

Comparación de Métodos de Fragmentación de Péptidos Mediante MALDI TOF/TOF (LIFT Y  
CID)

Paula Camila Bonza Pérez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director:

Dr. Herminul De Jesús Cano Calle

Doctor en química.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2025

**Dedicatoria**

Con amor y profunda gratitud a mi madre, por ser el cimiento de mi esfuerzo y mi mayor inspiración.

### **Agradecimientos**

En primer lugar, deseo expresar mi sincero agradecimiento a mi madre, cuyo apoyo incondicional y constante aliento han sido fundamentales para alcanzar esta meta académica. Su fe en mí y su dedicación han sido una fuente de inspiración inagotable.

A mis apreciadas amigas y colegas, Elizabeth G. y Ana B., extiendo mi gratitud por su valiosa compañía y colaboración durante este exigente proceso formativo. Compartir los desafíos y celebrar los logros junto a ustedes ha enriquecido profundamente mi experiencia.

A mis estimados amigos, Mateo C. y Kari C., agradezco sinceramente su apoyo incondicional y su presencia constante en los momentos en que más lo necesité. Su amistad y las experiencias compartidas han sido un importante soporte emocional y una fuente de motivación.

Asimismo, deseo reconocer la silenciosa compañía de mis leales perros, Magnus y Ginebra, quienes con su presencia constante hicieron más llevaderas las largas horas dedicadas al estudio.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento por su contribución a la culminación de este trabajo.

**Tabla de Contenido**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>16</b>
1.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	16
<b>2. MARCO TEÓRICO:</b> .....	<b>17</b>
2.1. TÉCNICA MALDI TOF/TOF .....	17
2.2. DESORCIÓN/IONIZACIÓN Y PAPEL DE LA MATRIX.....	18
2.3. FUNDAMENTOS DEL LÁSER PARA EL ANÁLISIS .....	21
2.4. FUNDAMENTOS DEL TIEMPO DE VUELO .....	22
2.5. FUNDAMENTOS DE LIFT.....	25
2.6. FUNDAMENTOS DE CID .....	26
2.7. ANCHORCHIP TARGET: ANCLAJE PRECISO DE MUESTRAS.....	29
2.8. PÉPTIDOS.....	31
2.9. SUSTANCIA P .....	32
2.10. ANGIOTENSINA II .....	33
<b>3. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES</b> .....	<b>34</b>
<b>4. METODOLOGIA:</b> .....	<b>34</b>
4.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	34
4.2. PREPARACIÓN DE LA MATRIX: .....	34
4.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:.....	35
4.4. OBTENCIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES .....	35
4.5. ADQUISICIÓN DE DATOS .....	35
4.6. ANÁLISIS DE DATOS .....	36

<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
5.1. ESPECTRO MALDI-TOF/TOF DEL ESTÁNDAR EN LA IDENTIFICACIÓN DE ANGIOTENSINA II Y SUSTANCIA P.....	36
5.2. EL ANÁLISIS MALDI-TOF/TOF SOBRE LA IDENTIFICACIÓN PEPTÍDICA ENTRE LOS VALORES TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES.....	38
5.3. IONES.....	39
5.3.1. IONES X, Y, Z.....	39
5.3.2. IONES a, b, c: .....	39
5.4. IDENTIFICACIÓN PRIMARIA DE LA COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE IONES AMONIO .....	40
5.5. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a,b,c) Y (X, Y, Z) DE LA ANGIOTENSINA II.....	41
5.5.1. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a) Y (X).....	41
5.5.2. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (b) Y (Y) .....	43
5.5.3. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (c) Y (Z).....	45
5.6. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a,b,c) Y (X, Y, Z) DE LA SUSTANCIA P .....	46
5.6.1. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a) Y (X).....	46
5.6.2. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (b) Y (Y) .....	48
5.6.3. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (c) Y (Z).....	50
5.7. ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE ANGIOTENSINA II MEDIANTE MALDI-TOF/TOF-LIFT.....	53

5.8. ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE ANGIOTENSINA II MEDIANTE MALDI-TOF/TOF-CID.....	60
5.9. ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE SUSTANCIA P MEDIANTE MALDI-TOF/TOF-LIFT.....	66
5.10. ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE LA SUSTANCIA P MEDIANTE MALDI-TOF/TOF-CID .....	73
<b>CONCLUSIONES .....</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	

**Lista de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Estructura química de los fragmentos aX de los aminoácidos de la Angiotensina II ....	41
<b>Tabla 2.</b> Estructura química de los fragmentos bY de los aminoácidos de la Angiotensina II .....	43
<b>Tabla 3.</b> Estructura química de los fragmentos cZ de los aminoácidos de la Angiotensina II .....	45
<b>Tabla 4.</b> Estructura química de los fragmentos aX de los aminoácidos de la Sustancia P .....	46
<b>Tabla 5.</b> Estructura química de los fragmentos bY de los aminoácidos de la Sustancia P .....	48
<b>Tabla 6.</b> Estructura química de los fragmentos cZ de los aminoácidos de la Sustancia P .....	50
<b>Tabla 7.</b> Comparación de la Eficiencia de Fragmentación de Angiotensina II y Sustancia P en MALDI-TOF/TOF mediante CID y LIFT. ....	79

**Lista de Figuras**

<b>Figura 1.</b> Diagrama del sistema ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF .....	18
<b>Figura 2.</b> Esquema del proceso MALDI-TOF .....	18
<b>Figura 3.</b> Estructura química del ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) .....	21
<b>Figura 4.</b> Láser Smartbeam <sup>TM</sup> /Smartbeam II .....	21
<b>Figura 5.</b> Esquema del proceso de ionización y aceleración en un espectrómetro de masas MALDI-TOF .....	22
<b>Figura 6.</b> Ion Source .....	23
<b>Figura 7.</b> Esquema del modo reflector en un espectrómetro de masas MALDI-TOF .....	25
<b>Figura 8.</b> Esquema de etapas de tiempo de vuelo. ....	26
<b>Figura 9.</b> Análisis de mezcla de tres componentes .....	28
<b>Figura 10.</b> AnchorChip Tartet. ....	29
<b>Figura 11.</b> Estructura de la sustancia P en el modelo esqueleto carbonatado .....	32
<b>Figura 12.</b> Estructura de la Angiotensina II en el modelo esqueleto carbonatado .....	33
<b>Figura 13.</b> Espectro de masas en MALDI TOF/TOF del péptido estándar [Espectro] .....	37
<b>Figura 14.</b> Espectro de masas en MALDI TOF/TOF del péptido estándar [Espectro] .....	40
<b>Figura 15.</b> Esquema de Fragmentación de la Angiotensina II en Espectrometría de Masas MALDI-TOF/TOF [Diagrama] .....	53
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis LIFT de la composición de aminoácidos de angiotensina II [Espectro]. ....	54
<b>Figura 17.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis LIFT de la Angiotensina II [Espectro] .....	55

<b>Figura 18.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de angiotensina II en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].....	55
<b>Figura 19.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de angiotensina II en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].....	57
<b>Figura 20.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos c y Z de angiotensina II en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].....	58
<b>Figura 21.</b> Cuantificación de fragmentos de angiotensina II obtenidos por MALDI-TOF/TOF con detección LIFT [Tabla].....	59
<b>Figura 22.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la composición de aminoácidos de angiotensina II [Espectro]. ....	60
<b>Figura 23.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la Angiotensina II [Espectro].....	61
<b>Figura 24.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de angiotensina II en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. ....	61
<b>Figura 25.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de angiotensina II en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. ....	63
<b>Figura 26.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos c e Z de angiotensina II en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. ....	64
<b>Figura 27.</b> Cuantificación de fragmentos de angiotensina II obtenidos por MALDI-TOF/TOF con disociación inducida por colisión (CID) [Tabla].....	65
<b>Figura 28.</b> Esquema de Fragmentación de la Sustancia P en Espectrometría de Masas MALDI-TOF/TOF [Diagrama]. ....	66

<b>Figura 29.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis LIFT de la composición de aminoácidos de la sustancia p. [Espectro]. .....	67
<b>Figura 30.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis LIFT de la sustancia p. [Espectro]. .....	68
<b>Figura 31.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de la sustancia p en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. .....	68
<b>Figura 32.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de la sustancia p en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. .....	70
<b>Figura 33.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos c y Z de la sustancia p en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. .....	71
<b>Figura 34.</b> Cuantificación de Fragmentos de Sustancia P Obtenidos por MALDI-TOF/TOF con Detección LIFT [Tabla]. .....	72
<b>Figura 35.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la composición de aminoácidos de la sustancia p. [Espectro]. .....	73
<b>Figura 36.</b> Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la sustancia p. [Espectro]. .....	74
<b>Figura 37.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de la sustancia p en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error. Autor [Tabla]. .....	74
<b>Figura 38.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de la sustancia p en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. .....	76
<b>Figura 39.</b> Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos c y z de la sustancia P en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla]. .....	77

**Figura 40.** Cuantificación de Fragmentos de Sustancia P Obtenidos por MALDI-TOF/TOF con Disociación Inducida por Colisión (CID) [Tabla]. ..... 78

## Resumen

**Título:** Comparación de métodos de fragmentación de péptidos mediante MALDI TOF/TOF (LIFT Y CID)\*

**Autor:** Paula Camila Bonza Pérez\*\*

**Palabras Clave:** Fragmentación de péptidos, Análisis estructural, Iones fragmento, CID (Disociación Inducida por Colisión), LIFT (Fragmentación Inducida por Cambio de Velocidad); diferente a técnica de fragmentación inducida por láser.

### Descripción:

Este estudio compara la eficiencia y selectividad de las técnicas de Disociación Inducida por Colisión (CID) y Fragmentación Inducida por Cambio de Velocidad (LIFT), diferente a técnica de fragmentación inducida por láser. para el análisis estructural de dos péptidos de relevancia biológica, la Sustancia P y la Angiotensina II, utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Las condiciones experimentales, incluyendo la matrix (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) y los parámetros instrumentales, se dieron las mejores condiciones experimentales para maximizar la información estructural obtenida. Un análisis comparativo de los espectros MS/MS generados por CID y LIFT para ambos péptidos permitió la evaluación de las capacidades de cada técnica en términos de cobertura de secuencia y la naturaleza de los iones fragmento producidos.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad, de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: Herminsul de Jesús Cano Calle. Título académico completo de mayor rango: Doctor en Química.

**Abstract**

**Title:** Comparison of Peptide Fragmentation Methods using MALDI TOF/TOF (LIFT and CID)\*

**Author:** Paula Camila Bonza Pérez\*\*

**Keywords:** Peptide fragmentation, Structural analysis, Fragment ions, CID (Collision-Induced Dissociation), LIFT (Change of speed-Induced Fragmentation).

**Description:**

This study compares the efficiency and selectivity of Collision-Induced Dissociation (CID) and Change of speed-Induced Fragmentation (LIFT) techniques for the structural analysis of two biologically relevant peptides, Substance P and Angiotensin II, using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Experimental conditions, including the matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and instrumental parameters, the best conditions were given to maximize the structural information obtained. A comparative analysis of the MS/MS spectra generated by CID and LIFT for both peptides allowed for the evaluation of each technique's capabilities in terms of sequence coverage and the nature of the fragment ions produced.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Sciences. School of Chemistry. Chemistry. Director: Herminsul de Jesús Cano Calle. Full academic title of highest rank: Doctor in Chemistry.

## INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas (EM) constituye una técnica analítica de elevada sofisticación y versatilidad en la ciencia contemporánea, con aplicaciones que se extienden desde la elucidación estructural de compuestos orgánicos de baja masa molecular hasta la caracterización exhaustiva de biomoléculas complejas. Dentro del espectro de sus metodologías, la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Ionización/Desorción Láser Asistida por Matrix - Tiempo de Vuelo/Tiempo de Vuelo) se erige como una herramienta en disciplinas como la proteómica, la metabolómica y el análisis estructural de péptidos. Su capacidad para integrar una ionización eficiente y selectiva con una etapa de fragmentación controlada posibilita la obtención de información estructural detallada, esencial para la investigación de biomoléculas en contextos biológicos y clínicos.

Una de las características distintivas de MALDI-TOF/TOF reside en su capacidad para implementar métodos avanzados de fragmentación iónica, tales como CID y LIFT. La CID, extensamente utilizada en diversos analizadores de masas, se fundamenta en colisiones controladas de iones precursores con moléculas de gas inerte, lo que induce la fragmentación peptídica y la generación de espectros de masas MS/MS informativos. Por su parte, la LIFT, desarrollada específicamente para instrumentación Bruker Daltonics, emplea cambio de velocidad para promover la fragmentación iónica post-fuente, ofreciendo una alternativa que puede superar a la CID en términos de selectividad y resolución espectral bajo ciertas condiciones experimentales.

En este contexto experimental, péptidos de relevancia biológica emergen como sistemas modelo idóneos para la exploración y comparación de estas estrategias de fragmentación. La sustancia P, un neuropéptido undecapeptídico, ejerce funciones cruciales en la neurotransmisión nociceptiva y en procesos inflamatorios, erigiéndose como un analito de interés tanto en neurociencia como en farmacología. De manera análoga, la Angiotensina II, un octapéptido

vasoactivo implicado en la regulación cardiovascular y la homeostasis hidroelectrolítica, representa un modelo fundamental para estudios concernientes a patologías cardiovasculares.

Para el acondicionamiento de las muestras, se empleó como matrix el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), disuelto en una fase móvil compuesta por acetonitrilo (ACN), agua (H<sub>2</sub>O) y ácido trifluoroacético (TFA). Adicionalmente, se utilizaron placas MTP AnchorChip 384 TF, las cuales facilitan la concentración del analito en áreas de deposición definidas, optimizando la sensibilidad del análisis. Los parámetros instrumentales, incluyendo las condiciones de ionización y la adquisición de espectros de masas, se dieron las mejores condiciones para maximizar la resolución y la eficiencia de fragmentación de los péptidos seleccionados.

El presente estudio tiene como objetivo la evaluación comparativa de la eficiencia y selectividad de las técnicas de fragmentación CID y LIFT en la elucidación estructural de la sustancia P y la Angiotensina II. Este análisis permitirá discernir las capacidades inherentes a cada técnica, proporcionando información crucial para la optimización de metodologías analíticas aplicables en investigaciones biomoleculares y futuros desarrollos en el ámbito de la investigación clínica y farmacéutica.

## 1. OBJETIVO GENERAL

Comparar dos métodos de fragmentación CID y LIFT en la técnica MALDI TOF/TOF.

### 1.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar las condiciones experimentales para cada método, como energías de colisión o parámetros laser.
2. Evaluar la especificidad de la fragmentación, diferenciando entre fragmentos específicos de la molécula y fragmentos relacionados.
3. Identificar las limitaciones y ventajas de cada método, como la velocidad de análisis, la facilidad de implementación y los costos asociados.
4. Evaluar y comparar la eficiencia de fragmentación de las dos técnicas, es decir cuál de ellas producen más fragmentos y de que calidad.

## 2. MARCO TEÓRICO:

### 2.1. TÉCNICA MALDI TOF/TOF

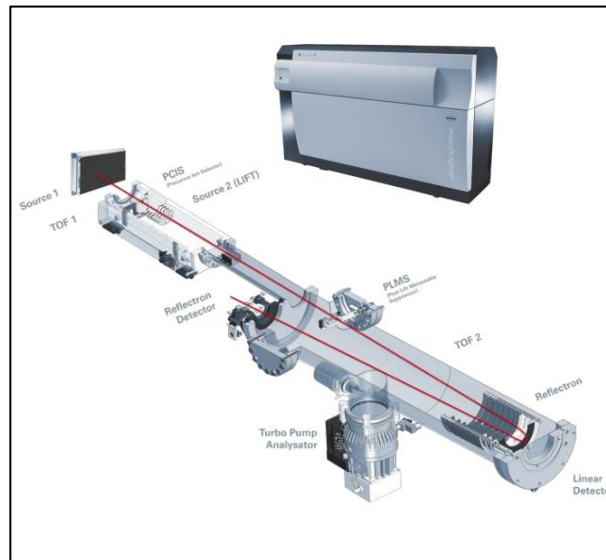
A principios de la década de 1990, la ionización por desorción láser asistida por matrix (MALDI) se consolidó como una técnica de ionización suave esencial en espectrometría de masas. Una ventaja de MALDI está en su elevada resolución y la facilidad de implementar colisiones de alta energía, un aspecto crítico en la elucidación secuencial de péptidos. La matrix empleada en MALDI se fundamenta en un compuesto orgánico sólido con la capacidad de absorber radiación electromagnética en el rango del láser utilizado. Esta propiedad facilita la dispersión de las moléculas analíticas mediante co-cristalización (Abián, Carrascal, & Gay, 2008). Adicionalmente, la matrix ejerce un rol fundamental al absorber la energía fotónica del láser, promoviendo reacciones fotoquímicas que culminan en la generación de iones moleculares del analito. La naturaleza pulsada del proceso de ionización MALDI exige su acoplamiento a analizadores de tiempo de vuelo (TOF) para la determinación de la relación masa-carga de los iones generados.

La fuente de ionización MALDI de extracción continua opera con fluencias de irradiación láser próximas al límite de ablación y ionización, optimizando la preservación de la resolución espectral. La implementación de la técnica de extracción retardada, mediante la aplicación de un pulso de voltaje retardado en la etapa de aceleración, contribuye a una mejora sustancial en la resolución de masa. Tras permitir la dispersión espacial de los iones en función de sus distintas energías cinéticas iniciales durante un breve intervalo de tiempo, típicamente del orden de cientos de nanosegundos, se aplica un pulso de potencial de aceleración de alta velocidad. Este procedimiento estratégico asegura la finalización de los procesos fotoquímicos inducidos por el láser antes del inicio de la aceleración iónica, garantizando así la exactitud y exactitud de las determinaciones de la relación masa-carga (Brodbelt, 2016; Lammert & Cooks, 1991). Esta

metodología minimiza la dispersión energética inicial de los iones, un factor determinante en la resolución de los analizadores de tiempo de vuelo.

**Figura 1.**

*Diagrama del sistema ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF*

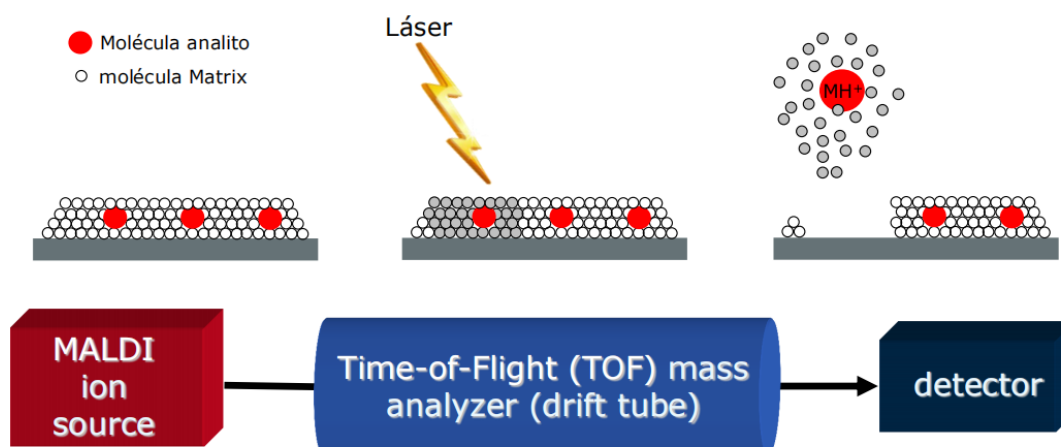


*Nota.* Tomado de *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry* [Diagrama], por Bruker Daltonics, Inc., 2011.

## 2.2. DESORCIÓN/IONIZACIÓN Y PAPEL DE LA MATRIX

**Figura 2.**

*Esquema del proceso MALDI-TOF*



*Nota.* Tomado de *Fundamentos de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight MS*, por Bruker Daltonics, Inc. (2011), *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente el procedimiento integral de un análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Inicialmente, se prepara una muestra en estado sólido mediante co-cristalización con una matrix. Dicha matrix, constituida por moléculas de bajo peso molecular con alta absorptividad en la longitud de onda del láser empleado, desempeña un rol crucial en la eficiencia del proceso de ionización. La irradiación de la muestra con un pulso láser induce la absorción de energía por parte de la matrix, desencadenando una rápida desorción y ionización tanto de las moléculas de la matrix como de las especies analíticas co-cristalizadas. Los iones moleculares generados son subsiguientemente acelerados mediante la aplicación de un campo eléctrico y proyectados hacia el interior de un tubo de vuelo. En este analizador de tiempo de vuelo, la separación iónica se efectúa en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ), donde iones con menor  $m/z$  alcanzan el detector en un tiempo inferior a aquellos con mayor  $m/z$ . Finalmente, un detector de iones registra el impacto de las especies iónicas, produciendo un espectro de masas característico de la composición molecular de la muestra original (Bruker Daltonics, Inc., 2011).

