

Tesis Doctoral

# Estudio de factores que afectan la ionización de los hidratos de carbono en espectrometría de masa UV-Maldi

Giudicessi, Silvana Laura

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giudicessi, Silvana Laura. (2011). Estudio de factores que afectan la ionización de los hidratos de carbono en espectrometría de masa UV-Maldi. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giudicessi, Silvana Laura. "Estudio de factores que afectan la ionización de los hidratos de carbono en espectrometría de masa UV-Maldi". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

***ESTUDIO DE FACTORES QUE AFECTAN LA IONIZACIÓN  
DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN ESPECTROMETRÍA  
DE MASA UV-MALDI***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Silvana Laura Giudicessi**

Director de Tesis: Rosa Erra-Balsells  
Consejero de Estudios: Silvia Moreno de Colonna

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica - CEQUIBIEM

Buenos Aires, 2011



*A mi hija Lucía, la luz de mi vida y el mejor de los regalos  
A Marcos y la hermosa familia que empezamos juntos  
A mis padres y mi hermana  
A mi abuela*



*Mi mayor agradecimiento a la Dra. Rosa Erra-Balsells  
por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo  
de tesis, por recibirme en su laboratorio, por tanta calidez,  
comprensión y enseñanza a lo largo de estos años*



*Deseo también expresar mi agradecimiento a todos aquellos que, de alguna forma, contribuyeron a este trabajo de tesis:*

*A mis compañeros de laboratorio, por todo lo vivido a lo largo de estos años:  
a la Dra. María Alejandra Ponce, por su dulzura y sus enseñanzas en la primera etapa de este trabajo de tesis  
al Dr. Sergio M. Bonesi, por su buen humor y por tantos momentos gratos e inolvidables  
a la Dra. Olga I. Tarzi, por todas sus enseñanzas a lo largo de todos estos años de trabajo, por su amistad y su excelente compañía  
a la Dra. María Laura Salum, por su amistad, hermosos momentos compartidos, su buen humor y aliento a lo largo de todos estos años  
también a Franco Cabrerizo, Gabriela Petroselli, Micaela González, Ruby Terranova y Akemi.*

*A la Dra. Silvia Moreno de Colonna (Depto. de Química Biológica), por ser mi consejera de estudios, por su enseñanza y paciencia*

*A la Dra. Silvia Camperi, por la realización de los experimentos UV-MALDI de ligandos peptídicos y por su colaboración, por su enseñanza y paciencia. A la Dra. Mariela Marani y a la Lic. Camila Martínez Cerón, por su calidez, entusiasmo y ayuda.*

*Al Centro de estudios químicos y biológicos por espectrometría de masa (CEQUIBIEM), por permitirme utilizar el espectrómetro de masa UV-MALDI para realizar este trabajo de tesis*

*A la Dra. Alicia Couto y la Dra. Malena Landoni, por los compuestos aportados para la realización de este trabajo de tesis. A Adriana, Tamara y Juliana, por su entusiasmo y ayuda.*

*A la Dra. Pilar Buera y la Dra. Carolina Schebor (Depto. de Industrias, FCEyN-UBA), por los experimentos de calorimetría de barrido diferencial, así como por sus desinteresados asesoramientos y explicaciones.*

*A la Dra. Elsa Sileo (INQUIMAE) por la realización de los experimentos de termogravimetría.*

*A la Dra. María Eugenia Monge, por sus enseñanzas en espectrometría de masa UV-MALDI y por haber provisto reactivos para la realización de este trabajo de tesis*

*Al Dr. Hiroshi Nonami, del Plant Biophysics/Biochemistry Research Laboratory, Universidad de Ehime, Japón, por haberme recibido en su laboratorio, por su ayuda y confianza, por los espectros de masa ESI y UV-MALDI y por haber provisto reactivos útiles para este trabajo de tesis. A mis compañeros de Matsuyama, especialmente Kaniz Fatema, Mokter, Yasuto Sato y Yousef Gholipour, por su paciencia y esfuerzo y por haber compartido conmigo sus conocimientos durante mi estadía.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por permitirme realizar este trabajo de tesis.*

*A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por permitirme realizar este trabajo de tesis y por proveer los fondos para la pasantía realizada en la Universidad de Ehime, Japón.*

*Al departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

*Al personal de la Biblioteca Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.*

*A Carina Gaviglio, Alcira Trinelli, Carolina Tropea y Nora Burroni, por su ayuda, calidez y amor.*

*A Paula, por tantas cosas vividas, por tanta luz y amor desde los comienzos*

*Finalmente, quisiera agradecer a Romina, Fernando, Laura, César, Rosana, Cynthia, Carolina, Carina, Mariana, Mariano, María, Virginia y Maxi, por el camino de fe que protegieron con su amor y sus oraciones.*



## Estudio de factores que afectan la ionización de los hidratos de carbono en espectrometría de masa UV-MALDI

En este trabajo de tesis se estudió el efecto de la presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  (y/o  $\text{Mg}^{2+}$ ) en el análisis por UV-MALDI MS de hidratos de carbono, utilizando el EDTA como un reactivo auxiliar. Este análisis mostró un claro efecto de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espectros obtenidos cuando se utilizó *nor*-harmano (nHo) como matriz. Dicho efecto se basaría en la interacción del ion  $\text{Ca}^{2+}$  con los grupos HO- presentes en los hidratos de carbono. Con matrices ácidas el efecto observado fue menor y se debería a que los grupos HO- y -COOH de las mismas pueden unirse al catión  $\text{Ca}^{2+}$  y además por su carácter prótico inhibir la interacción de éste con el azúcar. El estudio comparativo por espectrometría de masa ESI mostró que el comportamiento de los hidratos de carbono en presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  (y/o  $\text{Mg}^{2+}$ ) no es uniforme, dependiendo éste del tamaño molecular y de la estructura del compuesto. En ambos casos, la presencia del EDTA compitió con la formación de los complejos metal-hidrato de carbono y mostró ser una herramienta útil para la restitución de las señales sodiadas de los analitos y la obtención de espectros de masa de mejor calidad. También se analizó la formación de la especie  $[\text{A}+\text{Cl}]^-$  en el proceso de desorción/ionización de hidratos de carbono neutros, utilizando diferentes técnicas de incorporación del ion  $\text{Cl}^-$  a las muestras. Para ello se utilizó la mezcla de la matriz nHo y la sal  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , una matriz clorada sintetizada en nuestro laboratorio (6-cloro-*nor*-harmano) y el clorhidrato de *nor*-harmano. Las especies  $[\text{A}+\text{Cl}]^-$  se formaron eficientemente, especialmente utilizando esta última matriz. La formación de estas especies cloradas es una alternativa a tener en cuenta al momento de estudiar hidratos de carbono neutros cuyo proceso de ionización no es eficiente. Finalmente, se analizó la capacidad de nanopartículas (NPs) de actuar como matrices en el análisis por UV-MALDI MS de azúcares neutros. Dichas NPs mostraron ser eficientes matrices para la detección de azúcares tanto comerciales como los presentes en extractos de tejidos y en tejidos intactos (análisis *in situ*), a diferencia de las matrices orgánicas clásicas que no resultaron útiles como tales para este último tipo de análisis.

Palabras claves: UV-MALDI MS, ESI MS,  $\text{CaCl}_2$ , hidratos de carbono, nanopartículas, matrices UV-MALDI, EDTA



---

## Study of the factors that affect the UV-MALDI mass spectrometry ionization of carbohydrates

In the present Project the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  (and/or  $\text{Mg}^{2+}$ ) on the UV-MALDI MS analysis of carbohydrates and that of EDTA as auxiliary reagent have been studied. These cations showed a very clear effect when *nor*-harmane (nHo) was used as matrix. This fact can be explained taking into account the interaction between the  $\text{Ca}^{2+}$  (and/or  $\text{Mg}^{2+}$ ) with the hydroxyl groups present in the carbohydrate structure. When matrix with hydroxy and carboxy functional groups were used the observed effect was quite mild probably because these groups interact preferentially with the discharged cations and because their hydrogen donor capability inhibits the carbohydrate- $\text{Ca}^{2+}$  interaction.

Comparative studies conducted by ESI MS showed that the carbohydrate-  $\text{Ca}^{2+}$  (and/or  $\text{Mg}^{2+}$ ) interaction is not the same for all the sugars studied depending strongly on the molecular size and structure. EDTA addition to the sample competes with the sugar because its  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  quelating properties showing to be a useful tool to enhance the intensity of the carbohydrate signals yielding higher quality mass spectra.

The detection of neutral carbohydrates as the anion  $[\text{A}+\text{Cl}]^-$  species was also studied by means of different  $\text{Cl}^-$  addition methods to the sample. With this purpose the mixture of the matrix nHo and the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  salt, a chloroderivative of *nor*-harmane prepared in our laboratory (6-chloro-*nor*-harmane) and *nor*-harmane hydrochloride were used. The  $[\text{A}+\text{Cl}]^-$  were efficiently formed specially when *nor*-harmane hydrochloride was used. Formation of the chlorinated anions is a possibility to take into account when neutral carbohydrates with low UV-MALDI desorption/ionization are analyzed.

Finally, the capability of nanoparticles (NPs) to behave as UV-MALDI matrices for neutral carbohydrate analysis was studied. Those studied showed to be efficient for the analysis of neutral sugars commercially available and those present in extracts from tissues as well as present in intact tissues (analysis *in situ*), on the contrary than the classical organic matrices that were not useful at all for *in situ* analysis.

Key words: UV-MALDI MS, ESI MS,  $\text{CaCl}_2$ , carbohydrates, nanoparticles, UV-MALDI matrices, EDTA.



## ABREVIATURAS

A: analito

Ác. galacturónico: ácido galacturónico

Ác. galactárico: ácido galactárico

Ag: plata

APCI: ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*)

BaSrTiO: óxido mixto de bario, estroncio y titanio

Bc: banda de energía de conducción

Bcd:  $\beta$ -ciclodextrina

Bv: banda de energía de valencia

CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio

Cel: celobiosa

(CH<sub>3</sub>)<sub>n</sub>Bcd:  $\beta$ -ciclodextrina sustituida con n metilos

CHCA: ácido *trans*- $\alpha$ -cyano-4-hydroxicinámico

CHCl<sub>3</sub>: cloroformo

CI: ionización química

CID: fragmentación inducida por colisión (*collision-induced decomposition*)

Cf: cafeína

6-Cl<sub>n</sub>Ho: 6-cloro-*nor*-harmano

CNT: nanotubos de carbono

Cp: celopentaosa

Ct: celotetraosa

D: diamante

Da: dalton

DI: desorción/ionización

DMBcd: heptakis-(2,6-di-*O*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina

Dx: dextrano estándar 5000 de la bacteria *Leconostoc mesenteroides*

EC: energía cinética

ECAR: electroforesis capilar de alta resolución

EDTA (EDTA.Na): sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético

EI: ionización electrónica

ESI: volatilización/ionización por nebulización en un campo eléctrico (*electrospray ionization*)

EtOH: etanol

FAB: bombardeo por átomos acelerados (*fast atom bombardment*)

FD: desorción por campo (*field desorption*)

FI: ionización por campo (*field ionization*)

Fr: fructano

Fru: fructosa

Fr(2): sacarosa

Fr(3): 1-kestosa

Fr(4): nistosa

Fr(5): 1<sup>F</sup>-fructofuranosilnistosa

FT-ICR: *ion cyclotron resonance* con transformada de Fourier

GA: ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido genticóico)

GC/MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

Glc: glucosa

HClnHo: clorhidrato de *nor*-harmano

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography*)

HRMS: espectrometría de masa de alta resolución (*high resolution mass spectrometry*)

I<sub>n</sub>: inulina

ISD: descomposición en la fuente (*in-source decay*)

IT: Trampa iónica

KCl: cloruro de potasio

kV: kilovoltios

Lac: lactosa

LC/MS: Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa

LDI: desorción/ionización por láser (*laser desorption/ionization*)

l/min: litros/minuto

LOD: límite de detección (*limit of detection*)

M: matriz

M(2): maltosa  
M(3): maltotriosa  
M(4): maltotetraosa  
M(5): maltopentaosa  
M(6): maltohexaosa  
M(7): maltoheptaosa  
MBcd: metil- $\beta$ -ciclodextrina  
MeCN: acetonitrilo  
MeOH: metanol  
MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio  
 $\mu$ M: micromolar  
 $\mu$ M/ml: micromolar/mililitro  
 $\mu$ l: microlitro  
ml: mililitro  
 $\mu$ l/min: microlitros/minuto  
 $\mu$ mol: micromol  
MNBA: alcohol *m*-nitrobencílico  
MPa: megapascales  
MS: espectrometría de masa  
MS/MS o MS<sup>n</sup>: espectrometría de masa en tandem  
MWNT: nanotubos de múltiples paredes (*mutli-walled nanotubes*)  
m/z: relación de masa/carga  
NaCl: cloruro de sodio  
neocarraoctaosa-SO<sub>3</sub>Na+H: neocarraoctaosa tetrasulfato de sodio con una desulfatación  
neocarraoctaosa-(SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>+2H: neocarraoctaosa tetrasulfato de sodio con dos desulfataciones  
neocarraoctaosa-(SO<sub>3</sub>Na)<sub>3</sub>+3H: neocarraoctaosa tetrasulfato de sodio con tres desulfataciones  
neocarraoctaosa-(SO<sub>3</sub>Na)<sub>4</sub>+4H: neocarraoctaosa tetrasulfato de sodio con cuatro desulfataciones

neocarratetraosa disulfato-SO<sub>3</sub>Na+H: neocarratetraosa disulfato de sodio con una desulfatación

neocarratetraosa disulfato-(SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>+2H: neocarratetraosa disulfato de sodio con dos desulfataciones

neocarratetraosa sulfato-SO<sub>3</sub>Na+H: neocarratetraosa sulfato de sodio con una desulfatación

NH<sub>4</sub>Cl: cloruro de amonio

nHo: 9H-pirido[3,4-b]indol (*nor*-harmano)

nm: nanometros

NPs: nanopartículas

OA: orbital atómico

OHPBcd: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

OM: orbital molecular

PD: desorción/ionización por acción de un plasma (*plasma desorption*)

PDE: extracción retardada por pulsos (*pulse delayed extraction*)

PESI: electrospray por medio de sonda muestreadora (*probe electrospray ionization mass spectrometry*)

PM: peso molecular

pmol/μl: picomol/microlitro

PSD: fragmentación en el analizador (*post source decay*)

Q: cuadrupolo

RI: intensidad relativa

SA: ácido sinapínico

SDS-PAGE: electroforesis seguida de transferencia a la membrana conductora por la técnica *electron-block*

SEC: cromatografía de exclusión por tamaño (*size exclusion chromatography*)

SIMS: espectrometría de masa de iones secundarios (*secondary ion mass spectrometry*)

S/R: relación señal/ruido

Tb: teobromina

TES: ionización por termo spray (*thermo spray ionization*)

Tf: teofilina

TFA: ácido trifloroacético

TiO<sub>2</sub>: dióxido de titanio

TiSiO: óxido mixto de silicio y titanio

TMBcd: heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)-β-ciclodextrina

THAP: 2',4',6'-trihidroxiacetofenona

TOF: analizador de tiempo de vuelo (*time-of-flight*)

TLC: cromatografía sobre capa delgada (*thin-layer chromatography*)

V: campo eléctrico

vol/vol: volumen/volumen

UV-MALDI: desorción/ionización inducida por un láser ultravioleta y asistida por una matriz (*ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*)



## PALETA DE COLORES

$[A+Na]^+$	
$[A+K]^+$	
$[A-H+Na+K]^+$	
$[A-H+2Na]^+$	
$[A-H+Na+K+H_2O]^+$	
$[A+matriz+Na]^+$	
$[A+ matriz+H]^+$	
$[A+matriz+K]^+$	
$[A+CaCl]^+$	
$[A+NaCl+Na]^+$	
$[A+NaCl+K]^+$	
$[A+2Na]^{2+}$	
$[A+Ca]^{2+}$	
$[A+Mg]^{2+}$	
$[A-H]^-$	
$[A+Cl]^-$	
$[A+HSO_4]^-$	
$[A-C_4H_8O_4]^-$	
$[A-Na]^-$	
$[A-SO_3Na+H-Na]^-$	
$[A-(SO_3Na)_2+2H-Na]^-$	
$[A-(SO_3Na)_3+3H-Na]^-$	



## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I: <i>Introducción</i></b>	1
1.1 ESPECTROMETRÍA DE MASA	3
1.2 MÉTODOS DE IONIZACIÓN	12
1.2.1 Ionización electrónica ( <i>Electron ionization, EI</i> )	12
1.2.2 Ionización química ( <i>Chemical ionization, CI</i> )	12
1.2.3 Ionización por campo ( <i>Field ionization, FI</i> )	13
1.2.4 Bombardeo por átomos acelerados ( <i>Fast atom bombardment, FAB</i> ) y espectrometría de masa de iones secundarios ( <i>Secondary ion mass spectrometry, SIMS</i> )	14
1.2.5 Desorción por campo ( <i>Field desorption, FD</i> )	15
1.2.6 Desorción por plasma ( <i>Plasma desorption, PD</i> )	16
1.2.7 Desorción por láser ( <i>Laser desorption, LD o LDI</i> )	16
1.3 DESORCIÓN/IONIZACIÓN INDUCIDA POR UN LÁSER UV y ASISTIDA POR UNA MATRIZ ( <i>UV-Matrix-assisted laser desorption/ionization, UV-MALDI</i> ) y VOLATILIZACIÓN/IONIZACIÓN POR NEBULIZACIÓN EN UN CAMPO ELECTRICO ( <i>Electrospray ionization, ESI</i> )	17
1.3.1 UV-MALDI MS	18
1.3.1.1 Métodos de preparación de la muestra en UV-MALDI MS	21
1.3.2 Analizador de tiempo de vuelo ( <i>time-of-flight, TOF</i> )	29
1.3.3 ESI MS	33
1.4 ESPECTROMETRÍA DE MASA UV-MALDI APLICADA AL ESTUDIO DE HIDRATOS DE CARBONO	42
1.4.1 Matrices orgánicas clásicas utilizadas en el análisis de oligosacáridos	47
1.4.2 Los nanotubos de carbono (CNT) como matrices de azúcares	54
1.5 EFECTO DE SALES EN EL ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO NEUTROS	61
1.6 FRAGMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO	63
1.7 REFERENCIAS	67
<b>CAPÍTULO II: <i>Efecto de la presencia de CaCl<sub>2</sub> en el análisis por UV-MALDI MS de hidratos de carbono. Uso del EDTA como reactivo auxiliar</i></b>	83
2.1 INTRODUCCIÓN	85
2.2 EXPERIMENTAL	90
2.2.1 Materiales y métodos	90
2.2.2 Equipamiento	95
2.2.3 Preparación de muestras	95
2.3 RESULTADOS	96
2.3.1 Análisis por UV-MALDI MS de β-ciclodextrina	98
2.3.2 Análisis por UV-MALDI MS de azúcares lineales	107
2.3.3 Análisis por UV-MALDI MS de fructanos	132
2.3.4 Análisis por UV-MALDI MS de mezclas naturales de familias de	

oligosacáridos	153
2.3.5 Análisis por UV-MALDI MS de ciclodextrinas sustituidas	163
2.3.6 Análisis por UV-MALDI MS de hidratos de carbono sulfatados	194
2.3.7 Análisis por UV-MALDI MS de hidratos de carbono ácidos	209
2.4 CONCLUSIONES	219
2.5 REFERENCIAS	223
<b>CAPÍTULO III: Efecto de la presencia de CaCl<sub>2</sub> en el análisis por ESI MS de hidratos de carbono. Uso del EDTA como reactivo auxiliar</b>	243
3.1 INTRODUCCIÓN	245
3.2 EXPERIMENTAL	246
3.2.1 Materiales y métodos	246
3.2.2 Equipamiento	248
3.2.3 Preparación de muestras	248
3.3 RESULTADOS	250
3.3.1 Agregado de EDTA	253
3.3.2 Análisis por ESI MS de las β-ciclodextrinas	253
3.3.3 Análisis por ESI MS de las maltosas lineales y fructanos	270
3.3.4 EDTA como agente quelante	275
3.4 CONCLUSIONES	278
3.5 REFERENCIAS	280
<b>CAPÍTULO IV: Efecto del uso de matrices cloradas en el análisis por UV-MALDI MS de hidratos de carbono neutros</b>	285
4.1 INTRODUCCIÓN	287
4.2 EXPERIMENTAL	289
4.2.1 Materiales y métodos	289
4.2.2 Equipamiento	292
4.2.3 Preparación de muestras	293
4.3 RESULTADOS	293
4.4 CONCLUSIONES	311
4.5 REFERENCIAS	312
<b>CAPÍTULO V: Efecto del uso de NPs como matrices en el análisis por UV-MALDI MS de hidratos de carbono neutros. Análisis in situ de tejidos vegetales</b>	315
5.1 INTRODUCCIÓN	317
5.2 EXPERIMENTAL	323
5.2.1 Materiales y métodos	323
5.2.2 Equipamiento	325
5.2.3 Preparación de nanopartículas de TiO <sub>2</sub>	326
5.2.4 Preparación de matrices orgánicas clásicas y CNT	327
5.2.5 Análisis <i>in vitro</i>	327
5.2.6 Obtención del extracto de hidratos de carbono solubles a partir de tejidos	328
5.2.7 Preparación de muestras de tejido	329
5.3 RESULTADOS	330

5.3.1	Análisis de fructanos <i>in vitro</i> utilizando NPs. Determinación del límite de detección (LOD)	330
5.3.2	Análisis directo sobre el tejido (análisis <i>in situ</i> ). Deposición de NPs asistida por solvente	346
5.3.3	Análisis directo de tejido intacto (análisis <i>in situ</i> ). Deposición de NPs sin auxilio de solvente	355
5.4	CONCLUSIONES	359
5.5	REFERENCIAS	361
	<b>APÉNDICE 1</b>	367
	<b>APÉNDICE 2</b>	383
	<b>RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	413



# *CAPÍTULO I*

## *Introducción*

---



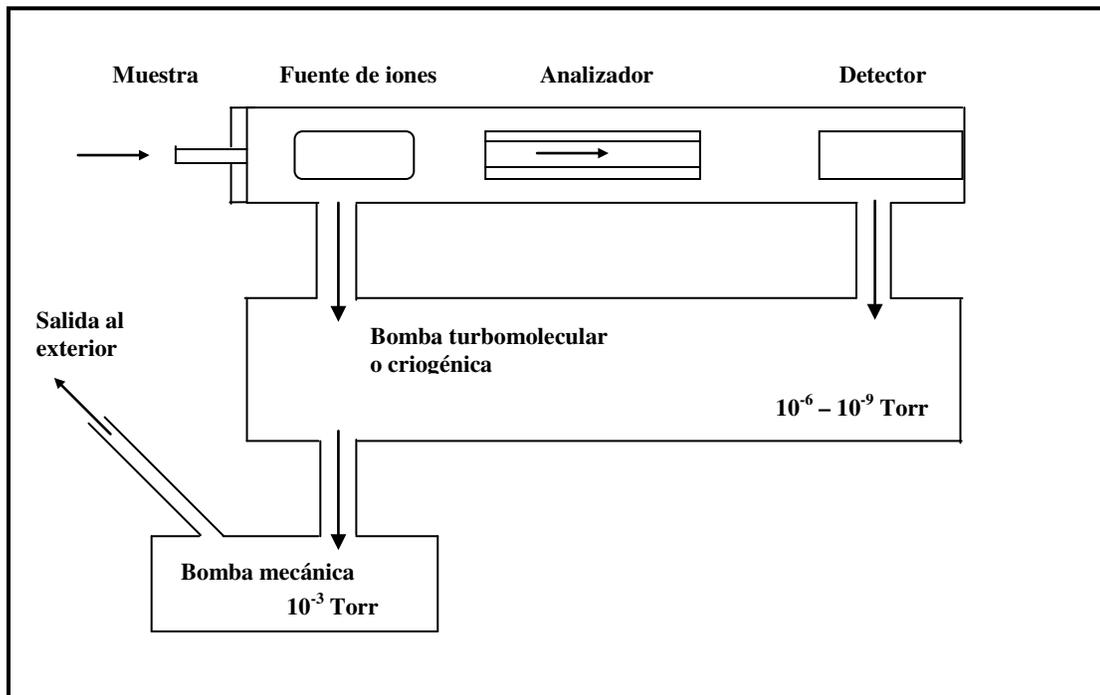
## 1.1 ESPECTROMETRÍA DE MASA

La espectrometría de masa (MS) reúne a un conjunto de técnicas que tienen por objetivo determinar la masa molar de compuestos químicos (analito, A). Se basa en la producción de iones gaseosos que se someten, dentro de un analizador, a la acción de un campo eléctrico y/o magnético para su detección y caracterización, de acuerdo al valor de su relación  $m/z$  (donde  $m$  es la masa del ión molecular en unidades atómicas dalton (Da) y  $z$  es el número de carga del mismo). La medición exacta de este valor para las moléculas ionizadas del analito (ión molecular) dará información sobre su peso molecular. Es posible además, obtener información sobre el tipo de grupo funcionales o bloques estructurales presentes, así como la secuencia que los mismos tienen en la molécula a través de estudios de fragmentación [1, 2]. La fragmentación del ión molecular, llamado ión precursor o padre, dará fragmentos iónicos producto, que serán detectados con su propio valor de  $m/z$ . El conjunto de fragmentos producto formados es característico de cada analito y depende de su estructura química.

Existen elementos comunes a todo espectrómetro de masa: una fuente o cámara generadora de iones gaseosos, un analizador (o más de uno), un detector y un sistema de vacío (figura 1.1). En la actualidad, se ofrecen en el mercado una gran variedad de espectrómetros de masa que resultan de las combinaciones lógicas de las distintas fuentes productoras de iones, con los diferentes tipos de analizadores.

La gran variedad de equipamiento disponible en espectrometría de masa difiere fundamentalmente en los métodos empleados para generar los iones, los cuales se basan en fenómenos físicos y físico-químicos de volatilización y ionización diferentes. A lo largo de los últimos 60 años se han ido perfeccionando y desarrollando distintos métodos

de ionización. En la figura 1.2 se presenta en forma resumida la evolución en el tiempo de la espectrometría de masa teniendo en cuenta la introducción de los diferentes métodos de ionización, la ifenación con técnicas cromatográficas, el rango dinámico y la sensibilidad así como los campos de aplicación.



**Figura 1.1.** Diagrama general de un espectrómetro de masa [3].

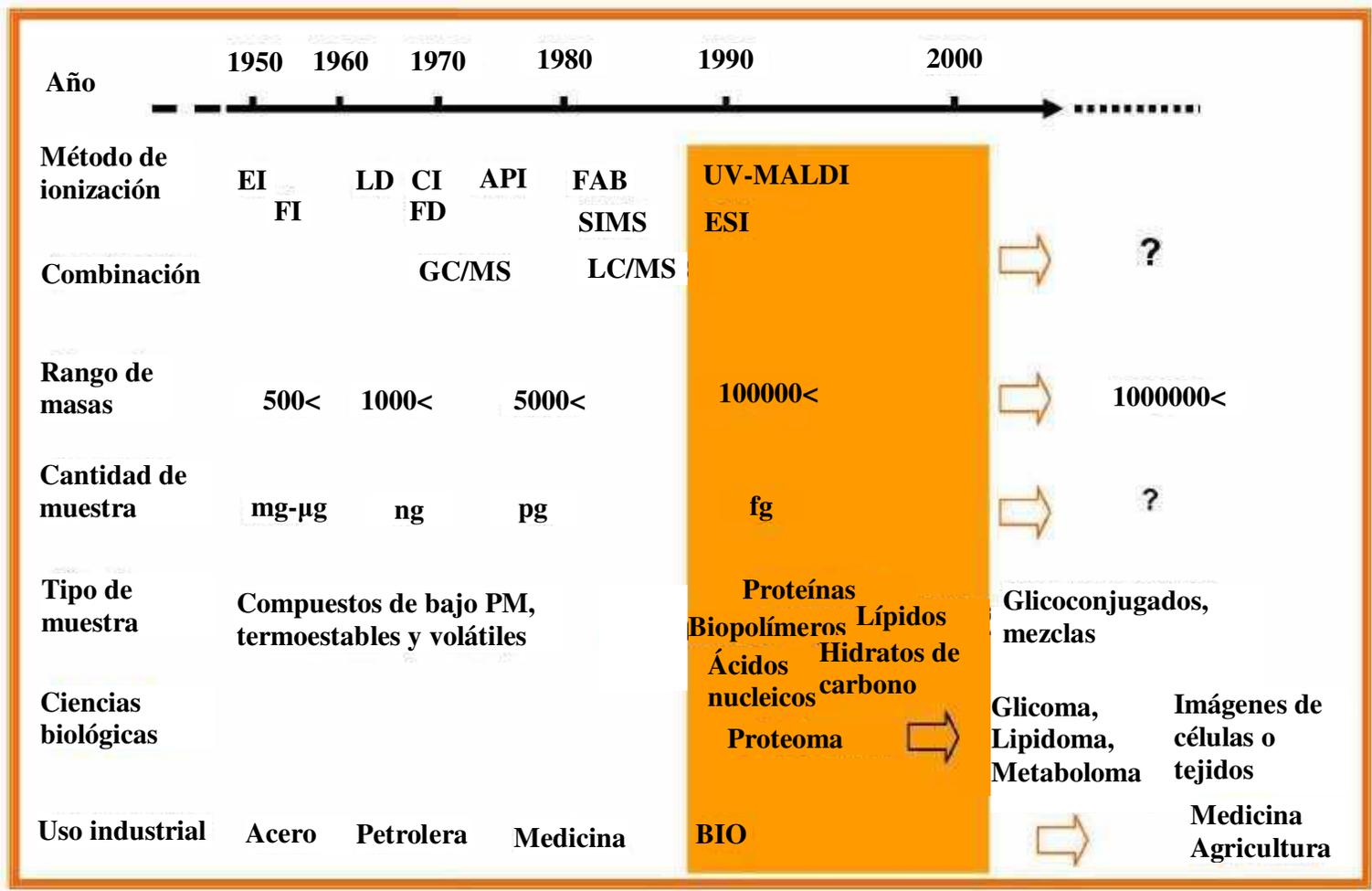


Figura 1.2. Evolución en el tiempo de la espectrometría de masa: método de ionización, sensibilidad, campos de aplicación [4].

El primer método de ionización utilizado fue la denominada ionización electrónica (EI). Los iones se producen por bombardeo con un haz de electrones acelerados a los analitos gaseosos neutros [2]. En el caso de ser el analito sólido o líquido a temperatura ambiente se usa calor para la obtención del gas correspondiente. La aplicación de este método esta limitada al análisis de compuestos de bajo peso molecular, termoestables y fácilmente volatilizables. Poco después surgió el método de ionización por campo (FI), donde el analito gaseoso neutro se expone a la acción de un fuerte campo eléctrico que produce su ionización por efecto túnel [2].

Más tarde surgió el método denominado ionización química (CI) [2]. Los iones gaseosos se originaban en dos etapas: en la primera, el analito era volatilizado mediante el uso de calor, y en la segunda etapa de ionización, el analito gaseoso neutro se bombardeaba con un haz de moléculas gaseosas ionizantes.

Estos métodos convencionales de ionización resultaron ser muy útiles en el campo de la química orgánica para el análisis de compuestos de bajo peso molecular, pero excluyó del estudio a los compuestos de masas moleculares mayores a 500 Da y a aquéllos termolábiles.

En los años 70 y a principios de los 80, se describieron los primeros experimentos en los que las moléculas térmicamente inestables pudieron ser transformadas en iones gaseosos sin descomposición alguna y en un único paso. Estas técnicas de volatilización/ionización se denominaron técnicas de desorción e incluyen:

- La ionización por bombardeo con un haz de átomos acelerados o FAB (*fast atom bombardment*). En esta técnica el analito no volátil se deposita sobre un portamuestras metálico (electrodo portamuestras), éste se introduce en la cámara de ionización en alto

vacío, y es bombardeado con un haz de átomos neutros acelerados, como He o Xe [2, 5]. Cuando se utilizan haces de iones acelerados como He<sup>+</sup> o Xe<sup>+</sup> para bombardear la muestra, se habla de emisión de iones secundarios o SIMS (*secondary ion mass spectrometry*) [2, 6].

- Otro método desarrollado fue la ionización por desorción de campo o FD (*field desorption*). El analito depositado sobre la punta del electrodo aguja es expuesto a la acción de un fuerte campo eléctrico que induce su volatilización/ionización por efecto túnel [2].

- También se desarrolló la desorción/ionización por acción de un plasma o PD (*plasma desorption*) [7].

- Finalmente, se puede mencionar la ionización por acción de un láser o LDI (*laser desorption/ionization*) [2, 8].

En conjunto, todos estos métodos de ionización ampliaron por un lado el rango de peso molecular de los compuestos analizables para el análisis por espectrometría de masa y por el otro el uso de la técnica para el análisis de moléculas termosensibles y macromoléculas, tanto sintéticas como biomacromoléculas.

A fines de la década del 80 se introdujeron las técnicas de ionización suaves más modernas: la desorción/ionización asistida por una matriz e inducida por un láser ultravioleta (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, UV-MALDI) y la volatilización/ionización por nebulización en un campo eléctrico (*electrospray ionization*, ESI) [2, 4, 9-11].

En la espectrometría de masa UV-MALDI (UV-MALDI MS) el analito se deposita junto con una matriz sólida fotosensible sobre un portamuestras (electrodo

portamuestras) y la mezcla seca introducida en la cámara de ionización en alto vacío se irradia con un láser ultravioleta (UV). La matriz, que es el componente mayoritario, absorbe la energía recibida y provoca tanto su propia desorción y ionización como la desorción/ionización del analito incluido en la muestra sólida [2, 4, 9, 10].

En la espectrometría de masa ESI la solución polar que contiene al analito se convierte en una nube de gotas cargadas que se somete a la acción de un campo eléctrico fuerte (4 kV aproximadamente), el solvente se evapora y los iones moleculares gaseosos generados son enfocados hacia el analizador [11].

Estos dos desarrollos ampliaron los horizontes de aplicación de la espectrometría de masa y durante la década del 90 revolucionaron el campo de investigación de las ciencias biológicas. Permitieron el análisis de biomacromoléculas o biopolímeros de alto peso molecular como proteínas (de hasta 300 kDa), hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos y metabolitos, así como de polímeros sintéticos (figura 1.2). Más recientemente dieron origen a nuevas áreas de investigación denominadas: “Proteómica”, “Glicómica”, “Lipidómica” y “Metabolómica” (figura 1.2) [12, 13].

Los autores de estos desarrollos recibieron, en reconocimiento de lo que los mismos significaron, el Premio Nobel en Química, en el año 2002: Koichi Tanaka (Japón) por su contribución al desarrollo de la espectrometría de masa UV-MALDI y John B. Fenn (USA) por el desarrollo de la espectrometría de masa ESI [4, 14].

Paralelamente, los analizadores también debieron perfeccionarse con el fin de satisfacer los requerimientos crecientes respecto al rango de masa de los compuestos analizables (rango dinámico de análisis), sensibilidad y exactitud necesarios, principalmente para el análisis de muestras en forma confiable. En la tabla 1.1 se

comparan las ventajas y desventajas de los analizadores más comunes que forman parte de instrumentos comerciales, así como el rango de masa de análisis y poder de resolución [3].

Analizador (a)	Cota máxima de m/z	Ventajas	Desventajas
Cuadrupolo (Q)	4000 – 6000	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buena resolución</li> <li>- Pequeño tamaño</li> <li>- Bajo costo</li> <li>- Tolera altas presiones</li> <li>- Óptimo para el acople a espectrometría de masa tandem (MS<sup>n</sup>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rango de masas limitado</li> <li>- Pobre adaptabilidad a UV-MALDI MS</li> </ul>
Tiempo de vuelo (TOF)	∞	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rango teórico de masas ilimitado</li> <li>- Buena resolución</li> <li>- Fácil cambio de modo de análisis, iones (+) o (-)</li> <li>- Velocidad de análisis muy alta</li> <li>- Diseño simple</li> <li>- Fácil adaptación a UV-MALDI MS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Costo de los equipos de alta resolución</li> <li>- Tamaño</li> </ul>
Sector magnético	20000	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gran capacidad de resolución</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No tolera altas presiones</li> <li>- Elevado costo</li> <li>- Baja velocidad de análisis</li> </ul>
Trampa iónica (IT)	2000	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buena resolución</li> <li>- Pequeño tamaño</li> <li>- Diseño simple</li> <li>- Apropiado para MS<sup>n</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rango de masas limitado en los instrumentos comercializados actualmente</li> </ul>
<i>Ion ciclotron resonance con transformada de Fourier (FT-ICR)</i>	10000	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resolución y sensibilidad altas</li> <li>- Apropiado para MS<sup>n</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Costo muy elevado</li> <li>- Gran tamaño</li> </ul>

**Tabla 1.1.** Comparación general de los analizadores de masas comunes [15, 16]. (a) No se incluye el analizador llamado OrbiTrap por encontrarse el mismo en etapa de desarrollo acoplado en los equipos comerciales sólo a la cámara ESI [16].

La resolución (o poder de resolución) de un instrumento se define como la capacidad de un espectrómetro de masa para distinguir iones con valores de m/z muy

próximos. Cuanto mayor es el poder de resolución, mayor es su habilidad para diferenciar especies químicas y mayor es la exactitud de la medición.

Actualmente existe una gran variedad de espectrómetros disponibles en el mercado, cuyas capacidades varían dependiendo de su diseño y del objetivo con que fueron creados. Entre los equipos más utilizados para el análisis de biomacromoléculas se pueden mencionar: los espectrómetros de masa UV-MALDI con un analizador de tiempo de vuelo (UV-MALDI-TOF) y los espectrómetros de masa ESI con un analizador de tipo cuadrupolo (ESI-Q), o un analizador de tiempo de vuelo (ESI-TOF), o una trampa iónica (ESI-IT) [16, 17].

En la espectrometría de masa en tandem o  $MS^n$  se alinean dos o más analizadores de manera que a partir del ión molecular los iones producto y/o nietos que se generan por fragmentación pueden ser analizados. Las variantes instrumentales en espectrometría de masa tandem incluyen por ejemplo: el arreglo de dos analizadores de tiempo de vuelo (TOF-TOF), o un analizador de tipo cuadrupolo y un tiempo de vuelo (Q-TOF) acoplados al método de ionización MALDI (MALDI-TOF-TOF, MALDI-Q-TOF) [18, 19]. Un arreglo similar puede encontrarse en equipos con ionización por nebulización (ESI-Q-TOF). Otras variantes incluyen la combinación de un analizador cuadrupolo y una trampa iónica (ESI-Q-IT) o incluso dos analizadores de tipo cuadrupolo en serie (ESI-Q-q-Q) [20, 21].

Luego de atravesar el/los analizadores, los iones alcanzan el detector, encargado de generar una señal. Los iones son detectados al convertir su energía cinética en una corriente eléctrica, mediada por electrones, o al generar una corriente por cargas en movimiento. Entre los detectores más comúnmente utilizados cabe mencionar al

“multiplicador de electrones secundarios” y al “fotomultiplicador” [2, 16, 17]. El primero consiste en un arreglo de 10 dínodos, compuestos de un material emisor de electrones, como BeO, o CsCd, que se mantienen a potenciales crecientes. Una vez que un ion alcanza a la primera placa multicanal se emiten electrones secundarios, que son atraídos al próximo dínodo donde se generan más electrones secundarios, produciéndose así una cascada de electrones o corriente que finalmente se detecta por un osciloscopio digital que envía los datos a la computadora. Este detector logra una amplificación de la señal de  $10^6$  veces. El fotomultiplicador funciona básicamente como multiplicador de electrones, pero la corriente de electrones secundarios finalmente incide sobre una pantalla fotoemisora que libera fotones, los cuales son entonces detectados por una pantalla fotosensible. Este tipo de detector tiene una vida media mayor que la del detector anterior, por lo que su uso es cada vez más frecuente [2, 16, 17].

Otro elemento común a todos los espectrómetros de masa, es un conjunto de bombas que mantienen el sistema en vacío. El vacío es necesario para evitar la colisión de los iones entre sí o con otras moléculas que puedan inducir su fragmentación o incluso impedir su llegada al detector, causando pérdida de resolución y sensibilidad del instrumento [2, 16, 17]. La muestra se encuentra normalmente a presión atmosférica (760 Torr) en los equipos ESI MS y en cámaras con vacío regulado en los equipos UV-MALDI MS, mientras que en el analizador la presión puede alcanzar valores de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  Torr. Existen varias configuraciones mecánicas que mantienen el vacío en el equipo mientras se introduce la muestra en la cámara de ionización, combinándose bombas mecánicas, con bombas criogénicas, turbomoleculares y de difusión (figura 1.1).

## 1.2 MÉTODOS DE IONIZACIÓN

### 1.2.1 Ionización electrónica (*Electron ionization, EI*)

Esta técnica, desarrollada por Bleakney [22] y Nier [23] resulta útil para ionizar moléculas en fase gaseosa pero induce una gran fragmentación, de modo que los iones moleculares en algunos casos no son observados. Se hacen colisionar a las moléculas gaseosas con electrones acelerados. Los gases de las especies con alta presión de vapor son inyectados dentro de la fuente. Los analitos líquidos y sólidos son calentados para incrementar la presión de vapor y pasarlos al estado gaseoso. No se trata de un método de volatilización/ionización, sino de ionización directa, de modo que la muestra debe encontrarse en estado gaseoso, para lo cual se la debe calentar. Esto hace que la EI en su forma clásica no pueda aplicarse al análisis de moléculas termolábiles, tales como proteínas, aminoácidos e hidratos de carbono [2, 16].

### 1.2.2 Ionización química (*Chemical ionization, CI*)

Esta técnica de ionización suave produce iones con un pequeño exceso energético [24]. Presenta la ventaja de generar espectros más limpios, debido a una menor cantidad de fragmentaciones, en el cual las especies moleculares son fácilmente reconocibles. Consecuentemente, la ionización química es complementaria a la ionización electrónica. La ionización química consiste en producir iones a través de una colisión de las moléculas gaseosas del analito con iones primarios gaseosos acelerados presentes en la fuente. La colisión entre moléculas es inducida en un lugar determinado de la fuente, y para producirla es necesario tener una presión tal que la permita. Los iones producidos

por una molécula de analito a partir de la pérdida de un protón, o la adición de un protón u otro ion cargado, son especies iónicas gaseosas denominadas pseudomoleculares.

Dentro de la CI merece destacarse la transferencia de protones (*proton transfer*). Cuando las moléculas de analito (A) son introducidas en el plasma de ionización, el gas con el cual reaccionan ( $\text{GH}^+$ ) puede transferir un protón a cada molécula A y producir la forma protonada  $\text{AH}^+$ . Este proceso de ionización química puede ser descrito como una reacción ácido-base, donde el gas ionizado es el ácido y el analito, la base. La transferencia de protones depende de la afinidad del analito y del gas por los protones, si la afinidad del gas es mayor que la del analito, la transferencia no se llevará a cabo. Los compuestos más utilizados para la transferencia son metano e isobutano protonados ( $\text{CH}_5^+$  y  $\text{C}_4\text{H}_9^+$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) [16].

### 1.2.3 Ionización por campo (*Field ionization, FI*)

Es un método que utiliza campos eléctricos fuertes para producir iones a partir de moléculas en fase gaseosa. Este es un método de ionización suave [25]. Al igual que la CI y la EI, la FI se utiliza para ionización del analito en fase gaseosa. La muestra es introducida en la fuente utilizando las mismas técnicas que en CI y EI. En la FI se pueden obtener iones del tipo  $\text{A}^{*+}$  y/o  $\text{AH}^+$ , dependiendo de la naturaleza del analito y del modo de operación seleccionado. La formación de especies moleculares protonadas puede ocurrir a partir de reacciones ion - molécula que se producen entre el ion radical inicial y las moléculas neutras de la muestra que se encuentran cerca de la región de generación de iones. Debido a que la energía transferida en este proceso es muy baja, se generan iones con muy poco exceso de energía vibracional, evitándose así la formación de fragmentos.

Gracias a esta baja energía, la FI es considerada una de las técnicas más suaves para la generación de iones moleculares. Generalmente, la FI se utilizaba como complemento de la CI y EI, y se utilizaba cuando ambas técnicas no permitían obtener el ion molecular. Sin embargo, su aplicación sigue limitándose al campo de las moléculas térmicamente estables [16].

#### **1.2.4 Bombardeo por átomos acelerados (*Fast atom bombardment, FAB*) y espectrometría de masa de iones secundarios (*Secondary ion mass spectrometry, SIMS*)**

La técnica denominada SIMS [26] analiza los iones secundarios producidos cuando una superficie sólida (o semisólida) es irradiada con un haz de iones atómicos gaseosos acelerados. Esta técnica es utilizada para el análisis de sólidos, y es especialmente útil para estudiar superficies de materiales. De este modo, se obtienen mapas químicos de alta resolución a lo largo de la superficie de la muestra.

FAB es una técnica suave que consiste en enfocar sobre la muestra sólida un haz de alta energía cinética de átomos neutros acelerados. En esta técnica, la muestra debe ser disuelta o suspendida en matrices líquidas no volátiles. En la práctica, el glicerol es el más comúnmente usado, mientras que el alcohol *m*-nitrobencílico (mNBA) es una buena matriz para compuestos no volátiles (menos polares), y la di y trietanolamina son útiles, debido a su basicidad, para producir iones negativos. También se utilizan alternativas del glicerol, como el tioglicerol (mezcla eutéctica del ditiotreitrol ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ) y el ditioeritritol ( $C_4H_{10}O_2S_2$ )). En esta técnica la naturaleza líquida de la matriz genera en forma continua capas nuevas superficiales que permiten la formación reproducible de iones. Las partículas energéticas calientan, por transferencia de energía cinética, la

solución de la muestra, produciendo la desorción de iones y moléculas. Los primeros son enfocados y acelerados por diferencia de potencial hacia el analizador. Estas técnicas producen poca ionización. Este método es útil para el análisis de analitos de peso molecular medio (de alrededor de 1000 Da), como péptidos y nucleótidos. Los iones producidos presentan un largo tiempo de vida, lo cual es ventajoso para realizar distintos análisis, utilizando por ejemplo analizadores múltiples (MS/MS). Sin embargo, estas técnicas presentan como desventaja un alto número de señales o clusters producidas por la matriz, lo que hace al espectro más complejo [2, 16, 22].

### **1.2.5 Desorción por campo (*Field desorption*, FD)**

Esta fue la primera técnica usada en MS que producía la desorción y la ionización de un analito sin usar calor para la volatilización [27]. Dado que no es necesaria la evaporación previa de la muestra antes de la ionización, la FD es una técnica indicada para analizar moléculas termolábiles. La muestra es depositada, a través de la evaporación de una solución que también contiene al analito y una sal, sobre un filamento de tungsteno o renio cubierto con microagujas de carbón. Se produce una diferencia de potencial entre los filamentos y el contra - electrodo para generar un campo eléctrico muy alto. Los iones generados migran hasta la punta de las agujas, donde se produce la desorción de los mismos. La ionización se produce en la fase condensada o cerca de la superficie del filamento por interacción con un campo eléctrico, en forma similar a lo que ocurre en FI. Se trata de un método de ionización suave, y prácticamente, no se observa fragmentación del ion o pseudo ion molecular [2, 16].

### **1.2.6 Desorción por plasma (*Plasma desorption, PD*)**

En esta técnica, la muestra es depositada en un pequeño papel de nylon aluminizado expuesto a una fuente de iones de descripción de  $^{252}\text{Cf}$  de alto contenido energético. El bombardeo de estos fragmentos produce la desorción y la ionización de los iones componentes de las moléculas neutras de tipo salino. Esta técnica permite el análisis de compuestos inorgánicos de peso molecular del orden de los 10000 Da [2, 16].

### **1.2.7 Desorción por láser (*Laser desorption, LD o LDI*)**

Se basa en el bombardeo de la superficie de la muestra que generalmente se encuentra en estado sólido o semisólido con pulsos de un láser UV-visible. Estos pulsos producen una ablación en el material de la superficie, y crea un microplasma de iones y moléculas neutras que pueden reaccionar consigo mismas en esa densa fase de vapor cerca de la superficie de la muestra. El pulso del láser produce tanto la vaporización (desorción) como la ionización de la muestra. Es una técnica que se utiliza para el estudio de superficies y para el análisis de la composición local de la muestra, como inclusiones en minerales u organelas celulares. Incluso, se puede obtener una ionización selectiva ajustando la longitud de onda del láser o usando múltiples láseres. Se trata de una técnica de ionización fuerte que induce fragmentaciones muy abundantes a partir de los iones moleculares. Debido a que la fuente del láser es pulsada y los pulsos producidos son muy cortos, se necesitan analizadores que detecten en forma rápida y simultánea los pulsos de iones generados, como los analizadores de tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF). La obtención de un buen espectro de masa depende principalmente de las propiedades físicas y estabilidad fotoquímica de los analitos. Incluso, en el mayor número de casos, los iones

generados son fragmentos producidos por los iones moleculares. Esta técnica requiere que la especie a analizar tenga una absorbancia no nula a la longitud de onda del láser [16].

### **1.3 DESORCIÓN/IONIZACIÓN INDUCIDA POR UN LÁSER UV y ASISTIDA POR UNA MATRIZ (UV-*Matrix-assisted laser desorption/ionization*, UV-MALDI) y VOLATILIZACIÓN/IONIZACIÓN POR NEBULIZACIÓN EN UN CAMPO ELECTRICO (*Electrospray ionization*, ESI)**

Las técnicas de espectrometría de masa UV-MALDI y ESI comparten algunas características: son métodos de ionización suave, con escasa o ninguna fragmentación, que brindan información generalmente sobre el ión molecular; presentan una elevada sensibilidad en el orden de femtomol o átomomol, se aplican al análisis de péptidos y proteínas (intactas o degradadas enzimáticamente) y sus modificaciones post-traduccionales, al análisis de nucleótidos y nucleósidos, hidratos de carbono, lípidos, glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos), polímeros sintéticos y pequeñas moléculas polares. En la tabla 1.2 se detallan las diferencias más significativas que permitirán seleccionar la técnica más adecuada para el análisis de una muestra particular.

