

**DESEMPEÑO DE UN DERIVADO DEL 1,8-DIAMINONAFTALENO COMO  
MATRIZ MALDI (*MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION*)  
MODO NEGATIVO**

**JENNY ANDREA CARO DURÁN**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2016**

**DESEMPEÑO DE UN DERIVADO DEL 1,8-DIAMINONAFTALENO COMO  
MATRIZ MALDI (*MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION*)  
MODO NEGATIVO**

**JENNY ANDREA CARO DURÁN**

**Trabajo de grado presentado como requisito  
para optar al título de Química**

**DIRECTOR:  
MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA MONTAÑEZ  
Química, Ph.D.**

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

**2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a Dios, por todo el amor que ha irradiado en mi vida, por toda la fortaleza y paciencia que me ha dado para llevar a cabo mis estudios.

A mis padres José Antonio Caro Ortega y Edith Durán Guevara por su apoyo durante toda una vida, que con sus esfuerzos y sacrificios me dieron la oportunidad de ser una persona íntegra; a mis hermanos: Edith Ximena y José David, a Dennis por ser mi fuerza y estabilidad, por estar siempre para mí.

A mis compañeros del grupo de investigación GIFTEX y a todos mis amigos en especial a Deysi Suárez por su apoyo incondicional.

A la Universidad Industrial de Santander, al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS por el apoyo económico de este trabajo de investigación.

Al parque Tecnológico Guatiguará por el apoyo técnico.

Muy especialmente a la profesora Marianny Yajaira Combariza, por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de grado bajo su asesoría y por todo el apoyo científico y personal.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	18
2 MARCO TEÓRICO	20
2.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	20
2.1.2 Técnica de Ionización/Desorción Láser Asistida por una Matriz (MALDI)	22
2.1.3 Matrices para MALDI	24
2.1.4 MALDI con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF)	25
3 METODOLOGÍA	28
3.1 Materiales y métodos	29
3.1.1 Determinación de la solubilidad de las matrices en diferentes solventes	31
3.1.2 Análisis espectroscópico UV-Vis	31
3.2 Espectrometría de masas	32

3.2.1.	Determinación de las condiciones de trabajo para MALDI en modo negativo	32
3.2.2	Preparación de la muestra para análisis MALDI.	32
3.2.3	Evaluación del derivado como matriz MALDI modo negativo	33
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	ENSAYOS DE SOLUBILIDAD	34
4.2	ANÁLISIS UV-VIS	35
4.3	ABSORTIVIDAD MOLAR	38
4.4	CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI	40
4.5	EVALUACIÓN DEL DERIVADO COMO MATRIZ	49
5	CONCLUSIONES	54
6	RECOMENDACIONES	55
	CITAS	56
	BIBLIOGRAFIA	60
	ANEXOS	64

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Matrices MALDI de uso común. A) Ácido 2,5-dihidroxi benzoico (DHB), B) 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP), C) Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -CHCA). .....	18
<b>Figura 2.</b> Matrices convencionales MALDI modo negativo. A) 9-Aminoacridina (9AA), B) Esponja protónica (SP). .....	199
<b>Figura 3.</b> Esquema de ionización MALDI modo negativo.....	23
<b>Figura 4.</b> Esquema de un espectrómetro de masas MALDI-TOF. ....	26
<b>Figura 5.</b> Esquema de un reflectrón tiempo de vuelo. ReTOF. ....	27
<b>Figura 6.</b> Metodología empleada en el proyecto. ....	28
<b>Figura 7.</b> Estructuras de las moléculas empleadas como matrices y analitos. A) 1,8-diaminonaftaleno (1,8-DAN), B) Derivado (Der), C) Ácido <i>p</i> -formilbenzoico (APFB), D) Ácido esteárico (AE). ....	29
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de reacción para la síntesis de la Matriz (E)-N <sup>1</sup> -(4-metoxibencilideno)-naftalen-1,8-diamina, diseñada a partir del 1,8-DAN para MALDI en modo negativo. ....	30
<b>Figura 9.</b> Solubilidad del 1,8-DAN y su derivado en diferentes solventes .....	35
<b>Figura 10.</b> Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en Acetonitrilo.....	37
<b>Figura 11.</b> Absorbancia a 355 nm de las soluciones matriz en diversos solventes.. .....	39
<b>Figura 12.</b> Espectros LDI en ACN/H <sub>2</sub> O. A) 1,8-DAN, B) Derivado, C) APFB y D) AE en un rango de m/z 100 a 1000. ....	41
<b>Figura 13.</b> Espectros LDI en THF/H <sub>2</sub> O. A) 1,8-DAN, B) Derivado, C) APFB y D) AE en un rango de m/z 100 a 1000.....	42
<b>Figura 14.</b> Cristalización de las matrices en el target del MALDI en ACN.....	43

<b>Figura 15.</b> Cristalización de las matrices en el target del MALDI en THF..	43
<b>Figura 16.</b> Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 20% en ACN/H <sub>2</sub> O.	45
<b>Figura 17.</b> Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 25% en ACN/H <sub>2</sub> O.	46
<b>Figura 18.</b> Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 20% en THF/H <sub>2</sub> O.	47
<b>Figura 19.</b> Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 25% en THF/H <sub>2</sub> O.	48
<b>Figura 20.</b> Efecto de la relación molar entre el analito y la matriz sobre la relación S/N y la abundancia de los iones formados del APFB. A y C) Atenuación 20%, B y D) Atenuación 25%.	50
<b>Figura 21.</b> Efecto de la relación molar entre el analito y la matriz sobre la relación S/N y la abundancia de los iones formados del AE. A y C) Atenuación 20%, B y D) Atenuación 25%.	51
<b>Figura 22.</b> Efecto de la relación molar entre las matrices con los analitos, APFB y AE sobre la Resolución y los dos solventes. A) Resolución del APFB con atenuación del láser de 20%. B) Resolución del APFB con atenuación del láser de 25%. C) Resolución del AE con atenuación del láser 20%. D) Resolución del AE con atenuación del láser 25%.	53

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Diluciones preparadas en cada solvente para las dos matrices..	32
<b>Tabla 2.</b> Pruebas de solubilidad.	34
<b>Tabla 3.</b> Longitud de onda de máxima absorción del 1,8-DAN y su Derivado en los diferentes solventes.	38
<b>Tabla 4.</b> Absortividad molar de las moléculas a 355 nm.	39

## LISTA DE ECUACIONES

	<b>Pág.</b>
<b>Ecuación 1.</b> Transferencia electrónica desde el analito a la matriz .....	21
<b>Ecuación 2.</b> Transferencia protónica desde la matriz hacia el analito. ....	22
<b>Ecuación 3.</b> Generación de especies negativas por desprotonación del analito. .	22
<b>Ecuación 4.</b> Resolución; Donde m es la masa y $\Delta U$ es la dispersión de la energía. .....	26

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo A.</b> Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en metanol. ....	64
<b>Anexo B.</b> Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en dimeltilsulfóxido. ....	65
<b>Anexo C.</b> Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en cloroformo. ....	66
<b>Anexo D.</b> Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en acetona. ....	67
<b>Anexo E.</b> Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en etanol. ....	68
<b>Anexo F.</b> Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en tetrahidrofurano.. ....	69
<b>Anexo G.</b> Absorbancia de 1,8-DAN y su Derivado con su respectivo coeficiente de absorción molar. ....	70

## ABREVIATURAS

<b>MALDI</b>	Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz.
<b>Uv-vis</b>	Ultravioleta visible
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con analizador tiempo de vuelo
<b>LDI</b>	Desorción/Ionización láser sin matriz.
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo
<b>1,8-DAN</b>	1,8-Diaminonaftaleno
<b>Der</b>	Derivado ( <i>E</i> )- <i>N</i> <sup>1</sup> -(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina
<b>APFB</b>	Ácido <i>p</i> -formilbenzoico
<b>AE</b>	Ácido Esteárico
<b>9AA</b>	9-Aminoacridina
<b>DHB</b>	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
<b>THAP</b>	2,4,6-trihidroxiacetofenona
<b>α-CHCA</b>	Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>CH<sub>3</sub>Cl</b>	Cloroformo
<b>Ac</b>	Acetona
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>ACN/H<sub>2</sub>O</b>	Acetonitrilo/Agua
<b>THF/ H<sub>2</sub>O</b>	Tetrahidrofurano/Agua
<b>S/N</b>	Relación Señal/Ruido
<b>m/z</b>	Relación Masa/Carga

## RESUMEN

**TÍTULO:** DESEMPEÑO DE UN DERIVADO DEL 1,8-DIAMINONAFTALENO COMO MATRIZ MALDI (*MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION*) MODO NEGATIVO\*

**AUTOR:** JENNY ANDREA CARO DURÁN\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Espectrometría de masas MALDI, Matrices MALDI modo negativo.

En esta investigación se determinó el desempeño del derivado (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina como matriz MALDI modo negativo para la ionización de moléculas ácidas (ácidos carboxílicos). Al derivado se le realizó pruebas de solubilidad en siete solventes con diferente polaridad; se caracterizó por medio espectroscópicas y de espectrometría de masas.

De acuerdo con las pruebas de solubilidad, mostraron que a pesar que presenta mayor solubilidad en CHCl<sub>3</sub> y DMSO no son adecuados para el análisis MALDI debido a que el DMSO presenta baja volatilidad y el CHCl<sub>3</sub> es muy volátil, por lo tanto es mejor emplear solventes con moderada polaridad como el ACN y el THF.

Los resultados obtenidos en la caracterización espectroscópica evidenciaron que los coeficientes de absorción molar del derivado en la mayoría de los solventes fueron superiores con respecto a matriz de referencia (1,8-DAN), lo cual asegura su interacción efectiva con la radiación del láser de Nd-YAG (355 nm). El análisis por espectrometría de masas MALDI modo negativo del ácido p-formilbenzoico y al ácido esteárico usando el derivado evidenció mayor cobertura en la deprotonación del analito en diferentes relaciones molares (1:1, 1:10 y 1:100) empleando ACN y THF como solventes.

Los estudios de espectrometría de masa, mostraron que la abundancia iónica y la relación S/N fue notablemente superior comparada con el desempeño de la 1,8-DAN bajo las mismas condiciones de atenuación del láser (20 y 25%). De este modo se pudo demostrar que el (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina es una promisorio matriz para MALDI modo negativo; especialmente para moléculas ácidas fácilmente deprotonables y que puedan estabilizarse a través de la deslocalización electrónica.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez

## ABSTRACT

**TITLE:** PERFORMANCE OF 1,8-DIAMINONAPHTHALENE DERIVATIVE AS MATRIX MALDI (MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION) NEGATIVE MODE\*.

**AUTHOR:** JENNY ANDREA CARO DURÁN\*\*

**KEYWORDS:** Maldi mass spectrometry, Matrices negative mode.

This project determined the performance of the derivative (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-methoxybenzylidene)naphthalene-1,8-diamine as matrix in acid molecules ionization using negative mode MALDI matrix for ionization of acidic molecules (carboxylic acids). The derivative was tested for solubility in seven solvents with different polarity; It was characterized by spectroscopic means and mass spectrometry.

According to the solubility test, they showed that despite having higher solubility in CHCl<sub>3</sub> and DMSO are not suitable for MALDI analysis because the DMSO has low volatility and CHCl<sub>3</sub> is very volatile, so it is better to use solvents moderate polarity as the ACN and THF.

The spectroscopic results showed that derivate coefficient molar absorption in different solvents were higher in magnitude than matrix reference (1,8-DAN), therefore its interaction with Nd-YAG (355 nm) radiation is more effective. Analysis of *p*-formylbenzoic acid and stearic acid using derivative and 1,8-DAN as matrix in negative mode notice us about derivate characteristics such as analyte deprotonation in different molar ratios (1:1, 1:10 and 1:100) using ACN and THF.

Studies mass spectrometry showed that the ion abundance and the S / N was significantly higher compared to the performance of the 1,8-DAN under the same conditions of attenuation of the laser (20 and 25%). Thus it was proved that the (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-methoxybenzylidene)-naphthalene-1,8-diamine is a promising matrix for MALDI negative way; especially acid molecules and they can easily deprotonables stabilized by electron delocalization.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez

# INTRODUCCIÓN

---

La espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más utilizadas, junto con otros métodos instrumentales (UV-Vis, IR, RMN, DRX, etc), para establecer la masa y la composición elemental de moléculas cargadas o de iones moleculares [1].

La técnica de ionización MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* por sus siglas en inglés) es hoy día fundamental en la espectrometría de masas, debido a que se trata de una técnica suave, sensible y versátil que se aplica en el análisis de variados analitos (péptidos, proteínas, lípidos, oligosacáridos, oligonucleótidos, polímeros e incluso moléculas de bajo peso molecular como metabolitos y fármacos) [2, 3, 4, 5]. Debido a su tolerancia en presencia de sales e impurezas se aplica al análisis de muestras complejas como determinación de pesos moleculares de materiales orgánicos e inorgánicos, así como en el mapeo y generación de imágenes de tejidos [6, 7].

En esta técnica se requiere el uso de una matriz que co-cristalice con el analito y promueva la ionización después de la desorción laser; las matrices MALDI se eligen de forma selectiva para que puedan absorber la radiación emitida por el láser que opera generalmente en el UV (336 o 355 nm) [3]. Recientemente se han explorado sistemas aromáticos conjugados como matrices MALDI modo negativo, siendo este modo de operación el que menor desarrollo ha tenido frente al modo positivo. En el año 2002 se introduce la 9-aminoacridina (9AA) y más adelante la esponja protónica (SP) como matrices eficientes para analizar compuestos de bajo peso molecular en modo negativo [8, 9, 10, 11]. Sin embargo las propiedades optoelectrónicas de las matrices 9AA y la esponja protónica no son sobresalientes.

La 9AA usada comúnmente en metabólica presenta interferencias y baja sensibilidad para algunos analitos. Adicionalmente, un gran número de métodos

de análisis por modo negativo necesitan de una alta potencia del láser para alcanzar la sublimación del conjunto matriz-analito y finalmente transferir los iones preformados a la fase gaseosa. Estas consideraciones hacen necesaria la búsqueda y desarrollo de nuevas matrices MALDI.

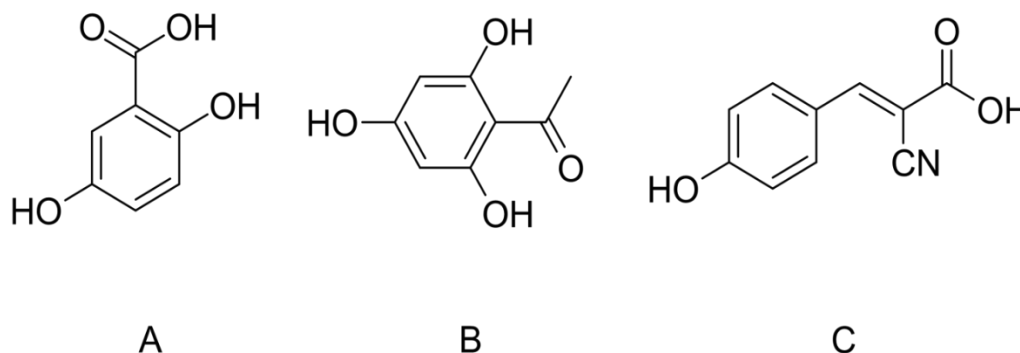
El desarrollo del presente proyecto permitió evaluar algunas propiedades optoelectrónicas de la (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina así como su desempeño como matriz MALDI en modo negativo teniendo como referencia el comportamiento de su precursor, el 1,8-diaminonaftaleno (1,8-DAN). Este derivado arrojó resultados interesantes que permiten considerarlo como matriz MALDI para el análisis de ácidos orgánicos.

## 1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

---

Los análisis MALDI en modo de ionización negativo se usan muy poco debido a la baja sensibilidad del método y baja eficiencia en la generación de iones negativos especialmente cuando se utilizan matrices como el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 2,4,6-trihidroxiacetofenona y ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Figura 1) [12, 13]. Estas matrices presentan desventajas para el estudio de analitos con relaciones  $m/z$  inferiores a 600 u, debido a la formación de aductos y clúster de la matriz que aparecen en este rango de masas del espectro LDI lo que dificulta la identificación y análisis de los iones correspondientes al analito.

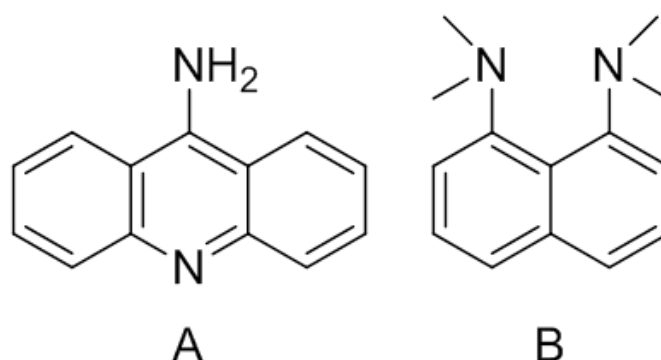
**Figura 1. Matrices MALDI de uso común. A) Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), B) 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP), C) Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -CHCA).**



La reciente aparición de compuestos como el 1,8-DAN y la 9AA (Figura 2.) demuestra la importancia en la búsqueda y estudio de nuevas moléculas como matrices MALDI. Sin embargo estas moléculas presentan baja absorptividad molar

a la longitud de onda de operación del láser, lo que hace que los análisis en modo negativo requieran del uso de altas potencias del láser para transferir iones preformados de la fase sólida a la gaseosa, particularmente para análisis en modo negativo de moléculas relevantes en el campo de la lipidómica, la metabolómica y la farmacocinética [13, 14, 15].

