

DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD PROTÓNICA DE UNA FAMILIA DE ÁCIDOS  
ACRÍLICOS USANDO EL MÉTODO CINÉTICO DE COOKS

JHON FREDY RINCÓN LÓPEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2016

DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD PROTÓNICA DE UNA FAMILIA DE ÁCIDOS  
ACRÍLICOS USANDO EL MÉTODO CINÉTICO DE COOKS

JHON FREDY RINCON LOPEZ

Trabajo de grado para optar al título de  
QUÍMICO

Directora

MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA MONTAÑEZ, Ph.D. QUÍMICA

Co-Director

Juan Sebastián Ramírez, M Sc. QUÍMICA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2016

*"La ciencia no es sino una perversión de sí misma a menos que tenga como objetivo final el mejoramiento de la humanidad".*

**Nicola Tesla**

## **Agradecimientos**

Ha sido un largo camino hasta lograr este gran objetivo, y estoy seguro de que será tan solo el primero tantos pos cumplir, es por esto que agradezco a Dios, a mi novia y a mi madre por ser los motores de mi vida, quienes siempre estuvieron en mis mejores y peores momentos. A ellos todo les debo y los amo.

A mis amigos de la universidad que me demostraron lo valioso de una amistad, fueron grandes personas de las cuales aprendí demasiadas cosas que me ayudaron a crecer en lo personal de una manera increíble. A Félix Orlando una persona que con sus consejos me llevaron a plantear y luchar para lograr grandes objetivos, a Jairsito y todos los bonitos de BFC, los quiero mucho y siempre les desearé lo mejor.

Agradezco a Jesús, Erika, Dianita, Fabián y Xuxan por aguantar mis pataletas, además de que estuvieron en los momentos cuando más los necesité, a ellos los quiero mucho y espero aprender mucho de ustedes amiguitos. Gracias a todos y que la ciencia nos una en torno al progreso de nuestras vidas, nuestras familias y sobre todo nuestro planeta que tanto nos necesita.

# CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>16</b>
1.1 IONIZACIÓN ESI PARA MEDICIONES EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	16
1.2 FUNCIONAMIENTO DE LA TRAMPA DE IONES CUADRUPOLO QIT.	17
1.3 FUNCIÓN DE LA MATRIZ EN MALDI Y PROCESOS DE FORMACIÓN DE IONES.	19
1.4 FUNCIÓN DE LA MATRIZ EN MALDI Y PROCESOS DE FORMACIÓN DE IONES.	21
1.5 CARACTERÍSTICAS DE LAS MATRICES MALDI.	22
<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>34</b>
2.1 CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS ACRÍLICOS POR ESI-MS.	34
2.2 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BASES DE REFERENCIA ESI-MS.	35
2.3 PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS BINARIAS.	36
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
3.1 ESPECTROS ESI-MS DE ÁCIDOS ACRÍLICOS.	38
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE REFERENCIA.	42
3.3 MEZCLAS BINARIAS Y DISOCIACIONES INDUCIDAS POR COLISIÓN.	46
3.4 DETERMINACIÓN DE LAS AFINIDADES PROTÓNICAS DE LOS ÁCIDOS ACRÍLICOS A TRES ENERGÍAS DE COLISIÓN	49
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>67</b>

## Lista de figuras

<b>Figura. 1</b> Esquema de una fuente de ionización por electrospray ESI	<b>16</b>
<b>Figura. 2</b> Esquema del proceso de ionización por electrospray	<b>17</b>
<b>Figura. 3</b> Trampa de iones en el tiempo ( <i>in time MS</i> )	<b>18</b>
<b>Figura. 4</b> Mecanismos de formación de iones primarios y secundarios presentes en MALDI	<b>19</b>
<b>Figura. 5</b> Espectros de absorción UV-Vis de una serie de ácidos acrílicos en DMSO at 24°C	<b>31</b>
<b>Figura. 6</b> Determinación de los coeficientes de extinción molar de seis ácidos acrílicos mediante la Ley de Beer	<b>32</b>
<b>Figura. 7</b> Familia de ácidos acrílicos que se usará para determinar sus respectivas afinidades protónicas relativas por medio del método cinético de Cooks	<b>34</b>
<b>Figura. 8</b> Ácidos acrílicos caracterizados mediante ESI-MS	<b>39</b>
<b>Figura. 9</b> Esquema propuesto para la deshidratación del AA-TioCN en fase gaseosa	<b>40</b>
<b>Figura. 10</b> Esquema propuesto para la deshidratación del AA-ITiofeno en fase gaseosa	<b>41</b>
<b>Figura. 11</b> Espectros ESI-MS de ocho bases de referencia usadas en la determinación de las APs de una familia de ácidos acrílicos	<b>44</b>
<b>Figura. 12</b> Espectro ESI-MS de una mezcla binaria que contiene 4-metilbenzaldehído y AA-Tiofeno	<b>46</b>
<b>Figura. 13</b> Fragmentación del dímero protonado [4-Metilbenz...H...ATio] <sup>+</sup> a tres energías de colisión	<b>47</b>
<b>Figura. 14</b> Espectro ESI-MS de una mezcla binaria compuesta por DHB y AA-ITioCN 2 mM	<b>48</b>
<b>Figura. 15</b> Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-Tiofeno vs AP de	

las bases de referencia medido a 1,25; 1,3 5 y 1,45 eV	
<b>Figura. 16</b> Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-Furano vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,3 5 y 1,45 eV	<b>55</b>
<b>Figura. 17</b> Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-TioCN vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,3 5 y 1,45 eV	<b>56</b>
<b>Figura. 18</b> Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-FuCN vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,3 5 y 1,45 eV	<b>57</b>
<b>Figura. 19</b> Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-ITiofeno vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,3 5 y 1,45 eV	<b>58</b>
	<b>59</b>

## Lista de tablas

<b>TABLA 1.</b> Valores de PI para una serie de ácidos acrílicos.	<b>28</b>
<b>TABLA 2.</b> Valores de afinidad protónica generales para la serie de ácidos acrílicos.	<b>30</b>
<b>TABLA 3.</b> Longitudes de absorción máximas para una serie de ácidos acrílicos.	<b>33</b>
<b>TABLA 4.</b> Moléculas orgánicas usadas como bases de referencia, fuente Hunter and Lias.	<b>35</b>
<b>TABLA 5.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{ATio}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Tiofeno a una energía de 1,25 eV.	<b>49</b>
<b>TABLA 6.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{ATio}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Tiofeno a una energía de 1,35 eV.	<b>50</b>
<b>TABLA 7.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{ATio}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Tiofeno a una energía de 1,45 eV.	<b>50</b>
<b>TABLA 8.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AITio}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-ITiofeno a una energía de 1,25 eV.	<b>51</b>
<b>TABLA 9.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AITio}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-ITiofeno a una energía de 1,35 eV.	<b>51</b>
<b>TABLA 10.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AITio}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-ITiofeno a una energía de 1,45 eV.	<b>51</b>
<b>TABLA 11.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AFu}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Furano a una energía de 1,25 eV.	<b>51</b>

<b>TABLA 12.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AFu}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Furano a una energía de 1,35 eV.	<b>52</b>
<b>TABLA 13.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AFu}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Furano a una energía de 1,45 eV.	<b>52</b>
<b>TABLA 14.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{ATioCN}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-TioCN a una energía de 1,25 eV.	<b>52</b>
<b>TABLA 15.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{ATioCN}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-TioCN a una energía de 1,35 eV.	<b>53</b>
<b>TABLA 16.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{ATioCN}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-TioCN a una energía de 1,45 eV.	<b>53</b>
<b>TABLA 17.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AFuCN}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-FuCN a una energía de 1,25 eV.	<b>53</b>
<b>TABLA 18.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AFuCN}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-FuCN a una energía de 1,35 eV.	<b>54</b>
<b>TABLA 19.</b> Relación de abundancias de los iones fragmento $[\text{Ref}+\text{H}]^+$ y $[\text{AFuCN}+\text{H}]^+$ y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-FuCN a una energía de 1,45 eV.	<b>54</b>
<b>TABLA 20.</b> Afinidad protónica experimental de cinco ácidos acrílicos obtenida por el método cinético a tres diferentes energías de colisión usando Argón como gas colisionador.	<b>60</b>

## **Lista de anexos**

**Anexo A.** Espectros ESI-MS de cada una de las mezclas binarias usadas para la determinación de las APs de cinco ácidos acrílicos.

**Anexo B.** Espectros MS/MS de fragmentación del dímero protonado para cada ácido acrílico respectivamente.

## Resumen

**TÍTULO:** DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD PROTÓNICA DE UNA FAMILIA DE ÁCIDOS ACRÍLICOS USANDO EL MÉTODO CINÉTICO DE COOKS\*

**AUTOR:** JHON FREDY RINCÓN LOPEZ\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Afinidad protónica, método cinético, ácidos acrílicos, espectrometría de masas, MALDI.

En este trabajo, se midieron experimentalmente las afinidades protónicas relativas (AP) de cinco ácidos acrílicos sintéticos mediante el método cinético de Cooks, con el fin de explorar su potencial uso como matrices MALDI de transferencia protónica. Las afinidades protónicas experimentales fueron comparadas con los valores previamente calculados teóricamente. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas con fuente electrospray y trampa de iones cuadrupolar (ESI-QIT), donde el dímero protonado  $[A \cdots H \cdots B]^+$  formado a partir de mezclas binarias de los compuestos investigados y moléculas de referencia con afinidad protónica conocida, se fragmentó mediante colisiones activadas (*Collision-Induced Dissociation, CID*).

Los valores experimentales de afinidad protónica obtenidos para esta familia de ácidos acrílicos, estuvieron en el rango de los 196 a 206 kcal/mol, presentando una buena correlación con respecto a los valores obtenidos de cálculos mecano-cuánticos para estos mismos ácidos. Adicionalmente, las afinidades protónicas relativas determinadas para los ácidos acrílicos están en el rango de las matrices MALDI comerciales utilizadas para el análisis de péptidos y proteínas como el CHCA o DHB.

Con la información termoquímica obtenida en este estudio, se abre la puerta para que los ácidos acrílicos puedan ser evaluados en el desarrollo de nuevas matrices MALDI de transferencia protónica.

---

\*Proyecto de grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Ph.D Química. Co-director: Juan Sebastián Ramírez, M Sc Química.

## Abstract

**TÍTULO:** PROTON AFFINITY DETERMINATION OF AN ACRYLIC ACID FAMILY USING THE COOKS'S KINETIC METHOD\*

**AUTHOR:** JHON FREDY RINCÓN LOPEZ\*\*

**KEYWORDS:** Proton affinity, kinetic method, acrylic acids, mass spectrometry, MALDI.

The relative proton affinities of five acrylic acids were experimentally measured through the Cook's Kinetic Method in order to explore their potential use as a MALDI matrix proton transfer. The experimental data were compared with values previously calculated. The Kinetic Method took place in a quadrupole ion trap mass spectrometer device (QIT-MS) and electrospray ionization source (ESI), where the protonated dimer  $[A \cdots H \cdots B]^+$  formed from binary mixtures of the compound and reference bases whose proton affinity is known, was fragmented by Collision-Induced Dissociation (CID) using helium as gas collider, Furthermore each experiment was performed at three different collision energies (1.25 eV; 1.35 eV and 1.45 eV).

The experimental proton affinities obtained were in the range from 196 to 206 kcal/mol. The relative proton affinity showed very good correlation with the calculated values. The experimental data or the relative proton affinities for these acrylic acids are in the range of commercial MALDI matrices for the analysis of peptides and proteins as CHCA o DHB. With the thermochemical information obtained in this study, the door is opened to the acrylic acids to be evaluated in the rational development of proton transfer MALDI matrices.

---

\*Degree Project

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de Química. Tutor: Marianny Yajaira Combariza Montañez, ph.D. Cheistry: Co-tutor: Juan Sebastián Ramírez, M Sc. Chemistry

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los estudios por espectrometría de masas de macromoléculas como proteínas, carbohidratos, péptidos y biopolímeros, han sido posibles gracias al desarrollo de métodos de ionización suave, como la ionización-desorción por láser asistida por matriz (MALDI), capaces de transferir eficientemente estas especies a fase gaseosa sin su fragmentación. El desarrollo racional de nuevas matrices MALDI es vital para expandir la aplicación de la técnica debido a que matrices comerciales como el ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) presentan reconocidas limitaciones analíticas <sup>1</sup>.

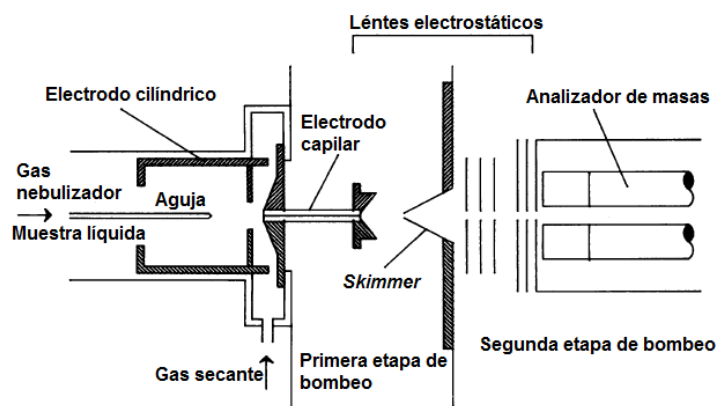
El método cinético de Cooks <sup>2</sup>, es una herramienta muy versátil que se ha utilizado en la determinación de afinidades protónicas (AP) de numerosas moléculas como cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos, aminas y aminoácidos. Este método, permite hallar AP muy cercanas a las reportadas por otros métodos experimentales ya establecidos hasta final de los años 80 y comienzos de los 90. En esta investigación, se utilizó el método cinético para determinar las afinidades protónicas (AP) experimentales de una serie de ácidos acrílicos sintéticos que teóricamente exhiben valores de afinidad protónica cercanos a los presentados por matrices comerciales como el CHCA. Consecuentemente, esta nueva serie de ácidos acrílicos podría tener un uso potencial en el desarrollo racional de nuevas matrices MALDI de transferencia protónica.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. IONIZACIÓN ESI PARA MEDICIONES EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La ionización por electronebulización, *electrospray* (ESI), desarrollada en la década de 1980 <sup>3</sup>, se ha convertido en una técnica muy utilizada debido a su amplia gama de aplicaciones químicas y biológicas. En la fuente ESI, se forman gotas altamente cargadas que se someten a una fisión asimétrica en el límite de carga de Rayleigh (Véanse Figuras 1 y 2) formando gotas más pequeñas. El gas de nebulizador ayuda a eliminar los neutrales generados en los procesos de formación de los iones y durante la explosión coulombica, enseguida los iones formados son colimados por una serie de electrodos (*skimmers*) o embudos iónicos que los dirigen hacia el analizador de masas <sup>4</sup>.

