

SÍNTESIS DE MATRICES MALDI BASADAS EN UN NÚCLEO DE  
TRIFENILAMINA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS LÁBILES Y  
TERMOINESTABLES

Anderson Rodriguez Mantilla

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

SÍNTESIS DE MATRICES MALDI BASADAS EN UN NÚCLEO DE  
TRIFENILAMINA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS LÁBILES Y  
TERMOINESTABLES

Anderson Rodriguez Mantilla

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Julio Roberto Pinzón Joya

Química, Ph.D

Codirector

Luis Miguel Díaz Sánchez, Químico, M.Sc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

### **Dedicatoria**

En homenaje a mi padre Carlos Julio Rodriguez a quien le debo todo y a mi madre Stella María Mantilla Arias a quien le debo aún más, a mi novia y mis hermanos Steven, Letty y Betty.

### **Agradecimientos**

Primero que todo agradezco a mis padres por el tiempo y la dedicación que tuvieron en mi crianza, agradezco a mis hermanas Letty, Betty y a mi hermano Steven, pues han sido un gran apoyo incondicional en momentos de zozobra, agradezco a mi novia también por todo su amor, aliento y enfoque lo que me ha sabido reconfortar y centrar, agradezco a todos mis amigos, por las experiencias vividas y la construcción que hemos tenido, a mis colegas del laboratorio del Grupo de Investigación en Físicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX) y a los que han participado de este proyecto por medio de la colaboración con el Grupo de Investigación “Modelamiento Molecular y Simulación Computacional – *In Silico*” de la Universidad de Sucre, agradezco a mis profesores, tutores, y, por último, pero no menos importante agradezco a la Universidad Industrial de Santander por haber prestado las instalaciones para el desarrollo y terminación de este proyecto de investigación.

## Tabla de Contenido

Lista de tablas .....	7
Lista de figuras .....	8
Lista de anexos .....	10
Abreviaturas y acrónimos .....	13
Introducción.....	17
1. Planteamiento del problema .....	19
2. Justificación .....	21
3. Hipótesis .....	23
4. Objetivos.....	24
4.1. Objetivo general .....	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
5. Marco teórico.....	24
5.1. Espectrometría de Masas.....	24
5.1.1. <i>Ionización/Desorción Láser Asistida por una Matriz</i> .....	25
5.2. Sistemas donador-aceptor .....	34
5.3. Trifenilamina.....	35
5.4. Métodos computacionales para la selección de moléculas derivadas de TFA como candidatas a matrices MALDI-ET .....	36
5.5. Antecedentes .....	38

6. Metodología.....	40
6.2. Caracterización espectroscópica de los productos sintetizados .....	41
6.3. Evaluación de la efectividad de las nuevas matrices basadas en un núcleo de trifenilamina mediante LDI.....	42
7. Resultados y Discusión.....	44
7.1. Cálculos teóricos .....	44
7.2. Síntesis de <i>p</i> -(difenilamino)benzaldehído .....	45
7.3. Síntesis de <i>N, N</i> -difenil-4-[(4-alkilfenil) imino]bencenamina .....	46
7.4. Espectroscopia UV-Vis .....	48
7.5. Espectroscopia UV de reflectancia difusa.....	52
7.6. LDI-MS.....	58
7.6.1. <i>Parámetros dependientes de la energía de la fuente</i> .....	63
7.6.2. <i>Experimentos de protonación y cationización de los derivados de TFA</i> .....	66
8. Conclusiones.....	68
9. Divulgación de resultados .....	70
Bibliografía .....	70

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1. Matrices más comunes en MALDI, con sus respectivos máximos de absorción.(Skoog et al., 2007).....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 2. Valores de <math>E_i</math> calculados con método el RHF con una función de base def2-QZVPP.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 3. Etiqueta del derivado entre la TFA y la amina correspondiente.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 4. Comparación cuantitativa de UV-Vis y UV de reflectancia para las moléculas bajo estudio. ....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 5. Señales observadas en el espectro de masas LDI de los derivados de TFA en modo de ionización positiva, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico. ....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 6. Comparación de los valores de la relación S/N y resolución entre los derivados de TFA. ....</b>	<b>65</b>
<b>Tabla 7. Comparativo de señales encontradas en los espectros acidificados entre los derivados de TFA.....</b>	<b>67</b>

### Lista de figuras

<b>Figura 1. Ilustración de la formación de iones de la matriz (Pooling) y la ionización secundaria (transferencia electrónica).....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 2. Estructuras moleculares de compuestos utilizados como matrices MALDI. 1. <math>\alpha</math>-CHCA, 2. DHB, 3. 3-HPA, 4. DCTB, 5. SA. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 3. Cantidad de publicaciones relacionadas con MALDI de transferencia electrónica en el periodo 2000-2022. Fecha de búsqueda 13/09/2022. Fuente Scopus (Elsevier).....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4. Cristales de (a) TFA-COH y (b) TFA-BCA-OCH<sub>3</sub>. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 5. Cromatograma HPLC comparativo de los derivados de TFA, usando una columna C18 (4,6 x 150 mm, 5 <math>\mu</math>m) como fase estacionaria, metanol como fase móvil y un detector UV con <math>\lambda = 254</math> nm. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 6. Espectros de absorción UV-Vis de TFA-COH, TFA-BCA, TFA-BCACH<sub>3</sub> y TFA-BCAOCH<sub>3</sub> a una concentración de 20<math>\mu</math>M en THF.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 7. Absortividad molar de los derivados de TFA a la <math>\lambda = 355</math>nm.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 8. Espectros de UV de Reflectancia Difusa de los derivados de TFA.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 9. Representación simplificada de la banda de transición: A. Banda de transición directa prohibida de un fotón con energía <math>E_g</math>, B. Transición permitida y C. Banda de transición indirecta (López &amp; Gómez, 2012). ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 10. Representación gráfica para el método de Kubelka-Munk para la molécula a) TFA-COH, b) TFA-BCA. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 11. Representación gráfica para el método de Kubelka-Munk para el derivado a) TFA-BCACH<sub>3</sub>, b) TFA-BCAOCH<sub>3</sub>.....</b>	<b>58</b>

<b>Figura 12. a) Comparación de espectros LDI de los derivados de TFA: TFA-COH (negro), TFA-BCA (rojo), TFA-BCACH3 (naranja), TFA-BCAOCH3 (amarillo ocre), espectros LDI y perfiles isotópicos experimentales de b) TFA-COH, c) TFA-BCA, d) TFA-BCACH3 y e) TFA-BCAOCH3. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 13. Patrón de fragmentación del derivado TFA-BCAOCH3. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 14. Curva de aparición de iones de los derivados de TFA. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 15. Curvas de relación S/N y resolución versus energía del láser. ....</b>	<b>66</b>

**Lista de anexos**

<b>Anexo 1. <math>^1\text{H}</math>-RMN del derivado TFA-COH. ....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 2. <math>^{13}\text{C}</math>-RMN del derivado TFA-COH. ....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo 3. Tabla con operaciones de función <math>F(R_\infty)</math> del método Kubelka-Munk para el derivado TFA-COH. ....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 4. Tabla con operaciones de función <math>F(R_\infty)</math> del método Kubelka-Munk para el derivado TFA-BCA. ....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 5. Tabla con operaciones de función <math>F(R_\infty)</math> del método Kubelka-Munk para el derivado TFA- BCACH<sub>3</sub>. ....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 6. Tabla con operaciones de función <math>F(R_\infty)</math> del método Kubelka-Munk para el derivado TFA- BCAOCH<sub>3</sub>. ....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 7. Espectro LDI de la matriz comercial DCTB. ....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 8. Espectro LDI del catión radical [TFA-COH]<sup>++</sup> vs espectro simulado (señales verdes). ....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo 9. Espectro LDI del catión radical [TFA-BCA]<sup>++</sup> vs espectro simulado (señales verdes). ....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo 10. Espectro LDI del catión radical [TFA-BCACH<sub>3</sub>]<sup>++</sup> vs espectro simulado (señales verdes). ....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 11. Espectro LDI del catión radical [TFA- BCAOCH<sub>3</sub>]<sup>++</sup> vs espectro simulado (señales verdes). ....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 12. Anexo 12. Espectro LDI del ion acidificado [TFA-COH+H]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes). ....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo 13. Espectro LDI del ion acidificado [TFA-BCA+H]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes). ....</b>	<b>80</b>

<b>Anexo 14. Espectro LDI del ion acidificado [TFA-BCACH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	81
<b>Anexo 15. Espectro LDI del ion acidificado [TFA- BCAOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	81
<b>Anexo 16. Espectro LDI del aducto de sodio [TFA-COH+Na]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	82
<b>Anexo 17. Espectro LDI del aducto de sodio [TFA-BCA+Na]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	82
<b>Anexo 18. Espectro LDI del aducto de sodio [TFA-BCACH<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	83
<b>Anexo 19. Espectro LDI del aducto de sodio [TFA- BCAOCH<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	83
<b>Anexo 20. Espectro LDI del aducto de potasio [TFA-BCA+K]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	84
<b>Anexo 21. Espectro LDI del aducto de potasio [TFA-BCACH<sub>3</sub>+K]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	84
<b>Anexo 22. Espectro LDI del aducto de potasio [TFA- BCAOCH<sub>3</sub>+K]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	85
<b>Anexo 23. Espectro LDI del aducto de plata [TFA-COH+Ag]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	85
<b>Anexo 24. Espectro LDI del aducto de plata [TFA-BCA+Ag]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	86
<b>Anexo 25. Espectro LDI del aducto de plata [TFA-BCACH<sub>3</sub>+Ag]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).</b> .....	86

**Anexo 26. Espectro LDI del aducto de plata [TFA- BCAOCH<sub>3</sub>+Ag]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).....87**

**Abreviaturas y acrónimos**

GIFTEX	Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> (Cromatografía en Capa Fina)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Ionización por desorción láser asistida por matriz)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
TOF	<i>Time-Of-Flight</i> (analizador de Tiempo de vuelo)
Re-TOF	<i>Reflectron Time-Of-Flight</i> (analizador de Tiempo de vuelo con reflectrón)
QqQ	<i>Triple quadrupole mass spectrometer</i> (Espectrometro de masas de triple cuadrupolo)
LDI	<i>Laser Desorption/Ionization</i> (Ionización por desorción laser)
ET	Transferencia electrónica
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización electrónica)
CI	<i>Chemical Ionization</i> (Ionización Química)
FD	<i>Field Desorption</i> (Desorción por campo)

FI	<i>Field Ionization</i> (Ionización por campo)
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i> (Bombardeo rápido atómico)
SIMS	<i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de ion secundario)
$m/z$	Relación masa/carga
CPCD	<i>Coupled Physical and Chemical Dynamics</i> (Dinámica física y química acoplada)
$E_i$	Energía de Ionización
eV	Electronvoltio
nm	Nanómetro
Da	Dalton
UV	Ultravioleta
IR	Infrarrojo
EQE	<i>External quantum efficiency</i> (Eficiencia cuántica externa máxima)
IPCE	<i>Incident photon-to-electron conversion efficiency</i> (Eficiencia de conversión de fotones a electrones incidentes)
HF	Hatree-Fock
RHF	Restricted Hatreee-Fock (Hatree-Fock Restringido)

## Resumen

**Título:** SÍNTESIS DE MATRICES MALDI BASADAS EN UN NÚCLEO DE TRIFENILAMINA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS LÁBILES Y TERMOINESTABLES\*

**Autor:** Anderson Rodriguez Mantilla\*\*

**Palabras Clave:** Sistemas donador-aceptor, Trifenilamina, Síntesis, MS, MALDI.

**Descripción:** En vista del aumento en el desorden de los ciclos biogeoquímicos es menester monitorear como están las situaciones actuales de dichos ciclos (ciclo del carbono, ciclo del agua, ciclo del nitrógeno, entre otros) y con base a esos datos poder emitir pronósticos. Monitoreos tales como la medición de bienestar del fitoplancton a través del análisis de sus pigmentos, los cuales requieren el mejoramiento de las condiciones en las mediciones como las que se realizan mediante la técnica MALDI, en la cual la matriz juega un papel crucial. Esta matriz se puede modificar para mejorar el alcance y la precisión en los análisis, y, dependiendo de sus propiedades se establece su enfoque, con esta pauta, en este trabajo se propuso sintetizar una serie de matrices MALDI, derivadas de trifetilamina con forme a resultados de cálculos teóricos de su  $E_i$ , las matrices sintetizadas fueron: TFA-BCA, TFA-BCACH<sub>3</sub> y TFA-BCAOCH<sub>3</sub>, las cuales se sometieron a mediciones de propiedades fisicoquímicas y optoelectrónicas, esta evaluación de sus propiedades confirmó el correcto desarrollo de la síntesis, la correlación entre los cálculos teóricos y la experimentación, y, definió sus respectivos modos de análisis en Espectrometría de Masas, mostrando tendencia a la transferencia prótonica y la transferencia electrónica.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Julio Roberto Pinzón Joya. Químico, Ph.D. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez, Químico. M.Sc.

### Abstract

**Title:** SYNTHESIS OF MALDI MATRICES BASED ON A TRIPHENYLAMINE NUCLEUS FOR THE ANALYSIS OF LABILE AND THERMOINSTABLE COMPOUNDS \*

**Author:** Anderson Rodriguez Mantilla<sup>1</sup>

**Key Words:** Donor-acceptor systems, Triphenylamine, Synthesis, MS, MALDI.

**Description:** In view of the increase in the disorder of biogeochemical cycles, it is necessary to monitor the current situation of these cycles (carbon cycle, water cycle, nitrogen cycle, among others) and, based on these data, to be able to issue forecasts. Monitoring such as the measurement of phytoplankton welfare through the analysis of their pigments, which require the improvement of the conditions in the measurements such as those made by the MALDI technique, in which the matrix plays a crucial role. This matrix can be modified to improve the scope and precision in the analyses, and, depending on its properties its approach is established, with this guideline, in this work it was proposed to synthesize a series of MALDI matrices, derived from triphenylamine according to results of theoretical calculations of its  $E_i$ , the synthesized matrices were: TFA-BCA, TFA-BCACH<sub>3</sub> and TFA-BCAOCH<sub>3</sub>, which were subjected to physicochemical and optoelectronic properties measurements, this evaluation of their properties confirmed the correct development of the synthesis, the correlation between theoretical calculations and experimentation, and, defined their respective modes of analysis in Mass Spectrometry, showing tendency to protonic transfer and electronic transfer.

---

\* Degree Work

<sup>1</sup> Science Faculty. School of Chemistry. Director: Julio Roberto Pinzón Joya. Chemist, Ph.D. Co-director: Luis Miguel Díaz Sánchez, Chemist. M.S.

## Introducción

Desde el desarrollo de la técnica analítica MALDI, en los años 80's, esta se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada en los laboratorios del mundo para la detección de una amplia gama de compuestos *e.g.*, pigmentos y proteínas en clorosomas y células de bacterias fotosintéticas (Carrasco & Quesada, 2007). La versatilidad de MALDI radica en que se puede escoger la matriz orgánica a utilizar en los experimentos. Por lo que, desde su desarrollo, se ha trabajado en mejorar las propiedades fisicoquímicas de las matrices empleadas, *i.e.*, diseñar, sintetizar y obtener una matriz que permita un análisis integral los compuestos de interés, la elección de la matriz es de vital importancia pues de esta depende la ionización efectiva de los analitos.

Recientemente, algunos autores han reportado el análisis de pigmentos propios de microorganismos fitoplanctónicos utilizando espectrometría de masas (MS) MALDI (Carrasco & Quesada, 2007). Los pigmentos fitoplanctónicos difieren bastante en su estructura molecular y abarcan un amplio rango de polaridades. Sin embargo, en algunos pigmentos su variación es tan pequeña como la posición de un doble enlace, esto hace que la separación, detección e identificación sea compleja cuando se utilizan técnicas convencionales como HPLC. En la separación de pigmentos la técnica más usada es HPLC, aún así algunos autores reportan el análisis de pigmentos fitoplanctónicos utilizando LC-MS con analizadores de masas como: trampa de iones, TOF y combinaciones como QqQ y QTOF. (Roy *et al.*, 2011)

Debido a las características evolutivas relacionadas con una eficiente captación de fotones para el proceso de la fotosíntesis, los microorganismos que constituyen el fitoplancton

contienen en general una gran variedad de pigmentos, comparados con las plantas vasculares (Mora *et al.*, 2015), lo que los hace analitos más complejos por su diversidad intrínseca.

El fitoplancton es una comunidad de organismos autótrofos que pertenecen al plancton. Entre las funciones más relevantes de este conjunto de microorganismos se destaca que es el primer escalón de la red alimenticia acuática, *i.e.* alimentan a gran variedad de especies, desde el zooplancton minúsculo -krill- hasta ballenas de varias toneladas. Otra de las importancias del fitoplancton radica en el clima y el ciclo del carbono, ya que mediante la fotosíntesis consume dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y transfiere cerca de 10 gigatoneladas de carbono de la atmósfera al océano profundo por año. (*What Are Phytoplankton?*, 2010) Sin embargo, se debe mantener un equilibrio entre la proliferación de biomasa fitoplanctónica y su degradación natural, pues al haber un aumento excesivo en la producción de la misma, pueden ocurrir floraciones de algas nocivas, lo que destruye la vida marina y tiene consecuencias nocivas sobre el ecosistema. Debido a lo anterior, las comunidades de fitoplancton son monitoreadas constantemente alrededor del mundo; dichos seguimientos se basan en el análisis de compuestos coloreados, que absorben radiación en la región visible del espectro electromagnético (Roy *et al.*, 2011).

El grupo de investigación GIFTEX, ha trabajado y reportado sistemas conjugados basados en un núcleo de fenilenvinileno (FV) (Castellanos-García *et al.*, 2017; Cristancho *et al.*, 2016; Ramírez-Pradilla *et al.*, 2019) como matrices MALDI, con ventajas sobre las matrices ya establecidas (DCTB), entre las cuales destacan, una eficiente producción de iones primarios a bajos umbrales de energía del láser, alto valor de energía de ionización ( $\geq 8,0$  eV) e incremento de la sobrevivencia de los iones moleculares. Las matrices comerciales y las reportadas permiten analizar compuestos de alto peso molecular (como compuestos

biológicos), pero debido a que los pigmentos del fitoplancton son lábiles, termoinestables y de mediano o bajo peso molecular, el análisis con este tipo de matrices dificulta la asignación de las señales y puede conducir a identificaciones erróneas.

Las matrices actualmente usadas para ionizar moléculas lábiles no tienen una buena definición en el rango de masas bajas, dónde las señales provenientes de la matriz se pueden superponer con las señales del analito, por lo que la caracterización de los compuestos de bajo y mediano peso molecular es compleja e imprecisa.

El objetivo principal de este trabajo fue sintetizar, caracterizar y evaluar bajo condiciones MALDI sistemas orgánicos derivados de trifenilamina, que en ensayos posteriores permitan la caracterización de moléculas de mediano y bajo peso molecular, lábiles y termoinestables presentes en muestras complejas como por ejemplo las mezclas de pigmentos fitoplanctónicos. Se espera que con los resultados totales de esta investigación se aporte nuevo conocimiento a la comunidad científica por medio de su divulgación en eventos académicos relacionados con el área de investigación como en el primer congreso virtual LatinXChem 2020, y LatinXChem 2022, además de ampliar la forma en que se monitorean las floraciones de fitoplancton.

## 1. Planteamiento del problema

La Espectrometría de Masas (MS) MALDI permite el análisis de moléculas de alto peso molecular (Karas *et al.*, 1985), *e.g.*, proteínas, polímeros, ácidos grasos, entre otros. Además, MALDI MS permite la caracterización de moléculas lábiles y termoinestables de

mediano y bajo peso molecular. Para que ocurra el proceso de ionización en MALDI, el analito inicialmente debe encontrarse co-cristalizado con un compuesto orgánico denominado matriz, de propiedades fisicoquímicas conocidas (energía de ionización  $E_i$ , afinidad protónica AP, absorción en la región del UV, entre otras) (Gross, 2004), el cual facilita la desorción/ionización de la muestra, una vez esta es irradiada por un láser cuya energía está en el rango del UV al IR (Gross, 2004).

Típicamente, los pigmentos fitoplanctónicos se han analizado utilizando técnicas espectroscópicas como espectroscopía UV-Vis con previa separación de estos mediante cromatografía de columna abierta, TLC o HPLC. Recientemente, algunos autores han propuesto el análisis de pigmentos de algunos microorganismos aislados mediante espectrometría de masas MALDI (García *et al.*, 2012). Los autores en su mayoría analizan los pigmentos de tipo clorofila utilizando matrices de transferencia protónica (*e.g.*, DHB, CHCA), aun así, otros pigmentos con estructuras químicas difícilmente protonables requieren el uso de matrices de transferencia electrónica (ET), como ha sido reportado previamente en el grupo de investigación (Sánchez *et al.*, 2019).

Las matrices comerciales que existen en la actualidad como DCTB, CHCA, DBH, entre otras; pueden llegar a presentar algunos problemas en el análisis de compuestos lábiles como clorofilas y/o carotenoides. El GIFTEX ha trabajado en los últimos años en el desarrollo de nuevas matrices MALDI derivadas de fenilenvinileno y de fluoreno para el análisis de moléculas de mediano y bajo peso molecular, lábiles y termoinestables (Cristancho *et al.*, 2016). Se ha reportado que durante los análisis de este tipo de muestras pueden ocurrir fragmentaciones indeseadas que dificultan la identificación de los compuestos de interés. Para solucionar este problema, se propuso la síntesis, caracterización y evaluación de un set

de nuevas matrices MALDI diseñadas para el análisis de este tipo de mezclas con excelentes propiedades fisicoquímicas como alta energía de ionización, estabilidad al vacío y altos valores de absorptividad molar, que permitan observar señales de los iones moleculares de los analitos de interés.

## 2. Justificación

La técnica MALDI presenta ventajas sobre otros métodos de ionización en espectrometría de masas, como sobrevivencia del ion molecular, rapidez, alta tolerancia a impurezas en la muestra y uso de mínimas cantidades de analito para el análisis. Por lo anterior, MALDI MS es una técnica ampliamente utilizada en análisis de rutina de una gran cantidad de analitos, utilizando matrices comerciales. No obstante, existen compuestos difícilmente protonables, cuya ionización puede ocurrir vía transferencia electrónica (ET), los cuales son por lo general compuestos que se degradan fácilmente.

La desorción/ionización en MALDI depende fundamentalmente de las propiedades optoelectrónicas y fisicoquímicas de la matriz, tales como: bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia o radiativos, que garantizan que la energía absorbida por la matriz proveniente del láser será emitida en formas no radiativas como transferencia de calor y vibraciones moleculares, otra de las propiedades concierne altos valores de absorptividad molar, que además benefician la vida útil del láser debido a que requiere potencias menores de láser para la producción de iones primarios de la matriz y valores de energía de ionización altos que permiten la ionización vía ET.

Las matrices MALDI utilizadas en el UV, suelen tener una estructura química conjugada con cierta planaridad, que les permite estabilizar eficientemente las cargas, contribuyendo a la desorción/ionización de los compuestos de interés. Además, la estabilidad al vacío es una importante propiedad que se debe tener presente al evaluar las matrices MALDI. Actualmente, existen matrices de ET comerciales como DCTB, que permiten el análisis de compuestos de mediano y bajo peso molecular. Aun así, exhiben problemas de interferencias entre las señales del espectro debido a las provenientes de la matriz y posibles compuestos producto de la reacción entre el DCTB y el analito (Vasil'ev et al., 2006).

Asimismo, el DCTB presenta baja estabilidad química a condiciones de alto vacío dificultando la reproducibilidad de los análisis en el tiempo (Vasil'ev et al., 2006). Por lo anterior, es importante hacer aproximaciones hacia el diseño, la síntesis, la caracterización y la evaluación de nuevas matrices MALDI ET. Para esto se propuso modificar estructuralmente la trifenilamina y obtener moléculas con características fisicoquímicas adecuadas para su uso en procesos de transferencia electrónica en fase gaseosa.

Considerando parámetros como la  $E_i$  establecidos mediante cálculos computacionales, se determinó la viabilidad de las nuevas matrices, las cuales se prepararon conforme al reporte de (Li *et al.*, s. f.) en el que se destacan aplicaciones tales como el desarrollo de OLEDs (Diodo Orgánico de Emisión de Luz, por sus siglas en inglés).

### 3. Hipótesis

¿Pueden los derivados de un núcleo de trifenilamina tener las características optoelectrónicas necesarias para funcionar como matrices efectivas capaces de ionizar compuestos termolábiles mediante transferencia electrónica?

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Sintetizar nuevas matrices MALDI de transferencia electrónica (ET) a partir de un núcleo de trifenilamina y evaluar su desempeño como matriz efectiva.