El principio fundamental de la espectrometría de masas MALDI-TOF se basa en la siguiente secuencia de etapas:

1. Preparación de la muestra: El analito se mezcla homogéneamente con una matrix apropiada, seleccionada en función de la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas del compuesto a analizar, y la mezcla resultante se deposita sobre un soporte adecuado.
2. Ionización: La irradiación de la muestra con un pulso láser de longitud de onda específica induce la desorción y la ionización de las moléculas del analito. La matrix desempeña un papel crucial al absorber la energía fotónica del láser y facilitar la transferencia de carga a las moléculas del analito, promoviendo la formación de iones moleculares, predominantemente monoprotonados o con aductos metálicos.

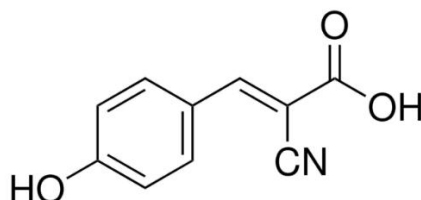
3. Aceleración: Los iones generados en la fuente de ionización son acelerados mediante la aplicación de un campo eléctrico de potencial conocido, impartiendoles una energía cinética proporcional a su carga.
4. Separación: Los iones acelerados ingresan a un analizador de tiempo de vuelo (TOF), un tubo de vacío donde se separan espacialmente en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). A una energía cinética constante, la velocidad de los iones es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su  $m/z$ , lo que permite que iones con menor  $m/z$  alcancen el detector en un tiempo inferior a aquellos con mayor  $m/z$ .
5. Detección: Los iones separados impactan sobre la superficie de un detector, típicamente un multiplicador de electrones o un detector de microcanales, generando una cascada de electrones y, por ende, una señal eléctrica cuya intensidad es proporcional a la abundancia de iones con una determinada relación masa-carga. El registro de estas señales en función del tiempo de vuelo genera el espectro de masas característico de la muestra.

La matrix de uso predominante para el análisis de péptidos mediante MALDI es el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), cuya estructura molecular se representa en la Figura 3. El CHCA exhibe propiedades fisicoquímicas idóneas para la ionización MALDI, caracterizándose por una eficiente absorción de la radiación láser en las longitudes de onda comúnmente empleadas (típicamente UV) y por su capacidad para formar co-cristales homogéneos y bien definidos con una amplia gama de biomoléculas, incluyendo péptidos. Esta co-cristalización favorece la dispersión y el aislamiento de las moléculas del analito dentro de la matrix, facilitando su posterior desorción e ionización al ser irradiadas por el láser. Adicionalmente, la acidez del grupo carboxílico del CHCA contribuye a la protonación de los péptidos durante el proceso de ionización, generando iones moleculares monoprotonados ( $[M+H]^+$ ), que son típicamente los más abundantes

y los preferidos para el análisis MS. La presencia del grupo Ciano (CN) también influye en las propiedades de absorción y en la eficiencia de la transferencia de energía durante la ablación láser.

**Figura 3.**

*Estructura química del ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA)*



*Nota.* Adaptado de *Estructura química del ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA)*, por Sigma-Aldrich, 2024, Sigma-Aldrich.

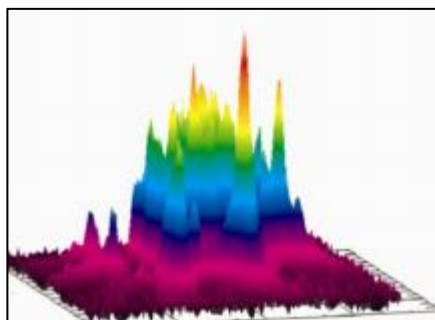
URL:  [\$\alpha\$ -Ciano-4-hydroxycinnamic acid -  \$\alpha\$ -CCA,  \$\alpha\$ -CHCA](#)

### 2.3. FUNDAMENTOS DEL LÁSER PARA EL ANÁLISIS

La utilización de un láser de Nd: YAG modificado, como el Smartbeam<sup>TM</sup>/Smartbeam II, representa un avance significativo en la espectrometría de masas MALDI.

**Figura 4.**

*Láser Smartbeam<sup>TM</sup>/Smartbeam II*



*Nota.* Tomado de “*Laser Smartbeam<sup>TM</sup>/Smartbeam II*”, por A. Holle, A. Haase, M. Kayser, & J. Höhndorf, 2006, *Journal of Mass Spectrometry*, 41(6), pp. 705-716.

Este láser destaca por su alta velocidad de disparo, alcanzando hasta 1000 Hz, lo que se traduce en un aumento significativo en la productividad del análisis. Su perfil de energía estructurado, cuidadosamente diseñado, interactúa con las matrices utilizadas comúnmente, maximizando la eficiencia de ionización. La compatibilidad con todas las matrices desarrolladas

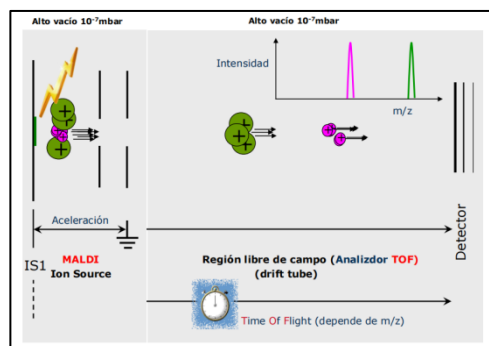
para láseres de nitrógeno proporciona una gran versatilidad, permitiendo adaptar el análisis a una amplia gama de muestras. Finalmente, su eficiencia energética contribuye a reducir los costos operativos y a minimizar el impacto ambiental (Holle et al., 2006).

#### 2.4. FUNDAMENTOS DEL TIEMPO DE VUELO

Tras la etapa de ionización mediante desorción/ionización láser asistida por matrix (MALDI), cuyo principio fundamental radica en la generación de iones a partir de una muestra co-cristalizada con una matrix tras la irradiación láser, los iones moleculares formados son subsiguientemente acelerados mediante un campo eléctrico hacia un analizador de tiempo de vuelo (TOF), tal como se esquematiza en la Figura 5:

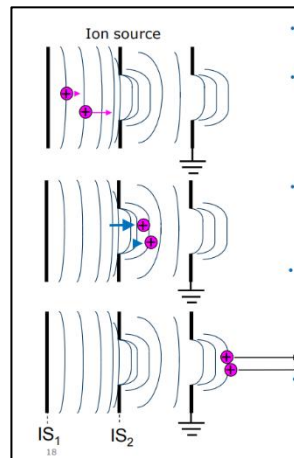
#### Figura 5.

*Esquema del proceso de ionización y aceleración en un espectrómetro de masas MALDI-TOF*



*Nota.* Tomado de *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*, por Bruker Daltonics, Inc., 2011.

**Figura 6.**  
*Ion Source.*



*Nota.* Tomado de *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*, por Bruker Daltonics, Inc., 2011.

Los iones generados en la fuente de ionización MALDI, ilustrada esquemáticamente en la Figura 6, son acelerados mediante un campo eléctrico hacia un analizador de tiempo de vuelo (TOF) operado bajo condiciones de alto vacío. Dentro de este tubo de vuelo, la separación iónica se efectúa en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Debido a una energía cinética constante, la velocidad de los iones es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su  $m/z$ , las especies iónicas de menor masa-carga alcanzan el detector en un tiempo inferior a aquellas de mayor masa-carga. Esta diferencia en el tiempo de tránsito permite la obtención de un espectro de masas, donde la posición de cada pico en el eje de tiempo (convertido a  $m/z$ ) corresponde a una especie iónica específica, y su intensidad es proporcional a su abundancia relativa. El tiempo de vuelo de un ion está directamente relacionado con la raíz cuadrada de su relación masa-carga. Esta técnica analítica posibilita la identificación y cuantificación de una amplia diversidad de biomoléculas, que abarcan desde péptidos hasta proteínas de mayor masa molecular.

La extracción pulsada retardada (Delayed Extraction, DE), también referida como extracción pulsada iónica (Pulsed Ion Extraction, PIE), constituye una estrategia instrumental fundamental en la espectrometría de masas MALDI-TOF para mejorar significativamente la

resolución espectral. Como se representa en la Figura 6, durante el proceso de ionización inicial en la fuente MALDI, los iones se forman con una distribución inherente de energías cinéticas iniciales. Esta heterogeneidad energética puede comprometer la resolución del espectro de masas, ya que iones con idéntica relación masa-carga pero con diferentes velocidades iniciales pueden arribar al detector en instantes distintos.

Para mitigar esta dispersión energética, se implementa la técnica de extracción pulsada. Inicialmente, se mantiene un potencial eléctrico nulo o menor entre los electrodos de la fuente de iones (designados como  $IS_1$  e  $IS_2$  en la Figura 6), permitiendo que los iones generados se dispersen libremente en la región de formación durante un breve intervalo de tiempo de retardo. Transcurrido este retardo, se aplica un pulso de alto voltaje a los electrodos de la fuente, generando un campo eléctrico intenso que acelera los iones hacia el analizador TOF (Holmes, 1985; Gross, 2011). Los iones más lentos, que han recorrido una distancia menor desde su punto de formación durante el tiempo de retardo, experimentan una aceleración mayor en el campo eléctrico aplicado, lo que les permite alcanzar el detector en un tiempo más similar al de los iones más rápidos con la misma relación masa-carga (Suckau et al., 2003).

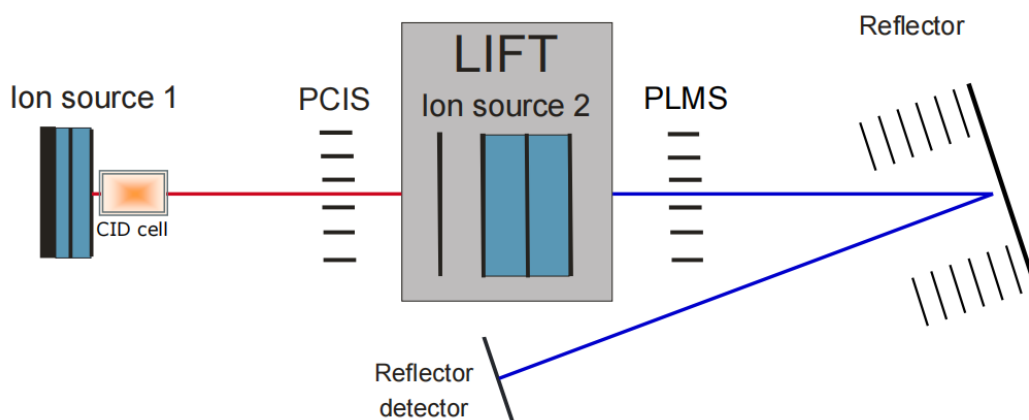
Mediante el ajuste preciso del intervalo de tiempo de retardo y la amplitud del pulso de voltaje aplicado a los electrodos de extracción, es posible optimizar la focalización temporal de los iones en el detector, obteniendo espectros de masas con una resolución notablemente superior. Esta mejora en la resolución espectral es crucial para la discriminación e identificación precisa de componentes en mezclas complejas, permitiendo la resolución de picos con diferencias de masa muy pequeñas.

## 2.5. FUNDAMENTOS DE LIFT

El modo reflector constituye una técnica instrumental esencial en la espectrometría de masas MALDI-TOF, empleada para optimizar significativamente la resolución de masa y la sensibilidad de la detección.

### Figura 7.

*Esquema del modo reflector en un espectrómetro de masas MALDI-TOF*



*Nota.* La figura muestra el esquema del modo reflector en un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Los iones son acelerados hacia el reflector, donde son reflejados y focalizados antes de alcanzar el detector.

Tomado de *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*, por Bruker Daltonics, Inc., 2011.

El espectrómetro de masas MALDI-TOF incorpora una configuración híbrida que combina regiones de tiempo de vuelo lineal y reflector para optimizar la separación y detección de iones moleculares. La Fuente de Iones 1 (IS1), correspondiente a la fuente MALDI, genera iones mediante la desorción/ionización láser asistida por matrix. Estos iones son inicialmente acelerados y atraviesan la región lineal del analizador TOF. La Fuente de Iones 2 (IS2), también denominada celda de re-aceleración LIFT, puede emplearse para una manipulación adicional del haz iónico.

Posteriormente a la región lineal de TOF, los iones ingresan a la región reflectora del analizador. Esta sección consiste en un conjunto de electrodos con un gradiente de potencial eléctrico, cuya función es invertir la dirección del movimiento de los iones y dirigirlos nuevamente

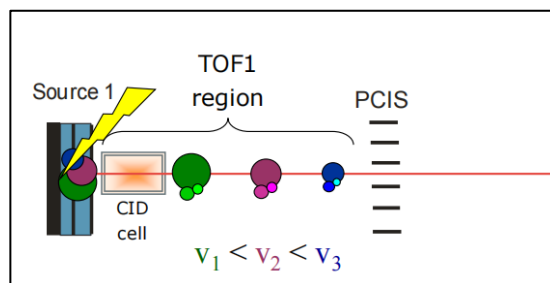
hacia el detector. El reflector compensa las variaciones en las energías cinéticas iniciales de los iones, lo que se traduce en una mejora significativa de la resolución de masa y la sensibilidad de la detección. Mediante el control preciso de los voltajes aplicados a los electrodos del reflector, los iones con diferentes relaciones masa-carga pueden ser enfocados temporalmente en el detector, generando espectros de masas de alta resolución (Baumgaertel et al., 2008).

Esta técnica de enfoque iónico simultáneo, tanto espacial como temporal, corrige las dispersiones en la energía cinética de los iones producidos en la fuente de ionización, lo que resulta en un incremento sustancial de la resolución y la sensibilidad del espectro de masas obtenido. Adicionalmente, la implementación del modo reflector permite el análisis de iones dentro de un amplio rango de masas, ya que los iones de mayor masa pueden ser reflejados múltiples veces antes de alcanzar el detector, extendiendo el rango dinámico del análisis.

## 2.6. FUNDAMENTOS DE CID

### Figura 8.

*Esquema de etapas de tiempo de vuelo.*



*Nota.* Tomado de *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*, por Bruker Daltonics, Inc., 2011.

En la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, se implementa una configuración de doble analizador de tiempo de vuelo (TOF1 y TOF2) para la ejecución de experimentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En la primera etapa de análisis (TOF1), los iones moleculares generados en la fuente MALDI son acelerados y separados espacialmente en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Durante esta fase inicial, una porción selecta de los iones

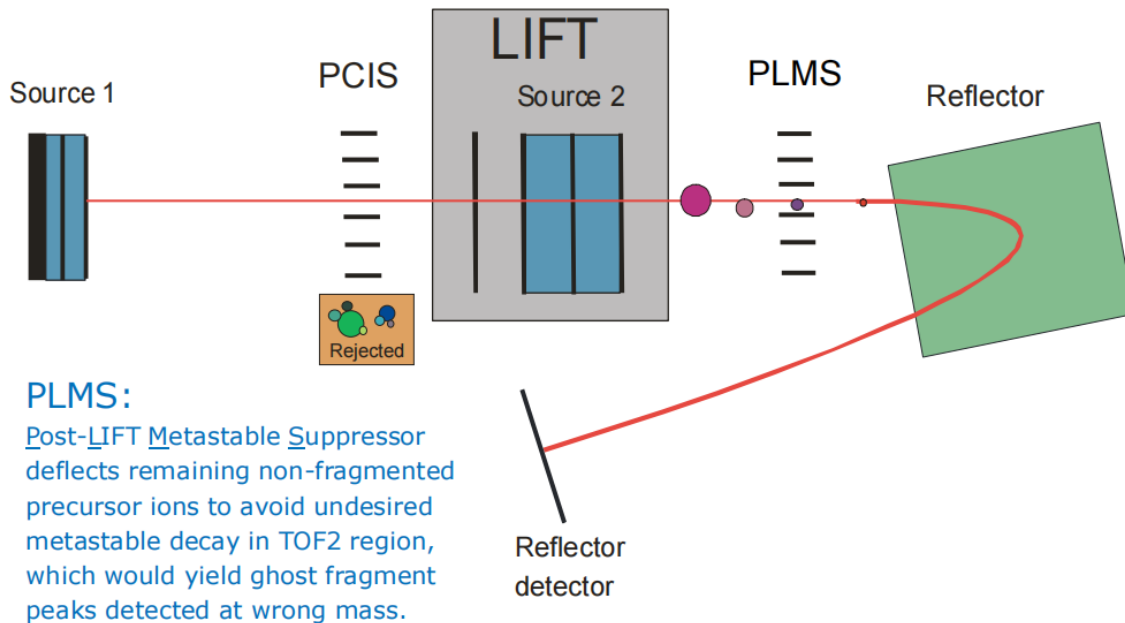
precursores puede ser inducida a fragmentarse mediante mecanismos como la desorción/ionización inducida por láser post-fuente (LIFT) o la disociación inducida por colisión (CID) (McLafferty et al., 1973; Suckau et al., 2003).

En el contexto de la fragmentación LIFT, la absorción de energía fotónica proveniente de un láser secundario puede inducir la ruptura de enlaces covalentes dentro de la estructura molecular del ion precursor, generando una serie de iones fragmento característicos. Este mecanismo de disociación resulta particularmente eficaz para el análisis secuencial de péptidos, produciendo predominantemente iones de la serie b e y, los cuales proporcionan información estructural esencial para la determinación de la secuencia aminoacídica de las proteínas.

Por otro lado, la técnica CID implica la colisión de los iones precursores seleccionados con un gas inerte (comúnmente argón o helio) dentro de una celda de colisión a una energía cinética elevada. Este proceso de transferencia de energía induce la fragmentación del ion precursor, generando un espectro de iones producto que puede incluir una mayor diversidad de fragmentos, tales como iones internos, además de los iones de la serie b e y (Holmes, 1985). Un principio fundamental en ambos mecanismos de fragmentación post-fuente es que los iones fragmento generados conservan la velocidad del ion precursor del cual se originaron. Esta característica permite que los iones producto sean detectados simultáneamente en la segunda etapa del analizador de tiempo de vuelo (TOF2), facilitando la correlación entre el ion precursor y sus fragmentos, lo que simplifica la interpretación de los espectros MS/MS y la elucidación estructural de los compuestos analizados.

**Figura 9.***Análisis de mezcla de tres componentes*

Analysis of a mixture containing 3 compounds (**green, red, blue**) being different in mass:



*Nota.* Tomado de *FLEX™ Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*, por Bruker Daltonics, Inc., 2011.

La Figura 9 ilustra esquemáticamente el proceso de fragmentación secuencial en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF. En esta modalidad de análisis en tándem, se integra una configuración de doble analizador de tiempo de vuelo (TOF1 y TOF2) para la elucidación estructural de moléculas (Höckfelt et al., 2001).

Inicialmente, en la primera etapa de análisis (TOF1), los iones moleculares generados en la fuente MALDI (Source 1) son acelerados y separados espacialmente en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Seguidamente, un ion precursor específico de interés (representado por el ion rojo en la Figura 9) es seleccionado mediante un selector de iones precursor (PCIS) para su posterior fragmentación.

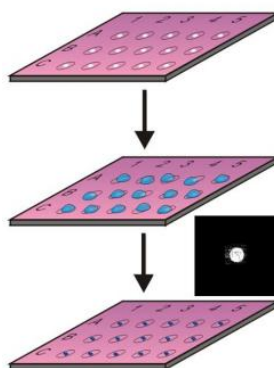
A continuación, los iones precursores aislados ingresan a una segunda etapa de manipulación iónica, denominada LIFT, ubicada en la Fuente de Iones 2. En esta región, los iones seleccionados experimentan una re-aceleración y un re-enfoque espacial, lo que contribuye a mejorar la resolución del análisis de los iones fragmento.

Finalmente, el conjunto de iones, incluyendo tanto los iones precursores residuales como los iones fragmento generados durante el proceso de disociación (ya sea por LIFT u otro método implementado en la Fuente 2), son dirigidos hacia el analizador reflector TOF2. En esta segunda etapa de tiempo de vuelo, los iones se separan nuevamente según su relación masa-carga y son detectados, proporcionando información estructural detallada del ion precursor seleccionado (123RF, n.d.).