UV-MALDI MS	ESI MS
<p>-Se producen iones monocargados (<math>m/z</math> con <math>z=1</math>), que se traduce en una “simplicidad espectral” óptima para el análisis tanto de muestras puras como de mezclas complejas (ejemplo: oligómeros, digeridos tripticos, etc.)</p> <p>- No presenta limitación en relación al peso molecular capaz de analizar</p> <p>- Tolerancia a la presencia de sales del orden de mM</p>	<p>- Se producen generalmente iones policargados (<math>m/z</math> con <math>z=1, 2, 3, \dots, n</math>). El número de cargas del ion depende del número de grupos ionizables en la molécula. Para un compuesto puro, se observan en el espectro numerosos iones con distintos valores de <math>m/z</math> que difieren en su carga, pero corresponden al mismo ion molecular. Esta particularidad hace dificultosa la aplicación de la técnica al análisis de mezclas de compuestos.</p> <p>- Su rango dinámico de análisis no supera el valor de <math>m/z</math> 6000 (limitado por el rango dinámico del cuadrupolo interno)</p> <p>- Interferencia frente a la presencia de sales</p> <p>- Fácil adaptación a técnicas separativas: HPLC, ECAR, etc.</p> <p>- Ionización más suave, permite el análisis (estructural y cinético) de complejos estabilizados por uniones no covalentes, como por ejemplo, interacciones proteína – proteína., fármaco – ADN, etc.</p>

**Tabla 1.2.** Comparación entre las técnicas UV-MALDI MS [4] y ESI MS [28].

### 1.3.1 UV-MALDI MS

La espectrometría de masa UV-MALDI requiere la preparación de una muestra sólida por dilución o mezcla del analito con una matriz. Esta es una especie fotosensibilizadora, con propiedades tales como capacidad de absorber la energía emitida por el láser, inducir su desorción y la del analito, promoviendo la desorción/ionización del mismo. En la sigla espectrometría de masa UV-MALDI las letras UV denotan el tipo de láser utilizado. Los láseres que emiten fotones en el rango de la región ultravioleta (UV), de 260 a 360 nm, son los utilizados casi exclusivamente en UV-MALDI MS. Los

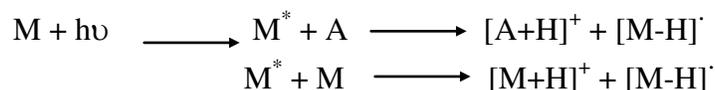
equipos comerciales están provistos generalmente con un láser de nitrógeno con una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 337 nm o un láser sólido (Nd:YAG) de  $\lambda_{em} = 355$  nm. En el equipo, el haz de fotones del láser se enfoca hacia el electrodo portamuestras a través de un sistema óptico de lentes, y su variación en diámetro, entre 50 y 500  $\mu\text{m}$ , permite regular la potencia del láser. Éste se utiliza en forma pulsada, y cada pulso tiene una duración del orden de 2-3 nanosegundos. La cantidad de material removido de la muestra sólida por un pulso del láser se calcula de una superficie entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  y unos pocos nanómetros de profundidad, de aquí su extrema sensibilidad.

Se sabe que la ionización de las moléculas tiene lugar durante la volatilización por intercambio de electrones y/o de protones (protonación/desprotonación), o por interacción con unidades que poseen carga neta, como iones metálicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , cationización) [2, 16]. El mecanismo exacto por el cual esto sucede aún no se ha comprendido totalmente [29, 30]. Sin embargo, dos modelos de ionización han sido propuestos para explicar la protonación del analito:

*Modelo de la ionización fotoquímica:* Este modelo propone la formación de cationes radicales libres de la matriz (M) como consecuencia de la energía UV absorbida. Estos intermediarios altamente reactivos sufren reacciones químicas con especies neutras (analito y matriz) produciendo su protonación en forma directa, y a su vez, las especies ionizadas de la matriz pueden reaccionar con otras moléculas neutras del analito (A) para ionizarlo [31-33].

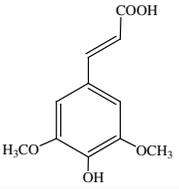
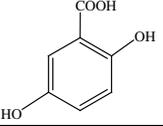
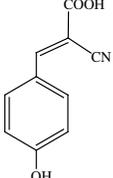


*Modelo de matriz no ionizada:* En este caso, la matriz electrónicamente excitada, como consecuencia de la absorción de la energía del láser, actúa como un ácido transfiriendo un protón al analito o a una molécula de la matriz no excitada. La transferencia intermolecular del protón dependerá de las afinidades relativas de las moléculas de matriz y del analito [34, 35].



Finalmente, debemos considerar que la formación de iones dependerá de la naturaleza química de la matriz, como también de la del analito [33].

Las matrices que se utilizan en general, a las que llamamos matrices orgánicas clásicas, son compuestos orgánicos aromáticos que contienen un grupo carboxilo en su estructura. En la Tabla 1.3 se muestran los compuestos más frecuentemente utilizados en UV-MALDI MS. Sin embargo, existe una gran variedad de matrices y combinaciones de las mismas que se emplean de acuerdo a la naturaleza del analito y a sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, polaridad, etc.).

Matriz	Uso	Referencia
<p><b>Ácido sinapínico (SA)</b></p> 	Proteínas, glicoproteínas y polímeros sintéticos	[36]
<p><b>Ácido 2, 5 – dihidroxibenzoico (GA)</b></p> 	Proteínas y glicoproteínas, hidratos de carbono, polímeros sintéticos, mapeo de péptidos	[37]
<p><b>Ácido <i>trans</i>-<math>\alpha</math>-ciano-4-hydroxicinámico (CHCA)</b></p> 	Proteínas y glicoproteínas, mapeo de péptidos y polímeros sintéticos	[38]

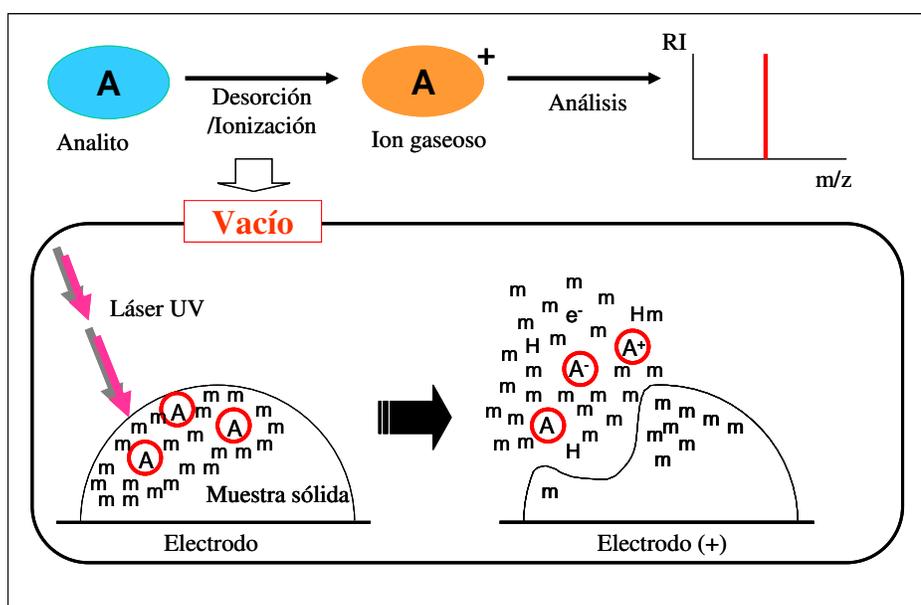
**Tabla 1.3.** Matrices orgánicas clásicas para UV-MALDI MS

### 1.3.1.1 Métodos de preparación de la muestra en UV-MALDI MS

La realización de experimentos utilizando la técnica de ionización UV-MALDI se puede dividir en dos etapas fundamentales:

*Primera etapa:* En esta primera etapa, llamada “preparación de muestra”, el compuesto a analizar (A) se disuelve en una solución que contiene la especie química que actuará como la matriz o fotosensibilizador (M). Estas moléculas orgánicas deben tener una alta absorción a la longitud de onda del láser UV que se va a utilizar. Esta mezcla de A y M se deposita sobre el electrodo portamuestras y se deja secar en atmósfera normal antes del análisis. El resultado es un depósito de una “solución sólida” heterogénea compuesta por

cristales de matriz y analito. El analito se encuentra embebido dentro de la matriz, como “las pasas en el budín”, de manera que las moléculas del compuesto se encuentran aisladas unas de otras. Incluso, la gran cantidad de moléculas de matriz, que supera ampliamente la del analito, hace que las moléculas de éste se encuentren aisladas, evitando así la formación de clusters de analito que inhiben la aparición de iones moleculares (figura 1.3).

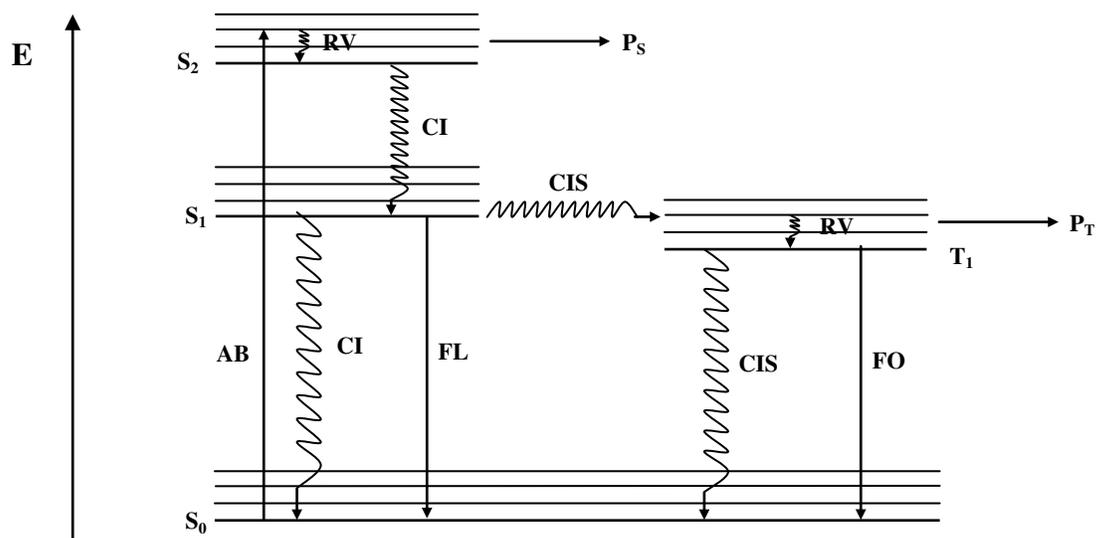


**Figura 1.3.** Proceso UV-MALDI (*ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*): A, analito; m, matriz; A<sup>+</sup>, catión del analito en el estado gaseoso, A<sup>-</sup>, anión del analito en el estado gaseoso; e<sup>-</sup>, electrón. Análisis en modo positivo [4].

La matriz también minimiza los daños indirectos que el láser puede ocasionar a la muestra, al absorber la mayor parte de la energía térmica generada, y así incrementa la eficiencia del uso de la energía del láser. La utilización de una matriz es la base del uso exitoso de la técnica, ya que es la matriz la que absorbe la radiación UV. Por el contrario, el analito debe ser completamente transparente a la radiación del láser usado. Esto hace a

la técnica UV-MALDI una técnica suave y más universal que la técnica LDI, que por el contrario es un método de ionización muy fuerte.

La matriz UV-MALDI es una especie química cuyo comportamiento fotoquímico, descrito en el diagrama de Jablonsky (esquema 1.1), corresponde al de una especie cuya desactivación desde el estado electrónico excitado ocurre preferencialmente por la vía no radiativa con una rápida emisión de calor al medio.



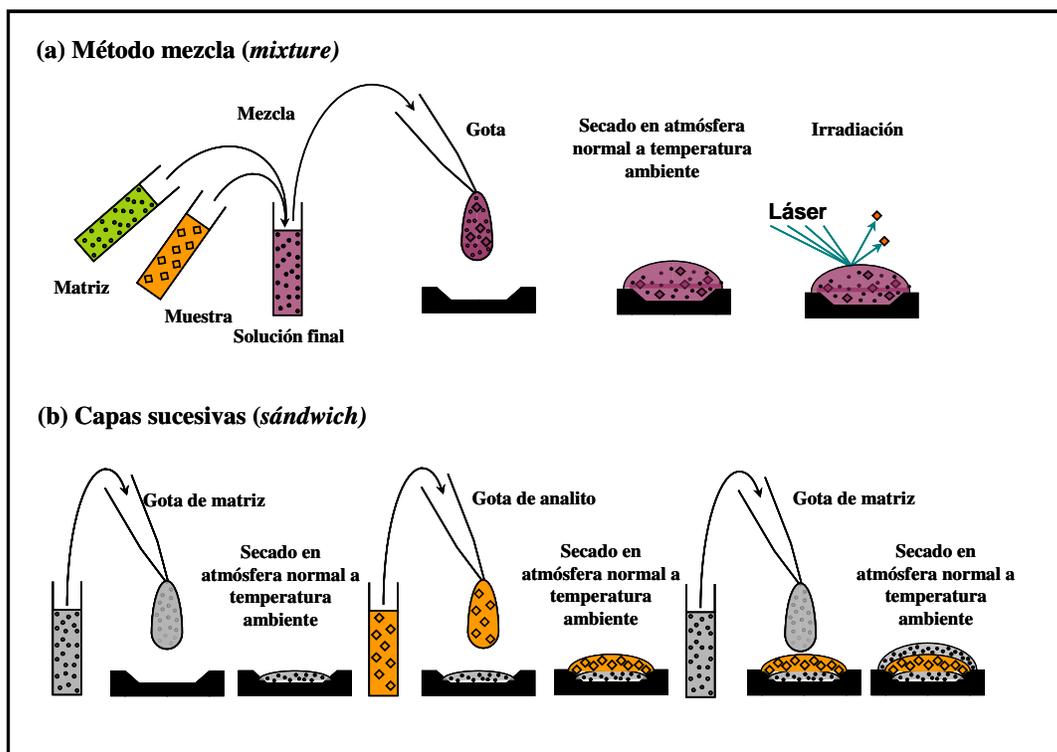
**Esquema 1.1.** Diagrama de energía y procesos originados a partir de la absorción de luz (AB):  $S_0$ , estado basal de energía;  $S_1$ , estado excitado singulete;  $S_2$ , estado excitado singulete de mayor energía;  $T_1$ , estado excitado triplete; RV, relajación vibracional; CI, conversión interna; FL, fluorescencia; CIS, cruce intersistemas; FO, fosforescencia;  $P_S$ , producto de reacción a partir de estado singulete;  $P_T$ , producto de reacción a partir de estado triplete (Diagrama de Jablonsky, [39]).

Como es sabido [39], el resultado de la interacción de moléculas con la luz UV – visible es la generación de estados electrónicamente excitados ( $S_1$ ,  $S_2$ ). Luego de la absorción de la luz, las moléculas pueden liberar al medio la energía absorbida a través de

vías radiativas (fluorescencia (FL) o fosforescencia (FO)), no radiativas (CI, CIS) o a través de transformaciones químicas permanentes denominadas procesos fotoquímicos ( $P_S$ ,  $P_T$ ), de manera de cumplir con la condición de conservación de la energía. La desactivación radiativa se manifiesta como luminiscencia (FL, FO), y la desactivación no radiativa (en ausencia de reacciones fotoquímicas) libera la energía como calor al medio (CI, CIS). La primera puede darse por medio de procesos unimoleculares o bimoleculares. En los procesos bimoleculares la especie electrónicamente excitada interactúa con un segundo cuerpo, denominado “*quencher*” (Q). Los procesos bimoleculares de desactivación, dependiendo de la naturaleza del *quencher*, pueden ser simples procesos fotofísicos que no alteran al analito (desactivación radiativa o no radiativa) o ser transformaciones químicas permanentes.

Asociado a la técnica UV-MALDI MS, existen diferentes modos de preparación de la muestra. El método más utilizado es el de mezcla o *mixture*, en el cual, se mezcla una alícuota por ejemplo de 0,5  $\mu\text{l}$  de solución de matriz con una alícuota de 0,5  $\mu\text{l}$  de solución de analito, ambas preparadas en solventes miscibles en los cuales el analito y la matriz son solubles. Se deposita 0,5-1  $\mu\text{l}$  de la solución final sobre el portamuestras y se lo lleva a sequedad por evaporación del solvente en atmósfera normal a temperatura ambiente. El segundo método más usado es el de capas sucesivas, *dry droplet* o sándwich, en el cual se colocan por ejemplo 0,5  $\mu\text{l}$  de solución de matriz sobre el electrodo portamuestras, llevándolo a sequedad como se indicó a temperatura ambiente. Luego, se colocan sobre la primer capa 0,5  $\mu\text{l}$  de solución de analito, se seca y luego nuevamente alícuotas de 0,5  $\mu\text{l}$  de solución de la matriz, llevando a sequedad a temperatura ambiente en cada caso. De esta manera, las capas pueden ser M:A:M<sub>n</sub>, con

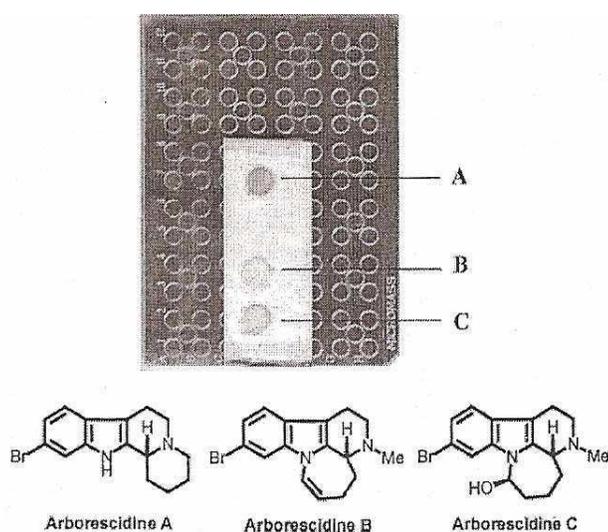
$n = 0, 1$  o  $2$ . La relación molar A:M varía entre 1:1000 hasta 1:10000 (figura 1.4). Algunos autores completan el secado de la muestra colocando el electrodo portamuestras dentro de un desecador o recipiente cerrado donde se puede hacer vacío.



**Figura 1.4.** Métodos de preparación de la muestra para análisis por UV-MALDI MS. (a) Método mezcla o *mixture*, (b) método de capas sucesivas *dry doplet* o sándwich [4].

Entre los métodos alternativos descritos para preparar las muestras para el análisis UV-MALDI MS, se puede mencionar el que utiliza directamente placas de cromatografía en capa delgada con soporte de aluminio (Al), las cuales son cortadas y colocadas directamente sobre el portamuestras mediante el uso de un adhesivo (figura 1.5) para su análisis por UV-MALDI MS (*thin-layer chromatography*, TLC- MALDI MS) [40]. En este caso, las placas de sílica suelen presentar un indicador fluorescente

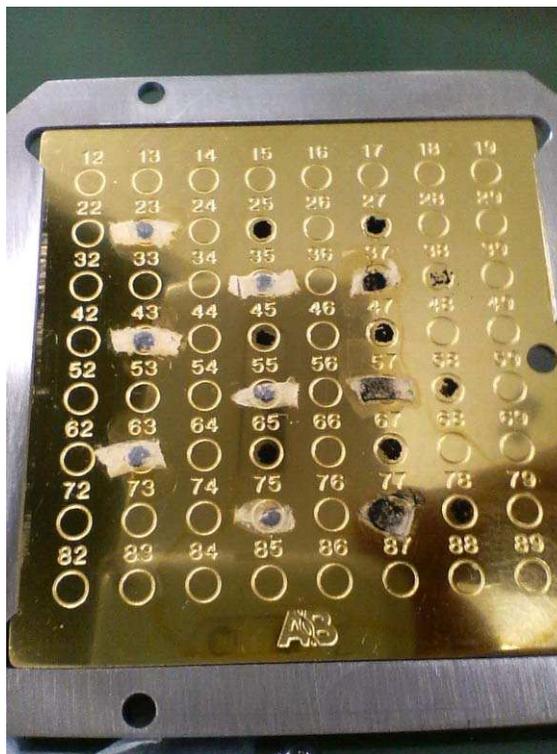
para la detección y localización de los analitos presentes en la placa a analizar. La matriz puede ser un líquido iónico (en este caso, una mezcla de la matriz clásica CHCA y la base trietilamina [40]) o cualquiera de las matrices UV-MALDI conocidas, la cual se deposita sobre la región ocupada por el analito. Este método resulta muy útil para la detección de compuestos presentes en mezclas complejas.



**Figura 1.5.** Análisis por UV-MALDI MS de un extracto que contiene tres alcaloides utilizando el método de preparación de muestra TLC-MALDI [40].

Cabe también mencionar el método de preparación de muestra en el cual se utiliza una membrana o tejido que se coloca directamente sobre el electrodo portamuestras. En algunos casos se usan adhesivos conductores de electricidad para la fijación de la muestra sobre el electrodo. Este método se utiliza en los análisis de muestras de tejido (*in vivo*), en los cuales el tejido es la muestra que se coloca sobre el electrodo portamuestras y

sobre la cual se transfiere la solución que contiene a la matriz, dejándola secar como ya se dijo, en atmósfera normal a temperatura ambiente (figura 1.6, ver capítulo V) [41].



**Figura 1.6.** Método de preparación de muestra de tejidos sobre el portamuestras. Se observa en los spots 23, 35, 37, 43, 55, 57, 63, 75 y 77 muestras de tejido que presentan matriz depositada sobre las mismas [41]. Matriz: nanotubos de carbono (CNT).

En forma similar, también se ha descrito la preparación de muestra para el análisis *in situ* de polipéptidos contenidos en la membrana luego de su caracterización y separación por la técnica SDS-PAGE (electroforesis seguida de transferencia a la membrana conductora por la técnica *electron-block*) [42].

*Segunda etapa:* La segunda etapa de la técnica UV-MALDI MS ocurre en condiciones de vacío dentro de la cámara de ionización. Este paso involucra la ablación de la muestra sólida por medio de un láser UV de corta duración que impacta (dispara o “shotea”) sobre

su superficie. La irradiación del láser induce un rápido calentamiento de la muestra (cristales y/o material amorfo) por acumulación de grandes cantidades de energía térmica en la fase condensada a través de la excitación electrónica de las moléculas de matriz. El rápido calentamiento produce sublimación local de moléculas de matriz, ablación de la porción de material superficial y la expansión de la matriz a una fase gaseosa, incorporando consigo por arrastre mecánico y/o electrostático las moléculas de analito intacto. El mecanismo de formación de iones involucra transferencia de cationes ( $H^+$ ,  $Na^+$  y/o  $K^+$ ), pérdida de protones en la fase sólida antes de la ablación/desorción y/o intercambio de las mismas partículas en la fase gaseosa (plasma). Los iones en fase gaseosa son luego enfocados por un campo eléctrico hacia el analizador.

Al igual que LD y SIMS, UV-MALDI MS ha sido utilizada para el mapeo de la distribución superficial de distintos compuestos en tejidos y materiales no volátiles. Permite, por ejemplo, el análisis de péptidos, proteínas y otras biomoléculas directamente en la porción del tejido [16, 41, capítulo V].

Las desventajas de esta técnica que deben destacarse incluyen la baja reproducibilidad de las señales obtenidas entre los disparos sucesivos del láser sobre la misma muestra. Se observa también una alta dependencia de los resultados con el método de preparación de muestra utilizado. Cada disparo produce la ablación de una pequeña porción de la superficie de la muestra, produciendo a veces variaciones de la composición de la región. Además, el cambio de la posición del impacto en la superficie de la muestra puede producir variación en el espectro debido a la heterogeneidad de la muestra. Para mejorar la reproducibilidad de los resultados, es necesario incrementar la homogeneidad de la muestra. Esto es muy importante cuando se requieren resultados cuantitativos

precisos. En un esfuerzo para aumentar la homogeneidad de las muestras y la reproducibilidad de las señales se ha propuesto el uso de líquidos iónicos (material de alta viscosidad a temperatura ambiente) como matrices [43-45], así como el agregado de líquidos viscosos transparentes de alto punto de ebullición (vaselina, glicerol) en la muestra [16, 44, 45]. Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de sales, buffers y otras sustancias afectan la cristalización de la mezcla analito-matriz, y en base a los resultados obtenidos en la literatura se recomienda en muchos casos la remoción de las mismas [16, 44, 45].

### 1.3.2 Analizador de tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF)

El analizador de tiempo de vuelo TOF mide el tiempo que tardan los iones acelerados por un voltaje fijo  $V$  en llegar al detector. Consiste en un tubo simple de longitud variable, entre 70 y 180 cm, dentro del cual los iones describen una trayectoria lineal hacia el detector (Figura 1.7).

Los iones gaseosos que se generaron en la cámara de ionización, luego del pulso del láser, son sometidos a un campo eléctrico formado entre el electrodo portamuestras y una grilla de electrodos ubicados justo antes de la entrada al analizador, de manera que ingresan al mismo con una cierta energía cinética. El tiempo de vuelo de un ión depende tanto de su masa ( $m$ ) y carga ( $ze$ ) como de su energía cinética ( $EC$ ). La  $EC$  en el campo eléctrico  $V$  será igual al producto de su carga,  $ze$ , y la fuerza del campo eléctrico o voltaje aplicado  $V$ :

$$EC = z e V$$

Dado que todos los iones son sometidos al mismo campo eléctrico se asume, en condiciones ideales, que todos los iones ingresan al analizador con la misma EC, independientemente de sus masas (m),

$$EC = \frac{1}{2} m v^2 \quad (2)$$

donde v es la velocidad de los iones, e igual a

$$v = \delta x / \delta t = D/t \quad (3)$$

donde  $\delta x$  es la distancia D recorrida por los iones dentro del analizador, y  $\delta t$  el tiempo t que los mismos tardan en llegar al detector. Reemplazando en (2), se tiene que:

$$z e V = \frac{1}{2} m (D/t)^2 \quad (4)$$

reordenando, el tiempo t de arribo al detector es igual a:

$$t = D / ((2 z e V) / m)^{1/2} \quad (5)$$

Así, conociendo el tiempo de vuelo de un ión, se determina su relación m/z:

$$m/z e = 2 V (t/D)^2$$

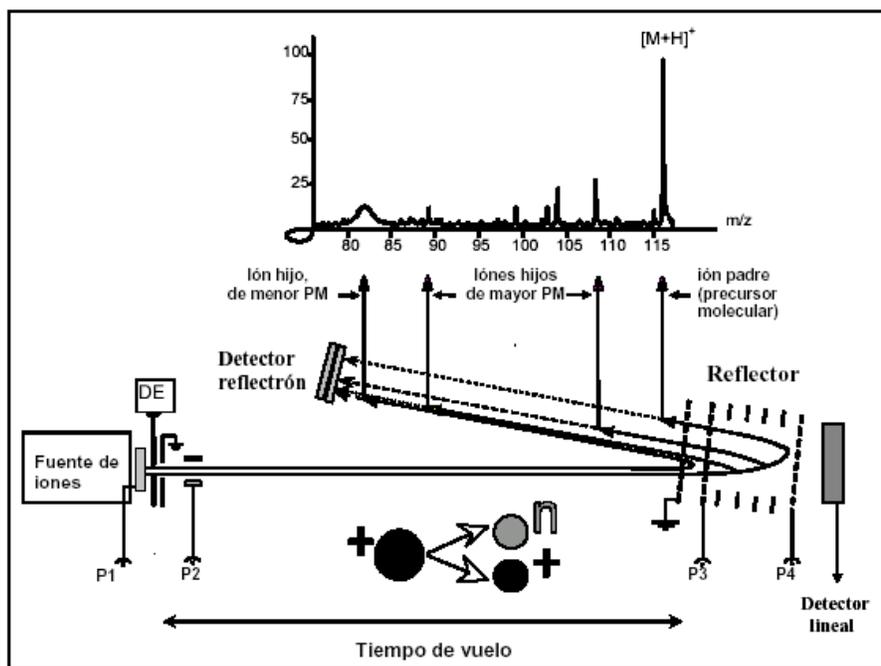
que por simplificación se obtiene

$$m/z = 2 e V (t/D)^2$$

La exactitud en las mediciones de masas obtenidas depende de la calibración del equipo. Normalmente se utilizan compuestos de masa molecular conocida para regiones de bajo y de alto peso molecular. Para la región de bajo peso molecular se utiliza  $\text{Na}^+$  (23

Da), pequeños péptidos, o incluso una matriz orgánica clásica. Para las masas mayores se utilizan polímeros o polipéptidos, como insulina (5734 Da), citocromo c (12361Da), mioglobina (16951 Da) y polietilenglicoles (pesos moleculares promedios 1000, 3000, 5000, etc.) entre otros [2, 16, 44, 45].

La naturaleza pulsada del proceso de desorción/ionización genera iones que no presentan la misma energía cinética inicial de distribución, como se asumió teóricamente, y este hecho se traduce en una baja resolución del instrumento, evidenciada por la presencia de picos anchos en el espectro obtenido. Para resolver este problema se desarrollaron accesorios técnicos que permitieron aumentar la resolución de los equipos (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Esquema de un analizador de tiempo de vuelo (TOF) equipado con extracción retardada por pulsos (PDE) y reflector de iones [46].

El primero de estos desarrollos consiste en un re-enfoque de los iones dentro del analizador. Los equipos modernos presentan un reflector de iones, dentro del analizador, que consiste en un arreglo de electrodos cuyo potencial provoca un retardo eléctrico o desaceleración de los iones y un re-direccionamiento de los mismos hacia un segundo detector. Este re-enfoque compensa las diferencias de tiempo de vuelo de los iones con el mismo valor de  $m/z$  y energías cinéticas levemente distintas. Cuanto mayor es la energía del ión, mayor tiempo estará dentro del reflector, y mayor será la distancia que viaje dentro del mismo. De esta manera, se logró aumentar el poder de resolución de estos equipos en uno o dos órdenes de magnitud; sin embargo, esto ocurre a expensas de la sensibilidad. Dependiendo del equipo, el modo de análisis lineal o reflectrón puede ser seleccionado en cada experimento, así como el modo positivo (+) o negativo (-) que permite el estudio de los cationes o aniones respectivamente, que pudieron originarse a partir de la ionización del analito en estudio [16, 44, 45].

El segundo desarrollo conocido como extracción retardada por pulsos (*pulse delayed extraction*, PDE), consiste en un sistema de electrodos colocados al final de la cámara de ionización cuyo potencial retarda los iones generados en forma pulsada. Este enfoque de iones corrige su velocidad inicial y el ingreso de los mismos al analizador ocurre en el mismo momento, de manera tal que iones con un mismo valor de  $m/z$  alcanzarán el detector en el mismo momento (igual tiempo de vuelo). Consecuentemente, se logra el aumento en el poder resolutivo del equipo, tanto en modo lineal como reflectrón [47].

El elevado poder de resolución se sumó a las ventajas del analizador TOF frente a otros analizadores, en cuanto a sensibilidad, simplicidad y velocidad de análisis, rango de

detección de masas ilimitado, y detección casi simultánea de todas las especies. Estas características en conjunto se aplican tanto en el uso clásico de UV-MALDI-TOF MS para determinar pesos moleculares, patrones de fragmentación y caracterización de mezclas, así como para la obtención de imágenes de tejidos u órganos normales, o patológicos [48, 49]. En los equipos de última generación denominados UV-MALDI-TOF-TOF, dos analizadores TOF han sido colocados en tandem de manera de poder realizar experimentos de tipo MS/MS, efectuando la selección de los iones precursores con el primero y luego de su excitación vibracional el análisis de los fragmentos formados en el segundo analizador TOF. Se trata de equipos de alta sensibilidad y alta resolución (*high resolution MS*, HRMS).

### 1.3.3 ESI MS

La combinación de la espectrometría de masa con la electroforesis bidimensional (2-D GE) y las técnicas analíticas separativas líquidas (LC, HPLC, HPEC, SEC, IEC) permite caracterizar e identificar proteínas y compuestos polares termolábiles. La miniaturización de la escala de trabajo al nano-litro y al nano-flujo han optimizado las características de esta técnica en lo que se refiere a tiempo y sensibilidad [17, 28, 44].

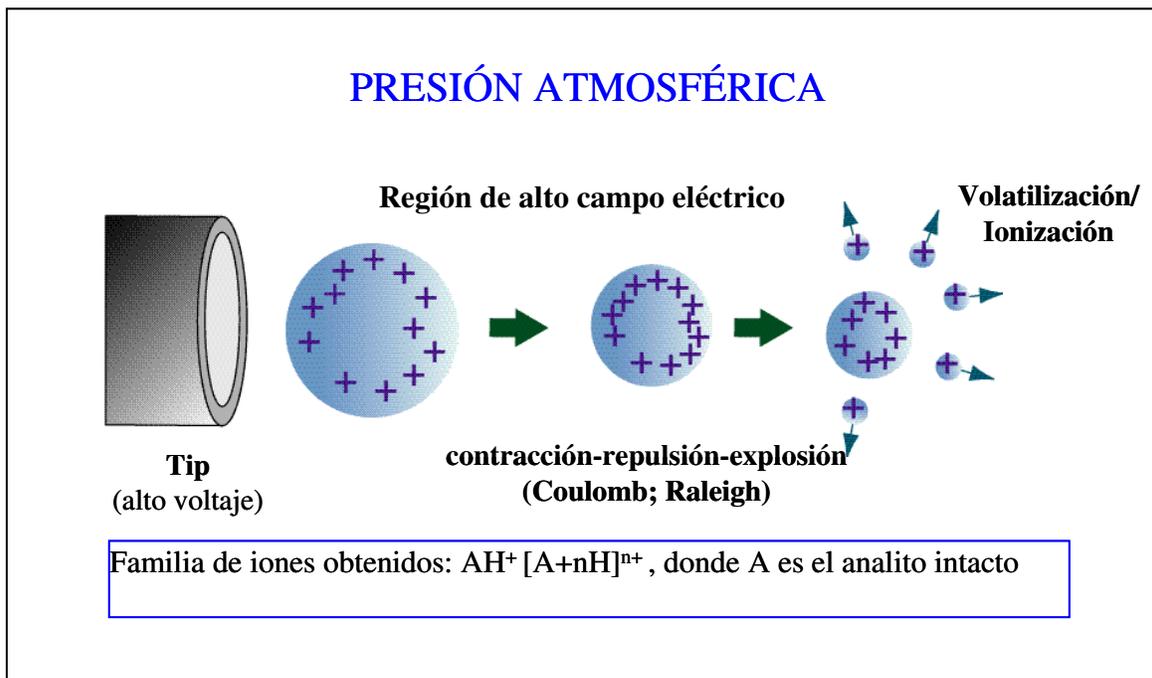
Toda esta revolución se debe a la introducción no sólo del método de ionización UV-MALDI, ya descrito previamente, sino también al desarrollo del método de ionización por *electrospray* (ESI). Este último, a diferencia del primero, requiere disponer del analito en solución, en un medio polar, el que es introducido en forma de flujo continuo a la región donde se aplica un elevado campo eléctrico. Ambos son suficientemente suaves, de manera que generan iones moleculares gaseosos intactos.

Además, el método ESI genera para un dado analito de peso molecular  $m$ , una familia de iones moleculares gaseosos policargados (familia de señales con valores de  $m/z$  tales que  $z$  pertenece a un conjunto de números enteros sucesivos;  $z = n+1, n+2, n+3, \dots, n+q$ ;  $m/z = m/n+1, m/n+2, \dots, m/n+q$ ) [17, 28, 44].

Como es sabido [50], uno de los desafíos en la década de los 80 era encontrar la forma de analizar compuestos de alto peso molecular y termolábiles por espectrometría de masa y además convertir a esta técnica en el detector de las técnicas analíticas separativas en fase líquida (técnicas cromatográficas para analitos en solución líquida; LC, HPLC, ECAR, SEC) [50]. La introducción de la técnica de ionización basada en la generación, a partir de la solución del analito, de una nube (“spray”) formada por diminutas gotas cargadas eléctricamente y sometida a la acción de una fuerte campo eléctrico, permitió concretar este tipo de análisis [50]. A este método de ionización se lo llamó “electrospray” (ES) y las diferentes mejoras tecnológicas han conducido al método de ionización que hoy conocemos como “electrospray ionization” (ESI) y que llevó a John B. Fenn [51] a compartir con el ingeniero Koichi Tanaka el Premio Nobel de Química 2002 [16, 44, 45]. Se trata del método de volatilización/ionización de analitos más suave que se conoce, a tal punto, que se ha demostrado que material viral sometido a este método de ionización mantiene intacta su actividad luego de ser sometido a tal proceso [52].

Luego de la descripción de los experimentos iniciales efectuados por el físico John Zeleny en 1917, la primera explicación lógica del fenómeno de la generación de una nube con microgotas cargadas la formuló en 1968 Malcolm Dole [53]. Esta descripción del principio por el que se produce el “electrospray” (ES) y su comportamiento bajo la

acción de un fuerte campo eléctrico, incluye el modelo que contempla la formación de cargas residuales (CRM) el que ha sobrevivido como la mejor descripción física del proceso de ionización por "electrospray" (ESI). De acuerdo a este modelo, las microgotas cargadas electrostáticamente sometidas a un fuerte campo eléctrico, sufren primero una contracción de volumen. Cuando el número de cargas electrostáticas del mismo signo, que se encuentran en la superficie, es mayor que las que puede estabilizar una gota del mismo tamaño teniendo en cuenta las repulsiones de Coulomb, se produce la "explosión de Raleigh" que no es más que la eyección de moléculas de la superficie de la gota que pasan al estado gaseoso llevándose una o varias cargas, con el objeto de disminuir el número de cargas y las fuerzas repulsivas en la superficie. Esta "explosión" produce una microgota cargada de tamaño menor, la cual sigue teniendo en su superficie un número alto de cargas electrostáticas del mismo signo. Ésta, bajo la acción del fuerte campo eléctrico, vuelve a contraerse. Si en esta gota menor no se cumple la relación número de cargas repulsivas a superficie total de la gota adecuada, nuevamente vuelve a producirse una "explosión de Raleigh", con pasaje al estado gaseoso de más moléculas que componen la gota mono o policargada. Esta sucesión de contracciones-explosiones (evaporaciones superficiales) – disminución del tamaño de la gota – contracciones - explosiones (evaporaciones superficiales) – etc., va generando moléculas gaseosas ionizadas de los componentes de la gota original y por lo tanto, de la solución de partida (figura 1.8).



**Figura 1.8.** Proceso ESI. Modelo de Dole para explicar las cargas residuales presentes en las moléculas de analito desolvatadas [28].

Las fuerzas repulsivas que provocan estas explosiones no inducen en general la ruptura de uniones químicas covalentes. Por lo tanto, es posible generar, a partir de soluciones diluidas, iones moleculares gaseosos intactos de cualquier analito presente en la solución. La particularidad de este método de volatilización/ionización no es solamente su “suavidad” (producción del ión molecular intacto, en el estado vibracional frío o más estable) sino además la generación de una familia de iones debido a que el ión molecular intacto puede alojar un número variable de cargas [17, 28, 44].

La mayor o menor capacidad que tendrá el analito para generar moléculas gaseosas cargadas y el número de cargas ( $z$ ), depende directamente del peso molecular ( $m$ ) y del carácter polar del mismo, es decir, de su estructura química (tipo y número de

grupos funcionales polares presentes). A mayor peso molecular y mayor número de grupos polares, mayor posibilidad de generar iones policargados ( $z > 1$ ) y menor posibilidad de generar iones monocargados ( $z = 1$ ). Además, la mayor o menor capacidad que tendrá el analito para generar iones gaseosos cargados positivamente (cationes) o negativamente (aniones) depende, en primer lugar, del tipo de grupos polares presentes en su estructura, y en segundo lugar, de las características del medio (pH, presencia de sales) y del solvente de la solución original (carácter prótico del solvente, polaridad, constante dieléctrica, volatilidad, etc.). Esta triple dependencia (estructura molecular - medio - solvente) del proceso de ionización llamado ESI y su suavidad, indica el campo de aplicación del mismo, el cual no sólo se limita al ámbito de las moléculas polares en medios polares, sino también al de las moléculas polarizables mediante modificaciones adecuadas del medio donde se las disuelve (cambio de pH, agregado de sales cuyos cationes forman complejos gaseoso estables cargados con la molécula del analito neutro, etc.) [17, 28, 44].

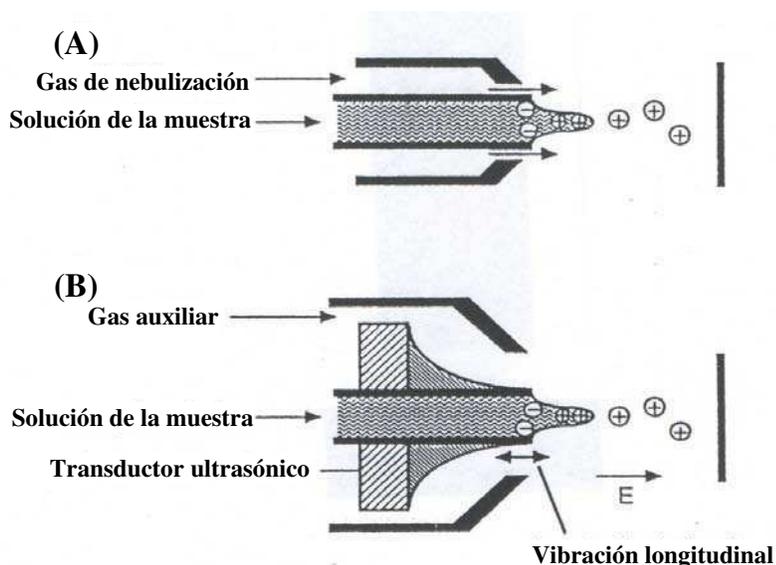
Cabe señalar que, dependiendo de los factores antes mencionados, para un analito A su ionización en modo positivo puede deberse a la fijación de 1) n protones:  $[A(H)_n]^{n+}$ , 2) m ó p cationes ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$ , etc.):  $[A(Na)_m]^{m+}$ ,  $[A(K)_p]^{p+}$ , etc., 3) la combinación de n protones y m y p cationes:  $[A(H)_n]^{n+}$ ,  $[A(H)_n(Na)_m]^{(n+m)+}$ ,  $[A(H)_n(Na)_m(K)_p]^{(n+m+p)+}$ ,  $[A(H)_n(K)_p]^{(n+p)+}$ ,  $[A(Na)_m(K)_p]^{(m+p)+}$ , etc., donde todas las combinaciones y valores de n, m y p son posibles [28]. En el modo negativo normalmente se produce la pérdida de protones  $[A-(H)_n]^{n-}$  y/o la pérdida de cationes en compuestos salinos. Esto puede producir complicaciones en el estudio por ESI MS, debido principalmente a la presencia adicional de iones policargados múltiples formados por cationes del medio y dependientes no sólo

de la estructura del analito sino además de los componentes de la solución (pH, sales). Este fenómeno es una fuerte desventaja del método de ionización ESI frente al método de ionización suave UV-MALDI. Por lo tanto, en el primero, la pureza del analito y de la solución es crítica [17, 28, 44].

En los experimentos que describió Dole en 1968 [53] se usó un gas inerte adicional para facilitar la desolvatación irreversible (separación irreversible de moléculas del analito y del solvente en el estado gaseoso) durante la “explosión de Raleigh”. En otros experimentos se mejoraba la eficiencia de la generación de moléculas de analito gaseosas y cargadas que estuvieran “desorbidas” o libres de moléculas de solvente, calentando el conducto o aguja metálica, o *tip*, por el que circula la solución que va a ser volatilizada/ionizada por ES y al que se le aplica un alto voltaje. Esta es la denominada *thermo spray ionization* (TES) [52, 53] que es la base de la técnica de volatilización/ionización denominada *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) [50].

Lo que hoy se conoce como método de volatilización/ionización ESI de real utilidad para moléculas termolábiles, es una modificación del método de Dole formulada por Fenn en 1988 [54]. En dicha comunicación se describió la identificación de polipéptidos y proteínas de peso molecular de hasta 40 kDa. Fenn demostró que era posible determinar, a partir de la familia de iones generada debido a la policarga de un mismo ion molecular, su peso molecular con una exactitud del 0,01%. Para ello, teniendo en cuenta la abundancia isotópica natural de cada elemento constituyente, se simulaba matemáticamente cuál era la mejor combinación de átomos en el ión molecular (el mejor *m*; determinación de la fórmula molecular) que generaría la familia de iones

multicargados obtenida en cada caso experimentalmente. Este resultado fue la culminación de desarrollos tecnológicos y de un modelado matemático que se estaban realizando en el laboratorio de Fenn desde 1984 [55]. En ese año se efectuó exitosamente la utilización del *electrospray* como método de volatilización/ionización en un espectrómetro de masa. Fenn usó su conocimiento sobre el proceso denominado *free-jet expansion* en la interfase líquido - gas ionizado. Entre otras cosas, se agregó un gas inerte adicional para optimizar el proceso de desolvatación (*drying gas*), eliminando el proceso inverso o re-solvatación del ión gaseoso macromolecular formado, sin necesidad de calentar el *tip* metálico (*needle*), la cámara de ionización y/o la solución de analito que se introduce dentro del flujo a través del *tip* (figura 1.9).



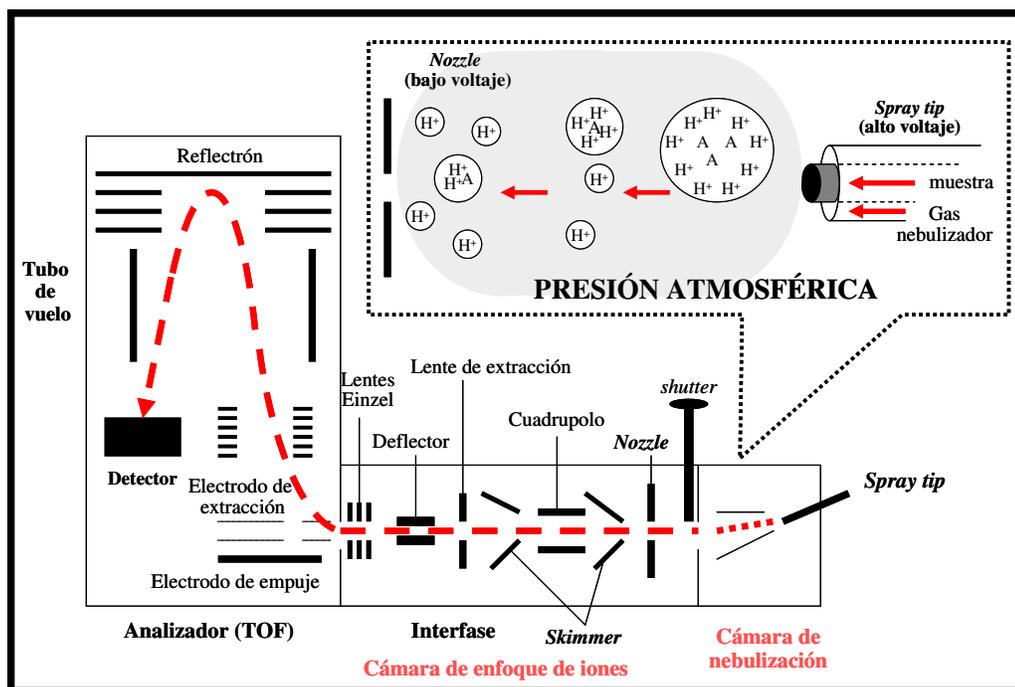
**Figura 1.9.** Esquema de dos tipos diferentes de electrodos aguja (*needle*) de equipos ES MS (A) sin el arreglo de Fenn, y (B) con el arreglo patentado por Fenn como ESI [55].

Además, Fenn eliminó el calentamiento del electrodo aguja que inducía la descomposición de analitos termolábiles. Por otro lado, modificó la forma de colectar y analizar a los iones producidos. En reemplazo de la caja de Faraday conectada al galvanómetro de Dole [50, 51, 53], luego de colectar y obligar a pasar el haz de iones por un “primer agujero colector” (*nozzle*), y en segundo lugar “a través de una espumadera o separador de partículas sólidas” (*skimmer*) que terminaba de separar las moléculas gaseosas de aquéllas que pasan al estado sólido, introdujo a la corriente de moléculas gaseosas policargadas en un “cuadripolo” (q). Como se muestra en la figura 1.10, la cámara de ionización ESI consta siempre de dos partes: 1) la cámara de nebulización y 2) la zona de enfoque de iones. La primera se encuentra a presión atmosférica y la segunda con vacío intermedio ( $10^{-2}$ -  $10^{-4}$  Torr). En la primera, al *tip* se le aplica alto voltaje (2 - 4 kV); en la segunda, siempre están presentes el *nozzle*, los *skimmers* y el “cuadripolo”. Según sea el signo del voltaje aplicado en el *tip* y en el *nozzle*, se analizan cationes (modo positivo) o se analizan aniones (modo negativo).

El proceso ESI está gobernado por una serie de parámetros químicos y físicos cuya optimización en forma conjunta determina la eficiencia del proceso. Este proceso puede representarse como un circuito eléctrico que genera y controla la nube (*spray*) de gotitas líquidas cargadas. Se inicia con el analito generalmente cargado (protonado) y disuelto en un medio con alto contenido acuoso (solvente polar). Al final del proceso el mismo analito, como una molécula gaseosa multicargada y desnuda (desolvatada, sin interacción con el solvente), es atraído y colectado por el orificio de entrada del analizador de masas (*nozzle*). En el alto vacío del analizador, el analito gaseoso

policargado será selectivamente caracterizado por su relación  $m/z$ , quedando totalmente en el olvido el hecho de que se trate de un analito de alto peso molecular y termolábil.

### ElectroSpray Ionization TOF MS (ESI-TOF MS)



**Figura 1.10.** Esquema de un equipo ESI MS, donde se muestra la cámara de nebulización y la cámara de enfoque de iones (Mariner ESI-TOF Applied Biosystems) [28].

Según sea la naturaleza química y el peso molecular del analito, el número  $z$  puede variar entre 2 y 40 o ser aún mayor. Si el analito es una especie química única, el espectro resultante mostrará una serie regular de señales que reflejan los diferentes valores de  $m/z$ . El hecho de que se generen familias de señales agrega complejidad a la interpretación de los espectros de masa obtenidos. Sin embargo, se debe a Fenn no solamente el desarrollo tecnológico que optimizó el proceso “*free-jet expansion*” (y como consecuencia la eficiencia de la volatilización/ionización sin necesidad de calentar el

sistema), sino también los primeros programas de cálculo. Estos programas mostraron que la complejidad debida a las múltiples señales obtenidas por cada ión molecular, agregaba información para un cálculo más exacto del peso molecular del ión molecular monocargado no detectado (valor de  $m$ ). Este “secreto” fue revelado por Fenn como la “teoría de la carga múltiple” en una publicación del año 1987 [51]. Esta teoría demostró que los diferentes estados cargados del mismo ion molecular podían interpretarse como medidas independientes del peso molecular del mismo analito y que, por lo tanto, un método de promediación basado en la solución simultánea de una familia de ecuaciones podría proveer una estimación mucho más precisa del peso molecular de macromoléculas.

Dentro de las ventajas que presenta el método ESI MS, se puede destacar que es el método de ionización menos invasivo y modificante de las propiedades del analito, salvo en lo que refiere a su volatilización y ionización. Por dicha razón es posible estudiar complejos moleculares debidos a débiles interacciones no-covalentes dativas, como por ejemplo: complejos proteína-proteína, enzima-substrato o proteína-ligando, estudios de la cinética del plegado y/o desplegado de proteínas, entre otros. Además, con la técnica ESI no solamente queda resuelto el problema de la termolabilidad sino que además queda tecnológicamente resuelto el problema de volatilizar/ionizar analitos manipulando directamente la solución líquida que los contiene [16, 17, 28, 44, 56].

