

DISEÑO RACIONAL Y SÍNTESIS DE NUEVAS MATRICES MALDI DE  
TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA BASADAS EN 2,7-DIBROMOFLUORENO

LAURA MARÍA CRISTANCHO GONZÁLEZ

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2016

Diseño racional y síntesis de nuevas matrices MALDI de transferencia electrónica  
basadas en 2,7-dibromofluoreno

Laura María Cristancho González

Trabajo de grado para optar al título de  
QUÍMICO

Directora

Marianny Yajaira Combariza Montañez, PhD.

Co-director

Juan Sebastián Ramírez Pradilla, M.Sc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2016

## DEDICATORIA

*A mis padres, mi hermano y a Sebastián por su apoyo incondicional y haber sido la mejor compañía durante esta etapa.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitirme cumplir esta meta.

A la Universidad Industrial de Santander y a los profesores Marianny Yajaira Combariza y Cristian Blanco, por abrirme las puertas de su laboratorio y acogerme en su grupo de investigación GIFTEX, por la orientación y consejos en la elaboración del proyecto de grado.

Al codirector de la tesis Juan Sebastián Ramírez, por compartir sus conocimientos, por su paciencia y constante apoyo a lo largo de la tesis, que aportaron considerablemente a mi crecimiento profesional.

A mis amigos incondicionales Karent, Angie y Yeison por ser una bendición en mi vida, por darme luz, alegría, fortaleza y optimismo en todo momento.

A Sergio, por su sincera amistad, compañía y motivación durante las largas jornadas nocturnas para la elaboración del escrito.

A la entidad COLCIENCIAS por el apoyo económico para el desarrollo de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	20
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
2. JUSTIFICACIÓN .....	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MARCO TEÓRICO .....	26
4.1 MALDI .....	27
4.2 MECANISMO DE IONIZACIÓN MALDI .....	28
4.3 MATRICES UV-MALDI .....	30
4.4 ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO (TOF) .....	32
4.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA Y VISIBLE .....	33
4.5.1 Espectroscopia de reflectancia difusa.....	34
4.6 ESTADO DEL ARTE .....	35
5. METODOLOGÍA .....	42
5.1 CÁLCULOS COMPUTACIONALES .....	42
5.2 SÍNTESIS DE FLs .....	43
5.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FLs.....	43
5.4 CARACTERIZACIÓN OPTOELECTRÓNICA DE FLs.....	43
5.4.1 Determinación de los coeficientes de absorptividad molar .....	44
5.4.2 Análisis de Reflectancia Difusa.....	44
5.5 MALDI-MS.....	45
5.5.1 Preparación de la muestra .....	45
5.5.2 Experimentos de masas .....	45

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	48
6.1 DISEÑO RACIONAL DE FLs .....	48
6.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS DE FLUORENO .....	49
6.2.1 Síntesis.....	49
6.2.2 Caracterización de FLs .....	52
6.3 CARACTERIZACIÓN OPTOELECTRÓNICA DE FLs.....	57
6.3.1 Longitud de máxima absorción .....	57
6.3.2 Determinación de coeficientes de absortividad molar ( $\epsilon$ ).....	59
6.3.3 Reflectancia difusa .....	60
6.4 EVALUACIÓN DE DERIVADOS DE FLUORENO COMO MATRICES ET- MALDI .....	61
6.4.1 Experimentos LDI-MS .....	61
6.4.2 Experimentos MALDI-MS con analito modelo.....	67
6.4.3 Experimentos MALDI-MS con mezcla de analitos modelo .....	73
6.4.4 Experimentos MALDI-MS con muestra real .....	78
7. CONCLUSIONES .....	82
8. RECOMENDACIONES .....	83
REFERENCIAS .....	84
BIBLIOGRAFÍA .....	90
ANEXOS .....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema de ionización MALDI.....	28
Figura 2. Esquema de fotoionización y posibles vías de reacción en MALDI-MS. ....	29
Figura 3. Estructuras de moléculas empleadas como matrices MALDI para el análisis de porfirinas y ftalocianinas.....	31
Figura 4. Esquema de un analizador de tiempo de vuelo-refletrón (Re-TOF). <sup>4</sup> ...	33
Figura 5. Efectos de la radiación incidente sobre una muestra. ....	35
Figura 6. Espectros MALDI positivo del bis(4-metoxifenil)metano[60]fullereno con diferentes matrices. <sup>5</sup> .....	37
Figura 7. Estructuras de los compuestos candidatos.....	42
Figura 8. Portamuestra para análisis por reflectancia difusa. ....	44
Figura 9. Estructura molecular de las matrices FLs. ....	48
Figura 10 . Espectro IR del FL-CN.....	53
Figura 11. Espectros RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C del FL-CN. ....	53
Figura 12. Espectro NOESY del FL-CN.....	55
Figura 13. Espectro HMQC del FL-CN. ....	56
Figura 14. Espectro HMBC del FL-CN.....	57
Figura 15. Espectros de absorción UV-Vis de FL-H, FL-Cl, FL-CN, FL-CH <sub>3</sub> y FL-OCH <sub>3</sub> a una concentración de 5mM. ....	58

Figura 16. Curvas de calibración de las matrices sintetizadas. ....	60
Figura 17. Espectros de reflectancia difusa para FL-H, FL-Cl, FL-CN, FL-CH <sub>3</sub> , FL-OCH <sub>3</sub> y DCTB. ....	61
Figura 18. Espectros LDI y perfiles isotópicos experimentales de las matrices sintetizadas FL-H, FL-Cl, FL-CN, FL-CH <sub>3</sub> y FL-OCH <sub>3</sub> .....	64
Figura 19. (a) Curva de aparición de iones, (b) Relación S/N y (c) Resolución para el ion molecular de las matrices.....	65
Figura 20. Espectros LDI del FL-OCH <sub>3</sub> a energías del láser de 0.83, 1.24 y 3.3 μJ/pulso. ....	66
Figura 21. Estructura de la porfirina de Cobalto C <sub>48</sub> H <sub>36</sub> CoN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> .....	67
Figura 22. Espectros de la porfirina de Cobalto C <sub>48</sub> H <sub>36</sub> CoN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> a) LDI y utilizando como matrices b) DCTB, c) FL-CN, d) FL-CH <sub>3</sub> y e) FL-OCH <sub>3</sub> .....	69
Figura 23. (a) Curva de aparición de iones, (b) Relación S/N y (c) Resolución para el ion molecular de la porfirina de cobalto.....	70
Figura 24. Grafica de relación S/N vs relación molar matriz:analito utilizando como matriz FL-CN, FL-CH <sub>3</sub> , FL-OCH <sub>3</sub> y DCTB.....	71
Figura 25. Decaimiento de la relación S/N en función del tiempo empleando como matrices FL-CN, FL-CH <sub>3</sub> , FL-OCH <sub>3</sub> y DCTB.....	73
Figura 26. Estructuras de las porfirinas y ftalocianinas de la mezcla analizada por MALDI.....	76
Figura 27. Espectros de la mezcla de porfirinas y ftalocianinas a) LDI y utilizando como matriz b) DCTB, c) FL-CN, d) FL-OCH <sub>3</sub> . ....	77

Figura 28. Espectros APPI, LDI y MALDI de petroporfirinas de crudo colombiano utilizando como matrices DCTB, FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub>.....81

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema general de la reacción para la síntesis de derivados del 2,7-dibromofluoreno. ....	50
Esquema 2. Mecanismo de reacción para la obtención de los derivados de fluoreno 2a-e.....	51

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación S/N para el polímero PMMA 14kDa utilizando 10 nuevas matrices MALDI descubiertas con un enfoque de selección screening/rational. ....	39
Tabla 2. PI calculados mediante empleando la teoría de Koopmans. ....	49
Tabla 3. Rendimientos y tiempos de reacción para la serie de compuestos 3a-e. ....	50
Tabla 4. Valores de relación S/N y mass accuracy para ion molecular de las matrices sintetizadas y DCTB. ....	63
Tabla 5. Valores de relación S/N y mass accuracy para ion molecular de la porfirina de cobalto ( $M^{+}$ ). ....	68
Tabla 6. Valores de mass accuracy para porfirinas y ftalocinanas presentes en la muestra analizada por MALDI. ....	78
Tabla 7. Cobertura de las matrices MALDI para el análisis de petroporfirinas de un crudo colombiano. ....	80

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Reacción de transferencia electrónica. ....	30
Ecuación 2. Luz absorbida por una muestra en reflectancia difusa. ....	34

## ANEXOS

Anexo A. Caracterización FT-IR y RMN de derivados del 2,7-dibromofluoreno. ...	98
Anexo B. Espectro infrarrojo del 2,7-dibromofluoreno. ....	100
Anexo C. Espectro infrarrojo del FL-H. ....	101
Anexo D. Espectro infrarrojo del FL-Cl. ....	102
Anexo E. Espectro IR del FL-CN. ....	103
Anexo F. Espectro infrarrojo del FL-CH <sub>3</sub> . ....	104
Anexo G. Espectro infrarrojo del FL-OCH <sub>3</sub> . ....	105
Anexo H. Espectro RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C del FL-CN. ....	106
Anexo I. Espectro RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C del FL-CH <sub>3</sub> . ....	107
Anexo J. Espectro RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C del FL-OCH <sub>3</sub> . ....	108
Anexo K. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina C <sub>32</sub> H <sub>18</sub> N <sub>8</sub> utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> . ....	109
Anexo L. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina C <sub>32</sub> H <sub>16</sub> N <sub>8</sub> Ni utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> . ....	109
Anexo M. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina C <sub>32</sub> H <sub>16</sub> N <sub>8</sub> Zn utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> . ....	110
Anexo N. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> . ....	110

Anexo O. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina $C_{44}H_{31}N_5$ utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> .....	111
Anexo P. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina $C_{48}H_{26}N_8$ utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> .....	111
Anexo Q. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina $C_{48}H_{36}CoN_4O_4$ utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> .....	112
Anexo R. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina $C_{64}H_{82}N_8O_8$ utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> .....	112
Anexo S. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina $C_{80}H_{90}N_8O_8$ utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> .....	113
Anexo T. Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina $C_{80}H_{90}N_8O_8$ utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH <sub>3</sub> .....	113
Anexo U. Tabla de compuestos observados por MALDI para petroporfirinas de crudo colombiano utilizando como matrices DCTB, FL-CN y FL-OCH <sub>3</sub> .....	114

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo	Término
<b>MALDI</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>
<b>FLs</b>	<i>Derivados del 2,7-dibromofluoreno</i>
<b>FL-H</b>	<i>9-bencilideno-2,7-dibromofluoreno</i>
<b>FL-Cl</b>	<i>9-(4-clorobencilideno)-2,7-dibromofluoreno</i>
<b>FL-CN</b>	<i>9-(4-cianobencilideno)-2,7-dibromofluoreno</i>
<b>FL-CH<sub>3</sub></b>	<i>9-(4-metilbencilideno)-2,7-dibromofluoreno</i>
<b>FL-OCH<sub>3</sub></b>	<i>9-(4-metoxibencilideno)-2,7-dibromofluoreno</i>
<b>m/z</b>	Relación masa/carga
<b>eV</b>	Electrón-voltio
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética de protón
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>Hz</b>	Hertz
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Nd:YAG</b>	Acrónimo del láser operado en el instrumento de Neodymium-doped Yttrium aluminium garnet.
<b>E</b>	Absortividad molar
<b>PI</b>	Potencial de ionización
<b>λ</b>	Longitud de onda
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Da</b>	Dalton

## RESUMEN

**TÍTULO:** DISEÑO RACIONAL Y SÍNTESIS DE NUEVAS MATRICES MALDI DE TRASFERENCIA ELECTRÓNICA BASADAS EN 2,7-DIBROMOFLUORENO<sup>1</sup>

**AUTOR:** LAURA MARÍA CRISTANCHO GONZÁLEZ<sup>2</sup>

**PALABRAS CLAVE:** Espectrometría de masas, MALDI, matrices, 2,7-dibromofluoreno, transferencia electrónica, porfirinas, ftalocianinas.

La espectrometría de masas MALDI-TOF es una de las técnicas más utilizadas para el análisis de una amplia gama de compuestos con alto peso molecular, no volátiles y termolabiles como péptidos, proteínas, carbohidratos, polímeros, estructuras altamente conjugadas y derivados de fullereno.

El proceso de ionización en MALDI mediante radiación de láser requiere el uso de una matriz con propiedades definidas como absorción de luz UV, solubilidad, cristalización homogénea y estabilidad química y al vacío. Desafortunadamente las matrices convencionales presentan limitaciones que no permiten un análisis óptimo empleando la técnica, específicamente cuando se trata de fenómenos de transferencia electrónica, siendo este último mecanismo de ionización de gran importancia para el análisis de estructuras altamente conjugadas que no pueden ser ionizadas mediante métodos convencionales de ionización química.

Las porfirinas y ftalocianinas son de gran interés debido a su uso como colorantes y pigmentos de contraste, además de la actual aplicación como catalizadores orgánicos, materiales moleculares y agentes para la terapia fotodinámica del cáncer y otras enfermedades, razón por la cual su caracterización e identificación es indispensable.

En este trabajo se realizó la síntesis, caracterización estructural y aplicación de compuestos derivados de 2,7-dibromofluoreno como matrices MALDI de transferencia electrónica. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados a nivel estructural y fisicoquímico. El desempeño de las matrices sintetizadas se estudió en el modo ion positivo, bajo una secuencia de caracterización de analitos discretos, mezcla de ellos y muestras complejas, comparando la respuesta con la matriz convencional DCTB, obteniendo en todos los casos un mejor desempeño analítico y químico.

---

<sup>1</sup> Proyecto de grado

<sup>2</sup> Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, PhD. Codirector: Juan Sebastián Ramírez Pradilla, M.Sc.

## ABSTRACT

**TITLE:** RATIONAL DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL 2,7-DIBROMOFLUORENE BASED MALDI MATRICES FOR ELECTRON TRANSFER IONIZATION<sup>3</sup>

**AUTHOR:** LAURA MARÍA CRISTANCHO GONZÁLEZ<sup>4</sup>

**KEYWORDS:** Mass Spectrometry, MALDI, matrices, 2,7-dibromofluorene, electron transfer, porphyrins, phthalocyanines.

MALDI-TOF mass spectrometry is a suitable technique for the analysis of a wide-range of high molecular weight, non-volatile and termolabile compounds (e.g. peptides, proteins, carbohydrates, polymers, highly conjugated structures and fullerene derivatives).

Ionization process in MALDI through laser irradiation requires the use of a suitable matrix with well-known physicochemical properties such as UV absorption, solubility, homogeneous crystallization, chemical and vacuum stabilities. Unfortunately commercial matrices have disadvantages and do not allow an optimal analysis, more specifically with electron transfer phenomena, which has great importance in highly conjugated structure analysis.

Porphyrins and phthalocyanines are of great interest due to their use as dyes and contrast pigments, nowadays these structures are used as organic catalyst, organic molecular materials and photodynamic therapy agents in cancer research, facts that support the importance of detection and identification by MALDI-MS.

In this work we report on synthesis, characterization and applications of 2,7-dibromofluorene derivatives as ET MALDI matrices. The obtained compounds were characterized and their optoelectronic properties were measured obtaining good results. The performance of FI's matrices in MALDI was evaluated in positive ion-mode, under rationally sequence of analysis, starting with discrete analyte analysis, followed by analyte mixture and petroporphyrin mixture from crude-oil. In all cases the synthesized matrices showed better analytical performance and better chemical and vacuum stabilities in comparison with DCTB standard matrix.

---

<sup>3</sup> Proyecto de grado

<sup>4</sup> Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, PhD. Codirector: Juan Sebastián Ramírez Pradilla, M.Sc.

## INTRODUCCIÓN

La técnica de ionización MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) fue introducida a finales de la década de los 80's junto con ESI (*Electrospray ionization*) como resultado de intensos esfuerzos para desarrollar métodos que permitieran la ionización de macromoléculas lábiles y no volátiles para su análisis por espectrometría de masas (MS). Aunque en la década de los 80's ya existían técnicas como FAB-MS (*Fast atom bombardment*) y PD-MS (*Plasma desorption*), que generaban espectros de moléculas de peso molecular medio ( $\sim m/z$  7000), con la ionización MALDI fue posible el análisis de macromoléculas sintéticas y biológicas (e.g. polímeros, péptidos, proteínas, nucleótidos).<sup>1</sup>

En el proceso de desorción asistido por una matriz una mezcla homogénea de analitos con compuestos orgánicos (matrices) es irradiada con un láser, comúnmente UV (Nd:YAG o N<sub>2</sub>). Las matrices empleadas para este fin suelen ser compuestos orgánicos con anillos aromáticos y alta conjugación que permiten la absorción de fotones provenientes del láser, además de presentar características como estabilidad en el vacío, alta solubilidad y volatilidad.<sup>2</sup> Las matrices MALDI empleadas en la actualidad fueron introducidas hace dos décadas y no han sido modificadas, razón por la cual la técnica MALDI con matrices tradicionales presenta problemas asociados con las características fisicoquímicas de la matriz como inestabilidad en vacío, reacción con los analitos, formación de clusters en la región de masas bajas, entre otras.

En años recientes, se ha demostrado un creciente interés y aumento en el número de publicaciones, sobre el uso de nuevos compuestos y materiales orgánicos e inorgánicos como matrices MALDI que permitan la incursión de la técnica en nuevas

áreas de análisis. Esto indica que una aproximación racional al diseño de matrices MALDI, en contraste con la aproximación de prueba-error tradicionalmente empleada, es válida y útil para el desarrollo de nuevas aplicaciones.

En MALDI la formación de iones del analito se produce como consecuencia de procesos de transferencia protónica, catiónica y electrónica entre iones de la matriz y moléculas neutras del analito. En el caso de UV-MALDI el diseño racional de nuevas matrices se orienta a la búsqueda de núcleos con alta absorción UV, por ejemplo el fluoreno que gracias a su doble anillo conjugado a un metileno activo brinda no solo alta conjugación y absorción de luz UV, sino también gran versatilidad sintética que permite ajustar sus propiedades electrónicas, fotónicas y morfológicas con una adecuada selección de sus grupos sustituyentes.<sup>3</sup>

El enfoque de este trabajo de investigación es el desarrollo de nuevas matrices de transferencia electrónica basadas en derivados del 2,7-dibromofluoreno que permitan el análisis de porfirinas y ftalocianinas modelo y muestras reales, para ello se realizó el diseño racional, síntesis, caracterización y estudio de su aplicación.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La técnica MALDI se desarrolló como alternativa para el análisis de moléculas de alto peso molecular, no volátiles y lábiles. Actualmente se reportan más de 3000 publicaciones anuales desde 2006, sobre la aplicación del método al análisis de proteínas, péptidos, carbohidratos, oligonucleótidos y polímeros sintéticos, entre otros.<sup>4</sup>

Para llevar a cabo un experimento MALDI se necesita la incorporación de la muestra en una matriz orgánica que facilita la desorción/ionización de la muestra tras la irradiación con un láser UV.<sup>2</sup> Las matrices tradicionales como el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA), el ácido 2,5-dihydroxibenzoico (DHB), el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y el *trans*-2-[3-(4-*ter*-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]malononitrilo (DCTB), entre otras, presentan problemas asociados a sus propiedades fisicoquímicas y estructurales que en gran medida influyen en los datos analíticos y en la sensibilidad de la técnica.<sup>5</sup> Inconvenientes adicionales como interferencias en la región de masas bajas,  $< m/z$  1000, dificultan el análisis cualitativo de compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos, nucleótidos, medicamentos y esteroides, entre otros.<sup>6</sup> Para solucionar este problema, se ha propuesto el uso de matrices libres de interferencia como el ácido cloro- $\alpha$ -cianocinámico (Cl-CCA),<sup>7</sup> además del estudio de las condiciones óptimas para el efecto de supresión de la matriz (MSE) con el fin de incrementar las señales de los analitos y disminuir las de la matriz.<sup>8</sup>

## 2. JUSTIFICACIÓN

La técnica MALDI presenta ventajas sobre otros métodos de ionización como alta tolerancia a impurezas en la muestra, rapidez, alta sensibilidad, alto rendimiento (*high throughput*) y uso de mínimas cantidades de analito para el análisis; por estas razones la técnica es muy usada en análisis rutinarios con matrices tradicionales. Sin embargo, existen aplicaciones emergentes, basadas en el proceso de transferencia electrónica (ET), particularmente para el análisis de materiales que requieren del uso de matrices con características fisicoquímicas específicas, puesto que para que el proceso de transferencia electrónica ocurra se necesita que el potencial de ionización del analito sea menor que el de la matriz.

Uno de los factores más importantes para el diseño de una matriz MALDI de transferencia electrónica es la absorptividad molar a la longitud de onda típica del láser Nd:YAG (355 nm), uno de los más comunes en la técnica. El fenómeno de desorción/ionización en MALDI depende intrínsecamente de las propiedades optoelectrónicas de la matriz por lo que se requiere de la presencia en la estructura de sistemas altamente conjugados. La estabilidad química y al vacío son también propiedades importantes que se deben tener en cuenta a la hora de elegir una matriz, sobre todo para garantizar que los métodos analíticos sean reproducibles en el tiempo. Debido a que la ionización se da a través de una transferencia electrónica, es fundamental que el potencial de ionización de la matriz sea suficientemente alto como para ionizar los analitos de interés.

En la actualidad existen pocas matrices de ET, adicionalmente las utilizadas convencionalmente como el DCTB presentan problemas de interferencias en el espectro debido a las señales de la matriz y posibles compuestos producto de la

reacción entre el DCTB y el analito, además presenta baja estabilidad química a condiciones de alto vacío dificultando la reproducibilidad del análisis en el tiempo. Por estas razones es importante el estudio de nuevas matrices MALDI-ET, como por ejemplo las basadas en 2,7-dibromofluoreno. La combinación de esta unidad central con sustituyentes adecuados permitirá la obtención de moléculas con valores altos de potencial de ionización, con alta absorptividad molar y características fisicoquímicas adecuadas para su desempeño en procesos de ET en fase gaseosa.

Una vez establecido el protocolo de síntesis, los compuestos sintetizados se emplearán como matrices MALDI para el análisis de complejos de coordinación como porfirinas y ftalocianinas. Las primeras como clorofila, hemoglobina y petroporfirinas, entre otras, son importantes en procesos de captura y transformación de energía en la biosfera<sup>9</sup> y como biomarcadores del petróleo en la determinación de fuentes biológicas, medios deposicionales, madurez de la materia orgánica y edad geológica.<sup>10</sup> Por otro lado las ftalocianinas al ser compuestos que absorben radiación visible, presentan una alta estabilidad óptica lo que les permite ser empleadas tradicionalmente como colorantes y pigmentos en la industria textil y de las pinturas; además su elevado coeficiente de extinción posibilita su uso como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica del cáncer.<sup>11</sup>

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una matriz MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) de transferencia electrónica a partir de un diseño racional y la síntesis de derivados del 2,7-dibromofluoreno que abarque un amplio rango de analitos.

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar un diseño racional de moléculas derivadas del 2,7-dibromofluoreno.
- Sintetizar los derivados del 2,7-dibromofluoreno con los mejores potenciales de ionización arrojados por el diseño racional.
- Determinar las propiedades espectroscópicas de los compuestos sintetizados.
- Caracterizar los compuestos sintetizados por técnicas espectroscópicas.
- Evaluar experimentalmente la capacidad de los compuestos sintetizados como matrices MALDI de transferencia electrónica frente a analitos modelo y mezclas de ellos.

#### 4. MARCO TEÓRICO

En espectrometría de masas se realiza la ionización de especies moleculares y atómicas y se mide su relación masa-carga ( $m/z$ ); la técnica es útil para el análisis de muestras simples y complejas, la determinación de la fórmulas moleculares e identificación de elementos, además del estudio de la conectividad entre átomos, secuencia de constituyentes de macromoléculas, identificación de grupos funcionales y la reactividad de especies en fase gaseosa, entre otros.<sup>4</sup> El principio básico de la espectrometría de masas es la generación de iones, mediante estrategias que involucran el uso de campos eléctricos, impactos (fotones, electrones, átomos acelerados), efectos térmicos y de presión, y su separación de acuerdo con su relación  $m/z$  mediante tiempo de vuelo, campos eléctricos o magnéticos.<sup>12</sup>

Uno de los métodos convencionales de generación de iones es la desorción laser (LDI), que inicialmente se basó en la irradiación de una muestra depositada en una base metálica con un láser, sin embargo, este método presenta limitaciones debido a que no todos los analitos absorben radiación a la longitud de onda del láser y a la excesiva fragmentación de los que si absorben la radiación. Las limitaciones de esta técnica condujeron a la búsqueda de materiales que se ionicen eficientemente bajo las condiciones operacionales del equipo lo que condujo a que la técnica LDI junto con FAB (Fast Atom Bombardment), evolucionaran en MALDI a finales de 1980<sup>4,12</sup> cuando se reporta por primera vez el uso de compuestos orgánicos para promover eficientemente la desorción/ionización de macromoléculas.

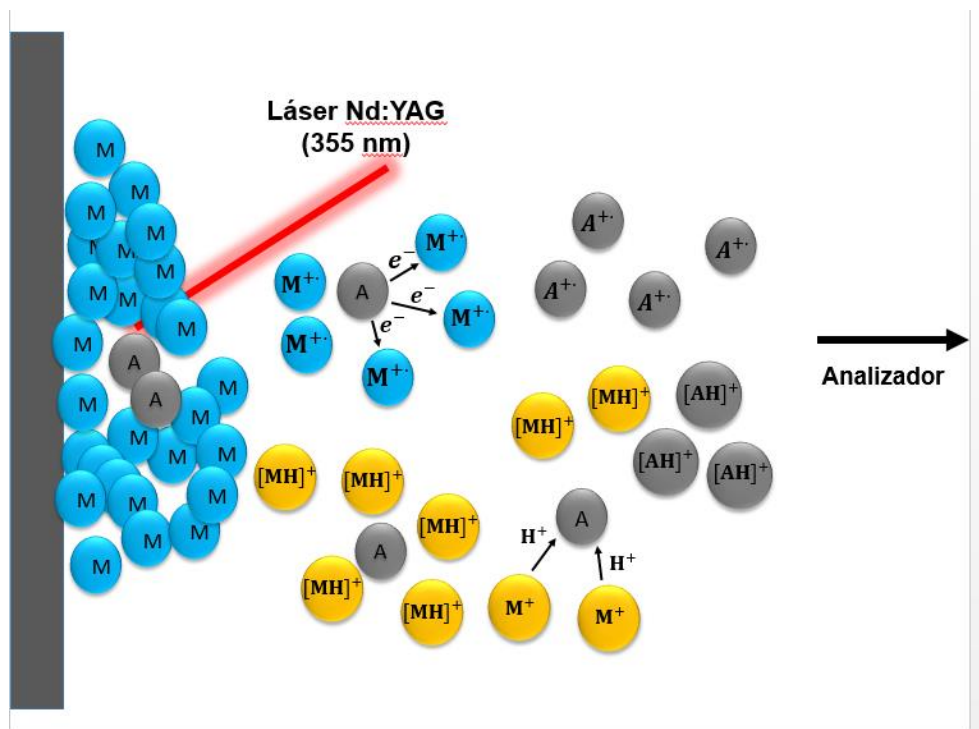
#### 4.1 MALDI

La técnica MALDI se desarrolló simultáneamente por los grupos de investigación de los profesores Franz Hillekamp y Michael Karas de la Universidad de Münster en Alemania, y Koichi Tanaka de los laboratorios de investigación de Shimadzu en Kyoto-Japón. Este último fue ganador del Premio Nobel de Química en el año 2002.<sup>13,14</sup> MALDI es actualmente uno de los métodos de ionización más importantes para el análisis de compuestos no volátiles, lábiles, termoinestables y de alto peso molecular como péptidos, proteínas, oligonucleótidos y oligosacáridos, polímeros sintéticos, fullerenos y sus derivados, y complejos no covalentes, entre otros.<sup>15</sup>

Para el desarrollo de un experimento MALDI la muestra se incorpora en una matriz generalmente de naturaleza orgánica, sin embargo en estudios recientes se reporta el uso de nanopartículas<sup>16</sup>, superficies inorgánicas<sup>17</sup> y líquidos iónicos<sup>18</sup> que tienen como función absorber energía proveniente del láser, convertir la mayor parte de ella en calor causando que se desorba la muestra. Adicionalmente la matriz también protege las moléculas del analito de daños por radiación.<sup>19</sup>

La mezcla matriz-analito se deposita en un portamuestra que se introduce en la fuente de ionización donde se irradia con un láser (UV) para desorber de la superficie una pluma de moléculas neutras y cargadas en forma de agregados que reaccionan entre sí, en un proceso adiabático donde hay eliminación de solvente, rompimiento de agregados e ionización de las moléculas del analito, comúnmente mediante procesos de transferencia protónica o electrónica, que serán discutidos más adelante (Figura 1).<sup>4,19</sup>

**Figura 1.** Esquema del sistema de ionización MALDI.



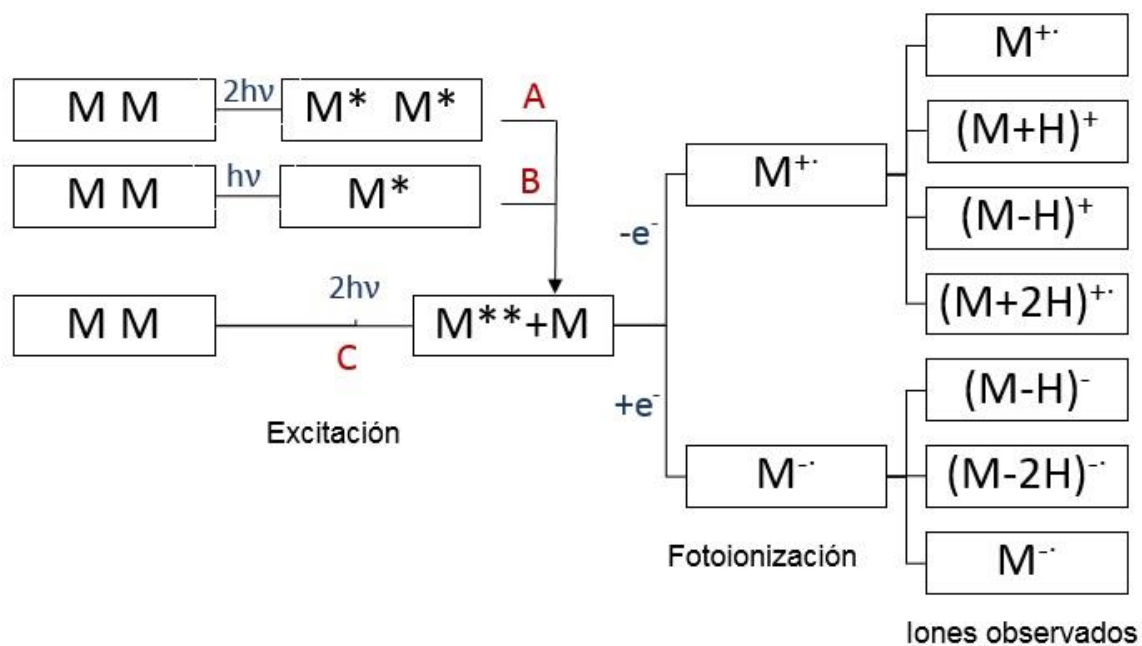
## 4.2 MECANISMO DE IONIZACIÓN MALDI

En MALDI en modo positivo se observan típicamente iones de tipo catión radical, moléculas protonadas, y aductos de sodio y potasio.<sup>15</sup> Los investigadores Zenobi y Knochenmuss explican el mecanismo de ionización en MALDI como un suceso en dos etapas; la primera involucra la formación de iones primarios de la matriz(i) y la segunda la formación de iones secundarios del analito (ii) por interacción de los iones de la matriz en fase gaseosa con las moléculas neutras del analito.<sup>20</sup>

La primera etapa puede darse por varias rutas: Ionización multifotónica de un paso (ruta C), ionización multifotónica de dos pasos (ruta B), “*Pooling*” de energía (ruta A), y modelos multicéntricos donde dos o más moléculas excitadas de la matriz combinan su energía para producir un catión radical o una molécula de la matriz

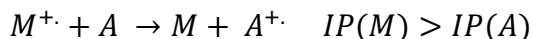
altamente excitada (Figura 2). En la segunda etapa los iones primarios reaccionan con las moléculas neutras del analito formando nuevos iones, en procesos de tipo ion-molécula, que pueden ser de tres tipos: transferencia protónica, electrónica y catiónica. <sup>15,19</sup>

**Figura 2.** Esquema de fotoionización y posibles vías de reacción en MALDI-MS.



La transferencia protónica es de gran importancia debido a que muchas moléculas aparecen de forma protonada en el espectro de masas, esto se debe a que la matriz le cede un protón al analito formando especies protonadas  $[AH]^+$ , esta reacción sucede solo si la afinidad protónica del analito es superior a la de la matriz. <sup>15</sup> Por su parte, el proceso de transferencia de electrones (ET) de analitos neutros a iones de la matriz es el paso secundario que conduce a la formación de cationes radicales del analito. El parámetro termodinámico que explica la ionización ET es la diferencia de los potenciales de ionización de la matriz y el o los analitos, el proceso solo se lleva a cabo si el analito (A) tiene un potencial de ionización menor que el de la

matriz (M), por esta razón la técnica se utiliza principalmente para el análisis de compuestos con potenciales de ionización bajos (Figura 1).<sup>15,19</sup>



***Ecuación 1. Reacción de transferencia electrónica.***

Cada uno de los mecanismos de ionización discutidos puede ser utilizado como criterio para el diseño de nuevas matrices partiendo de la formación de una mayor densidad de iones primarios. Teniendo en cuenta la aplicación deseada se buscará que presenten potenciales de ionización altos favoreciendo la transferencia electrónica del analito a la matriz.

