



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

**Líquidos iónicos orgánicos como matrices MALDI
para el análisis de hidratos de carbono.
Una aproximación térmica, fotoquímica y óptica
para la comprensión de su comportamiento.**

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

Lic. Tobías Schmidt De León

Directora de tesis y consejera de estudios: Dra. Rosa Erra-Balsells
Directora asistente: Dra. María Laura Salum

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica – FCEN – UBA.
CIHIDECAR, CEQUIBIEM. CONICET.

Buenos Aires 2023

Líquidos iónicos orgánicos como matrices MALDI para el análisis de hidratos de carbono.

Una aproximación térmica, fotoquímica y óptica para la comprensión de su comportamiento.

Resumen

En este trabajo de tesis se analiza el uso de líquidos iónicos como matrices (LIMs) en comparación con las matrices orgánicas clásicas cristalinas para el estudio de hidratos de carbono de bajo peso molecular mediante la técnica MALDI-MS (*Matrix assisted Laser desorption ionization Mass Spectrometry*). Los LIMs presentan algunas ventajas frente a las matrices clásicas tales como mayor homogeneidad de la muestra, lo que mejora en la reproducibilidad de los resultados, aumento en la relación señal-ruido y disminución de los iones propios de la matriz. Principalmente el aumento de la homogeneidad es descrito como un aumento de la homogeneidad óptica de la matriz al pasar de las matrices clásicas a sus respectivos LIs.

En este trabajo se aborda la investigación de LIMs formados por las matrices ácidas E- α -ciano-4-hidroxicinámico (ECHCA), E-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ESA) y Z-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ZSA) y aminas alifáticas, variando la longitud de la cadena, ramificación y funcionalidad. También se estudiaron LIs con aminas aromáticas, incluyendo la matriz básica norharmano (nHo). Comparativamente se evaluó el desempeño de estas matrices con hidratos de carbono de distinto peso molecular, considerando la eficiencia como matriz y la relación, de existir, entre la homogeneidad óptica y química de la muestra. Además, se analizó la estabilidad fotoquímica y térmica de las matrices, en solución y en fase sólida por técnicas espectroscópicas, calentamiento en solución (microondas, MW) y en fase sólida y las técnicas de calorimetría de barrido diferencial (DSC) y termogravimetría (TGA).

Como parte del proyecto, se estudió la formación de complejos moleculares entre los isómeros ESA y ZSA y azúcares de bajo peso molecular mediante la técnica ESI-MS (*Electrospray ionization Mass Spectrometry*). Estos resultados contribuyen a comprender el comportamiento de las matrices MALDI en el análisis de hidratos de carbono y proporcionan información relevante para su aplicación en experimentos MALDI-MS.

Palabras claves: Espectrometría de masa, MALDI, ESI, matrices, hidratos de carbono, fotoquímica, química térmica.

Organic ionic liquids as MALDI matrices for carbohydrate analysis. A thermal, photochemical and optical approach to the understanding of their behaviour.

Abstract

This thesis work analyzes the use of ionic liquids as matrices (LIMs) in comparison with classical crystalline organic matrices for the study of low molecular weight carbohydrates by MALDI-MS (Matrix assisted Laser desorption ionization Mass Spectrometry). LIMs have some advantages over classical matrices such as greater homogeneity of the sample, which improves the reproducibility of the results, increase in the signal-to-noise ratio and decrease of the matrix ions. Mainly the increase in homogeneity is described as an increase in the optical homogeneity of the matrix when passing from the classical matrices to their respective LIs.

In this work, we addressed the investigation of LIMs formed by the acidic matrices E- α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (ECHCA), E-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (ESA) and Z-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (ZSA) and aliphatic amines, varying chain length, ramification and functionality. LIs with aromatic amines, including the basic matrix norharmane (nHo), were also studied. Comparatively, the performance of these matrices with carbohydrates of different molecular weight was evaluated, considering the efficiency as a matrix and the relationship, if it exists, between the optical and chemical homogeneity of the sample. In addition, the photochemical and thermal stability of the matrices, in solution and in solid phase, were analyzed by spectroscopic techniques, heating in solution (microwaves, MW) and in solid phase and the techniques of differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TGA).

As part of the project, the formation of molecular complexes between ESA and ZSA isomers and low molecular weight sugars was studied by ESI-MS (Electrospray ionization Mass Spectrometry). These results contribute to the understanding of the behavior of MALDI matrices in carbohydrate analysis and provide relevant information for their application in MALDI-MS experiments.

Keywords: Mass spectrometry, MALDI, ESI, matrices, carbohydrates, photochemistry, thermal chemistry.

A mi hermano Elías, por acompañarme desde siempre

A mi mamá Teresa, por impulsarme y contenerme en cada paso que doy

A mi papá Juan Carlos, por ayudarme en cada etapa

A mi sobrina Lara, para alentarla a soñar

A mis compañeros de vida, Lucas y Puchaki, por tanto amor, tanta contención. Esta familia que sin importar lo que suceda, uno siempre se siente ... completo, en armonía.

A la memoria de los que ya no están, mi tío Jorge e Ian

A Rosa por permitirme y alentarme a realizar este trabajo. Por siempre estar presente, tanto en lo profesional como en lo personal. Por compartir sus conocimientos y experiencia en cada etapa. Por siempre incluirme, con un voto de confianza, en sus proyectos científicos. Aprecio enormemente su tono de voz sereno y la expresión de sus ojos detrás de los lentes que te dicen todo. Tengo la seguridad de que esta relación personal y científica que hemos construido durará mucho tiempo.

Esta tesis es el resultado de la colaboración, tanto directa como indirecta, de varias personas, cada una aportando desde su propia perspectiva y de manera única. Estoy infinitamente agradecido con cada uno de ellos.

En primer lugar quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis. Al ANPCyT y al CONICET por las becas concedidas para realizar este trabajo. Al Departamento de Química Orgánica de la FCEyN y al CIHIDECAR, por el lugar de trabajo y el acceso a la infraestructura necesaria. A la Universidad de Buenos Aires por permitirme realizar un doctorado de excelente nivel de forma gratuita. Gracias a la universidad pública Argentina.

A Laura por enseñarme el trabajo y la manualidad en un laboratorio de química orgánica, por compartir su trabajo científico y su apoyo en el ámbito docente.

A mis compañeros del L1, Gaby, Mati, Oscar y Sergio, por ayudarme siempre que necesité y por sus palabras de aliento.

A Maru por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza y por ayudarme a realizar un gran trabajo. Una persona a la que admiro enormemente. A todo el equipo de Espectrometría de masa del CIBION, un hermoso grupo, siempre dispuestos a enseñar y ayudar al resto Invaluable.

Al grupo del CEQUIBIEM, Pía, Richard y Germán, por la enorme predisposición a enseñar y ayudar con el uso de los equipos y por la buena compañía durante las interminables horas de medición.

Al grupo del L13, Lucas, Vero, Eva, Nico, Agus, Vero y Dani, que ha sido un refugio donde compartir las alegrías y frustraciones de esta tesis, que siempre acompañaron con un café y algo dulce para picar. A Martín, quien no solo me brindó un gran apoyo emocional, sino que también contribuyó a la obtención de parte de los resultados presentados en este trabajo. A mi amigo Guille, con quien conectamos desde el primer día y compartimos muchas cosas, siempre dispuesto a dar un consejo químico y personal y a ayudar en todo lo que estuviese a su alcance.

A Pablito, por la compañía de siempre, por esas horas compartidas en la escritura de la tesis.

A al Dra. Gabriela Lagorio del grupo de fotoquímica del INQUIMAE, por la buena predisposición, las explicaciones y por facilitarme el uso de los equipos.

A la Dra. Carla Spagnuolo y a su grupo de trabajo por enseñarme y facilitarme el uso de los equipos.

A los compañeros tesisistas que transitaron este trabajo a la par. A los docentes del DQO con los que compartí los turnos de TP.

Al personal no docente del DQO, Mica, Nancy, Gabi y Sergio, por la paciencia, por la buena onda y la enorme predisposición a ayudar.

A mi tía Marita, por recibirme cuando me mudé a Buenos Aires y por apoyarme desde los comienzos. Por las charlas y por siempre tener listo un mate con algo rico para comer.

A mis hermanitos de la vida, Lu, Agus, Sebi, Fio, Belu, Nati, Caro y Chechu, por siempre estar, por compartir mis alegrías, por alentarme en mis decisiones, por contenerme en los momentos difíciles, por ser incondicionales.

Índice

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 5 |
| ÍNDICE..... | 10 |
| ABREVIATURAS Y TÉRMINOS EN INGLÉS | 14 |
| REACTIVOS: ESTRUCTURA Y MASA EXACTA | 18 |
| CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN | 23 |
| • Preparación de la muestra..... | 25 |
| • Matriz | 26 |
| • Mecanismos de ionización | 30 |
| ♦ Proceso de desorción/ablación | 30 |
| ♦ Mecanismos de ionización primarios | 31 |
| ♦ Mecanismos de ionización secundarios | 34 |
| • Analizador de masa | 35 |
| • Líquidos iónicos como matrices | 37 |
| 1.1 REFERENCIAS..... | 41 |
| CAPÍTULO 2 : LÍQUIDOS IÓNICOS CON AMINAS ALIFÁTICAS COMO MATRICES EN MALDI-MS. | |
| ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO DE BAJO PESO MOLECULAR..... | 47 |
| 2.1 INTRODUCCIÓN | 47 |
| 2.2 EXPERIMENTAL..... | 52 |
| 2.2.1 <i>Materiales y métodos</i> | 52 |
| 2.2.2 <i>Preparación de muestras para MALDI-MS</i> | 54 |
| 2.2.3 <i>Límite de detección (LOD)</i> | 55 |
| 2.2.4 <i>Estabilidad de los LIMs</i> | 55 |
| 2.2.5 <i>Espectrometría de masa MALDI</i> | 55 |
| 2.2.6 <i>Mapeo químico superficial por espectrometría de masa MALDI (imágenes MALDI-MS)</i> . | 56 |
| 2.2.7 <i>Espectroscopía de absorción UV-Visible y reflectancia difusa</i> | 57 |
| 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 57 |
| 2.3.1 <i>Caracterización de matrices</i> | 57 |
| 2.3.2 <i>Análisis por espectrometría de masa MALDI</i> | 63 |
| 2.3.2.1 <i>Desorción/ionización láser de los compuestos estudiados como matrices (LDI)</i> | 63 |
| 2.3.2.2 <i>Carbohidratos Neutros</i> | 71 |
| 2.3.2.2.1 <i>Mapeo químico superficial por EM MALDI.</i> | 79 |
| 2.3.2.2.2 <i>LOD y Estabilidad</i> | 88 |
| 2.3.2.3 <i>Carbohidratos Sulfatados</i> | 93 |
| 2.3.2.3.1 <i>Mapeo químico superficial por EM MALDI.</i> | 104 |

| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.3.2.3.2 | LOD y Estabilidad | 110 |
| 2.3.2.4 | Mezclas de matrices E/Z | 115 |
| 2.4 | CONCLUSIONES | 118 |
| 2.5 | REFERENCIAS | 124 |
| CAPÍTULO 3 : LÍQUIDOS IÓNICOS CON NORHARMANO COMO MATRICES EN MALDI-MS. ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO DE BAJO PESO MOLECULAR. | | 129 |
| 3.1 | INTRODUCCIÓN | 129 |
| 3.2 | EXPERIMENTAL..... | 129 |
| 3.2.1 | <i>Materiales y métodos.....</i> | <i>129</i> |
| 3.2.2 | <i>Preparación de muestras para espectrometría de masa MALDI.....</i> | <i>130</i> |
| 3.2.3 | <i>Límite de detección (LOD)</i> | <i>130</i> |
| 3.2.4 | <i>Estabilidad de los LIMs.....</i> | <i>130</i> |
| 3.2.5 | <i>Espectrometría de masa MALDI.....</i> | <i>130</i> |
| 3.2.6 | <i>Mapeo químico superficial por espectrometría de masa MALDI (imágenes MALDI-MS)</i> | <i>130</i> |
| 3.2.7 | <i>Espectroscopía de absorción UV-visible y reflectancia difusa.....</i> | <i>131</i> |
| 3.3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 131 |
| 3.3.1 | <i>Caracterización de las matrices</i> | <i>131</i> |
| 3.3.2 | <i>Análisis por espectrometría de masa MALDI</i> | <i>136</i> |
| 3.3.2.1 | <i>Desorción/ionización láser de los compuestos usados como matrices (LDI).....</i> | <i>136</i> |
| 3.3.2.2 | <i>Carbohidratos Neutros</i> | <i>141</i> |
| 3.3.2.2.1 | <i>Mapeo químico superficial por EM MALDI</i> | <i>153</i> |
| 3.3.2.2.2 | <i>Rango dinámico y límite de detección</i> | <i>155</i> |
| 3.3.2.2.3 | <i>Experimentos MALDI con matrices modelo análogas al ECHCA.nHo.....</i> | <i>157</i> |
| 3.3.2.3 | <i>Carbohidratos Sulfatados</i> | <i>160</i> |
| 3.4 | CONCLUSIONES | 163 |
| 3.5 | REFERENCIAS..... | 166 |
| CAPÍTULO 4 : ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS MATRICES MALDI ESTUDIADAS. | | 169 |
| 4.1 | INTRODUCCIÓN | 169 |
| 4.2 | EXPERIMENTAL | 173 |
| 4.2.1 | <i>Materiales y métodos.....</i> | <i>173</i> |
| 4.2.2 | <i>Estabilidad térmica en solución. Calentamiento por microondas.....</i> | <i>174</i> |
| 4.2.3 | <i>Estabilidad térmica en fase sólida</i> | <i>175</i> |
| 4.2.3.1 | <i>Termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> | <i>175</i> |
| 4.2.3.2 | <i>Escala preparativa (EP)</i> | <i>176</i> |
| 4.2.3.3 | <i>Punto de fusión.....</i> | <i>177</i> |
| 4.3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 177 |
| 4.3.1 | <i>Estabilidad térmica en solución</i> | <i>177</i> |
| | • <i>Ácidos sinapínicos (ESA y ZSA) y sus LIs con BAM y nHo.....</i> | <i>177</i> |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| • Ácidos férulicos (EFE y ZFE) y ácidos cumáricos (ECUM y ZCUM). | 182 |
| • Otros ácidos cinámicos. | 184 |
| • Ácidos α -cianocinámicos (CHCA, 4MCHCA, 4ClCHCA, 4FCHCA) | 187 |
| 4.3.2 Estabilidad térmica en fase sólida | 203 |
| • Ácidos sinapínicos (ESA y ZSA) y sus LIs con BAM | 203 |
| • Ácidos ferúlicos (EFE y ZFE), ácidos cumáricos (ECUM y ZCUM) y sus LIs con BAM | 209 |
| • Otros ácidos cinámicos. | 211 |
| • Ácido E- α -cianocinámico (ECHCA) y sus LIs | 216 |
| 4.4 CONCLUSIONES | 221 |
| 4.5 REFERENCIAS | 225 |
| CAPÍTULO 5 : ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA DE LAS MATRICES MALDI ESTUDIADAS | 231 |
| 5.1 INTRODUCCIÓN | 231 |
| 5.2 EXPERIMENTAL | 234 |
| 5.2.1 Materiales y métodos..... | 234 |
| 5.2.2 Método general de irradiación..... | 235 |
| 5.2.3 Espectroscopía de absorción y emisión (Fluorescencia) UV-Vis..... | 236 |
| 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 237 |
| 5.3.1 Ácidos sinapínicos (ESA y ZSA), análogos y sus LIs..... | 237 |
| • Espectro de absorción UV-Vis y emisión fluorescente. | 237 |
| • Fotoquímica | 240 |
| 5.3.2 Ácido α -cianocinámico (ECHCA), análogos y sus LIs (BAM y nHo)..... | 244 |
| • Espectro de absorción UV-Vis y emisión fluorescente. | 244 |
| • Fotoquímica | 248 |
| 5.4 CONCLUSIONES | 252 |
| 5.5 REFERENCIAS | 254 |
| CAPÍTULO 6 : ESTUDIO DE COMPLEJOS MOLECULARES POR ESI-MS ENTRE LAS MATRICES MALDI ESA Y ZSA CON CARBOHIDRATOS. | 259 |
| 6.1 INTRODUCCIÓN | 259 |
| 6.2 EXPERIMENTAL..... | 261 |
| 6.2.1 Materiales y métodos..... | 261 |
| 6.2.2 Síntesis y caracterización de los ligandos | 262 |
| 6.2.3 Preparación de muestras para ESI-MS..... | 263 |
| 6.2.4 Experimentos de titulación competitiva..... | 263 |
| 6.2.5 Espectrometría de masa ESI (ESI-SQ-EM) | 263 |
| 6.2.6 Espectrometría de masa Tandem (ESI-QToF-MS/MS) | 264 |
| 6.2.7 Análisis de datos | 264 |
| 6.2.8 Modelado Molecular | 265 |
| 6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 266 |

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.3.1 | <i>Espectro de masa ESI y eficiencia de ionización: ligandos (ZSA, ESA y ESA-d6)</i> | 267 |
| 6.3.2 | <i>Espectro de masa ESI y eficiencia de ionización: carbohidratos (Carbs)</i> | 269 |
| 6.3.3 | <i>Afinidades de unión en complejos no covalentes [Ácido+Carb]</i> | 271 |
| 6.3.4 | <i>Comparación cualitativa de las constantes de unión: titulación competitiva</i> | 275 |
| 6.3.5 | <i>Estabilidad en fase gaseosa de los complejos no covalentes [Ácido+Carb]</i> | 276 |
| 6.3.6 | <i>Modelado molecular: estereoquímica, HOMO y propiedades QSAR</i> | 280 |
| 6.4 | CONCLUSIONES | 280 |
| 6.5 | REFERENCIAS | 282 |
| CAPÍTULO 7 : RESUMEN GENERAL Y CONCLUSIONES | | 287 |
| 7.1 | REFERENCIAS | 294 |
| ANEXO 2 : CAPÍTULO 2 - LÍQUIDOS IÓNICOS CON AMINAS ALIFÁTICAS COMO MATRICES EN MALDI-MS. ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO DE BAJO PESO MOLECULAR | | 296 |
| ANEXO 3: CAPÍTULO 3 - LÍQUIDOS IÓNICOS CON NORHARMANO COMO MATRICES EN MALDI-MS. ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO DE BAJO PESO MOLECULAR | | 321 |
| ANEXO 4 : CAPÍTULO 4 - ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS MATRICES MALDI ESTUDIADAS | | 348 |
| ANEXO 5 : CAPÍTULO 5 - ESTABILIDAD FOTOQUÍMICA DE LAS MATRICES MALDI ESTUDIADAS | | 367 |
| ANEXO 6 : CAPÍTULO 6 - ESTUDIO DE COMPLEJOS MOLECULARES POR ESI-MS ENTRE LAS MATRICES MALDI ESA Y ZSA CON CARBOHIDRATOS | | 372 |

Abreviaturas y términos en inglés

| Abreviatura | Significado |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (OHP) β CD | hepta(2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina |
| Abs | Absorción o Absorbancia |
| AP / APs | Afinidad/es Protónica |
| BAM | n-butilamina |
| BOHAM | Butanolamina o 4-aminobuta-1ol |
| Carbs | Carbohidratos |
| CCD | Cromatografía en capa delgada |
| CEM | Modelo de eyección en cadena |
| CID | Celda de colisión |
| CL-EM | Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masa |
| CM | Modelo de Clúster o <i>Clúster Model</i> |
| CPCD | Modelo de Dinámica Química y Física Acomplada o <i>Coupled Physical and Chemical Dynamics Model</i> |
| CRM | Modelo de carga residual |
| DCA | Ácido dicloroacético |
| DHB | Ácido 2,5-dihidroxibenzóico (ácido gentísico) |
| DI | Desorción/ionización |
| DMSO-d6 | Dimetilsulfóxido deuterado |
| DM β CD | Hepta(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina |
| DSC | Calorimetría Diferencial de Barrido |
| dTGA | Derivada de la curva de TGA |
| E-245TMCA | Ácido <i>E</i> -2,4,5-trimetoxicinámico |
| E-2HCA | Ácido <i>E</i> -2-hidroxicinámico |
| E-2MCA | Ácido <i>E</i> -2-metoxicinámico |
| E-345TMCA | Ácido <i>E</i> -3,4,5-trimetoxicinámico |
| E-34DIOCA | Ácido <i>E</i> -3,4-metilendioxicinámico |
| E-3HCA | Ácido <i>E</i> -3-hidroxicinámico |
| E-3MCA | Ácido <i>E</i> -3-metoxicinámico |
| E-4CICA | Ácido <i>E</i> -4-clorocinámico |
| E-4ClCHCA | Ácido <i>E</i> -4-cloro- α -cianocinámico |
| E-4FCHCA | Ácido <i>E</i> -4-flúor- α -cianocinámico |
| E-4MCA | Ácido <i>E</i> -4-metoxicinámico |
| E-4MCHCA | Ácido <i>E</i> -4-metoxi- α -cianocinámico |
| E-4NCA.HCl | Clorhidrato del ácido <i>E</i> -4-aminocinámico |
| E-4NOCA | Ácido <i>E</i> -4-nitrocinámico |
| E/Z-3MCA | Mezcla de los ácidos <i>E</i> -3-metoxicinámico y <i>Z</i> -3-metoxicinámico |
| E/Z-4ClCHCA | Mezcla de los ácidos <i>E</i> -4-cloro- α -cianocinámico y <i>Z</i> -4-cloro- α -cianocinámico |
| E/Z-4FCHCA | Mezcla de los ácidos <i>E</i> -4-flúor- α -cianocinámico y <i>Z</i> -4-flúor- α -cianocinámico |

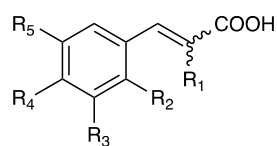
| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| E/Z-CHCA | Mezcla de los ácidos <i>E</i> -4-hidroxi- α -cianocinámico y <i>Z</i> -4-hidroxi- α -cianocinámico |
| EAM | Etilamina |
| ECA | Ácido <i>E</i> -cinámico |
| ECAF | Ácido <i>E</i> -3,4-dihidroxicinámico (ácido caféico) |
| ECHCA | Ácido <i>E</i> -4-hidroxi- α -cianocinámico |
| ECUM | Ácido <i>E</i> -4-hidroxicinámico (ácido cumárico) |
| ED | Energía de disociación |
| EFE | Ácido <i>E</i> -3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido ferúlico) |
| EI | Eficiencia de ionización |
| EiFE | Ácido <i>E</i> -4-metoxi-3-hidroxicinámico (ácido isoferúlico) |
| EM | Espectrometría de masa |
| Emi | Emisión |
| EOHAM | Etanolamina o 2-aminoeta-1ol |
| EP | Escala preparativa |
| EPM | Modelo de partición del equilibrio |
| ESA | Ácido <i>E</i> -3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico) |
| ESA-d6 | Ácido <i>E</i> -3,5-di(metoxi-d3)-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico deuterado) |
| ESI | Ionización por electrospray |
| E α MECA | Ácido <i>E</i> - α -metilcinámico |
| F2 | Sacarosa o sucrosa |
| F5 | 1F-fructofuranosilnstosa |
| FIA-EM | Espectrometría de masa por inyección de flujo |
| FM | Fase móvil |
| Frc | Fructosa |
| FT-ICR | Resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier |
| Glc | Glucosa |
| Ho | 1-metil-9H-pyrido[3,4-b]indole (harmano) |
| HOMO | Orbital molecular más alto ocupado |
| HRMS | Espectrometría de masa de alta resolución |
| ID | Infusión directa |
| IEM | Modelo de evaporación de iones |
| IPSG | Isopropil- β -D-1-tiogalactosido |
| IR / IR-FT | Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier |
| ISC | Cruce entre sistemas o en inglés <i>Inter System Crossing</i> |
| ISD | Fragmentación en la fuente o del inglés <i>in source decomposition</i> |
| IT | Trampa iónica |
| Ka | Constante de asociación |
| Kd | Contante de disociación |
| L | Modo de análisis Lineal |

| | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| LDI | Desorción ionización láser o del inglés <i>laser desorption ionization</i> |
| LI / LIs | Líquido iónico / líquidos iónicos |
| Lift | Hace referencia a la espectrometría de masa tandem en MALDI (MS/MS) |
| LIM / LIMs | Líquido/s iónico/s como matriz/matrices |
| LIOAS | Espectroscopía optoacústica resuelta en el tiempo e inducida por láser |
| LIPs | Líquidos iónicos próticos |
| LMW | Compuestos de bajo peso molecular o del inglés <i>low molecular weight</i> |
| LOD | Límite de detección o del inglés <i>limit of detection</i> |
| LS | Modelo de Afortunados Sobrevivientes o Lucky Survivor Model |
| LUMO | Orbital molecular más bajo desocupado |
| LVEI | Líquido viscos espectroscópicamente inerte |
| M4 | Maltotetraosa |
| M5 | Maltopentaosa |
| M6 | Maltohexaosa |
| M7 | Maltoheptaosa |
| MALDI-MS | Espectrometría de masa por desorción/ionización asistida por matriz |
| MeCN | Acetonitrilo |
| MeCN-d3 | Acetonitrilo deuterado |
| MeOD | Metanol deuterado |
| MeOH | Metanol |
| MI y MIs | Matriz iónica o Matrices iónicas |
| MISs | Matrices iónicas sólidas |
| MIVs | Matrices iónicas vítreas |
| MNILs | Matrices no iónicas líquidas |
| MNISs | Matrices no iónicas sólidas |
| MS | Espectrometría de masa del inglés Mass Spectrometry |
| MS/MS | Espectrometría de masa tandem - fragmentación |
| MW | Microondas del inglés <i>microwave</i> |
| MβCD | Hepta(O-metil)-β-ciclodextrina |
| NCH | Neocarrahexaosa-2 ⁴ ,4 ¹ ,4 ³ ,4 ⁵ -tetrasulfato |
| NCO | Neocarraoctaosa-4 ¹ ,4 ³ ,4 ⁵ ,4 ⁷ -tetrasulfato |
| NCT | Neocarratetraosa-4 ¹ ,4 ³ -disulfato |
| nHo | 9H-pirido[3,4-b]indol (nor-harmano) |
| nHo.HCl | Clorhidrato de 9H-pirido[3,4-b]indol (nor-harmano.H ⁺ +Cl) |
| PET | Transferencia de electrones fotoinducida del inglés <i>photoinduced-electron-transfer</i> |
| PF | Modelo de fluido Polar o <i>Polar Fluid Model</i> |
| PI / Pis | Potencial/es de ionización |
| PM | Peso molecular |
| PSD | Descomposición luego de la fuente o del inglés <i>post source decomposition</i> |

| | |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Py | Piridina |
| QSAR | Análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad del inglés <i>Quantitative structure-activity relationship</i> |
| R | Modo de análisis Reflectrón |
| Rf | Relación de frente |
| RTIL / RTILs | Líquido/s iónico/s a temperatura ambiente o del inglés <i>room temperature ionic liquids</i> |
| S/R | Señal/ruido |
| SD | Desviación estándar |
| Shot | Disparo del láser |
| Spot | Depósito de la muestra en el electrodo porta muestra (matriz + analito) |
| SQ | Simple cuadrupolo |
| Sweet Spot | Puntos dulces |
| TBAM | Tributilamina |
| TEAM | Trietilamina |
| TG | Termogravimetría |
| TGA | Análisis termogravimétrico |
| THA | 2,4,6-trihidroxiacetofenona |
| TIC | Corriente total de iones |
| T _{inicio} | Temperatura de inicio del proceso en DSC o TGA |
| T _{max} | Temperatura de máxima tasa de conversión en la descomposición, calculado a partir de la dTGA |
| TMβCD | Hepta(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina |
| TOF | Tiempo de Vuelo |
| T _{pico} | Temperatura de pico observado en los procesos de DSC |
| TPT | Modelo de Transferencia Térmica de Protones o <i>Thermal Proton Transfer Model</i> |
| UV | Ultravioleta |
| Vis | Visible |
| Z-2MCA | Ácido Z-2-metoxicinámico |
| Z-345TMCA | Ácido Z-3,4,5-trimetoxicinámico |
| Z-3MCA | Ácido Z-3-metoxicinámico |
| ZCUM | Ácido Z-4-hidroxicinámico |
| ZFE | Ácido Z-3-metoxi-4-hidroxicinámico |
| ZSA | Ácido Z-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico |
| βCD | β-ciclodextrina |

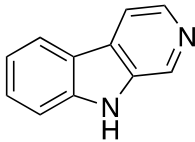
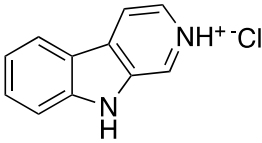

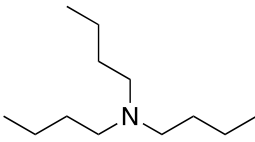
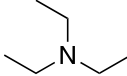
Reactivos: Estructura y masa exacta

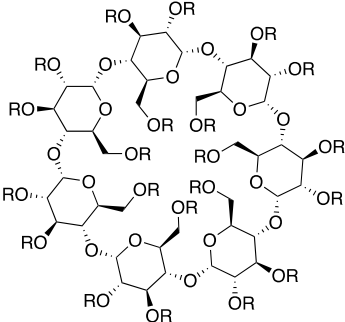
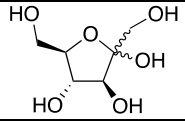
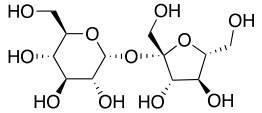
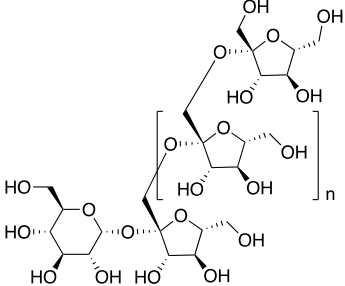
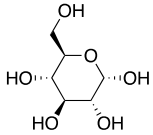
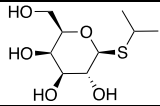
Ácidos cinámicos (Estructura general)

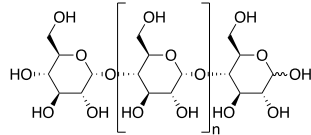
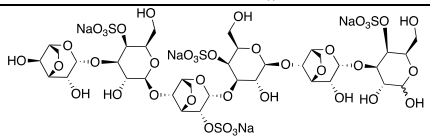
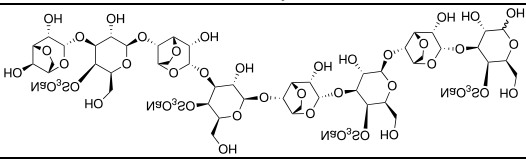
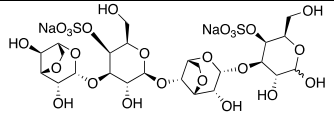


| Abreviatura | Nombre | Masa exacta | Estructura |
|------------------------|------------------------------------------|-------------|------------|
| BAM | n-butilamina | 73,0891 | |
| BOHAM | 4-aminobuta-1-ol | 89,0841 | |
| DHB | Ácido gentísico | 154,0266 | |
| E-245TMCA | Ácido E-2,4,5-trimetoxicinámico | 238,0841 | |
| E-2HCA | Ácido E-2-hidroxicinámico | 164,0473 | |
| E-2MCA Z-2MCA | Ácido E/Z-2-metoxicinámico | 178,0630 | |
| E-345TMCA Z-345TMCA | Ácido E/Z-3,4,5-trimetoxicinámico | 238,0841 | |
| E-34DIOCA | Ácido E-3,4-metilendioxicinámico | 192,0423 | |
| E-3HCA | Ácido E-3-hidroxicinámico | 164,0473 | |
| E-3MCA Z-3MCA | Ácido E/Z-3-metoxicinámico | 178,0630 | |
| E-3NCA.HCl | Clorohidrato del ácido E-4-aminocinámico | 199,0400 | |
| E-4CICA | Ácido E-4-clorocinámico | 182,0135 | |

| | | | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|----------|--|
| E-4ClCHCA Z-4ClCHCA | Ácido <i>E/Z</i> -4-cloro- α -cianocinámico | 207,0087 | |
| E-4FCHCA Z-4FCHCA | Ácido <i>E/Z</i> -4-flúor- α -cianocinámico | 191,0383 | |
| E-4MCHCA | Ácido <i>E</i> -4-metoxi- α -cianocinámico | 203,0582 | |
| E-4NOCA | Ácido <i>E</i> -4-nitrocinámico | 193,0375 | |
| EAM | Etilamina | 45,0578 | |
| ECA | Ácido <i>E</i> -cinámico | 148,0524 | |
| ECAF ZCAF | Ácido <i>E/Z</i> -cafeíco | 180,0423 | |
| ECHCA ZCHCA | Ácido <i>E/Z</i> -4-hidroxi- α -cianocinámico | 189,0426 | |
| ECUM ZCUM | Ácido <i>E/Z</i> -cumárico | 164,0473 | |
| EFE ZFE | Ácido <i>E/Z</i> -ferúlico | 194,0579 | |
| EIFE | Ácido <i>E</i> -isoferúlico | 194,0579 | |
| EOHAM | 2-aminoetano-1-ol | 61,0528 | |
| ESA ZSA | Ácido <i>E/Z</i> -sinapínico | 224,0685 | |
| ESA-d6 | Ácido <i>E</i> -3,5-di(metoxi- <i>d</i> 3)-4-hidroxicinámico | 230,1061 | |
| E α MCA | Ácido <i>E</i> - α -metilcinámico | 162,0681 | |
| Ho | Harmano | 184,1000 | |

| | | | |
|---------|-------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| nHo | Nor-harmano | 170,0844 |  |
| nHo.HCl | Norharmano clorohidrato | 206,0622 |  |
| Py | Piridina | 79,0422 |  |
| TBAM | Tributilamina | 185,2143 |  |
| TEAM | Trietilamina | 101,1204 |  |

| Abreviatura | Nombre | Masa exacta | Estructura |
|----------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| βCD (R=H) | β -ciclodextrina | 1134,3698 |  |
| MβCD (R=CH ₃) | Hepta(O-metil)-β-ciclodextrina | | |
| DMβCD (R=CH ₃) | Hepta(2,6-di-O-metil)-β-ciclodextrina | | |
| TMβCD (R=CH ₃) | Hepta(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina | | |
| (HOP)βCD (R=C ₃ H ₇ O) | Hepta (2-hidroxipropil)-β-ciclodextrina | | |
| Frc | Fructosa | 180,0634 |  |
| F2 | Sacarosa o sucrosa | 342,1162 |  |
| F5 (n=2) | 1F-fructofuranosilnstosa | 828,2747 |  |
| Inulina | | (n=13) 2124,6973 | |
| Glc | Glucosa | 180,0634 |  |
| IPSG | Isopropil-β-D-1-tiogalactosido | 238,0875 |  |

| | | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| M4 (n=2) | Maltotetraosa | 666,2219 |  |
| M5 (n=3) | Maltopentaosa | 828,2747 | |
| M6 (n=4) | Maltohexaosa | 990,3275 | |
| M7 (n=5) | Maltoheptaosa | 1152,3803 | |
| NCH | Neocarrahexaosa- 2 ⁴ ,4 ¹ ,4 ³ ,4 ⁵ - tetrasulfato | 1344,0508 |  |
| NCO | Neocarraoctaosa- 4 ¹ ,4 ³ ,4 ⁵ ,4 ⁷ - tetrasulfato | 1650,1459 |  |
| NCT | Neocarratetraosa- 4 ¹ ,4 ³ -disulfato | 834,0782 |  |

Capítulo 1 : Introducción

En 1985, Karas, Hillenkamp y col.¹ comenzaron a desarrollar el concepto de espectrometría de masas (EM) por desorción/ionización láser asistida por una matriz e introdujeron para la misma la denominación MALDI (*Matriz Assisted Laser Desorption Ionization*). En estos trabajos los autores utilizaron moléculas orgánicas pequeñas como matrices (fotosensibilizadores) para facilitar la desorción/ionización (DI) de moléculas bajo irradiación de un láser en la región ultravioleta (UV) del espectro electromagnético²⁻⁴. En los comienzos, los autores utilizaron el segundo armónico de un láser de Nd:YAG (266 nm) para generar la DI de aminoácidos o péptidos. En estos trabajos observaron una disminución en la energía necesaria para generar la DI del analito producto del agregado de una matriz (ácido nicotínico). Si embargo, a esta longitud de onda absorben tanto la matriz como el analito, pudiendo ser considerados experimentos de tipo desorción/ionización láser (LDI). Recién en 1987 describen la DI de dos analitos no absorbentes a esta longitud de onda, un tetrasacárido y un antibiótico, usando ácido nicotínico como matriz³. En forma casi simultánea, Tanaka y col⁵ reportaron por primera vez el análisis de macromoléculas por EM, especialmente proteínas con una relación de m/z de hasta 10 kDa, en un experimento al que hoy llamamos MALDI. En este trabajo los autores utilizan un láser UV (N₂, 337 nm) pulsado para la desorción/ionización del analito junto con una matriz, consistente en un fino polvo de cobalto con un diámetro en el orden de los nanómetros, todo suspendido en glicerol. En estos experimentos el polvo de cobalto es el responsable de la absorción de la radiación láser mientras que a esta longitud de onda el analito no absorbe.

Sin embargo, el uso de láseres pulsados como fuente de desorción/ionización (*Laser Desorption Ionization*, LDI) en espectrometría de masa se remonta a la década de los 60, aplicado a la fotoionización de moléculas neutras y en la investigación de muestras sólidas inorgánicas, principalmente para la determinación de su composición elemental, mientras que en menor medida se utilizó para la investigación de biomoléculas pequeñas. La mayor limitación de la técnica LDI es que el analito debe absorber los fotones emitidos por el láser UV, lo que genera la excitación electrónica de la especie. Desde este estado excitado, el analito podría reaccionar fotoquímicamente (ej. disipar el exceso de energía por fragmentación del compuesto), lo que imposibilitaría el análisis del ion molecular intacto gaseoso^{2,6}.

En este sentido, la técnica de EM MALDI permite superar estas limitaciones y desde su desarrollo como una técnica de ionización láser suave, se ha utilizado para generar y analizar iones de una gran variedad de moléculas, especialmente compuestos de alto peso molecular,

no volátiles y térmicamente lábiles como proteínas, péptidos, carbohidratos, polímeros sintéticos, oligonucleótidos, entre otros. Debido a sus ventajas, como su fácil manejo, alto rendimiento y gran tolerancia a los contaminantes (por ejemplo, sales, buffers, detergentes, etc), los instrumentos basados en la EM MALDI se han utilizado ampliamente en muchas áreas de la ciencia. A modo de ejemplo: i) la identificación de compuestos y microorganismos, principalmente aplicado a microbiología clínica, ii) diagnóstico de enfermedades, iii) estudio de pequeñas moléculas donde se puede encontrar al estudio y desarrollo de las matrices, iv) investigación biológica en áreas como proteómica y metabolómica, v) macromoléculas y polímeros sintéticos y vi) investigaciones relativas a la técnica ya sea la ampliación de las aplicaciones de la misma o a los estudios de los fundamentos de la técnica⁷.