## 2.7. ANCHORCHIP TARGET: ANCLAJE PRECISO DE MUESTRAS

### Figura 10.

*AnchorChip Target.*



*Nota.* Tomado de *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*, por Bruker Daltonics, Inc., 2011.

La Figura 10 esquematiza el principio fundamental de los soportes AnchorChip™ en contraste con los soportes metálicos convencionales empleados en espectrometría de masas MALDI. Los soportes AnchorChip™ se caracterizan por presentar microáreas hidrofílicas ("anclas") delimitadas por una superficie circundante hidrofóbica. Durante la deposición de la

muestra líquida, las gotas se confinan selectivamente y se concentran de manera auto-organizada en estas microáreas hidrofílicas, actuando como micro-reactores sin paredes físicas. Esta disposición garantiza una alineación espacial precisa de los puntos de análisis, asegurando que cada evento de ablación láser incida exactamente sobre la región de muestra deseada, optimizando la eficiencia del proceso de adquisición de datos. Adicionalmente, el efecto de concentración de analito que ocurre durante la evaporación del solvente en el área restringida del ancla conduce a un incremento en la sensibilidad de la detección (Thermo Scientific Chemicals, n.d.). La superficie hidrofóbica que rodea las anclas en los soportes AnchorChip™ exhibe resistencia no solo a solventes acuosos, sino también a una amplia gama de solventes orgánicos relevantes en la preparación de muestras, lo que los hace particularmente adecuados para el manejo de muestras con alto contenido orgánico. Los soportes AnchorChip™ permiten su reutilización, aproximadamente hasta 50 ciclos, siempre que se sigan los protocolos de limpieza y uso recomendados (Holle et al., 2006).

Para la preparación de muestras peptídicas destinadas al análisis MALDI-TOF, se emplea una solución matrix basada en ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) disuelto en una mezcla optimizada de acetonitrilo, agua y ácido trifluoroacético (TFA). Se recomienda la aplicación de la solución matrix en volúmenes reducidos mediante un sistema de dispensación de baja velocidad para favorecer la formación de cristales finos y homogéneos. En la preparación de patrones de calibración externos, se utiliza una solución matrix con una mayor proporción de agua y se mezcla con un estándar de calibración peptídico de masa conocida. La implementación rigurosa de estos procedimientos de preparación de muestra es crucial para la obtención de resultados analíticos de alta calidad y reproducibilidad en los análisis MALDI-TOF.

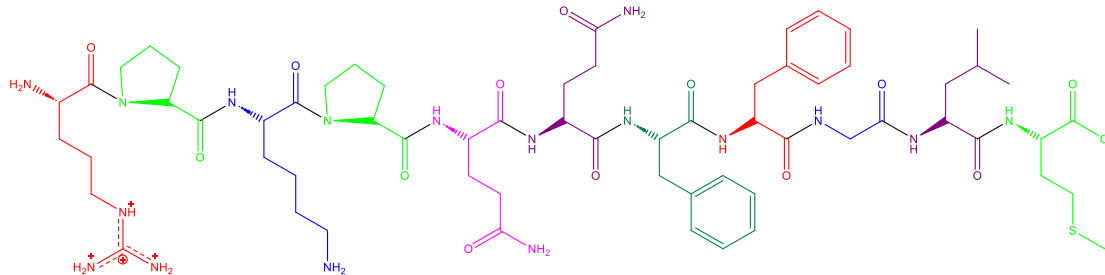
## 2.8. PÉPTIDOS

La fragmentación de péptidos en espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF constituye una estrategia analítica esencial para su inequívoca identificación y caracterización estructural. Los péptidos, en virtud de su naturaleza polimérica y su masa molecular relativamente elevada, son susceptibles a diversas fragmentaciones a lo largo de su esqueleto peptídico, originando iones fragmento diagnósticos. Estos iones fragmento, que portan la carga en el extremo amino-terminal (iones de las series a, b, c) o carboxilo-terminal (iones de las series x, y, z), generan un patrón de fragmentación único y característico para cada péptido individual. La técnica MALDI-TOF/TOF explota estas vías de ruptura selectivas para la determinación de la secuencia lineal de aminoácidos que componen un péptido. Mediante la comparación precisa de la relación masa-carga medida de los iones fragmento con una base de datos teórica de masas de fragmentos peptídicos, es posible inferir la identidad y el orden de los residuos aminoacídicos presentes en la secuencia primaria. Dado que la masa molecular de un péptido es aditiva y corresponde a la sumatoria de las masas de sus aminoácidos constituyentes, y considerando la naturaleza finita del conjunto de aminoácidos biológicos, cada péptido exhibe una masa molecular distintiva. Esta propiedad fundamental, en conjunción con la información estructural detallada proporcionada por los patrones de fragmentación inducida, permite la realización de un mapeo peptídico de alta exactitud y confiabilidad. La espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, al posibilitar tanto la determinación precisa de la masa molecular del péptido intacto como la generación de iones fragmento informativos mediante técnicas de disociación controlada, se ha erigido como una herramienta indispensable en el campo de la proteómica para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas en sistemas biológicos complejos (Abián, Carrascal, & Gay, 2008).

## 2.9. SUSTANCIA P

**Figura 11.**

*Estructura de la sustancia P en el modelo esqueleto carbonatado*



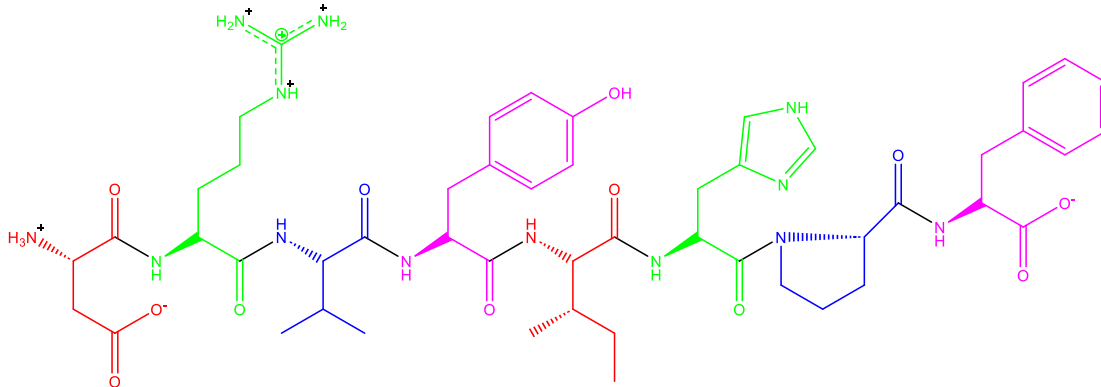
*Nota.* Figura elaborada por el autor (2025).

La Figura 11 ilustra la estructura molecular de la Sustancia P, un undecapéptido de significativa importancia fisiológica en el sistema nervioso. Se presenta un modelo de esqueleto carbonado que enfatiza la secuencia lineal de los residuos aminoacídicos y los enlaces peptídicos que los conectan (Papp et al., 2000; Rupniak et al., 2000). La Sustancia P, inicialmente identificada en extractos del tracto gastrointestinal, pertenece a la familia de neuropéptidos taquicinas y ejerce un rol fundamental como neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico (SNP). Su secuencia aminoacídica, notablemente conservada, particularmente en la región carboxilo-terminal, subraya su relevancia biológica (Hökfelt et al., 2001; Hall & Guyton, 2021)

## 2.10. ANGIOTENSINA II

**Figura 12.**

*Estructura de la Angiotensina II en el modelo esqueleto carbonatado.*



*Nota.* Figura elaborada por el autor (2025).

La Figura 12 ilustra la estructura molecular de la Angiotensina II (Ang II), un octapéptido con la secuencia aminoacídica Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, desempeña un papel central en la regulación quimio-fisiológica de la presión arterial y la homeostasis cardiovascular. Es un regulador crucial y multifuncional del sistema cardiovascular y renal. Como potente vasoconstrictor, eleva rápidamente la presión arterial al estrechar los vasos sanguíneos. Sus efectos sobre el equilibrio hídrico y electrolítico incluyen la estimulación de la liberación de aldosterona, lo que resulta en una mayor reabsorción renal de sodio y agua, y la inducción de sed y liberación de vasopresina, contribuyendo colectivamente a la regulación del volumen sanguíneo. Además, la Ang II participa activamente en la remodelación cardiovascular al promover el crecimiento celular y la fibrosis en tejidos cardiacos y vasculares, exhibe propiedades proinflamatorias y pro-oxidativas mediante la inducción de ROS y citocinas inflamatorias, y modula la actividad del sistema nervioso simpático y el reflejo barorreceptor, consolidando su papel fundamental en el mantenimiento de la presión arterial y la homeostasis de fluidos.

### 3. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES

Se empleó un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics) equipado con un láser Nd: YAG y una célula de colisión para la adquisición de datos. Todos los análisis se realizarán en modo reflector positivo.

Para la preparación de las muestras, se utilizaron los siguientes materiales: péptido estándar, micropipeteador, tubos Eppendorf, centrífuga, sonicador, vortex, ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) como matrix y placas AnchoTarget.

### 4. METODOLOGIA:

#### 4.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Péptidos: Se seleccionaron Angiotensina II (DRVYIHPF) y sustancia P (RPKPQQFFGLM) como analitos modelo.

#### 4.2. PREPARACIÓN DE LA MATRIX:

Se preparó una solución de matrix CHCAA a una concentración de 10 mg/mL en un solvente compuesto por 30% de Acetonitrilo y 70% de agua acidificada con ácido TFA al 0,1% (v/v).

Se tomó 0,5  $\mu$ L de esta solución y luego pasó por un baño de ultrasonido (modelo Elmasonic Easy 10H, Elma Schmidbauer GmbH, Alemania) durante 5 minutos a temperatura ambiente para garantizar una disolución completa de la matrix.

La solución se centrifugó a 10,000 RPM durante 5 minutos para eliminar cualquier partícula insoluble.

### **4.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:**

Se tomaron 0,5  $\mu\text{L}$  de la solución de péptido estándar (Angiotensina II o Sustancia P) y se mezclaron con 0,5  $\mu\text{L}$  de la solución de matrix en un nuevo tubo Eppendorf.

La mezcla se lleva a un vortex (modelo Vortexer, Heathrow Scientific, USA) brevemente para homogeneizarla antes de depositar 0,5  $\mu\text{L}$  de la muestra en el portamuestra de una placa MTP AnchorChip 384 TF.

### **4.4. OBTENCIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES**

Para encontrar los mejores parámetros de adquisición de datos, se empleó un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF en modo reflectron positivo. Se utilizaron placas MTP AnchorChip 384 TF para la deposición de muestras. Los parámetros de ionización se ajustaron cuidadosamente para ambos péptidos, considerando sus características particulares. En cuanto a la fragmentación, se ajustó la energía de colisión en el modo CID para cada péptido, y se ajustó la potencia del láser IR en el modo LIFT para alcanzar la excitación vibracional necesaria. Los parámetros del reflectron se ajustaron de manera específica para la Angiotensina II (15 kV) y la sustancia P (13.70 kV en modo CID y 14.65 kV en modo LIFT), con el objetivo de obtener la mejor resolución de los fragmentos. En todos los casos, se utilizó un láser Smartbeam en modo ultra y se activó el choque con gas argón en el modo CID.

### **4.5. ADQUISICIÓN DE DATOS**

Se adquirieron espectros de masas de alta resolución en modo MS y MS/MS para ambos péptidos, utilizando tanto CID como LIFT. Se prestaron especial atención a las regiones de los espectros donde se esperaban los fragmentos más característicos.

#### **4.6. ANÁLISIS DE DATOS**

Para la identificación de los péptidos y sus fragmentos, se emplearon bases de datos especializadas y software de búsqueda. Los espectros obtenidos se compararon con las secuencias conocidas de la Angiotensina II y la sustancia P. Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo de la eficiencia de fragmentación de las técnicas CID y LIFT, evaluando tanto la cantidad como la intensidad de los fragmentos generados para cada péptido. Los patrones de fragmentación obtenidos se contrastaron con los reportados en la literatura, permitiendo una caracterización más exacta de los péptidos estudiados.

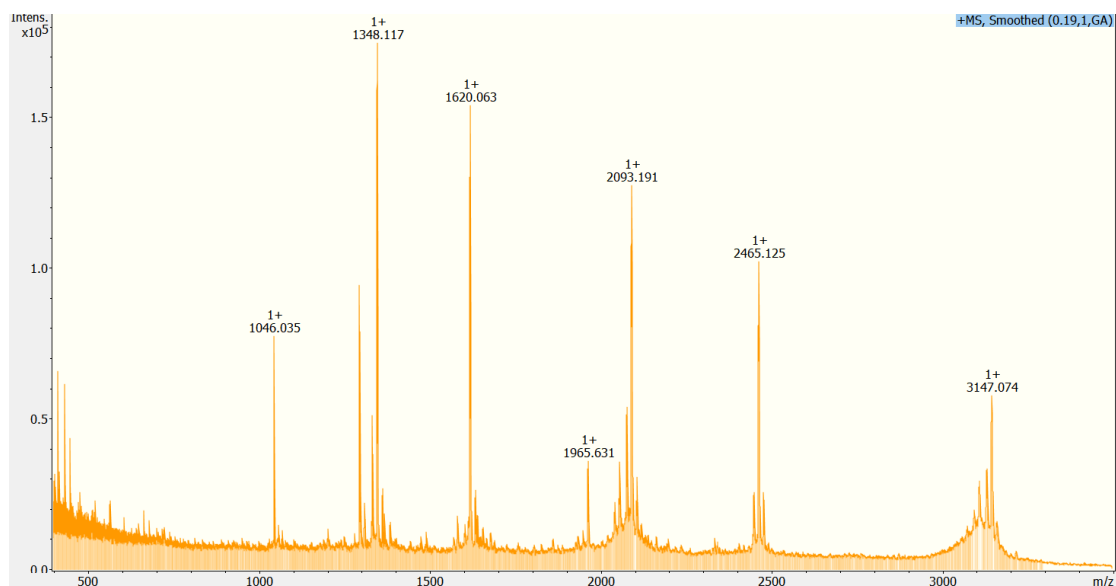
### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. ESPECTRO MALDI-TOF/TOF DEL ESTÁNDAR EN LA IDENTIFICACIÓN DE ANGIOTENSINA II Y SUSTANCIA P.**

El espectro de masas MALDI-TOF/TOF, ilustrado en la Figura 13, fue adquirido del péptido estándar de referencia, fundamental para la identificación y selección de las especies peptídicas de interés, la Angiotensina II y la Sustancia P.

**Figura 13.**

*Espectro de masas en MALDI TOF/TOF del péptido estándar [Espectro].*



*Nota.* Elaboración propia a partir de resultados experimentales (Autor, 2024).

En este espectro másico, se manifiesta un perfil iónico complejo, donde cada señal corresponde a una especie molecular ionizada presente en la matrix analítica. Con base en los cálculos teóricos, la Angiotensina II y la sustancia P exhiben masas moleculares nominales de 1046.54 Da y 1347.74 Da, respectivamente (Hoofnagle, 2010; Thermo Scientific Chemicals, n.d.). La confrontación de estos valores teóricos con el espectro experimental derivó en la identificación de las siguientes señales iónicas, presumiblemente correspondientes a los iones moleculares monoprotonados  $[M+H]^+$  dentro del rango de masas explorado:

**Angiotensina II.** Se detectó una señal iónica en  $m/z$  1046.035, exhibiendo una concordancia elevada con el valor teórico, con una discrepancia de aproximadamente 0.5 Da. Esta mínima desviación podría ser consecuencia de la exactitud instrumental, la distribución isotópica natural de los elementos constituyentes y potenciales errores sistemáticos inherentes al proceso de calibración del espectrómetro de masas.

**Sustancia P.** Se identificó una señal iónica en  $m/z$  1348.117, mostrando asimismo una proximidad significativa al valor teórico, con una diferencia de alrededor de 0.4 Da. Esta ligera variación es comparable a la observada para la Angiotensina II.

Tras la identificación de los péptidos de interés, se procedió a su aislamiento iónico para el subsiguiente análisis estructural mediante las técnicas de (CID) y LIFT. La implementación del modo reflectron positivo aseguró la obtención de datos con elevada resolución en masa, crucial para la asignación precisa de las masas de los iones moleculares precursores y sus correspondientes iones fragmento, gracias a la mejora en el enfoque de los iones. La fragmentación mediante CID, típicamente empleando un gas de colisión inerte como el argón, y la técnica LIFT generan una serie de iones fragmento que permiten inferir la secuencia de aminoácidos de los péptidos analizados, proporcionando información estructural detallada (Harrison et al., 2004).

## **5.2. EL ANÁLISIS MALDI-TOF/TOF SOBRE LA IDENTIFICACIÓN PEPTÍDICA ENTRE LOS VALORES TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES.**

El análisis espectrométrico de masas MALDI-TOF/TOF suministró información preliminar esencial correspondiente a la composición de la muestra, permitiendo la confirmación de la presencia de los péptidos objetivo. La elevada concordancia observada entre los valores teóricos y experimentales de las masas moleculares evidencia la calidad de los datos adquiridos y la robustez de la identificación peptídica.

La Figura 14 ilustra un esquema detallado de los principales sitios de escisión de la Angiotensina II, un octapéptido de significativa importancia biológica. Cada residuo aminoacídico dentro de la secuencia peptídica se representa mediante un conjunto de átomos con designaciones alfanuméricas (x, y, z y a,b,c). Esta nomenclatura facilita la identificación de los diversos tipos de iones fragmento generados durante el proceso de disociación (Ambihapathy et al., 1997).

Los enlaces peptídicos, responsables de la concatenación de los aminoácidos, constituyen los puntos lábiles donde la molécula experimenta fragmentación. Las líneas verticales cromáticas que interconectan las etiquetas señalan los potenciales sitios de ruptura, dando origen a iones con variaciones en masa y carga.

### 5.3. IONES

#### 5.3.1. IONES X, Y, Z

- IONES X: Estas especies iónicas se originan mediante la fragmentación del enlace peptídico por la región carboxilo-terminal (lado C-terminal), reteniendo el fragmento resultante el oxígeno carbonílico (C=O) del enlace escindido.
- IONES Y: Estos iones se generan cuando la disociación del enlace peptídico ocurre por la región amino-terminal (lado N-terminal), conservando el fragmento el átomo de nitrógeno (N) del enlace roto.
- IONES Z: Estos fragmentos iónicos comprenden el extremo carboxilo-terminal (C-terminal) y una porción de la estructura del esqueleto peptídico-carboxilo (C-terminal), y el fragmento resultante retiene el oxígeno carbonílico (C=O) del enlace roto.

#### 5.3.2. IONES a, b, c:

- IONES a: Estas especies iónicas presentan analogía estructural con los iones b, diferenciándose por la pérdida de una molécula de monóxido de carbono (CO).
- IONES b: Estos iones se producen por la escisión del enlace peptídico en la región amino-terminal (lado N-terminal), reteniendo el grupo carbonilo (C=O) del enlace fragmentado.
- IONES c: Estos iones exhiben similitud estructural con los iones y, caracterizándose por la pérdida de una molécula de amoníaco (NH<sub>3</sub>).

#### 5.4. IDENTIFICACIÓN PRIMARIA DE LA COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE IONES AMONIO

**Figura 14.**

*Espectro de masas en MALDI TOF/TOF del péptido estándar [Espectro].*

Name	3-letter code	1-letter code	Residue Mass	Immonium ion	Related ions	Composition
Alanine	Ala	A	71.03711	44		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO
Arginine	Arg	R	156.10111	129	59,70,73,87,100,112	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O
Asparagine	Asn	N	114.04293	87	70	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Aspartic Acid	Asp	D	115.02694	88	70	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>
Cysteine	Cys	C	103.00919	76		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NOS
Glutamic Acid	Glu	E	129.04259	102		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>
Glutamine	Gln	Q	128.05858	101	56,84,129	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Glycine	Gly	G	57.02146	30		C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO
Histidine	His	H	137.05891	110	82,121,123,138,166	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O
Isoleucine	Ile	I	113.08406	86	44,72	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO
Leucine	Leu	L	113.08406	86	44,72	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO
Lysine	Lys	K	128.09496	101	70,84,112,129	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Methionine	Met	M	131.04049	104	61	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NOS
Phenylalanine	Phe	F	147.06841	120	91	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO
Proline	Pro	P	97.05276	70		C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO
Serine	Ser	S	87.03203	60		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
Threonine	Thr	T	101.04768	74		C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
Tryptophan	Trp	W	186.07931	159	11,117,130,132,170,100	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O
Tyrosine	Tyr	Y	163.06333	136	91,107	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
Valine	Val	V	99.06841	72	44,55,69	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO

*Nota. De Interpretación de los espectros de masas en tándem de disociación inducida por colisión de péptidos (Papayannopoulos, 1995), Mass Spectrometry Reviews.*

La Figura 14 ilustra un aspecto crucial en la identificación primaria de la composición aminoacídica de péptidos mediante espectrometría de masas: el análisis de los iones imonio. Estos iones diagnósticos son fragmentos de baja masa/carga ( $m/z$ ) que se generan preferencialmente durante la disociación de péptidos, al romperse los enlaces de la cadena lateral de residuos aminoacídicos específicos.