**Figura 2. Matrices convencionales MALDI modo negativo. A) 9-Aminoacridina (9AA), B) Esponja protónica (SP).**



Para lograr superar estas dificultades es necesario el diseño racional de compuestos con carácter básico que no solo tengan la capacidad de sustraer protones del analito sino que además presenten un alto coeficiente de absorción a una longitud de onda cercana a 355 nm. De esta forma será posible preformar iones negativos en solución y adicionalmente transferir a la matriz y al analito la energía del láser. Consecuentemente la presente investigación fue enfocada en el desarrollo de una nueva matriz para MALDI en modo negativo derivada del 1,8-DAN.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la espectrometría de masas se producen, separan y detectan iones en fase gaseosa [16]. Inicialmente la técnica se aplicaba solo al estudio de analitos termoestables y de bajo peso molecular debido a limitaciones inherentes a los métodos de ionización fuertes. Sin embargo, la necesidad de métodos de caracterización de moléculas termolábiles y de alto peso molecular generó numerosos métodos de ionización suaves [1]. A partir de los años 80's, los métodos de ionización basados en desorción de iones (de fases condensadas) han revolucionado la técnica y han permitido su aplicación a prácticamente cualquier especie química [4,17, 18].

**2.1.2. Técnica de Ionización/Desorción Láser Asistida por una Matriz (MALDI).** La técnica de ionización MALDI fue desarrollada por *Karas y Hillenkamp* en 1980 para el análisis de biomoléculas de alto peso molecular [19, 20]. En este método de ionización, la muestra se mezcla junto con una solución saturada de una matriz y se deposita sobre un portamuestra metálico (Figura 3). La función del láser pulsado es concentrar una pequeña unidad de área una gran cantidad de energía, haciendo que las moléculas de la matriz se exciten, ionicen y reaccionen con las moléculas del analito y así formar los iones secundarios a causa de procesos de transferencia de carga.

**2.1.2.1. Procesos de ionización MALDI.** Es importante considerar que los iones generados mediante el proceso de ionización son mayoritariamente moléculas protonadas, deprotonadas, cationizadas, aniones y cationes radicales y su

abundancia está relacionada con la capacidad de la matriz para formarlos. Además, tiene lugar la aparición de aductos positivos y negativos formados a partir de las moléculas del analito con iones metálicos como con  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que pueden ser observados en el modo positivo y con iones  $\text{Cl}^-$  en modo negativo [21].

**2.1.2.2 Transferencia electrónica.** Resulta ser la reacción más simple entre el analito y la matriz, teniendo lugar la transferencia de un electrón desde el analito con alta densidad electrónica hacia un catión radical preformado de la matriz. Sin embargo, es uno de los procesos menos probables ya que se requiere que el potencial de ionización (P.I) del analito (**A**) sea menor que el de matriz (**M**).



**Ecuación 1.** Transferencia electrónica desde el analito a la matriz

La mayoría de matrices para MALDI poseen potenciales de ionización entre 6-9 eV; estos valores son demasiado bajos para ionizar todo tipo de analitos y por consiguiente este modo de ionización solo se aplica a analitos con potenciales de ionización por debajo del de la matriz. Otro factor importante en este modo de ionización es el uso de altas energías por pulso, por lo cual se emplean atenuaciones superiores al 30% en el láser, lo cual causa fragmentación excesiva del analito y obstrucción en la identificación de los iones de interés. Esta condición limita aún más el análisis de algunas moléculas cuyo potencial de ionización es menor al de la matriz [22].

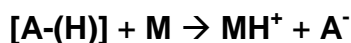
**Transferencia protónica de protonación.** Este tipo de transferencia es común en analitos que tienen alta afinidad protónica como los péptidos y proteínas. En este caso la transferencia se da desde la matriz protonada ( $\text{MH}^+$ ) hacia el analito (**A**).



**Ecuación 2.** Transferencia protónica desde la matriz hacia el analito.

Las matrices más comunes son ácidos orgánicos débilmente protonables que ceden fácilmente su protón en el proceso de ionización primario. La mayoría de análisis requieren la que en la preparación de la matriz se incluyen ácidos, como el ácido tri-fluoroacético (TFA), en un porcentaje cercano a 0.01% que se encargan de suministrar protones. Pese a ser uno de los modos de ionización más empleados se le asociada una gran desventaja relacionada con las diferencias entre las afinidades protónicas matriz-analito, que deben ser cercanas o de lo contrario la protonación del analito será un proceso exotérmico que puede resultar en la degradación del analito (típicamente biomoléculas) antes del análisis MALDI. Las especies cargadas positivamente son observadas en el MALDI en modo positivo [23, 24].

**Transferencia protónica de deprotonación.** En modo negativo normalmente se produce la sustracción de protones del analito (**A**) debido a la basicidad de la matriz (**M**).

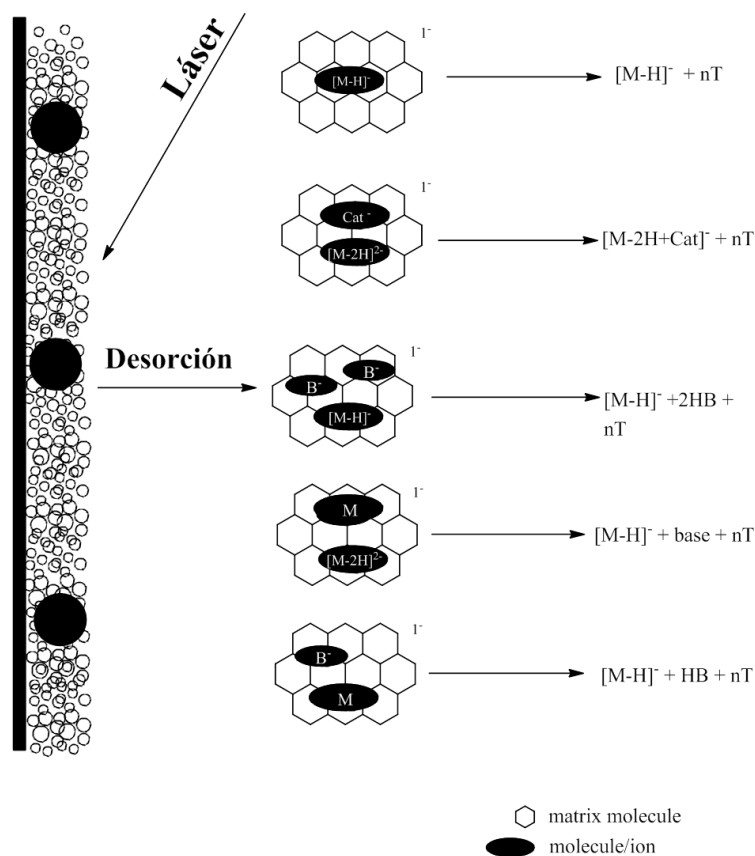


**Ecuación 3.** Generación de especies negativas por deprotonación del analito.

Este tipo de ionización tiene lugar en analitos con elevado carácter ácido y cuyos grupos funcionales presentes fácilmente estabilicen el anión formado. Pese a ser uno de los procesos de ionización menos explorados, brinda una alternativa

eficiente para el análisis de moléculas con alto contenido de oxígeno, compuestos poliinsaturados, polisacáridos, oligosacáridos, fosfolípidos y oligonucleótidos. Estas especies aniónicas se observan en el análisis MALDI modo negativo [13, 25, 27]. Adicionalmente es posible observar otras especies negativas mediante procesos de transferencia electrónica matriz-analito (Figura 3) o por presencia de aniones metálicos en el medio que se asocian al analito en el proceso de ionización/desorción.

**Figura 3.** Esquema de ionización MALDI modo negativo. Modificado de *Karas, Glückmann y Schäfer, 2000.*



**2.1.3. Matrices para MALDI.** Las primeras matrices sólidas para MALDI fueron el ácido nicotínico, triptófano, ácido succínico, y las líquidas fueron el alcohol 3-nitrobencilo, 3-nitrofeniletil éter, glicerol; estas últimas se emplearon principalmente para el análisis de carbohidratos y proteínas [20, 28, 29]. Años más tarde estas matrices fueron sustituidas por sustancias con mayor absorptividad molar en la región UV como el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y derivados del ácido cinámico como el ácido ferúlico, ácido cafeíco y el ácido sinapínico [19].

**2.1.3.1. Propiedades de las matrices MALDI.** Si se considera que el papel fundamental de las matrices MALDI es absorber energía y formar iones primarios, que posteriormente ionizan los analitos por procesos de transferencia de carga (protonación, deprotonación) o transferencia de electrones, existen características fundamentales que debe cumplir una matriz MALDI:

- Alta absorptividad molar a la longitud de onda del láser.
- Solubilidad.
- Cristalización homogénea, con el fin de prevenir fenómenos de puntos dulces y generar espectros reproducibles.
- Alta basicidad, para que actúe como trampa de protones para el caso de matrices para operación en modo negativo, y baja afinidad protónica para facilitar la transferencia de protones en el caso de ionización en modo positivo.
- 

Bajo algunas circunstancias el proceso MALDI puede conducir a la fragmentación del analito como resultado del exceso de energía que se imparte durante el proceso de ionización/desorción [30, 31]. Desde esta perspectiva existen cuatro factores fundamentales que determinan la fragmentación del analito:

- La energía del enlace que se rompe.
- La estabilidad de productos que se forman como iones y especies neutras.
- La energía interna de los iones que se fragmentan.
- El intervalo de tiempo que transcurre entre la formación y la detección de los iones.

Los espectrómetros de masas de tiempo de vuelo, los más usados en combinación con la técnica de ionización MALDI, generalmente comienzan a extraer iones tan pronto como se forman, los procesos de fragmentación pueden extenderse desde el momento de ionización hasta llegar al detector. Los efectos sobre los espectros de masas y la cantidad de información que se obtiene dependen de dónde y cuándo se produce la fragmentación.

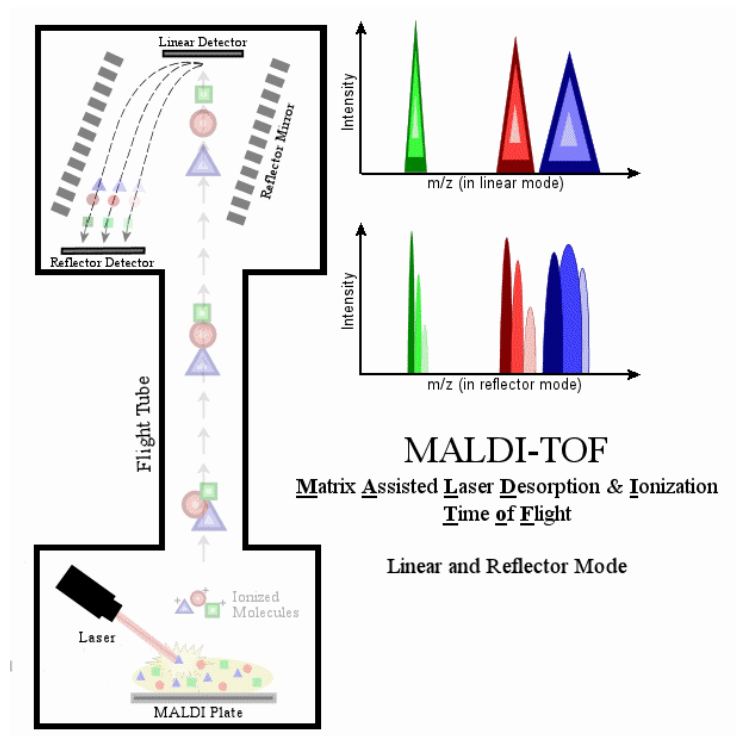
**2.1.4. MALDI con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF).** MALDI es una técnica de ionización pulsada que produce iones de forma intermitente. La naturaleza pulsada es apropiada para combinarse con un analizador tiempo de vuelo (TOF, *time of flight* por sus siglas en inglés). Además, el analizador TOF tiene algunas características adicionales, tales como: alta sensibilidad y un rango de masas ilimitado [17]. Hay dos tipos de operación del TOF: baja y alta resolución. La resolución en el TOF mejora cuando se utiliza un potencial retardativo, modo reflectrón, en un extremo del tubo de vuelo para corregir la dispersión en la energía cinética de los iones durante el análisis. De otra manera los iones con la misma relación masa/carga y diferentes velocidades se detectan como señales ensanchadas, modo lineal, con baja resolución (Figuras 4 y 5). En el analizador TOF la resolución se determina sólo por la dispersión de energía  $\Delta U$ , de acuerdo con la ecuación 4.

$$R = \frac{m}{\Delta U} = \frac{U}{\Delta U}$$

**Ecuación 4.** Resolución; Donde  $m$  es la masa y  $\Delta U$  es la dispersión de la energía.

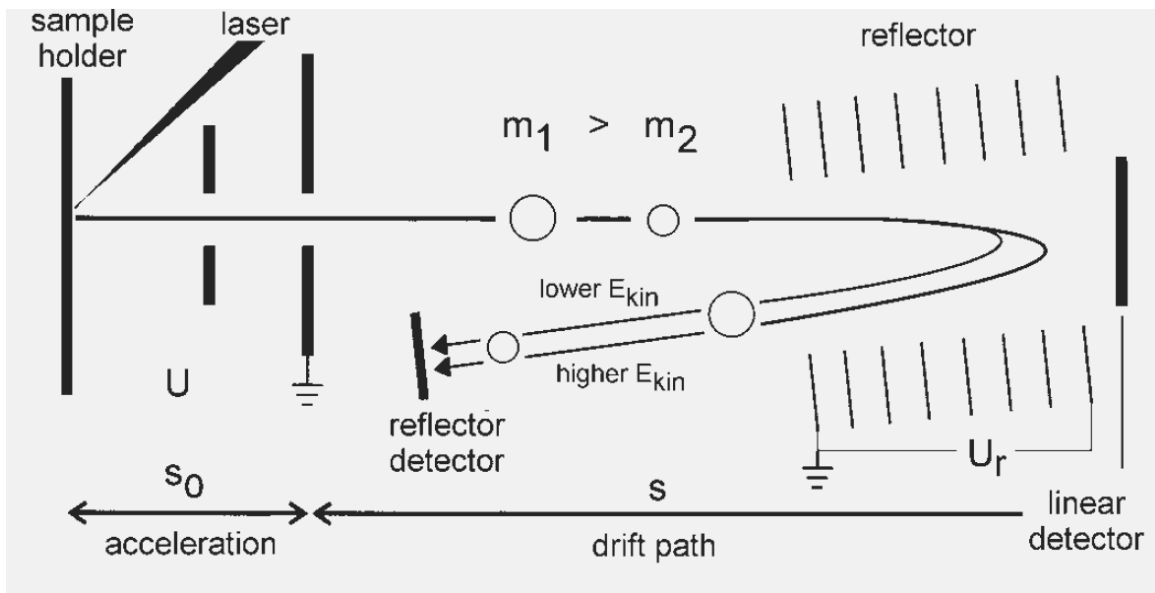
Los iones monoenergéticos con diferentes proporciones masa/carga tienen diferentes velocidades y tiempos de vuelo. El tiempo de vuelo para cada ion se mide por la diferencia de tiempo entre la señal de inicio, dada por el pulso de láser, y las señales de los iones, producidas cuando inciden en el detector [18, 31, 32].

**Figura 4.** Esquema de un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Tomado de STANFORD, School of medicine. (PAN\_MSPEC).



Fuente: STANFORD SCHOOL OF MEDICINE. Matrix Assisted Laser Desorption & Ionization time of flight. [online] Stanford University Medical Center. [Stanford, CA, E:U.] Stanford School of Medicine – PAN, 2006. [Cited: 15 Octubre 2015] Available from Internet: <http://cmgm.stanford.edu/pan/section.html/MS/>

Figura 5. Esquema de un reflectr3n tiempo de vuelo. ReTOF



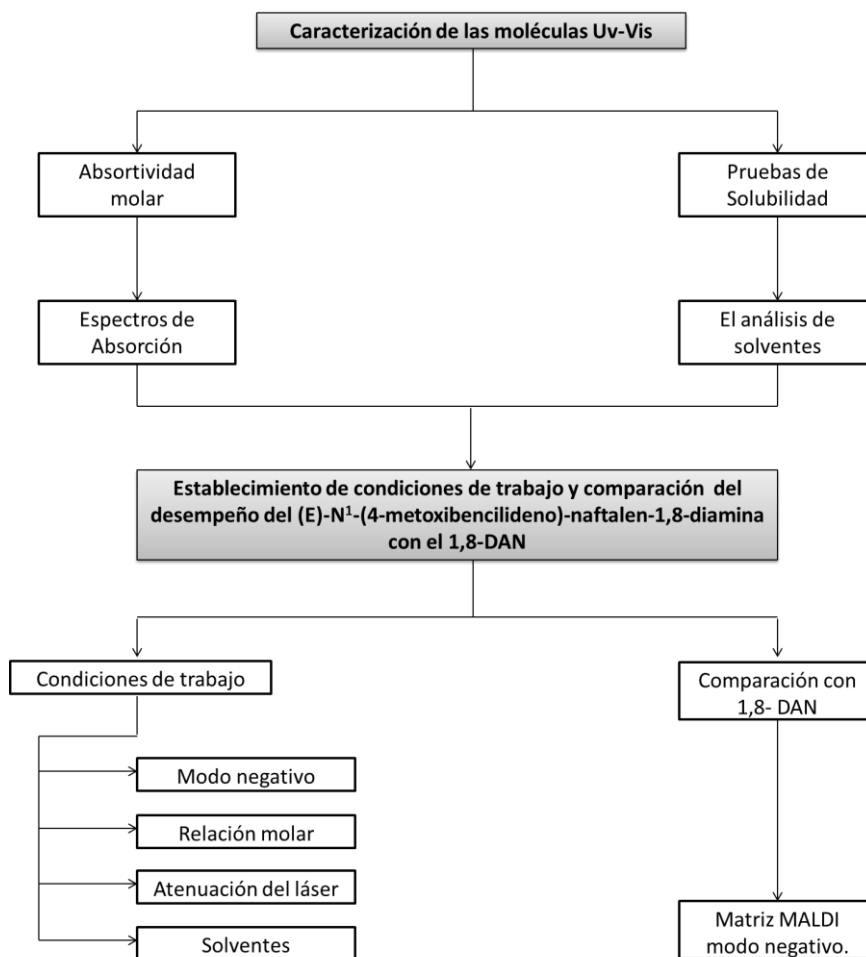
Fuente: Mass Spectrometry A Textbook, Gross, J., page 120.