### 4.2. Objetivos específicos

Sintetizar las nuevas matrices MALDI derivadas de trifenilamina.

Caracterizar los compuestos sintetizados mediante la determinación de las propiedades espectroscópicas y fisicoquímicas.

Evaluar el desempeño de los compuestos sintetizados como matrices MALDI-ET efectivas.

## 5. Marco teórico

### 5.1. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite el análisis de átomos o moléculas, una vez estas son ionizadas. Típicamente se analizan iones con carga positiva, los cuales son separados de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ), para luego ser detectados y registrados (Gross, 2017).

MS proporciona información confiable en la determinación del peso molecular de los compuestos de interés. Además, permite obtener información estructural a partir de procesos de fragmentación controlada de un analito. Los límites de detección en espectrometría de

masas pueden llegar al rango de attomoles ( $10^{-18}$  moles) (Martín & Ballesteros, 2010), lo que permite detectar analitos presentes a concentraciones muy bajas en muestras complejas. Esta técnica analítica ha sido ampliamente utilizada en el análisis de moléculas volátiles, no volátiles, polares y no polares (Martín & Ballesteros, 2010), sólidas, líquidas y gaseosas (Gross, 2004), en conjunto con técnicas de separación.

El análisis por espectrometría de masas se puede agrupar en cuatro etapas (Martín & Ballesteros, 2010):

1. Entrada de la muestra.
2. Ionización de la muestra, donde los analitos de interés pasan a fase gaseosa, pierden su neutralidad y son ionizados.
3. Clasificación y análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación  $m/z$ .
4. Detección de los iones producidos y separados, representados en una gráfica - espectro de masas - donde se muestra la abundancia de los iones con respecto a su relación  $m/z$ .

El proceso de ionización de la muestra es una etapa crucial en el análisis por MS, entre las técnicas de ionización suave, con alta sobrevivencia del ion molecular, se encuentran *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) y *Electrospray Ionization* (ESI), cuyos desarrollos fueron merecedores de dos premios Nobel en Química, en el año 2002 (Gross, 2004). La elección de la fuente de ionización está sujeta a la naturaleza de la muestra y la clase de información que se desea medir a partir de esta (Martín & Ballesteros, 2010).

#### **5.1.1. Ionización/Desorción Láser Asistida por una Matriz**

La técnica de LDI (*Laser Desorption/Ionization*) introducida a finales de 1960, es una herramienta útil para el análisis de moléculas orgánicas estables, de bajo peso molecular y

con fuerte absorción en la región de emisión del láser (Gross, 2004). Sin embargo, hasta 1980 las biomoléculas, compuestos de alto peso molecular, se analizaban mediante técnicas como *Fast Atom Bombardment* (FAB), debido a que permitían obtener mejores mediciones comparadas con LDI (Gross, 2004).

Para finales de los 80's de manera casi simultánea, dos grupos de investigación, uno alemán y otro japonés describieron las primeras nociones de la técnica (MALDI) (Hillenkamp & Beavis, s. f.). El primero a cargo de los profesores Franz Hillenkamp y Michael Karas, quienes describieron un método en el que usan moléculas orgánicas volátiles de bajo peso molecular como “matrices” capaces de absorber radiación láser para fomentar la desorción e ionización de macromoléculas (Karas *et al.*, 1985). El segundo, a cargo de Koichi Tanaka, que reportó el uso de polvo fino de cobalto para el análisis de polímeros y proteínas por encima de los 100kDa (Tanaka *et al.*, 1988). Debido a la versatilidad para escoger la matriz orgánica, MALDI es una herramienta analítica muy útil en la ciencia moderna.

Actualmente, MALDI es utilizada en el análisis de compuestos no volátiles, lábiles, termoinestables y de alto peso molecular como polímeros, proteínas, oligosacáridos, péptidos, aminoácidos. Además, debido a que MALDI es una técnica de ionización suave, también ha sido utilizada para el análisis de compuestos de mediano y bajo peso molecular como clorofilas (Sánchez *et al.*, 2019), carotenoides (Kaufmann *et al.*, 1996) y flavonoides. La técnica MALDI, utiliza una matriz que comúnmente es un compuesto orgánico con características fisicoquímicas definidas (*e.g.* absorción UV, alta energía de ionización, afinidad protónica, entre otras), que se encuentra co-cristalizada con los analitos para luego ser irradiados por un láser (comúnmente de Nd: YAG,  $\lambda = 355$  nm). En MALDI, los procesos de ionización involucran la formación de iones primarios de la matriz seguidos de reacciones

de transferencia de protones, cationes y/o electrones, siendo este último mecanismo el menos explorado, debido a su complejidad. (Karas *et al.*, 1987; Molin *et al.*, 2012; Zenobi & Knochenmuss, s. f.)

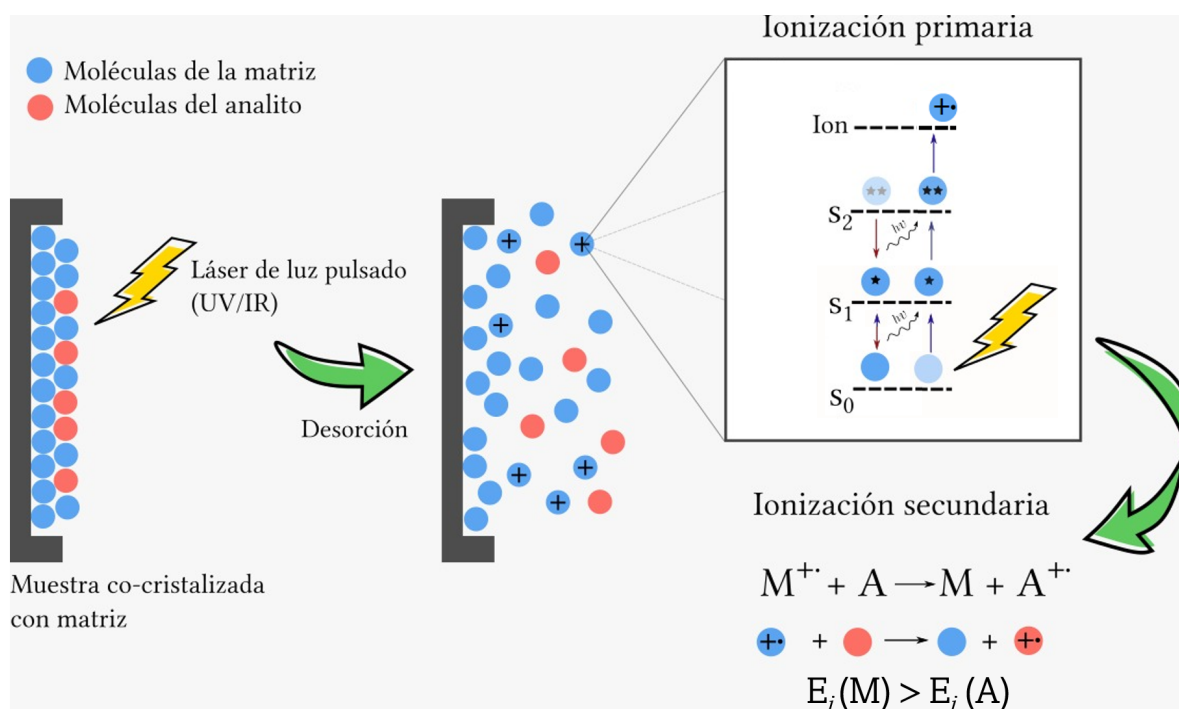
**5.1.1.1. Mecanismo de ionización MALDI.** Tanto en LDI como en MALDI, la muestra es irradiada con un láser, y la energía absorbida provoca una desorción/ionización del analito (Gross, 2004). Como la irradiación es un punto neurálgico en la técnica, se emplea un atenuador de haz variable para ajustar la irradiancia de un 100% a un 1%. Sin embargo, el porcentaje de irradiancia debe ser optimizado en cada medición (Gross, 2004).

La generación de iones en MALDI no tiene un solo origen pues no se aplica un proceso único. En modo de ionización positivo, típicamente se observan iones del tipo cationes radicales, moléculas protonadas y aductos de sodio, potasio, plata, entre otros (Gross, 2004). Actualmente se ha establecido el modelo CPCD (*Coupled Physical and Chemical Dynamics*) para la ionización en MALDI, (Knochenmuss & Zenobi, 2003) (Knochenmuss, 2014) que involucra aspectos fotofísicos, cinéticos y termodinámicos, donde se propone una ionización en dos etapas.

Bajo la explicación de Zenobi y Knochenmuss, el mecanismo de ionización en MALDI se da en dos etapas en serie; la primera radica en la absorción de energía por parte de la matriz, que genera iones de la matriz también llamados iones primarios. La segunda etapa, en la que los iones primarios reaccionan de la forma ion-molécula con las moléculas neutras del analito para producir iones del analito (iones secundarios) (Gross, 2004; Karas & Krüger, 2003; Molin *et al.*, 2012; Stutzman & McLuckey, 2012; Zenobi & Knochenmuss, s. f.).

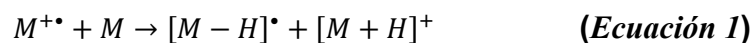
En la primera etapa, las moléculas de la matriz absorben energía y la liberan de forma radiativa, la cual aporta al proceso de “pooling” de energía -responsable de la ionización primaria de la matriz- como se muestra en la **Figura 1**. Mientras que la liberación de energía no radiativa provoca la expansión de la red cristalina y ablación del material, como se defiende en el modelo CPCD (*Coupled Physical and Chemical Dynamics*). Este postulado involucra un estado excitado intermedio cuya interacción con otras especies del porta-muestra MALDI da como resultado la ionización de la matriz. Dos o más moléculas excitadas de la matriz combinan su energía para la formación de una molécula de la matriz altamente excitada ( $M^{**}$ ), donde alcanza el estado ionizado con la formación de un catión radical ( $M^{+\bullet}$ ) (Zenobi & Knochenmuss, s. f.), como se muestra a continuación: (Knochenmuss, 2006)

**Figura 1.** Ilustración de la formación de iones de la matriz (*Pooling*) y la ionización secundaria (*transferencia electrónica*).

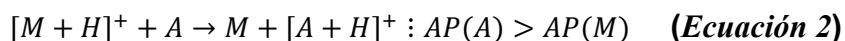


Una vez formados los iones primarios de la matriz, (véase **Figura 1**) estos pueden reaccionar con moléculas neutras del analito formando iones del analito mediante transferencia protónica y transferencia electrónica (Knochenmuss, 2006; Zenobi & Knochenmuss, s. f.).

En la segunda etapa donde se forman los iones secundarios; la técnica MALDI se ha visto centrada en procesos de transferencia catiónica y protónica, y poco en la ET debido a la complejidad e incertidumbre detrás de este. Karas indicó que la transferencia protónica transcurre de la siguiente forma (Ehring et al., 1992): primero ocurre una reacción ion catión-radical de la matriz con una molécula neutra de la misma como se muestra en la **Ecuación 1**, luego el ion protonado de la matriz reacciona con una molécula neutra del analito de acuerdo con la **Ecuación 2**.



Además, es imprescindible que la afinidad protónica del analito sea mayor que la afinidad protónica de la matriz (véase **Ecuación 2**).



La ionización en MALDI vía transferencia electrónica (ET) ha sido reportada para el análisis de compuestos no volátiles, lábiles (Martín & Ballesteros, 2010), polímeros, poliaromáticos (Hurtado & Martínez, 2012) y complejos metálicos, entre otros (Ramírez-Pradilla *et al.*, 2019). Además puede ser utilizada para el análisis de una gran cantidad de analitos que no son susceptibles a adquisición de carga por otros métodos.

Los pioneros en reportar ET fueron Juhaz & Costello quienes en 1993 analizaron compuestos no polares por MALDI MS utilizando ditranol y 9-nitroantraceno como matrices con alta absortividad UV. Los autores reportaron la detección de los compuestos como cationes

radicales y plantearon un mecanismo probable en el que ocurre una reacción de intercambio de carga entre un ion precursor de la matriz y el analito en fase gaseosa formando iones radicales de los analitos (Juhasz & Costello, 1993). Asimismo, McCarley reportó el primer estudio de reacciones de ET en MALDI, en donde observó señales predominantes correspondientes a cationes radicales en el análisis de metallocenos utilizando tertiofeno y antraceno como matrices MALDI (McCarley *et al.*, 1998).

En el proceso de transferencia electrónica, la matriz se ioniza a través de un mecanismo de “pooling” tal y como se postuló en el modelo CPCD (*Coupled Physical and Chemical Dynamics*) (Knochenmuss, 2014; Knochenmuss & Zenobi, 2003). Una vez formados, los iones de la matriz pueden abstraer un electrón del analito neutro para formar un ion secundario del analito (en modo de ionización positivo). El criterio termodinámico que explica la ionización ET es la diferencia de la  $E_i$  de la matriz y el o los analitos. Esta reacción solo es posible si la energía de ionización del analito es menor que la energía de ionización de la matriz, como se muestra a continuación (véase **Ecuación 3**) (McCarley *et al.*, 1998), condición que permite la migración de carga hacia la especie termodinámicamente más favorable (el analito).



La aplicabilidad de la ionización por transferencia electrónica depende de la combinación de matriz y analito, aditivos y/o contaminantes presentes y está estrechamente relacionada con la naturaleza de la matriz utilizada en el análisis (Calvano *et al.*, 2017).

**5.1.1.2. Matrices MALDI.** La matriz MALDI es un compuesto orgánico con propiedades fisicoquímicas conocidas, generalmente es un sólido cristalino con baja presión de vapor

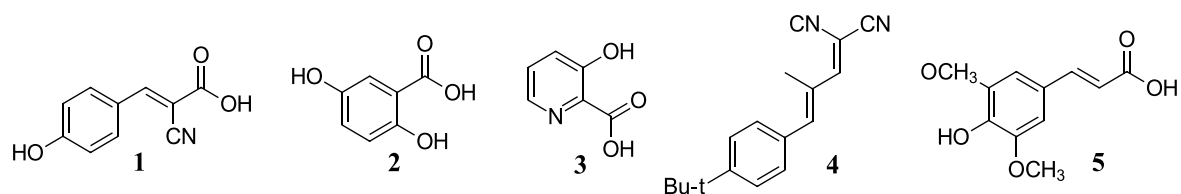
debido a las condiciones de operación en MALDI. Una de las funciones de la matriz es aumentar las distancias intermoleculares entre las moléculas analito-analito, rodeándolas durante la evaporación del solvente *i.e.* durante el proceso de co-cristalización. Además, la matriz orgánica funciona como mediador para la absorción de energía por parte del analito una vez la mezcla matriz:analito es irradiada con el láser (Karas, 2000).

Las matrices en UV-MALDI se caracterizan por presentar una fuerte absorción de energía en la región de emisión del láser. Para esto, los compuestos deben tener estructuras moleculares que permitan la excitación electrónica *i.e.* la estructura de las matrices involucra grupos cromóforos y típicamente se basan en un núcleo aromático. En la actualidad, el desarrollo de matrices MALDI se enfoca en el diseño de nuevos compuestos que ionicen eficientemente péptidos, proteínas, azúcares, metabolitos, lípidos, entre otros analitos de interés (Gross, 2004). Además compuestos orgánicos de alta inestabilidad, polímeros, nanopartículas, pigmentos y componentes de petróleo crudo (Giraldo-Dávila *et al.*, 2018). Actualmente, existen matrices comerciales como ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -CHCA), ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA), ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), ditranol y 2-[(2E)-3-(4-*ter*-butilfenil)-2-metilprop-2-enilideno]malonitrilo (DCTB), entre otras. A continuación, en la **Tabla 1** y la **Figura 2** se encuentran algunas matrices MALDI de uso común (Gross, 2004).

**Tabla 1. Matrices más comunes en MALDI, con sus respectivos máximos de absorción.** (Skoog et al., 2007)

<b>Matriz</b>	<b>Analitos típicos</b>	<b>Longitud de onda máximo de absorción, nm</b>
Nitropiridinas:		
2-Amino-4-metil-5-nitropiridina	Proteínas, oligonucleótidos	355
2-Amino-5-nitropiridina	Oligonucleótidos	355
Ácido nicotínico	Proteínas, glucoproteínas, oligonucleótidos	266,220-290
Derivados del ácido benzoico:		
Ácido 2-aminobenzoico	Proteínas	266,337,355
Ácido benzoico 2-(4- hidroxifenilazo)	Proteínas, gangliósidos, polímeros	266,337
Ácido 2-piracina-carboxílico	Proteínas	266
Ácido 3-aminopiracina-2- carboxílico	Proteínas	337
Derivados del ácido cinámico:		
Ácido sinapínico	Proteínas, polímeros industriales	337,355
Ácido $\alpha$ -ciano-4- hidroxicinámico	Proteínas, oligosacáridos	337
Alcohol 3-nitrobenzílico	Proteínas	266

**Figura 2. Estructuras moleculares de compuestos utilizados como matrices MALDI. 1.  $\alpha$ -CHCA, 2. DHB, 3. 3-HPA, 4. DCTB, 5. SA.**



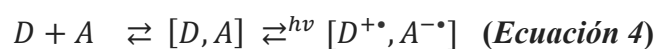
La matriz orgánica DCTB ha sido ampliamente utilizada para el análisis de compuestos por ET. Sin embargo, es altamente reactiva con los analitos de interés (cuando estos tienen grupos amino), es poco estable en el vacío, lo que se refiere a que sufre cambios químicos al alterar el equilibrio termodinámico del sistema, (el cual está determinado por los parámetros intensivos como: la presión, la temperatura entre otros) haciendo que la molécula reaccione con sus alrededores o sea con más moléculas de matriz o analito, formando agregados, observándose señales adicionales en el espectro de masas, lo que dificulta los análisis (Wyatt et al., 2006).

El grupo de investigación GIFTEX, ha reportado la síntesis y el uso de nuevos compuestos basados en un núcleo de fenilvinileno como matrices MALDI de transferencia electrónica, con  $E_i$  entre 7,9 y 8,5 eV (Castellanos-García et al., 2017; Giraldo-Dávila et al., 2018; Ramírez-Pradilla et al., 2019). Entre los resultados reportados por el GIFTEX, se estableció que las nuevas matrices MALDI ( $\alpha$ -CNFVs) aumentan significativamente la capacidad de formar iones secundarios de los analitos. Entre los analitos susceptibles de análisis con estas matrices, se encuentran porfirinas, petroporfirinas, compuestos poliaromáticos, complejos metálicos, ftalocianinas y algunos colorantes a base de trifetilamina ( $E_i < 7,0$  eV) (Castellanos-García et al., 2017; Giraldo-Dávila et al., 2018; Ramírez-Pradilla et al., 2019).

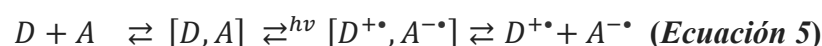
## 5.2. Sistemas donor-aceptor

Un donante de electrones es un agente reductor, que al donar sus electrones resulta oxidado en el proceso (Avery, 1982). Definidos en términos de ácidos y bases de Lewis, un donador de electrones es una base electrocedente y un aceptor de electrones es un ácido electrodeficiente, que al unirse y compartir pares electrónicos forman enlaces covalentes (Raymond, 2011).

El concepto de transferencia electrónica tuvo sus primeras perspectivas alrededor de la década de 1950. Inicialmente Mulliken concibió la interacción difusional de un donador rico en electrones (D) con un aceptor relativamente ‘pobre’ de electrones (A) en el encuentro reversible ocurrido por la formación de un complejo (D, A) espontáneamente observado con colores vivos relacionados con la transición óptica (transferencia de carga) (Rosokha & Kochi, 2008), descrita así:



Casi simultáneamente, la formulación de Marcus de la transferencia electrónica bimolecular coincidió en un paso común con el concepto de transferencia electrónica no adiabática en un equilibrio controlado de donor/aceptor propuesto por Mulliken.



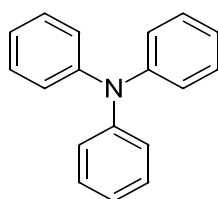
Diversos investigadores han enfocado su atención en los conceptos de transferencia electrónica basándose en la interacción biomolecular de donadores electrónicos orgánicos (nucleófilos) y aceptores electrónicos (electrófilos) (Rosokha & Kochi, 2008). La transferencia electrónica es de vital importancia en procesos bioquímicos tales como el

transporte electrónico y la fosforilación oxidativa en gradiente de protones mediante la transferencia de electrones donde la energía resultante es aprovechada en forma de síntesis de ATP (Lehninger, 1985).

### 5.3. Trifenilamina

La trifenilamina es un cromóforo estructural de tipo hélice con un centro de átomo de nitrógeno (Lian *et al.*, 2017) (ver **Esquema 1**), tiene un gran impedimento estérico y un efecto electrónico de hiperconjugación lo que lo hace un buen donador de electrones. Los compuestos que incluyen en su estructura unidades de TFA son importantes para producir materiales de transporte de carga (Tian *et al.*, 2008), que son ampliamente empleados en materiales fotovoltaicos orgánicos (Mahmood, 2016) como celdas solares optoelectrónicas (Fan *et al.*, 2008), en materiales electroluminescentes (como OLED's), (Adachi *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 2009) y materiales electrocromáticos (Hsiao *et al.*, 2010).

**Esquema 1. Estructura química de la trifenilamina, ( $C_{18}H_{15}N$ ), peso molecular: 245,3184.**



Los derivados de TFA tienen propiedades optoelectrónicas favorables (Allain *et al.*, 2007; Fave *et al.*, 2004) (con una intensidad absorción máxima en el rango de 320-380 nm), hecho que anticipa un posible buen desempeño como matriz, ya que la longitud de onda de emisión del láser MALDI es 355 nm.

Algunos derivados de TFA con enlaces de benceno, tiofeno y furano (Jia *et al.*, 2013) aumentan el rango de respuesta espectral y muestran un mayor IPCE (eficiencia de conversión de fotones a electrones incidentes).

Otra propiedad importante de los compuestos con TFA es la electroluminiscencia pues muestra como el transporte de carga bipolar puede estabilizar el electrón-hueco, (Ge *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008) y al tener buena estabilidad electrocrómica presentaban una capacidad rápida de cambio (Su *et al.*, 2005).

Al ser la TFA un buen grupo donador de electrones (Liu *et al.*, 2012), celdas solares hechas con heterouniones de TFA obtuvieron una alta eficiencia de conversión fotoeléctrica, amplificó la eficiencia cuántica externa máxima, y mejoró el voltaje de circuito abierto. Por lo anterior los autores concluyeron que emplear TFA como grupo donador de electrones tiene potenciales aplicaciones (Calvano *et al.*, 2017) (So *et al.*, 2012). Y por su notable comportamiento electrocrómico muchos materiales pueden lograr cambios multicolores con los cambios de voltaje. (Chang *et al.*, 2009; Preat *et al.*, 2010)

#### **5.4. Métodos computacionales para la selección de moléculas derivadas de TFA como candidatas a matrices MALDI-ET**

La química computacional está basada en principios de la mecánica clásica y cuántica, con un fuerte soporte de principios matemáticos, que intenta explicar y predecir el comportamiento de la materia a escala atómica (Jensen, 2017; Lewars, 2016; Tsuneda, 2014). La complejidad de las estructuras estudiadas puede ir desde un átomo, pasando por decenas, hasta cientos de estos, y a su vez la forma de analizar cada sistema también varía (Tsuneda,

2014). Sistemas periódicos de cientos de átomos se pueden analizar mediante el enfoque de la mecánica clásica, asumiendo que los átomos son esferas y los enlaces, puentes, cada tipo con propiedades y energía intrínseca (aproximación). El estudio de los sistemas macro, también puede ser analizado mediante la dinámica molecular, la cual se basa principalmente en la termodinámica estadística y las leyes de movimiento de Newton para entender y predecir el comportamiento de un sistema molecular determinado (Gabriel *et al.*, 2007; Lewars, 2016). Sin embargo, los sistemas con pocos átomos pueden describirse mucho mejor con cálculos mecano-cuánticos basados en la solución de la ecuación de Schrödinger. La diferencia entre mecánica cuántica y clásica, radica en que en la primera se estudian los electrones y no se asumen como un solo punto de energía, como si ocurre en la mecánica clásica (Gabriel *et al.*, 2007).