#### **1.4 ESPECTROMETRÍA DE MASA UV-MALDI APLICADA AL ESTUDIO DE HIDRATOS DE CARBONO**

Los hidratos de carbono son los compuestos más abundantes y estructuralmente diversos que se encuentran en la naturaleza. Entre ellos, se incluyen azúcares libres

(monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos), azúcares conjugados a otras moléculas (glicoconjugados) como proteínas, para dar glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos, o unidos a lípidos para dar glicolípidos (como esfingolípidos, sulfolípidos, o anclas tipo glicosil–inositol–fosfato).

Los hidratos de carbono presentan una complejidad estructural mayor que las proteínas y ácidos nucleicos debido a la presencia de ramificaciones en sus cadenas, y a que la unión entre distintas unidades constitutivas puede ocurrir en diversos sitios, aumentando aún más su complejidad. Se estima teóricamente que para un hexosacárido pueden existir  $1 \times 10^{12}$  isómeros posibles. Esta diversidad estructural impuso históricamente una gran limitación en el análisis de estos compuestos [57-63].

El campo de la espectrometría de masa ofrece un gran número de técnicas y métodos de análisis estructurales divergentes, junto a una elevada sensibilidad, necesarias para el análisis de hidratos de carbono [64].

Los primeros estudios de espectrometría de masa aplicados al estudio de hidratos de carbono se realizaron por espectrometría de masa EI y CI, posibilitando el análisis de múltiples monosacáridos y disacáridos. La restricción de peso molecular y estabilidad térmica que imponían las técnicas retrasó el análisis de hidratos de carbono de mayor peso molecular hasta el desarrollo de la espectrometría de masa FAB [65]. El rango de análisis de masas se extendió de 500 hasta 7000 Da (cota superior experimental real 1000 Da), y la sensibilidad alcanzó el rango de nanomol–picomol. Al igual que las técnicas anteriores también requiere la derivatización para la estabilización térmica de la muestra (permetilación) para ampliar su campo de aplicación. Esta técnica permite obtener información sobre el ión molecular, pero la mayoría de los iones que se generan resultan

de la fragmentación del ión molecular, debido a la gran cantidad de energía cinética-térmica recibida durante el proceso de ionización y a la termolabilidad de los azúcares [12]. Consecuentemente, los espectros obtenidos resultaban de difícil interpretación.

Cuando se introdujeron las técnicas de ionización más suaves en el campo de la espectrometría de masa surgió una revolución en el análisis estructural de los hidratos de carbono. La espectrometría de masa UV-MALDI gradualmente desplazó a la técnica FAB y se convirtió en la herramienta de preferencia para el estudio de azúcares y de los compuestos glicoconjugados [57, 60-63]. La identificación del patrón de expresión de hidratos de carbono en una célula o tejido dado, por UV-MALDI MS dio lugar a una nueva disciplina que se conoce como “Glicómica” [57, 60-64].

La técnica UV-MALDI MS fue originalmente concebida para el análisis de proteínas, sin embargo, el primer compuesto analizado fue un tetrasacárido: la estaquiosa [66]. Esta técnica permitió la ionización de moléculas de alto peso molecular como glicoproteínas, oligosacáridos, y glucanos cíclicos, con una sensibilidad entre 10 y 100 veces mayor que la espectrometría de masa FAB [57, 60-63, 66-68].

La aplicación de la técnica UV-MALDI MS en el análisis de hidratos de carbono resulta especialmente valiosa debido a que permite el análisis de compuestos mezcla nativos, sin necesidad de separación ni de derivatización previa. Sin embargo, con el objeto de mejorar o ampliar los límites de detección de los compuestos, o simplificar sus espectros de fragmentación, la derivatización continúa siendo empleada [69].

La mayoría de las matrices utilizadas en UV-MALDI MS producen la ionización de los hidratos de carbono principalmente por cationización, originando aductos de sodio y/o potasio ( $[A+Na]^+$  y/o  $[A+K]^+$ ), a diferencia de las proteínas que normalmente se

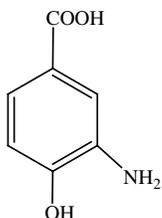
ionizan como especies protonadas  $[A+H]^+$ , o desprotonadas  $[A-H]^-$  [69]. Sin embargo, también pueden producirse especies iónicas desprotonadas, especialmente a partir de los azúcares ácidos.

Los oligosacáridos y polisacáridos son capaces de unirse a otros cationes metálicos como  $Li^+$  y  $Cs^+$ , y se ha observado que presentan afinidades relativas diferentes con distintos metales alcalinos. El orden informado es:  $Cs^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > H^+$  [70]. Aunque el  $Cs^+$  es el metal más eficiente para ciertos azúcares, no es capaz de generar por ionización aductos estables con azúcares de bajo peso molecular [71]. El  $Na^+$  se encuentra en forma ubicua, incluso como traza en el agua calidad HPLC, de allí que forma los aductos más frecuentemente observados. Cabe destacar que en estudios usando la técnica ESI MS otros autores han analizado la unión de los azúcares a cationes divalentes y trivalentes, informando que en esta técnica las afinidades relativas observadas fueron:  $Ca^{+2} > Mg^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+}$  [72]. La formación de ciertos aductos puede manipularse experimentalmente por el agregado de sustancias que las contengan durante la preparación de la muestra. Estos compuestos se denominan dopantes. Se utilizan con el objeto de aumentar la intensidad de la señal, mejorando la relación señal/ruido (S/R) o mejorar la homogeneidad de la muestra sólida a analizar [57]. Más recientemente se ha descrito su utilización para diferenciar patrones de fragmentación de oligosacáridos, especialmente para oligosacáridos ramificados [64].

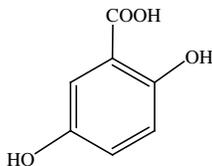
Los dopantes más comúnmente usados son: sales de los metales antes mencionados, como acetato de sodio o amonio, citrato de amonio, etc.; compuestos nitrogenados como por ejemplo, espermina; otros azúcares como monosacáridos, por ejemplo, fucosa; otras matrices UV-MALDI (co-matriz).

**Matrices utilizadas para oligosacáridos neutros**

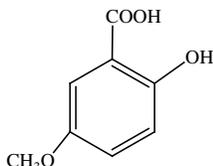
**- Familia del ácido benzoico sustituido**



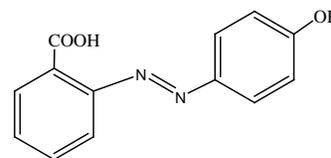
Ácido 3 - amino - 4  
hidroxibenzoico



Ácido 2, 5 -  
dihidroxibenzoico  
(GA)

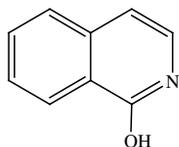


Ácido 2 - hidroxí - 5 -  
metoxibenzoico + GA  
Súper GA (sGA)

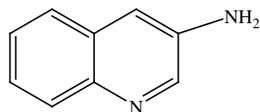


Ácido p - hidroxifenil  
- azo - benzoico  
(HABA)

**- Quinolininas**

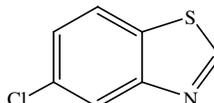


1 - hidroxí -  
isoquinolina  
(1- HIQ)



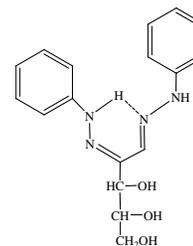
3 - aminoquinolina  
(3- AQ)

**- Mercaptobenzotiazoles**



5 - cloro -  
mercaptobenzotiazol  
(CMBT)

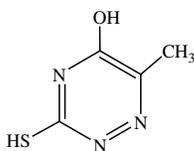
**- Osazonas**



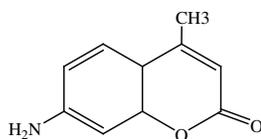
arabinosazona

**Matrices utilizadas para oligosacáridos ácidos**

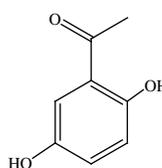
**- Familia de hidroxiacetofenonas**



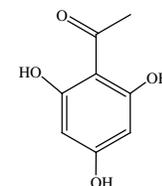
6 - aza - tiotimina



7 - amino - 4 -  
metilcumarina

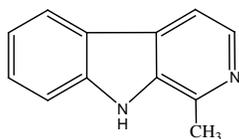


2, 5 -  
dihidroxiacetofenona  
(DHAP)

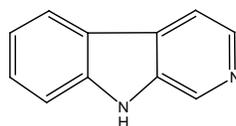


2, 4, 6 -  
trihidroxiacetofenona  
(THAP)

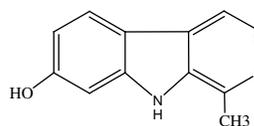
**- Familia de β- carbolinas**



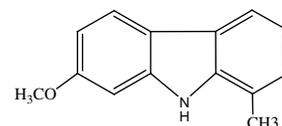
Harmano



nor -  
harmano



Harmol



Harmina

**Tabla 1.4.** Matrices UV-MALDI recomendadas para el análisis de hidratos de carbono [44, 45, 57, 60-63, 68].

Los hidratos de carbono presentan mayor dificultad para ser ionizados que los péptidos o las proteínas. Este hecho hace que en el análisis de azúcares sea necesario utilizar el láser a potencia más alta, y según cuál sea la matriz y el grado de homogeneidad de la muestra, recorrer la superficie de ésta con el láser para mantener la intensidad de la señal con valores similares (reproducibilidad) [57].

En relación a las matrices que se utilizan para su análisis, existe una gran diversidad de compuestos orgánicos cristalinos disponibles, algunos de los cuales resultan muy efectivos en la desorción/ionización de cierto tipo de azúcares, y totalmente inefectivas con otros. Por lo tanto, podemos decir que no existe para los hidratos de carbono una matriz universal. La Tabla 1.4 muestra la estructura química de las matrices orgánicas clásicas recomendadas para este tipo de análisis.

#### 1.4.1 Matrices orgánicas clásicas utilizadas en el análisis de oligosacáridos

La primera matriz descrita como apta para el análisis de hidratos de carbono por UV-MALDI MS fue el ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico [69]. Esta matriz permitió el análisis de hidrolizados de dextranos, y cadenas *N*-glicosídicas liberadas de glicoproteínas.

Rápidamente fue superada por el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) conocido como ácido gentísico (GA). Aunque originalmente fue introducida para el análisis de proteínas [37], es actualmente la más utilizada y popular de las matrices disponibles para el análisis de hidratos de carbono. Produce principalmente especies de tipo  $[A+Na]^+$  y  $[A+K]^+$ , que pueden ser acompañadas por señales como  $[A+Li]^+$  si se agregan a las muestras las sales inorgánicas correspondientes. El GA es soluble en mezclas acuosas de

acetonitrilo o metanol, cristaliza como finas agujas desde la periferia del depósito sobre el electrodo portamuestras hacia el centro, y se produce una distribución heterogénea de la muestra con la matriz cuando se analizan mezclas de oligosacáridos y glicoproteínas (ver figura 1.11) [73]. La región central amorfa normalmente concentra los azúcares, sales y contaminantes de donde se obtiene el espectro de los oligosacáridos; mientras que de la periferia del cristal se obtienen los espectros de la glicoproteína.

Varios isómeros de posición del GA se probaron como posibles matrices para el análisis de hidratos de carbono, pero sólo algunos resultaron eficientes. Se propuso que para que un compuesto sea una matriz eficiente, el mismo debe ser capaz de sufrir una transferencia intramolecular de un protón, por ejemplo entre el grupo fenólico y el grupo carboxilo. Este tipo de transferencia sólo se produce en aquellos compuestos del tipo ácido benzoico que presentan un grupo OH en posición *orto* respecto del grupo carboxilo (equilibrio ceto – enólico en el estado electrónico excitado) [74, 75].



**Figura 1.11.** Imagen de los cristales de GA depositados sobre el electrodo portamuestras.

Ciertos autores propusieron el uso combinado de GA con otro derivado del ácido benzoico, el ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico, mezcla que se denominó “súper DHB” o “súper GA” (sGA) [76]. Esta mezcla logró mejor sensibilidad y resolución en el análisis de compuestos mezcla como dextrano 1000, glicopéptidos derivados de digestiones tríplicas, y oligosacáridos liberados de glicoproteínas.

Alternativamente se utilizó una combinación de GA y 1-hidroxi-isoquinolina (1-HIQ). En este caso la mezcla resultó más tolerante a la presencia de sales y aditivos, incluyendo dodecilsulfato de sodio (SDS), y se observaron señales más intensas y cristales más delgados. Para la obtención de los cristales se utilizó el secado en vacío, en lugar del método de secado común con corriente de aire a presión atmosférica [70].

Otros autores encontraron mayor reproducibilidad y resolución, cuando se agregó  $\alpha$ -L-fucosa al GA. Los resultados fueron aún mejores cuando mezclaron fucosa y sGA [77].

Otro derivado del ácido benzoico utilizado es el ácido 2-p-hidroxifenilazobenzoico o HABA. Suele producir mayor fragmentación y abundantes iones de matriz en la zona de  $m/z < 1000$ , resultando poco útil para oligosacáridos pequeños [70].

Otra familia de compuestos ensayados como matrices UV-MALDI son las quinolinas, entre ellas, la más utilizada es la 3-aminoquinolina (3-AQ), de poca utilidad para oligosacáridos neutros de glicoproteínas, pero especialmente útil en el análisis de inulinas de plantas de hasta 6000 Da de peso molecular [57]. La mezcla con ácido *trans*- $\alpha$ -ciano-4-hydroxicinámico (CHCA) resultó igualmente de aplicabilidad limitada para oligosacáridos, pero confirmó su utilidad para inulinas [78]. La apariencia viscosa de esta

mezcla de matrices dio origen al término “matrices líquidas”. Se describió el uso de glicerol y hexacianoferrato como matrices líquidas, que resultaron muy efectivas en el análisis de glicolípidos, pero muy pobres para oligosacáridos sin derivatizar. Años más tarde se logró mejorar la intensidad de las señales obtenidas a partir de oligosacáridos derivatizados, tanto por permetilación como benzoilación [79].

Varios componentes de la familia de los compuestos mercaptobenzotiazoles fueron probados como matrices UV-MALDI. Entre ellos sólo el 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol (CMBT) resultó efectivo para el análisis de hidratos de carbono, y resultó aún más sensible que el GA en el análisis de oligosacáridos de tipo alta manosa [80].

Las  $\beta$ -carbolinas, una familia de alcaloides naturales presentes en plantas, demostraron ser matrices muy útiles en el análisis de azúcares no cíclicos y cíclicos, como las ciclodextrinas con valores de  $m/z$  próximos a 1000 [81]. Son compuestos heterocíclicos nitrogenados que difieren en sus sustituyentes. Los más conocidos son: harmano, *nor*-harmano, harmina, harmol, harmalina y harmalol. En modo positivo producen señales de especies del tipo  $[A+Na]^+$  de intensidad comparable a las obtenidas con GA. En modo negativo normalmente no se observan iones con otras matrices, sin embargo, utilizando estos compuestos es posible la obtención de iones de tipo  $[A-H]^-$ , tanto de oligosacáridos de cadenas pequeñas (bajo peso molecular) como de mezclas de dextranos de hasta 7500 Da [82].

Otra familia de sustancias ensayadas como matriz fueron las osazonas, de las cuales la arabinosazona (ARA), que resulta de la condensación de L-arabinosa y fenilhidrazina, resultó la más exitosa. Utilizando esta matriz se necesita una menor

potencia en el láser para lograr los mismos resultados que con GA, de lo contrario se observan fragmentaciones típicas de los iones precursores  $[A+H]^+$  [83].

Varias acetofenonas sustituidas resultaron apropiadas para el análisis de hidratos de carbono. Al igual que los derivados del ácido benzoico sólo aquellos que poseen un grupo hidroxilo como sustituyente en posición *orto* son efectivos en el proceso de ionización. Las más efectivas en la ionización de oligosacáridos neutros, tanto en modo positivo como negativo, son la 2,5-dihidroxiacetofenona (DHAP) y la 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP) [57, 60-63].

Las moléculas de oligosacáridos ácidos generalmente contienen residuos de ácido siálico, o ácidos urónicos como monosacáridos componentes, o sustituyentes de monosacáridos como grupos sulfato o fosfato. Uno de los problemas más frecuentes en el análisis de oligosacáridos ácidos es su tendencia a la fragmentación por descarboxilación y pérdida de sustituyentes sulfato y/o fosfato además de la pérdida de residuos del azúcar [57]. Los compuestos que poseen ácidos urónicos son estables en las condiciones de análisis típicas [84]. Los oligosacáridos sialilados en general presentan espectros poco sensibles y con múltiples señales cuando se utiliza GA como matriz. Se encuentran iones moleculares del tipo  $[A+Na]^+$ , sumados a los que forman con distintos metales alcalinos, e iones que resultan de la descarboxilación  $[A-44]^+$ , lactonización  $[A-18]^+$  y pérdida del residuo  $[A-291]^+$ . Se ha planteado también como alternativa el uso de láser IR [85], pero no se trata de un método de aplicación general, limitándose sólo a experimentos con *set-ups* preparados en los laboratorios ya que no existen equipos comerciales.

Muchos de los inconvenientes antes mencionados pueden ser superados utilizando matrices alternativas. Es posible, por ejemplo, obtener iones intactos de oligosacáridos

sialilados cuando se utiliza 3-amino-quinolina (3-AQ) [73]. La 6-azo-2-tiotimina originalmente descrita en el análisis de gangliósidos, mostró ser más sensible que otras matrices para el estudio de oligosacáridos sialilados liberados de glicoproteínas. Sin embargo, se observó fragmentación y pérdida de ciertos residuos, que aumentó cuando se utilizó el modo reflectrón [86]. Alternativamente, se utilizaron 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP) y citrato de amonio como dopante, para el análisis de azúcares en modo lineal negativo. Se obtuvieron iones de tipo  $[A-H]^-$  sin evidencia de fragmentación, y una sensibilidad aún mayor que la obtenida con la matriz anterior. Para la obtención de máxima sensibilidad las condiciones de preparación de la muestra fueron cruciales. Para asegurar el secado de la muestra y prevenir la formación de cristales grandes se utilizó el secado al vacío. La presencia de agua en la muestra afecta la formación de cristales y la intensidad de las señales obtenidas [87]. Otra mezcla utilizada exitosamente como matriz en el análisis de oligosacáridos sialilados en modo negativo fue la del compuesto nitrogenado espermina y GA, sin señales aparentes de fragmentación [42]. Se utilizó también arabinosazona para el análisis de pequeñas cadenas sialiladas en modo negativo y se obtuvieron iones intactos de tipo  $[A-H]^-$  [57].

El análisis de azúcares sulfatados por espectrometría de masa UV-MALDI resulta dificultoso, parcialmente debido a la labilidad del enlace del grupo sulfato. El compuesto 7-amino-4-metil-cumarina fue descrito como una muy buena matriz para el análisis de disacáridos monosulfatados. En combinación con 6-azo-2-tiotimina permitieron el análisis de trisacáridos y tetrasacáridos sulfatados como así también oligosacáridos sialilados [88].

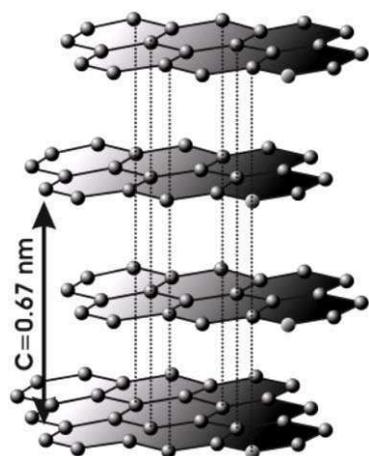
Las  $\beta$ -carbolinas, harmano y *nor*-harmano, fueron capaces de producir aniones en modo negativo a partir de  $\gamma$ -carragenanos, polisacáridos de algas altamente sulfatados [89]. Se demostró que el ácido antranílico, varias hidroxacetofenonas, hidroxibenzofenonas, harmalol, carbazoles sustituidos y el ácido indolacrílico, resultaron matrices inefectivas para el análisis de azúcares sulfatados. Recientemente se han utilizado como matrices UV-MALDI fotosensibilizadores tan variados como diversos tipos de materiales con estructura de nanopartículas (NPs, ver detalles en el Capítulo V), nanotubos de carbono (CNTs, ver detalles en la próxima sección en este mismo capítulo y en el Capítulo II), sales cloradas agregadas como dopantes específicos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ver detalles en el Capítulo IV) y líquidos iónicos como clorhidratos de  $\beta$ -carbolinas (ejemplo,  $\text{HClnHo}$ , ver detalles en el Capítulo IV) para el análisis de azúcares neutros en la forma  $[\text{A}+\text{Cl}]^-$  en el modo negativo. Un ejemplo muy interesante de matrices líquidas iónicas (ILMs) especialmente preparadas para el análisis de azúcares son las sintetizadas a partir del ácido-*p*-cumárico y el GA con 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG). Las mismas se usaron para el análisis de oligosacáridos carragenanos, obteniéndose mejores resultados y espectros de mejor calidad respecto de los obtenidos utilizando matrices clásicas [90]. Merece especial consideración la posibilidad de desarrollar matrices unidas por uniones covalentes a los glicocompuestos analizados, las que a su vez cumplan funciones como marcadores cromofóricos para el uso de técnicas analíticas adicionales tales como absorción UV-visible y fluorescencia [91].

#### 1.4.2. Los nanotubos de carbono (CNT) como matrices de azúcares

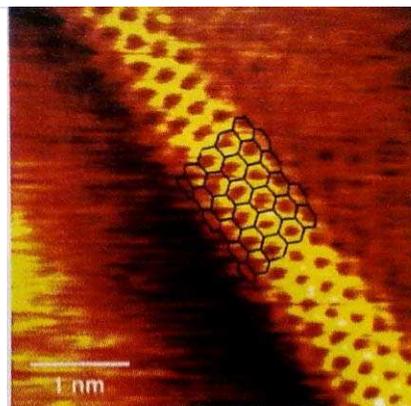
La espectrometría de masa UV-MALDI no sólo permite obtener información sobre el peso molecular de especies termolábiles y especies de alto peso molecular, como proteínas, ácidos DNA y RNA, hidratos de carbono, glicoconjugados y polímeros sintéticos entre otros, sino que también proporciona la información necesaria para la identificación estructural de las mismas. Sin embargo, esta técnica, que ha sido utilizada para la identificación y caracterización de biomacromoléculas, presenta un problema que pone en duda su eficiencia en especial para el análisis de especies de bajo peso molecular. A bajos valores de  $m/z$  ( $m/z < 500$ ), las matrices UV-MALDI clásicas producen señales de variada intensidad (*clusters*), las cuales dificultan la detección de analitos cuyo peso molecular se encuentra dentro de ese rango de valores de  $m/z$ . Por esta razón, se han propuesto diferentes alternativas para solucionar este problema. Por ejemplo, se propuso el uso de nuevos compuestos agregados a la muestra, como comatrices o dopantes, para que supriman las señales propias de las matrices [77, 92] Otra alternativa ha sido el uso de matrices alternativas a las orgánicas clásicas que formen una menor cantidad de *clusters* en el rango de valores de  $m/z$  de interés. Como ejemplo podemos mencionar sílica porosa [93], fullereno [94, 95], porfirinas [96, 97], grafito [98, 99] y material inorgánico [100, 101].

Los nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNT) han sido de sumo interés para los científicos desde que fueron descritos por Iijima *et al* [102, 103], debido a sus propiedades únicas mecánicas, eléctricas, electromecánicas y su estructura sumamente hidrofóbica. Son una de las formas alotrópicas del carbono, así como lo es el diamante, el

grafito y el grafeno, y estructuralmente están formadas por láminas gruesas de grafito llamadas grafeno [104] (figura 1.12).



Estructura general del grafito

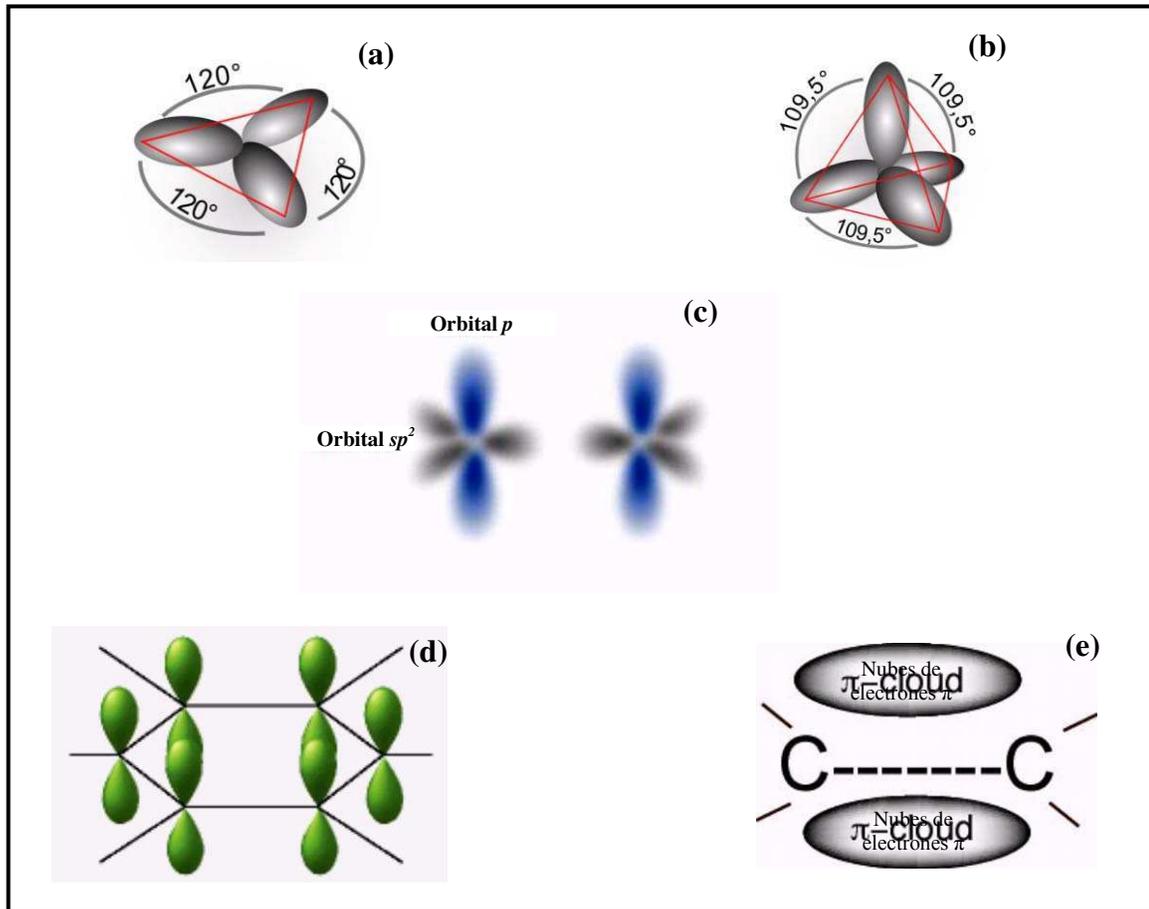


Enrollamiento de una lámina gruesa de grafito para formar un nanotubo. La pared de los CNT está compuesta por anillos bencénicos, resaltados en la imagen obtenida por microscopía (STM).

**Figura 1.12.** Estructura del grafito y formación de un nanotubo de carbono [105].

La estructura química de los CNT está formada en su totalidad por átomos de C unidos entre sí por uniones (orbitales) resultantes de la combinación de orbitales atómicos híbridos  $sp^2$  trigonales planos, al igual de lo que ocurre en el grafito. En cambio, el diamante presenta enlaces debidos a la combinación de orbitales atómicos tetraédricos  $sp^3$  (figura 1.13). Los electrones aportados por los orbitales atómicos  $p$  se encuentran deslocalizados alrededor de los anillos bencénicos que forman los átomos de carbono que componen las láminas de grafito, formando así orbitales moleculares  $\pi$  deslocalizados. Estos electrones no están asociados a un átomo ni a un tipo particular de unión debido a que se encuentran “compartidos”. Esta característica es propia de los materiales

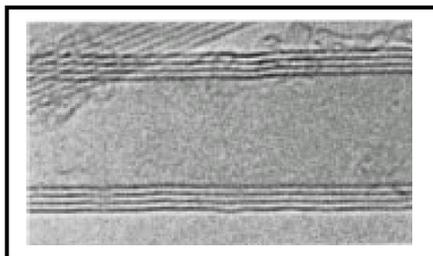
conductores de electricidad, como los CNT, a diferencia del diamante que se comporta como un excelente aislante eléctrico [104] (figura 1.13).



**Figura 1.13.** Orbitales atómicos y moleculares de las diferentes formas alotrópicas del carbono. (a) orbitales  $sp^2$  trigonales planos del grafito y los CNT, (b) orbitales tetraédricos  $sp^3$  del diamante, (c) orbitales  $sp^2$  y  $p$  presentes en los CNT, (d) disposición de los orbitales  $p$  de los átomos de carbono que forman el anillo bencénico de una lámina de grafito (y de CNT), (e) orbitales moleculares  $\pi$  deslocalizados en el anillo bencénico.

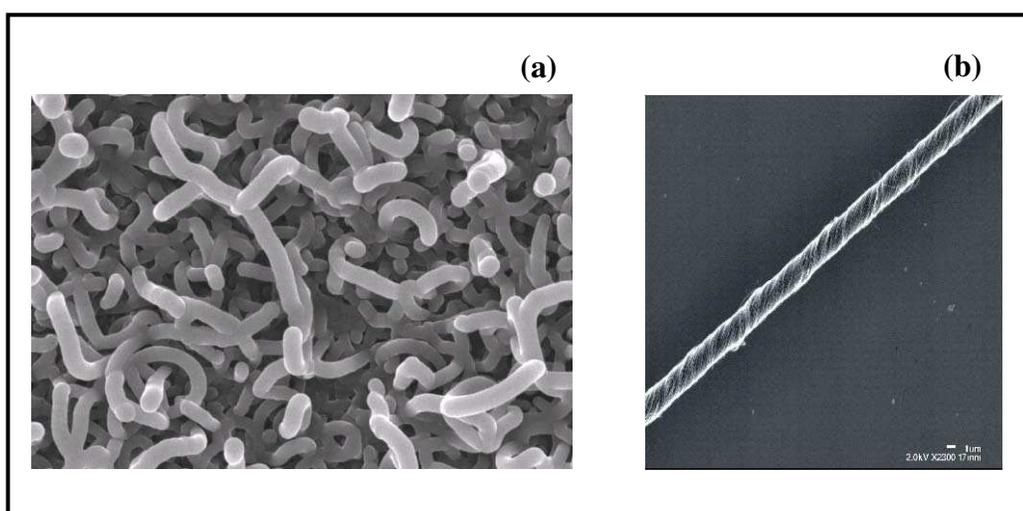
Una lámina (o “pared”) de CNT equivale a una lámina de grafito enrollada en forma cilíndrica con un diámetro externo del orden de pocos nanómetros. A su vez, es posible formar CNT con estructuras más complejas incorporando varias “paredes” en

forma concéntrica. Este tipo de material se denomina *mutli-walled nanotubes* (MWNT) [104, 105] (figura 1.14).



**Figura 1.14.** Imagen obtenida por microscopía de transmisión de alta resolución de dos CNT de pared múltiple o *mutli-walled nanotubes* (MWNT) [104].

Los CNT también se agrupan entre sí formando conjuntos de “cuerdas”, unidas fuertemente por fuerzas de Van der Waals (figura 1.15). Estas mismas fuerzas permiten que las multiláminas que forman los CNT de pared múltiple puedan permanecer unidas. Todas estas características estructurales le otorgan a los CNT propiedades que los hacen únicos [104].



**Figura 1.15.** (a) Agrupaciones de CNT generadas por fuerzas de Van der Waals. (b) Una “cuerda” aislada de CNT [105].

Recientemente, los CNT han sido utilizados como matrices UV-MALDI para el análisis de especies de bajo peso molecular. Esto es posible dadas sus propiedades ópticas y fotofísicas (alta eficiencia en la absorción de la energía emitida por el láser UV, su capacidad de transformar eficientemente dicha energía en energía térmica para inducir la desorción/ionización (DI) de los analitos; ver esquema 1.1, Diagrama de Jablonsky) y a la mínima interferencia que generan en la zona de bajos valores de  $m/z$  ( $m/z < 300$ ), permitiendo un mejor análisis de los compuestos cuyo ion molecular se encuentra en dicha región [106]. Su efectividad ha sido demostrada para el análisis de varios compuestos de bajo peso molecular utilizados como analitos modelo, como por ejemplo, pequeños péptidos [106, 107], oligosacáridos neutros y glucosa [107-108]. Recientemente, también se han empleado para el análisis *in situ* de tejidos vegetales, obteniéndose buenos resultados en la detección de azúcares neutros de bajo peso molecular presentes en los mismos [41]. En este caso se observó que, a diferencia de las matrices orgánicas clásicas que interactúan químicamente con los tejidos e invalidan el valor de los resultados obtenidos, los CNT resultaron totalmente inertes al ser puestos en contacto con los tejidos vegetales. También es importante destacar que en los experimentos UV-MALDI los CNT necesitan una potencia de láser mucho menor que las matrices convencionales para inducir la DI de un dado analito, obteniéndose mayor sensibilidad en la detección además de una mayor resolución debida a la eliminación de las señales de interferencia propias de la matriz y la fragmentación. Esto fue descrito por Xu *et al* [106] en los primeros análisis que se realizaron con CNT como matriz UV-MALDI con analitos de bajo y mediano peso molecular ( $\beta$ -ciclodextrina, di-, tri- y tetra-péptidos). También se ha descrito el uso de CNT para realizar en primer lugar la

extracción de analitos en fase sólida, y una vez fijados éstos sobre los CNT usarlos directamente como matriz UV-MALDI para el análisis de los mismos analitos [109].

Sin embargo, el uso de los CNT como matriz en UV-MALDI MS presenta algunas desventajas, siendo la más seria el desprendimiento de los mismos una vez depositados sobre el electrodo portamuestras al ser introducido éste en la cámara de ionización y durante el experimento, produciéndose una importante contaminación dentro del equipo (cámara de ionización). La consecuencia más seria es la modificación de la conductividad del material contaminado. En un primer momento, para solucionar este problema, se utilizó un tipo de poliuretano adhesivo conductor para inmovilizar los CNT sobre el electrodo portamuestras, lo que permitió una aplicación menos riesgosa de los mismos [110]. En estos análisis, pequeños hidratos de carbono neutros que eran difíciles de analizar utilizando matrices orgánicas clásicas, fueron detectados exitosamente como especies  $[A+Na]^+$  y  $[A+K]^+$ . Por ejemplo, los azúcares glucosa y fructosa (PM 180), ribosa (PM 150), celobiosa (PM 342) y maltopentosa (PM 828), fueron observados sin la interferencia de señales de matriz que pudieran producir supresión o enmascaramiento de las señales del analito. También el análisis de la  $\alpha$ -ciclodextrina en modo lineal y su fragmentación en el modo PSD fueron realizados de manera eficiente, al igual que el análisis de péptidos de peso molecular del orden de los 1000 Da [105].

Como ya se mencionó, los CNT existen en forma de “cuerdas” o paquetes debido a que las fuertes interacciones de van der Waals generan agregaciones importantes de nanotubos individuales. Esto disminuye la superficie activa que interactúa con el medio, limitando también su capacidad de absorción de energía (por ejemplo, luz UV-visible). Hasta ahora, se han realizado varios intentos para el mejoramiento de la preparación de

los CNT evitando la agregación de los mismos [108]. Como ejemplo se puede mencionar la oxidación de los mismos por tratamiento con soluciones ácidas [107]. En este caso, luego del lavado con ácido nítrico y su resuspensión en agua, los CNT de mayor tamaño eran separados mediante filtros de poro de 100 nm. Estos resultados demostraron que el tratamiento de CNT con ácido nítrico y la filtración de los mismos producen CNT oxidados de menor tamaño y con mayor solubilidad en agua, eficientes como matrices UV-MALDI para el análisis de biomoléculas.

Los CNT también han sido modificados para utilizarlos para la obtención de perfiles proteicos por el método de desorción/ionización denominado *material enhanced laser desorption/ionization* (MELDI) MS y por UV-MALDI MS [110]. La derivatización de los CNT es un procedimiento que consta de tres pasos. Primero, los grupos carboxílicos, obtenidos luego del proceso de oxidación y purificación con agentes ácidos oxidantes, son clorados con ácido clorhídrico (HCl, 70° C durante 24 hs). El exceso de reactivo se remueve por evaporación en vacío. En segundo lugar, se realiza la aminación del producto clorado en presencia de una base (en este caso, trietil-amina). En el tercer y último paso, los CNT son colocados en una solución acuosa de CuSO<sub>4</sub> 100 mM para permitir la interacción entre éstos y el ion Cu (II). Estas modificaciones permitieron obtener resultados satisfactorios en el análisis por MELDI MS de proteínas de alto peso molecular [110].

Estos resultados descriptos en la literatura, sumados a estudios físicoquímicos realizados con los CNT y otros compuestos de carbono [111, 112] han permitido avanzar en el conocimiento de las propiedades y aplicaciones de estos nanomateriales y su utilidad como matrices en el análisis de analitos orgánicos por UV-MALDI MS.

Como conclusión, se puede decir que estos nanomateriales son una alternativa importante como matrices para el estudio de ciertos compuestos de bajo peso molecular por UV-MALDI MS, aunque hasta el presente parecería que no pueden considerarse matrices UV-MALDI generales. Al igual que lo observado al usarse las matrices orgánicas clásicas, la eficiencia de los CNT como matrices en UV-MALDI MS depende no sólo de sus propiedades físicoquímicas, sino también del tipo de analito que se está estudiando, además del método de preparación de la muestra empleado (mezcla o sándwich, ver detalle en la sección 1.3.1.1.), etapa crucial de dicha técnica. Todos estos factores deben ser tomados en cuenta al momento de realizar un análisis por UV-MALDI MS, de modo de obtener los mejores resultados y optimizar el empleo de esta técnica.

En resumen, pese al desarrollo alcanzado y el extenso uso de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF en el campo de los hidratos de carbono, es evidente que hasta el momento, no existe una matriz universal capaz de ionizar efectivamente todos los componentes de esta familia, ni una técnica de preparación de muestra particular que sea igualmente útil para todos los azúcares. Por lo tanto, el análisis de cada muestra (analito) debe ser considerado individualmente. La búsqueda de nuevas matrices y la comprensión acabada de los procesos involucrados en la desorción/ionización del analito en la espectrometría de masa UV-MALDI han sido y son objeto de numerosos proyectos de investigación [57, 60-63, 89].

## **1.5. EFECTO DE SALES EN EL ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO NEUTROS**

Es importante señalar que los hidratos de carbono son más sensibles a la presencia de impurezas que las proteínas y glicopéptidos [113]. Estas sustancias afectan la

cristalización y formación de iones, por lo que se han desarrollado varios métodos para la remoción de sales o impurezas antes del análisis por UV-MALDI MS. Como ejemplos pueden mencionarse: lavado de la muestra seca con agua o TFA diluido; uso de una membrana de corte 500 Da para dializar los oligosacáridos [114]; utilización de una membrana Nafion-117, que permite la remoción de sales, y la adsorción de proteínas y péptidos a la misma [115]; cubrir el electrodo portamuestras con membranas sintéticas activadas, como polietilenos o polipropilenos, sobre las que se deposita la muestra, se enjuaga con agua y se remueve de la misma muestra impurezas como sales, glicerol y detergentes [116]. Se desarrollaron también puntas de pipetas (*típs*; 1 - 2  $\mu$ l) conteniendo resinas hidrofóbicas, fase reversa, resinas de intercambio aniónico, catiónico, fase normal, entre otros [117]; El uso de grafito, empaquetado en cartuchos, se implementó utilizando soluciones acuosas para la purificación de oligosacáridos en solución, la que contiene sales, monosacáridos, detergentes (SDS o Tritón X-100), proteínas (incluyendo enzimas), entre otros. [118]. Más recientemente, se ha descrito el uso de una pequeña cantidad de una resina hidrofóbica (SP20SS, Supelco) que se mezcla con la muestra de oligosacáridos en solución. La resina se centrifuga o deja decantar y los oligosacáridos se recuperan en el sobrenadante libres de detergentes, proteínas y todo posible remanente hidrofóbico que se adsorbe a la resina [119].

Como se describe en los Capítulos II y III del presente trabajo, al estudiar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Mg}^{2+}$  en el proceso de desorción/ionización MALDI de azúcares surgió como consecuencia el estudio del uso de la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), un conocido complejante de ambos cationes, para enmascarar dicho efecto. En particular en el Capítulo III se describen los beneficios de su

uso para el análisis por ESI MS de muestras de hidratos de carbono contaminadas con dicho cationes.

## 1.6 FRAGMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

El patrón de fragmentación de los hidratos de carbono obtenidos por UV-MALDI MS, es equivalente al que se obtiene por otras técnicas de ionización [120]. Sin embargo, presentan ciertas diferencias que provienen:

- del tipo de ión padre que se forma en el proceso de desorción/ionización ( $[A+H]^+$ ,  $[A+Na]^+$ , etc.), y que varía parcialmente de acuerdo a la matriz empleada;
- de la energía recibida en el proceso de ionización, determinada por la potencia del láser utilizada y la matriz;
- del tiempo en el que ocurre la fragmentación.

Se definen dos tipos principales de rupturas:

- las rupturas del enlace glicosídico entre monosacáridos brinda información especialmente acerca de la secuencia de azúcares y ramificación de las cadenas, pero muy poco sobre los enlaces entre los mismos. Se interpreta que el mecanismo por el cual se generan es el de inducción por carga.
- las rupturas dentro del anillo del monosacárido que involucra ruptura de dos enlaces dentro del anillo. Este tipo de iones son muy útiles para determinar el tipo de enlaces entre monosacáridos. Al parecer se generan por un mecanismo de carga-remota [71]. La fragmentación dentro de los anillos ocurre con una frecuencia menor a la fragmentación del enlace glicosídico, posiblemente debido a que requieren mayor energía para la ruptura de estos enlaces.

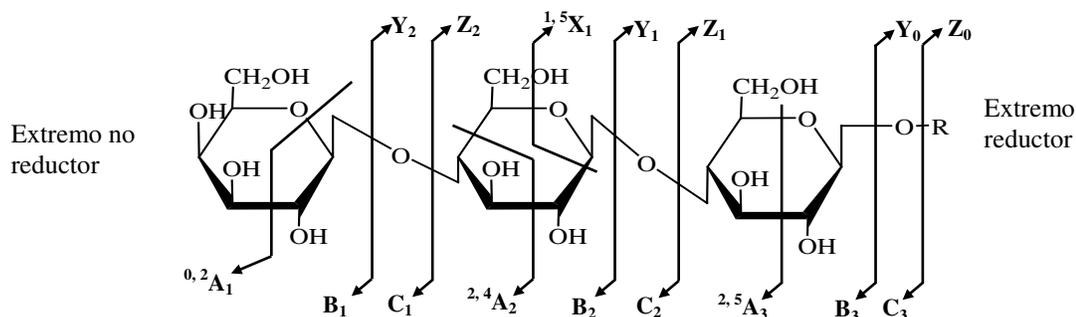
Domon y Costello introdujeron la nomenclatura para describir los fragmentos que se generan a partir de la ruptura de oligosacáridos por espectrometría de masa FAB, y dada la equivalencia de las fragmentaciones por UV-MALDI MS y ESI MS, se mantuvo la misma nomenclatura (esquema 1.2) [121]:

- los iones que mantienen la carga sobre el extremo reductor se denominan X, si corresponden a rupturas de anillo; Y, si la ruptura ocurre entre el carbono 1 y el oxígeno del enlace glicosídico ( $C_1 \rightarrow O$  glicosídico); o Z, si la ruptura del enlace glicosídico ocurre entre el oxígeno del enlace y el carbono de otro residuo ( $O \rightarrow C_x$  glicosídico),

- si la carga queda del extremo no reductor los iones se denominan A, B y C respectivamente,

- se utilizan subíndices para indicar la unión o anillo del azúcar que se fragmentó, comenzando a numerar desde el extremo reductor para los fragmentos X, Y, y Z, y desde el extremo no reductor para los fragmentos A, B, y C,

- los fragmentos que provienen de la ruptura del anillo, X o A, llevan un superíndice que indica la posición de los enlaces rotos en el anillo.



**Esquema 1.2.** Nomenclatura de Domon y Costello para los iones que se generan por fragmentación de hidratos de carbono [121].

En los espectros de fragmentación en general los iones que predominan son normalmente del tipo B e Y, y la abundancia relativa de los mismos depende del tipo de ión parental. Los iones  $[A+H]^+$  típicamente originan fragmentos Y, mientras que los iones  $[A+Na]^+$ , originan fragmentos B e Y. Los iones X o A dan señales muy débiles, con excepción del fragmento  $^{0,2}A$ , que se produce a partir del residuo terminal del extremo reductor de la mayoría de los oligosacáridos [122].

Las especies protonadas,  $[A+H]^+$ , tienden a sufrir menos rupturas dentro del anillo, pero se descomponen más rápidamente que aquellas especies que forman aductos con cationes metálicos [71]. Estas últimas muestran un orden de descomposición decreciente:  $Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$  [123]. Se observó además que los oligosacáridos lineales se fragmentan más fácilmente que los que presentan ramificaciones [57, 60-63, 71].

Por otra parte, en UV-MALDI-TOF MS se distinguen distintos tipos de fragmentación de acuerdo a la velocidad con la que ocurre el proceso y consecuentemente el sitio donde tienen lugar dentro del instrumento. El primer tipo de fragmentación que pueden sufrir los iones ocurre muy rápidamente, y tiene lugar dentro de la cámara de ionización. Se conoce como “descomposición en la fuente”, *in-source decay* (ISD) o *promp fragmentation*. Las fragmentaciones que ocurren más rápidamente corresponden a rupturas dentro del anillo. Los fragmentos iónicos que se generan en la cámara de ionización pueden ser observados en espectros en modo lineal y especialmente, empleando analizadores de tiempo de vuelo que poseen extracción retardada de iones (PDE), utilizando tiempos de retardo más largos que los comunes [64]. Los iones tipo Y formados en la cámara de ionización son indistinguibles de los iones moleculares, y su

presencia puede distorsionar el perfil del espectro cuando se trata de analizar muestras mezcla. Sin embargo, la formación de estos iones es normalmente baja y no representa un problema importante [57].

El segundo tipo de fragmentación de iones es el que ocurre dentro del analizador, se conoce como “fragmentación en el analizador” o *post source decay* (PSD). Corresponde típicamente a fragmentaciones de enlaces glicosídicos, cuya ocurrencia normalmente requiere más tiempo, posiblemente por el proceso de transferencia de protones entre distintos grupos funcionales. Este tipo de fragmentación produce iones desenfocados, con masas moleculares mayores que sus contrapartes enfocadas y pueden provocar picos anchos que afectan la exactitud de las mediciones en modo lineal. Estos tipos de iones producto se discriminan en analizadores de tiempo de vuelo reflectrón (ver figura 1.7), ya que los mismos son reenfocados dentro del reflector, y alcanzan el detector a velocidades proporcionales a sus masas. Sin embargo también pueden ser observados con instrumentos equipados con extracción retardada de iones (PDE), si se utilizan tiempos de retardo suficientemente largos. Así, la abundancia relativa de los fragmentos iónicos en espectros PSD, depende parcialmente del tiempo de retardo utilizado para la extracción de los iones.

Un tercer tipo de fragmentación es la “fragmentación inducida por colisión” con un gas inerte o *collision-induced decomposition* (CID). Esta técnica se utiliza en espectrometría de masa tandem ( $MS^n$ ). Los iones se filtran o eligen en un primer analizador, luego se induce la fragmentación de estos iones precursores dentro de una cámara llamada celda de colisión, intercalada entre los analizadores. Los iones son bombardeados con un gas inerte, argón normalmente, y los iones producto que se generan

son discriminados en un segundo analizador. Los espectros de fragmentación de oligosacáridos obtenidos por CID, muestran típicamente iones de tipo B e Y, y un aumento importante de los iones X, provenientes de la fragmentación del anillo [57]. Este tipo de experimentos se realiza en los equipos UV-MALDI TOF-TOF.

## 1.7 REFERENCIAS

- [1] Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D. H. Mass spectrometry of organic compounds. San Francisco: Holden-Day, USA, (1967).
- [2] McLafferty, F. W., Turecek, F. Interpretation of mass spectra. 4th Edition, University Science Books, USA, (1993).
- [3] Siuzdack, G. Mass spectrometry for biotechnology. Academic Press., USA, (1996).
- [4] Erra-Balsells, R. Del volar de las proteínas y de cómo lograrlo (Espectrometría de masa UV-MALDI). Química Viva, <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>, (2004), 3, 56-69.
- [5] Barber, M., Green, B. N. The analysis of small proteins in the molecular weight range 10-24 kDa by magnetic sector mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom., (1987), 1, 80-83.
- [6] Benninghoven, A. Chemical analysis of inorganic and organic surfaces and thin films by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). Angew. Chem., Int. Ed. Engl., (1994), 33, 1023-1043.
- [7] Sundqvist, B., Macfarlane, R. D.  $^{252}\text{Cf}$ -plasma desorption mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev., (1985), 4, 421-460.

- [8] Vastola, F. J., Mumma, R. O., Pirone, A. J. Analysis of organic salts by laser ionization. *Org. Mass Spectrom.*, (1970), 3, 101-104.
- [9] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, (1988), 2, 151-153.
- [10] Karas, M., Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, (1988), 60, 2299-2301.
- [11] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, (1989), 246, 64-71.
- [12] Dell, A., Morris, H. R. Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science*, (2001), 291, 2351-2356.
- [13] Helenius, A., Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, (2001), 291, 2364-2369.
- [14] [www.nobel.se/chemistry/laureates/2002](http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2002).
- [15] Karas, M., Bahr, U. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry: principles and applications. *Selected Topics Mass Spectrom Biomolecular Science*, (1997), 504, 33-53.
- [16] Hoffman, E., Stroobant, V. *Mass spectrometry. Principles and applications*. Third edition. Wiley and Sons, West Sussex, Inglaterra, (2007).
- [17] Cole, R. B. *Electrospray ionization mass spectrometry: Fundamentals, instrumentations and applications*. Wiley and Sons, New Jersey, USA, (1997).
- [18] Morris, H. R., Paxton, T., Dell, A., Langhorne, J., Berg, M., Bordoli, R. S., Hoyes, J., Bateman, R. H. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass

---

spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1996), 10, 889-896.

[19] Medzihradszky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L., Burlingame, A. L. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.*, (2000), 72, 552-558.

[20] Johnson, J. V., Yost, R. A., Kelley, P. E., Bradford, D. C. Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: Triple quadrupoles and quadrupole ion traps. *Anal. Chem.*, (1990), 62, 2162-2172.

[21] Sheeley, D. M., Reinhold, V. N. Structural characterization of carbohydrate sequence, linkage, and branching in a quadrupole ion trap mass spectrometer: Neutral oligosaccharides and N-linked glycans. *Anal. Chem.*, (1998), 70, 3053-3059.

[22] Bleakney, W. A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of the probability and critical potentials for the formation of multiply charged ions in Hg vapor electron impact. *Phys. Rev.*, (1929), 34, 157-160.