### 3. METODOLOGÍA

---

La metodología se dividió en tres etapas: Caracterización de las moléculas por UV-Vis, establecimiento de condiciones de trabajo y comparación del desempeño del (E)-N<sup>1</sup>-(4-metoxibencilideno)-naftalen-1,8-diamina con el 1,8-DAN como matriz MALDI modo negativo. En la figura 6 se presenta el esquema de la metodología empleada en el proyecto.

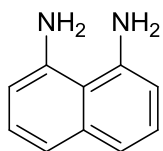
**Figura 6. Metodología empleada en el proyecto.**



### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

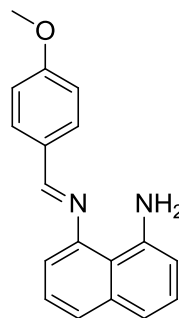
Los reactivos acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), dimetilsulfóxido (DMSO), cloroformo (CH<sub>3</sub>Cl), acetona (Ac), etanol (EtOH) y tetrahidrofurano (THF), fueron adquiridos de Merck; los reactivos de 1,8-diaminonaftaleno (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>), ácido *p*-formilbenzoico (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>), ácido esteárico (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>), se adquirieron de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos fueron de grado analítico y se utilizaron sin ningún tipo de purificación previa. Se empleó agua desionizada Tipo I con resistividad 18.2 Ω obtenida desde un purificador MilliQ del Laboratorio 402 de la Universidad Industrial de Santander parque Tecnológico Guatiguará.

**Figura 7. Estructuras de las moléculas empleadas como matrices y analitos. A) 1,8-diaminonaftaleno (1,8-DAN), B) Derivado (Der), C) Ácido *p*-formilbenzoico (APFB), D) Ácido esteárico (AE).**



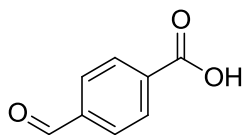
**A) 1,8-Diaminonaftaleno  
1,8-DAN**

Masa monoisotópica: 158,08



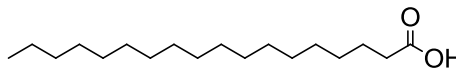
**B) (E)-N<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina  
Derivado**

Masa monoisotópica: 276,13



**C) Ácido *p*-Formilbenzoico  
APFB**

Masa monoisotópica: 150,03

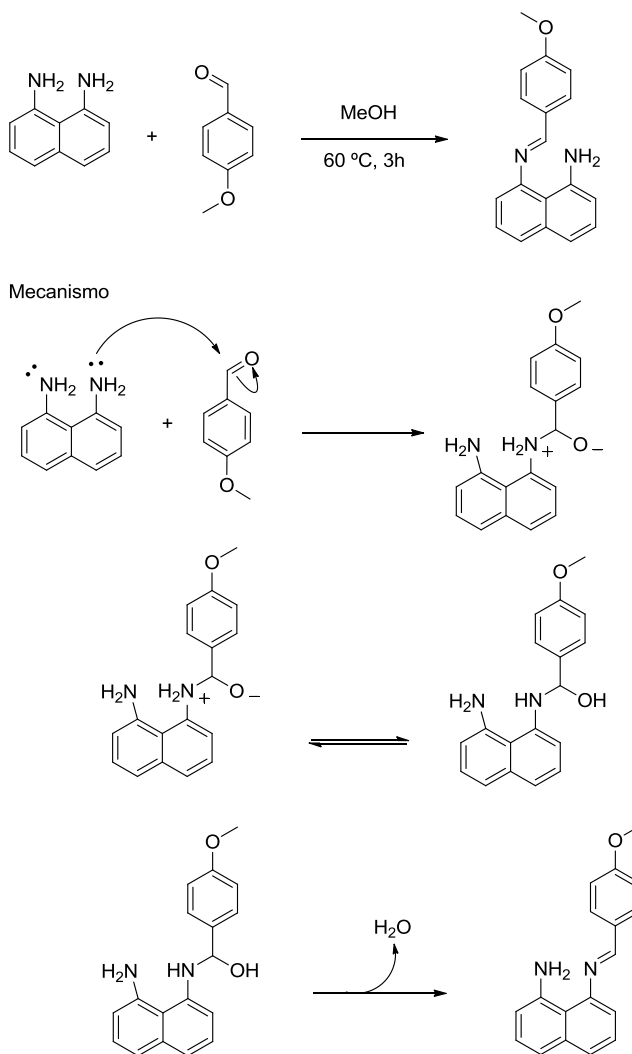


**D) Ácido Esteárico  
AE**

Masa monoisotópica: 284,27

El derivado (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O) fue sintetizado por el estudiante de doctorado en química Juan Sebastian Ramírez Pradilla, M.Sc. miembro del grupo de investigación GIFTEX (Figura 7B). La síntesis del derivado se realizó siguiendo la ruta descrita en la Figura 8.

**Figura 8. Mecanismo de reacción para la síntesis de la Matriz (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina, diseñada a partir del 1,8-DAN para MALDI en modo negativo.**



**3.1.1. Determinación de la solubilidad de las matrices en diferentes solventes.** La solubilidad de la matriz estándar y su derivado en los siguientes solventes: THF, DMSO, Ac, EtOH, ACN, CH<sub>3</sub>Cl y MeOH. El procedimiento incluye pesar alrededor de 1,0 mg de cada una de las matrices y adicionar volúmenes específicos de cada solvente hasta que se logre una solución homogénea. Tras cada adición de solvente la mezcla se somete a ultrasonido, entre 5-10 minutos, utilizando un baño marca Branson 3800 (130 W, 40 KH).

**3.1.2. Análisis espectroscópico UV-Vis.** Inicialmente se tomaron los espectros UV-Vis de las matrices MALDI (1,8-DAN y su derivado) en cada uno de los solventes estudiados (THF, DMSO, Ac, EtOH, ACN, CH<sub>3</sub>Cl y MeOH) realizando un barrido espectral entre 200 a 700 nm para determinar los máximos de absorción de cada matriz. Este análisis se realizó en un espectrofotómetro *Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis* equipado con una celda de cuarzo, Precision cells Inc. 3ES10 2EA, de 1,0 cm de paso óptico. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

A partir de una solución Stock equimolar de 2,5 mM de cada matriz se realizaron diluciones sucesivas en cada solvente como se muestra en la tabla 1. A cada disolución se le midió la absorbancia a 355 nm por duplicado con el fin de determinar coeficiente de absorptividad molar, el cual se calculó a partir de la pendiente de la curva linealizada de las gráficas de Absorbancia Vs Concentración presentadas en los Anexos A-F.

**Tabla 1. Diluciones preparadas en cada solvente para las dos matrices.**

<b>Solución</b>	<b>Concentración, mM</b>
1	0,125
2	0,100
3	0,075
4	0,050
5	0,025
6	0,0125

## **3.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

### **3.2.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA MALDI EN MODO NEGATIVO**

Para determinar la capacidad del derivado como matriz MALDI en modo negativo, se tomó como referencia el desempeño del 1,8-DAN. En esta etapa se evaluó la influencia de la atenuación del láser (20 - 25%), la relación molar de la matriz:analito y el efecto del solvente en relación con la calidad de los espectros en términos analíticos como resolución y relación señal/ruido (S/N) utilizando como analitos el ácido esteárico (AE) y el ácido *p*-formilbenzoico (APFB).

**3.2.2. Preparación de la muestra para análisis MALDI.** Las muestras fueron preparadas empleando el método *Dried-Droplet (DD)*. Se preparó una solución de 10 mM de cada matriz en a) ACN/H<sub>2</sub>O (2:1) y b) THF/H<sub>2</sub>O (2:1), considerando que el ACN y el THF son solventes adecuados para los análisis MALDI y con ellos se logró la mayor solubilidad tanto de las matrices como de los analitos. Cada mezcla matriz-solvente se agitó en el Vortex Multi-tube BV1010 Bechmark durante 1 hora a 1500 rpm y para alcanzar buena homogeneización de la muestra.

Por otra parte, tanto el AE como APFB fueron diluidos en ACN/H<sub>2</sub>O (2:1) y b) THF/H<sub>2</sub>O (2:1) hasta alcanzar concentraciones de 1,0 mM, 0,1 mM y 0,01 mM. Finalmente, volúmenes iguales de matriz y analito se depositaron en un tubo *ependorf* y la mezcla se agitó en el vortex durante 5 minutos a 1500 rpm para finalmente depositar 2,0 µL de la mezcla el *spot* del porta muestras. El solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente dentro de la cabina de extracción. Se realizaron cinco replicas por cada ensayo.

**3.2.3. Evaluación del derivado como matriz MALDI modo negativo.** Se empleó un espectrómetro de masas estándar *Bruker UltraFlex* MALDI-TOF/TOF con analizador de tiempo de vuelo TOF, en modo reflectrón teniendo como fuente de energía un láser de Nd-YAG en estado sólido en su tercer armónico (355 nm) con pulsos de 5 ns y una frecuencia de 1000 Hz. Tanto los espectros LDI (desorción/ionización láser sin matriz) como los MALDI fueron adquiridos realizando un barrido entre 100-1500 Da. Cada espectro reportado corresponde a la sumatoria de 2000 espectros individuales. Con el fin de minimizar los procesos de fragmentación de la muestra se usaron atenuaciones del láser de 20 y 25% para todas las muestras; este parámetro fue fijado por observación cualitativa de las señales arrojadas por el analito respecto al 1,5-DAN (isómero del 1,8-DAN empelado como patrón de calibración). El tratamiento de los espectros se realizó con el programa *FlexAnalysis* de Bruker; asignando picos con abundancias mayores a S/N=6.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD

En la tabla 2 se presentan los resultados de solubilidad de las matrices, 1,8-DAN y su derivado en cada solvente.

**Tabla 2. Pruebas de solubilidad.**

Solvente	1,8-DAN		Derivado	
	Solub. M	Abs. 355 nm.	Solub. M	Abs. 355 nm.
Etanol	5,06	2,320	1,65	2,868
Tetrahidrofurano	2,32	2,382	3,77	2,951
Acetonitrilo	2,23	2,251	1,85	2,898
Dimetilsulfóxido	22,76	2,548	4,66	2,913
Acetona	10,34	2,496	3,30	3,105
Metanol	56,89	2,396	1,65	2,874
Cloroformo	20,23	2,462	8,24	3,260

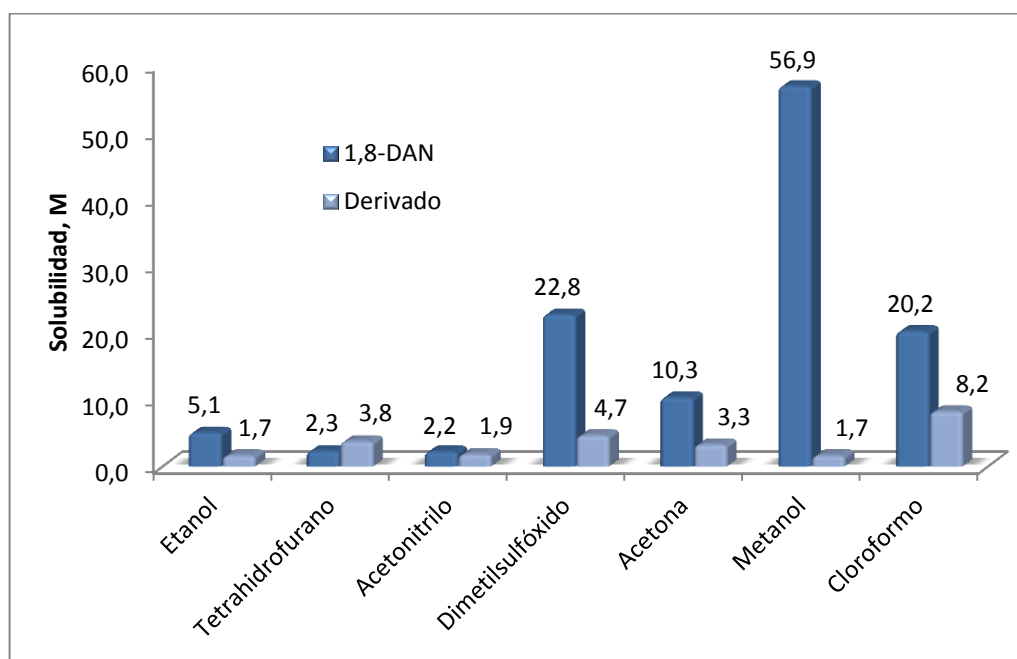
**Solub:** Solubilidad, **Abs:** Absorbancia.

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla 2 se observa que tanto el 1,8-DAN como su derivado presentan mayor solubilidad en  $\text{CHCl}_3$  y DMSO. Sin embargo estos solventes no son adecuados para análisis MALDI ya que por ejemplo el DMSO presenta baja volatilidad lo cual desfavorece la co-cristalización de matriz-analito mientras que el  $\text{CHCl}_3$  es demasiado volátil y tiende a expandirse en la superficie del target.

Uno de los factores que influye la calidad de los análisis MALDI es la composición y la preparación de la mezcla muestra:matriz, lo cual lleva a la elección adecuada de un solvente en el cual se alcance la mayor solubilidad y que en procesos de

secado su eliminación sea eficiente. Es evidente, como se observa en la Figura 9, el 1,8-DAN presenta mayor solubilidad en todos los solventes con respecto a su derivado. Esta diferencia de solubilidades representa en sí una desventaja para el derivado en la preparación de soluciones saturadas y sobresaturadas, lo cual es recomendable para el análisis por MALDI-TOF. Sin embargo la solubilidad es solo uno de los criterios que determinan el desempeño de una matriz MALDI y en el caso del derivado existen otras ventajas tal y como se observa en las siguientes secciones.