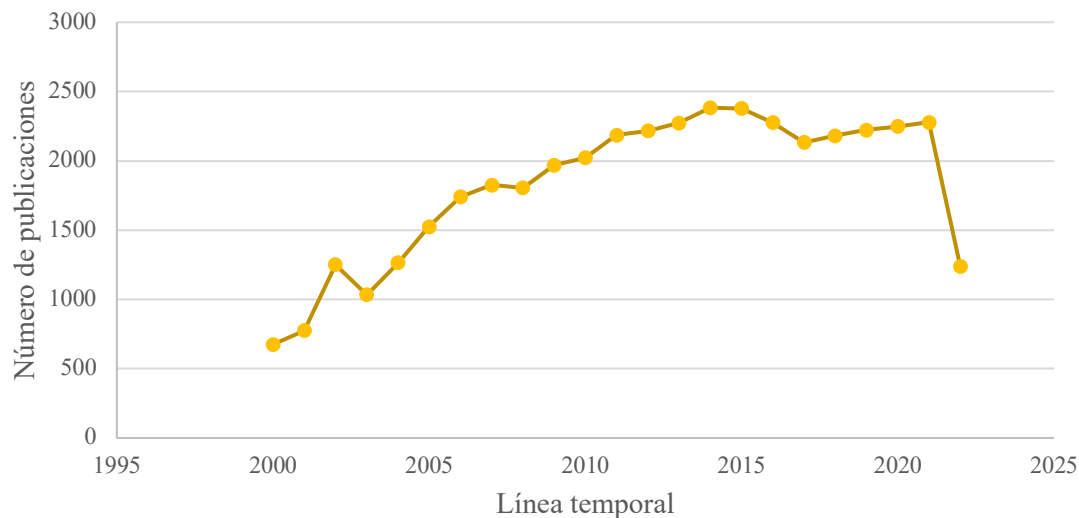
Específicamente, utilizando herramientas de la química cuántica es posible entender y predecir con bastante exactitud algunas propiedades físicas y químicas de interés asociadas al movimiento electrónico de los átomos, como conformaciones geométricas de las moléculas,  $E_i$ , IR, UV, entre otros parámetros relevantes (Lewars, 2016). Además, en los últimos años esta área de la química ha impactado positivamente en la búsqueda de soluciones a predicciones complejas para la resolución de las mismas en el campo experimental (Padilla Jaramillo *et al.*, 2021). Los enfoques mecano-cuánticos usados hoy día son: *ab Initio*, semiempíricos y DFT (“Density Functional Theory”). Entre los métodos *ab Initio*, se destaca el de Hatree-Fock (HF), en donde la posición más probable de cada función de onda (electrón) es descrita por un orbital atómico, que se usa para crear la función de onda total de cualquier sistema molecular.

El teorema de Koopman indica que independiente de la función base, “*basis set*”, que se use, el valor negativo del orbital HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) es equivalente a la energía de ionización de la molécula, siempre y cuando dicho valor se calcule con el método RHF (HF de capa cerrada) (Luzanov & Pedash, 1987), lo que es bastante útil para hacer una preselección de las moléculas con las mejores características, específicamente  $E_i$ , como matrices MALDI-ET.

### 5.5. Antecedentes

En MALDI la efectiva ionización de moléculas de interés depende de la interacción entre la matriz y el analito bajo estudio, así como a su vez la formación primaria de iones depende de la afinidad fotónica de la matriz con el pulso láser (Fitzgerald *et al.*, s. f.). En la **Figura 3** se ilustra una tendencia creciente en investigaciones/citaciones en el área de desarrollo de nuevas matrices MALDI-ET.

**Figura 3.** *Cantidad de publicaciones relacionadas con MALDI de transferencia electrónica en el periodo 2000-2022. Fecha de búsqueda 13/09/2022. Fuente Scopus (Elsevier).*



El primer reporte de detección de cationes radicales de una relación de  $m/z$  de hasta 10.000 fue hecho en el año 1993 por Peter Juhasz y Catherine Costello (Juhasz & Costello, 1993), más adelante en el año 2000 Heinrich Luftmann y colaboradores (Ulmer *et al.*, 2000) reportan el DCTB como matriz MALDI-ET, en el análisis de moléculas basadas en fullereno. Para el 2006 Yury Vasiliev y colaboradores (Vasil'ev *et al.*, 2006) reportan desventajas del DCTB, pues presentaban interferencias por formación de aductos, descomposición química, reactividad con analitos, baja estabilidad química y al vacío, lo que impide el análisis prolongado bajo alto vacío.

En el 2012 Haruki Kouchi y colaboradores (Kouchi *et al.*, 2012) usan el  $\alpha,\beta$ -difenilfumaronitrilo (DPF) como matriz MALDI-ET en modo negativo para el estudio de clusters de oro.

Siguiendo esta tendencia el laboratorio GIFTEX ha hecho aportes a lo largo de los años con la síntesis y evaluación de sistemas orgánicos con núcleo de fenilenvileno, que han permitido el análisis de diferentes analistas de interés (Castellanos-García *et al.*, 2017; Giraldo-Dávila *et al.*, 2018; Ramírez-Pradilla *et al.*, 2019).

## 6. Metodología

### 6.1. Cálculos computacionales: Energías de Ionización

Como punto de partida fundamental para la selección de especies químicas a sintetizar se realizaron cálculos mecano cuánticos para determinar de forma *a priori* las energías de ionización, las cuales son una propiedad termoquímica fundamental para los sistemas moleculares que son objetivo de esta investigación (matrices MALDI ET) (ver **Figura 1**).

Estos cálculos se realizaron en colaboración con el Grupo de Investigación “Modelamiento Molecular y Simulación Computacional – *In Silico*” de la Universidad de Sucre, donde se hizo una serie de optimizaciones geométricas con el método RHF y las funciones base def2-SVP, def2-TZVP, y def2-QZVPP, siguiendo una metodología reportada previamente (Padilla Jaramillo *et al.*, 2021). A partir de las geometrías optimizadas, se calculó la energía del orbital molecular HOMO, que de acuerdo con el teorema de Koopmans es equivalente al inverso del valor de la Energía de Ionización,  $E_i$  (ver **Ecuaciones 6 y 7**).

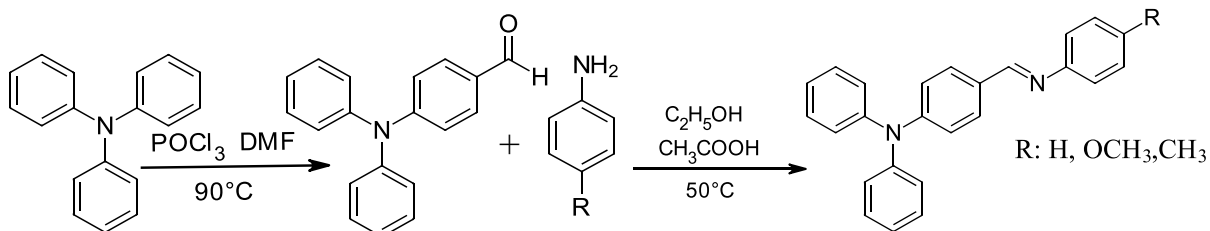
$$E_N - E_{N-1} = h_k + \frac{1}{2} \sum i = 1^{Nelec} (J_{ik}) - K_{ik} + \sum j = 1^{Nelec} (j_{ij} - K_{ij}) \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$E_N - E_{N-1} = h_k + \sum i = 1^{Nelec} (J_{ik} - K_{ik}) = \epsilon_k \quad (\text{Ecuación 7})$$

Con estos valores de  $E_i$  se seleccionaron las mejores moléculas candidatas para la síntesis, las cuales se describen mediante el mecanismo de reacción del **Esquema 2**. En términos generales, una molécula de trifetilamina en medio de DMF reacciona con el  $\text{POCl}_3$  para formar un electrófilo, para generar el producto **TFA-COH**. El compuesto obtenido en el

paso anterior es el precursor general para la familia de derivados que dependiendo del sustituyente en la posición *p*- de la amina determina el producto final: **TFA-BCA**, **TFA-BCACH<sub>3</sub>** o **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>**. El mecanismo de síntesis se discute detalladamente en las **Secciones 7.2. y 7.3.**

**Esquema 2. Ruta de síntesis de los sistemas orgánicos con núcleo de trifetilamina.**



## 6.2. Caracterización espectroscópica de los productos sintetizados

Todos los productos de reacción (moléculas **TFA-COH**, **TFA-BCA**, **TFA-BCACH<sub>3</sub>** y **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>**) se caracterizaron bajo las siguientes técnicas y condiciones:

**Espectroscopia UV-Vis:** Se empleó para la determinación de los coeficientes de absorptividad molar de los sistemas sintetizados. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-VIS. El barrido espectral de medición se estableció entre 200 y 700 nm, y se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los compuestos evaluados fueron disueltos en THF en un rango de concentraciones de 10 a 30  $\mu\text{M}$  y se midió la absorbancia a la longitud de onda,  $\lambda=355$  nm.

**Espectroscopia UV-Vis de reflectancia difusa:** Se registraron los datos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC con esfera de integración. Para la medición del blanco, se utilizó sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ), en un barrido espectral desde 200 hasta 700 nm, con un slit de 0.5 nm. La muestra fue homogeneizada y se mezclaron 5 mg de muestra con

BaSO<sub>4</sub>, de esta mezcla se dispuso suficiente material sobre el portamuestra de la celda hasta completa cobertura.

**Resonancia Magnética Nuclear (RMN):** Los tubos de resonancia magnética nuclear (RMN) donde las muestras se dispusieron se lavaron con EtOH, Acetato de etilo, acetona y cloroformo antes de ser usados. Se disolvieron 60 mg del compuesto en CDCl<sub>3</sub> al 99,8% y se registraron los espectros de <sup>1</sup>H a 400 MHz y los de <sup>13</sup>C a 100 MHz.

**Espectrometría de masas LDI:** Para todos los experimentos LDI se utilizó un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF Bruker Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA), equipado con un láser *Smart Beam* de Nd:YAG ( $\lambda = 355$  nm), con frecuencia de 1 kHz y una salida máxima de energía de aproximadamente 85  $\mu$ J por disparo un pulso de duración de 6 ns con ancho de *spot* de 10  $\mu$ m a 100  $\mu$ m, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Los espectros de masas se adquirieron en el rango de  $m/z$  100 a 1500 en modo reflectrón usando voltaje de aceleración de 25 kV, con un pulso de 100 ns. La calibración del equipo en el rango de masas especificado se realizó usando de la serie de péptidos estándar: leucina-encefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Todos los resultados de medición de la energía por pulso del láser se determinaron a partir del promedio de diez mediciones.

### **6.3. Evaluación de la efectividad de las nuevas matrices basadas en un núcleo de trifenilamina mediante LDI**

Para el caso específico de los ensayos LDI en la evaluación del desempeño de los nuevos sistemas basados en trifenilamina como matrices MALDI.

Los experimentos de protonación se realizaron utilizando ácido fórmico en metanol. Se evaluaron dos concentraciones del ácido: 10% v/v y 20% v/v. Se prepararon soluciones de 4,7 mM de cada uno de los derivados de TFA en el metanol acidificado. Finalmente, con el método de la gota seca - *dried droplet*, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  del derivado acidificado sobre el target MALDI y se dejó secar por 2 horas en la cabina. Se sembraron 3 *spots* con cada uno de los derivados, con ambos porcentajes de ácido para generar la especie  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Para los experimentos de cationización se eligieron las sales más usadas en los procesos de cationización en MALDI ( $\text{AgBF}_4$ ,  $\text{LiOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{KCl}$ ) (Knochenmuss et al., 1998) y se prepararon soluciones de iguales concentraciones de los derivados de TFA y de las sales disponibles en el laboratorio. Se prepararon soluciones de 4,7 mM de  $\text{AgBF}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{KCl}$  en metanol, y de **TFA-BCA**, **TFA-BCACH<sub>3</sub>** y **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** en el mismo solvente, ambas soluciones se agitaron en el vortex a 1500 rpm por 10 minutos hasta solubilizarse. Luego se combinaron iguales volúmenes de ambas soluciones y de nuevo se agitó en el vortex por 5 minutos, y esta solución se depositó también con el método *dried droplet* 1  $\mu\text{L}$  sobre el target y se dejó secar por 2 horas en la cabina. Se dispusieron por triplicado 3 *spots* con cada uno de los derivados, para generar las especies  $[\text{M}+\text{Ag}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  y  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

Se tomaron los espectros de masas en el rango de  $m/z$  100 a 1500. Cada espectro compuesto corresponde a 2000 espectros, tomados en 4 adquisiciones de 500 disparos cada una, de esta forma es posible hacer análisis estadístico de los resultados obtenidos.

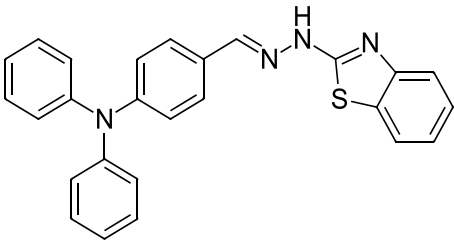
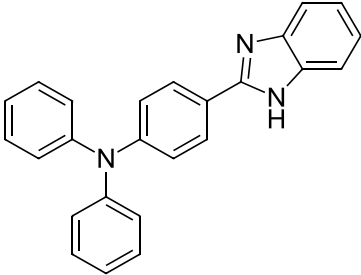
Adicionalmente, se evaluó la estabilidad en el vacío de las matrices cristalizadas sobre el objetivo MALDI, realizando mediciones en el tiempo y midiendo descriptores analíticos como la abundancia de iones, la relación señal/ruido (S/N) y la resolución de los iones moleculares de interés.

## 7. Resultados y Discusión

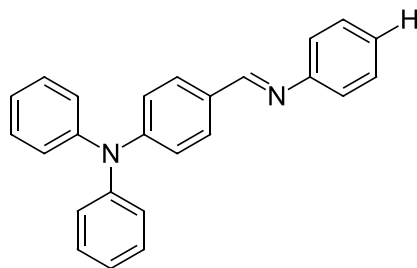
### 7.1. Cálculos teóricos

La síntesis de los primeros dos candidatos de la **Tabla 2** no se priorizó puesto que sus  $E_i$  son las más bajas respecto a los demás, en cuanto a las especies restantes, se esperaba que el derivado **TFA-BCA** transfiriera más eficientemente la carga de la matriz al analito a causa de su  $E_i$ , seguido de **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>**. Termodinámicamente, este proceso se ve favorecido cuando las diferencias de  $E_i$  entre matriz y analito (moléculas lábiles y termoinestables) son mayores a 0.5 eV (Knochenmuss & Zenobi, 2003).

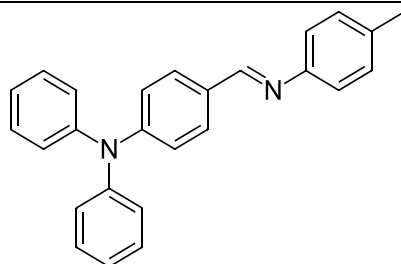
**Tabla 2.** Valores de  $E_i$  calculados con método el RHF con una función de base def2-QZVPP.

Nombre de Matriz	Estructura	$E_i$ (eV) (RHF/def2-QZVPP)
TFA*		7,29
TFA*		7,27

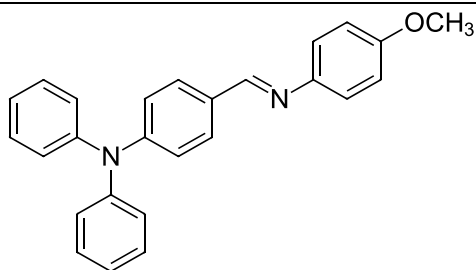
TFA-BCA



7,39

TFA-BCACH<sub>3</sub>

7,33

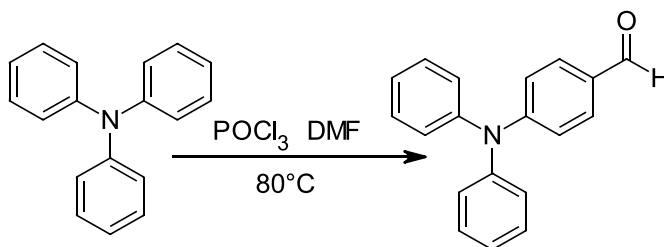
TFA-BCAOCH<sub>3</sub>

7,36

Los primeros dos derivados con etiqueta TFA\* de la **Tabla 2** no se sintetizaron debido a su bajo valor de  $E_i$  comparado con los demás derivados de TFA candidatos.

## 7.2. Síntesis de *p*-(difenilamino)benzaldehído

Esquema 3. *Obtención de la p*-(difenilamino)benzaldehído.



En un balón de fondo redondo y en un baño de hielo, se introdujeron 6,31 mL (DMF seco) y 1,00 g (4,08 mmol) de Trifenilamina (TFA), se enfrió hasta 0°C, y se añadieron gota

a gota 1,12 mL (12,2 mmol) ( $\text{POCl}_3$ ) y la mezcla se agitó por 40 minutos a  $0^\circ\text{C}$ . Luego se retiró el baño de hielo y se estabilizó a temperatura ambiente, seguido de un aumento hasta  $80^\circ\text{C}$  con agitación constante durante 3 h. Posterior a esto se permitió el enfriamiento del reactor a temperatura ambiente, y se dispuso en un baño de hielo para una posterior neutralización con NaOH. Seguidamente se filtró, y el sólido se llevó a secado en horno, se formó con este una pastilla con silica gel y se separaron los dos productos con una columna por gravedad con una F.M. (hexano: acetato de etilo) (5:1 v/v), cuyo rendimiento fue de 1,09 g (98%).

El producto obtenido se caracterizó según se muestra en el **Anexo 1** por  $^1\text{H}$ -RMN: (400 Hz, cloroformo- d),  $\delta$  (ppm): 9,88 (d,  $J= 9,88$  Hz, Ha), 7,76-7,74 (d,  $J= 7,55$  Hz 2H, Hb), 7,43-7,40 (dd,  $J= 7,41$  Hz, 4H, Hc), 7,26 -7,24-7,22(m,  $J= 7.24$  Hz, H, He, 4H, Hd) y 7,10-7,08 (d,  $J= 7,09$  Hz, 2H, Hf). Y el **Anexo 2**: y  $^{13}\text{C}$ -RMN (400 Hz, cloroformo-d)  $\delta$  (ppm): 190,22 ( $\text{C}_1$ ), 153,15 ( $\text{C}_2$ ), 145,95 ( $\text{C}_3$ , x2), 131,10 ( $\text{C}_4$ , x2), 129,53 ( $\text{C}_5$ , x4), 128,89 ( $\text{C}_6$ ), 126,11 ( $\text{C}_7$ , x4), 124,91 ( $\text{C}_8$ , x2) y 119,14 ( $\text{C}_9$ , x2).

### 7.3. Síntesis de *N, N*-difeníl-4-[(4-alkilfenil) imino]bencenamina

Esquema 4. *Obtención de la N, N*-difeníl-4-[(4-alkilfenil) imino]bencenamina.

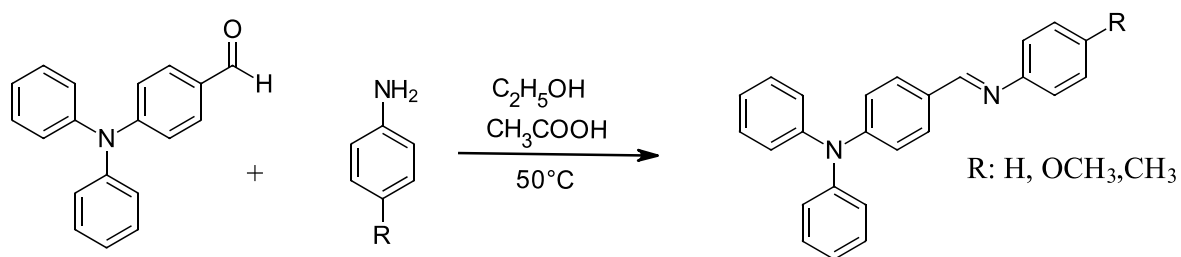
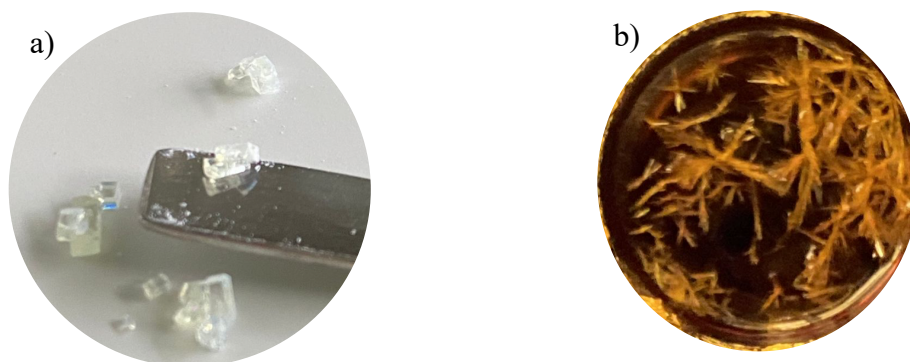


Tabla 3. *Etiqueta del derivado entre la TFA y la amina correspondiente.*

Amina	Anilina (R=H)	<i>p</i> -toluidina (R=CH <sub>3</sub> )	<i>p</i> -anisidina (R=OCH <sub>3</sub> )
Derivado de TFA	TFA-BCA	TFA-BCACH <sub>3</sub>	TFA-BCAOCH <sub>3</sub>

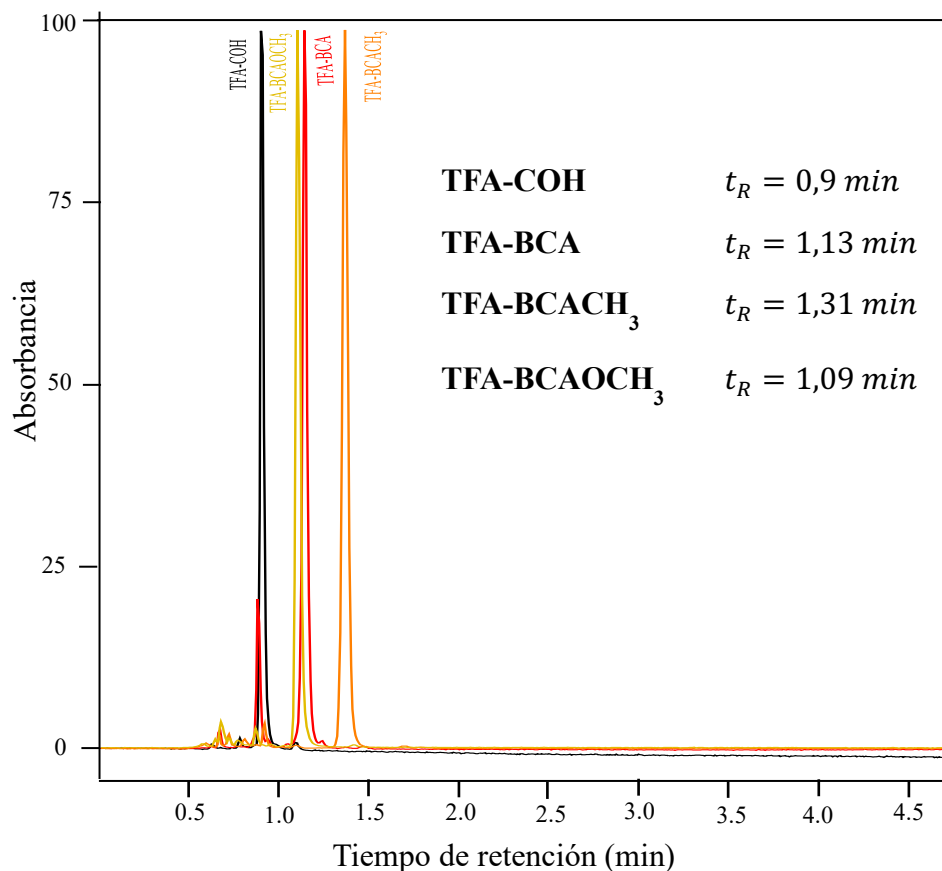
En un balón de fondo redondo, se introdujeron 10,0 mL (EtOH) y 2 gotas (ácido acético glacial), junto con 0,20 g (0,73 mmol) de (TFA-COH) y se aumentó la temperatura a 50°C. Luego se añadieron 0,07 g, 0,08 g y 0,09 g (0,73 mmol) (de las aminas respectivas: anilina, *p*-toluidina y *p*-anisidina, dependiendo del producto deseado) y se dejó en agitación constante por 4 h. Se retiró del baño de aceite y se dejó hasta temperatura ambiente. Se evaporó el medio de reacción y con el sólido se formó una pastilla de silica gel para separar los productos utilizando una columna de cromatografía con una F.M. (hexano: acetato de etilo) (4:1 v/v). En la **Figura 4** se muestran los cristales de TFA-COH (**a**) y TFA-BCA-OCH<sub>3</sub> (**b**) usados para los análisis posteriores.