La técnica de EM MALDI comienza con la preparación de la muestra. Aunque existen varios métodos, típicamente la mezcla sólida analito y matriz es depositada sobre un electrodo metálico (electrodo porta muestra). El electrodo porta muestra se coloca en la cámara de ionización a alto vacío y se irradia la muestra con un láser pulsado (normalmente un láser de N_2 a una longitud de onda (λ) de 337 nm o el tercer armónico de un láser sólido de Nd:YAG $\lambda = 355$ nm, como el utilizado en este trabajo de tesis). Las moléculas de la matriz absorben la energía láser pasando a un estado electrónico excitado, la liberación de energía desde la matriz genera instantáneamente el paso de la mezcla sólida de la matriz y el analito a un estado gaseoso. Luego de la desorción de la muestra, se produce dentro de la nube o plasma generado (pluma de ablación), una transferencia de carga que provoca la ionización del analito por colisiones entre las moléculas neutras sin carga, los iones de la matriz, los protones, los electrones y los cationes metálicos. A continuación, los iones generados son direccionados y acelerados por un campo eléctrico hacia el analizador de masas para diferenciarlos por su relación masa/carga (m/z)^{6,7} (Figura 1).

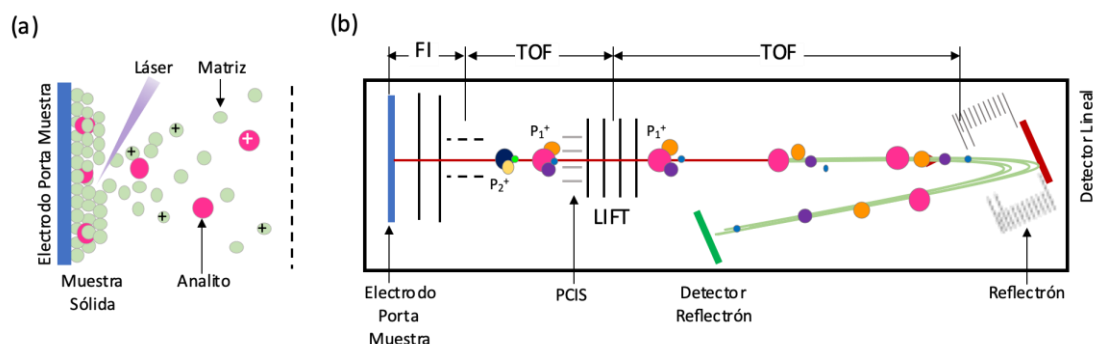


Figura 1. Representación esquemática del proceso MALDI (a) y del instrumento Bruker Ultraflex II TOF/TOF utilizado en esta tesis (b)⁸.

- Preparación de la muestra

La preparación de la muestra, o también llamado sembrado de la muestra, es considerada uno de los pasos más importantes en EM MALDI. Su objetivo es depositar sobre el electrodo porta muestra una mezcla del analito que se desea estudiar y la matriz seleccionada. Esta mezcla sólida se efectúa en una relación molar analito:matriz que varía entre 1:1000 a 1:10000, idealmente con el objetivo que el analito este homogéneamente distribuido en el seno de la matriz. Esto no solo optimizaría la interacción entre el analito y la matriz en el proceso de transferencia de energía durante la desorción/ionización, sino que también, mejoraría la reproducibilidad de la técnica tanto en disparos sucesivos sobre la misma muestra como en las réplicas analíticas de la misma⁶. Una muestra con una distribución no homogénea, requiere la búsqueda exhaustiva sobre toda la superficie de la misma de zonas de óptima relación matriz:analito que generen espectros de buena calidad, en lo referente a ancho medio de pico y relación señal a ruido, denominados puntos dulces (*sweet spots* o *hot spots*) como se discutirá en detalle en los capítulos 2 y 3 de este trabajo de tesis.

Existen diferentes métodos de preparación de muestras⁶, algunos de ellos son: (i) Gota seca (*Dried Droplet*), es el método original introducido por Karas y Hillenkamp⁴, en el cual se coloca una gota de solución saturada de matriz sobre el electrodo porta muestra e inmediatamente sobre esta se coloca una gota de una solución diluida del analito. La muestra se deja a temperatura ambiente o en una cámara de vacío para evaporar el solvente y así obtener la muestra sólida. (ii) Evaporación rápida (*Fast Evaporation*)⁹, en este caso la matriz y el analito se manipulan de forma completamente desacoplada. Se coloca sobre el electrodo porta muestra una gota de solución de matriz en un solvente volátil y se deja secar a temperatura ambiente bajo un flujo de nitrógeno. Una vez cristalizada la matriz se coloca sobre esta una gota de la solución del analito. (iii) Capas sucesivas o Sandwich, es un método desarrollado por Nonami y col.¹⁰; se basa en dos métodos previamente descritos, el método de evaporación rápida y el método de superposición. El método sándwich se basa en preparar soluciones independientes de matriz y analito y transferir microgotas de las mismas al electrodo porta muestra en forma de capas sucesivas, permitiendo la evaporación del solvente y cristalización de la capa antes de colocar la siguiente. La distribución de las capas varía según el detalle experimental pero típicamente el patrón de capas utilizado es matriz, analito, matriz, matriz. (iv) Mezcla, es la forma tradicional de preparación de muestra, consiste en preparar soluciones independientes de matriz y analito en el mismo solvente o solventes que sean miscibles entre sí, para luego preparar una mezcla de ambas soluciones, manteniendo la relación molar analito:matriz deseada. De esta mezcla luego se colocan microgotas sobre el electrodo porta

muestra y se deja evaporar el solvente para obtener la muestra sólida. v) Electrospray^{11,12}, en este método la mezcla analito-matriz es depositada sobre el electrodo porta muestra por medio de la nebulización de la solución producto de un campo eléctrico generado entre un fino capilar metálico por donde ingresa la muestra y el electrodo porta muestra.

En la actualidad existe una amplia variedad de métodos de preparación de muestra desde la utilización de soportes líquidos donde se utilizan líquidos viscosos de baja volatilidad, como el utilizado por Tanaka y col.⁵, la utilización de soportes sólidos fotosensibles como materiales nanoporosos o la preparación de la muestra sin utilizar solventes, como el utilizado en EM MALDI para la obtención de imágenes de superficies (MSI, *Mass Spectrometry Imaging*)¹³, entre otras. Cada método de preparación de muestra tiene sus ventajas y desventajas, lo que los hace más apropiados para cierto tiempo de análisis o con ciertos tipos de compuestos (matriz y/o analitos).

- **Matriz**

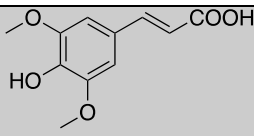
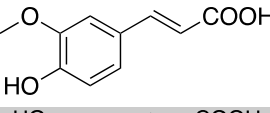
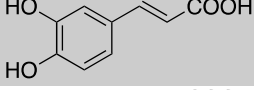
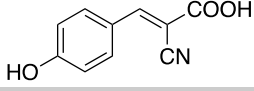
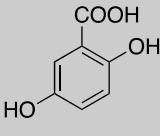
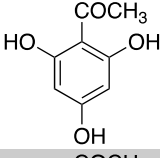
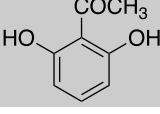
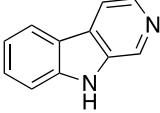
Aunque el mecanismo de ionización del proceso MALDI sigue siendo objeto de debate, se reconoce que la matriz desempeña un papel crucial. Existe una amplia variedad de matrices MALDI; Hassain y Limbach en su capítulo de libro⁶ en 2010 hacen una detallada clasificación de las matrices reportadas hasta esa fecha dividiéndolas entre matrices clásicas y no clásicas. Entre ellas, las matrices clásicas son las que dieron origen a la técnica, como: i) matrices en suspensión, como la utilizada por Tanaka y col.⁵, donde nanopartículas metálicas son suspendidas en un líquido viscoso no volátil espectroscópicamente inerte (LVEI); en estas matrices las nanopartículas metálicas son las responsables de la absorción de la radiación láser; y ii) matrices orgánicas, como aquellas introducidas por Karas y Hillenkamp, que son moléculas orgánicas pequeñas, generalmente polares, líquidas o sólidas, que simultáneamente absorben la radiación del láser e interaccionan con el analito en el proceso de ionización¹⁴. Este último tipo de matrices clásicas, son las más comúnmente utilizadas y si bien existe una gran cantidad de compuestos que han sido experimentalmente probados, una pequeña cantidad de ellos han demostrado ser matrices eficientes para el proceso de DI, por ejemplo algunos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico¹⁵ (Tabla 1).

Luego se encuentran las matrices clasificadas como no clásicas, entre las cuales podemos encontrar: i) DIOS, por sus siglas en inglés *Desorption/Ionization on Silicon*, materiales nanoporosos de silicio, donde el analito queda atrapado dentro de los poros de tamaño nanométrico y la superficie de silicio que presenta características fotoactivas y fotoluminiscentes, absorbe la radiación UV del láser¹⁶. ii) Matrices no polares, que si bien son

moléculas orgánicas como las matrices clásicas, son compuestos no polares como el antraceno, el tertiofeno, acenafteno, entre otros. Estas matrices han sido utilizadas para la detección en modo positivo del radical catión molecular ($M^{+\bullet}$) de diversos analitos no polares de bajo peso molecular (en inglés *Low molecular weight*, LMW)^{17,18} y de polímeros no polares sintéticos¹⁹. Estas matrices promueven eficientemente la ionización del analito por transferencia de electrones. iii) Nanotubos de carbono, son utilizados para el estudio de analitos de LMW, ya que eliminan la interferencia de la matriz en el espectro de iones, mejoran la reproducibilidad y mejoran la sensibilidad debido al aumento del área superficial por unidad de volumen en comparación con las matrices orgánicas^{20,21}. iv) Matrices de alto peso molecular, al igual que las matrices orgánicas, son moléculas con grupos aromáticos como cromóforos, pero de alto peso molecular, esto hace que sean útiles para el estudio de compuestos de LMW ya que disminuyen la interferencia de los iones de la matriz en el ruido de fondo del espectro a bajos valores de m/z ²²⁻²⁴. v) Matrices reactivas, son mezclas de compuestos orgánicos que actúan simultáneamente como matrices MALDI y como agentes derivatizantes, esto mejora la eficiencia de ionización, brinda información estructural del analito y permite el estudio de compuestos de LMW disminuyendo su volatilidad o aumentando su valor de m/z final²⁵. vi) Matrices binarias, esta estrategia busca explotar los efectos sinérgicos mediante la combinación de distintos componentes en un solo sistema. Estos sistemas multicomponentes son a) combinación de dos matrices MALDI orgánicas clásicas²⁶ y b) matrices híbridas, donde se combina una matriz orgánica y un compuesto inorgánico, que generalmente se basa en una matriz inorgánica como los nanomateriales²⁷. vii) Líquidos iónicos como matrices (LIMs), como se los definió originalmente²⁸, son sales no moleculares que presentan puntos de fusión por debajo de los 100 °C. Estas sales se forman por combinación de una matriz MALDI orgánica clásica de carácter ácido y una amina orgánica, sin embargo, en la actualidad este grupo de matrices es mucho más amplio, pudiendo ser definido como matrices iónicas (MI). Este tipo de matrices es el principal objeto de estudio en este trabajo de tesis y de las que vamos a hablar de forma detallada más adelante en esta introducción y en los capítulos 2 y 3.

Sin embargo y más allá de la amplia variedad de matrices existentes, la elección final de la misma depende del tipo de muestra analizada y/o del rango de m/z estudiado, ya que una matriz eficiente para la DI de una dada familia de analitos y en un dado rango de m/z puede no serlo para otra familia de compuestos y/o en otro rango de m/z ¹⁵.

Tabla 1. Matrices Clásicas Orgánicas utilizadas en espectrometría de masa UV- MALDI

| Nombre | Estructura | Aplicación | Ref |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Ácido <i>E</i> -4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico (ácido sinapínico, ESA) |  | Proteínas/Péptidos Oligonucleótidos | 29 30 |
| Ácido <i>E</i> -4-hidroxi-3-metoxicinámico (ácido ferúlico, EFE) |  | Proteínas/Péptidos | 29 |
| Ácido <i>E</i> -3,4-dihydroxicinámico (ácido caféico, ECAF) |  | Proteínas/Péptidos | 29 |
| Ácido <i>E</i> - α -ciano-4-hidroxicinámico (ECHCA) |  | Proteínas/Péptidos | 31 |
| Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico, DHB) |  | Proteínas/Péptidos Hidratos de Carbono Oligonucleótidos Lípidos Polímeros sintéticos | 32 33,34 30 35 36 |
| 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THA) |  | Glicoproteínas Hidratos de Carbono Oligonucleótidos | 34 34 30 |
| 2,6-dihidroxiacetofenona |  | Proteínas/Péptidos | 37 |
| <i>nor</i> -Harmano (nHo) |  | Proteínas Hidratos de Carbono Polímeros sintéticos Lípidos | 10,38 10,38–41 42,43 44 |

Generalmente, el analito está embebido en un gran excedente de matriz y ambos compuestos se desorben y se ionizan luego de la excitación de ésta por láser. Si bien, la esencia de la técnica MALDI es la presencia de la matriz, poco se conoce sobre qué propiedades físico-químicas hacen a una buena matriz. Sin embargo, existe cierto consenso en algunas de las propiedades que debe cumplir una matriz MALDI eficiente⁶: i) Solubilidad: esta propiedad está relacionada con la forma más usada de preparación de la muestra, y establece que la matriz y el analito deben ser solubles o parcialmente solubles en el mismo solvente o mezclas de solventes, para luego ser depositados en el electrodo porta muestra, permitiendo la co-cristalización de ambos. De esta forma la muestra sólida que se genera luego de la evaporación del solvente es lo más homogénea posible. Sin embargo, algunos métodos de preparación de muestras dejan de lado esta propiedad. ii) Absortividad: esta propiedad establece que la matriz debe absorber de forma eficiente a la longitud de onda de emisión del láser. En MALDI, generalmente se utilizan compuestos orgánicos con un alto coeficiente de absorptividad molar (ϵ_λ) (Figura 2), cuyas

estructuras están basadas en un núcleo aromático con cierta funcionalización que le hagan cumplir las propiedades deseadas (Tabla 1). Está demostrado que existe una correlación entre un mayor coeficiente de absortividad molar, ϵ , de la matriz a la λ de emisión del láser con el aumento de la intensidad en las señales del analito y del rendimiento iónico total (corriente total de iones, *Total Ion Current*, TIC). En este sentido la absortividad de la matriz tiene un gran impacto en la fluencia umbral requerida para la generación de iones, y este parámetro, la fluencia del láser, ha sido identificado como uno de los parámetros láser más relevantes en el proceso MALDI⁴⁵. iii) Reactividad: las matrices deben ser químicamente inertes con el analito, es decir, no deben modificar covalentemente el analito en estudio. Las matrices deben servir como especies donoras y/o aceptoras de protones y/o electrones para promover la ionización del analito. Sin embargo, esta característica es dejada de lado con la aparición de las llamadas matrices reactivas. iv) Volatilidad: las matrices deben poseer una presión de vapor baja para minimizar la volatilización de la misma frente al alto vacío en el que se encuentra la fuente de iones, sin embargo, la matriz debe sublimar eficientemente a la temperatura que se alcanza durante la desorción, para promover la desorción de la mezcla sólida. v) Las matrices deben ser fotoquímicamente y térmicamente estables frente a los sucesivos impactos del láser en una misma posición durante el experimento⁴⁶. vi) La desactivación preferencial de la matriz electrónicamente excitada debe ser la emisión de calor rápido al medio, para provocar la ablación⁴⁷⁻⁵⁰.

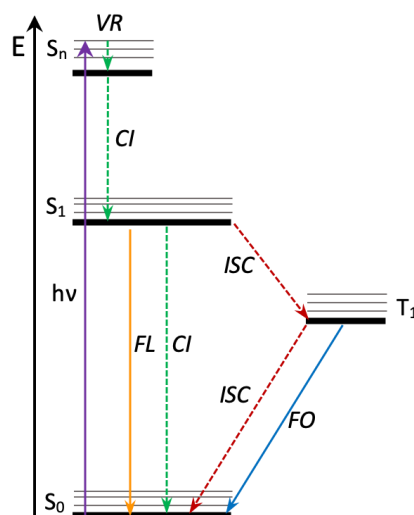


Figura 2. Diagrama de Jablonski genérico representando los niveles de energía (E) de los diferentes estados electrónicos y las posibles transiciones entre ellos para describir la interacción de una molécula con la radiación electromagnética. Estados electrónicos y niveles de energía: Singlete (S), Triplete (T) y el subíndice indica el nivel energético (n). Transiciones: Absorción de un fotón ($h\nu$), relajación vibracional (VR), conversión interna (CI), fluorescencia (FL), cruce inter sistema (ISC) y fosforescencia (FO). Las líneas continuas representan transiciones radiativas y las líneas discontinuas transiciones no radiativas^{51,52}.

- **Mecanismos de ionización**

En cuanto al proceso de desorción/ionización por MALDI, al día de hoy no existe una teoría o modelo completo que permita predecir el espectro de masa observado en función de las variables experimentales tales como la matriz, sus propiedades físico-químicas y las del analito, relación de concentración entre ellas, método de preparación de la muestra, características del láser, entre otras. En su capítulo de libro⁶ publicado en 2010, Knochenmuss realiza una detallada revisión general de los mecanismos de ionización en MALDI. El proceso de formación de iones en MALDI puede ser dividido en dos etapas⁵³. La etapa primaria, es la etapa inicial que involucra eventos rápidos que ocurren en el orden de las decenas de nanosegundos donde se crean los primeros iones. La etapa secundaria de formación de iones, incluye eventos tardíos que se dan en el orden de tiempo desde los nanosegundos hasta los microsegundos y se desarrollan a lo largo de la expansión de la pluma de ablación. En esta etapa los iones formados inicialmente o incluso parte del material neutro pueden sufrir reacciones de transferencia de carga. En esta última etapa existe mayor consenso sobre los mecanismos que ocurren ya que se considera que la pluma de ablación alcanza el equilibrio térmico por lo que estas reacciones secundarias pueden ser tratadas según la termodinámica convencional. Estas dos etapas de ionización son consecuencia del evento de ablación/desorción característico del proceso MALDI.

- ♦ **Proceso de desorción/ablación**

Dreisewerd, reúne en un interesante trabajo los aspectos relacionados a la desorción/ablación láser en MALDI¹⁵. La función primordial de la matriz es la absorción de la energía del láser ($h\nu$, Figura 2) y la conversión de esta en calor (CI y ISC, Figura 2). Esto genera la vaporización de la matriz, en un proceso lo suficientemente energético como para arrastrar el analito que ha co-cristalizado dentro o sobre la matriz. El cambio de fase puede ser caracterizado como un proceso de “desorción” o de “ablación”, principalmente dependiendo de la densidad de energía del láser depositada sobre la muestra, es decir la fluencia (densidad de fotones por área) de irradiación. El proceso de desorción está caracterizado por una transición de fase suave desde la superficie de la muestra liberando principalmente moléculas individuales, mientras que la ablación surge de un sobrecalentamiento desde el seno de la muestra, generando una transición de fase explosiva, que libera tanto moléculas individuales como grandes clústeres de material sólido y gaseoso. En el capítulo 4 (Estabilidad térmica de las matrices estudiadas) de esta tesis se profundiza un poco más sobre conceptos teóricos relacionados con estos procesos.

Durante la desorción de las especies, su conversión a fase gaseosa da lugar a la pluma de ablación que se expande por el vacío del sistema. En este punto, la matriz es un reactivo clave

en el desarrollo de la pluma ya que puede estar involucrada en reacciones bimoleculares de transferencia de protón, hidrógeno, electrón o cationes, dimerizaciones, etc. Es por esto que en el espectro de masa, usualmente se observan los iones de la matriz asociados a este tipo de reacciones. Para las matrices clásicas, dependiendo de la matriz, los potenciales de ionización (PI) se encuentran por encima de los 775 kJ/mol^{6,54}. En el caso de UV-MALDI es necesario entre dos o tres fotones ($2 \times 337 \text{ nm} = 710 \text{ kJ/mol}$ o $2 \times 355 \text{ nm} = 673 \text{ kJ/mol}$) para generar la autoionización de las matrices clásicas, sin embargo, esto no implica que necesariamente exista directamente un proceso de fotoionización como se verá más adelante. La mayoría de las matrices (m) pueden presentar señales fuertes correspondientes a los iones: $m^{+\bullet}$, $[m+H]^+$, $[m+Na]^+$, $[m+K]^+$, m^{\bullet} y $[m-H]^-$ e incluso algunos productos de descomposición como $m-H_2O$ o $m-CO_2$. Si bien estos iones parecen ser independientes, pueden interconvertirse entre ellos por reacciones con moléculas neutras durante la evolución de la pluma, lo que permite explicar también los efectos de supresión de señales^{6,54,55}. También pueden observarse la formación de iones correspondientes a agregados moleculares de tipo 2m o superiores (clústeres) o la formación de estructuras poliméricas (dímeros, trímeros, etc.) por uniones covalentes.

♦ Mecanismos de ionización primarios

Los mecanismos de ionización primaria son los aspectos más controversiales sobre el proceso MALDI. En los últimos años los mecanismos que han tenido más relevancia son: el *Modelo de Fluido Polar (Polar Fluid Model, PF)*^{56,57}, sugiere que la matriz en estado gaseoso, en etapas tempranas de la pluma donde la densidad de la fase gaseosa es muy alta, se comporta como un solvente polar en fase líquida, en el cual los compuestos iónicos pueden disociarse. Dado que las matrices clásicas son generalmente compuestos con propiedades ácido-base, pueden generar protones “solvatados” por la matriz, que luego ionizan el analito. En los últimos años a partir de este modelo, surge el *Modelo de Transferencia Térmica de Protones (Thermal Proton Transfer Model, TPT)*⁵⁸⁻⁶¹. En este modelo, se propone que luego de la absorción de la radiación láser por la matriz ($h\nu$, Figura 2), hay una desactivación del estado electrónico excitado por vías no radiativas (CI, Figura 2), generando moléculas con estados vibracionalmente excitados. La transferencia de energía vibracional intermolecular produce un aumento de la energía térmica en la zona irradiada y un aumento de la temperatura. Esto causa que la muestra funda antes de la desorción/ablación y que puedan ocurrir reacciones químicas inducidas térmicamente en fase líquida, entre ellas la transferencia de protón. Estas reacciones tienen calores de formación pequeños y pueden alcanzar el equilibrio térmico debido a las altas temperaturas y a la alta frecuencia de colisión en la fase condensada. Este tipo de reacciones ocurre únicamente cuando existe una alta densidad molecular por lo que no se dan luego de

una amplia expansión de la fase gaseosa. Estos modelos sugieren que el estado electrónico excitado de la matriz no genera una transferencia de excitación electrónica al analito para generar su ionización, ya que la fotoionización de la matriz por absorción de dos o tres fotones es poco probable. Dada la alta concentración de la matriz en relación al analito y sus propiedades ácido-base, los autores⁵⁸ sugieren que los iones de la matriz son los primeros en formarse y que luego el analito se ioniza por reacciones bimoleculares de transferencia de protón inducidas térmicamente entre la matriz y el analito.

El *Modelo de Afortunados Sobrevivientes (Lucky Survivor Model, LS)*^{62,63} o también llamado el *Modelo de Clúster (Cluster Model, CM)*⁶⁴, postula que los iones, tanto de la matriz como del analito, están preformados desde la solución en la que se prepara la muestra. Los analitos son incorporados en la matriz sólida con sus correspondientes cargas, preservadas desde la solución, con sus respectivos contraiones, dada la naturaleza neutra de la materia. Este modelo diferencia dos posibilidades, en la primera de ellas los clústeres generados durante la ablación no tienen carga neta, dado que existe la misma cantidad de iones y contraiones, la disociación de estos clústeres induce la neutralización de la carga o la generación de aductos neutros, en ambos casos, no pudiendo ser detectados. La otra posibilidad es que los clústeres tengan carga neta debido a una separación de carga por disrupción de la muestra sólida analito-matriz durante el proceso ablativo. Debido a la falta de contraiones se inhibe la neutralización de los iones preformados, los afortunados sobrevivientes, por lo que pueden ser detectados. Más detalles teóricos de este modelo serán tratados en el capítulo 4.

Los modelos de ionización primaria pueden ser descriptos como no térmicos, directamente térmicos e indirectamente térmicos. Los modelos PF y TPT, son directamente térmicos, ya que se asume que los iones son formados térmicamente en condiciones de equilibrio, mientras que el modelo de LS (o CM) es indirectamente térmico, ya que requiere el calor, no para formar los iones, sino para liberarlos ya que estos están preformados antes de la ablación⁶⁵. En estos modelos la absorción de la radiación láser por la matriz es importante ya que proporciona el medio por el cual la matriz se calienta a las temperaturas necesarias para la ionización y/o la ablación.

A diferencia de estos, el *Modelo de Dinámica Química y Física Acoplada (Coupled Physical and Chemical Dynamics Model, CPCD)*⁶⁵⁻⁷¹, es descripto como un modelo no térmico ya que la formación de iones está directamente relacionado con la excitación electrónica de la matriz por la radiación del láser. Como se mencionó anteriormente, los potenciales de ionización de moléculas aisladas de las matrices se encuentran en el rango de energía de tres fotones, para los láser típicos utilizados actualmente en UV-MALDI (355 nm y 337 nm). Si bien las moléculas

en fase condensada presentan una disminución de los PIs en comparación con las moléculas aisladas debido a un efecto colectivo, este efecto no es lo suficientemente importante como para inducir la fotoionización de la matriz⁶. Por otro lado, la ionización multifotónica directa de las matrices bajo la fluencia de irradiación típica del proceso MALDI es poco eficiente, por lo que es poco probable que suceda⁶⁵. El modelo CPCD propone que las excitaciones electrónicas móviles, denominadas excitones, y las reacciones de agrupación de estos (*Pooling reactions*) proporcionan un mecanismo por el cual la energía de múltiples fotones puede ser almacenada, transportada y concentrada para formar los primeros iones. Las etapas principales de la formación de iones en este modelo son:

- i) Fotoexcitación de la matriz: $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$
- ii) Agrupación de dos excitones: $S_1 + S_1 \rightarrow S_n + S_0$
- iii) Agrupación de dos excitones, incluyendo uno con un estado electrónico excitado de mayor nivel: $S_n + S_1 \rightarrow m^{\bullet+} + e^- + S_0$
- iv) Captura electrónica: $m + e^- \rightarrow m^{\bullet-}$

en estas etapas S_0 es el estado electrónico fundamental de la matriz (m), S_1 el primer estado electrónico excitado y S_n un estado electrónico de mayor nivel, mientras que $h\nu$ es el fotón láser (Figura 2). La absorción de la radiación del láser genera especies en estado electrónico excitado (i), estos excitones se agrupan y por transferencia de energía generan un excitón en un estado electrónico de mayor nivel y uno en el estado electrónico fundamental (ii). Este nuevo excitón, se agrupa con otro excitón y por transferencia de energía producen la ionización de la matriz y la liberación de un electrón (iii). El electrón emitido tiene una energía tal que le permite alejarse del sitio de agrupación para ser capturado luego por una molécula neutra de matriz para dar el correspondiente anión, evitando de esta forma la neutralización (iv). Los iones de la matriz reaccionan rápidamente, principalmente por transferencia de protón o transferencia de electrón, siendo la primera el camino de menor energía para las matrices con propiedades ácido-base. De esta forma se generan los iones $[m+H]^+$ y $[m-H]^-$, los que luego participan en reacciones secundarias con el analito para ionizarlo. El modelo puede incluir el cruce intersistema (*Intersystem Crossing*, ISC, Figura 2) para dar las reacciones a partir del estado triplete (T) de los excitones, dependiendo de la matriz, ya que alguna de ellas como la THA presentan un ISC muy eficiente⁷². Tanto el movimiento de los excitones, la agrupación, el quenching (extinción, remoción o disminución de una propiedad física producto de la interacción con un segundo agente) y la recombinación son procesos que dependen en gran medida de las frecuencias de colisión intramolecular y por lo tanto de la temperatura y presión de la pluma. Como ya se mencionó anteriormente, esto depende de la conversión de energía (CI, Figura 2) desde los

estados electrónicos excitados en calor, tanto de las moléculas neutras de matriz como de los iones, lo que da lugar al proceso de desorción/ablación.

♦ Mecanismos de ionización secundarios

Los iones primarios son creados en un ambiente denso, incluso en forma de clústeres, pero necesariamente deben alcanzar un régimen de baja densidad para poder ser estudiados en el analizador de masa. Durante la expansión de la pluma, los iones primarios reaccionan con especies neutras para generar los iones secundarios observados en el espectro de masa. En esta expansión, la pluma se hace menos densa por lo que las colisiones se hacen menos probables y la frecuencia de las reacciones ion-molécula disminuyen. Debido a que la matriz se encuentra en exceso, la reacción bimolecular entre la matriz y el analito se convierte en la reacción limitante. Junto con este concepto y la aproximación al equilibrio térmico local en la pluma, se propone que la reacción de transferencia de carga entre la matriz y el analito se encuentra bajo control termodinámico en lugar de control cinético. Esto permite aplicar la relación entre la energía libre de Gibbs y la constante de equilibrio ($\Delta G = -RT \ln(K)$) y asumiendo que existe la misma eficiencia de detección para todos los iones, entonces la constante de equilibrio (K) está dada por las abundancias relativas de los iones, lo que permite predecir o interpretar directamente el espectro de masa⁷³. Sin embargo, existen condiciones experimentales donde es posible que domine el control cinético, por ejemplo, bajas fluencias del láser o reacciones de transferencia de electrones altamente exotérmicas⁶.

Existen tres tipos de reacciones secundarias de transferencia de carga en el proceso MALDI: transferencia de protón, catión y electrón, que discutiremos brevemente^{6,69,70,74,75}. En las *reacciones de transferencia de protón*, si la aproximación al equilibrio térmico local es generalizada, entonces el espectro de masa está definido por las afinidades protónicas (APs) en fase gaseosa de la matriz y el analito. Para el análisis de péptidos y proteínas, en especial aquellos con aminoácidos básicos en su estructura, la transferencia de protón con matrices ácidas es energéticamente favorable. El protón es un ion pequeño por lo que las APs de la matriz y el analito son grandes, es por esto que las especies protonadas son los iones secundarios energéticamente más favorables, sin embargo, esto no aplica para todos los analitos como por ejemplo polímeros sintéticos y carbohidratos. Estos analitos, por lo general, son detectados más eficientemente como aductos catiónicos con los metales alcalinos Na^+ y K^+ . En estos casos las *reacciones de transferencia de cationes* están determinadas por las afinidades de los analitos por los distintos cationes, que en el caso de las bases nitrogenadas del ADN o ARN o los hidratos de carbono son mayores que las APs. Otros iones metálicos con importantes aplicaciones como agentes ionizantes en MALDI son el Cu^+ y Ag^+ , sin embargo, en estos casos es necesario

agregarlos como dopantes en la preparación de las muestras. Las matrices comerciales y los analitos en estudio, usualmente están contaminados con sales, especialmente de metales alcalinos y su concentración es difícilmente controlada por lo que puede llevar a resultados inconsistentes. Es por eso que usualmente se adicionan sales en la preparación de la muestra para mejorar la intensidad de la señal y para simplificar el espectro, favoreciendo un tipo de ion dominante con el catión agregado.

Las *reacciones de transferencia de electrones* suelen observarse en moléculas de baja polaridad, con pocos o ningún grupo funcional polar. En el equilibrio térmico, estas reacciones están gobernadas por las diferencias entre los potenciales de ionización entre el analito y la matriz en el modo de análisis positivo¹⁸ y en las afinidades electrónicas en el modo de análisis negativo⁷⁶. La presencia de sales de cationes divalentes como Ca^{2+} y Cu^{2+} , son un caso especial de reacciones de transferencia de electrones, ya que al usar estos agentes ionizantes solo se observan los aductos con simple carga. Esto implica la reducción de los metales a su estado de oxidación +1, o la emisión de un protón para reducir la carga neta. La reducción del metal es posible, dado que los PIs de la mayoría de las matrices MALDI le permite reducir a estos cationes divalentes⁷⁷.

Si bien algunos de los métodos de ionización aquí descriptos pueden ser extendidos al modo iónico negativo de análisis, este modo ha tenido menos relevancia en el desarrollo de modelos que lo expliquen, siendo en la mayoría de los casos omitido. Sin embargo, varias matrices han sido descriptas en la literatura para el análisis en modo negativo de diversos analitos^{6,10,78}. En estos casos las matrices de tipo básicas operarían por un mecanismo opuesto tomando protones y por lo tanto favoreciendo la formación de aniones en aquellos analitos que poseen grupos potencialmente ácidos como -OH, -COOH, -SH, -SO₃H, -PO₃H₂, entre otros.

- **Analizador de masa**

Una vez generados los iones, estos son direccionados hacia el analizador de masa por un campo eléctrico para ser separados según su relación masa/carga (m/z). El método de desorción/ionización MALDI puede ser acoplado a los diversos analizadores de masa actualmente vigentes entre ellos: i) Trampa iónica (IT)⁶, este analizador de masa se basa en la aplicación de campos eléctricos y/o magnéticos variables para atrapar los iones según su relación de m/z en una región del espacio. ii) Resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier (FT-ICR)⁷⁹, en este analizador se determina la relación m/z de los iones en función de su frecuencia de ciclotrón en un campo magnético fijo. La frecuencia de ciclotrón, es la frecuencia del movimiento circular que describe un ion en un campo magnético estático y

uniforme debido a la fuerza de Lorentz. Esta frecuencia está directamente relacionada con la carga y la masa del ion. iii) El tiempo de vuelo (TOF)^{6,8}, es el analizador de iones más utilizado acoplado a la técnica MALDI y el utilizado durante este trabajo de tesis. iv) Orbitrap, desde hace ya unos años existen en el mercado los equipos que combinan MALDI con el analizador Orbitrap; en este los iones se diferencian según su m/z por la frecuencia del movimiento que describen al desplazar sus trayectorias circulares en forma oscilante respecto de un electrodo piramidal central.

El analizador TOF es de diseño sencillo, con una alta sensibilidad, resolución y de alto rendimiento, que le permite analizar los iones generados en MALDI, una fuente de iones pulsada de alta frecuencia. Los iones generados en la fuente se extraen mediante un pulso de potencial retardado (*post delayed ion extraction*, PDE) que acelera los iones que ingresan en el tubo TOF (Figura 1b), con la misma energía cinética. El tubo TOF es una región libre de campo en el cual los iones describen una trayectoria rectilínea con una velocidad inversamente proporcional a sus valores de m/z . De esta forma, registrando el tiempo de vuelo que presentan los iones hasta alcanzar el detector, se puede calcular su valor de m/z . Este analizador, en teoría, no está limitado en el rango de la relación m/z , lo que lo convierte en un analizador ideal para MALDI, donde se generan iones monocargados de macromoléculas. La resolución de un analizador TOF, es decir la capacidad de diferenciar dos señales de m/z similares, depende fundamentalmente del largo de la trayectoria de vuelo que tengan los iones, lo que se aumenta en los equipos TOF con la tecnología reflectrón. En estos equipos, en el extremo del tubo TOF se coloca una serie de electrodos, que generan un campo eléctrico que redireccionan los iones, modificando su trayectoria, hacia un detector en el extremo opuesto del tubo con cierto ángulo respecto de la trayectoria original de los iones. De esta forma se aumenta el tiempo de vuelo de los iones y por lo tanto se mejora la resolución en comparación con un TOF lineal. Cuando el analizador de masa TOF no es suficiente para analizar los analitos de una mezcla compleja o es necesario obtener información adicional sobre la estructura de los iones, el acoplamiento de un segundo analizador TOF permite realizar una fragmentación de los iones (MS/MS o MS *tándem*). En estos equipos el primer analizador TOF se utiliza para seleccionar el ion precursor que se fragmenta, mientras que el segundo TOF permite analizar los iones producidos. Este trabajo de tesis se realiza con un equipo Bruker Ultraflex II TOF/TOF (Figura 1b), que cuenta con dos analizadores TOF en *tándem* y permite trabajar en tres modos de análisis: (i) modo Lineal, los dos TOF funcionan como un único analizador con un detector al final del tubo; (ii) modo Reflectrón, como se mencionó anteriormente cuando los iones alcanzan el final del segundo tubo son redireccionados hacia un segundo detector, aumentando el tiempo de vuelo y por lo tanto la resolución y (iii) modo

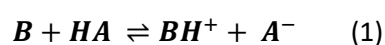
MS/MS, denominado en este equipo modo LIFT, que permite realizar un espectro de masa tándem por descomposición tardía del ion precursor (*post source decomposition*, PSD) como se discutirá en el capítulo 3 de este trabajo.

- Líquidos iónicos como matrices

Si bien el uso de líquidos iónicos como matrices MALDI (LIMs) fue introducido por Armstrong y col. en 2001²⁸, en realidad estos fueron previamente desarrollados por Kolli y Orlando⁸⁰ en 1996 al utilizar 3-aminoquinolina como agente solubilizante de matrices ácidas clásicas. Estos LIMs son el resultante de la reacción de transferencia de protón intermolecular entre una amina orgánica (Base de Brønsted) y una matriz ácida clásica de tipo ácido carboxílico (ácido de Brønsted). Las sales orgánicas resultantes de esta reacción también son clasificados en la literatura como líquidos iónicos próticos (LIP) y en particular aquellas que son líquidos a temperatura ambiente se los clasifica en la literatura como “room temperature ionic liquids” (RTILs). Mientras algunas de las sales orgánicas descritas en la literatura como matrices MALDI son líquidas, otras tantas combinaciones de aminas y ácidos resultan ser sólidas. Es por esto que Kobyls y col.⁸¹ introducen el término matrices iónicas (MIs) para describir tanto a las matrices iónicas MALDI sólidas como líquidas. El estado de agregación de la mezcla entre una amina y un ácido orgánico no solo depende del carácter iónico de la mezcla sino preferentemente del arreglo tridimensional de las moléculas en el espacio, lo que puede favorecer la fluidez o no del material.