**Figura 9. Solubilidad del 1,8-DAN y su derivado en diferentes solventes.**

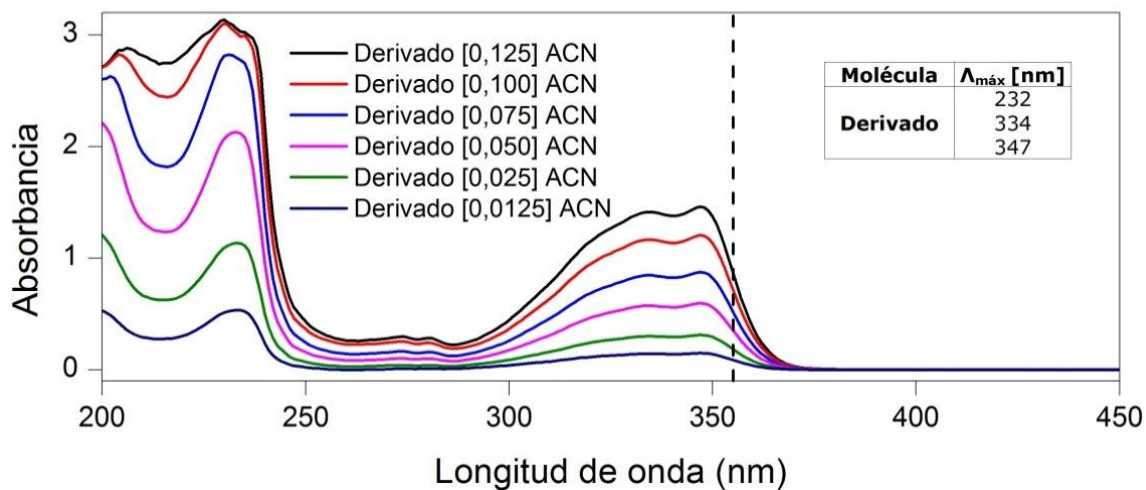
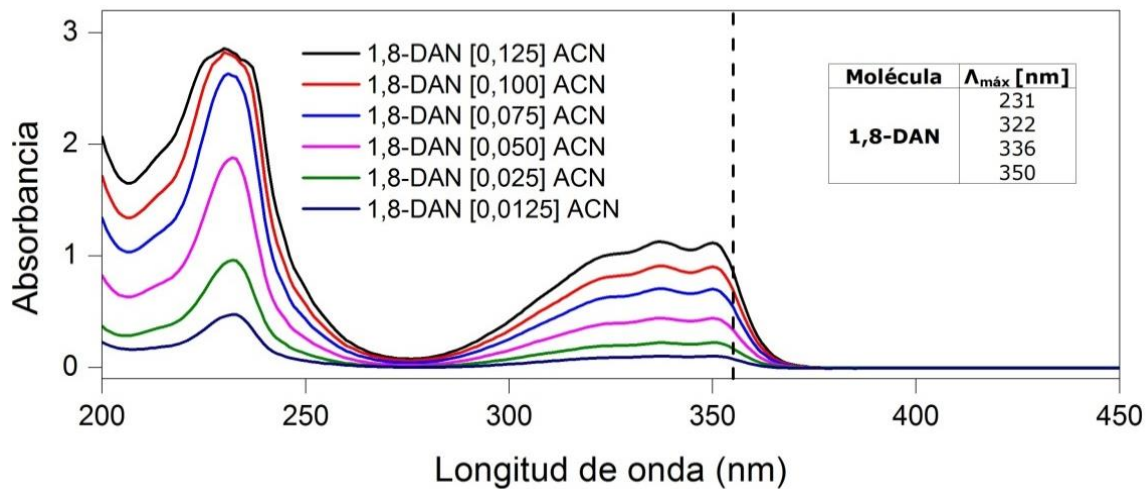


#### 4.2. ANÁLISIS UV-Vis.

Los espectros UV-Vis de cada matriz, en los diferentes solventes, presentan una banda primaria de alta intensidad correspondiente a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  del anillo bencénico y nafténico con un máximo de absorción en longitudes de onda entre 200-250 nm. Adicionalmente, se observa un banda secundaria en longitud de onda de 330-354 nm, la cual es atribuida a transiciones de tipo  $n \rightarrow \pi^*$

atribuidas a los electrones no enlazantes presentes en los grupos cromóforos que contienen nitrógeno y oxígeno. La observación de esta banda, tanto en el 1,8-DAN como en el (E)-N<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina, permite inferir que es posible la interacción de estas especies con los fotones del láser UV (355 nm) utilizado en el análisis MALDI [32]. Por otra parte, las interacciones de la matriz con los solventes son de diferente naturaleza y como consecuencia se observan corrimientos hipsocrómicos o batocrómicos de acuerdo con la naturaleza del solvente. Los solventes con alta polaridad e hidroxílicos como el MeOH y EtOH ocasionan un corrimiento hipsocrómico; la formación de puentes de hidrogeno con el carbonilo y la amina presentes en la estructura del derivado disminuye la energía del estado basal, como la excitación se da en un lapso de tiempo muy corto las moléculas no alcanzan a reacomodarse siendo necesaria mayor energía para promover los electrones desde  $n \rightarrow \pi^*$  [33, 34]. Para el caso de los solventes polares apróticos (DMSO, ACN y THF) se observa por el contrario un corrimiento batocrómico con bandas de menor ensanchamiento, esto debido a que las asociaciones entre la matriz-solvente son menos fuertes y logra conservarse la estructura fina vibracional de las moléculas de matriz. Estos desplazamientos son mostrados en la figura 10 y la tabla 3.

Figura 10. Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en Acetonitrilo.



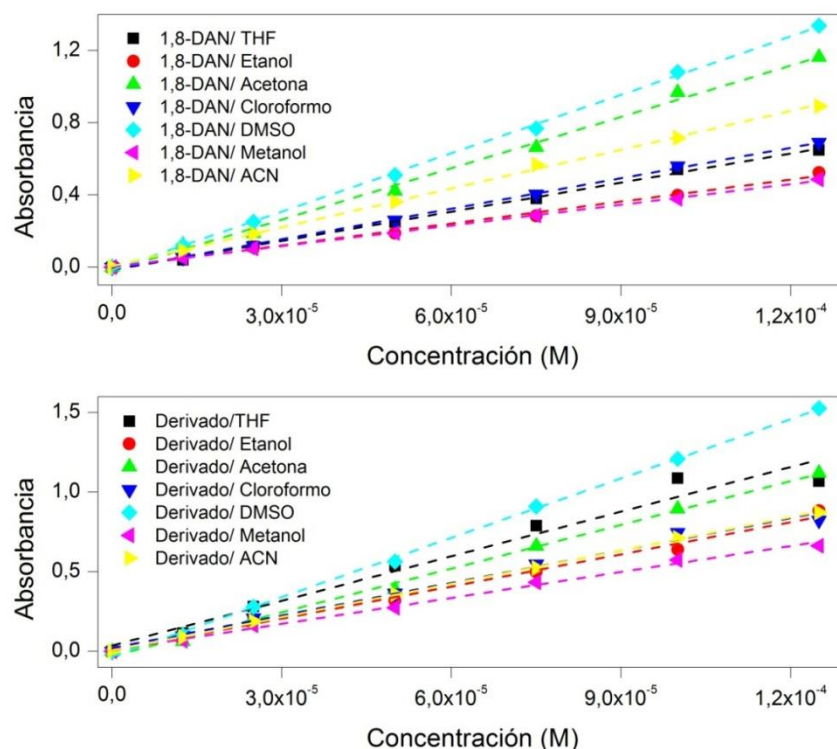
**Tabla 3. Longitud de onda de máxima absorción del 1,8-DAN y su Derivado en los diferentes solventes.**

Solvente	$\lambda_{\text{máx}}$ [nm]	
	1,8-DAN	Derivado
ACN	350	347
THF	350	349
DMSO	354	352
MeOH	334	345
CH <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>	350	347
Acetona	350	348
EtOH	334	345

#### **4.3. ABSORTIVIDAD MOLAR**

Los coeficientes de absorción molar a 355 nm para las matrices se determinaron con base en la ecuación de Beer-Lambert. Los valores de absorbancia adquiridos para cada concentración se muestran en la figura 11 y anexo G.

**Figura 11. Absorbancia a 355 nm de las soluciones matriz en diversos solventes.**



**Tabla 4. Absortividad molar de las moléculas a 355 nm.**

Solvente	$\epsilon \times 10^3$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\epsilon \times 10^3$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
	1,8-DAN	Derivado
Acetonitrilo	7,17	6,98
Metanol	3,82	5,44
Dimetilsulfóxido	10,79	12,42
Cloroformo	5,64	6,80
Acetona	9,49	9,16
Etanol	4,06	6,74
Tetrahidrofurano	5,38	9,34

En la tabla 4 se observa que los coeficientes de absorción molar del derivado en la mayoría de los solventes son superiores a los de la matriz de referencia (1,8-DAN), lo cual asegura la absorción eficiente de la radiación del láser. Su alta absorptividad se atribuye a la transferencia de electrones  $n$  del par solitario del nitrógeno al orbital  $\pi^*$  del grupo naftaleno que permiten una deslocalización efectiva de los electrones en toda la cadena, lo que causa su desplazamiento hacia longitudes de onda más altas y permite mayor eficiencia en la absorción de fotones [35].

El análisis UV-Vis demuestra que el 1,8-DAN y su derivado exhiben altas absorptividades molares cuando se diluyen en DMSO, ACN y THF. Sin embargo, pese a que en DMSO se observa mayor absorptividad molar el uso de este solvente para preparación de muestra fue descartado debido a su baja volatilidad. Con esta consideración se eligieron el THF y ACN como solventes de trabajo debido a su versatilidad.

#### **4.4. CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI**

En la Figuras 12 y 13 se observan los espectros LDI (en modo negativo) de las matrices y de los analitos, para cada compuesto se depositaron  $2 \times 10^{-8}$  moles en el target a partir de una solución ACN/H<sub>2</sub>O (2:1) y THF/H<sub>2</sub>O (2:1). En el espectro del 1,8-DAN (Figura 12A) se observa una señal de mayor intensidad con relación  $m/z$  311.853, mientras el derivado (Figura 12B) se observa en  $m/z$  288.148. Adicionalmente en los espectros de masas se observan señales correspondientes a clusters en la región de masas  $m/z$  261.043, 273.263, 304.343. No se observaron señales para los analitos APFB y AE en los espectros LDI (Figuras 12

C y D). No se observaron diferencias significativas entre los espectros LDI tomados a partir de muestras disueltas en ACN:H<sub>2</sub>O o THF:H<sub>2</sub>O.

**Figura 12. Espectros LDI en ACN/H<sub>2</sub>O. A) 1,8-DAN, B) Derivado, C) APFB y D) AE en un rango de m/z 100 a 1000**

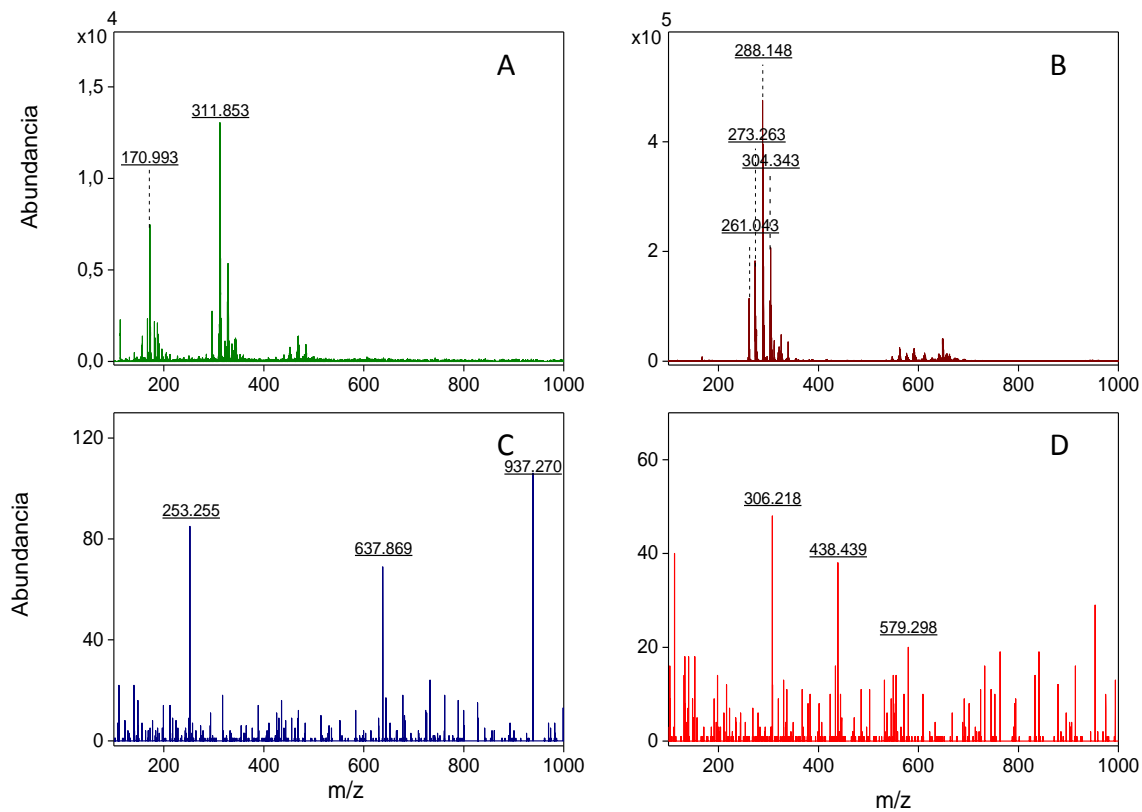
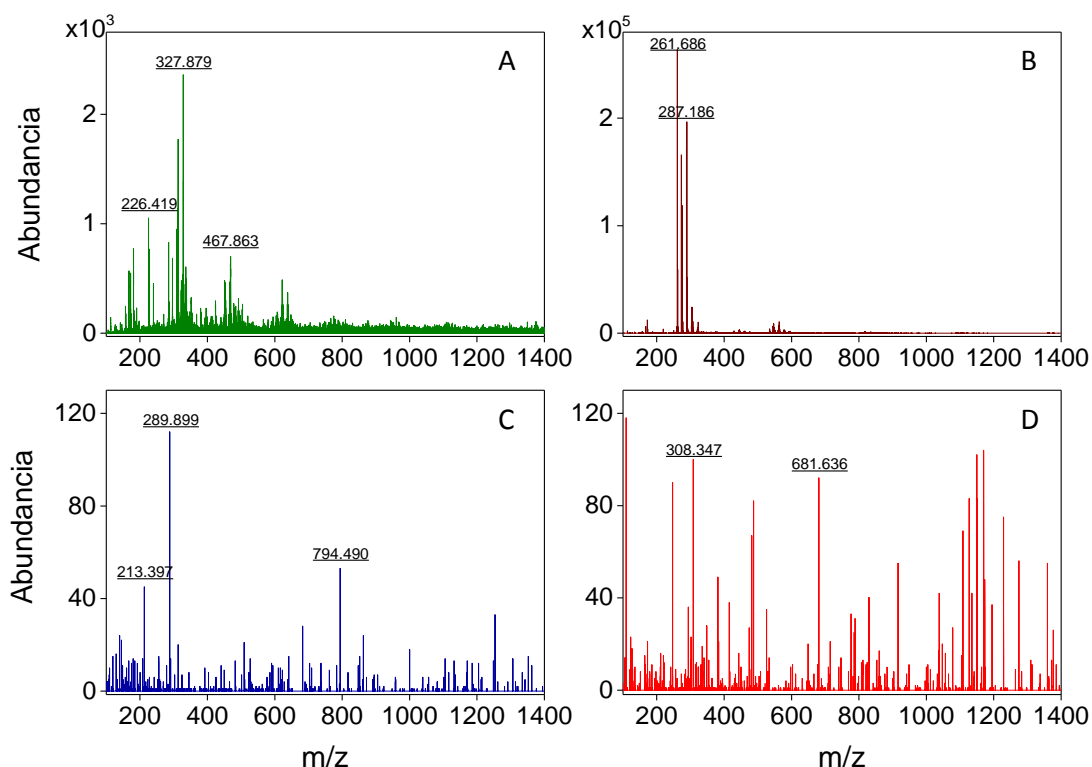


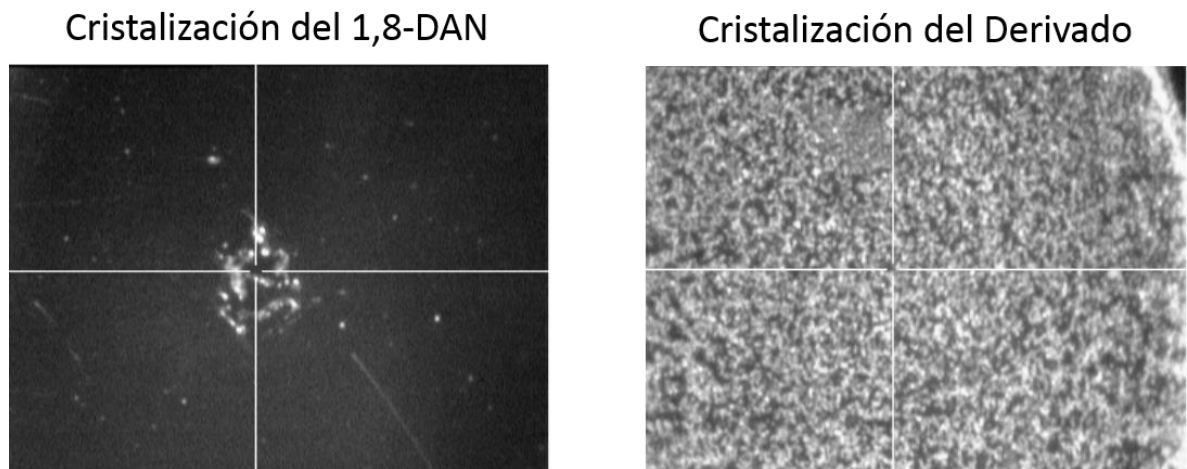
Figura 13. Espectros LDI en THF/H<sub>2</sub>O. A) 1,8-DAN, B) Derivado, C) APFB y D) AE en un rango de m/z 100 a 1000.



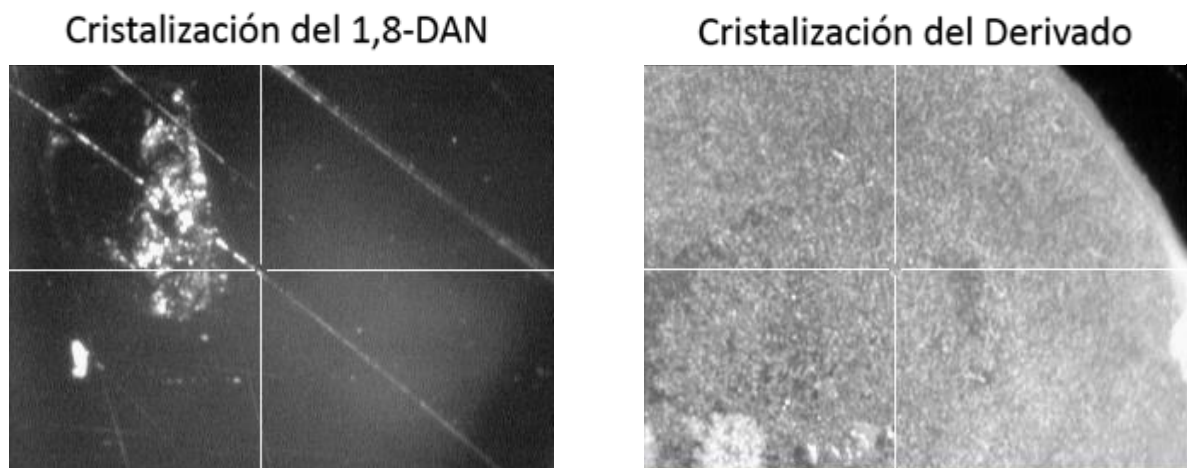
Por otra parte, la cristalización del derivado en ambas mezclas de solvente es mejor que la del 1,8-DAN. En la Figura 14 se observa que cuando se usó ACN:H<sub>2</sub>O el 1,8-DAN cristalizó formando pequeños puntos dulces, mientras que su derivado cristalizó en una capa uniforme en el *target*. Exactamente el mismo comportamiento se observa cuando se usó THF:H<sub>2</sub>O, ver figura 15. Debido a la alta polaridad del ACN (IP 0.62) respecto al THF (0.55) es de esperar que el 1,8-DAN tenga poca afinidad por estos solventes debido a su naturaleza apolar. El derivado, por su parte tiene mayor polaridad la cual es conferida por el grupo amino del anillo naftaleno y por el metoxibencenil, por esta razón su cristalización

sobre el *target* usando ambas mezclas de solventes, ACN:H<sub>2</sub>O o THF:H<sub>2</sub>O, es uniforme (Figuras 14 y 15). Tanto el TFH y el ACN presentan una tensión superficial similar, 28,2 y 30,2 Dynes/cm respectivamente, lo cual da lugar a la formación de gotas más homogéneas las cuales no se deforman evitando el desplazamiento hacia el borde y garantizando la uniformidad de la muestra.