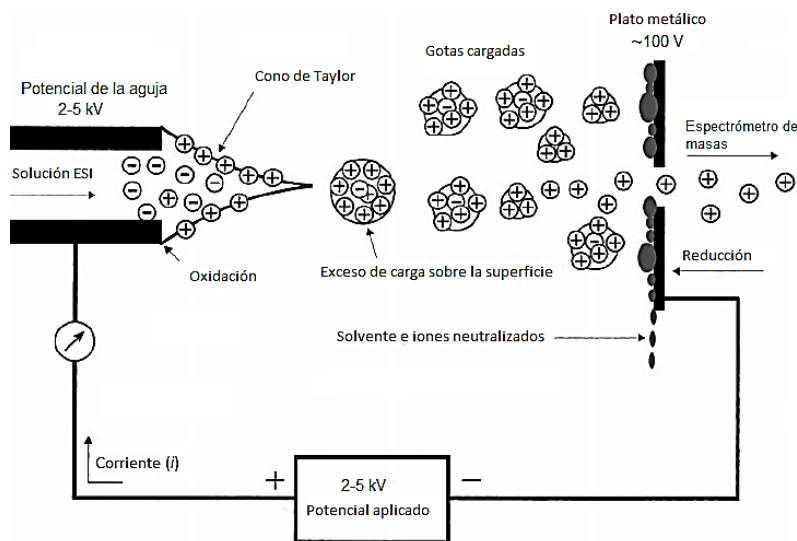
Figura 1. Esquema de una fuente de ionización por *electrospray* ESI <sup>3</sup>



La ionización ESI es suave y generalmente resulta en la formación de iones moleculares protonados  $[M+H]^+$ , deprotonados  $[M-H]^-$  y aductos. A diferencia de

un espectro de impacto de electrones, IE, donde el analito es ionizado y fragmentado por electrones de alta energía (~70 eV), el espectro de masas ESI es sencillo, porque solo se observan la molécula protonada (o deprotonada), aductos con  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y *clúster* con solventes. Debido a su naturaleza química, las proteínas a menudo presentan estados altos de carga con  $z > 40$ , mientras en moléculas pequeñas predomina sólo un estado de carga. Los procesos de multiprotonación en macromoléculas están determinados por la composición del solvente, de forma tal, que el *pH* de la solución tiene un fuerte efecto en la eficiencia de la ionización y la distribución de los estados de carga en los iones del analito <sup>5</sup>.

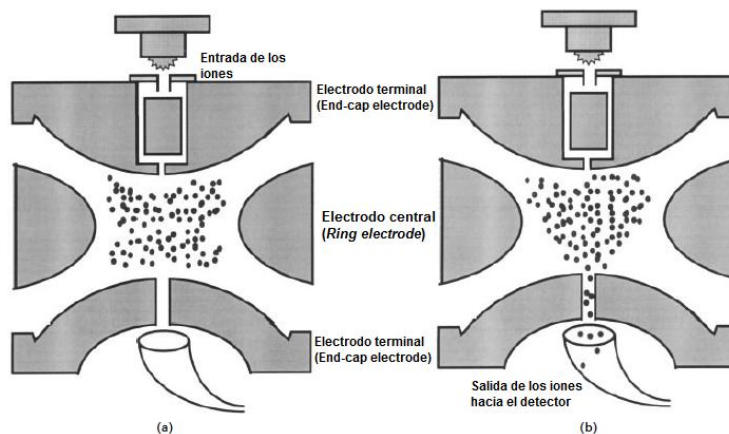
**Figura 2.** Esquema del proceso de ionización por *electrospray* <sup>6</sup>.



## 1.2. FUNCIONAMIENTO DE LA TRAMPA DE IONES CUADROPOLAR

La trampa iónica cuadrupolar (QIT) funciona como dispositivo de almacenamiento de iones, en el cual estos se confinan por periodos de tiempo relativamente largos (50~100 ms). La QIT funciona a bajas presiones  $\sim 1 \times 10^{-3}$  torr usando helio (He) como gas buffer <sup>7, 8</sup>.

**Figura 3.** Trampa de iones en el tiempo (*in-time MS*). (a) Confinamiento de los iones por una amplitud de radiofrecuencia que se aplica en un intervalo de tiempo. (b) Expulsión del ion seleccionado hacia el detector <sup>7</sup>.



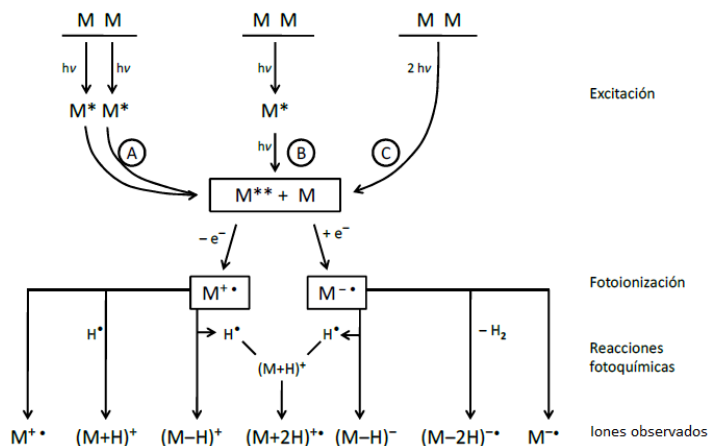
Este dispositivo consta de tres electrodos de superficie hiperbólica, el electrodo central en forma de anillo (*ring electrode*) y dos electrodos terminales (*end-caps*). Funciona como filtro de masas manteniendo los iones en trayectorias hiperbólicas descritas por las ecuaciones de Mathieu <sup>7</sup>. La QIT, desarrollada por el Premio Nobel de física Wolfgang Paul <sup>9</sup> (1989), es un analizador de masas muy versátil en el que se pueden realizar sucesivas fragmentaciones de un ion particular en lo que se conoce como espectrometría de masas por etapas ( $MS^n$ ) o TÁNDEM. Este dispositivo permite realizar estudios cinéticos y termodinámicos, reacciones ion-molécula o ion-ion; establecer parámetros fisicoquímicos como la acidez, basicidad, afinidad electrónica, potencial de ionización, afinidad catiónica de especies en fase gaseosa; además de estudiar mecanismos de fragmentación mediante experimentos de colisiones activadas utilizando He o Ar <sup>10, 11</sup>.

El método CID o disociaciones inducidas por colisión (CID, *Collision-Induced Dissociation*) de una especie iónica confinada en la trampa de iones, se ha convertido en una potente técnica para determinaciones estructurales debido al estudio de los iones fragmento producto de las colisiones activadas entre un ion precursor y un gas buffer al interior de la trampa <sup>12</sup>.

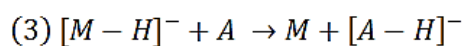
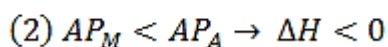
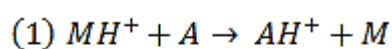
### 1.3. FUNCIÓN DE LA MATRIZ EN MALDI Y PROCESOS DE FORMACIÓN DE IONES

La comprensión mecanista de los procesos de formación de iones en MALDI <sup>13, 14</sup> es fundamental para el desarrollo racional de esta técnica analítica. Las bases teóricas que pueden explicar el método cinético <sup>15</sup>, o la fisicoquímica involucrada en los procesos de ionización, los cálculos de energía de los procesos de formación de iones primarios y secundario (Ver Figura 4), tienen como objetivo central maximizar la sensibilidad de MALDI mediante la formación de muchos iones primarios como sea posible, como consecuencia de esto, llegar a la formación de iones secundarios del analito a través de reacciones secundarias que involucran transferencia protónica, las características termoquímicas de la matriz tales como su afinidad protónica. Muchas preguntas acerca de los procesos de formación de iones en MALDI se mantienen aún sin respuesta y muy pocas matrices han sido investigadas en mayor detalle <sup>15</sup>.

Figura 4. Mecanismos formación de iones primarios de una matriz MALDI <sup>16</sup>



La Figura 4 muestra algunos de los mecanismos de ionización primarios más frecuentes e investigados en matrices MALDI, principalmente, de origen fotoquímico y que favorecen la formación de iones secundarios del analito mediante reacciones de transferencia protónica en la fase gaseosa de la especie  $[M+H]^+$  (Ver Ecuación 1) siempre y se vea favorecido termodinámicamente, puesto que las reacciones de transferencia protónica en un proceso de ionización secundario ocurren solamente cuando la afinidad protónica de la matriz es más baja que la afinidad protónica del analito dando como resultado una reacción exotérmica (Ver Ecuación 2) donde  $M$  es la molécula de la matriz y  $A$  es el analito. Típicamente las matrices MALDI más utilizadas exhiben AP de aproximadamente 201 kcal/mol o más <sup>17</sup>.



En el proceso de ionización MALDI por transferencia protónica, para el análisis de biomoléculas como péptidos, proteínas, carbohidratos y otros biopolímeros, ocurren una serie de reacciones promovidas por la matriz, sin embargo la diferencia energética entre matriz y analito, puede inducir la fragmentación del analito por lo que es necesario encontrar matrices con afinidades protónicas similares a las del analito de interés <sup>18</sup>. Cuando los analitos tienen una AP relativamente baja, en estos casos es preferible utilizar matrices básicas (aceptores de protones), siempre y cuando el analito posea en su estructura protones ácidos que puedan ser transferidos generando así analitos deprotonados (Véase Ecuación 3). Por estas razones, para predecir el desempeño de una molécula como matriz de transferencia protónica en MALDI es necesario conocer en más detalle acerca de sus propiedades termoquímicas.

#### 1.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS MATRICES MALDI

Las matrices MALDI pueden presentarse en como sólidos o líquidos de alta densidad, con propiedades optoelectrónicas que les permitan absorber eficientemente energía suministrada por una fuente de fotones (UV, Vis o IR) para, mediante procesos de transferencia de carga, producir iones primarios capaces de interactuar con las moléculas del analito y ionizarlo. Adicionalmente, las matrices sólidas deben ser solubles en solventes apropiados para el análisis MALDI y cristalizar de forma homogénea.<sup>19, 20</sup> Además, en procesos de ionización del analito por transferencia protónica las matrices MALDI deben presentar AP por debajo de las de los analitos para asegurar la transferencia del protón desde la matriz hacia el analito <sup>21</sup>. Otro aspecto a tener en cuenta, es la formación de “puntos calientes” o “puntos dulces” que son literalmente regiones de baja uniformidad en la mezcla matriz/analito que causan incremento en los tiempos de medición y obstaculizan la aplicación de MALDI MS para el análisis cuantitativo <sup>21</sup>

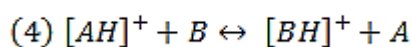
Otra propiedad importante de una matriz MALDI es su capacidad de inducir (o no) fragmentación. La fragmentación del analito que, aunque en muchas aplicaciones sería un proceso indeseable, se usa en la metodología denominada decaimiento en la fuente (*in-source decay*) para secuenciar proteínas en aproximaciones *Top-Down*.

## 1.5. MEDICIONES TERMOQUÍMICAS

La determinación experimental de afinidades protónicas usando el método cinético requiere experimentos que involucran la medición de la relación de abundancias entre las señales del analito cuya AP se desea calcular (*A*) y un compuesto de referencia de AP conocida (*B*). Inicialmente, en la literatura se describieron dos métodos<sup>17</sup> para medir diferencias en la basicidad en fase gaseosa de una familia de piridinas sustituidas, tanto como la técnica del equilibrio de transferencia protónica (*Proton transfer equilibrium method*) y el método cinético de Cooks (*Kinetic method*) se realizó en un espectrómetro de masas con trampa de iones y usando una fuente electrospray<sup>2, 23</sup>.

### 1.5.1. Equilibrio de transferencia protónica

La reacción de transferencia protónica en el equilibrio, entre un analito (*A*) y un compuesto de referencia (*B*) está dada por:



Donde la constante de equilibrio  $K_{eq}$  está definida como:

$$(5) K_{eq} = \left[ \frac{(BH)^+(A)}{(AH)^+(B)} \right]$$

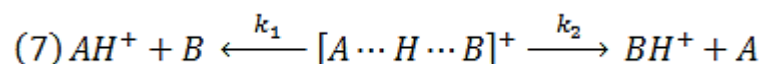
En la Ecuación 5, el término  $[A/B]$  es la relación de las concentraciones de las bases en la mezcla gaseosa en el espectrómetro de masas y  $[BH^+/AH^+]$  es la relación en las concentración de las dos bases protonadas medida en el espectrómetro de masas, después de que se ha alcanzado el equilibrio de la reacción. Ahora según las leyes de la termodinámica, el cambio en la energía libre en una reacción en función de la temperatura está dado por:

$$(6) \Delta G^\circ = -RT \ln(K_{eq}) = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Cuando los efectos de entropía son insignificantes <sup>11</sup>, el cambio en la energía libre puede ser equiparado con el cambio en la entalpía de la reacción; de esta forma es posible aproximarse al cálculo de las AP relativas de las bases involucradas en la reacción. Para la serie de piridinas sustituidas utilizadas por Cooks <sup>2</sup> en sus experimentos los cambios de entropía eran similares para cada uno de los compuestos, siendo entonces  $T\Delta S = 0$  (Ecuación 6). Estos estudios presentan inconvenientes debido a que se debe hacer una serie de consideraciones relacionadas con los cambios de energía asociados al efecto de la entropía que podrían llevar a errores en los cálculos de propiedades termoquímicas <sup>2</sup>.

### 1.5.2. El método cinético

Un principio importante en espectrometría de masas establece que la disociación competitiva de un enlace en un ion activado, a menudo ocurre bajo un control termoquímico <sup>24</sup>. La regla de Stevenson establece que dos fragmentos derivados del rompimiento de un solo enlace pueden competir por la carga del ion basados en la cantidad de energía interna y de su estructura <sup>25</sup>. Dentro de este marco, el uso de fragmentaciones competitivas de iones clúster para la determinación relativa de propiedades termoquímicas se conoce como método cinético. El procedimiento experimental involucra el aislamiento del dímero protonado formado durante el proceso de ionización  $[A \cdots H \cdots B]^+$  que se fragmenta posteriormente para generar los fragmentos  $[A]^+$  y  $[B]$ ; las abundancias de las señales de los fragmentos del clúster dependen directamente de la afinidad protónica de cada molécula <sup>11, 26</sup>.



Las entalpías de reacción para cada una de las rutas de disociación son <sup>11</sup>:

$$(8) \varepsilon_0(1) = \Delta H_f(AH^+) + \Delta H_f(B) - \Delta H_f(A \cdots H \cdots B^+)$$

$$(9) \varepsilon_0(2) = \Delta H_f(BH^+) + \Delta H_f(A) - \Delta H_f(A \cdots H \cdots B^+)$$

$$(10) \Delta \varepsilon_0 = \Delta(\Delta H_f) = [\Delta H_f(BH^+) + \Delta H_f(A)] - [\Delta H_f(AH^+) + \Delta H_f(B)]$$

Para la reacción:  $(11) A + H^+ \rightarrow AH^+$

Se define la afinidad protónica como el negativo la entalpía de la reacción <sup>27</sup>:

$$(12) AP \equiv -\Delta H_{reac}$$

De esta manera:  $(13) AP(A) = \Delta H_f(A) + \Delta H_f(H^+) - \Delta H_f(AH^+)$

Así mismo:  $(14) AP(B) = \Delta H_f(B) + \Delta H_f(H^+) - \Delta H_f(BH^+)$

Si restamos las dos ecuaciones tenemos que:

$$(15) \Delta AP = AP(B) - AP(A) = \Delta H_f(AH^+) + \Delta H_f(B) - [\Delta H_f(BH^+) - \Delta H_f(A)]$$

Según las ecuaciones 11 y 15 se tiene que:  $\Delta AP = -\Delta \varepsilon_0$

La constante cinética para cada semirreacción se puede expresar como:

$$(16) k_i = \frac{RTQ^*}{hQ} e^{-\varepsilon_0/RT}$$

Donde  $Q^*$  representa la función de partición para el complejo activado y  $Q$  representa la función de partición del ion <sup>18</sup>, el término  $\varepsilon_0/RT$  representa la fracción de colisiones moleculares que tienen una energía igual o mayor que  $\varepsilon_0$ , donde  $\varepsilon_0$  es la energía de activación en J/mol,  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin, y  $R$  es la constante de los gases 8,314 J/Kmol.