La presencia de señales iónicas con valores de  $m/z$  característicos para cada residuo de aminoácido constituyente en el espectro de masas en tándem proporciona información preliminar invaluable sobre la composición elemental del péptido.

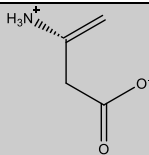
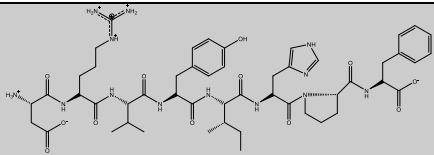
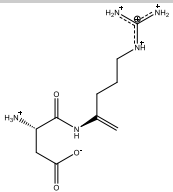
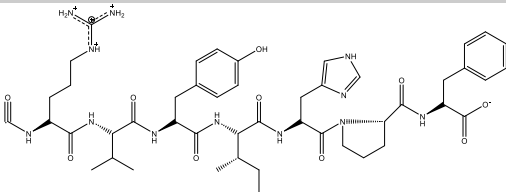
La identificación y cuantificación de estos iones imonio no solo confirman la presencia de ciertos aminoácidos en la secuencia peptídica, sino que también pueden inferir su abundancia relativa. Esta estrategia diagnóstica, al proporcionar una "huella dactilar" aminoacídica de baja masa, se establece como una herramienta preliminar eficaz para guiar la inferencia de la secuencia primaria de péptidos a partir de los datos espectrométricos de masa.

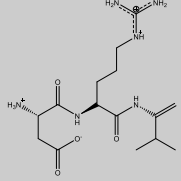
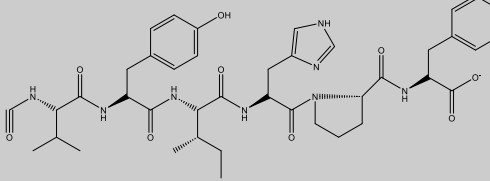
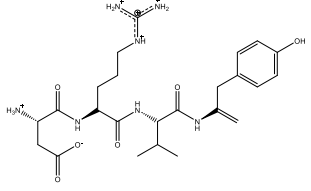
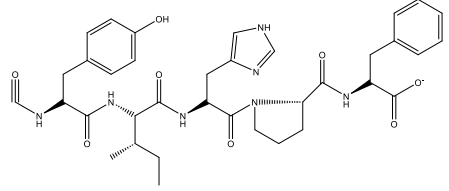
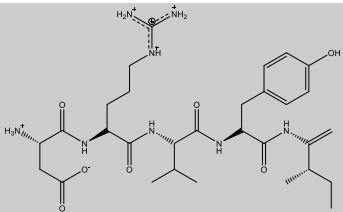
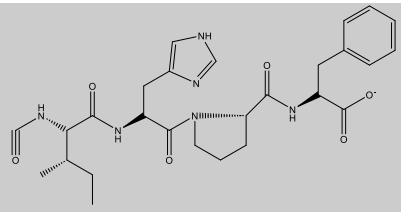
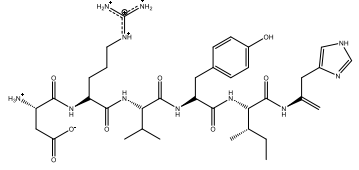
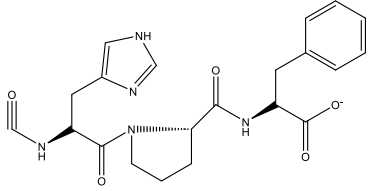
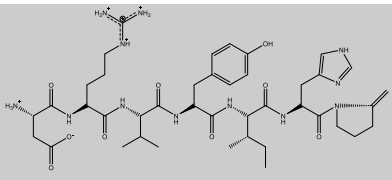
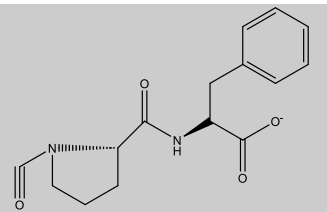
## 5.5. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a,b,c) Y (X, Y, Z) DE LA ANGIOTENSINA II

### 5.5.1. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a) Y (X)

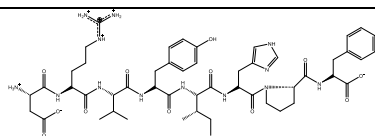
**Tabla 1.**

*Estructura química de los fragmentos aX de los aminoácidos de la Angiotensina II*

SEQ	#	a	X	#
D	1			8
		Peso Molecular: 88,03935	Peso Molecular: 1046,20	
DR	2			7
		Peso Molecular: 244,14	Peso Molecular: 957,49	

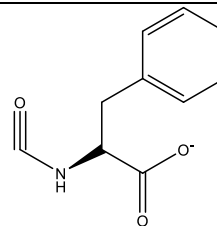
<b>DRV</b>	3			6
		Peso Molecular: 343,2	Peso Molecular: 801,39	
<b>DRVY</b>	4			5
		Peso Molecular: 506,27	Peso Molecular: 702,32	
<b>DRVYI</b>	5			4
		Peso Molecular: 619,35	Peso Molecular: 539,26	
<b>DRVYIH</b>	6			3
		Peso Molecular: 756,41	Peso Molecular: 426,17	
<b>DRVYIHP</b>	7			2
		Peso Molecular: 853,46	Peso Molecular: 289,11	

DRVYIHPF 8



Peso Molecular: 1046,20

1



Peso Molecular: 191,19

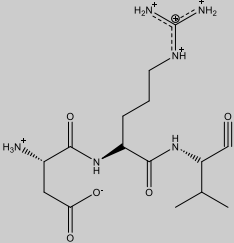
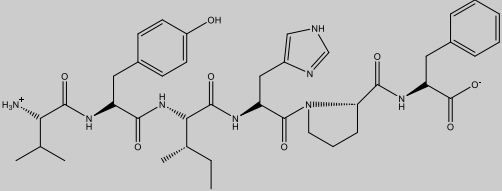
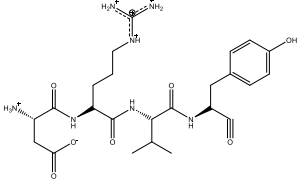
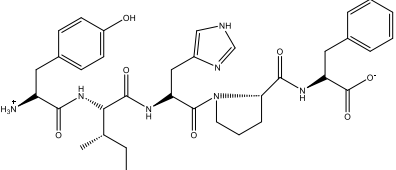
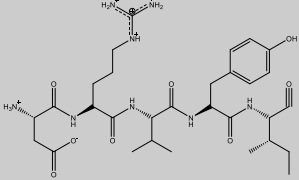
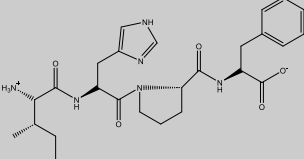
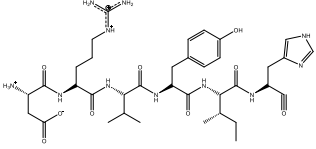
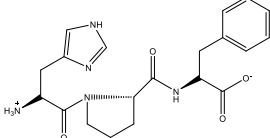
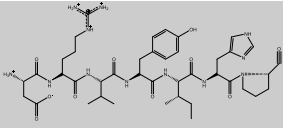
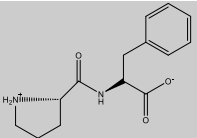
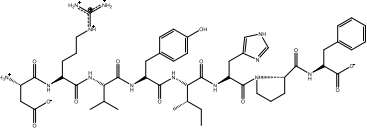
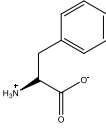
Nota. Autor. (2024). Adaptado de "Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra?", por Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., & Harrison, A. G., 1995, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

### 5.5.2. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (b) Y (Y)

Tabla 2.

Estructura química de los fragmentos bY de los aminoácidos de la Angiotensina II

SEQ	#	b	Y	#
D	1	<p>Peso Molecular: 116,03426</p>	<p>Peso Molecular: 1046,54183</p>	8
DR	2	<p>Peso Molecular: 255,895</p>	<p>Peso Molecular: 931,51489</p>	7

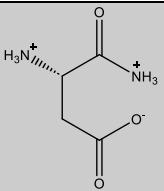
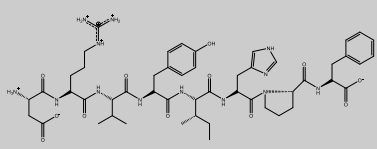
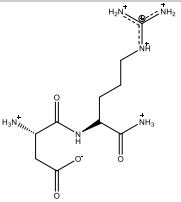
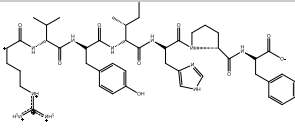
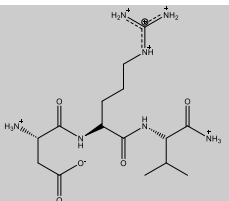
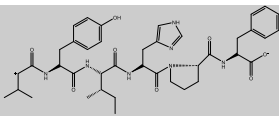
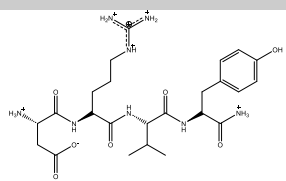
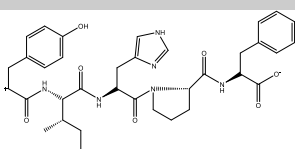
<b>DRV</b>	3			6
		Peso Molecular: 353,20379	Peso Molecular: 775,41378	
<b>DRVY</b>	4			5
		Peso Molecular: 534,26712	Peso Molecular: 676,34537	
<b>DRVYI</b>	5			4
		Peso Molecular: 647,35118	Peso Molecular: 513,28204	
<b>DRVYIH</b>	6			3
		Peso Molecular: 784,41009	Peso Molecular: 400,19797	
<b>DRVYIHP</b>	7			2
		Peso Molecular: 881,96286	Peso Molecular: 263,13906	
<b>DRVYIHFP</b>	8			1
		Peso Molecular: 1028,53127	Peso Molecular: 166,9863	

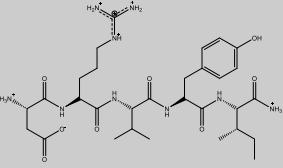
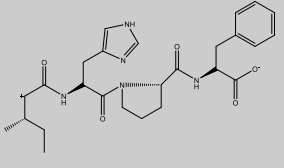
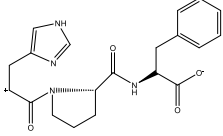
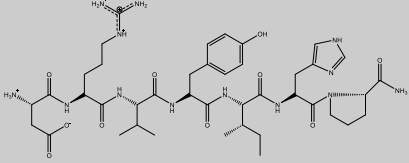
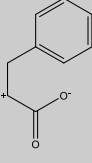
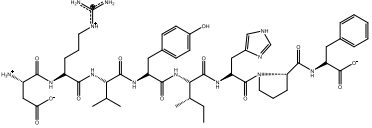
Nota. Autor. (2024). Adaptado de “Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra?”, por Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., & Harrison, A. G., 1995, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

### 5.5.3. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (c) Y (Z)

**Tabla 3.**

*Estructura química de los fragmentos cZ de los aminoácidos de la Angiotensina II.*

SEQ	#	c	Z	#
D	1	 <p>Peso Molecular: 133,06081</p>	 <p>Peso Molecular: 1029,51638</p>	8
DR	2	 <p>Peso Molecular: 272,16192</p>	 <p>Peso Molecular: 914,48944</p>	7
DRV	3	 <p>Peso Molecular: 370,23034</p>	 <p>Peso Molecular: 758,38833</p>	6
DRVY	4	 <p>Peso Molecular: 551,29367</p>	 <p>Peso Molecular: 659,31991</p>	5

<b>DRVYI</b>	5		<b>Peso Molecular: 664,37773</b>		4
<b>DRVYIH</b>	6	<b>Peso Molecular: 801, 43664</b>		<b>Peso Molecular: 383,17252</b>	3
<b>DRVYIHP</b>	7		<b>Peso Molecular: 898,5894</b>		2
<b>DRVYIHPF</b>	8		<b>Peso Molecular: 1046,20</b>	<b>Peso Molecular: 149,06085</b>	1

Nota. Autor. (2024). Adaptado de “Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra?”, por Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., & Harrison, A. G., 1995, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

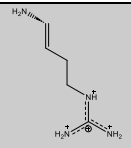
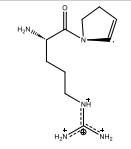
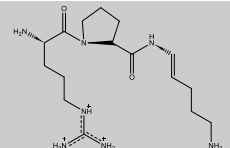
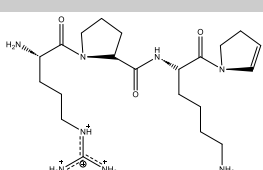
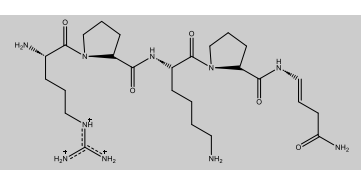
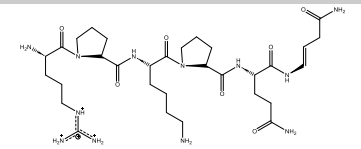
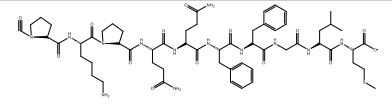
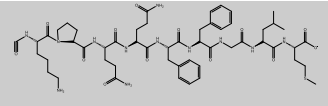
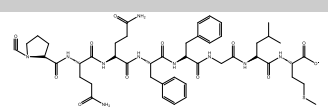
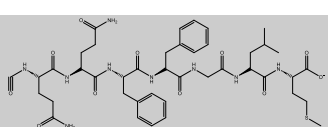
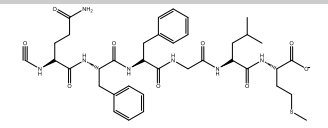
## 5.6. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a,b,c) Y (X, Y, Z) DE LA SUSTANCIA P

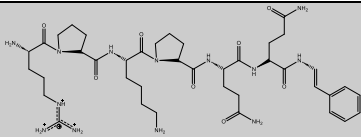
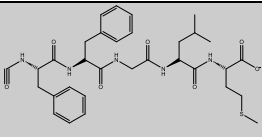
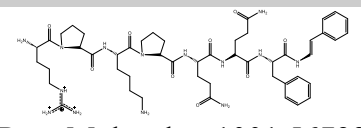
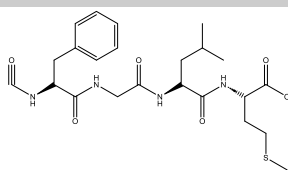
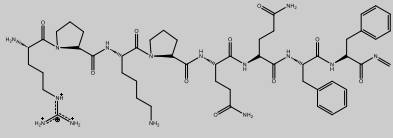
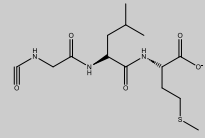
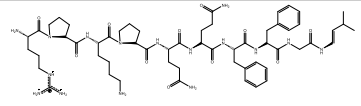
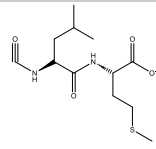
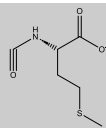
### 5.6.1. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (a) Y (X)

**Tabla 4.**

*Estructura química de los fragmentos aX de los aminoácidos de la Sustancia P.*

SEQ	#	a	X	#
-----	---	---	---	---

<b>R</b>	1		11
		Peso Molecular: 129,11352	
<b>RP</b>	2		10
		Peso Molecular: 226,16628	
<b>RPK</b>	3		9
		Peso Molecular: 354,26124	
<b>RPKP</b>	4		8
		Peso Molecular: 451,31401	
<b>RPKPQ</b>	5		7
		Peso Molecular: 579,37258	
<b>RPKPQQ</b>	6		6
		Peso Molecular: 707,43116	
			10
		Peso Molecular: 1218,59763	
			9
		Peso Molecular: 1121,54487	
			8
		Peso Molecular: 993,44991	
			7
		Peso Molecular: 896,39714	
			6
		Peso Molecular: 768,33857	

<b>RPKPQQF</b>	7			5
		Peso Molecular: 854,49958	Peso Molecular: 640,27999	
<b>RPKPQQFF</b>	8			4
		Peso Molecular: 1001,56799	Peso Molecular: 493,21158	
<b>RPKPQQFFG</b>	9			3
		Peso Molecular: 1058,58945	Peso Molecular: 346,14316	
<b>RPKPQQFFGL</b>	10			2
		Peso Molecular: 1171,67352	Peso Molecular: 289,1217	
<b>RPKPQQFFGLM</b>	11	Peso Molecular: 1302,714		1
			176,03764	

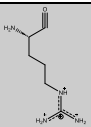
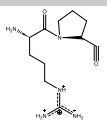
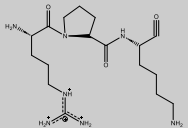
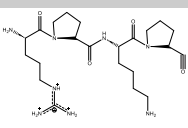
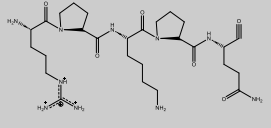
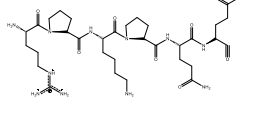
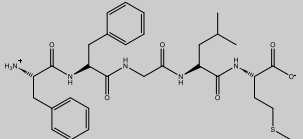
Nota. Autor. (2024). Adaptado de "Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra?", por Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., & Harrison, A. G., 1995, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

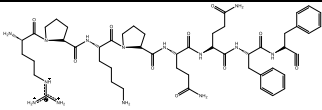
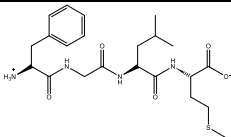
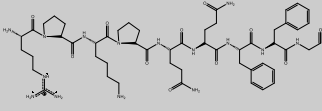
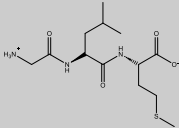
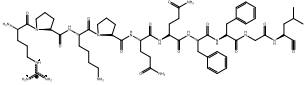
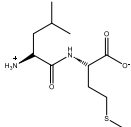
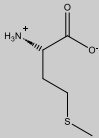
### 5.6.2. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (b) Y (Y)

**Tabla 5.**

*Estructura química de los fragmentos bY de los aminoácidos de la Sustancia P.*

SEQ	#	b	Y	#
-----	---	---	---	---

<b>R</b>	1		Peso Molecular: 1348,71948	11
		Peso Molecular: 157,10843		
<b>RP</b>	2		Peso Molecular: 1192,61837	10
		Peso Molecular: 254,1612		
<b>RPK</b>	3		Peso Molecular: 1095,56561	9
		Peso Molecular: 382,25616		
<b>RPKP</b>	4		Peso Molecular: 967,47064	8
		Peso Molecular: 479,30892		
<b>RPKPQ</b>	5		Peso Molecular: 870,41788	7
		Peso Molecular: 607,3675		
<b>RPKPQQ</b>	6		Peso Molecular: 742,3593	6
		Peso Molecular: 735,42608		
<b>RPKPQQF</b>	7		Peso Molecular: 614,30073	5
		Peso Molecular: 882,49449		

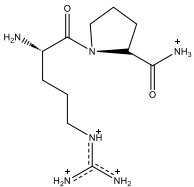
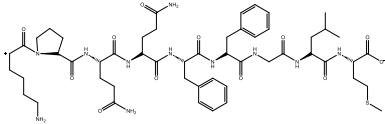
<b>RPKPQQFF</b>	8			4
		Peso Molecular: 1029,5629	Peso Molecular: 467,23231	
<b>RPKPQQFFG</b>	9			3
		Peso Molecular: 1086,58437	Peso Molecular: 320,1639	
<b>RPKPQQFFGL</b>	10			2
		Peso Molecular: 1199,66843	Peso Molecular: 263, 14244	
<b>RPKPQQFFGLM</b>	11	Peso Molecular: 1330,70892		1
			Peso Molecular: 150,05837	