**Figura 14. Cristalización de las matrices en el target del MALDI en ACN.**



**Figura 15. Cristalización de las matrices en el target del MALDI en THF.**

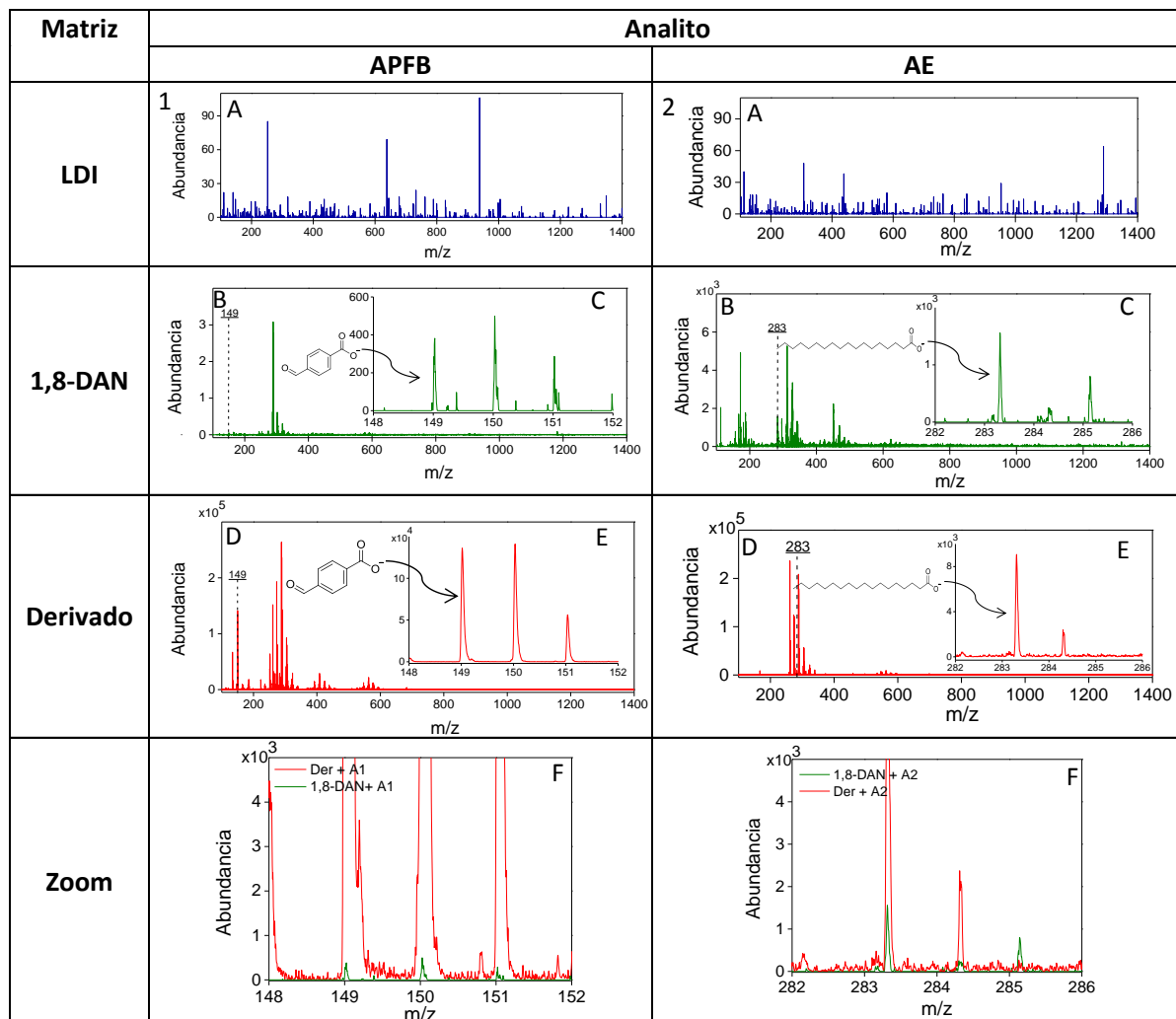


En las figuras 16-19 se presentan los espectros de masas de los analitos AE y APFB utilizando 1,8-DAN y su derivado como matrices, y ACN/H<sub>2</sub>O y THF/H<sub>2</sub>O como solventes. Los experimentos se realizaron utilizando el láser con atenuación del 20 y 25%. Bajo estas condiciones en todos los espectros de masas se detectó el ion molecular deprotonado con relación  $m/z$  149 para el APFB y  $m/z$  283 para el AE. Los bajos valores de atenuación láser empleados evitan la formación de *clusters* y la fragmentación de los analitos por lo cual se propone que el derivado puede ser usado como matriz para la ionización en modo negativo, especialmente de moléculas ácidas fácilmente deprotonables y que puedan estabilizarse a través de la deslocalización electrónica [36].

En la figura 16 se observan los espectros de masas de los analitos AE y APFB usando el 1,8-DAN y su derivado como matrices MALDI, 20% de atenuación láser y ACN/H<sub>2</sub>O como solvente. El espectro LDI del APFB y del AE ( $2 \times 10^{-8}$  moles en target) no muestra señales correspondientes a las moléculas deprotonadas. La aparición de los iones del analito es evidente cuando se incluye la matriz. Por ejemplo, el espectro MALDI del APFB usando 1,8-DAN como matriz muestra la señal del ion molecular en  $m/z$  149 con abundancias en el orden de  $10^2$  y S/N de 149.018. Un comportamiento similar se observa con el derivado con el que se obtienen abundancias en el orden de  $10^4$  y S/N de 149.008. En el análisis del AE se observa la misma tendencia, la molécula deprotonada en  $m/z$  283 presenta un aumento en abundancia de  $10^3$  con el 1,8-DAN y el derivado, lo que corresponde a S/N de 283.307 y 283.300 respectivamente (2C-2E).

Es evidente que el derivado tiene un mejor desempeño como matriz MALDI que el 1,8-DAN; esta observación puede atribuirse a varios factores. Inicialmente el derivado exhibe mayor absorptividad molar a la longitud de onda del láser, lo cual le permite a estas moléculas absorber mayor energía para transferir los iones preformados de AE y APFB a la fase gaseosa [37].

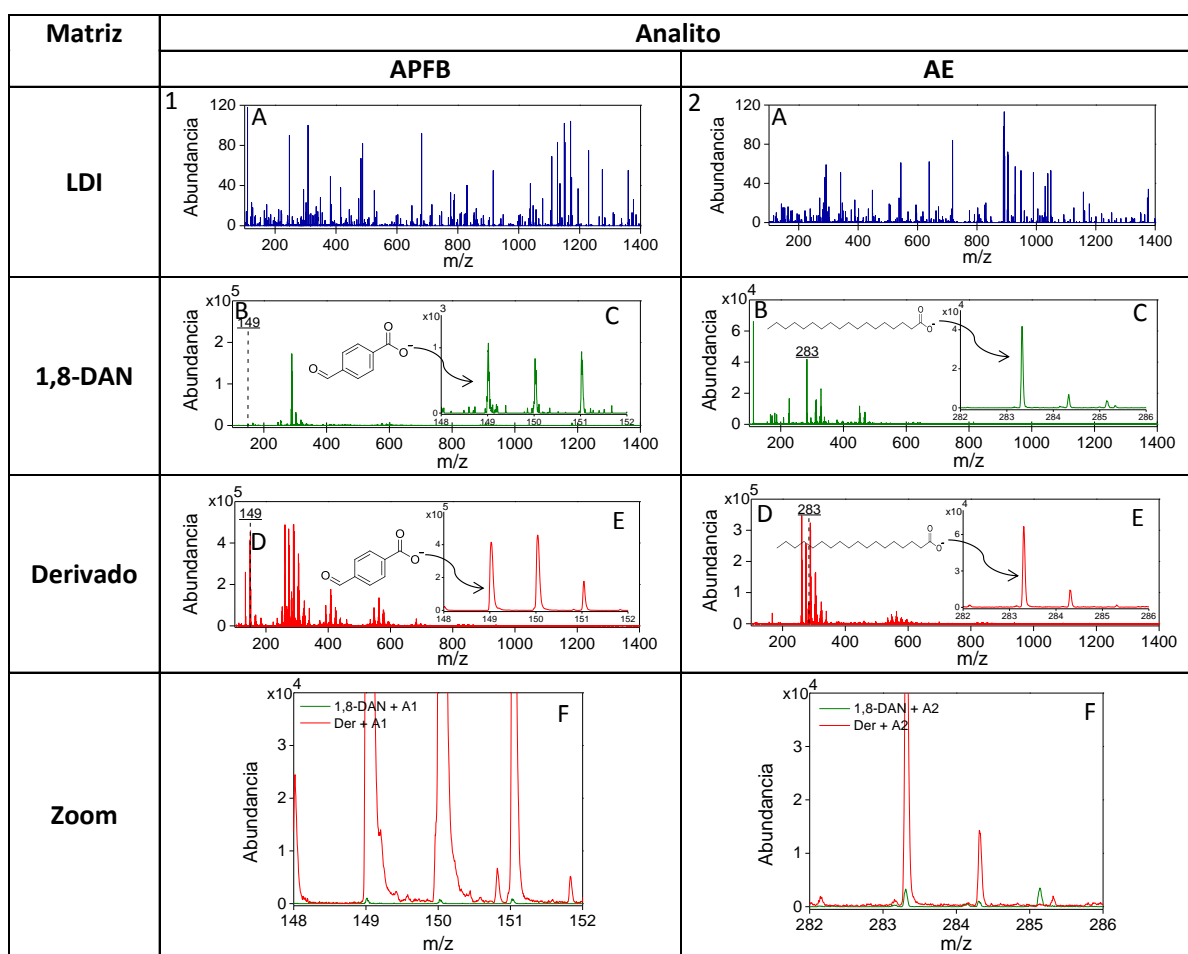
**Figura 16. Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 20% en ACN/H<sub>2</sub>O.**



En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos para los analitos AE y APFB usando el 1,8-DAN y su derivado como matrices MALDI, 25% de potencia del láser y ACN/H<sub>2</sub>O como solvente. Se observa que el espectro LDI del APFB y del AE ( $2 \times 10^{-8}$  moles en target) no presenta señales significativas de las moléculas protonadas, la intensidad es muy baja ( $10^1$ ). Al introducir la matriz aparecen señales diferenciadas y con calidad. Para el caso del APFB 1,8-DAN como matriz muestra la señal del ion molecular en  $m/z$  149 con abundancias en el orden de  $10^3$  y S/N de 149.018. Un comportamiento similar se observa con el derivado con el

que se obtienen abundancias en el orden de  $10^5$  y S/N de 149.025. El análisis del AE empleando las dos matrices conduce a observaciones similares; obteniendo abundancias del mismo orden de  $10^4$  con una S/N de 283.328 y 283.292 para cada caso (2C-2E).

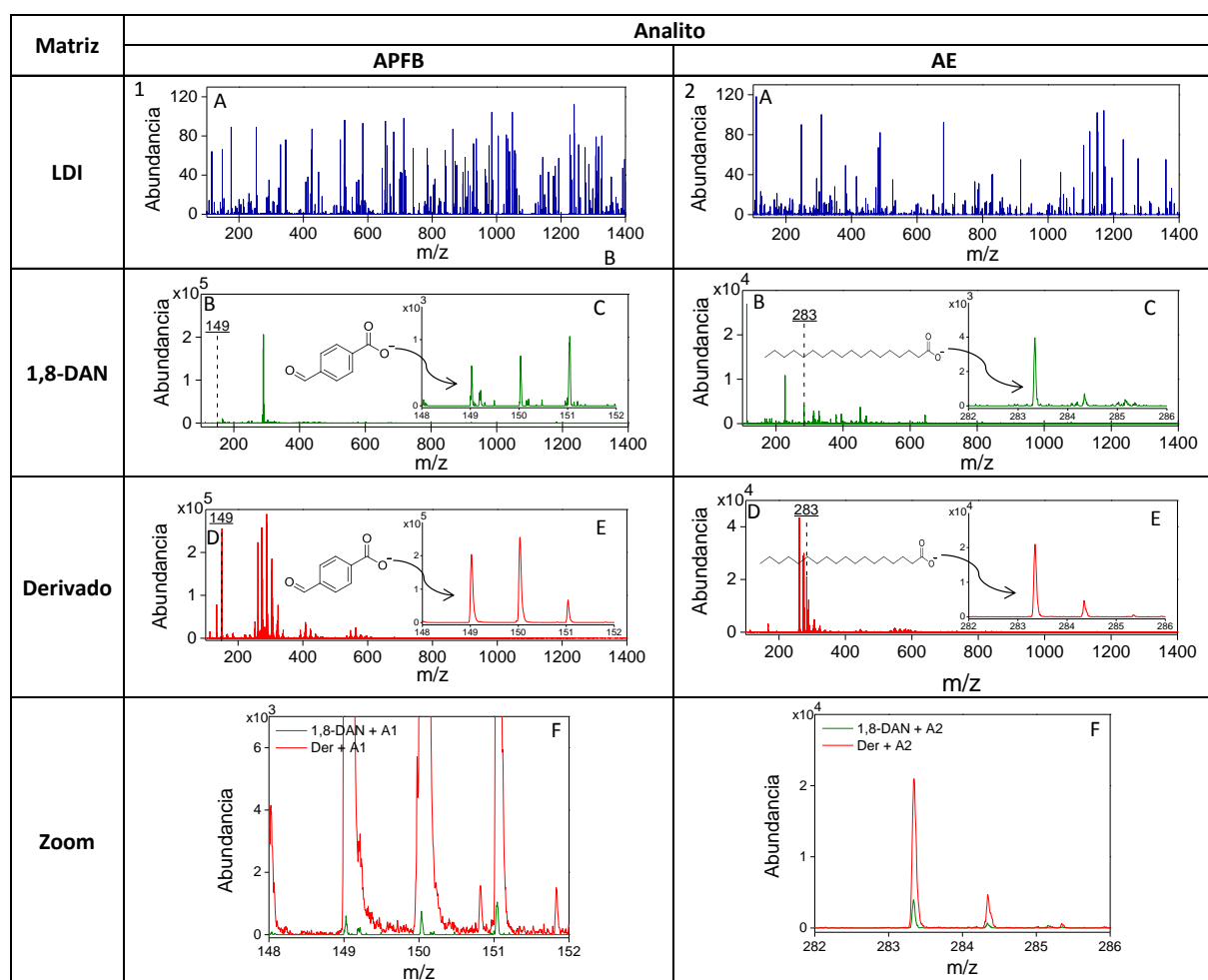
**Figura 17.** Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 25% en ACN/H<sub>2</sub>O.