**Figura 4.** Cristales de (a) TFA-COH y (b) TFA-BCA-OCH<sub>3</sub>.



Los productos TFA-BCA, TFA-BCACH<sub>3</sub> y TFA-BCAOCH<sub>3</sub> (ver **Tabla 3**) fueron obtenidos con rendimientos de: 0,24 g (93%), 0,22 g (82%) y 0,26 g (94%) respectivamente. La presencia de un solo pico en el cromatograma obtenido por HPLC (**Figura 5**) permite corroborar la pureza de los compuestos obtenidos, los cuales eluyeron con un tiempo de retención: TFA-COH  $t_R$ : 0,90 min, TFA-BCA  $t_R$ : 1,13 min, TFA-BCACH<sub>3</sub>  $t_R$ : 1,31 min, TFA-BCAOCH<sub>3</sub>  $t_R$ : 1,09 min.

**Figura 5.** *Cromatograma HPLC comparativo de los derivados de TFA, usando una columna C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m) como fase estacionaria, metanol como fase móvil y un detector UV con  $\lambda = 254$  nm.*



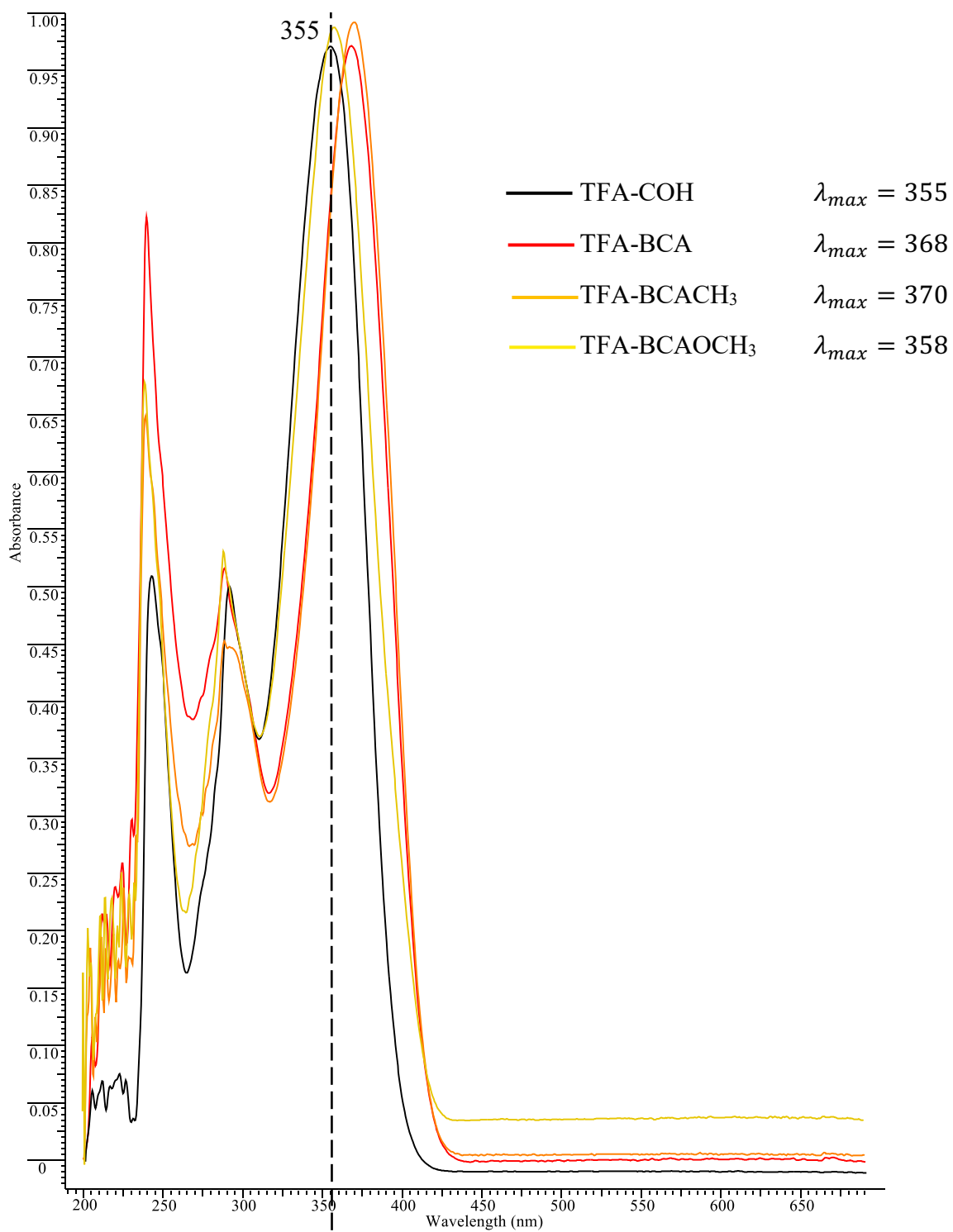
#### 7.4. Espectroscopia UV-Vis

Los sistemas derivados de TFA tienen numerosas aplicaciones gracias a sus propiedades fotofísicas y químicas, las cuales dependen del tipo de sustituyentes y sus posiciones en el núcleo base.

Para comprender el efecto de los sustituyentes en el núcleo de TFA, se realizaron experimentos UV-Vis en solución. En la **Figura 6** se observan las bandas de absorción UV normalizadas de los diferentes derivados de TFA, donde las dos primeras señales provienen del núcleo común TFA y los máximos de absorción corresponden predominantemente a

transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ . El blanco o referencia es el **TFA-COH** (*negro*), el cual absorbe a una longitud de onda  $\lambda_{max}$  de 355 nm; mientras que los derivados **TFA-BCA** (*rojo*), **TFA-BCACH<sub>3</sub>** (*naranja*) y **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** (*amarillo pardo*) con grupos auxocromos como sustituyentes, mostraron un corrimiento batocrómico de 13 nm, 15 nm y 3 nm referentes a la banda de **TFA-COH**, respectivamente. Este comportamiento se debe a la presencia de grupos activantes como el -CH<sub>3</sub>; señal ubicada en 370 nm, cuyo desplazamiento se racionaliza en términos de la presencia de insaturaciones entre enlaces de carbonos sp<sup>2</sup>(correspondientes al núcleo) y carbonos sp<sup>3</sup>(correspondientes al metilo). Por otra parte, por efecto mesomérico, la señal en 358 nm correspondiente al grupo -OCH<sub>3</sub>, es indicativa de estabilización de la especie a causa de la deslocalización ocurrida entre los electrones libres del oxígeno con la nube electrónica del núcleo central, haciendo que la diferencia de energía entre el HOMO y el LUMO incremente.

**Figura 6.** Espectros de absorción UV-Vis de TFA-COH, TFA-BCA, TFA-BCACH<sub>3</sub> y TFA-BCAOCH<sub>3</sub> medidos a 20 μM en THF.

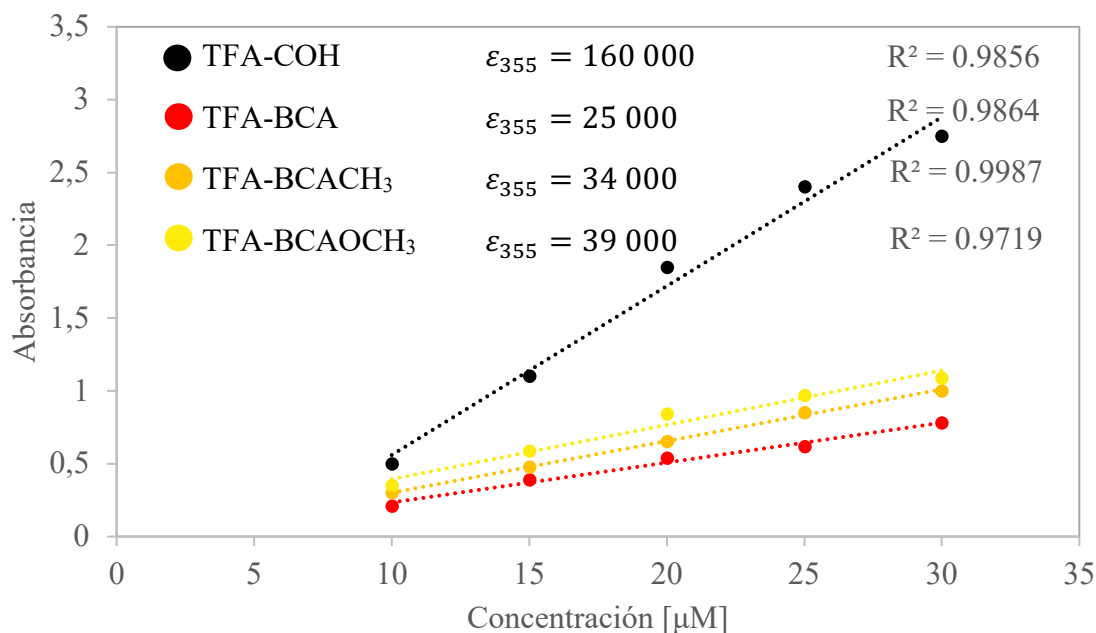


#### 7.4.1. *Determinación del coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ )*

El coeficiente de absorptividad hace referencia a la medida de la luz absorbida por una solución en términos de la concentración de esta, este se calculó conforme a la ecuación de Lambert-Beer, utilizando una serie de diluciones en un rango de concentración de 10 a 30  $\mu\text{M}$  en THF.

En la **Figura 7** se observa una tendencia lineal y los coeficientes de absorptividad molar para cada derivado de TFA, entre los que sobresalen el **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** con  $\epsilon = 39000$ ; dicho valor muestra correspondencia con el respectivo máximo de absorción para el derivado en mención, lo que corrobora su estabilidad; dicho en otras palabras, este derivado requiere absorber radiación con menor longitud de onda (más energética) para promover el movimiento electrónico entre el HOMO y el LUMO. Por otra parte, el derivado **TFA-BCACH<sub>3</sub>** con cuyo  $\epsilon = 34000$  se explica el corrimiento hacia longitudes de onda más grandes para su respectivo máximo de absorción en 370 nm. Finalmente, el derivado con menor coeficiente de absorptividad molar es el **TFA-BCA**,  $\epsilon = 25000$ , siendo este el que más se diferencia entre los derivados sintetizados y se estima que este comportamiento ocurre a causa de las diferencias en la naturaleza de los sustituyentes; para esta sustancia se observó un máximo de absorción en 368 nm, muy próximo al máximo del **TFA-BCACH<sub>3</sub>**.

Para 2 de 3 sustancias bajo estudio se observaron valores más altos en sus respectivos coeficientes de absorptividad molar en contraste con el DCTB cuyo coeficiente corresponde a  $\epsilon = 33980$  (Miranda, s. f.). Las unidades de los coeficientes se presentan en: ( $\epsilon_{355}: L * mol^{-1} * cm^{-1}$ ).

**Figura 7.** Absortividad molar de los derivados de TFA a la  $\lambda = 355\text{nm}$ .

### 7.5. Espectroscopia UV de reflectancia difusa

La formulación matemática de la teoría de Kubelka-Munk ha sido reproducida por muchos autores, y esta descrita mediante la ecuación:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1-R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{k}{s} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

El parámetro  $R_{\infty}$  corresponde a la reflectancia de una muestra de grosor finito,  $k$  y  $s$ , son los coeficientes de absorción y de dispersión, respectivamente.  $F(R_{\infty})$  se define como la función de reemisión.

La derivación de la ecuación anterior asume que la radiación incidente es monocromática y por tanto no se manifiesta dependencia de la longitud de onda de radiación. Sin embargo, se puede anticipar dependencia de dicho parámetro cuando las dimensiones de los centros de dispersión son comparables (con valores menores) a la longitud de onda de la radiación incidente (Morris *et al.*, 1982).

$$s = c\lambda^{-n} \text{ (Ecuación 9)}$$

Siendo  $c$  una constante y el exponente  $n$ , se encuentra entre los límites  $0 < n < 4$ , donde el límite mayor es el característico de la dispersión de Rayleigh. De este modo, la **Ecuación 8** se define finalmente como:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1-R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{k}{c} \lambda^n \text{ (Ecuación 10)}$$

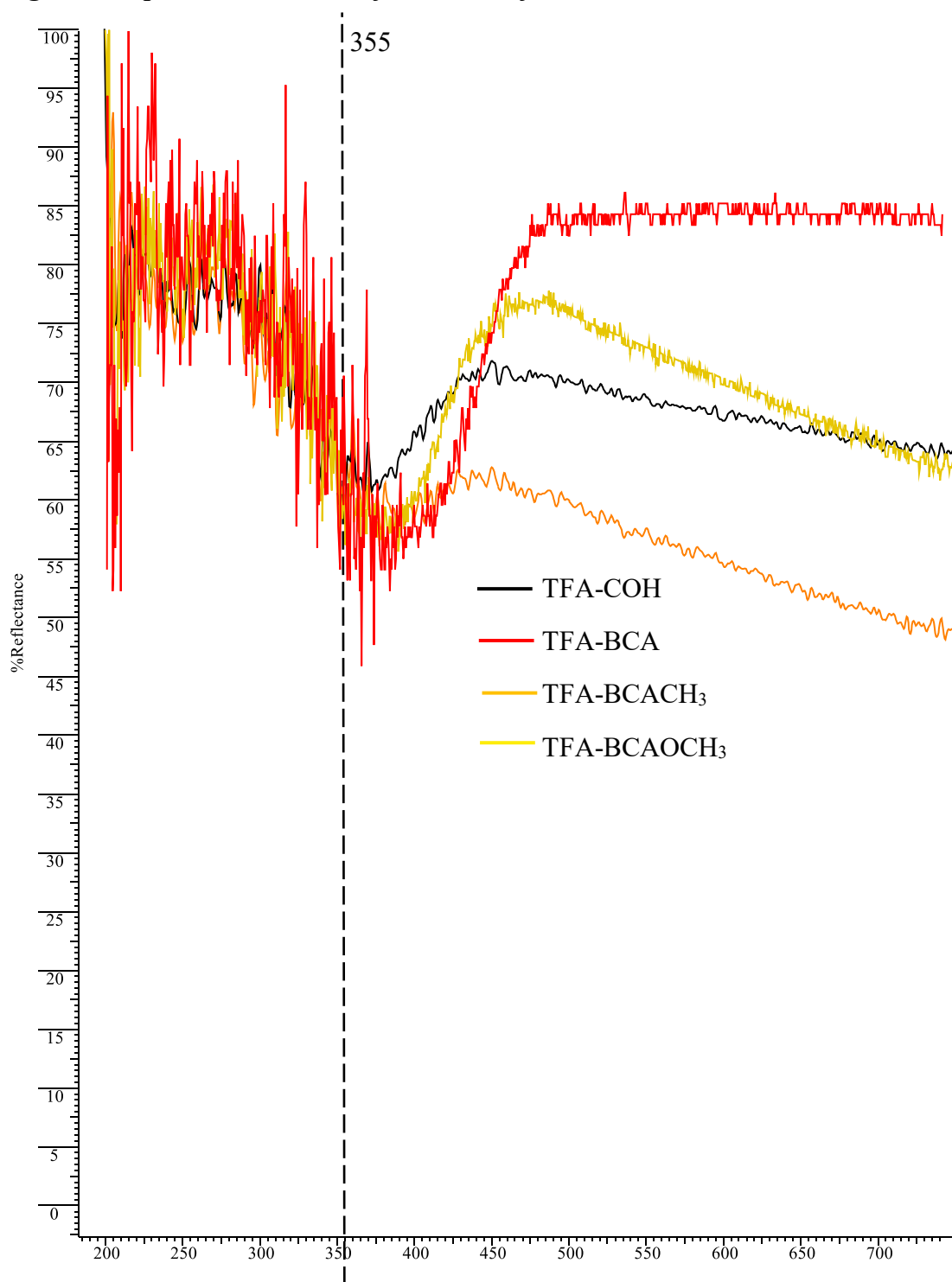
Cuando los valores  $k$  y el tamaño de los centros de dispersión son pequeños y están próximos entre sí, se considera una ecuación independiente de la longitud de onda incidente y se aplica la teoría de Kubelka-Munk que se describió en la **Ecuación 8** (Morris et al., 1982).

Para los derivados de TFA estudiados en este trabajo se reconoce la dependencia de la longitud de onda de la radiación incidente a causa de los cambios reflejados en el valor de  $k/s$  que se muestran en los **Anexos 3, 4, 5 y 6** y se aplica la **Ecuación 10**.

La técnica de reflectancia difusa describe el comportamiento electrónico en la estructura de un sólido, donde a través de los espectros de reflexión se proporciona información sobre las transiciones electrónicas de los diferentes orbitales moleculares en un sólido. Dicho lo anterior, la excitación de los electrones desde el HOMO al LUMO se evidencia por una disminución en la reflexión a una longitud de onda dada.

La **Figura 8** muestra las curvas de decaimiento de reflectancia para los diferentes derivados de TFA en el rango de 200 a 700 nm. En las curvas se observan regiones de mínima intensidad relativa reflejada en el rango que va de 350 a 400 nm, lo que significa que en este rango las matrices sintetizadas absorben la radiación, lo que es evidencia del desempeño en las condiciones de trabajo en MALDI con una fuente de radiación con longitud de onda de 355 nm. También, se evidencia que estos valores muestran concordancia con lo encontrado en los espectros UV-Vis, siendo este el mismo intervalo de aparición de los máximos de

absorción en Ultravioleta Visible. Así mismo, en la **Tabla 4** también se muestran los valores experimentales de  $E_g$ , energía del espacio de banda, que fueron calculados conforme a la **Ecuación 10**, más adelante se discuten estos resultados con mayor detalle.

**Figura 8.** *Espectros de UV de Reflectancia Difusa de los derivados de TFA.*

**Tabla 4.** *Comparación cuantitativa de UV-Vis y UV de reflectancia para las moléculas bajo estudio.*

MÓLECULA	$E_i$ (teórica) (eV)	$E_g$ (eV)	$\lambda$ Max. Abs. (nm)
TFA-COH	-	2.78	355
TFA-BCA	7.39	2.66	368
TFA-BCACH <sub>3</sub>	7.33	2.54	370
TFA-BCAOCH <sub>3</sub>	7.36	2.63	358

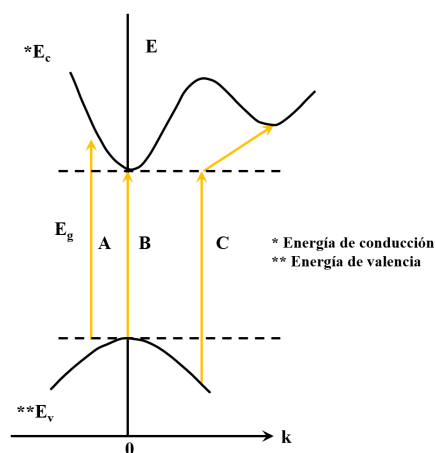
El valor numérico de  $E_g$  permite elucidar cual será la energía necesaria para promover el movimiento de un electrón de la capa de valencia a un nivel de mayor energía en materiales usados como semiconductores altamente dispersantes (*movimientos electrónicos desde la capa de valencia a la capa de conducción en una red orgánica*).

Al hacer una analogía del movimiento electrónico de los semiconductores con los movimientos electrónicos que ocurren dentro de las matrices MALDI, donde se involucran estados excitados intermedios; la probabilidad de formar dichos estados está directamente relacionada con el valor de  $E_g$  para la formación primaria de iones.

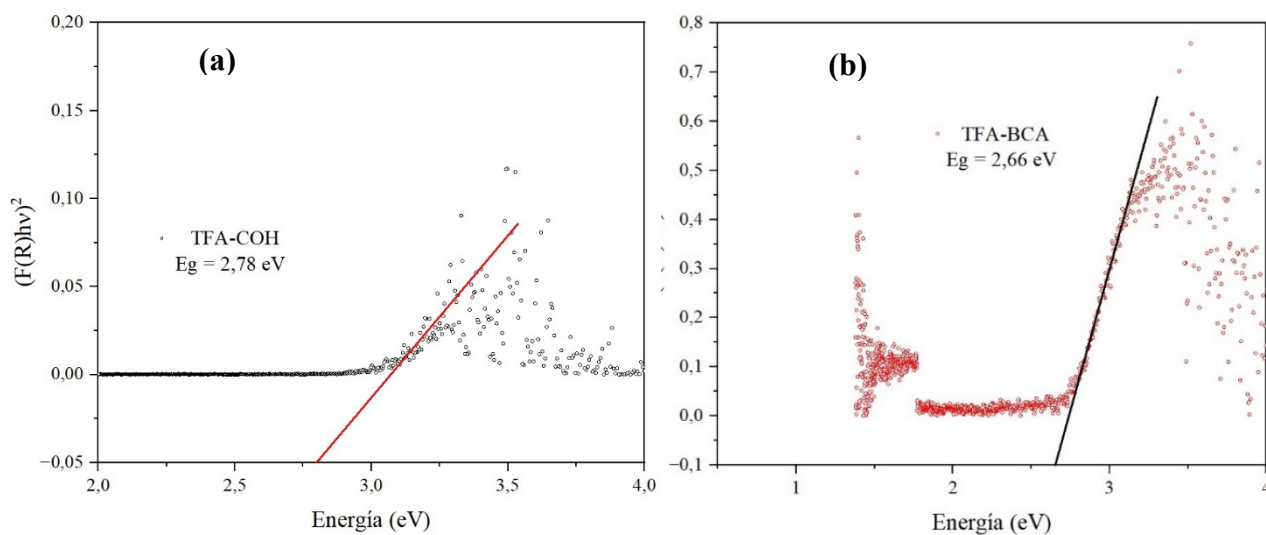
En la **Tabla 4** se evidencia la correlación entre los valores  $E_g$  encontrados por extrapolación de la recta pendiente de las gráficas para cada derivado, (donde la ordenada corresponde al valor de la transición indirecta,  $(F(R)*h\nu)^{1/2}$  y la abscisa corresponde a la energía de la fuente de radiación,  $(h\nu)$ ) con los valores teóricos calculados mostrados en la **Tabla 2**, cabe mencionar que se guarda la proporcionalidad de las transiciones intermedias de  $E_g$  versus las transiciones directas de  $E_i$ .

Como se puede observar en las **Figuras 10 y 11** y la **Tabla 4**, la energía del espacio de banda,  $E_g$ , de los derivados de TFA está en un rango que va de 2,20 a 2,70 eV, muy por debajo de la energía de un fotón de la fuente del láser Nd:YAG que corresponde a 3,49 eV para formar el excitón, esto significa que la absorción de un fotón es suficiente para promover el salto de los electrones.

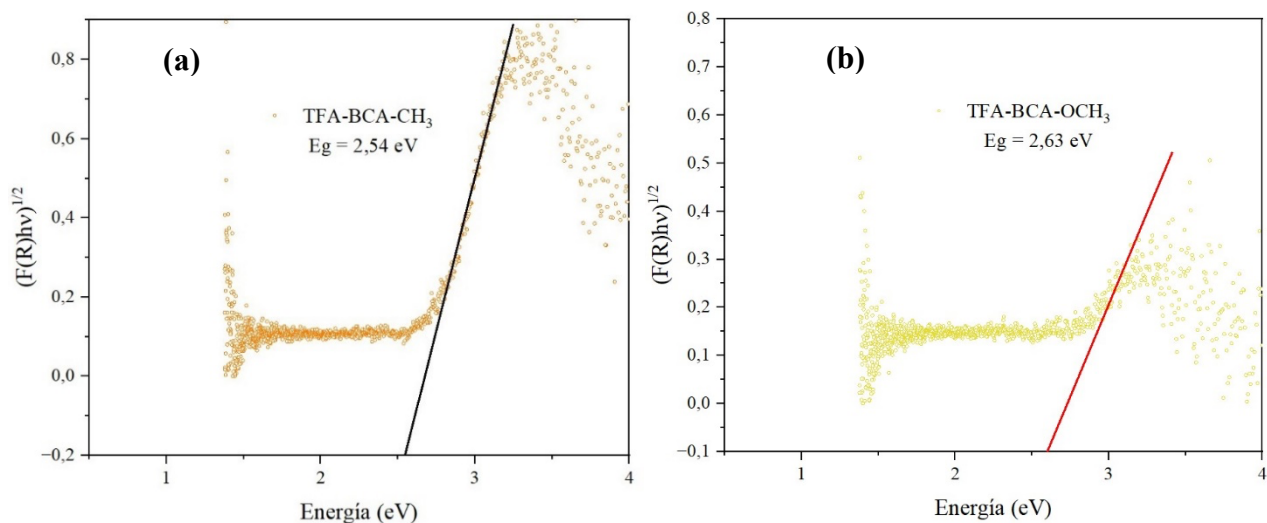
**Figura 9.** *Representación simplificada de la banda de transición: A. Banda de transición directa prohibida de un fotón con energía  $E_g$ , B. Transición permitida y C. Banda de transición indirecta (López & Gómez, 2012).*



**Figura 10.** *Representación gráfica para el método de Kubelka-Munk para la molécula a) TFA-COH, b) TFA-BCA.*



**Figura 11.** Representación gráfica para el método de Kubelka-Munk para el derivado a) TFA-BCACH<sub>3</sub>, b) TFA-BCAOCH<sub>3</sub>.