[23] Nier, A. O. A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *Rev. Sci. Instrum.*, (1947), 18, 398-411.

[24] Harrison, A. G. *Chemical ionization mass spectrometry*, CRC Press., Boca Raton, USA, (1983).

[25] Beckey, H. D. *Field ionization mass spectrometry*. *Research/ Development*, (1969), 20, 26-29.

- [26] Van Vaeck, L., Adriaens, A., Gijbels, R. Static secondary ion mass spectrometry: S-SIMS. Part 1. Methodology and structural information. *Mass Spectrom. Rev.*, (1999), 18, 1-47.
- [27] Beckey, H. D. Principles of field ionization and field desorption in mass spectrometry. Pergamon Press., Oxford, Inglaterra, (1977).
- [28] Erra-Balsells, R. Del volar de las proteínas y de cómo lograrlo (espectrometría de masa ESI). *Química Viva*, <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>, (2004), 3, 96-121.
- [29] Ehring, E., Karas, M., Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, (1992), 27, 472-480.
- [30] Bökelmann, V., Spengler, B. Kaufmann, R. Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Eur. J. Mass Spectrom.*, (1995), 1, 81-83.
- [31] Wang, B. H., Dreisewerd, K., Bahr, U., Karas M., Hillenkamp, F. Gas-phase cationization and protonation of neutrals generated by matrix-assisted laser desorption. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (1993), 4, 393-398.
- [32] Grigorean, G., Carey, R. I., Amster, I. J. Studies of exchangeable protons in the matrix-assisted laser desorption/ionization process. *Eur. J. Mass Spectrom.*, (1996), 2, 139-143.
- [33] Gimon-Kinsel, M., Preston-Schaffter, L. M., Kinsel, G. R., Russell, D. H. Effects of matrix structure/acidity on ion formation in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, (1997), 119, 2534-2540.

- 
- [34] Chan, T. W. D., Colburn, A. W., Derrick, P. J. Matrix-assisted UV laser desorption. Suppression of the matrix peaks. *Org. Mass Spectrom.*, (1991), 26, 342-344.
- [35] Knochenmuss, R., Dubois, F., Dale, M. J., Zenobi, R. The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1996), 10, 871-877.
- [36] Beavis, R. C., Chait, B. T. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1989), 3, 432-435.
- [37] Strupat, K., Karas, M., and Hillenkamp, F. 2,5-dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, (1991), 111, 89-102.
- [38] Beavis, R. C., Chaudhary, T Chait, B. T. Alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, (1992), 27, 156-158.
- [39] Turro, N. J. *Modern molecular photochemistry*. Benjamin, Menlo Park, USA, (1978).
- [40] Santos, L. S., Haddad, R., Höehr, N. F., Eberlin, M. N. Fast screening of low molecular weight compounds by thin-layer chromatography and “on-spot” MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (2004), 76, 2144-2147.
- [41] Gholipour, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R. In situ analysis of plant tissues underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix. *Anal. Biochem.*, (2008), 383, 159-167.

[42] Mechref, Y., Novotny, M. V. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of acidic glycoconjugates facilitated by the use of spermine as a co-matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (1998), 9, 1293-1302.

[43] Armstrong, D. W., Zhang, L.-K., He, L., Gross, M. L. Ionic Liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anla. Chem.*, (2001), 73, 3679-3686.

[44] Cole, R. B. *Electrospray and MALDI mass spectrometry: Fundamentals, instrumentation, practicalities and biological applications.* Wiley and Sons, New Jersey, USA, (2010).

[45] Gross, J. H. *Mass Spectrometry.* Springer-Verlag, Alemania, (2004), 411-434.

[46] Verentchikov, A. N., Ens, W., Standing, K. G. Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ion source and orthogonal extraction. *Anal. Chem.*, (1994), 66, 126-133.

[47] Brown, R. S., Lennon, J. J. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.*, (1995), 67, 1998-2003.

[48] Caprioli, R. M., Farmer, T. B., Gile, J. Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.*, (1997), 69, 4751-4760.

[49] Touboul, D., Piednoel, H., Voisin, V., De La Porte, S., Brunelle, A., Halgand, F., Laprevote, O. Changes of phospholipid composition within the dystrophic muscle by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and mass spectrometry imaging. *Eur. J. Mass Spectrom.*, (2004), 10, 657-664.

- [50] Back to basics manual, micromass UK limited, <http://www.micromass.co.uk> (1997).
- [51] Fenn, J. B., Electrospray wings for molecular elephants, nobel lecture, <http://www.nobel.se>.
- [52] Bothner, B., Dong, X. F., Bibbs, L., Johnson, J. E., Siuzdak, G. Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, (1998), 273, 673-676.
- [53] Dole, M., Mach, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, (1968) 49, 2240-2247.
- [54] Mann, M., Meng, K. C., Fenn, J. B. Proc. Proceedings of the 36th annual Conference on mass spectrometry and allied topics. Am. Soc. Mass Spectrom., San Francisco CA, USA, (1988), 1207-1208.
- [55] Yamashita, M., Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, (1984) 88, 4451-4469.
- [56] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Sciences*, (1989), 64, 246-264.
- [57] Harvey, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.*, (1999), 18, 349-451.
- [58] Harvey, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *Int. J. Mass Spectrom.*, (2003), 226, 1-35.
- [59] Harvey, D. J. Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1993), 7, 614-619.

- [60] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 1999–2000. *Mass Spectrom. Rev.*, (2006), 25, 595– 662.
- [61] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 2001-2002. *Mass Spectrom. Rev.*, (2008), 27, 125-201.
- [62] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 2003-2004. *Mass Spectrom. Rev.*, (2009), 27, 125-201.
- [63] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 2005-2006. *Mass Spectrom. Rev.*, (2011), 30, 1-100.
- [64] Zaia, J. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom. Rev.*, (2004), 23, 161-227.
- [65] Dell, A., Reason A. J., Khoo, K-H., Panico, M., McDowell, R. A., Morris, H. R., Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. *Methods Enzymol.*, (1994), 230, 108-132.
- [66] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, (1987), 78, 53-68.
- [67] Huberty, M. C., Vath, J. E. Yu, W., Martin, S. A. Site-specific carbohydrate identification in recombinant proteins using MALD-TOF MS. *Anal. Chem.*, (1993), 65, 2791-2800.

- 
- [68] Garozzo, D., Spina, E., Sturiale, L., Montaudo, G., Rizzo, R., Daolio, S. Quantitative determination of (1-2) cyclic glucans by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1994), 8, 358-360.
- [69] Mock, K. K., Davey, M., Cottrell, J. S. The analysis of underivatised oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption mass. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1991), 177, 644-651.
- [70] Mohr, M. D., Börnsen, K. O., Widmer, H. M. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Improved matrix for oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1995), 9, 809-814.
- [71] Cancilla, M. T., Penn, S. G. Carroll, J. A., Lebrilla, C. B. Coordination of alkali metals to oligosaccharides dictates fragmentation behavior in matrix assisted laser desorption ionization/fourier transform mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, (1996), 118, 6736-6745.
- [72] Harvey, D. J. Ionization and collision-induced fragmentation of N-linked and related carbohydrates using divalent cations. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2001), 12, 926-937.
- [73] Stahl, B., Thurl, S., Zeng, J., Karas, M., Hillenkamp, F., Steup, M., Sawatzki, G. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, (1994), 223, 218-226.
- [74] Krause, J., Stoeckli, M., Schlunegger, U. P. Studies on the selection of new matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1996), 10, 1927-1933.
- [75] Tarzi, O. I., Nonami, H., Erra-Balsells, R. Temperatura effect on the stability of compounds used as UV-MALDI-MS matrix: 2,5-dihydroxybenzoic acid, 2,4,6-

trihydroxyacetophenone, trans- $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, nor-harmane and harmane. *J. Mass Spectrom.*, (2009), 44, 260-277.

[76] Karas, M., Ehring, H., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., Hillenkamp, F., Grehl, M., Krebs, B. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Org. Mass Spectrom.*, (1993), 28, 1476-1481.

[77] Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A., Hercules, D. M. Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in MALDI analysis. *Anal. Chem.*, (1995), 67, 1034-1041.

[78] Kolli, V. S. K., Orlando, R. A new matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization on magnetic sector instruments with point detectors. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1996), 10, 923-926.

[79] Zöllner, P., Stübiger, G., Schmid, E., Pittenauer, E., Allmaier, G. MALDI mass spectrometry of biomolecules and synthetic polymers using alkali hexacyanoferrate (II) complexes and glycerol as matrix. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, (1997), 169-170, 99-109.

[80] Naxing, X., Huang, Z., Watson, J. T., Gage, D. A. Mercaptobenzothiazoles: A new class of matrices for laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (1997), 8, 116 -124.

[81] Nonami, H., Tanaka, K., Fukuyama, Y., Erra-Balsells, R.  $\beta$ -Carboline alkaloids as matrices for UV-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in positive and negative ion modes. Analysis of proteins of high molecular

mass, and of cyclic and acyclic oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1998), 12, 285-296.

[82] Hao, C., Ma, X., Fang, S., Liu, Z., Liu, S., Song, F., Liu, J. Positive- and negative-ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of saccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1998), 12, 345-348.

[83] Chen, P., Baker, A. G., Novotny, M. V. The use of osazones as matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Anal. Biochem.*, (1997), 244, 144-151.

[84] Daas, P. J. H., Arisz, P. W., Schols, H. A., De Ruiter, G. A., Voragen, A. G. J. Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, (1998), 257, 195-202.

[85] Cramer, R., Richter, W. J., Stimson, E., Burlingame, A. L. Analysis of phospho- and glycopolypeptides with infrared matrix-assisted laser desorption and ionization. *Anal. Chem.*, (1998), 70, 4939-4944.

[86] Papac, D. I., Wong, A., Jones, A. J. S. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (1996), 68, 3215-3223.

[87] Figueroa, I. D., Torres, O., Russell, D. H. Effects of the water content in the sample preparation for MALDI on the mass spectra. *Anal. Chem.*, (1998), 70, 4527-4533.

[88] Dai, Y., Whittal, R. M., Bridges, C. A., Isogai, Y., Hindsgaul, O., Li, L. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for the analysis of monosulfated oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, (1997), 304, 1-9.

- [89] Nonami, H., Fukui, S. y Erra-Balsells, R.  $\beta$ -carboline alkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: A comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *J. Mass Spectrom.*, (1997), 32, 287-296.
- [90] Fukuyama, Y., Shuuichi, N., Yamazaki, Y., Tanaka, K. Ionic liquid matixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides. *Anal. Chem.*, (2008), 80, 2171-2179.
- [91] Landoni, M., Duschak, V. G., Erra-Balsells, R., Couto, A. S. UV-MALDI mass spectrometry analysis of NBD-glycosphingolipids without an external matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2008), 19, 923-926.
- [92] Guo, Z., Zhang, Q., Zou, H., Guo, B., Ni, J. A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (2002), 74, 1637-1641.
- [93] Wei, J., Buriak, J., Siuzdak, G. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature*, (1999), 399, 243-246.
- [94] Han, M., Sunner, J. An activated carbon substrate for laser desorption mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2000), 11, 644-649.
- [95] Michalak, L., Ficher, K. J., Alderdice, D. S., Jardine, D. R., Willett, G. D.  $C_{60}$ -assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, (1994), 29, 512-515.
- [96] Ayorinde, F. O., Garvin, K., Saed, K. Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2000), 14, 608-615.

- [97] Ayorinde, F. O., Hambright, O., Porter, T. N., Keith, Q. L. Jr. Use of meso-tetrakis (pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1999), 13, 2474-2479.
- [98] Sunner, J., Dratz, E., Chen, Y.-C. Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (1995), 67, 4335-4342.
- [99] Dale, M. J., Konchenmuss. R., Zenobi, R. Graphite/liquid mixed matrices for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (1996), 68, 3321-3329.
- [100] Chen, Y.-C., Shiea, J., Sunner, J. Rapid determination of trace nitrophenolic organic in water by combining solid-phase extraction with surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2000), 14, 86-90.
- [101] Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M., Niwa, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *J. Mass Spectrom.*, (2000), 35, 417-422.
- [102] Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, (1991), 354, 56-58.
- [103] Iijima, S and Ichihashi, T., Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, (1993), 363, 603-605.
- [104] Ajayan, P. M. Nanotubes from carbon. *Chem. Rev.*, (1999), 99, 1787-1799.
- [105] Ren, S.-F., Li, Z., Chen, Z.-H., Guo, Y.-L. Immobilized carbon nanotubes as matrix for MALDI-TOF-MS analysis: Applications to neutral small carbohydrates. *J. Am. Soc. Mass spectrum.*, (2005), 16, 333-339.

[106] Xu, S., Li, Y., Zou, H., Qiu, J., Guo, Z., Guo, B. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (2003), 75, 6191-6195.

[107] Ren, S.-F., Guo, Y.-L. Oxidized carbon nanotubes as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of biomolecules, *R. Com. Mass Spectrom.*, (2005), 19, 255-2260.

[108] Pan, C., Xu, S., Hu, L., Su, X., Ou, J., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Y., Guo, B. Using oxidized carbon nanotubes as matrix for analysis of small molecules by MALDI-TOF MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2005), 16, 883-892.

[109] Pan, C., Xu, S., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Y., Guo, B. Carbon nanotubes as adsorbent of solid-phase extraction and matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2005), 16, 263-270.

[110] Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Schwarzenauer, T., Huck, C. W., Bonn, G. K. Chemically modified carbon nanotubes as material enhanced laser desorption ionization (MELDI) material in protein profiling, *Anal. Chem. Acta*, (2006), 651, 32-39.

[111] Valentini, F., Amine, A., Orlanducci, S., Terranova, M. L. Carbon nanotubes purification: preparation and characterization of carbon nanotubes paste electrodes. *Anal. Chem.*, (2003), 75, 5413-5421.

[112] Sedo, O., Alberti, M., Janca, J., Havel, J. Laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry of various carbon materials. *Carbon*, (2006), 44, 840-847.

[113] Mock, K. K., Sutton, C. W., Cottrell, J. S. Sample immobilization protocols for matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1992), 6, 233-238.

- [114] Görisch, H. Drop dialysis: Time course of salt and protein exchange. *Anal. Biochem.*, (1988), 173, 393-398.
- [115] Börnsen, K. O., Mohr, M. D., Widmer, H. M. Ion exchange and purification of carbohydrates on a Nafion membrane as a new sample pretreatment for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1995), 9, 1031-1034.
- [116] Worrall, T. A., Cotter, R. J., Woods A. S. Purification of contaminated peptides and proteins on synthetic membranes surfaces for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (1998), 70, 750-756.
- [117] Kussmann, M., Nordhoff, E., Rahbek-Nielsen, H., Haebel, S., Rossel-Larsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Kroll-Kristensen, A., Palm, L., Roepstorff, P., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.*, (1997), 32, 593-601.
- [118] Packer, N. H., Lawson, M. A., Jardine, D. R., Redmond, J. W. A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconjugate Journal*, (1998), 15, 737-747.
- [119] Huang, Y., Mechref, Y., Tian, J., Gong, H., Lennarz, W. J., Novotny, M. V. A simple sample preparation for enhancing the sensitivity of mass spectrometric oligosaccharide determinations through the use of an adsorptive hydrophobic resin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2000), 14, 1233-1237.

[120] Reinhold, V. N., Reinhold, B. B., Costello, C. E. Carbohydrate molecular weight profiling, sequence, linkage, and branching data: ES-MS and CID. *Anal. Chem.*, (1995), 67, 1772-1784.

[121] Domon, B., Costello, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrates fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.*, (1988), 5, 397-409.

[122] Okamoto, M., Takahashi, K., Doi, T., Takimoto, Y. High-sensitivity detection and postsource decay of 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (1997), 69, 2919-2926.

[123] Ngoka, L. C., Gal, J. F., Lebrilla C. B. Effects of cations and charge types on the metastable decay rates of oligosaccharides. *Anal. Chem.*, (1994), 66, 692-698.



El capítulo II fue retirado a pedido del autor

At author's request chapter II has been withdrawn

### ***CAPÍTULO III***

***Efecto de la presencia de CaCl<sub>2</sub> en el análisis por ESI MS de hidratos de carbono. Uso del EDTA como reactivo auxiliar***

---



### 3.1 INTRODUCCIÓN

En el campo de la espectrometría de masa se ha desarrollado recientemente el análisis directo de hidratos de carbono naturales presentes en células vegetales, sin la necesidad del aislamiento de los mismos mediante el uso de solventes (extracción). Ejemplos de estas técnicas son: espectrometría de masa por ionización del tipo electrospray por medio de sonda muestreadora (*Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, PESI MS) [1, 2], micromuestreador capilar por succión a presión controlada combinado con espectrometría de masa UV-MALDI (*Pressure Probe - UV-MALDI MS*) [3] y UV-MALDI MS aplicada directamente sobre tejidos vegetales intactos [4-7]. Sin embargo, la mayoría de los análisis por espectrometría de masa involucran como analitos (A) hidratos de carbono aislados de material vegetal seco [8-11]. Los hidratos de carbono solubles en el citoplasma de las células vegetales se encuentran en soluciones acuosas conteniendo cationes como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  en rangos de concentraciones de 2,3-4,3 mg/ml para el  $K^+$ , 0,109-0,122 mg/ml para el  $Na^+$  y menores a 0,001 mg/ml para  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  [12]. Esto hace que los azúcares sean detectados por MS como especies  $[A+K]^+$  en modo positivo [2-9] y  $[A-H]^-$  en modo negativo [3] utilizando directamente el citoplasma intacto o el tejido celular como material de estudio [1, 4-7].

La situación es diferente cuando se trata de muestras de azúcares nativos obtenidos por extracción, debido a que las paredes celulares están incluidas en el material vegetal tratado y su contenido de  $Ca^{2+}$  es muy alto [12]. Como consecuencia, el contenido promedio de cationes en material vegetal seco resulta ser de 1% de  $K^+$ , 0,5% de  $Ca^{2+}$  y 0,2% de  $Mg^{2+}$ . El contenido de  $Na^+$  y la relación  $Na^+/K^+$  que acompaña a los azúcares extraídos puede cambiar drásticamente debido a que se trata de un catión que se encuentra tanto en el material vegetal como en el agua, en las soluciones y en los solventes y reactivos

salinos utilizados en el aislamiento, fraccionamiento y purificación de los hidratos de carbono. En estos casos, los analitos son detectados en general como especies  $[A+Na]^+$  [8-11].

En un estudio previo donde se efectuó el análisis por UV-MALDI MS de xilanos extraídos del alga *Nothogenia fastigiata* [13], se observó la notoria influencia del  $Ca^{2+}$  presente en cantidades elevadas (cuantificado por espectroscopía de absorción atómica) en la calidad (relación S/R, sensibilidad, resolución) de los espectros obtenidos. El mismo efecto se observó en el estudio donde se agregó  $Ca^{2+}$  en forma de  $CaCl_2$  a las soluciones de las muestras estudiadas. No solamente se observó un efecto inhibitorio, sino que también las señales de los oligómeros fueron completamente suprimidas con el sucesivo agregado de la sal hasta alcanzar la relación molar analito:sal 1:100.

Con el objetivo de entender estos resultados y mejorar el análisis por espectrometría de masa de los hidratos de carbono nativos que pudiesen contener importantes cantidades de  $Ca^{2+}$  (y/o  $Mg^{2+}$ ), se llevaron a cabo en forma comparativa experimentos paralelos estudiando el efecto del  $Ca^{2+}$  (y  $Mg^{2+}$ ) y de la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), un conocido quelante del  $Ca^{2+}$  (y  $Mg^{2+}$ ) [14], en el proceso de volatilización/ionización de hidratos de carbono utilizando los métodos UV-MALDI MS, cuyos resultados se describieron en el Capítulo II, y ESI MS cuyos resultados y conclusiones finales conjuntas se describen en el presente capítulo.

## **3.2 EXPERIMENTAL**

### **3.2.1 Materiales y métodos**

Para el análisis de hidratos de carbono por ESI MS se utilizaron los siguientes compuestos comerciales: glucosa (Glc, PM 180), maltosa (M(2), PM 342), maltotriosa

(M(3), pureza > 95%, PM 504), maltotetraosa (M(4), pureza > 96%, PM 666), maltopentaosa (M(5), pureza > 95%, PM 828), maltohexaosa (M(6), pureza > 90%, PM 990) y maltoheptaosa (M(7), pureza > 98%, PM 1152), todos provenientes de Sigma – Aldrich Chem Corp.; fructanos (Fr): 1-kestosa (Fr(3), pureza > 99 %, PM 504), nistosa (Fr(4), pureza > 99 %, PM 666) y 1<sup>F</sup>-fructofuranosilnistosa (Fr(5), pureza > 99 %, PM 828), provenientes de Wako Chemicals; maltosas cíclicas comerciales: β-ciclodextrina (Bcd, pureza > 98 %, PM 1134), metil-β-ciclodextrina (MBcd, PM 1232), heptakis-(2,6-di-O-metil)-β-ciclodextrina (DMBcd, pureza > 90 %, PM 1330), heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina (TMBcd, PM 1428), y 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (OHPBcd, PM 2352), provenientes de Sigma – Aldrich Chem Corp. Como calibrantes se utilizaron compuestos orgánicos de distinta naturaleza: cafeína (Cf, PM 194), bromuro de tetrabutilamonio (PM 322), α-ciclodextrina (PM 972), γ-ciclodextrina (PM 1296) y angiotensina I (PM 1297), provenientes de Sigma – Aldrich Chem Corp.

Con el objetivo de analizar el efecto en el proceso de ionización del agregado de metales en las soluciones de los diferentes analitos, se utilizaron las sales NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>, todas provenientes de MERK. Se usó la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, PM 572), proveniente de Wako Chemicals, para evaluar el efecto del agregado de este quelante en las soluciones que contuvieran Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Se utilizaron como solventes acetonitrilo (MeCN) y metanol (MeOH) grado HPLC (provenientes de Sigma – Aldrich Chem Corp.) y agua de baja conductividad (grado Milli Q; 56 - 59 nS/cm, PURIC-S, ORUGANO Co., Ltd., Tokio, Japón).

La calibración se realizó utilizando soluciones de concentración 1 μM de los calibrantes seleccionados en MeOH-H<sub>2</sub>O 9:1 vol/vol. Los hidratos de carbono (1 mg) se

disolvieron en 1ml de agua (pH 6,20 – 6,80). Se prepararon soluciones stock de sales de concentración 100, 10 y 1  $\mu\text{mol/ml}$  en agua. De cada solución de hidrato de carbono, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  y se mezclaron con un volumen de solución de sal de manera tal de obtener relaciones molares A:CaCl<sub>2</sub> dentro del rango 100:1 a 1:10 mol/mol (pH 6,30 – 6,50) utilizando soluciones de CaCl<sub>2</sub> (y/o MgCl<sub>2</sub>) cuya concentración era de 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ .

### **3.2.2 Equipamiento**

Los experimentos se realizaron con un equipo ESI MS Mariner Applied Biosystems ESI-TOF. Los espectros se obtuvieron inyectando directamente en la cámara de ionización volúmenes comprendidos entre 0,5 y 50  $\mu\text{l}$  de las soluciones a temperatura ambiente. Se usó una mezcla de MeOH - H<sub>2</sub>O 9:1 vol/vol como solvente de corrida (*stream solvent*). El rango dinámico de valores de m/z seleccionado fue 100-4000. Se utilizó una jeringa automática Harvard PHD 2000 (Holliston, M, USA) para la infusión y se trabajó con un flujo de 5  $\mu\text{l/min}$  para la introducción de las soluciones a analizar. El potencial aplicado en el *tip* (punta del electrodo aguja) fue de +3691 V, el potencial del *skimmer*, +15 V y el del *nozzle*, +100 V. Este último se mantuvo a una temperatura de 137 °C. El flujo de N<sub>2</sub> fue de 0,4 l/min, la temperatura del analizador se mantuvo a 29.0 °C y la presión del gas auxiliar de nebulización en 0,55 MPa.

### **3.2.3 Preparación de muestras**

Con el fin de estudiar el efecto en el proceso ESI de la presencia de Ca<sup>2+</sup> (y/o Mg<sup>2+</sup>) y del posterior agregado de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se prepararon soluciones de hidratos de carbono de concentración 10 a 100 pmol/ $\mu\text{l}$ , a las

cuales se les agregó una cantidad de sal ( $\text{CaCl}_2$  y/o  $\text{MgCl}_2$ ) de manera de obtener relaciones molares analito:sal (A:sal) 1:1, 1:5 y 1:10. Las relaciones molares A:EDTA utilizadas fueron 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:5 y 1:10. A partir de estos experimentos, las condiciones óptimas seleccionadas para el estudio del efecto del EDTA consistieron en la adición del mismo en la solución mezcla A: $\text{CaCl}_2$  1:1 mol/mol, de manera de obtener una relación molar  $\text{CaCl}_2$ :EDTA 1:1 y 1:10. También se analizó de manera complementaria el efecto del agregado de EDTA a las soluciones nativas de los distintos hidratos de carbono utilizando relaciones molares A:EDTA 1:1 y 1:10.

El conjunto de muestras que se prepararon para cada analito, para realizar los experimentos, fueron: 1) A nativo; 2) [A: $\text{CaCl}_2$ ] (1:1 mol/mol); 3) [(A: $\text{CaCl}_2$ ) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:1 mol/mol); 4) [(A: $\text{CaCl}_2$ ) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol); 5) [A:EDTA] (1:1 mol/mol); 6) [A:EDTA] (1:10 mol/mol). Los experimentos con  $\text{MgCl}_2$  se realizaron de manera similar.

Se analizó el pH de las soluciones con el fin de evaluar el nivel de complejación entre el quelante y los metales iónicos en las soluciones analizadas, de acuerdo a los valores encontrados en la literatura. Para la medición del pH, se utilizaron las soluciones de los hidratos de carbono cíclicos (Bcd, MBcd, DMBcd, TMBcd, OHPBcd) y lineales (M(2)-M(7)) y las siguientes soluciones mezcla: A: $\text{CaCl}_2$  (1:1 y 1:10 mol/mol), A: $\text{CaCl}_2$ :EDTA (1:1:1 y 1:10:10 mol/mol) y A:EDTA (1:1 y 1:10 mol/mol). También se midieron los pH de las soluciones acuosas de EDTA y de  $\text{CaCl}_2$  nativos así como el de las mezclas conteniendo una concentración tal de manera de obtener las relaciones molares  $\text{CaCl}_2$ :EDTA 1:1 y 1:10 mol/mol. En todos los casos, se midió el pH directamente en las soluciones utilizando un electrodo Cole-Pamer Chemcadet 5986-50. El electrodo fue previamente calibrado empleando dos soluciones de buffers a pH 4 y 7 y lavado con agua luego de cada medición.

### 3.3 RESULTADOS

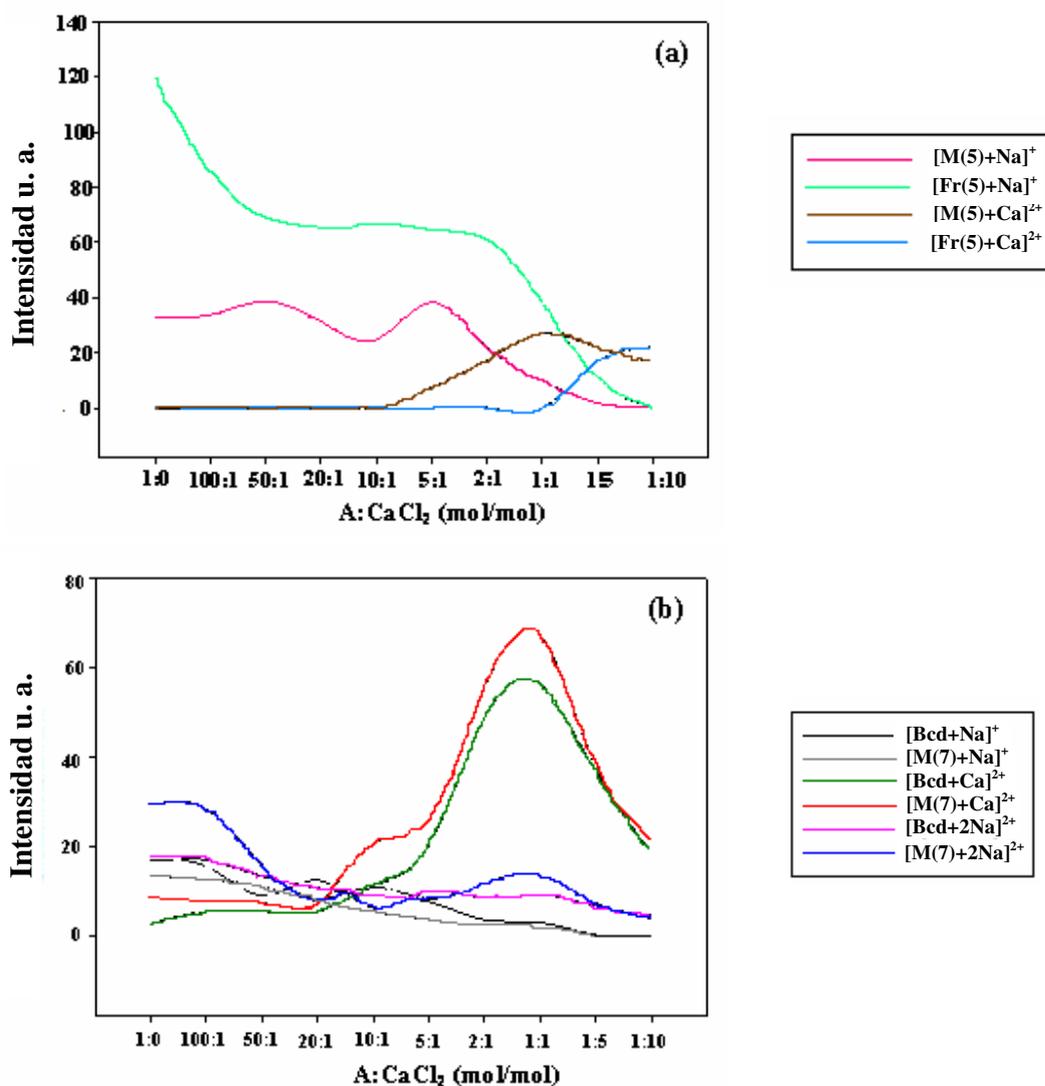
Con el objetivo de analizar el efecto del agregado de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y EDTA en el proceso de ionización ESI de los hidratos de carbono, se evaluaron las intensidades relativas (RI) de las especies  $[\text{A}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{A}+2\text{Na}]^{2+}$ ,  $[\text{A}+\text{K}]^+$  y  $[\text{A}+\text{Ca}]^{2+}$  utilizando como analitos las maltosas M(3)-M(7), la Bcd y sus derivados metilados (MBcd, DMBcd y TMBcd) y 2-hidroxiopropilado (OHPBcd), y los fructanos Fr(3)-Fr(5). Se utilizó como solvente agua de baja conductividad para las soluciones de los analitos y las sales inorgánicas, y la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O 9:1 vol/vol como solvente de corrida (*stream solvent*). En estas condiciones, no se observó la formación de las especies  $[\text{A}+\text{CaCl}]^+$ ,  $[\text{A}+(\text{solvente})_n+\text{Ca}]^{2+}$  y  $[(\text{A})_n+\text{Ca}]^{2+}$ , las cuales fueron detectadas con importante intensidad en estudios realizados por ESI MS de mezclas de trisacáridos,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  utilizando MeCN y mezclas MeCN:H<sub>2</sub>O como solvente [15, 16]. En otros estudios con M(7) y azúcares relacionados, la señal principal observada fue  $[\text{M}+\text{Ca}]^{2+}$ , utilizando  $\text{CaCl}_2$  en relaciones molares mayores a 1:100, y utilizando como solvente una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol [17].

Las relaciones molares A: $\text{CaCl}_2$  ( $\text{MgCl}_2$ ) elegidas para el estudio del efecto de la presencia de sales en el análisis por ESI MS de los hidratos de carbono, se determinó a partir de las soluciones de los analitos con concentraciones comprendidas entre 10 y 100 pmol/ $\mu\text{l}$ . Las soluciones estudiadas se prepararon con relación molar A: $\text{CaCl}_2$  (A: $\text{MgCl}_2$ ) 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:5 y 1:10 mol/mol. Como se muestra en la figura 3.1(a), la señal más importante obtenida en el análisis por ESI MS de M(5) fue la de la especie  $[\text{M}(5)+\text{Na}]^+$ , la cual disminuyó su intensidad con el agregado creciente de  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución. Esto, a su vez, produjo la aparición y posterior incremento de intensidad de la señal correspondiente a la especie  $[\text{M}(5)+\text{Ca}]^{2+}$ . Resultados similares fueron obtenidos para

los analitos M(3) y M(4). En los análisis realizados con M(7), se observaron inicialmente las señales de las especies  $[M(7)+Na]^+$  y  $[M(7)+2Na]^{2+}$  con una relación de intensidades de 1:2, mientras que en el análisis de Bcd, las especies  $[Bcd+Na]^+$  y  $[Bcd+2Na]^{2+}$  presentaron la misma intensidad (figura 3.1(b)). Las maltosas M(5), M(7) y la Bcd mostraron mayor afinidad por el  $Ca^{2+}$  y mayor estabilidad de la especie  $[A+Ca]^{2+}$ . Esta última fue detectada a partir de la relación molar A:CaCl<sub>2</sub> 10:1 para M(5) y 100:1 para Bcd. En el caso de la M(7) y la Bcd, la señal de la especie  $[A+Ca]^{2+}$  fue detectada antes de la incorporación de CaCl<sub>2</sub> a las soluciones de M(7) y Bcd nativas, lo que indica la presencia de sales de calcio en los hidratos de carbono comerciales (figura 3.1(b)). Tanto las señales de las especies dicargadas  $[M(7)+2Na]^{2+}$  como  $[Bcd+2Na]^{2+}$  observadas para las soluciones nativas de la M(7) y la Bcd presentaron una disminución en sus intensidades por el agregado de  $Ca^{2+}$  a las soluciones. Estos cambios fueron similares a los detectados para las especies monocargadas  $[M(7)+Na]^+$  y  $[Bcd+Na]^+$  (figura 3.1(b)). Para M(3) y M(4), las especies  $[M(3)+Ca]^{2+}$  y  $[M(4)+Ca]^{2+}$  fueron detectadas a partir de las relaciones molares A:CaCl<sub>2</sub> 1:5 y 1:10 respectivamente (resultados no mostrados).

A diferencia de las maltosas lineales y cíclicas, los fructanos presentaron una sensibilidad menor a la presencia de  $Ca^{2+}$  en las soluciones, dado que las especies  $[Fr(3)+Ca]^{2+}$ ,  $[Fr(4)+Ca]^{2+}$  y  $[Fr(5)+Ca]^{2+}$  fueron detectadas a partir de una relación molar Fr:CaCl<sub>2</sub> menor a 2:1 (figura 3.1(a)). La intensidad de la especie  $[Fr(5)+Na]^+$  no se vio significativamente afectada ante el incremento del  $Ca^{2+}$  en las soluciones en los rangos de relaciones molares Fr(5):CaCl<sub>2</sub> de 50:1 a 5:1, y la relación de las intensidades  $[Fr(5)+Na]^+/[M(5)+Na]^+$  se mantuvo alrededor de 2 (figura 3.1(a)). Es importante aclarar que las especies  $[A+2Na]^{2+}$  con A: Fr(3) - Fr(5) y M(3) - M(6) no fueron detectadas en los análisis por ESI MS, lo que permitió que las especies  $[A+Ca]^{2+}$  fueran más fácilmente

detectadas por ser más limpias las regiones del espectro correspondientes a sus valores de  $m/z$ .



**Figura 3.1.** Espectro de masa ESI. Efecto de la concentración del  $\text{CaCl}_2$  en el análisis de: (a) M(5) y Fr(5), (b) M(7) y Bcd. Relación molar analito: $\text{CaCl}_2$ : 1:0; 100:1; 50:1; 20:1; 10:1; 5:1; 2:1; 1:1; 1:5 y 1:10. Solvente: agua.

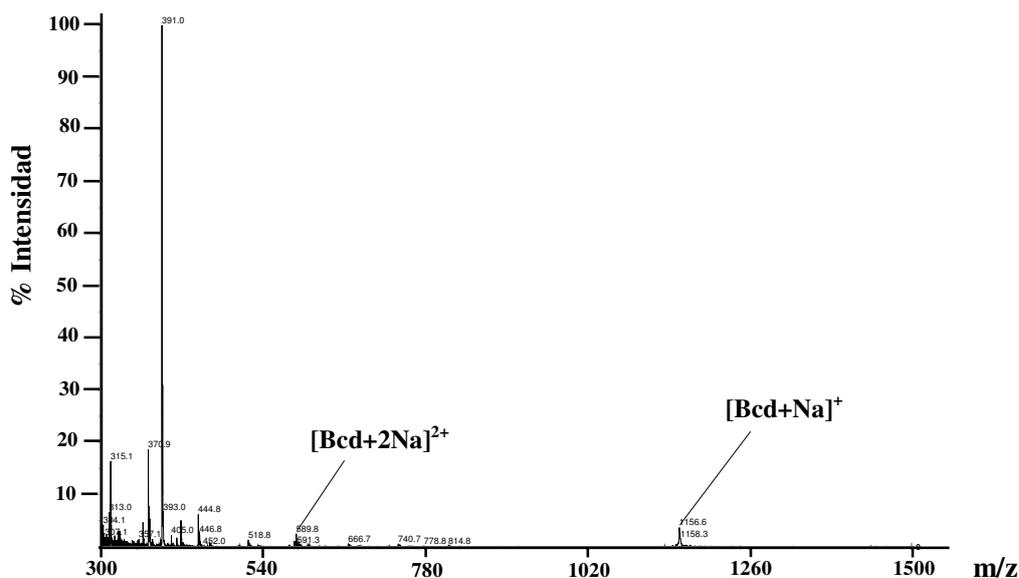
### 3.3.1 Agregado de EDTA

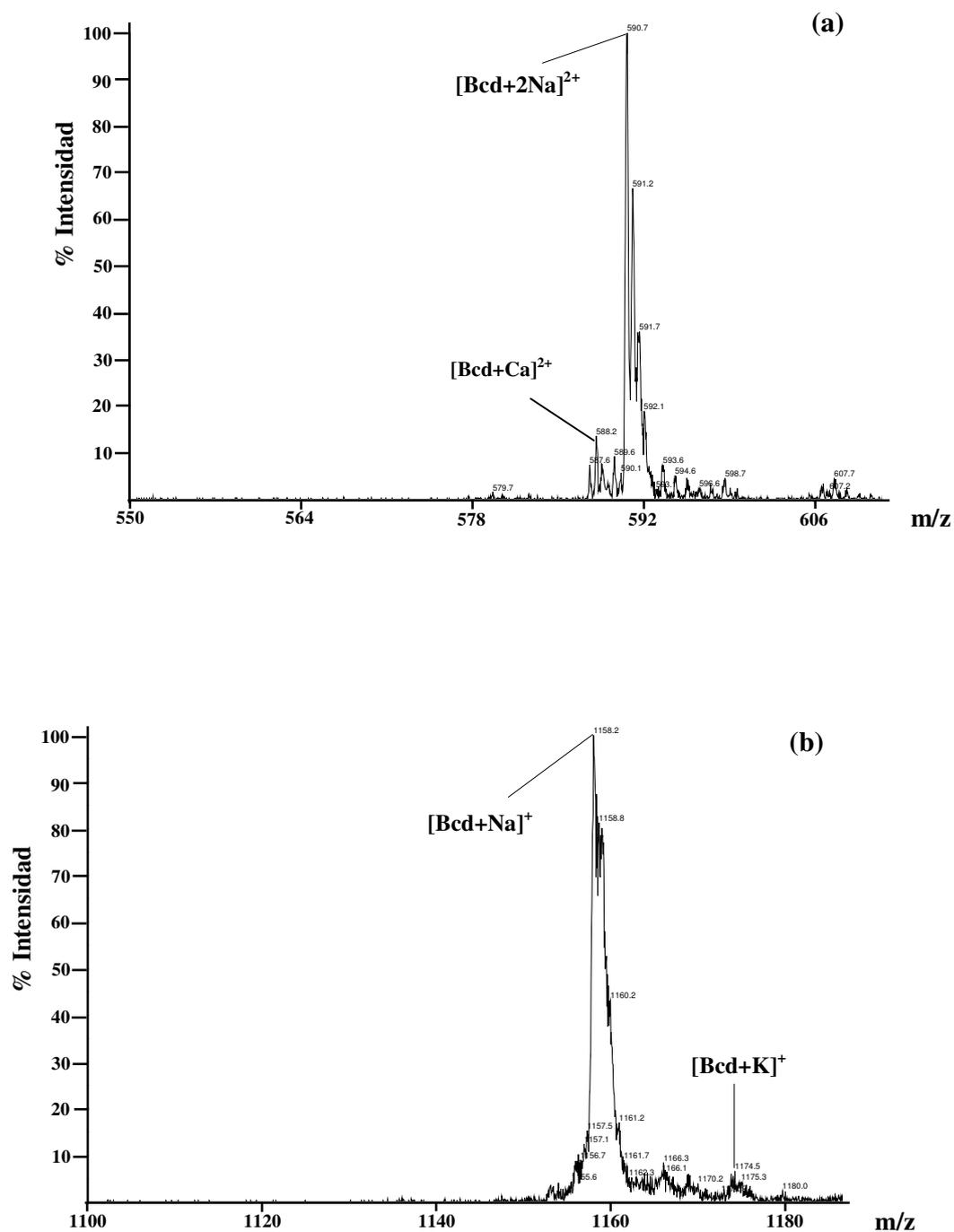
Se utilizó el EDTA con el objeto de “limpiar” muestras nativas de hidratos de carbono contaminadas con  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Mg}^{2+}$  gracias a sus propiedades quelantes. Con el fin de evaluar la eficiencia del EDTA, se realizaron experimentos con los analitos antes mencionados. A las soluciones acuosas que contenían  $\text{CaCl}_2$  en relación molar A: $\text{CaCl}_2$  1:1, se les agregó una cantidad de EDTA de manera de obtener una relación molar  $\text{CaCl}_2$ :EDTA de 1:1 y 1:10. También se les agregó la misma cantidad de EDTA a soluciones nativas de los diferentes hidratos de carbono (1:1 y 1:10 mol/mol) para evaluar el posible efecto inhibitorio del EDTA en la ionización ESI de los azúcares estudiados. Los resultados mostraron buenas intensidades relativas de las señales mono y disódicas de las diferentes maltosas al igual que para la Bcd. Dichas intensidades relativas fueron similares a las observadas en los experimentos realizados con los hidratos de carbono nativos.

### 3.3.2 Análisis por ESI MS de las $\beta$ -ciclodextrinas

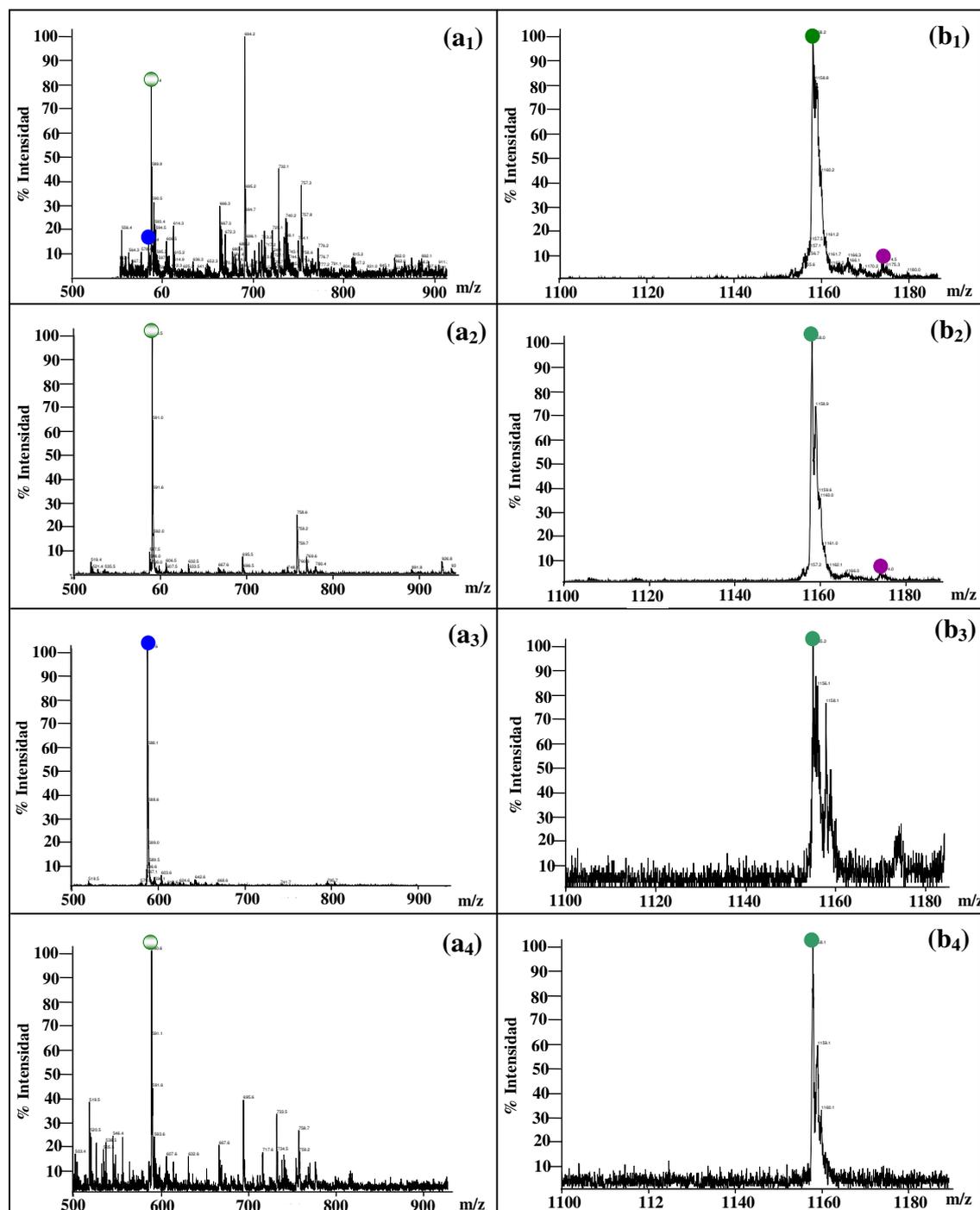
En los espectros de la Bcd nativa (figuras 3.2(a)-(b) y 3.3(a<sub>1</sub>)-(b<sub>1</sub>)) se observaron cuatro señales, dos correspondientes a las especies dicargadas  $[\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  (m/z 590) y  $[\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  (m/z 587), y las otras a m/z 1157 y 1173, correspondientes a las especies  $[\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  y  $[\text{Bcd}+\text{K}]^+$  respectivamente (ésta última sólo se volvió a ver en el análisis de la solución mezcla de Bcd:EDTA). La detección de la especie  $[\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  en el espectro de la solución de Bcd nativa indicó la presencia de la sal en el analito comercial. Esta especie prácticamente desapareció luego del agregado de EDTA a la solución de Bcd en relación molar 1:1 mol/mol (figuras 3.3(a<sub>2</sub>)-(b<sub>2</sub>)). Luego del agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  a las soluciones de Bcd, se observó el incremento de la intensidad de la señal a m/z 587, junto con la disminución de la señal monosódica y la desaparición de las señales  $[\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  y

$[\text{Bcd}+\text{K}]^+$  (figuras 3.3(a<sub>3</sub>)-(b<sub>3</sub>)). La señal de la especie  $[\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  no se vio significativamente afectada luego del agregado de EDTA a la solución que contiene la mezcla de Bcd y  $\text{CaCl}_2$  en relación  $\text{CaCl}_2:\text{EDTA}$  1:1 mol/mol, si bien la especie  $[\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  volvió a observarse. Sin embargo, con el agregado de EDTA a la solución en relación  $\text{CaCl}_2:\text{EDTA}$  1:10 mol/mol, se observó la desaparición de la especie  $[\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  y un incremento en la intensidad de las señales correspondientes a las especies mono y disódica, obteniéndose un espectro similar al obtenido con la solución de Bcd nativa (figuras 3.3(a<sub>4</sub>)-(b<sub>4</sub>)).





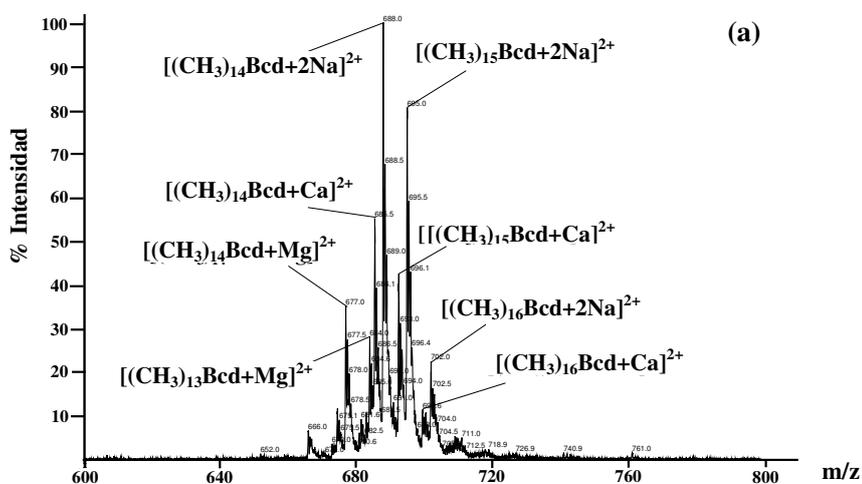
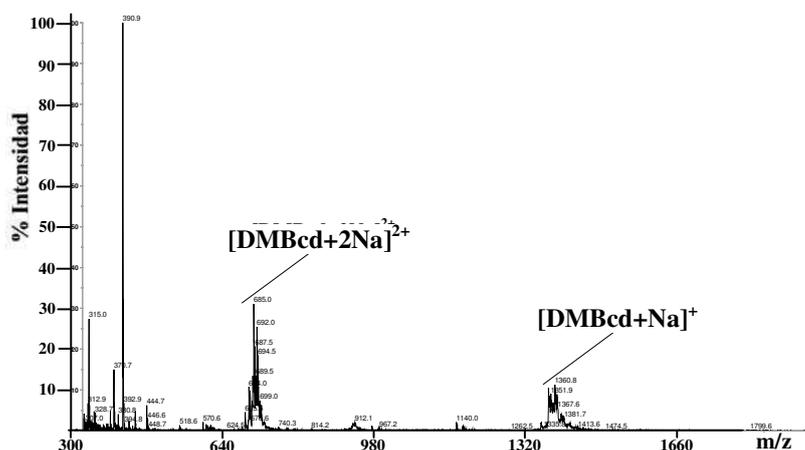
**Figura 3.2.** Espectro de masa ESI de la Bcd. Detalle las señales observadas: (a)  $[Bcd+2Na]^{2+}$  y  $[Bcd+Ca]^{2+}$ , rango de m/z: 550-610 y (b)  $[Bcd+Na]^+$  y  $[Bcd+K]^+$ , rango de m/z: 1100-1190. Modo positivo.

