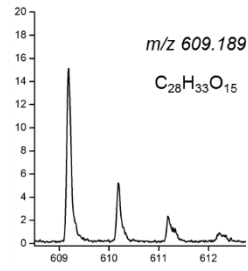
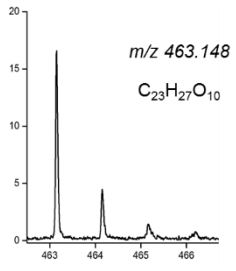
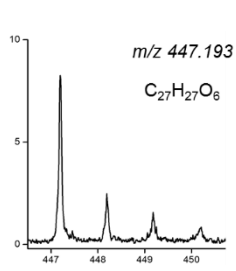
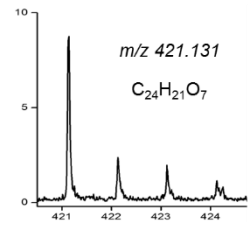
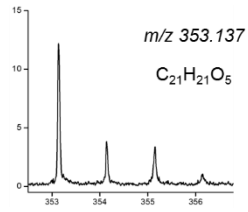
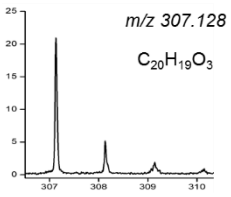
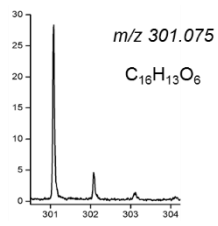
**ANEXO K. MALDI-IMS DE UNA HOJA DE CAFÉ (PARTE MEDIA Y BASE)  
CORRESPONDIENTE A LOS PICOS CARACTERÍSTICOS DE LA MATRIZ a) 9-  
AA ( $m/z$  193.099) Y b) 1,5-DAN ( $m/z$  157.052) COMO IONES  $[M-H]^-$ .**



**ANEXO L. PATRÓN ISOTÓPICOS EXPERIMENTALES DE LAS SEÑAL  
IDENTIFICAS EN LOS EXTRACTOS DE CLOROFORMO: METANOL (2:1),  
HEXANO Y METANOL COMO IONES [M-H]-**







# ANEXO M. PÓSTER CONGRESO

## Identification of Lipids extracted from leaves of a Colombian Coffee Plant (*Coffea Arabica*) using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-Flight Mass Spectrometry



Rivero D. Alexander-Correa, Johnson J. Alexander-Correa, Cristian Rivera-Trejo and Maritany C. Castañeda  
 Facultad de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander 680001, Colombia.  
 maritany@uis.edu.co

**ABSTRACT:** Coffee is an important crop plant in Colombia. However, the coffee plant is an important component in terms of medicinal and aromatic compounds. The aromatic compounds are responsible for the specific taste and quality of coffee beans. The identification of these compounds is a complex task. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a powerful tool for the identification of these compounds. In this work, we used MALDI-TOF MS to identify the lipids extracted from the leaves of a Colombian coffee plant. The results show that the coffee leaves contain a wide variety of lipids, including fatty acids, glycerolipids, and sterols. The identification of these lipids is important for the study of the coffee plant's biology and for the development of new coffee products.

### INTRODUCTION

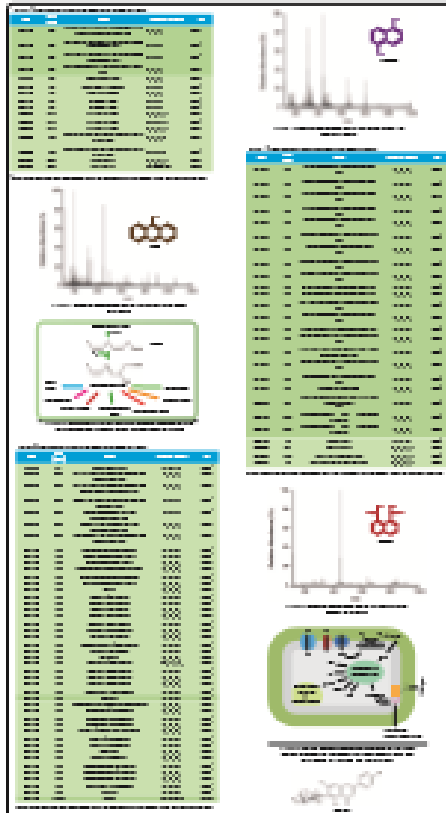
Coffee is an important crop plant in Colombia. However, the coffee plant is an important component in terms of medicinal and aromatic compounds. The aromatic compounds are responsible for the specific taste and quality of coffee beans. The identification of these compounds is a complex task. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a powerful tool for the identification of these compounds. In this work, we used MALDI-TOF MS to identify the lipids extracted from the leaves of a Colombian coffee plant. The results show that the coffee leaves contain a wide variety of lipids, including fatty acids, glycerolipids, and sterols. The identification of these lipids is important for the study of the coffee plant's biology and for the development of new coffee products.