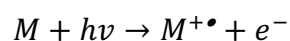
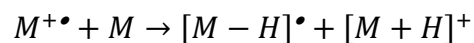


## 7.6. LDI-MS

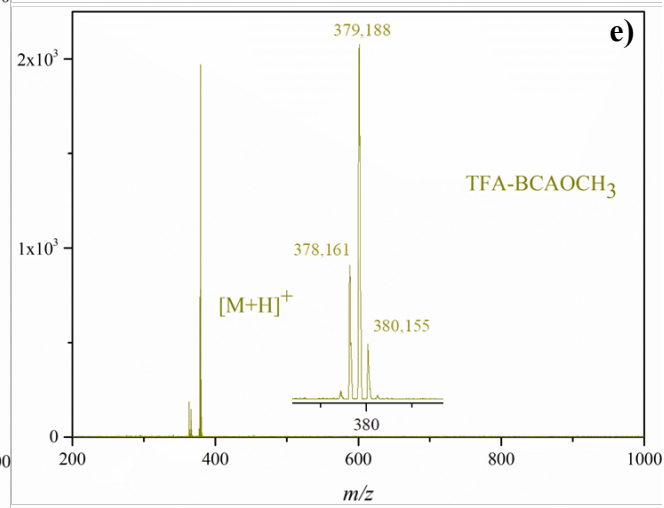
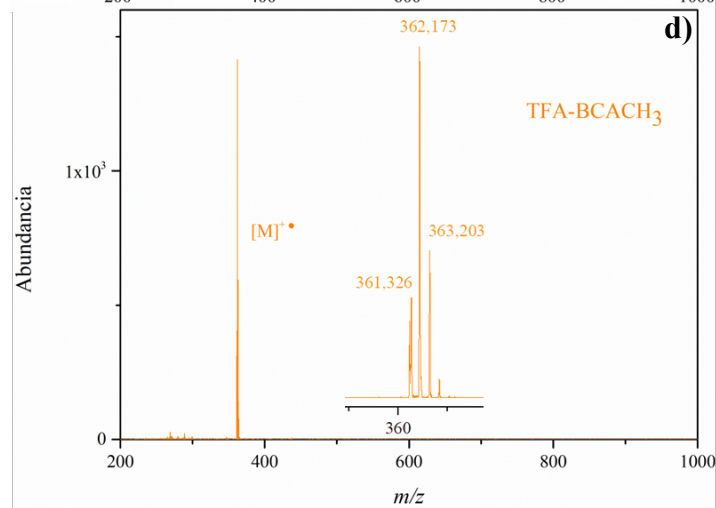
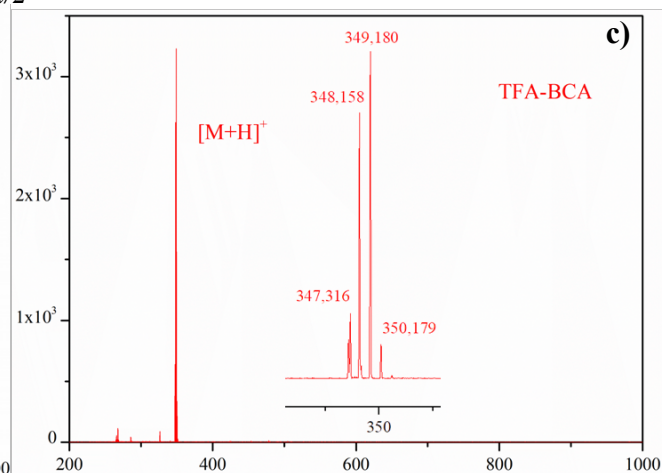
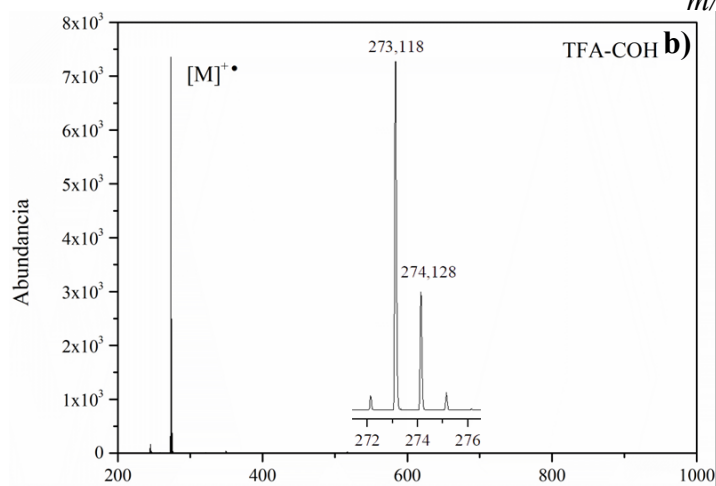
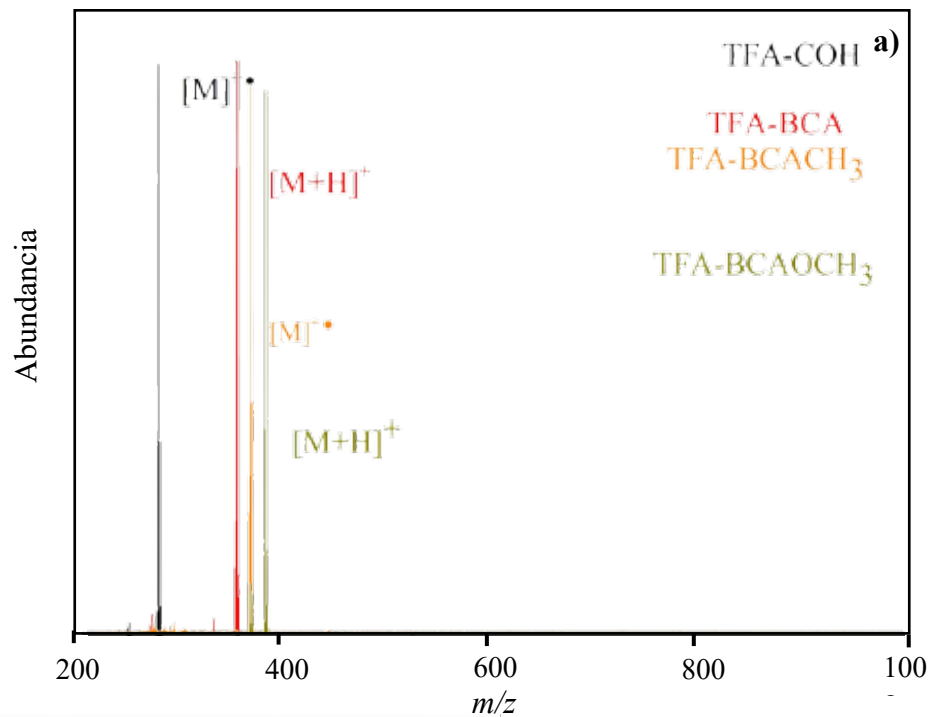
Un aspecto crucial a tener en cuenta al momento de seleccionar una matriz para un análisis MALDI es su espectro base, el cual debe mostrar el menor número de señales provenientes de la matriz, fragmentos o agregados con el objetivo de que las señales producidas en un experimento MALDI sean inequívocamente de los analitos.

Para esto LDI ofrece información sobre la capacidad que tiene un compuesto (matriz) en estado sólido de ionizarse bajo las condiciones operacionales del equipo; por ello en la **Figura 12** se muestran los espectros LDI de los derivados de TFA, usando 4,7 mM de cada compuesto en *target*, y 1,25  $\mu$ J/pulso, en los cuales se observaron pocas señales, lo que demuestra que no hay formación de agregados (clústeres), iones multicargados, excesiva fragmentación, ni presencia de aductos como:  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  o  $[M+Ag]^+$ ; contrario a lo que sucede con el DCTB (**Anexo 7**). Lo que implica que los compuestos en estudio logran estabilizar la carga generada en el proceso de ionización debido a su alta conjugación, generando un espectro limpio y sin fondo, especialmente en la región de masas bajas. El ion

más abundante en los espectros LDI de los derivados concuerda con la relación  $m/z$  del catión radical  $[M]^{+\bullet}$  respectivo con contribuciones de especies protonadas  $[M+H]^+$ , las cuales se pueden generar debido a diferentes reacciones como:



**Figura 12. a) Comparación de espectros LDI de los derivados de TFA: TFA-COH (negro), TFA-BCA (rojo), TFA-BCACH3 (naranja), TFA-BCAOCH3 (amarillo ocre), espectros LDI y perfiles isotópicos experimentales de b) TFA-COH, c) TFA-BCA, d) TFA-BCACH3 y e) TFA-BCAOCH3.**



Con base en los espectros anteriores, en la **Tabla 5** se resume el valor de masa calculada monoisotópica y masa experimental para cada señal, con su respectiva exactitud relativa de la masa, valores de la relación señal-ruido (S/N) y patrón isotópico. Los derivados **TFA-BCA** y **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** tienen mayor contribución de la señal correspondiente a  $[M+H]^+$  en  $m/z$  349,180 y  $m/z$  379,188, respectivamente, probablemente debido a reacciones bimoleculares (Knochenmuss, 2013). Debido a que el espectro LDI del derivado **TFA-BCACH<sub>3</sub>** exhibe prominentemente la formación del catión radical, estos iones de la matriz resultan ser efectivos en procesos de ionización por transferencia electrónica.

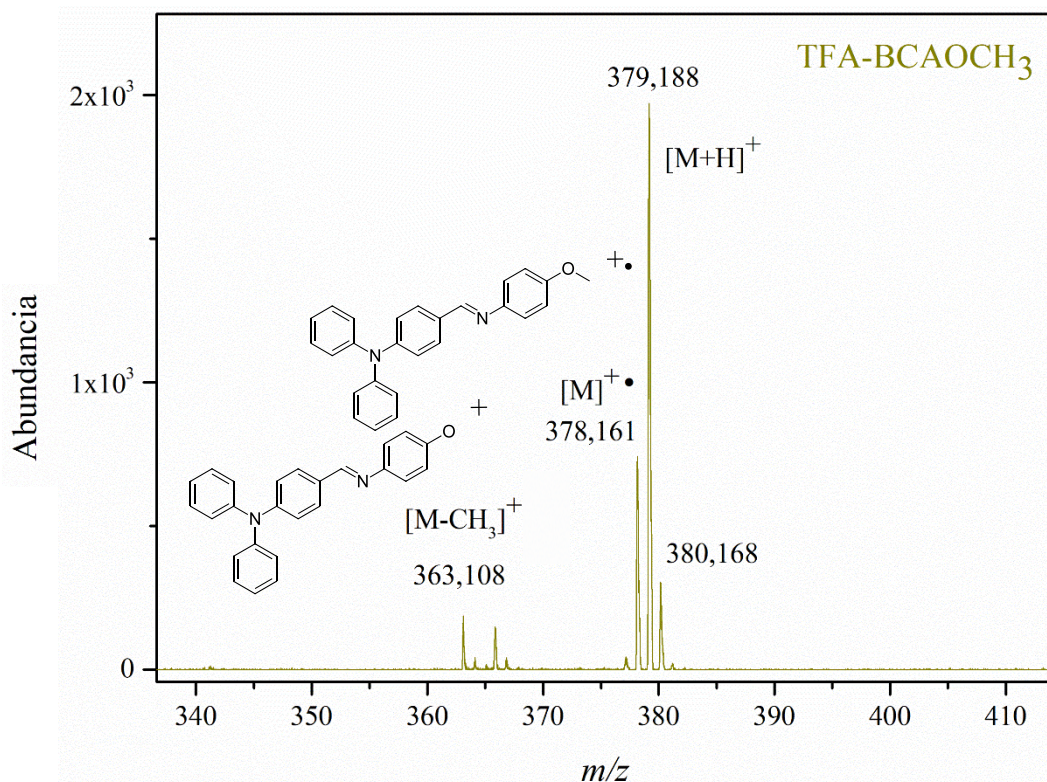
Los altos valores de S/N y abundancia indican que los compuestos **TFA-COH** y **TFA-BCA** se ionizan con mayor facilidad que los compuestos **TFA-BCACH<sub>3</sub>** y **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** utilizando las mismas condiciones en la toma de los espectros de masas, por lo que se está garantizando la formación de iones primarios de la matriz (**Figura 13**).

**Tabla 5.** Señales observadas en el espectro de masas LDI de los derivados de TFA en modo de ionización positivo, con su respectiva masa experimental, masa calculada, exactitud relativa en la masa, S/N y patrón isotópico.

Especie química detectada	Fórmula molecular	Masa calculada	Masa experimental	$\Delta$ ppm	S/N	Patrón isotópico
<b>TFA-COH</b>	$C_{19}H_{15}NO$	273,115	273,118	10,984	1015,8	273,118; 274,128
<b>TFA-BCA</b>	$C_{25}H_{20}N_2$	348,162	348,158	11,489	372,8	347,316; 348,158; 349,180

						361,326;
<b>TFA-</b>						
	$C_{26}H_{22}N_2$	362,178	362,173	13,805	207,5	362,173;
<b>BCACH3</b>						363,203
<hr/>						
						378,161;
<b>TFA-</b>						
	$C_{26}H_{22}N_2O$	378,173	378,161	31,732	92,1	379,188;
<b>BCAOCH3</b>						380,155

De los derivados de TFA el único que presentó la formación de fragmentos fue el **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** que tiene una señal en  $m/z$  363,682, el cual tiene de diferencia 15 unidades, con respecto al peso del ion molecular, lo correspondiente a la pérdida de un grupo metilo (**Figura 13**). Por otro lado, los derivados **TFA-BCA** y **TFA-BCACH<sub>3</sub>** no exhiben fragmentación y se observa principalmente el catión radical. De acuerdo con los **Anexos 8, 9, 10 y 11**, los patrones isotópicos y sus respectivas abundancias coinciden con los patrones isotópicos simulados.

**Figura 13. Patrón de fragmentación del derivado TFA-BCAOCH<sub>3</sub>.**

### 7.6.1. Parámetros dependientes de la energía de la fuente

El desempeño de una matriz en MALDI está relacionado con su capacidad para formar iones primarios. El láser utilizado (Nd:YAG) en los experimentos MALDI puede modularse para emitir pulsos entre 0,39 a 3,0 μJ, en teoría una matriz debe formar iones primarios, a bajos valores de energía por pulso. En la **Figura 14** se visualiza la relación entre la energía por pulso del láser y la abundancia de iones primarios de los derivados de TFA objeto de esta investigación.

Las curvas de aparición de iones tienen una estructura similar para todos los compuestos hasta alcanzar 1,80 μJ en donde el derivado TFA-BCA alcanza su máximo de generación de iones, mientras que los derivados TFA-BCACH<sub>3</sub> y TFA-BCAOCH<sub>3</sub> alcanzan su máximo a

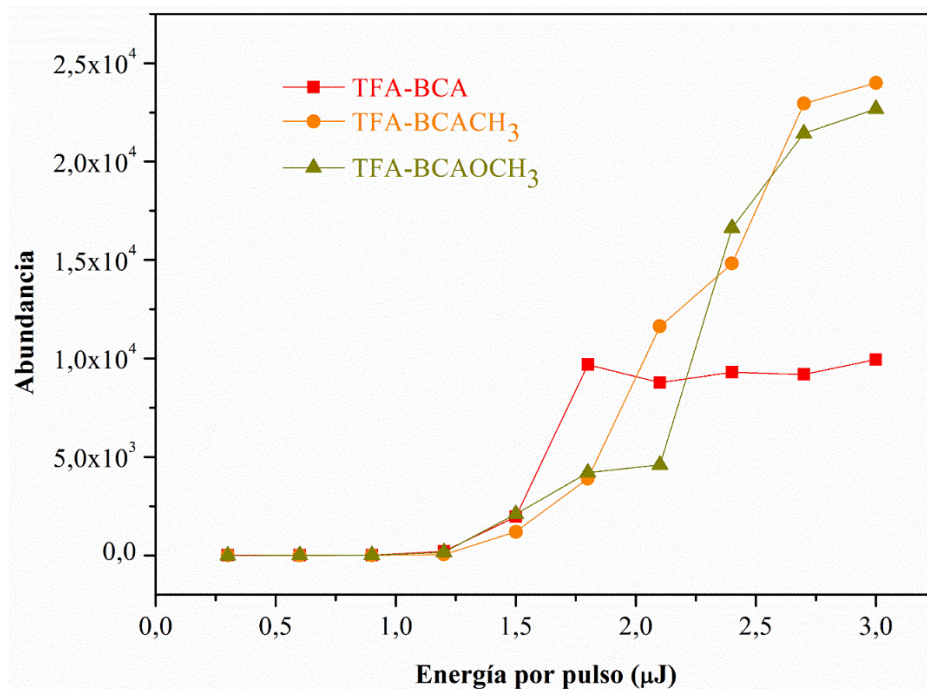
2,60  $\mu\text{J}$ , mostrando estos últimos dos una mayor estabilidad al soportar mayores energías por pulso proveniente del láser antes de empezar a fragmentarse por el exceso de energía.

La sección lineal de la curva de aparición se puede ajustar a una función de potencia:

$$Y \sim H^m \quad \text{(Ecuación 11)}$$

Donde Y es la abundancia de iones, H se relaciona con la energía del pulso y m es la pendiente que describe el desempeño de la matriz, en términos de producción de iones primarios. Un alto valor de m implica una alta producción de iones al aumentar la energía del láser. Las ecuaciones de la región lineal ajustada a la ecuación de potencia  $Y=H^m$  en las curvas de aparición de iones de los derivados son: **TFA-BCA** ( $y = 36,6x^{9,6}$ ), **TFA-BCACH<sub>3</sub>** ( $y = 11,7x^{9,8}$ ) y **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** ( $y = 93,7x^{5,9}$ ). Las respectivas pendientes de cada ecuación indican que, bajo condiciones experimentales idénticas, todos los derivados estudiados tienen la capacidad de absorber energía de manera eficiente, siendo el TFA-BCA y TFA-BCACH<sub>3</sub> los derivados con mejor desempeño en formación de iones primarios.

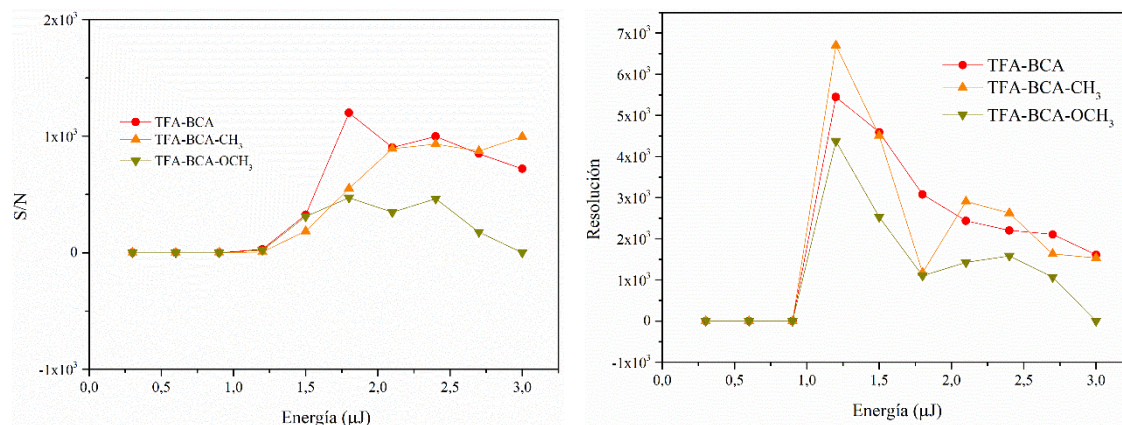
**Figura 14.** Curva de aparición de iones de los derivados de TFA.



La **Figura 15** muestra la evolución de la relación señal ruido (S/N) y la resolución de la señal del catión radical de los derivados de TFA a medida que se aumenta la energía del láser. Enseñando la misma tendencia entre ellos a medida que se aumenta la energía del láser. Como se esperaba tanto el valor de S/N como el de la resolución se incrementan significativamente y alcanzan un máximo cerca de dos veces la energía de aparición de los derivados de TFA, y después de esto disminuyen ambos valores al tiempo que se aumenta la energía del láser. Como se puede observar en la **Figura 15** la abundancia aumenta con la energía del láser o tiende a permanecer constante, por lo tanto, la disminución de los valores de S/N y resolución se debe a un aumento en el ruido espectral, producido por los procesos de fragmentación de la matriz a altas energías del láser. Los derivados de TFA presentan valores máximos según la **Tabla 6**, parámetros como la relación S/N y resolución van de la mano, siendo indicativos del desempeño de una matriz. Según se observó en la **Tabla 6** la matriz **TFA-BCA** es aquella en la cual estos parámetros tienen valores mayores, por lo que se infiere que la misma podría ser la matriz con mejor desempeño para análisis MALDI, por ese motivo se propone como candidata para análisis de muestras en MALDI.

**Tabla 6.** *Comparación de los valores de la relación S/N y resolución entre los derivados de TFA.*

Derivado de TFA	Relación S/N	Resolución
TFA-BCA	1250	6750
TFA-BCACH <sub>3</sub>	900	5500
TFA-BCAOCH <sub>3</sub>	500	4500

**Figura 15. Curvas de relación S/N y resolución versus energía del láser.**

### 7.6.2. Experimentos de protonación y cationización de los derivados de TFA

Los experimentos de protonación y cationización se prepararon como se mencionó anteriormente (ver **Sección 6.3**).

Otro de los iones más abundantes en todos los espectros de masas además del ion molecular, corresponde a la formación del catión  $[M+H]^+$ , comportamiento que describe cierta afinidad por la protonación. Sin embargo, estos espectros de protonación enseñaron una afinidad protónica baja que permite la formación de la especie  $[M+H]^+$  y luego la transferencia del protón al analito (Knochenmuss, 2006).

En los ensayos hechos, los espectros LDI obtenidos, acidificados (ver **Anexos 12, 13, 14 y 15**) y sin acidificar (ver **Anexos 8, 9, 10 y 11**) son muy similares. Esto implica que aún bajo condiciones ácidas los derivados **TFA-BCA** y **TFA-BCACH<sub>3</sub>** no se protonan, a diferencia del derivado **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** en el que se observa que en ambos espectros (acidificado y sin acidificar) el ion pico de base corresponde a la especie  $[M+H]^+$ , por lo tanto se prevee como una matriz de transferencia protónica. En la **Tabla 7** se recopila y resume la información obtenida de los espectros acidificados.

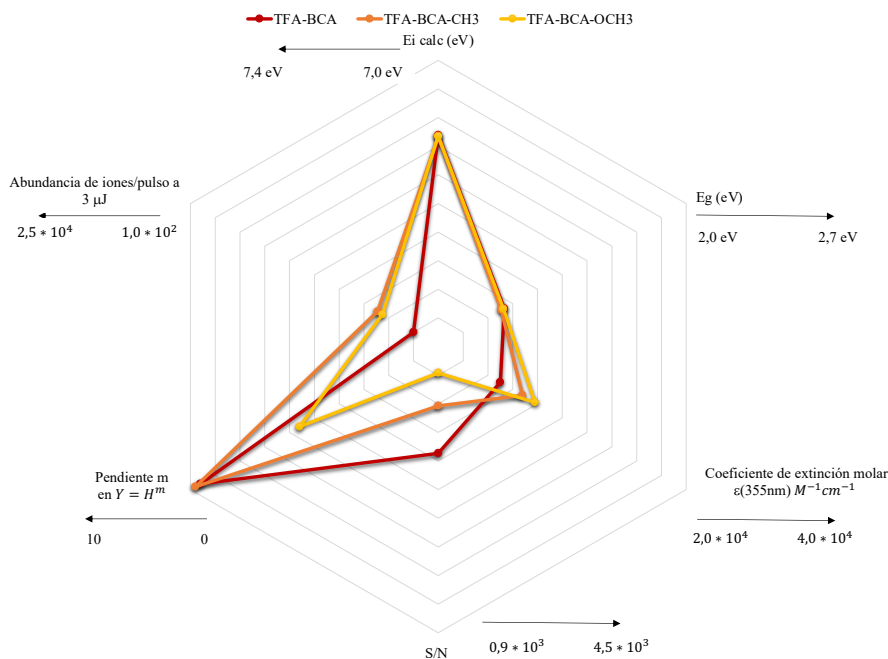
Por otra parte, el proceso de transferencia catiónica es análogo al de transferencia protónica, pues para que este ocurra, previamente la matriz debe adquirir un catión en fase gaseosa y transferirlo al analito. Para estos experimentos se usaron los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y  $\text{Ag}^+$ , tal y como se describe previamente en la **Sección 6.5**. En los cuales no se observan (ver **Anexos 16-26**) señales  $m/z$  correspondientes a las matrices cationizadas  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  y  $[\text{M}+\text{Ag}]^+$ , mostrando que estos procesos de transferencia catiónica son poco probables.