Combinando las constantes cinéticas, se obtiene que:

$$(17) \ln \frac{k_B}{k_A} = \ln \frac{Q_B^* Q_A}{Q_A^* Q_B} - \frac{\Delta \varepsilon_0}{RT}$$

Las reacciones de disociación competitiva tienen los mismos factores de frecuencia, además, dado que los productos de disociación proceden del mismo ion precursor, las funciones de partición son equivalentes ( $Q_1 = Q_2$ ) por otra parte, La disociación de los complejos activados difieren principalmente en la frecuencia de vibración del enlace de hidrógeno ( $\nu$ );  $Q_1^*/Q_2 \approx \nu_1/\nu_2$  y si las frecuencias son iguales [ $\Delta(\Delta S) \approx 0$ ]<sup>18</sup>.

En la espectrometría de masas en tándem, el rendimiento relativo de los iones producto  $[AH]^+$  y  $[BH]^+$  puede ser calculado y se asume que la relación de intensidad de aparición de los productos es aproximadamente la relación de las constantes de velocidad (Ver Ecuación 18).<sup>11, 27</sup>

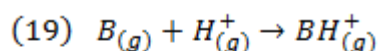
$$(18) \ln \frac{k_B}{k_A} \approx \ln \frac{[BH^+]}{[AH^+]} = \frac{-\Delta \varepsilon_0}{RT_{eff}} = \frac{AP(B) - AP(A)}{RT_{eff}}$$

La ecuación 18, podría expresarse de la forma ( $Y = mx + b$ ), donde  $Y$  es el logaritmo de la relación de abundancia de los iones fragmento  $[AH]^+/[BH]^+$ ,  $m$  es la pendiente de la recta ( $1/RT_{eff}$ ) y  $b$  es  $[AP(A)/RT_{eff}]$  donde  $AP(A)$  es la afinidad protónica del analito a estudiar y  $AP(B)$  es la afinidad protónica de la base de referencia,  $T_{eff}$  es la temperatura efectiva de los iones precursores activados, se refiere a una temperatura real de la población de iones que están en equilibrio térmico<sup>28-31</sup>.

Usando diferentes bases de referencia (como el CHCA), pueden calcularse diferentes valores de  $\ln(k_1/k_2)$ . A partir de las correlaciones lineales de estos puntos, la temperatura efectiva y las afinidades protónicas aparentes de los analitos se determinan a partir de la pendiente y el intercepto de la recta respectivamente. Las AP aparentes, se obtienen extrapolando el valor del  $\ln [BH^+]/[AH^+]$  a cero (intersección con el eje x).

Cada punto corresponde al  $\ln [BH]^+/[AH]^+$  (coordenada en el eje Y) vs afinidad protónica de cada base de referencia (coordenada X) y, usando el método de regresión lineal, se halla la ecuación de la recta. La ecuación 18 es utilizada para calcular las afinidades protónicas relativas en fase gaseosa de moléculas cuya AP se desconoce además de la  $T_{eff}$  de los iones.

Los primeros resultados de basicidad en fase gaseosa, reportados por Cooks por medio del método cinético, se obtuvieron usando un espectrómetro de masas de trampa de iones cuadrupolar<sup>2</sup>. En las determinaciones termoquímicas relacionadas con el método cinético, se describe la basicidad en fase gaseosa como el negativo del cambio en la energía libre y la afinidad protónica como el negativo de la entalpía de la reacción<sup>32</sup>. Según el concepto de Bronsted-Löwry (1923), la afinidad protónica se define como una medida de la tendencia a aceptar un protón en una reacción (*Ecuaciones 19-21*). Cooks propone que el método cinético es idóneo para estudiar propiedades termoquímicas de moléculas en fase gaseosa y que es posible comparar sus resultados con informaciones obtenidas por otros métodos<sup>2</sup>.



$$(20) -\Delta G^\circ = GB(B)$$

$$(21) -\Delta H^\circ = AP(B)$$

Las ecuaciones 19-21 se relacionan según la siguiente expresión que describe el cambio en la energía libre de una reacción.

$$(22) \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

$$(23) PA(B) = GB(B) - T\Delta S$$

$$(24) \Delta S^\circ = \Delta S_{trans}^\circ + \Delta S_{rot}^\circ + \Delta S_{vib}^\circ$$

Por otra parte, otros autores <sup>32</sup> no toman en cuenta las consideraciones termodinámicas relacionadas con la variación en la AP ligada a los cambios de entropía por lo que asume que los cambios de entropía en las moléculas son iguales en magnitud. Este hecho implica necesariamente que para que esta condición se cumpla las moléculas deben ser en su estructura lo más similares posibles. Estas observaciones son similares a las AP reportadas para una serie de aminoácidos <sup>27</sup>, utilizando el método cinético usando la trampa de iones con ionización ESI como fuente de iones.

En este estudio, Cheung <sup>27</sup> explicó cómo se determina la Ecuación 18, a partir de las energías de disociación asociadas a la disociación del dímero protonado (Véase Ecuación 7). La corrección de la entropía permite superar una de las limitaciones más importantes de método cinético, para ello, se planteó modificar la Ecuación 18 añadiendo el término  $\Delta S_p(B_i)/R$  conocido como entropía de protonación <sup>33, 34</sup>.

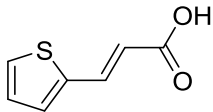
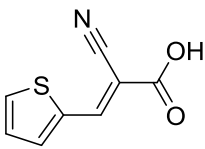
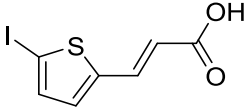
### **1.5.3. Ácidos acrílicos como potenciales matrices MALDI**

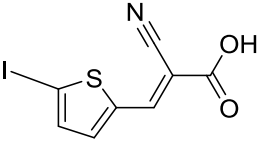
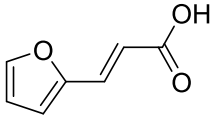
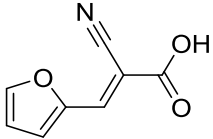
En estudios recientes del grupo de investigación en fisicoquímica teórica y experimental GIFTEX, de la Universidad Industrial de Santander, en la tesis de maestría de la estudiante Laura Castellanos, se evaluaron experimentalmente y teóricamente algunas propiedades termoquímicas de una familia de ácidos acrílicos <sup>35</sup> (Potencial de ionización, coeficientes de extinción molar y afinidades protónicas teóricas). Las moléculas investigadas en este trabajo, que se muestran en la Tabla 1, fueron sintetizadas por el grupo de investigación en macromoléculas de la Universidad Nacional de Colombia UNAL.

### 1.5.4. Potencial de ionización de ácidos acrílicos

Una característica de las matrices de transferencia protónica es su relativo alto potencial de ionización (PI) y baja afinidad protónica de manera que en los procesos de ionización primarios que ocurren en MALDI se forme principalmente la especie  $[M+H]^+$  y no catión radical (Figura 4). En la Tabla 1 se observa que los derivados del ácido acrílico, que se consideran en este estudio, exhiben valores de PI por encima de 8.4 eV <sup>37</sup>.

**TABLA 1.** Valores de PI para una serie de ácidos acrílicos <sup>35</sup>.

Ácidos Acrílicos	Estructura	PI (eV)
<b>AA-Tiofeno</b>	 <p>Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 154,00855 Da ácido (<i>E</i>)-3-(tiofen-2-il)acrílico</p>	8.67
<b>AA-TioCN</b>	 <p>Formula química: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 179,00410 Da ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-(tiofen-2-il)acrílico</p>	9.07
<b>AA-ITiofeno</b>	 <p>Formula química: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>IO<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 279,90549 Da ácido (<i>E</i>)-3-(5-iodotiofen-2-il)acrílico</p>	8,60
<b>Ácido acrílico</b>	<b>ESTRUCTURA</b>	<b>PI (eV)</b>

<p><b>AA-ITioCN</b></p>	 <p>Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>INO<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 304,90074 Da ácido(<i>E</i>)-2-ciano-3-(5-iodotiofen-2-il)acrílico</p>	<p>8,74</p>
<p><b>AA-Furano</b></p>	 <p>Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> Masa monoisotópica: 138,03169 Da ácido (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrílico</p>	<p>8,48</p>
<p><b>AA-FuCN</b></p>	 <p>Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub> Masa monoisotópica: 163,02694 Da ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-(furan-2-il)acrílico</p>	<p>8,96</p>

### 1.5.5. Cálculos teóricos de AP en ácidos acrílicos

Una de las principales características de las matrices de transferencia protónica es su baja afinidad protónica comparada con la de analitos como péptidos y proteínas. Una baja AP es necesaria para que ocurra el proceso de transferencia protónica de la matriz al analito <sup>4</sup>. Para los cálculos teóricos de la AP, se usó la teoría del funcional de densidad (DFT), con el funcional B3LYP y el conjunto base 6-311G\*\*(2d,2p), según el método para el cálculo de afinidad protónica de matrices MALDI propuesto por Hoppilliard. <sup>33, 35</sup>

En la Tabla 2, se observan los valores teóricos de AP para la serie de ácidos acrílicos que se consideran en esta investigación. El valor de AP reportado corresponde al sitio de protonación con mayor basicidad en la molécula.

**TABLA 2.** Valores de afinidad protónica generales para la serie de ácidos acrílicos <sup>35</sup>.

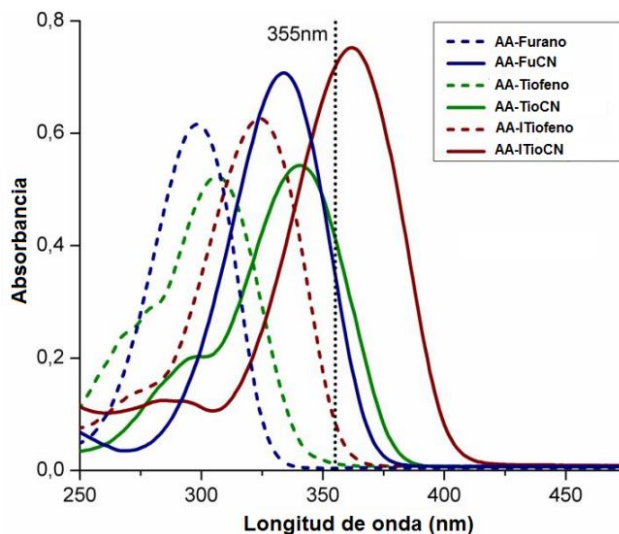
<b>Molécula</b>	<b>Sitio preferente de protonación</b>	<b>Afinidad Protónica [kcal/mol]</b>
<b>CHCA*</b>	Oxígeno del carbonilo	201,02
<b>AA-Tiofeno</b>	Oxígeno del carbonilo	208,26
<b>AA-Furano</b>	Oxígeno del carbonilo	208,24
<b>AA-TioCN</b>	Oxígeno del carbonilo	208,07
<b>AA-FuCN</b>	Oxígeno del carbonilo	197,96
<b>AA-ITiofeno</b>	Oxígeno del carbonilo	208,61
<b>AA-ITioCN</b>	Oxígeno del carbonilo	199,08

En los estudios realizados por el GIFTEX, se usó como referencia el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) debido a que es una de las matrices MALDI más utilizadas para el análisis de péptidos y proteínas <sup>36</sup>, como se observa en la tabla anterior, el valor calculado para el CHCA (Véase Tabla 2), concuerda con el valor reportado el cual es de 201 Kcal/mol <sup>23</sup>, demostrando la fiabilidad de las determinaciones teóricas.

#### **1.5.6. Determinación de los coeficientes de extinción molar**

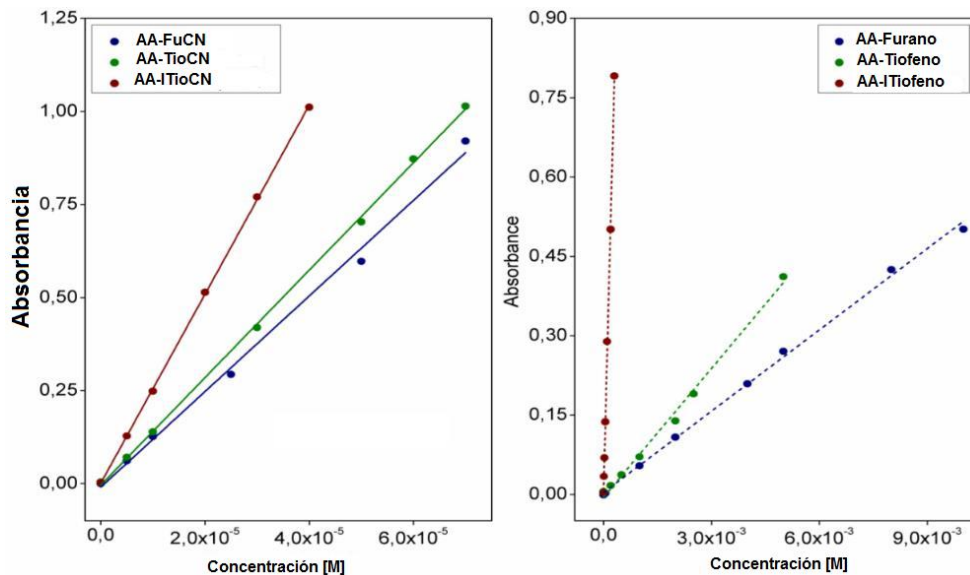
Otra de las características importantes en una matriz MALDI es su capacidad de absorber radiación a longitudes de onda cercanas o iguales a las de la fuente láser (Nd-YAG 355 nm). Los espectros UV-VIS de cada uno de los ácidos acrílicos se midieron en un espectrofotómetro UV-Vis barriendo la longitud de onda entre 200 y 450 nm, utilizando soluciones de los ácidos de 50  $\mu$ m en THF y usando la Ley de Beer-Lambert para determinar la absorptividad molar a 355 nm ( $\lambda_{355}$  nm), como se muestra en la Figura 5 <sup>35</sup>.

**Figura 5.** Espectros de absorción UV-Vis de una serie de ácidos acrílicos en DMSO at 24°C<sup>35</sup>.



Los máximos de absorción observados en la Figura 5 corresponden a transiciones de tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  en los orbitales  $p$  del sistema aromático y a transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  de los grupos cromóforo con electrones no enlazantes (O, N, S, I) al orbital antienlazante del sistema aromático. La línea punteada indica la longitud de onda característica del láser Nd: YAG de  $\lambda = 355$  nm. Respecto a los espectros UV-vis se llegó a la conclusión de que la presencia de grupos (-CN) en el carbono  $\alpha$ , causa un leve desplazamiento hacia el rojo con respecto a los derivados que no contienen este grupo funcional<sup>35</sup>.

**Figura 6.** Determinación de los coeficientes de extinción molar de seis ácidos acrílicos mediante la Ley de Beer <sup>35</sup>.



No solo las propiedades fisicoquímicas de los compuestos candidatos, sino también las optoelectrónicas determinan en gran medida su uso potencial como matrices MALDI de transferencia protónica <sup>37</sup>. En la Tabla 3 se muestran los coeficientes de extinción molar a  $\lambda = 355$  nm de los ácidos acrílicos estudiados en este trabajo; también, se incluyen las longitudes máxima de absorción. Estos cálculos fueron realizados con base en la Ley de Beer para soluciones diluidas de los compuestos.