*Nota.* Autor. (2024). Adaptado de “Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra?”, por Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., & Harrison, A. G., 1995, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

### 5.6.3. ESTRUCTURA CARBONATADA DE LOS FRAGMENTOS (c) Y (Z)

**Tabla 6.**

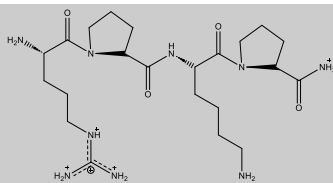
*Estructura química de los fragmentos cZ de los aminoácidos de la Sustancia P.*

SEQ	#	c	Z	#
<b>R</b>	1	Peso Molecular: 174,13498	Peso Molecular: 1331,69403	11
<b>RP</b>	2			10
			Peso Molecular: 1175,59292	

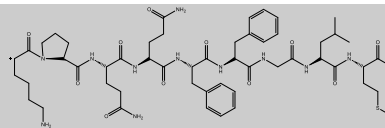
Peso Molecular: 271,18774

RPK

3



Peso Molecular: 399,28271



Peso Molecular: 1078,54015

RPKP

4

496,33547

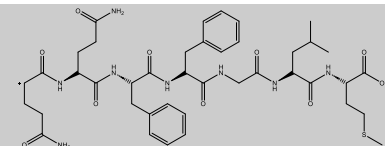
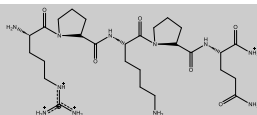
Peso Molecular: 95044519

8

RPKPQ

5

Peso Molecular: 624,39405

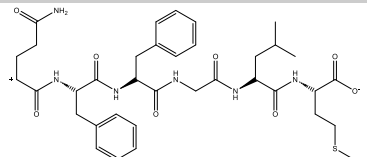
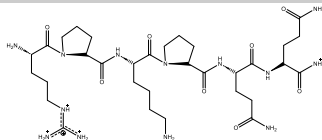


Peso Molecular: 853,39243

RPKPQQ

6

Peso Molecular: 752,45263

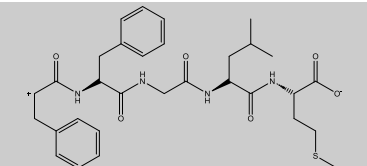
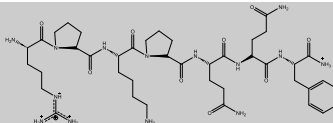


Peso Molecular: 725,33385

RPKPQQF

7

Peso Molecular: 899,52104

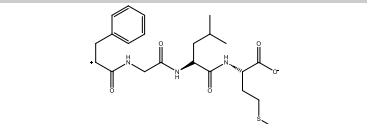
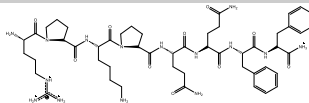


Peso Molecular: 597,27527

RPKPQQFF

8

Peso Molecular: 1046,58945

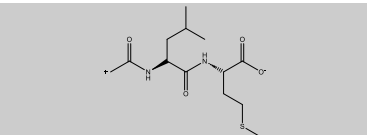
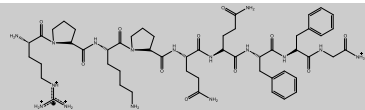


Peso Molecular: 450,20686

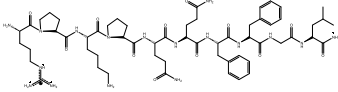
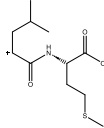
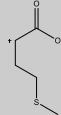
RPKPQQFFG

9

Peso Molecular: 1103,61092



3

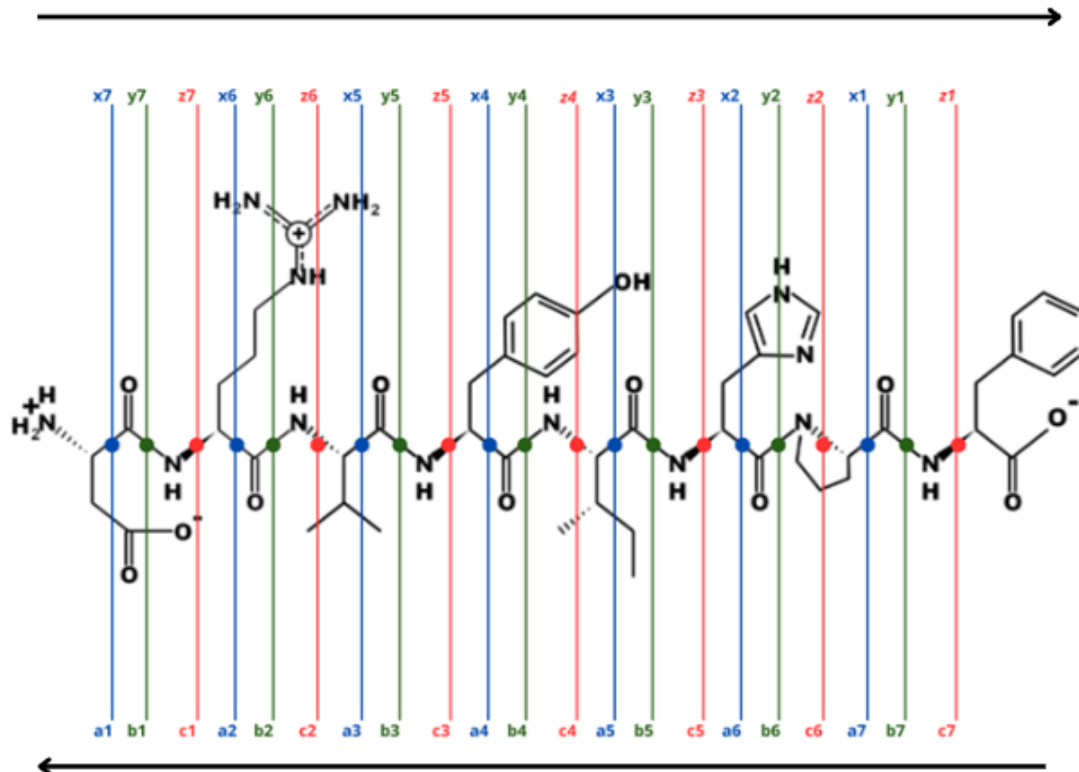
		Peso Molecular: 303,13845		
<b>RPKPQQFFGL</b>	10			2
		Peso Molecular: 1216,69498	Peso Molecular: 246,11698	
<b>RPKPQQFFGLM</b>	11			1
			Peso Molecular: 133,03292	

*Nota.* Autor. (2024). Adaptado de “Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra?”, por Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., & Harrison, A. G., 1995, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*.

## 5.7. ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE ANGIOTENSINA II MEDIANTE MALDI-TOF/TOF-LIFT

**Figura 15.**

*Esquema de Fragmentación de la Angiotensina II en Espectrometría de Masas MALDI-TOF/TOF [Diagrama].*



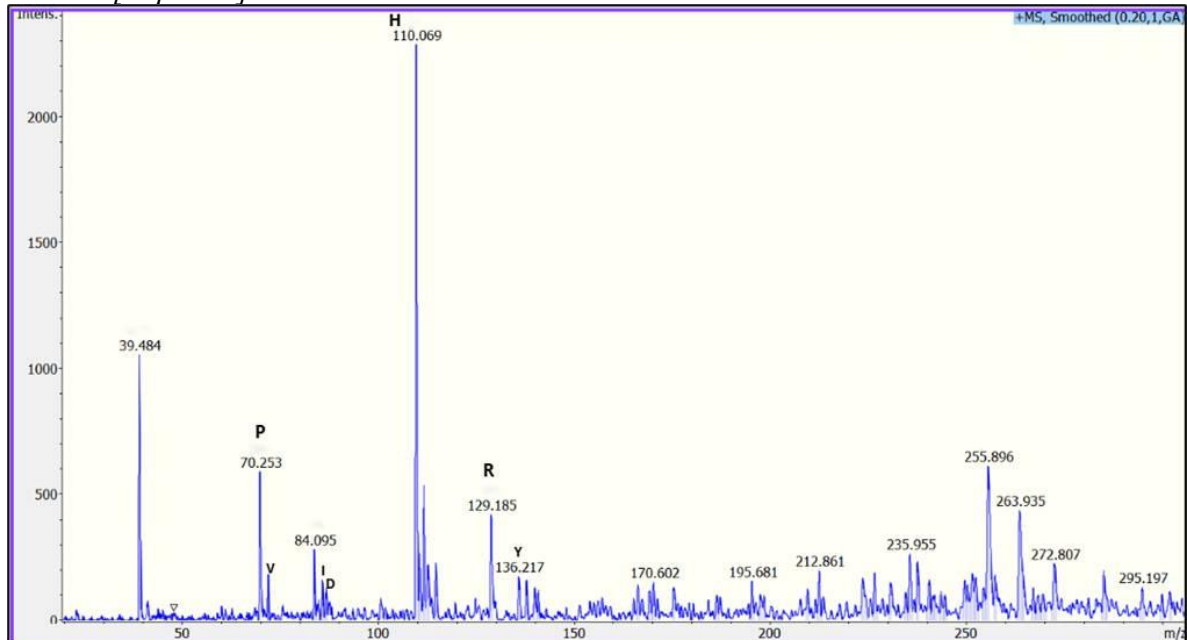
*Nota.* Figura elaborada por el autor (2025).

En la Figura 16 se presenta el espectro de masas donde se evidencian señales iónicas correspondientes a iones imonio de diversos aminoácidos que conforman la Angiotensina II (DRVYIHPF). Se observa una señal en  $m/z$  110.069, designada como H, la cual presenta una alta correlación con la masa teórica del ion imonio de Histidina ( $m/z$  110.07). Adicionalmente, se identifica una señal en  $m/z$  129.185, rotulada como R, próxima a la masa teórica del ion imonio de Arginina ( $m/z$  129.11). Una señal designada como V se detecta cercana a la masa teórica del ion imonio de Valina ( $m/z$  72.08). La señal etiquetada como Y en  $m/z$  136.217 exhibe concordancia con la masa teórica del ion imonio de Tirosina ( $m/z$  136.08). Se observa una señal rotulada como

I en  $m/z$  84.095, aunque con una ligera desviación respecto a la masa teórica del ion imonio de Isoleucina ( $m/z$  86.10). Una señal designada como P en  $m/z$  70.253 coincide con la masa teórica del ion imonio de Prolina ( $m/z$  70.07). No se detecta una señal etiquetada que corresponda a la masa teórica del ion imonio de Fenilalanina ( $m/z$  120.08). La detección de señales iónicas correspondientes a los iones imonio de Histidina, Arginina, Valina, Tirosina, Isoleucina y Prolina robustece la identificación de fragmentos del péptido Angiotensina II en el espectro analizado (Ambihapathy et al., 1997; Harrison et al., 2004).

**Figura 16.**

*Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis LIFT de la composición de aminoácidos de angiotensina II [Espectro].*



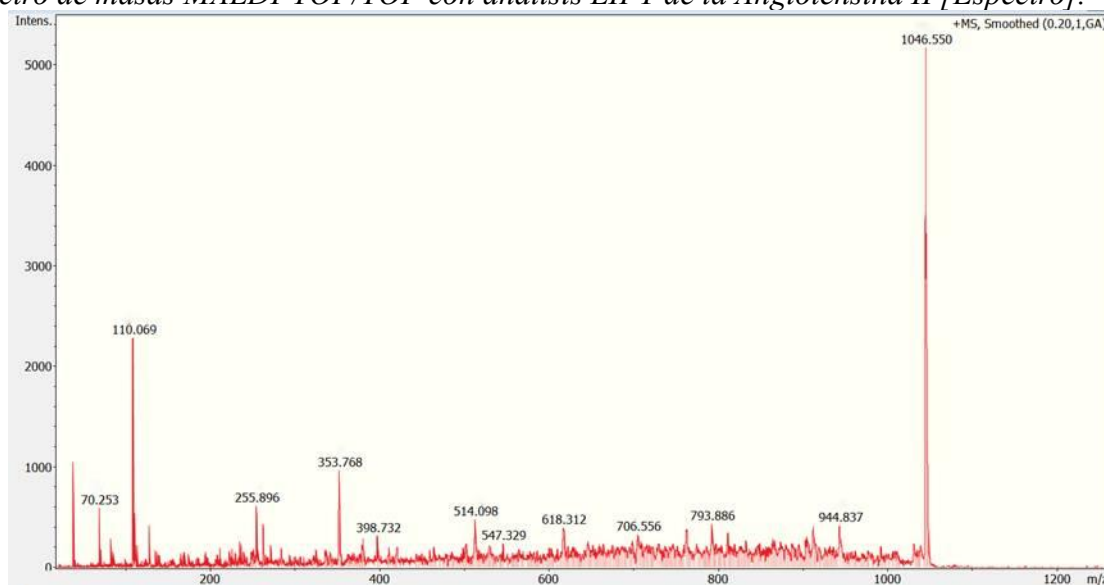
*Nota.* Figura elaborada por el autor (2025).

La Figura 17 ilustra el espectro de masas MALDI-TOF/TOF resultante de la fragmentación de Angiotensina II mediante la técnica LIFT. En este espectro, cada señal iónica representa un fragmento peptídico con una relación masa-carga ( $m/z$ ) específica. La señal de mayor abundancia, localizada en la región de  $m/z$  superior, corresponde al ion molecular precursor del péptido intacto. Las señales de menor  $m/z$  representan los iones fragmento generados por la escisión de los enlaces

peptídicos. La técnica LIFT, mediante la utilización de un láser infrarrojo, induce una disociación controlada del péptido, posibilitando la elucidación de la composición aminoacídica. El análisis exhaustivo de este espectro, en conjunto con la información proporcionada por la tabla de masas de aminoácidos derivatizados, permitirá la determinación precisa de la secuencia de aminoácidos de Angiotensina II y la evaluación comparativa de la eficiencia de la técnica LIFT frente a otras metodologías de fragmentación (Harrison et al., 2004; Good et al., 2013).

**Figura 17.**

*Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis LIFT de la Angiotensina II [Espectro].*



*Nota.* Figura elaborada por el autor (2025).

**Figura 18.**

*Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de angiotensina II en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	a (teórico)	a (experimental)	% error	X (teórico)	X (experimental)	% error	#
D	1	88,03935	87,883	0,177591043	0	0	0	8
R	2	244,14	226,965 + 17	0,071680184	957,49	944,839 + 17	0,454208399	7
V	3	343,2	326,193 + 17	0,002039627	801,39	805,471	0,509240195	6
Y	4	506,27	504,069	0,434748257	702,32	700,058	0,322075407	5
I	5	619,35	618,316	0,166949221	539,26	532,084	1,330712458	4
H	6	756,41	752,987	0,452532357	426,17	422,133	0,947274562	3
P	7	853,46	854,665	0,14118998	289,11	285,5	1,24865968	2
F	8	1000,53	1008,402	0,786783005	192,66	195,681	1,568047337	1
PROMEDIO % ERROR				0,279189209	PROMEDIO % ERROR		0,797527255	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025). Algunos valores pueden ganar agua o perder amoníaco durante su fragmentación.

El análisis de los iones fragmento de tipo a, obtenidos mediante la técnica LIFT en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF para el péptido Angiotensina II (DRVYIHPPF) y compilados en la Tabla 1, revela una concordancia sobresaliente entre las masas teóricas y experimentales. Los porcentajes de error individuales para cada ion fragmento a son notablemente bajos, manteniéndose consistentemente por debajo del 1%. Este hallazgo sugiere una fragmentación y detección de alta exactitud para estas especies iónicas. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos a se sitúa en 0.32%, lo que denota una elevada fiabilidad en la determinación de sus masas y una mínima desviación sistemática.

En lo concerniente a los iones fragmento de tipo X, el análisis también exhibe una correlación favorable entre las masas teóricas y experimentales, aunque con una variabilidad ligeramente superior en comparación con los fragmentos a. Los porcentajes de error individuales para los fragmentos X son generalmente bajos, si bien se aprecian valores marginalmente más elevados en relación con los fragmentos a. El porcentaje de error promedio para los fragmentos X asciende a 0.80%, lo que indica una exactitud razonable en la detección de estas especies iónicas, aunque con una mayor dispersión en los datos respecto a los fragmentos a.

Considerando la potencial influencia de una descalibración instrumental, los resultados sugieren que, si bien podría existir una contribución mínima, no se erige como el factor predominante en las discrepancias observadas, particularmente en el caso de los fragmentos a, donde la exactitud demostró ser considerablemente alta (Harrison et al., 2004; Yu et al., 1993).

**Figura 19.**

*Valores de masa-carga ( $m/z$ ) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de angiotensina II en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	b (teórico)	b (experimental)	% error	Y (teórico)	Y (experimental)	% error	#
D	1	116,03426	115,081	0,821533226	1046,54183	1046,55	0,000780666	8
R	2	272,13537	255,895 + 17	0,279136813	931,51489	933,346	0,196573347	7
V	3	371,20379	353,768 + 17	0,117399125	775,41378	776,016	0,077664341	6
Y	4	534,26712	532,084	0,408619568	676,34537	676,804	0,06781003	5
I	5	647,35118	647,589	0,036737401	513,28204	514,096	0,158579482	4
H	6	784,41009	787,379	0,378489522	400,19797	398,73	0,366810956	3
P	7	881,96286	881,003	0,108832247	263,13906	263,934	0,302098822	2
F	8	1028,53127	1032,739	0,409100834	166,9863	166,602	0,23013864	1
PROMEDIO % ERROR				0,319981092	PROMEDIO % ERROR		0,175057036	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo b e y obtenidos para la angiotensina II arroja errores porcentuales promedio de 0.328% para los fragmentos b y 0.175% para los fragmentos y, lo que denota una concordancia general aceptable entre los valores teóricos y experimentales, aunque ligeramente inferior para los iones b. Considerando la secuencia de la angiotensina II (DRVYIHPF), los fragmentos b que presentan mayor significancia para la elucidación de la secuencia, debido a su masa, son aquellos que incorporan residuos aminoacídicos con masas elevadas, tales como Arginina (R,  $m/z$  teórico 255.135), Tirosina (Y,  $m/z$  teórico 534.267) y Fenilalanina (F,  $m/z$  teórico 1028.531). De manera análoga, para los fragmentos y, los iones que comprenden estos aminoácidos desde el extremo carboxilo-terminal (C-terminal) resultan igualmente cruciales, como los fragmentos y que terminan en Fenilalanina (F,  $m/z$  teórico 166.986), Prolina-Fenilalanina (PF,  $m/z$  teórico 263.139) e Histidina-Prolina-Fenilalanina (HPF,  $m/z$  teórico 400.198). La identificación precisa de estos fragmentos clave, a pesar de los errores menores observados que podrían atribuirse a factores como una leve descalibración del instrumento, es esencial para la confirmación de la secuencia peptídica y la verificación de la presencia de los aminoácidos distintivos en la angiotensina II (Harrison et al., 2004; Yu et al., 1993).

**Figura 20.**

Valores de masa-carga ( $m/z$ ) teóricos y experimentales de fragmentos c y Z de angiotensina II en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].

SEQ	#	c (teórico)	c ( experimental)	% error	Z (teórico)	Z (experimental)	% error	#
D	1	133,06081	136,217	2,371990671	1029,51638	1032,739	0,313022703	8
R	2	272,16192	272,808	0,237388096	914,48944	913,812	0,074078493	7
V	3	370,23034	371,626	0,376970726	758,38833	760,625	0,294924106	6
Y	4	551,29367	547,33	0,718976149	659,31991	660,787	0,222515653	5
I	5	664,37773	665,892	0,227923052	496,25659	500,192	0,793019192	4
H	6	801,43664	805,471	0,50339101	383,17252	382,107	0,278078397	3
P	7	898,5894	896,8	0,199134332	246,11361	243,895	0,901457664	2
F	8	0	0	0	149,06085	140,303	5,875352247	1
PROMEDIO % ERROR				0,579471755	PROMEDIO % ERROR		1,094056057	

Nota. Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo c, generados mediante la técnica LIFT en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF para el péptido Angiotensina II (DRVYIHPF), revela una concordancia aceptable entre las masas teóricas y experimentales. Los porcentajes de error individuales para cada ion fragmento c son generalmente bajos, situándose mayoritariamente por debajo del 1%. Se observa una desviación ligeramente superior para el fragmento c correspondiente al residuo de Ácido Aspártico (D), con un error del 2.37%. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos c es de 0.58%, lo que indica una exactitud razonable en la determinación de sus masas, aunque con una dispersión ligeramente mayor en comparación con los fragmentos a y b previamente analizados.