**Tabla 7. Comparativo de señales encontradas en los espectros acidificados entre los derivados de TFA.**

Especie química detectada	Fórmula molecular	Relación $m/z$	S/N
[TFA-COH+H]	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}$	274,126	106,9
[TFA-BCA+H]	$\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_2$	349,183	98,4
[TFA-BCACH <sub>3</sub> +H]	$\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2$	363,189	515,9
[TFA-BCAOCH <sub>3</sub> +H]	$\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}$	379,191	608,1

En la **Figura 16** se puede observar un mejor panorama de comparación de todas las propiedades fisicoquímicas evaluadas anteriormente que nos muestra que los derivados con mejor comportamiento fueron **TFA-BCA** y **TFA-BCACH<sub>3</sub>** para matrices del tipo MALDI-ET.

**Figura 16. Gráfico de radar comparativo de propiedades fisicoquímicas evaluadas de las matrices derivadas de TFA.**



## 8. Conclusiones

Conforme a los resultados de los cálculos computacionales de  $E_i$ , se enfocó la síntesis en los siguientes derivados de TFA con el mayor valor, **TFA-BCA** ( $E_i=7,39$ ), **TFA-BCACH<sub>3</sub>** ( $E_i=7,33$ ) y **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** ( $E_i=7,36$ ).

Con el análisis de los espectros de UV-Vis fue posible establecer que los máximos de absorción se aproximan a la longitud de onda de emisión de la fuente característica de la técnica (355 nm), hecho que se corrobora con valores experimentales de  $\epsilon$ , a partir de la regresión lineal hecha de las variables que componen la ecuación de Beer-Lambert, lo que demuestra que el derivado **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** es capaz de absorber radiaciones de menor frecuencia.

De acuerdo con los cálculos de  $E_g$  aplicando el método de Kubelka-Munk, se corroboró que las energías de ionización calculadas fueron un aspecto determinante para la síntesis de las matrices propuestas en este trabajo, ya que se evidenció proporcionalidad entre los valores de  $E_g$  y  $E_i$ , siendo el  $E_g$  igual a 2,66 correspondiente a la matriz **TFA-BCA**, el mayor con lo que se demuestra mayor estabilidad para esta especie, al requerir mayor energía para promover el movimiento electrónico.

Según la comparación de los espectros de LDI acidificados y sin acidificar se encontró que el ion más abundante de los derivados **TFA-BCA** y **TFA-BCACH<sub>3</sub>** concuerdan con la relación  $m/z$  del catión radical  $[M]^{+\bullet}$ , esto indica que estas matrices resultan ser efectivas en procesos de ionización por transferencia electrónica bajo condiciones MALDI.

Así mismo, el ensayo acidificado efectivo que obtuvo el derivado **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>**, el cual tiene el ión pico de base en la señal correspondiente a  $[M+H]^+$  en  $m/z$  379,188, y se presume que esto ocurre debido a reacciones bimoleculares.

Bajo el parámetro  $m$  (desempeño de la matriz) calculado, se deduce que las matrices con mejor desempeño fueron la **TFA-BCA** y **TFA-BCACH<sub>3</sub>** ( $m=9,60$  y  $m=9,80$  respectivamente).

De los ensayos de protonación se infiere que el derivado **TFA-BCAOCH<sub>3</sub>** al tener como ion pico de base a la especie  $[M+H]^+$  se desempeñará mejor como matriz MALDI-PT.

Y de los ensayos de cationización se concluye que bajo condiciones MALDI ningún derivado forma aductos con los metales probados  $Na^+$ ,  $K^+$ , y  $Ag^+$ .

## 9. Divulgación de resultados

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación serán divulgados con un manuscrito que será entregado a la biblioteca de la Universidad Industrial de Santander. Además, se espera la participación en el Congreso Latinoamericano LatinXChem 2022 de manera virtual, en el mes de noviembre, del presente año.

### Bibliografía

- Adachi, C., Tsutsui, T., & Saito, S. (1989). Organic electroluminescent device having a hole conductor as an emitting layer. *Applied Physics Letters*, 55(15), 1489-1491. <https://doi.org/10.1063/1.101586>
- Allain, C., Schmidt, F., Lartia, R., Bordeau, G., Fiorini-Debuisschert, C., Charra, F., Tauc, P., & Teulade-Fichou, M.-P. (2007). Vinyl-Pyridinium Triphenylamines: Novel Far-Red Emitters with High Photostability and Two-Photon Absorption Properties for Staining DNA. *ChemBioChem*, 8(4), 424-433. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600483>
- Avery, H. E. (1982). *Cinética química básica y mecanismos de reacción*. Reverte.
- Calvano, C. D., Ventura, G., Trotta, M., Bianco, G., Cataldi, T. R. I., & Palmisano, F. (2017). Electron-Transfer Secondary Reaction Matrices for MALDI MS Analysis of Bacteriochlorophyll a in *Rhodobacter sphaeroides* and Its Zinc and Copper Analogue Pigments. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(1), 125-135. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1514-x>
- Carrasco, D., & Quesada, A. (2007). *CIANOBACTERIAS PLANCTÓNICAS Y CIANOTOXINAS EN EMBALSES ESPAÑOLES*.
- Carrasco, D.; Quesada, A. *CIANOBACTERIAS PLANCTÓNICAS Y CIANOTOXINAS EN EMBALSES ESPAÑOLES*. 2017,2017, 1-320. (s. f.).
- Castellanos-García, L. J., Agudelo, B. C., Rosales, H. F., Cely, M., Ochoa-Puentes, C., Blanco-Tirado, C., Sierra, C. A., & Combariza, M. Y. (2017). Oligo p-Phenylenevinylene Derivatives as Electron Transfer Matrices for UV-MALDI. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(12), 2548-2560. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1783-z>
- Chang, H.-W., Lin, K.-H., Chueh, C.-C., Liou, G.-S., & Chen, W.-C. (2009). New P-type of poly(4-methoxy-triphenylamine)s derived by coupling reactions: Synthesis, electrochromic behaviors, and hole mobility: P-Type of Poly(4-Methoxy-Triphenylamine). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(16), 4037-4050. <https://doi.org/10.1002/pola.23465>

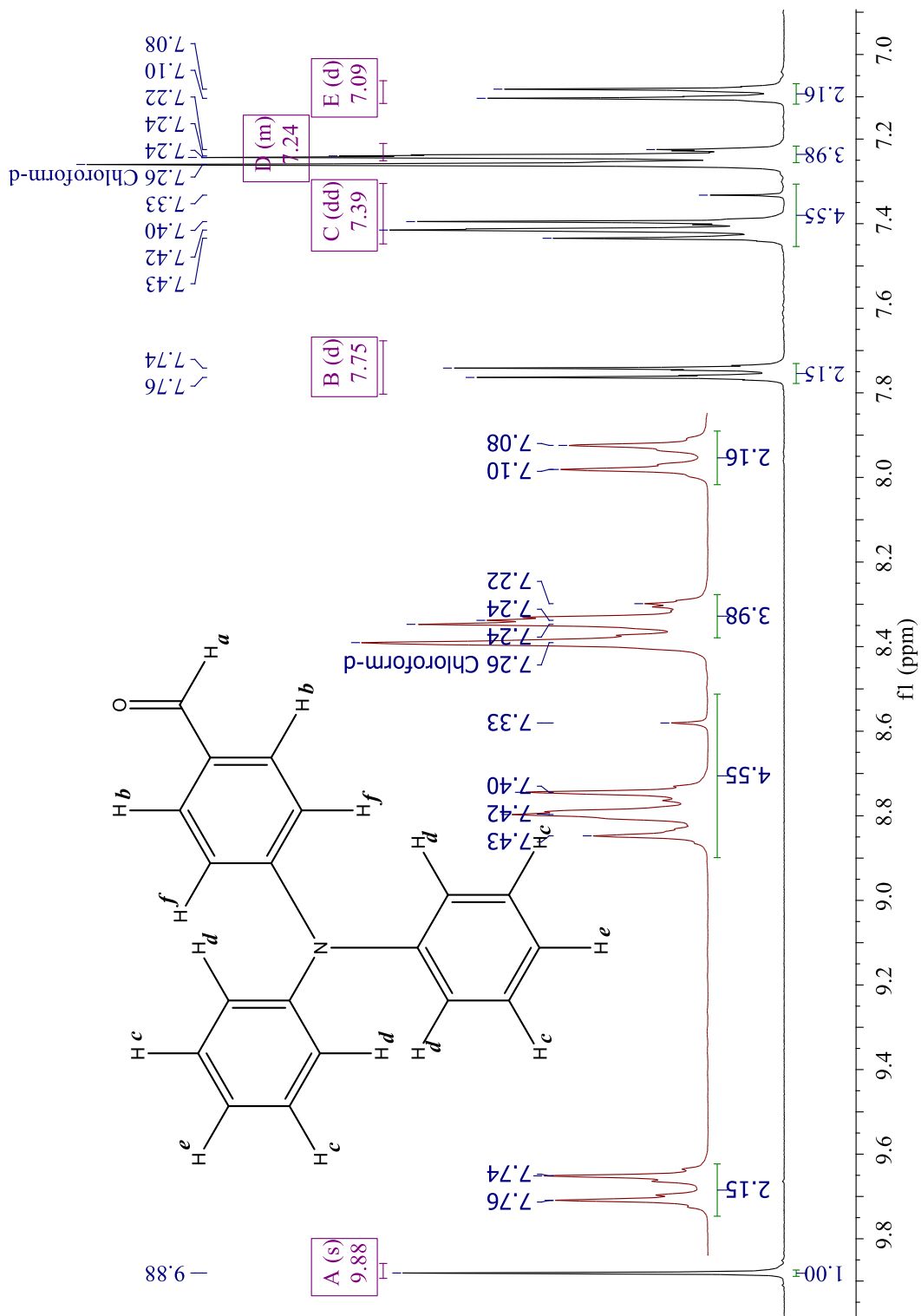
- Cristancho, L., Combariza, M., & Ramírez-Pradilla, J. S. (2016). *DISEÑO RACIONAL Y SÍNTESIS DE NUEVAS MATRICES MALDI DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA BASADAS EN 2,7-DIBROMOFLUORENO*.
- Ehring, H., Karas, M., & Hillenkamp, F. (1992). Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 27(4), 472-480. <https://doi.org/10.1002/oms.1210270419>
- Fan, C., Pu, S., Liu, G., & Yang, T. (2008). Substituent position effect on the properties of isomeric photochromic diarylethenes bearing chlorine atoms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 194(2-3), 333-343. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.08.032>
- Fave, C., Hissler, M., Kárpáti, T., Rault-Berthelot, J., Deborde, V., & Toupet, L. (2004). Connecting  $\pi$ -Chromophores by  $\sigma$ -P-P Bonds: New Type of Assemblies Exhibiting  $\sigma$ - $\pi$ -Conjugation. *Journal of the American Chemical Society*, 6. <https://doi.org/10.1021/ja0317067>
- Fitzgerald, M. C., Parr, G. R., & Smith', L. M. (s. f.). *Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides*. 8. <https://doi.org/10.1021/ac00070a007>
- Gabriel, M., Knappek, S., & Zumbusch, G. (2007). *Numerical Simulation in Molecular*.
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista chilena de infectología*, 29(3), 263-272. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000300003>
- Ge, Z., Hayakawa, T., Ando, S., Ueda, M., Akiike, T., Miyamoto, H., Kajita, T., & Kakimoto, M. (2008). Spin-Coated Highly Efficient Phosphorescent Organic Light-Emitting Diodes Based on Bipolar Triphenylamine-Benzimidazole Derivatives. *Advanced Functional Materials*, 18(4), 584-590. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700913>
- Giraldo-Dávila, D., Chacón-Patiño, M. L., Ramirez-Pradilla, J. S., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2018). Selective ionization by electron-transfer MALDI-MS of vanadyl porphyrins from crude oils. *Fuel*, 226, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.016>
- Gross, J. H. (2004). *Mass spectrometry: A textbook*. Springer.
- Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>
- Hillenkamp, F., & Beavis, R. C. (s. f.). *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers*. 10. [https://doi.org/10.1021/ac00024a002?casa\\_token=vhXW5OZcXA8AAAAA:nnUHYnzN2hZaPia\\_bWTT1K6Q1DU5r7b18pK6trurnJ8sndpHPokHadblm1RhVqsnr25yNnMmcaOkqnnl](https://doi.org/10.1021/ac00024a002?casa_token=vhXW5OZcXA8AAAAA:nnUHYnzN2hZaPia_bWTT1K6Q1DU5r7b18pK6trurnJ8sndpHPokHadblm1RhVqsnr25yNnMmcaOkqnnl)
- Hsiao, S.-H., Liou, G.-S., Kung, Y.-C., & Lee, Y.-J. (2010). Synthesis and characterization of electrochromic poly(amide-imide)s based on the diimide-diacid from 4,4'-diamino-4''-methoxytriphenylamine and trimellitic anhydride. *European Polymer Journal*, 46(6), 1355-1366. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.03.016>
- Hurtado, P., & Martínez, B. (2012). *Estudio de agregados supramoleculares mediante técnicas de desorción/ionización y espectroscopia láser*.
- Jensen, F. (2017). *Introduction to Computational Chemistry Computational Chemistry*.
- Jia, J., Zhang, Y., Xue, P., Zhang, P., Zhao, X., Liu, B., & Lu, R. (2013). Synthesis of dendritic triphenylamine derivatives for dye-sensitized solar cells. *Dyes and Pigments*, 96(2), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.09.015>

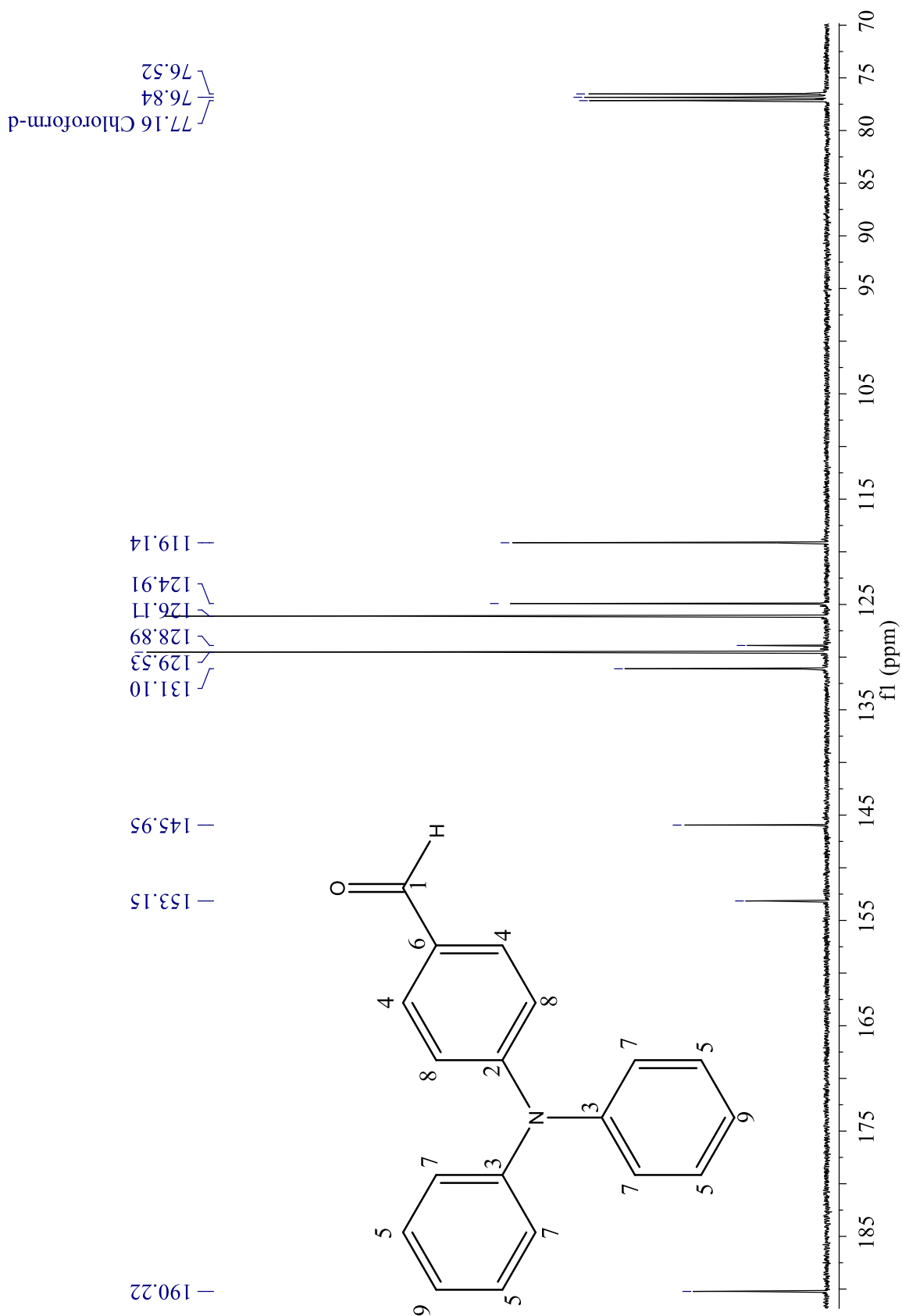
- Jiang, Z., Chen, Y., Yang, C., Cao, Y., Tao, Y., Qin, J., & Ma, D. (2009). A Fully Diarylmethylene-Bridged Triphenylamine Derivative as Novel Host for Highly Efficient Green Phosphorescent OLEDs. *Organic Letters*, 11(7), 1503-1506. <https://doi.org/10.1021/ol9001152>
- Juhasz, P., & Costello, C. E. (1993). Generation of large radical ions from oligometalloenes by matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7(5), 343-351. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290070508>
- Karas, M. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom.*, 12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200001\)35:1<1::AID-JMS904>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200001)35:1<1::AID-JMS904>3.0.CO;2-0)
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53-68. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(87\)87041-6](https://doi.org/10.1016/0168-1176(87)87041-6)
- Karas, M., & Krüger, R. (2003). Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews*, 103(2), 427-440. <https://doi.org/10.1021/cr010376a>
- Karas, Michael., Bachmann, Doris., & Hillenkamp, Franz. (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*, 57(14), 2935-2939. <https://doi.org/10.1021/ac00291a042>
- Kaufmann, R., Wingerath, T., Kirsch, D., Stahl, W., & Sies, H. (1996). Analysis of Carotenoids and Carotenol Fatty Acid Esters by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI-Post-Source-Decay Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 238(2), 117-128. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0264>
- Knochenmuss, R. (2006). Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *The Analyst*, 131(9), 966. <https://doi.org/10.1039/b605646f>
- Knochenmuss, R. (2013). MALDI ionization mechanisms: The coupled photophysical and chemical dynamics model correctly predicts 'temperature'-selected spectra: CPCD selected spectra. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(9), 998-1004. <https://doi.org/10.1002/jms.3248>
- Knochenmuss, R. (2014). MALDI mechanisms: Wavelength and matrix dependence of the coupled photophysical and chemical dynamics model. *The Analyst*, 139(1), 147-156. <https://doi.org/10.1039/C3AN01446K>
- Knochenmuss, R., Lehmann, E., & Zenobi, R. (1998). Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization. *European Journal of Mass Spectrometry*, 4(1), 421. <https://doi.org/10.1255/ejms.266>
- Knochenmuss, R., & Zenobi, R. (2003). MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes. *Chemical Reviews*, 103(2), 441-452. <https://doi.org/10.1021/cr0103773>
- Kouchi, H., Kawasaki, H., & Arakawa, R. (2012). A new matrix of MALDI-TOF MS for the analysis of thiolate-protected gold clusters. *Analytical Methods*, 4(11), 3600. <https://doi.org/10.1039/c2ay26013a>
- Lehninger, A. L. (1985). *Bioquímica* (2a ed). Ediciones Omega.
- Lewars, E. G. (2016). *Computational Chemistry*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30916-3>
- Li, C., Yang, W., Zhou, W., Zhang, M., Xue, R., Li, M., & Cheng, Z. (s. f.). *Branching effect for aggregation-induced emission in fluorophores containing imine and triphenylamine structure*. 11.
- Lian, X., Zhao, Z., & Cheng, D. (2017). Recent progress on triphenylamine materials: Synthesis, properties, and applications. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 648(1), 223-235. <https://doi.org/10.1080/15421406.2017.1302042>
- Liu, B., Li, X., Liu, M., Ning, Z., Zhang, Q., Li, C., Müllen, K., & Zhu, W. (2012). Photovoltaic performance of solid-state DSSCs sensitized with organic isophorone dyes: Effect of dye-

- loaded amount and dipole moment. *Dyes and Pigments*, *94*(1), 23-27.  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.11.005>
- Luzanov, A. V., & Pedash, Yu. F. (1987). Restricted Hartree-Fock method for open shells; Self-consistency and Koopmans' theorem. *Journal of Structural Chemistry*, *27*(4), 510-516.  
<https://doi.org/10.1007/BF00753995>
- Mahmood, A. (2016). Triphenylamine based dyes for dye sensitized solar cells: A review. *Solar Energy*, *123*, 127-144. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2015.11.015>
- Martín, M., & Ballesteros, M. (2010). *Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores*.  
Martín, M.; Ballesteros, M. *Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores*. 2010, 2010, 113-168. (s. f.).
- McCarley, T. D., McCarley, R. L., & Limbach, P. A. (1998). Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *70*(20), 4376-4379. <https://doi.org/10.1021/ac980527i>
- Miranda, D. S. G. (s. f.). *REACTIVIDAD EN FASE GASEOSA DE  $\alpha$ -CIANOFENILENVINILENOS COMO MATRICES MALDI DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA*. 86.
- Molin, L., Seraglia, R., Czarnocki, Z., Maurin, J. K., Pluciński, F. A., & Traldi, P. (2012). On the Primary Ionization Mechanism(s) in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2012*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/161865>
- Mora, E., Lind, O., Bello, J., & Alcocer, J. (2015). *COMPOSICIÓN DEL FITOPLANCTON Y RELACIONES ESPECIES-ÁREA DE CINCO SISTEMAS LACUSTRES EN LOS TUXTLAS, VER., MÉXICO*.
- Morris, R. V., Neely, S. C., & Mendell, W. W. (1982). Application of Kubelka-Munk theory of diffuse reflectance to geologic problems: The role of scattering. *Geophysical Research Letters*, *9*(2), 113-116. <https://doi.org/10.1029/GL009i002p00113>
- Padilla Jaramillo, C. A., Díaz Sánchez, L. M., Combariza Montañez, M. Y., Blanco Tirado, C., & Combariza Montañez, A. F. (2021). Photon Harvesting Molecules: Ionization Potential from Quantum Chemical Calculations of Phytoplanktonic Pigments for MALDI-MS Analysis. *Orinoquia*, *25*(1), 13-23. <https://doi.org/10.22579/20112629.676>
- Preat, J., Jacquemin, D., & Perpète, E. A. (2010). Design of New Triphenylamine-Sensitized Solar Cells: A Theoretical Approach. *Environmental Science & Technology*, *44*(14), 5666-5671. <https://doi.org/10.1021/es100920j>
- Ramírez-Pradilla, J. S., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2019). Electron-Transfer Ionization of Nanoparticles, Polymers, Porphyrins, and Fullerenes Using Synthetically Tunable  $\alpha$ -Cyanophenylenevinylens as UV MALDI-MS Matrices. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *11*(11), 10975-10987. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b22246>
- Raymond, C. (2011). *Fundamentos de Química*. Mexico - McGraw-Hill.
- Rosokha, S. V., & Kochi, J. K. (2008). Fresh Look at Electron-Transfer Mechanisms via the Donor/Acceptor Bindings in the Critical Encounter Complex. *Accounts of Chemical Research*, *41*(5), 641-653. <https://doi.org/10.1021/ar700256a>
- Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., & Johnsen, G. (2011). *PHYTOPLANKTON PIGMENTS: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*.
- Sánchez, L. M. D., Combariza, M. Y., & Blanco-Tirado, C. (2019). *Identificación de biomarcadores fitoplanctónicos utilizando espectrometría de masas*. 120.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of instrumental analysis* (6th ed). Thomson Brooks/Cole.
- So, S., Choi, H., Min Ko, H., Kim, C., Paek, S., Cho, N., Song, K., Lee, J. K., & Ko, J. (2012). Novel unsymmetrical push-pull squaraine chromophores for solution processed small molecule bulk heterojunction solar cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, *98*, 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2011.10.017>

- Stutzman, J. R., & McLuckey, S. A. (2012). Ion/Ion Reactions of MALDI-Derived Peptide Ions: Increased Sequence Coverage via Covalent and Electrostatic Modification upon Charge Inversion. *Analytical Chemistry*, 84(24), 10679-10685. <https://doi.org/10.1021/ac302374p>
- Su, T.-H., Hsiao, S.-H., & Liou, G.-S. (2005). Novel family of triphenylamine-containing, hole-transporting, amorphous, aromatic polyamides with stable electrochromic properties. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43(10), 2085-2098. <https://doi.org/10.1002/pola.20666>
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., & Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151-153. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>
- Tao, S., Zhou, Y., Lee, C.-S., Lee, S.-T., Huang, D., & Zhang, X. (2008). Highly Efficient Nondoped Blue Organic Light-Emitting Diodes Based on Anthracene-Triphenylamine Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(37), 14603-14606. <https://doi.org/10.1021/jp803957p>
- Tian, H., Yang, X., Pan, J., Chen, R., Liu, M., Zhang, Q., Hagfeldt, A., & Sun, L. (2008). A Triphenylamine Dye Model for the Study of Intramolecular Energy Transfer and Charge Transfer in Dye-Sensitized Solar Cells. *Advanced Functional Materials*, 18(21), 3461-3468. <https://doi.org/10.1002/adfm.200800516>
- Tsuneda, T. (2014). *Density Functional Theory in Quantum Chemistry*. Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-54825-6>
- Ulmer, L., Mattay, J., Torres-Garcia, H. G., & Luftmann, H. (2000). Letter: The Use of 2-[(2 E )-3-(4-tert -Butylphenyl)-2-Methylprop-2-Enylidene]Malononitrile as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 6(1), 49-52. <https://doi.org/10.1255/ejms.329>
- Vasil'ev, Y. V., Khvostenko, O. G., Streletskii, A. V., Boltalina, O. V., Kotsiris, S. G., & Drewello, T. (2006). Electron Transfer Reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI): Ionization Energy, Electron Affinity and Performance of the DCTB Matrix within the Thermochemical Framework. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(18), 5967-5972. <https://doi.org/10.1021/jp060568f>
- What are Phytoplankton?* (2010, julio 16). [Text.Article]. Earth Observatory; NASA Earth Observatory. <https://earthobservatory.nasa.gov/features/Phytoplankton>
- Wyatt, M. F., Stein, B. K., & Brenton, A. G. (2006). Characterization of Various Analytes Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and 2-[(2 E )-3-(4- tert -Butylphenyl)-2-methylprop-2- enylidene]malononitrile Matrix. *Analytical Chemistry*, 78(1), 199-206. <https://doi.org/10.1021/ac050732f>
- Zenobi, R., & Knochenmuss, R. (s. f.). *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. 30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1998\)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S)

## ANEXOS

Anexo 1.  $^1\text{H}$ -RMN de TFA-COH.