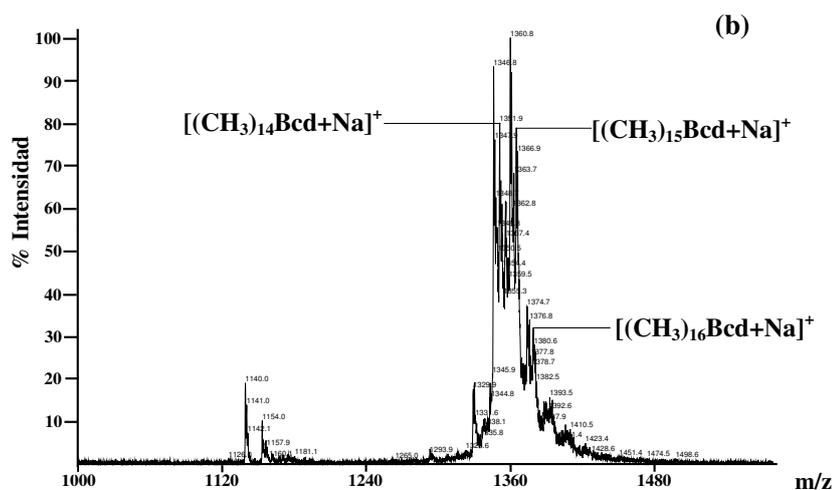


**Figura 3.3.** Espectros de masa ESI de la Bcd. (a<sub>1</sub>): Bcd; (a<sub>2</sub>): [Bcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (a<sub>3</sub>): [Bcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (a<sub>4</sub>): [(Bcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z 500-900; (b<sub>1</sub>): Bcd; (b<sub>2</sub>): [Bcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (b<sub>3</sub>): [Bcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (b<sub>4</sub>): [(Bcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 1100-1190. Detalle de las señales: [Bcd+2Na]<sup>2+</sup> (●), [Bcd+Ca]<sup>2+</sup> (●), [Bcd+Na]<sup>+</sup> (●) y [Bcd+K]<sup>+</sup> (●). Modo positivo.

Los espectros de las Bcd sustituidas (MBcd, DMBcd, TMBcd y OHPBcd) mostraron en general más de una señal en la región de valores de  $m/z$  correspondientes a los iones moleculares. Esto es debido, como ya se detalló en el Capítulo II, a la presencia de mezclas de especies con diferente grado de sustitución en los compuestos comerciales. La DMBcd, por ejemplo, mostró en su espectro de masa ESI tres señales correspondientes a las especies  $[(\text{CH}_3)_{14}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$ ,  $[(\text{CH}_3)_{15}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  y  $[(\text{CH}_3)_{16}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  cuyos valores de  $m/z$  son 1353, 1367 y 1381 respectivamente (figuras 3.4(a)-(b) y 3.5(a<sub>1</sub>) y (b<sub>1</sub>)). De estas tres especies,  $[(\text{CH}_3)_{14}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  correspondió al ion molecular “más sodio” esperado teóricamente, debido a que presenta dos grupos metilo como sustituyentes en cada unidad de glucosa de su estructura, mientras que las otras dos especies detectadas presentan una tercera metilación en el caso de la  $(\text{CH}_3)_{15}\text{Bcd}$  y dos metilaciones adicionales en el caso de la especie  $(\text{CH}_3)_{16}\text{Bcd}$ . A su vez, también se observaron las correspondientes señales de las especies dicargadas,  $[(\text{CH}_3)_{14}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$ ,  $[(\text{CH}_3)_{15}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  y  $[(\text{CH}_3)_{16}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$ , cuyos valores de  $m/z$  son 685, 692 y 699 respectivamente (figuras 3.4(a)-(b) y 3.5(a<sub>1</sub>)-(b<sub>1</sub>)). Sin embargo, en la zona de valores de  $m/z$  de las señales dicargadas se detectaron también señales satélites cuya intensidad disminuyó marcadamente luego del agregado de EDTA a la solución madre de DMBcd (DMBcd:EDTA 1:1 mol/mol, figuras 3.4(a)-(b) y 3.5(a<sub>1</sub>)). Dichas señales satélites presentaron un valor de  $m/z$  677, 684, 685, 692 y 699. Para demostrar que dichas señales satélites correspondían a las especies  $[\text{DMBcd}+\text{Ca}]^{2+}$  y  $[\text{DMBcd}+\text{Mg}]^{2+}$ , se agregó a la solución madre de DMBcd una cantidad de  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{MgCl}_2$ ) correspondiente a la relación molar A: $\text{CaCl}_2$  1:1. El agregado de  $\text{CaCl}_2$  a la solución de DMBcd produjo un incremento relativo de la intensidad de las señales a  $m/z$  685, 692 y 699, correspondientes a las especies  $[(\text{CH}_3)_{14}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$ ,  $[(\text{CH}_3)_{15}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  y  $[(\text{CH}_3)_{16}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  respectivamente (figuras 3.5(a<sub>3</sub>)-(b<sub>3</sub>)). De la misma manera, el agregado

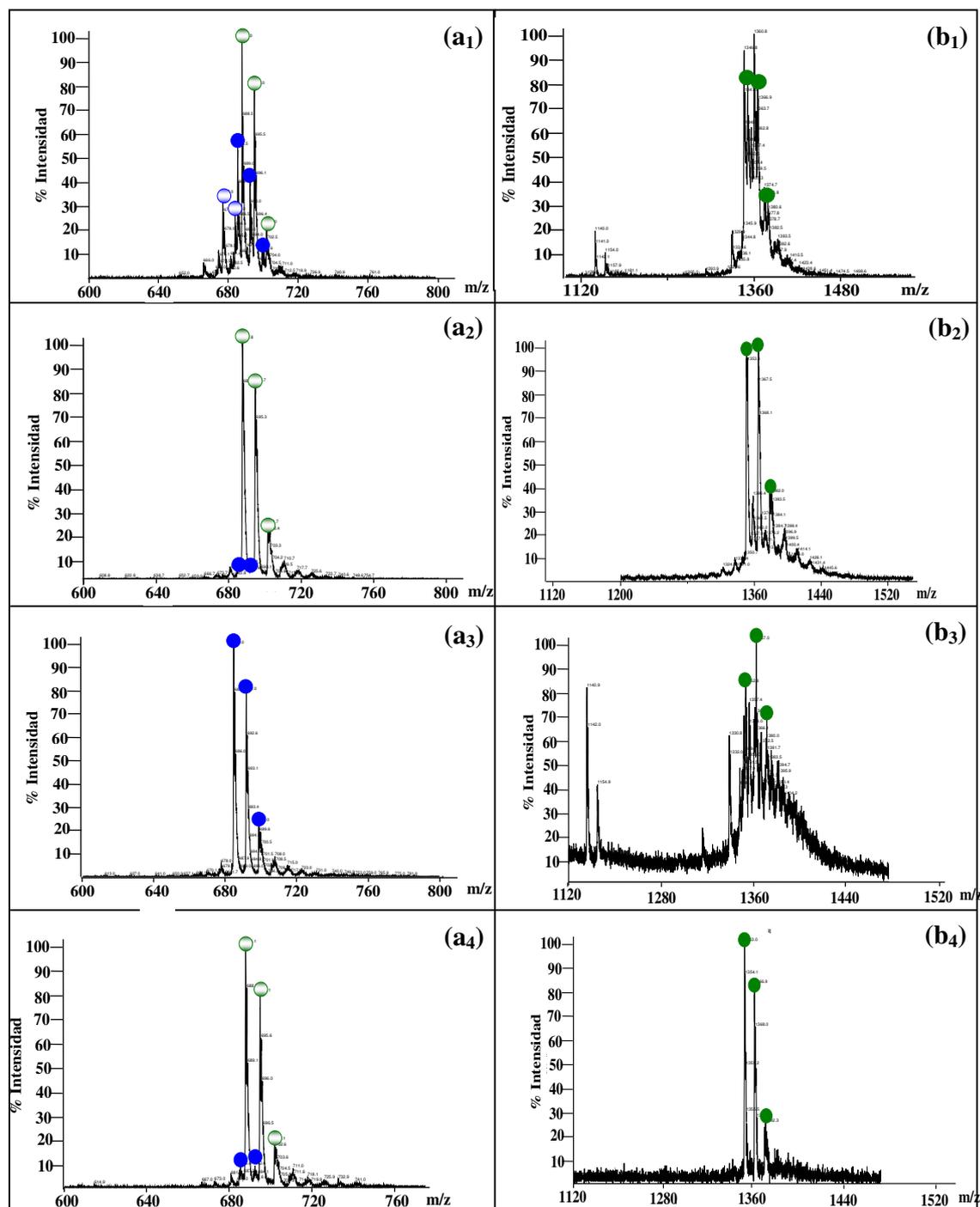
de  $\text{MgCl}_2$  produjo un incremento de las señales a  $m/z$  677, 684 y 691, correspondientes a las especies  $[(\text{CH}_3)_{14}\text{Bcd}+\text{Mg}]^{2+}$ ,  $[(\text{CH}_3)_{15}\text{Bcd}+\text{Mg}]^{2+}$  y  $[(\text{CH}_3)_{16}\text{Bcd}+\text{Mg}]^{2+}$  (figuras 3.6(a<sub>3</sub>)-(b<sub>3</sub>)). Estas señales disminuyeron sus intensidades relativas con el agregado de EDTA a la solución en relación molar  $\text{CaCl}_2:\text{EDTA}$  ( $\text{MgCl}_2:\text{EDTA}$ ) 1:1, mientras que al incrementar la cantidad de EDTA llevando la relación molar a 1:10 mol/mol, las señales dicargadas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  disminuyeron marcadamente su intensidad, observándose predominantemente las señales de las especies  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  (figuras 3.5(a<sub>4</sub>)-(b<sub>4</sub>) y 3.6(a<sub>4</sub>)-(b<sub>4</sub>)).



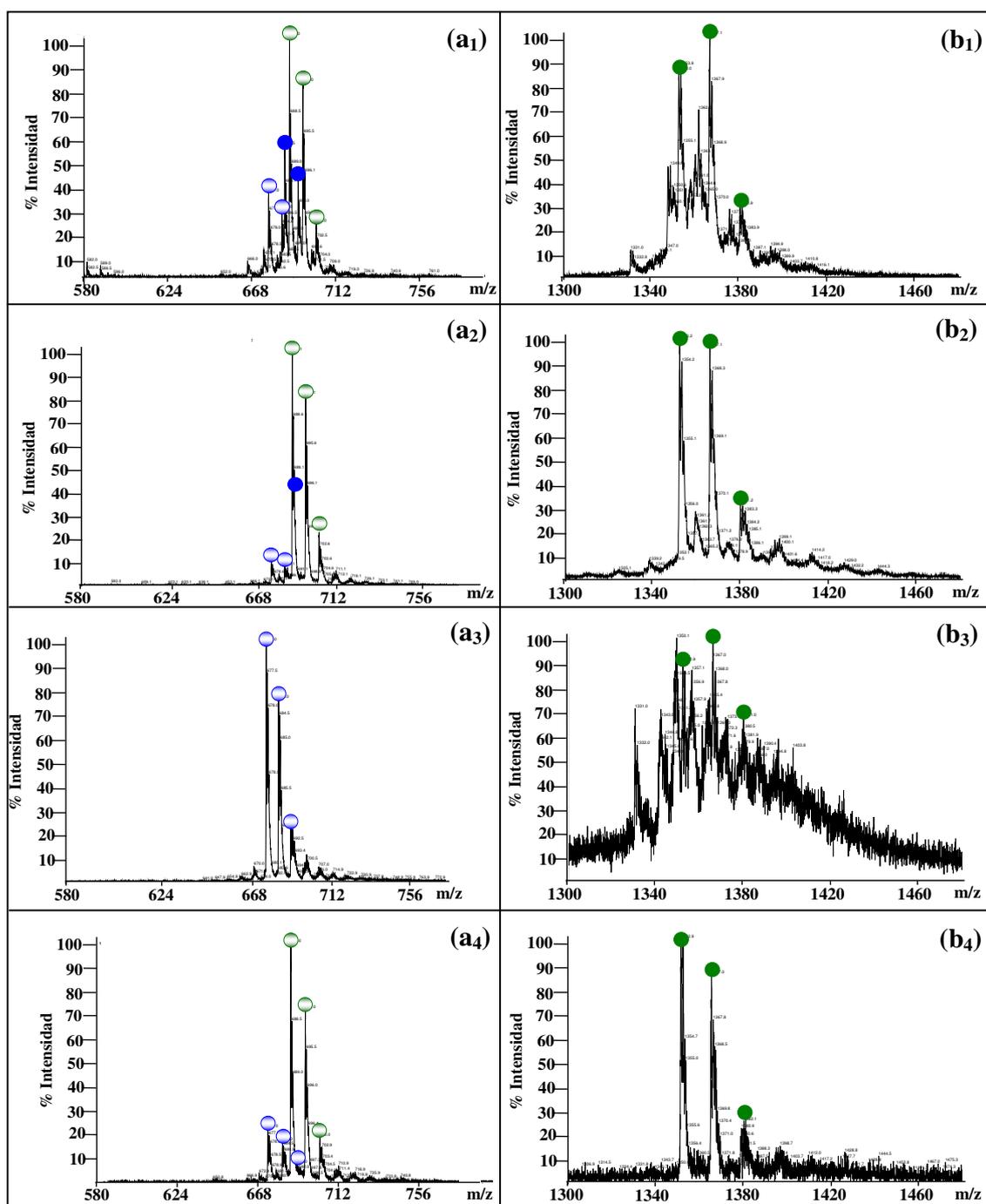


**Figura 3.4.** Espectro de masa ESI de la DMBcd. Detalle las señales observadas: (a)  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$ ,  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  y  $[(\text{CH}_3)_{14-15}\text{Bcd}+\text{Mg}]^{2+}$ , rango de  $m/z$ : 600-800 y (b)  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$ , rango de  $m/z$ : 1000-1500. Modo positivo.

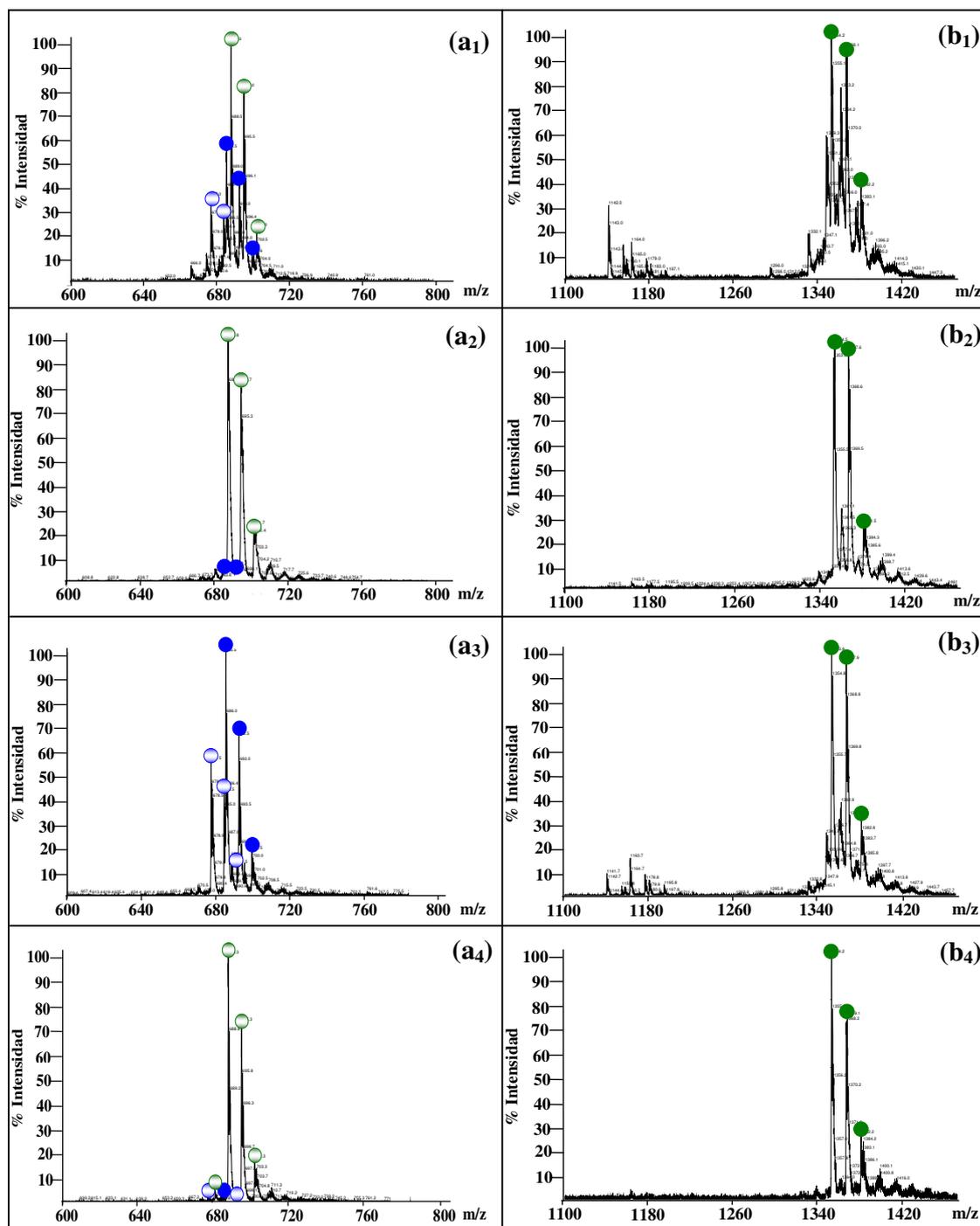
En el análisis de la DMBcd con el agregado de la mezcla de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$ , se observaron las señales correspondientes a las especies  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Mg}]^{2+}$  y  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  con alta intensidad, siendo las especies con  $\text{Ca}^{2+}$  las más importantes (figuras 3.7(a<sub>3</sub>)). El posterior agregado de EDTA a la solución restituyó las señales disódicas, mientras que las señales con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  prácticamente desaparecieron. Esto indica que el efecto quelante del EDTA es más importante sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  que sobre el  $\text{Mg}^{2+}$ , ya que las especies  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  eran inicialmente las más abundantes (figuras 3.7(a<sub>3</sub>)-(b<sub>3</sub>) y (a<sub>4</sub>)-(b<sub>4</sub>)).



**Figura 3.5.** Espectros de masa ESI de la DMBcd. (a<sub>1</sub>): DMBcd; (a<sub>2</sub>): [DMBcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (a<sub>3</sub>): [DMBcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (a<sub>4</sub>): [(DMBcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 600-760; (b<sub>1</sub>): DMBcd; (b<sub>2</sub>): [DMBcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (b<sub>3</sub>): [DMBcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (b<sub>4</sub>): [(DMBcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 1120-1520. Detalle de las señales:  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  (●),  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  (●),  $[(\text{CH}_3)_{14-15}\text{Bcd}+\text{Mg}]^{2+}$  (●),  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  (●). Modo positivo.



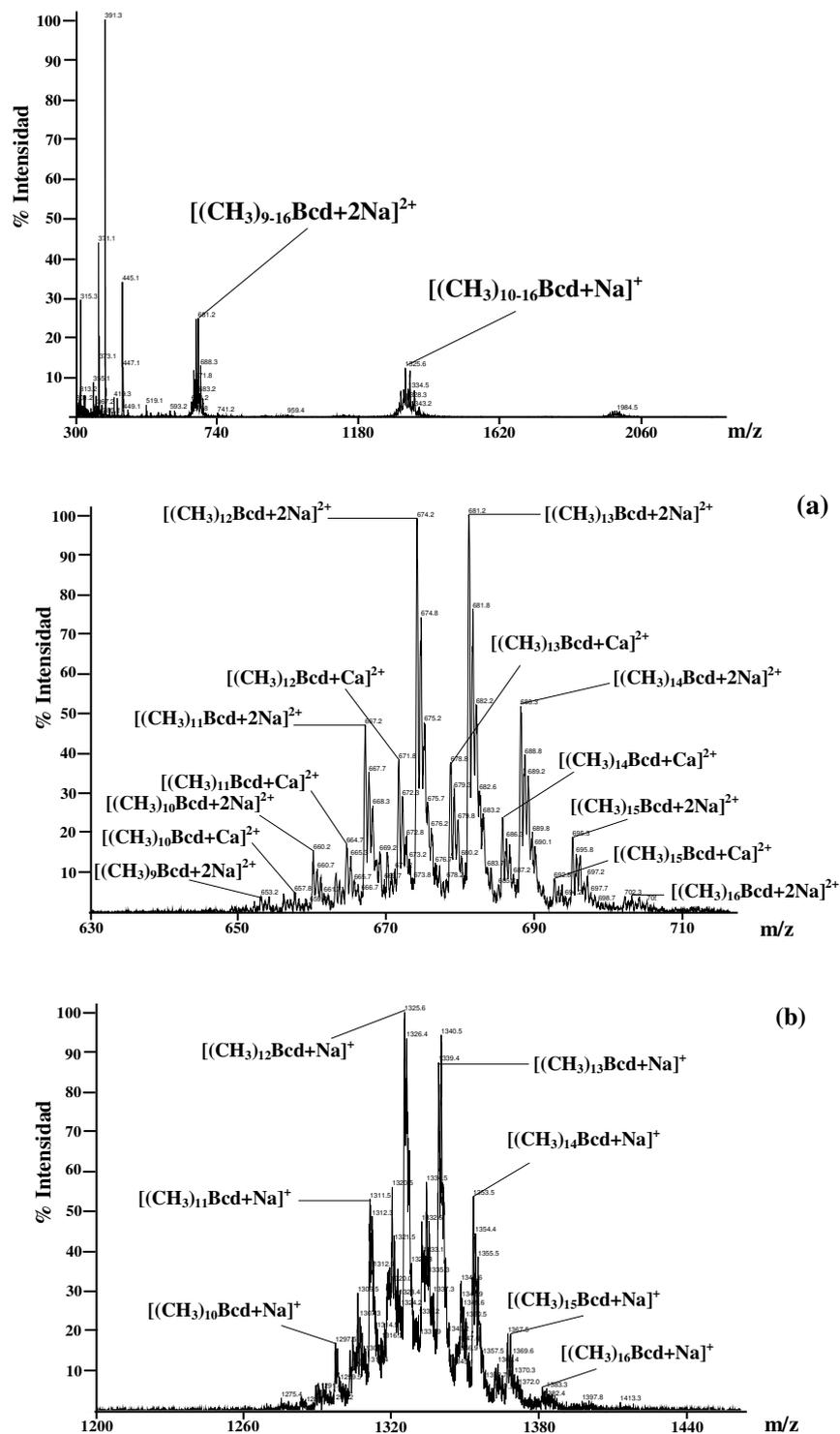
**Figura 3.6.** Espectros de masa ESI de la DMBcd. (a<sub>1</sub>): DMBcd; (a<sub>2</sub>): [DMBcd:EDTA] (1:1mol/mol); (a<sub>3</sub>): [DMBcd:MgCl<sub>2</sub>] (1:1mol/mol); (a<sub>4</sub>): [(DMBcd:MgCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 580-760; (b<sub>1</sub>): DMBcd; (b<sub>2</sub>): [DMBcd:EDTA] (1:1mol/mol); (b<sub>3</sub>): [DMBcd:MgCl<sub>2</sub>] (1:1mol/mol); (b<sub>4</sub>): [(DMBcd:MgCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 1300-1500. Detalle de las señales: [(CH<sub>3</sub>)<sub>14-16</sub>Bcd+2Na]<sup>2+</sup> (●), [(CH<sub>3</sub>)<sub>14-16</sub>Bcd+Ca]<sup>2+</sup> (●), [(CH<sub>3</sub>)<sub>14-15</sub>Bcd+Mg]<sup>2+</sup> (●), [(CH<sub>3</sub>)<sub>14-16</sub>Bcd+Na]<sup>+</sup> (●). Modo positivo.



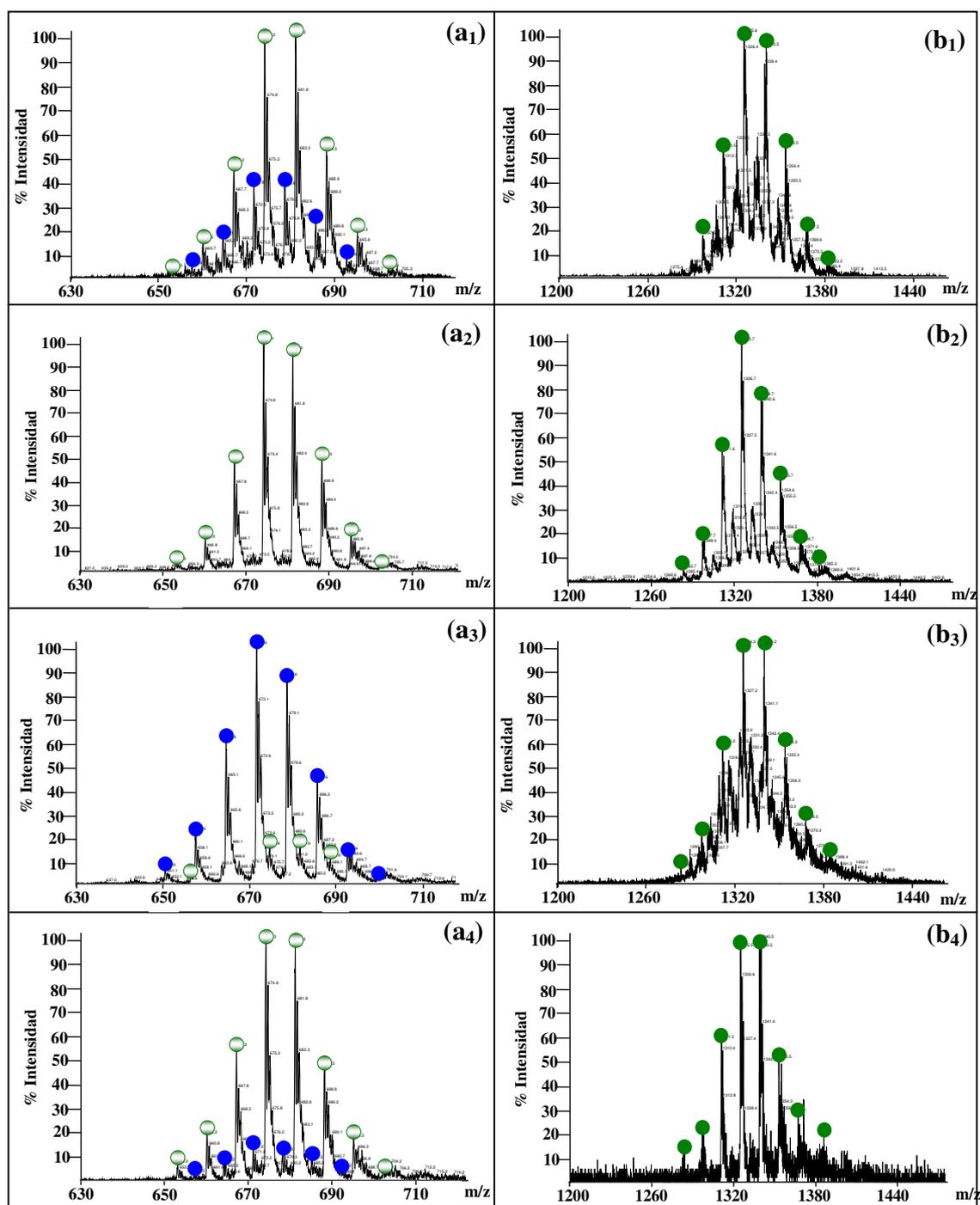
**Figura 3.7.** Espectros de masa ESI de la DMBcd. (a<sub>1</sub>): DMBcd; (a<sub>2</sub>): [DMBcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (a<sub>3</sub>): [DMBcd:( $\text{CaCl}_2+\text{MgCl}_2$ )] (1:1 mol/mol); (a<sub>4</sub>): [(DMBcd:( $\text{CaCl}_2+\text{MgCl}_2$ )) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 600-800; (b<sub>1</sub>): DMBcd; (b<sub>2</sub>): [DMBcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (b<sub>3</sub>): [DMBcd:( $\text{CaCl}_2+\text{MgCl}_2$ )] (1:1 mol/mol); (b<sub>4</sub>): [(DMBcd:( $\text{CaCl}_2+\text{MgCl}_2$ )) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 1100-1430. Detalle de las señales:  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  (●),  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  (●),  $[(\text{CH}_3)_{14-15}\text{Bcd}+\text{Mg}]^{2+}$  (●),  $[(\text{CH}_3)_{14-16}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  (●). Modo positivo.

Al efectuar el análisis por ESI MS de la MBcd se observó un patrón más complejo de señales en la región de valores de  $m/z$  correspondientes a las especies de  $[\text{MBcd}+\text{Na}]^+$  y  $[\text{MBcd}+2\text{Na}]^{2+}$  (figuras 3.8(a)-(b) y 3.9(a<sub>1</sub>)-(b<sub>1</sub>)). Esta ciclodextrina presentó una familia de ocho oligómeros, desde  $[(\text{CH}_3)_9\text{Bcd}]$  a  $[(\text{CH}_3)_{16}\text{Bcd}]$ , los cuales produjeron las señales de las especies  $[(\text{CH}_3)_{9-16}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  ( $m/z$  653, 660, 667, 674, 681, 688, 695 y 702 respectivamente) y las especies  $[(\text{CH}_3)_{9-16}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  1283, 1297, 1311, 1325, 1339, 1353, 1367 y 1381 respectivamente, figuras 3.8(a)-(b) y 3.9(a<sub>1</sub>)-(b<sub>1</sub>)).

Tanto en la zona de las señales dicargadas como en la de las monocargadas, el agregado de EDTA a la solución de la MBcd nativa produjo una clara disminución en el número de señales a lo largo de todo el espectro de masa, lo que indicaría que posiblemente, dichas señales corresponden a las especies  $[\text{MBcd}+\text{Ca}]^{2+}$  y  $[\text{MBcd}+\text{Mg}]^{2+}$ , como se había observado en el análisis de la DMBcd (figuras 3.9(a<sub>1</sub>)). Con el agregado de  $\text{CaCl}_2$  a la solución de MBcd nativa, se observó un incremento de la intensidad de las señales a  $m/z$  650, 657, 664, 671, 678, 685, 692 y 699, las cuales correspondieron a las especies  $[(\text{CH}_3)_{9-16}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  (figuras 3.9(a<sub>3</sub>)-(b<sub>3</sub>)). Por otro lado, y coincidiendo con los resultados obtenidos con DMBcd, la presencia de EDTA en la solución mezcla de MBcd y  $\text{CaCl}_2$  produjo una disminución en la intensidad de las señales de las especies  $[(\text{CH}_3)_n\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$  y un aumento en la intensidad de las especies de  $[(\text{CH}_3)_n\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  (figuras 3.9(a<sub>4</sub>)-(b<sub>4</sub>)). La diferencia principal que se observó en este caso en el análisis por ESI MS respecto del análisis de la Bcd, DMBcd y TMBcd es el alto número de señales que presenta en su espectro de masa, las que van desde  $[(\text{CH}_3)_9\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  1260) a  $[(\text{CH}_3)_{16}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  1358). Este “peine” es propio de la MBcd, y le confiere una característica única en su espectro ESI MS.

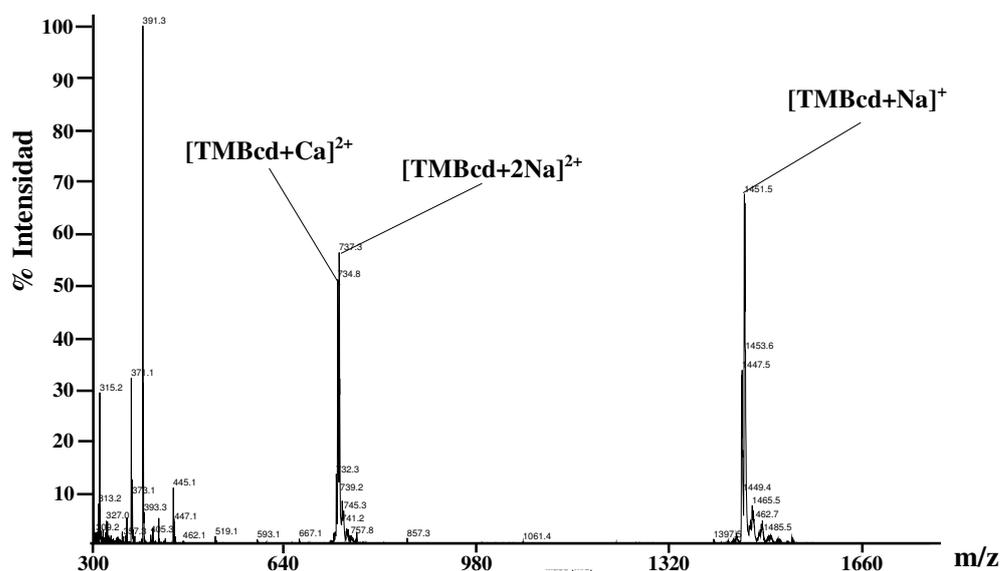


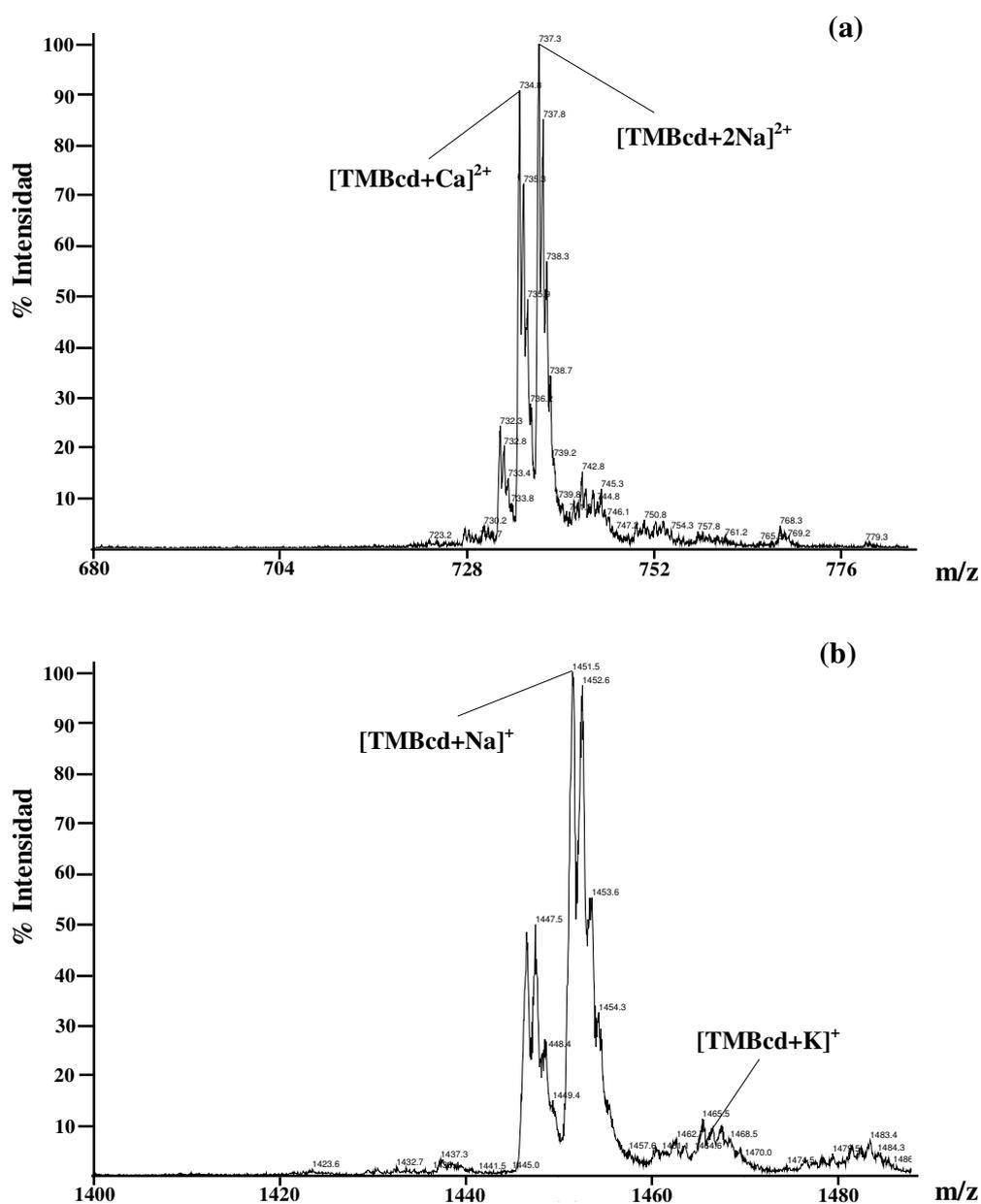
**Figura 3.8.** Espectro de masa ESI de la MBcd. Detalle las señales observadas: (a)  $[(\text{CH}_3)_{9-16}\text{Bcd}+2\text{Na}]^{2+}$  y  $[(\text{CH}_3)_{10-15}\text{Bcd}+\text{Ca}]^{2+}$ , rango de  $m/z$ : 630-730 y (b)  $[(\text{CH}_3)_{10-16}\text{Bcd}+\text{Na}]^+$ , rango de  $m/z$ : 1200-1460. Modo positivo.



**Figura 3.9.** Espectros de masa ESI de la MBcd. (a<sub>1</sub>): MBcd; (a<sub>2</sub>): [MBcd:EDTA] (1:1mol/mol); (a<sub>3</sub>): [MBcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1mol/mol); (a<sub>4</sub>): [(MBcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 630-720; (b<sub>1</sub>): MBcd; (b<sub>2</sub>): [MBcd:EDTA] (1:1mol/mol); (b<sub>3</sub>): [MBcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1mol/mol); (b<sub>4</sub>): [(MBcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 1200-1450. Detalle de las señales: [(CH<sub>3</sub>)<sub>9-16</sub>Bcd+2Na]<sup>2+</sup> (●), [(CH<sub>3</sub>)<sub>9-16</sub>Bcd+Ca]<sup>2+</sup> (●), [(CH<sub>3</sub>)<sub>9-16</sub>Bcd+Na]<sup>+</sup> (●). Modo positivo.

Como ya se había observado en los experimentos realizados por espectrometría de masa UV-MALDI (Capítulo II), el análisis por ESI MS de la TMBcd mostró un espectro más simple, similar al obtenido en el análisis de la Bcd, en el cual se observaron tres señales principales correspondientes a las especies  $[\text{TMBcd}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  1451),  $[\text{TMBcd}+\text{K}]^+$  ( $m/z$  1467) y  $[\text{TMBcd}+2\text{Na}]^{2+}$  ( $m/z$  737, figuras 3.10(a)-(b) y 3.11(a<sub>1</sub>)-(b<sub>1</sub>)), correspondiendo todos ellos al ion molecular debido a que la TMBcd comercial corresponde a la Bcd que presenta todas sus unidades de glucosa trimetiladas. Como se muestra en la figura 3.10, también se observó la especie  $[\text{TMBcd}+\text{Ca}]^{2+}$  en el espectro de la solución madre de TMBcd, la cual disminuyó drásticamente su intensidad por el agregado de EDTA a dicha solución (figuras 3.11(a<sub>2</sub>)-(b<sub>2</sub>)).

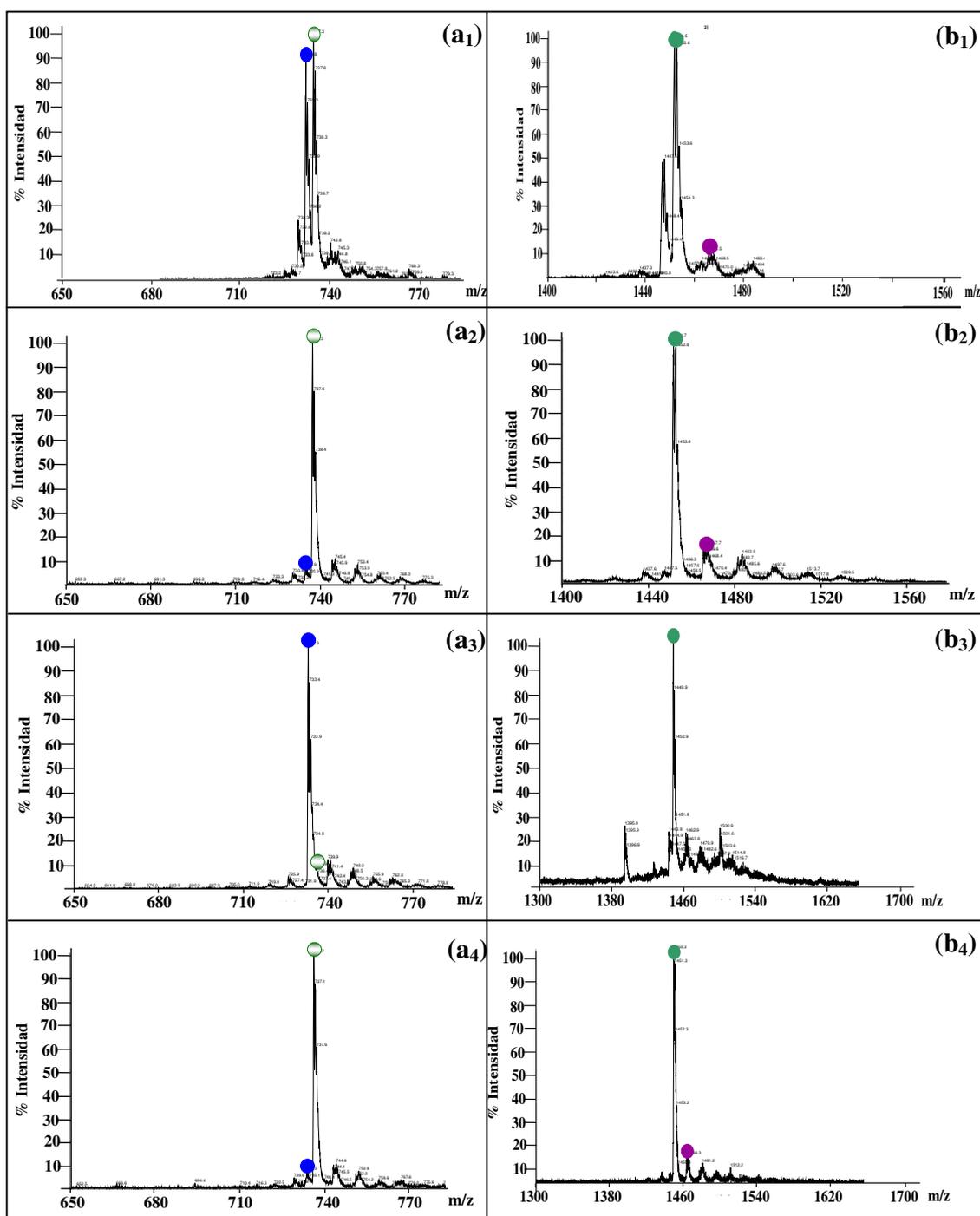




**Figura 3.10.** Espectro de masa ESI de la TMBcd. Detalle las señales observadas: (a)  $[TMBcd+2Na]^{2+}$  y  $[TMBcd+Ca]^{2+}$ , rango de m/z: 680-780; (b)  $[TMBcd+Na]^+$  y  $[TMBcd+K]^+$ , rango de m/z: 1400-1500. Modo positivo.

Tal como se esperaba, la intensidad de la especie [TMBcd+Ca]<sup>2+</sup> fue máxima en el espectro de la solución mezcla TMBcd:CaCl<sub>2</sub> 1:1 mol/mol (figuras 3.11(a<sub>3</sub>)-(b<sub>3</sub>)). La presencia de EDTA en la solución en cantidades crecientes restableció las condiciones iniciales al enmascarar el Ca<sup>2+</sup> en la solución mezcla, reduciendo la intensidad de las señales de la especie [TMBcd+Ca]<sup>2+</sup> y mostrando nuevamente a la especie [TMBcd+2Na]<sup>2+</sup> como la responsable de la señal principal en ese rango de valores de m/z (figuras 3.11(a<sub>4</sub>)-(b<sub>4</sub>)).

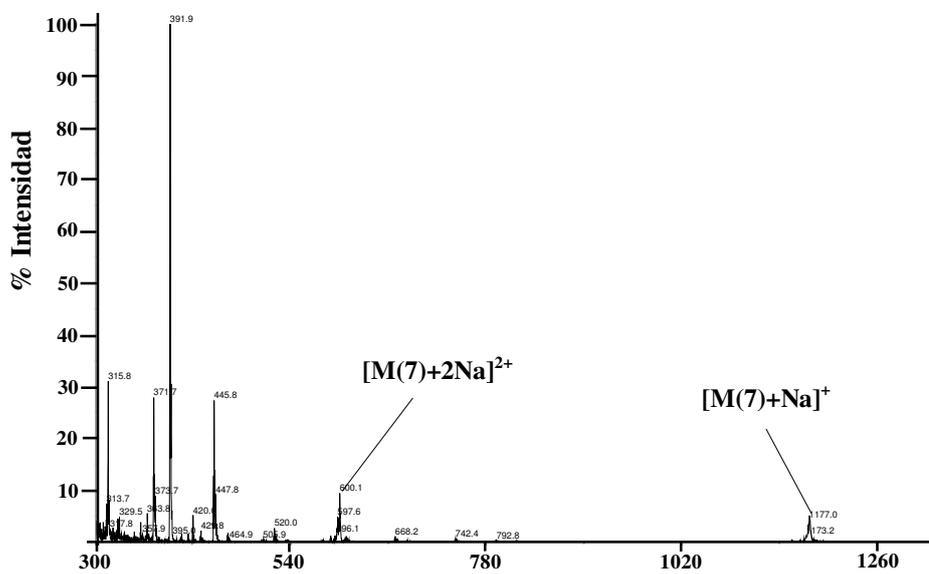
Finalmente, en el análisis de la OHPBcd comercial se observó nuevamente un patrón complejo de señales correspondiente a los diferentes grados de sustitución de la Bcd por los grupos 2-hidroxipropilos. Este derivado de la Bcd mostró en los experimentos realizados resultados similares a los descritos para la Bcd y sus derivados luego del agregado de CaCl<sub>2</sub> y/o EDTA (resultados no mostrados).

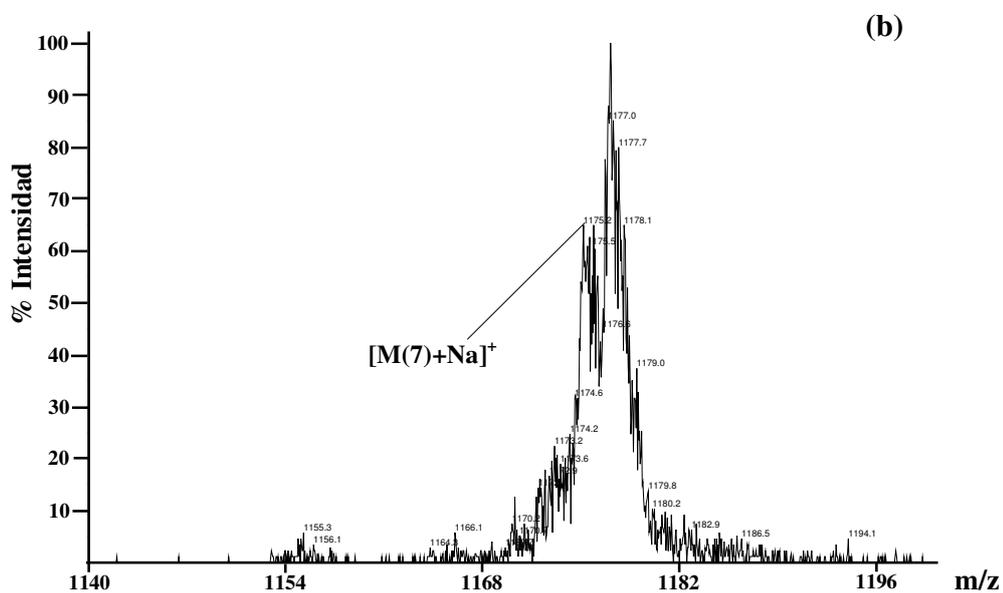
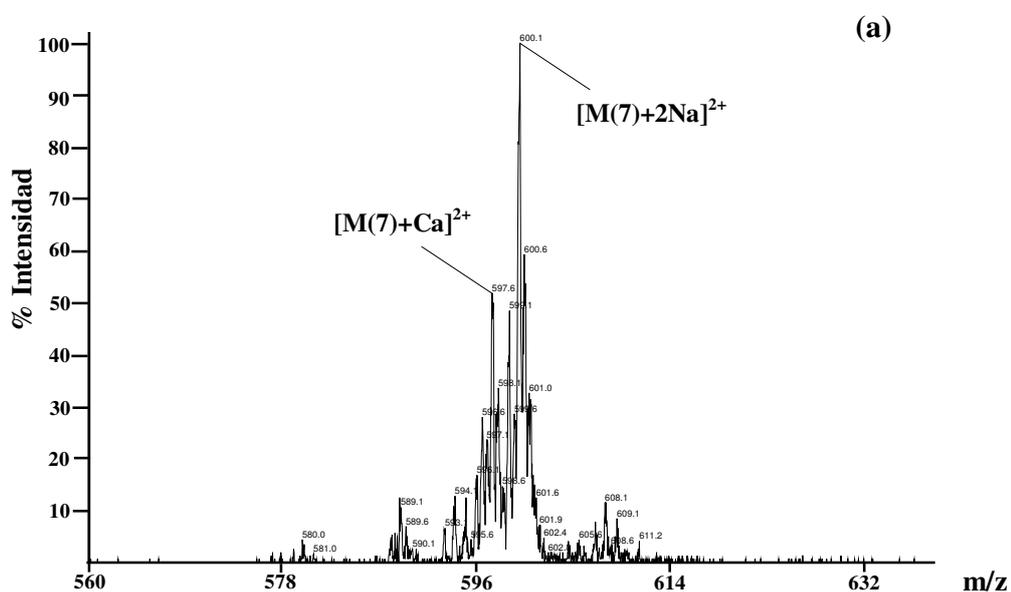


**Figura 3.11.** Espectros de masa ESI de la TMBcd. (a<sub>1</sub>): TMBcd; (a<sub>2</sub>): [TMBcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (a<sub>3</sub>): [TMBcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (a<sub>4</sub>): [(TMBcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 650-780; (b<sub>1</sub>): TMBcd; (b<sub>2</sub>): [TMBcd:EDTA] (1:1 mol/mol); (b<sub>3</sub>): [TMBcd:CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (b<sub>4</sub>): [(TMBcd:CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 1400-1600. Detalle de las señales: [TMBcd+2Na]<sup>2+</sup> (●), [TMBcd+Ca]<sup>2+</sup> (●), [TMBcd+Na]<sup>+</sup> (●), [TMBcd+K]<sup>+</sup> (●). Modo positivo.