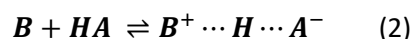
Las principales características de los LIMs que los diferencian de las matrices cristalinas clásicas utilizadas en MALDI, son su carácter iónico y el estado de agregación líquido. En particular esta última característica es altamente atractiva para el desarrollo analítico de esta técnica, ya que una matriz líquida permitiría una distribución homogénea del analito en la muestra, mejorando la reproducibilidad de los resultados tanto en la misma muestra (en disparos sucesivos) como en las réplicas analíticas de la misma^{82–84}. Por el contrario, las matrices clásicas sólidas, co-cristalizan con el analito generando agregados del mismo en ciertas zonas de la muestra, denominados puntos dulces o “hot spots”.

En cuanto al carácter iónico de estas matrices (LIMs y MIs), como se describió anteriormente, la reacción de síntesis está descrita por la transferencia de protón entre un ácido de Brønsted (HA) y un base de Brønsted (B) como se muestra en la reacción 1:



Por definición en los líquidos iónicos próticos (LIPs) puros se considera que la proporción de especies neutras es menor al 1%. Sin embargo, se ha determinado que el estado líquido de una mezcla entra una base y un ácido orgánico no es indicio que el producto está compuesto netamente por iones⁸⁵.

Otra teoría que describe este tipo de compuestos esta representada en la reacción 2:



En esta descripción no existe una transferencia total del protón, sino que este se encuentra compartido por el catión y el anión. Ya sea la transferencia completa del protón o la distancia relativa del hidrógeno entre el ácido y la base, dependerá de las propiedades de los compuestos, en especial de la fuerza como ácidos de Lewis (ΔpK_a). Sin embargo, entre mezclas puramente moleculares a mezclas completamente iónicas existen distintos tipos de estados. En este sentido se proponen cuatro tipos de posibles estructuras internas dependiendo del grado de transferencia de protón⁸⁶: (a) mezcla ácido base mayoritariamente sin ionizar, (b) par ácido-base unido por puente de hidrógeno (sin transferencia de protón), (c) sales próticas mayoritariamente ionizadas (con transferencia de protón y los iones generados son independientes entre si) y (d) sales próticas asociadas (con transferencia de protón pero los iones generados están asociados por puente de hidrógeno), como se muestra en la Figura 3. En los LIs, el grado de ionicidad está definido como la “fracción de iones efectiva, disponibles para participar en la conductividad”^{87,88}, lo que es la resultante de cada tipo de interacción que presente la mezcla. En este tipo de compuestos, además del grado de transferencia de protón y asociación, es necesario considerar otras interacciones intermoleculares adicionales debido a la presencia de cadenas alquílicas, anillos aromáticos y sitios donores y aceptores de puente de hidrógeno. En particular en los compuestos iónicos utilizados como matrices MALDI, también es necesario considerar aquellas interacciones intermoleculares entre la matriz y el analito. Incluso si uno evalúa el grado de ionicidad de estos compuestos en solución, también es necesario evaluar las interacciones propias con el solvente. En este caso, dependiendo de la polaridad del mismo la estructura de estos compuestos iónicos puede ser descripta como: (a) pares iónicos en contacto, (b) pares iónicos con solvente o (c) pares iónicos separados por solvente⁸⁹, como se muestra en la Figura 4.

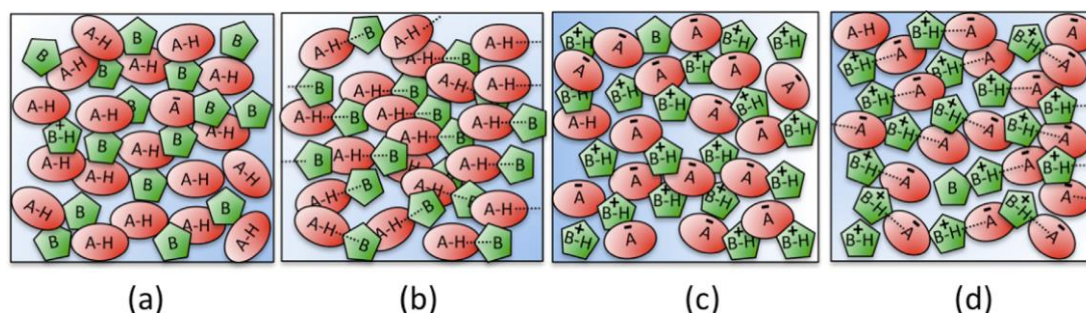


Figura 3. Posibles estructuras internas: (a) mezcla ácido base mayoritariamente sin ionizar, (b) par ácido-base unido por puente de hidrógeno (sin transferencia de protón), (c) sales próticas mayoritariamente ionizadas (con transferencia de protón y los iones generados son independientes entre si) y (d) sales próticas asociadas (con transferencia de protón, pero los iones generados están asociados por puente de hidrógeno). (Imagen reproducida de la referencia ⁸⁶)

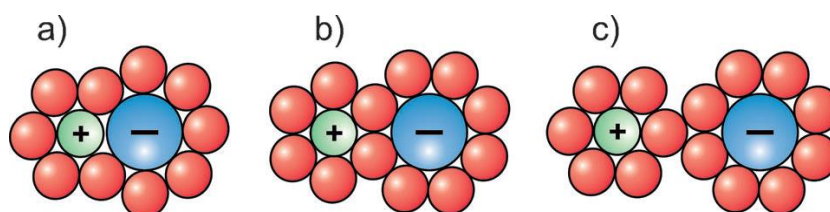


Figura 4. Representación esquemática de tipos de pares iónicos: (a) pares iónicos en contacto, (b) pares iónicos con solvente o (c) pares iónicos separados por solvente. (Imagen reproducida de la referencia ⁸⁹)

Este contexto hace que la determinación del grado de ionicidad en las posibles MIs sea complejo, pero también fundamental para el diseño racional de nuevos LIPs que puedan actuar como matrices MALDI. En este sentido Kobylis y col.⁸¹ realizan un análisis espectroscópico (¹H-RMN, Absorción UV-Vis, IR-TGA) de 66 combinaciones de matrices ácidas clásicas y aminas orgánicas con el fin de determinar el grado de ionicidad de las mezclas y relacionarlo con el estado de agregación de la misma. En este trabajo los autores introducen una nueva nomenclatura para los productos obtenidos de las mezclas ácido-base, dependiendo del grado de ionicidad y el estado de agregación de las mismas a distintas temperaturas: matrices iónicas sólidas (MISs), matrices no iónicas líquidas (MNILs), matrices no iónicas sólidas (MNISs) y matrices iónicas vítreas (MIVs)⁸¹ que se suman a la ya conocida clasificación como matrices iónicas líquidas (o líquidos iónicos como matrices, LIMs)²⁸. Tanto la transferencia de protón, como la formación de un puente de hidrógeno es posible cuando se utiliza para la síntesis de las MIs un ácido y una base fuerte. Sin embargo, la diferencia de pKa necesaria para generar una matriz iónica difiere según los autores ($\Delta pK_a \geq 10^{86}$, ⁸⁹⁰, ^{3,75}⁹¹ y ^{3,54}⁸¹). Este valor puede ser utilizado para predecir la ionicidad del producto pero no el estado de agregación del mismo.

Por otro lado, Kobylis y col.⁸¹ concluyen que el estado físico de las matrices iónicas depende tanto de la fuerza como ácidos de Lewis (pKa) de sus componentes como de la estructura de los mismos (geometría molecular, simetría, número de sustituyentes, impedimento estérico). Es por eso que mientras más asimétrico sea el catión, más desestructurado será el sistema resultante (mayor entropía) y por lo tanto mayor probabilidad de obtener la matriz en estado líquido. Por el contrario, mientras más simétrico sea el catión, más estructurado es el sistema (menor entropía) y por lo tanto mayor probabilidad de que el producto resultante sea sólido⁸¹. Incluso muchas MIs pueden variar su estado de agregación entre sólidos, ceras, vítreo o líquidos con el aumento de la temperatura, por lo que el estado físico de la mezcla no provee información de la estructura interna de la misma⁹².

El carácter iónico y en particular el carácter prótico de estas MIs, en principio, podría ser perjudicial para el análisis por MALDI, ya que las matrices requieren de protones disponibles para promover la ionización de la muestra, según asumen algunos modelos de ionización primaria^{6,63} descritos anteriormente. Sin embargo, desde su introducción, tanto las MIs sólidas como líquidas han demostrado su capacidad de promover la ionización de la muestra, incluso, en algunos casos, de manera más eficiente que las matrices clásicas^{28,92}. Este tipo de investigación ha sido recientemente abordado por Kobylis y col.⁹³, en el cual determinan el grado iónico de cuatro LIMs y su relación con la auto-ionización de la matriz al ser irradiada por el láser (LDI). Los autores sugieren que luego de la irradiación láser puede generarse una transferencia de protón inversa, desde el ácido conjugado de la amina al anión carboxilato, este proceso es impulsado por el aumento de temperatura en la superficie de la muestra como por la inestabilidad de los iones en fase gaseosa. Esto indica que luego del pulso láser, el carácter iónico de estas matrices se revierte y por lo tanto la eficiencia en el proceso de ionización en MALDI es independiente del grado de ionicidad de la matriz⁹³.

A diferencia de las matrices ácidas clásicas, donde luego de la irradiación láser la relación entre iones de la matriz y moléculas neutras es baja^{61,69}, las MIs poseen una alta proporción de iones en relación a las moléculas neutras. A pesar de esta gran diferencia entre las matrices iónicas y las clásicas, la corriente total de iones en los espectros de masa de ambas matrices es similar⁹³. Esto sugiere que solo una pequeña proporción de iones son estables en el vacío, lo cual es acorde al modelo de ionización descrito anteriormente como los afortunados sobrevivientes (*Lucky Survivor*)⁶². Por lo tanto, la eficiencia en la formación de iones de analito utilizando matrices iónicas es independiente del grado de ionicidad de las mismas y está más relacionado a la diferencia entre la afinidad protónica entre la matriz y el analito. A pesar de estas conclusiones, los autores sostienen que es necesario profundizar en el estudio de la

relación que existe entre el carácter iónico de este tipo de matrices con la eficiencia en la ionización de distintos analitos por MALDI ya que ellos mismos no pueden llegar a una conclusión clara sobre la relación entre la eficiencia de una matriz y descripción de la misma con los parámetros espectroscópicos usados por ellos.

En el presente trabajo de tesis se propone estudiar de forma comparativa la eficiencia como matrices MALDI de una serie de líquidos iónicos para el análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular. Estos resultados se presentan en dos capítulos. En el primero de ellos los LI son formados por la combinación de matrices orgánicas clásicas de carácter ácido y una amina alifática, modificando el tamaño, la funcionalización y la ramificación de la misma (Capítulo 2) y en el segundo capítulo nos enfocamos en LIs preparados utilizando el nHo, matriz de carácter básico, como contraión de las matrices orgánicas ácidas clásicas (Capítulo 3). Para tratar de comprender y relacionar el cambio de eficiencia de las distintas matrices propuestas se propone el estudio de su estabilidad térmica (Capítulo 4) y fotoquímica (Capítulo 5).

Complementariamente, y como parte de un proyecto de investigación más amplio, se ha efectuado el estudio de formación y estabilidad de complejos moleculares entre las matrices ácidas E-sinapínico y su isómero geométrico Z con carbohidratos de LMW por medio de la técnica de espectrometría de masa con ionización por electrospray (ESI-MS) (Capítulo 6), con el objetivo de evaluar la interacción de estas matrices MALDI con el analito.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis son agrupados en seis capítulos independientes, cada uno de los cuales cuenta con su introducción donde se detallan los antecedentes bibliográficos relacionados, una sección experimental, una sección de resultados y discusión y la bibliografía correspondiente, junto a un Anexo preparado conteniendo información adicional. Los Anexos se identifican con el número de capítulo al que están asociados.

1.1 REFERENCIAS

- 1 M. Karas, D. Bachmann and F. Hillenkamp, *Anal Chem*, 1985, **57**, 2935–2939.
- 2 M. Karas and U. Bahr, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1986, **5**, 90–93.
- 3 M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr and F. Hillenkamp, *Int J Mass Spectrom Ion Process*, 1987, **78**, 53–68.
- 4 M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal Chem*, 1988, **60**, 2299–2301.

- 5 K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida and T. Matsuo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1988, **2**, 151–153.
- 6 R. B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, Second Edi., 2010.
- 7 D. Li, J. Yi, G. Han and L. Qiao, *ACS Measurement Science Au*, 2022, **2**, 385–404.
- 8 Bruker Daltonik GmbH, *Manual*, 2006, **0**, 54.
- 9 O. Vorm, P. Roepstorff and M. Mann, *Anal Chem*, 1994, **66**, 3281–3287.
- 10 H. Nonami, K. Tanaka, Y. Fukuyama and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**, 285–296.
- 11 R. R. Hensel, R. C. King and K. G. Owens, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997, **11**, 1785–1793.
- 12 J. Axelsson, A. M. Hoberg, C. Waterson, P. Myatt, G. L. Shield, J. Varney, D. M. Haddleton and P. J. Derrick, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997, **11**, 209–213.
- 13 R. Cramer, *Advances in MALDI and Laser-Induced Soft Ionization Mass Spectrometry*, Springer, Switzerland, 2016th Edi., 2016.
- 14 M. Schürenberg, K. Dreisewerd and F. Hillenkamp, *Anal Chem*, 1999, **71**, 221–229.
- 15 K. Dreisewerd, *Chem Rev*, 2003, **103**, 395–426.
- 16 J. Wei, J. M. Buriak and G. Siuzdak, *Nature*, 1999, **399**, 243–246.
- 17 T. D. McCarley, R. L. McCarley and P. A. Limbach, *Anal Chem*, 1998, **70**, 4376–4379.
- 18 S. F. Macha, T. D. McCarley and P. A. Limbach, *Anal Chim Acta*, 1999, **397**, 235–245.
- 19 S. F. Macha, P. A. Limbach and P. J. Savickas, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, **11**, 731–737.
- 20 S. Xu, Y. Li, H. Zou, J. Qiu, Z. Guo and B. Guo, *Anal Chem*, 2003, **75**, 6191–6195.
- 21 S. Ren, L. Zhang, Z. Cheng and Y. Guo, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, **16**, 333–339.
- 22 S. Chen, L. Chen, J. Wang, J. Hou, Q. He, J. Liu, J. Wang, S. Xiong, G. Yang and Z. Nie, *Anal Chem*, 2012, **84**, 10291–10297.
- 23 C. D. Calvano, A. Monopoli, T. R. I. Cataldi and F. Palmisano, *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**, 4015–4038.
- 24 Z. Qiao and F. Lissel, *Chem Asian J*, 2021, 868–878.

- 25 L. K. Zhang and M. L. Gross, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, **13**, 1418–1426.
- 26 T. Solouki, K. J. Gillig and D. H. Russell, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1994, **8**, 26–31.
- 27 P.-C. Lin, M.-C. Tseng, A.-K. Su, Y.-J. Chen and C.-C. Lin, *Anal Chem*, 2007, **79**, 3401–3408.
- 28 D. W. Armstrong, L. K. Zhang, L. He and M. L. Gross, *Anal Chem*, 2001, **73**, 3679–3686.
- 29 R. C. Beavist and B. T. Chait, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989, **3**, 432–435.
- 30 G. R. Parr, M. C. Fitzgerald and L. M. Smith, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1992, **6**, 369–372.
- 31 R. C. Beavis, T. Chaudhary and B. T. Chait, *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 156–158.
- 32 K. Strupat, M. Karas and F. Hillenkamp, *Int J Mass Spectrom Ion Process*, 1991, **111**, 89–102.
- 33 S. I. Snovida and H. Perreault, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21**, 3711–3715.
- 34 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 1999, **18**, 349–450.
- 35 J. Schiller, R. Süß, J. Arnhold, B. Fuchs, J. Leßig, M. Müller, M. Petković, H. Spalteholz, O. Zschörnig and K. Arnold, *Prog Lipid Res*, 2004, **43**, 449–488.
- 36 U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp and U. Giessmann, *Anal Chem*, 1992, **64**, 2866–2869.
- 37 J. J. Gorman, B. L. Ferguson and T. B. Nguyen, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, **10**, 529–536.
- 38 H. Nonami, S. Fukui and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, **32**, 287–296.
- 39 Y. Fukuyama, M. Ciancia, H. Nonami, A. S. Cerezo, R. Erra-Balsells and M. C. Matulewicz, *Carbohydr Res*, 2002, **337**, 1553–1562.
- 40 M. E. Monge, M. R. Negri, A. A. Kolender and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21**, 2638–2646.
- 41 M. Barboza, V. G. Duschak, Y. Fukuyama, H. Nonami, R. Erra-Balsells, J. J. Cazzulo and A. S. Couto, *FEBS Journal*, 2005, **272**, 3803–3815.

- 42 R. Erra-Balsells and H. Nonami, *Environment Control in Biology*, 2002, **40**, 55–73.
- 43 E. M. Rustoy, Y. Sato, H. Nonami, R. Erra-Balsells and A. Baldessari, *Polymer (Guildf)*, 2007, **48**, 1517–1525.
- 44 A. C. Casabuono, A. D’Antuono, Y. Sato, H. Nonami, R. Ugalde, V. Lepek, R. Erra-Balsells and A. S. Couto, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, **20**, 2175–2182.
- 45 K. N. Robinson, R. T. Steven and J. Bunch, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, **29**, 501–511.
- 46 O. I. Tarzi, H. Nonami and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2009, **44**, 260–277.
- 47 S. M. Bonesi, M. Mesaros, F. M. Cabrerizo, M. A. Ponce, G. M. Bilmes and R. Erra-Balsells, *Chem Phys Lett*, 2007, **446**, 49–55.
- 48 M. Mesaros, O. I. Tarzi, R. Erra-Balsells and G. M. Bilmes, *Chem Phys Lett*, 2006, **426**, 334–340.
- 49 G. Petroselli, R. Erra-Balsells, P. D. Gara and G. M. Bilmes, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2012, **11**, 1062–1068.
- 50 O. I. Tarzi, Director: Rosa Erra-Balsells N° 4015, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2006.
- 51 A. Jablonski, *Nature*, 1933, **131**, 839–840.
- 52 T. Neveselý, M. Wienhold, J. J. Molloy and R. Gilmour, *Chem Rev*, 2022, **122**, 2650–2694.
- 53 R. Zenobi and R. Knochenmuss, *Mass Spectrom Rev*, 1998, **17**, 337–366.
- 54 A. J. Hoteling, W. F. Nichols, D. J. Giesen, J. R. Lenhard and R. Knochenmuss, *European Journal of Mass Spectrometry*, 2006, **12**, 345–358.
- 55 L. V. Zhigilei, E. Leveugle, B. J. Garrison, Y. G. Yingling and M. I. Zeifman, *Chem Rev*, 2003, **103**, 321–348.
- 56 S. Niu, W. Zhang and B. T. Chait, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1998, **9**, 1–7.
- 57 X. Chen, J. A. Carroll and R. C. Beavis, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1998, **9**, 885–891.
- 58 S. H. Ahn, K. M. Park, Y. J. Bae and M. S. Kim, *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, **48**, 299–305.
- 59 K. Y. Chu, S. Lee, M. T. Tsai, I. C. Lu, Y. A. Dyakov, Y. H. Lai, Y. T. Lee and C. K. Ni, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2014, **25**, 310–318.

- 60 I.-C. Lu, K. Y. Chu, C.-Y. Lin, S.-Y. Wu, Y. A. Dyakov, J.-L. Chen, A. Gray-Weale, Y.-T. Lee and C.-K. Ni, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, **26**, 1242–1251.
- 61 I. C. Lu, C. Lee, Y. T. Lee and C. K. Ni, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, **8**, 21–39.
- 62 M. Karas, M. Glückmann and J. Schäfer, *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, **35**, 1–12.
- 63 T. W. Jaskolla and M. Karas, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, **22**, 976–988.
- 64 M. Karas and R. Krüger, *Chem Rev*, 2003, **103**, 427–439.
- 65 R. Knochenmuss, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2016, **9**, 365–385.
- 66 R. Knochenmuss, *Journal of Mass Spectrometry*, 2002, **37**, 867–877.
- 67 R. Knochenmuss, *Anal Chem*, 2003, **75**, 2199–2207.
- 68 K. M. Kirmess, R. Knochenmuss, G. J. Blanchard and G. R. Kinsel, *Journal of Mass Spectrometry*, 2016, **51**, 79–85.
- 69 R. Knochenmuss, *Int J Mass Spectrom*, 2009, **285**, 105–113.
- 70 R. Knochenmuss, *Analyst*, 2006, **131**, 966–986.
- 71 R. Knochenmuss, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, **26**, 1645–1648.
- 72 K. M. Kirmess, R. Knochenmuss, G. J. Blanchard and G. R. Kinsel, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014, **28**, 2134–2140.
- 73 G. R. Kinsel, D. Yao, F. H. Yassin and D. S. Marynick, *European Journal of Mass Spectrometry*, 2006, **12**, 359–367.
- 74 Y. J. Bae and M. S. Kim, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, **8**, 41–60.
- 75 R. Knochenmuss and R. Zenobi, *Chem Rev*, 2003, **103**, 441–452.
- 76 A. V. Streletskii, I. N. Ioffe, S. G. Kotsiris, M. P. Barrow, T. Drewello, S. H. Strauss and O. V. Boltalina, *Journal of Physical Chemistry A*, 2005, **109**, 714–719.
- 77 J. Zhang, V. Frankevich, R. Knochenmuss, S. D. Friess and R. Zenobi, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, **14**, 42–50.
- 78 R. L. Vermillion-Salsbury and D. M. Hercules, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, **16**, 1575–1581.
- 79 A. G. Marshall, C. L. Hendrickson and G. S. Jackson, *Mass Spectrom Rev*, 1998, **17**, 1–35.

- 80 V. S. Kumar Kolli and R. Orlando, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, **10**, 923–926.
- 81 P. Kobylis, H. Lis, P. Stepnowski and M. Caban, *J Mol Liq*, 2019, **284**, 328–342.
- 82 X. Zhao, S. Shen, D. Wu, P. Cai and Y. Pan, *Anal Chim Acta*, 2017, **985**, 114–120.
- 83 P. Kobylis, P. Stepnowski and M. Caban, *Microchemical Journal*, 2021, **164**, 105983.
- 84 H. N. Abdelhamid, *Mass Spectrom Purif Tech*, 2015, **01**, 1–10.
- 85 Y. Fukuyama, in *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology*, 2011.
- 86 J. Stoimenovski, P. M. Dean, E. I. Izgorodina and D. R. MacFarlane, *Faraday Discuss*, 2012, **154**, 335–352.
- 87 D. R. MacFarlane, M. Forsyth, E. I. Izgorodina, A. P. Abbott, G. Annat and K. Fraser, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, **11**, 4962–4967.
- 88 K. J. Fraser, E. I. Izgorodina, M. Forsyth, J. L. Scott and D. R. MacFarlane, *Chemical Communications*, 2007, 3817–3819.
- 89 K. Fumino, P. Stange, V. Fossog, R. Hempelmann and R. Ludwig, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2013, **52**, 12439–12442.
- 90 T. L. Greaves and C. J. Drummond, *Chem Rev*, 2008, **108**, 206–237.
- 91 S. L. Johnson and K. A. Rumon, *Journal of Physical Chemistry*, 1965, **69**, 74–86.
- 92 J. A. Crank and D. W. Armstrong, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, **20**, 1790–1800.
- 93 P. Kobylis, M. Kasprzyk, A. Nowacki and M. Caban, *J Mol Liq*, 2022, **349**, 118106.

Capítulo 2 : Líquidos iónicos con aminas alifáticas como matrices en MALDI-MS. Análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular.

2.1 INTRODUCCIÓN

Desde su introducción como matrices MALDI en los comienzos del desarrollo de la técnica de espectrometría de masa UV-MALDI, los derivados del ácido cinámico, en particular el ácido *E*- α -ciano-4-hidroxicinámico (ECHCA)¹ y el ácido *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido *E*-sinapínico, ESA)², han sido ampliamente utilizados como tales para el análisis de péptidos y proteínas. Esta primera generación de matrices fue encontrada de forma aleatoria, probando moléculas orgánicas pequeñas que presentaran un alto coeficiente de absortividad molar a la longitud de onda de irradiación del láser. El hecho de que estos ácidos presenten un muy buen desempeño como matrices MALDI los ha puesto en el foco de estudio para el diseño racional de nuevas matrices manteniendo fijo el núcleo estructural del ácido cinámico. Es así que se han descrito en la literatura, la síntesis y diversas aplicaciones como matrices para los ácidos *E*-4-cloro- α -cianocinámico (*E*-4ClCHCA)³, *E*-4-flúor- α -cianocinámico (*E*-4FCHCA)³, *E*-2-ciano-3-(naftalen-2-il)acrilico³, *E*-3-(antracen-9-il)-2-cianoprop-2-enoico³ y otros halo derivados del ECHCA (ácido 4-bromo y diferentes combinaciones de poli-flúor y poli-cloro-flúor α -cianocinámicos)^{4,5}. De la misma forma han sido descritas diversas aplicaciones para variantes del ESA, como el isómero *Z*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ZSA) que ha sido utilizado para el estudio de hidratos de carbono⁶ y de péptidos⁷. Estos nuevos compuestos son llamados matrices de segunda generación ya que son desarrollados de forma racional modificando sistemáticamente la naturaleza, número y posición de los grupos funcionales de aquellas primeras matrices para alcanzar ciertas propiedades físico-químicas, no claramente establecidas, que mejoren su comportamiento como matriz⁴. Esto generó un avance en el desarrollo de nuevas matrices al pasar de un abordaje empírico a uno más racional.

Dentro de esta segunda generación de matrices, los líquidos iónicos (LIs) han abierto las puertas al desarrollo de líquidos iónicos como matrices MALDI (LIMs)⁸. Estos LIs están diseñados a partir de una matriz MALDI ácida clásica (como el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB), ECHCA y ESA) y una base orgánica (como piridina (Py), *n*-butilamina (BAM), tributilamina (TBAM), trietilamina (TEAM), 3-aminoquinolina, 1-metilimidazol, anilina, entre otras)⁸⁻¹¹. En estos compuestos la matriz ácida es el constituyente responsable de la absorción de la radiación del láser utilizado. A diferencia de las matrices sólidas clásicas, la principal ventaja de estos compuestos es su fase condensada líquida lo que mejora la homogeneidad de las muestras. Esto mejora la reproducibilidad de los resultados, tanto en los disparos sucesivos del láser sobre la misma muestra como en las réplicas de la misma, haciendo más atractiva esta técnica para fines

analíticos cuantitativos¹². En cambio, en las matrices sólidas se obtienen zonas donde la producción de iones del analito es mayor, zonas denominadas puntos dulces o “*hot spots*”, lo que no solo hace a la poca reproducibilidad de la técnica sino también a un análisis tedioso de la muestra^{13–15}. Se ha demostrado que el estado de agregación de las mezclas, entre un ácido y una base orgánica, y el grado de ionicidad no son condicionantes entre sí, por lo que no es posible predecir o asumir una característica en base a la otra¹⁶. Si bien, algunas de las combinaciones propuestas en la literatura entre una matriz ácida clásica (Ácido de Brønsted) y una amina (Base de Brønsted), resultan ser líquidas en su fase condensada, muchas otras no lo son¹⁶ e incluso, algunas de ellas cambian su estado de agregación dependiendo de la temperatura¹⁰. Es por eso que se introduce el término matrices iónicas (MIs) para describir tanto a las mezclas ácido-base líquidas como sólidas. De igual forma, no todas las mezclas resultan ser completamente iónicas. El grado de ionicidad del producto va a estar determinado principalmente por la diferencia en la fuerza como ácidos de Lewis (pKa) de los componentes de la mezcla¹⁶. Mientras mayor sea esta diferencia, mayor será el grado de transferencia de protón. Por el contrario, mientras menor sea esta diferencia más carácter molecular tendrá la mezcla resultante (interacciones de tipo puente de hidrógeno y de dispersión de London). Estudios recientes, tienden a demostrar que el grado de ionicidad de estas matrices no afecta significativamente la eficiencia en la producción de iones del analito en el proceso de desorción-ionización (DI) por MALDI¹⁷, aunque esta afirmación requiere mayor investigación.

En cuanto a los analitos, los compuestos de bajo peso molecular (LMW), independientemente de su naturaleza, constituyen una familia con un inconveniente común en su análisis por espectrometría de masa MALDI, ya que sus valores de m/z se encuentran en la región donde aparecen las señales propias de la matriz, ya sea el ion molecular de la misma, sus aductos con iones inorgánicos y abundantes señales de distinta naturaleza como clústeres y sus fragmentos. Si bien la definición de compuestos de bajo peso molecular no tiene fijo un límite superior de masa, se consideran analitos de LMW a todos aquellos que su ion molecular esté comprendido en el rango donde aparecen las señales propias de la matriz. Es así que, si se toma como ejemplo la matriz ECHCA, esta presenta, en modo positivo, además del aducto con sodio y con potasio de la molécula, clústeres que cubren el rango hasta m/z 1300, como por ejemplo el ion $[(ECHCA)_5 + 4K - 3H]^+$ a m/z 1287¹⁸.

Muchos esfuerzos se han realizado para superar este inconveniente y revalorizar la técnica para el análisis de compuestos de LMW. Estos innumerables esfuerzos han sido detalladamente compilados en dos recientes trabajos, uno de ellos por Qiao y col.¹⁹ y el otro por Calvano y col.¹⁸ como así también descriptos por U. Bahr y T. W. Jaskolla en su capítulo del libro

*“Advances in MALDI and laser-induced soft ionization mass spectrometry”*⁴. Las últimas generaciones de equipos MALDI-MS, con analizadores de alta resolución y mayor sensibilidad han abiertos nuevos horizontes para el estudio de compuesto de LMW, debido a que pueden diferenciar con alta precisión valores de m/z muy próximos, permitiendo diferenciar las señales propias de la matriz y las del analito. Incluso, esto ha permitido que las señales propias de la matriz sean utilizadas como calibrantes internos para esa región de valores de m/z ²⁰. A pesar de estos avances instrumentales, la mayoría de los esfuerzos para mejorar el análisis de compuestos de bajo peso molecular están puestos en disminuir o suprimir las señales propias de la matriz para disminuir su interferencia en los espectros de masa. Entre estos intentos están los desarrollos utilizando las matrices MALDI clásicas, aplicando estrategias nuevas como el agregado de un segundo compuesto (aditivo) a la matriz, distintas formas de preparación y sembrado de las muestras, como así también la derivatización de las matrices y/o los analitos. Otro abordaje de esta problemática es el desarrollo de nuevas matrices, las ya definidas como segunda generación de matrices, que tengan propiedades físico-químicas que las hagan más adecuadas para el estudio de este tipo de analitos (ej. matrices reactivas, matrices especiales para modo negativo, matrices híbridas con componentes orgánicos e inorgánicos, nano materiales, matrices básicas, líquidos iónicos, entre otras)^{4,18}. En particular han sido descriptas varias aplicaciones de los LIMs en el análisis de compuestos de bajo peso molecular ya que, comparado con las matrices sólidas clásicas, las señales de fondo propias de la matriz se ven disminuidas o completamente suprimidas¹⁵⁻¹⁸.

Por otro lado, el análisis de hidratos de carbono por MALDI-MS es desafiante debido a la baja eficiencia de ionización de estos analitos²¹. Si bien existen algunas metodologías de derivatización de los mismos para mejorar la eficiencia de DI, estos procesos son realizados en múltiples etapas y por lo tanto requieren una gran cantidad de masa y tiempo de preparación de la muestra²². Es por eso que muchos esfuerzos son realizados para mejorar la técnica para el estudio de este tipo de analitos²³, principalmente en el desarrollo de nuevas matrices que mejoren la eficiencia de DI. Como es sabido, las matrices MALDI clásicas como el ESA, el ácido *E*-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido ferúlico, EFE) e incluso el ECHCA no presentan un buen desempeño como matriz para el estudio de azúcares, en especial para aquellos de bajo peso molecular²⁴⁻²⁶. Dentro de las matrices clásicas, el DHB es la matriz por excelencia para el estudio de oligosacáridos²⁴, sin embargo, el ZSA ha sido recientemente descripto como una matriz eficiente para el análisis de esta familia de analitos, aunque hasta la actualidad el número de aplicaciones reportadas de esta matriz es relativamente bajo⁶. En este sentido, los LIMs son una alternativa promisorio a las matrices clásicas para el estudio de estos compuestos, en especial

para oligosacáridos de LMW, ya que no solo se disminuye el ruido de fondo de la matriz, sino que también, en la mayoría de los casos han demostrado una mejora en la eficiencia de DI en comparación con las matrices clásicas^{10,15,27-29}. Generalmente, en este tipo de experimentos es necesario probar distintos tipos de cationes constituyentes de los LIMs, ya que, si bien la respuesta de los LIMs es similar, no todos los cationes utilizados presentan la misma eficiencia de DI para un dado analito o familia de analitos³⁰. Esto lo convierte en una variable experimental más a optimizar ya que no se encuentra descrito, hasta el día de hoy, que propiedades debe poseer el catión para generar un LIMs más eficiente.

En particular, dentro de la familia de los hidratos de carbono, los oligosacáridos sulfatados presentan una problemática especial en su estudio por MALDI-MS. Los grupos sulfatos presentan uniones lábiles y por lo tanto son fácilmente disociados del azúcar en el proceso de DI, produciéndose la descomposición (fragmentación) del analito dentro de la cámara de ionización (ISD, por sus siglas del inglés *In Source Decomposition*), lo que dificulta la detección del ion molecular intacto^{26,31}. Si bien algunos abordajes a esta problemática han sido la estabilización de los grupos sulfato por derivatización^{26,31}, esto requiere una preparación de la muestra extra que dificulta y encarece el análisis. Una respuesta a esta problemática es el desarrollo de matrices frías, es decir, matrices que no generen analitos en un estado vibracional excitado y así evitar su descomposición. Si bien el ESA ha sido utilizado para el estudio de azúcares sulfatados, ya que presenta una baja descomposición del analito en la cámara de ionización, su eficiencia como matriz es baja (baja relación señal/ruido para el ion molecular) y además presenta una abundante cantidad de señales propias, lo que dificulta la visualización del ion molecular^{6,32}. Por el contrario, su isómero geométrico, el ZSA, ha demostrado ser una matriz más eficiente para el estudio en modo negativo de estos analitos, presentando una menor descomposición en la fuente y un aumento significativo de la eficiencia del proceso de desorción/ionización⁶. Por otro lado, el ácido gentísico (DHB) es una matriz fría ampliamente utilizada para el estudio de hidratos de carbono^{27,31,33} que induce muy poca descomposición del analito en la fuente. Una desventaja de esta matriz, del mismo tipo de la observada para el ZSA, es la menor homogeneidad de la muestra. En el caso del DHB la cristalización de la matriz como agujas pequeñas distribuidas irregularmente en ciertos sectores de la muestra sólida hace que los puntos dulces estén localizados heterogéneamente solo en unos pocos sectores de la muestra. Este factor no solo dificulta el análisis, sino que también disminuyen drásticamente la reproducibilidad de los resultados. Por el contrario, el nor-harmano (nHo, 9H-pirido[3,4-b]índol) como matriz, presenta una mejor distribución de los puntos dulces en las muestras con respecto al DHB. Esta matriz cristaliza en forma de abundantes agujas distribuidas homogéneamente en

toda la muestra sólida, sin embargo, ésta se comporta como una matriz más caliente que el DHB en similares condiciones experimentales, obteniéndose los iones de los fragmentos con mayor o igual intensidad que el ion molecular³³.

Dentro de las matrices clásicas sólidas, el nHo, miembro de la familia de los alcaloides β -carbolinas, fue introducido como matriz MALDI hace 25 años y ha sido aplicado para el análisis de diversos tipos de analitos tales como proteínas e hidratos de carbono ácidos, neutros y básicos tanto en modo positivo como en modo negativo^{34–36}, polisacáridos sulfatados^{33,37}, sulfoglicoesfingolípidos³⁸, lípidos³⁹ y polímeros^{40,41} en modo iónico negativo. Recientemente, el nHo ha sido aplicado satisfactoriamente en la obtención de imágenes por MALDI-MS, en particular para generar perfiles de lípidos presentes en tejidos animales (ej.: distribución de fosfolípidos en tejido cerebral⁴², lípidos en tumores⁴³, cardiolipinas en células eucariotas⁴⁴, entre otros). Sin embargo, hasta el desarrollo del presente trabajo, a pesar de la gran cantidad de aplicaciones del nHo como matriz y sus particulares propiedades ácidas y básicas, nunca fue estudiado como constituyente estructural de matrices iónicas, actuando como contra ion de las matrices ácidas clásicas (sales de norharmonio). Vale destacar que tanto el nHo como la BAM, para tomar como ejemplo una de las aminas alifáticas utilizadas como contra ion en los LIMs descritos en la literatura, son bases orgánicas que tienen un pKa alrededor de 10: BAM pKa = 10,6, nHo pKa(N) (nitrógeno piridínico) = 7,2 a 7,9^{40,45} y pKa(NH) (nitrógeno indólico) = 14,5^{40,45}, lo que permitiría la formación de matrices iónicas próticas. En el estado electrónico excitado de una molécula se produce la reorganización del momento dipolar, por lo que la constante de ionización cambia y por lo tanto cambia la constante de transferencia de protón en comparación con el estado electrónico fundamental⁴⁶. El nHo en el estado electrónico excitado (*) singulete (S1) tiene un pKa*(N) (nitrógeno piridínico) = 12,2 a 13^{40,45,47} y pKa*(NH) (nitrógeno indólico) = 7,7^{40,45}.

En este capítulo y en el siguiente (capítulos 2 y 3) nos focalizamos en la propuesta y estudio de ciertos LIs como matrices MALDI para el estudio de hidratos de carbono de bajo peso molecular. El objetivo de este trabajo es realizar un estudio exploratorio modificando el componente catiónico de los LIs de matrices MALDI clásicas de carácter ácido. Los resultados de estos experimentos se dividen en dos capítulos, en el primero de ellos se hace foco en las MIs con aminas alifáticas como contraíón, mientras que en el segundo se utiliza el nHo como componente catiónico de estas nuevas matrices. A diferencia de las aminas alifáticas, el nHo al igual que la matriz ácida clásica tienen la capacidad de absorber la radiación del láser en el proceso MALDI. Entre las matrices ácidas de primera generación utilizadas como constituyentes de las nuevas MIs hemos utilizado el ECHCA, DHB y ESA. Los LI de estos ácidos conteniendo BAM

u otras aminas alifáticas ya han sido descriptos en la literatura para el análisis de péptidos, proteínas e hidratos de carbono^{8,10}, es por eso que son incluidos en este estudio comparativo. Dentro de las matrices de segunda generación incluidas en el presente estudio se encuentran (i) el ZSA, que ha sido descripto como una matriz más eficiente que su isómero *E* para el análisis de azúcares⁶ y (ii) los comercialmente disponibles halo-derivados del ácido α -cianocinámico como el ácido *E*-4-cloro- α -cianocinámico (E-4ClCHCA)³ y el ácido *E*-4-flúor- α -cianocinámico (E-4FCHCA)³. De igual forma los LI con BAM de estos halo-derivados también han sido descriptos en la literatura como potenciales matrices MALDI por Towers y col.^{4,48}.