Anexo 2.  $^{13}\text{C}$ -RMN de TFA-COH.

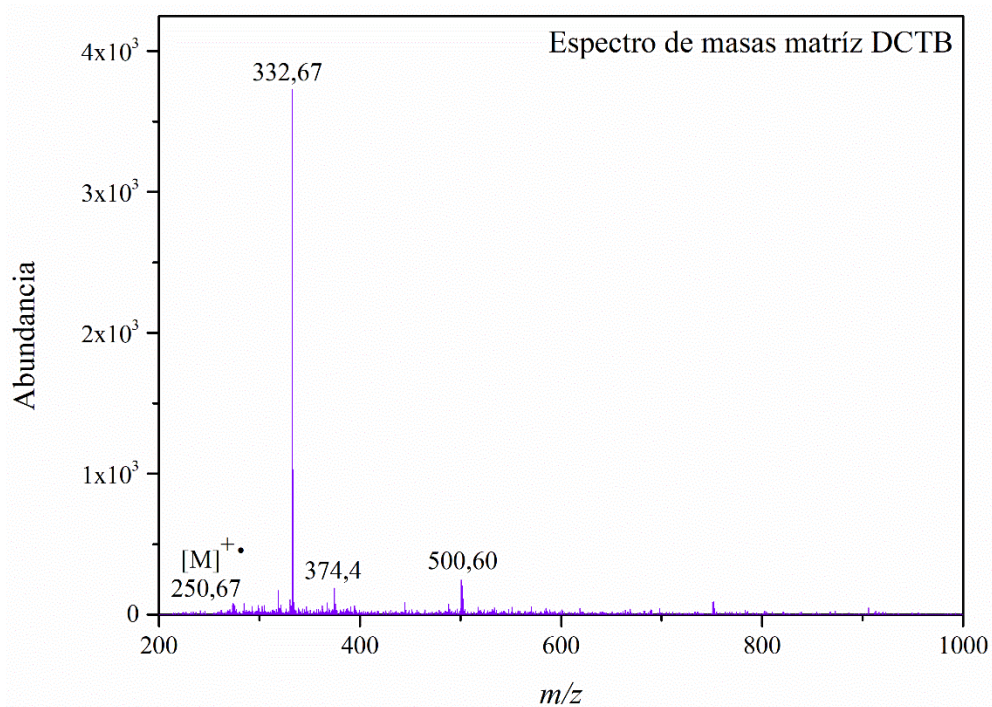
**Anexo 3. Tabla con operaciones de función  $F(R_\infty)$  del método Kubelka-Munk para el derivado TFA-COH.**

**Anexo 4. Tabla con operaciones de función  $F(R_\infty)$  del método Kubelka-Munk para el derivado TFA-BCA.**

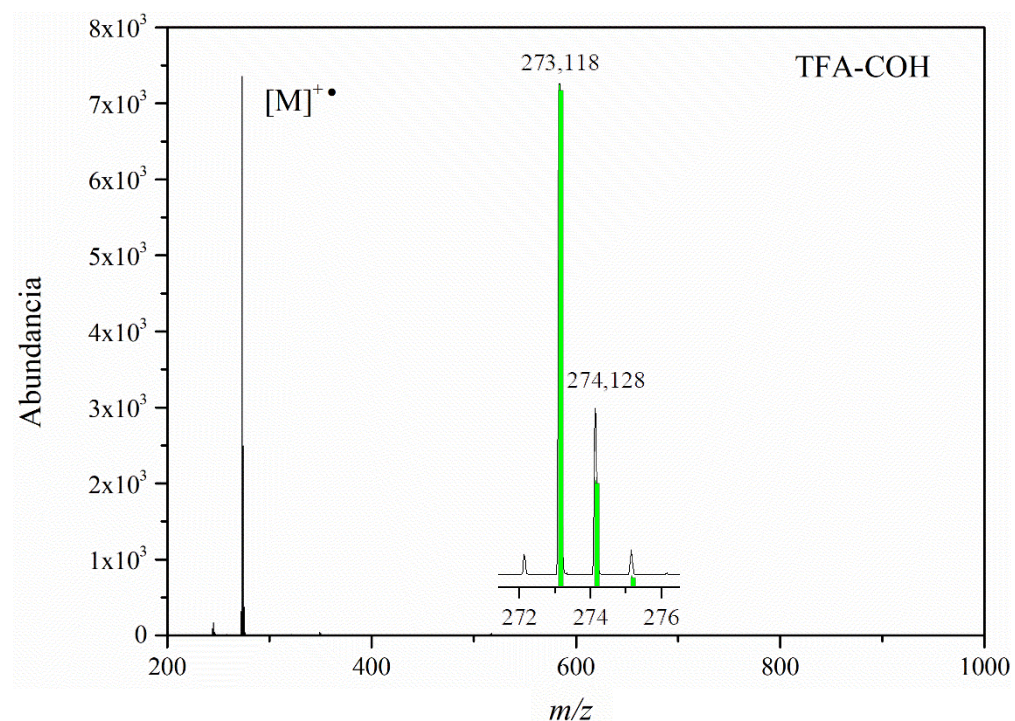
**Anexo 5. Tabla con operaciones de función  $F(R_\infty)$  del método Kubelka-Munk para el derivado TFA-BCACH<sub>3</sub>.**

**Anexo 6. Tabla con operaciones de función  $F(R_\infty)$  del método Kubelka-Munk para el derivado TFA-BCAOCH<sub>3</sub>.**

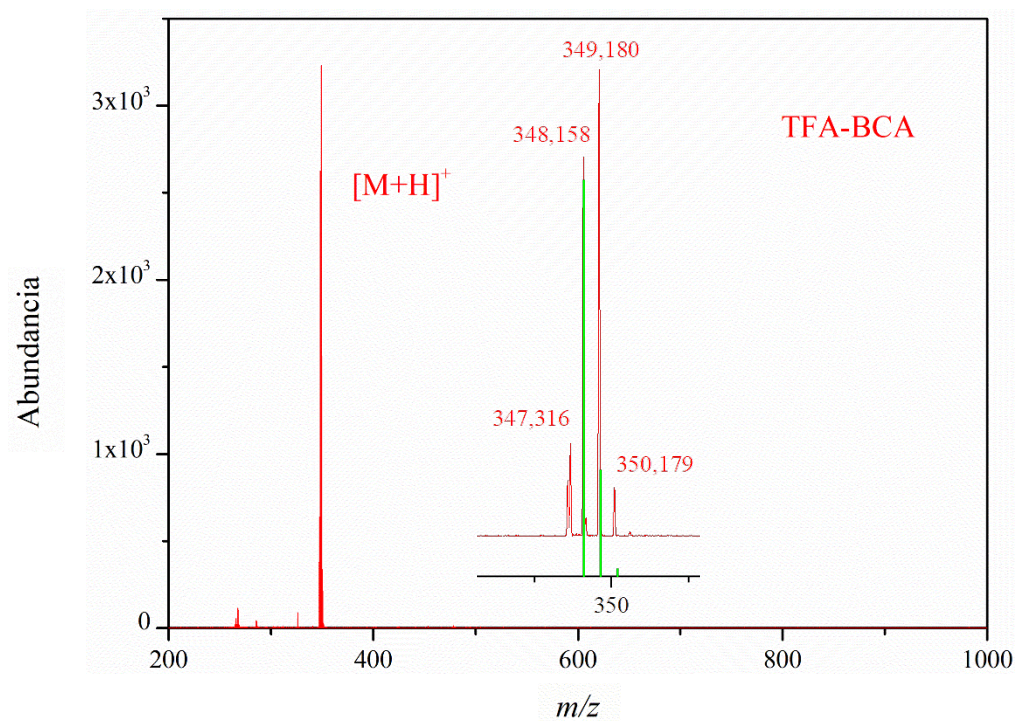
**Anexo 7. Espectro LDI de la matriz comercial DCTB.**



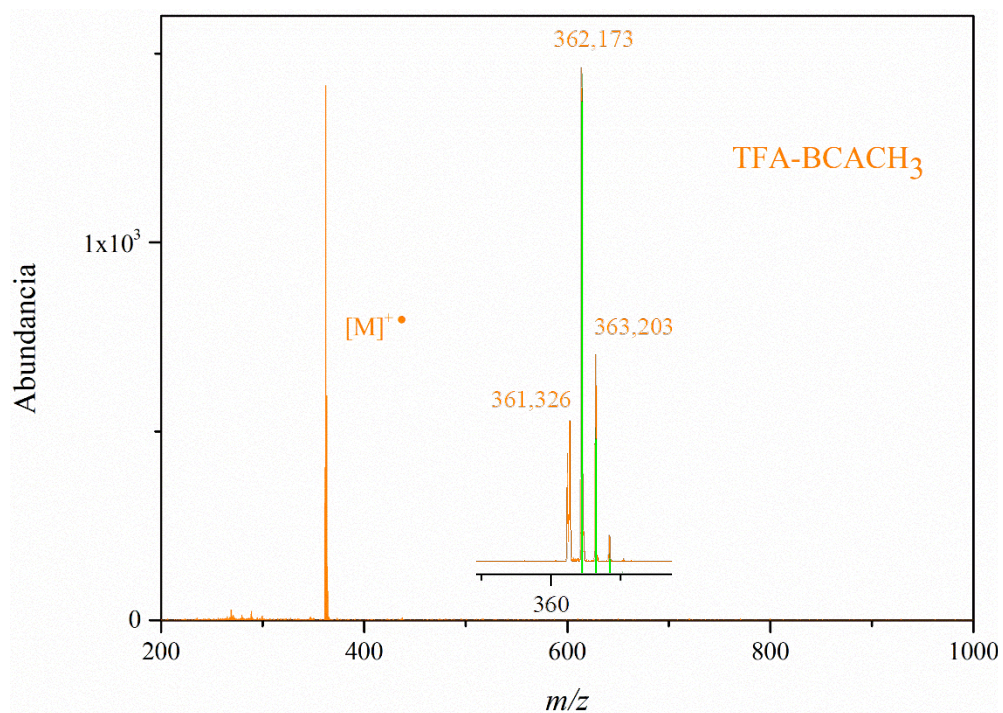
**Anexo 8. Espectro LDI del catión radical  $[TFA-COH]^{+\bullet}$  vs espectro simulado (señales verdes).**



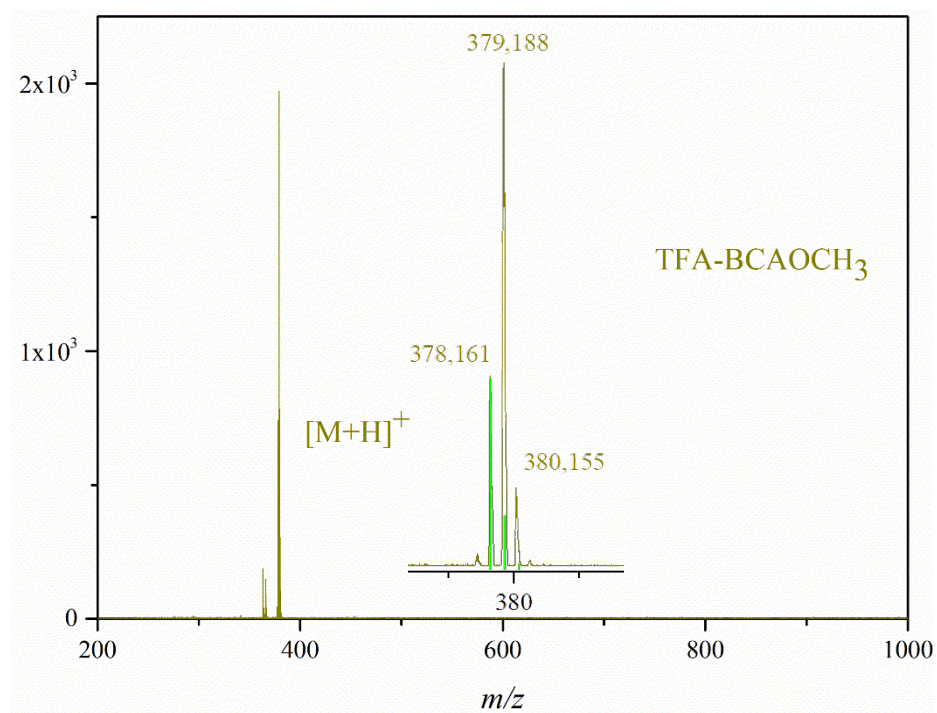
**Anexo 9. Espectro LDI del catión radical  $[TFA-BCA]^{+\bullet}$  vs espectro simulado (señales verdes).**



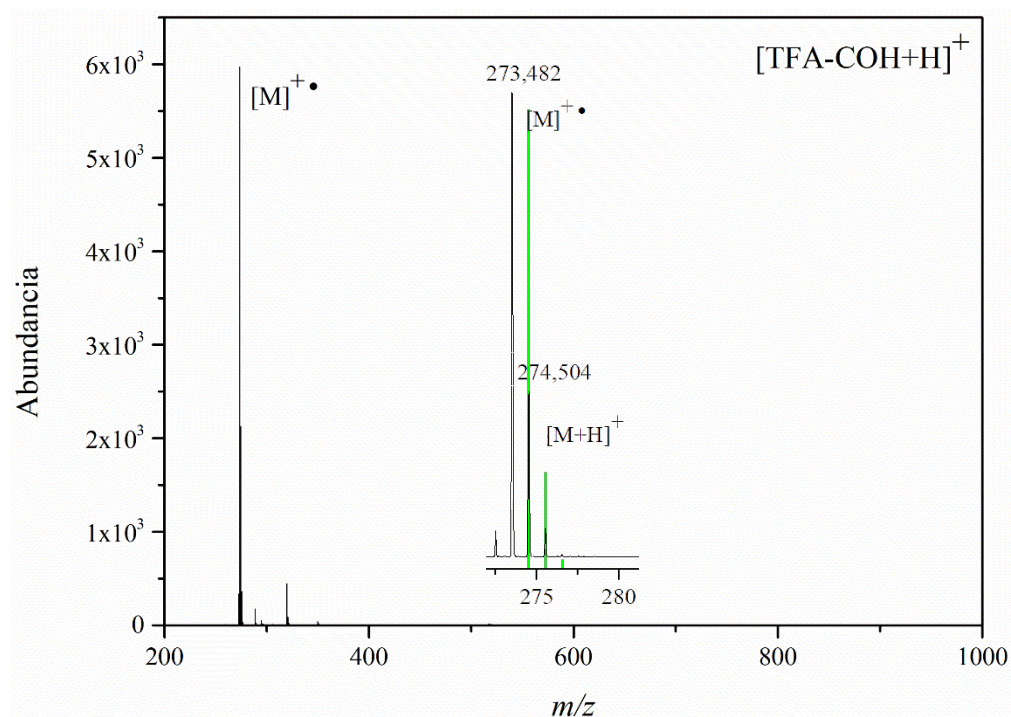
**Anexo 10. Espectro LDI del catión radical  $[TFA-BCACH_3]^{+\bullet}$  vs espectro simulado (señales verdes).**



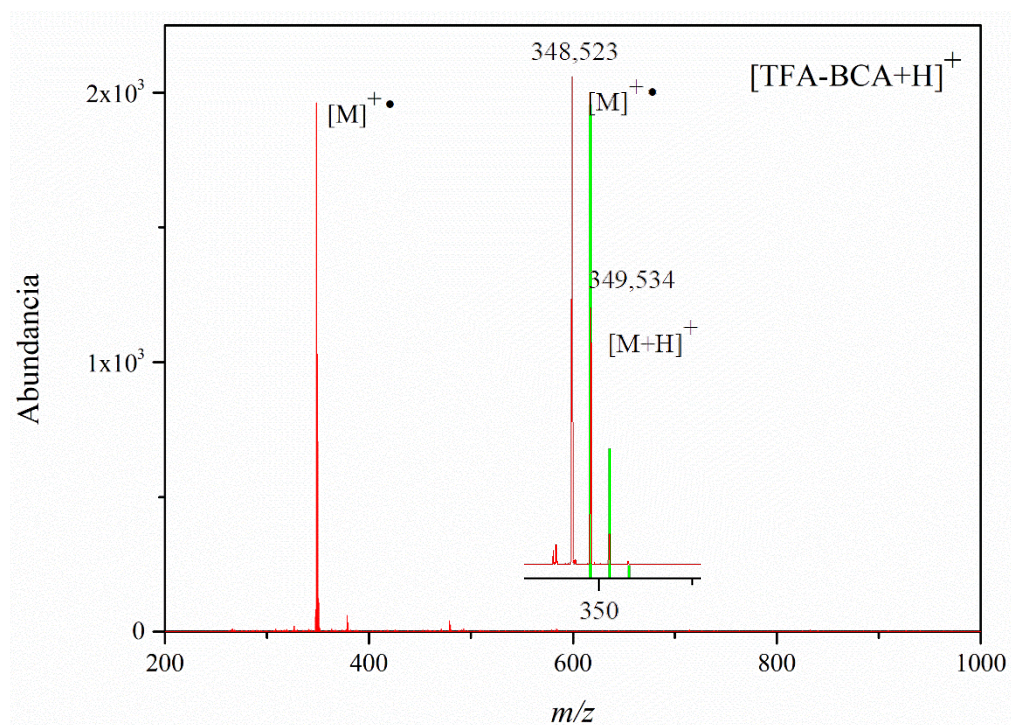
**Anexo 11. Espectro LDI del catión radical  $[TFA-BCAOCH_3]^{+\bullet}$  vs espectro simulado (señales verdes).**



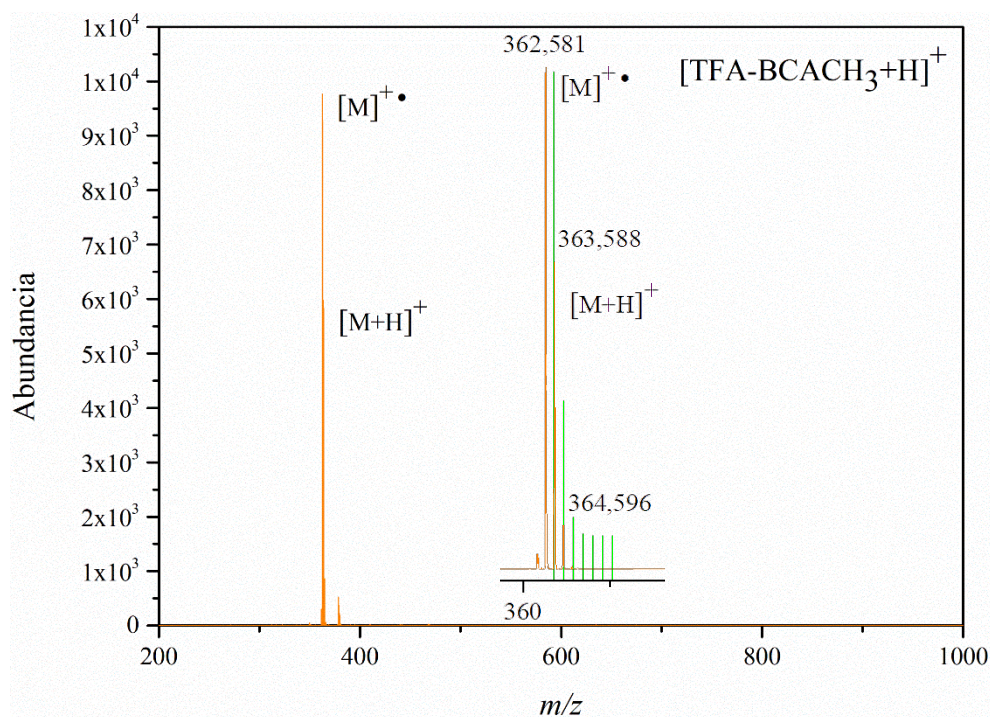
**Anexo 12. Anexo 12. Espectro LDI del ion acidificado [TFA-COH+H]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).**



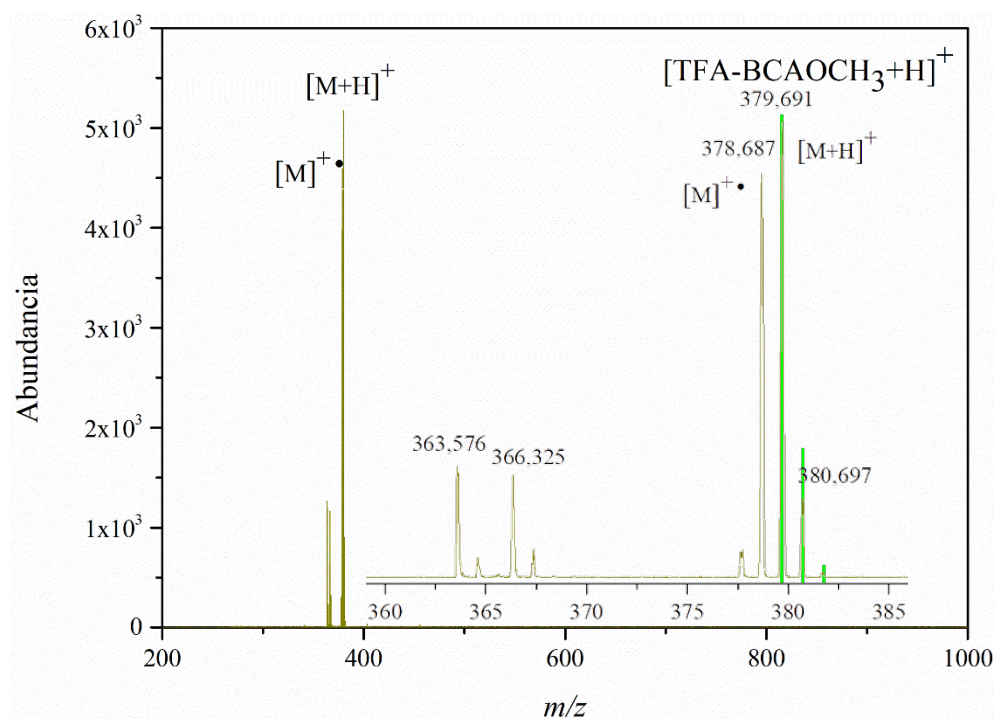
**Anexo 13. Espectro LDI del ion acidificado [TFA-BCA+H]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).**