#### **4.3 MATRICES UV-MALDI**

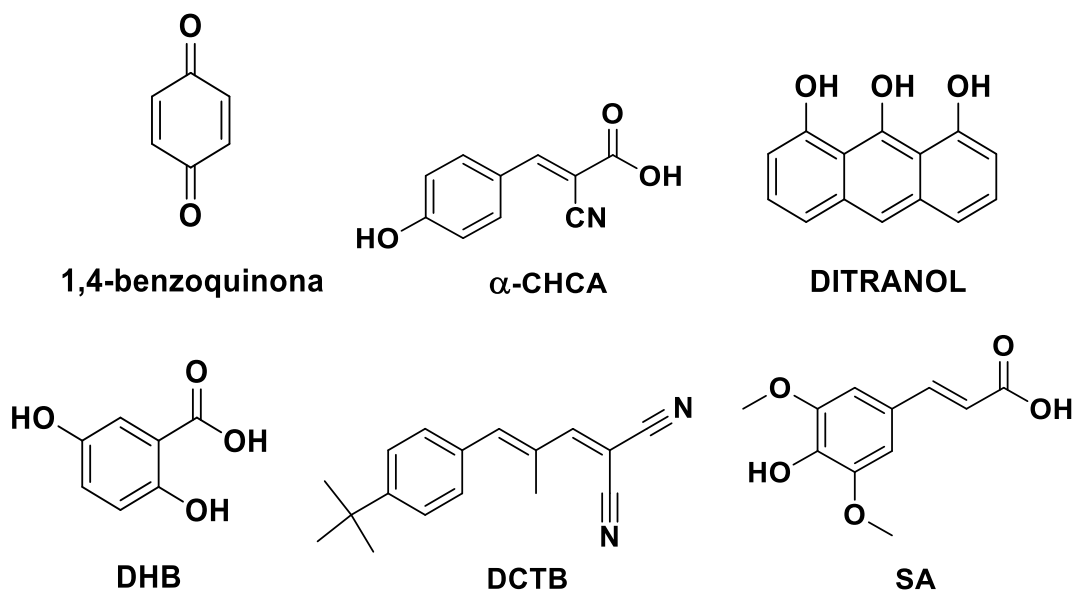
Uno de los factores más importantes para el desarrollo de un experimento MALDI es la elección de la matriz a utilizar, donde se debe tener en cuenta que tipo de análisis se llevará a cabo, bajo que mecanismo y parámetros instrumentales. Debido a que los procesos de ionización de la matriz dependen directamente de sus propiedades fisicoquímicas es necesario determinar que parámetros influyen directamente en el proceso. A continuación se mencionan los más importantes:

- Alta absorptividad molar a la longitud de onda de los fotones emitidos por el láser.
- La absorción de energía y la posterior evaporación de la matriz debe conducir a la generación de iones del analito de interés.
- Estabilidad bajo condiciones de alto vacío ( $1 \times 10^{-9}$  bar).
- Aislamiento de los iones generados, proporcionar un único aducto del analito y exhibir una débil tendencia a agruparse.

- Co-cristalizar con el analito homogéneamente.
- Proporcionar una relación señal ruido alta.
- Bajo ruido de fondo (señales de la matriz pequeñas) con el fin de evitar interferencias entre la matriz y los iones del analito.<sup>21,22</sup>

No hay una matriz que cumpla con los requerimientos para ser utilizada en el análisis de todo tipo de analitos, por tal motivo, el estudio de las matrices se ha basado en prueba y error con analitos específicos. Por ejemplo, en el análisis MALDI de porfirinas y ftalocianinas se ha reportado el uso de 1,4-benzoquinona,<sup>23</sup> ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -CHCA),<sup>24</sup> 1,8,9-antraceno-1,8,9-triol (ditranol),<sup>11,25</sup> ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB),<sup>25,26</sup> ácido sinápico (SA)<sup>26</sup> y trans-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB)<sup>25,27</sup>; las estructuras de estas matrices se muestran en la figura 3.

**Figura 3.** Estructuras de moléculas empleadas como matrices MALDI para el análisis de porfirinas y ftalocianinas.

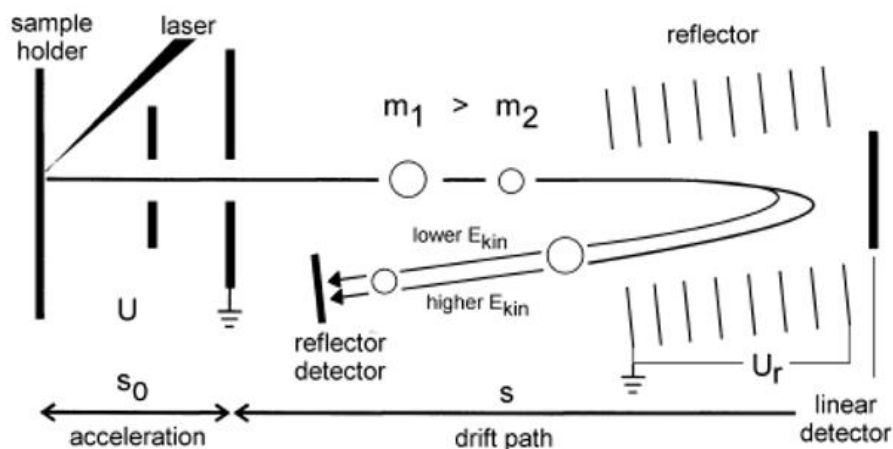


#### 4.4 ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO (TOF)

El tiempo de vuelo es un analizador simple, económico, con un ciclo de barrido rápido y un rango de masa alto, hasta 500 kDa. Su principio se basa en medir el tiempo que tarda un ion en viajar desde la fuente de iones a un detector fijo a 1 o 2 m del punto de partida. Todos los iones reciben la misma energía cinética durante la aceleración instantánea pero adquieren distintas velocidades dependiendo de su relación  $m/z$  por lo que el tiempo en recorrer el “campo libre”, región entre la fuente de iones y el detector, varía.<sup>28</sup> Los iones con relación  $m/z$  más baja alcanzan el detector antes de los iones con relación  $m/z$  más alta puesto que estos últimos tienen menor velocidad como se observa en la figura 4.<sup>29</sup> La resolución del analizador TOF fue mejorada con la adición del reflectrón (Re-TOF), el cual actúa como un espejo que centra iones de diferentes energías cinéticas en el tiempo corrigiendo la dispersión en la velocidad de los iones de la misma masa, derivada del proceso de ionización.<sup>4,28</sup>

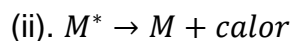
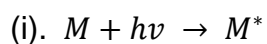
Un reflectrón sencillo consiste en una serie de electrodos en forma de anillo que producen un campo eléctrico de retardo detrás de la región de campo libre en oposición a la fuente de iones. Los iones penetran en el alcanzando una energía cinética cero, luego son expulsados del reflector en dirección opuesta por lo que la trayectoria de vuelo varía en función de las diferencias de energía cinética. Los iones que transportan más energía cinética volarán más profundamente en el campo de desaceleración, y así pasaran más tiempo dentro del reflector que los iones menos energéticos (Figura 4).<sup>4</sup>

**Figura 4.** Esquema de un analizador de tiempo de vuelo-refletrón (Re-TOF).<sup>4</sup>



#### 4.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

La absorción de radiación ultravioleta o visible por una especie atómica o molecular (M) es un proceso que se puede considerar en dos etapas: (i) en primer lugar se genera una especie excitada electrónicamente a partir de la reacción entre la especie molecular y un fotón, (ii) y en segundo lugar ocurren los distintos procesos de relajación ya sea por emisión de calor o por medio de una reacción fotoquímica dando lugar a nuevas especies.<sup>30</sup>



Todos los compuestos orgánicos son capaces de absorber radiación electromagnética porque contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía superiores. La absorción a longitudes de onda largas ocurre cuando existen grupos funcionales con electrones de valencia con energías de excitación relativamente bajas a los que se les llama cromóforos. Los electrones

que contribuyen a la absorción son aquellos que participan directamente en la formación del enlace entre átomos ( $\sigma$  y  $\pi$ ) y los electrones no enlazantes ( $n$ ) que se encuentran localizados alrededor de átomos como O, S, N, X por medio de cuatro tipo de transiciones electrónicas:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ .<sup>30</sup>

Los análisis por espectroscopia UV-Vis en sólido y líquido permiten encontrar la longitud de onda de máxima absorción para las matrices sintetizadas, lo ideal es que este valor sea cercano a la longitud del láser de Nd:YAG (355 nm) confirmando así la absorción de la mayor parte de la radiación láser.<sup>13</sup>

#### **4.5.1 Espectroscopia de reflectancia difusa**

Cuando la luz incide sobre una muestra, cierta cantidad de fotones son transmitidos a través de la muestra y el resto es reflejado o absorbido por enlaces covalentes que actúan como resortes oscilantes que se acoplan con la longitud de onda exacta de la radiación lumínica (figura 5).<sup>31</sup>

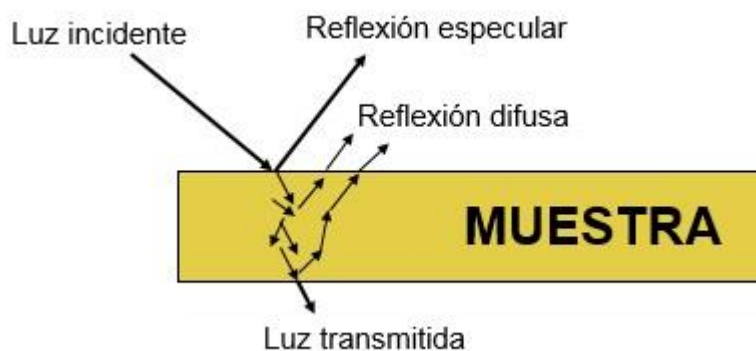
La absorción de luz se determina mediante la diferencia entre la luz incidente ( $L_i$ ) y la reflejada ( $L_r$ ) y transmitida ( $L_t$ ); cuando se trabaja en modo reflexión el material es lo suficientemente opaco por lo que la luz reflejada es igual a cero dando como resultado la ecuación 2.<sup>31</sup>

$$L_a = L_i - L_r$$

***Ecuación 2. Luz absorbida por una muestra en reflectancia difusa.***

En el modo de reflexión, la absorbancia se define como el  $\log(1/R)$  siendo R la suma de la reflexión especular y la reflexión difusa que finalmente es la que suministra información útil sobre la naturaleza y composición de la muestra.<sup>31</sup>

**Figura 5.** Efectos de la radiación incidente sobre una muestra.



#### 4.6 ESTADO DEL ARTE

Con frecuencia se observan en los espectros de masas MALDI en modo positivo, iones producto de transferencia protónica, sin embargo, existen analitos que no se pueden protonar fácilmente debido a una baja afinidad protónica, poca polaridad, o a la carencia de grupos funcionales polares. Por esta razón es importante el estudio de matrices que permitan ionizar dichos analitos mediante procesos alternativos como la transferencia electrónica, que promueve la formación de cationes radicales.

La obtención de cationes radicales empleando matrices de transferencia electrónica fue reportada por primera vez en el año 1993 por los investigadores Peter Juhasz y Catherine Costello<sup>32</sup> usando matrices derivadas del antraceno como ditranol, 9-nitroantraceno y quinizarina para caracterización de ferroceno, oligómeros de rutenoceno y polímeros de hasta  $m/z$  10000. Los autores reportaron que las señales

de los analitos en el espectro de MS-MALDI correspondían a iones moleculares de tipo catión radical que hasta el momento no habían sido observados.

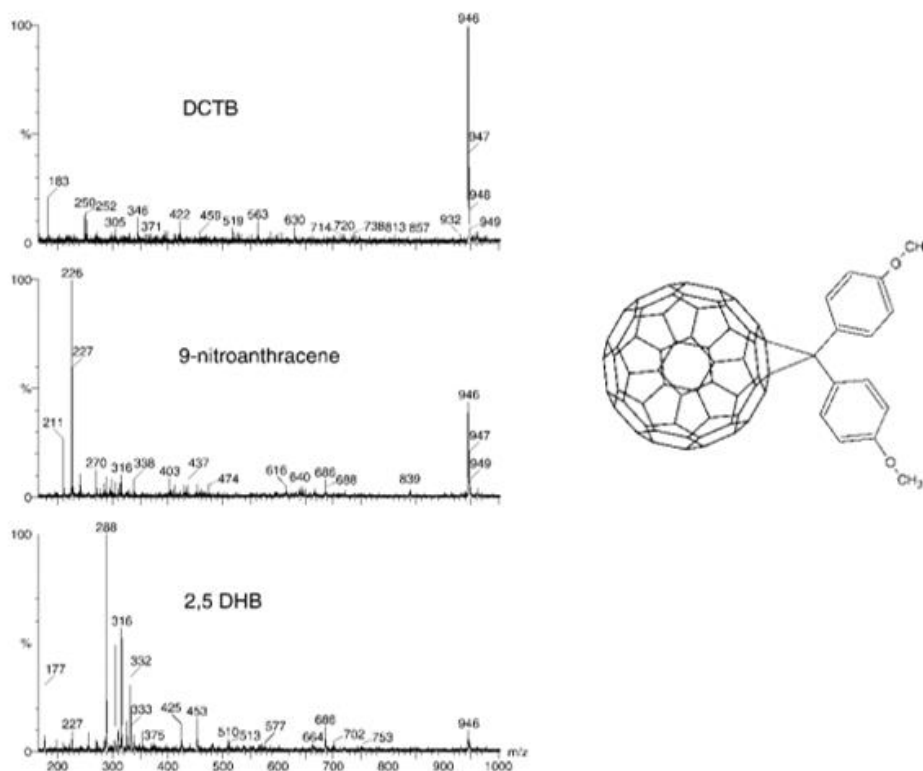
Leszek Michalak *et al.* (1994)<sup>33</sup> reportaron el uso del fullereno C<sub>60</sub> como matriz MALDI en modo positivo y negativo, como una alternativa para el análisis de moléculas biológicas de gran tamaño (insulina, citocromo c y albumina de suero bovino), los autores asignaron en los espectros de cada proteína analizada, especies de tipo catión o anión radical según el modo operacional. La matriz presentó inconvenientes como baja solubilidad en medio acuoso lo que dificulta el análisis de analitos hidrofílicos.

La investigación sobre el desarrollo de matrices de transferencia electrónica ha crecido en los últimos años debido a la creciente demanda para el análisis de polímeros y materiales moleculares orgánicos. Por ejemplo, Heinrich Luftmann *et al.* (2000)<sup>5</sup> reportaron uso de trans-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB) como matriz MALDI de transferencia electrónica para compuestos lábiles, que permitía el análisis de moléculas basadas en fullereno produciendo aniones o cationes radicales dependiendo del modo de operación. En la figura 6 se observa el espectro de masas MALDI en modo positivo de un derivado de fullereno usando 2,5 ácido dihidroxibenzoico (DHB), 9-nitroantraceno (9NA) y DCTB como matrices. La figura 6 demuestra el buen desempeño que presenta el DCTB en el modo ion positivo para la caracterización del derivado de fullereno, adicionalmente los autores reportaron un excelente comportamiento analítico, el cual no había sido observado con anterioridad en ET-MALDI.

El DCTB se estableció como una matriz idónea de transferencia electrónica, lo que condujo un estudio más profundo sobre sus características fisicoquímicas y la

relación que estas tienen sobre el proceso de desorción/ionización. Yury Vasiliev *et al.* (2006)<sup>34</sup> determinaron experimentalmente la energía de ionización (IE) del DCTB ( $8.54 \pm 0.05$  eV) corroborando el amplio rango de analitos que puede analizar de acuerdo con la ecuación 1. El análisis para fenantreno arrojó señal de analito puesto que presenta un IE de 7,9 eV, menor que el de DCTB, en cambio para analitos de tipo fluorofullerenos (FF) no se observa señal debido al alto IE de estas especies (12 eV). Este reporte demuestra que para que sea termoquímicamente factible la desorción/ionización del analito en procesos de transferencia de electrones es necesario de energías de ionización menores a la matriz.

**Figura 6.** Espectros MALDI positivo del bis(4-metoxifenil)metano[60]fullereno con diferentes matrices.<sup>5</sup>



Por otra parte Mark Wyatt *et al.*(2006)<sup>25</sup> reportaron la ionización de una variedad de compuestos optoelectrónicos, incluyendo derivados organometálicos, orgánicos conjugados (porfirinas y ftalocianinas), hidratos de carbono, entre otros, utilizando DCTB. Los resultados exhibidos, demostraron que el DCTB es una matriz efectiva en términos de producción de cationes o aniones radicales de los analitos a bajas fluencias del láser. Sin embargo, las interferencias por formación de aductos, descomposición química y reactividad con los analitos (ruido de fondo significativo de la matriz) generan alta variabilidad en los resultados obtenidos. Estas desventajas también fueron reportadas por los investigadores, quienes adicionalmente observaron que el DCTB no es conveniente para el análisis de moléculas solubles en agua o de naturaleza biológica, presenta baja estabilidad química lo que requiere de almacenamiento bajo atmosfera inerte a baja temperatura y exhibe baja estabilidad al vacío lo que imposibilita el análisis prolongado bajo las condiciones operacionales de alto vacío en el equipo MALDI.

Como una alternativa al DCTB, Michael Meier *et al.* (2007)<sup>35</sup> estudiaron la posibilidad de varios compuestos de actuar como matriz en modo positivo para polímeros sintéticos por medio de transferencia de protones, transferencia de cationes o transferencia electrónica. Los autores reportaron al menos 10 nuevas matrices MS-MALDI-TOF prometedoras para el análisis de diferentes polímeros. La tabla 1, resume la lista de los compuestos nuevos y prometedores como matrices MALDI que proporcionaron valores de S/N mayores a 10 para el análisis del polímero PMMA con un peso molecular de 14kDa.

Más recientemente Haruki Kouchi *et al.* (2012)<sup>36</sup> reportaron el uso de  $\alpha,\beta$ -difenilfumaronitrilo (DPF) como matriz MALDI para el análisis de Clusters de Oro (Au- CLs) en modo negativo mediante ionización por transferencia de electrones. Los autores obtuvieron menor fragmentación y señales de mayor abundancia en

comparación con el DCTB. En este mismo año, Nazim Boutaghou y Richard Cole<sup>37</sup> investigaron el desempeño del 9,10-difenilantraceno (9,10-DPA) para el análisis de compuestos modelo como clorofila a, retinol y protoporfirina de Zinc entre otros. El 9,10-DPA tiene, sin embargo, un bajo potencial de ionización (7,04 eV) razón por la cual no ioniza analitos que tengan un valor superior de potencial. Finalmente, Cosima Calvano *et al.* (2015)<sup>38</sup> realizaron un estudio del 1,5-diaminonaftaleno (DAN) como matriz de reacción secundaria de transferencia de electrones para la identificación de clorofilas y sus derivados por medio de espectrometría de masas MALDI, el DAN supera matrices convencionales como  $\alpha$ -CHCA, ditranol y antraceno en estas aplicaciones.

**Tabla 1.** Relación S/N para el polímero PMMA 14kDa utilizando 10 nuevas matrices MALDI descubiertas con un enfoque de selección screening/rational.<sup>35</sup>

Nombre	Mejor solvente	Relación S/N (PMMA 4kDa)
galvinoxil (radical libre)	Acetona	23.1
acrilato rojo disperso N° 13	Cloroformo	20.6
disperso rojo N° 1	Cloroformo	19.2
acrilato rojo disperso N° 1	Acetona	18.4
metacrilato rojo disperso N° 1	Cloroformo	17.4
4,4'-metilenbis(N,N-diglicidilanilina)	Cloroformo	15.7
éster dietílico del ácido N-(4-nitrobenzoil)-L-glutámico	Cloroformo	15.2
(S)-(+)-2-metilbutil 4-(4-deciloxi-bencilidenamino) cinamato	Cloroformo	14.4
$\alpha$ -naftolftaleína	Cloroformo	14.1
2,4-di-terc-butyl-6- (5-cloro-2H-benzotriazol-2-il)fenol	Cloroformo	12.6

En la actualidad el grupo de investigación GIFTEX de la Universidad Industrial de Santander, junto con el grupo de Macromoléculas de la Universidad Nacional de Colombia, investigan en nuevos sistemas fenilvinileno (FV) como matrices MALDI de transferencia electrónica. Estos compuestos tienen características optoelectrónicas definidas, altos valores de absorptividad molar, alto potencial de ionización y capacidad para formar iones estables, sin fragmentación en la fuente, estabilidad química y al vacío y por supuesto un desempeño excepcional como matrices MALDI.<sup>39</sup>

Los artículos reportados evidencian la constante búsqueda y estudio en el campo de matrices MALDI con el fin de suplir los análisis de diferentes tipos de analito y mejorar los resultados obtenidos con las matrices convencionales, por esta razón se pensó en un diseño racional que direcciona la síntesis, hacia la obtención de compuestos prometedores para su uso como matriz, usando como base estructural el fluoreno debido a su alta conjugación, sus propiedades optoelectrónicas y fácil acceso.

En los últimos años el fluoreno ha sido altamente estudiado para aplicaciones como celdas solares, OLED's y sensores. Con relación a la síntesis de derivados de fluoreno, M. John Plater et al. (2000)<sup>40</sup> publicaron un estudio de derivados del 4,5-Diazafluoreno donde se reporta una metodología para sintetizar el 2,7-Dibromo-9-(1-fenilmetileno)-9*H*-fluoreno bajo condiciones rápidas, económicas y amigables al medio ambiente con un alto porcentaje de rendimiento.

Un amplio conocimiento de las relaciones entre estructura y propiedades permite el diseño racional de materiales orgánicos de emisión. Fluorenos conjugados y

polifluorenos han mostrado ser prometedores como materiales emisores de luz azul (B-OLED's). Por ejemplo, Rathnayake *et al.* (2006)<sup>3</sup> reportaron el estudio en las propiedades electrónicas, fotónicas y morfológicas por modificación de sustituyentes del fluoreno para optimizar las propiedades OLED's del 2,7-Bis(feniletetil)fluorenos. Atul Goel *et al.* (2009)<sup>41</sup> reportaron el uso de sustituyentes cromóforos de tipo donador-aceptor en el esqueleto de fluorenos y fluorenonas para solucionar el efecto de emisión verde y convertir dicha luz en luz azul para el uso comercial en B-OLED's.

Frente a problemáticas energéticas y el tema del calentamiento global han surgido estudios sobre el desarrollo de energías renovables a partir de colorantes orgánicos libres de metales partiendo de su alto coeficiente molar, bajo costo y relativamente alta eficiencia. Los investigadores Wenqin Li *et al.* (2011)<sup>42</sup> reportaron el diseño y síntesis de una serie de colorantes orgánicos con unidades de fluoreno utilizados como puentes para su aplicación como celdas solares sensibilizada por colorante (DSSC).

El diseño y preparación de sensores fluorescentes para especies moleculares biológicamente importantes, es de primordial interés en biorgánica. Adachi *et al.* (2014)<sup>43</sup> sintetizaron dendrímeros de fluoreno con terminales de naftaleno que funcionaron de manera eficaz como sensores químicos de la vitamina K4 útil para la prevención de enfermedades por carencia de vitaminas en la dieta. Mientras que Hosseinzadeh *et al.* (2015)<sup>44</sup> sintetizaron un ácido bórico a base de fluoreno para observar cambios de fluorescencia tras la adición de sacáridos a pH fisiológico.

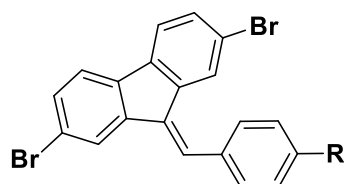
## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 CÁLCULOS COMPUTACIONALES

El parámetro más importante para realizar un diseño racional de moléculas candidatas a matrices MALDI, es el potencial de ionización. El potencial de ionización (PI) está estrechamente relacionado con la ionización de la molécula y la capacidad de ionizar analitos, siguiendo el parámetro discutido previamente (ecuación 1).

Antes de llevar a cabo la síntesis de las moléculas diseñadas *in-silico*, se utilizó el método de Koopmans basado en cálculos Hartree-Fock (HF) que establece que el PI es el negativo de la energía del orbital desocupado de más baja energía (LUMO), dicho valor fue obtenido de los orbitales virtuales (LUMO) después de realizar una optimización de geometría para buscar el mínimo de energía, parámetro requerido para conocer el potencial. Los experimentos se llevaron a cabo mediante el uso del programa GAUSSIAN 09.<sup>45</sup>

**Figura 7.** Estructuras de los compuestos candidatos.



R= H, Cl, CN, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>

## **5.2 SÍNTESIS DE FLs**

Los compuestos fueron sintetizados a partir del 2,7- dibromofluoreno y benzaldehído en relación 1:1 en presencia de hidróxido de potasio (KOH) empleando la ruta sintética publicada por Plater, M. et al.<sup>40</sup> La síntesis del FL-CN se obtuvo utilizando metilpiperidina como base (Esquema 1).

Los compuestos se prepararon a partir de 1 mmol de 2,7-dibromofluoreno, 1 mmol de benzaldehído, KOH y 20 mL de etanol a reflujo y agitación constante. Posterior al tiempo de reacción establecido se filtró, se lavó con etanol y se purificó por cromatografía FLASH utilizando una relación diclorometano-hexano 3:1. Los valores de rendimiento y tiempo de reacción se muestran en la tabla 3. (Los datos experimentales de la caracterización estructural de las moléculas sintetizadas, se encuentran reportados en los anexos A-J).

## **5.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FLs**

El análisis de espectroscopia infrarroja se realizaron en un espectrofotómetro FTIR Bruker tensor 27. Los análisis de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker TopSpin 400 MHz utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>), no se efectuó para los compuestos FL-H y FL-Cl, debido a que fueron descartados para su evaluación como matrices MALDI. Los espectros de masas LDI-MS se obtuvieron empleando un espectrómetro de masas Bruker UltrafleXtreme operado con un láser de estado sólido de Nd:YAG con analizador de reflectrón/tiempo de vuelo (rTOF).

## **5.4 CARACTERIZACIÓN OPTOELECTRÓNICA DE FLs**

#### 5.4.1 Determinación de los coeficientes de absorptividad molar

Los espectros de absorción UV-Vis se obtuvieron en un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-VIS. El barrido espectral en la región entre 200-700 nm se realizó a velocidad de escaneo media y slit de 1 nm. Se empleó una celda de cuarzo de camino óptico de 1 cm. Se preparó una curva de calibración para cada una de las matrices (FL-H, FL-Cl, FL-CN, FL-CH<sub>3</sub>, FL-OCH<sub>3</sub>) en THF con concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mM a las que se les midió la absorbancia a 355 nm, por medio de la ecuación de Lambert-Beer se determinaron los respectivos coeficientes. Además se realizó un barrido espectral entre 200-700 nm a las soluciones de concentración 5mM.