El derivado AA-TioCN tiene un máximo de absorción ( $\lambda = 340$  nm) bastante cercano a la longitud de onda característica del láser Nd: YAG ( $\lambda = 355$  nm), adicionalmente, los demás compuestos también presentan valores cercanos a 355 nm <sup>21</sup>.

**TABLA 3.** Longitudes de absorción máximas para una serie de ácidos acrílicos <sup>35</sup>.

<b>Ácido acrílico</b>	<b><math>\lambda_{m\acute{a}x}</math> nm</b>	<b>Coefficiente de absorptividad molar <math>\epsilon[M^{-1}cm^{-1}]</math></b>
AA-Tiofeno	306	$1.3 \times 10^2$
AA-ITiofeno	324	$3.6 \times 10^2$
AA-TioCN	340	$6.9 \times 10^3$
AA-ITioCN	362	$3.0 \times 10^4$
AA-Furano	298	$4.0 \times 10^4$
AA-FuCN	334	$4.1 \times 10^4$

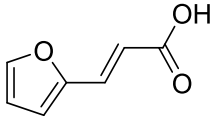
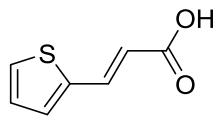
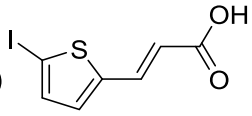
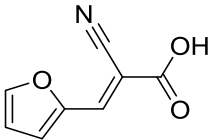
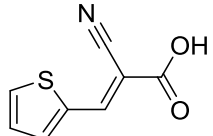
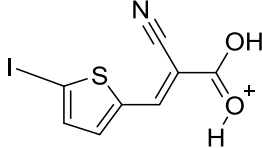
Los cálculos de los respectivos coeficientes de extinción molar fueron realizados con base en la Ley de Beer para soluciones diluidas <sup>35</sup>. Algunos ácidos como el AA-TioCN tienen un máximo de absorción bastante cercano a la longitud de onda característica del láser Nd: YAG, entre tanto los demás ácidos no se alejan mucho de este valor <sup>21</sup>.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS ACRÍLICOS POR ESI-MS

Esta investigación se centra principalmente en la determinación experimental de las afinidades protónicas de los siguientes ácidos acrílicos.

**Figura 7.** Ácidos acrílicos para la determinación de sus afinidades protónicas relativas, por medio del método cinético de Cooks a) AA-Furano, b) AA-Tiofeno, c) AA-ITiofeno, d) AA-FuCN, e) AA-TioCN y f) AA-ITioCN

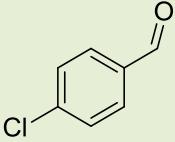
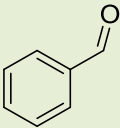
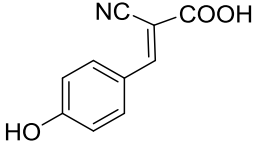
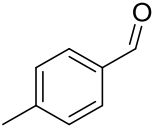
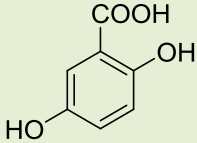
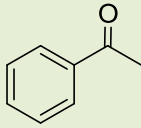
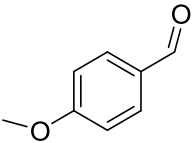
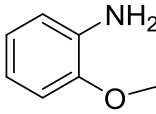
<p>a) </p> <p>Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> Masa monoisotópica: 138,03169 Da ácido (E)-3-(furan-2-il)acrílico AA-Furano</p>	<p>b) </p> <p>Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 154,00855 Da ácido (E)-3-(tiofen-2-il)acrílico AA-Tiofeno</p>
<p>c) </p> <p>Formula química: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>IO<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 279,90549 Da ácido (E)-3-(5-iodotiofen-2-il)acrílico AA-ITiofeno</p>	<p>d) </p> <p>Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub> Masa monoisotópica: 163,02694 Da ácido (E)-2-ciano-3-(furan-2-il)acrílico AA-FuCN</p>
<p>e) </p> <p>Formula química: C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 179,00410 Da ácido (E)-2-ciano-3-(tiofen-2-il)acrílico AA-TioCN</p>	<p>f) </p> <p>Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>INO<sub>2</sub>S Masa monoisotópica: 304,90074 Da ácido(E)-2-ciano-3-(5-iodotiofen-2-il)acrílico AA-ITioCN</p>

Los ácidos acrílicos mostrados, fueron sintetizados por el laboratorio de macromoléculas de la Universidad Nacional de Colombia y sus respectivas afinidades protónicas fueron calculadas por el grupo de investigación GIFTEX de la Universidad Industrial de Santander <sup>35</sup>.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS BASES DE REFERENCIA

A continuación, se presentan las bases de referencia usadas para la determinación experimental de las AP y que provienen de Sigma-Aldrich.

**TABLA 4.** Moléculas orgánicas usadas como bases de referencia (Fuente Hunter and Lias et al<sup>38</sup>)

Base orgánica de Referencia	AP <i>kcal/mol</i> <sup>40</sup>	Base orgánica de referencia	AP <i>kcal/mol</i> <sup>40</sup>
 <p>4-Clorobenzaldehído Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClO Masa monoisotópica: 140,00289 Da</p>	198,7	 <p>Benzaldehído Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O Masa monoisotópica: 106,04186 Da</p>	199,3
 <p>Ácido α-4-hidroxicinámico Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub> Masa monoisotópica: 189,04259 Da</p>	201,0	 <p>4-Metilbenzaldehído Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O Masa monoisotópica: 120,05751 Da</p>	203,6
 <p>Ácido 2,5-dihidroxibenzoico Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> Masa monoisotópica: 154,02661 Da</p>	204,4	 <p>Acetofenona Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O Masa monoisotópica: 120,05751 Da</p>	205,8
 <p>4-Anisaldehído Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> Masa monoisotópica: 136,05243 Da</p>	210,6	 <p>2-Anisidina Fórmula química: C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO Masa monoisotópica: 123,06841 Da</p>	216,3

Las moléculas de referencia de la Tabla 4 fueron escogidas principalmente por su afinidad protónica las cuales han sido previamente calculadas y reportadas en la literatura <sup>38</sup>, algunas se obtuvieron a través de otros métodos analíticos, lo cual limita en parte la exactitud del método cinético. La caracterización se realizó por espectrometría de masas, en un espectrómetro Bruker *ESI-MS/MS Ion Trap Amazon (+)* con fuente electrospray con el fin de garantizar la presencia del ion molecular protonado de cada una de las referencias.

### **2.3. PREPARACIÓN DE MEZCLAS BINARIAS Y TOMA DE ESPECTROS**

Se prepararon soluciones stock 2,0 mM, de un serie de moléculas orgánicas de referencia (Véase Tabla 4) y de cada uno de los ácidos acrílicos (Figura 7) empleando como disolvente una mezcla de acetonitrilo/agua en (1:1, v/v, grado *HPLC*) con adición de ácido fórmico (FA) al 0,03%. Las mezclas binarias (Base orgánica + ácido) fueron preparadas añadiendo volúmenes iguales a un vial de 2 mL y posteriormente fueron analizadas en un espectrómetro de masas Bruker *ESI-MS/MS Ion Trap Amazon (+)* equipado con una fuente iónica de electronebulización (ESI) y una trampa iónica cuadrupolar hiperbólica (QIT).

Para la implementación del método cinético se operó la fuente ESI en modo positivo con barrido de masas entre 100 - 400 Dalton (Da) ya que todos los iones esperados están en este rango; el flujo de la muestra fue de 30  $\mu$ L/min; la diferencia de potencial aplicada 4,5 kV; se usó nitrógeno como gas nebulizador, a una presión de 5,0 psi, y como gas de secado en contracorriente, a un flujo de 3,0 L/min. Bajo las anteriores condiciones se tomaron espectros de masas para los ácidos acrílicos, así como para las referencias. De igual forma, se registraron los respectivos espectros de masas para las mezclas binarias ácido acrílico/referencia (Ver Anexo 1).

Para cada mezcla binaria, se aisló el respectivo dímero protonado  $[\text{Ref}\cdots\text{H}\cdots\text{Ácido}]^+$  con una ventana de 2,0 Da, posteriormente se fragmentó mediante CID<sup>39</sup> usando helio como gas de colisión a una presión de  $1,5\times 10^{-4}$  torr. Los espectros MS/MS del dímero protonado (Véase Ecuación 7) se tomaron a tres energías de colisión: 1,25 eV; 1,35 eV y 1,45 eV respectivamente.

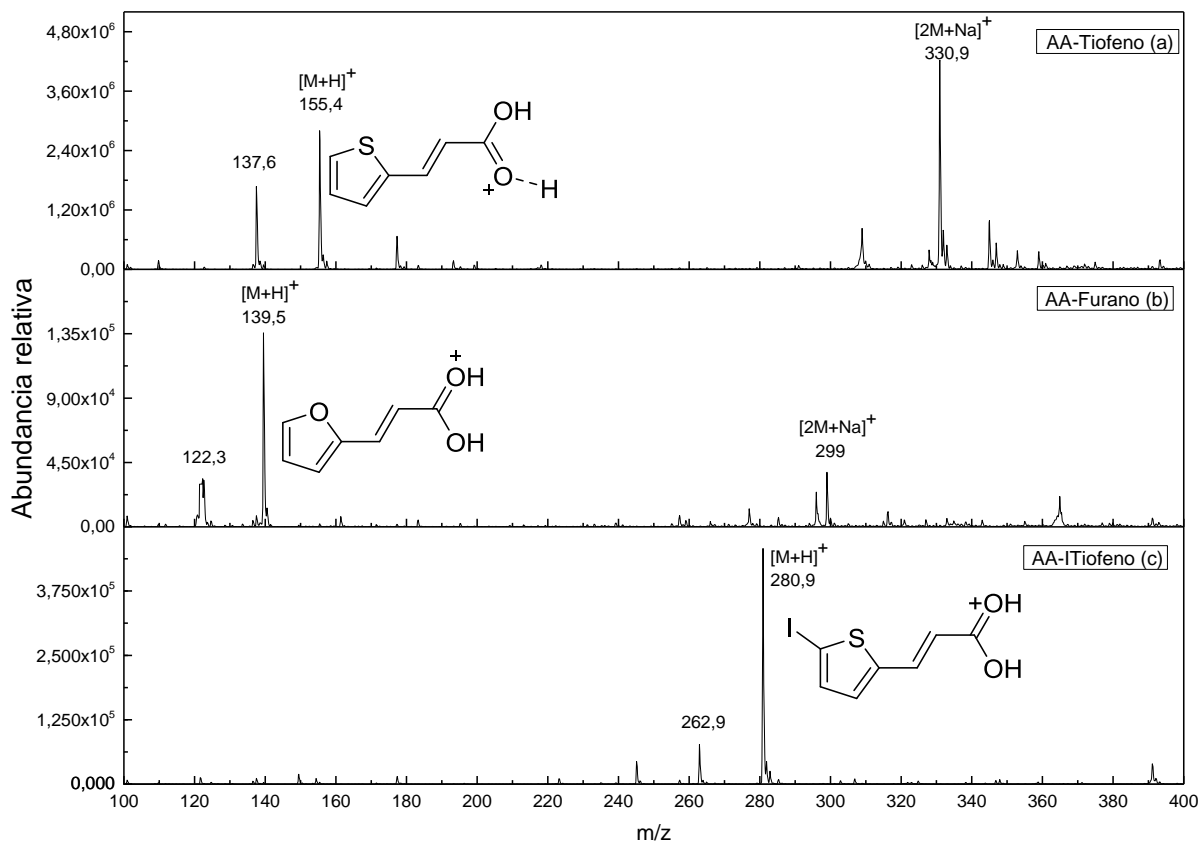
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS ACRÍLICOS

La Figura 8 que se observa más abajo, contiene los espectros de masas de los ácidos acrílicos tomados utilizando ESI en modo positivo. En general, los espectros presentan señales correspondientes a las moléculas protonadas, además, presentan iones fragmento producto de deshidratación de los ácidos y aductos de Na. Todos los ácidos mostrados presentaron señales producto de la deshidratación del ion molecular, así por ejemplo, el espectro del AA-TioCN muestra un pico de base correspondiente al producto de deshidratación del ácido en  $m/z$  162,4 correspondiente al ion  $[M+H - H_2O]^+$ , seguido del ion molecular protonado  $[M+H]^+$  en  $m/z$  180,4. Por el contrario, a excepción del AA-ITioCN, todos los demás ácidos presentan el pico base correspondiente al ion  $[M+H]^+$ .

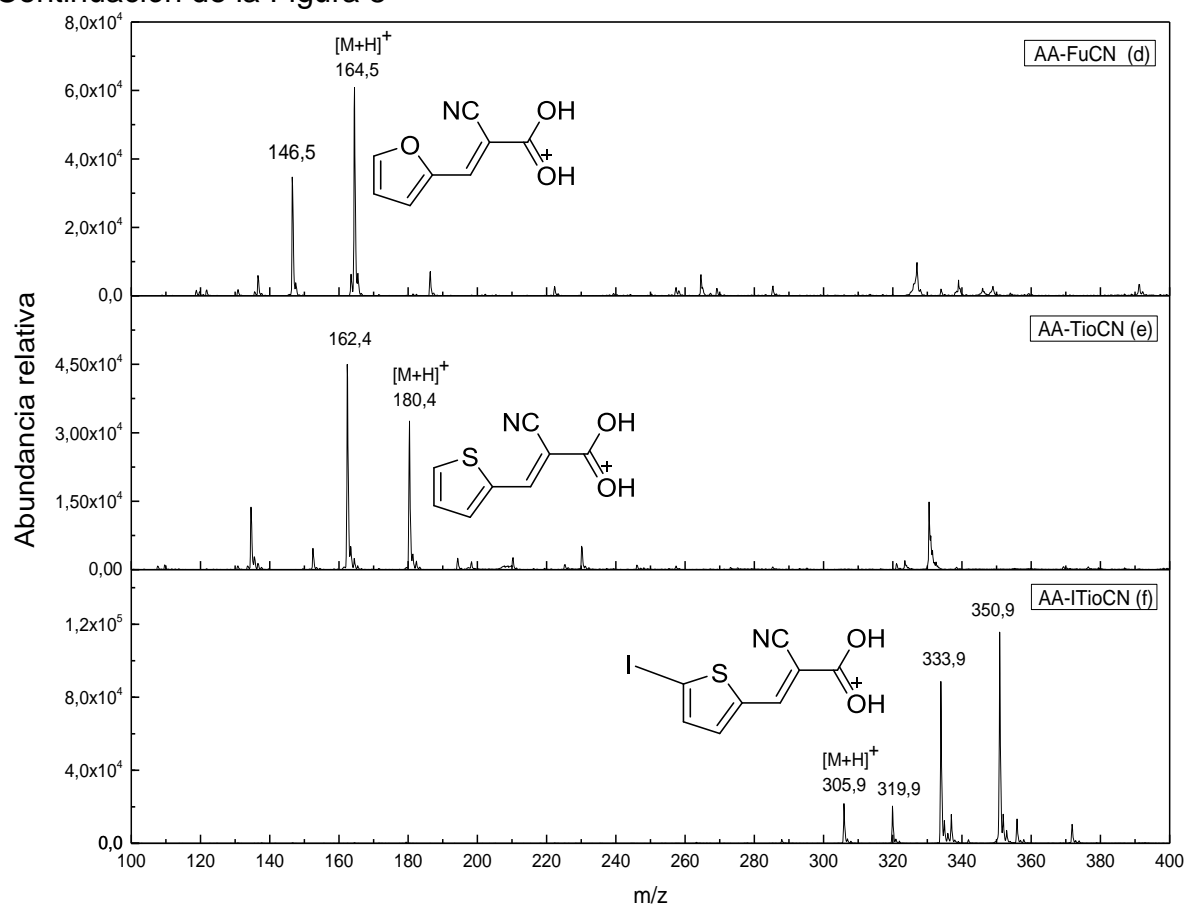
El derivado AA-Tiofeno presenta el ion  $[2M + Na]^+$  (El sodio se encuentra presente en el solvente) como pico de base en  $m/z$  330,9 seguido por la señal correspondiente a la molécula protonada  $[M+H]^+$  en  $m/z$  155,4 y a su producto de deshidratación  $[M+H - H_2O]^+$ , en  $m/z$  137,6. Finalmente el derivado AA-ITioCN con presenta una señal correspondiente a la molécula protonada en  $m/z$  305,9 y tres señales de mayor abundancia en  $m/z$  319,9, 333,9 y 350,9 (Figura 8) de origen desconocido que pueden corresponder a impurezas producto de la reacción de síntesis o por la formación de Clúster en los procesos de formación de los iones en la interfaz del ESI.