Para este estudio se seleccionan una serie de carbohidratos neutros y sulfatados como analitos para comparar el desempeño de este conjunto de matrices MALDI. Los estudios se realizan en distintos modos de análisis: positivo, negativo, lineal y reflectrón, efectuándose también en algunos casos experimentos MS/MS. Complementariamente se analizan también las propiedades físicas y morfológicas (imágenes ópticas) de las matrices sólidas por separado comparadas con las de los LIs propuestos. En forma comparativa también se analiza la homogeneidad en la distribución del analito en la muestra. Como se discutirá posteriormente este análisis se realiza comparando la homogeneidad óptica de las muestras con el mapa iónico de la superficie de la misma. Las Figuras A2.1-A2.39 y las Tablas A2.1 y A2.2 mencionadas en este capítulo se encuentran en el Anexo 2.

2.2 EXPERIMENTAL

2.2.1 Materiales y métodos

El 9H-pirido[3,4-b]indol (nor-harmano, nHo), el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico, DHB), los ácidos *E*-cinámicos: ácido *E*-4-hidroxi- α -cianocinámico (ECHCA), ácido *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido *E*-sinapínico, ESA), ácido *E*-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido *E*-ferúlico, EFE), ácido *E*-4-hidroxicinámico (ácido *E*-cumárico, ECUM), ácido *E*-4-cloro- α -cianocinámico (E-4ClCHCA), ácido *E*-4-flúor- α -cianocinámico (E-4FCHCA) y las aminas: etilamina (EAM), 2-aminoetan-1-ol (etanolamina, EOHAM), trietilamina (TEAM), *n*-butilamina (BAM), 4-aminobutan-1-ol (butanolamina, BOHAM) y tributilamina (TBAM) fueron provistas por Aldrich (USA). La estructura de estos compuestos y su masa exacta se muestra en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 18.

Las sales sódicas de azúcares sulfatados: neocarratetraosa-4¹,4³-disulfato (NCT), neocarrahexaosa-2⁴,4¹,4³,4⁵-tetrasulfato (NCH), neocarraoctaosa-4¹,4³,4⁵,4⁷-tetrasulfato (NCO) fueron provistas por Sigma-Aldrich (USA). Los azúcares: maltoheptaosa (M7), isopropil- β -D-1-tiogalactosido (IPSG), β -ciclodextrina (β CD) y la mezcla de fructanos llamada Inulina de fórmula

molecular $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$ se obtuvieron de Sigma Chemical, Tokyo, Japón. El fructano sacarosa o sucrosa (F2) fue provisto por Wako Pure Chemical, Japón. Las estructuras generales de los carbohidratos estudiados se muestran en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 21. Todos los solventes orgánicos (J. T. Baker grado HPLC), fueron utilizados sin previa purificación. Se utilizó agua de muy baja conductividad (grado Milli-Q).

Los ácidos Z-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ZSA), Z-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ZFE) y el Z-4-hidroxicinámico (ZCUM) fueron sintetizados según el protocolo descripto por Salum y colaboradores⁴⁹. Para ello se prepara una solución de 1×10^{-3} moles del isómero *E* del ácido en metanol (MeOH, 5 mL). A esta solución se le agrega BAM para alcanzar una relación molar 1:1 ácido:amina. La solución se lleva a un volumen final de 300 mL de acetonitrilo (MeCN) para alcanzar una concentración aproximada 4 mM. Esta solución se irradia por siete horas con 4 lámparas con un máximo de emisión a 300 nm (Rayonet RPR lamp 300 nm, bandwidth ~ 20 nm, 8W, 26 cm length; Southern N.E. Ultraviolet Co.), con agitación. Luego de alcanzar el equilibrio fotoestacionario, la solución se enfría lentamente hasta la aparición de un precipitado que consiste únicamente en el LI con BAM del isómero *Z* del ácido utilizado. El sólido se separa, se disuelve en metanol y se utiliza una resina de intercambio catiónico (Dowex 50WX8-200 ion-exchange resin, Sigma Aldrich) para liberar el ácido de la amina. El producto de reacción se caracteriza por p.f. y espectroscopía ^1H -RMN. Las mezclas de los isómeros *E/Z*-CHCA, *E/Z*-4ClCHCA y *E/Z*-4FCHCA se obtienen por irradiación a 300 nm por 5 hs de una solución 4 mM del isómero *E* en una mezcla acetonitrilo:metanol (97:3 %v/v). Al finalizar la irradiación se evapora el solvente a presión reducida y el sólido obtenido se caracteriza por espectroscopía ^1H -RMN. Se realiza una cuantificación relativa de la proporción de ambos isómeros en la mezcla, por medio de la comparación del área de la señal correspondiente al H β de ambos isómeros en el espectro de ^1H -RMN, en los tres casos se obtienen mezclas entre 56% y 58% para el isómero *E* y 44% y 42% para el isómero *Z*. La descripción espectroscópica de estas mezclas se encuentra detallada en el anexo de este capítulo, Anexo 2 (Espectroscopía IR y ^1H -RMN).

Los líquidos iónicos se prepararon disolviendo 0,3 a 0,1 g del ácido en 10 a 5 mL de metanol y agregando luego una cantidad equimolar de la base orgánica (EAM, EOHAM, TEAM, BAM, BOHAM, TBAM, nHo). La mezcla se mantiene por 10 minutos en el sonicador y luego se evapora el solvente a presión reducida. El residuo obtenido se mantiene en la oscuridad y se procede a su caracterización (espectroscopía de absorción UV-Vis y espectroscopía ^1H -RMN).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) fueron realizados en un espectrómetro Bruker AC-200 (200-MHz) (DQO, FCEN, UBA) y en un espectrómetro Bruker AMX500 (500-MHz, BrukerBiospin, USA) (UMYMFOR-CONICET. DQO, FCEN, UBA). Las medidas

fueron realizadas utilizando una secuencia de pulsos estándar. Todas las mediciones fueron realizadas utilizando dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆) (Aldrich, USA) como solvente.

La morfología de la superficie de las matrices clásicas y de los LI propuestos como matrices se analizaron usando un microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) con un instrumento Zeiss NTS Supra 40 con un detector secundario en la lente (CMA, FCEN, UBA). Las muestras (polvo) se fijaron al soporte utilizando una cinta adhesiva de carbono conductora y antes de examinarlas se recubrieron con una fina capa de Pt.

2.2.2 Preparación de muestras para MALDI-MS

Las soluciones stock de las matrices se prepararon de la siguiente manera: (a) matrices clásicas: se disolvieron 2 mg de la matriz en 1 mL de metanol/agua 65:35 (v/v) (concentración aproximada 0,01 M); (b) líquidos iónicos como matrices (LIMs): se preparan LIMs en dos relaciones molares 1:1 y 1:2 ácido:base, para lo cual se preparó una solución del ácido en metanol:agua (65:35 v/v) y luego se agrega a la misma, la cantidad necesaria de la base para alcanzar la relación molar deseada. Los LIMs se utilizan en una concentración 0,01 M. Las soluciones de analito se preparan por triplicado disolviendo 1 mg del carbohidrato en 1 mL de agua.

Para preparar la muestra sólida analito-matriz se utilizaron dos métodos a fin de realizar estudios comparativos. Método de capas sucesivas (método sándwich)⁵⁰. Se deposita sobre el electrodo porta muestra 0,5 µL de la solución de matriz y se espera que se seque a temperatura ambiente en atmósfera normal. Luego se coloca 0,5 µL de la solución del analito sobre el electrodo cubriendo la matriz, produciéndose parcialmente la disolución de la misma y se deja secar a temperatura ambiente. La preparación se concluye agregando dos porciones adicionales y sucesivas (0,5 µL) de la solución de matriz sobre el previo depósito de analito en el electrodo. Para resumir, la secuencia de la transferencia de las soluciones de matriz y analito sobre el electrodo porta muestras es: (a) matriz, (b) analito, (c) matriz y (d) matriz; en la muestra preparada la relación de los volúmenes es matriz:analito 3:1 v/v. Método mezcla. A partir de soluciones stock de matriz y analito preparadas como se indica anteriormente, se prepara previamente una solución de la muestra mezclando las soluciones matriz:analito en relación 3:1 v/v. Dos porciones de 0,5 µL de dicha mezcla se colocan sucesivamente sobre el electrodo porta muestra dejándose secar a temperatura ambiente y en atmósfera normal luego de cada transferencia.

2.2.3 Límite de detección (LOD)

Usando la β CD, como representante de los hidratos de carbono neutros, se determinó el límite de detección (LOD) para las matrices clásicas ECHCA, ESA, ZSA, nHo y DHB y sus LIMs ácido.TEAM y ácido.BAM en modo iónico positivo. Se prepararon y analizaron una serie de soluciones acuosas de diferente concentración por dilución a partir de una solución stock 10 mM hasta alcanzar una concentración mínima 0,1 μ M. Todas las soluciones fueron preparadas por triplicado. La preparación de la muestra se realizó utilizando el método de capas sucesivas (sándwich) descrito en la sección 2.2.2. En el análisis se utiliza como ion diagnóstico el aducto con sodio $[M+Na]^+$ ($[\beta CD+Na]^+$). Se realizó el mismo tipo de análisis en modo iónico negativo utilizando la NCT como analito modelo de los hidratos de carbono sulfatados. En este caso el ion diagnóstico utilizado en el estudio es la especie $[M-Na]^-$ ($[NCT-Na]^-$). El LOD se define como pmol de analito (β CD o NCT) transferidos al electrodo porta muestra que muestran picos con una relación señal ruido (S/R) mayor o igual a 4. El rango dinámico se determinó a partir de aquellos puntos cuya regresión lineal presentara el mayor R^2 ; en todos los casos el R^2 obtenido oscila entre 0,950 y 0,999.

2.2.4 Estabilidad de los LIMs

La estabilidad de la señal del analito en las distintas matrices se obtuvo a partir de la adquisición de 20 espectros de masa sucesivos en un punto fijo de la muestra (*sweet spot*). Cada espectro de masa es el resultante de la suma de 10 pulsos láser a una frecuencia de 100 Hz y una fluencia de 60%; lo que resulta en un total de 200 pulsos láser en un único punto. Los analitos estudiados fueron la β CD en modo lineal positivo (ion diagnóstico $[\beta CD+Na]^+$) y la NCT en modo lineal negativo (ion diagnóstico $[NCT-Na]^-$). La preparación de la muestra se realizó utilizando el método de capas sucesivas (sándwich) descrito en la sección 2.2.2.

2.2.5 Espectrometría de masa MALDI

Los experimentos fueron llevados a cabo en un equipo Bruker Ultraflex II TOF/TOF, usando como software de control el FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) (CEQUIBIEM-CONICET. DQB, FCEN, UBA). La desorción/ionización se realizó usando el tercer armónico de un láser de Nd:YAG, con una longitud de onda de emisión de 355 nm con una frecuencia de 100 Hz. El espectrómetro de masa se calibró en el rango de m/z 0-1500 con β CD utilizando nHo como matriz, para la calibración en ambos modos de análisis se utilizan tanto los iones propios de la matriz como de la β CD. Los espectros fueron adquiridos en modo lineal (L) positivo (+) y negativo (-) indicado en cada figura. En un primer momento los experimentos se realizan escaneando toda la muestra con el objetivo de encontrar la posición óptima para la adquisición de los datos (puntos dulces o *sweet spots*), luego se deja fija la posición del láser en

alguno de estos puntos y se adquieren los espectros. En estudios comparativos para cada analito, se ajustó la fluencia del láser para obtener una alta relación señal ruido (S/R), mínima fragmentación del ion precursor y una buena resolución, en la matriz que requiriese el umbral de fluencia más alto para la volatilización/ionización de un dado analito. Esta fluencia (informada en el epígrafe de cada figura) se dejó fija para los experimentos comparativos entre grupo de matrices. Cada espectro de masa es el resultante de una suma de 200 pulsos láser (*shots*) en el mismo punto de la muestra con una frecuencia de 100 Hz. Los resultados fueron analizados usando el software FlexAnalysis desarrollado por Bruker para este equipo. Se utilizó un electrodo porta muestras de acero inoxidable MTP 384 (Número de parte: 209519; 384 puntos circulares de 3,5 mm de diámetro S/N 03630, Bruker).

2.2.6 Mapeo químico superficial por espectrometría de masa MALDI (imágenes MALDI-MS)

El estudio de la homogeneidad de las muestras sólidas por MALDI se realizó para las matrices clásicas y sus LIs con TEAM y BAM en relación molar ácido.amina 1:1 obteniendo imágenes iónicas de la superficie de la muestra por MALDI-MS. Las muestras fueron preparadas siguiendo ambas metodologías descritas anteriormente en la sección 2.2.2: Capas sucesivas, depositando 0,5 µL de la solución acuosa del analito (0,1 mM) sobre la matriz ya depositada sobre el porta muestras y el método mezcla depositando dos alícuotas de 0,5 µL de una solución mezcla matriz:analito 3:1 v/v.

Para cada muestra depositada, de geometría aproximadamente circular, se definió la superficie a estudiar y se dividió el área en una cuadrícula de 10x10 nombrando y numerando cada división de la superficie. Cada posición fue impactada con el láser manualmente. Los espectros adquiridos son el resultado de la acumulación de los iones generados en 200 pulsos láser sucesivos con una frecuencia de 100 Hz en cada una de las posiciones de la cuadrícula. La imagen MALDI resultante surge de la representación bidimensional de la información proveniente de los espectros de masa individuales utilizando un ion diagnóstico para cada analito estudiado (ver información en el epígrafe de cada imagen). Se crea así un mapa molecular bidimensional mostrando la intensidad porcentual del ion diagnóstico seleccionado en las diferentes posiciones de la superficie de la muestra sólida. Para la representación gráfica de estas imágenes se utiliza el programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) como software de análisis. La comparación de intensidades en estas imágenes MALDI es semi cuantitativa ya que la intensidad relativa porcentual consignada para cada punto está normalizada respecto a la máxima intensidad obtenida dentro del grupo de matrices comparadas en la figura (información detallada en el epígrafe de cada figura). Se recurrió al

protocolo “*made-at-home*” descripto, ya que por el costo del programa que provee Bruker para tal fin, nunca se dispuso del mismo.

2.2.7 Espectroscopía de absorción UV-Visible y reflectancia difusa

Los espectros de absorción UV-Visible se realizaron en un espectrómetro Shimadzu UV-1203. Las medidas fueron realizadas en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y tapa de teflón (1x1, 2,5 mL, Hellma, Alemania). Para ello se prepararon soluciones 20 μ M en metanol, metanol:agua (65:35 v/v) y acetonitrilo. Los espectros de reflectancia difusa de las muestras sólidas se realizaron con un espectrómetro Shimadzu UV3101PC equipado con una esfera integradora Shimadzu ISR-3100. Sulfato de Bario fue utilizado como blanco de referencia estándar para ajustar el 100% de reflectancia (INQUIMAE-CONICET. DQIAQF, FCEN, UBA).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde la aparición de los LIs como matrices MALDI⁸, numerosas aplicaciones han sido reportadas utilizando diversos LIs de las matrices clásicas. Sin embargo muy pocos trabajos han apuntado a estudiar de forma exhaustiva cómo variando el constituyentes aniónico o el catiónico de los LIs, afecta a las propiedades físicas del LIM y su eficiencia en el proceso de desorción/ionización o en la especificidad para cada tipo de analito. Este capítulo tiene como objetivo realizar un estudio exploratorio modificando sistemáticamente el componente catiónico en el LI de matrices MALDI clásicas de carácter ácido. De esta forma se evalúa como el cambio en el largo o la ramificación de la cadena del catión o su funcionalidad modifican la eficiencia en el proceso de desorción/ionización (DI) de los LIMs para el estudio de hidratos de carbono de bajo peso molecular. En este capítulo también se realiza un estudio comparativo de cómo afecta el proceso de DI para azúcares de bajo peso molecular cuando se modifica el componente aniónico de los LIs derivados de las matrices ácidas de la familia de los ácidos *E*-cinámicos, por su isómero geométrico *Z*.

2.3.1 Caracterización de matrices

En las Figuras 1, 2 y 3 a y b se muestran los espectros de absorción UV-Visible en solución metanólica en condiciones de Beer-Lambert y los espectros de reflectancia difusa de los LIMs propuestos, comparados con los espectros de las respectivas matrices ácidas constituyentes. En el caso de los espectros de absorción UV-Visible se analizaron todos los LIMs propuestos. El análisis de la reflectancia difusa se realizó únicamente de forma comparativa entre la matriz ácida y el LI con BAM debido a que esta técnica requiere cantidades considerables de masa y a la baja disponibilidad del equipo. Dada la experiencia en nuestro laboratorio y el ejemplo mostrado en la Figura 1b para el ECHCA.TEAM y el ECHCA.BAM, nos permite extrapolar

el comportamiento en la reflectancia de las muestras sólidas ácido.BAM a todos los LIs estudiados, asumiendo que todos ellos presentan el mismo efecto en el corrimiento de el máximo de reflectancia comparado con la matriz ácida constituyente.

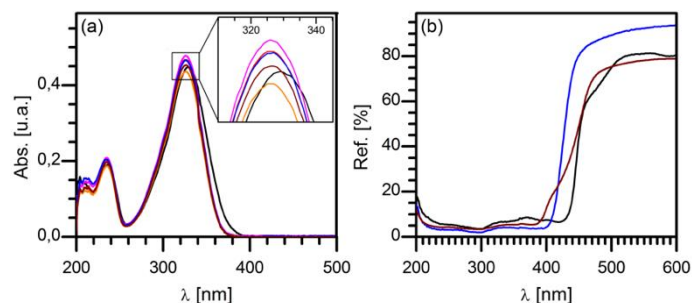


Figura 1. (a) Espectro de absorción UV-Vis para las matrices ECHCA (negro) y los LIs ECHCA.EAM (rojo), ECHCA.EOHAM (verde), ECHCA.TEAM (rosa), ECHCA.BAM (azul), ECHCA.BOHAH (naranja) y ECHCA.TBAM (marrón). Concentración: 2×10^{-5} M, solvente: metanol. (b) Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de la muestra sólida: ECHCA (negro), ECHCA.BAM (azul), ECHCA.TBAM (marrón).

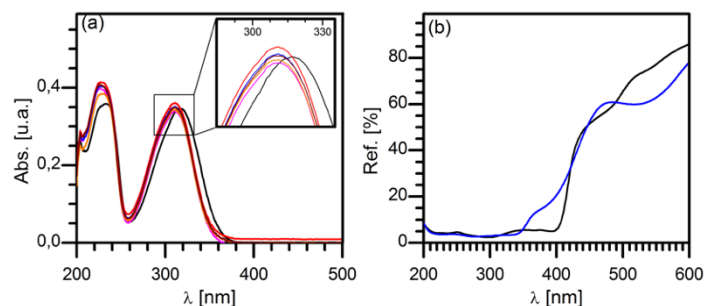


Figura 2. (a) Espectro de absorción UV-Vis para las matrices ESA (negro) y los LIs ESA.EAM (rojo), ESA.EOHAM (verde), ESA.TEAM (rosa), ESA.BAM (azul), ESA.BOHAH (naranja) y ESA.TBAM (marrón). Concentración: 2×10^{-5} M, solvente: metanol. (b) Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de la muestra sólida: ESA (negro) y ESA.BAM (azul).

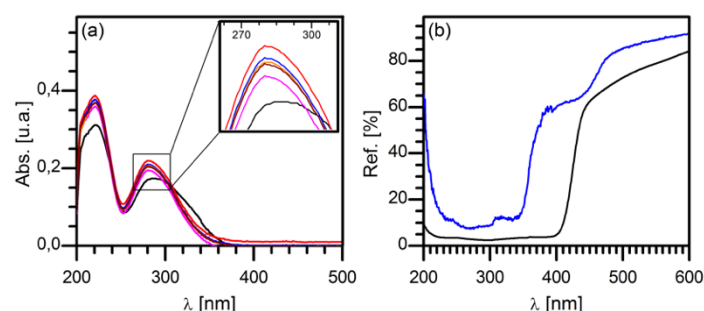


Figura 3. (a) Espectro de absorción UV-Vis para las matrices ZSA (negro) y los LIs ZSA.EAM (rojo), ZSA.EOHAM (verde), ZSA.TEAM (rosa), ZSA.BAM (azul), ZSA.BOHAH (naranja) y ZSA.TBAM (marrón). Concentración: 2×10^{-5} M, solvente: metanol. (b) Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de la muestra sólida: ZSA (negro) y ZSA.BAM (azul).

En las Figuras 1, 2 y 3 a se observa que para los tres ácidos estudiados la presencia de una amina alifática produce un corrimiento hipsocrómico del espectro de absorción debido a la formación del ion carboxilato. Este corrimiento también se observa en los otros solventes estudiados (datos no mostrados). Sin embargo, en todos los casos la magnitud del corrimiento hacia menores longitudes de onda de los LIMs con respecto a las matrices ácidas depende del solvente, siendo mayor en solventes polares próticos debido a la estabilización de los iones por solvatación⁵¹. Este mismo comportamiento puede observarse en los espectros de reflectancia difusa, donde el LI (ácido.BAM) presenta un corrimiento a menores longitudes de onda respecto a la reflectancia del ácido sólo (Figuras 1, 2 y 3 b).

En particular los LIs derivados del ECHCA con las hidroxiaminas presentan una disminución del coeficiente de absortividad molar (ϵ) en metanol respecto al ECHCA mientras que el resto de las aminas presentan un aumento del ϵ . Si bien a 355 nm, longitud de onda de emisión láser en el proceso de DI, todos los LIs ECHCA.amina presentan un coeficiente de absortividad molar distinto de cero en metanol (entre $6,0$ y $7,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), estos coeficientes son menores al del ácido sólo ECHCA ($\epsilon_{(355\text{nm})} = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) debido al corrimiento hipsocrómico del espectro de absorción de los LIs. El espectro de reflectancia difusa (Figura 1b) sigue la misma tendencia que lo observado en solución, con un corrimiento hipsocrómico de los LIs ECHCA.BAM y ECHCA.TEAM con respecto al ácido ECHCA. Como es de esperar, para todas las especies, en estado sólido las bandas de absorción se ensanchan, abarcando longitudes de onda mayores. En ambos casos las especies presentan una buena absorción a la longitud de onda de emisión del láser ($\lambda = 355 \text{ nm}$).

Para el caso de los isómeros del ácido SA (Figuras 2 y 3 a), es sabido que el ZSA además de presentar un corrimiento del máximo de absorción a menor longitud de onda con respecto al ESA, presenta un menor coeficiente de absortividad molar a la longitud de onda del máximo de absorción, estos efectos están asociados a la pérdida de planaridad de su estructura comparado con la geometría completamente plana del ESA⁵¹. En presencia de aminas alifáticas, la tendencia mostrada por ambos isómeros es la misma que para los LIs derivados del ECHCA, observándose el característico corrimiento hipsocrómico producto de la formación y estabilización del carboxilato. Cabe destacar, que a diferencia de lo observado en LIs ESA.amina con respecto al ESA, los LIs ZSA.amina presentan un aumento notorio del coeficiente de absortividad molar a la longitud de onda de máxima absorción comparado con el ϵ del ZSA. En estas condiciones, si bien todos los LIs presentan un ϵ a 355 nm distinto de cero, el corrimiento a menores longitudes de onda del espectro de absorción respecto al ácido hace que el ϵ a 355 nm sea menor en los LIs que en los ácidos solos. Es decir, la tendencia observada para el

coeficiente de absorptividad molar a 355 nm en metanol es la siguiente $\epsilon_{ZSA.amina} < \epsilon_{ZSA} < \epsilon_{ESA.amina} < \epsilon_{ESA}$ ($\epsilon_{(355nm)} ZSA.amina = 0,5 \text{ a } 10 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{(355nm)} ZSA = 12 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{(355nm)} ESA.amina = 10 \text{ a } 18 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{(355nm)} ESA = 32 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Al igual que lo observado en solución, los espectros de reflectancia difusa de los LIs ESA.amina y ZSA.amina sufren un corrimiento a menores longitudes de onda con respecto al del ácido solo. Este corrimiento es ligeramente mayor para el LI ZSA.BAM lo que resulta en una disminución significativa de la absorción del sólido a 355 nm comparado con el LI ESA.BAM y con los ácidos ESA y ZSA.

En el caso de estos ácidos (ECHCA $pK_{aH_2O} = 1,17$, ESA $pK_{aH_2O} = 4,47$, ZSA $pK_{aH_2O:MeOH} = 4,13$)^{52,53,54} al igual que con el DHB ($pK_{aH_2O} = 2,97$)¹⁶, matriz usada como referencia en estos estudios, la diferencia de acidez en comparación con las bases utilizadas como contraión (EAM $pK_{aH_2O} = 10,6$, EOHAM $pK_{aH_2O} = 9,5$, TEAM $pK_{aH_2O} = 10,67$, BAM $pK_{aH_2O} = 10,61$, BOHAM $pK_a = 10,35$ Y TBAM $pK_a = 10,52$)⁵⁵⁻⁵⁷ son lo suficientemente grandes (ΔpK_a entre 5 y 9,5) como para que los compuestos resultantes presenten un alto carácter iónico¹⁶. En el caso del nHo, su fuerza como ácido es mucho menor con un $pK_{aH_2O} = 14,5$ ⁵⁸ correspondiente a la pérdida del protón del nitrógeno indólico; en este caso las mezclas resultantes con aminas alifáticas no generan compuestos iónicos ya que la fuerza de la base no es suficiente como para abstraer este protón. Según la clasificación establecida por Kobylis en 2019¹⁶ las matrices de tipo ECHCA.amina, ESA.amina, ZSA.amina y DHB.amina pueden ser clasificadas como matrices iónicas sólidas (MISs) a temperatura ambiente, mientras que las matrices de tipo nHo.amina pueden ser clasificadas dentro de las matrices no iónicas sólidas (MNISs). A pesar de esta clasificación, en este trabajo de tesis se utiliza la nomenclatura LIMs o LIs introducida por Armstrong⁸ en 2001 para hacer referencia a los compuestos resultantes de la combinación de un ácido y una base orgánica, independientemente del estado agregación de la misma a temperatura ambiente.

En las Figuras 4 y A2.1 del Anexo 2 (pág. 296) se muestran las imágenes ópticas de las matrices MALDI ácidas comparada con los LIs estudiados como posibles matrices, depositadas sobre el electrodo porta muestra según el protocolo descrito en la sección experimental (capas sucesivas). Estas imágenes fueron tomadas dentro del mismo equipo Bruker UltraFlex II TOF/TOF antes de realizar los experimentos MALDI. Estas imágenes permiten comparar a escala macroscópica como cambia la solidificación de las matrices ácidas con la de los LIs y si existen variaciones en la solidificación dependiendo del largo, funcionalidad o ramificación de la amina constituyente del LI.

En la Figura 4a se observa como el ECHCA solidifica como pequeños agregados distribuidos de forma aleatoria cubriendo toda la superficie del *spot* (zona demarcada sobre el electrodo porta muestras). A diferencia de este, los LIs derivados del ECHCA (Figura 4b-g) presentan una solidificación con agregados más grandes y distribuidos más espaciados entre si, esto puede interpretarse como un ligero aumento de la homogeneidad óptica de la matriz respecto a la matriz clásica. En el caso de los LIs ECHCA.EAM y ECHCA.EOHAM (Figura 4b y c) este cambio en la morfología de la matriz ácida respecto del LIs se hace más evidente, casi sin observarse aglomerados en toda la superficie del *spot*.

Como ya ha sido descrito anteriormente por Salum y colaboradores⁶ el cambio de la estereoquímica entre el ESA y el ZSA modifica significativamente la forma en la que estos compuestos solidifican. El ESA solidifica como pequeños agregados distribuidos aleatoriamente ocupando todo el *spot* mientras que el ZSA solidifica en los bordes del *spot* formando un anillo, perímetro circundante (Figura 4h y o, respectivamente). Para el caso de los LIs derivados de ESA, el cambio en la forma de solidificación es muy radical, observándose la formación de un anillo en los bordes del *spot*. A diferencia del resto de los LIs, el ESA.BAM (Figura 4l) solidifica como una solución sólida, mejorando significativamente la homogeneidad óptica respecto de la matriz ácida. Al igual que para el ESA.BAM los LIs derivados del ZSA (Figura 4p-u), con excepción del ZSA.EAM y ZSA.TBAM, se observa una solidificación al estilo de un solución sólida homogénea, parecido a un vidrio. Esta mejora en la homogeneidad óptica de los LIs con respecto a las matrices ácidas, ha sido uno de los criterios establecidos, y en algunos casos el único, para evaluar la mejora en la homogeneidad de esta segunda generación de matrices y por extensión de la homogeneidad de las muestras preparadas con ellas^{8,10,59}. En el caso de las imágenes ópticas de las matrices nHo, DHB y sus LIMs no se observan cambios morfológicos significativos como se muestra en la Figura A2.1.

En la Figura 5 se muestran las imágenes SEM de las matrices MALDI clásicas comparadas con sus LIs. En este caso se selecciona el LI ácido.BAM como modelo para el análisis microscópico del cambio morfológico que sufren las matrices ácidas en presencia de una amina. Para el caso del ECHCA también se estudia el efecto de un amina ramificada (TEAM) en estos cambios morfológicos. El análisis se realiza de forma comparativa entre los ácidos solos y sus LIs y la correlación entre los cambios microscópicos y macroscópicos observados, teniendo en consideración que la forma de obtención de los sólidos en ambas imágenes es distinto (ver sección experimental).

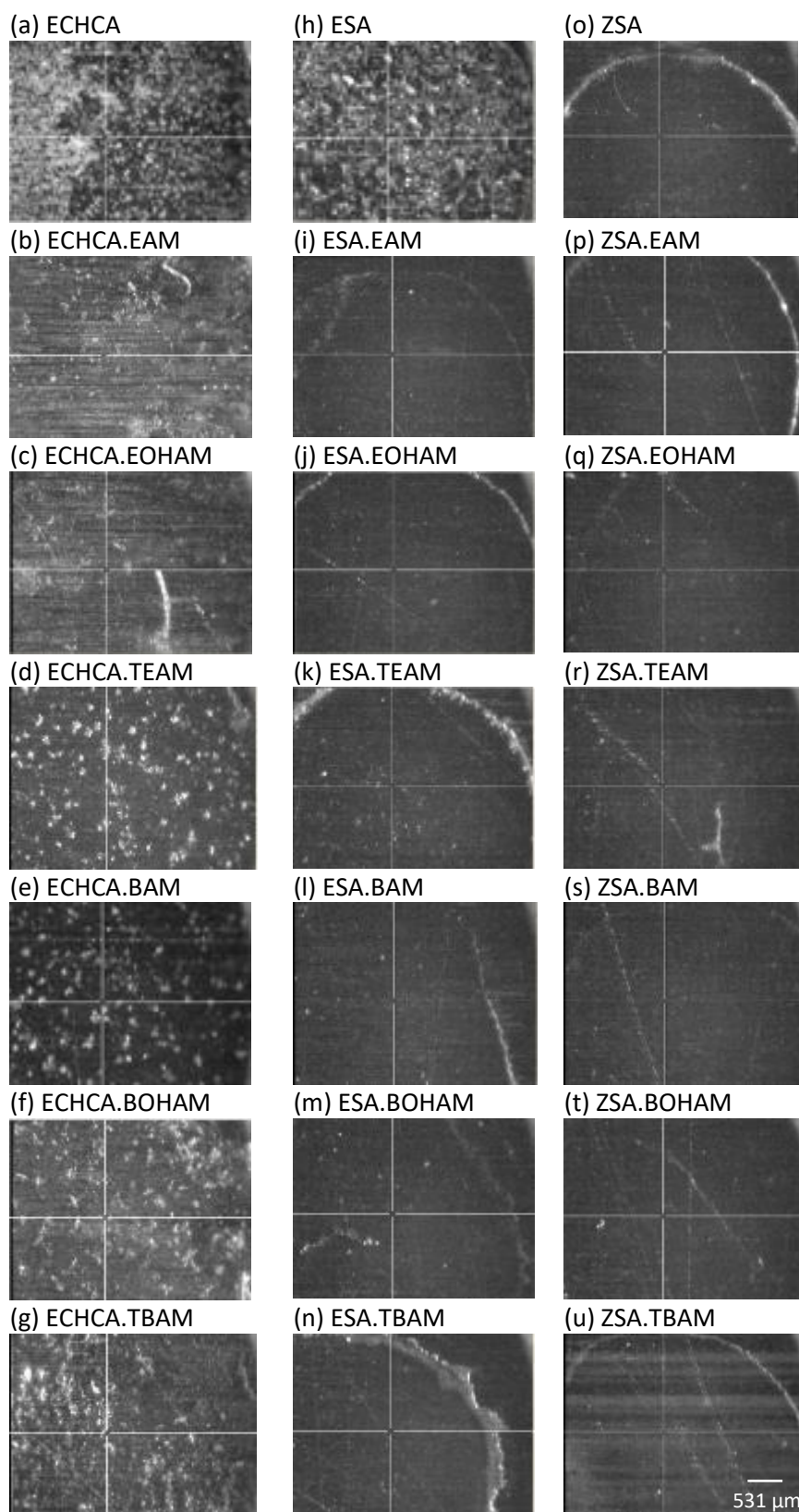


Figura 4. Imágenes ópticas de las matrices MALDI depositadas en el electrodo porta muestras: (a) ECHCA, (b-g) LIMs ECHCA.amina, (h) ESA, (i-n) LIMs ESA.amina, (o) ZSA y (p-u) LIMs ZSA.amina. Imágenes tomada en el centro del *spot*. Escala: 0,5 cm = 531 μm

Para el caso de los ácidos ECHCA y ESA el cambio morfológico en presencia de una amina es muy notorio, las matrices ácidas (Figura 5a y d) presentan pequeñas acumulaciones de

matriz superpuestas unas con otras generando una disposición que ocupan toda la imagen, mientras que los LIs forman aglomerados más grandes separados entre si (Figura 5b, c y e). Este cambio en la dispersión de los cristales puede correlacionarse con lo observado a nivel macroscópico interpretándose como un aumento de la homogeneidad óptica en los LIs (Figura 4). El ZSA, en cambio, forma agregados grandes separados entre si con una morfología rugosa, mientras que el LI ZSA.BAM forma cristales lisos en forma de agujas.

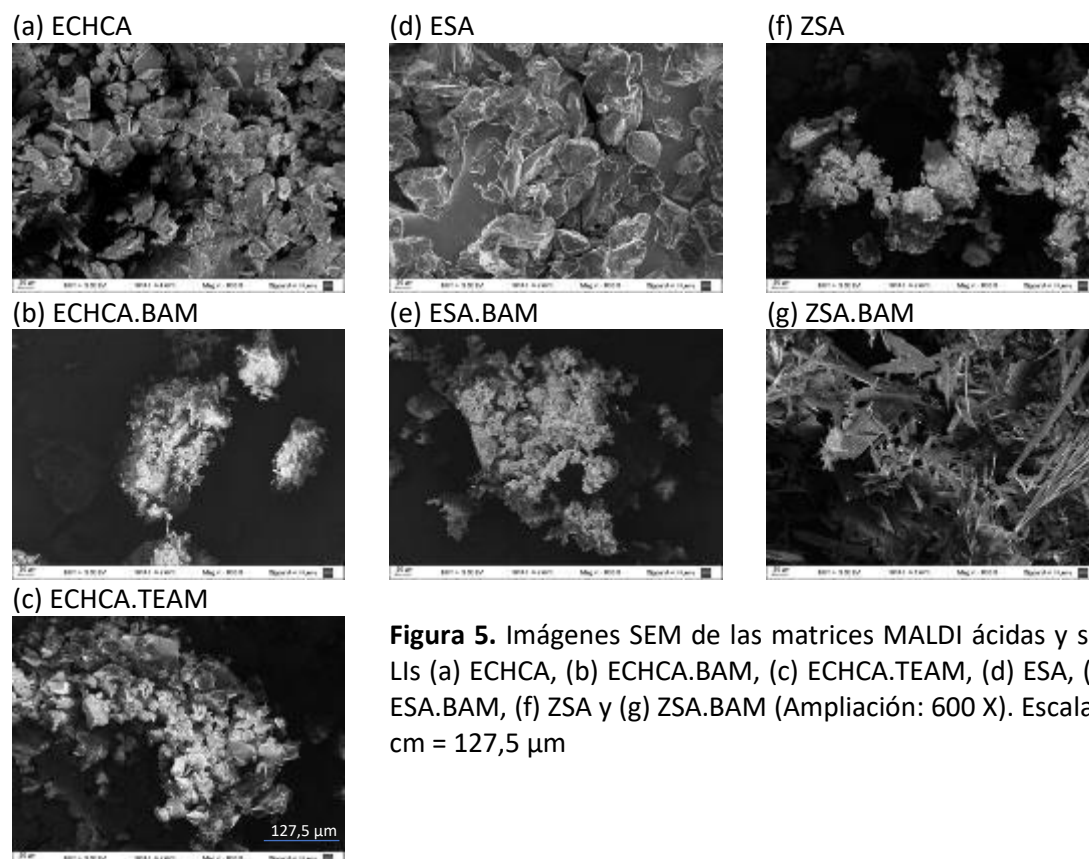


Figura 5. Imágenes SEM de las matrices MALDI ácidas y sus LIs (a) ECHCA, (b) ECHCA.BAM, (c) ECHCA.TEAM, (d) ESA, (e) ESA.BAM, (f) ZSA y (g) ZSA.BAM (Ampliación: 600 X). Escala 1 cm = 127,5 μm

2.3.2 Análisis por espectrometría de masa MALDI

2.3.2.1 Desorción/ionización láser de los compuestos estudiados como matrices (LDI)

El análisis del espectro de masa producto de la desorción/ionización láser (LDI) que sigue a la excitación electrónica de la especie considerada es fundamental en la propuesta de nuevas matrices MALDI. La cantidad, intensidad, rango de m/z y tipo de iones que genera la matriz en el proceso LDI puede dificultar el análisis de analitos. En particular el estudio de moléculas de LMW por MALDI ha sido, por muchos años, considerado como no apropiado o inútil debido principalmente al gran “ruido de fondo” debido a los diversos iones relacionados con la matriz presentes en el rango de estudio¹⁸. Con fines comparativos, los experimentos LDI se realizan en las mismas condiciones experimentales en las que se obtienen los espectros de masa MALDI para el análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular (sección 2.2.5).

En la Figura 6 se muestran de forma comparativa los espectros de masa LDI en modo lineal positivo en el rango de m/z de 0 a 500 para el ECHCA y sus LIs con las distintas aminas estudiadas, en este caso se muestran los espectros LDI correspondientes a los LIs en relación molar ácido:amina 1:1.