**Figura 8.** Portamuestra para análisis por reflectancia difusa.



#### 5.4.2 Análisis de Reflectancia Difusa

Los espectros de reflectancia difusa se midieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC. El blanco usado correspondió a sulfato de bario, compuesto que también tiene la función de material soporte para las muestras sólidas de los compuestos. Se realizó un barrido espectral de 200-900 nm, a velocidad de escaneo media y slit de 1 nm. Para determinar la  $\lambda_{\text{máx}}$  en fase sólida se realizó un fondo en el portamuestra con 2 g de sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>). Por aparte fueron pesados 0,7 g de BaSO<sub>4</sub> y 0,3 g de la muestra de matriz, los cuales se homogeneizaron en un mortero y se depositaron uniformemente sobre la capa realizada previamente hasta

obtener un sólido compacto (figura 15). Finalmente fueron tomados los espectros en modo de reflectancia utilizando como blanco BaSO<sub>4</sub>.

## **5.5 MALDI-MS**

### **5.5.1 Preparación de la muestra**

El proceso de cristalización es un parámetro crítico en la preparación de la muestra para análisis por LDI y MALDI.<sup>4</sup> El método de co-cristalización convencional y más utilizado es el dried droplet razón por la que se llevó a cabo los análisis por dicho método.

LDI: Se preparó una solución de cada uno de los compuestos sintetizado en THF a una concentración de 5mM. Se tomó 1  $\mu$ L de la solución y se depositó en el target empleando el método de dried droplet.

MALDI: Se prepararon soluciones stock de todos los analitos empleados a una concentración única de 5mM para todos los experimentos. A partir de la solución stock de analitos, se llevó a cabo una serie de diluciones con el fin de evaluar las diferentes relaciones matriz:analito (100:1, 1000:1 y 100000:1). Las muestras fueron depositadas en el target mediante el método dried droplet.

### **5.5.2 Experimentos de masas**

Los experimentos se realizaron en un espectrómetro de masas Bruker UltraFlex extreme MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA) equipado con un láser Nd:YAG (355 nm). Las energías reales del láser se midieron conforme el

avance de los experimentos empleando un sensor láser PowerMax-USB UV/vis Wand (Coherent, Santa Clara, USA), teniendo en cuenta que el láser de operación sufre desgaste a través del tiempo.

#### **5.5.2.1 Experimentos LDI-MS**

Se estudió la dependencia de la ionización en función de la energía del láser, para cada matriz de fluoreno a una concentración de 5mM, para lo cual se tomaron un total de 5 espectros (2000 disparos del láser), con el fin de obtener un análisis estadístico, a diferentes energías del láser de Nd:YAG (355 nm).

#### **5.5.2.2 Experimentos MALDI-MS con analito modelo**

Como analito modelo se empleó porfirina de cobalto (tetrametoxifenilporfirina de cobalto) utilizando como matrices FL-CN, FL-CH<sub>3</sub>, FL-OCH<sub>3</sub> y DCTB a diferentes energías del láser (5 espectros/ energía, 2000 disparos del láser/ espectro) con una relación molar matriz:analito 1000:1, experimentos variando la relación molar matriz:analito manteniendo constante la energía del láser (1,24 μJ/pulso) y experimentos con valores fijos de relación matriz:analito y energía del láser (1000:1, 1,24 μJ/pulso) a diferente tiempo después de ingresado el target.

#### **5.5.2.3 Experimentos MALDI-MS con mezcla de analitos modelo**

Se realizó el análisis de una mezcla de porfirinas y ftalocianinas modelo utilizando como matrices FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub> y DCTB a una relación molar matriz:analito 1000:1, energía del láser 1,24 μJ/pulso, 2000 disparos del láser/ espectro.

#### **5.5.2.4 Experimentos MALDI-MS con muestra real**

Se tomaron espectros de una fracción de petroporfirinas extraídas de un crudo pesado colombiano utilizando como matrices FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub> y DCTB a una relación molar matriz:analito 10:1, energía del láser 1,24 μJ/pulso, 2000 disparos del láser/ espectro.

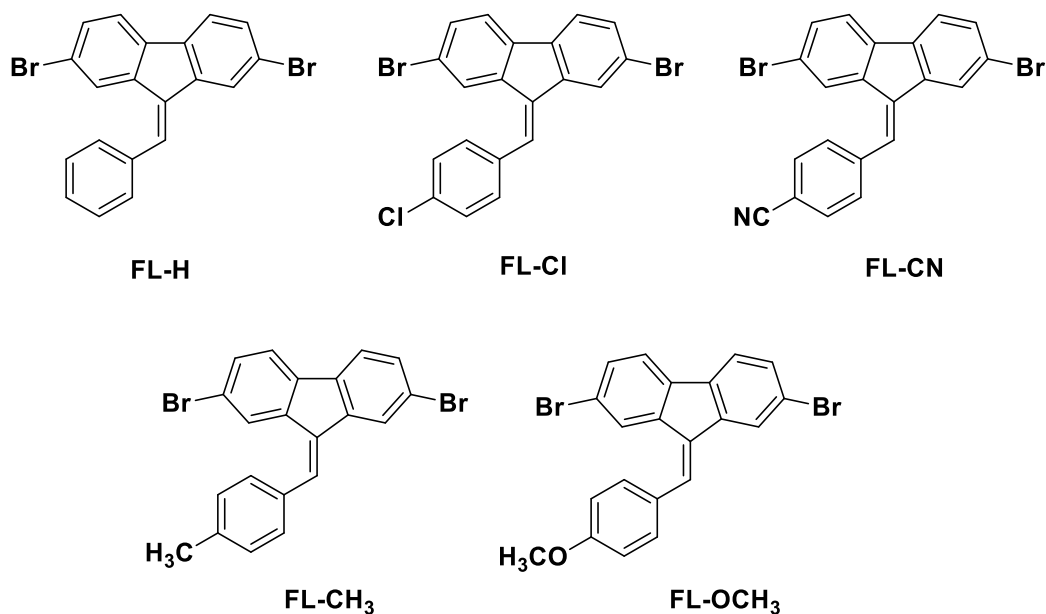
## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 DISEÑO RACIONAL DE FLs

El fluoreno como base estructural, ha sido un pilar importante en la química de los materiales moleculares orgánicos, su alta conjugación permite obtener estructuras ricas en electrones empleadas en la construcción de OLED's,<sup>3,41</sup> sensores,<sup>43,44,46</sup> celdas solares<sup>42,47</sup>, entre otros.

Las características fisicoquímicas y optoelectrónicas de estos compuestos motivaron por ende el diseño de las estructuras basadas en fluoreno para su uso como matriz MALDI, dada la relación estrecha de la conjugación y propiedades de absorción con la eficiencia de ionización en MALDI.<sup>21,22</sup>

**Figura 9.** Estructura molecular de las matrices FLs.



El PI se define como la mínima cantidad de energía que requiere absorber un átomo o molécula en sus estados fundamentales vibracionales y electrónicos para formar un ion.<sup>4</sup> Los valores de potencial de ionización (PI) obtenidos con el software Gaussian 09 para los FLs (figura 9) se reportan en la tabla 2. Los compuestos de estudio presentan un PI similar al de la matriz convencional (DCTB) por lo que es de esperarse que sean buenos candidatos a matrices MALDI. Recordando que para que ocurra el proceso de transferencia electrónica el PI(Matriz) > PI(Analito) se espera que el FL-CN permita un rango mayor de analitos puesto que teóricamente su PI es el mayor en el grupo.

**Tabla 2.** PI calculados mediante empleando la teoría de Koopmans.

Compuesto	Potencial de Ionización (eV)
FL-H	8.5
FL-Cl	8.6
FL-CN	8.7
FL-CH <sub>3</sub>	8.3
FL-OCH <sub>3</sub>	8.3
DCTB	8.54 <sup>34</sup>

## 6.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS DE FLUORENO

En esta sección se discutirá la síntesis de los derivados de fluoreno obtenidos, métodos de purificación y caracterización estructural.

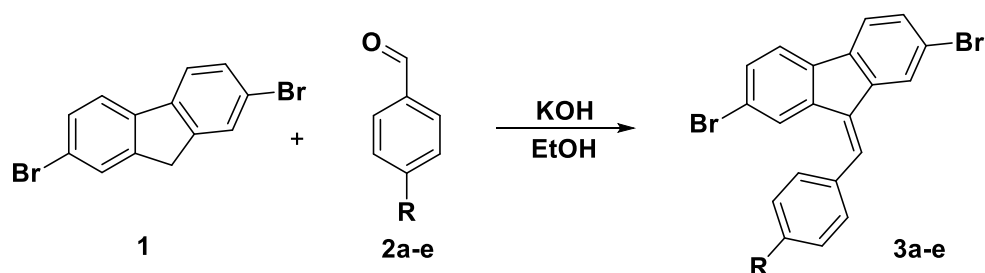
### 6.2.1 Síntesis

Los compuestos basados en fluoreno presentan propiedades fisicoquímicas y optoelectrónicas ampliamente estudiadas.<sup>41–44,46,47</sup> De acuerdo a la tabla 2, los potenciales de ionización de todas las moléculas presentaron valores superiores a 8.0 eV, por lo cual se llevó a cabo la síntesis de todas las moléculas partiendo de

2,7-dibromofluoreno **1** y aldehídos sustituidos **2a-e** en posición *para* como se observa en el Esquema 1.

Los compuestos se obtuvieron con tiempos de reacción cortos y rendimientos buenos (ver tabla 3). La reacción transcurrió bajo un mecanismo de tipo condensación aldólica donde la base extrae uno de los protones ácidos del fluoreno, los protones en posición C-9 tienen este carácter debido a que la carga negativa generada, se estabiliza por resonancia en los dos anillos aromáticos.

**Esquema 1.** Esquema general de la reacción para la síntesis de derivados del 2,7-dibromofluoreno.



R = -H (a), -Cl (b), -CH<sub>3</sub> (c), -OCH<sub>3</sub> (d), -CN (e)

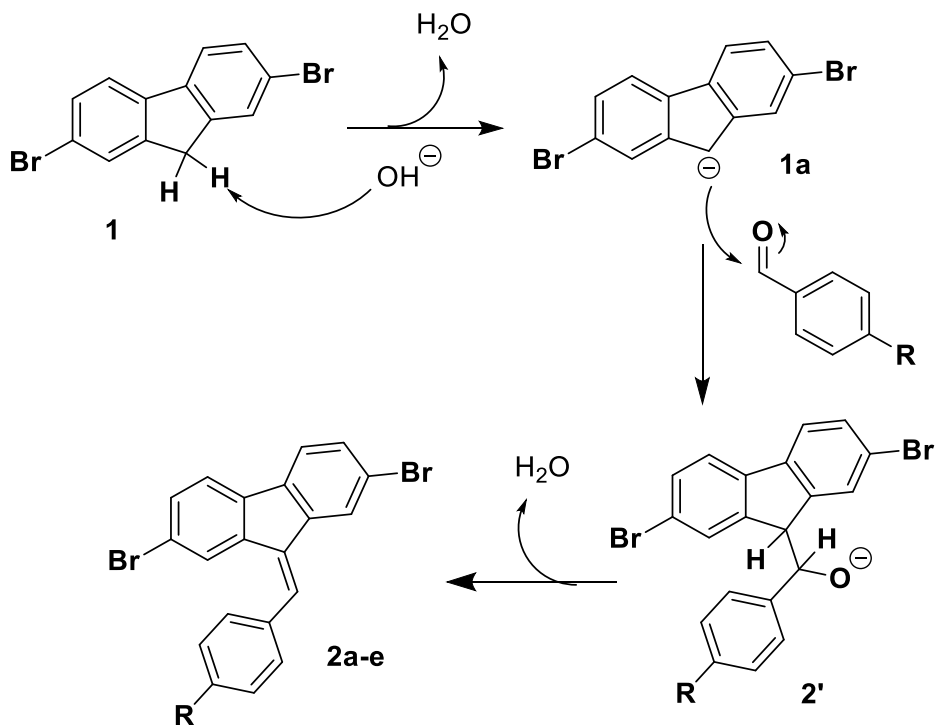
**Tabla 3.** Rendimientos y tiempos de reacción para la serie de compuestos **3a-e**.

Compuesto	Sustituyente (R)	Peso Molecular (g/mol)	Rendimiento (%)	Tiempo de Reacción
<b>3<sup>a</sup></b>	-H	412,12	53	30 min.
<b>3<sup>b</sup></b>	-Cl	446,57	33	30 min.
<b>3<sup>c</sup></b>	-CH <sub>3</sub>	426,15	55	60 min.
<b>3<sup>d</sup></b>	-OCH <sub>3</sub>	442,15	57	60 min.
<b>3<sup>e</sup></b>	-CN*	437,13	36	24 h.

\*El derivado FL-CN se sintetizó mediante el uso de 4-metilpiperidina como catalizador debido a descomposición en presencia de KOH.

El carbanión **1a** generado es un nucleófilo fuerte que ataca el carbono carbonílico del aldehído a través de una condensación tipo aldólica, generando el intermediario **2'** el cual se deshidrata rápidamente para formar los derivados de fluoreno **3a-e**. En el caso particular de la obtención del compuesto **3e** (FL-CN) se utilizó 4-metilpiperidina como catalizador básico, debido a que la reacción exhibía descomposición con KOH por ataque nucleofílico del hidróxido  $\text{OH}^-$  al grupo ciano electrodeficiente, llevando a la formación de una amida, a través de un mecanismo de hidrólisis.

**Esquema 2.** Mecanismo de reacción para la obtención de los derivados de fluoreno **3a-e**.



### 6.2.2 Caracterización de FLs

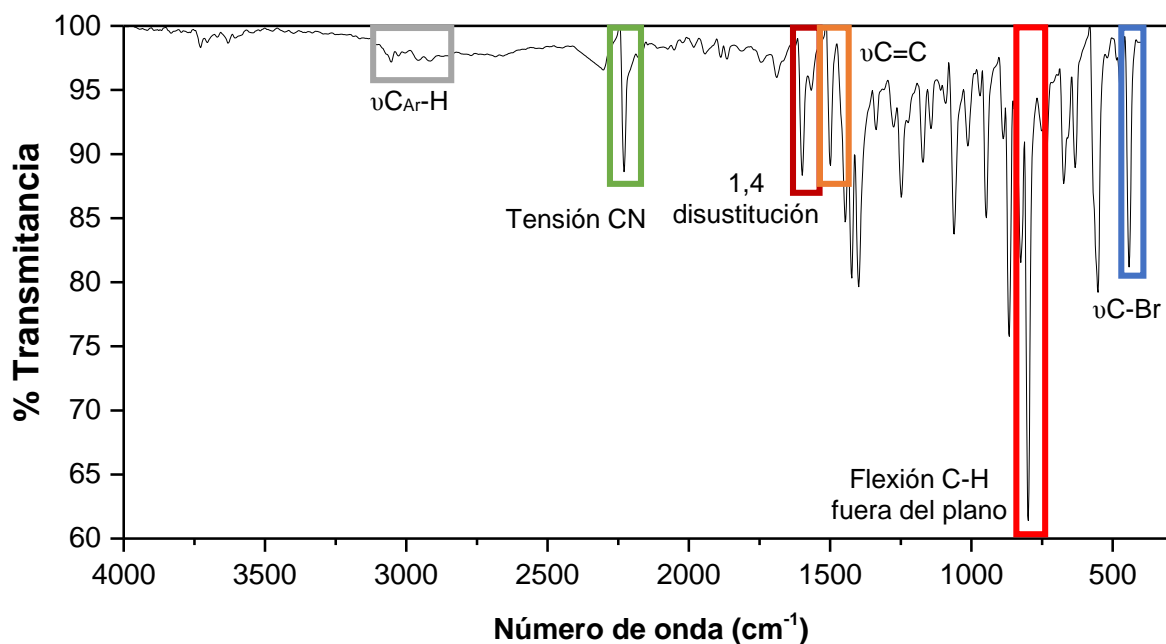
La caracterización de los compuestos se realizó mediante las técnicas espectroscópicas FT-IR, RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, experimentos bidimensionales y espectrometría de masas LDI-TOF. El compuesto FL-CN fue elegido como representante de la serie de compuestos para ser discutida su caracterización estructural.

En la figura 10 se muestra el espectro infrarrojo del FL-CN con las bandas características señaladas. En la región comprendida entre 3100-3000 cm<sup>-1</sup> se observan bandas débiles pertenecientes a la vibración C-H en compuestos de tipo aromático, en 1593 cm<sup>-1</sup> una banda media lo que implica la presencia de 1-4 disustitución aromática además de una banda fuerte en 803 cm<sup>-1</sup> por la flexión C-H fuera del plano para compuestos aromáticos con sustitución *para*, bandas débiles por vibraciones del anillo aromático debido a enlaces C=C en 1504 cm<sup>-1</sup> y vibraciones C-Br en 445 cm<sup>-1</sup>, finalmente y confirmando la presencia del grupo sustituyente ciano, una banda en 2230 cm<sup>-1</sup> debido a la flexión –CN.

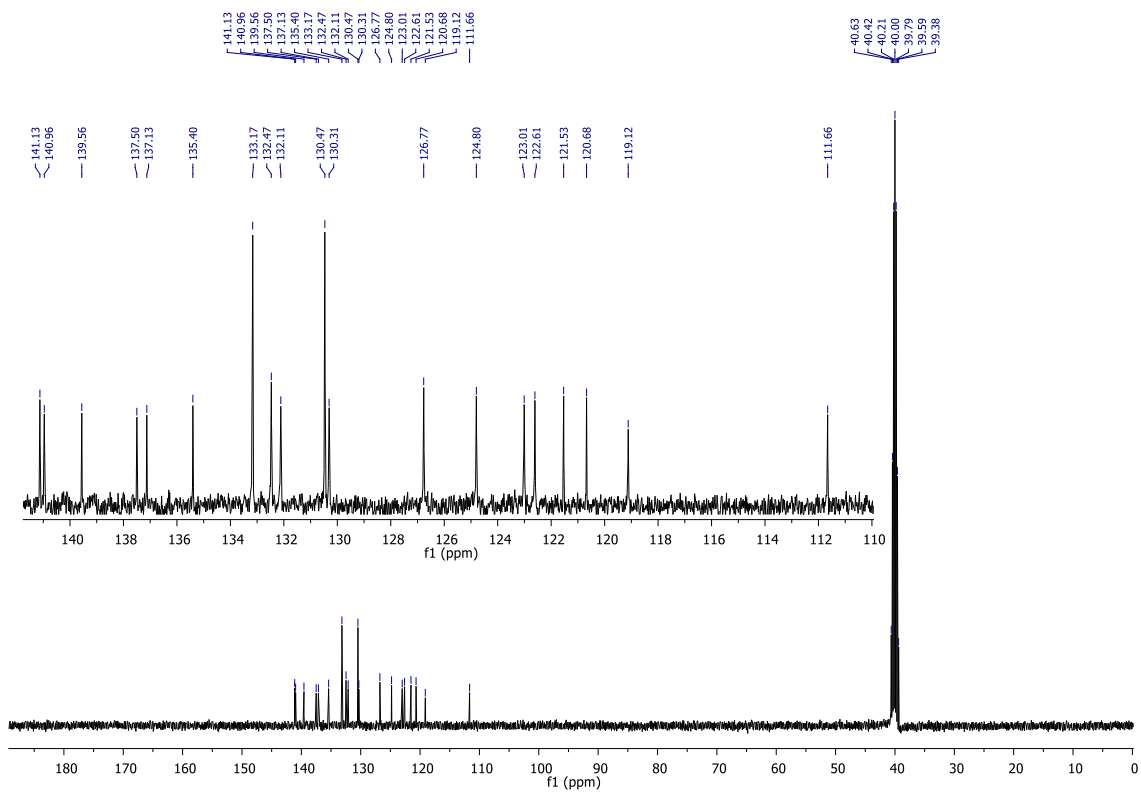
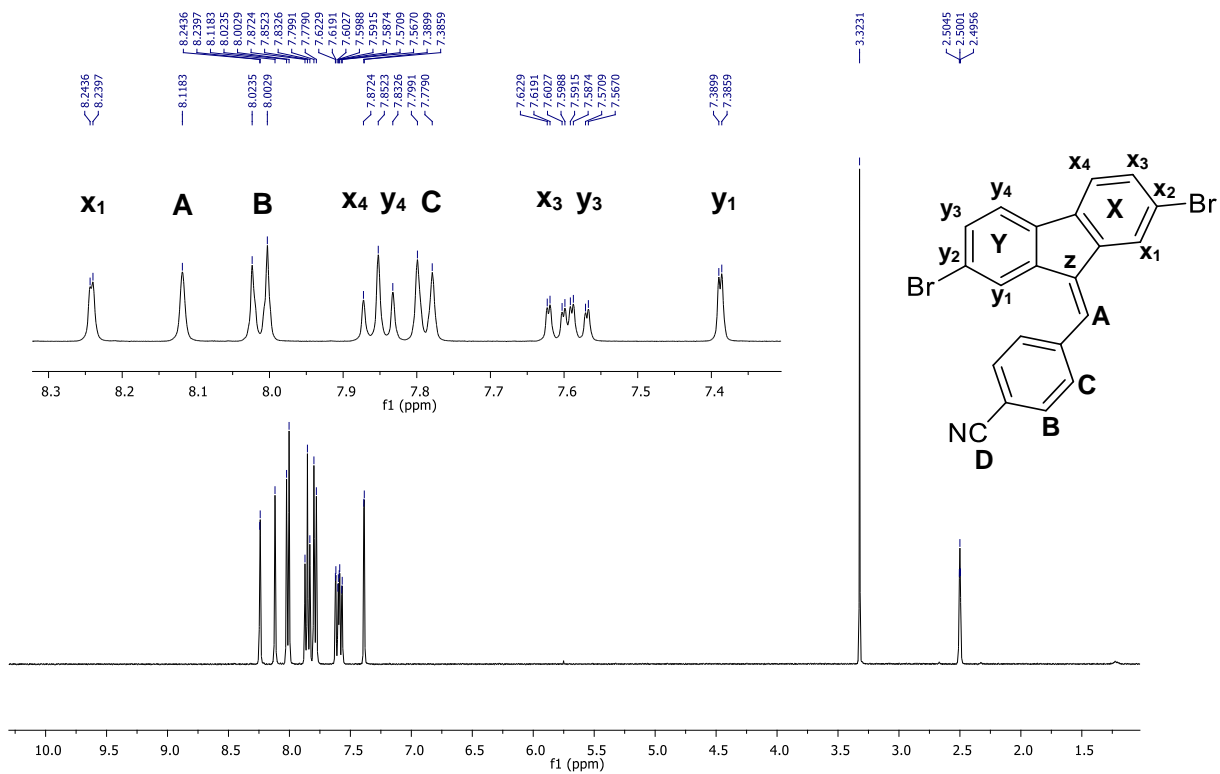
En la figura 11 se muestran los espectros RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C correspondientes al compuesto FL-CN. Como prueba determinante de que la reacción transcurrió con éxito, se observa en el espectro RMN-<sup>1</sup>H dos señales correspondientes al sistema de sustitución “*para*” con constantes de acoplamiento <sup>3</sup>J = 8.15 Hz que integra para dos protones a un desplazamiento de 8.01 (B) y 7.79 ppm (C) respectivamente, este sistema proviene del aldehído base 4-cianobenzaldehído. Otra señal determinante, es la correspondiente al protón vinílico que se encuentra desplazada a 8.12 ppm (A) y se expresa como una señal tipo singlete, debido a que no existe acoplamiento vecinal, esta señal garantizó que la unión de los dos sistemas fue exitosa.

Por medio de los espectros LDI de los derivados de fluoreno (ver figura 15) se observó la distribución isotópica experimental, la cual corresponde estrechamente a la distribución isotópica teórica, además los valores de mass accuracy <100ppm reportados en la tabla 4, indican la alta precisión en la medición de la masa experimental corroborando la correcta síntesis de los compuestos.

**Figura 10 . Espectro IR del FL-CN.**

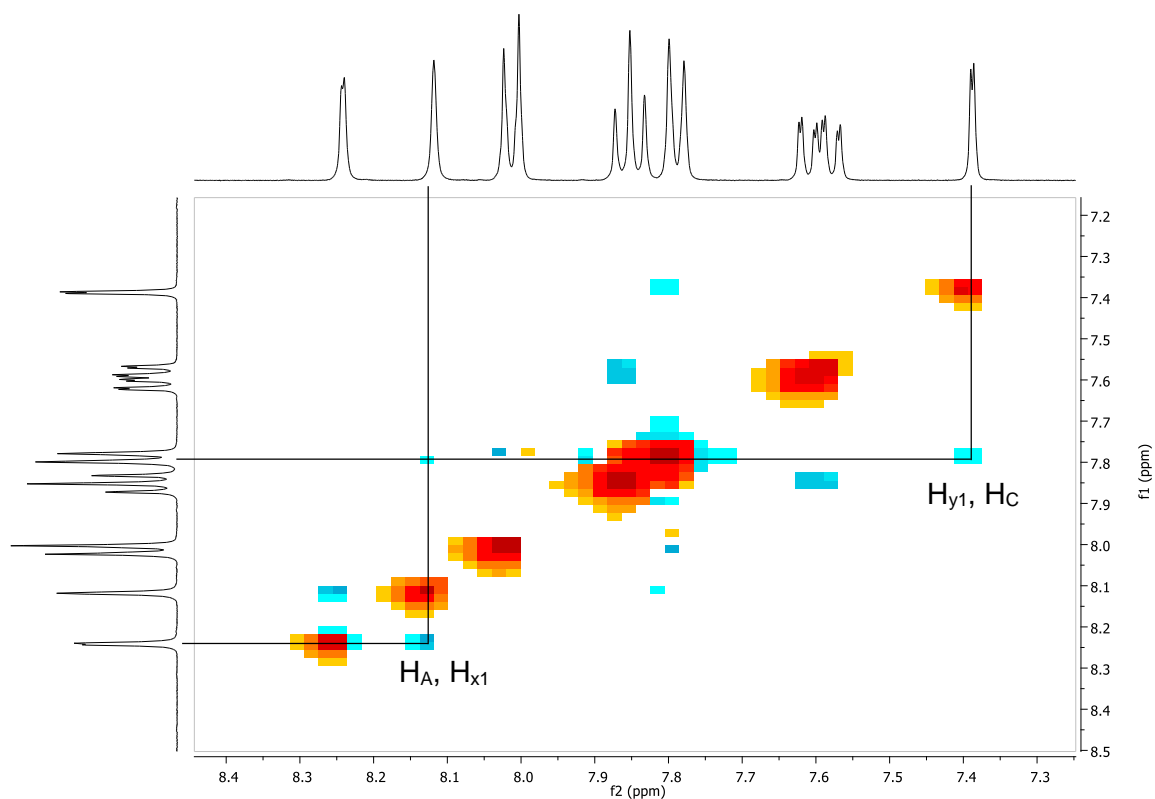


**Figura 11. Espectros RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del FL-CN.**



Para la correcta elucidación de los sistemas de protones X y Y se llevó a cabo un espectro de correlación por efecto nuclear Overhauser NOESY. En la figura 12, se observa una correlación espacial entre el protón  $H_{x1}$  y el protón vinílico a través del espacio lo que sugiere una rigidez del sistema y diferenciación de los anillos. La señal correspondiente a los protones orto, exhiben una correlación espacial con los protones  $H_{y1}$ . Estas señales son las más importantes y determinan la geometría de la molécula.

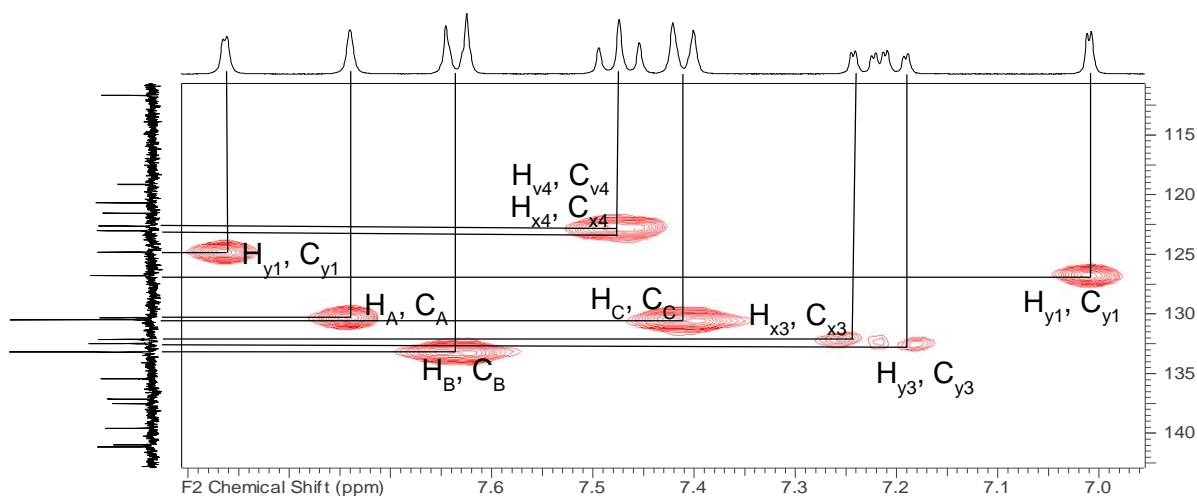
**Figura 12.** Espectro NOESY del FL-CN.



Con respecto al experimento de  $^{13}\text{C}$  se observa en la figura 11, parte inferior, dos señales de mayor intensidad correspondientes a los carbonos “orto” y “meta” desplazadas a 130.4 y 133.1 ppm, respectivamente. A 130.3 ppm se observa la señal de  $^{13}\text{C}$  correspondiente al carbono vinílico, la cual corrobora la unión de los

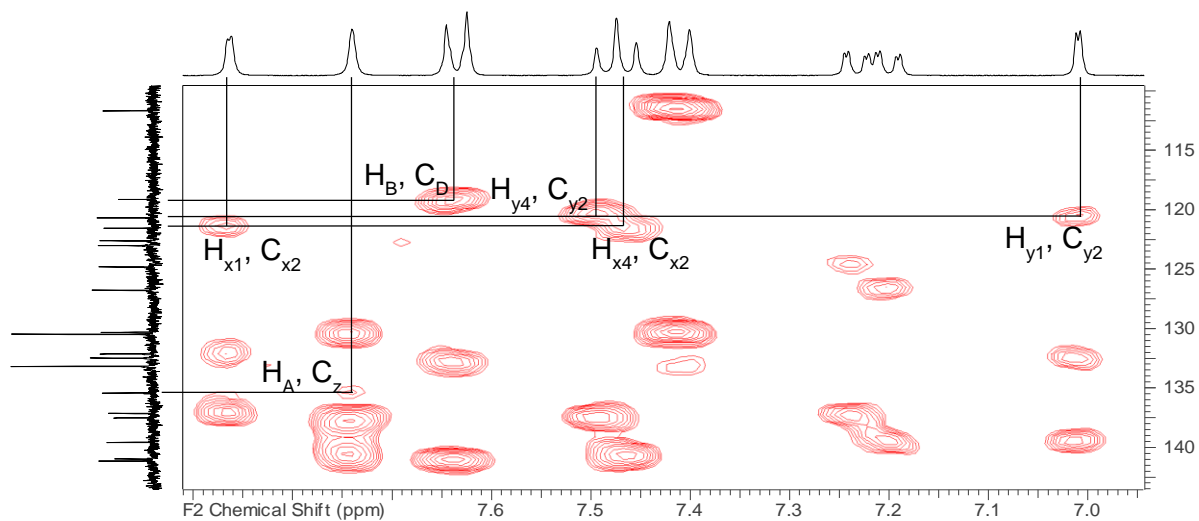
dos sistemas. En la figura 13, se observa el espectro HMQC que correlaciona cada señal de protones con su respectivo carbono  $^{13}\text{C}$ .