### 3.3.3 Análisis por ESI MS de las maltosas lineales y fructanos

La M(7), un análogo lineal de la Bcd, presentó en su espectro de masa ESI tres señales correspondientes a las especies  $[\text{M}(7)+\text{Na}]^+$  (m/z 1175),  $[\text{M}(7)+\text{Ca}]^{2+}$  (m/z 596) y  $[\text{M}(7)+2\text{Na}]^{2+}$  (m/z 599, figuras 3.12(a)-(b) y 3.13(a<sub>1</sub>)-(b<sub>1</sub>)).

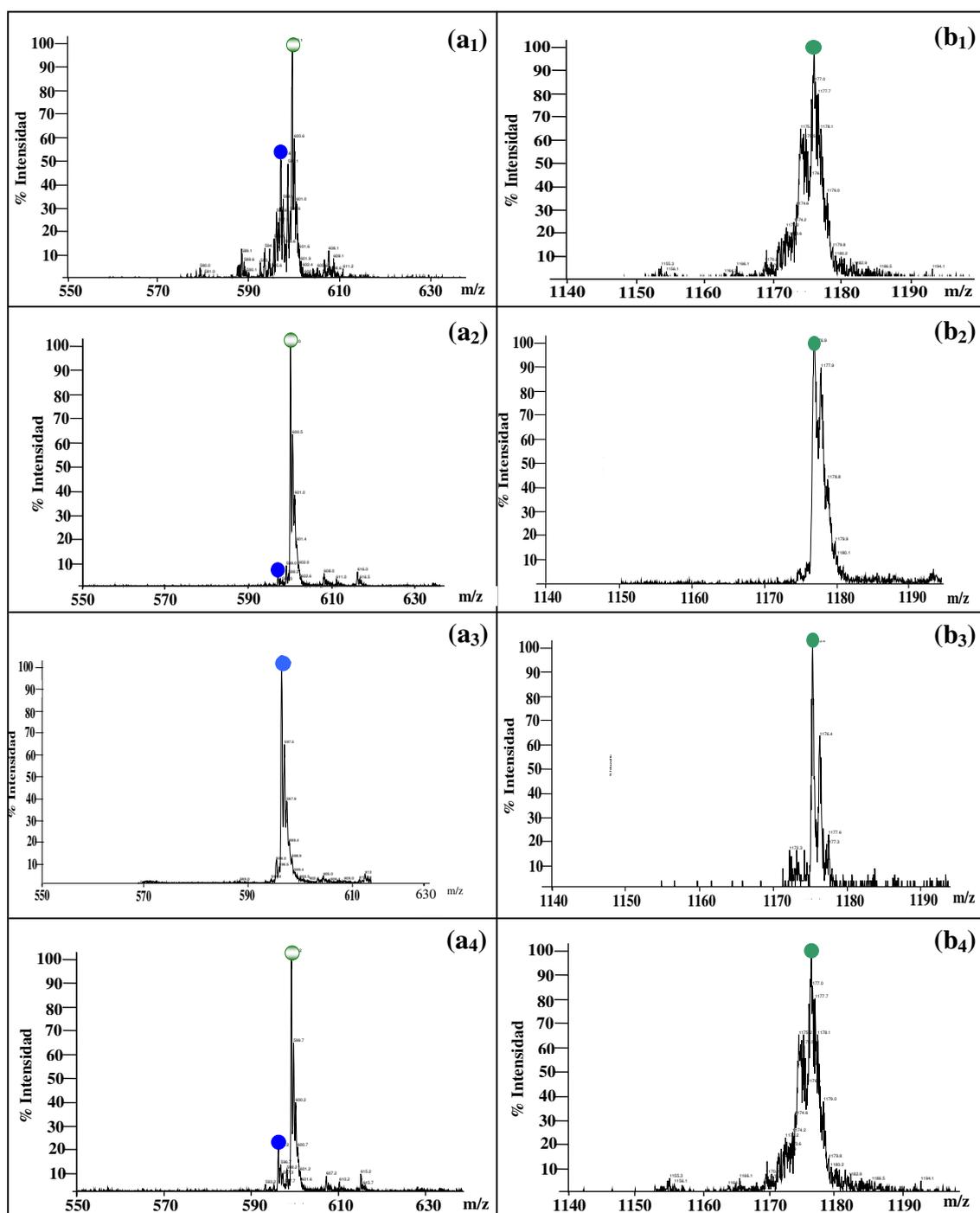




**Figura 3.12.** Espectro de masa ESI de la M(7). Detalle las señales observadas: (a)  $[M(7)+2Na]^{2+}$  y  $[M(7)+Ca]^{2+}$ , rango de  $m/z$ : 560-640 y (b)  $[M(7)+Na]^+$ , rango de  $m/z$ : 1140-1200. Modo positivo.

Al igual que en el caso de las ciclodextrinas, la señal correspondiente a la especie  $[M(7)+2Na]^{2+}$  desapareció con el agregado de CaCl<sub>2</sub>, detectándose la señal de la especie  $[M(7)+Ca]^{2+}$  (m/z 596) como la señal principal (figuras 3.12(a<sub>3</sub>)-(b<sub>3</sub>)). Esta observación está de acuerdo con la alta afinidad ya observada de la M(7) con el Ca<sup>2+</sup>. El agregado de EDTA en cantidades crecientes a la solución mezcla de M(7):CaCl<sub>2</sub> permitió restablecer la señal de la especie  $[M(7)+Na]^+$  (figura 3.12(b<sub>4</sub>)), disminuyendo la señal de la especie  $[M(7)+Ca]^{2+}$  (m/z 596) que, a diferencia de resultados anteriores, no desapareció totalmente (figura 3.12(a<sub>4</sub>)). El agregado de EDTA en la solución de M(7) nativa disminuyó la señal de  $[M(7)+Ca]^{2+}$ , al igual que lo observado en el análisis de los hidratos de carbono cíclicos (Bcd y sus derivados).

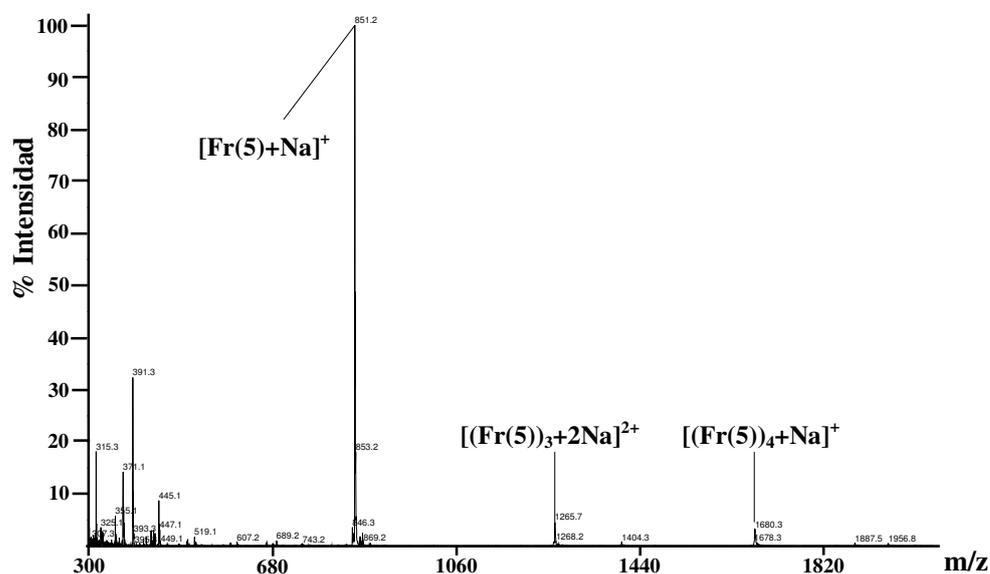
Cabe señalar que en todos los estudios hasta aquí descriptos ( $\beta$ -ciclodextrinas y M(7)), la señal correspondiente a la especie dicargada  $[A+2Na]^{2+}$ , siendo A cualquiera de los hidratos de carbono analizados, fue la de mayor intensidad relativa en el espectro de masa ESI de las soluciones acuosas de los azúcares comerciales. Esto no se aplica a todas las maltosas, ya que, por ejemplo, en los resultados obtenidos con M(5) las señales correspondientes a la especie dicargada  $[M(5)+2Na]^{2+}$  presentó una intensidad relativa menor a la de la señal monosódica, mientras que en los espectros de M(3), M(4) y M(6) no se observó la señal de la especie disódica.



**Figura 3.13.** Espectros de masa ESI de la M(7). (a<sub>1</sub>): M(7); (a<sub>2</sub>): [M(7):EDTA] (1:1 mol/mol); (a<sub>3</sub>): [M(7):CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (a<sub>4</sub>): [(M(7):CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 550-630; (b<sub>1</sub>): M(7); (b<sub>2</sub>): [M(7):EDTA] (1:1 mol/mol); (b<sub>3</sub>): [M(7):CaCl<sub>2</sub>] (1:1 mol/mol); (b<sub>4</sub>): [(M(7):CaCl<sub>2</sub>) (1:1 mol/mol)]+EDTA (1:10 mol/mol), rango de m/z: 1140-1200. Detalle de las señales: [M(7)+2Na]<sup>2+</sup> (●), [M(7)+Ca]<sup>2+</sup> (●), [M(7)+Na]<sup>+</sup> (●). Modo positivo.

La diferencia más importante que presentan los espectros de masa ESI de los fructanos (Fr) estudiados respecto de los correspondientes a sus análogos de la familia de las maltosas, es la presencia de nuevas especies iónicas gaseosas formadas por moléculas de fructanos que se complejan (adhieren) entre si formando clusters (figura 3.14). Dichas especies fueron observadas en los análisis de los tres fructanos, y solamente desaparecieron con el agregado de CaCl<sub>2</sub> y posterior adición de EDTA en relación molar CaCl<sub>2</sub>:EDTA 1:10 a la solución. Estas observaciones evidencian una alta estabilidad de estos complejos o clusters formados durante la ionización de los fructanos, en contraste con las maltosas análogas que no presentaron dicho tipo de señales. Por otro lado, ni las maltosas M(3), M(4) y M(6) ni los fructanos presentaron las señales correspondientes a la especie [A+2Na]<sup>2+</sup> en sus espectros ESI, a diferencia de lo observado para M(5) y M(7) y la familia de las ciclodextrinas estudiadas.

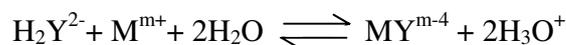
Finalmente, es interesante destacar que, si bien las señales correspondientes a las especies [A-H+Ca]<sup>+</sup> y [A-H+Mg]<sup>+</sup> ubicadas en la región de m/z de las especies [A+Na]<sup>+</sup> y [A+K]<sup>+</sup> no fueron en general detectadas en los espectros de masa ESI de maltosas lineales, fructanos y la Bcd, sí se observaron como señales satélites en el análisis de las Bcd sustituidas DMBcd, MBcd, TMBcd y OHPBcd. Como ejemplo, en la región de valores de m/z entre 1250 y 1500 en el espectro de la MBcd se observó un conjunto complejo de señales que fue eliminado con el agregado de EDTA e intensificada su intensidad con el agregado de CaCl<sub>2</sub> (figura 3.9(b<sub>1</sub>)-(b<sub>4</sub>)).



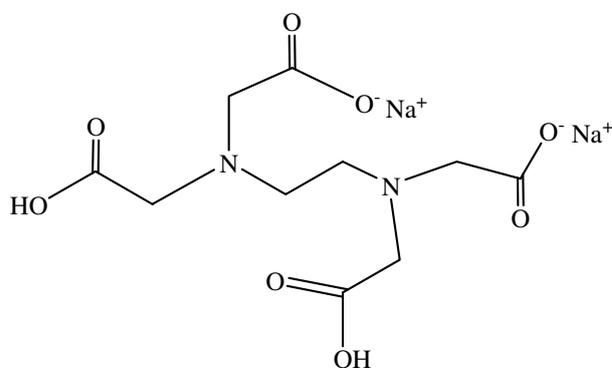
**Figura 3.14.** Espectro de masa ESI de Fr(5). Rango de m/z: 300-1900. Modo positivo.

### 3.3.4 EDTA como agente quelante

El EDTA es un agente quelante muy utilizado para los procesos de complejación y titulación de metales alcalinos y alcalino térreos como el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Es un ácido tetraprótico que contiene cuatro  $\text{H}^+$  intercambiables, por lo que presenta cuatro valores de pKa diferentes:  $\text{pKa}_1 = 2,18$ ,  $\text{pKa}_2 = 2,73$ ,  $\text{pKa}_3 = 6,20$  y  $\text{pKa}_4 = 10$ . La sal disódica del EDTA (esquema 3.1) presenta un pH en agua de 5,06, similar al valor del  $\text{pKa}_3$  debido a que sólo contiene dos  $\text{H}^+$  intercambiables [14]. Su forma básica presenta la forma  $\text{Na}_2\text{H}_4\text{Y}$ , y la forma aniónica con la cual se produce el complejo con los metales es  $\text{Y}^{4-}$ . Esta última, al unirse con los metales  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  presentes en el medio, produce la liberación de los protones cuando ocurre la formación del complejo. La extensión de la formación del complejo puede estar regulada ajustando el pH. La reacción entre el quelante  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  y el metal  $\text{M}^{m+}$  se representa como el siguiente equilibrio:



Para la mayoría de los metales, los complejos metal: EDTA 1:1 se forman en un amplio rango de condiciones [14].

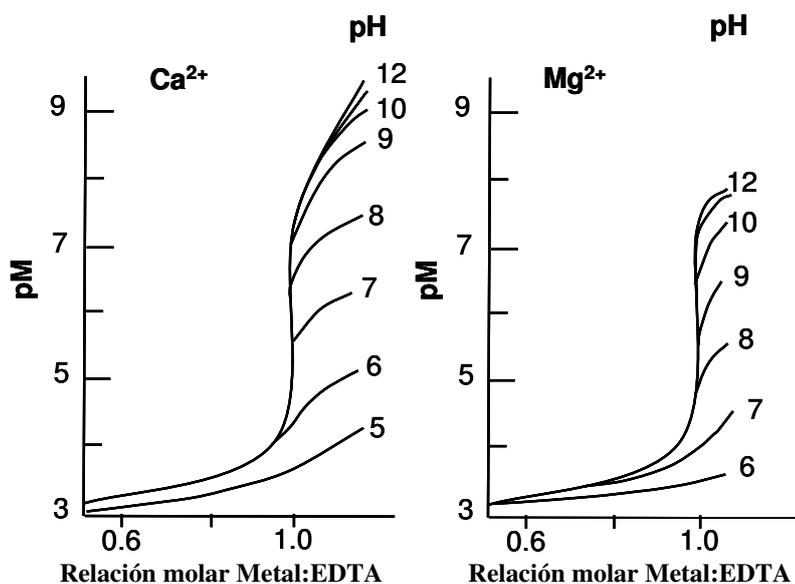


**Esquema 3.1.** Estructura de la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

Si la solución de un ion metálico  $\text{M}^{m+}$  es titulada con un quelante estándar del tipo  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ , la concentración del ion decrece a medida que procede la titulación, y se incrementa el valor de  $\text{pM}$  (en este caso,  $\text{pCa}$  y  $\text{pMg}$ ), definido como el  $-\log[\text{M}]$ . Si la estabilidad del complejo  $\text{MY}^{m-4}$  es lo suficientemente alta, y la acidez es lo suficientemente baja para permitir la formación cuantitativa del complejo al punto de equivalencia, entonces el  $\text{pM}$  aumentará bruscamente en el punto de equivalencia. Un gráfico de  $\text{pM}$  vs la relación molar de  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ :metal tiene una forma curvada tipo S. Como se muestra en la figura 3.15, los metales alcalinos térreos tales como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  deben titularse a un pH alcalino,

mientras que, por ejemplo, el Fe (III) forma complejos lo suficientemente fuertes como para poder ser titulado en medios de alta acidez. Los puntos de titulación del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  se encuentran cerca del pH 6 y 8 respectivamente [14].

En los experimentos descritos en el presente capítulo, los resultados obtenidos en la medición de pH mostraron que las soluciones acuosas de los hidratos de carbono estudiados presentaron un pH entre 6,2 y 6,8, mientras que el de las soluciones mezcla con  $\text{CaCl}_2$  se encontraba entre 6,3 y 6,5 y el de las soluciones mezcla con  $\text{MgCl}_2$  entre 4,5 y 5,5 independientemente de las relaciones molares azúcar: $\text{CaCl}_2$  (azúcar: $\text{MgCl}_2$ ) analizadas. Los valores de pH de las soluciones con  $\text{Ca}^{2+}$  se encontraron dentro del rango de valores aptos para la complejación o titulación del mismo (figura 3.15) [14], lo que explica la eficiencia del EDTA para complejar al  $\text{Ca}^{2+}$  en las soluciones mezcla. En el caso del  $\text{Mg}^{2+}$ , debido a que el pH de las soluciones se encontraba por debajo de su punto o valor de titulación óptimo (figura 3.15), presentó mayor dificultad que el  $\text{Ca}^{2+}$  para la formación de los complejos, requiriéndose mayor concentración de EDTA para que resultara eficaz. Sin embargo, cabe señalar que en ambos casos no fue necesario el agregado de bases tales como el amoníaco o la etanolamina al medio para modificar el pH de la solución, lo cual minimizó la cantidad de material químico presente en las muestras, pudiendo esto afectar los resultados del análisis de hidratos de carbono neutros por ESI MS.



**Figura 3.15.** Curvas de titulación del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con EDTA.  $\text{pM}$  está definido como  $-\log[\text{M}]$ , siendo  $\text{M} = \text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ .

### 3.4 CONCLUSIONES

En el análisis de hidratos de carbono por espectrometría de masa ESI las especies  $[\text{A}+2\text{Na}]^{2+}$  fueron detectadas con igual o mayor intensidad que las especies  $[\text{A}+\text{Na}]^+$  en el caso de la Bcd y la M(7) (figuras 3.2-3.3 y 3.12-3.13), y se obtuvieron resultados similares con las  $\beta$ -ciclodextrinas sustituidas. Por otra parte, en los espectros de estas últimas, las señales satélites producidas por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  como contaminantes de los analitos comerciales agrega señales adicionales en la región de valores de  $m/z$  de las especies  $[\text{A}+2\text{Na}]^{2+}$ . Esto produce un patrón más complejo de señales, de manera que la detección de las señales disódicas resulta más difícil, especialmente en el análisis de mezclas de especies químicas que presentarán más de una señal del tipo  $[\text{A}+2\text{Na}]^{2+}$  como en el caso de la DMBcd, MBcd y OHPBcd. A esto también se le suma la presencia de señales satélites del tipo  $[\text{A}-\text{H}+\text{Ca}]^+$  y  $[\text{A}-\text{H}+\text{Mg}]^+$  en la región de  $m/z$  correspondientes a

las especies  $[A+Na]^+$  y  $[A+K]^+$ . Por ejemplo, los estudios realizados con las Bcd sustituidas mostraron una mayor sensibilidad ante la presencia del  $Ca^{2+}$  respecto de las maltosas lineales (M(3)-M(6)). Además, a relación molar Bcd:CaCl<sub>2</sub> 100:1 se observó a la especie  $[A+Ca]^{2+}$  como ion estable, junto con las especies  $[A+Na]^+$  y  $[A+2Na]^{2+}$  (figura 3.1(b)). Comparando los fructanos y las maltosas del mismo peso molecular (M(5) con Fr(5), M(4) con Fr(4) y M(3) con Fr(3)), se observó que estas últimas produjeron iones de la especie  $[A+Ca]^{2+}$  más estables. En el caso de los fructanos, si bien la presencia del  $Ca^{2+}$  produjo una disminución en la intensidad de la señal de  $[A+Na]^+$ , la detección de la especie  $[A+Ca]^{2+}$  sólo se observó con relaciones molares Fr:CaCl<sub>2</sub> menores a 1:1.

Este estudio permite concluir nuevamente que el comportamiento de los hidratos de carbono en presencia del  $Ca^{2+}$  ( $Mg^{2+}$ ) no es uniforme y depende del peso molecular, de la longitud de la cadena y la estructura del compuesto. El hecho de que la interacción de cada analito con el  $Ca^{2+}$  sea particular y no común a todos los hidratos de carbono, puede generar errores para la caracterización y cuantificación en el análisis del compuesto en cuestión.

La adición de EDTA a la solución de los hidratos de carbono inhibe el efecto complejante del  $Ca^{2+}$  ( $Mg^{2+}$ ) en el proceso de ionización ESI de los hidratos de carbono debido a sus propiedades quelantes, al mismo tiempo que no afecta las señales propias de los analitos ( $[A+Na]^+$  y  $[A+2Na]^{2+}$ ), las cuales son restituidas una vez que éste es agregado a la solución que contiene la mezcla de A:CaCl<sub>2</sub> (A:MgCl<sub>2</sub>).

Es importante señalar que mediante este estudio nosotros hemos desarrollado un método sencillo en el cual se usa simplemente soluciones acuosas de los hidratos de carbono y de la sal disódica del EDTA, sin modificación de su pH por el agregado de bases tales como amoníaco, trietanolamina o etanolamina a las mismas. Con esto se minimiza el

uso de reactivos químicos y se simplifica el protocolo ya que no se requieren durante el uso del EDTA cuidados especiales para evitar la descomposición de los analitos. Si bien como se muestra en la figura 3.15 en el rango de pH 6-12, la complejación del Ca<sup>2+</sup> y el Mg<sup>2+</sup> se ven favorecidas [14], los resultados que hemos obtenidos simplemente en agua muestran que no es necesario una modificación del pH.

La presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> debe ser tomada en cuenta en los estudios cualitativos y cuantitativos por espectrometría de masa ESI de hidratos de carbono tanto comerciales como los que provienen de tejidos biológicos vegetales y/o animales. En todos estos casos, el EDTA es una herramienta importante a ser tomada en cuenta al momento de realizar análisis por espectrometría de masa ESI de hidratos de carbono neutros.

En conexión con los resultados discutidos en el capítulo anterior (Capítulo II), los experimentos detallados en el presente capítulo muestran que las especies gaseosas [A+Ca]<sup>2+</sup> y [A+Mg]<sup>2+</sup> (siendo A cualquiera de los hidratos de carbono estudiados) pueden formarse como entidades estables con tiempos de vida mayores que los tiempos requeridos para su manipuleo (enfoco, aceleración, almacenamiento temporal, etc.) dentro de la cámara de ionización ESI y el analizador TOF utilizado. Por lo tanto puede asegurarse que en el caso de los experimentos realizados por espectrometría de masa UV-MALDI con los mismos analitos, la ausencia de estas especies en la región de análisis y detección se debe simplemente a que las mismas no son generadas en la cámara de ionización.

### **3.5 REFERENCIAS**

[1] Yu, Z., Chen, L. C., Suzuki, H., Ariyada, O., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. Direct analysis of plant tissues by probe electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2009), 20, 2304-2311.

- [2] Chen, L. C., Nishidate, K., Saito, Y., Mori, K., Asakawa, D., Takeda, S., Kubota, T., Terada, N., Hashimoto, Y., Hori, H., Hiraoka, K. Application of probe electrospray to direct ambient analysis of biological samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2008), 22, 2366–2374.
- [3] Gholipour, Y., Nonami, Y., Erra-Balsells, R. Application of pressure probe and UV-MALDI TOF MS for direct analysis of plant underivatized carbohydrates in sub-picoliter single-cell cytoplasm extract. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2008), 19, 1841-1848.
- [4] Stahl, B., Linos, A., Karas, M., Hillenkamp, F., Steup, M. Analysis of fructans from higher plants by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, (1997), 246, 195–204.
- [5] Burrell, M., Earnshaw, C. J., Clench, M. R. Imaging matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high spatial resolution. *J. Exp. Bot.* (2007), 58, 757–763.
- [6] Robinson, R., Warburton, K., Seymour, M., Clench, M., Thomas, J. Localization of water- soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytol.*, (2007), 173, 438 –444.
- [7] Gholipour, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R. In situ analysis of plant tissue underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix. *Anal. Biochem.*, (2008), 383, 159-167.
- [8] Harvey, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.*, (1999), 18, 349-451.

- [9] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 1999–2000. *Mass Spectrom. Rev.*, (2006), 25, 595– 662.
- [10] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update covering the period 2001–2002. *Mass Spectrom. Rev.*, (2008), 27, 125–201.
- [11] Zaia, J. Mass Spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom. Rev.*, (2004), 23, 161–227.
- [12] Shimizu, S. *Plant Physiology* (Revised edition), Shokabo Ltd. Co., Tokyo, Japan, (1993).
- [13] Fukuyama, Y., Kolender, A. A., Nishioka, M., Matulewicz, M. C., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Cerezo, A. S. Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization and electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry of  $\beta$ -(1→3),  $\beta$ -(1→4)-xylans from *Nothogenia fastigiata*. Usage of nor-harmane as UV-MALDI matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2005), 19, 349–358.
- [14] Blaedel, J., Meloche, V.W. *Elementary quantitative analysis, theory and practice*, 2<sup>nd</sup> edition, Harper & Row, New York, USA, (1964).
- [15] Fura, A., Leary, J. A. Differentiation of Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-. Coordinated branched trisaccharide isomers: An electrospray ionization and tandem mass spectrometry study. *Anal. Chem.* (1993), 65, 2805–2811.
- [16] Sible, E. M., Brimmer, S. P., Leary, J. A. Interaction of first row transition metals with  $\alpha$  1-3,  $\alpha$  1-6 Mannotriose and conserved trimannosyl core oligosaccharides: a

comparative electrospray ionization study of doubly and single charged complex. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (1997), 8, 32-42.

[17] Harvey, D. J. Ionization and collision-induced fragmentation of N-linked and related carbohydrates using divalent cations, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2001), 12, 926-937.



El capítulo IV fue retirado a pedido del autor

At author's request chapter IV has been withdrawn

## ***CAPÍTULO V***

***Efecto del uso de NPs como matrices en el análisis por UV-MALDI MS de hidratos de carbono neutros. Análisis in situ de tejidos vegetales***

---



## 5.1 INTRODUCCIÓN

La caracterización *in situ* de biomoléculas mediante el uso de la espectrometría de masa UV-MALDI MS es potencialmente importante, ya que permite el análisis de las mismas utilizando matrices adecuadas capaces de producir su desorción/ionización (DI) directa desde la superficie del material biológico (tejido, célula). En el estudio de los hidratos de carbono neutros que constituyen la mayoría de los metabolitos vegetales, la baja DI tanto en modo positivo como negativo es un problema común en su análisis por UV-MALDI MS (Capítulos II y IV). Como se ha descrito previamente [1-4], las matrices orgánicas cristalinas (matrices clásicas) como el GA [5-7], el CHCA, el *nor*-harmano (nHo) [5-8] y la THAP [4-7], que son eficientes en el estudio *in vitro* de diversos analitos, presentan serias dificultades para ionizar los hidratos de carbono cuando son depositadas directamente sobre el tejido vegetal [3,4]. El problema puede deberse a que, al ser depositadas sobre el tejido y previo al disparo del láser, éstas se incorporan al mismo generando interacciones y uniones químicas con los metabolitos y componentes estructurales que lo conforman. Este hecho disminuye y/o suprime las señales tanto de las matrices como de los componentes del tejido [4]. La presencia de grupos funcionales tales como grupos carboxílicos y/o fenólicos en el GA, el CHCA y la THAP produce fuertes interacciones químicas entre el tejido y la matriz, lo cual no debe ocurrir con las matrices UV-MALDI en el estado electrónico basal (previo al disparo del láser), al ser depositadas sobre el tejido.

Las nanopartículas (NPs) son materiales que pueden presentar en su estructura componentes metálicos (ejemplo, Au, Ti, Sr, Ba, Fe), óxidos inorgánicos (ejemplo, TiO<sub>2</sub>) y no metálicos (ejemplo grafito, carbón, diamante, C<sub>60</sub>, grafeno) con propiedades mecánicas, eléctricas y electromecánicas únicas. Son materiales microscópicos o nanoscópicos con por

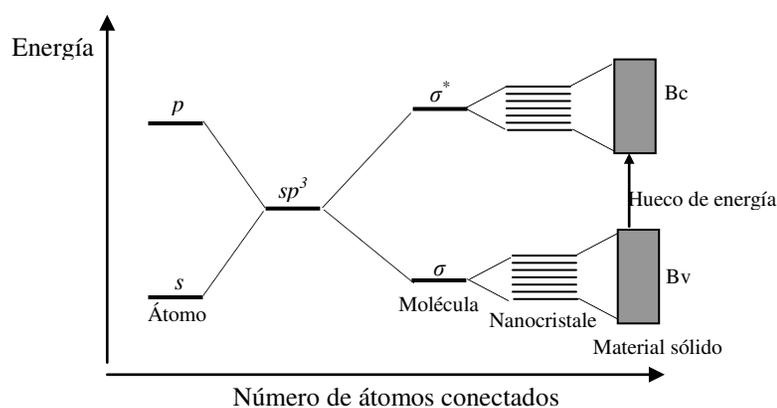
lo menos una de sus dimensiones menor que 100 nm. Estas unidades estructurales, más grandes que los átomos y las moléculas, no obedecen estrictamente a la química cuántica, ni a las leyes de la física clásica, poseyendo características propias. Los materiales a escala nanométrica frecuentemente presentan un comportamiento intermedio entre el de los sólidos macroscópicos y los sistemas atómico-moleculares [9].

En un átomo, los electrones orbitan alrededor de un solo núcleo, y el número de electrones depende del elemento del que se trate. A medida que se suman más electrones, la predicción de los niveles de energía se vuelve más compleja debido a la interacción entre el núcleo y los electrones, y entre los electrones en sí mismos. Cada electrón puede ser ubicado en una órbita individual definida como orbital atómico (OA), con un nivel (valor) de energía discreto asociado. Dependiendo del momento angular de la órbita, los OAs pueden tener forma esférica (orbital *s*), doble campana u “ocho” (orbital *p*) o adoptar formas más complejas (orbitales *d* y *f*) [9].

En el caso de una molécula, los electrones orbitan alrededor de más de un núcleo, y los electrones responsables de las uniones covalentes entre los átomos no pueden ser considerados en forma individual debido a que se encuentran “compartidos”. Estos electrones conforman los orbitales moleculares (OMs), y estos orbitales, al igual que los OAs, presentan niveles de energía discretos asociados [9].

Cuando el tamaño de un sistema con más de un átomo se hace mayor, el cálculo de su estructura electrónica en términos de combinación de OAs es más complicado. Sin embargo, es posible simplificar el cálculo cuando el sistema es un cristal. En estos casos, la estructura electrónica puede ser descrita en términos de combinaciones periódicas de OAs. Los electrones son descritos como una superposición o un conjunto de planos de ondas extendidos a lo largo del sólido. A diferencia de los átomos y las moléculas, un sólido

macroscópico o microscópico no presenta niveles discretos de energía, sino regiones o bandas anchas de energía (figura 5.1, banda de valencia (Bv) y banda de conducción (Bc)) [9]. Dichas bandas o regiones sólo pueden ser llenadas con una cantidad de electrones de energía limitada dentro de ciertos rangos. En el caso de un nanocrystal, el cual por sus propiedades físicas no puede ser descrito con los mismos términos que un sólido macroscópico, su estructura electrónica puede ser explicada como un intermedio entre los niveles discretos de los OMs y las bandas de un sólido (Bv y Bc). Como se muestra en la figura 5.1, los niveles energéticos de los nanocristales son discretos con contenido energético o densidad mayor y amplitud menor que los correspondientes atómicos y moleculares. A estos últimos niveles discretos de energía, es posible aplicarles en este caso el concepto de bandas de energía (Bv y Bc) y electrón-hueco (hueco u orbital sin electrón). Los electrones de los niveles atómicos más altos interactúan entre ellos y forman la Bv del nanocrystal, mientras que el hueco de energía (diferencia de energía) entre la Bv y la Bc forma el hueco de banda del nanocrystal [9].



**Figura 5.1.** Niveles electrónicos de energía de átomos, moléculas, nanocristales y material sólido macroscópico conductor. Al agregar más átomos, los niveles discretos de energía de los OAs se asocian en bandas de energía (Bv y Bc). Los nanocristales semiconductores pueden ser considerados como híbridos estructurales entre pequeñas moléculas y materiales sólidos [9].

De esta manera se puede utilizar el concepto de dualidad onda - partícula para explicar el comportamiento fotofísico de nanocristales (nanomateriales) semiconductores frente a la radiación UV-visible. En un semiconductor inorgánico en el estado electrónico excitado, el electrón en la Bc puede moverse libremente a lo largo del cristal, y su movimiento puede ser descrito satisfactoriamente por una combinación lineal de funciones de onda cuya longitud se encuentran generalmente en el orden de los nanómetros, o sea en la región UV-visible del espectro electromagnético [9]. Una descripción orbital análoga se utiliza para describir el arreglo electrónico de las nanopartículas cristalinas de carbono en sus formas alotrópicas diamante, grafito, grafeno y nanotubos.

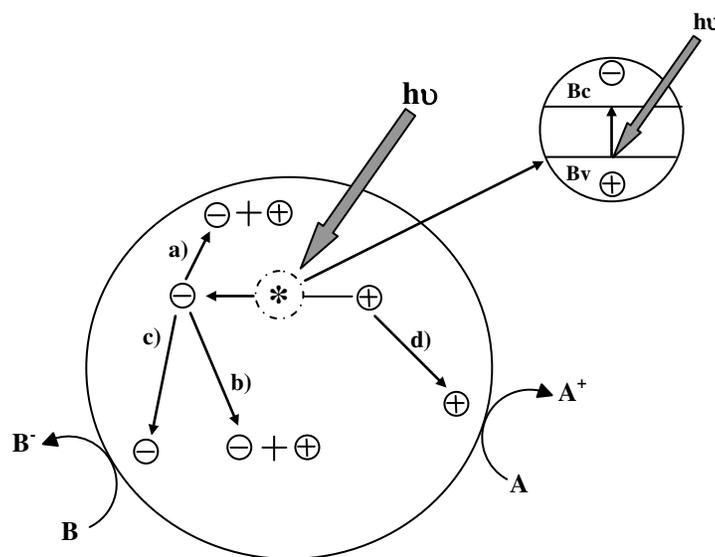
Estas propiedades ópticas, debidas a la interacción con la luz UV- visible, son dependientes del tamaño de la NP [10,11]. Esta capacidad de interactuar con fuentes de radiación UV-visible le otorga a las NPs propiedades de fotocatalizadores o fotosensibilizadores, como las que presentan los materiales semiconductores (ejemplo  $\text{TiO}_2$ ) [9-11].

El proceso de fotocatalisis de los semiconductores se basa en los siguientes principios [11]:

- 1- formación de un portador de carga por un fotón
- 2- recombinación de los portadores de carga para liberar calor
- 3- inicio de un proceso de oxidación por formación de un hueco en la Bv
- 4- inicio de un proceso de reducción producido por un electrón de la Bc
- 5- reacciones térmicas (hidrólisis o reacción con especies oxidativas activas) y fotocatalíticas posteriores que forman productos de mineralización
- 6- captura de un electrón proveniente de la Bc que formará una unión superficial para obtener la forma reducida (por ejemplo, Ti (III) en el caso del  $\text{TiO}_2$ )

## 7- captura de un electrón proveniente de la Bv por un grupo HO-

En la figura 5.2 se muestran los procesos químicos que ocurren en una partícula de semiconductor, cuando ésta es electrónicamente excitada con radiación de energía adecuada. En estas condiciones, se crean pares de electrón - hueco cuya vida media está en el rango de los nanosegundos; en ese lapso, los electrones y huecos generados deben migrar a la superficie y reaccionar con especies adsorbidas (procesos c) y d)). Los pares electrón-hueco que no alcanzan a separarse y a reaccionar con especies en la superficie se recombinan, y la energía se disipa (liberación de calor). Esta recombinación puede tener lugar tanto en la superficie como en el seno de la partícula (procesos a) y b) respectivamente). El proceso neto es la catálisis de la reacción entre el oxidante B y el reductor A [11].



**Figura 5.2.** Procesos que ocurren en la interfaz semiconductor - electrolito bajo iluminación [11].

Este tipo de interacción con fuentes de energía como la radiación UV-visible (particularmente con la región de longitud de onda de entre 337 y 355 nm) [10], convierte a las NPs (que pueden funcionar o no como semiconductores eléctricos) en potenciales matrices para UV-MALDI MS y en nuevas alternativas para el estudio directo de tejidos biológicos.

El uso de NPs como matrices para la DI en UV-MALDI MS fue considerado en los comienzos del desarrollo de nuevas técnicas suaves de ionización para espectrometría de masa. Tanaka *et al* [12] utilizaron un “polvo fino” (partículas de 20 nm) de cobalto metálico para el análisis de proteínas y polímeros. Desde entonces, y especialmente en estas últimas décadas, las NPs relacionadas con el carbono fueron probadas como posibles matrices para el análisis por UV-MALDI MS y *surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry* (SALDI MS) de analitos orgánicos y biomoléculas. Ejemplo de estas NPs son el grafito [13] y los nanotubos de carbono (CNT) [14, 15]. También se han usado NPs metálicas como óxido de titanio [16, 17], plata [18-21], silicio [22], oro [19,23-24] y óxido de zinc [25]. Además, se han utilizado NPs de diamante para incrementar la uniformidad de los cristales de matrices orgánicas clásicas, como en el caso del CHCA [26]. También se ha estudiado la aplicación de los CNT en el análisis directo de hidratos de carbono en tejido vegetal [3,4], el uso de grafito coloidal para el análisis *in situ* de metabolitos pequeños provenientes de tejido de frutas [27] y el uso de NPs de óxido de titanio para el análisis directo de triacilgliceroles, flavonoides y antocianinas en tejidos vegetales [17].

Con el objetivo de profundizar el estudio de las diferentes NPs y sus aplicaciones en el análisis *in situ* de tejidos vegetales, se examinó la capacidad de ionización de las NPs de diamante (D), plata (Ag), óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), óxido mixto de titanio, estroncio y bario

[(BaTiO<sub>3</sub>)(SrTiO<sub>3</sub>); BaSrTiO] y el óxido mixto de titanio y silicio [(SiO<sub>2</sub>)(TiO<sub>2</sub>); TiSiO] en el análisis por UV-MALDI MS de azúcares presentes en tejidos de bulbos de plantas (tulipán, ajo y cebolla). Estos tejidos contienen naturalmente hidratos de carbono neutros solubles en las soluciones celulares, principalmente sacarosa (Fr(2)) y otros fructanos (Fr). El análisis fue realizado tanto en modo lineal positivo como negativo. Junto con el estudio realizado efectuando la transferencia de las NPs al tejido asistida por solvente, se evaluó si la ausencia de solvente en la deposición de las NPs sobre el tejido podría mejorar los resultados del análisis por UV-MALDI MS. En todos los casos, los resultados obtenidos fueron comparados con los provenientes de las soluciones de hidratos de carbono solubles extraídos de tejidos de los distintos bulbos, utilizando las mismas NPs, CNT y matrices orgánicas clásicas (GA y nHo).

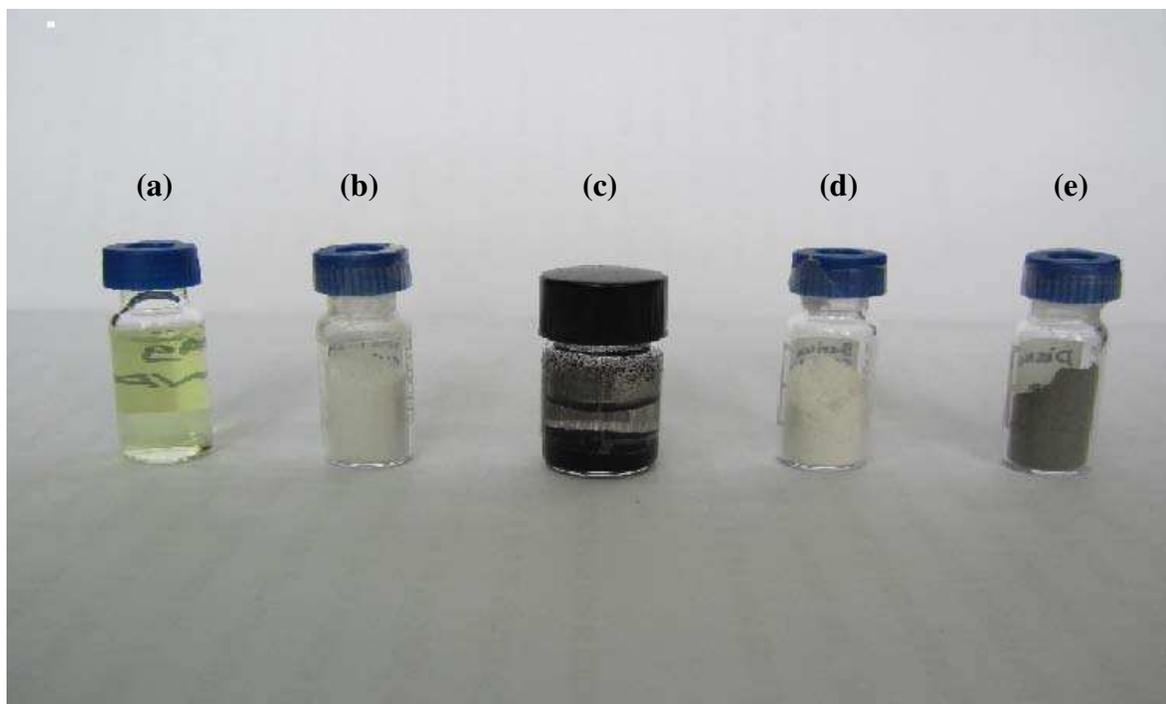
También se analizaron algunas propiedades de las NPs como matrices UV-MALDI relacionadas con el proceso de DI de los fructanos comerciales *in vitro*. Se compararon los resultados obtenidos en el estudio del límite de detección (LOD) y la reproducibilidad de las señales utilizando como analitos la sacarosa (Fr(2)) y la 1-kestosa (Fr(3)) y como matrices las NPs, GA, nHo y CNT. Por último, se analizó la relación entre la intensidad absoluta y la intensidad relativa (RI) de las señales de los hidratos de carbono y la concentración de la solución de los mismos utilizando las NPs como matrices.

## 5.2 EXPERIMENTAL

### 5.2.1 Materiales y métodos

Se utilizó para las distintas soluciones metanol (MeOH), etanol (EtOH), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y acetona de grado HPLC provenientes de Sigma-Aldrich Chem. Corp., sin ningún tipo de purificación adicional, Las NPs seleccionadas fueron diamante (D, pureza 97%,

diámetro < 10 nm, superficie de área= 278-6335 m<sup>2</sup>/g), óxido mixto de titanio y silicio (TiSiO, (SiO<sub>2</sub>)(TiO<sub>2</sub>), pureza = 99,8% diámetro < 50 nm), óxido mixto de bario, estroncio y titanio (BaSrTiO, (BaTiO<sub>3</sub>)(SrTiO<sub>3</sub>), pureza = 99,7%, diámetro < 100 nm), obtenidas de Sigma – Aldrich Chem. Corp., dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>, DP-25 nm de diámetro, aproximadamente 80% de anatasa y 20% de rutilo), obtenido de Evonik Degussa Corp., NPs de plata (Ag, diámetro < 20 nm, suspensión acuosa), obtenidas de British Biocell International, y nanotubos de carbono (CNT, diámetro externo ED 10-30 nm) provenientes de Wako Chemicals (figura 5.3). Los analitos utilizados fueron: glucosa (Glc, PM 180), fructosa (Fru, PM 180), sacarosa (Fr(2), PM 342), 1-kestosa (Fr(3), pureza > 99 %, PM 504), nistosa (Fr(4), pureza > 99%, PM 666), 1<sup>F</sup>-fructofuranosilnistosa (Fr(5), pureza > 80%, PM 828), provenientes de Wako Chemicals; β-ciclodextrina (Bcd, pureza > 98%, PM 1134), provenientes de Sigma-Aldrich Chem. Corp. Se utilizaron también las sales KCl y NaCl, ambas provenientes de Wako Chemicals. Las matrices orgánicas clásicas utilizadas fueron *nor*-harmano (9H-pirido[3,4-b]indol, nHo, PM 168) y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido géntísico, GA, PM 154), provenientes de Sigma-Aldrich Chem. Corp. Para las soluciones acuosas se utilizó agua de baja conductividad (grado Milli Q; 56 - 59 nS/cm with PURIC-S, ORUGANO Co., Ltd., Tokio, Japón).



**Figura 5.3.** NPs utilizadas en el análisis por UV-MALDI MS. (a) suspensión acuosa de Ag, (b) TiSiO, (c), CNT, suspensión en MeOH:H<sub>2</sub>O 9:1 vol/vol, (d) BaSrTiO y (e) D.

### 5.2.2 Equipamiento

Los espectros de masa UV-MALDI se obtuvieron en un equipo Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Foster City, CA), equipado con un analizador de tiempo de vuelo (UV-MALDI-TOF MS) y con un láser de nitrógeno con una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 337 nm (ancho de pulso de 3 ns), utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV. Para obtener señales con buena resolución y relación S/R óptima, se ajustó la potencia del láser por encima de la potencia umbral necesaria y se obtuvo cada espectro de masa con una suma de 100 espectros (disparos). Los fructanos estándares comerciales y la  $\beta$ -ciclodextrina fueron utilizados como calibrantes externos. Las señales obtenidas de las muestras de tejidos y de extractos fueron comparadas con las detectadas con los fructanos y maltosas comerciales (estándares).

### **5.2.3 Preparación de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>**

El TiO<sub>2</sub> comercial se encuentra generalmente como polvo con diámetro de partícula de 25 nm y un área de superficie específica de 22 m<sup>2</sup>/g, lo que genera largos agregados durante el proceso de secado. Los mejores resultados se obtuvieron con el siguiente método de purificación [28]: el TiO<sub>2</sub> fue lavado por diálisis hasta que la conductividad de la solución del sobrenadante fuera la misma que la del agua. Luego de ser filtrado, fue secado al vacío y colocado en un deseador en atmósfera seca y en la oscuridad. Los agregados del TiO<sub>2</sub> formados fueron triturados utilizando un mortero de ágata (figura 5.4), hasta obtener un polvo fino (escala nanométrica). Se analizó la composición del polvo de TiO<sub>2</sub> por difracción de rayos X (XRD), cuyo patrón indicó que su componente mayoritario era anatasa. Este procedimiento de purificación fue desarrollado y llevado a cabo en la CNEA (en el laboratorio del Dr. M. A. Blesa, Argentina).



**Figura 5.4.** Mortero de ágata utilizado para la trituración del TiO<sub>2</sub> a tamaño nanoscópico.

Se ensayaron diferentes formas de preparación de las suspensiones de las NPs de TiO<sub>2</sub>. Primero se utilizó agua para la suspensión de las NPs, pero esto no produjo buenos resultados y la intensidad de las señales obtenidas fue extremadamente baja. Luego, se

probaron diferentes relaciones de volúmenes de MeOH:H<sub>2</sub>O, obteniéndose con la relación 1:1 vol/vol los mejores resultados. Ésta fue la relación de volumen elegida para el solvente mezcla usado en los experimentos, y en 1 ml de este solvente se suspendieron 50 mg de NPs. Debido a que las NPs sedimentan rápidamente, fue necesaria su resuspensión por agitación por medio de un vórtex antes de aplicar la alícuota de matriz sobre la muestra o directamente sobre el tejido.

#### 5.2.4 Preparación de matrices orgánicas clásicas y CNT

Las soluciones de GA y nHo fueron preparadas disolviendo 2 mg de matriz en 1ml de MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol. Los CNT fueron purificados por sucesivos procesos de lavado y centrifugación con acetona y diferentes mezclas de MeOH:H<sub>2</sub>O desde 1:1 a 1:9 vol/vol, siguiendo luego con una resuspensión final en MeOH:H<sub>2</sub>O 1:9 vol/vol [3,4].

El método elegido para depositar la matriz y los analitos solubles sobre el electrodo portamuestras fue el de gotas sucesivas (*dried-droplet* o tapa, M:A), en el cual se coloca una alícuota de 1 µl de solución (o suspensión) de matriz y se lo lleva a sequedad en atmósfera normal a temperatura ambiente. Luego se coloca una alícuota ~~µl de~~ la solución del analito sobre capas de matriz ya depositada y se lo lleva nuevamente a sequedad en las mismas condiciones a temperatura ambiente.

#### 5.2.5 Análisis *in vitro*

Las soluciones de Fr(2) y fructanos (Fr(3-5)) se prepararon en una mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol y en otra de composición MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 KCl (50 mM). Las soluciones estándar de azúcares fueron preparados mezclando volúmenes pre-determinados de cada solución de hidratos de carbono estándar y la solución total se mezcló en un vórtex.

Se eligió a la Fr(3) (presente en los tejidos analizados) para la determinación y comparación del límite de detección (LOD) alcanzado con GA, nHo, CNT y las NPs estudiadas. Se realizaron una serie de diluciones con MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol a partir de la solución madre de Fr(3) 25 mM (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol) y se analizaron estas soluciones por UV-MALDI MS. La concentración más baja analizada fue 1,2 μM. De cada solución de Fr(3) se colocó una alícuota de 1 μl sobre el depósito ya seco obtenido con 1 μl de solución de matriz (GA o nHo), 1 μl de suspensión de CNT en MeOH:H<sub>2</sub>O 1:9 vol/vol o 1 μl de suspensión de NPs en MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol. De esta forma, se prepararon las muestras con las siguientes combinaciones: 1) 1 μl de solución de Fr(3) n μM - 1 μl de solución de GA; 2) 1 μl de solución de Fr(3) n μM - 1 μl de solución de nHo; 3) 1 μl de solución de Fr(3) n μM - 1 μl de solución de CNT MeOH:H<sub>2</sub>O 1:9 vol/vol; 4) 1 μl de solución de Fr(3) n μM - 1 μl de solución de NPs MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol.

El LOD fue definido como el número de picomoles (pmol) de Fr(3) transferido al portamuestras que produce una relación señal/ruido (S/R) mayor o igual a 6,5 para el modo positivo, y mayor o igual a 13,5 para el modo negativo (ver tablas 1 y 2 en Resultados). Cada matriz fue estudiada en ambos modos (positivo y negativo). También se realizaron experimentos para determinar el LOD con mezclas de la solución de Fr(3) 25 mM en MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol diluida con una solución madre de KCl (1 mM) MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol. Por otro lado, se realizaron también otros análisis del LOD utilizando como solución diluyente una solución de NaCl 1 mM en MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol .

### **5.2.6 Obtención del extracto de hidratos de carbono solubles a partir de tejidos**

Para obtener el extracto de azúcares solubles provenientes de los bulbos de tulipán y ajo, se preparó una muestra de tejido de cada uno, a partir de ejemplares mantenidos a 5°C

por 9 semanas y ésta se trató con una mezcla de EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3 vol/vol. Luego de la centrifugación (a 3000 g durante 10 minutos), se logró separar la solución sobrenadante. La fase líquida, conteniendo los hidratos de carbono solubles, fue lavada con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) con el fin de eliminar contaminantes polares de bajo peso molecular. Finalmente, se la transfirió a cartuchos de Waters Accell™ Plus QMA and Accell™ Plus CM para su purificación por filtración.