En el espectro de masa LDI del ECHCA (Figura 6a) se puede identificar el pico correspondiente a la especie protonada $[M+H]^+$ a m/z 190 y el ion formado por la deshidratación del ácido $[M-H_2O+H]^+$ a m/z 172. El resto de los iones observados corresponden a clústeres y fragmentos de los mismos que no fueron asignados. En el espectro LDI de los LIs en relación ácido:amina 1:1, con excepción de ECHCA.EAM, se observa una marcada disminución de la intensidad de las señales propias del ácido $[M+H]^+$ y $[M-H_2O+H]^+$, en algunos casos estas especies desaparecen por completo del EM de los LIs (Figura 6c-g). En estos espectros, con excepción de los LIs con aminas terciarias, se observa la aparición del ion molecular protonado $[M+H]^+$ de la amina correspondiente. En este rango de m/z , lo que se observa en general, en el espectro de los LIs en comparación con el espectro del ácido, es una disminución global de la cantidad de iones pero un aumento de la intensidad de los mismos. Este efecto puede interpretarse como una limpieza del ruido de fondo en los EM de los LIMs respecto de la matriz ácida. Cuando se realiza el espectro LDI sobre los LIs con el doble de amina (relación molar 1:2, espectros no mostrados) se observa en todos los casos la desaparición de los iones $[M+H]^+$ y $[M-H_2O+H]^+$ correspondientes al ácido y un aumento del ion $[M+H]^+$ de la amina correspondiente. En general lo que se observa es una disminución de la intensidad de las señales en el espectro de masa. En particular el espectro LDI del LI ECHCA.BAM 1:2 muestra una completa desaparición del espectro de masa LDI del ácido y una aparición de señales nuevas en el rango m/z de 200 a 500.

En la Figura A2.2 se muestra el espectro de masa LDI en modo lineal positivo del ECHCA y sus LIs con las distintas aminas en el rango de m/z entre 500 a 1500. En este rango de m/z se observa para el primero una serie de clústeres de alto peso molecular con una diferencia de masa aproximadamente constante entre ellos. En el espectro de masa de los LIs estos clústeres se ven aumentados en cantidad alcanzando valores de m/z mayores. También puede observarse que los LIs, con excepción de ECHCA.EAM y ECHCA.TBAM, presentan un aumento significativo de la intensidad de estas señales comparado a lo observado en el EM del ácido solo. El efecto del aumento de la relación molar ácido:amina 1:2 genera una disminución de la intensidad de estas señales, hasta en algunos casos desaparecer del espectro (espectros no mostrados). En ninguno de los LIs se observa la aparición de nuevas señales en comparación con lo observado para el ácido solo.

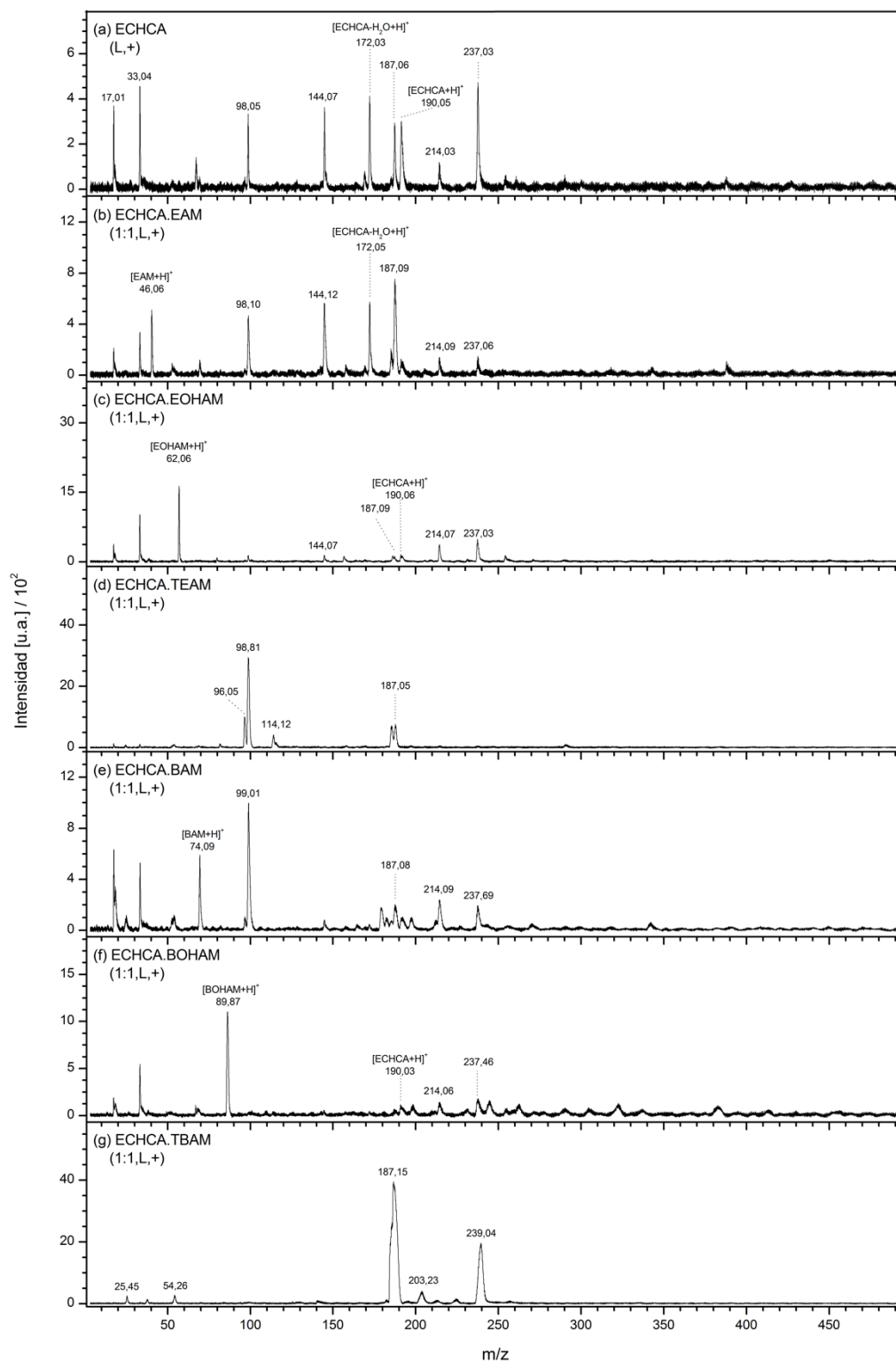


Figura 6. Espectros de masa LDI: (a) ECHCA y los LIs en relación molar ácido:amina 1:1: (b) ECHCA.EAM, (c) ECHCA.EOHAM, (d) ECHCA.TEAM, (e) ECHCA.BAM, (f) ECHCA.BOAM y (g) ECHCA.TEAM. Modo lineal positivo (L,+). Rango: m/z 0 a 500. Fluencia del láser 40%.

En modo lineal negativo los espectros de masa LDI de los LIs y el ECHCA en el rango de m/z 0 a 500 son iguales, ya que presentan las mismas señales tanto en el ácido como en los LIs. Respecto a la intensidad de las mismas no se observa una tendencia clara entre los LIs y el ácido solo, ya que en algunos casos se observa un pequeño aumento de la intensidad y en otros casos una disminución de la misma. A diferencia de esto, en el rango de m/z de 500 a 1500, si se observan cambios en el espectro LDI de los LIs en comparación con el del ácido solo. En este rango se puede observar una muy marcada disminución de la intensidad de las señales propias del ácido. Esta disminución de la intensidad genera un espectro LDI con menor ruido de fondo para los LIs en comparación con el ácido solo. Cabe aclarar que esta marcada disminución en la intensidad de los picos en los LIs en comparación con el ECHCA genera espectros que pueden malinterpretarse como más ruidosos debido a que se empiezan a distinguir varias señales de baja relación S/R pero que originalmente ya existían. En modo lineal negativo el aumento de la relación molar 1:2 ácido:amina genera una disminución en la intensidad de las señales respecto a la relación 1:1; en el rango de m/z de 0 a 500 esta disminución es muy pequeña, mientras que a mayores valores de m/z esta disminución es más significativa, generando en algunos casos la desaparición de las señales propias del ácido (espectros no mostrados).

En las Figuras 7 y 8 se muestran los espectros de masa LDI en el rango de m/z 0 a 500 en modo lineal positivo para los ácidos ESA y ZSA respectivamente. En cada figura se muestra en forma comparativa los espectros de los ácidos con sus LIs con las distintas aminas alifáticas estudiadas en relación molar ácido:amina 1:1. Los espectros LDI de ambos isómeros son similares entre sí, en ambos casos solo se observan el pico correspondiente al ion molecularn protonado $[M+H]^+$ a m/z 225 y la señal producto de la deshidratación del ácido $[M-H_2O+H]^+$ a m/z 207 que resulta ser el pico base del espectro (Figuras 7a y 8a). En el caso del ESA, el efecto del agregado de la amina resulta en una disminución de la intensidad de las señales propias del ácido en el espectro de masa LDI del LI, con excepción del ESA.EAM ((Figura 7b) que no presenta cambios significativos. En los LIs ESA.EAM, ESA.EOHAM, ESA.TEAM y ESA.TBAM se puede observar la aparición de la señal del ion protonado de la amina correspondiente $[M+H]^+$ a m/z 46, 62, 102 y 186 respectivamente. En el caso del LI ESA.BAM (Figura 7e) las señales correspondientes al ácido desaparecen completamente y no aparecen nuevas señales características de la amina o del LI, generando de esta forma un espectro limpio de ruido de fondo. En cambio, el efecto de las aminas en los LIs derivados del ZSA es más uniforme ya que en todos los casos se observan espectros de masa LDI completamente limpios, es decir desaparecen todas las señales propias del ácido y solo en el caso del LI ZSA.TBAM aparece el ion protonado de la amina y una señal propia del LI no identificada a m/z 234 (Figura 8b-g).

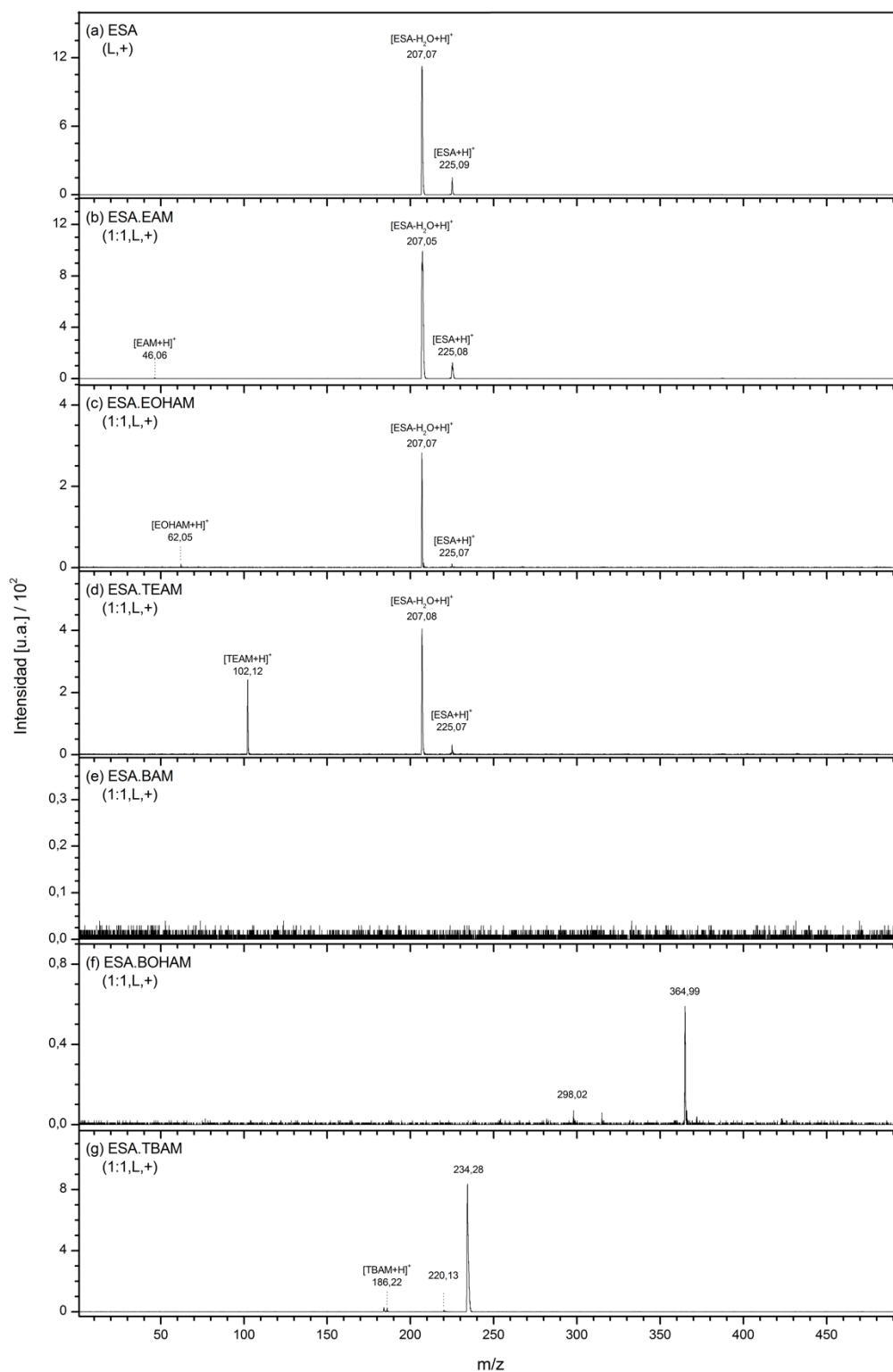


Figura 7. Espectros de masa LDI: (a) ESA y los LIs en relación molar ácido:amina 1:1: (b) ESA.EAM, (c) ESA.EOHAM, (d) ESA.TEAM, (e) ESA.BAM, (f) ESA.BOHAM y (g) ESA.TEAM. Modo lineal positivo ($L, +$). Rango: m/z 0 a 500. Fluencia del láser 40%.

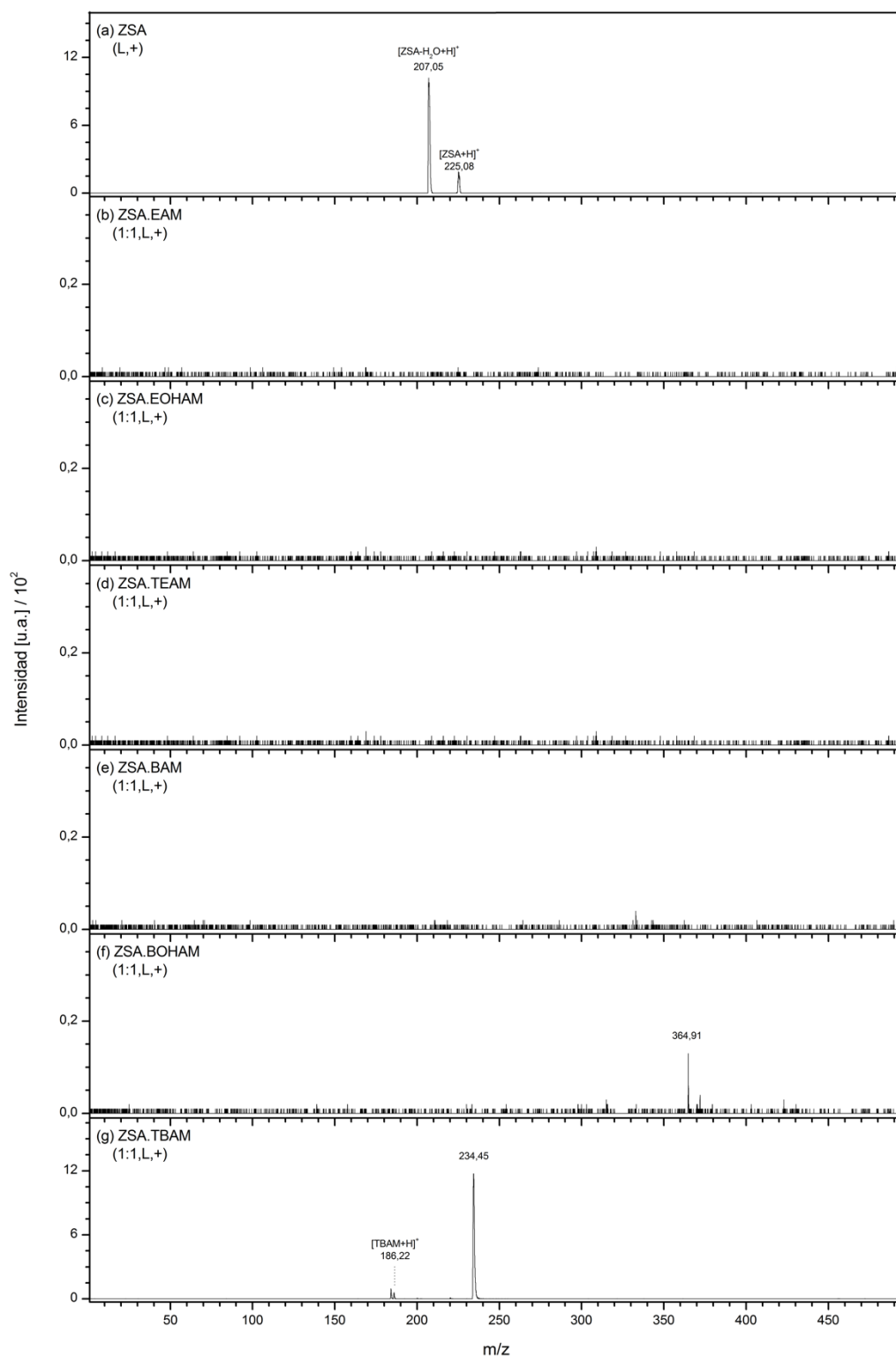


Figura 8. Espectro de masa LDI: (a) ZSA y los LIs en relación molar ácido:amina 1:1: (b) ZSA.EAM, (c) ZSA.EOHAM, (d) ZSA.TEAM, (e) ZSA.BAM, (f) ZSA.BOHAM y (g) ZSA.TEAM. Modo lineal positivo (L,+). Rango: m/z 0 a 500. Fluencia del láser 40%.

El aumento de la relación molar entre el ácido y la amina en los LIs (ácido:amina 1:2) genera un efecto similar a lo descrito anteriormente para los LIs del ECHCA. Para los LIs del ESA se observa en una desaparición completa de las señales del ácido en todos los casos, con excepción del LI ESA.EAM donde se observa una marcada disminución de la intensidad de los mismos. Para ambos isómeros, el aumento de la concentración de la amina en los LIs SA.EOHAM, SA.BAM y SA.BOHAM genera la aparición de una nueva señal a m/z 308, 332 y 364 respectivamente; estas especies no fueron asignadas (espectros no mostrados).

En las Figuras A2.3 y A2.4 podemos ver los espectros LDI en modo lineal positivo de los ácidos ESA y ZSA y sus respectivos LIs en relación molar 1:1 en el rango de m/z de 500 a 1500. En este rango el ácido ESA presenta una serie de clústeres no asignados a m/z 695, 918 y 1094, que en los LIs con EOHAM, TEAM y BAM desaparecen por completo del espectro LDI, no observándose otras señales con una alta relación S/R (Figura A2.3c-e). A diferencia de estos, el LI ESA.BOHAM (Figura A2.3f) si presenta la aparición de nuevas señales a m/z 618 y 769. En el caso de los LIs ESA.EAM y ESA.TBAM no hay cambios significativos en el espectro LDI en comparación con el del ácido (Figura A2.3b y g). Para el isómero ZSA y sus LIs se observa el mismo fenómeno. El ácido ZSA presenta, en este rango, tres clústeres que en presencia de una amina se ven disminuidos en intensidad y sin la aparición de nuevas señales, generando un espectro LDI con menor ruido de fondo que el ácido solo (Figura A2.4b-d y g). En el caso del ZSA.BAM y el ZSA.BOHAM aparecen señales nuevas con una alta relación señal ruido, que, si bien no generan un espectro ruidoso, aumentan la intensidad global del espectro de masa (Figura A2.4 e y f). Para ambos isómeros el aumento de la relación molar ácido:amina 1:2 genera una gran disminución de las señales propias del ácido, en algunos casos logrando la desaparición de las mismas del espectro, pero esto mismo conlleva la aparición de nuevas señales y/o el aumento de las señales propias del LI. Esto último genera en algunos LIs un aumento de la intensidad global del espectro LDI en comparación con la del ácido solo (espectros no mostrados).

En el modo de análisis lineal negativo en el rango de m/z de 0 a 500, los espectros LDI de los ácidos ESA y ZSA son iguales, se observan únicamente las señales de los iones correspondientes al ácido desprotonado $[M-H]^-$ (pico base) a m/z 223 y al clúster dimerico desprotonado $[2M-H]^-$ a m/z 447. Los LIs de estos ácidos presentan la misma tendencia que lo observado en modo positivo, observándose una disminución de la intensidad de estos iones. En el caso de los LIs derivados del ESA, esta disminución de la intensidad es mayor para el ion $[M-H]^-$ que para el dímero, lo que genera un cambio en la intensidad relativa de ambos, convirtiendo al ion $[2M-H]^-$ en el pico base de los espectros LDI de los LIs. En particular el LI ESA.BOHAM presenta un ruido de fondo de muy baja intensidad. En el caso de los LIs derivados del ZSA la

diminución de la intensidad de las señales es tal que, con excepción del LI ZSA.EAM, produce la desaparición completa de estos iones, generando espectros LDI completamente limpios en este rango de análisis (espectros no mostrados). En este mismo modo de análisis, pero en el rango de m/z de 500 a 1500, el ácido ZSA presenta una serie de clústeres alrededor de los valores de m/z 693, 918 y 1143 que no fueron asignados. El efecto de las aminas en el espectro LDI del ácido ZSA muestra la misma tendencia que lo mencionado anteriormente en el rango de 0 a 500 m/z , observándose una marcada disminución de los iones propios del ácido generando espectros LDI con menor ruido de fondo. Distinto es el caso del ESA que, si bien presenta los mismos tipos de clústeres que su isómero, el efecto de las distintas aminas en los espectros LDI de los LIs no sigue la misma tendencia a la disminución de las señales propias del ácido. En algunos LIs se observa un gran aumento de la intensidad de estos iones y/o la aparición de nuevas señales, mientras que en otros casos se observa una pequeña disminución de la intensidad de las mismas. Esto resulta, en modo negativo, que los espectros LDI de los LIs derivados del ESA, en todo el rango de análisis, son ligeramente más ruidosos en comparación con el espectro LDI del ácido solo (espectros no mostrados).

Este mismo análisis de los espectros LDI se realizó para el DHB y el nHo en comparación con sus LIs, para evaluar el efecto de la amina en el espectro LDI (espectros no mostrados). En modo lineal positivo el DHB presenta cuatro señales: el aducto con sodio del ácido $[M+Na]^+$ y el producto de deshidratación del mismo $[M-H_2O+H]^+$ a m/z 177 y 137 respectivamente y dos iones no asignados a m/z 187 y 99 (pico base del espectro) que en la literatura se los asocia a fragmentos de clústeres. El efecto de las aminas en el espectro LDI del ácido, sigue la misma tendencia que lo descrito anteriormente. El espectro LDI del DHB.EAM muestra una ligera disminución de las señales del ácido, mientras que en el resto de los LIs las señales propias del ácido desaparecen por completo. En estos últimos aparecen nuevas señales, no asignadas, en el rango de m/z entre 150 y 220 que varían dependiendo de la amina que se use como contra ion. Si bien la menor intensidad de las señales de los LIs en comparación con las del ácido solo genera espectros LDI con una menor intensidad global, esto no genera cambios significativos en la limpieza del ruido de fondo de la matriz. En el rango de m/z más altos tanto el DHB como sus LIs presentan espectros de masa limpios de ruido de fondo. En modo lineal negativo en el rango de m/z de 0 a 500, no se observan cambios en los espectros LDI de los LIs en comparación con los del ácido solo, tanto en las señales que presenta como en la intensidad de las mismas, sin embargo, este mismo efecto no se observa a mayores valores de m/z , en donde los LIs si presentan una marcada disminución de las señales propias del ácido.

En el caso del nHo, el efecto de las aminas en los espectros de masa LDI es completamente distinto a lo que se describió para el ECHCA, el ESA, el ZSA y el DHB. En modo lineal positivo en el rango de m/z de 0 a 500 el nHo presenta dos señales, el ion molecular protonado $[M+H]^+$ y el aducto con sodio $[M+Na]^+$ a m/z 169 y 191 respectivamente. En los LIs estas señales se mantienen y no presentan una tendencia clara a la disminución de su intensidad ya que se mantienen en el mismo rango de intensidad y en el caso del nHo.BAM y nHo.TBAM muestran un ligero aumento. En el rango de m/z de 500 a 1500 todos los LIs presentan un aumento significativo de la intensidad de las señales propias del nHo, distintos clústeres no asignados entre m/z 700 y 800. En ninguno de los dos rangos se observa la aparición de nuevas señales propias de cada LI. En modo lineal negativo el nHo tiene un espectro LDI limpio de ruido de fondo donde solo se observa la señal correspondiente el ion $[M-H]^-$ a m/z 167 y unas señales de baja relación S/R a m/z 565, 711 y 811. Los espectros LDI de los LIs derivados del nHo no presentan cambios ni en el número de señales ni en la intensidad de las mismas en este modo de análisis. Cuando se aumenta la relación molar del LI nHo.amina 1:2 tampoco se observan cambios en los espectros LDI de los LIs en comparación con el espectro del nHo solo en todo el rango de análisis y en ambos modos.

En ninguno de los LIs estudiados en esta sección (ECHCA.amina, ESA.amina, ZSA.amina, DHB.amina y nHo.amina) se observan especies supramoleculares del tipo $[M+amina+H]^+$ o ningún otro ion, en modo positivo o negativo, que muestre la presencia del LI intacto en fase gaseosa.

2.3.2.2 Carbohidratos Neutros

Para realizar un estudio sistemático del desempeño como matrices MALDI de los distintos LIs propuestos en comparación con las matrices clásicas (ECHCA, ESA, DHB, nHo), se toman como ejemplos una serie de hidratos de carbono de bajo peso molecular entre los cuales encontramos la β CD y la M7 como representantes de estructuras cíclicas y lineales de polisacáridos.

En la Figura 9 se muestra de forma comparativa los espectros de masa MALDI obtenidos para la β -ciclodextrina (β CD) en modo lineal positivo con la matriz ácida ECHCA y sus LIs con las distintas aminas estudiadas. En esta figura también se comparan los espectros MALDI obtenidos utilizando líquidos iónicos como matrices en dos relaciones molares ácido:amina 1:1 y 1:2, pudiendo de esta forma comparar el efecto en el procesos de DI del aumento de la concentración de la amina en el LIM. En esta figura se muestra el rango de m/z entre 500 y 1800,

zona donde se observan los iones de mayor intensidad que corresponden al aducto con sodio $[M+Na]^+$ y con potasio $[M+K]^+$ de la β CD.

Como ha sido descripto en la literatura la eficiencia en el proceso de desorción/ionización (DI) para un dado analito depende de una serie de factores experimentales como la fluencia del láser y la matriz que se utilice^{4,24,60,61}. Es por eso que los estudios comparativos se realizan bajo las mismas condiciones experimentales modificando únicamente la naturaleza de la matriz.

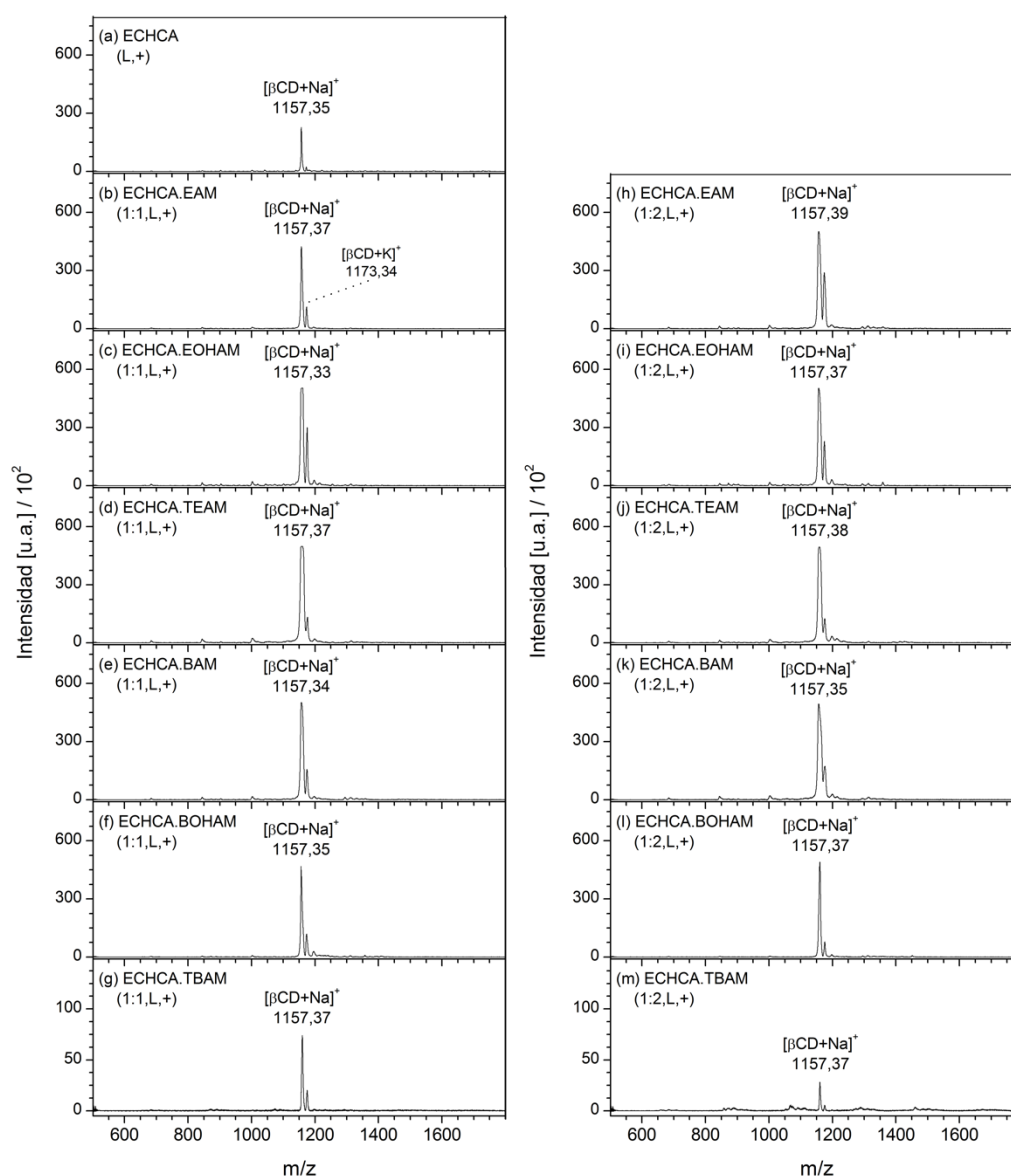


Figura 9. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD. Matrices: (a) ECHCA, (b y h) ECHCA.EAM, (c e i) ECHCA.EOHAM, (d y j) ECHCA.TEAM, (e y k) ECHCA.BAM, (f y l) ECHCA.BOHAM, (g y m) ECHCA.TBAM. LIs en relación molar ácido:amina: (b-g) 1:1 y (h-m) 1:2. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 40%.

En la Figura 9a-g se observa claramente que para la β CD los LIMs, con excepción del LI ECHCA.TBAM, presentan un mejor desempeño como matriz en el proceso de DI del analito, alcanzando intensidades para el aducto con sodio $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ de más del doble que la intensidad obtenida en la matriz clásica ECHCA. Este mismo resultado se mantiene cuando se aumenta la relación de amina en el LI a 1:2 (Figura 9h-m). En particular el LIM ECHCA.TBAM, en ambas relaciones molares, presenta una marcada disminución de la intensidad del aducto con sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ en comparación con el ECHCA.

A modo de resumen, en la Figura 10 se muestra la intensidad porcentual obtenida en los EM MALDI del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en cada una de las matrices estudiadas, tanto para los LIMs en relación molar ácido:amina 1:1 como 1:2 (Figura 10 a y b, respectivamente). En esta figura se representa la intensidad como una relación porcentual respecto a la máxima intensidad obtenida en el grupo de matrices comparado. El promedio de la intensidad surge de tres réplicas analíticas realizadas el mismo día en las mismas condiciones experimentales.

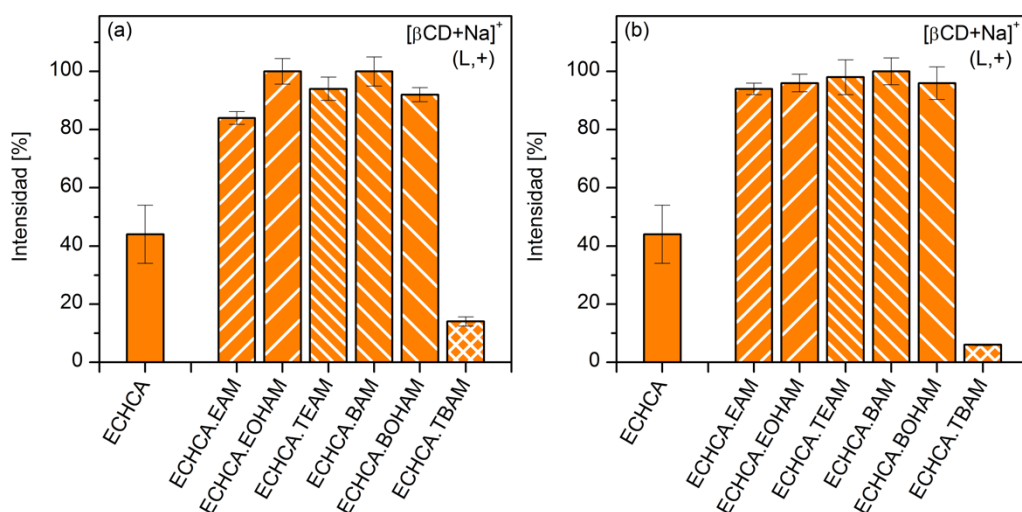


Figura 10. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas: ECHCA y sus LIs. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina (a) 1:1 y (b) 1:2.

En la Figura 10a se observa claramente la diferencia significativa en el proceso de DI de la β CD entre la matriz clásica ECHCA y sus LIs con las distintas aminas alifáticas en relación molar 1:1. En los LIMs se obtiene un aumento de la intensidad de las señales de más del doble, entre 80 y 100%, que lo obtenido para la matriz clásica ECHCA (45%). Con excepción del LI ECHCA.TBAM, el aumento de la intensidad, y la magnitud de la misma, es independiente de la amina que se utilice como contra ion en el LIM, no observándose grandes diferencias entre los distintos LIM estudiados. Al igual que lo observado en la Figura 9g, el LIM ECHCA.TBAM rompe con la tendencia observada para el resto de los LIM derivados del ECHCA; esta matriz presenta

una marcada disminución de la eficiencia en el proceso de DI, siendo peor matriz que la matriz clásica sola. Por otro lado, el cambio de relación molar del LIM a 1:2 (Figura 10b) no genera cambios significativos a lo descrito anteriormente.

En la Figura 11 se muestran de forma comparativa los espectros de masa MALDI para la β CD utilizando como matrices los isómeros ESA y ZSA y los LIMs derivados de estos ácidos en relación molar ácido:amina 1:1. Los espectros de masa en esta figura fueron adquiridos en modo lineal positivo y se muestra el rango de m/z entre 900 y 1300, región del espectro donde aparecen los iones más intensos del analito: el aducto con sodio $[M+Na]^+$ y con potasio $[M+K]^+$.

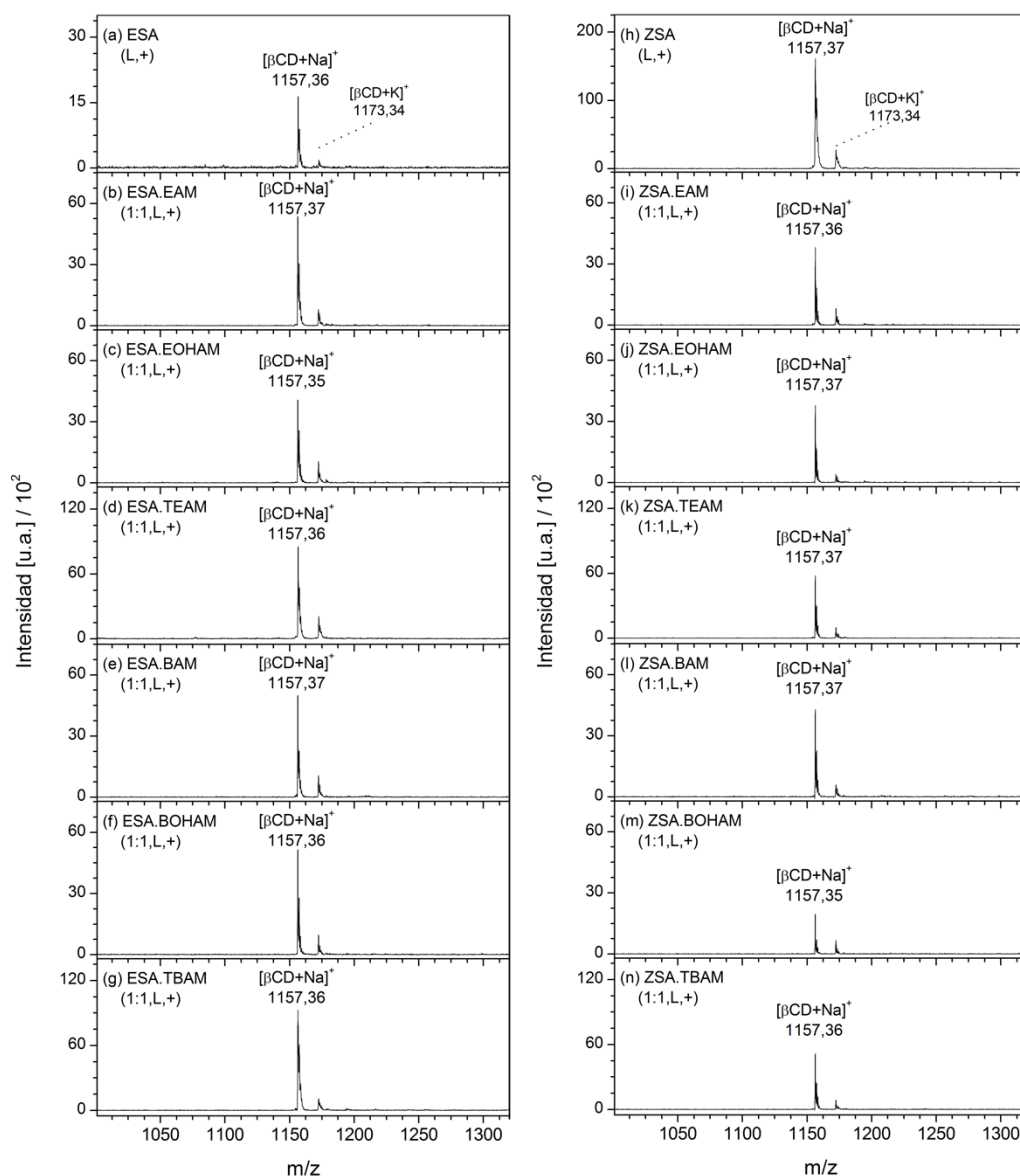


Figura 11. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.EAM, (c) ESA.EOHAM, (d) ESA.TEAM, (e) ESA.BAM, (f) ESA.BOAM, (g) ESA.TBAM, (h) ZSA, (i) ZSA.EAM, (j) ZSA.EOHAM, (k) ZSA.TEAM, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.BOAM y (n) ZSA.TBAM. Lis en relación molar ácido:amina 1:1. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 40%.