**Figura 13.** Espectro HMQC del FL-CN.



El experimento HMBC (figura 14) se empleó para elucidar la estructura, siendo las señales determinantes en 119.1 ppm correspondiente al  $^{13}\text{C}$  del grupo ciano (D), la señal a 135.4 ppm para el  $^{13}\text{C}$  en la posición z de la estructura, identificada por su acoplamiento con el protón vinílico  $\text{H}_{\text{A}}$  a 2 enlaces, además de señales en 137.5 y 139.5 ppm para los  $^{13}\text{C}$  cuaternarios de las posiciones  $\text{x}_2$  y  $\text{y}_2$  respectivamente.

**Figura 14. Espectro HMBC del FL-CN.**

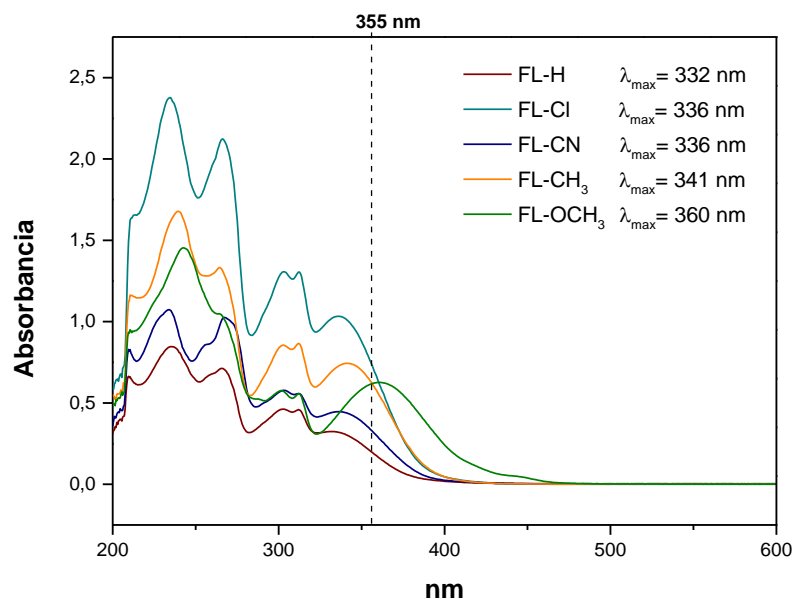


## 6.3 CARACTERIZACIÓN OPTOELECTRÓNICA DE FLs

### 6.3.1 Longitud de máxima absorción

Los FLs sintetizados presentan múltiples máximos de absorción, un máximo de absorción cercano a la región de 355 nm y los demás desplazados a longitudes de onda menores como se observa en la figura 15; el corrimiento y diferencias entre las bandas de absorción de los compuestos se deben a la naturaleza química que le confieren los distintos grupos funcionales unidos al núcleo de fluoreno. Estas bandas corresponden a transiciones de tipo  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$  debido a la estructura molecular altamente conjugada y la presencia de electrones no enlazantes localizados en átomos como O, N, Cl y Br.<sup>30</sup>

**Figura 15.** Espectros de absorción UV-Vis de FL-H, FL-Cl, FL-CN, FL-CH<sub>3</sub> y FL-OCH<sub>3</sub> a una concentración de 5mM.



En la figura 15, se observa que las matrices que tienen en la posición para (*p*) un sustituyente electrodonador como el FL-CH<sub>3</sub> y el FL-OCH<sub>3</sub> presentan un máximo de absorción a longitudes de onda mayores, para el caso del sustituyente metoxi se debe a que es un grupo auxocromo que al tener un par de electrones *n* capaces de interactuar con los electrones  $\pi$  del anillo tiene el efecto de estabilizar el estado  $\pi^*$ , disminuyendo su energía y provocando un desplazamiento batocrómico; mientras que los sustituyentes electroattractores como el -CN Y el -Cl provocan lo opuesto, desplazando los máximos de absorción hacia longitudes de onda menores (efecto hipsocrómico).<sup>30</sup>

Las moléculas FL-CH<sub>3</sub> y FL-OCH<sub>3</sub> poseen los máximos de absorción más cercanos a la longitud de onda del láser de Nd:YAG (355 nm) además presentan coeficientes

de absorptividad molar altos a dicha longitud de onda por lo que se espera que su desempeño como matrices MALDI se destaque respecto al grupo de moléculas sintetizadas.

### **6.3.2 Determinación de coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ )**

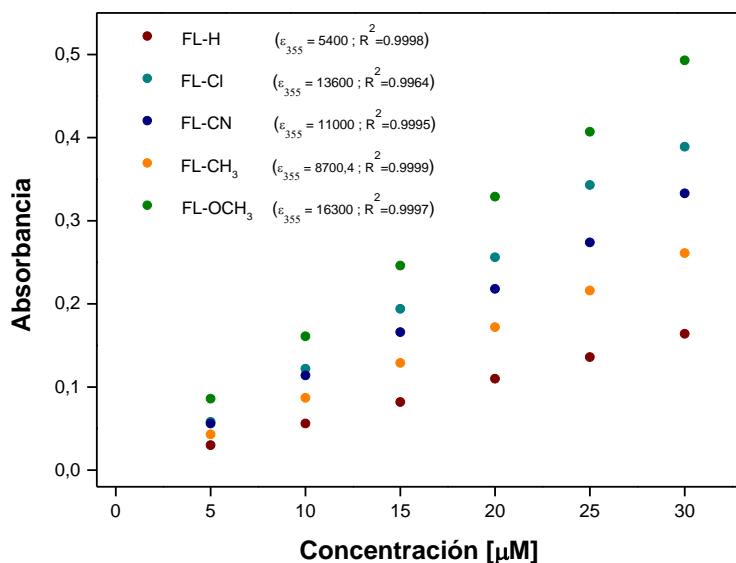
Las curvas de calibración de las matrices sintetizadas se muestran en la figura 16 con su correspondiente coeficiente de absorptividad molar a 355 nm. Los valores fueron determinados utilizando la ecuación de Lambert-Beer por medio de soluciones diluidas de las matrices en THF a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{M}$ .

Durante el proceso de ionización MALDI, se absorbe la energía del láser por la matriz, dando lugar a su excitación y luego ionización como se indicó en la figura 1. Por lo tanto una matriz adecuada debe tener una fuerte absorptancia a la longitud de onda de trabajo del láser Nd: YAG (355 nm).<sup>7</sup> En la figura 16 se evidencia que el FL-OCH<sub>3</sub> junto con el FL-Cl presentan los valores de absorptividad molar más altos entre las matrices sintetizadas indicando que para dichos compuestos la energía suministrada a la longitud de onda de 355 nm es eficientemente absorbida por lo que se puede esperar que actúen como buenas matrices MALDI al favorecerse la formación de iones primarios.

El DCTB presenta un coeficiente de absorptividad molar de 33980 a una longitud de onda de 355 nm,<sup>48</sup> superando las absorptividades de los compuestos sintetizados; partiendo de que las moléculas del fluoreno además de presentar una banda de absorción cercana a la longitud de onda de trabajo, tienen máximos de absorción intensos en la región de 200-300 nm, por lo que se espera que a dichas longitudes de onda la absorción sea alta (figura 15). Una alta absorptividad molar es una de las

propiedades que debe presentar una matriz MALDI pero no la única, por lo que se requiere de experimentos con analitos para observar su rendimiento a la hora del análisis.

**Figura 16.** Curvas de calibración de las matrices sintetizadas.

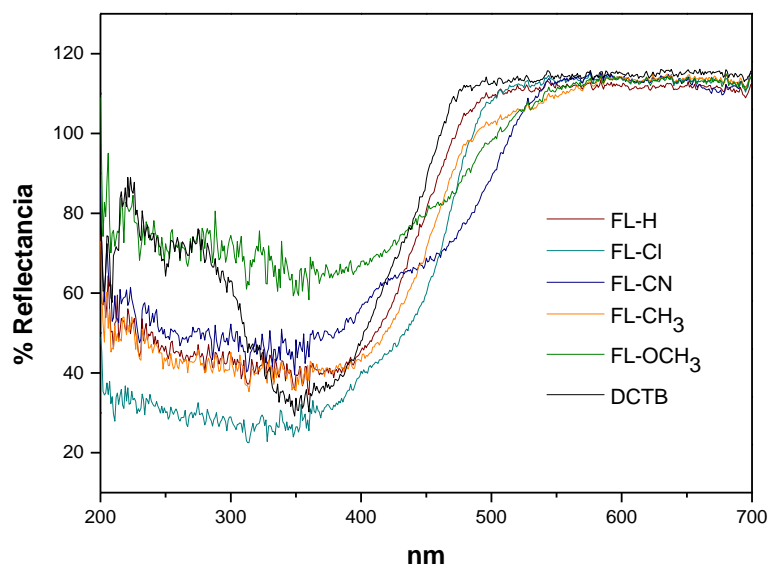


### 6.3.3 Reflectancia difusa

El análisis de reflectancia difusa (RD) exhibió el comportamiento de las matrices en estado sólido. Este resultado es aproximado al desempeño real de la matriz, debido a que los experimentos MALDI y la ionización de las matrices se realizan sobre un target metálico en estado sólido. En la figura 17 se observa una línea recta en la zona comprendida entre 550-700 nm la cual representa la luz incidente que paso a través de la muestra, luego se observa un descenso rápido y una abrupta caída generando un pozo de mínima reflectancia en la región espectral de 200-400 nm

puesto que los compuestos derivados del 2,7-dibromofluoreno presentan máximos de absorbancia en esta región, ver figura 15.

**Figura 17.** Espectros de reflectancia difusa para FL-H, FL-Cl, FL-CN, FL-CH<sub>3</sub>, FL-OCH<sub>3</sub> y DCTB.



## 6.4 EVALUACIÓN DE DERIVADOS DE FLUORENO COMO MATRICES ET-MALDI

### 6.4.1 Experimentos LDI-MS

Un aspecto de suma importancia que se debe tener en cuenta en el momento de elegir una matriz para un análisis MALDI es su espectro base. El espectro base debe exhibir el menor número de señales posibles de la matriz, fragmentos o agregados, con el fin de garantizar que las señales producidas en un experimento MALDI correspondan inequívocamente a los analitos.

Los espectros LDI brindan información sobre la capacidad que tiene un compuesto puro (en estado sólido) de ionizarse bajo las condiciones operacionales del equipo, por tal razón, se adquirieron los espectros LDI de los fluorenos sintetizados en el modo ion-positivo. En la figura 18 se observan los espectros LDI correspondientes a las matrices de fluoreno, donde se detectó con mayor abundancia (pico base) el ion correspondiente al catión radical molecular ( $M^+$ ) respectivo de cada compuesto, en la tabla 4 se registran los valores de relación S/N y mass accuracy para dicho pico.

En la figura 18, también se observa que los espectros obtenidos no presentan señales diferentes a la correspondiente al catión radical molecular ( $M^+$ ), lo que indica una efectiva ionización de los compuestos sin presencia de fragmentos y/o formación de aductos, a diferencia del DCTB. Los altos valores de relación S/N (tabla 4) y abundancia indican que los compuestos FL-CN, FL-CH<sub>3</sub> y FL-OCH<sub>3</sub> se ionizan con mayor facilidad que el FL-H y FL-Cl utilizando una misma energía del láser, por lo que se está garantizando la formación de la mayor cantidad de iones primarios de la matriz que finalmente permitirán la ionización del analito. Por la razón expuesta anteriormente se eligieron el FL-CN, FL-CH<sub>3</sub> y FL-OCH<sub>3</sub> para realizar los ensayos con analitos.

Se tomaron espectros a diferentes energías del láser de Nd:YAG para las matrices sintetizadas, a partir de los resultados obtenidos se construyeron graficas de abundancia de iones, relación señal/ruido y resolución, ver figura 19.<sup>49</sup>

Como se observa en la figura 19a, los iones de las matrices se registran a una energía del láser de 0.83  $\mu$ J/pulso, dicha energía no corresponde al umbral, con valores de abundancia y relación S/N bajos (figura 19b), a medida que la energía

del láser aumenta, la abundancia del ion molecular ( $M^+$ ) también aumenta hasta valores altos de energía donde permanece constante.

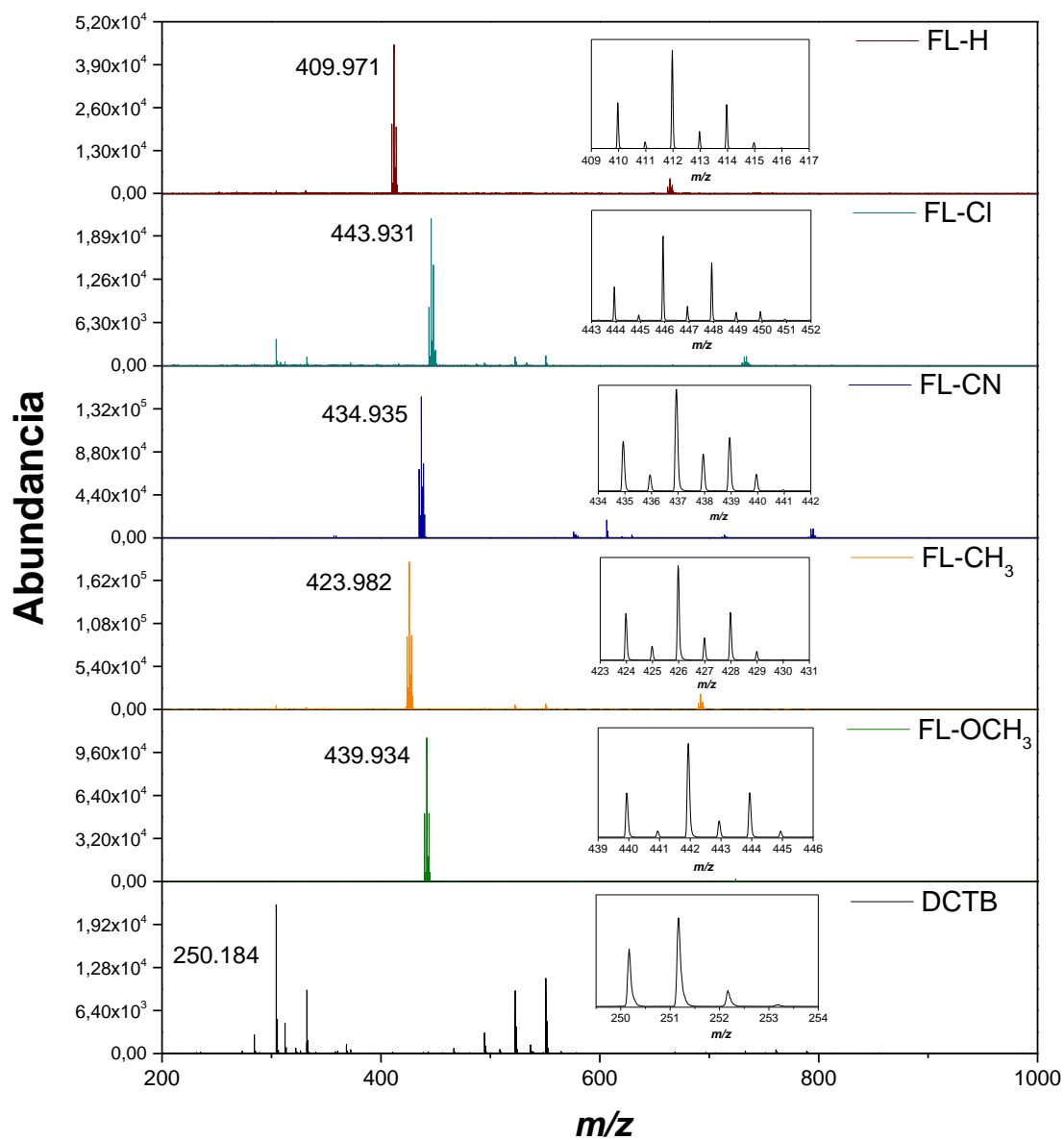
A valores bajos de energía hay poca cantidad de iones moleculares presentes, este hecho hace que el pico se encuentre más cercano al background del espectro y por consiguiente la relación S/N sea baja, al aumentar la energía y por tanto la abundancia de iones la relación S/N aumenta presentando un pico máximo a una energía del láser de 1,24  $\mu\text{J/pulso}$  aproximadamente (Figura 19b).

A medida que se aumenta la energía del láser, se incrementa la abundancia de los iones y por ende el número de señales en el espectro. Las señales que aparecen a energías mayores a 1,24  $\mu\text{J/pulso}$  corresponden a fragmentos y aductos debido a que se dan mayor número de reacciones y fragmentaciones al ser suministrada mayor energía por unidad de área (ver figura 20), este hecho repercute en la resolución del espectro que se ve afectada por el aumento en las señales del background y por tanto baja relación S/N (Figura 19b-19c).

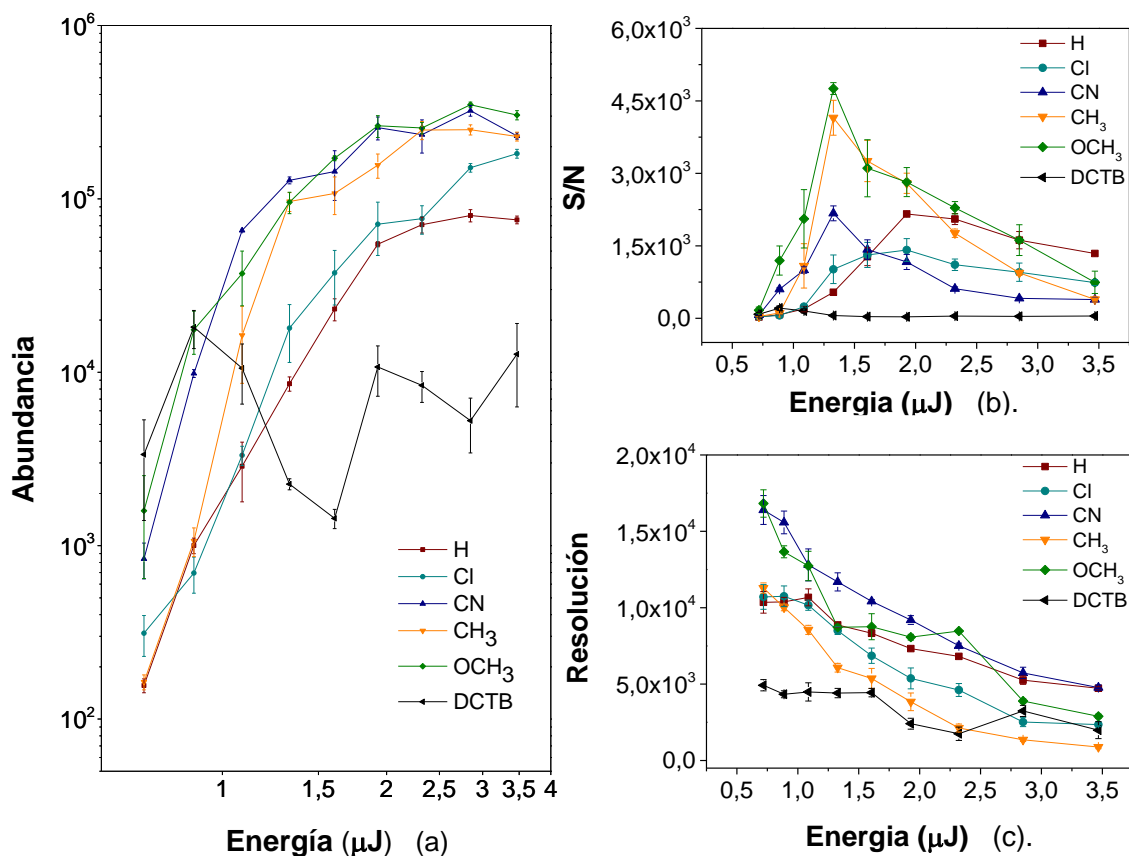
**Tabla 4.** Valores de relación S/N y mass accuracy para ion molecular de las matrices sintetizadas y DCTB.

MATRIZ	RELACIÓN S/N	MASS ACCURACY (PPM)
FL-H	935	87
FL-CL	360	99
FL-CN	9662	20
FL-CH <sub>3</sub>	1774	80
FL-OCH <sub>3</sub>	8490	15
DCTB	105	120

**Figura 18.** Espectros LDI y perfiles isotópicos experimentales de las matrices sintetizadas FL-H, FL-Cl, FL-CN, FL-CH<sub>3</sub> y FL-OCH<sub>3</sub>.



**Figura 19.** (a) Curva de aparición de iones, (b) Relación S/N y (c) Resolución para el ion molecular de las matrices.

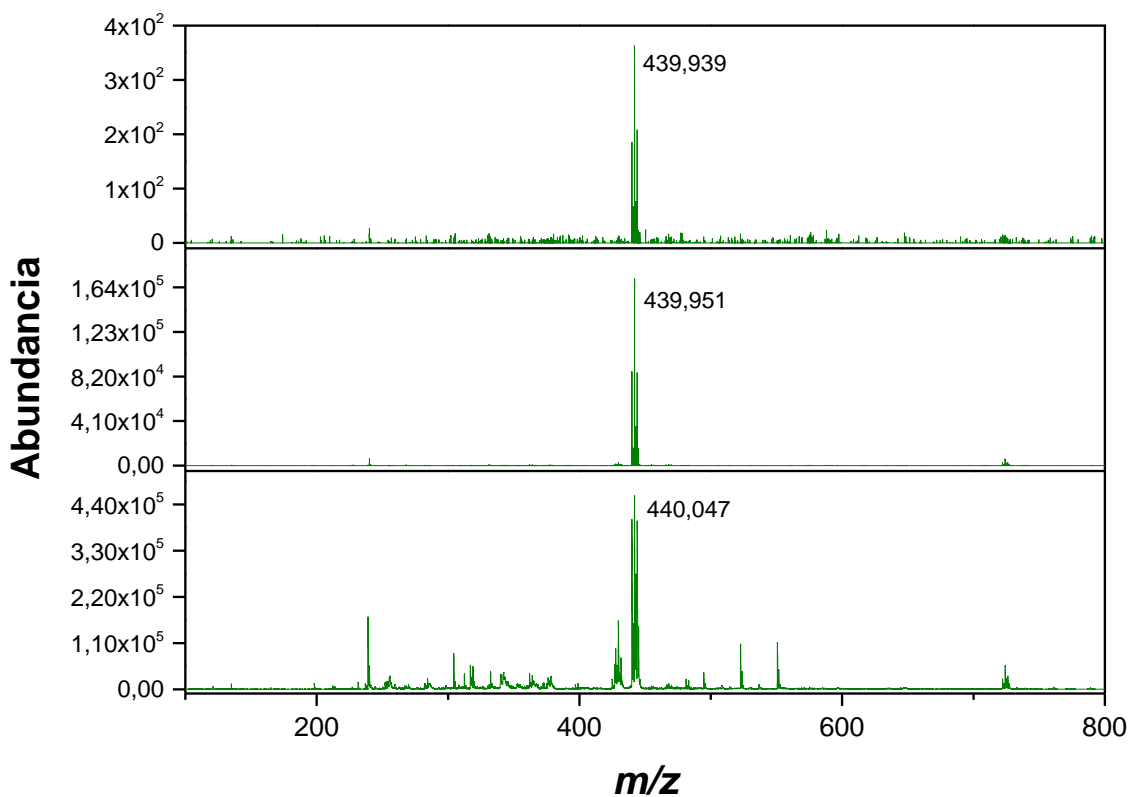


Es importante resaltar la diferencia entre el comportamiento de las matrices sintetizadas frente a la matriz convencional DCTB, en la figura 19 se observan las desventajas en términos de valores aleatorios de abundancia de iones además de valores bajos de resolución y relación S/N a cualquier valor de energía del láser.

El espectro de masas LDI de la molécula FL-OCH<sub>3</sub> en modo positivo a diferentes energías del láser se muestra en la figura 20. A una energía de 0.83 μJ/pulso se detectó únicamente el ion molecular con una abundancia de aproximadamente

$4 \times 10^2$  y ruido de fondo; utilizando una energía del láser de  $3.3 \mu\text{J/pulso}$ , el espectro presenta gran cantidad de señales provenientes de la fragmentación y la formación de aductos por la alta energía suministrada al sistema, mientras que a una energía de  $1,24 \mu\text{J/pulso}$ , el espectro se observa libre de ruido de fondo y con una abundancia del pico de base de aproximadamente  $5 \times 10^5$ .

**Figura 20.** Espectros LDI del FL-OCH<sub>3</sub> a energías del láser de 0.83, 1.24 y 3.3  $\mu\text{J/pulso}$ .



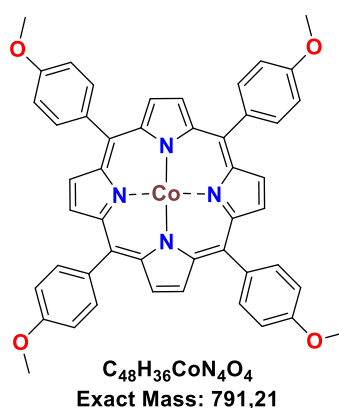
Los mejores espectros en MALDI en términos de resolución y baja fragmentación se consiguen ligeramente por encima del umbral de formación de iones,<sup>4</sup> pero debido a que a dicha energía la relación S/N es baja se determinó que las

condiciones más favorables se obtienen a una energía del láser de 1,24  $\mu\text{J}/\text{pulso}$  basándose en los valores obtenidos experimentalmente (figura 19b) y visualización del espectro (figura 20), por lo que se escogió dicho valor para realizar los análisis posteriores.

#### 6.4.2 Experimentos MALDI-MS con analito modelo

En base a los resultados obtenidos por LDI-MS se utilizaron los compuestos FL-CN, FL-CH<sub>3</sub> y FL-OCH<sub>3</sub> para el experimento con analito. Se llevó a cabo el análisis para la porfirina de cobalto (tetrametoxifenilporfirina de cobalto) (figura 21), la cual fue ionizada mediante transferencia electrónica empleando las matrices elegidas y la matriz convencional *trans*-2-[3-(4-terc-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno] malononitrilo (DCTB), se realizaron curvas de aparición de iones, relación S/N y resolución para el ion molecular del analito a diferentes energías del láser y utilizando una relación matriz:analito 1000:1 (Figura 23).

**Figura 21.** Estructura de la porfirina de Cobalto  $\text{C}_{48}\text{H}_{36}\text{CoN}_4\text{O}_4$ .



Los espectros correspondientes a la porfirina de cobalto, LDI y utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-CH<sub>3</sub> y FL-OCH<sub>3</sub> a una relación matriz:analito 1000:1 se

muestran en la figura 22. El LDI de la porfirina muestra que la molécula se ioniza fácilmente sin el uso de una matriz debido a su alta conjugación, con la desventaja de una relación S/N baja y presencia de ruido en la línea base; utilizando como matriz DCTB se obtiene la mejor respuesta en términos de abundancia del ion molecular pero registrando gran cantidad de picos que corresponden posiblemente a fragmentaciones, aductos y señales de fondo provenientes de la matriz. El mejor espectro en términos de abundancia, relación S/N, resolución y carencia de ruido en la línea base se obtuvo con la matriz FL-CN además, presenta un valor de mass accuracy de 25 ppm (tabla 5) lo que indica la alta precisión en la medición de la masa experimental, cabe resaltar que con las matrices FL-CH<sub>3</sub> y el FL-OCH<sub>3</sub> también se obtienen espectros con mejores resultados que el DCTB.

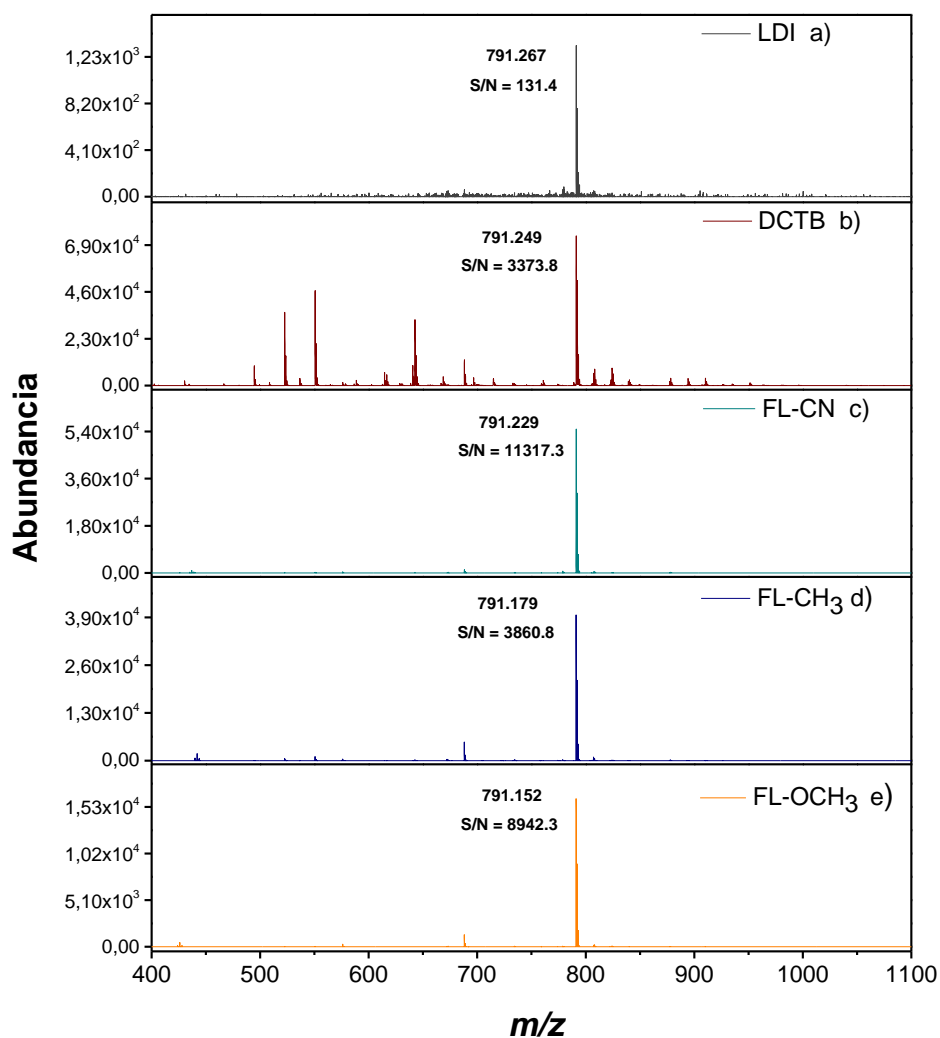
**Tabla 5.** Valores de relación S/N y mass accuracy para ion molecular de la porfirina de cobalto (M<sup>+</sup>).