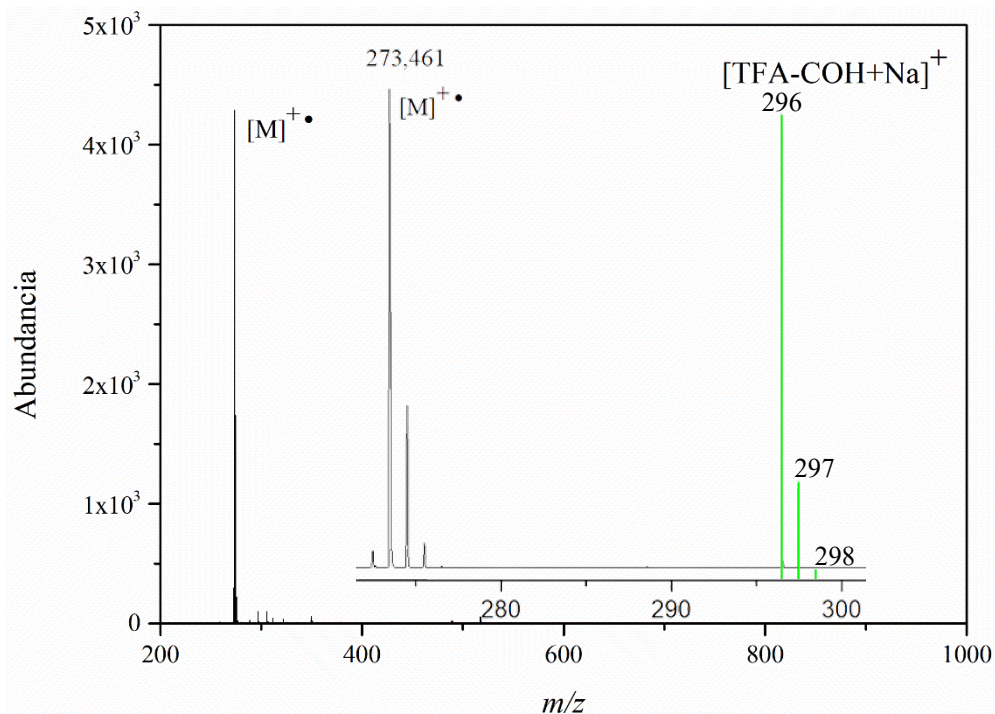
**Anexo 14. Espectro LDI del ion acidificado  $[TFA-BCACH_3+H]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**



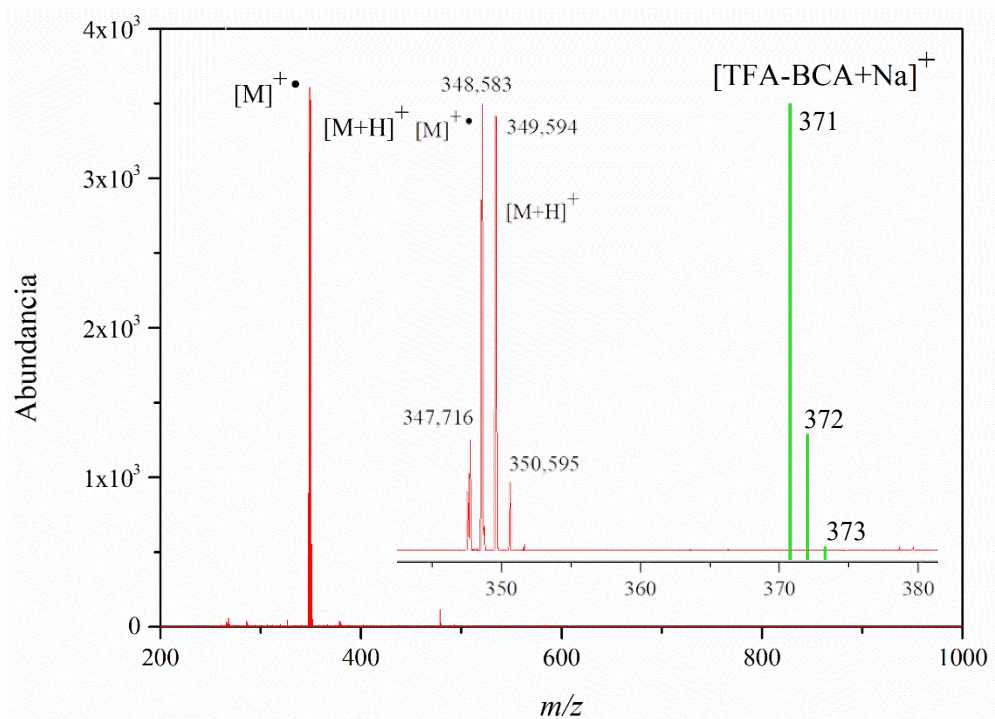
**Anexo 15. Espectro LDI del ion acidificado  $[TFA-BCAOCH_3+H]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**



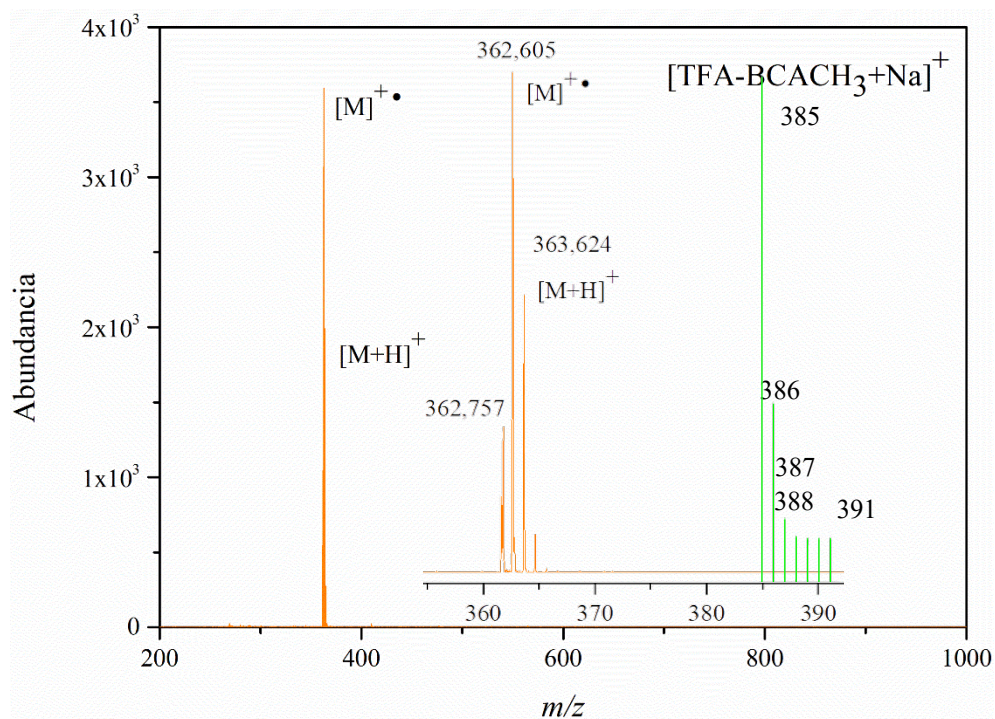
**Anexo 16. Espectro LDI del aducto de sodio  $[TFA-COH+Na]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**



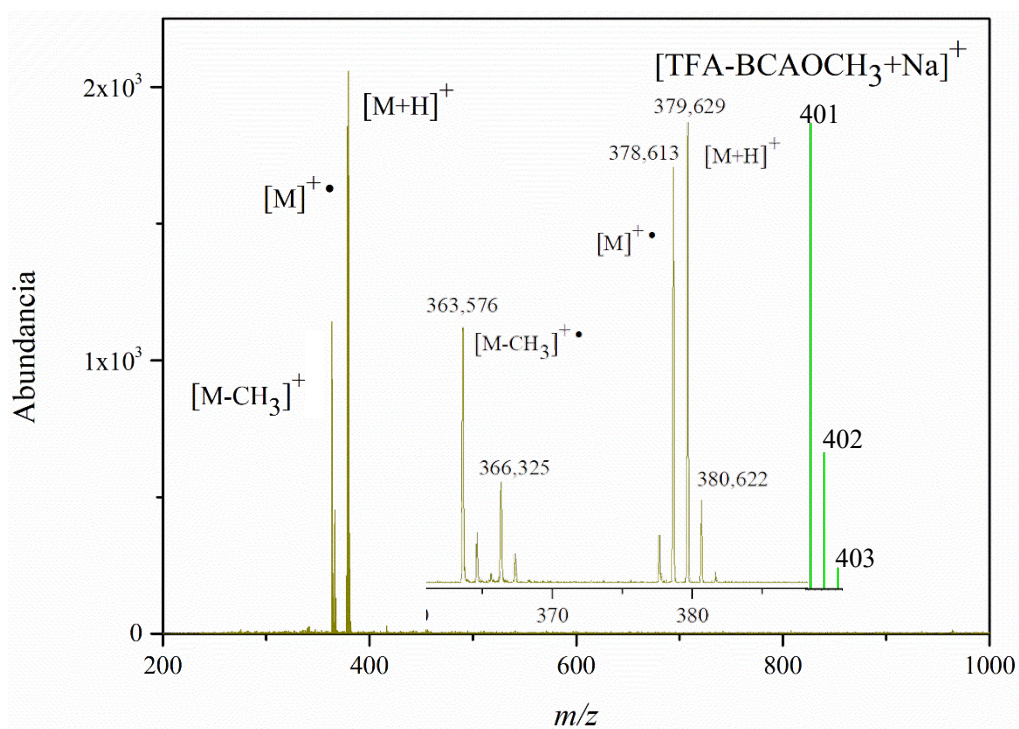
**Anexo 17. Espectro LDI del aducto de sodio  $[TFA-BCA+Na]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**



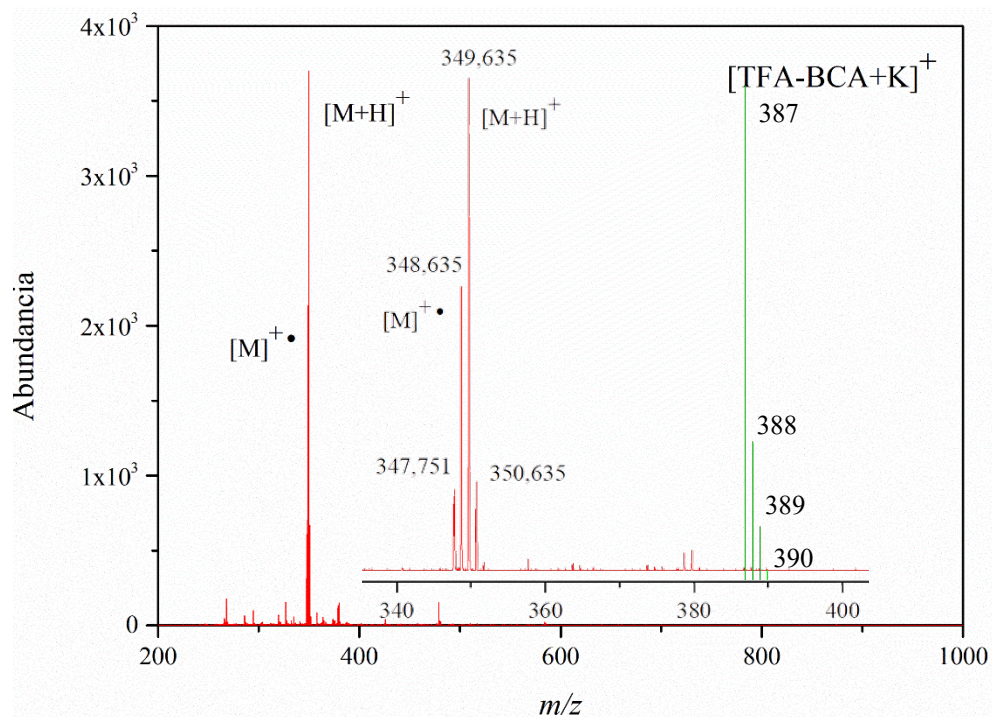
**Anexo 18. Espectro LDI del aducto de sodio  $[TFA-BCACH_3+Na]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**



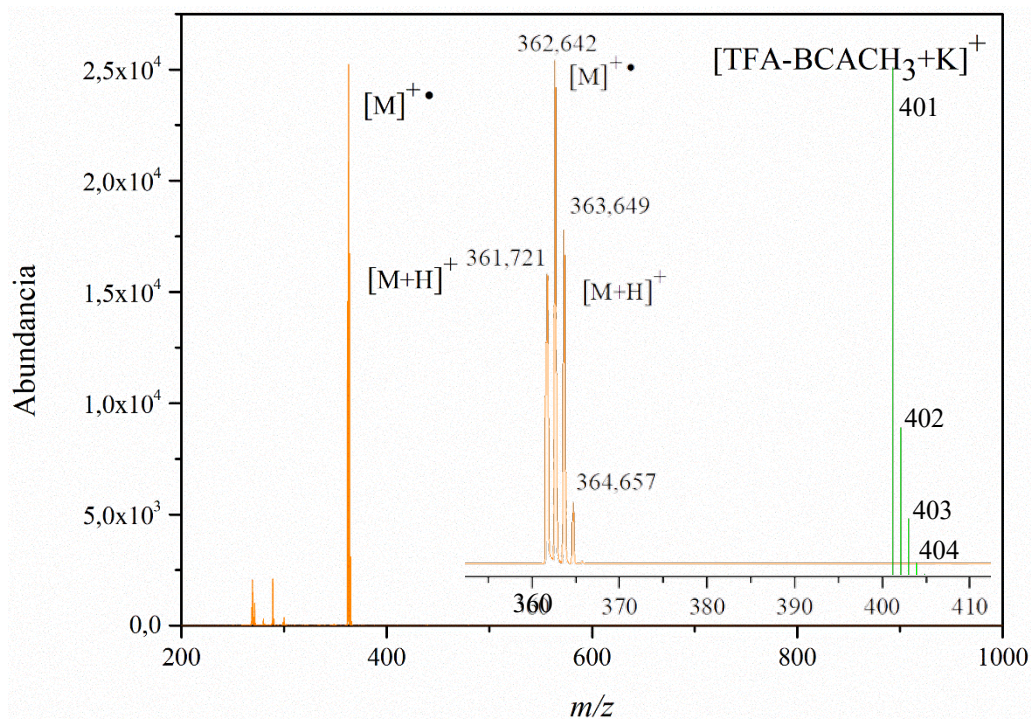
**Anexo 19. Espectro LDI del aducto de sodio  $[TFA-BCAOCH_3+Na]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**



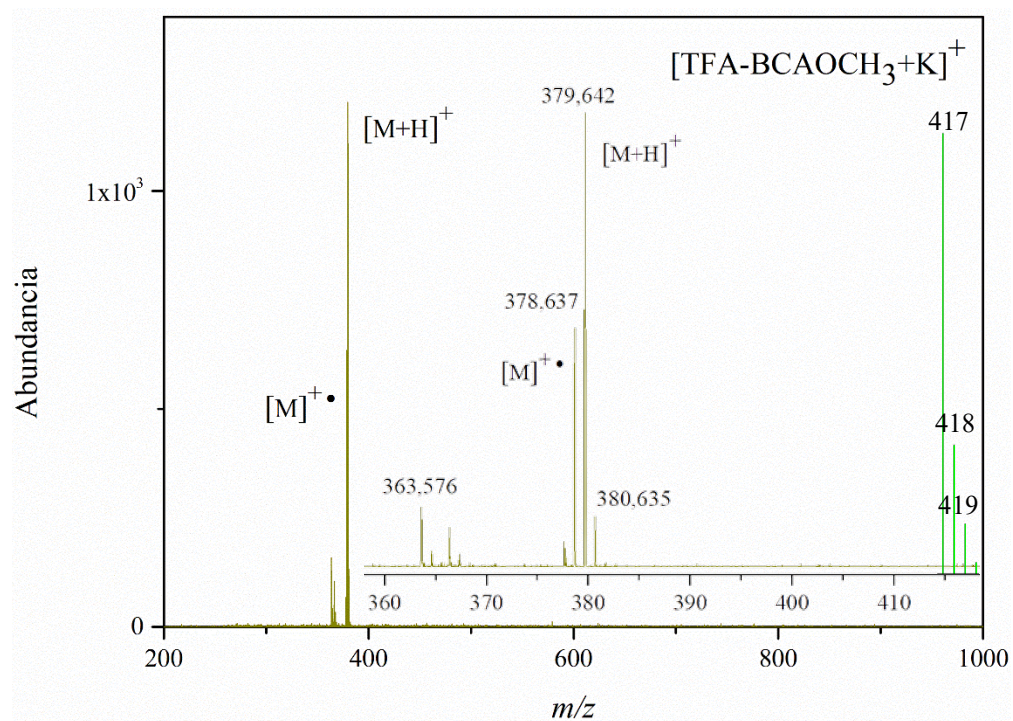
**Anexo 20. Espectro LDI del aducto de potasio  $[TFA-BCA+K]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**



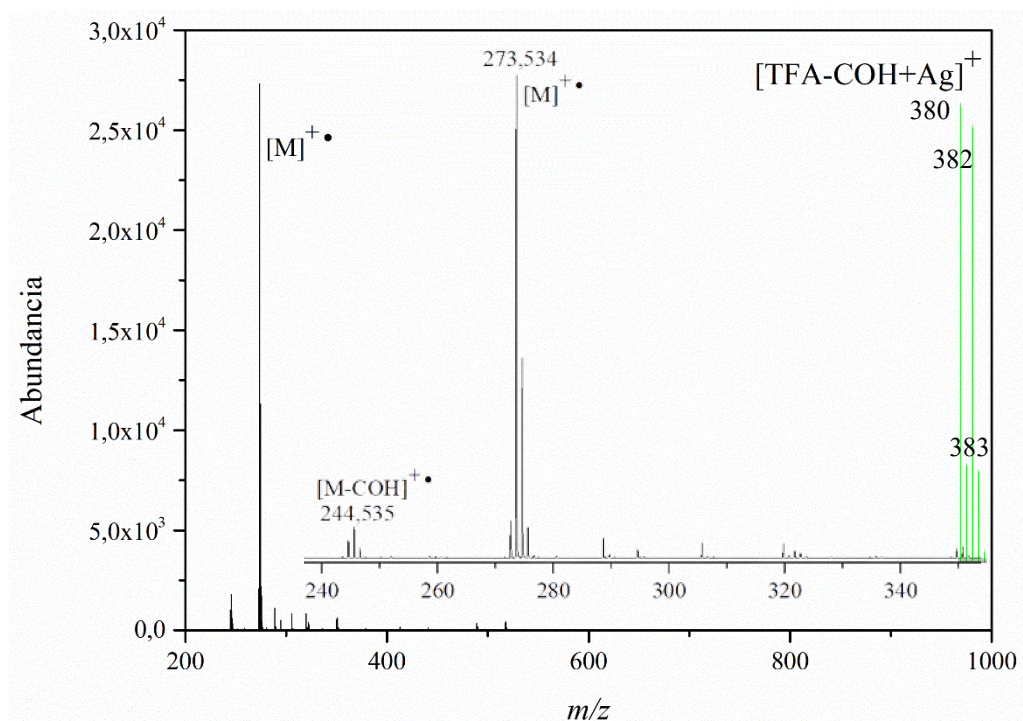
**Anexo 21. Espectro LDI del aducto de potasio  $[TFA-BCACH_3+K]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**

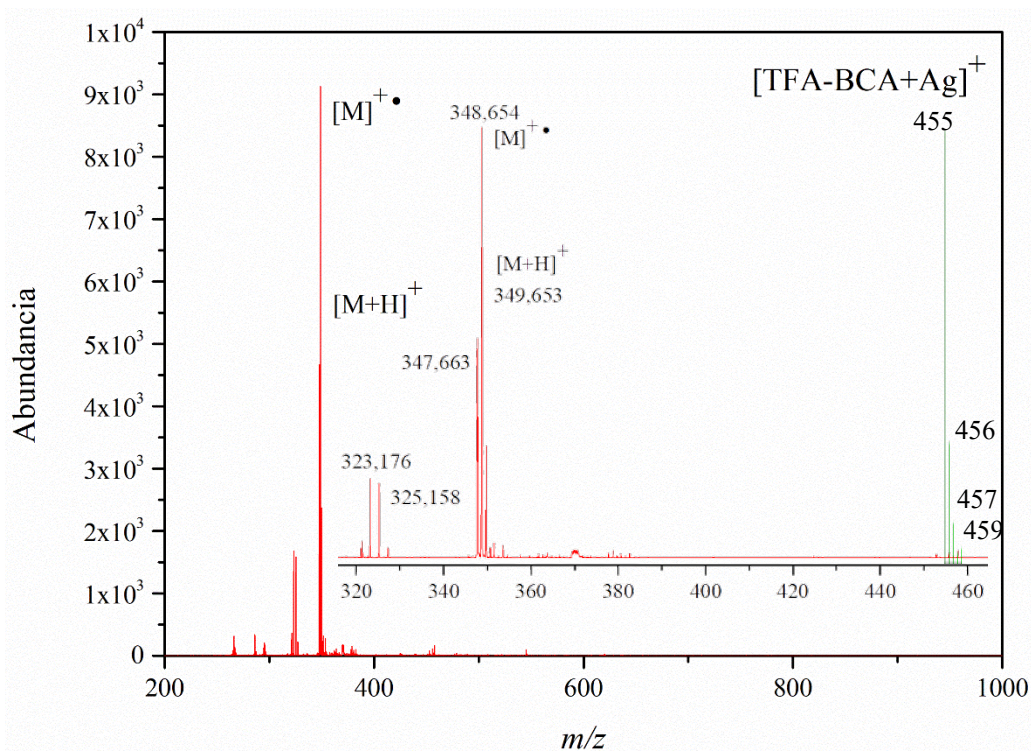
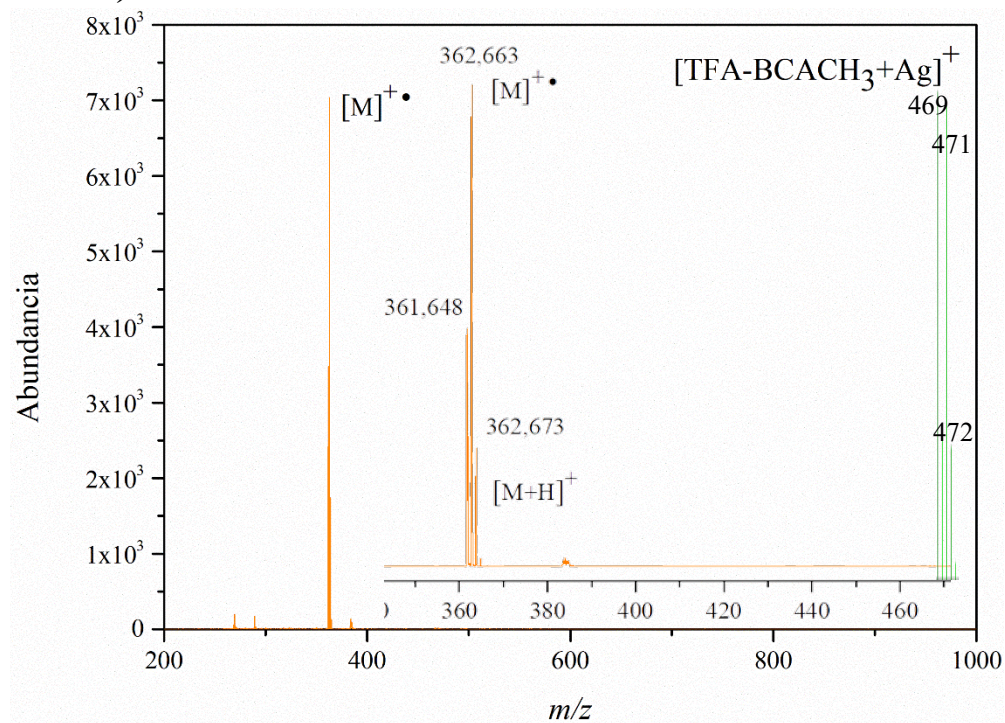


**Anexo 22. Espectro LDI del aducto de potasio [TFA-BCAOCH<sub>3</sub>+K]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).**



**Anexo 23. Espectro LDI del aducto de plata [TFA-COH+Ag]<sup>+</sup> vs espectro simulado (señales verdes).**



**Anexo 24. Espectro LDI del aducto de plata  $[TFA-BCA+Ag]^+$  vs espectro simulado***(señales verdes).***Anexo 25. Espectro LDI del aducto de plata  $[TFA-BCACH_3+Ag]^+$  vs espectro simulado***(señales verdes).*

**Anexo 26. Espectro LDI del aducto de plata  $[TFA-BCAOCH_3+Ag]^+$  vs espectro simulado (señales verdes).**