En lo referente a los iones fragmento de tipo z, el análisis exhibe una correlación moderada entre las masas teóricas y experimentales, aunque con una mayor variabilidad en los porcentajes de error en comparación con los fragmentos c. Los errores individuales oscilan entre un 0.07% para el residuo de Arginina (R) hasta un notable 5.88% para el residuo de Fenilalanina (F). El porcentaje de error promedio para los fragmentos z se eleva a 1.09%, lo que sugiere una menor exactitud en la detección de estas especies iónicas y una mayor dispersión en las mediciones. El error particularmente elevado observado para el fragmento z de Fenilalanina podría ser indicativo

de una inestabilidad específica de este ion o de dificultades inherentes a su detección bajo las condiciones experimentales empleadas (Harrison et al., 2004; Yu et al., 1993).

Considerando la potencial influencia de una descalibración del instrumento, los resultados sugieren que podría estar contribuyendo a las discrepancias observadas, especialmente en el caso de los fragmentos z, donde la exactitud es inferior y la variabilidad es más pronunciada. Una descalibración podría afectar la exactitud de la medición de la relación masa-carga ( $m/z$ ) de manera no uniforme a lo largo del espectro, lo que podría explicar los errores más significativos detectados en ciertos fragmentos. El error relativamente elevado en el fragmento c correspondiente al Ácido Aspártico también podría ser un indicio de esta problemática.

**Figura 21.**

*Cuantificación de fragmentos de angiotensina II obtenidos por MALDI-TOF/TOF con detección LIFT [Tabla].*

Fragmentos de Ang II en LIFT	
Fragmentos	Porcentaje
a	100%
b	100%
c	100%
X	100%
Y	100%
Z	100%

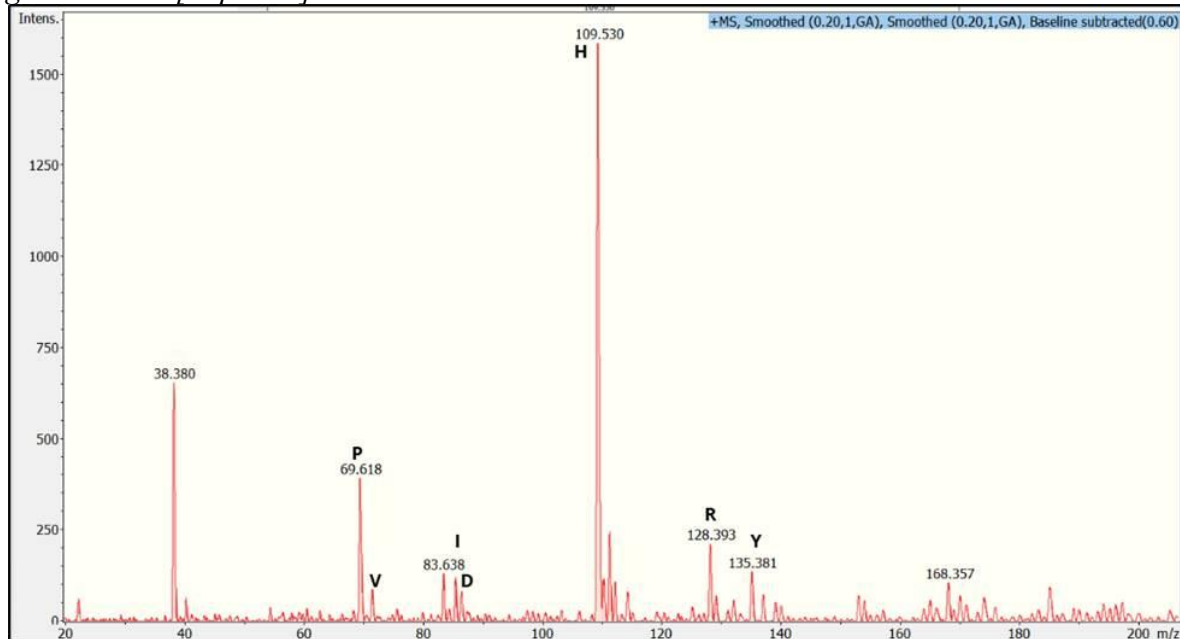
*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

Se observa que la totalidad de los fragmentos esperados (a, b, c, X, Y, Z) fueron identificados, con una eficiencia de recuperación del 100% para cada uno de ellos. Este hallazgo demuestra la alta capacidad de la técnica MALDI-TOF/TOF acoplada con LIFT para la fragmentación, lo que permite una identificación completa de la secuencia aminoacídica de la Angiotensina II. La eficiencia del 100% en la detección de todos los fragmentos pronosticados valida la robustez de este método para estudios de identificación y caracterización estructural de péptidos.

## 5.8. ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE ANGIOTENSINA II MEDIANTE MALDI-TOF/TOF-CID.

### Figura 22.

*Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la composición de aminoácidos de angiotensina II [Espectro].*

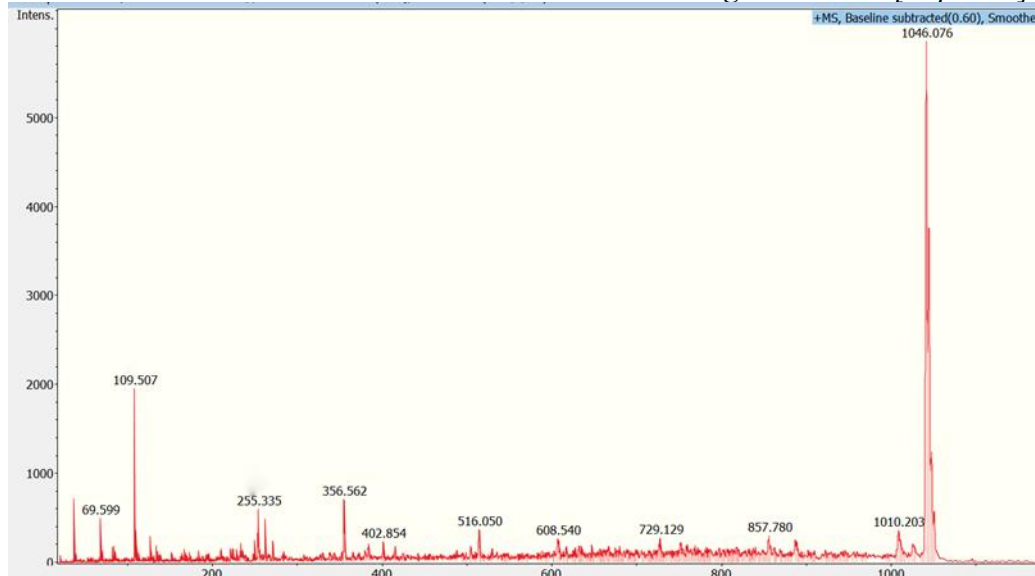


*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

El análisis del espectro de masas adquirido mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) revela la presencia de iones imonio característicos de la secuencia DRVYIHPF de la angiotensina II, identificándose específicamente las señales correspondientes a los iones imonio de arginina (R) en  $m/z$  128.393, tirosina (Y) en  $m/z$  135.381, histidina (H) en  $m/z$  109.530, prolina (P) en  $m/z$  69.618, valina (V) en  $m/z$  83.638 y ácido aspártico (D) con una señal adyacente a la de valina. La detección de estos fragmentos iónicos específicos, en conjunto con otras señales presentes en la región de  $m/z$  inferior a 200 Da, fortalece la identificación de la secuencia DRVYIHPF, resaltando la utilidad de los iones imonio en la espectrometría de masas para la confirmación de la identidad de los residuos aminoácidos y la elucidación de la secuencia peptídica.

**Figura 23.**

*Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la Angiotensina II [Espectro].*



Nota. Elaborado por el autor (2025).

**Figura 24.**

*Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de angiotensina II en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	a (teórico)	a ( experimental)	% error	X (teórico)	X (experimental)	% error	#
D	1	88,03935	86,658	1,56901431	0	0	0	8
R	2	244,14	226,721 + 17	0,58122389	957,49	0	0	7
V	3	343,2	356,544	3,88811189	801,39	0	0	6
Y	4	506,27	505,778	0,09718135	702,32	0	0	5
I	5	619,35	618,759	0,09542262	539,26	531,254	1,48462708	4
H	6	756,41	753,712	0,35668487	426,17	416,931	2,16791421	3
P	7	853,46	857,713	0,49832447	289,11	285,978	1,08332469	2
F	8	1000,53	1009,296	0,87613565	192,66	0	0	1
		PROMEDIO % ERROR		0,99526238	PROMEDIO % ERROR		0,59198325	

Nota. Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo a, generados mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF para el péptido Angiotensina II (DRVYIHPF), revela una concordancia variable entre las masas teóricas y experimentales. Los porcentajes de error individuales para los fragmentos a oscilan entre un valor menor de 0.097% para el residuo de Tirosina (Y) hasta un máximo de 3.89% para el residuo de Valina (V). El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos a se sitúa

en 0.95%, lo que indica una exactitud moderada en la determinación de sus masas, con desviaciones significativas para ciertos aminoácidos (Harrison et al., 2004).

En lo concerniente a los iones fragmento de tipo X, el análisis exhibe una concordancia aún más variable y, en general, una menor exactitud en comparación con los fragmentos a. Se observan varios fragmentos X con porcentajes de error considerablemente elevados, como el residuo de Isoleucina (I) con un 1.48% y el residuo de Histidina (H) con un 2.17%. Adicionalmente, no se detectaron fragmentos X correspondientes a los residuos de Ácido Aspártico (D), Arginina (R) y Valina (V), lo que limita la cobertura de la secuencia obtenida a partir de estos iones. El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos X es de 1.04%, aunque este valor se ve influenciado por la ausencia de datos para tres fragmentos. Los fragmentos X detectados presentan errores relativamente altos, lo que sugiere una fragmentación o detección menos eficiente para estas especies iónicas bajo las condiciones de CID empleadas (Wells & McLuckey, 2005).

Considerando la potencial influencia de una descalibración instrumental, los resultados sugieren que podría contribuir a las discrepancias observadas, especialmente en el caso de los fragmentos X, donde la exactitud es inferior y la variabilidad es más pronunciada. Una descalibración podría afectar la exactitud de la medición de la relación masa-carga ( $m/z$ ) de manera no uniforme a lo largo del espectro. No obstante, la ausencia de argón, necesario para llevar a cabo el análisis mediante CID. El gas de colisión, como el argón, es fundamental en la técnica CID para inducir la fragmentación eficiente de los iones precursores (Yu et al., 1993). La ausencia o la calidad inadecuada del gas de colisión puede resultar en una fragmentación ineficiente, una menor abundancia de iones fragmento y, consecuentemente, una menor exactitud en la determinación de sus masas.

**Figura 25.**

*Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de angiotensina II en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	b (teórico)	b (experimental)	% error	Y (teórico)	Y (experimental)	% error	#
D	1	116,03426	114,557	1,27312399	1046,54183	1043	0,33843177	8
R	2	272,13537	255,375	6,15883558	931,51489	0	0	7
V	3	371,20379	381,229	2,70072943	775,41378	770,728	0,60429414	6
Y	4	534,26712	531,56	0,50669785	676,34537	675,318	0,1519002	5
I	5	647,35118	648,634	0,19816446	513,28204	515,976	0,52484985	4
H	6	784,41009	784,463	0,0067452	400,19797	402,865	0,66642767	3
P	7	881,96286	888,423	0,73247302	263,13906	263,649	0,19379107	2
F	8	1028,53127	1026,893	0,15928247	166,9863	168,357	0,82084578	1
		PROMEDIO % ERROR		1,4670065	PROMEDIO % ERROR		0,41256756	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo b, generados mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF para el péptido Angiotensina II (DRVYIHPF), revela una concordancia moderada entre las masas teóricas y experimentales. Los porcentajes de error individuales para los fragmentos b exhiben una variabilidad considerable, desde un valor menor de 0.007% para el residuo de Histidina (H) hasta un valor máximo de 6.16% para el residuo de Arginina (R). El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos b se sitúa en 1.47%, lo que indica una exactitud aceptable en términos generales, aunque con desviaciones significativas para algunos aminoácidos. El error notablemente elevado observado para el fragmento b correspondiente a la Arginina sugiere una posible inestabilidad o dificultad inherente a la formación o detección de este ion específico bajo las condiciones de CID empleadas.

En lo concerniente a los iones fragmento de tipo Y, el análisis muestra una concordancia generalmente favorable entre las masas teóricas y experimentales. Los porcentajes de error individuales para los fragmentos Y son mayoritariamente bajos, situándose por debajo del 1%, con la excepción del residuo de Arginina (R), para el cual no se detectó ningún fragmento Y. El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos y detectados es de 0.41%, lo que indica una

exactitud relativamente alta en la determinación de sus masas. La ausencia del fragmento y correspondiente a la Arginina limita la cobertura de la secuencia obtenida a partir de estos iones.

Considerando la potencial influencia de una descalibración instrumental, los resultados sugieren que podría contribuir a las discrepancias observadas, especialmente en el caso del fragmento b de Arginina, que presenta un error significativamente elevado. Una descalibración podría afectar la exactitud de la medición de la relación masa-carga ( $m/z$ ) de manera no uniforme a lo largo del espectro. No obstante, la ausencia de argón, necesario para llevar a cabo el análisis mediante CID. El gas de colisión, como el argón, es fundamental en la técnica CID para inducir la fragmentación eficiente de los iones precursores (Harrison, 2009).

### Figura 26.

*Valores de masa-carga ( $m/z$ ) teóricos y experimentales de fragmentos c e Z de angiotensina II en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	c (teórico)	c ( experimental)	% error	Z (teórico)	Z (experimental)	% error	#
D	1	133,06081	135,381	1,74370651	1029,51638	1027,046	0,23995539	8
R	2	272,16192	272,79	0,23077439	914,48944	0	0	7
V	3	388,23034	385,671	0,65923235	758,38833	0	0	6
Y	4	551,29367	550,21	0,19656855	659,31991	0	0	5
I	5	664,37773	0	0	496,25659	495,854	0,08112537	4
H	6	801,43664	798,865	0,32087877	383,17252	381,109	0,53853549	3
P	7	898,5894	888,5	1,12280425	246,11361	243,869	0,91202189	2
F	8	0	0	0	149,06085	149,124	0,04236525	1
		PROMEDIO % ERROR		0,5342456	PROMEDIO % ERROR		0,22675042	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo c, generados mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF para el péptido Angiotensina II (DRVYIHPF), revela una concordancia favorable entre las masas teóricas y experimentales para la mayoría de los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales son generalmente bajos, manteniéndose por debajo del 1.2% para los fragmentos identificados, con la excepción del residuo de Ácido Aspártico (D), que presenta un error ligeramente superior del 1.74%. No obstante, no se detectaron fragmentos c correspondientes a los residuos de

Isoleucina (I) y Fenilalanina (F), lo que restringe la cobertura de la secuencia obtenida a partir de estos iones. El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos c detectados es de 0.53%, lo que indica una exactitud aceptable en la determinación de sus masas.

En lo referente a los iones fragmento de tipo Z, el análisis exhibe una concordancia sobresaliente entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos identificados. Los porcentajes de error individuales son muy bajos, situándose por debajo del 1% para todos los fragmentos Z detectados. Sin embargo, no se detectaron fragmentos z correspondientes a los residuos de Arginina (R) y Valina (V), lo que también limita la cobertura de la secuencia obtenida a partir de estos iones. El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos Z detectados es de 0.23%, lo que indica una alta exactitud en la determinación de sus masas (Medzihradzky, 2005).

**Figura 27.**

*Cuantificación de fragmentos de angiotensina II obtenidos por MALDI-TOF/TOF con disociación inducida por colisión (CID) [Tabla].*

Fragmentos de Ang II en CID	
Fragmentos	Porcentaje
a	100%
b	100%
c	75%
X	38%
Y	75%
Z	63%

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

Los resultados presentados en la Figura 27 detallan la detección y cuantificación de los fragmentos generados a partir de la Angiotensina II mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, utilizando la técnica de disociación inducida por colisión (CID). A diferencia de la fragmentación en modo LIFT, en este caso no todos los fragmentos esperados fueron recuperados

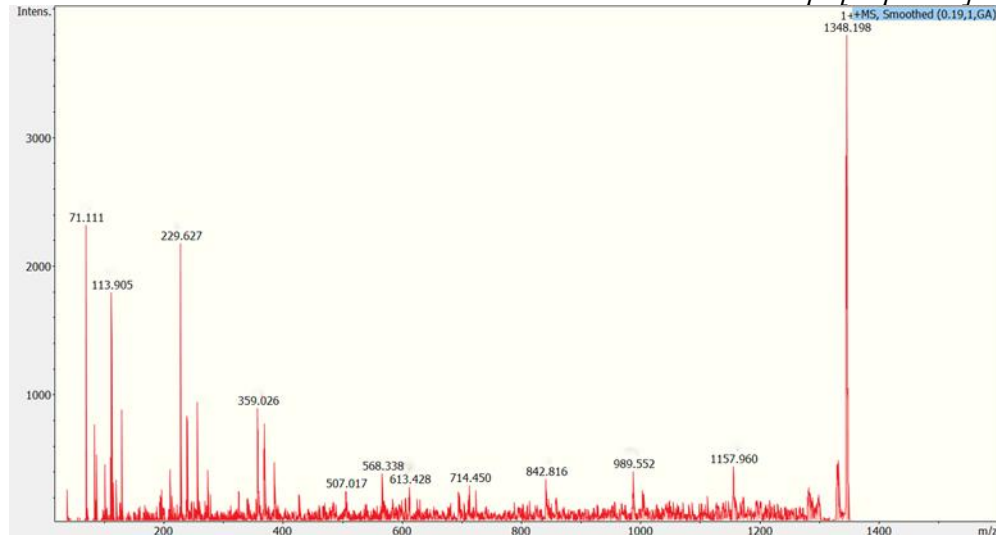




MALDI-TOF/TOF para la elucidación de la composición de péptidos a través de la identificación de sus aminoácidos constituyentes (Medzihradzsky, 2005).

### Figura 30.

*Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis LIFT de la sustancia p. [Espectro].*



*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

### Figura 31.

*Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de la sustancia p en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	a (teórico)	a ( experimental)	% error	X (teórico)	X (experimental)	% error	#
R	1	129,11352	128,071	0,80744449	0	0	0	11
P	2	226,16628	229,627	1,53016621	1218,59763	1202,336 + 17	0,06059178	10
K	3	354,26124	359,026	1,34498485	1121,54487	0	0	9
P	4	451,31401	0	0	993,44991	989,552	0,392361	8
Q	5	579,37258	568,338	1,90457408	896,39714	860,383	4,0176545	7
Q	6	707,43116	0	0	768,33857	0	0	6
F	7	854,49958	0	0	640,27999	0	0	5
F	8	1001,56799	1005,327	0,37531251	493,21158	490,148	0,62114924	4
G	9	1058,58945	1050,329	0,78032612	346,14316	341,909	1,22323954	3
L	10	1171,67352	1173,65	0,16868863	289,1217	0	0	2
M	11	1302,714	1300,606	0,16181602	176,03764	0	0	1
PROMEDIO % ERROR				0,64302845	PROMEDIO % ERROR		0,57409055	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo a, generados mediante la técnica LIFT en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF para el péptido Sustancia P (RPKPQQFFGLM), revela una concordancia generalmente favorable entre las masas teóricas y experimentales para los

fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales presentan variaciones, con la mayoría de los fragmentos exhibiendo errores inferiores al 1%. Se observan desviaciones ligeramente superiores para el residuo de Prolina en la posición 2 (1.53%) y el residuo de Glutamina en la posición 5 (1.90%). El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos a detectados es de 0.64%, lo que indica una exactitud aceptable en la determinación de sus masas. No obstante, no se identificaron fragmentos correspondientes a la Prolina en la posición 4, ambas Fenilalaninas (posiciones 7 y 8) y ambas Glutaminas (posición 6). Esta cobertura incompleta limita la información secuencial obtenida a partir de los iones de tipo a.