**Figura 8.** Espectros ESI-MS de los ácidos empleados: a) **AA-ITioCN**, b) ácido **AA-TioCN**, c) ácido **AA-FuCN**, d) ácido **AA-ITiofeno**, e) ácido **AA-Furano** y f) ácido **AA-Tiofeno**.

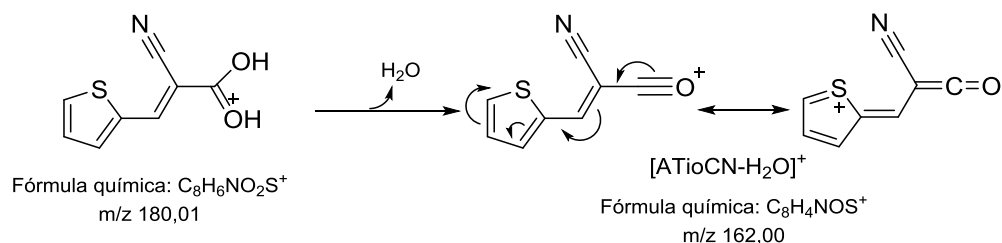


El espectro del AA-FuCN con  $m/z$  164,5 muestra baja formación de clústeres y más prevalencia del catión molecular, siendo esto una característica importante para estudios posteriores en MALDI para este ácido. El hecho de que en la mayoría de los espectros ESI de los ácidos acrílicos se observe una reacción de deshidratación, o pérdida de una molécula neutra de agua, se debe a un aumento moderado de la energía interna de los iones durante el proceso ESI que puede causar descomposición de la molécula.

Continuación de la Figura 8



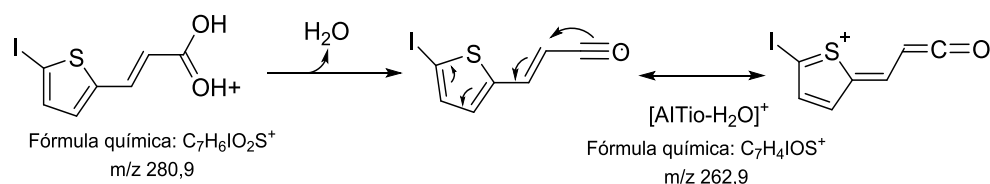
Se presentó un defecto de masa en algunos espectros como el del AA-Furano y el AA-Tiofeno, donde las señales se encuentran desviadas en hasta 0,5 Da, lo cual se concluyó que es debido a un error sistemático del equipo, el cual debe corregirse en futuras mediciones. Para el caso de la deshidratación del ácido AA-TioCN, se planteó un posible mecanismo:



**Esquema 1.** Mecanismo propuesto para la deshidratación del AA-TioCN y formación del ion m/z 162,00 debido a la estabilización de carga favorecida por la presencia de un sistema aromático como el tiofeno.

Según el mecanismo planteado, el ion producto de la deshidratación, tiene estabilidad debido a la deslocalización de la carga a través de todo el sistema aromático dado que el azufre en los derivados del tiofeno, posee orbitales  $3d$  vacíos que favorecen este proceso. Los ácidos acrílicos derivados del furano también presentan deshidratación del ion molecular protonado, este hecho puede explicarse debido a la capacidad de almacenamiento y estabilización de la carga en el oxígeno. La degradación de los iones por deshidratación es un efecto indeseable para una matriz, debido a que habría una considerable pérdida de iones de la matriz capaces de aportar una carga sobre el analito en los procesos de transferencia protónica que se presentan en MALDI.

El ion molecular del ácido AA-ITiofeno  $m/z$  280,9 se observa en el espectro a su vez acompañado una deshidratación o pérdida de una molécula de agua 18 Da formando así el ion  $m/z$  262,9 el cual por resonancia puede ser estabilizado debido a la presencia del anillo tiofeno, como se observa en el siguiente esquema propuesto.



**Esquema 2.** Mecanismo propuesto para la deshidratación del AA-ITiofeno y formación del ion  $m/z$  262,90 debido a la estabilización de carga favorecida por la presencia de un sistema aromático como el tiofeno.

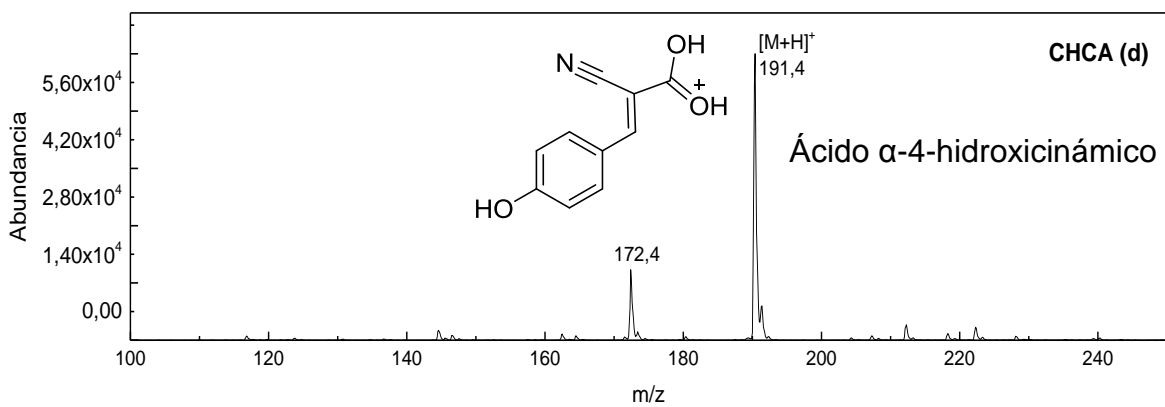
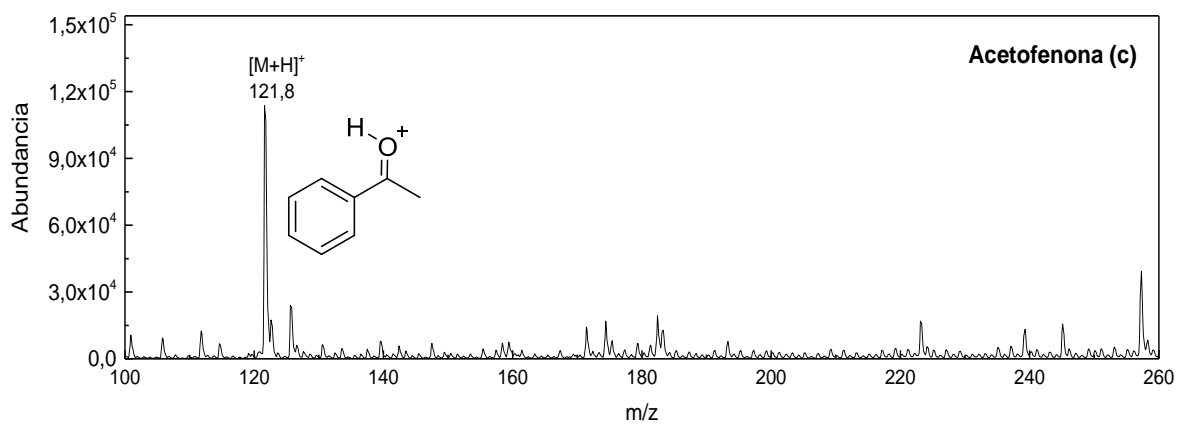
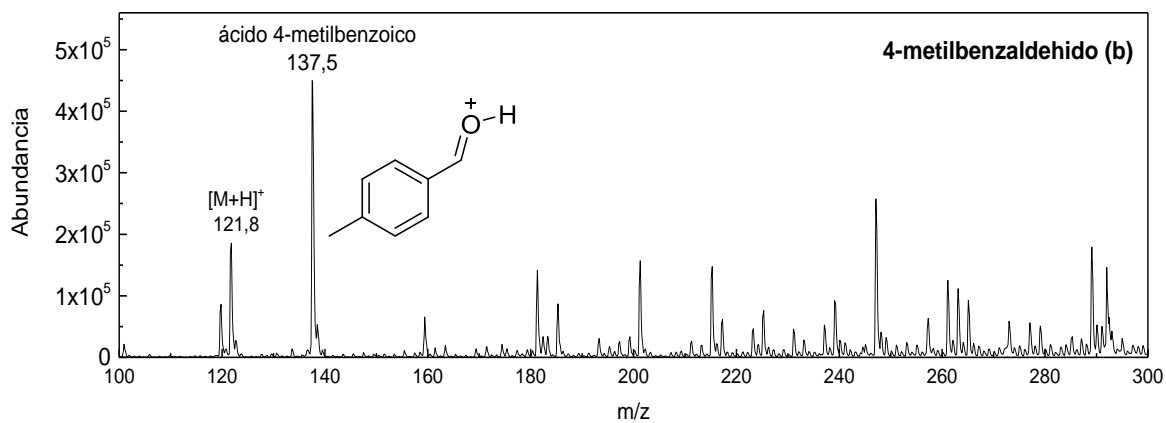
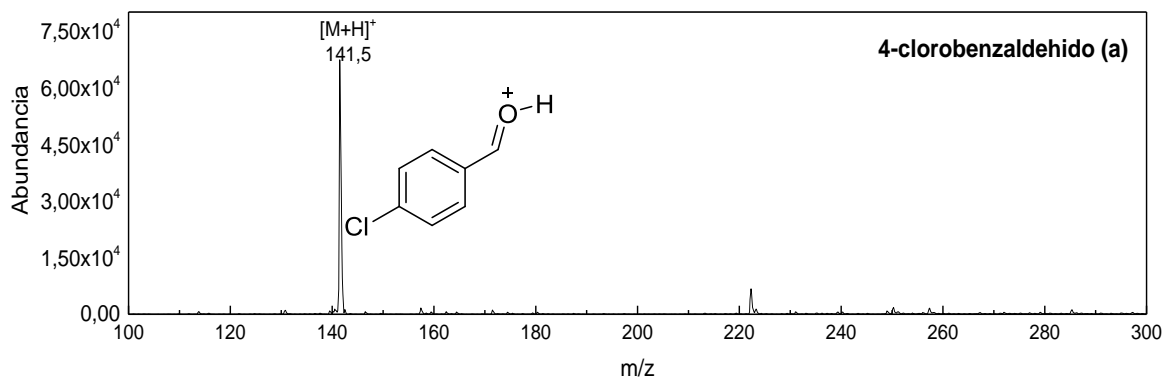
El espectro del AA-ITioCN (masa monoisotópica de 305,90802 Da), presentó los iones  $m/z$  319,9,  $m/z$  333,9 y  $m/z$  350,9 los cuales podrían haberse formado durante el proceso de síntesis, dichas moléculas pueden poseer casi las mismas propiedades de solubilidad o polaridad respecto al ácido de interés. Este tipo de eventualidades no afectan directamente al método cinético, ya que éste es un método que no depende de la pureza de los reactivos debido a que el aislamiento del dímero se lleva a cabo mediante MS/MS.

En el método cinético, las propiedades termoquímicas se estiman a través de mediciones de las abundancias relativas de los iones fragmento. A partir de la relación entre las abundancias relativas de los iones fragmento es posible obtener información termoquímica, si se consideran los argumentos presentados anteriormente (Véanse Ecuaciones 7-18).

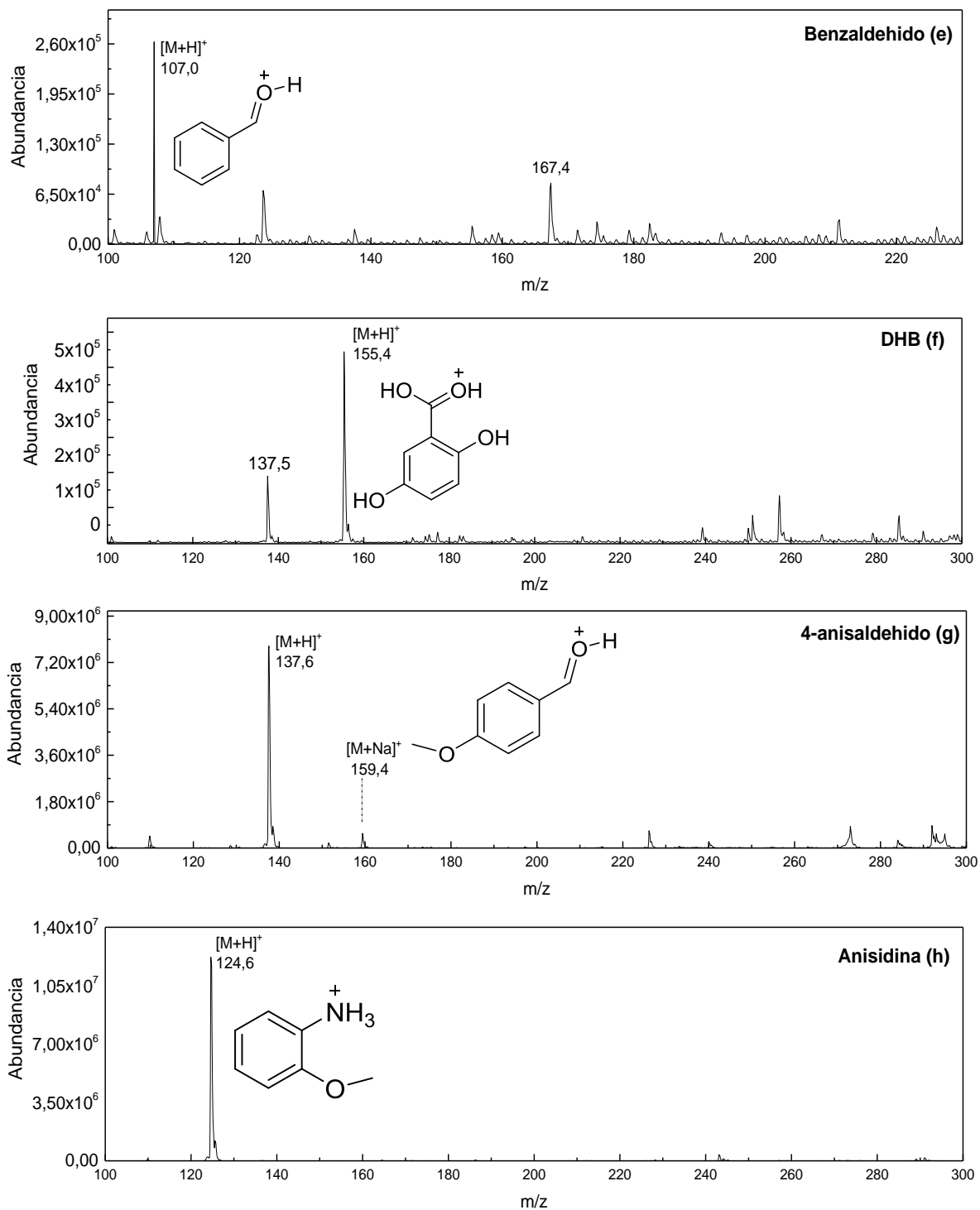
### **3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE REFERENCIA**

A continuación, se presentan ocho espectros de masas de las bases de referencias utilizadas en la determinación de las AP de los ácidos acrílicos. Estos espectros fueron tomados con un tiempo de un minuto y los iones fueron generados en una fuente ESI operando en modo positivo, el flujo de la solución fue de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , usando nitrógeno como gas nebulizador. Como mezcla de solvente se utilizó ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  en ácido fórmico al 0,03%. El potencial de electrodo nebulizador se calibró en 4,5 kV. Estas moléculas fueron escogidas debido a que cada una cuenta con una afinidad protónica determinada con anterioridad <sup>38</sup> y están en el rango de APs que va desde 198 a 216 kcal/mol, cubriendo así el rango de AP teóricas que presenta la familia de ácidos acrílicos a evaluar.