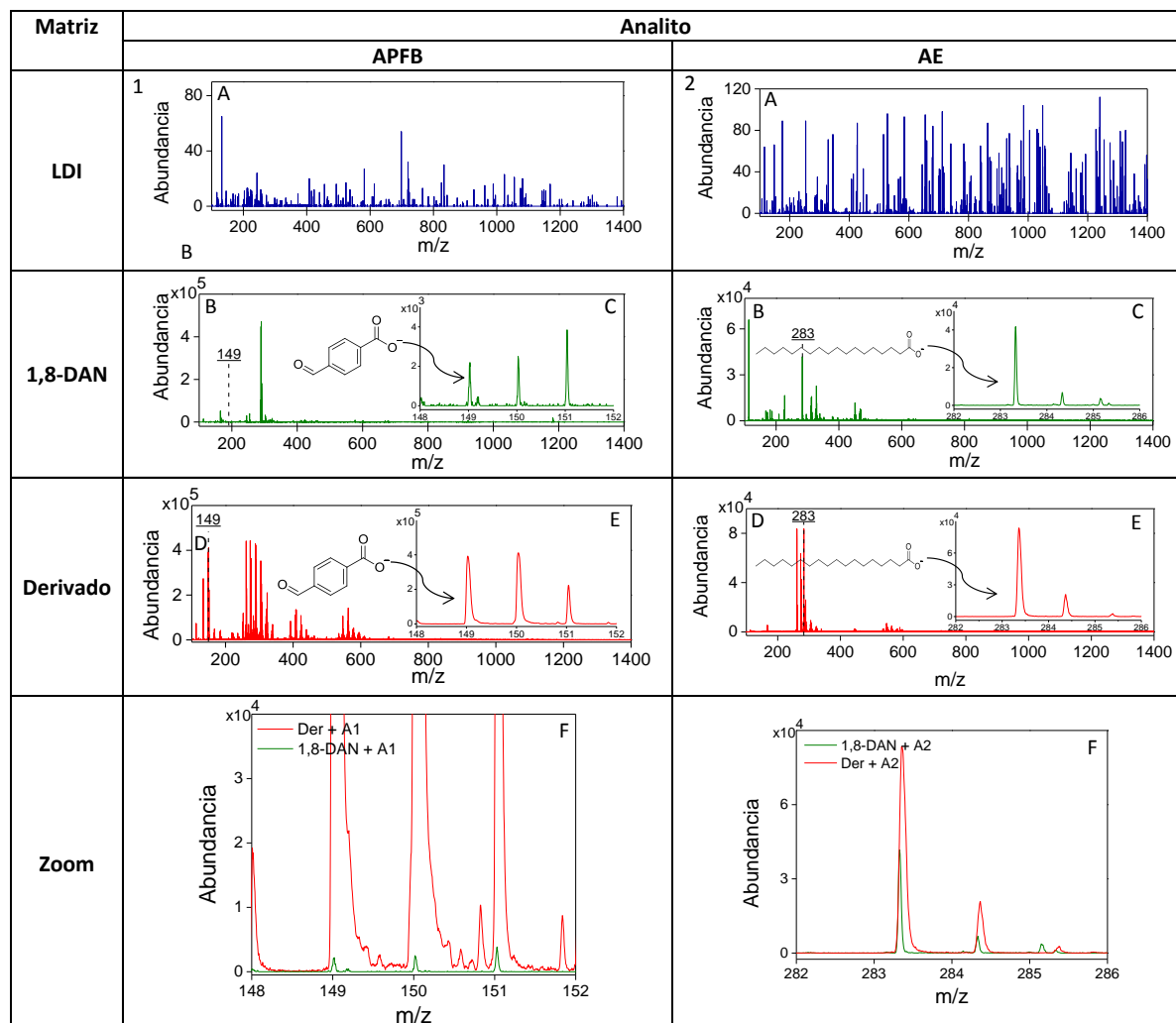
En las figuras 18 y 19 se presentan los resultados obtenidos para los analitos en las dos matrices empleando como solvente la mezcla THF/H<sub>2</sub>O a una atenuación

del 20 y 25% respectivamente. El comportamiento observado respecto a la potencia del láser es similar a la observada en los espectros adquiridos usando ACN/H<sub>2</sub>O. A simple vista no se aprecia alguna diferencia significativa usando uno de los dos solventes.

**Figura 18. Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 20% en THF/H<sub>2</sub>O.**



**Figura 19. Análisis LDI y MALDI de los analitos APFB y AE usando 1,8-DAN y su derivado como matrices y atenuación láser de 25% en THF/H<sub>2</sub>O.**



En general a medida que se aumenta la potencia del láser se incrementa tanto el número de señales en el espectro como su abundancia. Sin embargo la relación S/N disminuye debido al aumento del ruido de fondo en el espectro. Sin embargo el aumento de la potencia del láser también puede causar la fragmentación del

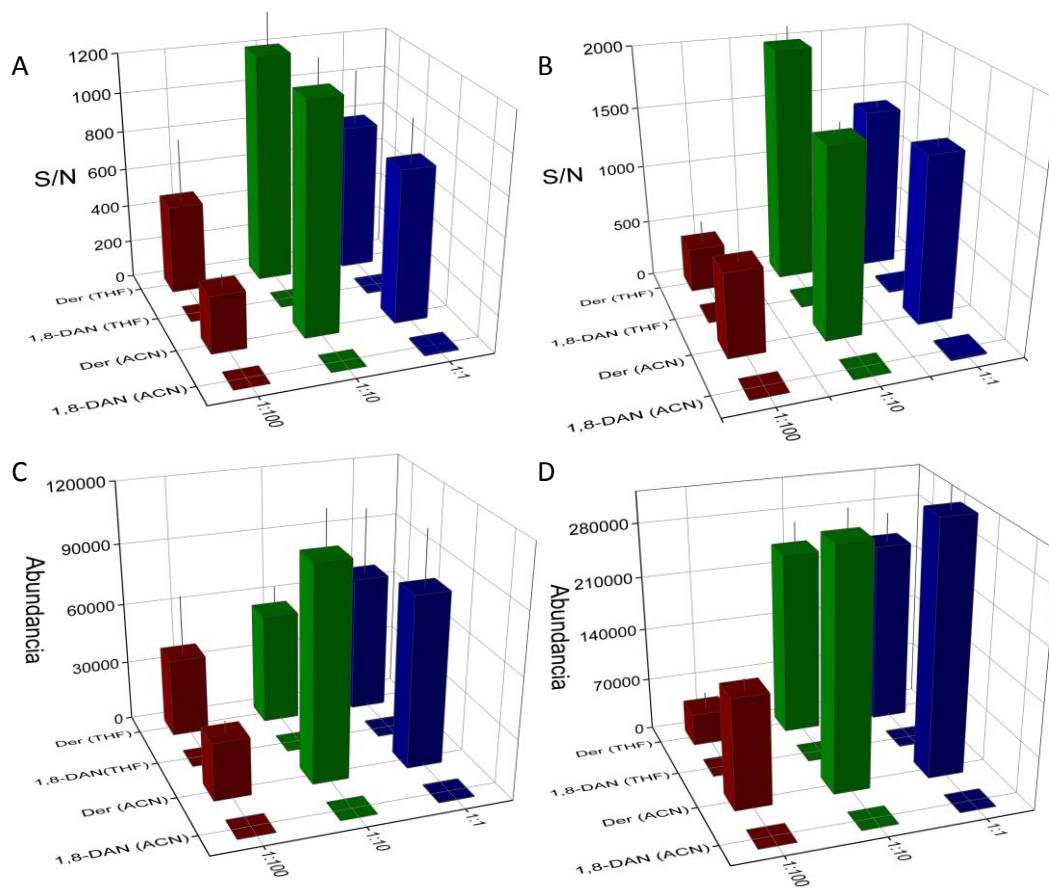
analito y la formación de *clusters* por reacciones unimoleculares y/o bimoleculares de la matriz y el analito lo que dificulta la asignación de señales en el espectro MALDI. Por esta razón que se recomienda operar el láser a la mínima potencia requerida para generar los iones de interés.

#### **4.5. Evaluación del derivado como matriz**

Otro de los parámetros evaluados en el desempeño del derivado como matriz para MALDI en modo negativo fue la relación molar de analito a matriz. Los resultados obtenidos para las relaciones estudiadas (1:1; 1:10 y 1:100, correspondientes a  $2 \times 10^{-8}$ ,  $2 \times 10^{-9}$  y  $2 \times 10^{-10}$  moles del analito en target) se presentan en la figura 20 para el APFB y en la figura 21 para el AE.

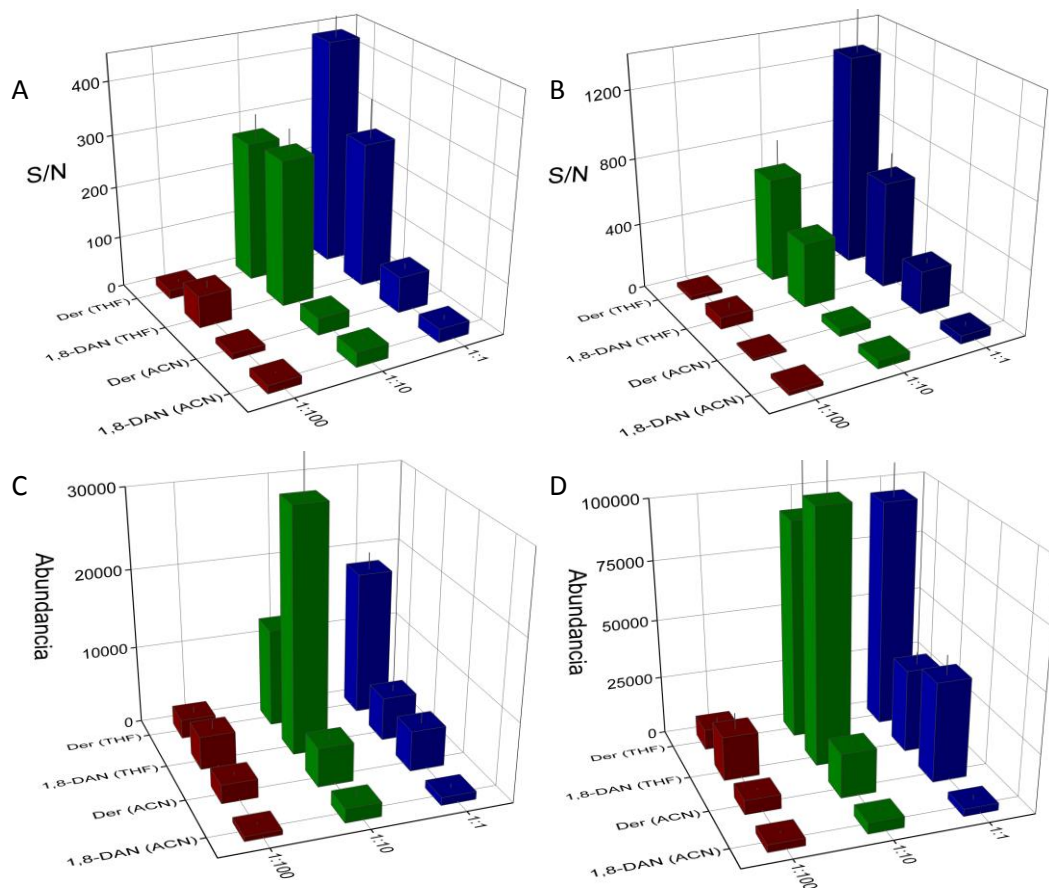
Puede observarse para el APFB (figura 20 A y C) que usando una atenuación del láser del 20% tanto la relación S/N como la abundancia de la señal alcanzan un máximo para la relación molar de 1:10 usando como matriz el derivado en los dos solventes (ACN:H<sub>2</sub>O y THF:H<sub>2</sub>O). Es posible concluir que el derivado actúa de forma más eficiente durante el proceso de ionización/desorción que la matriz estándar (1,8-DAN). Usando el láser a un 25% esta tendencia se mantiene; sin embargo la relación S/N aumenta (1982,2) al igual que la abundancia de los iones.

**Figura 20. Efecto de la relación molar entre el analito y la matriz sobre la relación S/N y la abundancia de los iones formados del APFB. A y C) Atenuación 20%, B y D) Atenuación 25%.**



Quando se emplea una relación molar analito:matriz 1:100 se alcanza una relación S/N aceptable, superior a 400 usando el derivado como matriz y 20-25% de atenuación. Al requerir menor moléculas de analito respecto a las moléculas de matriz se disminuye la probabilidad de choques intramoleculares en el analito evitando la formación de clusters y otros aductos [38].

**Figura 21. Efecto de la relación molar entre el analito y la matriz sobre la relación S/N y la abundancia de los iones formados del AE. A y C) Atenuación 20%, B y D) Atenuación 25%.**

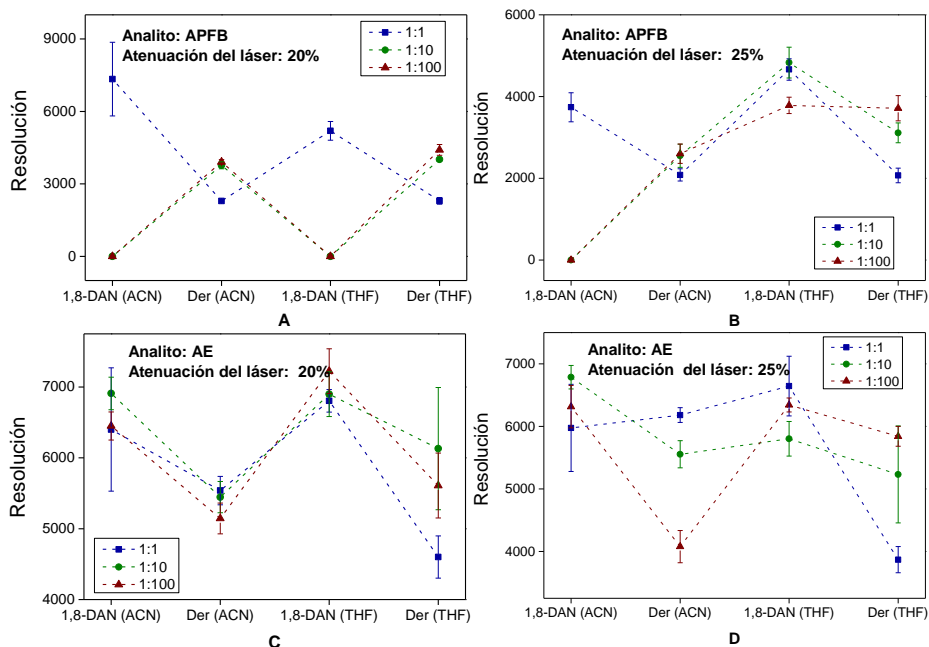


Para el caso del AE (figura 21 A y C), usando una atenuación del láser del 20% y 25% la relación S/N alcanza un máximo para la relación molar 1:1; la abundancia de la señal alcanzan un máximo para la relación molar de 1:10 usando como matriz el derivado en el solvente ACN:H<sub>2</sub>O. Es posible concluir que el derivado actúa de forma más eficiente durante el proceso de ionización/desorción que la matriz estándar (1,8-DAN). Usando el láser a un 25% esta tendencia se mantiene;

sin embargo la relación S/N aumenta (1982,2) al igual que la abundancia de los iones.

Finalmente, se analizó la resolución de los espectros obtenidos empleando tanto la matriz de referencia como el derivado (E)-N<sup>1</sup>-(4-metoxibencilideno)-naftalen-1,8-diamina. La figura 22 muestra que la mayor resolución en los espectros para el caso del análisis del APFB se observa cuando se emplea el derivado en THF a relaciones molares de 1:10 y 1:100 ( $2 \times 10^{-9}$  y  $2 \times 10^{-10}$  moles del analito en target) con atenuación del láser al 20%. Estos resultados corroboran las observaciones anteriores relacionadas con abundancia iónica y relación S/N. Cuando la atenuación del láser aumenta en un 5%, la resolución para una relación 1:10 disminuye la resolución de 4000 a 3000 y para la relación 1:100 la resolución paso de ser 4900 a 3800. Se puede verificar así que el uso de potencias mayores disminuye la calidad y resolución de las señales ya que puede causar la formación de *clúster* y fragmentación del analito [39].

**Figura 22. Efecto de la relación molar entre las matrices con los analitos, APFB y AE sobre la Resolución y los dos solventes. A) Resolución del APFB con atenuación del láser de 20%. B) Resolución del APFB con atenuación del láser de 25%. C) Resolución del AE con atenuación del láser 20%. D) Resolución del AE con atenuación del láser 25%.**



En el caso del AE, se observa cuando se emplea el derivado en THF a relaciones molares de 1:1 y 1:10 ( $2 \times 10^{-8}$  y  $2 \times 10^{-9}$  moles del analito en target) con atenuación del láser al 20%. Estos resultados corroboran las observaciones anteriores relacionadas con abundancia iónica y relación S/N. Cuando la atenuación del láser aumenta en un 5%, la resolución para una relación 1:10 disminuye la resolución de 4568 a 3874 y para la relación 1:100 la resolución paso de ser 6143 a 5242. El uso de relaciones molares de 1:10 y 1:100 para el caso del Der brindan mayor resolución de los espectros. Este hecho es muy importante en el análisis MALDI ya que en la mayoría de caso la cantidad de muestra es mínima y la concentración de los analitos se encuentra por debajo de un orden  $10^{-3}$  M [40].

## 5. CONCLUSIONES

---

El (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina exhibió propiedades optoelectrónicas adecuadas para su desempeño como matriz MALDI modo negativo.

Los análisis del ácido *p*-formilbenzoico y el ácido esteárico empleando el derivado mostró un mejor resultado en cuanto a la abundancia iónica, relación S/N y resolución de los espectros MALDI respecto a los resultados obtenidos con el 1,8-DAN.

La polaridad del derivado se debe al grupo amino del anillo naftaleno y por el metoxibencenil mejoran su solubilidad en solventes moderadamente polares como el ACN y el THF, además, interactúan de forma eficiente en el proceso de co-cristalización de las moléculas ácidas analizadas.

El uso del Derivado como matriz para el análisis del ácido esteárico y ácido *p*-formilbenzoico permitió obtener espectros reproducibles y con alta resolución con cantidades de analito inferiores a  $10^{-5}$ M con relaciones molares de analito a matriz iguales a 1:10 y 1:100 con una atenuación mínima del láser de 20%.

## 6. RECOMENDACIONES

---

Analizar otros analitos con carácter ácido que puedan originar iones negativos estables en el proceso de ionización/desorción empleando el (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina como la matriz MALDI en modo negativo y de este modo realizar un listado de las moléculas en las que se puede utilizar este derivado como matriz.

Con el fin de ampliar la cantidad de matrices que se emplean para el análisis MALDI en modo negativo, se recomienda diseñar y sintetizar otros derivados del 1,8-DAN incluyendo más grupos amina y otros cromóforos que le confieran la capacidad de absorber la energía suministrada por el láser de Nd-YAG y evaluar su desempeño como matrices MALDI.