En lo referente a los iones fragmento de tipo X, el análisis también muestra una concordancia variable entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales oscilan entre un valor menor de 0.14% para la Prolina en la posición 2 hasta un valor máximo de 4.02% para la Glutamina en la posición 5. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos X detectados es de 0.58%, lo que indica una exactitud aceptable en términos generales. Sin embargo, al igual que con los fragmentos a, se observa una cobertura secuencial incompleta, con la ausencia de fragmentos X correspondientes a la Arginina (posición 1), la Lisina (posición 3), ambas Glutaminas (posición 6), ambas Fenilalaninas (posición 7), la Leucina (posición 10) y la Metionina (posición 11) (Allen et al., 2008).

**Figura 32.**

Valores de masa-carga ( $m/z$ ) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de la sustancia p en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].

SEQ	#	b (teórico)	b (experimental)	% error	Y (teórico)	Y (experimental)	% error	#
R	1	157,10843	0	0	1348,71948	1348,198	0,03866482	11
P	2	254,1612	257	1,11692894	1192,61837	1195,776	0,26476449	10
K	3	382,25616	387	1,24101074	1095,56561	0	0	9
P	4	479,30892	486	1,39598487	967,47064	970,31	0,29348281	8
Q	5	607,3675	613	0,92736276	870,41788	873,282	0,32905114	7
Q	6	735,42608	725,378	1,36629367	742,3593	743,285	0,12469703	6
F	7	882,49449	0	0	614,30073	613,429	0,14190607	5
F	8	1029,5629	1029,11	0,04398954	467,23231	468,855	0,34729833	4
G	9	1086,58437	1088,553	0,18117599	320,1639	327,733	2,36413287	3
L	10	1199,66843	1197,862	0,15057744	263,14244	261,08	0,78377323	2
M	11	1330,70892	1331,182	0,03555098	150,05837	0	0	1
		PROMEDIO % ERROR		0,58717045	PROMEDIO % ERROR		0,42616098	

Nota. Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo b, generados mediante la técnica LIFT en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF para el péptido Sustancia P (RPKPQQFFGLM), revela una concordancia generalmente favorable entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales son mayoritariamente bajos, manteniéndose por debajo del 1.4%. Se observa la ausencia del fragmento b correspondiente al residuo de Arginina (R) en la posición 1 y a ambas Fenilalaninas (F) en las posiciones 7 y 8. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos b detectados es de 0.59%, lo que indica una exactitud aceptable en la determinación de sus masas. No obstante, la falta de cobertura para ciertos aminoácidos restringe la información secuencial obtenida a partir de los iones de tipo b.

En lo referente a los iones fragmento de tipo Y, el análisis exhibe una concordancia sobresaliente entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos identificados. Los porcentajes de error individuales son muy bajos, situándose mayoritariamente por debajo del 0.8%, con la excepción del residuo de Glicina (G) en la posición 9, que presenta un error ligeramente

superior del 2.36%. Sin embargo, no se detectaron fragmentos Y correspondientes al residuo de Lisina (K) en la posición 3 y al residuo de Metionina (M) en la posición 11. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos Y detectados es de 0.43%, lo que indica una alta exactitud en la determinación de sus masas. A pesar de la elevada exactitud, la ausencia de ciertos fragmentos Y también limita la cobertura secuencial (Harrison, 2008).

### Figura 33.

*Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos c y Z de la sustancia p en análisis LIFT, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	c (teórico)	c ( experimental)	% error	Z (teórico)	Z (experimental)	% error	#
R	1	174,13498	0	0	1331,69403	1331,446	0,01862515	11
P	2	271,18774	275,252	1,49868869	1175,59292	1173,592	0,17020518	10
K	3	382,28271	387,331	1,32056456	1078,54015	1073,271	0,48854463	9
P	4	496,33547	490,413	1,19323932	950,44519	958,441	0,84126997	8
Q	5	624,39405	626,97	0,41255198	853,39243	847,314	0,71226669	7
Q	6	752,45263	743,204	1,22913119	725,33385	725,398	0,0088442	6
F	7	899,52104	891,397	0,90315175	597,27527	585,389	1,9900824	5
F	8	1046,58945	1050,222	0,34708452	450,20686	461,81	2,5772908	4
G	9	1103,61092	1104,199	0,0532869	303,13845	0	0	3
L	10	1216,69498	1219,168	0,20325719	246,11698	241,033	2,06567625	2
M	11	0	0	0	133,03292	131,189	1,38606294	1
		PROMEDIO % ERROR		0,65099601	PROMEDIO % ERROR		0,93262438	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo c, generados mediante la técnica LIFT en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF para el péptido Sustancia P (RPKPQQFFGLM), revela una concordancia generalmente favorable entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales son mayoritariamente bajos, manteniéndose por debajo del 1.5%, con la excepción del residuo de Prolina en la posición 2 (1.50%) y el residuo de Lisina en la posición 3 (1.32%). No obstante, no se identificaron fragmentos c correspondientes al residuo de Arginina (R) en la posición 1 y al residuo de Metionina (M) en la posición 11, lo que restringe la cobertura de la secuencia obtenida a partir de estos iones. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos c detectados es de 0.66%, lo que indica una exactitud aceptable en la determinación de sus masas.

En lo referente a los iones fragmento de tipo z, el análisis exhibe una concordancia variable entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos identificados. Los porcentajes de error individuales oscilan entre un valor menor de 0.02% para el residuo de Arginina (R) hasta un valor máximo de 2.58% para el residuo de Fenilalanina en la posición 8. Además, no se detectaron fragmentos z correspondientes al residuo de Glicina (G) en la posición 9 y al residuo de Metionina (M) en la posición 11. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos z detectados es de 0.93%, lo que indica una exactitud razonable en términos generales, aunque con desviaciones más significativas para algunos aminoácidos (Paizs & Suhai, 2005b).

**Figura 34.**

*Cuantificación de Fragmentos de Sustancia P Obtenidos por MALDI-TOF/TOF con Detección LIFT [Tabla].*

Fragmentos de Sus P en LIFT	
Fragmentos	Porcentaje
a	73%
b	82%
c	82%
X	46%
Y	82%
Z	91%

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

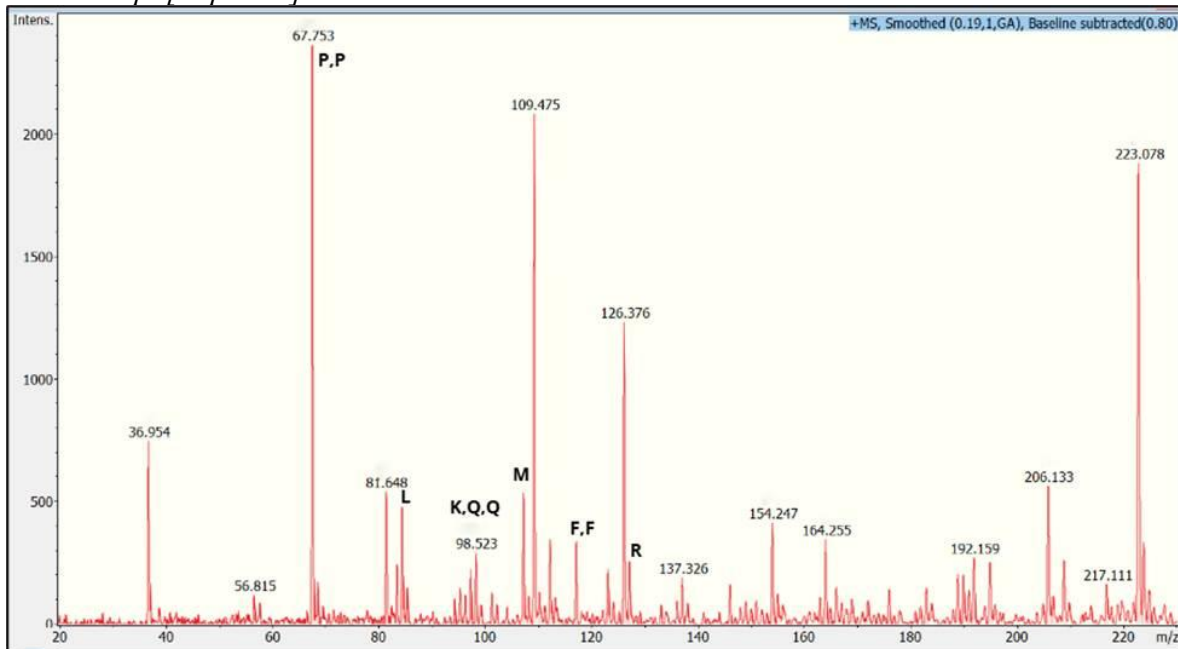
La Figura 34, que presenta la cuantificación de los fragmentos de Sustancia P obtenidos mediante MALDI-TOF/TOF en modo LIFT, revela una fragmentación robusta, aunque con porcentajes de recuperación variables para cada ion fragmento. A pesar de estas variaciones, es importante destacar que la eficiencia general de fragmentación fue considerablemente alta, con la mayoría de los fragmentos esperados detectados en proporciones significativas. Particularmente, los fragmentos 'b', 'c' e 'Y' fueron los más prominentes, con un porcentaje de recuperación del 82% cada uno, seguidos de cerca por el fragmento 'Z' que alcanzó un 91%. Estos resultados demuestran

la efectividad de la técnica LIFT para inducir la disociación de la Sustancia P y generar una serie de iones de producto informativos.

### 5.10. ANÁLISIS DE FRAGMENTACIÓN DE LA SUSTANCIA P MEDIANTE MALDI-TOF/TOF-CID

#### Figura 35.

Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la composición de aminoácidos de la sustancia p. [Espectro].



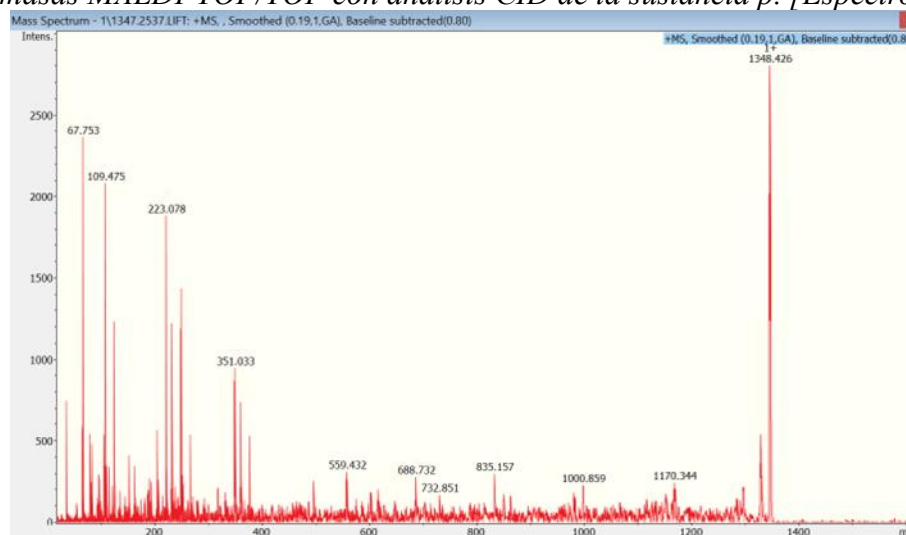
Nota. Elaborado por el autor (2025).

El espectro de masas adquirido mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF revela la composición aminoacídica de una secuencia que incluye señales iónicas correspondientes a los iones imonio de prolina (P) en  $m/z$  67.753, lisina (K) y glutamina (Q) en  $m/z$  98.523 (posible coelución o isobaras), leucina (L) en  $m/z$  81.648, fenilalanina (F) en  $m/z$  126.376, arginina (R) en  $m/z$  137.326 y metionina (M) en  $m/z$  109.475. La detección de estos iones imonio específicos, en conjunto con otras señales iónicas presentes en la región de  $m/z$  inferior a 223, fortalece la posible identificación de la secuencia peptídica observada como constituyente de la Sustancia P (RPKPQQFFGLM). Sin embargo, se

requeriría un análisis de fragmentación más exhaustivo, incluyendo la interpretación de iones de la serie b y y, así como la comparación con bases de datos de secuencias peptídicas, para la confirmación inequívoca de la secuencia completa y la diferenciación entre aminoácidos isobáricos como la lisina y la glutamina, resaltando la utilidad de la técnica CID en MALDI-TOF/TOF para la elucidación de la composición y, potencialmente, la secuencia de péptidos a través de la identificación de sus aminoácidos constituyentes (Harrison et al., 2006).

**Figura 36.**

*Espectro de masas MALDI-TOF/TOF con análisis CID de la sustancia p. [Espectro].*



*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

**Figura 37.**

*Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos a y X de la sustancia p en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error. Autor [Tabla].*

SEQ	#	a (teórico)	a (experimental)	% error	X (teórico)	X (experimental)	% error	#
R	1	129,11352	126,414	2,09081125	0	0	0	11
P	2	226,16628	223,107	1,35266849	1218,59763	1218,151	0,03665115	10
K	3	354,26124	351,064	0,90250912	1121,54487	1127,557	0,53605791	9
P	4	451,31401	460,234	1,97644873	993,44991	0	0	8
Q	5	579,37258	576,504	0,49511836	896,39714	0	0	7
Q	6	707,43116	0	0	768,33857	0	0	6
F	7	854,49958	852,159	0,27391236	640,27999	647,515	1,12997597	5
F	8	1001,56799	1000,436	0,11302178	493,21158	498,206	1,01263235	4
G	9	1058,58945	1057,635	0,09016243	346,14316	351,033	1,41266405	3
L	10	1171,67352	1171,612	0,00525061	289,1217	296,874	2,68132762	2
M	11	1302,714	1301,277	0,11030817	176,03764	0	0	1
				PROMEDIO % ERROR	0,67365557	PROMEDIO % ERROR	0,6190281	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo a, generados mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF para el péptido Sustancia P (RPKPQQFFGLM), revela una concordancia generalmente favorable entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales son mayoritariamente bajos, manteniéndose por debajo del 2.1%. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos a detectados es de 0.67%, lo que indica una exactitud aceptable en la determinación de sus masas. No obstante, no se identificaron fragmentos a correspondientes a la Prolina en la posición 4 y a ambas Glutaminas (posiciones 5 y 6), lo que restringe la cobertura de la secuencia obtenida a partir de los iones de tipo a.

En lo referente a los iones fragmento de tipo X, el análisis también muestra una concordancia variable entre las masas teóricas y experimentales para los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales oscilan entre un valor menor de 0.04% para la Prolina en la posición 2 hasta un valor máximo de 2.68% para el residuo de Leucina (L) en la posición 10. Adicionalmente, no se detectaron fragmentos X correspondientes al residuo de Arginina (R) en la posición 1, al residuo de Lisina (K) en la posición 3, a ambas Glutaminas (posiciones 5 y 6) y al residuo de Metionina (M) en la posición 11. El valor promedio del porcentaje de error para el conjunto de los fragmentos X detectados es de 0.62%, lo que indica una exactitud aceptable en términos generales. Sin embargo, al igual que con los fragmentos a, se observa una cobertura secuencial incompleta, lo que dificulta la elucidación completa de la secuencia peptídica basándose únicamente en estos iones (Polfer et al., 2005a).

**Figura 38.**

Valores de masa-carga ( $m/z$ ) teóricos y experimentales de fragmentos b e Y de la sustancia p en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].

SEQ	#	b (teórico)	b ( experimental)	% error	Y (teórico)	Y (experimental)	% error	#
R	1	139,10843	137,327	1,28060535	1048,71948	0	0	11
P	2	254,1612	0	0	1192,61837	0	0	10
K	3	382,25616	379,12	0,82043413	1095,56561	0	0	9
P	4	479,30892	0	0	967,47064	0	0	8
Q	5	607,3675	0	0	870,41788	0	0	7
Q	6	735,42608	733,949	0,20084683	742,3593	0	0	6
F	7	882,49449	0	0	614,30073	615,528	0,19978326	5
F	8	1029,5629	0	0	467,23231	0	0	4
G	9	1086,58437	0	0	320,1639	320,018	0,04557041	3
L	10	1199,66843	0	0	263,14244	268,104	1,88550353	2
M	11	1330,70892	1331,312	0,0453202	150,05837	154,271	0	1
		PROMEDIO % ERROR		0,21338241	PROMEDIO % ERROR		0,19371429	

Nota. Elaborado por el autor (2025).

El análisis de los iones fragmento de tipo b, generados mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF para el péptido Sustancia P (RPKPQQFFGLM), revela una concordancia generalmente favorable para los escasos fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales para los fragmentos b correspondientes a Arginina (R) y Glutamina (Q) son bajos, con valores de 1.28% y 0.20% respectivamente. El fragmento b correspondiente a Metionina (M) presenta un error aún menor del 0.05%. Sin embargo, se observa una cobertura secuencial muy limitada, con la ausencia de fragmentos b correspondientes a la Prolina (P) en las posiciones 2 y 4, la Lisina (K), ambas Fenilalaninas (F), la Glicina (G) y la Leucina (L). El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos b detectados es de 0.21%, lo que sugiere una alta exactitud en la determinación de sus masas donde se logró la detección. No obstante, la reducida cantidad de información secuencial obtenida a partir de los iones de tipo b constituye una limitación importante.

En lo referente a los iones fragmento de tipo Y, el análisis también muestra una concordancia generalmente favorable para los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales son bajos, con valores de 0.04% para la Glicina (G), 0.20% para la Fenilalanina (F) y

1.89% para la Leucina (L). El fragmento Y correspondiente a Metionina (M) presenta un error del 0.19%. Sin embargo, al igual que con los fragmentos b, se observa una cobertura secuencial limitada, con la ausencia de fragmentos Y correspondientes a la Arginina (R), la Prolina (P) en las posiciones 2 y 4, la Lisina (K) y ambas Glutaminas (Q). El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos Y detectados es de 0.19%, lo que indica una alta exactitud en la determinación de sus masas donde se logró la detección. No obstante, la falta de cobertura secuencial sigue siendo una limitación significativa (Liu et al., 2015).

### Figura 39.

*Valores de masa-carga (m/z) teóricos y experimentales de fragmentos c y z de la sustancia P en análisis CID, con cálculo del porcentaje de error [Tabla].*

SEQ	#	c (teórico)	c ( experimental)	% error	Z (teórico)	Z (experimental)	% error	#
R	1	174,13498	0	0	1331,69403	1331,312	0,02868752	11
P	2	271,18774	268,104	1,13712368	1175,59292	1171,612	0,33863082	10
K	3	399,28271	401,055	0,44386846	1078,54015	0	0	9
P	4	496,33547	498,206	0,37686809	950,44519	0	0	8
Q	5	624,39405	0	0	853, 39243	0	0	7
Q	6	752,45263	0	0	725,33385	0	0	6
F	7	899,52104	0	0	597,27527	0	0	5
F	8	1046,58945	0	0	450,20686	460,234	2,2272295	4
G	9	1103,61092	0	0	303,13845	0	0	3
L	10	1216,69498	1218,151	0,11967009	246,11698	251,091	2,02099831	2
M	11	0	0	0	133,03292	0	0	1
PROMEDIO % ERROR				0,18886639	PROMEDIO % ERROR		0,4195951	

*Nota.* Elaborado por el autor (2025). Los valores en 0 fueron datos que no se encontraron.

El análisis de los iones fragmento de tipo c, generados mediante la técnica de disociación inducida por colisión (CID) en el espectrómetro MALDI-TOF/TOF para el péptido Sustancia P (RPKPQQFFGLM), revela una concordancia sobresaliente para los escasos fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales para los fragmentos c correspondientes a Prolina (P) y Leucina (L) son bajos, con valores de 1.14% y 0.12% respectivamente. Sin embargo, se observa una cobertura secuencial muy limitada, con la ausencia de fragmentos c correspondientes a los residuos de Arginina (R), Lisina (K), ambas Glutaminas (Q), ambas Fenilalaninas (F), Glicina (G) y Metionina (M). El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos c detectados

es de 0.19%, lo que sugiere una alta exactitud en la determinación de sus masas donde se logró la detección. No obstante, la reducida cantidad de información secuencial obtenida a partir de los iones de tipo c constituye una limitación importante (Vachet et al., 1997).