Como ya ha sido descrito por Salum y colaboradores⁶, el ZSA presenta un mejor desempeño como matriz en el proceso de DI en el estudio de hidratos de carbono que su isómero geométrico el ESA. En la Figura 11a y h se observa como el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ alcanza una intensidad de un orden de magnitud mayor cuando se usa como matriz el ZSA en comparación con el ESA. En el caso de los LIMs generados a partir de la matriz clásica ESA y una amina alifática, producen un aumento significativo en la eficiencia de DI del analito. Como se puede observar en la Figura 11a-g, los LIMs generan señales de mayor intensidad absoluta para el aducto con sodio $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ que lo obtenido con la matriz ácida sola en las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, los LIMs derivados del isómero ZSA no generan el mismo efecto en comparación con el ácido solo, por el contrario, estos LIMs presentan una muy marcada disminución en la eficiencia de DI del analito con respecto a la matriz ácida ZSA (Figura 11h-n).

En la Figura 12 se grafican las intensidades porcentuales del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$, como un promedio de tres replicas analíticas, obtenidas con las matrices ESA y ZSA y sus LIs en relación molar ácido:amina 1:1 (Figura 12 a y b, respectivamente). En esta figura la intensidad porcentual se calcula en relación a la máxima intensidad absoluta observada en el grupo de matrices comparadas en toda la figura, en este caso el 100% corresponde a la intensidad obtenida para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en la matriz ácida ZSA. En esta figura se observa claramente lo descrito anteriormente en la Figura 11 respecto a la relación de intensidades entre cada matriz ácida y sus respectivos LIs. Sin embargo, llama la atención que el efecto contrapuesto en la eficiencia de DI del analito en los LIMs de ambos isómeros genera iones de intensidad similar. Es decir que independientemente del isómero (ESA o ZSA) que se utilice en el LIM, la eficiencia en la DI del analito alcanza valores entre 15 y 40% de intensidad dependiendo de la amina que se use como

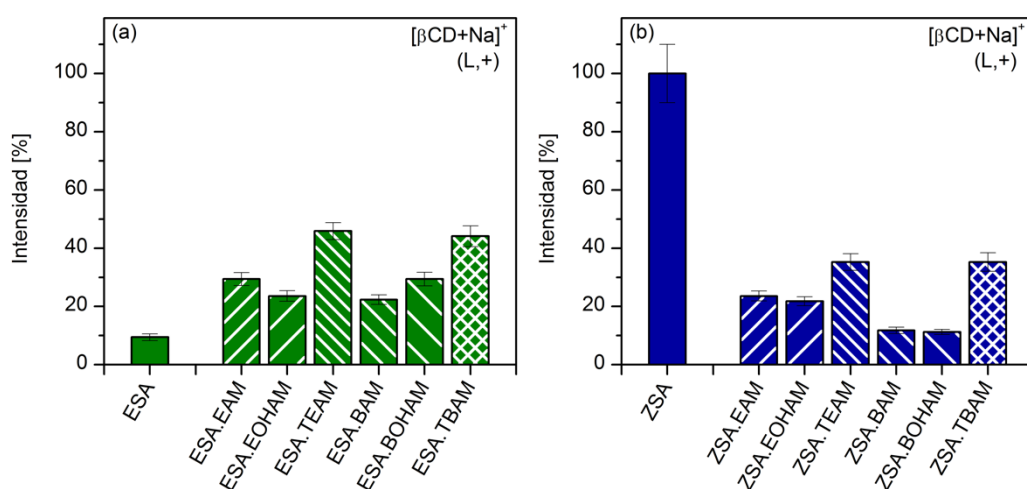


Figura 12. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

contraíón. Los LIMs derivados del ESA y ZSA en relación molar ácido:amina 1:2 muestran el mismo tipo de comportamiento (ver Figuras A2.5 y A2.6).

Esta tendencia observada en el proceso de DI de los LIMs en relación con las matrices ácidas solas ESA y ZSA, se replica en otros pares de isómeros geométricos que ya han sido descritos en la literatura como matrices MALDI⁶. En las Figuras A2.7 y A2.8 se muestran los gráficos de intensidad normalizada del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices: E y ZFE y sus LIMs y los isómeros E y ZCUM en comparación con sus LIMs respectivamente. La intensidad promedio surge del análisis de tres réplicas analíticas, normalizadas a la máxima intensidad obtenida en toda la figura, siendo en ambos casos la intensidad del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en la matriz ácida Z. En estos gráficos se puede observar, además de la diferencia en el proceso de DI del isómero Z en comparación con el E, como los LIMs derivados de los isómeros E presentan una mejora en la intensidad del aducto con sodio respecto al ácido E y por el contrario, como los LIMs derivados del isómero Z muestran una marcada disminución de la misma en comparación con el ácido Z solo. Al igual que lo descrito anteriormente, en ambos casos, la intensidad obtenida con los LIMs tiende a igualar los órdenes de intensidad para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ independientemente del cromóforo que se utilice para formar la matriz. Si bien en estos gráficos (Figuras 12, A2.7 y A2.8), no se puede apreciar la intensidad absoluta de los iones en las distintas matrices, cabe destacar que la intensidad obtenida para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ es mayor con la matriz ZSA. Los resultados obtenidos de la intensidad absoluta para el aducto con sodio de la β -ciclodextrina en las distintas matrices estudiadas sigue la tendencia: ZSA > ZFE > ESA > ZCUM > EFE > ECUM (resultados no mostrados).

Este mismo análisis, realizado para las matrices MALDI de tipo ácido cinámico y sus isómeros geométricos, se realizó sobre otras matrices MALDI, DHB y nHo, ampliamente utilizadas para el estudio de hidratos de carbono. Como ya se mencionó, el objetivo del estudio de estas matrices y sus LIMs es evaluar de forma comparativa el efecto del agregado de aminas alifáticas en las matrices clásicas en el proceso de DI de hidratos de carbono.

En la Figura A2.9 a-g se muestran los espectros de masa MALDI obtenidos para la βCD utilizando la matriz clásica nHo, en comparación con los espectros obtenidos de esta matriz en presencia de las distintas aminas alifáticas en relación molar nHo.amina 1:1. A modo de resumen en la Figura 13 se grafica la intensidad promedio porcentual de las señales obtenidas en tres muestras distintas con cada una de las matrices estudiadas. En ambas figuras se observa claramente como la presencia de la amina mejora significativamente el proceso de DI del analito en comparación con la matriz clásica sola, alcanzando intensidades para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en las matrices nHo.amina de más del doble que lo obtenido con el nHo solo. El cambio de la relación

molar nHo.amina de 1:1 a 1:2 (Figura 13 a y b, respectivamente) no genera cambios significativos en la eficiencia del proceso de DI.

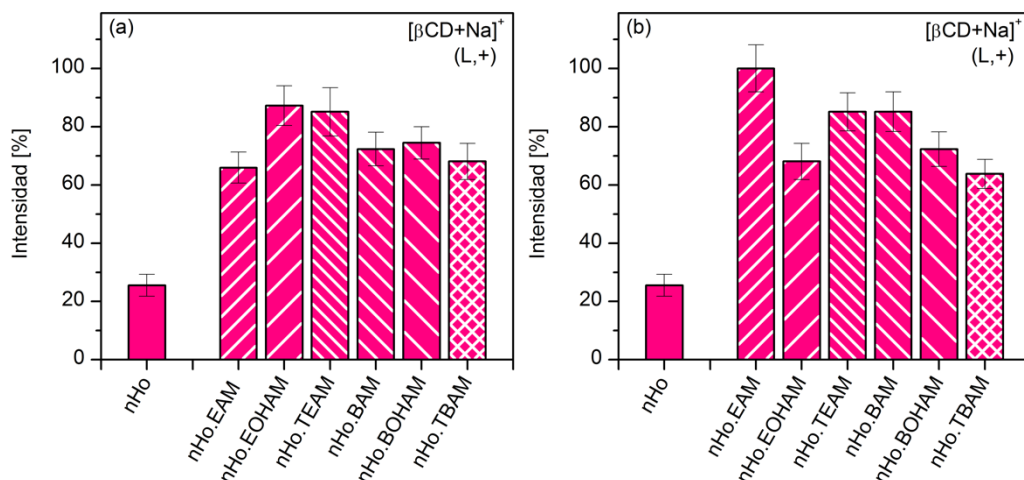


Figura 13. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas: nHo y sus LIMs. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina (a) 1:1 y (b) 1:2.

Por otro lado, en la Figura A2.9 h-m se muestran los resultados de EM MALDI obtenidos en el análisis de la βCD con la matriz DHB comparado con sus LIMs y en la Figura 14 se muestra la intensidad promedio del aducto con sodio en tres muestras distintas en cada una de las matrices, tanto para los LIMs en relación molar DHB.amina (a) 1:1 y (b) 1:2.

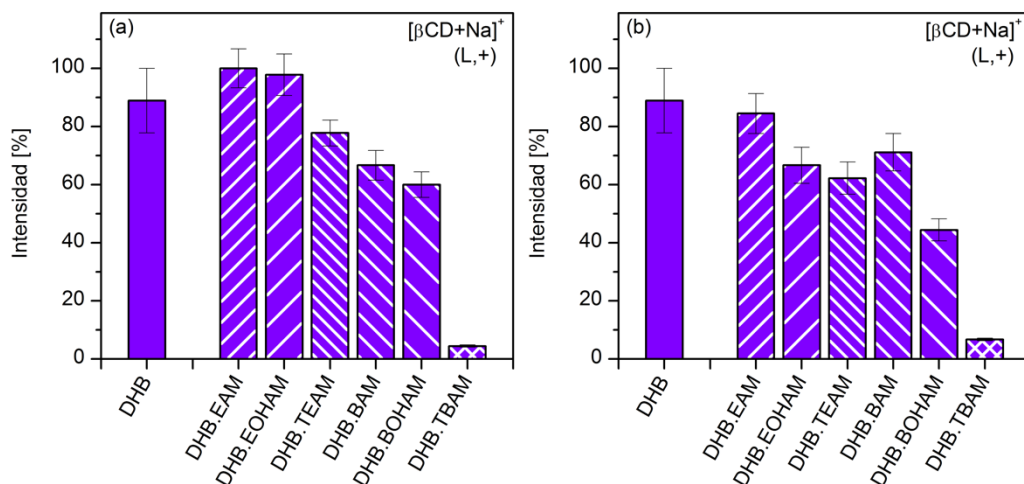


Figura 14. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas: DHB y sus LIMs. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina (a) 1:1 como (b) 1:2.

En este caso se observa que los LIMs presentan una tendencia a la disminución de la eficiencia en la DI del analito en comparación con el DHB, sin embargo, las diferencias de

intensidad de la señal en las distintas matrices no es lo suficientemente marcada como para asegurar esta tendencia. En el caso de los LIMs DHB.EAM y DHB.EOHAM en relación molar 1:1 (Figura 14a) el aparente aumento de intensidad se encuentra dentro del margen de error experimental, no siendo una diferencia significativa con respecto al DHB. Distinto es el caso del LIMs DHB.TBAM, donde si existe una marcada disminución en la intensidad de la señal en comparación con la matriz ácida sola. El análisis de los LIMs en relación molar DHB.amina 1:2 (Figura 14b) muestra una disminución en la intensidad porcentual de entre 10 y 20% dependiendo del LI. Esta observación refuerza la idea que estos LIs con β CD muestran una tendencia a la disminución de la eficiencia en el proceso de DI en relación al ácido DHB como matriz.

El mismo análisis comparativo del proceso de DI de la β CD con las matrices clásicas ECHCA, ESA, EFE, ECUM, nHo, DHB y sus LIMs con aminas alifáticas, se realizó para su análogo lineal, la maltosa M7. Asimismo, se realizó un estudio comparativo de los isómeros geométricos *E* y *Z* de los ácidos cinámicos: SA, FE y CUM y sus LIMs en la eficiencia como matriz para el análisis de este azúcar. De esta forma evaluamos la reproducibilidad de los resultados descriptos anteriormente para un oligosacárido de peso molecular similar a la β CD pero con distinta estructura.

En la Figura A2.10 se muestran los gráficos de intensidad normalizada para el ion $[M7+Na]^+$ con las matrices clásicas ECHCA (a y b), nHo (c y d) y DHB (e y f) en comparación con sus LIMs con aminas alifáticas en relación matriz:amina 1:1 y 1:2. En el caso del ECHCA y el nHo la tendencia observada es la misma que la descrita para la β CD, donde se evidencia que los LIMs presentan un aumento en la eficiencia en el procesos de DI de este oligosacárido en comparación con la matriz clásica sola. En el caso de los LIMs derivados del ECHCA el aumento de la intensidad con respecto al ácido solo es de un orden de magnitud o mayor dependiendo de la amina que se use como contra ion. Si bien no existe una tendencia de como la naturaleza de la amina afecta el grado de la eficiencia en el proceso de DI, si se repite que el LI ECHCA.TBAM presenta una muy marcada disminución de la intensidad del aducto con sodio, generando en el caso del analito M7 la desaparición de la señal (Figura A2.10a). En el caso de los LIMs ECHCA.amina en relación molar 1:2 la tendencia se mantiene, aunque se observa una ligera disminución de la intensidad (Figura A2.10b).

En el caso de las matrices de tipo nHo.amina en relación molar 1:1 el aumento de la intensidad de la señal $[M7+Na]^+$ es del doble hasta tres veces más que lo obtenido con el nHo solo (Figura A2.10c), mientras que en relación molar 1:2 este aumento de la intensidad se ve disminuido. Distinto es el caso de los LIMs derivados del DHB que, para este oligosacárido lineal,

a diferencia de lo observado para la β CD, si presentan un aumento de la eficiencia de DI con respecto a la matriz ácida sola. En el caso de los LIMs DHB.amina 1:1 este aumento de la intensidad es de aproximadamente el doble, mientras que para los LIMs 1:2 este aumento es mucho menor, no observándose, en algunos casos (DHB.EOHAM y el DHB.BOHAM), diferencias significativas con respecto al DHB solo. En la Figura A2.10e y f puede observarse como los LIMs DHB.TBAM, rompen con la tendencia observada y generan una muy marcada disminución de la intensidad de la señal del aducto con sodio de este azúcar.

La Figura A2.11 muestra de forma comparativa la intensidad promedio del ion $[M7+Na]^+$ obtenida con las matrices *E* y *Z* y sus LIMs en relación molar 1:1 para cada uno de los ácidos cinámicos estudiados: sinapínico (a y b), ferúlico (c y d) y cumárico (e y f). En estos gráficos se puede comparar tanto la relación de intensidad entre el ácido solo y sus LIMs, como también la relación de intensidad entre los isómeros geométricos *E* y *Z*, dado que la intensidad normalizada porcentual está calculada relativa a la máxima intensidad obtenida para el grupo de matrices *E*, *Z* y los LIMs. Al igual que lo observado anteriormente para la β CD y lo ya descrito en la literatura^{6,7}, los isómeros *Z* funcionan como mejores matrices MALDI que los *E* para el estudio de hidratos de carbono. Si bien en estos gráficos no se distinguen las diferencias de intensidad absoluta de la señal en los distintos ácidos cinámicos, cabe destacar que la máxima intensidad del aducto con sodio de la M7 se obtiene para el isómero ZSA siguiendo la tendencia: ZSA > ZFE > ZCUM > ESA > EFE > ECUM (resultados no mostrados).

En la Figura A2.11 y al igual que lo observado con la β CD, existe un fenómeno contrapuesto que produce una mejora en la eficiencia de DI del analito M7 en los LIMs derivados de los isómeros *E* con respecto al ácido *E* solo, mientras que el efecto contrario genera una disminución de la intensidad en los LIMs de tipo *Z*.amina con respecto al ácido *Z* solo. Este efecto contrapuesto hace que los LIMs derivados tanto del isómero *E* como del *Z* tengan una eficiencia en la desorción ionización del analito similar. En el caso de los LIMs EFE.TBAM y ECUM.TBAM, nuevamente se observa una disminución de la señal diagnóstico, rompiendo con la tendencia observada para el resto de los LIMs.

2.3.2.2.1 Mapeo químico superficial por EM MALDI

La introducción de los LIs como matrices MALDI por el grupo de Armstrong y Gross en 2001⁸ tenía como objetivo principal disminuir la heterogeneidad característica de las muestras sólidas que se utilizan para la realización de los experimentos MALDI. Como es sabido, esta heterogeneidad causa una falta de reproducibilidad de la intensidad de las señales en una misma muestra y en sus réplicas analíticas, lo que disminuye la confiabilidad de los resultados en

estudios cuantitativos. De esta forma, utilizando matrices líquidas se podría tener una distribución más uniforme del analito en la muestra y por lo tanto mejorar la reproducibilidad de los resultados¹⁰. Por lo general, en la literatura se utiliza el término homogeneidad de la muestra para hacer referencia indistintamente a la homogeneidad óptica como la homogeneidad química de la muestra, sin embargo, es necesario realizar un análisis por separado de ambas. El mapeo químico superficial por espectrometría de masa MALDI nos permite evaluar la homogeneidad química de la muestra y correlacionarla con la homogeneidad óptica de la matriz, analizada en la sección 2.3.1. Esta información nos permite estudiar de forma comparativa como cambia tanto la eficiencia en el proceso de DI como la distribución del analito en el *spot* entre las matrices clásicas y los LIMs derivados de ellas. En este apartado el estudio se realiza sobre los LIMs en relación molar ácido:amina 1:1, ya que por lo descrito anteriormente los LIMs en relación molar 1:2 no generan grandes diferencias en la eficiencia de DI de los analitos estudiados. El análisis de la homogeneidad química se realiza tomando un ion diagnóstico, característico del analito, y censando la intensidad del mismo en distintas partes de la muestra como se detalla en la sección experimental 2.2.6. Estos experimentos se realizan de forma comparativa entre la matriz clásica y dos LIMs, ácido.TEAM y ácido.BAM, que se seleccionaron como representantes de los LIMs estudiados en este capítulo. En estos estudios se comparan los dos métodos de preparación de la muestra sólida, el método de capas sucesivas (método sándwich) y el método mezcla, descritos en la sección 2.2.2.

En las Figuras 15 y 16 se muestran las imágenes MALDI-MS para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ con las matrices ECHCA, ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM. La intensidad porcentual graficada está normalizada a la máxima intensidad obtenida para el ion diagnóstico con las tres matrices comparadas en ambos métodos de preparación de la muestra, siendo en este caso el máximo con la matriz ECHCA.BAM con el método sándwich, alcanzando una intensidad máxima para el aducto con sodio de 308×10^2 u.a.

En primer lugar, al comparar ambas figuras se observa claramente una diferencia en la intensidad máxima obtenida con ambos métodos de preparación de la muestra sólida, obteniéndose una menor intensidad del aducto con sodio en todas las muestras preparadas con el método mezcla en comparación con la misma matriz preparada con el método sándwich. De la misma forma, la comparación entre ambas figuras no muestra una mejora de la homogeneidad del analito en alguno de los métodos de preparación de la misma, observándose para cada matriz, en ambas muestras zonas de mayor producción de iones (puntos dulces o *sweet spots*).

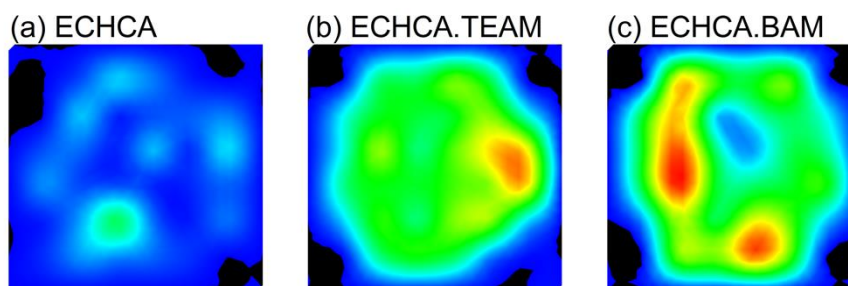


Figura 15. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 308×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

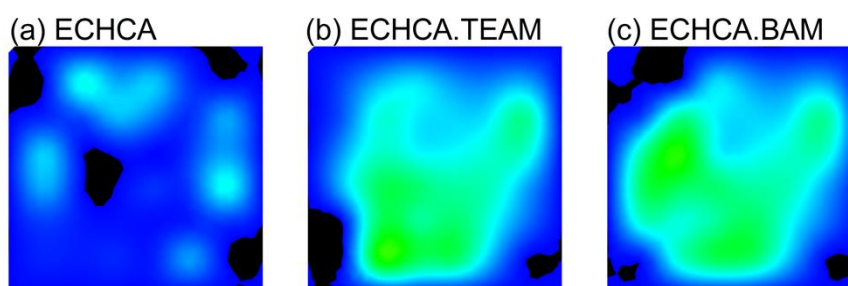


Figura 16. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 308×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla.

En la Figura 15 el aparente aumento de la homogeneidad del analito en los LIMs ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM con respecto al ácido ECHCA se debe únicamente al aumento en la eficiencia en el proceso de DI en los LIMs, ya que en las tres matrices se observan zonas donde la producción de iones es mayor. Este aumento en la intensidad del ion $[\beta\text{CD}+Na]^+$ en los LIMs genera señales con una alta relación S/R, lo cual no sucede en la matriz ácida sola. Esto se ve representado en las imágenes MALDI como un aumento de las zonas verdes (aproximadamente 50-60%) en los LIMs (Figura 15b y c) en comparación con las zonas azules o negras (aproximadamente 0-15%) en la matriz ácida (Figura 15a). Esto no significa un aumento de la homogeneidad de la muestra, ya que se observan tanto en el ECHCA como en ambos LI zonas de mayor producción de iones donde la intensidad el ion diagnóstico es mayor que en el resto del *spot*, zonas rojas. Una muestra homogénea ideal químicamente, requiere necesariamente que la intensidad de las señales en todo el *spot* no presente diferencias significativas independientemente del valor máximo que alcance.

Este mismo estudio se realizó sobre otros hidratos de carbono neutros de bajo peso molecular en el rango de 0 y 5000 Da como el monosacárido IPSPG (Figura A2.12), el disacárido F2 (Figura A2.13) y la mezcla de fructanos Inulina (Figura A2.14). En todos los casos la tendencia observada es la misma, los LIMs ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM presentan un aumento de la eficiencia en el proceso de DI del analito en comparación a la matriz ácida ECHCA, pero sin generar mejoras en la homogeneidad de la muestra. En el caso de la Inulina de fórmula molecular $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$, el aumento en la intensidad de los iones con los LIMs (aumento de la eficiencia de ionización), genera además la posibilidad de detectar especies con n mayores. Como por ejemplo con nHo y DHB, matrices clásicas para el estudio de hidratos de carbono, se obtienen iones de hasta $n = 22$, mientras que con el LIM ECHCA.BAM el n máximo detectado es 34 (datos no mostrados).

Dado los resultados descriptos anteriormente para los LIMs derivados del ECHCA, se decide ampliar el estudio a los análogos halogenados E-4ClCHCA y E-4FCHCA en comparación con sus LIs con BAM, tanto en la eficiencia de DI de hidratos de carbono neutros como en la homogeneidad la muestra. Estos compuestos ya han sido descriptos en la literatura como matrices MALDI para el estudio de polipéptidos³ así como también como componentes en LIMs⁴⁸.

En la Figura 17 se muestran las imágenes MALDI-MS de la β CD en las matrices E-4ClCHCA y E-4FCHCA y los LIMs derivados de estos ácidos con BAM como contra ion. Las muestras fueron preparadas únicamente por el método de capas sucesivas, dadas las observaciones descriptas anteriormente. La intensidad está normalizada a la máxima intensidad obtenida del ion $[\beta CD+Na]^+$ entre las cuatro matrices presentadas en la figura.

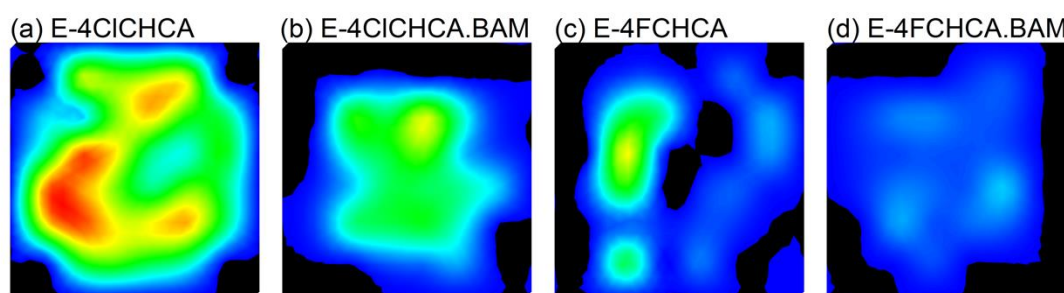


Figura 17. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) E-4ClCHCA, (b) E-4ClCHCA.BAM, (c) E-4FCHCA y (d) E-4FCHCA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = $8,4 \times 10^2$ u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

Ambos análogos halogenados del ECHCA, el E-4ClCHCA y el E-4FCHCA, presentan un peor desempeño como matriz MALDI para el estudio de la β CD, obteniéndose en ambos casos valores de intensidad absoluta de aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que lo obtenido con el ECHCA en las mismas condiciones experimentales (Intensidad máxima para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$: 121×10^2 (ECHCA), $8,4 \times 10^2$ (E-4ClCHCA) y $6,5 \times 10^2$ (E-4FCHCA). A diferencia de lo observado con el ECHCA y sus LIMs, estos derivados halogenados, como constituyentes de un LIM presentan un peor desempeño como matriz que el ácido solo. En la Figura 17 b y a, se observa claramente como el LIM E-4ClCHCA.BAM presenta aproximadamente un 30% menos intensidad que la matriz ácida E-4ClCHCA para el aducto con sodio de la β CD. Este mismo efecto se observó entre el LIMs E-4FCHCA.BAM y el ácido solo E-4FCHCA (Figura 17 d y c, respectivamente). En ninguno de los dos LIMs propuestos se observa una mejora de la homogeneidad en comparación con la matriz ácida, ya que en todos los casos se encuentran zonas en la superficie de la muestra donde hay mayor producción de iones.

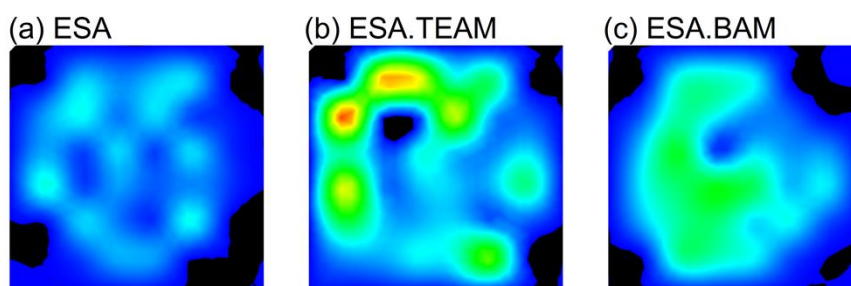


Figura 18. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.TEAM y (c) ESA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = $27,2 \times 10^2$ u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

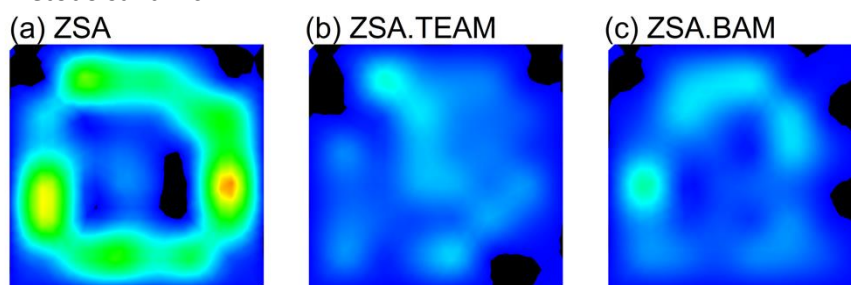


Figura 19. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) ZSA, (b) ZSA.TEAM y (c) ZSA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 46×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

En las Figuras 18 y 19 se muestran los mapas iónicos moleculares obtenidos para la β CD con las matrices ácidas ESA y ZSA en comparación con sus LIMs ácido.TEAM y ácido.BAM.

La muestra se preparó según el método de capas sucesivas y la intensidad está normalizada a la máxima intensidad obtenida en las tres matrices comparadas en cada figura.

En primer lugar, se observa como el cambio de la estereoquímica del ácido, no solo modifica la eficiencia de la matriz en el proceso de DI del analito, sino que también modifica la distribución del mismo en la superficie de la muestra. Esta mejora en la intensidad del aducto con sodio de la β CD en el isómero ZSA en comparación con el ESA ya ha sido descrita en la literatura tanto para azúcares⁶ como para péptidos⁷ de LMW y en las Figuras 11, 12, A2.6 y A2.11 de este mismo capítulo. Sin embargo, la diferencia en la distribución del analito en ambos estereoisómeros no ha sido descrito. En la Figura 18a se observa que el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en la matriz ESA tiene una distribución aleatoria en todo el *spot* con un máximo de intensidad de $8,2 \times 10^2$ u.a., esta distribución aleatoria no es homogénea ya que se pueden apreciar zonas de mayor producción de iones en ciertas regiones de la muestra (zonas de color turquesa). A diferencia de esta matriz, el ZSA (Figura 19a) muestra una distribución para la β CD en forma de anillo grueso cubriendo todo el borde de la muestra con una intensidad máxima de 46×10^2 u.a. para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$. Esta distribución totalmente heterogénea en la matriz ZSA, tampoco presenta una distribución homogénea perímetro circundante, ya que dentro del anillo existen zonas donde la producción de iones es mayor (zonas de color amarilla y roja). En el caso del ZSA la distribución del analito en la muestra (Figura 19a) puede relacionarse de forma directa con la distribución de la matriz en la imagen óptica mostrada en la Figura 4o. Sin embargo, esta misma correlación no puede hacerse para el isómero ESA, ya que la distribución de la matriz en la imagen óptica (Figura 4h) no muestra conglomerados de la misma que sean superponibles con las zonas de mayor producción de iones de la β CD observada en el mapeo químico en la superficie del *spot* (Figura 18a).

En segundo lugar, vamos a analizar los cambios en la homogeneidad química de la β CD entre las matrices ácidas y sus LIMs. En la sección 2.3.2.2 se analizó el efecto en la intensidad del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en las matrices ESA y ZSA en comparación con seis LIMs donde se variaba la amina alifática constituyente del LI. En la Figura 12 se muestra la intensidad máxima porcentual, como un promedio de tres réplicas analíticas, obtenida para cada una de las matrices estudiadas. En estos experimentos se llegó a la conclusión que en el caso de los LIMs del ácido ESA se observa un aumento en la eficiencia en el proceso de DI de la β CD, mientras que el efecto contrario se observó para los LIMs derivados del isómero ZSA. Estas mismas conclusiones se realizaron al comparar las imágenes MALDI de la β CD entre las matrices ácidas y sus LIMs. En el caso del ESA el aumento de intensidad es de aproximadamente un 60% entre la matriz ácida y el LIMs ESA.TEAM y un poco menos para el LIMs ESA.BAM (Figura 18a, b y c, respectivamente). Mientras

que el efecto contrario se observa para el ZSA y sus LIMs (Figura 19). Por otro lado, independientemente del aumento o disminución de la eficiencia de DI de los LIMs en comparación con las matrices ácidas, en ninguno de los LIMs se observa un aumento de la homogeneidad química de la muestra comparado con las matrices ácidas. En el caso de los LIMs de tipo ESA.amina (Figura 18 b y c) se observa una mayor producción de iones en zonas periféricas, pero la distribución del mismo sigue siendo aleatoria en todo el *spot*. En el caso de los LIMs de tipo ZSA.amina (Figura 19 b y c), si bien la mayor intensidad del aducto con sodio se encuentra en el borde de la muestra, estos LIMs pierden esa distribución tan particular del ZSA y comienzan a presentar una distribución aleatoria que ocupa gran parte del *spot*. Tanto en el caso de los LIMs ESA.amina como para los ZSA.amina, este cambio en la distribución del analito en el *spot* no se condice con el cambio de homogeneidad óptica observada en la Figura 4, donde todos los LIMs propuestos derivados de ambos isómeros parecen completamente homogéneos.

En las Figuras A2.15 y A2.16 se muestran los mapas iónicos de la β CD obtenidos con las matrices ESA y ZSA en comparación con sus LIMs, en las mismas condiciones experimentales que las Figuras 18 y 19, pero preparados según el método mezcla. El análisis de estos resultados nos lleva a las mismas observaciones que las realizadas anteriormente, es decir que el método de preparación de la muestra no modifica de forma significativa como se distribuye el analito en cada matriz. De la misma forma, y a diferencia de lo observado en el caso del ECHCA y sus LIMs, el método mezcla no muestra una diferencia significativa en la eficiencia del proceso DI del analito en cada matriz, en comparación con el método sándwich.

Este mismo estudio se realizó para la M7, un oligosacárido de cadena lineal de peso molecular similar a la β CD, con el objetivo de evaluar el efecto de la estructura del hidrato de carbono en la distribución en la muestra con las distintas matrices. En las Figuras A2.17 y A2.18 se muestran las imágenes MALDI-MS obtenidas para la M7 con las matrices ESA y ZSA respectivamente, comparadas con sus LIMs ácido.TEAM y ácido.BAM, utilizando ambos métodos de preparación de la muestra: (a-c) método sándwich y (d-f) método mezcla. Como en las figuras anteriores la intensidad porcentual en cada matriz está normalizada al máximo de intensidad obtenido en todas las matrices comparadas en la figura, de esta forma se puede hacer la comparación tanto de los cambios de homogeneidad como de la eficiencia en el proceso de DI del analito con cada matriz. De estas figuras se concluye que la estructura del analito no modifica el comportamiento anteriormente descrito para cada una de las matrices y las comparaciones entre ellas.

En la Figura A2.17a se observa como el ESA presenta una distribución aleatoria de la M7 en toda la superficie del *spot* con algunas zonas de mayor producción de iones (Int. máxima

= $6,8 \times 10^2$ u.a.). Dada la baja intensidad de la señal del aducto con sodio de la M7 con la matriz ácida ESA y debido a la normalización de la señal en la figura al máximo de intensidad obtenido para la matriz ESA.TEAM, puede ser dificultoso ver esta distribución aleatoria, sin embargo, esta conclusión se corrobora con el mapa iónico normalizado al máximo de intensidad obtenido en la matriz ácida ESA (datos no mostrados). Al igual que lo observado para la β CD, los LIMs ESA.TEAM y ESA.BAM, muestran una mejora de la intensidad del ion $[M7+Na]^+$ en comparación con el ácido solo (Figura A2.17b y c). Esta mejora de la intensidad genera una mayor cantidad de zonas donde se obtienen señales de alta relación S/R, lo cual no conlleva a una mejora en la homogeneidad de la muestra ya que siguen existiendo puntos dulces en la superficie de la misma. Por otro lado, el isómero ZSA muestra una distribución de iones de la M7 en los bordes de la muestra, como un anillo perimetral (Figura A2.18a), mientras que sus LIMs además de presentar una marcada disminución de la intensidad de la señal, rompen esta distribución de tipo anillo, generándose una distribución aleatoria de los iones del analito en casi todo el *spot*, sin embargo esto no genera un aumento de la homogeneidad química (Figura A2.18 b y c). Al igual que lo descrito para la β CD, el método de preparación de la muestra no genera cambios significativos tanto en la eficiencia en el proceso de DI de la M7 como en la distribución de la misma en el *spot*.

A modo comparativo se realizó el análisis del mapa iónico molecular de la β CD en dos matrices MALDI clásicas para el estudio de hidratos de carbono, el DHB (Figura 20) y el nHo (Figura 21) y el efecto de la presencia de aminas alifáticas en la distribución de los iones del analito en la muestra, preparada por el método de capas sucesivas. Al igual que en el resto de las imágenes MALDI-MS presentadas en este trabajo la intensidad porcentual está normalizada a la máxima intensidad obtenida para el ion diagnóstico en las tres matrices comparadas.

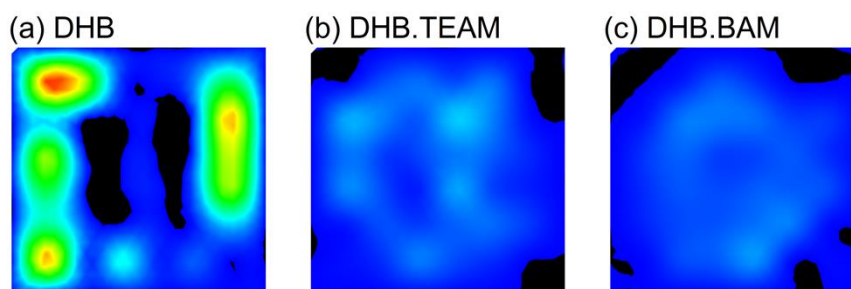


Figura 20. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) DHB, (b) DHB.TEAM y (c) DHB.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 135×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich

En la Figura 20a para la matriz DHB se observa una distribución del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en los bordes de la muestra, con regiones donde la producción de iones es mayor y se alcanza un máximo de intensidad de 135×10^2 u.a. Este tipo de distribución es característico del DHB y se condice con la forma de solidificación de la matriz que se observa en la imagen óptica (Figura A2.1h). En comparación con el ácido solo los LIMs DHB.TEAM y DHB.BAM (Figura 20 b y c) muestran una disminución en la eficiencia de DI de la βCD y un cambio en la disposición del analito en la muestra, generando una distribución más aleatoria del analito en toda la superficie de la muestra, sin embargo, siguen existiendo algunos puntos dulces donde se alcanzan intensidades máximas para el aducto con sodio de aproximadamente 20×10^2 u.a. Este cambio en el arreglo del analito en la muestra entre el ácido DHB y sus LIMs se condice con el cambio observado en la imagen óptica (Figura A2.1 k y l), donde los LIMs muestran una solidificación como pequeños agregados distribuidos aleatoriamente en todo el *spot*. Nuevamente, dada la forma de representación de la figura como intensidad normalizada al máximo de intensidad obtenido en las tres matrices y dada la disminución de la intensidad absoluta de casi un orden de magnitud entre el ácido y sus LIMs, resulta dificultoso mostrar en una figura el cambio en la distribución química. En la Figura A2.19 se muestran estos mismos resultados, pero usando como método de preparación de la muestra el método mezcla. Las observaciones sobre el cambio en la eficiencia de DI del analito y de la distribución del mismo en la muestra entre la matriz DHB y sus LIMs es la misma que la descrita anteriormente para el método sándwich. Sin embargo, y al igual que lo observado para el ECHCA y sus LIMs, se observa que el método mezcla presenta para todas las matrices una menor intensidad para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ que lo que se alcanza cuando se utiliza el método sándwich.