MATRIZ	RELACIÓN S/N	MASS ACCURACY (PPM)
-	131.4	76
<b>DCTB</b>	3373.8	53
<b>FL-CN</b>	11317.3	28
<b>FL-CH<sub>3</sub></b>	3860.8	35
<b>FL-OCH<sub>3</sub></b>	8942.3	69

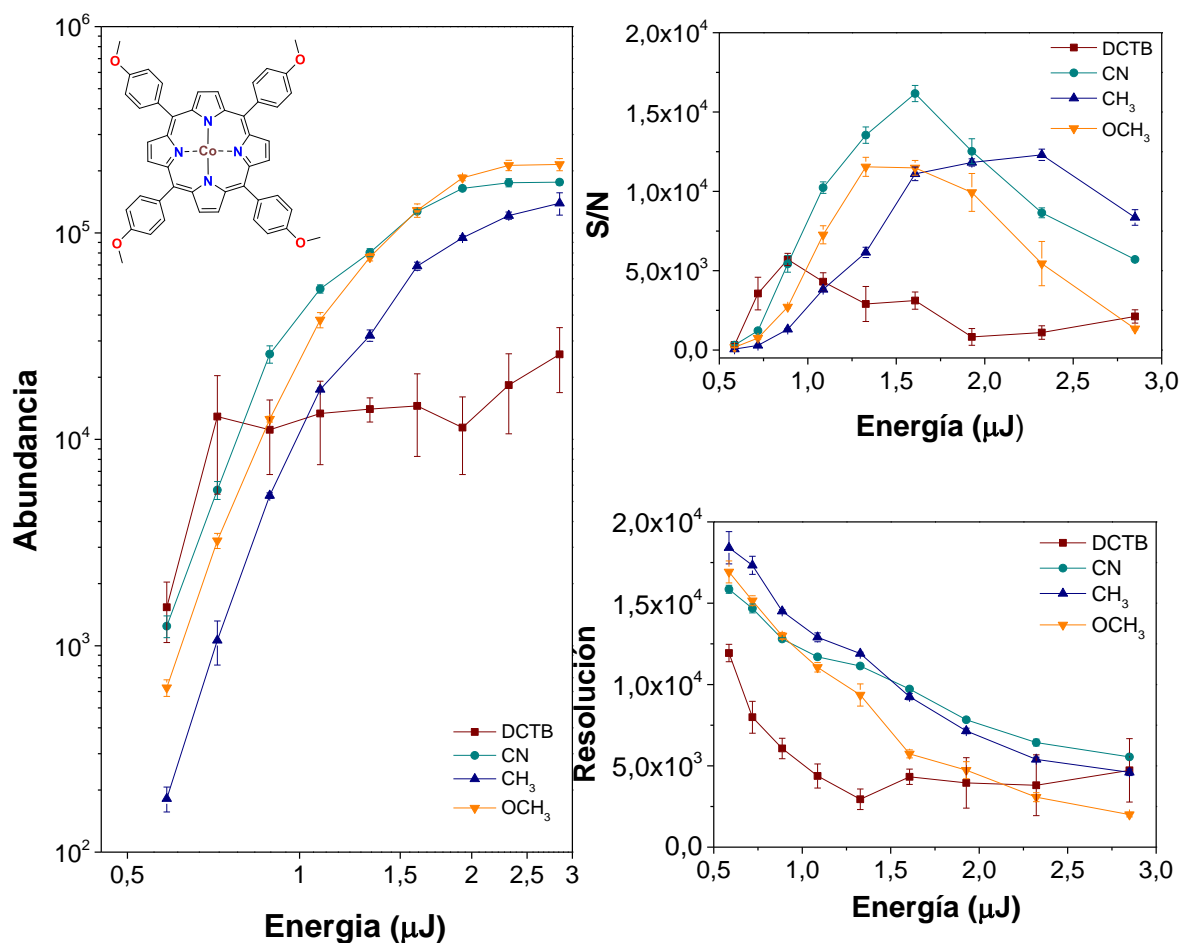
Como se observa en la figura 23, el comportamiento es comparable con los resultados obtenidos para el ion molecular de las matrices (LDI) de la figura 19, con lo que se puede concluir que los FLs permiten de manera eficiente la ionización de la porfirina de Cobalto (analito modelo) mejorando los espectros obtenidos utilizando DCTB como matriz, este comportamiento se evidencia en los altos valores de abundancia de iones, relación S/N y resolución de los espectros. A partir de

dichas graficas se escogió una energía del láser de 1.24  $\mu\text{J}/\text{pulso}$  para realizar los experimentos con analitos, puesto que es la mínima energía requerida con la que se consigue una buena calidad en los espectros desgastando menos el láser de Nd:YAG.

**Figura 22.** Espectros de la porfirina de Cobalto  $\text{C}_{48}\text{H}_{36}\text{CoN}_4\text{O}_4$  a) LDI y utilizando como matrices b) DCTB, c) FL-CN, d) FL- $\text{CH}_3$  y e) FL- $\text{OCH}_3$ .



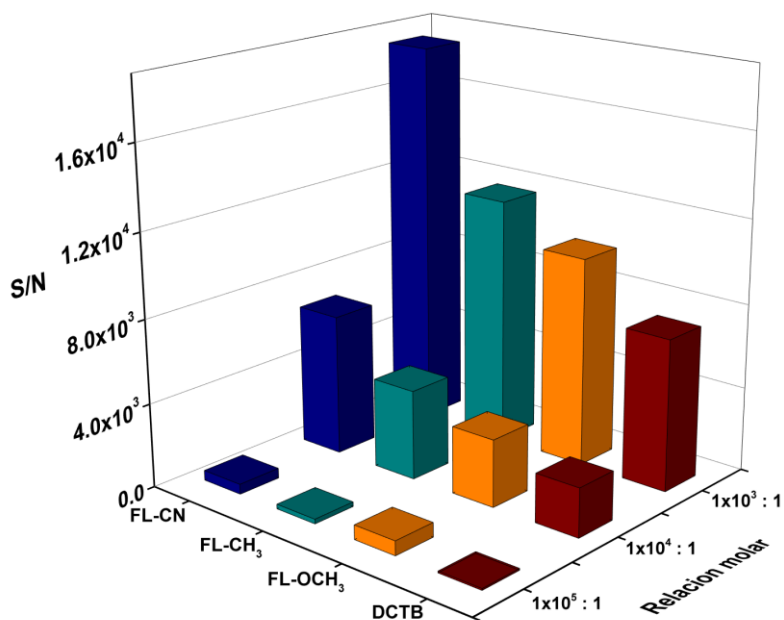
**Figura 23.** (a) Curva de aparición de iones, (b) Relación S/N y (c) Resolución para el ion molecular de la porfirina de cobalto.



Se evaluó el cambio de la relación S/N para relaciones matriz:analito de 1000:1, 10000:1 y 100000:1 correspondiente a concentraciones del analito de 1,25 pmol, 0,125 pmol y 12,5 fmol respectivamente. La grafica permitió conocer la mínima concentración requerida para la obtención de buenos espectros en términos de relación S/N. Se utilizó 1,24 μJ/pulso como energía del láser arrojando la gráfica de la figura 24.

Se conoce que la abundancia de iones incrementa a bajas concentraciones, esto se puede deber a una disminución de la eficiencia de detección, debido a que un mayor volumen de material tiene que ser sometido a ablación para generar un número suficiente de iones de analito. A altas concentraciones de analito, la absorción de energía por volumen se reduce puesto que la matriz se encuentra en menos proporción, causando que se requiera de una mayor energía para permitir la eficiente ionización.<sup>4</sup> El experimento se realizó para valores de relación S/N ya que brinda mayor información referente a la abundancia del ion molecular del analito con respecto a la abundancia de los demás picos presentes en el espectro, es por esto, que la tendencia esperada en el incremento de abundancia de iones a menor concentración de analito no se observa en este caso, este hecho puede ser atribuido a que la abundancia de señales no correspondientes al analito reflejan una disminución en la relación S/N.

**Figura 24.** Grafica de relación S/N vs relación molar matriz:analito utilizando como matriz FL-CN, FL-CH<sub>3</sub>, FL-OCH<sub>3</sub> y DCTB.

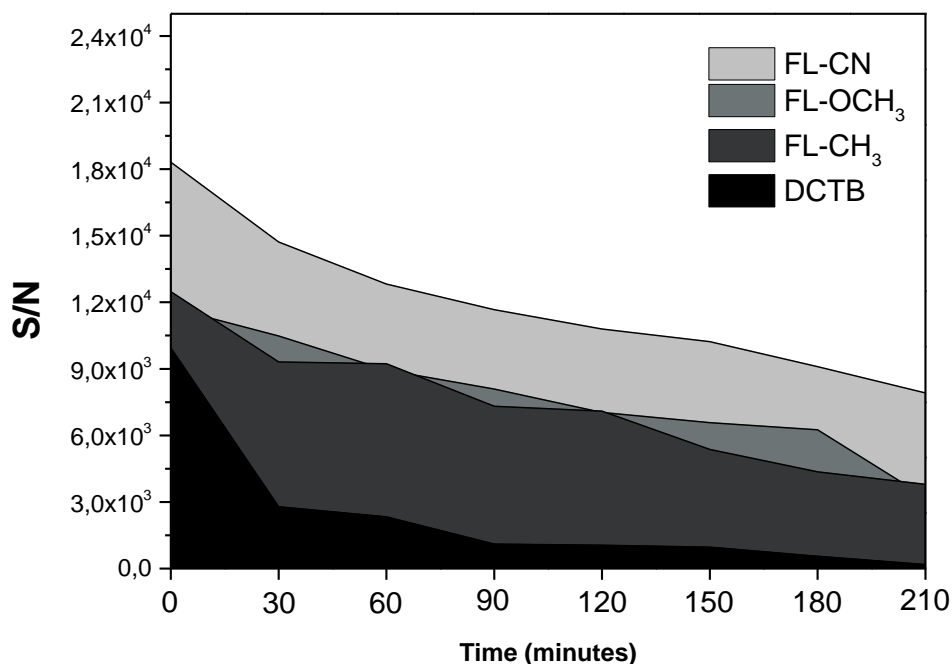


Se observa en la figura 24 que a medida que la relación matriz:analito aumenta la relación S/N decrece hasta una concentración de 12,5 fmol donde se registra señal del ion molecular pero con una baja relación S/N. Los FLs presentan un mejor rendimiento como matriz en comparación con el DCTB siendo el FL-CN la matriz con la que mejores resultados se obtienen para el análisis de porfirinas. Con lo que finalmente se puede concluir que una relación matriz: analito de 1000:1 es óptima para el proceso.

Como último experimento con analito discreto se evaluó el comportamiento de las diferentes matrices (relación S/N) en función del tiempo obteniendo una gráfica de decaimiento de la señal de la porfirina de cobalto por sublimación de las matrices en el vacío, con el fin de observar el rendimiento de la matriz al ser utilizadas en procedimientos que requieran de un tiempo prolongado para su realización, como es el caso de MALDI imágenes. Se aplicó sobre el target una relación molar matriz:analito de 1000:1 y utilizando una energía del láser de 1,24  $\mu\text{J}/\text{pulso}$  (Figura 25).

El resultado obtenido demuestra que el DCTB tiene baja estabilidad en el vacío corroborando los reportes sobre este hecho,<sup>25</sup> razón por la que a partir del tiempo cero la relación S/N decae drásticamente, este hecho perjudica la obtención de espectros puesto que varían con el tiempo afectando la reproducibilidad de estos. Con respecto a los FLs se puede observar su alta estabilidad resaltando la matriz FL-CN, mostrando al minuto 210 un valor de relación S/N útil para el análisis.

**Figura 25.** Decaimiento de la relación S/N en función del tiempo empleando como matrices FL-CN, FL-CH<sub>3</sub>, FL-OCH<sub>3</sub> y DCTB.



#### 6.4.3 Experimentos MALDI-MS con mezcla de analitos modelo

Debido a los excelentes resultados exhibidos por las matrices basadas en fluoreno: espectros sin interferencias, capacidad de ionización de analitos y términos analíticos, se extrapoló el estudio de la ionización. Las matrices seleccionadas para el análisis se consideraron a partir de los datos proporcionados por la tabla 4, los compuestos FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub> presentan valores mayores de relación S/N y mass accuracy indicando la efectiva ionización, formación de iones primarios de la matriz (alta abundancia de iones) y alta precisión en la medición de masa, razón por la que fueron escogidos.

El análisis fue realizado para una mezcla de porfirinas y ftalocianinas debido al reporte y desarrollo de múltiples aplicaciones. Estos sistemas aromáticos son de gran interés en temas como celdas solares orgánicas, dispositivos electro-ópticos, formación de complejos iónicos y reacciones redox biológicas.<sup>50</sup> Las porfirinas sintéticas han sido estudiadas como modelos biomiméticos, catalizadores, sensores y agentes terapéuticos, además de la conocida aplicación de las ftalocianinas como colorantes utilizados en tintas, materiales fotográficos, textiles, plásticos, pinturas, entre otros.<sup>23,51</sup>

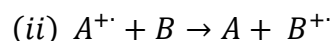
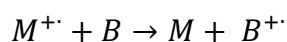
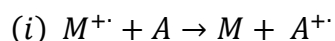
Se llevó a cabo el análisis de una mezcla de porfirinas y ftalocianinas para un total de 10 analitos (figura 26). En la figura 27 se muestran los espectros LDI y utilizando como matrices DCTB, FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub> con una relación matriz:analito de 1000:1 (5 pmol de cada analito), utilizando 1,24 μJ/pulso como energía del láser. Se encuentran señalados los picos pertenecientes a las porfirinas y ftalocianinas presentes en la muestra y en la parte superior las respectivas estructuras ordenadas de menor a mayor masa molecular.

Se evidencia la necesidad del uso de una matriz para la identificación de la mayor cantidad de analitos de la muestra o en el mejor de los casos en su totalidad, puesto que en el espectro LDI, no se registra picos correspondientes a los cationes radicales de los analitos.

Con el fin de comparar el rendimiento de los FLs y la matriz convencional DCTB se calculó el porcentaje de cobertura correspondiente a la cantidad de señales asignadas al catión radical molecular de cada analito. Las matrices de fluoreno permitieron la ionización de todos los analitos presentes en la mezcla, demostrando su buena respuesta con valores de mass accuracy bajos, en la mayoría de casos

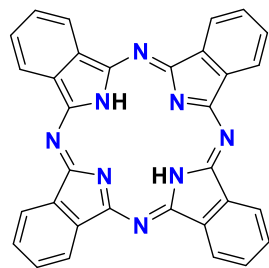
mejorando los valores conseguidos utilizando DCTB, asegurando una mejor precisión en la medición de la masa (tabla 6).

La no presencia de analitos en el espectro o las diferencias de abundancia entre estos se debe a que reacciones secundarias no sólo modifican la señal de la matriz en presencia de un analito, también puede afectar fuertemente las intensidades de los múltiples analitos. La supresión de analitos (ASE) se da por dos vías (i) si B reacciona de manera más eficiente que A con el catión radical de la matriz ( $M^+$ ), entonces la abundancia de ( $A^+$ ) será menor a la que sería en ausencia de B, (ii) por transferencia de carga directamente entre analitos, cumpliendo con un  $PI(A) > PI(B)$ .<sup>19</sup> Al utilizar como matriz DCTB, están siendo ionizados los analitos con PI más bajo por medio de las dos vías explicadas anteriormente, causando supresión de analitos con PI mayor. Además, el DCTB presenta señales que no corresponden a los analitos, muchos de estos provienen del LDI de la matriz o debido a reacciones matriz:analito por labilidad de los analitos generando señales indeseables.<sup>25</sup>

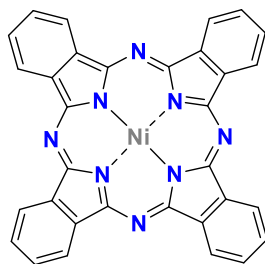


En los anexos K-T se muestra una ampliación de la región de iones moleculares de los analitos junto con una distribución isotópica teórica (línea roja) y el experimental (línea negra) donde se comprueba que con las matrices DCTB, FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub> se consigue un perfil isotópico muy cercano al teórico, fuerte evidencia de que coincide con la fórmula molecular de los analitos.

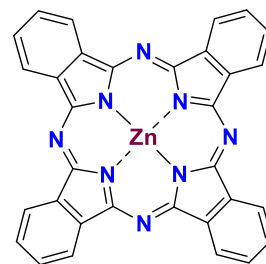
**Figura 26.** Estructuras de las porfirinas y ftalocianinas de la mezcla analizada por MALDI.



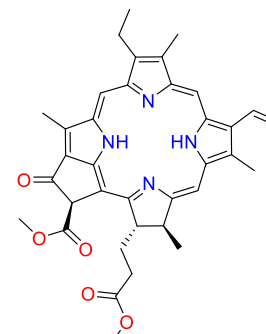
$C_{32}H_{18}N_8$   
Exact Mass: 514,17



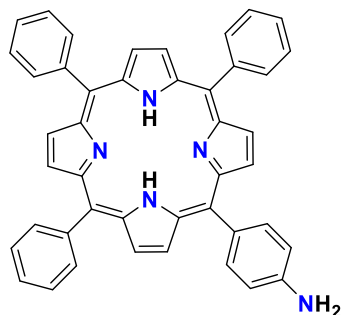
$C_{32}H_{16}N_8Ni$   
Exact Mass: 570,09



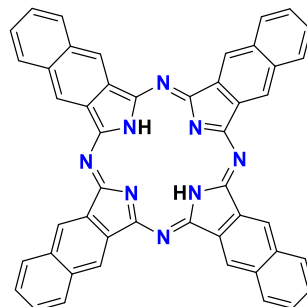
$C_{32}H_{16}N_8Zn$   
Exact Mass: 576,08



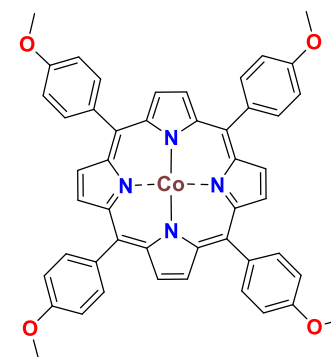
$C_{36}H_{38}N_4O_5$   
Exact Mass: 606,28422



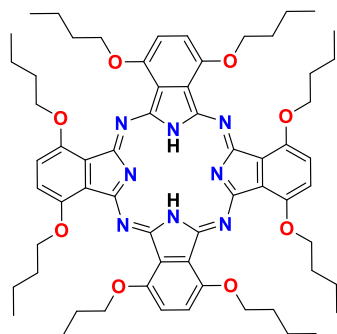
$C_{44}H_{31}N_5$   
Exact Mass: 629,26



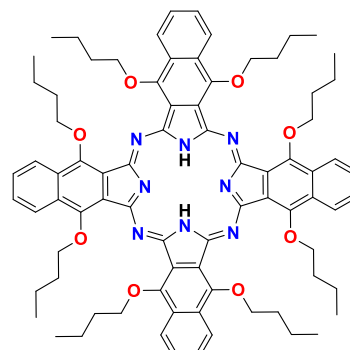
$C_{48}H_{26}N_8$   
Exact Mass: 714,23



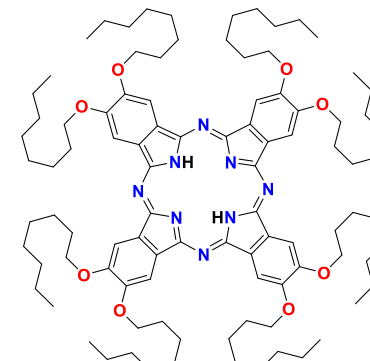
$C_{48}H_{36}CoN_4O_4$   
Exact Mass: 791,21



$C_{64}H_{82}N_8O_8$   
Exact Mass: 1090,63

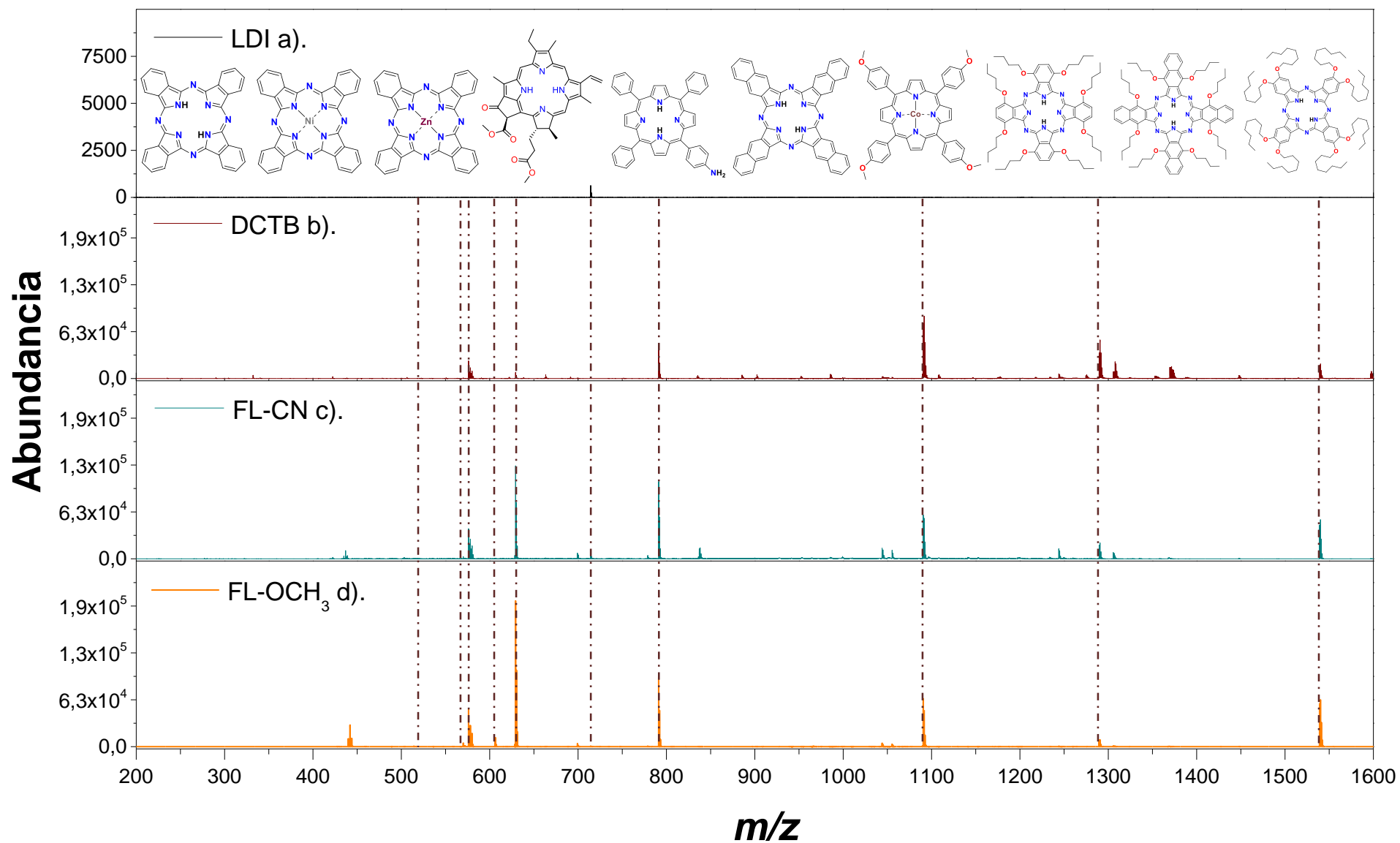


$C_{80}H_{90}N_8O_8$   
Exact Mass: 1290,69



$C_{96}H_{146}N_8O_8$   
Exact Mass: 1539,13

Figura 27. Espectros de la mezcla de porfirinas y ftalocianinas a) LDI y utilizando como matriz b) DCTB, c) FL-CN, d) FL-OCH<sub>3</sub>.



**Tabla 6.** Valores de mass accuracy para porfirinas y ftalocinanas presentes en la muestra analizada por MALDI.

<b>Analito</b>	<b>Formula</b>	<b>Masa</b>	<b>Mass Accuracy (ppm)</b>		
			<b>Molecular</b>	<b>monoisotópica</b>	<b>DCTB</b>
1	C <sub>32</sub> H <sub>18</sub> N <sub>8</sub>	514.165	*	9.7	3.8
2	C <sub>32</sub> H <sub>16</sub> N <sub>8</sub> Ni	570.085	71.9	17.5	3.5
3	C <sub>32</sub> H <sub>16</sub> N <sub>8</sub> Zn	576.078	88.5	17.5	5.2
4	C <sub>35</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	606.247	*	97	82
5	C <sub>44</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub>	629.257	79.4	7.9	6.35
6	C <sub>48</sub> H <sub>26</sub> N <sub>8</sub>	714.228	*	11.4	2.8
7	C <sub>48</sub> H <sub>36</sub> CoN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	791.206	94.7	6.3	2.52
8	C <sub>64</sub> H <sub>82</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	1090.625	22.9	11	9.16
9	C <sub>80</sub> H <sub>90</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	1290.688	5.4	3.0	7.7
10	C <sub>96</sub> H <sub>146</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	1539.126	11.6	40	16.8
<b>Cobertura de analitos</b>			<b>70%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

#### 6.4.4 Experimentos MALDI-MS con muestra real

Los experimentos realizados con una mezcla de porfirinas, evidenciaron que las matrices de fluoreno pueden ser utilizadas para la ionización de muestras complejas. Partiendo de estos resultados y del constante desarrollo de la industria petrolera que requiere de enfoques analíticos para el estudio y caracterización de mezclas complejas, provenientes de la extracción de aceites pesados de crudo, betunes y arenas bituminosas, se busca el uso de técnicas de fácil manejo, rapidez y menores costos operativos, propiedades que identifican a la técnica MALDI, para el análisis de fracciones del petróleo como las petroporfirinas. Debido a su complejidad molecular, en la actualidad su análisis se realiza mediante técnicas de ionización como la fotoionización a presión atmosférica (APPI) e ionización por electrospray (ESI).<sup>52</sup>

Se realizó el análisis de una fracción de petroporfirinas extraídas de un crudo pesado colombiano, la extracción se llevó a cabo en el grupo de investigación GIFTEX utilizando la metodología reportada por Combariza et al.<sup>52</sup>

En la figura 28 se muestran los espectros de abundancia relativa (%) vs relación  $m/z$  correspondientes al análisis por APPI, LDI y MALDI utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>, en cada espectro se resalta el perfil isotópico experimental (línea negra) junto con el teórico (línea roja) de la porfirina con mayor abundancia C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>OV, masa monoisotópica: 501.185; las matrices FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub> presentan una alta relación demostrando que coincide con la fórmula molecular propuesta para los analitos.

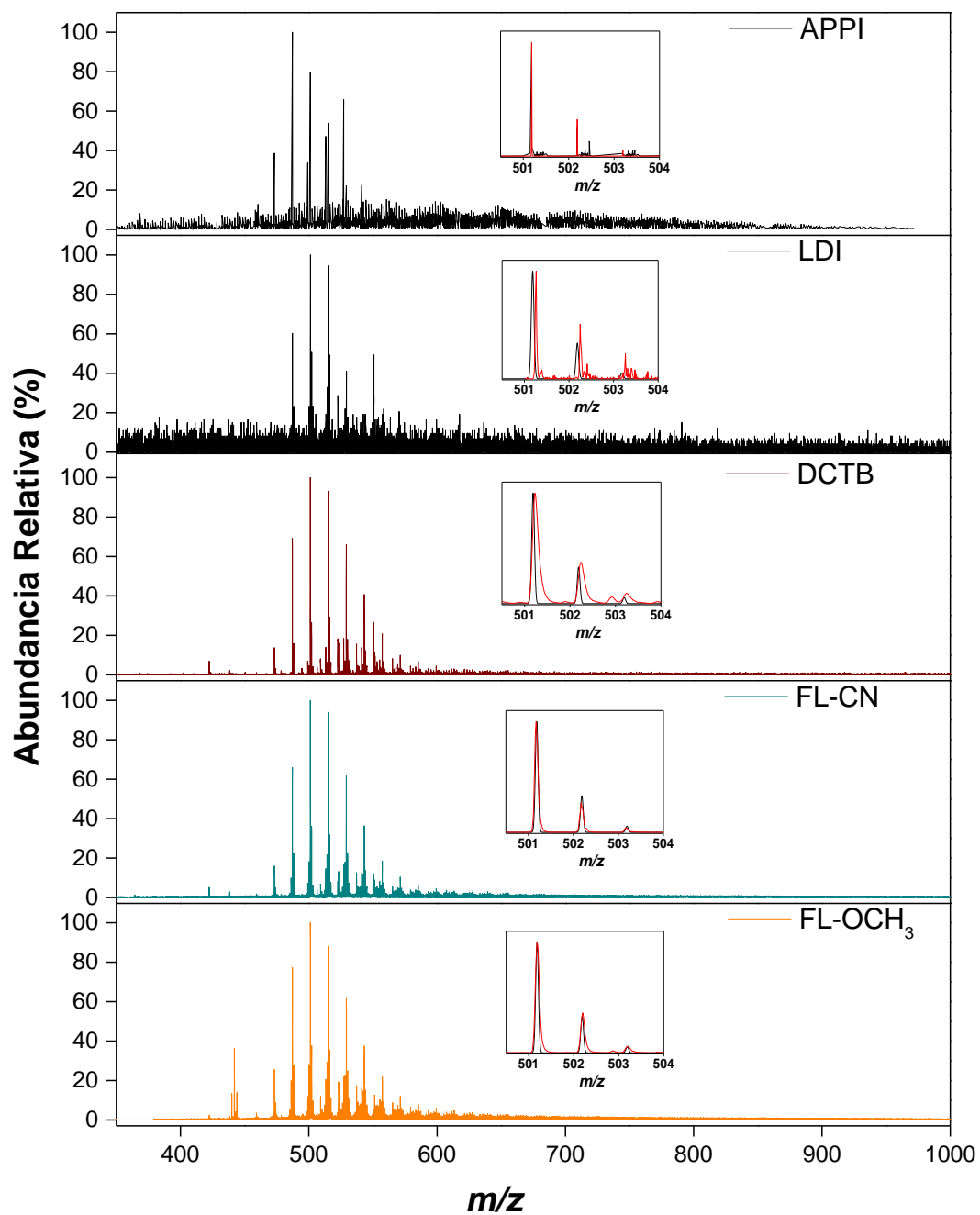
Se compararon las señales observadas por APPI y MALDI indicando con un (+) las señales presentes en el espectro y con un (-) las señales no registradas para las 50 petroporfirinas caracterizadas por APPI-FT-ICR-MS (anexo U) y se calculó el porcentaje de cobertura para cada una de las matrices presentando un mejor comportamiento el FL-OCH<sub>3</sub> por encima de las otras matrices estudiadas (tabla 7).