Realizar estudios del rendimiento cuántico del (*E*)-*N*<sup>1</sup>-(4-metoxibenciliden)-naftaleno-1,8-diamina y de este modo tener mayor conocimiento de las propiedades optoelectrónicas con fines de explicar su buen comportamiento como matriz en el proceso de ionización/desorción MALDI.

## CITAS

---

1. Stashenko, E. E. & Martínez, J. R. Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC-MS. Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas. *Sci. Chromatogr.* **2**, 5–12 (2010).
2. Cohen, L. H. & Gusev, A. I. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 571–586 (2002).
3. Robinson, A. S. & Jiang, W. Ion Mobility-Mass Spectrometry. (2013). doi:10.1002/9780470027318.a9292
4. Derrick, P. J. ISSN 1469-0667 IN THIS ISSUE human placenta tissue by matrix-assisted laser desorption/ionisation / matrices for negative mode metabolomics / electrical conductivity of matrix crystals. **19**, (2013).
5. Vaidyanathan, S. & Goodacre, R. Quantitative detection of metabolites using matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry with 9-aminoacridine as the matrix. 2072–2078 (2007). doi:10.1002/rcm
6. Erra-balsells, D. R. “ Del Vuelo de las Proteínas y de como lograrlo ” ( Espectrometría de masa UV-MALDI ). 56–69 (2004).
7. Chen, R. *et al.* N-(1-naphthyl) ethylenediamine dinitrate: A new matrix for negative ion MALDI-TOF MS analysis of small molecules. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 1454–1460 (2012).
8. Becher, J., Muck, A., Mithöfer, A. & Boland, W. Negative ion mode matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometric analysis of 9-aminoacridine matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 1153–1158 (2008).
9. Vermillion-Salsbury, R. L. & Hercules, D. M. 9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1575–1581 (2002).
10. Shroff, R. & Svatoš, A. Proton sponge: A novel and versatile MALDI matrix for the analysis of metabolites using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 7954–7959 (2009).

11. Calvano, C. D., Monopoli, a., Ditaranto, N. & Palmisano, F. 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene/9-aminoacridine: A new binary matrix for lipid fingerprinting of intact bacteria by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **798**, 56–63 (2013).
12. Cai, Y., Jiang, Y. & Cole, R. B. Anionic adducts of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 1638–1644 (2003).
13. Edwards, J. L. & Kennedy, R. T. Metabolomic Analysis of Eukaryotic Tissue and Prokaryotes Using Negative Mode MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **77**, 2201–2209 (2005).
14. Shroff, R. & Muck, A. Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. 3295–3300 (2007). doi:10.1002/rcm
15. Doubsky, J. Acid – base-driven matrix-assisted mass spectrometry for targeted metabolomics. *Direct* **106**, (2009).
16. Jurinke, C. & Oeth, P. Christian Jurinke ,\* Paul Oeth , and Dirk van den Boom. **26**, (2004).
17. Rader, H. J. & Schrepp, W. MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of synthetic polymers. 272–293 (1998).
18. Mamyrin, B. A. Time-of-flight mass spectrometry ( concepts , achievements , and prospects ). **206**, 251–266 (2001).
19. Fitzgerald, M. C., Parr, G. R. & Smith, L. M. Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Anal. Chem.* **65**, 3204–3211 (1993).
20. Harvey, D. J. MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION / IONIZATION MASS SPECTROMETRY OF CARBOHYDRATES. (1999).
21. Chen, C.-H. W. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal. Chem. Acta* **624**, 16–36 (2008).
22. Stutzman, J. R., McLuckey, S. A. Ion/Ion Reactions of MALDI-Derived Peptide Ions: Increased Sequence Coverage via Covalent and Electrostatic Modification upon Charge Inversion. *Anal. Chem.* **84**, 10679-10685 (2012).

23. Niu, S., Zhang, W., Chait, B. T. Direct Comparison of Infrared and Ultraviolet Wavelength Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins. *J Am Soc Mass Spectrom.* **9**, 1-7 (1998).
24. Sachon, E. *et al.* D -Amino Acid Detection in Peptides by MALDI-TOF-TOF. *Anal. Chem.***81**, 4389-4396 (2009).
25. Wuhrer, M., Deelder, A. M. Negative-Mode MALDI-TOF/TOF-MS of Oligosaccharides Labeled with 2-Aminobenzamide. *Anal. Chem.* **77**, 6954-6959 (2005).
26. Golovlev, V. V. *et al.* Nonresonant MALDI of Oligonucleotides: Mechanism of Ion Desorption. *Anal. Chem.* **73**, 809-812 (2001).
27. Glückmann, M. *et al.* Mechanisms in MALDI analysis: Surface interaction or incorporation of analytes? *Int. J. Mass Spectrom.* **210-211**, 121–132 (2001).
28. Bae, Y. J., Moon, J. H. & Kim, M. S. Expansion cooling in the matrix plume is under-recognized in MALDI mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1070–1078 (2011).
29. Cotter, R. Time-of-Flight Mass Spectrometry Instrumentation and Applications in biological Research. 326 (1997).
30. De Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications.* 489 (2007).
31. Gross, J. *Mass Spectrometry A Textbook.* 1–518 (2004).
32. Maltsev, A. *et al.* The Rearrangements of Naphthylnitrenes: UV/Vis and IR Spectra of Azirines, Cyclic Ketenimines, and Cyclic Nitrile Ylides. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 237-249 (2004).
33. Soediono, B. Espectroscopia UV-Vis. *Journal of Chemical Information and Modeling.* **53**, 31-65 (1989). doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
34. Marenich, A. V., Cramer, C. J., Truhlar, D. G. Electronic Absorption Spectra and Solvatochromic Shifts by the Vertical Excitation Model: Solvated Clusters and Molecular Dynamics Sampling. *J. Phys. Chem. B.* **119**, 958-967 (2015). doi: 10.1021/jp506293w.
35. Meier, M. A., Adams, N., Schubert, U. S. Statistical Approach To Understand MALDI-TOFMS Matrices: Discovery and Evaluation of New MALDI Matrices. *Anal. Chem.* **79**, 863-869 (2007).

36. Koubenakis, A. *et al.* Time-Resolved Surface Temperature Measurement of MALDI Matrices under Pulsed UV Laser Irradiation. *J. Phys. Chem. A.* **108**, 2405-2410 (2004).
37. Pashkova, A., Moskovets, E., Karger, B. L. Coumarin Tags for Improved Analysis of Peptides by MALDI-TOF MS and MS/MS. 1. Enhancement in MALDI MS Signal Intensities. *Anal. Chem.* **76**, 4550-4557 (2004).
38. Wang, M. Z., Fitzgerald, M. C. A Solid Sample Preparation Method That Reduces Signal Suppression Effects in the MALDI Analysis of Peptides. *Anal. Chem.* **73**, 625-631 (2001).
39. Smirnov, I. P. *et al.* Suppression of  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid Matrix Clusters and Reduction of Chemical Noise in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 2958-2965 (2004).
40. Anker, J. N. *et al.* Detection and Identification of Bioanalytes with High Resolution LSPR Spectroscopy and MALDI Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. C.* **113**, 5891-5894 (2009).

## BIBLIOGRAFIA

---

ANKER, J. N. *et al.* Detection and Identification of Bioanalytes with High Resolution LSPR Spectroscopy and MALDI Mass Spectrometry. *J. Phys. Chem. C.* (2009) **113**, 5891-5894.

BAE, Y. J., MOON, J. H. & KIM, M. S. Expansion cooling in the matrix plume is under-recognized in MALDI mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2011) **22**, 1070–1078.

BECHER, J., MUCK, A., MITHÖFER, A. & BOLAND, W. Negative ion mode matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometric analysis of 9-aminoacridine matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2008) **22**, 1153–1158.

CALVANO, C. D., MONOPOLI, A., DITARANTO, N. & PALMISANO, F. 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene/9-aminoacridine: A new binary matrix for lipid fingerprinting of intact bacteria by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **798**, (2013) 56–63.

CAI, Y., JIANG, Y. & COLE, R. B. Anionic adducts of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, (2003) 1638–1644.

CHEN, C.-H. W. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal. Chem. Acta* **624**, (2008) 16–36.

CHEN, R. *et al.* N-(1-naphthyl) ethylenediamine dinitrate: A new matrix for negative ion MALDI-TOF MS analysis of small molecules. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, (2012) 1454–1460.

COHEN, L. H. & GUSEV, A. I. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, (2002) 571–586.

COTTER, R. Time-of-Flight Mass Spectrometry Instrumentation and Applications in biological Research. (1997) 326.

DE HOFFMANN, E. & STROOBANT, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. (2007) 489.

DERRICK, P. J. ISSN 1469-0667 *In this issue human placenta tissue by matrix-assisted laser desorption/ionisation / matrices for negative mode metabolomics / electrical conductivity of matrix crystals*. (2013) **19**.

DOUBSKY, J. Acid – base-driven matrix-assisted mass spectrometry for targeted metabolomics. *Direct* (2009) **106**.

EDWARDS, J. L. & KENNEDY, R. T. Metabolomic Analysis of Eukaryotic Tissue and Prokaryotes Using Negative Mode MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **77**, (2005) 2201–2209.

ERRA-BALSELLS, D. R. “ Del Vuelo de las Proteínas y de como lograrlo ” ( Espectrometría de masa UV-MALDI ). (2004) 56–69.

FITZGERALD, M. C., PARR, G. R. & SMITH, L. M. Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Anal. Chem.* **65**, (1993) 3204–3211.

GLÜCKMANN, M. *et al.* Mechanisms in MALDI analysis: Surface interaction or incorporation of analytes? *Int. J. Mass Spectrom.* **210-211**, (2001) 121–132.

GOLOVLEV, V. V. *et al.* Nonresonant MALDI of Oligonucleotides: Mechanism of Ion Desorption. *Anal. Chem.* **73**, (2001) 809-812.

GROSS, J. *Mass Spectrometry A Textbook*. (2004) 1–518.

HARVEY, D. J. Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of carbohydrates. (1999).

JURINKE, C. & OETH, P. Christian Jurinke ,\* Paul Oeth , and Dirk van den Boom. **26**, (2004).

KOUBENAKIS, A. *et al.* Time-Resolved Surface Temperature Measurement of MALDI Matrices under Pulsed UV Laser Irradiation. *J. Phys. Chem. A.* **108**, (2004) 2405-2410.

MALTSEV, A. *et al.* The Rearrangements of Naphthylnitrenes: UV/Vis and IR Spectra of Azirines, Cyclic Ketenimines, and Cyclic Nitrile Ylides. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, (2004) 237-249.

MAMYRIN, B. A. Time-of-flight mass spectrometry ( concepts , achievements , and prospects ). **206**, (2001) 251–266.

MARENICH, A. V., CRAMER. C. J., TRUHLAR. D. G. Electronic Absorption Spectra and Solvatochromic Shifts by the Vertical Excitation Model: Solvated Clusters and Molecular Dynamics Sampling. *J. Phys. Chem. B.* **119**, (2015) 958-967. doi: 10.1021/jp506293w.

MEIER, M. A., ADAMS, N., SCHUBERT, U. S. Statistical Approach To Understand MALDI-TOFMS Matrices: Discovery and Evaluation of New MALDI Matrices. *Anal. Chem.* **79**, (2007) 863-869.

NIU, S., ZHANG, W., CHAIT. B. T. Direct Comparison of Infrared and Ultraviolet Wavelength Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins. *J Am Soc Mass Spectrom.* **9**, (1998) 1-7.

PASHKOVA, A., MOSKOVETS, E., KARGER, B. L. Coumarin Tags for Improved Analysis of Peptides by MALDI-TOF MS and MS/MS. 1. Enhancement in MALDI MS Signal Intensities. *Anal. Chem.* **76**, (2004) 4550-4557.

RADER, H. J. & SCHREPP, W. MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of synthetic polymers. (1998) 272–293.

ROBINSON, A. S. & JIANG, W. Ion Mobility-Mass Spectrometry. (2013).

SACHON, E. *et al.* D -Amino Acid Detection in Peptides by MALDI-TOF-TOF. *Anal. Chem.***81**, (2009) 4389-4396.

SHROFF, R. & MUCK, A. Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. (2007) 3295–3300.

SHROFF, R. & SVATOŠ, A. Proton sponge: A novel and versatile MALDI matrix for the analysis of metabolites using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, (2009) 7954–7959.

SMIRNOV, I. P. *et al.* Suppression of  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid Matrix Clusters and Reduction of Chemical Noise in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, (2004) 2958-2965.

SOEDIONO, B. Espectroscopia UV-Vis. *Journal of Chemical Information and Modeling.* **53**, (1989) 31-65.

STASHENKO, E. E. & MARTÍNEZ, J. R. Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC-MS. Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas. *Sci. Chromatogr.* **2**, (2010) 5–12.

STUTZMAN, J. R., MCLUCKEY, S. A. Ion/Ion Reactions of MALDI-Derived Peptide Ions: Increased Sequence Coverage via Covalent and Electrostatic Modification upon Charge Inversion. *Anal. Chem.* **84**, (2012) 10679-10685.

VAIDYANATHAN, S. & GOODACRE, R. Quantitative detection of metabolites using matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry with 9-aminoacridine as the matrix. (2007) 2072–2078.

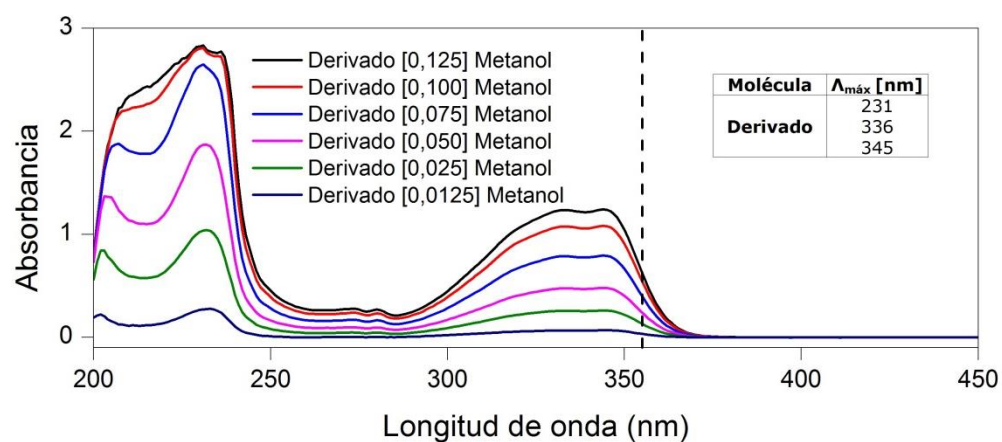
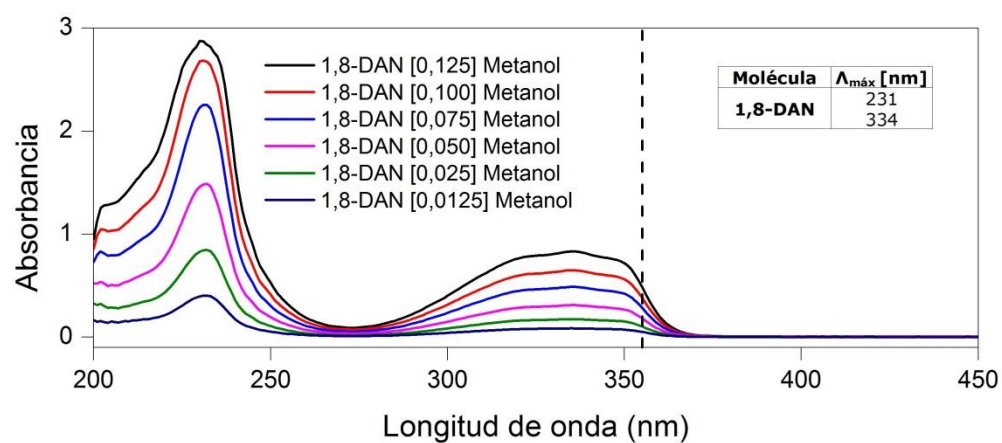
VERMILLION-SALSBURY, R. L. & HERCULES, D. M. 9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, (2002) 1575–1581.

WANG, M. Z., FITZGERALD, M. C. A Solid Sample Preparation Method That Reduces Signal Suppression Effects in the MALDI Analysis of Peptides. *Anal. Chem.* **73**, (2001) 625-631.