Algunos espectros ESI de las referencias presentadas se observaron con abundancias del orden de  $10^4$  como el ácido  $\alpha$ -4-hidroxicinámico (CHCA) y el 4-clorobenzaldehído (Figura 11), a diferencia de los demás espectros, cuyas abundancias relativas están por encima del orden de  $10^5$ . Lo anterior se debió quizás a fallas técnicas por las cuales atravesaba el detector del espectrómetro de masas el cual estaba presentando baja sensibilidad que posteriormente fue corregida. Aun así los experimentos se llevaron a cabo sin demás contratiempos y obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



**Figura 11.** Espectros ESI-MS de ocho bases de referencia usadas en la determinación de las AP de una familia de ácidos acrílicos. a) 4-Clorobenzaldehído, b) 4-Metilbenzaldehído, c) Acetofenona, d) CHCA, e) Benzaldehído, f) DHB, g) 4-Anisaldehído, h) Anisidina.



La caracterización de las bases de referencia se hace con el fin de evaluar el *background* o espectro base de cada una de estas moléculas. Los espectros de masas fueron medidos bajo las mismas condiciones experimentales descritas con anterioridad en una fuente ESI. La mayoría de las bases evaluadas muestran un espectro definido prevaleciendo el ion molecular protonado  $[M+H]^+$  y con buena resolución,

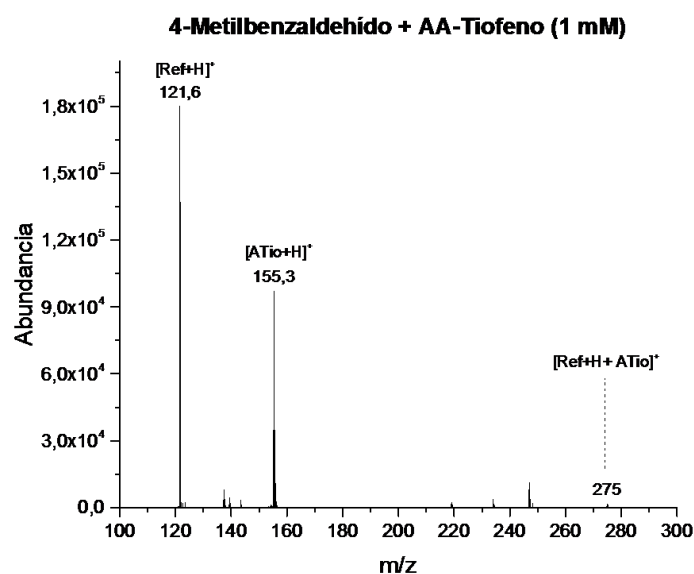
Una de las ventajas del método cinético es que no está limitado por la pureza de los reactivos, gracias a que se usa con iones específicos o seleccionados y con una relación  $m/z$  definida, éstos son aislados en una trampa de iones para su posterior fragmentación, por lo tanto, el factor pureza en los reactivos no es un factor decisivo al momento de aplicar el del método cinético <sup>22</sup>.

La mayoría de espectros, presentan una alta relación señal ruido como se puede observar en los respectivos espectros, sin embargo, el 4-metilbenzaldehído tiende a oxidarse en medio ácido muy rápidamente <sup>32</sup>, generando el derivado ácido 4-metilbenzoico ( $m/z$  137,5). Aun así pudo usarse como base de referencia, el método cinético muestra buenos resultados aún para pequeñas cantidades de muestra, es simple, es rápido y aplicable a las muestras polares y no volátiles sin derivatización. Otra ventaja importante del método es la de ser normalmente sensible a pequeñas diferencias en energía ( $\pm 0,1$  kcal/mol). Por otra parte, las muestras en general no necesitan ser purificadas específicamente, debido a que el aislamiento del dímero se lleva a cabo mediante MS/MS, sin embargo, el método se basa en ciertas aproximaciones y los resultados obtenidos son buenas aproximaciones a los valores reales <sup>5,6</sup>.

### 3.3. MEZCLAS BINARIAS Y DISOCIACIONES INDUCIDAS POR COLISIÓN

Se obtuvieron espectros ESI(+) para cada una de las mezclas binarias bajo las mismas condiciones de análisis descritas previamente, donde pudo aislar  $[\text{Ref--H--Ácido}]^+$ , estas mezclas se prepararon a partir de volúmenes iguales de solución 2,0 mM tanto del compuesto de referencia como del derivado del ácido acrílico. De esta forma cada mezcla posee una concentración 1,0 mM respecto a cada uno de los dos componentes (Ver anexo). En la Figura 12 se presenta el espectro ESI de una mezcla binaria usada en la determinación de la AP del AA-Tiofeno.

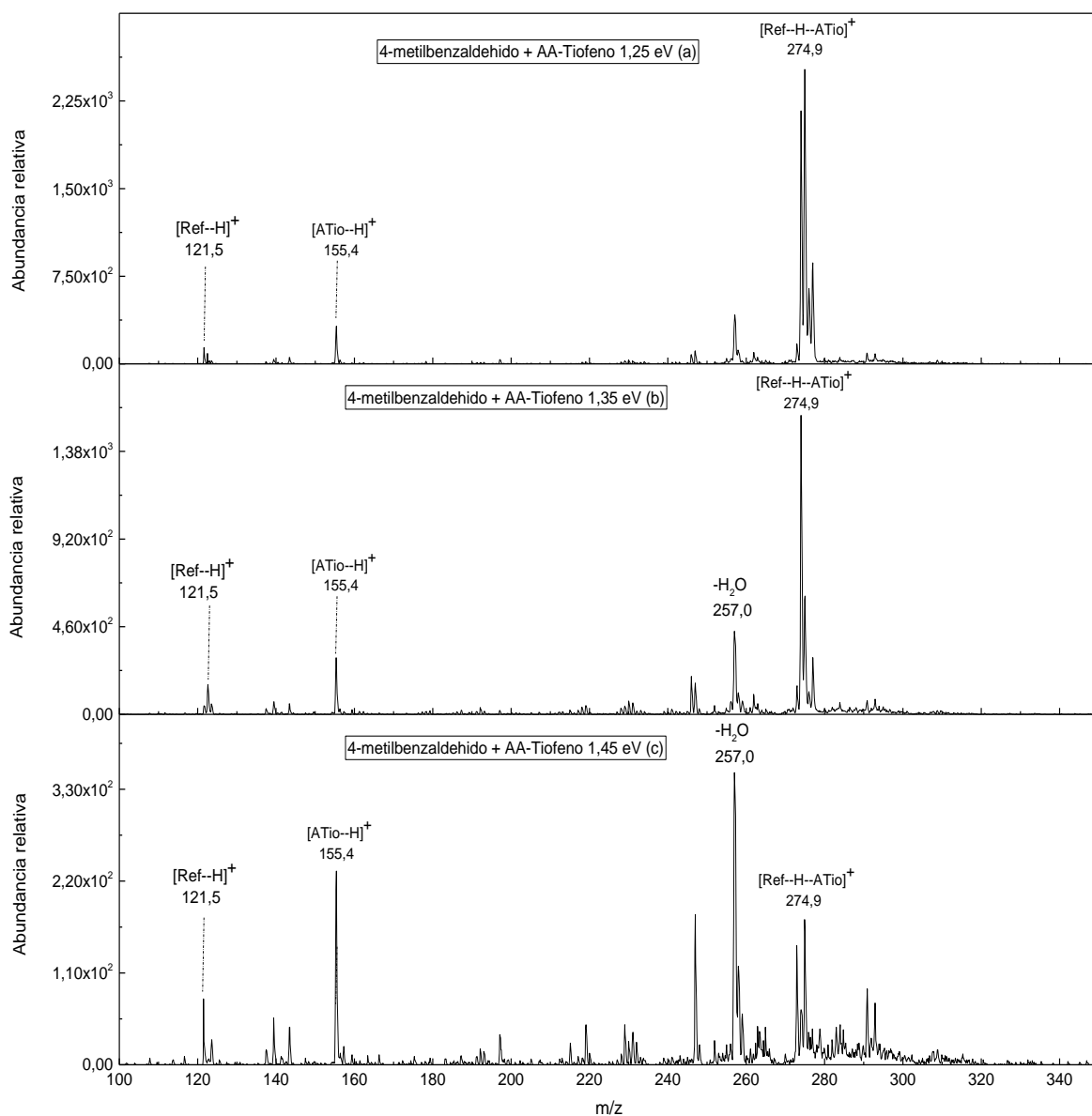
**Figura 12.** Espectro ESI-MS de una mezcla binaria 1 mM de 4-metilbenzaldehído (base de referencia) y el AA-Tiofeno de concentración 1 mM en solvente acetonitrilo/agua de relación 1:1 y FA al 0,03%



En el espectro de la Figura 12, se observa la aparición del 4-metilbenzaldehído ( $m/z$  121,6) usado como referencia y el AA-Tiofeno ( $m/z$  155,3). El dímero protonado  $[\text{4-metilbenz}\cdots\text{H}\cdots\text{ATio}]^+$  con  $m/z$  275, se aisló en la trampa de iones (con una ventana de 2 Da) y se fragmentó mediante colisiones activadas (CID) a tres energías (1,25 eV, 1,35 eV y 1,45 eV) empleando helio como gas buffer o

gas de colisión, a una presión de  $1,5 \times 10^{-6}$  mbar, este confinamiento de los iones en la fase gaseosa, permite la determinación de propiedades termoquímicas como afinidad protónica relativa de cada ácido acrílico al evaluarse la relación en las abundancias de cada ion fragmento (Véase Ecuación 18). En la Figura 14, se presenta el espectro  $MS^2$ , a tres energías de colisión, del dímero protonado [4-metilbenz...H...ATio]<sup>+</sup>.

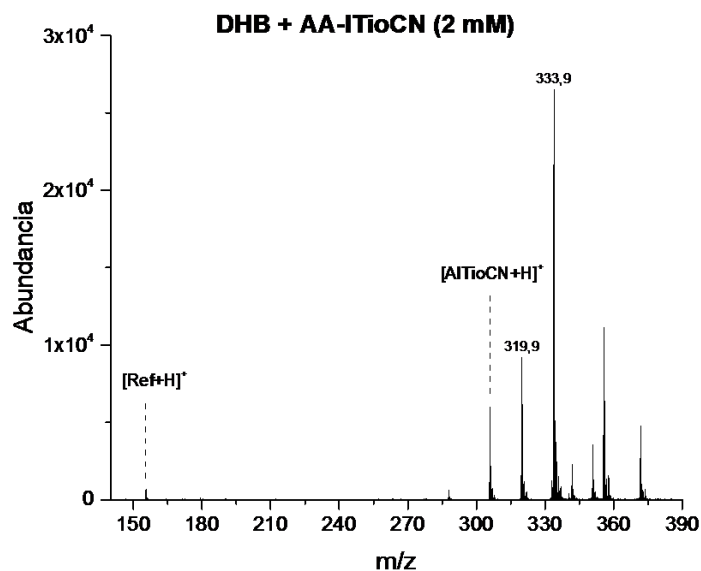
**Figura 13.** Espectros de fragmentación del dímero protonado ( $m/z$  275) usando 4-metilbenzaldehído como referencia y AA-Tiofeno, mediante colisiones activadas CID a tres energías de disociación a) 1,25 eV; b) 1,35 eV; c) 1,45 eV.



A medida que aumenta la energía de colisión, se observa una disminución en la abundancia relativa del dímero protonado debido al aumento de la energía cinética del ión, como consecuencia de la aplicación del voltaje de excitación, lo que causa incremento de las colisiones con el He que en su turno provocan fragmentación. Esto último se ve reflejado en el aumento de la abundancia relativa de los fragmentos del dímero, en  $m/z$  121,5 y 155,4 que corresponden al 4-metilbenzaldehído y al AA-tiofeno protonados, respectivamente. El aumento de la energía interna del dímero protonado también puede resultar en otros canales de reacción por ejemplo la pérdida de una molécula de agua para generar el ion en  $m/z$  257.

En la Figura 14 se muestra el espectro ESI (+) de una mezcla binaria entre el DHB y el AA-ITioCN.

**Figura 14.** Espectro ESI-MS de una mezcla binaria compuesta por DHB y AA-ITioCN (2 mM), se tomó un espectro de un minuto con un flujo de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  y un potencial de electrodo de 4,5 kV.



El espectro de una mezcla binaria de AA-ITioCN muestra una mayor abundancia de los iones en  $m/z$  de 319,9 y 333,9 que podrían ser impurezas de la síntesis del ácido AA-ITioCN, se observa también una muy baja abundancia de la molécula

protonada de referencia (DHB). Cuando se intentó aislar el dímero, presente en muy baja abundancia, no se observaron las señales correspondientes a los precursores por lo que no fue posible usar el DHB para la determinación de la AP del AA-ITioCN.

Probablemente, el AA-ITioCN no forma fácilmente dímeros protonados en fase gaseosa debido a que se observó una muy baja abundancia del dímero, además no se pudo establecer una posible ruta de fragmentación para este dímero protonado. Por lo anterior, no fue posible determinar la AP de éste ácido. Las mezclas binarias adicionales y los espectros CID de cada uno de los ácidos acrílicos evaluados en este proyecto y usados para la determinación de las AP de los mismos, son presentados en los anexos 1 y 2 respectivamente.

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LAS AP DE LOS ÁCIDOS ACRÍLICOS A TRES ENERGÍAS DE COLISIÓN 1,25 eV; 1,35 eV y 1,45 eV

Para la determinación de la AP de los ácidos acrílicos usando el método cinético se midieron las abundancias de los iones fragmento producidos de la disociación competitiva del dímero protonado  $[\text{Ref}\cdots\text{H}\cdots\text{Ácido}]^+$  a tres diferentes energías de disociación. Los resultados de estas mediciones se consignan en las Tablas 5-18 que se incluyen a continuación.