Cabe resaltar que la cobertura de las matrices se debe a que el software del equipo no detecta los iones debido a que la complejidad de la muestra, genera un espectro con demasiado ruido, lo que conlleva a que la relación S/N sea baja a pesar de la abundancia de iones. Para muchas señales no se obtuvo una relación S/N >3, necesaria para proporcionar una asignación. Lo anteriormente expuesto, evidencia que MALDI puede llegar a ser una técnica de ionización alterativa para el análisis de mezclas complejas de tipo porfirínico.

**Tabla 7.** Cobertura de las matrices MALDI para el análisis de petroporfirinas de un crudo colombiano.

<b>MATRIZ</b>	<b>DCTB</b>	<b>FL-CN</b>	<b>FL-OCH<sub>3</sub></b>
<b>COBERTURA</b>	48%	58%	82%

**Figura 28.** Espectros APPI, LDI y MALDI de petroporfirinas de crudo colombiano utilizando como matrices DCTB, FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub>.



## 7. CONCLUSIONES

- Las moléculas derivadas del 2,7- dibromofluoreno presentan excelentes propiedades fisicoquímicas; absorción UV, Potencial de Ionización y estabilidad química y al vacío, que las establecen como potenciales matrices MALDI de transferencia electrónica.
- Las matrices sintetizadas mostraron un buen comportamiento en términos analíticos; abundancia, relación señal/ruido y resolución, espectros sin interferencias debido a fragmentaciones, formación de aductos o iones producto de la reacción matriz-analito.
- Las matrices de fluoreno ionizaron eficientemente analitos modelo, mezcla de porfirinas y ftalocianinas, y petroporfirinas, conduciendo a resultados que no han sido reportados previamente en la literatura.
- Los compuestos FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub> presentaron el mejor desempeño como matrices MALDI de transferencia electrónica, superando en términos analíticos, fisicoquímicos y de estabilidad a la matriz convencional DCTB.

## 8. RECOMENDACIONES

- Calcular los potenciales de ionización experimentales de las matrices sintetizadas para corroborar los valores teóricos obtenidos.
- Abarcar experimentos que permitan obtener información más detallada de la relación estructura-ionización.
- Realizar estudios de ionización con una variedad de analitos para observar su respuesta frente a estos.
- Realizar modificaciones en el núcleo de fluoreno para mejorar sus propiedades espectroscópicas y de esta forma mejorar la calidad de los espectros.

## REFERENCIAS

- (1) Hillenkamp, F.; Katalinic, J. P. *MALDI MS A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*; John Wiley & Sons, 2007.
- (2) Okamoto, K. MALDI Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. *R&D Rev. Toyota CRDL* **2006**, *41* (3), 29–34.
- (3) Rathnayake, H. P.; Cirpan, A.; Lahti, P. M.; Karasz, F. E. Optimizing LED Properties of 2,7-Bis(phenylethenyl)fluorenes. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 560–566.
- (4) Gross, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2011. pp. 507-548.
- (5) Ulmer, L.; Mattay, J.; Torres-Garcia, H.; Luftmann, H. The Use of 2-[(2E)-3-(4-Tert-Butylphenyl)-2-Methylprop-2-Enylidene]malononitrile as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, *6* (1), 49.
- (6) Chen, S.; Chen, L.; Wang, J.; Hou, J.; He, Q.; Liu, J.; Wang, J.; Xiong, S.; Yang, G.; Nie, Z. 2,3,4,5-Tetrakis(3',4'-Dihydroxyphenyl)thiophene: A New Matrix for the Selective Analysis of Low Molecular Weight Amines and Direct Determination of Creatinine in Urine by MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10291–10297.
- (7) Porta, T.; Grivet, C.; Knochenmuss, R.; Varesio, E.; Hopfgartner, G. Alternative CHCA-Based Matrices for the Analysis of Low Molecular Weight Compounds by UV-MALDI-Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46* (2), 144–152.
- (8) McCombie, G.; Knochenmuss, R. Small-Molecule MALDI Using the Matrix Suppression Effect to Reduce or Eliminate Matrix Background Interferences. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (17), 4990–4997.
- (9) Piñeiro Pauwels, M. B. (2010). *Estudios Bioquímicos Y Genéticos En Pacientes Diagnosticados Con Porfiria Congénita Eritropoyética*. Universidad de Belgrano, Buenos Aires, Argentina.

- (10) Ortiz, J. E.; García, M. J.; Rodríguez Gallego, J. L. Biomarcadores Y Su Utilidad En La Evaluación de La Biodegradación Del Petróleo. *Ind. y Minería* **2003**, *351*, 41–45.
- (11) Cid Martín, J. J. (2008). Materiales Moleculares Y Polímeros Basados En Ftalocianinas Para Aplicaciones En Células Solares Orgánicas. (Tesis Doctoral). Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, España.
- (12) Carmen, M.; Gómez, M.; González, M. B. *Espectrometría de Masas Y Análisis de Biomarcadores*. Universidad de Alcalá, Madrid, España.
- (13) Mccarley, T. D.; Mccarley, R. L.; Limbach, P. A. Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (20), 4376–4379.
- (14) Li, L. *Maldi Mass for Synthetic Chemical Analysis*; 2010.
- (15) Zenobi, R.; Knochenmuss, R. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. **1999**, 337–366.
- (16) Spencer, M. T.; Furutani, H.; Oldenburg, S. J.; Darlington, T. K.; Prather, K. A. Gold Nanoparticles as a Matrix for Visible-Wavelength Single-Particle Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Small Biomolecules. *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 4083–4090.
- (17) Berger-Nicoletti, E.; Wurm, F.; Kilbinger, A. F. M.; Frey, H. Pencil Lead as a Matrix for MALDI-ToF Mass Spectrometry of Sensitive Functional Polymers. *Macromolecules* **2007**, *40*, 746–751.
- (18) Laremore, T. N.; Zhang, F.; Linhardt, R. J. Ionic Liquid Matrix for Direct UV-MALDI-TOF-MS Analysis of Dermatan Sulfate and Chondroitin Sulfate Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (4), 1604–1610.
- (19) Knochenmuss, R. Ion Formation Mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, *131* (9), 966–986.
- (20) Molin, L.; Seraglia, R.; Czarnocki, Z.; Maurin, J. K.; Pluciński, F. A.; Traldi, P. On the Primary Ionization Mechanism(s) in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *J. Anal. Methods Chem.* **2012**, 161865.
- (21) Fuchs, B.; Süß, R.; Schiller, J. An Update of MALDI-TOF Mass Spectrometry

- in Lipid Research. *Prog. Lipid Res.* **2010**, *49* (4), 450–475.
- (22) Fuchs, B.; Schiller, J. Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Apolar Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13* (16), 1664–1681.
- (23) Srinivasan, N.; Haney, C. A.; Lindsey, J. S.; Zhang, W.; Chait, B. T. Investigation of MALDI-TOF Mass Spectrometry of Diverse Synthetic Metalloporphyrins, Phthalocyanines and Multiporphyrin Arrays. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **1999**, *32* (10), 283–291.
- (24) Lapkina, L. a.; Niskanen, E.; Rönkkömäki, H.; Larchenko, V. E.; Popov, K. I.; Tsivadze, A. Y. Synthesis and Characterization of Sandwich-Type Gadolinium and Ytterbium Crown Ether-Substituted Phthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2000**, *4* (6), 588–590.
- (25) Wyatt, M. F.; Stein, B. K.; Brenton, A. G. Characterization of Various Analytes Using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry and 2-[(2E)-3-(4-Tert-Butylphenyl)-2-Methylprop-2-Enylidene]malononitrile Matrix. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (1), 199–206.
- (26) García, H. O. (2003). Porfirinas Solubles En Agua : Síntesis , Homoasociación Y Propiedades Fotofísicas de Porfirinas Sulfonadas 5,15-Difenilsustituidas. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- (27) Ferrero Martín, S. (2014). Preparación de Compuestos Poliaromáticos Con Capacidad Para Establecer Interacciones Supramoleculares Con Fullerenos. (Tesis de Maestría). Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- (28) Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. Introducción a La Espectrometría de Masas Para La Caracterización de Péptidos Y Proteínas En Proteómica. *Proteómica* **2008**, 16–35.
- (29) Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, 4th ed.; John Wiley & Sons, 2007.
- (30) Douglas A. Skoog & F. James Holler & Timothy A. Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*, 5 Edición.; Mc Graw Hill, 2001.

- (31) Campins Falcó, P.; Querol Piñón, F. Aplicaciones Del Uso de La Técnica de Espectroscopía de Reflectancia Difusa En Química Forense Para La Caracterización de Autenticidad de Sellos de Correos de España. *Gac. int. cienc. forense* **2012**, 5.
- (32) Juhasz, P.; Costello, C. E. Generation of Large Radical Ions from Oligometallocenes by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7 (5), 343–351.
- (33) Michalak, L.; Fisher, K. J.; Alderdice, D. S.; Jardine, D. R.; Willett, G. D. C60-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1994**, 29 (January), 512–515.
- (34) Vasil, Y. V.; Khvostenko, O. G.; Streletskii, A. V.; Boltalina, O. V.; Kotsiris, S. G.; Drewello, T. Electron Transfer Reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization ( MALDI ): Ionization Energy , Electron Affinity and Performance of the DCTB Matrix within the Thermochemical Framework. **2006**, No. reaction 2, 5967–5972.
- (35) Meier, M. A. R.; Adams, N.; Schubert, U. S. Statistical Approach to Understand MALDI-TOFMS Matrices: Discovery and Evaluation of New MALDI Matrices. *Anal. Chem.* **2007**, 79 (3), 863–869.
- (36) Links, D. A. A New Matrix of MALDI-TOF MS for the Analysis of Thiolate-Protected Gold. *Anal. Methods* **2012**, 4, 3600–3603.
- (37) Boutaghou, N. M.; Cole, R. B. 9,10-Diphenylanthracene as a Matrix for MALDI-MS Electron Transfer Secondary Reactions. *J. Mass Spectrom.* **2012**, 47 (8), 995–1003.
- (38) Calvano, C. D.; Ventura, G.; Cataldi, T. R. I.; Palmisano, F. Improvement of Chlorophyll Identification in Foodstuffs by MALDI ToF / ToF Mass Spectrometry Using 1 , 5-Diaminonaphthalene Electron Transfer Secondary Reaction Matrix. **2015**.
- (39) Cely Pinto, M. J. (2015). Síntesis de Compuestos Fenilenvinilenos Como Posibles Matrices de Transferencia Electrónica MALDI. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

- (40) Plater, M. J.; Kemp, S.; Lattmann, E. Heterocyclic Free Radicals. Part 1. 4,5-Diaza Fluorene Derivatives of Koelsch's Free Radical: An EPR and Metal-Ion Complexation Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *1*, 971–979.
- (41) Goel, A.; Chaurasia, S.; Dixit, M.; Kumar, V.; Prakash, S.; Jena, B.; Verma, J. K.; Jain, M.; Anand, R. S.; Manoharan, S. S. Donor - Acceptor 9-Uncapped Fluorenes and Fluorenones as Stable Blue Light. *Org. Lett.* **2009**, *11* (9), 1289–1292.
- (42) Li, W.; Wu, Y.; Li, X.; Xie, Y.; Zhu, W. Absorption and Photovoltaic Properties of Organic Solar Cell Sensitizers Containing Fluorene Unit as Conjunction Bridge. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4* (5), 1830–1837.
- (43) Adachi, N.; Sugiyama, H.; Arai, M.; Ogawa, H. Turn-on Type Chemical Sensing of Vitamin K4 by Fluorene Dendrimers with Naphthalene Segments. *Molecules* **2014**, *19* (4), 4135–4144.
- (44) Hosseinzadeh, R.; Mohadjerani, M.; Pooryousef, M.; Eslami, A.; Emami, S. A New Boronic Acid Fluorescent Sensor Based on Fluorene for Monosaccharides at Physiological pH. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *144*, 53–60.
- (45) Cioslowski, J.; Piskorz, P.; Liu, G. Ionization Potentials and Electron Affinities from the Extended Koopmans' Theorem Applied to Energy-Derivative Density Matrices: The EKTMPn and EKTQCISD Methods. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107* (17), 6804–6811.
- (46) Hosseinzadeh, R.; Mohadjerani, M.; Pooryousef, M. A New Selective Fluorene-Based Fluorescent Internal Charge Transfer (ICT) Sensor for Sugar Alcohols in Aqueous Solution. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 1–8.
- (47) Yella, A.; Humphry-Baker, R.; Curchod, B. F. E.; Ashari Astani, N.; Teuscher, J.; Polander, L. E.; Mathew, S.; Moser, J. E.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U.; et al. Molecular Engineering of a Fluorene Donor for Dye-Sensitized Solar Cells. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (13), 2733–2739.
- (48) Ulmer, L.; Mattay, J.; Torres-garcia, H. G.; Luftmann, H. The Use of 2- [(2E) - 3- (4-Tert-Butylphenyl) -2- Methylprop-2-Enylidene] Malononitrile as a Matrix

- for Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, 52 (European Journal of Mass Spectrometry), 49–52.
- (49) Knochenmuss, R.; Zenobi, R. MALDI Ionization: The Role of in-Plume Processes. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (2), 441–452.
- (50) Piet, D. P.; Danovich, D.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. Ionization Potentials of Porphyrins and Phthalocyanines. A Comparative Benchmark Study of Fast Improvements of Koopman's Theorem. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, No. 8, 1653–1662.
- (51) Rodriguez, M. S.; de la Torre, G.; Torres, T. Las Ftalocianinas Y Sus Singulares Propiedades Electrónicas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. Madrid 2003, pp 84–98.
- (52) Giraldo-Dávila, D.; Chacón-Patiño, M. L.; Orrego-Ruiz, J. A.; Blanco-Tirado, C.; Combariza, M. Y. Improving Compositional Space Accessibility in (+) APPI FT-ICR Mass Spectrometric Analysis of Crude Oils by Extrography and Column Chromatography Fractionation. *Fuel* **2016**, 185, 45–58.

## BIBLIOGRAFÍA

Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. Introducción a La Espectrometría de Masas Para La Caracterización de Péptidos Y Proteínas En Proteómica. *Proteómica* **2008**, 16–35.

Adachi, N.; Sugiyama, H.; Arai, M.; Ogawa, H. Turn-on Type Chemical Sensing of Vitamin K4 by Fluorene Dendrimers with Naphthalene Segments. *Molecules* **2014**, 19 (4), 4135–4144.

Berger-Nicoletti, E.; Wurm, F.; Kilbinger, A. F. M.; Frey, H. Pencil Lead as a Matrix for MALDI-ToF Mass Spectrometry of Sensitive Functional Polymers. *Macromolecules* **2007**, 40, 746–751.

Boutaghou, N. M.; Cole, R. B. 9,10-Diphenylanthracene as a Matrix for MALDI-MS Electron Transfer Secondary Reactions. *J. Mass Spectrom.* **2012**, 47 (8), 995–1003.

Calvano, C. D.; Ventura, G.; Cataldi, T. R. I.; Palmisano, F. Improvement of Chlorophyll Identification in Foodstuffs by MALDI ToF / ToF Mass Spectrometry Using 1,5-Diaminonaphthalene Electron Transfer Secondary Reaction Matrix. **2015**.

Campins Falcó, P.; Querol Piñón, F. Aplicaciones Del Uso de La Técnica de Espectroscopía de Reflectancia Difusa En Química Forense Para La Caracterización de Autenticidad de Sellos de Correos de España. *Gac. int. cienc. forense* **2012**, 5.

Carmen, M.; Gómez, M.; González, M. B. *Espectrometría de Masas Y Análisis de Biomarcadores*. Universidad de Alcalá, Madrid, España.

Cely Pinto, M. J. (2015). Síntesis de Compuestos Fenilenvinilenos Como Posibles Matrices de Transferencia Electrónica MALDI. (Tesis de Maestria). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

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

Cid Martín, J. J. (2008). Materiales Moleculares Y Polímeros Basados En Ftalocianinas Para Aplicaciones En Células Solares Orgánicas. (Tesis Doctoral). Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, España.

Cioslowski, J.; Piskorz, P.; Liu, G. Ionization Potentials and Electron Affinities from the Extended Koopmans' Theorem Applied to Energy-Derivative Density Matrices: The EKTMPn and EKTQCISD Methods. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*(17), 6804–6811.

Douglas A. Skoog & F. James Holler & Timothy A. Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*, 5 Edición.; Mc Graw Hill, 2001.

Ferrero Martín, S. (2014). Preparación de Compuestos Poliaromáticos Con Capacidad Para Establecer Interacciones Supramoleculares Con Fullerenos. (Tesis de Maestria). Universidad de Valladolid, Valladolid, España.

Fuchs, B.; Schiller, J. Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Apolar Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*(16), 1664–1681.

Fuchs, B.; Süß, R.; Schiller, J. An Update of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Lipid Research. *Prog. Lipid Res.* **2010**, *49*(4), 450–475.

García, H. O. (2003). Porfirinas Solubles En Agua : Síntesis, Homoasociación Y Propiedades Fotofísicas de Porfirinas Sulfonadas 5,15-Difenilsustituidas. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

Giraldo-Dávila, D.; Chacón-Patiño, M. L.; Orrego-Ruiz, J. A.; Blanco-Tirado, C.; Combariza, M. Y. Improving Compositional Space Accessibility in (+) APPI FT-ICR Mass Spectrometric Analysis of Crude Oils by Extrography and Column Chromatography Fractionation. *Fuel* **2016**, *185*, 45–58.

Goel, A.; Chaurasia, S.; Dixit, M.; Kumar, V.; Prakash, S.; Jena, B.; Verma, J. K.; Jain, M.; Anand, R. S.; Manoharan, S. S. Donor - Acceptor 9-Uncapped Fluorenes and Fluorenones as Stable Blue Light. *Org. Lett.* **2009**, *11* (9), 1289–1292.

Gross, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2011. pp. 507-548.

Hillenkamp, F.; Katalinic, J. P. *MALDI MS A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*; John Wiley & Sons, 2007.

Hosseinzadeh, R.; Mohadjerani, M.; Pooryousef, M. A New Selective Fluorene-Based Fluorescent Internal Charge Transfer (ICT) Sensor for Sugar Alcohols in Aqueous Solution. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 1–8.

Hosseinzadeh, R.; Mohadjerani, M.; Pooryousef, M.; Eslami, A.; Emami, S. A New Boronic Acid Fluorescent Sensor Based on Fluorene for Monosaccharides at Physiological pH. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *144*, 53–60.

Juhasz, P.; Costello, C. E. Generation of Large Radical Ions from Oligometallocenes by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7* (5), 343–351.

Knochenmuss, R. Ion Formation Mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, *131* (9), 966–986.

Knochenmuss, R.; Zenobi, R. MALDI Ionization: The Role of in-Plume Processes. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 441–452.

Lapkina, L. a.; Niskanen, E.; Rönkkömäki, H.; Larchenko, V. E.; Popov, K. I.; Tsivadze, A. Y. Synthesis and Characterization of Sandwich-Type Gadolinium and Ytterbium Crown Ether-Substituted Phthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2000**, *4* (6), 588–590.

Laremore, T. N.; Zhang, F.; Linhardt, R. J. Ionic Liquid Matrix for Direct UV-MALDI-TOF-MS Analysis of Dermatan Sulfate and Chondroitin Sulfate Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (4), 1604–1610.

Li, L. *Maldi Mass for Synthetic Chemical Analysis*; 2010.

Li, W.; Wu, Y.; Li, X.; Xie, Y.; Zhu, W. Absorption and Photovoltaic Properties of Organic Solar Cell Sensitizers Containing Fluorene Unit as Conjunction Bridge. *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4* (5), 1830–1837.

Links, D. A. A New Matrix of MALDI-TOF MS for the Analysis of Thiolate-Protected Gold. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 3600–3603.

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

McCombie, G.; Knochenmuss, R. Small-Molecule MALDI Using the Matrix Suppression Effect to Reduce or Eliminate Matrix Background Interferences. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (17), 4990–4997.

Meier, M. A. R.; Adams, N.; Schubert, U. S. Statistical Approach to Understand MALDI-TOFMS Matrices: Discovery and Evaluation of New MALDI Matrices. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (3), 863–869.

Michalak, L.; Fisher, K. J.; Alderdice, D. S.; Jardine, D. R.; Willett, G. D. C60-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1994**, *29* (January), 512–515.

Molin, L.; Seraglia, R.; Czarnocki, Z.; Maurin, J. K.; Pluciński, F. A.; Traldi, P. On the Primary Ionization Mechanism(s) in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *J. Anal. Methods Chem.* **2012**, 161865.

Okamoto, K. MALDI Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. *R&D Rev. Toyota CRDL* **2006**, *41* (3), 29–34.

Ortiz, J. E.; García, M. J.; Rodríguez Gallego, J. L. Biomarcadores Y Su Utilidad En La Evaluación de La Biodegradación Del Petróleo. *Ind. y Minería* **2003**, *351*, 41–45.

Piet, D. P.; Danovich, D.; Zuilhof, H.; Sudhölter, E. J. R. Ionization Potentials of Porphyrins and Phthalocyanines. A Comparative Benchmark Study of Fast Improvements of Koopman's Theorem. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, No. 8, 1653–1662.

Piñeiro Pauwels, M. B. (2010). *Estudios Bioquímicos Y Genéticos En Pacientes Diagnosticados Con Porfiria Congénita Eritropoyética*. Universidad de Belgrano, Buenos Aires, Argentina.

Plater, M. J.; Kemp, S.; Lattmann, E. Heterocyclic Free Radicals. Part 1. 4,5-Diaza Fluorene Derivatives of Koelsch's Free Radical: An EPR and Metal-Ion Complexation Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *1*, 971–979.

Porta, T.; Grivet, C.; Knochenmuss, R.; Varesio, E.; Hopfgartner, G. Alternative CHCA-Based Matrices for the Analysis of Low Molecular Weight Compounds by UV-MALDI-Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2011**, *46* (2), 144–152.

Rathnayake, H. P.; Cirpan, A.; Lahti, P. M.; Karasz, F. E. Optimizing LED Properties of 2,7-Bis(phenylethenyl)fluorenes. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 560–566.

Rodríguez, M. S.; de la Torre, G.; Torres, T. Las Ftalocianinas Y Sus Singulares Propiedades Electrónicas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. Madrid 2003, pp 84–98.

Spencer, M. T.; Furutani, H.; Oldenburg, S. J.; Darlington, T. K.; Prather, K. A. Gold Nanoparticles as a Matrix for Visible-Wavelength Single-Particle Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Small Biomolecules. *J. Phys. Chem.* **2008**, *112*, 4083–4090.

Srinivasan, N. ; Haney, C. A. ; Lindsey, J. S. ; Zhang, W. ; Chait, B. T. Investigation of MALDI-TOF Mass Spectrometry of Diverse Synthetic Metalloporphyrins, Phthalocyanines and Multiporphyrin Arrays. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **1999**, *32* (10), 283–291.

Ulmer, L.; Mattay, J.; Torres-garcia, H. G.; Luftmann, H. The Use of 2- [(2E) -3- (4-Tert-Butylphenyl) -2- Methylprop-2-Enylidene] Malononitrile as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, 52 (European Journal of Mass Spectrometry), 49–52.

Ulmer, L.; Mattay, J.; Torres-Garcia, H.; Luftmann, H. The Use of 2-[(2E)-3-(4-Tert-Butylphenyl)-2- Methylprop-2-Enylidene]malononitrile as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, 6 (1), 49.

Vasil, Y. V.; Khvostenko, O. G.; Streletskii, A. V.; Boltalina, O. V.; Kotsiris, S. G.; Drewello, T. Electron Transfer Reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization ( MALDI ): Ionization Energy , Electron Affinity and Performance of the DCTB Matrix within the Thermochemical Framework. **2006**, No. reaction 2, 5967–5972.

Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, 4th ed.; John Wiley & Sons, 2007.

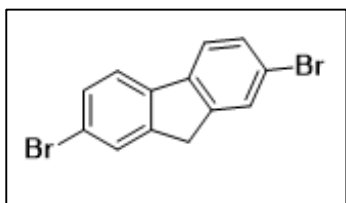
Wyatt, M. F.; Stein, B. K.; Brenton, A. G. Characterization of Various Analytes Using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry and 2-[(2E)-3-(4-Tert-Butylphenyl)-2-Methylprop-2-Enylidene]malononitrile Matrix. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (1), 199–206.

Yella, A.; Humphry-Baker, R.; Curchod, B. F. E.; Ashari Astani, N.; Teuscher, J.; Polander, L. E.; Mathew, S.; Moser, J. E.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U.; et al. Molecular Engineering of a Fluorene Donor for Dye-Sensitized Solar Cells. *Chem. Mater.* **2013**, 25 (13), 2733–2739.

Zenobi, R.; Knochenmuss, R. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. **1999**, 337–366.

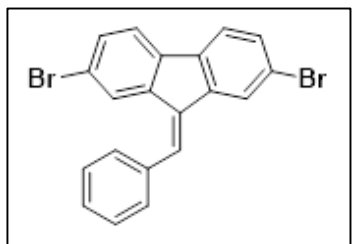
## ANEXOS

### **Anexo A.** Caracterización FT-IR y RMN de derivados del 2,7-dibromofluoreno.



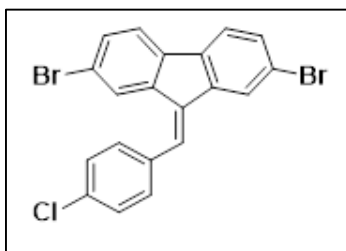
#### **2,7-dibromofluoreno**

FT-IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$ : 3050-2900 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$ ), 803 (C-H fuera del plano), 420 (C-Br) (anexo 2).



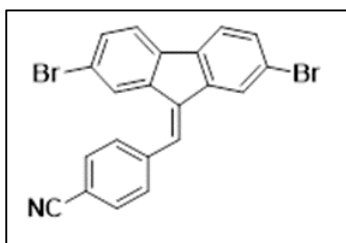
#### **9-bencilideno-2,7-dibromofluoreno (FL-H)**

FT-IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$ : 3100-3000 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$ ), 1593 (1,4-disustitucion aromática), 803 (C-H fuera del plano), 432 (C-Br) (anexo 3).



#### **9-(4-clorobencilideno)-2,7-dibromofluoreno (FL-Cl)**

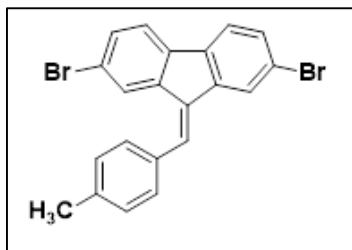
FT-IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$ : 3000-2900 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$ ), 1593 (1,4-disustitucion aromática), 803 (C-H fuera del plano), 430 (C-Br) (anexo 4).



#### **9-(4-cianobencilideno)-2,7-dibromofluoreno (FL-CN)**

FT-IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$ : 3100-3000 ( $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$ ), 1593 (1,4-disustitución aromática), 1504 (C=C), 803 (C-H fuera del plano), 445 (C-Br) (anexo 5). RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$  8.24 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.01 (d,  $J = 8.15$  Hz, 2H),

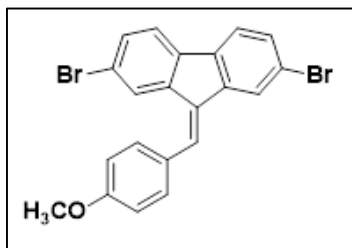
7.85 (m,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.79 (d,  $J = 8.15$  Hz, 2H), 7.61 (dd,  $J = 8.15, 1.5$  Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J = 8.15, 1.6$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H). RMN- $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO):  $\delta$  141.13, 140.96, 139.56, 137.50, 137.13, 135.40, 133.17, 132.47, 132.11, 130.47, 130.31, 126.77, 124.80, 123.01, 122.61, 121.53, 120.68, 119.12, 111.66 (anexo 8)



**9-(4-metilbencilideno)-2,7-dibromofluoreno (FL-CH<sub>3</sub>)**

FT-IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$ : 3000-2800 (C<sub>Ar</sub>-H), 1598 (1,4-disustitucion aromática), 1507 (C=C), 803 (C-H fuera del plano), 432 (C-Br) (anexo 6). RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$  8.23 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.86 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.69 (s, 1H),

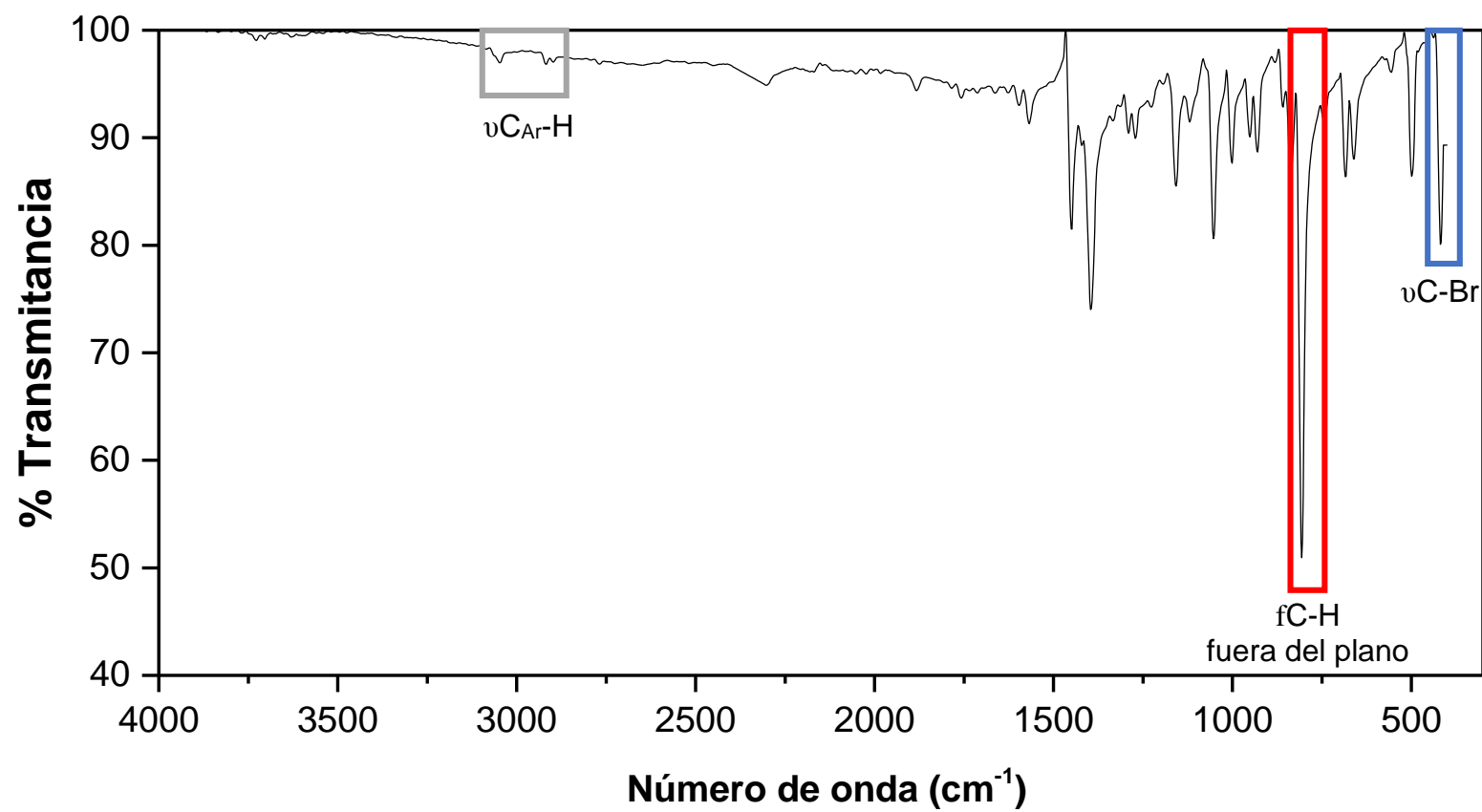
7.57 (t,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H) 2.41 (s, 3H). RMN- $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO):  $\delta$  141.47, 139.21, 138.00, 136.70, 133.26, 133.01, 132.77, 131.81, 131.41, 129.80, 129.64, 126.55, 124.38, 122.81, 122.46, 121.37, 120.52, 40.63, 40.42, 40.21, 40.00, 39.79, 39.59, 39.38, 21.52 (anexo 9).