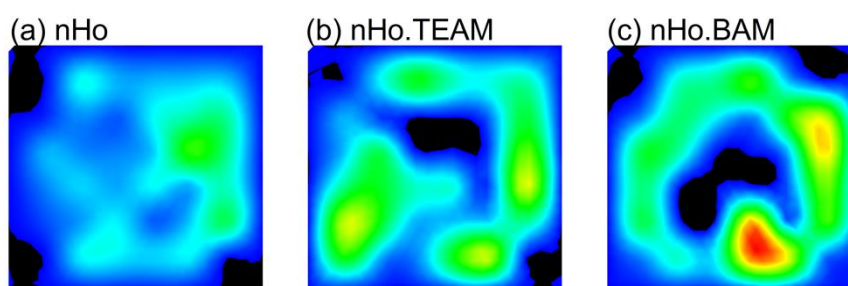


Figura 21. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Analito: βCD . Matrices: (a) nHo, (b) nHo.TEAM y (c) nHo.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 171×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich

En el caso del nHo, como ya se analizó anteriormente, la presencia de una amina alifática, nHo.TEAM y nHo.BAM (Figura 21 b y c), produce un aumento de la intensidad del ion

$[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en comparación con la matriz nHo (Figura 21a). En cuanto a la homogeneidad de las muestras, el nHo presenta un arreglo del analito de forma aleatoria abarcando casi la totalidad del *spot*, sin embargo y al igual que lo visto con las otras matrices, esta distribución no es homogénea ya que existen zonas de mayor producción de iones. En presencia de una amina alifática, como en las matrices nHo.TEAM y el nHo.BAM, se observa un cambio en la distribución de los iones del analito en comparación con la matriz nHo, generándose una disposición del mismo que ocupa las periferias de la muestra, en semejanza con un anillo. Dentro de este anillo existen ciertas regiones de mayor producción de iones alcanzando una intensidad máxima de entre 130 y 179×10^2 u.a. Este cambio en el mapa iónico de la muestra, entre la matriz nHo y en presencia de una amina (TEAM y BAM), no se correlaciona con los cambios observados en las imágenes ópticas de las matrices (Figura A2.1a, d y e). Al igual que lo observado para el ECHCA, el DHB y sus LIMs, el uso del método mezcla para la preparación de las muestras de βCD con las matrices nHo, nHo.TEAM y nHo.BAM (Figura A2.20) genera iones de menor intensidad que el método de preparación de capas sucesivas.

2.3.2.2.2 LOD y Estabilidad

Se utilizó la βCD , como representante de azúcares neutros, para el estudio del rango dinámico (linealidad), el límite de detección (LOD, *limit of detection*) y la estabilidad de las matrices propuestas, en modo lineal positivo. Como en los estudios de mapeo químico superficial por MALDI-MS, se estudió de forma comparativa las matrices clásicas y sus LIMs con TEAM y BAM como representantes de los LIMs analizados en este capítulo. Dado los resultados descritos en la sección 2.3.2.2 y en la subsección 2.3.2.2.1, en este estudio las muestras fueron preparadas según el método de capas sucesivas y se utilizaron únicamente los LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

Tabla 1. Límite de detección (LOD) y rango dinámico (linealidad) de βCD en modo iónico positivo. Ion monitoreado $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$

| Nº | Matriz | βCD | |
|----|------------|------------------|-----------------------------|
| | | LOD ^a | Rango dinámico ^a |
| 1 | ECHCA | 5,15 | 5,15 a 51,50 |
| 2 | ECHCA.TEAM | 0,26 | 2,59 a 25,95 |
| 3 | ECHCA.BAM | 2,59 | 2,59 a 25,95 |
| 4 | ESA | 5,15 | 5,15 a 51,50 |
| 5 | ESA.TEAM | 2,59 | 2,59 a 25,50 |
| 6 | ESA.BAM | 2,59 | 5,15 a 259,50 |
| 7 | ZSA | 2,59 | 2,59 a 25,95 |
| 8 | ZSA.TEAM | 2,59 | 2,59 a 51,50 |
| 9 | ZSA.BAM | 2,59 | 25,95 a 520 |

^a LOD y Rango Dinámico. Indicado como pmol de analito depositado sobre el electrodo porta muestra; S/R ≥ 4 .

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos del límite de detección y el rango dinámico, expresados como pmol de β CD en las muestras con matrices ácidas en comparación con sus LIMs. Por otro lado, en la Figura 22 se muestra gráficamente como varía la intensidad absoluta del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de la concentración del analito con cada una de las matrices estudiadas.

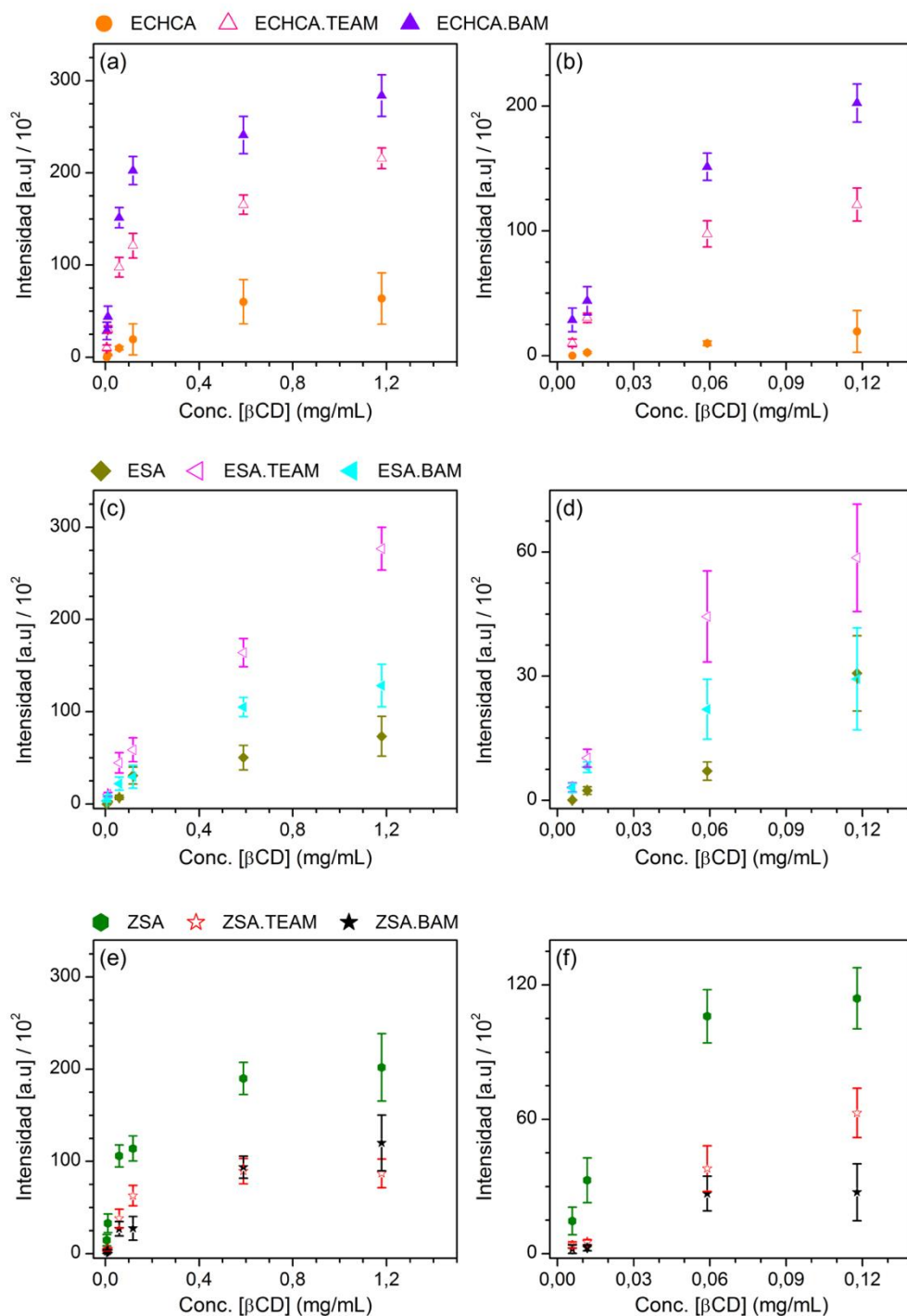


Figura 22. Intensidad absoluta vs. concentración. Analito: β CD, ion monitoreado: $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Matrices: (a,b) ECHCA, ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM, (c,d) ESA, ESA.TEAM y ESA.BAM y (e,f) ZSA, ZSA.TEAM y ZSA.BAM. Modo lineal positivo (L, +). (a,c,e) Todo el rango de concentraciones estudiado. (b,d,f) Ampliación de la región de comportamiento lineal.

En el caso de los LIMs derivados ECHCA, el aumento en la eficiencia en el proceso de DI del analito, con respecto al ácido solo, viene acompañado de un aumento en límite de detección de la β CD en estas condiciones experimentales. Esto modifica ligeramente el rango lineal de los LIMs a concentraciones menores en comparación con la matriz ácida (Tabla 1, entradas 1 a 3).

En la Figura 22 se observa claramente como, en todo el intervalo de concentración estudiado, los LIMs presentan un aumento en la eficiencia de DI del analito. En las tres matrices la intensidad de la señal diagnóstico se vuelve insensible al cambio de concentración del analito, generando una meseta en la respuesta de la señal (Figura 22 a, c y e). En el caso del ECHCA y el LI ECHCA.TEAM, a concentraciones mayores a 1,2 mg/mL del analito se observa una marcada disminución en la intensidad de la señal, mientras que para el LIM ECHCA.BAM esto no sucede y se mantiene una intensidad constante del ion diagnóstico (datos no mostrados).

Al igual que lo observado para el ECHCA y sus LIMs, el aumento de la intensidad del aducto con sodio $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en los LIMs ESA.TEAM y ESA.BAM en comparación con el ácido solo ESA, genera un aumento en el límite de detección del analito, pasando de 5 pmol en la matriz clásica ESA a 2,5 pmol en los LIMs ESA.amina (Tabla 1, entradas 3 a 5). Con respecto al cambio en el rango lineal de los LIMs en relación al ácido solos, se observa que el LI ESA.TEAM presenta dos rangos de linealidad distintos, uno a baja concentración entre 2,5 y 25,9 pmol (Tabla 1 y Figura 22d) y otro a mayores concentraciones hasta 970 pmol (Figura 22c); por encima de esta concentración (aprox. 1,2 mg/mL) la señal sufre una marcada disminución de la intensidad. Distinto es el caso del LI ESA.BAM que presenta un único de rango de linealidad entre 5 y 259 pmol (Tabla 1); por encima de esta concentración (aprox. 0,5 mg/ml, Figura 22c) la señal alcanza un valor constante, insensible al cambio de concentración del analito. Por el contrario, el efecto de disminución de la intensidad de la señal del aducto con sodio de la β CD en los LIMs derivados de ZSA con respecto al ácido, no modifica el LOD de los mismos (Tabla 1 y Figura 22e).

El mismo análisis se realizó sobre las matrices clásicas nHo y DHB y sus LIMs con TEAM y BAM. Estos resultados están resumidos en la Tabla A2.1 y en la Figura A2.21. En el caso del nHo y las matrices nHo.TEAM y nHo.BAM, el aumento de la eficiencia como matriz de estos últimos, en comparación con el nHo, no genera un aumento en el LOD del analito como lo observado para el ECHCA y el ESA. Sin embargo, esto si genera un pequeño aumento en el rango lineal de los LIMs con respecto al nHo. En el caso de los LIMs derivados del DHB, la disminución de la intensidad del ion diagnóstico produce una disminución en el LOD en comparación con lo obtenido con el DHB, siendo mucho peor para el DHB.BAM. Este mismo efecto puede

relacionarse al cambio a mayores concentraciones del rango lineal del analito en los LIMs DHB.TEAM y DHB.BAM, siendo mayor para este último.

En cuanto a la estabilidad de las matrices, se estudió de forma comparativa entre las matrices clásicas y sus LIMs, como varía la señal diagnóstico en sucesivos disparos (*shots*) en un punto fijo de la muestra. En la Figura 23 se grafica como varía la intensidad absoluta de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función del número de disparos para la matriz ácida ECHCA en comparación con los LIMs ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM. Fuera de la ya discutida diferencia en la eficiencia de DI del analito entre los LIMs y la matriz ácida, en estos gráficos puede observarse que el decaimiento de la señal es mayor en el LIM ECHCA.BAM, ya que la intensidad del ion cae a un 50% del valor máximo entre 20 y 30 disparos, mientras que para el ECHCA y el ECHCA.TEAM este decaimiento se alcanza aproximadamente a los 50 *shots*. A pesar de esta diferencia en la velocidad de decaimiento entre los primeros disparos, en ambos LIMs la señal alcanza el nivel del ruido del espectro entre los 90 y los 100 *shots*. En cambio, la matriz ácida ECHCA presenta una mayor estabilidad en comparación con sus LIMs, ya que presenta dos zonas de intensidad constante en disparos sucesivos y una señal que tiende a cero a partir de los 150-160 *shots*.

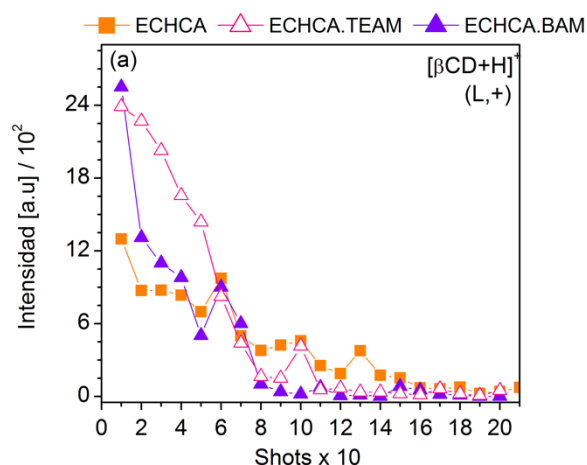


Figura 23. Estabilidad de las matrices. Intensidad del ion monitoreado vs. Número de disparos (*shots*). Analito: βCD , Ion monitoreado: $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Matrices: ECHCA (■), ECHCA.TEAM (△) y ECHCA.BAM (▲). Modo lineal positivo (L, +).

En la Figura 24a y b se muestran las curvas de decaimiento de la señal correspondiente al aducto con sodio de la βCD en función de la cantidad de disparos del láser, en las matrices ácidas ESA y ZSA y sus respectivos LIMs con TEAM y BAM como contra ion. En el caso del ESA y sus LIMs se observa claramente como la velocidad de decaimiento en los primeros disparos es muy similar, las tres matrices decaen al 50% de su intensidad máxima aproximadamente a los 30 *shots* (Figura 24a). Sin embargo, el ESA presenta levemente una mayor estabilidad que los

LIMs, ya que la señal diagnóstico tiende a cero a partir de los 90 disparos en el ESA y a partir de los 70/80 en los LIMs.

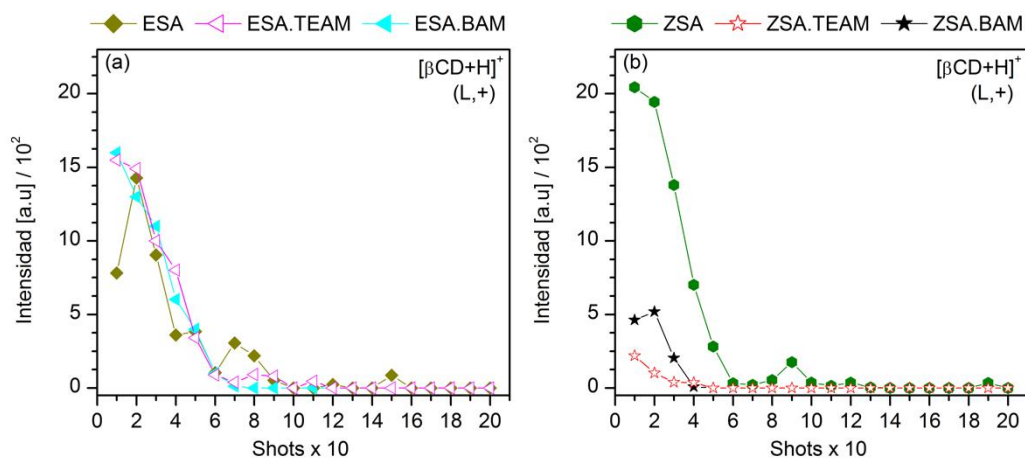


Figura 24. Estabilidad de las matrices. Intensidad del ion monitoreado vs. Número de disparos (*shots*). Analito: βCD , Ion monitoreado: $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Matrices: (a) ESA (◆), ESA.TEAM (◀), ESA.BAM (◀) y (b) ZSA (●), ZSA.TEAM (★), ZSA.BAM (★). Modo lineal positivo (L, +).

En la matriz ZSA, al igual que en el isómero ESA, la señal del analito decae a un 50% de su valor inicial aproximadamente entre los 30 y 40 disparos. Sin embargo, los LIMs derivados del ZSA presentan una velocidad de decaimiento ligeramente mayor que la del ácido solo alcanzando el 50% de la intensidad aproximadamente a los 20 disparos (Figura 24b). En esta figura se observa también que el ZSA presenta una mayor estabilidad de la señal que sus LIMs ya que la señal se mantiene hasta los 60 disparos en comparación con LIMs donde la señal tiende a cero a partir de los 40.

La Figura A2.22 a y b resume los resultados obtenidos de los estudios de estabilidad de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en las matrices nHo y DHB respectivamente, en comparación con los resultados obtenidos en presencia de las aminas TEAM y BAM. En el caso del nHo y de las matrices nHo.TEAM y nHo.BAM se observa una marcada disminución en la velocidad de decaimiento de la señal en estos últimos en comparación la matriz clásica sola, el nHo alcanza el 50% de intensidad entre los 20 y 30 disparos del láser mientras que la matriz nHo.TEAM lo hace entre 30 y 40 y la matriz nHo.BAM entre 50 y 60. Esta misma tendencia se observa en las diferencias de estabilidad de la señal en las matrices, mientras en el nHo la señal tiende a cero a partir de los 60 *shots*, las matrices nHo.TEAM y nHo.BAM siguen presentando señal por encima de los 200 disparos (datos no mostrados). Por otro lado, los LIMs derivados del DHB presentan un decaimiento ligeramente mayor que el ácido solo, presentando una reducción de la señal del analito al 50% entre 10 y 20 disparos en comparación con los 20 y 30 *shots* alcanzados para el

DHB. La estabilidad de la señal en las tres matrices no presenta una tendencia clara entre los LIMs DHB.TEAM, DHB.BAM y el DHB, ya que la intensidad del ion tiende a cero a partir de los 60, 120 y 80 *shots*, respectivamente.

2.3.2.3 Carbohidratos Sulfatados

Con el objetivo de analizar el desempeño de estas nuevas matrices para otro tipo de hidratos de carbono y en otro modo de análisis, se realiza el mismo tipo de estudio descripto anteriormente para carbohidratos neutros, pero con hidratos de carbono sulfatados. Como ya ha sido descripto en la literatura, este tipo de analitos son analizados por espectrometría de masa MALDI en modo negativo, ya que en ese modo presentan una mejor eficiencia en el proceso de DI, dado el carácter aniónico de los grupos sulfato^{27,33,62-64}. Al igual que lo desarrollado en la sección anterior se evalúa de forma comparativa el desempeño de las matrices ácidas ECHCA, ESA y ZSA en comparación con los LIMs derivados de estas.

En la Figura 25 se muestran los espectros de masa MALDI en modo de análisis lineal negativo obtenidos para la NCT con las matrices ECHCA y con los LIMs ECHCA.EAM, ECHCA.EOHAM, ECHCA.TEAM, ECHCA.BAM, ECHCA.BOAM y ECHCA.TBAM. Con el objetivo de evaluar el efecto de la cantidad de amina en el LIM utilizado se analizaron dos relaciones molares ácido:amina: 1:1 (b-g) y 1:2 (h-m); estos LIMs fueron preparados según el protocolo indicado en la sección experimental. Los espectros de masa en la Figura 25 muestran el rango de m/z entre 540 y 1040, ya que en esta zona del espectro aparecen las señales más importantes de la NCT; el ion $[NCT-Na]^-$ y la fragmentación del mismo con una pérdida de 102 unidades de m/z correspondiente al ion $[NCT-Na-SO_3Na+H]^-$, a m/z 811 y 709 respectivamente. Cabe destacar que todos los espectros y valores de intensidad comparados fueron obtenidos el mismo día en las mismas condiciones experimentales.

El estudio en modo negativo de la NCT muestra claramente la superioridad de los LIMs derivados del ECHCA en comparación con la matriz ácida sola. Como se observa en la Figura 25a, en estas condiciones experimentales no se logra obtener señal del analito en la matriz ECHCA, mientras que en los LIMs en relación molar ácido:amina 1:1 con EAM, EOHAM, TEAM, BAM y BOAM se alcanzan intensidades entre 200 y 600 $\times 10^2$ u.a para el ion $[NCT-Na]^-$ (Figura 25b-f). Si bien el LIM ECHCA.TBAM también presenta esta mejora en el proceso de DI con respecto al ácido solo, la intensidad de la señal del ion $[NCT-Na]^-$ se encuentra aproximadamente al nivel del ruido de fondo, entre varias señales propias de la matriz (Figura 25g). Si bien la fragmentación en la fuente (ISD) de estos azúcares por la pérdida del grupo sulfato es inevitable dado el carácter lábil de este grupo^{26,27,50}, estos LIMs presentan una muy baja descomposición

del analito, mostrando señales de un orden de magnitud menor para el ion fragmento a m/z 709 con respecto al ion $[NCT-Na]^-$.

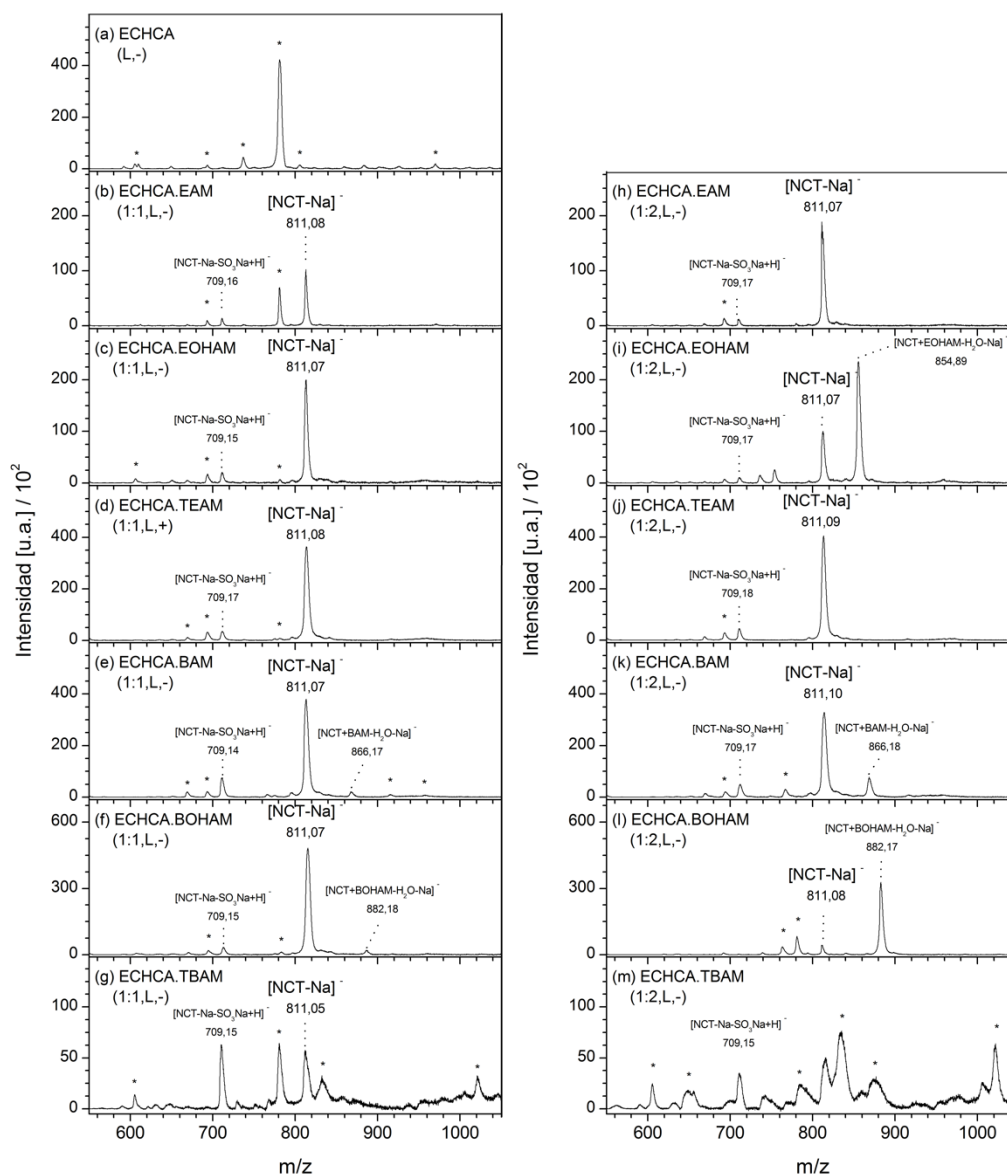


Figura 25. Espectros de masa MALDI. Analito: NCT. Matrices: (a) ECHCA, (b y h) ECHCA.EAM, (c e i) ECHCA.EOHAM, (d y j) ECHCA.TEAM, (e y k) ECHCA.BAM, (f y l) ECHCA.BOHAM, (g y m) ECHCA.TBAM. LIs en relación molar ácido:amina: (b-g) 1:1 y (h-m) 1:2. Modo lineal negativo (L, -). Fluencia del láser: 40%. * Clúster

Por otro lado, cuando se aumenta la relación molar ácido:amina a 1:2 se observa en los LIMs ECHCA.EOHAM, ECHCA.BAM y ECHCA.BOHAM la aparición de iones de tipo $[NCT+amina-H_2O-Na]^-$ a m/z 855, 866 y 882 respectivamente (Figura 25i, k y l). La aparición de estos iones produce la disminución del ion $[NCT+Na]^-$ de m/z 811. Esta disminución de la intensidad absoluta del ion $[NCT-Na]^-$ es proporcional a la intensidad del ion aducto formado. Si bien en el caso de los LIMs ECHCA.BAM y ECHCA.BOHAM en relación molar 1:1 también se

observan este tipo de iones, al aumentar la relación de amina en el LI estas señales se hacen mucho más intensas, pasando a ser, en las matrices ECHCA.EOHAM y ECHCA.BOAM, el pico base del espectro. A diferencia de estos, los LIMs con EAM y TEAM no presentan cambios en el espectro de masa al pasar de relación molar 1:1 a 1:2, mientras que en el caso de la matriz ECHCA.TBAM 1:2 desaparece la señal propia del analito y aumenta la intensidad y la cantidad de señales propias de la matriz (Figura 25 h, j y m, respectivamente).

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos para la NCT, usando como ion diagnóstico $[NCT-Na]^+$ con las matrices ECHCA y sus LIMs, tanto en relación molar ácido:amina 1:1 como 1:2. Esta figura muestra la intensidad porcentual del ion, usando como 100% el valor de máxima intensidad en todo el grupo de matrices comparadas. Esta intensidad porcentual y su desviación estándar se calcula como un promedio de tres réplicas analíticas, analizadas en las mismas condiciones experimentales el mismo día.

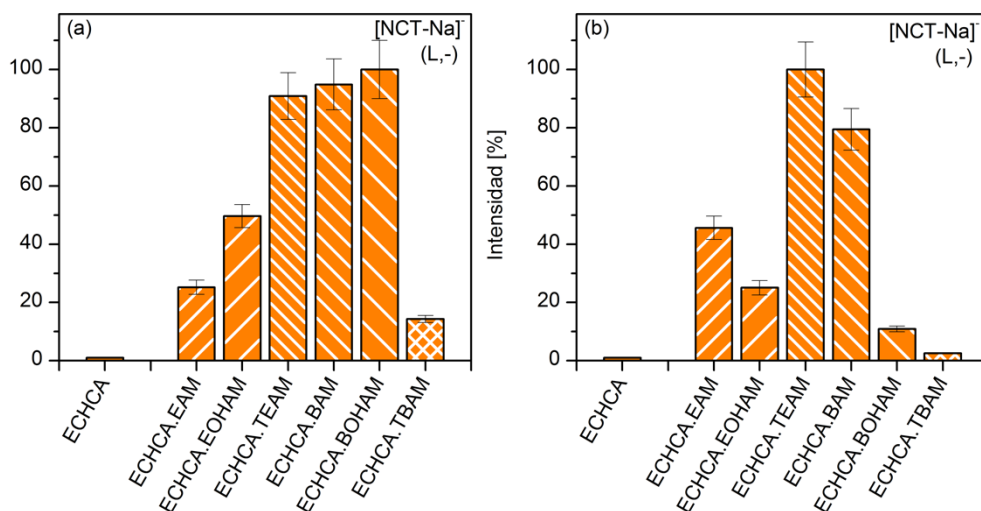


Figura 26. Intensidad normalizada de la señal $[NCT-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: ECHCA y sus LIMs. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina (a) 1:1 y (b) 1:2.

Al igual que lo descrito para la Figura 25, en la Figura 26 se observa claramente la mejora en la eficiencia en el proceso de DI de la NCT en los LIMs derivados del ECHCA. En este caso, a diferencia de lo observado para la β CD, se observan diferencias en el valor de la intensidad del ion diagnóstico entre los distintos LIMs utilizados, alcanzándose los valores mayores en los LIMs ECHCA.TEAM, ECHCA.BAM y ECHCA.BOAM y la menor eficiencia para la matriz ECHCA.TBAM. Si bien las diferencias son significativas, no existe una tendencia clara o una correlación clara entre la eficiencia en el proceso de DI y la amina constituyente de cada LIMs (peso molecular, longitud, ramificación, pKa, funcionalización, etc.). El cambio en la relación molar ácido:amina a 1:2 en los LIMs genera una disminución en la señal de los LIMs con

EOHAM, BAM y BOHAM debido al aumento de la intensidad de los clústeres deshidratados de tipo NCT+amina-H₂O. El caso más llamativo es la matriz ECHCA.EAM que presenta un aumento en la intensidad de casi el doble para el ion [NCT-Na]⁻ al aumentar la relación molar del LI de 1:1 a 1:2.

En la Figura 27 se muestran los espectros de masa MALDI en el rango de m/z de 560 a 1040 obtenidos para el oligosacárido NCT en las matrices ESA y ZSA y los LIMs derivados de estos ácidos, con las seis aminas alifáticas estudiadas en este capítulo, en relación molar ácido:amina 1:1. En este caso el análisis comparativo en el proceso de DI se realiza tanto para el efecto de la amina en el LIM como el efecto del cambio de la estereoquímica del ácido constituyente del LIM. Al igual que todos los estudios realizados en esta sección, el análisis de la NCT se realiza en modo lineal negativo. Los resultados de estos análisis se grafican en la Figura 28 como intensidad promedio porcentual del ion diagnóstico [NCT-Na]⁻ en función de las distintas matrices evaluadas. La intensidad de cada matriz se calcula como un promedio de tres réplicas analíticas y la intensidad porcentual se hace de forma relativa al máximo de intensidad obtenido para el ion diagnóstico en todas las matrices comparadas en la figura, siendo en este caso con la matriz ZSA.

Como se puede observar en la Figura 27a-g, tanto para el ESA como para sus LIMs (relación molar ácido:amina 1:1) se obtiene una señal, correspondiente al ion [NCT-Na]⁻ a m/z 811 con buena relación señal ruido. Sin embargo, tanto en la matriz ESA como en sus LIMs con EAM, EOHAM y TEAM, la señal se encuentra en un rango de m/z donde aparecen clústeres propios de la matriz que pueden llegar a dificultar el análisis de muestras incógnitas. A diferencia de estos, en los LIMs con BAM, BOHAM y TBAM estos clústeres desaparecen generando un espectro más limpio. Por otro lado, si bien los LIMs derivados del ESA se muestran como matrices más calientes que el ácido solo, es decir que presentan un mayor grado de ISD para dar el fragmento a m/z 709, esta descomposición del analito es muy baja para todos los LIMs, alcanzando intensidades menores al 15% con respecto del ion [NCT-Na]⁻, con excepción del LIM ESA.TBAM donde la fragmentación es significativa alcanzando un valor de un 70%. Por otro lado, el isómero ZSA como sus LIMs (ácido:amina 1:1) generan espectros limpios de clústeres propios de la matriz en este rango de m/z y una buena intensidad de la señal diagnóstico de la NCT (Figura 27h-n). A diferencia del ácido ZSA y los LIMs con EOHAM y BOHAM, los LI ZSA.EAM, ZSA.TEAM, ZSA.BAM y ZSA.TBAM presentan una mayor fragmentación del analito en la fuente, generando el ion [NCT-Na-SO₃Na+H]⁻ con una intensidad de entre 9 y 21% con respecto al ion [NCT-Na]⁻. De estos LIMs, el ZSA.TBAM es el que presenta mayor ISD, de todas formas, este grado de descomposición es bajo para este tipo de analito.

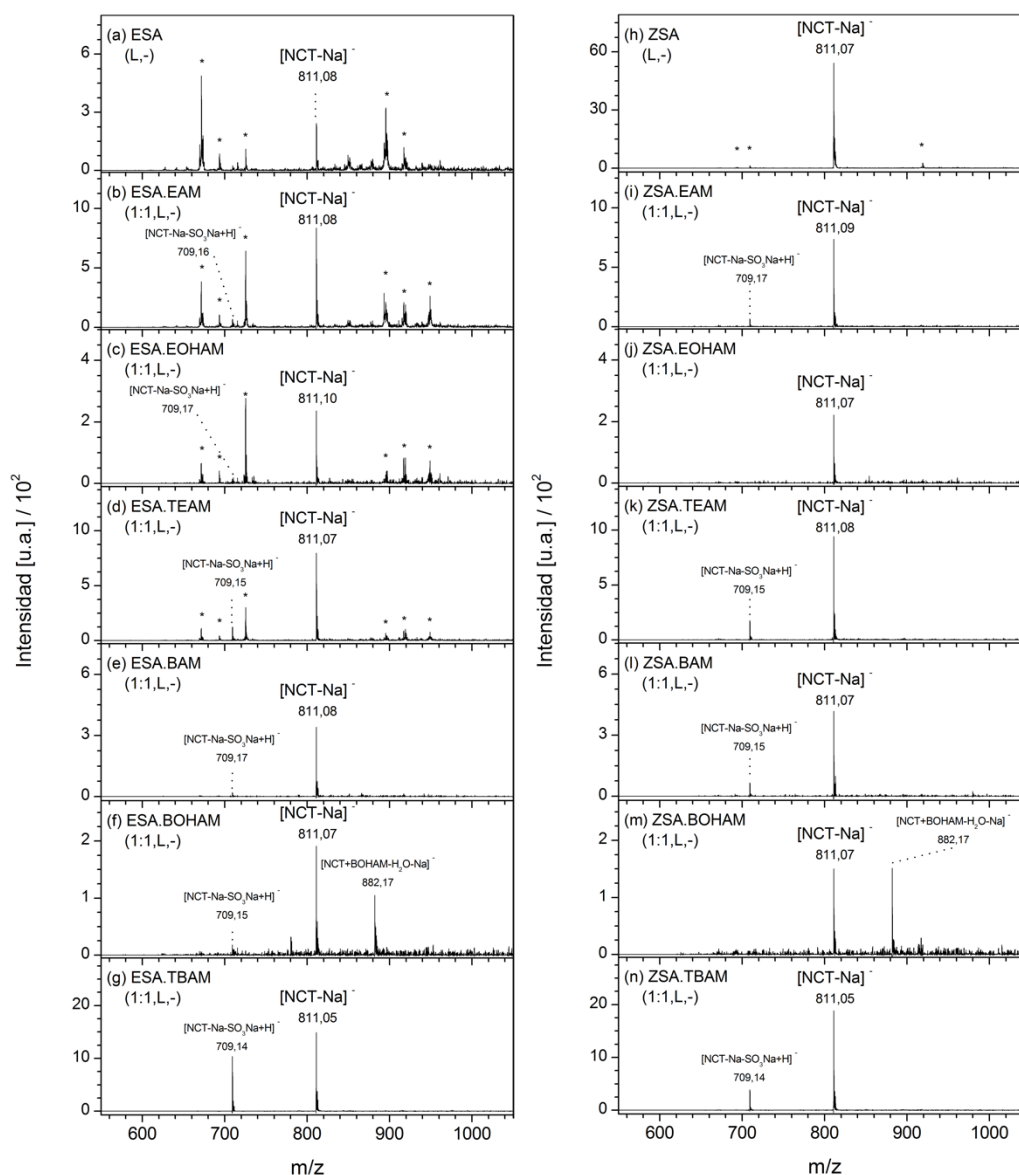


Figura 27. Espectros de masa MALDI. Analito: NCT. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.EAM, (c) ESA.EOHAM, (d) ESA.TEAM, (e) ESA.BAM, (f) ESA.BOHAM, (g) ESA.TBAM, (h) ZSA, (i) ZSA.EAM, (j) ZSA.EOHAM, (k) ZSA.TEAM, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.BOHAM y (n) ZSA.TBAM. Lis en relación molar ácido:amina 1:1. Modo lineal negativo (L, -). Fluencia del láser: 40%. * Clúster

Con respecto al cambio en la eficiencia de DI de la NCT entre las matrices ácidas y sus LIMs, tanto en la Figura 27a-g, como en la Figura 28a se puede apreciar que los LIMs ESA.EAM, ESA.TEAM y ESA.TBAM presentan una mejora en el proceso de DI del analito en comparación con el ácido ESA. Estos LIMs presentan un aumento en la intensidad del ion $[NCT-Na]^+$ de entre 3 y 5 veces más que lo obtenido en el ácido solo. Sin embargo, este comportamiento no es generalizado para todos los LIMs estudiados, ya que en las matrices ESA.EOHAM y ESA.BAM la diferencia en la intensidad del ion diagnóstico de este analito con respecto al ácido solo no es significativa. En el caso particular del ESA.BOHAM, la pequeña disminución de la intensidad de

la señal de la NCT (Figura 28a) puede deberse a la aparición del ion aducto $[NCT+BOHAM-H_2O-Na]^-$ a m/z 882 (Figura 27f). En el caso del isómero ZSA y sus LIMs, se observa una marcada disminución de la intensidad de la señal diagnóstico en estos últimos en comparación con la matriz ácida (Figura 28b). La intensidad promedio obtenida para el ion $[NCT-Na]^-$ en los distintos LIMs va desde 2 a 38% de la intensidad obtenida en la matriz ZSA. Esta disminución de la eficiencia en el proceso de DI es mayor en los LIMs ZSA.EAM, ZSA.BAM y ZSA.BOAM. El espectro de masa de la NCT en la matriz ZSA.BOAM (Figura 27m) muestra la formación del ion aducto deshidratado de la NCT con BOHAM, al igual que lo descrito para el ESA.BOAM, a m/z 882, en este caso la intensidad del clúster es aproximadamente igual a la intensidad del ion sin sodio de la NCT. Llama la atención, nuevamente, que a pesar de la marcada diferencia en la eficiencia de DI de la NCT en los isómeros ESA y ZSA, el efecto contrapuesto en la eficiencia de DI generado en los LIMs derivados de ambos isómeros, produce espectros de masa que tienden a igualar la intensidad del ion $[NCT-Na]^-$, generando intensidades en ambos casos de entre 2 y 38% dependiendo del LI que se utilice como matriz.