### CONCLUSION

The results of this study show that the coffee leaves contain a wide variety of lipids, including fatty acids, glycerolipids, and sterols. The identification of these lipids is important for the study of the coffee plant's biology and for the development of new coffee products. The use of MALDI-TOF MS is a powerful tool for the identification of these compounds.

### REFERENCES

1. Rivero D. Alexander-Correa, Johnson J. Alexander-Correa, Cristian Rivera-Trejo and Maritany C. Castañeda. Identification of Lipids extracted from leaves of a Colombian Coffee Plant (*Coffea Arabica*) using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2023.
2. Johnson J. Alexander-Correa, Cristian Rivera-Trejo, and Maritany C. Castañeda. Identification of Lipids extracted from leaves of a Colombian Coffee Plant (*Coffea Arabica*) using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2023.
3. Cristian Rivera-Trejo, Johnson J. Alexander-Correa, and Maritany C. Castañeda. Identification of Lipids extracted from leaves of a Colombian Coffee Plant (*Coffea Arabica*) using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2023.
4. Maritany C. Castañeda, Johnson J. Alexander-Correa, and Cristian Rivera-Trejo. Identification of Lipids extracted from leaves of a Colombian Coffee Plant (*Coffea Arabica*) using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2023.



### CONCLUSION

The results of this study show that the coffee leaves contain a wide variety of lipids, including fatty acids, glycerolipids, and sterols. The identification of these lipids is important for the study of the coffee plant's biology and for the development of new coffee products. The use of MALDI-TOF MS is a powerful tool for the identification of these compounds.

**OVERVIEW**

Low molecular weight metabolites (LMWM), e.g. phospholipids, glycosphingolipids, fatty acids and glycerolipids, help to prevent dehydration and act like signaling molecules to activate defense mechanisms in plants. MALDI IMS can provide spatial and temporal distributions of metabolites possibly involved in defense mechanisms against *Coffea arabica* pathogens like coffee rust.

LMWM, such as flavonoids, phospholipids, terpenoids and fatty acids, were detected as deprotonated molecules [M-H]<sup>-</sup> through a Bronsted-Lowry reaction involving proton transfer from the analytes to MALDI basic matrices (9-AA, 1,5-DAN and DMAN). In MALDI-MSI metabolite spatial distribution in coffee leaves is matrix-dependent.

**INTRODUCTION**

Genomic methods are normally used to obtain information about plant-disease interactions. These methods, although useful to identify alteration in metabolic routes and plant response to attacks, do not provide real-time data and metabolite localization and alterations. MALDI-MSI is useful to track temporal and spatial changes in low molecular weight metabolites which can also help understand the nature of plant-disease interactions such as the case of coffee rust, the most economically important coffee disease in Colombia and the world.

We developed a MALDI IMS method, using basic matrices (9-AA, 1,5-DAN and DMAN), to locate and identify phospholipids, fatty acids, flavonoids in Colombian coffee leaves. These compounds help to prevent dehydration and act like signaling molecules to activate defense mechanisms in plants.

**METHODS**

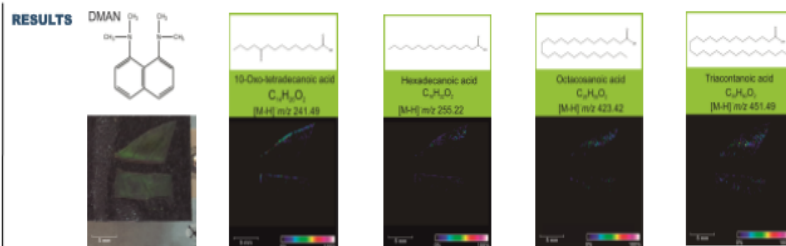
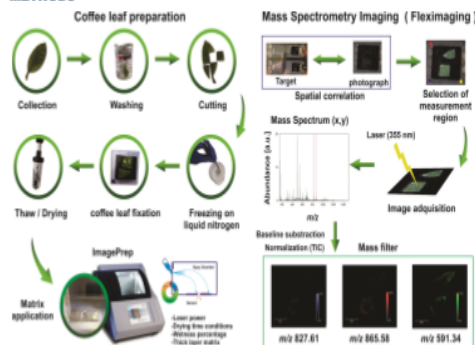


Figure 1. MSI of coffee leaves, using DMAN as matrix, showing predominantly signals corresponding to deprotonated molecules of fatty acids. (Top: leaf base; Bottom: leaf middle section including midrib.)