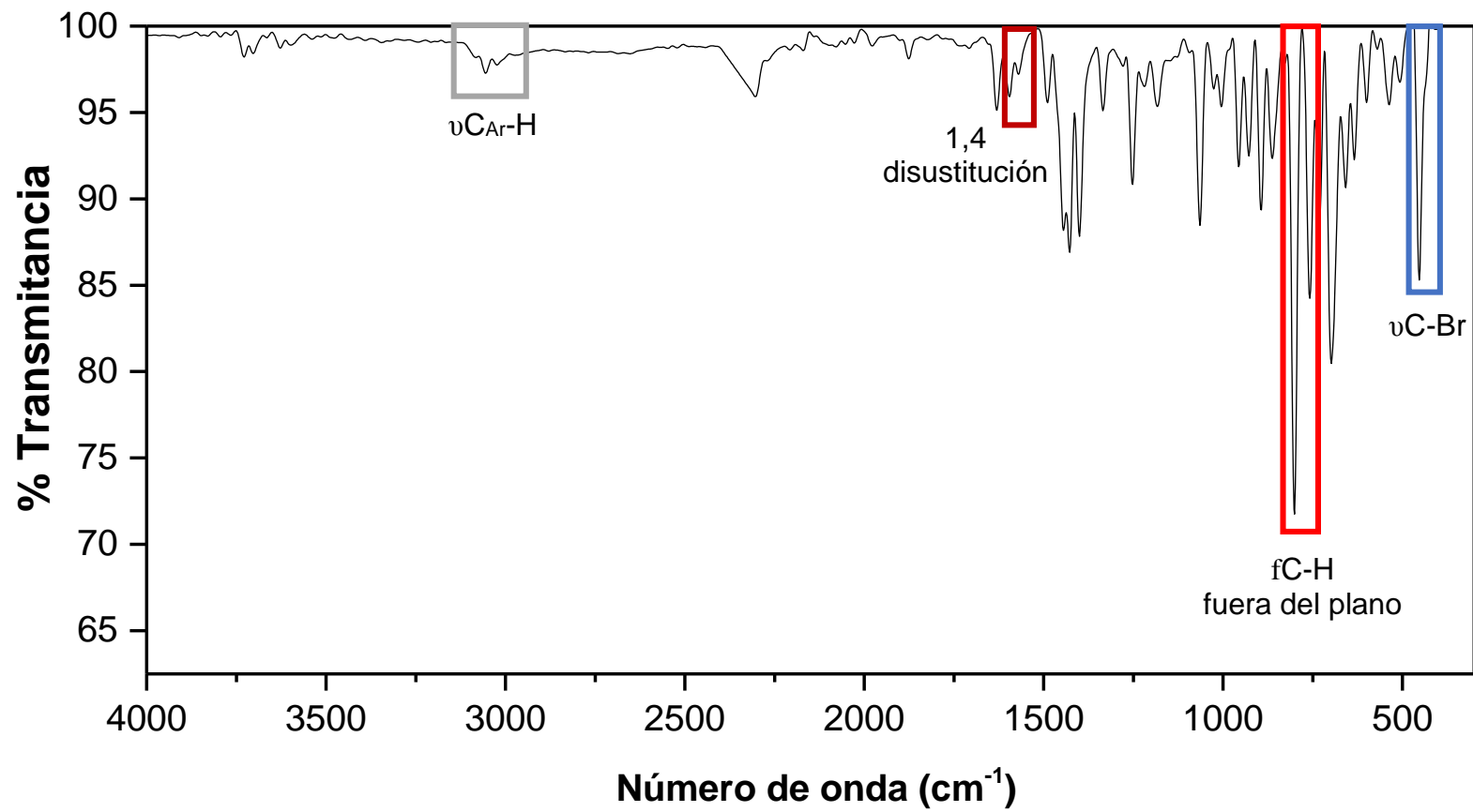
**9-(4-metoxibencilideno)-2,7-dibromofluoreno**

**(FL-OCH<sub>3</sub>)** FT-IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$ : 3100-3000 (C<sub>Ar</sub>-H), 1593 (1,4-disustitucion aromática), 803 (C-H fuera del plano), 432 (C-Br) (anexo 7). RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta$  8.18 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 7.89 – 7.78 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.54 (m, 4H), 7.09 (m, 2H), 3.86 (s, 3H). RMN- $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO):  $\delta$  160.40, 141.62, 138.99, 138.01, 136.51, 132.62, 132.40, 131.58, 131.52, 131.12, 127.98, 126.33, 124.16, 122.71, 122.36, 121.28, 120.49, 114.65, 55.82, 40.64, 40.43, 40.22, 40.01, 39.80, 39.59, 39.38 (anexo 10).

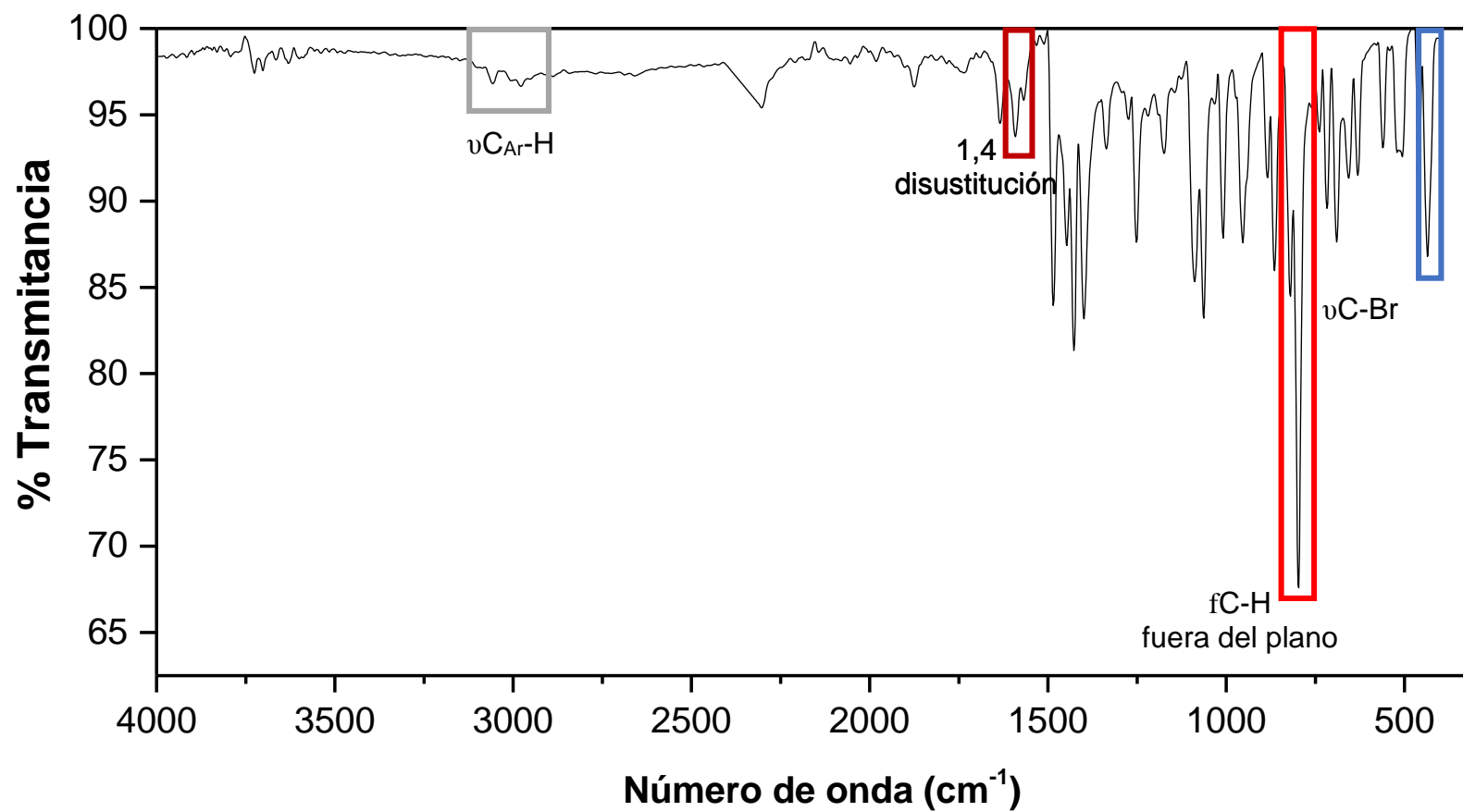
**Anexo B. Espectro infrarrojo del 2,7-dibromofluoreno.**



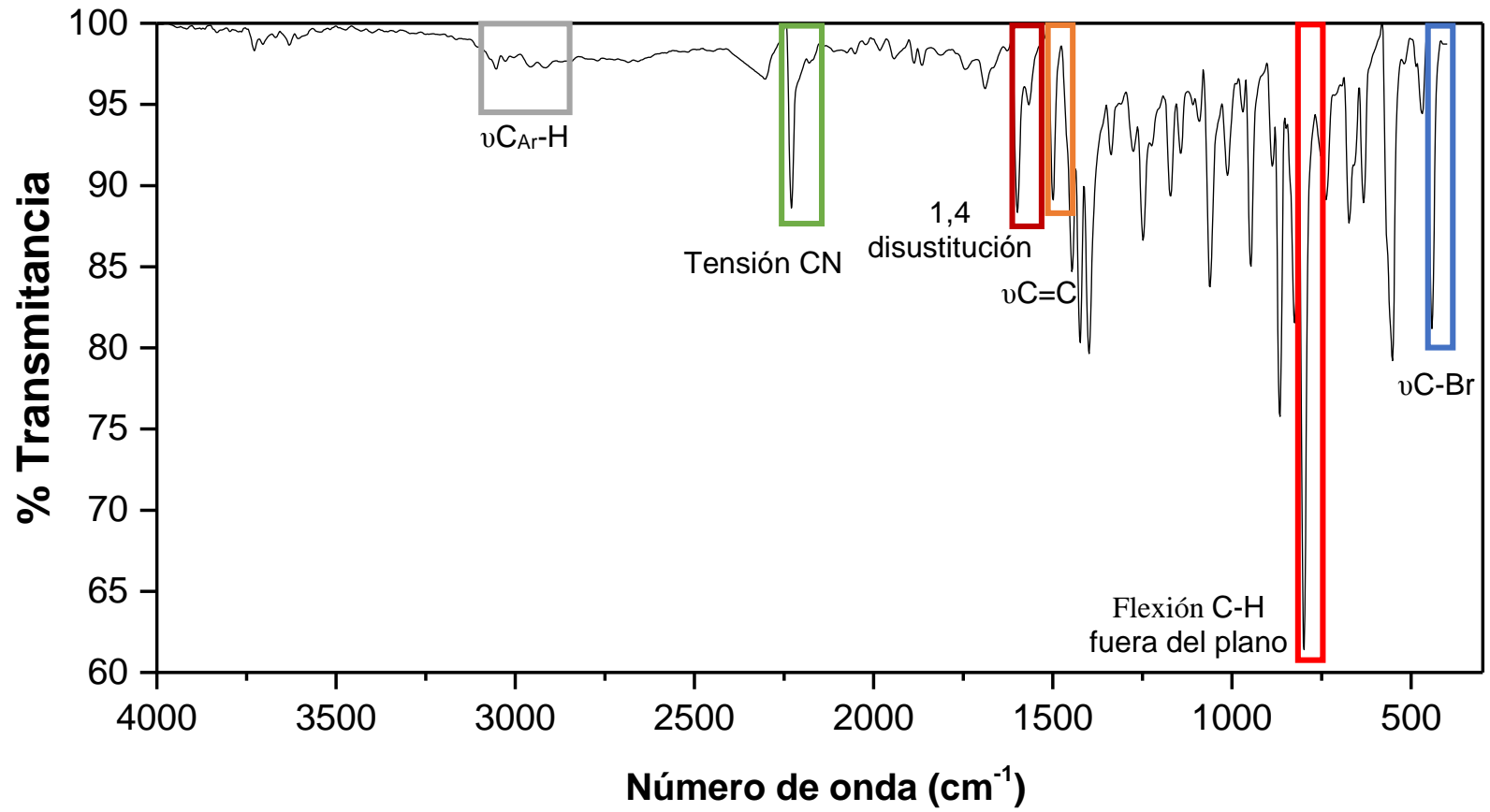
*Anexo C. Espectro infrarrojo del FL-H.*



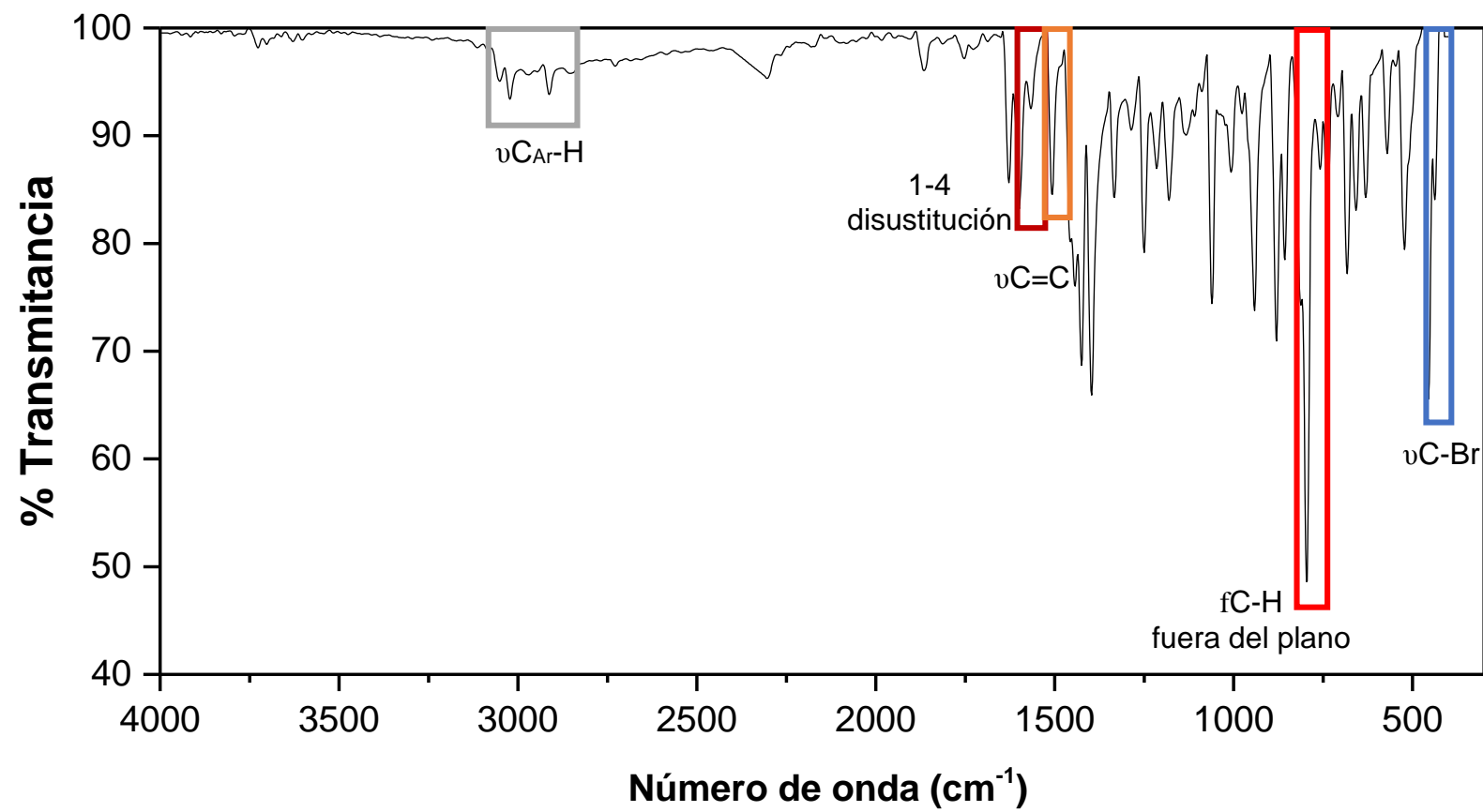
*Anexo D. Espectro infrarrojo del FL-Cl.*



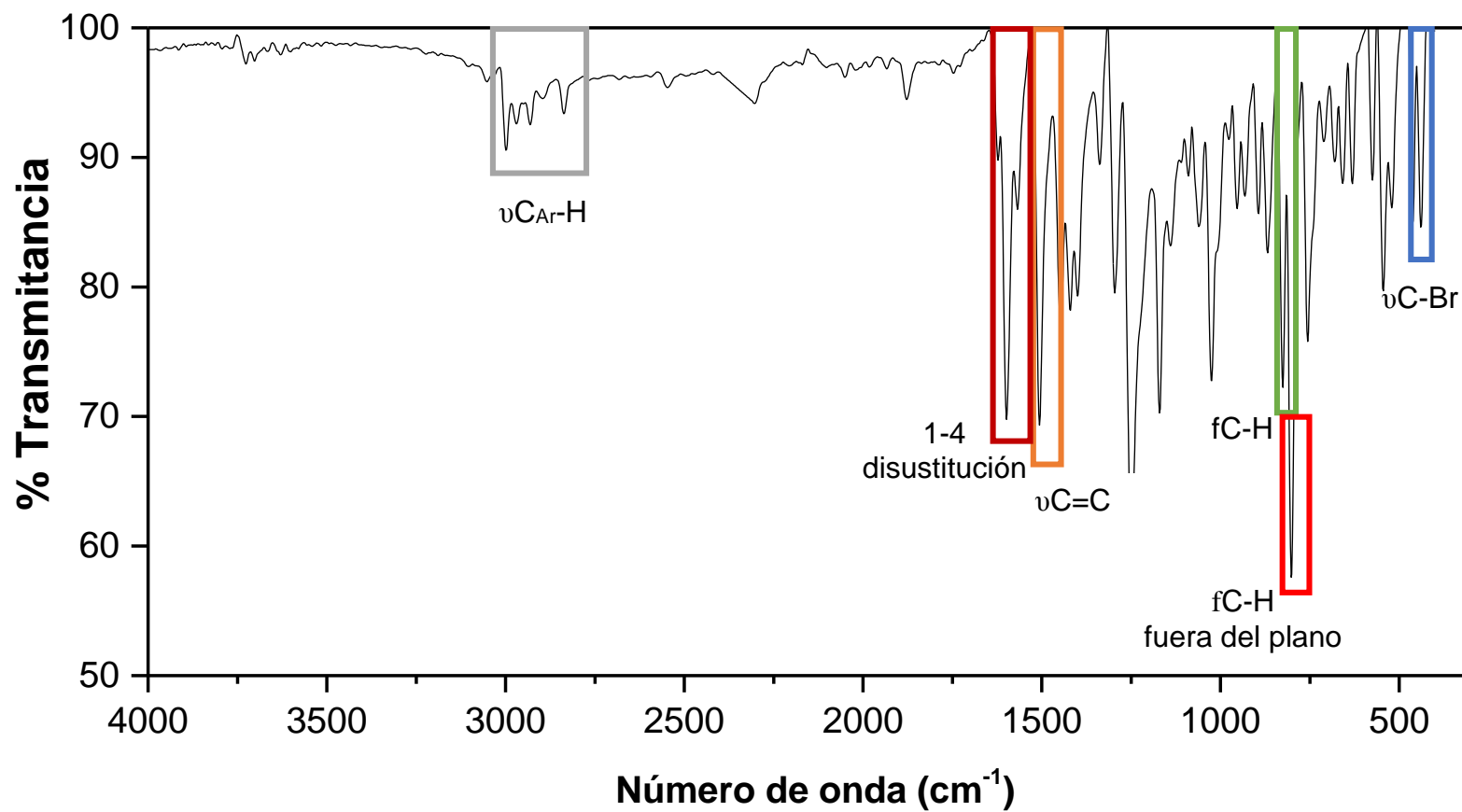
**Anexo E. Espectro IR del FL-CN.**



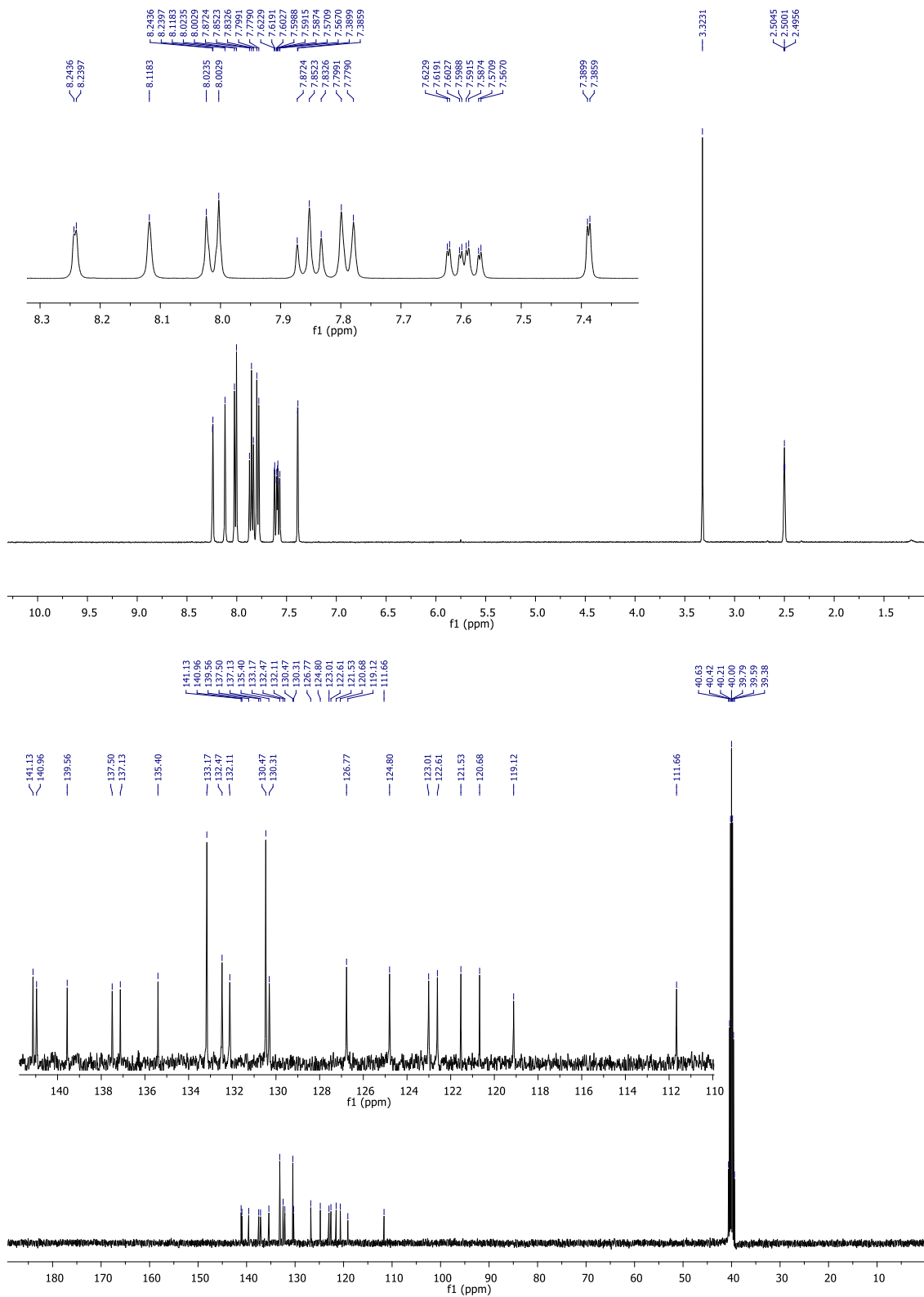
*Anexo F. Espectro infrarrojo del FL-CH<sub>3</sub>.*



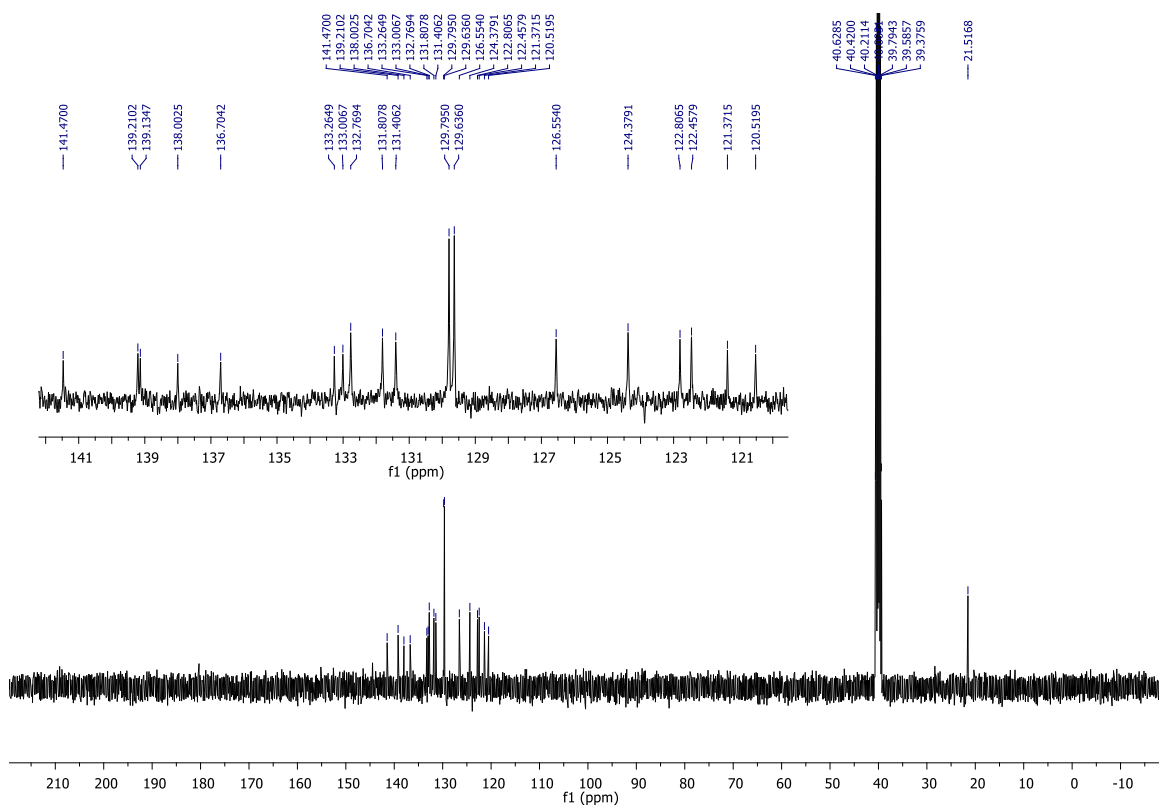
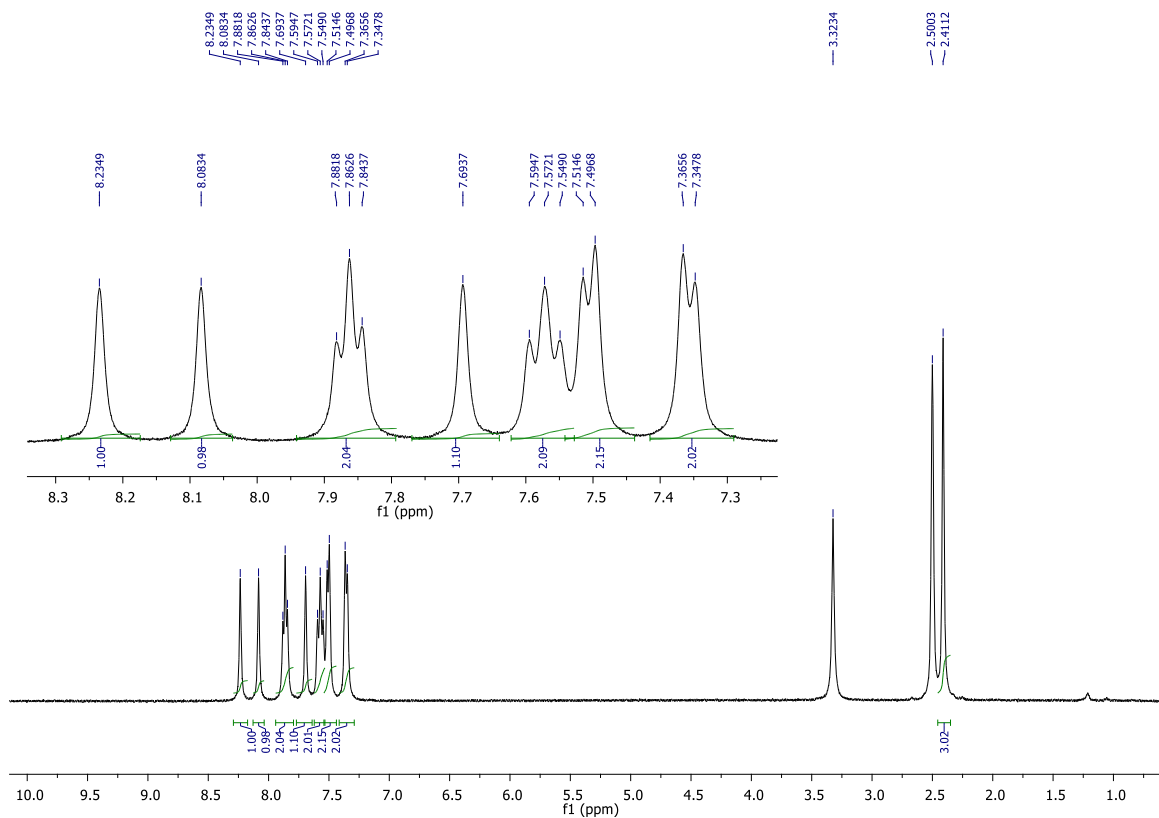
**Anexo G. Espectro infrarrojo del FL-OCH<sub>3</sub>.**