**TABLA 5.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[\text{Ref}+\text{H}]^+$  y  $[\text{ATio}+\text{H}]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Tiofeno a una energía de 1,25 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [ATio+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/ATioH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4- Clorobenzaldehído	20	156	4187	-2,1	198,7
4- Metilbenzaldehído	140	269	2519	-0,7	203,6
Acetofenona	302	207	2203	0,4	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	167	47	620	1,3	208,8
4-Anisalaldehído	687	102	4357	1,9	210,6

**TABLA 6.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[\text{Ref}+\text{H}]^+$  y  $[\text{ATio}+\text{H}]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Tiofeno a una energía de 1,35 eV

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [ATio+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/ATioH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4-Clorobenzaldehído	43	144	586	-1,2	198,7
4-Metilbenzalaldehído	247	297	1569	-0,2	203,6
Acetofenona	301	214	565	0,3	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	377	151	821	0,9	208,8
4-Anisalaldehído	847	251	3232	1,2	210,6

**TABLA 7.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[\text{Ref}+\text{H}]^+$  y  $[\text{ATio}+\text{H}]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Tiofeno a una energía de 1,45 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [ATio+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/ATioH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4-Clorobenzaldehído	41	1367	236	-3,5	198,7
4-Metilbenzalaldehído	30	232	174	-2,0	203,6
Acetofenona	294	209	164	0,3	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	4184	432	200	2,3	208,8
4-Anisalaldehído	2400	103	1083	3,1	210,6

Los productos de fragmentación del dímero protonado  $[\text{Ref}\cdots\text{H}\cdots\text{ATio}]^+$  fueron analizados y tabulados como se muestra en las Tablas 5-7. Este experimento se realizó a tres energías de fragmentación en una trampa de iones usando helio como gas de colisión.

Para todas las referencias usadas se observan diferentes patrones de fragmentación, que difieren notablemente en el número de iones fragmento detectado, que depende en gran medida al tipo de molécula de referencia ya que tienen diferentes propiedades termoquímicas en fase gaseosa.

Las siguientes tablas muestran un patrón similar y, en ellas, se presenta la información termoquímica obtenida para los demás ácidos acrílicos evaluados.

**TABLA 8.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AITio+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-ITiofeno a una energía de 1,25 eV

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AITio+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AITioH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4-Metilbenzaldehído	28	390	68	-2,6	203,6
Acetofenona	162	87	67	-0,1	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	2361	222	30	2,4	208,8
4-Anisaldehydo	221	6	327	3,6	210,6

**TABLA 9.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AITio+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-ITiofeno a una energía de 1,35 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AITio+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AITioH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4-Metilbenzaldehído	23	405	41	-2,9	203,6
Acetofenona	145	209	28	-0,4	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	2705	174	44	2,7	208,8
4-Anisaldehydo	324	7	301	3,8	210,6

**TABLA 10.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AITio+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-ITiofeno a una energía de 1,45 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AITio+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AITioH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4-Metilbenzaldehído	37	430	34	-2,5	203,6
Acetofenona	123	191	27	-0,4	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	2328	184	12	2,5	208,8
4-Anisaldehydo	-----	-----	No se observa	-----	-----

**TABLA 11.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AFu+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Furano a una energía de 1,25 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AFu+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AFuH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
CHCA	13	4102	548	-5,8	203,6
DHB	155	6	1046	-2,4	204,4
Acetofenona	816	567	114	0,4	205,8
<i>p</i> -cloroanilina	1556	295	1445	1,7	208,8

**TABLA 12.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AFu+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Furano a una energía de 1,35 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AFu+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AFuH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
CHCA	33	6460	363	-5,3	203,6
DHB	11	244	117	-3,1	204,4
Acetofenona	109	35	51	1,1	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	320	177	115	0,6	208,8

**TABLA 13.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AFu+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-Furano a una energía de 1,45 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AFu+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AFuH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
CHCA	61	6788	198	-4,7	203,6
DHB	10	190	41	-2,9	204,4
Acetofenona	1026	412	58	0,9	205,8
<i>p</i> -Cloroanilina	2041	407	28	1,6	208,8

**TABLA 14.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[ATioCN+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-TioCN a una energía de 1,25 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [ATioCN+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/ATioCNH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
CHCA	10905	1084	993	2,3	201,0
DHB	1337	48	1347	3,3	204,4
Acetofenona	797	30	1091	3,3	205,8
4-Anisaldehído	845	10	133	4,4	208,8

**TABLA 15.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[ATioCN+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-TioCN a una energía de 1,35 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [ATioCN+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/ATioCNH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
CHCA	13588	1634	433	2,1	201,0
DHB	2102	64	550	3,5	204,4
Acetofenona	250	14	521	4,0	205,8
4-Anisaldehído	1100	4	7150	5,6	208,8

**TABLA 16.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[ATioCN+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-TioCN a una energía de 1,45 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [ATioCN+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/ATioCNH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
CHCA	13588	1634	433	2,2	201,0
DHB	2102	64	550	3,2	204,4
Acetofenona	250	14	521	4,1	205,8
4-Anisaldehído	1100	4	7150	5,6	208,8

**TABLA 17.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AFuCN+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-FuCN a una energía de 1,25 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AFuCN+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AFuCNH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4-Clorobenzaldehído	17	42	135	-0,9	198,7
Benzaldehído	48	73	304	-0,4	199,3
CHCA	8584	684	441	2,5	201,0
DHB	798	10	94	4,4	204,4

**TABLA 18.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AFuCN+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-FuCN a una energía de 1,35 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AFuCN+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia a dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AFuCNH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
<b>4-Clorobenzaldehído</b>	39	97	101	-0,9	198,7
<b>Benzaldehído</b>	82	71	105	0,1	199,3
<b>CHCA</b>	9249	828	89	2,4	201,0
<b>4-Metilbenzalaldehído</b>	150	9	65	2,8	203,6
<b>DHB</b>	726	5	0	4,9	204,4

**TABLA 19.** Relación de abundancias de los iones fragmento  $[Ref+H]^+$  y  $[AFuCN+H]^+$  y la AP de cada una de las bases de referencia usadas para determinar la AP del AA-FuCN a una energía de 1,45 eV.

<i>Referencia</i>	<i>Abundancia [Ref+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia [AFuCN+H]<sup>+</sup></i>	<i>Abundancia dímero</i>	<i>Ln(RefH<sup>+</sup>/AFuCNH<sup>+</sup>)</i>	<i>AP referencia (kcal/mol)</i>
4-Clorobenzaldehído	65	152	37	-0,9	201,0
Benzaldehído	70	82	47	-0,2	204,4
CHCA	8031	673	18	2,5	205,8
DHB	755	11	13	4,2	208,8

Las moléculas de referencia usadas para determinar la AP de cada ácido acrílico se muestran en las tablas 5-19. Los dímeros protonados fueron generados en una fuente ESI y su fragmentación se llevó a cabo en una trampa de iones. Las abundancias relativas presentada por cada especie protonada fue usada para determinar la AP de cada ácido acrílico mediante una gráfica del logaritmo natural de la relación de abundancias de cada especie protonada contra la AP de las bases de referencia (Tabla 4).

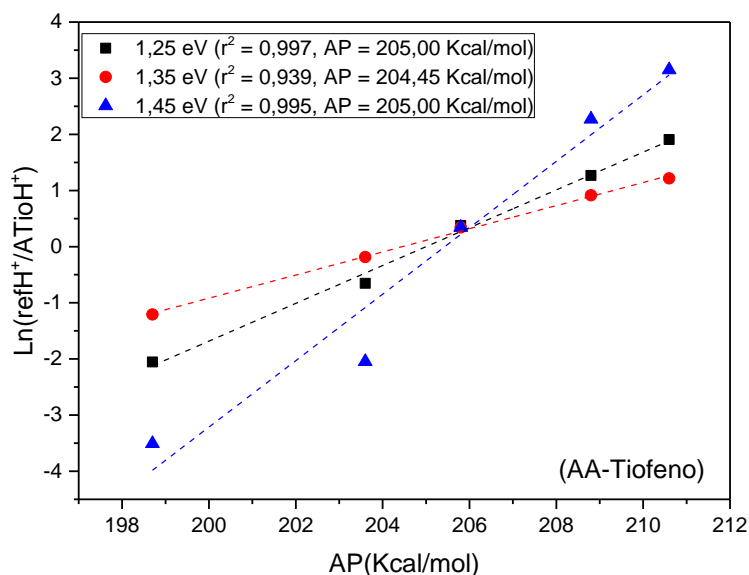
### 3.4.1 Gráficas del $\ln(AH^+/BH^+)$ vs afinidad protónica de las referencias.

A partir de una regresión lineal (Gráficas 16-20) se determinó la ecuación de la recta para cada energía de disociación y se calculó la AP de cada ácido extrapolando la gráfica en el eje X (intercepto con el eje X) y despejando la Ecuación 18 usando para esto la pendiente de la gráfica y su intercepto con el eje Y.

Los valores de AP aparente no son función de la energía de colisión puesto que son propiedades intrínsecas de las moléculas dependientes de su estructura y no de factores externos, por lo tanto, se reporta un promedio de valores de AP obtenidos a diferentes energías de colisión para cinco ácidos acrílicos evaluados.

#### Curvas del ácido AA-tiofeno a tres energías de colisión.

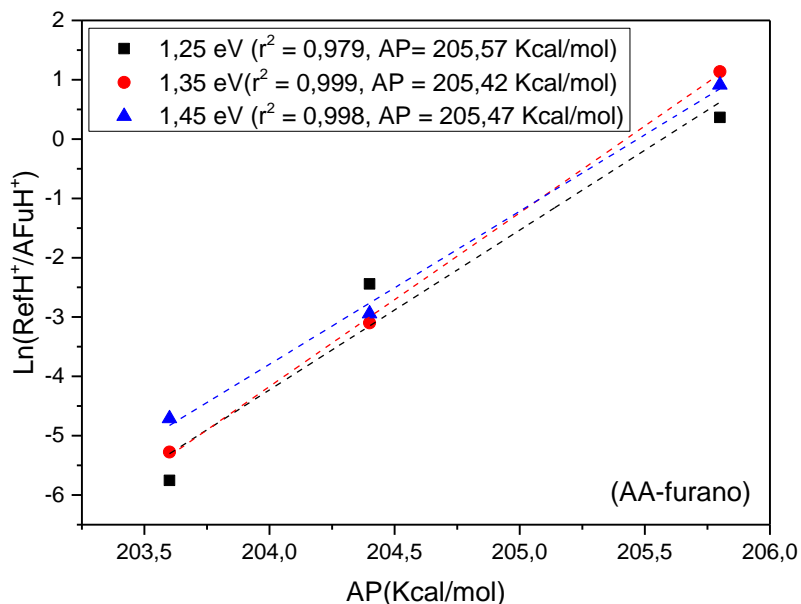
**Figura 15.** Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-tiofeno Vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,35 y 1,45 eV.



La gráfica del logaritmo natural de la relación de iones fragmento de la fragmentación del dímero protonado  $[\text{Ref}\cdots\text{H}\cdots\text{Ácido}]^+$  muestra coeficientes de correlación ( $r^2$ ) aceptables, además de que los valores experimentales de AP no difieren mucho entre sí ( $<0,6$  kcal/mol) para el AA-Tiofeno, además la AP promedio para este ácido es muy similar al valor calculado mostrando una diferencia de tan solo 3,41 kcal/mol lo cual brinda al método cinético una mayor confiabilidad para el cálculo de información termoquímica de iones en fase gaseosa.

### Curvas del ácido AA-Furano a tres energías de colisión.

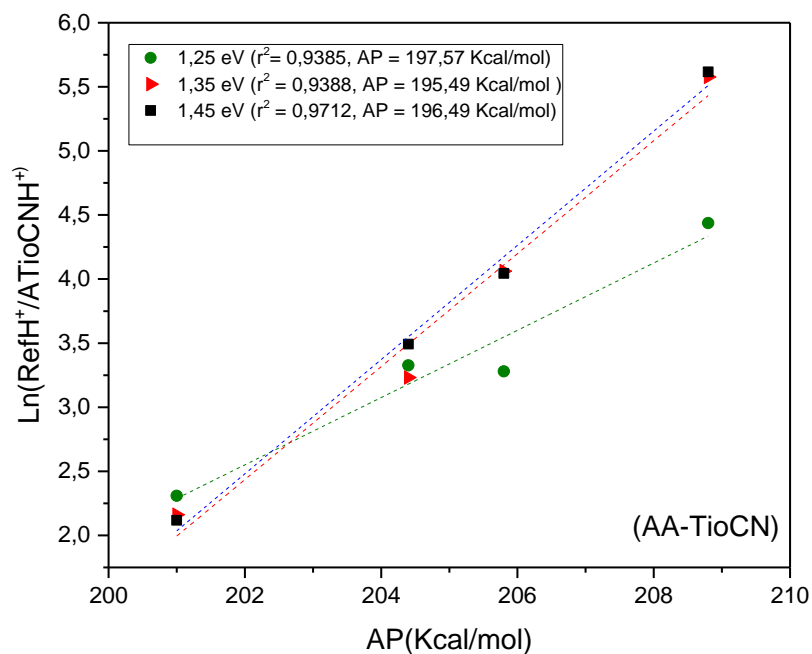
**Figura 16.** Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-Furano Vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,35 y 1,45 eV.



La gráfica 16 muestra buena correlación entre los puntos donde se muestran coeficientes de correlación mayores que 0,97. El promedio de AP experimental para el AA-Furano fue de 205,49 kcal/mol mostrando así una diferencia de tan solo 2,75 kcal/mol respecto al valor calculado ( $AP_{\text{teo}} = 208,24$  kcal/mol), mostrando así mayor exactitud en esta determinación en comparación con el AA-tiofeno que mostró una mayor precisión pero una menor exactitud.

## Curvas del ácido AA-TioCN a tres energías de colisión.

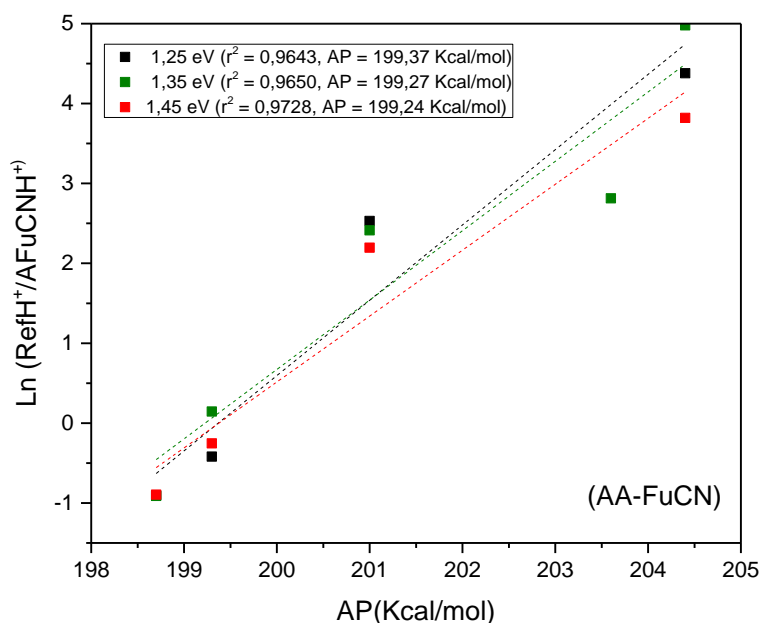
Figura 17. Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-TioCN Vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,35 y 1,45 eV.