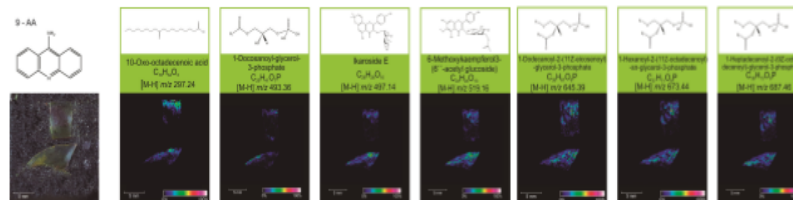


Figure 2. MSI of coffee leaves, using 9-AA as matrix, showing predominantly signals corresponding to deprotonated molecules of flavonoids, phosphatic acid. (Top: leaf middle section; Bottom: leaf base.)

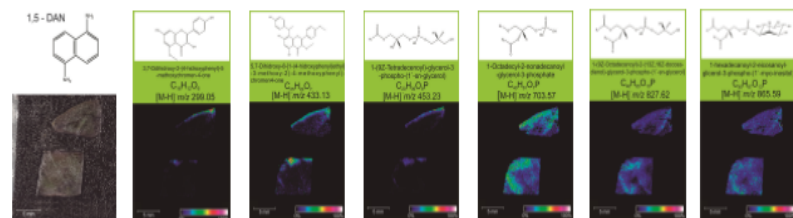


Figure 3. MSI of coffee leaves using 1,5-DAN as matrix, showing predominantly signals corresponding to deprotonated molecules of flavonoids, phosphatidylglycerols (PG), phosphatic acid and phosphatidylinositol. (Top: leaf base; Bottom: leaf middle section.)

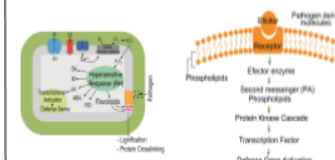


Figure 4. Metabolites involved in plant defense mechanisms against pathogens.<sup>11,12</sup>

**CONCLUSIONS**

-Negative ion mode MALDI IMS protocols were used to locate and identify phospholipids, fatty acids and flavonoids in Colombian coffee leaves. These compounds are important plant metabolites related to activation defense mechanisms in plants.

-Detection of LMWM in MALDI IMS of coffee leaves is matrix-dependent. The use of DMAN, as MALDI matrix, allowed observation of signals corresponding to deprotonated molecules of fatty acids. When 1,5-DAN was used, signals corresponding to deprotonated molecules of flavonoids, phosphatidylglycerols (PG), phosphatic acid (PA) and phosphatidylinositol (PI) were detected. Finally, 9-AA signals corresponding to deprotonated molecules of flavonoids, fatty acid and phosphatic acid (PA).

-LMWM have distinctive distributions on the leaves surface. While high abundance of fatty acid and flavonoids was observed on the leaves veins and margin, phosphatidylglycerols (PG), phosphatic acid and phosphatidylinositol were uniformly distributed on the leaves.

**REFERENCES**

1. Vrkoslav, V.; Muck, A.; Cracka, J.; Svatoš, A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 220-231.
2. Korte, A. R.; Jin, Y. **2014**, 737-741.
3. Shroff, R.; Rulisek, L.; Doubek, J.; Svatoš, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 10092-10096.
4. Holloway, P. J.; Deas, A. H. B.; Kabaara, A. M. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1443-1447.
5. Badoc, A.; Falouile, B.; Lacombez, C. **2006**, *50*, 549-559.
6. Silva, D. B.; Lopes, N. P. **2016**, 182-190.
7. Poms, P. E. S. **2002**, 2782-2787.
8. Al-saad, K. A.; Zaboronkov, V.; Siems, W. F.; Knowles, N. R.; Haman, R. M.; Jr. H. H. **2000**.
9. Harvey, D. J. **1996**, *30*, 1333-1346.
10. Mieczak, J.; Korytnik, K.; Kalma, A. *Molecules* **2014**, *19*, 16240-16265.
11. Jean-Benoit Morel; Dangl, J. L.; Morel, J. B.; Dangl, J. L. *Cell Death Differ.* **1997**, *4*, 671-683. **2002**, *5*, 332-338.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge technical support from the Mass Spectrometry Lab, Central Research Laboratory Facility at Guatiquiare's Campus-Universidad Industrial de Santander. Financial support was provided by the Vice-rector for Research Office at Universidad Industrial de Santander (Grant 1537). We also acknowledge Dr. Alvaro Galbán, from CENI-CAFÉ, for coffee leaves samples and useful discussions.