### 5.2.7 Preparación de muestras de tejido

A partir de bulbos mantenidos a temperaturas controladas de 5, 17 y 25°C durante 9 semanas se obtuvieron por corte con hoja de afeitar delgadas muestras de tejido de 3 x 4 mm aproximadamente, con un espesor menor al de 0,5 mm. Estas pequeñas muestras fueron colocadas inmediatamente sobre el electrodo portamuestras, sin previa preparación o adhesivo para fijar, y secadas en atmósfera normal a temperatura ambiente (ver figura 1.6 en el Capítulo I). Los tejidos fueron cubiertos con 1 µl de la suspensión NPs en EtOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol y también llevados a sequedad en las mismas condiciones a temperatura ambiente. Para el experimento de transferencia de NPs sin asistencia de solvente, se distribuyeron las NPs de manera homogénea sobre una lámina de polietileno y se cubrieron con muestras de tejido frescas y secadas parcialmente por el método habitual durante unos segundos. Luego, los tejidos fueron girados y colocados por su cara libre de NPs sobre el portamuestras, quedando sobre la superficie de los mismos las NPs secas distribuidas de manera uniforme. En cada experimento, se examinaron tres muestras y se registró un total de 100 espectros por cada muestra, obteniéndose espectros totales como suma de 300 disparos. Para cada tipo de NP, se utilizaron como calibrantes externos soluciones conteniendo los cinco fructanos estándares depositados también sobre la capa

seca de NPs. Las señales de los diferentes hidratos de carbono observados para los diferentes tejidos y extractos se compararon con las señales de los calibrantes obtenidas con las respectivas NPs tanto en modo lineal como reflectrón, positivo y negativo.

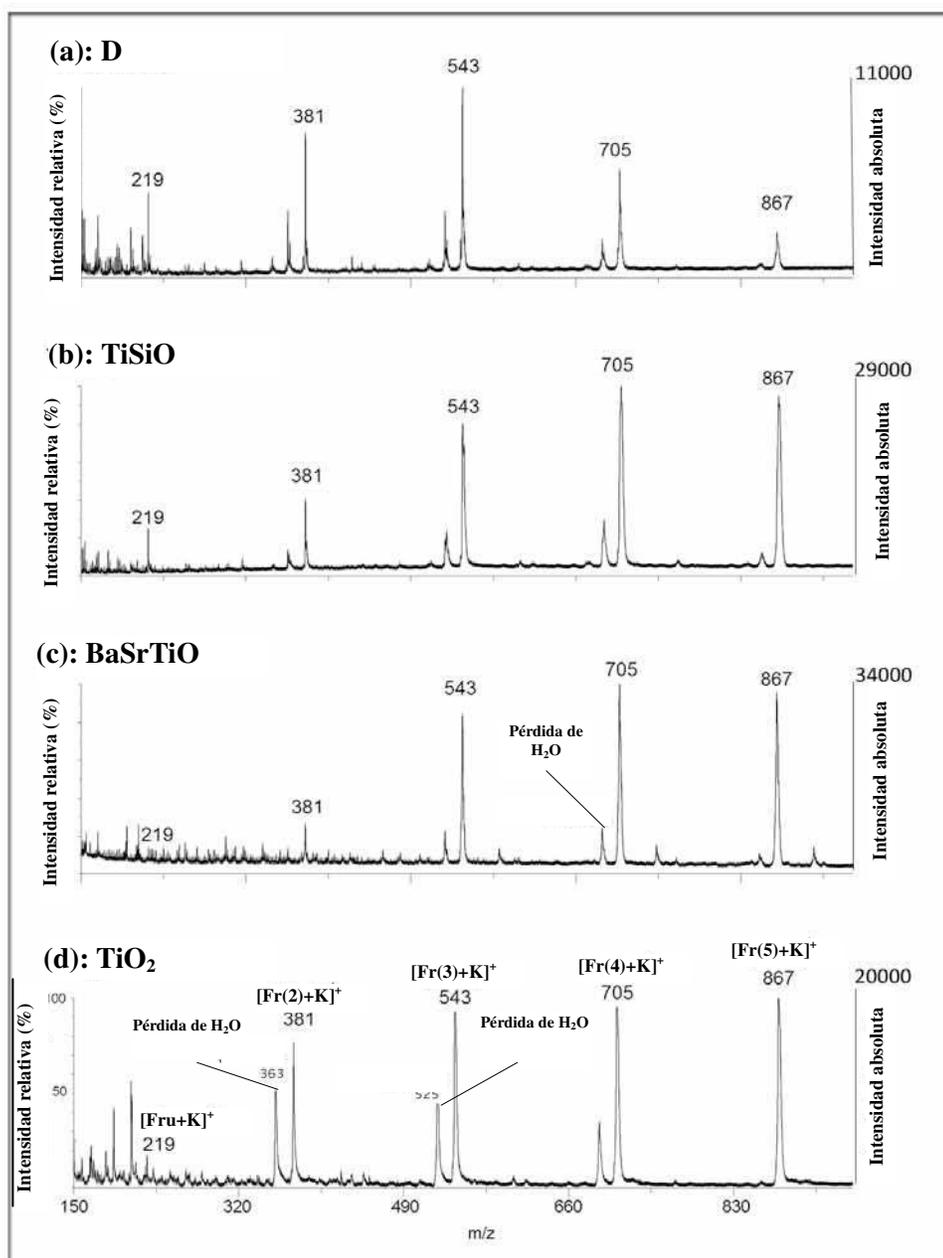
## **5.3 RESULTADOS**

### **5.3.1 Análisis de fructanos *in vitro* utilizando NPs. Determinación del límite de detección (LOD)**

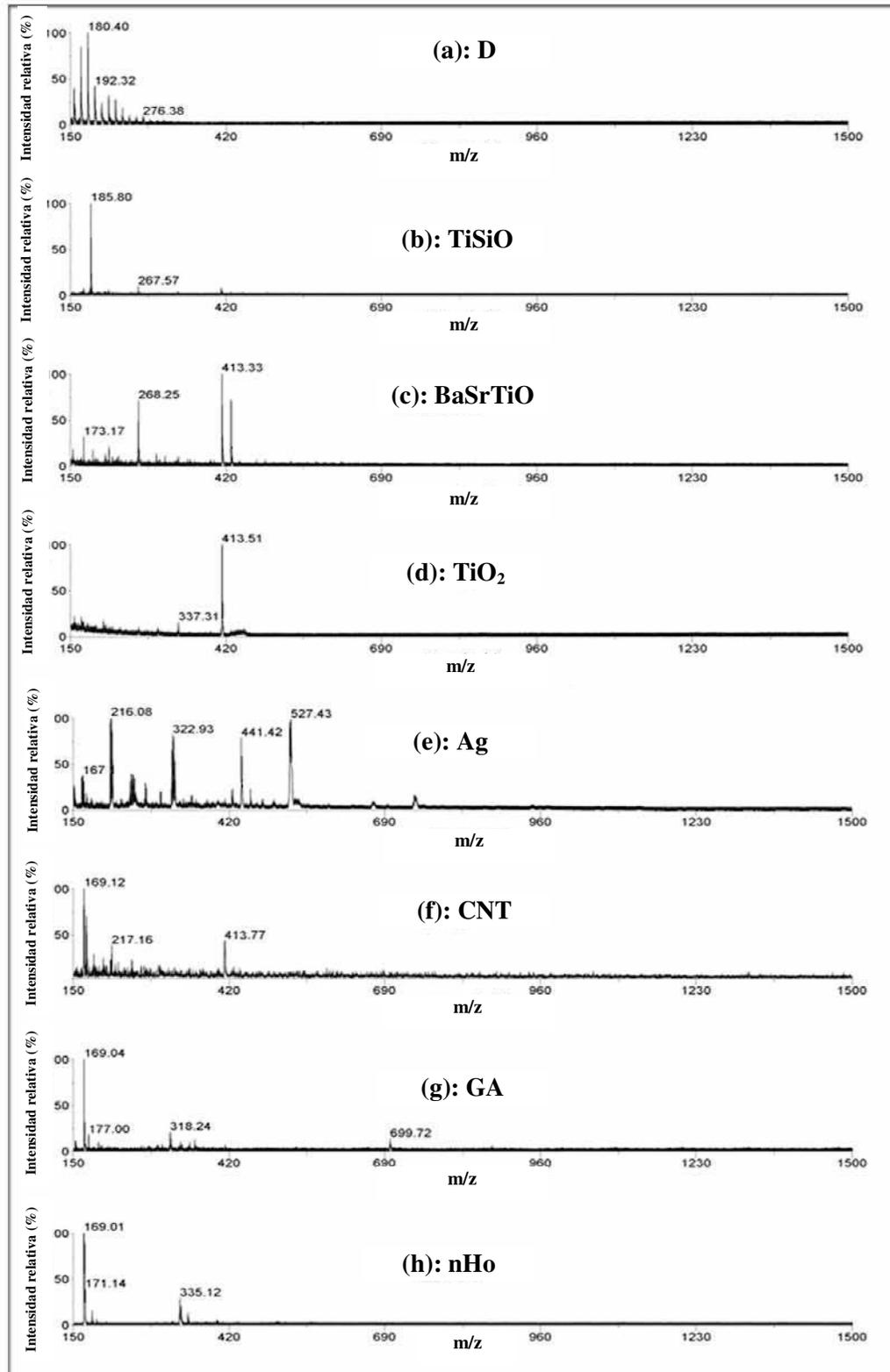
Como ya se mencionó en el Capítulo III, el citoplasma de la célula vegetal donde se encuentran los azúcares solubles contiene cationes como  $K^+$  (50-100 mM),  $Na^+$  (5,0-5,5 mM),  $Mg^+$  y  $Ca^+$  (menor a 2,5 mM), siendo por lo tanto la especie detectada predominantemente en sus espectros de masa en modo positivo  $[A+K]^+$  (A, analito), y en modo negativo,  $[A-H]^-$ , analizando tanto al citoplasma celular como el tejido o la célula en forma directa por UV-MALDI MS [3-7, 29]. La situación es diferente para el caso de los hidratos de carbono obtenidos luego de su extracción por manipuleo químico desde los tejidos. El contenido de  $Na^+$  presente en los solventes utilizados para la separación, fraccionamiento y purificación de los analitos es normalmente mayor que el de  $K^+$ , por lo que la especie principal detectada pasa a ser  $[A+Na]^+$ .

Teniendo en cuenta esto, se iniciaron los experimentos con NPs (D,  $TiO_2$ ,  $TiSiO$ ,  $BaSrTiO$  y Ag) evaluando primero su eficiencia como matrices UV-MALDI analizando fructanos comerciales (Fru-Fr(5)), para luego analizar los analitos provenientes del tejido y el tejido *in situ*. Los primeros experimentos *in vitro* se realizaron con soluciones de Fr en  $MeOH:H_2O$  1:1 vol/vol y con soluciones similares conteniendo KCl y NaCl. Como ejemplo, en la figura 5.5, se muestra el espectro de masa obtenido, en modo positivo, de la solución que contiene la mezcla de fructanos comerciales (500M) conteniendo además

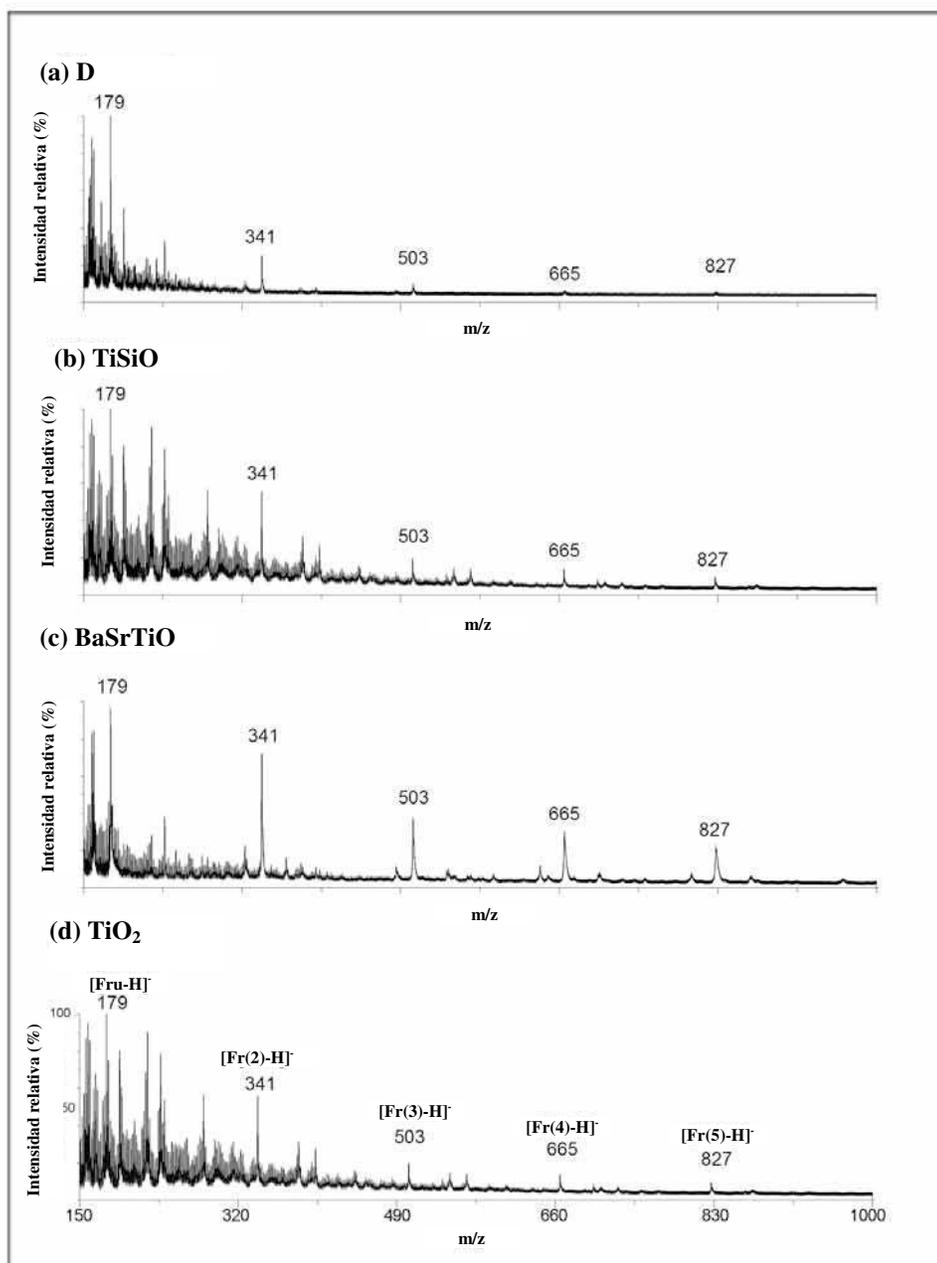
KCl en relación molar Fru–Fr(5):KCl 1:1 mol/mol, depositada sobre una delgada capa de NPs (D, TiO<sub>2</sub>, TiSiO, BaSrTiO y Ag). Se observó para cada fructano que la eficiencia de la formación de la especie [A+K]<sup>+</sup> dependió del tipo de NP utilizada, debido ésto tanto a sus propiedades como fotosensibilizadores como a la cantidad de clusters propios producidos por cada una. Por ejemplo, como se muestra en la figura 5.6, el espectro de masa obtenido para las matrices por desorción por láser (LDI). El diamante (D) mostró una gran cantidad de clusters en la zona de masa/carga ( $m/z$ ) 0 - 200. En cambio, para la Ag, los clusters muy abundantes se extendieron hasta la región de  $m/z$  530, mientras que en el caso del TiO<sub>2</sub> y los CNT los clusters propios se observaron en el rango de  $m/z$  0 - 420. El GA presentó clusters con señales de baja intensidad hasta la región de  $m/z$  700, mientras que el nHo presentó pocas señales propias sólo a valores de  $m/z$  menores que 350 (figura 5.6).



**Figura 5.5.** Espectro de masa UV-MALDI de la mezcla de Fru-Fr(5):KCl (1:1 mol/mol). Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (c) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-900. Modo lineal positivo.



**Figura 5.6.** Espectro de masa LDI de las matrices UV-MALDI. (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO, (d) TiO<sub>2</sub>, (e) Ag, (f) CNT, (g) GA y (h) nHo. Rango de m/z: 150-1500. Modo lineal positivo.



**Figura 5.7.** Espectro de masa UV-MALDI de la mezcla equimolar de Fru-Fr(5). Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (d) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-1000. Modo lineal negativo.

Los resultados obtenidos trabajando en el modo negativo y utilizando las distintas NPs, mostraron señales claras de las especies deprotonadas de cada fructano (figura 5.7). El

menor número de clusters propios de la matriz se observaron al usar D (a) y BaSrTiO (c) como matrices, mostrando ésta última los mejores resultados.

Adicionalmente, se determinó comparativamente el LOD de Fr(3) utilizando como matrices las NPs, los CNT y las matrices orgánicas clásicas, en los modos positivo y negativo. Se analizó la solución nativa de Fr(3) y las soluciones mezcla conteniendo Fr(3) y NaCl (1 mM) y Fr(3) y KCl (1 mM). Para las dos primeras, la especie monitoreada fue  $[A+Na]^+$  (m/z 527) en modo positivo y  $[A-H]^-$  (m/z 503) en modo negativo, y para la tercera, la especie fue  $[A+K]^+$  (m/z 543) en modo positivo y  $[A-H]^-$  (m/z 503) en modo negativo. De esta manera se pudo evaluar el rango dinámico en el cual se detectaron señales de fructanos con una relación S/R óptima (mayor o igual a 6,5 para modo positivo y mayor o igual a 13,5 en modo negativo) y con alta resolución (tablas 5.1 y 5.2). Todas las NPs, exceptuando la Ag, mostraron LOD y rango dinámico satisfactorios. En el modo negativo, las NPs resultaron ser superiores como matrices respecto del GA, nHo y los CNT (tabla 5.2). El agregado tanto de NaCl como KCl a la solución de Fr(3) no mejoró el LOD de ésta en el modo positivo (tabla 5.1), y para todas las NPs, exceptuando BaSrTiO, la presencia de sal redujo el LOD en el modo negativo (tabla 5.2).

Las NPs, exceptuando la Ag, mostraron un rango dinámico y relaciones diferentes entre la concentración de cada fructano (Fru-Fr(5)) y la intensidad de la señal de la especie  $[Fr+Na]^+$  (m/z 203, 365, 527, 689 y 851 respectivamente), trabajando en modo positivo (tabla 5.3).

NPs	Ausencia de sal		Presencia de KCl		Presencia de NaCl	
	Rango dinámico	LOD	Rango dinámico	LOD	Rango dinámico	LOD
D	50-25000	50	5-25000	5	5-25000	5
TiSiO	5-25000	5	2,5-25000	2,5	2,5-25000	2,5
BaSrTiO	1,2-25000	1,2	2,5-25000	2,5	2,5-25000	2,5
TiO <sub>2</sub>	2,5-25000	2,5	2,5-25000	2,5	2,5-25000	2,5
Ag	Sin señal		Sin señal		Sin señal	
CNT	50-25000	50	250-25000	250	500-25000	500
GA	1,2-25000	1,2	5-25000	5	50-25000	50
nHo	250-25000	250	50-25000	50	50-25000	50

**Tabla 5.1.** Rango dinámico y LOD expresados como los pmoles de Fr(3) depositados sobre el portamuestras, utilizando diferentes NPs, GA y nHo como matrices. Relación S/R  $\geq$  6,5. Modo lineal positivo.

NPs	Ausencia de sal		Presencia de KCl		Presencia de NaCl	
	Rango dinámico	LOD	Rango dinámico	LOD	Rango dinámico	LOD
D	250-25000	250	500-25000	500	500-25000	500
TiSiO	50-25000	50	5000-25000	5000	50-25000	50
BaSrTiO	50-25000	50	50-25000	50	500-25000	500
TiO <sub>2</sub>	50-25000	50	500-25000	500	500-25000	500
Ag	50-25000	50	500-25000	5000	5000-25000	5000
CNT	250-25000	250	5000-25000	5000	5000-25000	5000
GA	Sin señal		Sin señal		Sin señal	
nHo	250-25000	250	5000-25000	5000	5000-25000	5000

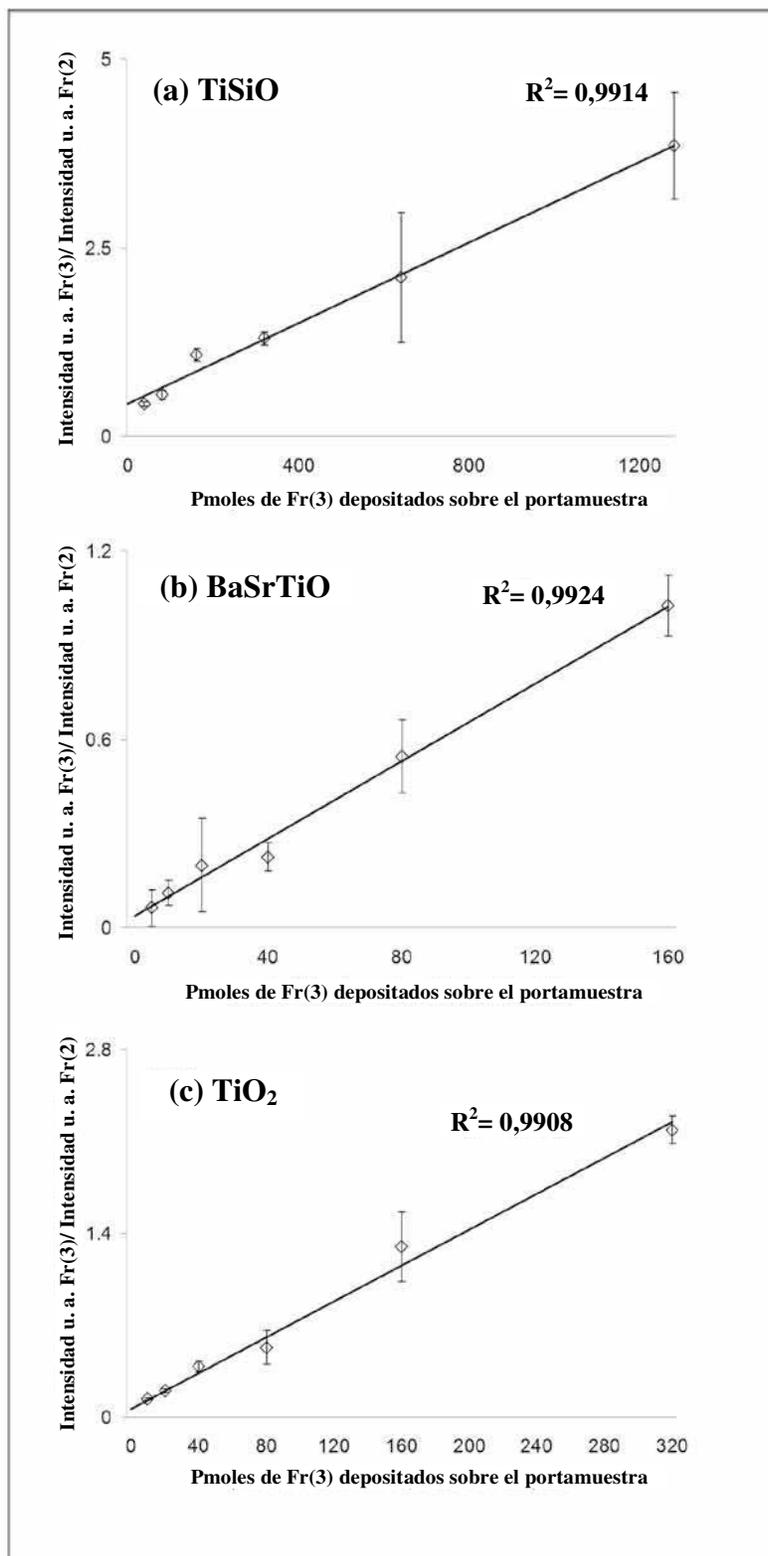
**Tabla 5.2.** Rango dinámico y LOD expresados como los pmoles de Fr(3) depositados sobre el portamuestras, utilizando diferentes NPs, GA y nHo como matrices. Relación S/R  $\geq$  13,5. Modo lineal negativo.

Fructanos	Fr(2)	Fr(3)	Fr(4)	Fr(5)
D	-	80-320	80-320	-
TiSiO	20-1280	2,5-1280 (a)	10-320	2,5-320
BaSrTiO	5-160	5-1280	20-320	20-320
TiO <sub>2</sub>	20-1280	2,5-1280 (a)	40-1280	20-1280

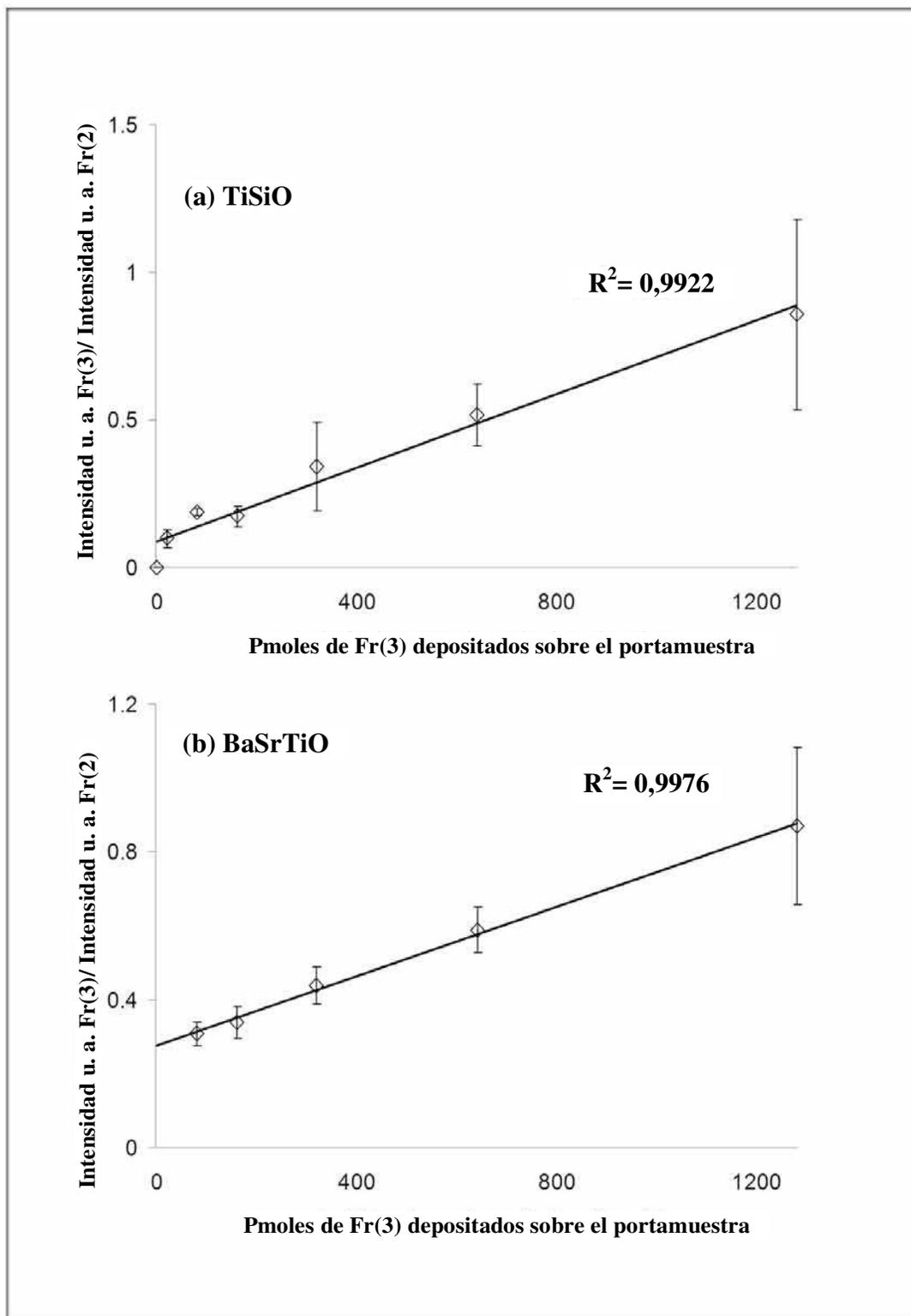
**Tabla 5.3.** Rango dinámico expresado como los pmoles de Fr depositados sobre el portamuestras. Linealidad:  $0,99 > R^2 \geq 0,95$ , (a)  $R^2 \geq 0,99$ .

Los estudios realizados en modo positivo mostraron una alta sensibilidad, especialmente el TiSiO y TiO<sub>2</sub>, a la relación entre la intensidad de las señales y la concentración de la solución de los analitos depositados sobre las NPs (tabla 5.3). Esta propiedad también fue evaluada como la relación entre la intensidad relativa (IR) de la señal debida a la Fr(3) y la IR de la señal correspondiente a la Fr(2) (sacarosa), utilizada esta última como estándar interno y la concentración de Fr(3) en las soluciones evaluadas. Para este experimento, se utilizaron soluciones mezcla conteniendo diferentes concentraciones de Fr(3) (10 a 1280 μM) y una concentración fija de Fr(2) (300 μM, referencia interna). Los resultados mostraron una buena linealidad usando TiSiO, BarSrTiO y TiO<sub>2</sub> como matrices UV-MALDI en modo positivo y TiSiO y BarSrTiO en modo negativo (figuras 5.8 y 5.9). También se obtuvo una buena linealidad en el estudio de la intensidad de la señal de Fr(2) y su concentración utilizando Fr(3) como referencia interna (Fr(2)/Fr(3), figura 5.10).

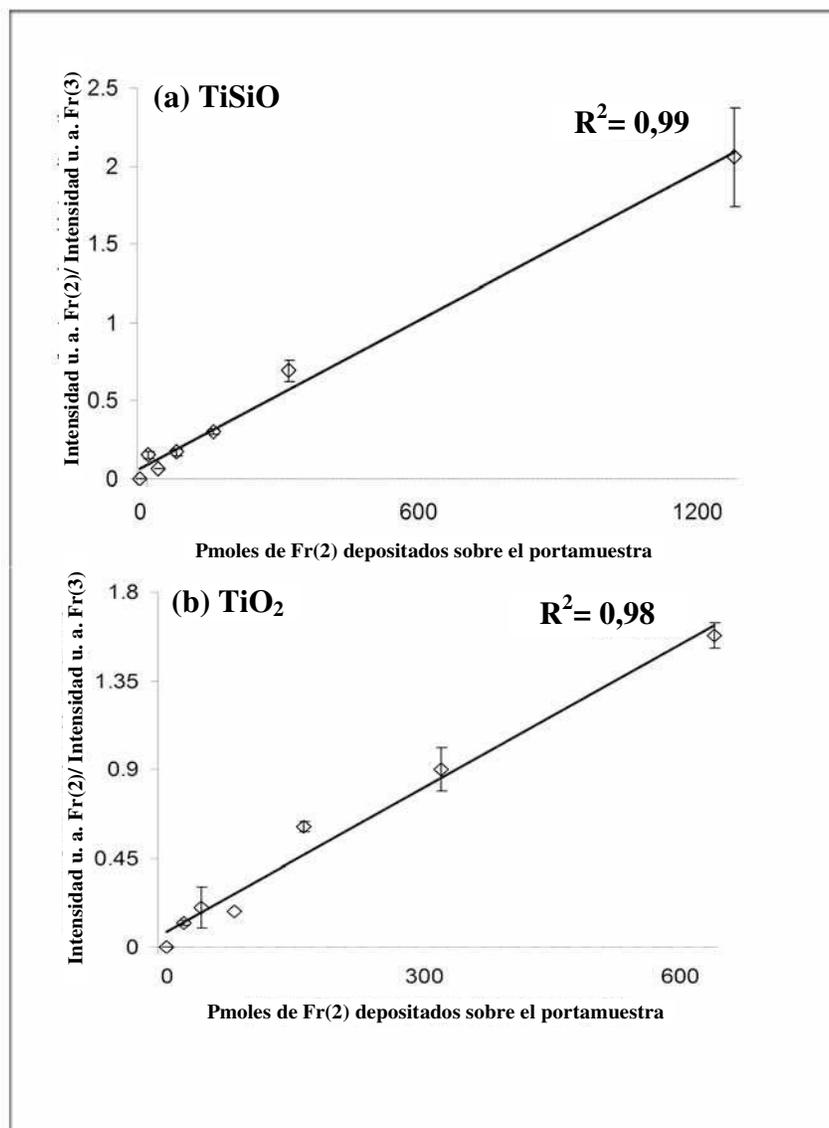
Es importante destacar que con el aumento de la concentración de hidratos de carbono depositados sobre las NPs, la eficiencia en la DI de los mismos disminuye. De hecho, dicha eficiencia parece ser también dependiente del tamaño de las NPs debido a que la agregación de las mismas disminuye la intensidad de las señales. Como ya se señaló, las NPs mostraron también una capacidad de DI diferente cuando se utilizó como solvente de transferencia H<sub>2</sub>O y/o MeOH en diferentes relaciones vol/vol, sugiriendo esto una posible interacción entre las moléculas de los solventes y las NPs. La mayor eficiencia de las NPs como matrices en modo negativo respecto de las matrices clásicas GA y nHo se debió, probablemente, a una mayor capacidad para deprotonar los hidratos de carbono, dadas sus propiedades físico-químicas características (foto oxidantes-foto reductores) ya mencionadas (ver figura 5.2).



**Figura 5.8.** Intensidad relativa de la Fr(3) definida como intensidad u. a. Fr(3)/ intensidad u. a. Fr(2) vs la concentración de Fr(3). Matriz: (a) TiSiO, (b) BaSrTiO y (c) TiO<sub>2</sub>. Concentración de Fr(3): 10 – 1280  $\mu$ M y de Fr(2): 300  $\mu$ M. Modo lineal positivo.



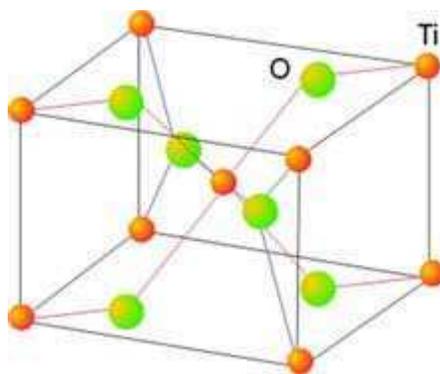
**Figura 5.9.** Intensidad relativa de la Fr(3) definida como intensidad u. a. de Fr(3)/ intensidad u. a. de Fr(2) vs la concentración de Fr(3). Matriz: (a) TiSiO y (b) BaSrTiO. Concentración de Fr(3): 10 – 1280  $\mu\text{M}$  y de Fr(2): 300  $\mu\text{M}$ . Modo lineal negativo.



**Figura 5.10.** Intensidad relativa de la Fr(2) definida como intensidad u. a. de Fr(2)/ intensidad u. a. de Fr(3) vs la concentración de Fr(2). Matriz: (a) TiSiO y (b) TiO<sub>2</sub>. Concentración de Fr(2): 10 – 1280  $\mu$ M y de Fr(3): 300  $\mu$ M. Modo lineal positivo.

El TiO<sub>2</sub> (conocido también como titania) es el compuesto semiconductor más ampliamente usado en fotocatalisis [30] (figura 5.11). La actividad fotoquímica del TiO<sub>2</sub> puede verse modificada estimulando o suprimiendo la recombinación del par electrón-hueco formado por la excitación con luz UV-visible (ver figuras 5.1 y 5.2). Uno de los

métodos para modificar esta propiedad del  $\text{TiO}_2$  es mediante el agregado de diferentes óxidos metálicos en su estructura (óxidos mixtos). Por ejemplo, la fotoactividad del complejo  $(\text{SiO}_2)(\text{TiO}_2)$  es tres veces mayor que la detectada para el  $\text{TiO}_2$  [31]. Sin embargo, el motivo por el cual la fotoactividad del complejo  $(\text{SiO}_2)(\text{TiO}_2)$  es mayor que el del  $\text{TiO}_2$  no es claramente comprendido. Se ha sugerido que este fenómeno puede deberse a una modificación del medio que rodea en la superficie a la unidad  $\text{TiO}_2$ , mediante la unión de átomos de Si [32].



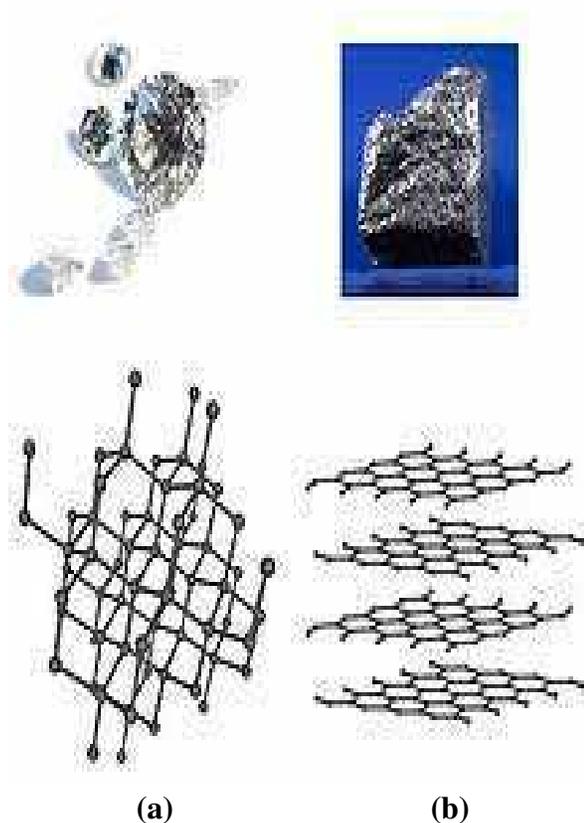
**Figura 5.11.** Estructura cristalina del  $\text{TiO}_2$  (rutilo).

El  $\text{TiO}_2$  como agente fotocatalítico induce la oxidación y dimerización de alcoholes [33, 34] y moléculas orgánicas, que presentan grupos funcionales  $\text{HO-}$ , los que son muy abundantes en las estructuras de los hidratos de carbono. El proceso fotoinducido es iniciado por la pérdida de un  $\text{H}^+$  proveniente del alcohol, seguido por la captura de un electrón liberado por el  $\text{TiO}_2$ . El primer paso genera especies del tipo  $[\text{A-H}]^-$ . Las moléculas de agua se unen selectivamente a la superficie del  $\text{TiO}_2$  debido a la interacción entre el Ti y los oxígenos del agua ( $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{TiO}_2$ ) [35, 36]. Por esto, el agua presente en la suspensión de las NPs, en el tejido y en la muestra preparada (A+NPs) para el análisis por UV-MALDI

MS, puede modificar la capacidad de interacción entre la superficie de las NPs y los hidratos de carbono. Debido a esto, la suspensión de NPs en la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 vol/vol mostró los mejores resultados tanto en modo positivo como negativo.

Las NPs de Ba<sub>x</sub>Sr<sub>1-x</sub>TiO<sub>3</sub> (*perovskite*), con cristales mezcla de óxido y metal en escala nanométrica, han sido de gran interés científico y tecnológico debido a sus propiedades ferroeléctricas y su alta relación superficie-volumen. Particularmente, debido a que la actividad fotocatalítica de estas NPs está relacionada con las propiedades de su superficie, se elige el material en polvo antes que los cristales o films para estos estudios [37]. Tanto el BaSrTiO, el TiSiO como mezclas de óxidos metálicos, mantienen las propiedades fotocatalíticas del TiO<sub>2</sub>. De este modo, junto con una ionización parcial bajo la irradiación del láser UV-visible, se produce una importante desactivación sin radiación, resultando en un importante crecimiento de la temperatura local. El calor es luego transferido a las moléculas de analito adsorbidas en la superficie de las NPs, produciendo una DI óptima de los analitos. En el modo positivo, la ionización es debida a la formación de aductos con K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y/o H<sup>+</sup>. En el modo negativo, debido a que las NPs inducen deprotonación, se detecta la especie [A-H]<sup>-</sup>.

Las NPs de D (figura 5.12), con un tamaño promedio de 10 nm, han sido descritas como nanomaterial fluorescente [38]. De esta manera, es esperable que la eficiencia de su desactivación térmica sea menor que la de las NPs que contienen TiO<sub>2</sub> u otras NPs no fluorescentes.



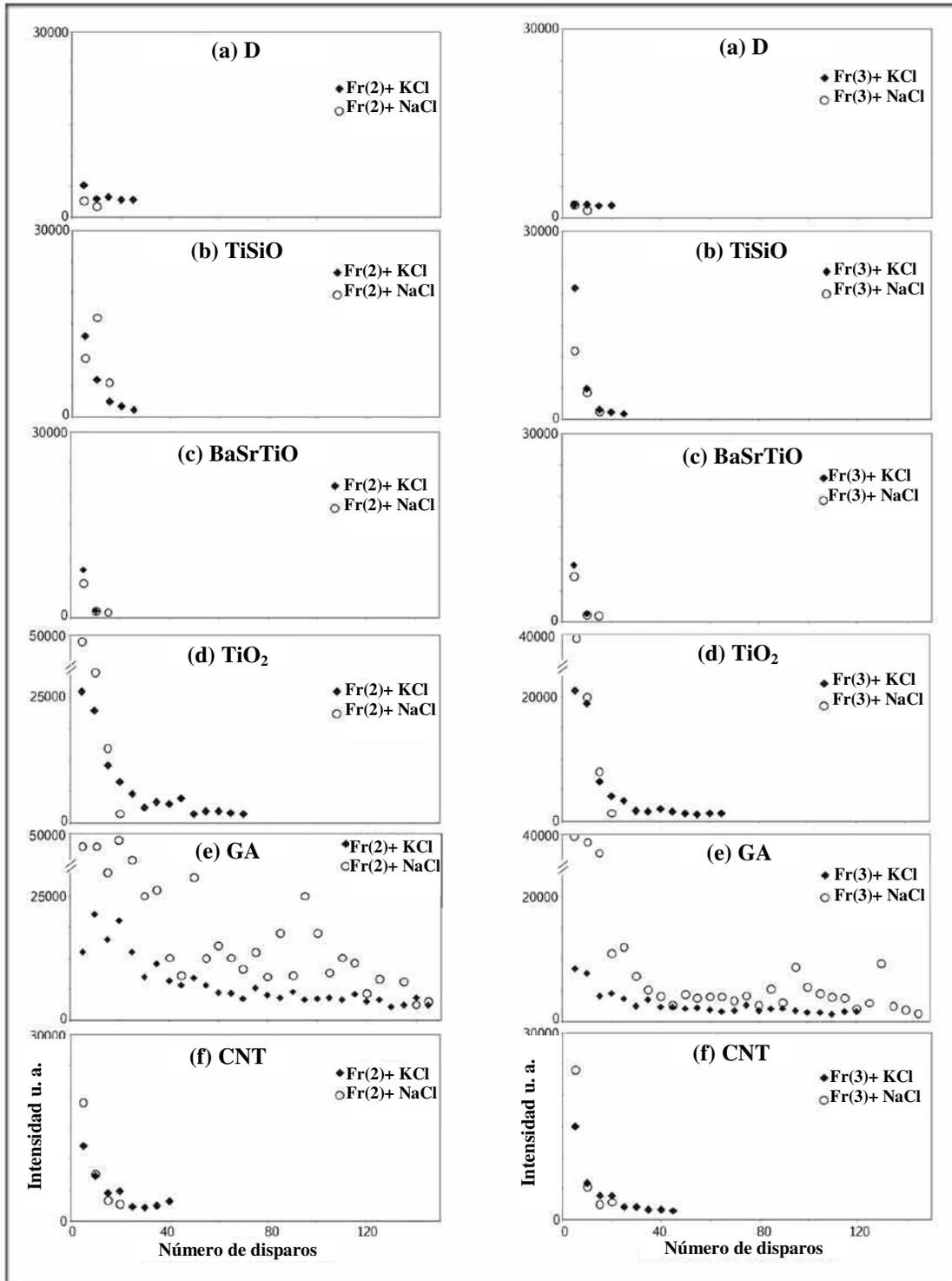
**Figura 5.12.** Estructura del (a) diamante y (b) grafito.

La reproducibilidad de las señales obtenidas en sucesivos disparos (*shots*) del láser en una misma posición de la muestra, utilizando como matrices NPs, resultó ser marcadamente menor en comparación con los experimentos realizados con GA (figura 5.13). En el caso de los óxidos metálicos ( $\text{TiSiO}$ ,  $\text{BaSrTiO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ) y los CNT, a la baja reproducibilidad en la señal se sumó una marcada disminución en la intensidad y la desaparición temprana de la señal de  $\text{Fr}(3)$  luego de los sucesivos disparos, si bien al principio de los experimentos se observó una buena DI, particularmente en el análisis con

TiSiO y TiO<sub>2</sub> (figura 5.13). En el caso del D, no se observó un descenso marcado de la intensidad de las señales debido a que la señal de la Fr(3) se la detectó con baja intensidad relativa desde los primeros disparos. La desactivación fluorescente del D explicaría esta menor eficiencia en la DI de los analitos. En el caso de usarse BaSrTiO y del TiSiO se observó una menor reproducibilidad de las señales entre disparos sucesivos en comparación con el comportamiento observado al usarse TiO<sub>2</sub>. Las propiedades catalíticas oxidativas y fotoquímicas del TiO<sub>2</sub>, TiSiO y del BaSrTiO podrían estar involucradas en la descomposición de los fructanos (desaparición - desvanecimiento de la señal).

Es interesante mencionar que la reproducibilidad de las señales utilizando las NPs como matrices no se vio afectada luego del agregado de KCl y NaCl, tal como se muestra en la figura 5.13.

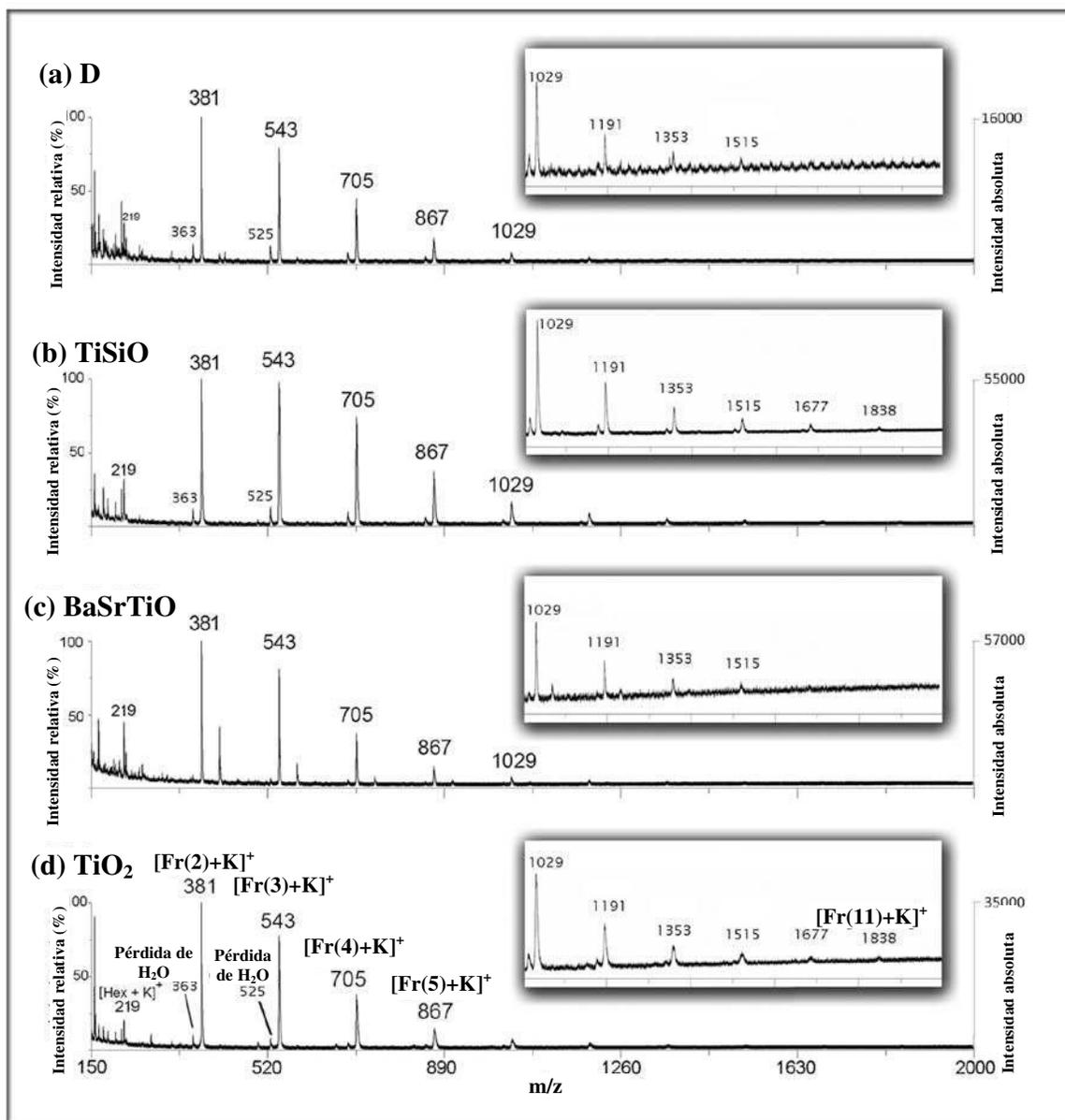
Como conclusión, las propiedades fotoquímicas y fisicoquímicas de las NPs tienen un efecto importante en los procesos de DI de los analitos, incluyendo el proceso de ablación térmica. Finalmente, es importante destacar que, si bien la mayor reproducibilidad de las señales en el análisis de los fructanos *in vitro* se obtuvo con GA (figura 5.13), con esta matriz no se observó la DI de los fructanos presentes en el tejido vegetal (análisis *in situ*).