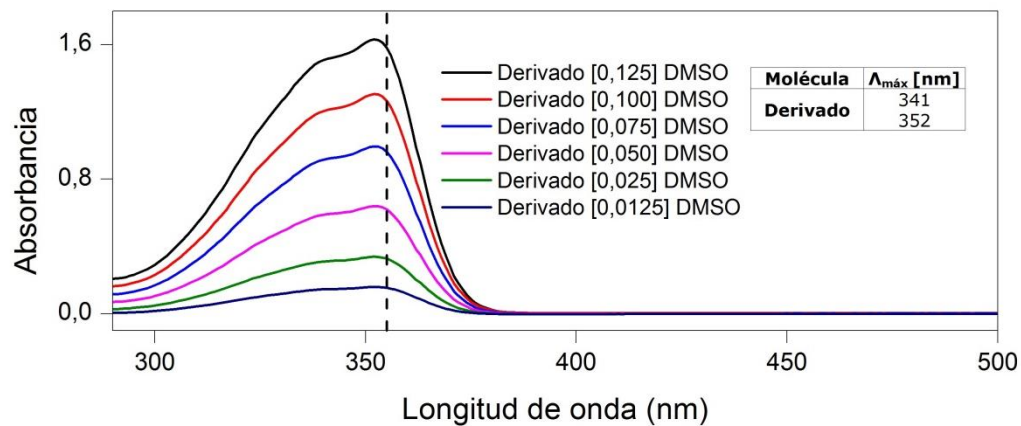
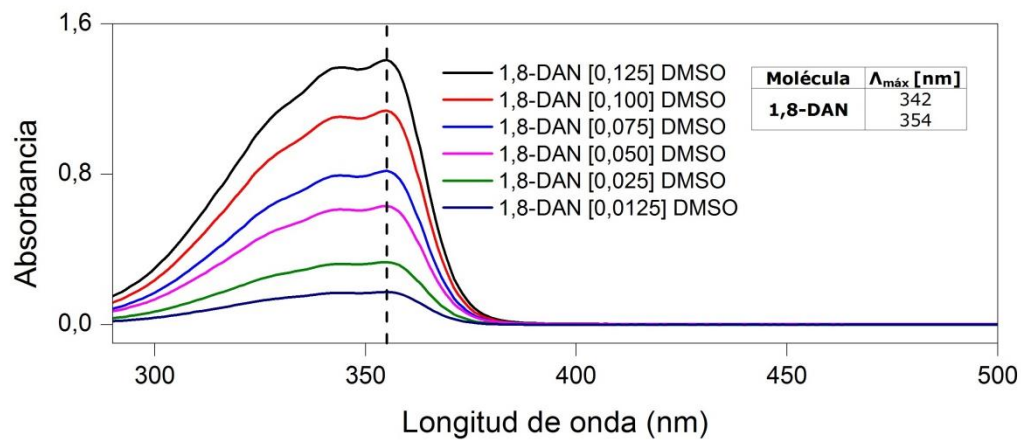
WUHRER, M., DEELDER, A. M. Negative-Mode MALDI-TOF/TOF-MS of Oligosaccharides Labeled with 2-Aminobenzamide. *Anal. Chem.* **77**, (2005) 6954-6959.

# ANEXOS

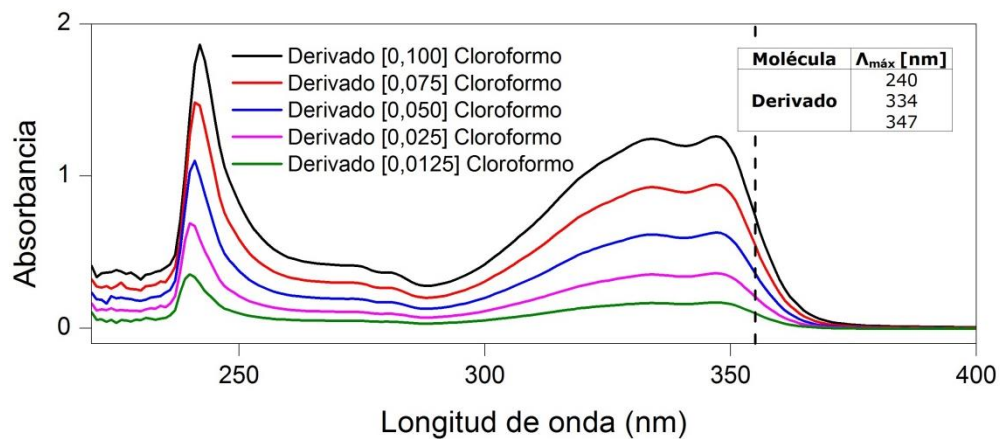
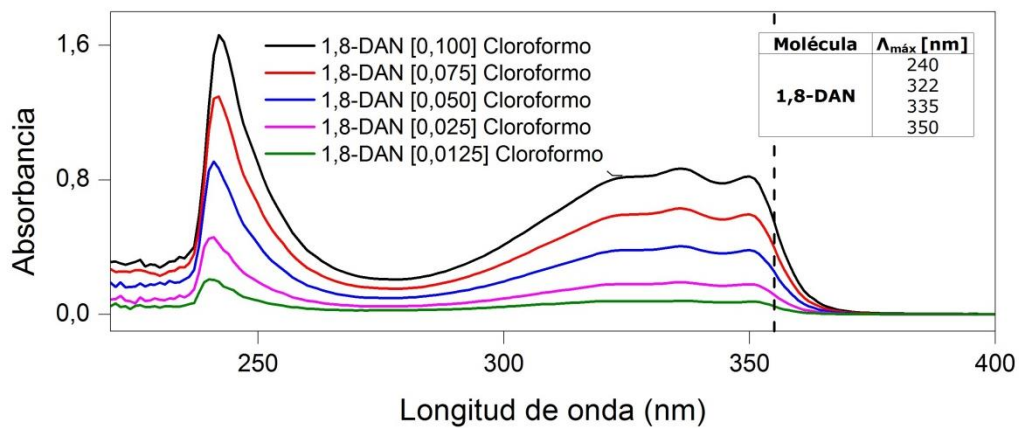
**Anexo A.** Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en metanol.



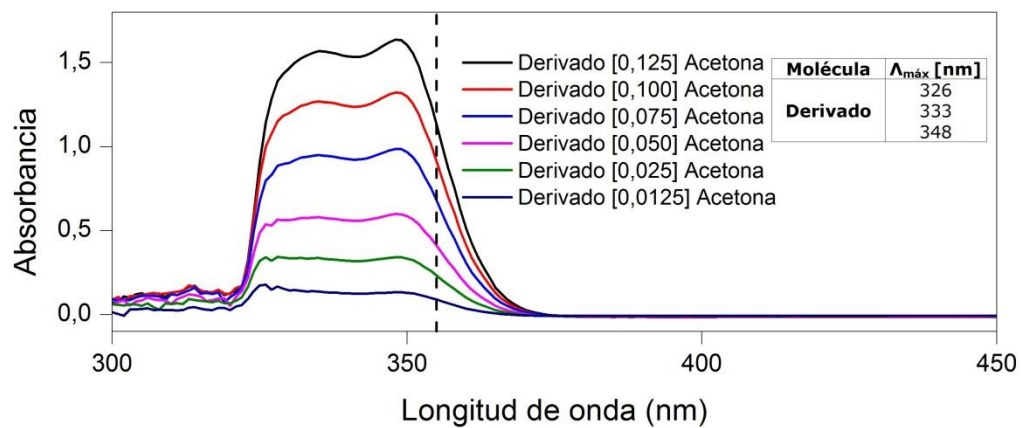
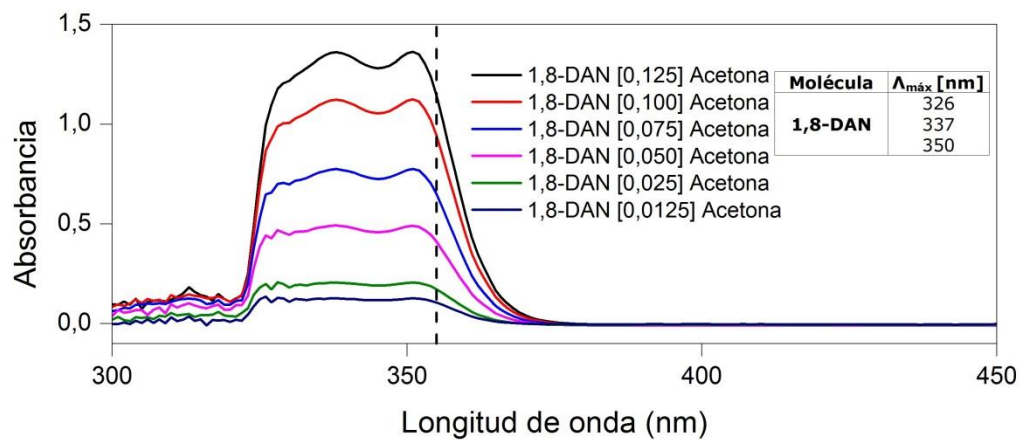
**Anexo B.** Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en dimetilsulfóxido.



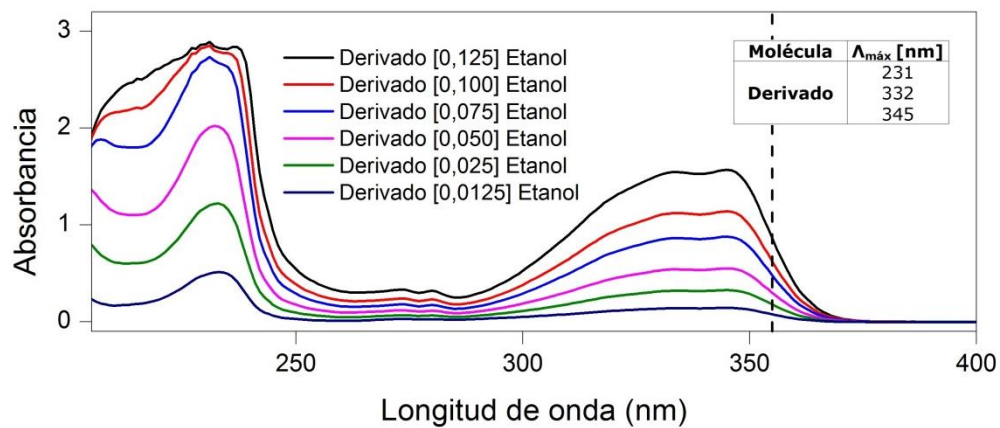
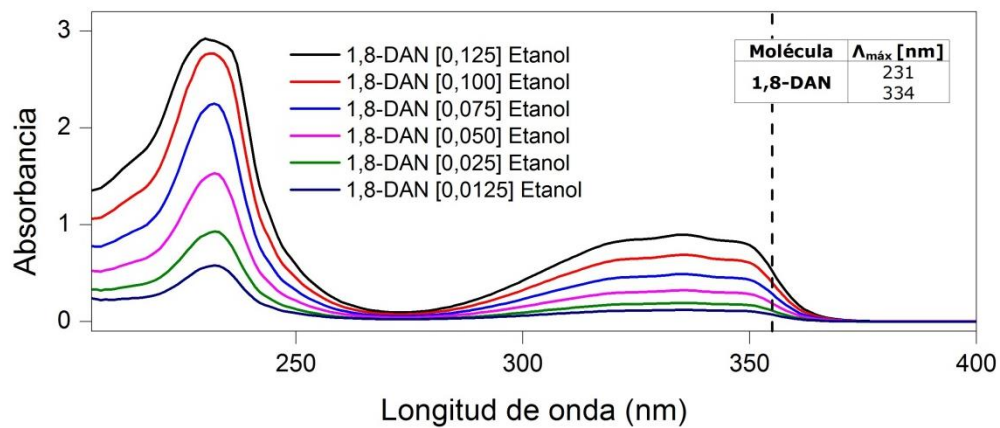
**Anexo C.** Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en cloroformo.



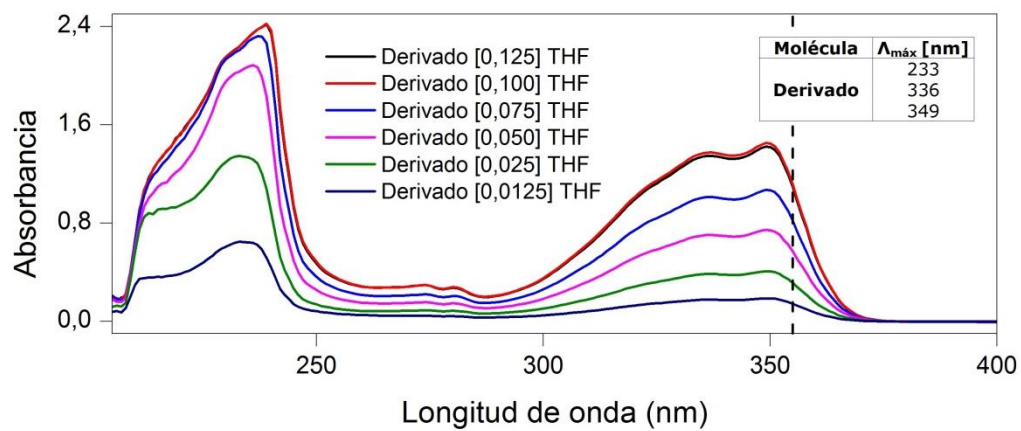
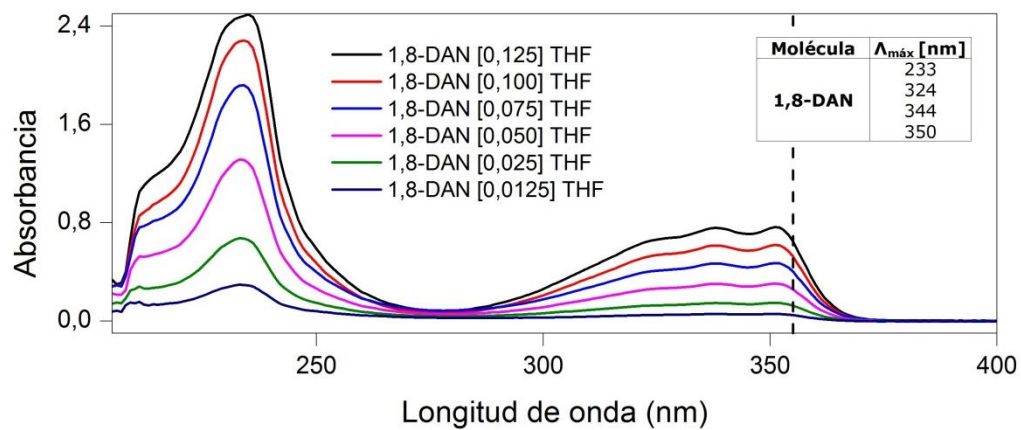
**Anexo D.** Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en acetona.



**Anexo E.** Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en etanol.



**Anexo F.** Espectros de absorción UV-Vis de las moléculas 1,8-DAN y su Derivado en tetrahidrofurano.



**Anexo G.** Absorbancia de 1,8-DAN y su Derivado con su respectivo coeficiente de absorción molar.

**Acetonitrilo**

<b>Concentración [M]</b>	<b>Absorbancia 1,8-DAN</b>	<b>Absorbancia Derivado</b>
1,25E-5	0,093	0,09
2,5E-5	0,186	0,189
5E-5	0,362	0,359
7,5E-5	0,568	0,524
1E-4	0,717	0,712
1,25E-4	0,893	0,873
<b><math>\epsilon</math> [M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>7167,327</b>	<b>6984,436</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9987</b>	<b>0,9995</b>

**Metanol**

<b>Concentración [M]</b>	<b>Absorbancia 1,8-DAN</b>	<b>Absorbancia Derivado</b>
1,25E-5	0,051	0,066
2,5E-5	0,104	0,163
5E-5	0,189	0,275
7,5E-5	0,286	0,433
1E-4	0,378	0,575
1,25E-4	0,486	0,663
<b><math>\epsilon</math> [M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>3820,296</b>	<b>5436,826</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9991</b>	<b>0,9939</b>

### Dimetilsulfóxido

<b>Concentración [M]</b>	<b>Absorbancia 1,8-DAN</b>	<b>Absorbancia Derivado</b>
1,25E-5	0,121	0,102
2,5E-5	0,251	0,280
5E-5	0,511	0,564
7,5E-5	0,768	0,910
1E-4	1,081	1,21
1,25E-4	1,339	1,528
<b><math>\epsilon</math> [M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>10785,256</b>	<b>12417,986</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9989</b>	<b>0,9987</b>

### Cloroformo

<b>Concentración [M]</b>	<b>Absorbancia 1,8-DAN</b>	<b>Absorbancia Derivado</b>
1,25E-5	0,0523	0,097
2,5E-5	0,118	0,209
5E-5	0,26	0,366
7,5E-5	0,404	0,549
1E-4	0,559	0,745
1,25E-4	0,69	0,825
<b><math>\epsilon</math> [M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>5637,224</b>	<b>6803,618</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9987</b>	<b>0,9897</b>

### Acetona

Concentración [M]	Absorbancia 1,8-DAN	Absorbancia Derivado
1,25E-5	0,123	0,064
2,5E-5	0,187	0,211
5E-5	0,423	0,390
7,5E-5	0,664	0,663
1E-4	0,969	0,897
1,25E-4	1,163	1,120
$\epsilon$ [ $M^{-1} cm^{-1}$ ]	<b>9488,055</b>	<b>9161,809</b>
$R^2$	<b>0,9946</b>	<b>0,9966</b>

### Etanol

Concentración [M]	Absorbancia 1,8-DAN	Absorbancia Derivado
1,25E-5	0,057	0,096
2,5E-5	0,11	0,196
5E-5	0,188	0,319
7,5E-5	0,284	0,500
1E-4	0,398	0,641
1,25E-4	0,524	0,883
$\epsilon$ [ $M^{-1} cm^{-1}$ ]	<b>4058,15</b>	<b>6739,795</b>
$R^2$	<b>0,9940</b>	<b>0,9921</b>

### Tetrahidrofurano

<b>Concentración [M]</b>	<b>Absorbancia 1,8-DAN</b>	<b>Absorbancia Derivado</b>
1,25E-5	0,04	0,115
2,5E-5	0,115	0,282
5E-5	0,249	0,538
7,5E-5	0,381	0,79
1E-4	0,542	1,088
1,25E-4	0,649	1,069
<b><math>\epsilon</math> [M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>5377,474</b>	<b>9341,399</b>
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,9971</b>	<b>0,9602</b>