En lo referente a los iones fragmento de tipo z, el análisis también muestra una concordancia generalmente favorable para los fragmentos detectados. Los porcentajes de error individuales son bajos, con valores de 0.03% para la Arginina (R) y 2.02% para la Leucina (L). El fragmento z correspondiente a Fenilalanina (F) presenta un error del 2.23%. Sin embargo, al igual que con los fragmentos c, se observa una cobertura secuencial limitada, con la ausencia de fragmentos z correspondientes a los residuos de Lisina (K), ambas Prolinas (P), ambas Glutaminas (Q), Glicina (G) y Metionina (M). El valor promedio del porcentaje de error para los fragmentos z detectados es de 0.42%, lo que indica una exactitud razonable en la determinación de sus masas donde se logró la detección. No obstante, la falta de cobertura secuencial sigue siendo una limitación significativa.

**Figura 40.**

*Cuantificación de Fragmentos de Sustancia P Obtenidos por MALDI-TOF/TOF con Disociación Inducida por Colisión (CID) [Tabla].*

Fragmentos de Sus P en CID	
Fragmentos	Porcentaje
a	91%
b	37%
c	37%
X	56%
Y	37%
Z	37%

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

Los resultados presentados en la Figura 40 ilustran la eficiencia de detección de los fragmentos generados a partir de la Sustancia P mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, empleando la técnica CID. En contraste con los resultados obtenidos por LIFT para la

misma Sustancia P, se observa una marcada diferencia en los porcentajes de recuperación para la mayoría de los fragmentos.

El fragmento 'a' fue el más abundantemente detectado, con un 91% de recuperación, indicando una notable estabilidad de este fragmento o una alta eficiencia de su formación bajo las condiciones de CID. Sin embargo, los fragmentos 'b', 'c', 'Y' y 'Z' mostraron una recuperación considerablemente menor, todos con un 37%. El fragmento 'X' se recuperó en un 56%, siendo el segundo más abundante.

**Tabla 7.**

*Comparación de la Eficiencia de Fragmentación de Angiotensina II y Sustancia P en MALDI-TOF/TOF mediante CID y LIFT.*

Fragmento	Angiotensina II (LIFT)	Angiotensina II (CID)	Sustancia P (LIFT)	Sustancia P (CID)
<b>a</b>	100%	100%	73%	91%
<b>b</b>	100%	100%	82%	37%
<b>c</b>	100%	75%	82%	37%
<b>X</b>	100%	38%	46%	56%
<b>Y</b>	100%	75%	82%	37%
<b>Z</b>	100%	63%	91%	37%

*Nota.* Elaborado por el autor (2025).

La técnica LIFT mostró una mayor eficiencia en la fragmentación para la Angiotensina II, logrando una cobertura de fragmentos completa y uniforme. Para la Sustancia P, si bien LIFT generó un espectro de fragmentos más diverso y con mayores porcentajes de recuperación para la mayoría de los iones (excluyendo el fragmento 'a'), la CID fue inesperadamente superior para el fragmento 'a'. No obstante, si el objetivo es obtener la mayor cantidad de información de secuencia posible a través de la cantidad de fragmentos, LIFT se perfila como la técnica más eficiente para

ambos péptidos en general, ya que produce un conjunto de iones de producto más amplio y con porcentajes de recuperación más altos en la mayoría de los casos.

## 6. CONCLUSIONES

Se establecieron las mejores condiciones experimentales para CID y LIFT en MALDI TOF/TOF (ganancia del detector, láser, pulso de extracción y 'Lens'), maximizando la eficiencia de ionización y fragmentación de péptidos.

La fragmentación predominantemente generó iones b e y. LIFT demostró ser la técnica más eficiente en la producción de estos iones de secuencia, facilitando la interpretación estructural. LIFT mostró mayores ventajas por su mayor cantidad y claridad de señales, además de ser una técnica integrada y económica. CID presentó limitaciones por el costo del gas Argón y menor abundancia de fragmentos.

la técnica LIFT exhibió una eficiencia de fragmentación notablemente superior y más consistente en comparación con la CID para la caracterización de ambos péptidos. Con una eficiencia promedio general del 88.08% frente al 62.17% de CID, LIFT demostró ser la técnica de elección para la obtención de espectros de fragmentos más completos y abundantes, lo cual es fundamental para una identificación de péptidos en espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

LIFT superó a CID en la generación de fragmentos, ofreciendo una mayor robustez en la secuenciación. Su naturaleza "libre de gas" y preinstalación lo posicionan como el método más eficiente y costo-efectivo para la fragmentación de péptidos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 123RF. (n.d.). *Estructura química de una molécula de la angiotensina II (AII) péptido, una hormona peptídica que tiene un número de efectos fisiológicos y juega un papel en la regulación de la presión arterial*. 123RF. Recuperado el 27 de marzo de 2024, de [https://es.123rf.com/photo\\_16083431\\_estructura-qu%C3%ADmica-de-una-mol%C3%A9cula-de-la-angiotensina-ii-aii-p%C3%A9ptido-una-hormona-pept%C3%ADdica-que.html](https://es.123rf.com/photo_16083431_estructura-qu%C3%ADmica-de-una-mol%C3%A9cula-de-la-angiotensina-ii-aii-p%C3%A9ptido-una-hormona-pept%C3%ADdica-que.html).
- Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteomica* <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/9144>
- Allen, J. M., Racine, A. H., Berman, A. M., Johnson, J. S., Bythell, B. J., Paizs, B., & Glish, G. L. (2008). Why Are a<sub>3</sub> Ions Rarely Observed? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(11), 1764–1770.
- Ambihapathy, K., Yalcin, T., Leung, H.-W., & Harrison, A. G. (1997). Pathways to immonium ions in the fragmentation of protonated peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(2), 209–215.
- Anbalagan, V., Silva, A. T. M., Rajagopalachary, S., Bulleigh, K., Talaty, E. R., & Van Stipdonk, M. J. (2004). [No title provided]. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(4), 495.
- Bakker, J. M., Besson, T., Lemaire, J., Scuderi, D., & Maitre, P. (2007). Gas-phase structure of a  $\pi$ -allyl-palladium complex: Efficient infrared spectroscopy in a 7 T fourier transform mass spectrometer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(51), 13415–13424.
- Baumgaertel, A., Becer, C. R., Gottschaldt, M., & Schubert, U. S. (2008). MALDI-TOF MS coupled with collision-induced dissociation (CID) measurements of poly(methyl methacrylate). *Macromolecular Rapid Communications*, 29(15), 1309 - 1315. <https://doi.org/10.1002/marc.200800150>

- Boyd, R., & Somogyi, Á. (2010). The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: A perspective. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(8), 1275–1278.
- Brodbelt, J. S. (2016). Ion activation methods for peptides and proteins. *Analytical Chemistry*, 88(1), 30–51. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04563>
- Bruker Daltonics, Inc. (2011). Diagrama del sistema ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF [Diagrama]. *FLEXTM Series Training Manual for MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Recuperado de [www.bdal.com](http://www.bdal.com)
- Bythell, B. J., & Harrison, A. G. (2015). Formation of a(1) ions directly from oxazolone b(2) ions: an energy-resolved and computational study. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(5), 774–781. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1080-7>
- Bythell, B. J., Csonka, I. P., Suhai, S., Barofsky, D. F., & Paizs, B. (2010a). Gas-phase structure and fragmentation pathways of singly-protonated peptides with N-terminal arginine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(47), 15092–15105.
- Bythell, B. J., Maitre, P., & Paizs, B. (2010b). Cyclization and rearrangement reactions of an fragment ions of protonated peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 132(42), 14766–14779.
- Bythell, B. J., Somogyi, Á., & Paizs, B. (2009). What is the structure of b2 ions generated from doubly protonated tryptic peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(4), 618–624.
- Carey, R. M., & Siragy, H. M. (2003). Newly recognized components of the renin angiotensin system: potential role of cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews*, 24(3), 261–271.
- Chen, X. A., Steill, J. D., Oomens, J., & Polfer, N. C. (2010). Oxazolone versus macrocycle structures for Leu-Enkephalin b2-b4: Insights from infrared multiple-photon dissociation spectroscopy and gas-phase hydrogen/deuterium exchange. *Journal of the American*

*Society for Mass Spectrometry*, 21(8), 1313–1321.

Cordero, M. M.; Houser, J. J.; Wesdemiotis, C. (1993). The Neutral Products Formed during Backbone Fragmentations of Protonated Peptides in Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1993, 65(11), 1594–1601.

DeGraan-Weber, N., Ashley, D. C., Keijzer, K., Baik, M.-H., & Reilly, J. P. (2016). Factors affecting the production of aromatic immonium ions in MALDI 157 nm photodissociation studies. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(5), 834–846. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1329-1>

Department of Food Science, Aarhus University. (2015). *FOOD Peptide predictor*. Retrieved From <https://www.peptidepredictor.com/>

Dongré, P. A.; Jones, J. L.; Somogyi, Á.; Wysocki, V. H. (2009). Energetics and Amino Acid Dependence of Peptide Ion Fragmentation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(3), 469–476.

Erlekam, U., Bythell, B. J., Scuderi, D., Van Stipdonk, M., Paizs, B., & Maitre, P. (2009). Infrared spectroscopy of fragments of protonated peptides: Direct evidence for macrocyclic structures of b5 ions. *Journal of the American Chemical Society*, 131(32), 11503–11508.

Farrugia, J. M., O’Hair, R. A. J., & Reid, G. A. (2001). Do All b2 Ions Have Oxazolone Structures? Multistage Mass Spectrometry and Ab Initio Studies on Protonated N-Acyl Amino Acid Methyl Ester Model Systems. *International Journal of Mass Spectrometry*, 210-211, 71–87.

Freeman, T. C., Jr. (2015). *PEPdraw*. Retrieved from <https://pepdraw.com/>

Godugu, B., Neta, P., Simón-Manso, Y., & Stein, S. E. (2010). Effect of N-terminal glutamic acid and glutamine on fragmentation of peptide ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(7), 1169–1176. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.03.027>

Good, D. M., Yang, H., & Zubarev, R. A. (2013). N-terminal peptide sequence repetition

- influences the kinetics of backbone fragmentation: a manifestation of the Jahn-Teller effect? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(11), 1671–1675. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0628-7>
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer Berlin Heidelberg.
- Gucinski, A. C., Chamot-Rooke, J., Steinmetz, V., Somogyi, Á., & Wysocki, V. H. (2013). Influence of N-terminal residue composition on the structure of proline-containing b<sub>2</sub><sup>+</sup> ions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(6), 1291–1298.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2021). *Tratado de fisiología médica* (14.<sup>a</sup> ed.). Elsevier.
- Harrison, A. G. (2008). Peptide Sequence Scrambling Through Cyclization of b<sub>5</sub> Ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(11), 1776–1780.
- Harrison, A. G. (2009). Cyclization of peptide b<sub>9</sub> ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(12), 2248–2253. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.08.013>
- Harrison, A. G. (2012). Fragmentation reactions of b<sub>5</sub> and a<sub>5</sub> ions containing proline - The structures of a<sub>5</sub> ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 23(4), 594–601.
- Harrison, A. G., & Yalcin, T. (1997). Proton mobility in protonated amino acids and peptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, 165/166, 339–347.
- Harrison, A. G., Csizmadia, I. G., & Tang, T. H. (2000a). Structures and Fragmentation of b<sub>2</sub> Ions in Peptide Mass Spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(5), 427–436.
- Harrison, A. G., Csizmadia, I. G., & Tang, T.-H. (2000b). Structure and Fragmentation of b<sub>2</sub> Ions in Peptide Mass Spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(5), 427–436.
- Harrison, A. G., Young, A. B., Bleiholder, C., Suhai, S., & Paizs, B. (2006). Scrambling of Sequence Information in Collision-Induced Dissociation of Peptides. *Journal of the*

- American Chemical Society*, 128(32), 10364–10365.
- Harrison, A. G., Young, A. B., Schnoelzer, M., & Paizs, B. (2004). Formation of iminium ions by fragmentation of a2 ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(14), 1635–1640.
- Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T.(1991). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Analytical Chemistry*. (1991), 63(24), 1193A–1203A.
- Höckfelt, T., Pernow, B., & Wahren, J. (2001). Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *Journal of Internal Medicine*, 249(1), 27–40. <https://doi.org/10.1046/j.0954-6820.2000.00773.x>
- Holle, A., Haase, A., Kayser, M., & Höhdorf, J. (2006). *Journal of Mass Spectrometry*, 41(6), 705-716.
- Holmes, J. L. (1985). Assigning structures to ions in the gas phase. *Organic Mass Spectrometry*, 20(3), 169–183. <https://doi.org/10.1002/oms.1210200302>
- Hoofnagle, A. N. (2010). Peptide lost and found: Internal standards and the mass spectrometric quantification of peptides. *Clinical Chemistry*, 56(10), 1515–1517. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.152181>
- Hoteling, A. J., & Owens, K. G. (2004). Improved PSD and CID on a MALDI TOFMS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(4), 523–535. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.12.004>
- Hunt, D. F.; Yates, J. R.; Shabanowitz, J.; Winston, S.; Hauer, C. R.(1986). Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(17), 6233–6237.
- Lammert, S. A., & Cooks, R. G. (1991). Surface-induced dissociation of molecular ions in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass*

- Spectrometry*, 2(6), 487–491. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(91\)80036-7](https://doi.org/10.1016/1044-0305(91)80036-7)
- Laskin, J., Yang, Z., Lam, C., & Chu, I. K. (2007). Charge-remote fragmentation of odd-electron peptide ions. *Analytical Chemistry*, 79(17), 6607–6614.
- Li, H., & Yuan, G. (2006). Electrospray ionization mass spectral characteristics and fragmentation mechanisms of Angiotensin II and its analogues. *International Journal of Mass Spectrometry*, 252(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2006.02.016>
- Liu, P., Cooks, R. G., & Chen, H. (2015). Structure elucidation of peptide b<sub>2</sub> ions. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(5), 1547–1550.
- Loo, J. A., Edmonds, C. G., & Smith, R. D. (1993). [No title provided]. *Analytical Chemistry*, 65(3), 425.
- McLafferty, F. W., Bente, P. F., Kornfeld, R., Tsai, S.-C., & Howe, I. (1973). Metastable ion characteristics. XXII. Collisional activation spectra of organic ions. *Journal of the American Chemical Society*, 95(7), 2120–2129. <https://doi.org/10.1021/ja00788a007>
- Medzihradszky, K. F. (2005). Peptide Sequence Analysis. *Methods in Enzymology*, 402, 209–244.
- Nakaya, Y., Kaneko, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1994). Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 347(2), 249–274. <https://doi.org/10.1002/cne.903470208>
- Nelson, C. R., Abutokaikah, M. T., Harrison, A. G., & Bythell, B. J. (2016). Proton mobility in b<sub>2</sub> ion formation and fragmentation reactions of histidine-containing peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(3), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1298-4>
- Neta, P.; Pu, Q. L.; Yang, X.; Stein, S. E. (2007). Consecutive Neutral Losses of H<sub>2</sub>O and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O from N-terminal Thr-Thr and Thr-Ser in Collision-Induced Dissociation of Protonated Peptides. Position-Dependent Water Loss from Single Thr or Ser. *International Journal of*

- Mass Spectrometry*, 267, 295–301.
- Paizs, B., & Suhai, S. (2005a). Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4), 508–548.
- Paizs, B., & Suhai, S. (2005b). Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4), 508–548.
- Papp, M., Vassout, A., & Gentsch, C. (2000). The NK1-receptor antagonist NKP608 has an antidepressant-like effect in the chronic mild stress model of depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 115(1), 19–23. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00230-8](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00230-8)
- Polfer, N. C., Oomens, J., Suhai, S., & Paizs, B. (2005a). Spectroscopic and theoretical evidence for oxazolone ring formation in collision-induced dissociation of peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 127(49), 17154–17155.
- Polfer, N. C.; Oomens, J.; Suhai, S.; Paizs, B. (2005b) Spectroscopic and theoretical evidence for oxazolone ring formation in collision-induced dissociation of peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, 127(49), 17154–17155.
- Poutsma, J. C.; Martens, J.; Oomens, J.; Maitre, P.; Steinmetz, V.; Bernier, M.; Jia, M.; Wysocki, V. (2017) Infrared Multiple-Photon Dissociation Action Spectroscopy of the b<sub>2</sub><sup>+</sup> Ion from PPG: Evidence of Third Residue Affecting b<sub>2</sub><sup>+</sup> Fragment Structure. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 28(7), 1482–1488.
- Roepstorff, P.; Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*. 1984, 11(11), 601.
- Rupniak, N. M. J., Carlson, E. C., Harrison, T., Oates, B., Seward, E., Owen, S., de Felipe, C., Hunt, S., & Wheeldon, A. (2000). Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology*, 39(8), 1413–1421. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00052-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00052-6)

- Savitski, M. M., Fälth, M., Fung, Y. M. E., Adams, C. M., & Zubarev, R. A. (2008). Bifurcating Fragmentation Behavior of Gas-Phase Tryptic Peptide Dications in Collisional Activation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(11), 1755–1763.
- Sinha, R. K., Erlekam, U., Bythell, B. J., Paizs, B., & Maître, P. (2011). Diagnosing the protonation site of b2 peptide fragment ions using IRMPD in the X-H (X = O, N, and C) stretching region. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(9), 1645–1650. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0173-1>
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., & Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and BioAnalytical Chemistry*, 376(7), 952–965. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2057-0>
- Tang, X. J., Thibault, P., & Boyd, R. K. (1993). Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass-spectrometry with low-energy collision-induced dissociation. *Analytical Chemistry*, 65(20), 2824–2834.
- Tasoglu, C., Arslanoglu, A., & Yalcin, T. (2023). Gas phase fragmentation behavior of proline in macrocyclic b7 ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 34(8), 1576–1583. <https://doi.org/10.1021/jasms.3c00049>
- Thermo Scientific Chemicals Angiotensin II (human). (n.d.). *Fishersci.es*. Retrieved March 27, 2024, from <https://www.fishersci.es/shop/products/angiotensin-ii-human/15423569>.
- Timberlake, K. (2013). *Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida*. Pearson Educación.
- Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, Una alternativa DE tratamiento DE origen natural: Una revisión antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: A review. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 158–168. <https://doi.org/10.1080/11358120809487641>
- Vachet, R. W., Bishop, B. M., Erickson, B. W., & Glish, G. L. (1997). Novel peptide dissociation:

- gas-phase intramolecular rearrangement of internal amino acid residues. *Journal of the American Chemical Society*, 119(23), 5481–5488.
- Vallejo Ardila, D. L., Tamayo Cáceres, Y. R., & Munive, A. A. (2020). Uso terapéutico de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en pacientes con COVID-19: las «dos caras de la moneda». *Revista colombiana de cardiología*, 27(4), 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2020.07.001>
- Verkerk, U. H., Siu, C.-K., Steill, J. D., El Aribi, H., Zhao, J., Rodriquez, C. F., Oomens, J., Hopkinson, A. C., & Siu, K. W. M. (2010).  $\alpha 2$  Ion derived from triglycine: An N1-protonated 4-imidazolidinone. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1(5), 868–872.
- Wells, J. M., & McLuckey, S. A. (2005). Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in Enzymology*, 402, 148–185.
- Yalcin, T., Khouw, C., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., & Harrison, A. G. (1995). Why Are B Ions Stable Species in Peptide Spectra? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6(12), 1169-1177.
- Yan, D., Chen, D., Shen, J., Xiao, G., van Wijnen, A. J., & Im, H.-J. (2013). Bovine lactoferricin is anti-inflammatory and anti-catabolic in human articular cartilage and synovium. *Journal of Cellular Physiology*, 228(2), 447-456. <https://doi.org/10.1002/jcp.24151>
- Yeh, L. I., Okumura, M., Myers, J. D., Price, J. M., & Lee, Y. T. (1989). Vibrational spectroscopy of the hydrated hydronium cluster ions  $H_3O^+(H_2O)_n$  ( $n=1, 2, 3$ ). *The Journal of Chemical Physics*, 91(12), 7319–7330.
- Yu, W., Vath, J. E., Huberty, M. C., & Martin, S. A. (1993). Identification of the facile gas-phase cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx peptide bonds in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 65(21), 3015–3023.
- Yurkanis Bruice, P. (2008). *Química orgánica*. Pearson Educación.
- Zhang, L., & Reilly, J. P. (2009). Peptide photodissociation with 157 nm light in a commercial

tandem time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 81(18), 7829–7838.

Zhang, L., & Reilly, J. P. (2010). De Novo sequencing of tryptic peptides derived from *Deinococcus radiodurans* ribosomal proteins using 157 nm photodissociation MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 9(6), 3025–3034.