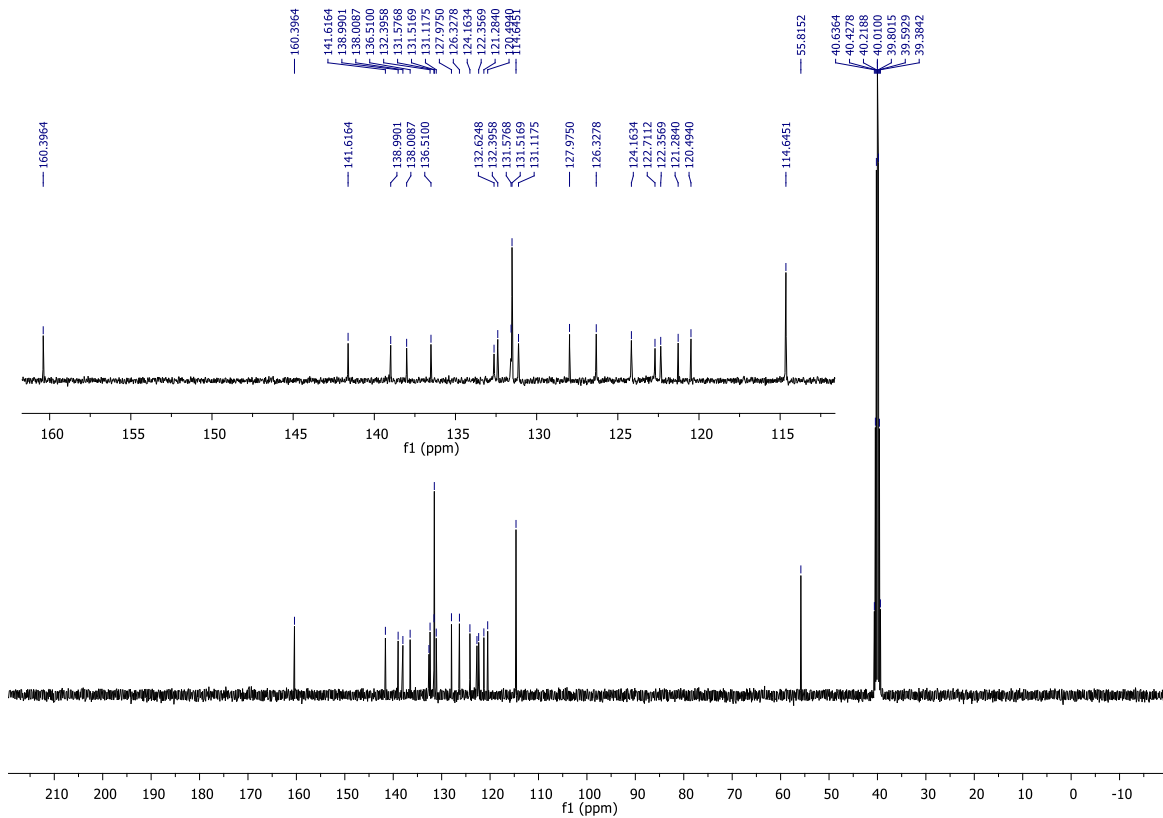
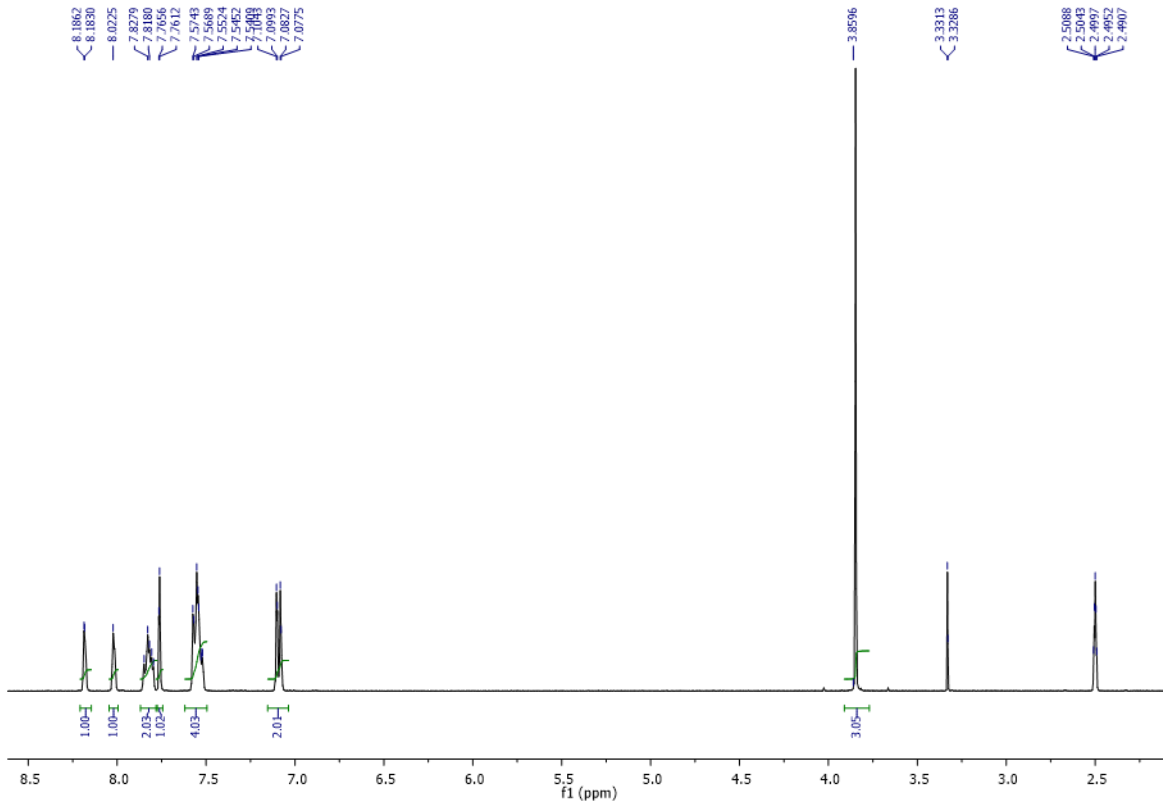
## Anexo H. Espectro RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del FL-CN.



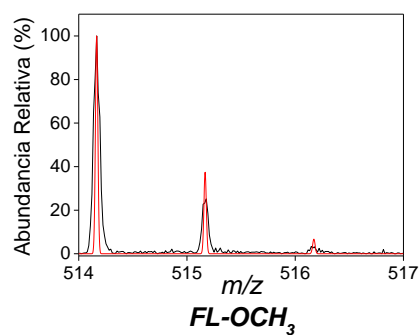
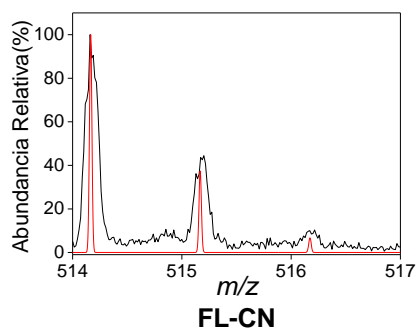
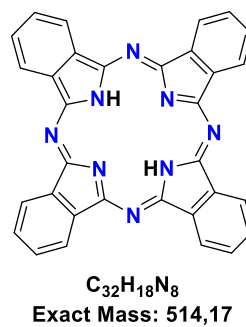
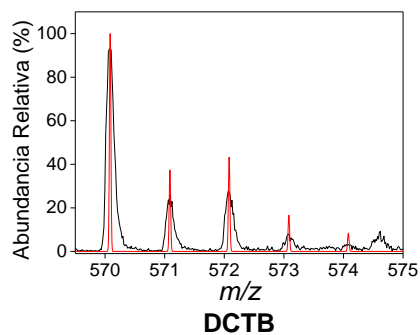
# Anexo I. Espectro RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del FL-CH<sub>3</sub>.



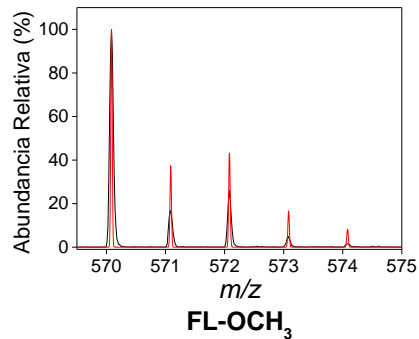
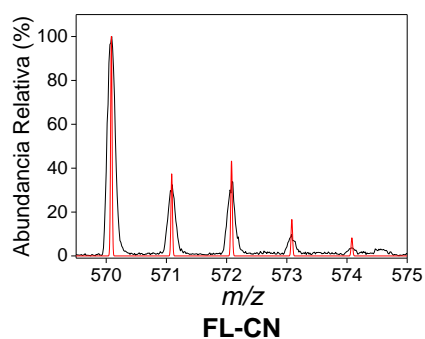
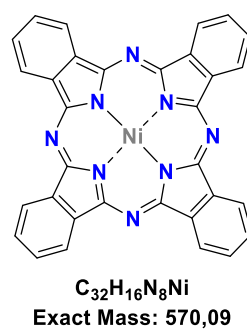
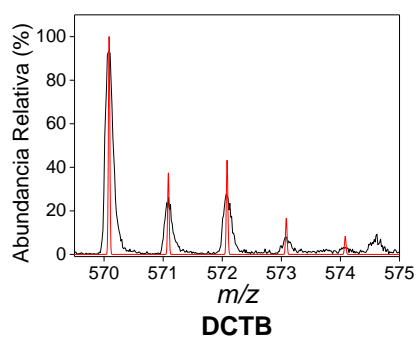
## Anexo J. Espectro RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C del FL-OCH<sub>3</sub>.



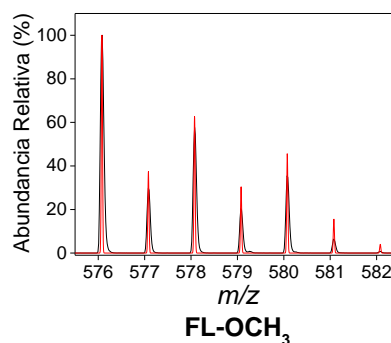
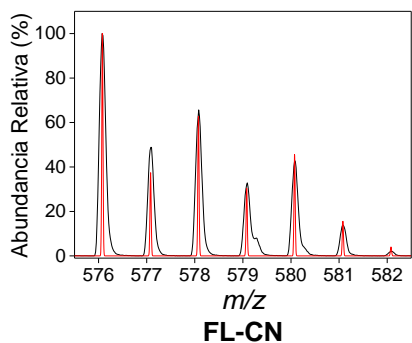
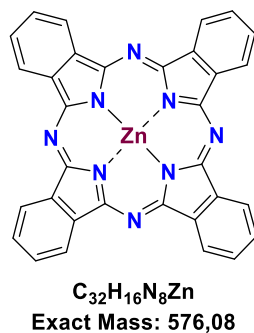
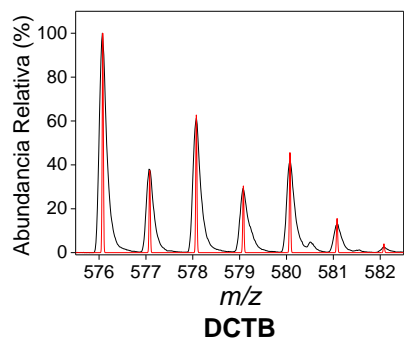
**Anexo K.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{32}H_{18}N_8$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



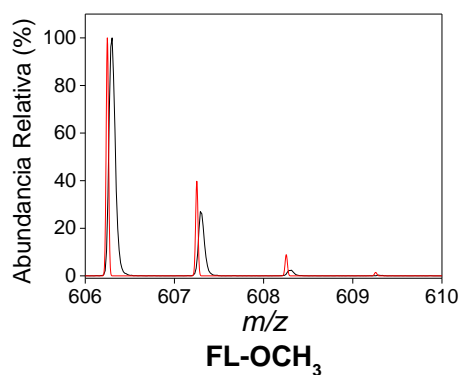
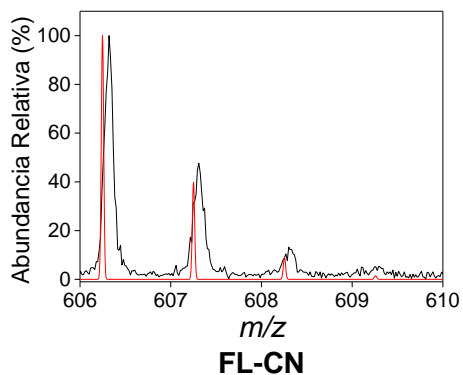
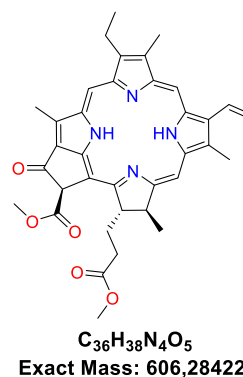
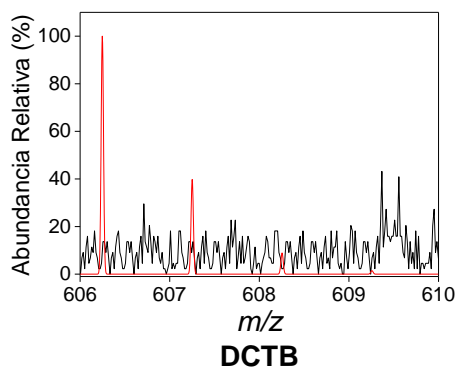
**Anexo L.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{32}H_{16}N_8Ni$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



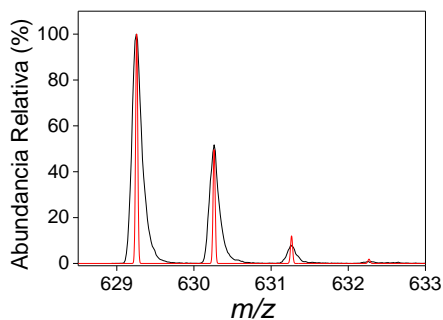
**Anexo M.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{32}H_{16}N_8Zn$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



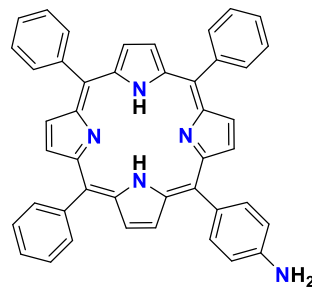
**Anexo N.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{36}H_{38}N_4O_5$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



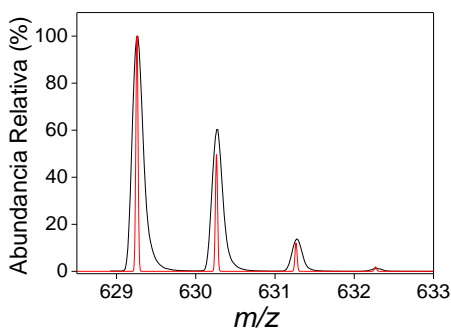
**Anexo O.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{44}H_{31}N_5$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



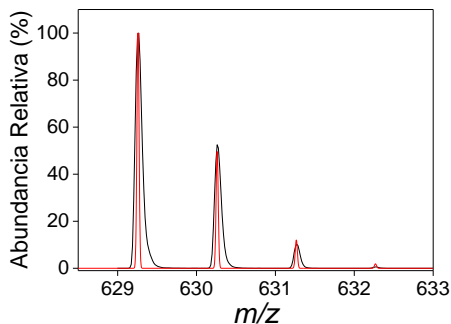
**DCTB**



$C_{44}H_{31}N_5$   
Exact Mass: 629,26

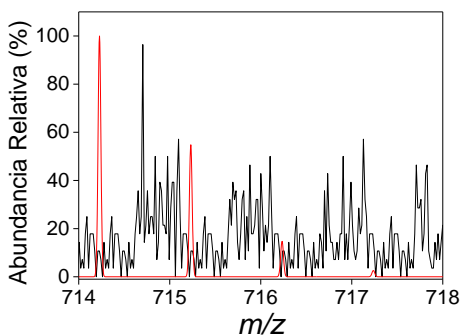


**FL-CN**

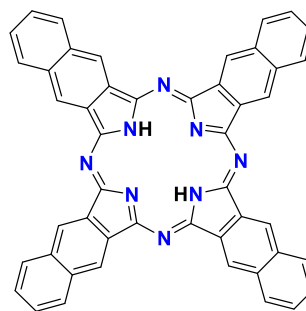


**FL-OCH<sub>3</sub>**

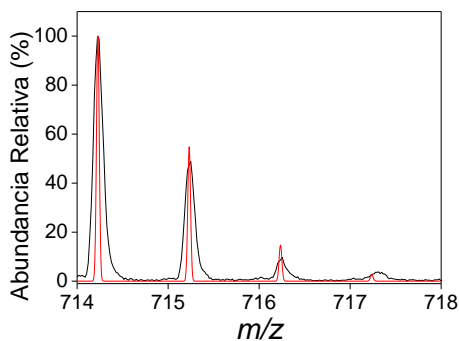
**Anexo P.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{48}H_{26}N_8$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



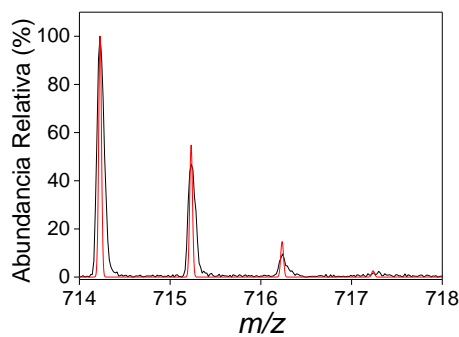
**DCTB**



$C_{48}H_{26}N_8$   
Exact Mass: 714,23

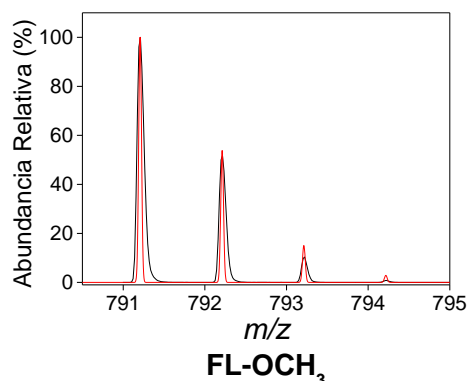
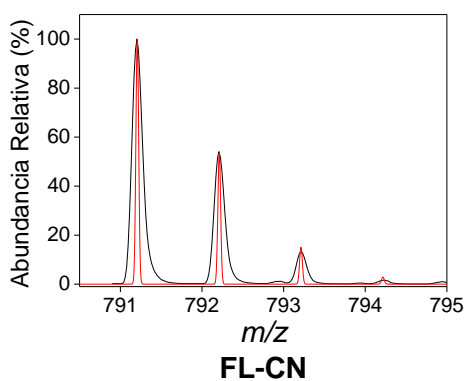
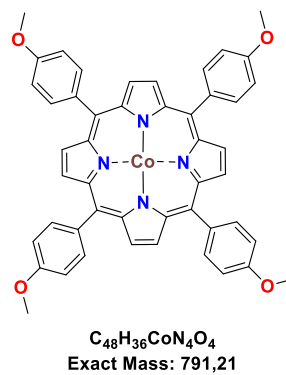
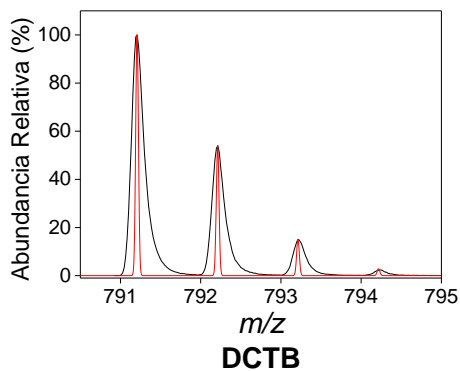


**FL-CN**

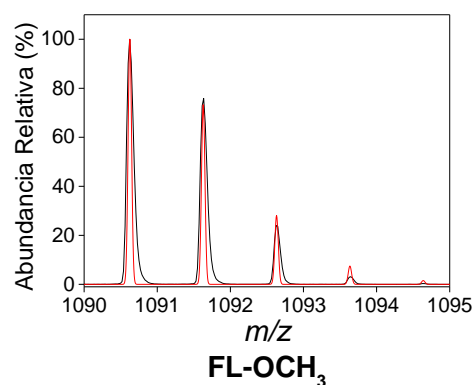
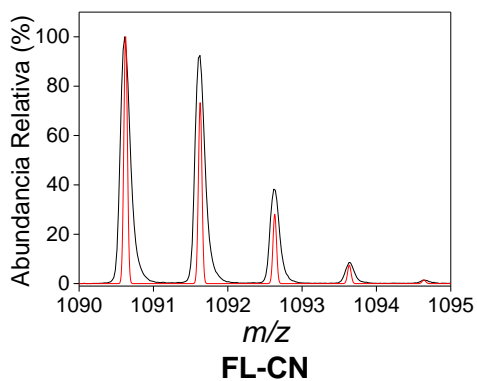
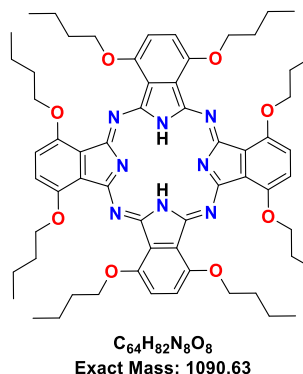
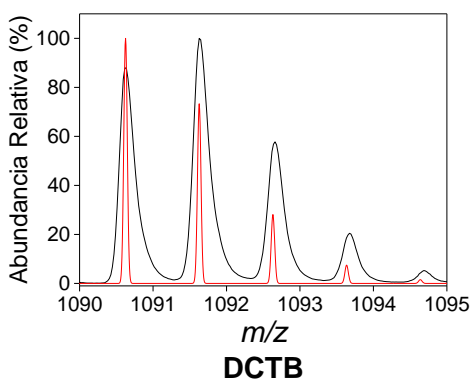


**FL-OCH<sub>3</sub>**

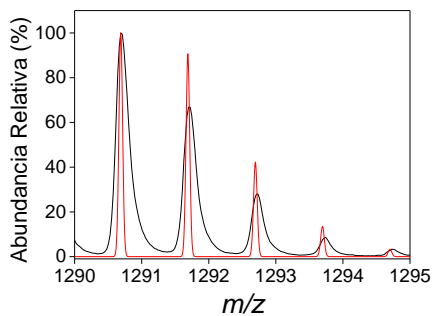
**Anexo Q.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{48}H_{36}CoN_4O_4$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



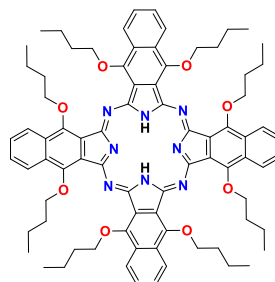
**Anexo R.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{64}H_{82}N_8O_8$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



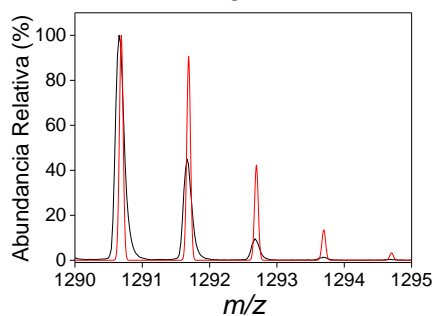
**Anexo S.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{80}H_{90}N_8O_8$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



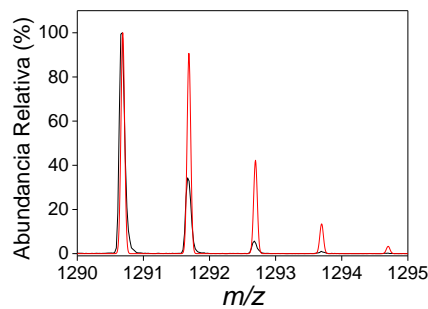
**DCTB**



$C_{80}H_{90}N_8O_8$   
Exact Mass: 1290,69

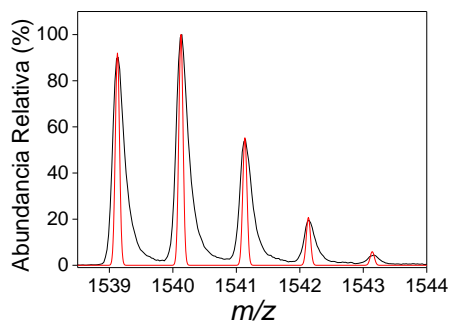


**FL-CN**

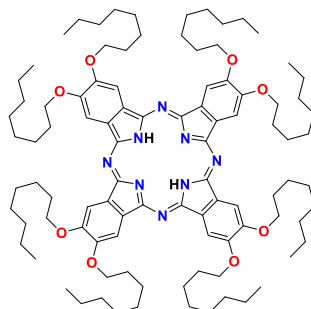


**FL-OCH<sub>3</sub>**

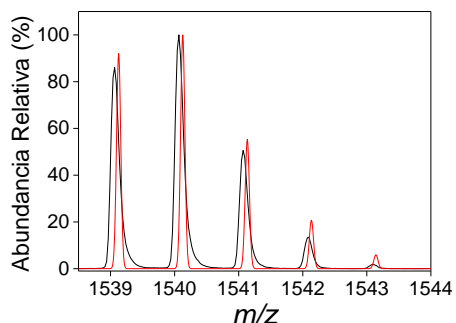
**Anexo T.** Perfiles isotópicos del catión radical de la porfirina  $C_{80}H_{90}N_8O_8$  utilizando como matrices DCTB, FL-CN, FL-OCH<sub>3</sub>.



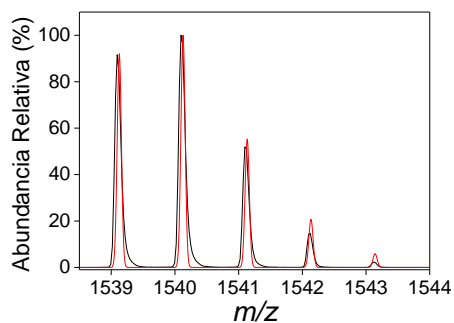
**DCTB**



$C_{96}H_{146}N_8O_8$   
Exact Mass: 1539,13



**FL-CN**



**FL-OCH<sub>3</sub>**

**Anexo U.** Tabla de compuestos observados por MALDI para petroporfirinas de crudo colombiano utilizando como matrices DCTB, FL-CN y FL-OCH<sub>3</sub>.

Compuesto (APPI-FT-ICR-MS)	Masa monoisotópica	Picos observados			Compuesto (APPI-FT-ICR-MS)	Masa monoisotópica	Picos observados		
		DCTB	FL-CN	FL-OCH <sub>3</sub>			DCTB	FL-CN	FL-OCH <sub>3</sub>
C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> OV	445.1227	-	-	-	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> OV	549.1853	-	-	-
C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> OV	459.1384	+	-	+	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> OV	551.2010	+	+	+
C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> OV	471.1384	-	-	+	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> OV	553.2166	+	+	+
C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	473.1540	-	+	-	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	555.2323	+	+	+
C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> OV	481.1227	-	+	+	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	557.2479	+	+	+
C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	485.1540	-	+	+	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> OV	563.2010	-	-	+
C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	487.1697	+	+	+	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> OV	565.2166	+	+	+
C <sub>29</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> OV	495.1384	-	+	+	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	567.2323	+	+	+
C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	497.1540	-	-	+	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	569.2479	+	+	+
C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	499.1697	+	-	+	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> OV	571.2636	+	+	+
C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> OV	501.1853	+	+	+	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> OV	577.2166	-	-	-
C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	509.1540	+	+	+	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	581.2479	-	-	+
C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	511.1697	-	+	-	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> OV	583.2636	+	+	+
C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> OV	513.1853	+	+	+	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	591.2323	-	-	+
C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> OV	515.2010	-	+	+	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	593.2479	+	-	+
C <sub>31</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	521.1540	+	+	+	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> OV	595.2636	-	-	+
C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	523.1697	+	+	+	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> OV	597.2792	-	-	+
C <sub>31</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> OV	525.1853	-	+	+	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> OV	605.2479	-	-	+
C <sub>31</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> OV	527.2010	+	+	+	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> OV	607.2636	-	-	+
C <sub>31</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> OV	529.2166	+	+	+	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> OV	609.2791	-	-	+
C <sub>32</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> OV	535.1697	-	+	+	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> OV	611.2949	-	-	+
C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> OV	537.1853	+	-	+	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> OV	619.2636	-	-	-
C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> OV	539.2010	+	+	+	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> OV	621.2792	-	-	-
C <sub>32</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> OV	541.2166	+	+	+	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> OV	541.2166	-	-	-
C <sub>32</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> OV	543.2323	+	+	+	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> N <sub>4</sub> OV	543.2323	-	-	-