El cálculo teórico de AP para el AA-TioCN fue de 208,07 kcal/mol por lo cual se escogieron referencias con AP reportadas muy cercanas a este valor, sin embargo, experimentalmente se observó que este ácido presentó una  $AP_{\text{exp}}$  de 196,51 kcal/mol dando así una diferencia de 11,56 kcal/mol siendo ésta la más grande reportada en este estudio. Las referencias usadas tienen una AP por encima del encontrado para el AA-TioCN, por lo cual es recomendable realizar un posterior análisis empleando referencias con AP menores que 196 kcal/mol, sin embargo esto podría arrojar espectros ESI con muy baja presencia de iones protonados.

## Curvas del ácido AA-FuCN a tres energías de colisión.

**Figura 18.** Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-FuCN Vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,35 y 1,45 eV.

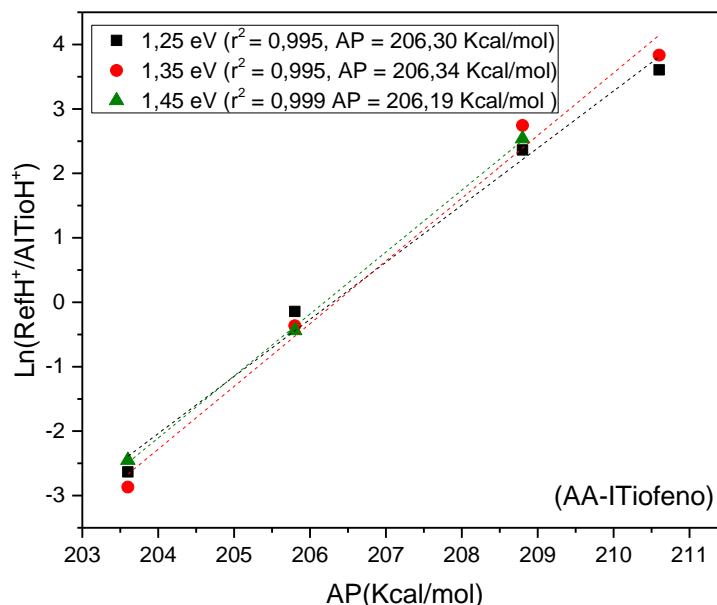


La AP teórica del AA-FuCN ( $AP_{teo} = 197,96$  kcal/mol), mostró una diferencia de 1,33 kcal/mol respecto al cálculo experimental promedio ( $AP_{exp} = 199,29$  kcal/mol), lo que concuerda con una buena exactitud en esta determinación, así mismo se reportaron coeficientes de correlación superiores a 0,96.

En la mayoría de experimentos se observó una buena presencia de iones fragmento (Tablas 5-19) especialmente aquellos que contienen la referencias ácido  $\alpha$ -4-hidroxiciámico (CHCA) y *p*-cloroanilina cuyas AP están en el intervalo de las matrices MALDI y la presencia de grupos funcionales protonables hacen de estas muy buenas referencias para el desarrollo del método cinético.

## Curvas del ácido AA-ITiofeno a tres energías de colisión.

**Figura 19.** Logaritmo natural de la relación en abundancias de los iones producto de la disociación del dímero protonado del AA-ITiofeno Vs AP de las bases de referencia medido a 1,25; 1,35 y 1,45 eV.



Se reportó una AP promedio de 206,28 kcal/mol para el AA-ITiofeno con un error calculado de 1,12% respecto al valor teórico ( $AP_{teo} = 208,61$  kcal/mol) siendo uno de los más bajos observados en este trabajo (0,67% para el AA-FuCN). Se destaca el hecho de que hubo una muy alta correlación entre los puntos de la gráfica para las tres energías de disociación donde se observaron los coeficientes de correlación más altos en todo el estudio con ácidos acrílicos hasta el momento.

Las abundancias relativas de los iones fragmento productos de la disociación del dímero protonado (Tablas 5-19) se utilizaron para calcular las AP de cinco ácidos acrílicos de interés en MALDI (Figura 7) graficando el logaritmo natural de las abundancias relativas de los iones fragmento  $\ln[AH]^+/[BH]^+$  versus la AP de las bases de referencia. A partir de la información termoquímica obtenida (Figuras 15-19), se lograron determinar las afinidades protónicas por medio de la pendiente y el intercepto del eje X de la ecuación de la recta (Ver Ecuación 18).

Todos los métodos de determinación de afinidades protónicas proporcionan valores relativos, existe cierta incertidumbre en la escala de referencia de las afinidades protónicas, esto permite que se deba establecer una escala absoluta. Por mediciones adecuadas, se establece una escala de basicidad en fase gaseosa o afinidad protónica relativa; para poner estas mediciones relativas en una escala absoluta, la basicidad o afinidad protónica de uno o más compuestos de la escala deben establecerse a partir de mediciones independientes. Desde hace algún tiempo, se establecido una escala de afinidad protónica, basada en la del AP(*i*C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>) = 195.9 kcal/mol <sup>40</sup>.

El método cinético de Cooks aplicado en este trabajo ha arrojado información termoquímica muy precisa donde los valores calculados por métodos mecano-cuánticos, se ajustan muy bien respecto a lo resultados experimentales (Tabla 20), lo que permite hacer de este método una herramienta versátil y fácil de usar en el estudio de la química de iones en fase gaseosa <sup>41</sup>.

**TABLA 20.** Afinidad protónica experimental de cinco ácidos acrílicos obtenida por el método cinético a tres diferentes energías de colisión usando helio como gas colisionador.

Ácido acrílico	AP 1,25 eV (kcal/mol)	AP 1,35 eV (kcal/mol)	AP 1,45 eV (kcal/mol)	AP <sub>exp</sub> (kcal/mol)	AP <sub>teo</sub> (kcal/mol)	%Error*
AA-Tiofeno	205,00	204,45	205,09	204,85 ± 0,28	208,26	1,64%
AA-ITiofeno	206,30	206,34	206,19	206,28 ± 0,06	208,61	1,12%
AA-Furano	205,57	205,42	205,47	205,49 ± 0,06	208,24	1,32%
AA-TioCN	197,57	195,49	196,49	196,52 ± 0,85	208,07	5,55%
AA-FuCN	199,37	199,27	199,27	199,29 ± 0,06	197,96	0,67%

\*El % de error se determinó para establecer una correlación entre la información determinada experimentalmente en este trabajo y la obtenida de cálculos mecano-cuánticos.

En la Tabla 20, se relacionan las AP de una serie de ácidos acrílicos de interés en MALDI que han sido calculados experimentalmente por primera vez, por medio del método cinético en un espectrómetro de masas con trampa de iones a tres diferentes energías de colisión, también se relacionan los respectivos valores teóricos calculados teóricamente <sup>35</sup> para cada uno de los ácidos.

Los valores de energía libre aparente no cambian con la energía de colisión puesto que son propiedades intrínsecas de las moléculas dependientes de su estructura y no de factores externos <sup>19</sup>, sin embargo, las pequeñas fluctuaciones son debidas a diversos factores, principalmente, aquellos que cambian la energía interna de los iones como la temperatura del sistema la cual debe ser constante, el voltaje de radiofrecuencia *r.f.* aplicado y la misma estructura de cada molécula.

#### 4. CONCLUSIONES

- En este estudio, se calcularon las AP para cinco derivados de ácidos acrílicos utilizando el método cinético de Cooks. Los valores experimentales encontrados presentan un error máximo de 5,55% (AA-TioCN) y mínimo de 0,67% (AA-FuCN) con respecto a los cálculos teóricos. Los demás ácidos acrílicos evaluados reportaron sus respectivas APs con errores <1,64 % y desviaciones típicas que están entre 0,06 y 0,85 kcal/mol.
- La presencia del yodo como sustituyente sobre un complejo aromático, muestra una leve disminución en la longitud de onda de absorción, sin embargo, en la práctica este elemento resulta ser un sustituyente muy lábil debido a su relativo alto peso molecular acompañado de una baja electronegatividad. Un aumento de la energía cinética de compuestos con yodo podría generar el desprendimiento del mismo, generando variaciones en sus propiedades termoquímicas.
- La sensibilidad del método cinético está determinada por el uso de CID, donde se pueden depositar sobre el dímero grandes cantidades de energía que pueden llevar a fragmentaciones secundarias, por lo que sin un estricto control de la energía de colisión pueden observarse otras señales "secundarias", aun así los dímeros protonados deben mantenerse como los fragmentos mayoritarios.
- El método es simple y muy sensible, permite diferenciar compuestos con diferencias AP de hasta 0,01 kcal/mol, sin embargo, su uso está limitado

por el hecho de que se requieren referencias con AP calculadas por otros métodos. La elección de las bases de referencia para la aplicación del método cinético ha de realizarse de una manera cuidadosa teniendo en cuenta principalmente su estructura, grupos funcionales protonables, afinidad protónica teórica o calculada, solubilidad, volatilidad, entre otras.

- En la implementación del método cinético deben seleccionarse referencias con grupos funcionales muy similares en peso y estructura, como aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y aminas de relativo bajo peso molecular (siempre que sea posible) y resistentes a la oxidación en medio ácido, además han de tener una AP cercana a la del analito, de esta manera, se evita que pueda liberarse energía suficiente para inducir fragmentaciones no deseadas.
- Las AP calculadas por métodos mecano-cuánticos, mostraron muy buena correlación con los valores experimentales, demostrando la validez al método cinético de Cooks como una herramienta válida, eficiente para la determinación de AP.
- Estas determinaciones demostraron que los ácidos acrílicos tienen potencial uso como matrices de transferencia protónica, cuentan con propiedades fisicoquímicas similares a las de las matrices comerciales para MALDI, son sólidos a temperatura ambiente y tienen buena solubilidad en agua. Con base en lo anterior, los ácidos acrílicos exhibieron propiedades fisicoquímicas similares a otras matrices MALDI. Estudios posteriores demostrarán su potencial uso de este tipo de moléculas en el desarrollo racional de nuevas matrices MALDI de transferencia protónica.

## REFERENCIAS

1. Leszyk, J. D. *J. Biomol. Tech.* **2010**, *21*, 81–91.
2. Brodbelt-Lustig, J. S.; Cooks, R. G. *Int. J. Pure Appl. Anal. Chem.* **1989**, *36*, 255–260.
3. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K. A. I.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *J. Mass Spectrom.* **1989**, *246*, 64-71.
4. Davis, E. J.; Bridges, M. A. *J. Aerosol Sci.* **1994**, *25*, 1179–1199.
5. Felitsyn, N.; Peschke, M.; Kebarle, P. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *219*, 39–62.
6. Cech, N. B.; Enke, C. G. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *20*, 362–387.
7. March, R. E. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 351–369.
8. Morand, K. L.; Horning, S. R.; Cooks, R. G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1991**, *105*, 13–29.
9. <http://nobelprize.org/physics/laureates/1989/paul-lecture.html>. Consultado el 15 de Noviembre de 2015.
10. O’Hair, R. a J. *Chem. Commun. (Camb).* **2006**, 1469–1481.
11. Cooks, R. G.; Patrick, J.; Kotiaho, T.; Mcluckey, S. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1995**, 287–339.
12. Cooks, R. G.; Wong, P. S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 379–386.
13. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
14. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1988**, *2*, 151–153.
15. Knochenmuss, R.; Zhigilei, L. V. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2511–2519.
16. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Organic mass spectrometry* **1992**, *27*, 472-480.
17. Jørgensen, T.; Bojesen, G.; Rahbek-Nielsen, H. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1998**, *4*, 39.

18. Nourse, B. D.; Graham Cooks, R. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1991**, *106*, 249–272.
19. Zhang, N.; Doucette, a.; Li, L. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2968–2975.
20. Zheng, J.; Li, N.; Ridyard, M.; Dai, H.; Bobbins, S. M.; Li, L. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1709–1716.
21. Rosales S, H. Ensayo de compuestos con núcleo de fenilvinileno como matrices MALDI. Tesis de pregrado Químico. Bucaramanga, Santander: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, **2013**. 25-28 p.
22. Tholey, A.; Heinzle, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 24–37.
23. Cech, N. B.; Enke, C. G. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *20*, 362–387.
24. Cooks, R. G.; Koskinen, J. T.; Thomas, P. D. *J. Mass Spectrom.* **1999**, *92*, 85–92.
25. Bursley, M. M.; Wolfe, E. S. *Org. Mass Spectrom.* **1968**, *1*, 543–549.
26. Mirza, S. P.; Raju, N. P.; Vairamani, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 431–435.
27. Cheung, C. P. The *Department of Chemistry, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106-7078. Phone 216.368.2000.* **0**, **3–4**.
28. Wysocki, V. H.; Kenttämää, H. I.; Cooks, R. G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1987**, *75*, 181–208.
29. Griffiths, I.W., Mukhtar, E.S., March, R.E., Harris, F.M., Beynon, J.H. *J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1981**, *39*, 125–132.
30. Leib, R.D., Donald, W.A., Bush, M.F., O'Brien, J.T., Williams, E.R.: *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4894–4895.
31. Donald, W.A., Williams, E.R.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 615–625.
32. Harrison, A. G. *Mass Spectrometry Reviews*, **1997**, *16*, 201–217.
33. Zheng, X.; Cooks, R. G. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 9939–9946.
34. Christine M. Nelson ; Lin Zhu ; Wei Tang ; Lloyd M. Smith ; Kevin Crellin, *et al.* Fragmentation mechanisms of oligonucleotides in MALDI mass spectrometry", *Proc. SPIE* 2680, Ultrasensitive Biochemical Diagnostics, 247 (April 1, 1996)

35. Castellanos, L. J. Desarrollo de una matriz para espectrometría de masas MALDI basado en sistemas tipo fenilenvinileno y ácidos acrílicos. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander. **2015**.
36. Gobom, J.; Schuerenberg, M.; Mueller, M.; Theiss, D.; Lehrach, H.; Nordhoff, E. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 434–438
37. Soltwisch, J.; Jaskolla, T. W.; Hillenkamp, F.; Karas, M.; Dreisewerd, K. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6567–6576.
38. Hunter, E.P.; Lias, S.G., *Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update*, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1998**, *27*, 3, 413-656
39. Zins, E. L.; Pepe, C.; Schröder, D. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 1253–1260.
40. Hunter, E. P. L.; Lias, S. G. *Journal Phys. Chem. Ref. Data* **2013**, *413*.
41. Shoeib, T.; Siu, K. W. M.; Hopkinson, A. C. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6121–6128.

## **BIBLIOGRAFÍA**

March, R. E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Mass Spectrom.* **1997**, (32), 351–369.

Cooks, R. G.; Patrick, J.; Kotiaho, T.; Mcluckey, S. A. Thermochemical Determinations by the Kinetic Method. *Mass Spectrometry Reviews.* **1995**, 287–339.

Castellanos, L. J. Desarrollo de una matriz para espectrometría de masas MALDI basado en sistemas tipo fenilvinileno y ácidos acrílicos. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, **2015**.

Mirza, S. P.; Raju, N. P.; Vairamani, M. Estimation of the proton affinity values of fifteen matrix-assisted laser desorption/ionization matrices under electrospray ionization conditions using the kinetic method. *Journal of American Society for Mass Spectrometry.* **2004**, (15), 431–435.

Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K. A. I.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Journal of Mass Spectrometry.* **1989**, (246), 64-71.