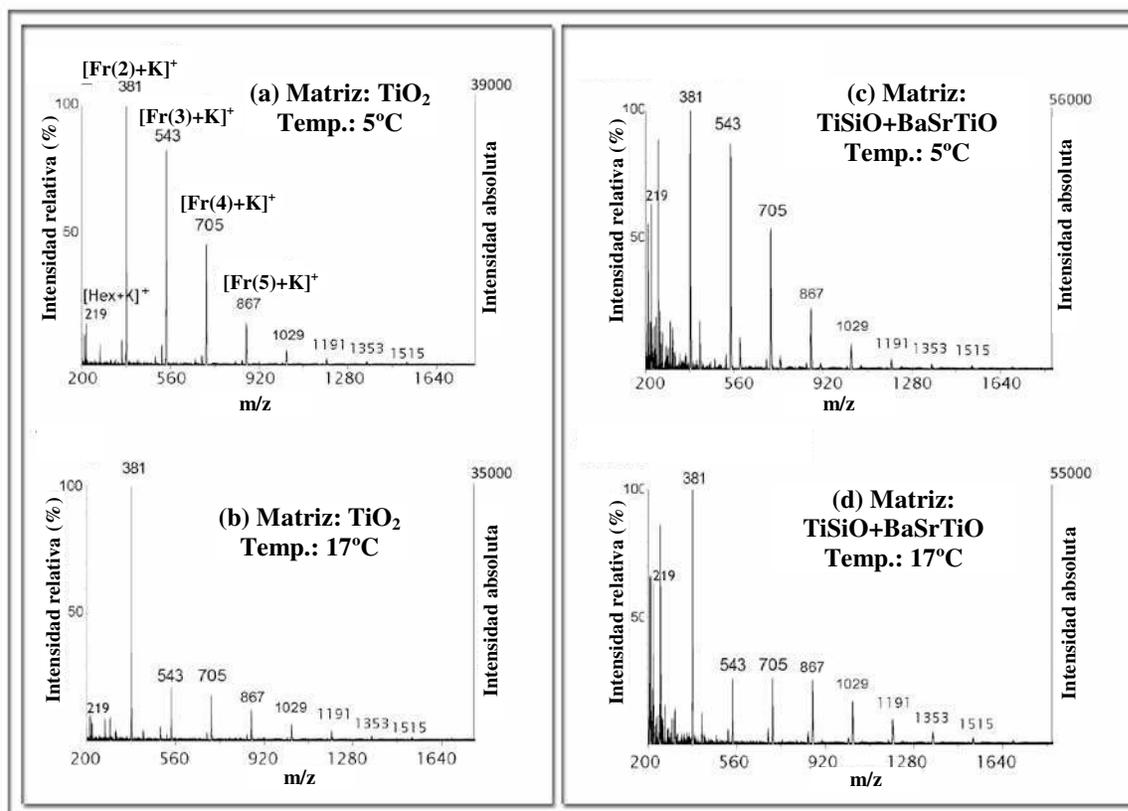
**Figura 5.13.** Intensidad de señales de Fr(2) y Fr(3) versus número de disparos del láser. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO, (d) TiO<sub>2</sub>, (e) GA y (f) CNT. Todos los datos fueron recolectados en el mismo lugar de la muestra. Modo lineal positivo.

### **5.3.2 Análisis directo sobre el tejido (análisis *in situ*). Deposición de NPs asistida por solvente**

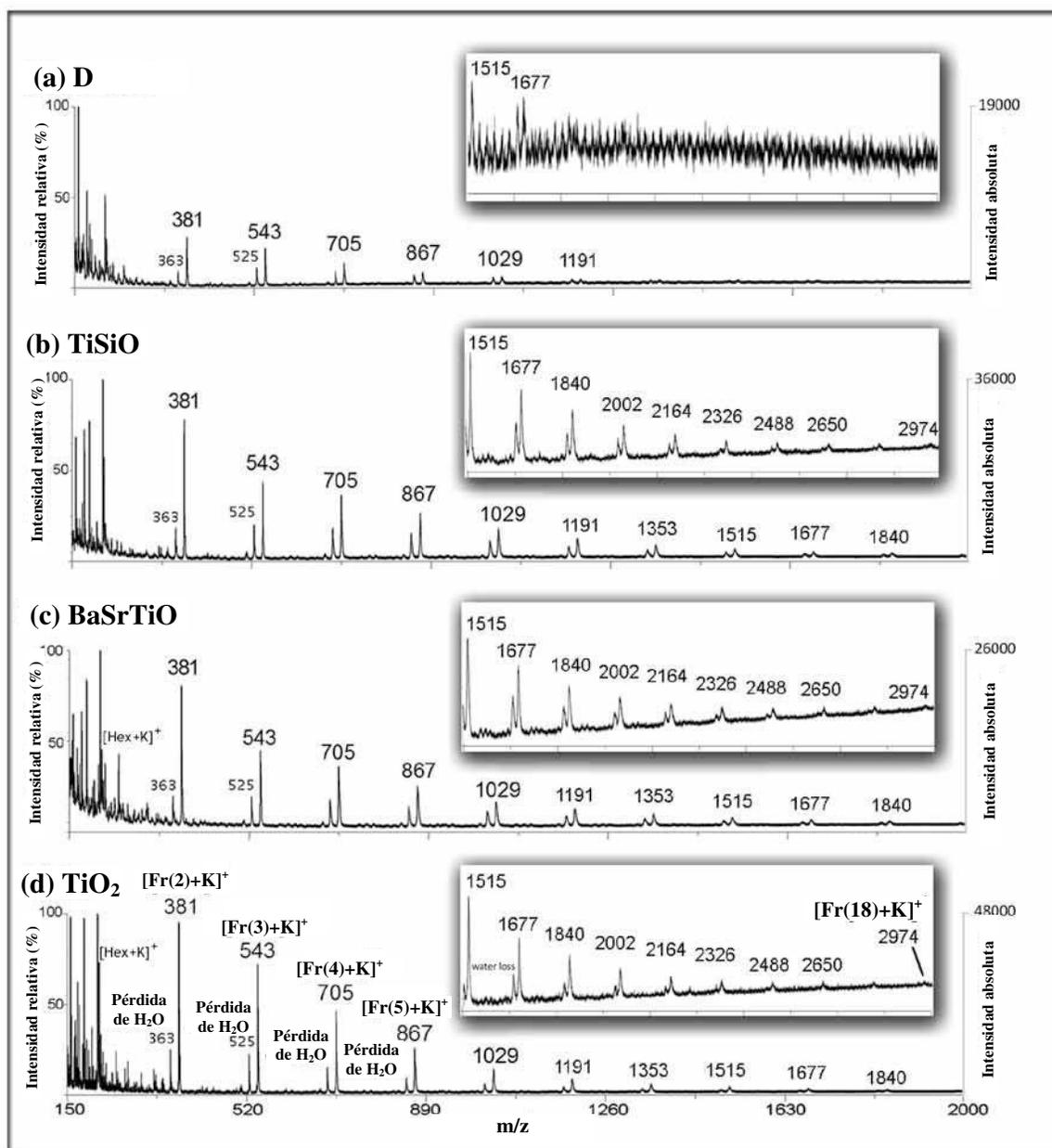
En el modo positivo, al depositar las NPs sobre la superficie del tejido de bulbo de tulipán, se obtuvieron las señales correspondientes a la Fr(2) y a los fructanos como las especies  $[A+K]^+$  (figuras 5.14 y 5.15). No se obtuvieron resultados reproducibles al utilizar NPs de Ag. Los rangos de  $m/z$  en los que se detectaron señales para los fructanos fueron diferentes dependiendo de la NP utilizada. Los resultados obtenidos en el análisis del tejido de bulbo de ajo fueron similares a los del bulbo de tulipán (figura 5.16). En comparación con los resultados obtenidos con los fructanos extraídos de los tejidos de bulbos (análisis *in vitro*), se observaron señales a mayores valores de  $m/z$  en el análisis directo sobre el mismo tipo de tejido, particularmente en el análisis de tejido de bulbo de ajo almacenado a 25°C (figuras 5.14, 5.16 y 5.17). En los experimentos *in vitro* (figura 5.17), también se observó una mayor pérdida de moléculas de agua desde el ion molecular respecto de los estudios realizados *in vivo* (ver figuras 5.14 a 5.16), lo cual se debería probablemente a una interacción directa entre los fructanos y la superficie de las NPs en los estudios *in vitro*, la que lleva a una deshidratación de los mismos. Por otro lado, dado que la pérdida de agua de los hidratos de carbono varía con la naturaleza de las NPs y con el experimento (figuras 5.14, 5.15 y 5.16, análisis *in vivo*; figuras 5.17, análisis *in vitro*), este hecho puede estar vinculado con la modificación en las propiedades físicas y fotoquímicas de las NPs debido a su interacción con las moléculas del solvente y del entorno donde se las deposita. Por último, se observó en el análisis *in vitro* una mayor intensidad de las señales  $[Fr+Na]^+$ , debido a que el  $Na^+$  se encuentra en los solventes utilizados para la extracción de los mismos (figura 5.17).



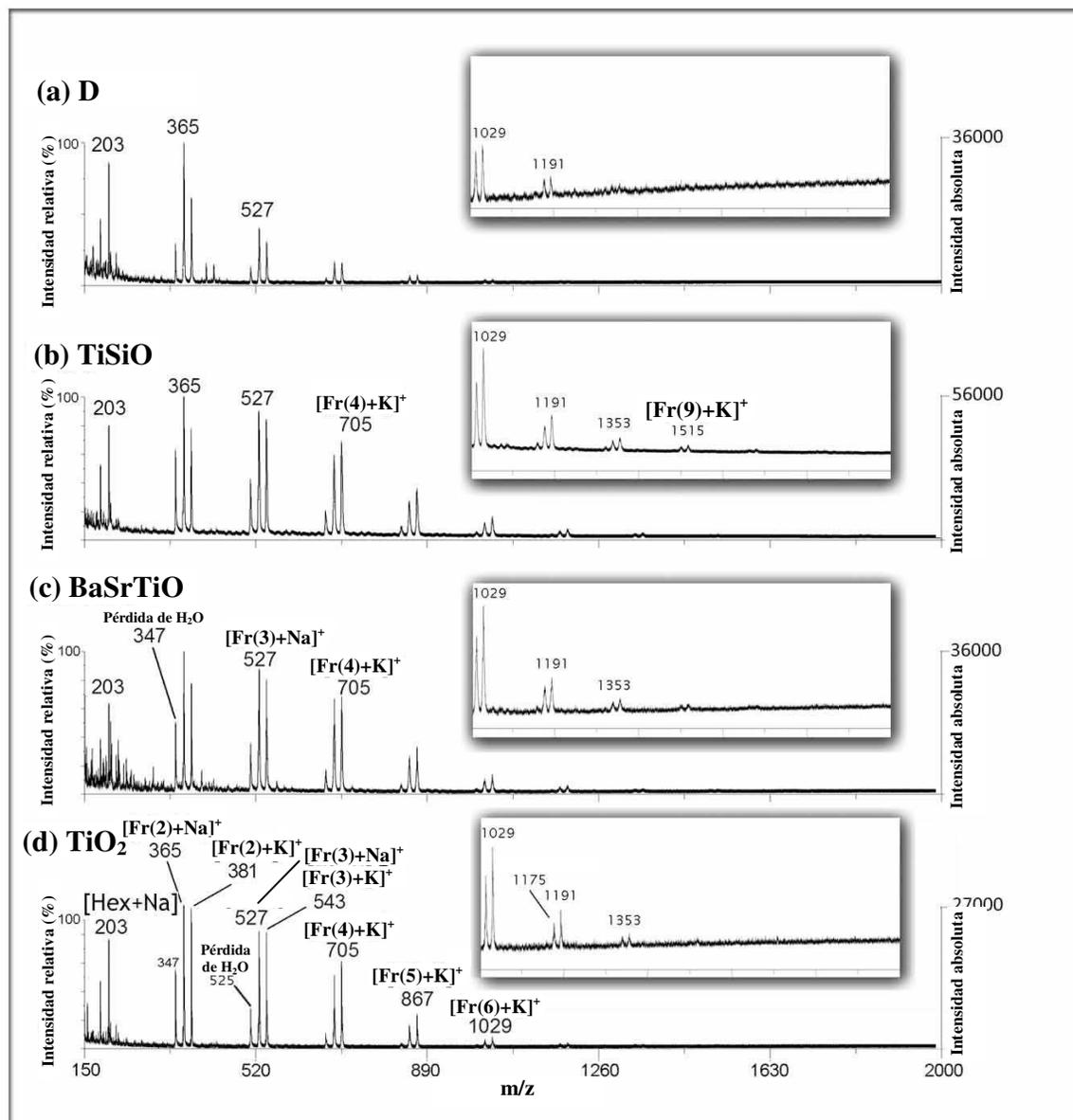
**Figura 5.14.** Espectro de masa UV-MALDI de tejido de bulbo de tulipán almacenado a 5°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (d) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-2000. Detalle del rango de m/z: 1000-2000. Las NPs fueron depositadas con asistencia de solvente sobre el tejido. Modo lineal positivo.



**Figura 5.15.** Espectro de masa UV-MALDI de tejido de bulbo de tulipán almacenados a (a) y (c) 5°C, (b) y (d) 17°C. Matriz: (a) y (b) TiO<sub>2</sub>, (c) y (d) TiSiO + BaSrTiO (1:1 mol/mol). Rango de m/z: 200-1680. Las NPs fueron depositadas con asistencia del solvente sobre el tejido. Modo lineal positivo.



**Figura 5.16.** Espectro de masa UV-MALDI de tejido de bulbo de ajo almacenado a 25°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (d) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-2000. Detalle del rango de m/z: 1500-3000. Las NPs fueron depositadas con asistencia del solvente sobre el tejido. Modo lineal positivo.

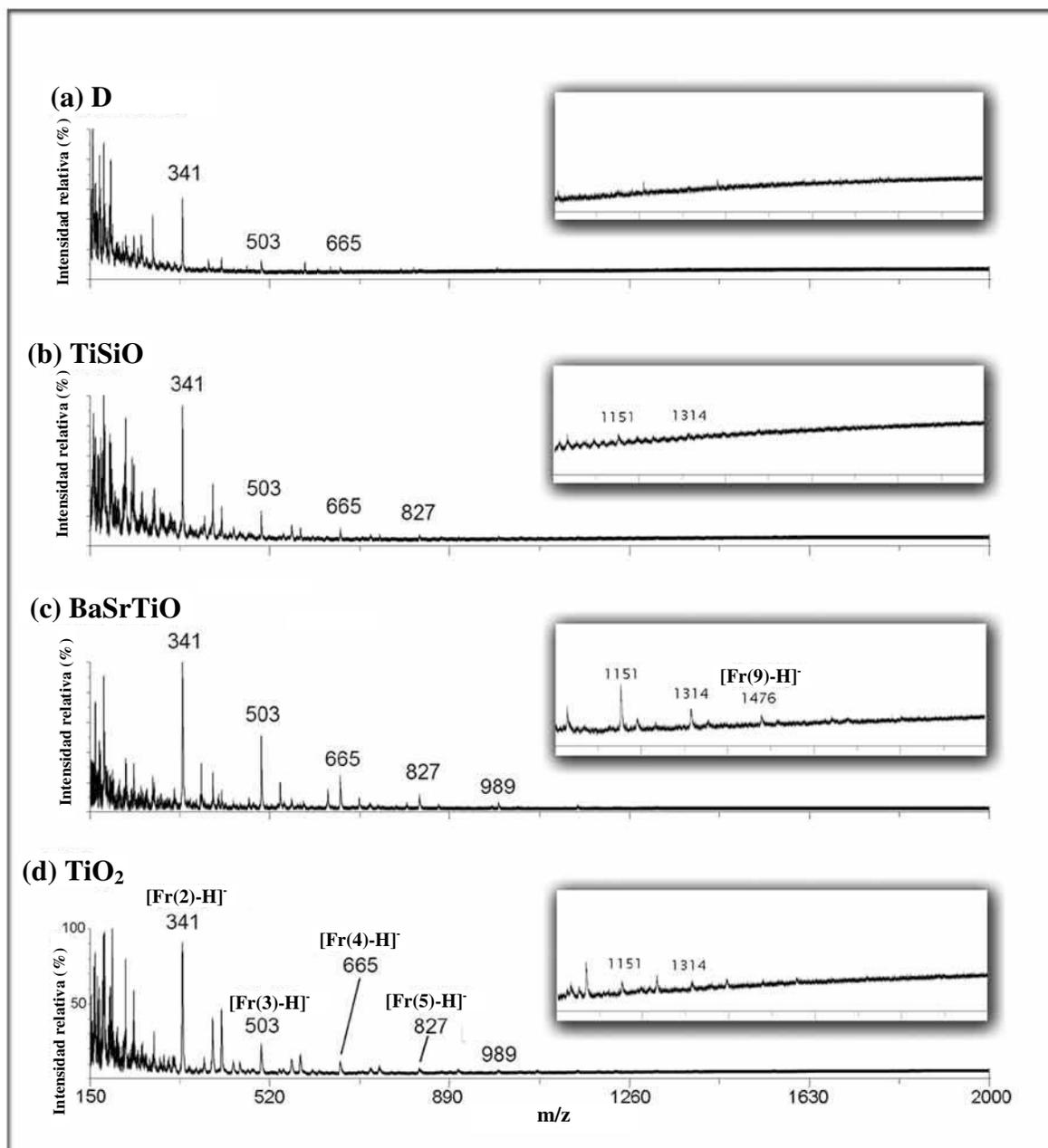


**Figura 5.17.** Espectro de masa UV-MALDI de fructanos extraídos a partir del bulbo de tulipán almacenado a 5°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (d) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-2000. Detalle del rango de m/z: 1000-2000. Modo lineal positivo.

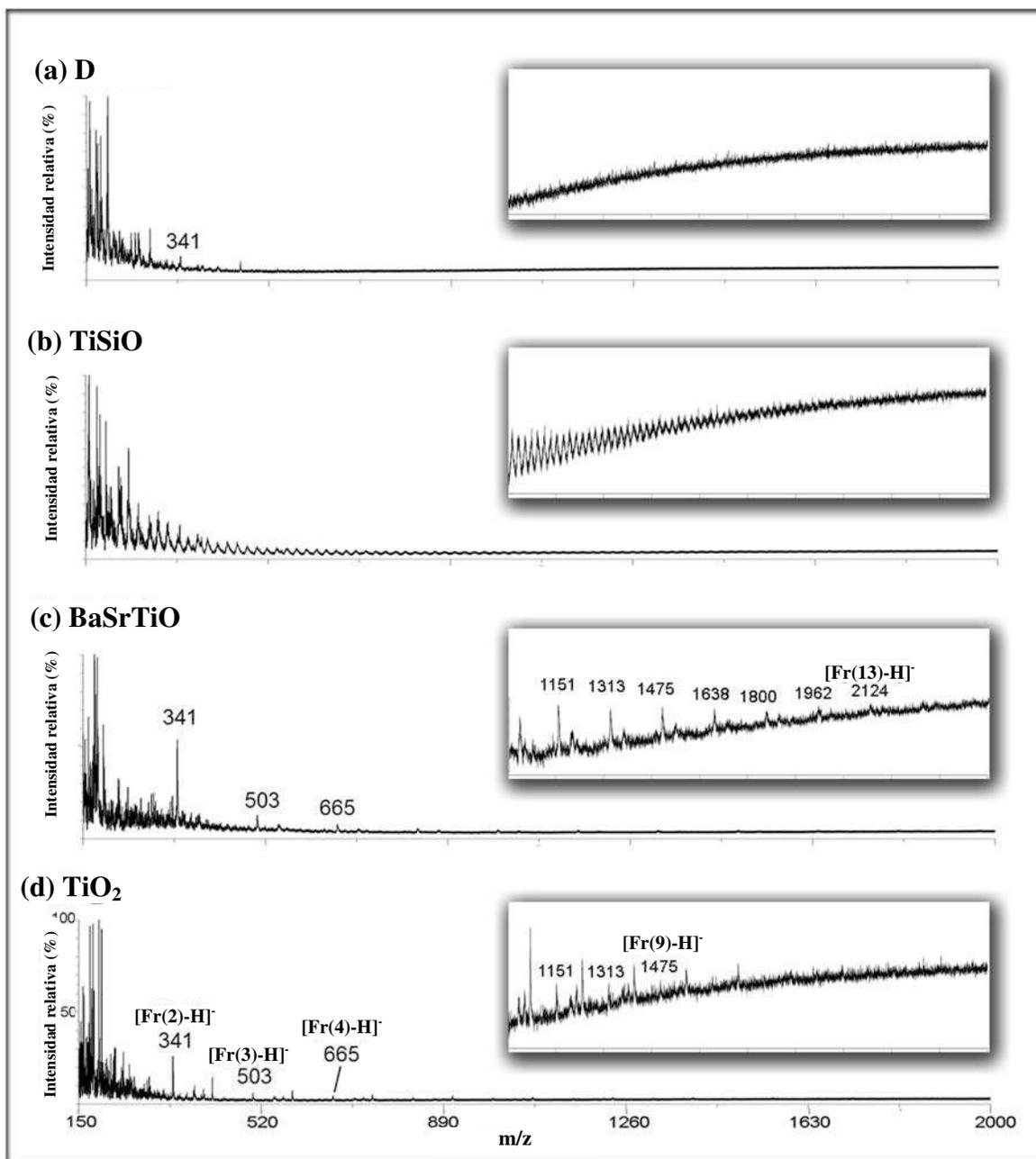
En el caso del análisis directo de tejido, debido a que una parte del calor producido por la irradiación UV de las NPs es usada para romper los enlaces puente de hidrógeno entre los azúcares y metabolitos presentes en la estructura del tejido, el daño (fragmentación) en las moléculas de los analitos resultó ser menor, lo que produjo una mejor calidad de los espectros obtenidos.

En el modo negativo, utilizando las NPs (exceptuando Ag), se obtuvieron señales debidas a la desprotonación de la Fr(2) y los fructanos provenientes del tejido, siendo BaSrTiO la matriz con la que se obtuvieron la mayor cantidad de señales (figuras 5.18 y 5.19). Al igual que lo observado en los resultados obtenidos en modo positivo, en el modo negativo la comparación entre el análisis por UV-MALDI MS del extracto de fructanos obtenido de tejido y el de tejido intacto mostró que la aplicación de las NPs como matrices en el tejido produjo muy buenos resultados en la detección de fructanos de alto valor de  $m/z$ . Nuevamente, con el BaSrTiO, se obtuvieron los mejores resultados (figura 5.20).

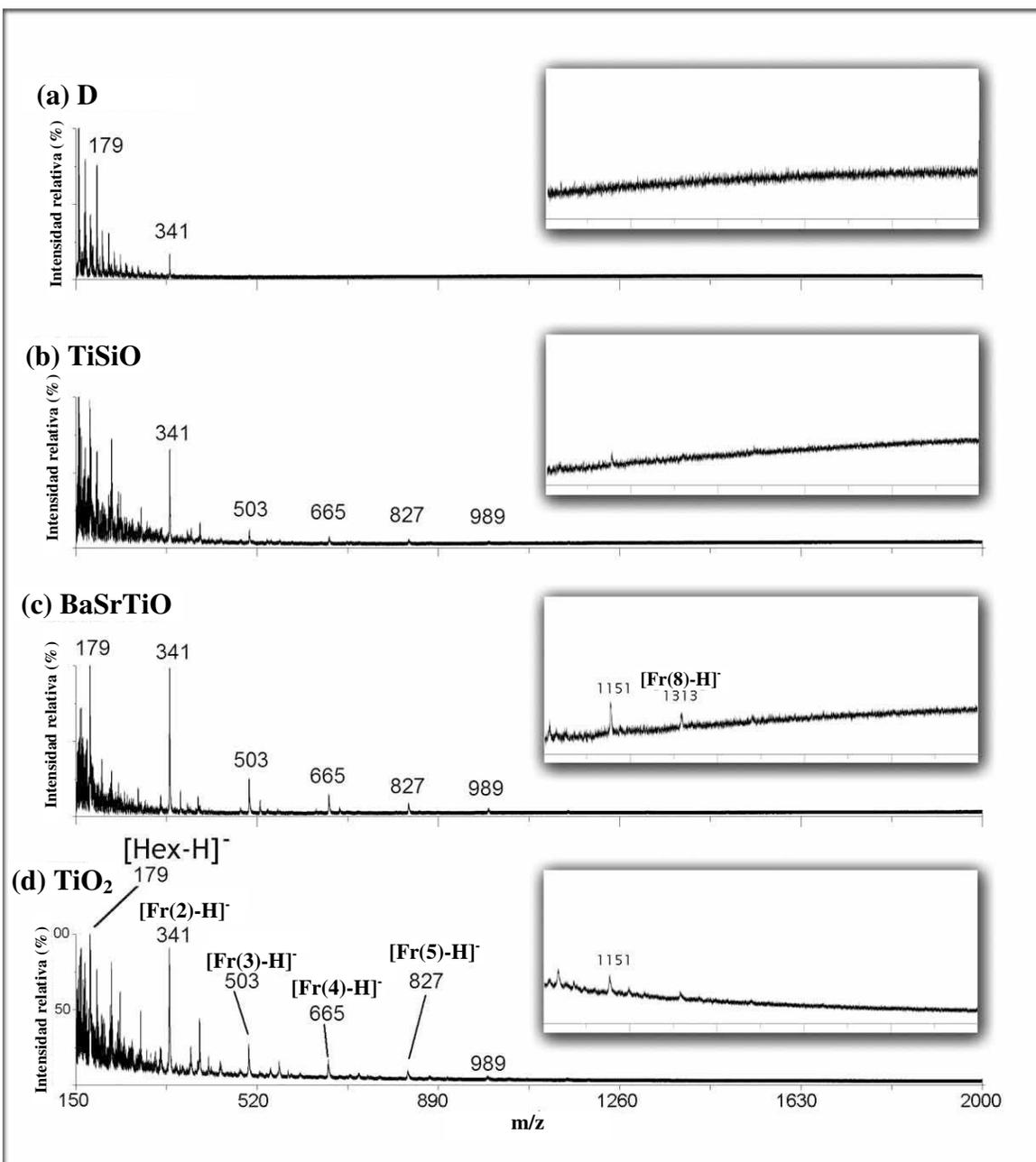
Finalmente, como es sabido, el almacenaje de los bulbos de tulipán a bajas temperaturas produce un incremento en el contenido de fructanos en los tejidos, especialmente de aquéllos de bajo peso molecular [39-41]. El estudio directo por UV-MALDI MS de tejidos de bulbos de tulipán mantenidos a 5 y 17°C durante 9 semanas, usando TiO<sub>2</sub> y la mezcla (TiSiO+BaSrTiO) como matrices, permitió caracterizar a los diferentes tejidos por su contenido de fructanos (figura 5.15). Estos resultados demuestran que el método es sensible al cambio de concentración de los denominados “hidratos de carbono solubles” en tejidos cuando se lo usa para análisis cualitativo y cuantitativo aproximado del tejido *in situ*.



**Figura 5.18.** Espectro de masa UV-MALDI del tejido del bulbo de tulipán almacenado a 5°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (d) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-2000. Detalle del rango de m/z: 1000-2000. Las NPs fueron depositadas con asistencia del solvente sobre el tejido. Modo lineal negativo.



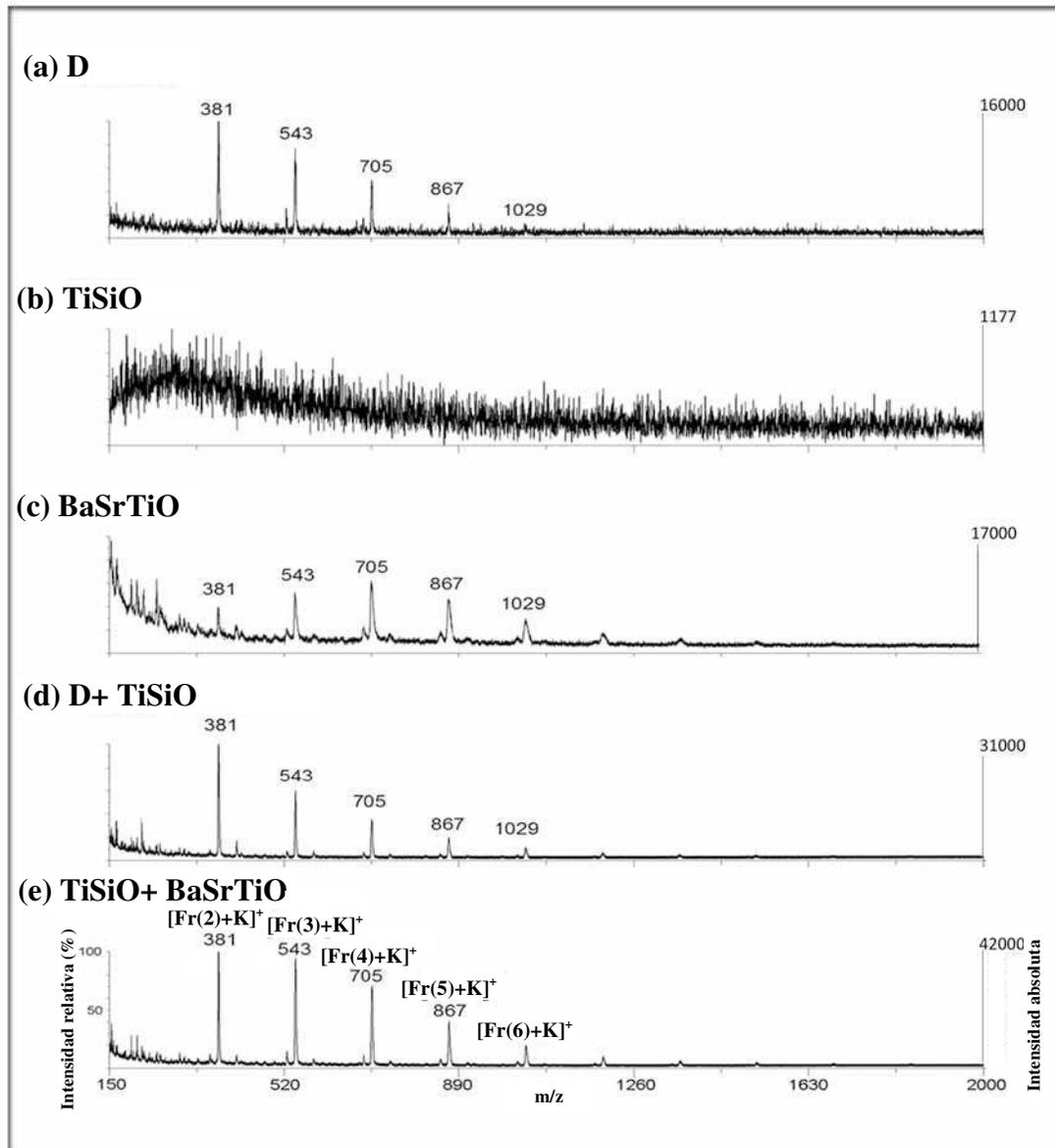
**Figura 5.19.** Espectro de masa UV-MALDI del tejido del bulbo de ajo almacenado a 25°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (d) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-2000. Detalle del rango de m/z: 1500-3000. Las NPs fueron depositadas con asistencia del solvente sobre el tejido. Modo lineal negativo.



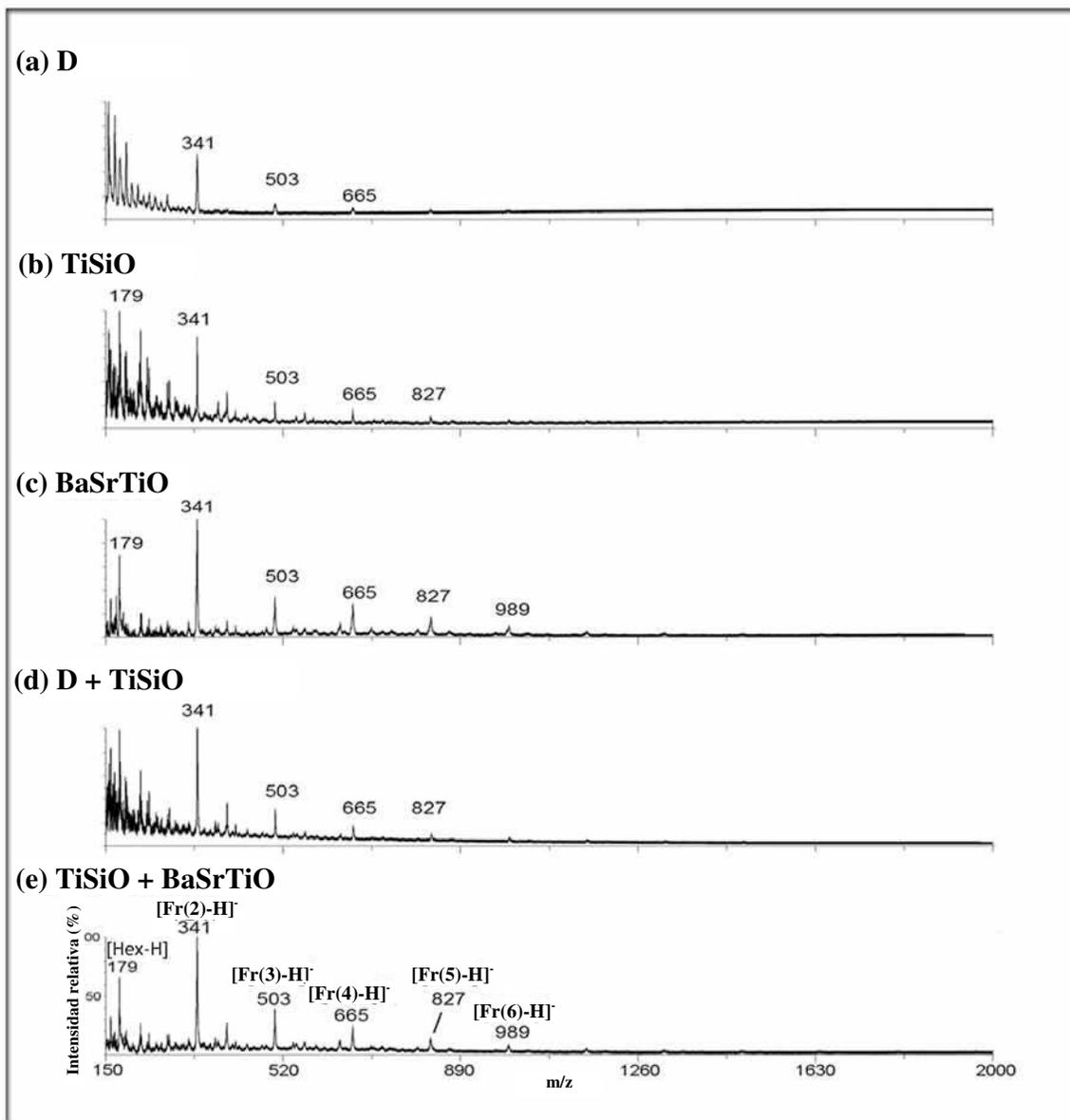
**Figura 5.20.** Espectro de masa UV-MALDI de fructanos extraídos a partir del tejido de bulbo de tulipán almacenado a 5°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO y (d) TiO<sub>2</sub>. Rango de m/z: 150-2000. Detalle del rango de m/z: 1000-2000. Modo lineal negativo.

### 5.3.3 Análisis directo de tejido intacto (análisis *in situ*). Deposición de NPs sin auxilio de solvente

Los análisis realizados en el modo positivo utilizando NPs como matrices, transferidas éstas a la superficie del tejido con y sin asistencia de solvente, mostraron resultados diferentes. Mientras que en el segundo caso el TiSiO no actuó como matriz, el BaSrTiO produjo una alta cantidad de señales de clusters y la intensidad relativa de las correspondientes a los fructanos fue baja. Sin embargo, tanto el D como la mezcla de distintas NPs permitieron incrementar el número, la intensidad de las señales y su resolución al trabajar en ausencia del solvente (figura 5.21, D + TiSiO y BaSrTiO + TiSiO). Este resultado favorable con D puede deberse a su baja actividad química y fotoquímica. En el modo negativo se observó que la transferencia de NPs sin solvente mejoró la calidad del espectro de la mezcla de Fr naturales, obteniéndose señales con una relación S/R similar a la obtenida cuando se efectuó la transferencia de las NPs con solvente (figura 5.22).

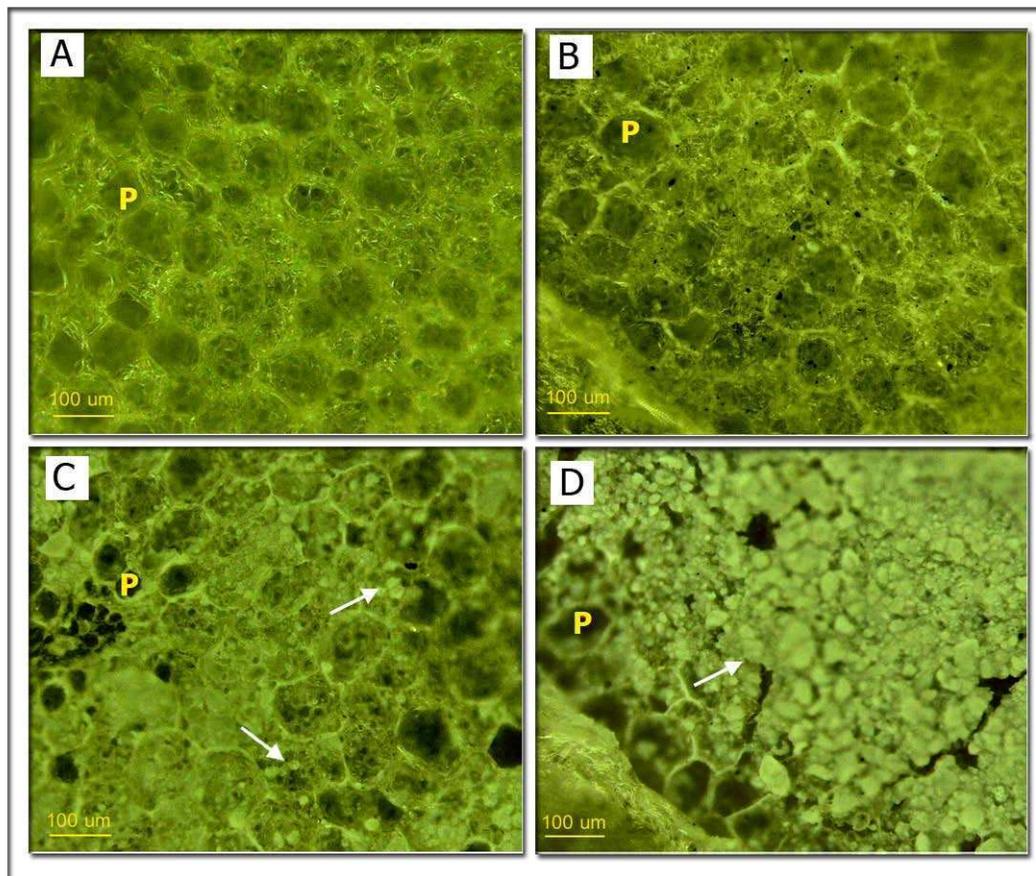


**Figura 5.21.** Espectro de masa UV-MALDI del tejido de bulbo de tulipán almacenado a 5°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO, (d) D+TiSiO y (e) TiSiO+BaSrTiO. Rango de m/z: 150-2000. Las NPs fueron depositadas sin auxilio de solvente. Modo lineal positivo.



**Figura 5.22.** Espectro de masa UV-MALDI del tejido de bulbo de tulipán almacenado a 5°C. Matriz: (a) D, (b) TiSiO, (c) BaSrTiO, (d) D+TiSiO y (e) TiSiO+BaSrTiO. Rango de m/z: 150-2000. Las NPs fueron depositadas sin auxilio de solvente. Modo lineal negativo.

Por último, se registraron imágenes digitales del tejido de bulbo de tulipán para observar la morfología de su superficie, mediante un microscopio digital Keyence VHX-900 (figura 5.23). Se observó que, en general, se lograba una alta uniformidad en la distribución de las NPs sobre la superficie del tejido con asistencia de solvente, utilizando una suspensión de NPs previamente mezcladas en un vórtex (figura 5.23 (B)). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los movimientos convectivos dentro de la alícuota líquida depositada sobre el tejido y los del solvente mismo pueden producir irregularidades en la distribución de las NPs. Se debe tener en cuenta que altas cantidades de agregados de NPs encontrados en los envases comerciales disminuye la uniformidad de distribución de las mismas sobre el tejido (figura 5.23 (C)). Esto podría afectar significativamente el análisis, por lo que dichos agregados deben ser removidos antes de iniciar el estudio (uso de mortero de ágata y vórtex). Además, cuando se colocaban NPs obtenidas a partir de suspensiones viejas o mal mezcladas sobre el tejido, utilizando la transferencia asistida por solvente, se producía una agregación de las NPs que resultaba en un aspecto de cubierta continua o de cáscara, la cual suprimía tanto las señales de los analitos como de las NPs mismas (figura 5.23 (D)).



**Figura 5.23.** Inspección morfológica del tejido de bulbo de tulipán. (A) tejido nativo. (B) tejido cubierto con NPs de BaSrTiO proveniente de una suspensión (asistencia de solvente), (C) tejido cubierto con NPs de BaSrTiO depositado por el método en ausencia solvente y mezcladas previamente en un vórtex, (D) tejido cubierto con NPs de BaSrTiO, no mezcladas en un vórtex. La P indica la presencia de parénquima celular (donde se almacenan los hidratos de carbono).

## 5.4 CONCLUSIONES

Las NPs de D, Ag, TiO<sub>2</sub>, TiSiO, BaSrTiO y sus mezclas pueden ser usadas como matrices para el análisis directo, *in situ*, por espectrometría de masa UV-MALDI de los hidratos de carbono neutros denominados solubles, presentes en tejidos vegetales. Sin embargo, si bien la naturaleza de la interacción con la luz UV-visible y la poca reactividad química de las NPs en el estado basal (estado electrónico fundamental) las hace potenciales

matrices para el análisis *in situ* por UV-MALDI MS de hidratos de carbono de tejidos, en la práctica estas NPs muestran diferentes capacidades como matrices relacionadas con las diferencias en tamaño (superficie activa), estructura, composición y propiedades químicas y fotoquímicas de cada una. Incluso, la capacidad para la DI parecería depender de las interacciones entre su superficie y el solvente de transferencia y su superficie y los componentes del tejido. Adicionalmente, la interacción entre NPs y los analitos también parece influenciar la capacidad de DI de las mismas. En los análisis llevados a cabo en ausencia de solvente de transferencia, los tejidos en diferentes estados de deshidratación (sequedad) generaron espectros de diferente calidad, lo que sugiere que la abundancia relativa de moléculas de agua en el tejido afecta en forma directa las propiedades de DI de las NPs al modificar la interacción directa de las mismas con el tejido y sus metabolitos.

Por otro lado, se observaron con mayor intensidad señales de Fr de alto peso molecular en los estudios directos del tejido (análisis *in situ*), respecto de los análisis de los extractos obtenidos de los mismos y depositados sobre las NPs. La detección de analitos de mayor peso molecular puede estar relacionada con la presencia de altas cantidades de agua y cationes (especialmente  $K^+$ ) en los tejidos, resultando en una ionización más suave, y consecuentemente, menos fragmentación y mayor estabilidad para las moléculas de alto peso molecular durante su análisis por UV-MALDI MS. Adicionalmente, no debe descartarse una baja eficiencia de su extracción a partir de tejido vegetal mediante el uso de solventes, problema que se soluciona al efectuar el análisis directo del tejido intacto (UV-MALDI MS *in situ*).

Finalmente, dado que la concentración de azúcares solubles en los tejidos es del orden de 0,1 a 1 M, el uso de NPs como matrices UV-MALDI (excepto la Ag) permite garantizar la detección de los mismos en los tejidos vegetales, debido a que se pudieron

detectar niveles muy bajos de fructanos en los análisis realizados en este proyecto (LOD expresado como pmoles de Fr(3) depositados sobre el electrodo portamuestras). Este aspecto es muy importante para el análisis de ciertos hidratos de carbono que se encuentran naturalmente en baja concentración, como los de alto peso molecular, que podrían no ser detectados al efectuar su análisis ya que este es fuertemente dependiente de la matriz y la metodología de preparación de la muestra que se utilice.

## 5.5 REFERENCIAS

- [1] Stahl, B., Linos, A., Karas, M., Hillenkamp, F., Steup, M. Analysis of fructans from higher plants by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, (1997), 246, 195–204.
- [2] Robinson, S., Warburton, K., Seymour, M., Clench, M., Thomas, J. Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. New Phytol.*, (2007), 173, 438–444.
- [3] Gholipour, Y., Nonami, Y., Erra-Balsells, R. Application of pressure probe and UV-MALDI TOF MS for direct analysis of plant underivatized carbohydrates in sub-picoliter single-cell cytoplasm extract. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2008), 19, 1841-1848.
- [4] Gholipour, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R. In situ analysis of plant tissue underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix. *Anal. Biochem.*, (2008), 383, 159-167.
- [5] Harvey, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.*, (1999), 18, 349-451.

[6] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update covering the period 1999–2000. *Mass Spectrom. Rev.*, (2006), 25, 595– 662.

[7] Harvey, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update covering the period 2001-2002. *Mass Spectrom. Rev.*, (2008), 27, 125–201.

[8] Nonami, H., Fukui, S., Erra-Balsells, R.  $\beta$ -Carbolines alkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: A comparative study using phenylcabonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *J. Mass Spectrom.*, (1997), 32, 287-296.

[9] Schmid, G. Nanoparticules. From theory to applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, Alemania, (2004).

[10] Watanabe, K., Menzel, D., Nilus, N., Freund, H.-J. Photochemistry on metal nanoparticles. *Chem. Rev.*, (2006), 106, 4301-4320.

[11] Grela, M. A., Loeb, B., Restrepo, G. M., Lagorio, M. G., San Román, E. Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea. Uso de óxidos semiconductores y materiales relacionados para aplicaciones en ambientes y ópticas. CIEMAT, Madrid, España, (2004).

[12] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. Protein and polymer analyses with  $m/z$  10000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1988), 2, 151-153.

[13] Sunner, J., Dratz, E., Chen, Y. C. Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Anal. Chem.*, (1995), 67, 4335-4342.

- [14] Xu, S., Li, Y., Zou, H., Qiu, J., Guo, Z., Guo, B. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (2003), 75, 6191-6195.
- [15] Pan, C., Xu, S., Hu, L., Su, X., Ou, J., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Y., Guo, B. Using oxidized carbon nanotubes as matrix for analysis of small molecules by MALDI-TOF MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2005), 16, 883-892.
- [16] Lee, K. H., Chiang, C. K., Lin, Z. H., Chang, H. T. Determining enediol compounds in tea using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with titanium dioxide nanoparticle matrices. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2007), 21, 2023-2030.
- [17] Lorkiewicz, P., Yappert, M. C. Titania microparticles and nanoparticles as matrixes for in vitro and in situ analysis of small molecules by MALDI-MS. *Anal. Chem.*, (2009), 81, 6596-6603.
- [18] Sluszný, C., Yeung, E. S., Nikolau, B. J. In-situ probing of the biotic-abiotic boundary of plants by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2005), 16, 107-115.
- [19] Castellana, E. T., Sherrod, S. D., Russell, D. H. Nanoparticles for selective laser desorption/ionization in mass spectrometry. *JALA*, (2008), 13, 330-334.
- [20] Chiu, T. C., Chang, L. C., Chiang, C. K., Chang, H. T. Determining estrogens using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with silver nanoparticles as the matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2008), 19, 1343-1346.
- [21] Shrivastava, K., Wu, H. F. Applications of silver nanoparticles capped with different functional groups as the matrix and affinity probes in surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and atmospheric pressure matrix-assisted laser

desorption/ionization ion trap mass spectrometry for rapid analysis of sulfur drugs and biothiols in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2008), 22, 2863-2872.

[22] Wen, X., Dagan, S., Wysocki, V. H. Small-molecule analysis with silicon-nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, (2007), 79, 434-444.

[23] McLean, J. A., Stumpo, K. A., Russell, D. H. Size-selected (2-10 nm) gold nanoparticles for matrix assisted laser desorption ionization of peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, (2005), 127, 5304-5305.

[24] Su, C. L., Tseng, W. L. Open-bench method for the preparation of BaTiO<sub>3</sub>, SrTiO<sub>3</sub> and Ba<sub>x</sub>Sr<sub>1-x</sub>-TiO<sub>3</sub> nanocrystals at 80° C. *Anal. Chem.*, (2007), 79, 1626-1633.

[25] Watanabe, T., Kawasaki, H., Yonezawa, T., Arakawa, R. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles. *J. Mass Spectrom.*, (2008), 43, 1063-1071.

[26] Wei, L. M., Xue, Y., Zhou, X. W., Jin, H., Shi, Q., Lu, H. J., Yang, P. Y. Nanodiamond MALDI support for enhancing the credibility of identifying proteins. *Talanta*, (2008), 74, 1363-1370.

[27] Zhang, H., Cha, S., Yeung, E. S. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MS<sup>n</sup> of small molecules. 2. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits. *Anal. Chem.*, (2007), 79, 6575-6584.

[28] Rodriguez, R., Blesa, M. A.; Regazzoni, A. E. Surface complexation at the TiO<sub>2</sub> (anatase)/ aqueous solution interface: Chemisorption of catechol. *J. Coll. and Int. Sci.*, (1996), 177, 122-131.

- [29] Yu, Z., Chen, L. C., Suzuki, H., Ariyada, O., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. Direct análisis of plant tissues by probe electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, (2009), 20, 2304-2311.
- [30] Hoffmann, M. R., Martin, S. T., Choi, W. Y., Bahnemann, D. W. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem. Rev.*, (1995), 95, 69-96.
- [31] Andreson, C., Bard, A. J. An improved photocatalyst of  $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$  prepared by a sol-gel synthesis. *J. Phys. Chem.*, (1995), 99, 9882-9885.
- [32] Nur, H. Modification of titanium surface of titania by attachment of silica nanoparticles. *Mat. Sci and Eng. B*, (2006), 133, 49-54.
- [33] Muller, B. R., Majoni, S., Meissner, D., Memming, R. Photocatalytic oxidation of ethanol on micrometer-and nanometer-sized semiconductor particles. *J. Photochem Photobiol. A.*, (2002), 151, 253-265.
- [34] Molinari, A., Montoncello, M., Rezala, H. , Maldotti, A. Partial oxidation of allylic and primary alcohols with  $\text{O}_2$  by photoexcited  $\text{TiO}_2$ . *Photochem. Photobiol. Sci.*, (2009), 8, 613-619.
- [35] Blesa, M. A., Morando, P. J., Regazzoni, A. E. *Chemical Disolution of Metal Oxides*, CRC Press, Boca Raton, USA, (1994).
- [36] Regazzoni, A. E., Mandelbaum, P. A., Matsusyoshi, M., Shiller, S., Bilmes, S. A., Blesa, M. A. Adsorption and photooxidation of salicylic acid on titanium dioxide: A surface complexation description. *Langmuir*, (1998), 14, 868-874.
- [37] Pena, M. A., Fierro, J. L. G. Chemical structures and performance of perovskite oxides. *Chem.Rev.*, (2001), 101, 1981-2018.

[38] Boudou, J-P., Curmi, P. A., Jelezko, F., Wrachtrup, J., Aubert, P., Sennour, M., Balasubramanian, G., Reuter, R., Thorel, A., Gaffet, E. High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds. *Nanotechnology*, (2009), 20, 235-602.

[39] Moe, R., Wickström, A. The effect of storage temperature on shoot growth, flowering, and carbohydrate metabolism in tulip bulbs. *Physiol Plant.*, (1973), 28, 81-87.

[40] Haaland, E., Wickström, A. The effect of storage temperature on carbohydrate interconversion in tulip bulbs. *Acta Hortic.*, (1975), 47, 371-376.

[41] Lambrechts, H., Rook, F., Kolloffell, C. Carbohydrate status of tulip bulbs during cold-induced flower stalk elongation and flowering. *Plant Physiol.*, (1994), 10, 515-520.



Los apéndices 1 y 2 y la sección resumen y conclusiones fueron retirados a pedido del autor

Appendixes 1 and 2 and abstract and conclusions have been withdrawn at author's request