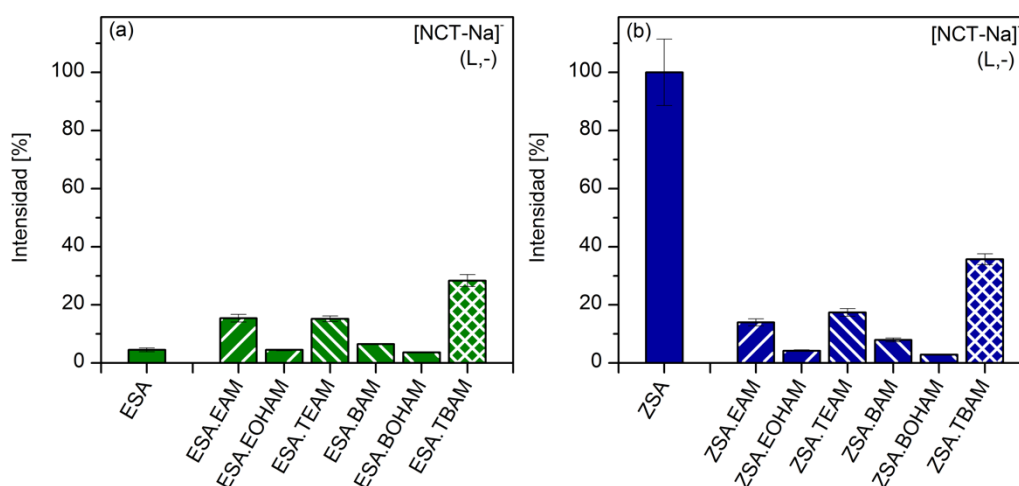


Figura 28. Intensidad normalizada de la señal $[NCT-Na]^-$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

En las Figuras A2.23 y A2.24 se muestran los espectros de masa para la NCT y el gráfico de la intensidad porcentual del ion $[NCT-Na]^-$, respectivamente, para las matrices ESA y ZSA y los LIMs derivados de estos ácidos, en relación molar ácido:amina 1:2. El aumento de la concentración de amina en los LIMs ESA.EOHAM, ESA.BAM, ZSA.EOHAM y ZSA.BAM genera la aparición de los iones aductos $[NCT+amina-H_2O-Na]^-$, mientras que en las matrices ESA.BOAM y ZSA.BOAM se produce un aumento de la intensidad de este ion, convirtiéndolo en el pico base del espectro (Figura A2.23) en comparación con lo observado en la Figura 27. La aparición

de este aducto es el responsable de la disminución de la intensidad del ion diagnóstico de la NCT en estas matrices (Figura A2.24). El caso extremo de este comportamiento son los LIMs ESA.BOHAM y ZSA.BOHAM donde la intensidad del ion $[NCT-Na]^+$ pasa a estar al nivel del ruido del espectro. Por otro lado, el aumento en la relación molar de la amina en los LIMs estudiados, genera en las matrices ESA.TBAM y ZSA.TBAM un aumento en la fragmentación del analito en la fuente para dar el ion fragmento de m/z 709. A diferencia de lo observado con respecto a la eficiencia de DI del analito entre la matriz ácida ESA y sus LIMs 1:1, el aumento en la relación molar ácido:amina a 1:2 no genera un cambio significativo en la intensidad promedio del ion diagnóstico de la NCT, con excepción en el LIM ESA.TBAM donde si se observa un aumento de la intensidad.

Con el objetivo de evaluar la reproducibilidad del comportamiento de estas matrices (ESA, ZSA y sus LIMs), se realizó el mismo tipo de análisis, en modo lineal negativo, con otros dos azúcares: la NCH, otro ejemplo de la familia de azúcares sulfatados y la β CD, como ejemplo de azúcares neutros. Si bien este último azúcar es mejor analizarlo en modo positivo dada su estructura, en modo negativo también presenta una ionización significativa dando el ion $[\beta CD-H]^+$. Lo interesante de analizar este azúcar, a diferencia de los azúcares sulfatados, es que la descomposición en la fuente, en estas condiciones experimentales, es nula, por lo cual el análisis comparativo de la intensidad del ion molecular desprotonado entre matrices y su relación con la eficiencia en el proceso de DI es más directo. Otra ventaja de este azúcar, por ser neutro, es que no forma clústeres de tipo βCD +amina, como se describió para la NCT, lo cual no influye en la intensidad absoluta del ion molecular desprotonado.

En las Figuras A2.25 y A2.26 se muestran los resultados de la intensidad porcentual obtenidos para el ion $[NCH-Na]^+$ con las matrices ESA, ZSA y sus LIMs en relación molar 1:1 y 1:2. En estas figuras se observa el mismo tipo de comportamiento que lo descrito anteriormente para la NCT. En el caso del ESA el aumento de la eficiencia de DI del analito con los LIMs es muy notorio, dado que en estas condiciones experimentales no se logra obtener señal en la matriz ácida (Figura A2.25a). Por el contrario, los LIMs derivados del ZSA presentan una disminución de la intensidad del ion diagnóstico en comparación con la matriz ácida. Esta disminución de intensidad genera iones de entre 8 y 50%, valores similares a lo obtenido con los LIMs derivados del ESA (Figura A2.25b). En ambos casos la menor intensidad obtenida corresponde a las matrices ESA.BOHAM y ZSA.BOHAM debido a la formación del clúster $[NCH+BOHAM-H_2O-Na]^+$, que en estos LIMs se hace significativa. El aumento de la concentración de amina en los LIMs derivados de ambos isómeros genera una ligera disminución de la intensidad de la señal diagnóstico. Al igual que lo observado para la NCT, la formación del clúster NCH+amina se

incrementa al aumentar la concentración de amina en la matriz; este efecto es crítico para los LIMs con BOHAM donde se observa una desaparición de la señal del ion molecular desprotonado del analito (Figura A2.26).

El análisis de la β CD en modo lineal negativo, con estas matrices, sigue exactamente la misma tendencia. Como puede observarse en la Figura A2.27, los LIMs derivados del ESA sufren un aumento en la eficiencia de DI del analito, mientras que los derivados del ZSA ven disminuida esta eficiencia, generando en ambos casos intensidades para el ion $[\beta\text{CD-H}]^-$ de entre 25 y 80%. Al aumentar la concentración de amina en los LIMs se produce una gran disminución, en todos los casos, de la intensidad de la señal diagnóstico. Esto genera, que la diferencia de intensidad observada entre la matriz ácida ESA y los LIMs, en la mayoría de los casos, no sea significativa (Figura A2.28). A pesar de que con la β CD no se observa descomposición en la fuente ni la formación de clústeres de tipo βCD +amina, no es posible hacer una relación directa entre la magnitud del cambio (aumento o disminución) de la eficiencia en la DI del analito en los LIMs con la naturaleza de la amina que se usa como contraión.

Al analizar el comportamiento como matrices de otros pares de isómeros geométricos del tipo ácido cinámico en comparación con sus LIs con aminas alifáticas para la NCT, se observa la misma tendencia que lo descrito para el par ESA y ZSA. En las Figuras A2.29 y A2.30 se resumen los resultados obtenidos de los espectros de masa MALDI de la NCT en modo lineal negativo con las matrices ácidas EFE, ZFE y los LIMs derivados de estos en relación molar ácido:amina 1:1 y con las matrices ECUM, ZCUM y sus LIMs 1:1. Al igual que en las figuras anteriores, estos gráficos muestran la intensidad promedio porcentual para el ion $[\text{NCT-Na}]^-$ en cada una de las matrices. El EFE en presencia de las aminas alifáticas presenta un cambio en la desorción ionización del analito muy marcado, ya que con el ácido EFE, en estas condiciones experimentales, no se observa el pseudo ion molecular de la NCT, mientras que con los LIMs la intensidad de este ion es bastante alta (Figura A2.29a), con excepción de la matriz EFE.EOHAM. Por otro lado, los LIMs derivados del ZFE, presentan una disminución de la intensidad del ion diagnóstico en comparación con el ácido solo, en este caso los LIMs derivados del ZFE presentan una intensidad relativa de aproximadamente 40% para los LIMs con EOHAM, TEAM, BAM, BOHAM y del 80% para las matrices ZFE.EAM y ZFE.TBAM (Figura A2.29b).

En el caso del ECUM, el aumento de intensidad del ion $[\text{NCT-Na}]^-$ en los LIMs no es tan marcado, siendo en algunos casos poco significativo. En el caso del ECUM el ion diagnóstico alcanza una intensidad del 5%, mientras que los LIMs van desde 8 a 20% (Figura A2.30a), con excepción del LIM ESA.TBAM donde hay una disminución de la intensidad que puede deberse al aumento en la fragmentación en la fuente para dar el ion a m/z 709 (datos no mostrados). En

cambio, el efecto de la amina en los LIMs derivados del ZCUM son muy significativos, generando una disminución en la eficiencia de DI de entre 72 y 95% de la intensidad obtenido con el ZCUM solo (Figura A2.30b). Al igual que lo observado para el ECUM.TBAM, el ZCUM.TBAM presenta una mayor fragmentación en la fuente que los otros LIMs estudiados, pudiendo ser esto la causa de una mayor disminución en la intensidad de la señal (datos no mostrados). A pesar de la diferencia en el proceso de DI de ambos isómeros, tanto los LIMs derivados del ECUM como del ZCUM generan el ion $[NCT-Na]^-$ en el mismo orden de magnitud, con intensidades que van entre 7 y 28% dependiendo del LI. Este comportamiento es similar a lo descrito anteriormente para los isómeros ESA y ZSA y sus LIMs. Si bien esta tendencia se mantiene en las matrices EFE, ZFE y los LIMs, estos presentan un comportamiento ligeramente diferente, donde el efecto de aumento de intensidad en las matrices EFE.amina es mayor que lo observado en los otros casos y por el contrario la disminución en la intensidad de las matrices ZFE.amina es menor que lo observado en los otros ácidos cinámicos.

Al igual que lo realizado para hidratos de carbono neutros, se utiliza la NCT para evaluar el efecto de la presencia de aminas alifáticas en el proceso de DI con las matrices clásicas DHB y nHo para el estudio de hidratos de carbono sulfatados. En la Figura A2.31a-g se muestran los espectros de masa MALDI obtenidos para la NCT en las matrices nHo y nHo.amina (relación molar 1:1) en modo lineal negativo. El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 29, como intensidad porcentual del ion diagnóstico en las matrices nHo y nHo.amina en relación molar 1:1 y 1:2. La intensidad promedio y su desviación estándar se calcula en función de tres réplicas analíticas obtenidas el mismo día en las mismas condiciones experimentales.

Como puede observarse en la Figura A2.31a, el nHo se comporta como una matriz caliente, donde la descomposición del analito en la fuente es importante. En estas condiciones experimentales, el ion fragmento $[NCT-Na-SO_3Na+H]^-$ alcanza un valor del 75% con respecto al ion $[NCT-Na]^-$. El agregado de una amina alifática a esta matriz reduce significativamente la ISD del analito, aunque no la suprime, generando iones fragmentos de entre 15 y 35% con respecto al ion $[NCT-Na]^-$ dependiendo de la amina que se utilice (Figura A2.31b-g).

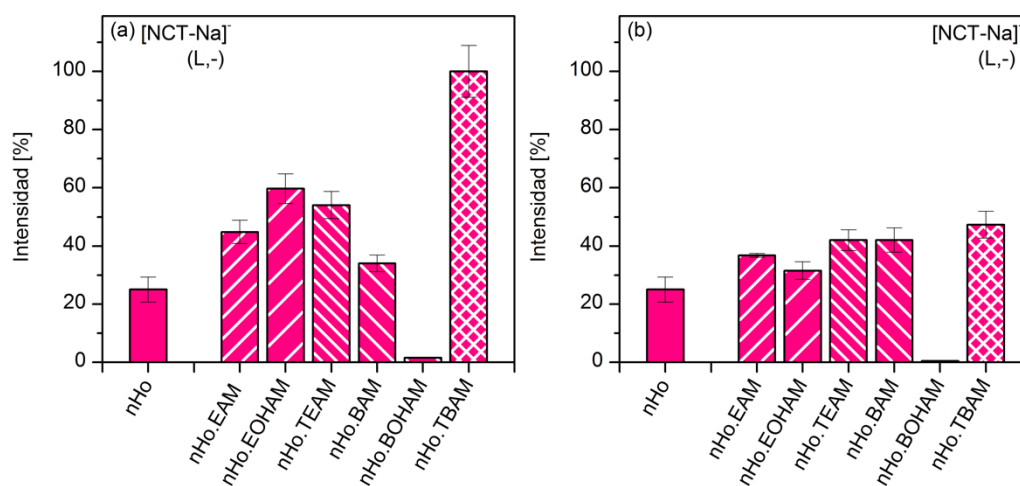


Figura 29. Intensidad normalizada de la señal $[NCT-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: nHo y sus LIMs. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina (a) 1:1 y (b) 1:2.

Al igual que lo observado para azúcares neutros en modo lineal positivo, la presencia de una amina en la matriz nHo, en relación molar 1:1, genera un aumento en la eficiencia en la DI del analito, sin embargo, este aumento no es generalizado y depende de la amina que se use como aditivo en la matriz. Si bien en el caso de la matriz nHo.BAM, se observa un pequeño aumento en la intensidad promedio, el cambio no es significativo comparado con el cambio que se observa con los otros LIMs (Figura 29a). Por otro lado, llama la atención la marcada disminución en la intensidad del ion $[NCT-Na]^+$ en la matriz nHo.BOHAM; esta disminución de la intensidad del ion $[NCT-Na]^+$ puede deberse a la formación del clúster deshidratado $NCT+amina-H_2O$, el cual con esta amina se hace muy importante, siendo el pico base del espectro de masa (Figura A2.31f). Si bien este tipo de clúster también aparece en las matrices nHo.EOHAM y nHo.BAM, no son tan intensos y por lo tanto afectan en menor proporción a la intensidad del ion diagnóstico (Figura 29a y Figura A2.31). Al aumentar la proporción de amina en la matriz (relación molar 1:2) se observa una disminución de la intensidad del EM, generando que la diferencia de intensidad entre el nHo y las matrices que contienen una amina alifática no sea tan marcada como en el caso anterior (Figura 29b). Este efecto puede deberse al aumento de la proporción del ion $[NCT+amina-H_2O-Na]^+$ con las matrices nHo.EOHAM, nHo.BAM y nHo.BOHAM (datos no mostrados). En el caso de la matriz nHo.TBAM la marcada disminución de la intensidad al aumentar la concentración de amina se debe a un aumento en fragmentación en la fuente del analito (ISD), es decir que la matriz en relación molar 1:2 se comporta como una matriz más caliente que en relación 1:1 (datos no mostrados).

En la Figura A2.31h-n se muestran los espectros de masa MALDI para este mismo azúcar obtenidos con la matriz DHB y sus LIMs en relación molar ácido:amina 1:1 en modo lineal negativo. Estos resultados se representan en la Figura 30, como intensidad promedio del ion diagnóstico con todas las matrices, tanto para los LIMs en relación molar 1:1 como 1:2.

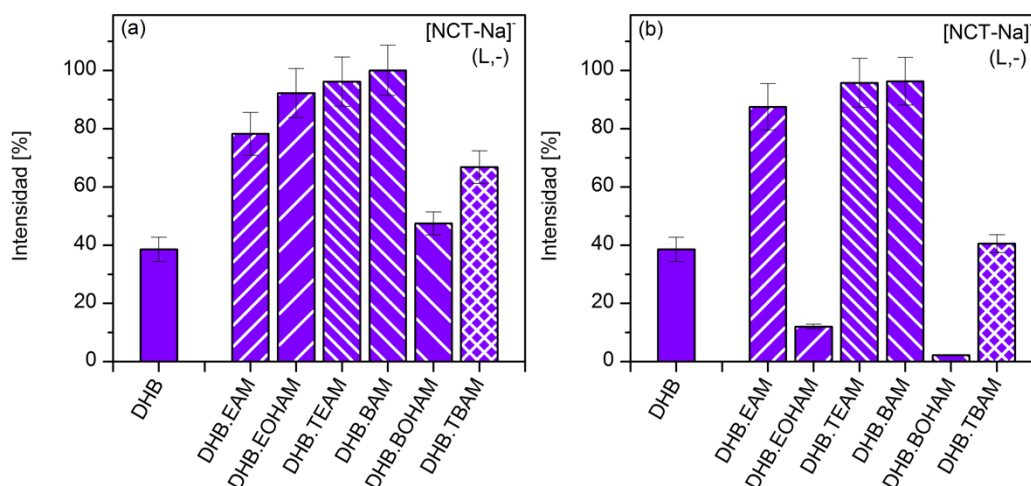


Figura 30. Intensidad normalizada de la señal $[NCT-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: DHB y sus LIMs. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina (a) 1:1 y (b) 1:2.

El DHB, a diferencia del nHo, se comporta como una matriz más fría en estas condiciones experimentales. Como se observa en la Figura A2.31h, la fragmentación de la NCT en la fuente es de aproximadamente un 15%. Este comportamiento no se modifica con los LIMs derivados del DHB, ya que en todos los casos la intensidad del ion fragmento no supera el 15% de la intensidad del ion $[NCT-Na]^+$. Distinto es el caso del LIM DHB.TBAM (Figura A2.31n) que, en comparación con el DHB, es una matriz mucho más caliente. En este LI tanto la intensidad del fragmento de la NCT a m/z 709 como el ion a m/z 811 es igual. Si bien la fragmentación del analito es alta, esto no impide obtener con una buena relación S/R el ion diagnóstico $[NCT-Na]^+$.

Por otro lado, tanto en la Figura A2.31 como en la Figura 30a se observa claramente que los LIMs que contienen el DHB como cromóforo presentan una mejora significativa en la eficiencia de DI de la NCT, generando intensidades del ion diagnóstico de más del doble que lo obtenido con la matriz ácida DHB. Si bien los LIMs DHB.BOHAM y DHB.TBAM también mejoran la intensidad de la señal diagnóstica, el efecto no es tan grande debido a que en el caso del DHB.BOHAM entra en competencia la formación del clúster deshidratado $NCT+BOHAM-H_2O$ a m/z 882, mientras que en el caso del DHB.TBAM la fragmentación del analito en la fuente es mayor que en el resto de los LIMs. Estos dos efectos hacen que el aumento de la intensidad de la señal no sea del mismo orden que el obtenido con los otros LIMs. Al aumentar la relación

molar de amina en los LIMs DHB.EOHAM y DHB.BOAM (Figura 30b) la formación del clúster NCT+amina se ve favorecida generando una disminución muy grande en la intensidad del ion diagnóstico (datos no mostrados). En el caso de la matriz DHB.TBAM, el aumento de la concentración de la amina en el LIM también genera una disminución significativa en la intensidad del ion $[NCT-Na]^+$ pero debido al aumento de la ISD del analito. En el resto de los LIMs el cambio de relación molar ácido:amina no genera cambios significativos en la intensidad del ion diagnóstico.

2.3.2.3.1 Mapeo químico superficial por EM MALDI.

Al igual que los estudios realizados para hidratos de carbono neutros, se analiza la distribución de los hidratos de carbono sulfatados en las distintas matrices estudiadas. El mapeo químico superficial por espectrometría de masa MALDI en modo lineal negativo nos permite evaluar el cambio en la homogeneidad química de la muestra en los LIMs ácido.TEAM y ácido.BAM con respecto a la matriz ácida que los compone. Este análisis se realiza sobre los LIMs en relación molar ácido:amina 1:1, dado que los LIMs en relación molar 1:2 han mostrado en algunos casos una ligera disminución en la eficiencia de DI, formación de clústeres de tipo NCT+amina y/o un aumento en la ISD. Como se describe en la sección experimental 2.2.6, la imagen MALDI resultante es una composición de la intensidad absoluta de una señal diagnóstico en distintos puntos de la muestra. Las muestras sólidas analizadas se prepararon según el método de capas sucesivas y el método mezcla, descritos en la sección 2.2.2.

En las Figuras 31 y 32 se muestran los resultados obtenidos del mapeo químico superficial de la especie $[NCT-Na]^+$ con las matrices ECHCA, ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM utilizando los dos métodos de preparación de muestra. En este caso la intensidad porcentual está calculada relativa a la máxima intensidad obtenida para el ion diagnóstico en ambas figuras ($\text{Int. Max. } [NCT-Na]^+_{ECHCA.TEAM} = 405 \times 10^2 \text{ u.a.}$, método sándwich), permitiendo de esta forma realizar un análisis comparativo tanto entre matrices como entre métodos de preparación de la muestra.

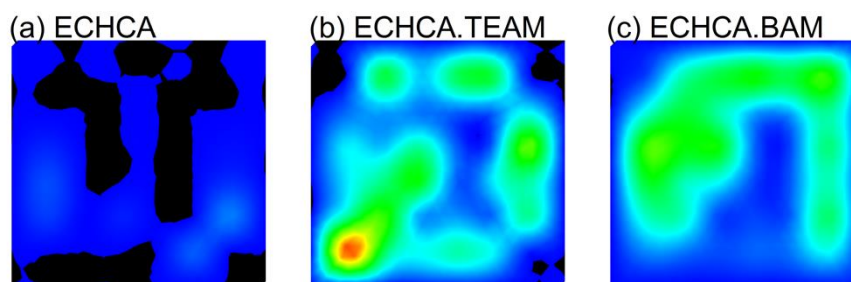


Figura 31. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 405×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

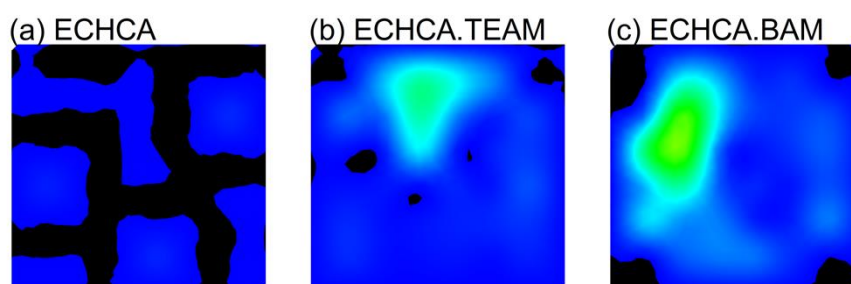


Figura 32. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 405×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla.

A pesar del aumento en la eficiencia de DI de la NCT en los LIMs en comparación con la matriz ácida ECHCA, descrita en la sección anterior, en la Figura 31 se observa que la presencia de una amina en la matriz no genera un aumento en la homogeneidad de la muestra. En las tres matrices evaluadas ECHCA, ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM se observa zonas de mayor producción de iones en la muestra sólida. Si bien existe un cambio en la distribución de los iones de la NCT en las tres muestras analizadas, esto no genera muestras más homogéneas. Esta observación es igual para ambos métodos de preparación de la muestra sólida; tanto en el método sándwich como en el método mezcla no se observa una mejora en la homogeneidad (Figura 32). Al comparar la Figura 31 con la Figura 32 se observa que, en estas condiciones experimentales, el método mezcla presenta una menor eficiencia de DI de la NCT en relación a lo observado con el método sándwich, independientemente de la matriz que se utilice. Esto genera intensidades en el método mezcla de aproximadamente un 50% para el ion diagnóstico en relación a lo observado en el método de capas sucesivas. Por otro lado, el cambio en la forma de cristalización de la matriz en presencia de una amina, observado en las imágenes ópticas

(Figura 4), no se correlaciona de forma directa con el cambio en la distribución del analito en los LIMs mostrados en la Figura 32. Utilizando estas matrices se realizó el mismo tipo de análisis para otros azúcares sulfatados con distinto PM. En las Figuras A2.32 y A2.33 se muestra la distribución del ion $[M-Na]^+$ para la NCH y NCO respectivamente, utilizando el método de capas sucesivas para la preparación de la muestra. Los resultados obtenidos siguen la misma tendencia que lo descrito para la NCT, si bien se observa un aumento en la eficiencia DI de los analitos en los LIMs que contienen el ECHCA en relación a la matriz ácida sola, no se observa una mejora en la distribución del analito en la muestra. En ambos casos se obtiene una mayor producción de iones en los bordes del *spot*, generando un anillo perímetro circundante.

Al igual que lo realizado para hidratos de carbono neutros, se decide evaluar el cambio en la eficiencia de DI y en la homogeneidad de las muestras sólidas de los análogos halogenados del ECHCA, el E-4ClCHCA y E-4FCHCA en comparación con sus LIMs con BAM como contraíón. Para el estudio en modo lineal negativo se utiliza la NCT como representante de la familia de los azúcares sulfatados. En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos de la distribución del ion $[NCT-Na]^+$ en las matrices E-4ClCHCA, E-4ClCHCA.BAM, E-4FCHCA y E-4FCHCA.BAM, utilizando el método sándwich como preparación de la muestra sólida.

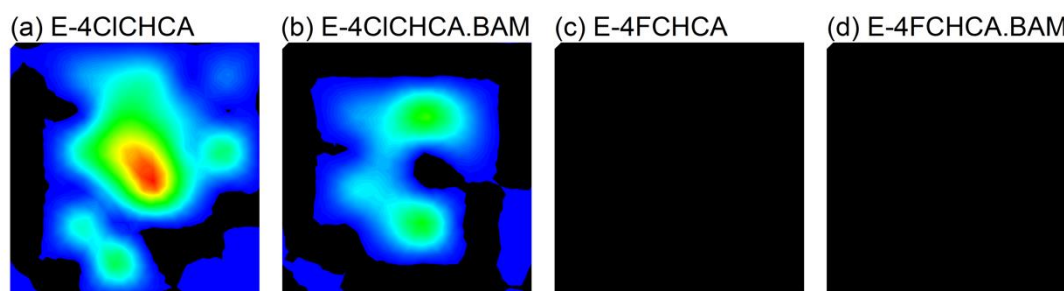


Figura 33. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) E-4ClCHCA, (b) E-4ClCHCA.BAM, (c) E-4FCHCA y (d) E-4FCHCA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = $3,5 \times 10^2$ u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

Estas matrices presentan un mal desempeño para el estudio de hidratos de carbono, en especial para el análisis en modo negativo de los mismos. Como puede observarse en la Figura 33a la intensidad máxima alcanzada para el ion $[NCT-Na]^+$ en la matriz E-4ClCHCA es de un orden de magnitud menor que lo obtenido con la matriz ECHCA. A diferencia de lo observado en el cambio en la eficiencia de DI del analito entre el ECHCA y sus LIMs, en este caso se observa una disminución en la intensidad del ion diagnóstico en el LIM E-4ClCHCA.BAM (Figura 33b) en comparación con el ácido solo. Este comportamiento es consistente con lo observado para la β CD, con estas matrices, en modo lineal positivo descrito en la sección 2.3.2.2.1. Tanto en la

matriz E-4FCHCA como en el LIM E-4FCHCA.BAM no se observa señal correspondiente a la NCT en estas condiciones experimentales.

En las Figuras 34 y A2.34 se muestra el mapeo químico superficial del ion $[NCT-Na]^+$ con las matrices ESA, ESA.TEAM y ESA.BAM, utilizando como método de preparación de la muestra sólida el método sándwich y el método mezcla respectivamente. De la misma forma en las Figuras 35 y A2.35 se muestran las imágenes MALDI obtenidas para la NCT con la matriz ZSA y sus LIMs con TEAM y BAM en los dos métodos de preparación de muestra. En ambos casos la intensidad porcentual del ion está normalizada a la máxima intensidad obtenida en ambas figuras, de esta forma es posible hacer un análisis comparativo directo entre los métodos de preparación de la muestra. Cabe destacar que las cuatro figuras antes mencionadas fueron realizadas bajo las mismas condiciones experimentales el mismo día de análisis, lo que nos permite hacer una comparación entre ellas.

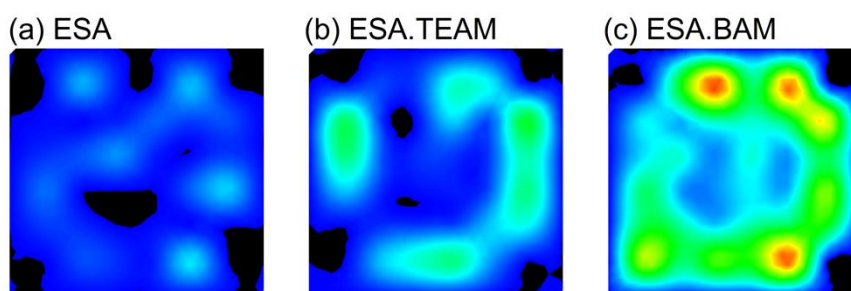


Figura 34. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.TEAM y (c) ESA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 18×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

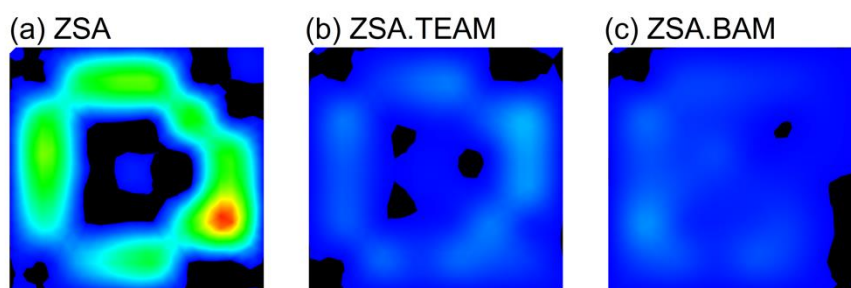


Figura 35. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) ZSA, (b) ZSA.TEAM y (c) ZSA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 91×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

Al igual que lo ya descrito en la literatura^{6,7}, el cambio en la geometría de la matriz ESA, genera un aumento en la eficiencia en el proceso de DI de la NCT, generando iones en más de un orden de magnitud con la matriz ZSA. Este cambio en la estereoquímica genera también una diferencia notable en la distribución de iones del analito en la muestra, en el caso del ESA los iones se distribuyen de forma aleatoria en toda la superficie del *spot* (Figura 34a), mientras que en el ZSA se observa una mayor producción en las periferias de la muestra, generando un anillo perimetral (Figura 35a). Este tipo de cambio en la distribución de los iones en el *spot*, puede relacionarse con el cambio en la forma de cristalización de ambos isómeros en el electrodo porta muestra, como se observa en las imágenes ópticas analizadas en la sección 2.3.1 (Figura 4). En presencia de una amina, la matriz ESA, ve aumentada su eficiencia como matriz MALDI para el análisis de la NCT en modo lineal negativo. Si bien se observa un cambio en la distribución de los iones del analito en la superficie del *spot* entre la matriz ácida y los LIMs derivados del ESA, este cambio no genera una mejora en la homogeneidad química de la muestra sólida ya que se siguen observando zonas de mayor producción de iones en la superficie del *spot*. Los LIMs derivados del ZSA presentan una disminución en la intensidad de la señal diagnóstico de la NCT y no generan cambios significativos en la distribución de iones del *spot*. Los LIMs ZSA.TEAM y ZSA.BAM, presentan una distribución de tipo anillo perimetral, aunque no tan definida como lo observado con el ZSA. Tanto para el ESA, ZSA y sus LIMs, el cambio en el método de preparación de la muestra sólida no genera cambios significativos en la distribución de iones del analito en el *spot* (Figuras A2.34 y A2.35). Sin embargo, en algunos casos, como el ZSA y ZSA.BAM, se observa una ligera disminución de la intensidad global de los iones generados cuando la muestra sólida se prepara por el método mezcla en comparación con el método sándwich.

Al igual que lo descrito anteriormente, el análisis del cambio en la homogeneidad química entre las matrices clásicas y sus LIMs también se realiza para las matrices DHB y nHo. En las Figuras 36 y A2.36 se resumen los resultados obtenidos para el ion $[NCT-Na]^+$ en las matrices DHB, DHB.TEAM y DHB.BAM utilizando como método de preparación de la muestra sólida: el método de capas sucesivas y el método mezcla, respectivamente. La intensidad porcentual está normalizada a la máxima intensidad obtenida para el ion diagnóstico en ambos métodos de preparación de la muestra para facilitar la comparación entre ellos. Esto mismo se muestra en las Figuras 37 y A2.37 para las matrices nHo, nHo.TEAM y nHo.BAM.

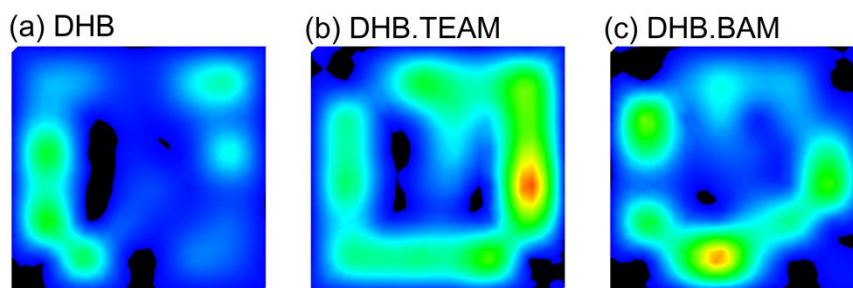


Figura 36. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) DHB, (b) DHB.TEAM y (c) DHB.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 70×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

En el caso del DHB, en la Figura 36 se observa que la presencia de una amina alifática en la matriz genera un aumento en la eficiencia del proceso de DI del analito en relación a la matriz ácida, esta observación es consistente con lo descrito anteriormente. En la comparación entre el DHB y sus LIMs con TEAM y BAM, no se observan cambios significativos en la distribución de iones del analito en la muestra, ya que en los tres casos el ion $[NCT-Na]^+$ se detecta preferentemente sobre los bordes de la muestra, de forma perimetral con algunas zonas de mayor intensidad. Si bien existe una buena correlación entre la forma de cristalización del DHB en el electrodo porta muestra (imagen óptica, Figura A2.1h) y la forma en la que se detecta a los iones del analito en la muestra (Figura 36a); esta correlación no se mantiene en los LIMs. El cambio en la cristalización de los LIMs genera pequeñas islas distribuidas aleatoriamente en toda la superficie del *spot* (Figura A2.1k y l), mientras que la imagen química de estas matrices muestra los iones del analito distribuido únicamente en la periferia de la misma (Figura 36b y c). El cambio en la forma de preparación de la muestra sólida no modifica la distribución de los iones en el *spot*, sin embargo, se observa una ligera disminución en la intensidad del ion

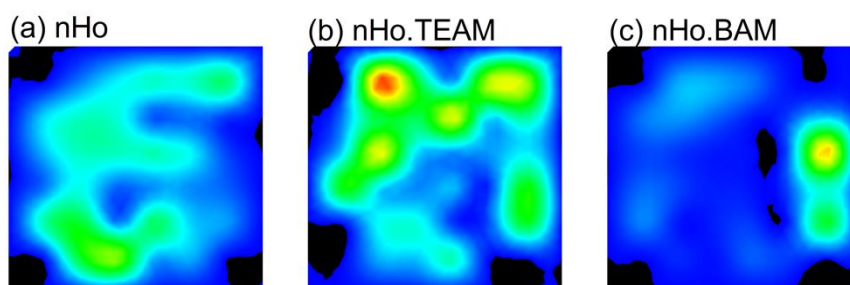


Figura 37. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) nHo, (b) nHo.TEAM y (c) nHo.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 200×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

diagnóstico de entre 25 y 35 % cuando la muestra se prepara por el método mezcla (Figura A2.36).

En el caso del nHo, se observa un ligero aumento en la intensidad del ion $[NCT-Na]^+$ en los LIMs en comparación con la matriz clásica, este aumento es de entre 10 y 30%, siendo mayor para el LIMs nHo.TEAM. En la Figura 37a se observa como el ion $[NCT-Na]^+$ en la matriz nHo se distribuye de forma aleatoria en todo el *spot*, aunque presenta zonas de mayor intensidad en los bordes de la muestra. En presencia de una amina alifática, la imagen química de la muestra cambia, mostrando una mayor producción de iones en los bordes de la muestra (Figura 37 b y c), esta distribución no es homogénea ya que de todas formas se observan puntos dulces en estos bordes. El cambio en la distribución del analito en el *spot* no se condice con el cambio en la forma de cristalización de la matriz en el electrodo porta muestra observado en la imagen óptica de la Figura A2.1d y e. En esta figura se observa que la matriz nHo cristaliza en forma agujas distribuidas en toda la superficie de la muestra, mientras que los LIMs nHo.TEAM y nHo.BAM presentan una solidificación como agujas de mucho menor tamaño distribuidos en todo el *spot* con algunas zonas de mayor acumulación. Al igual que lo descrito anteriormente para el ECHCA y el DHB, el método de preparación de la muestra no cambia de forma significativa la imagen química (distribución de la NCT) de la muestra, sin embargo, si modifica la intensidad del ion diagnóstico del analito, generando iones de menor intensidad cuando la preparación de la muestra se realiza por el método mezcla (Figura A2.37).

2.3.2.3.2 LOD y Estabilidad

Al igual que lo realizado para azúcares neutros en modo lineal positivo, se estudia el rango dinámico, el límite de detección (LOD) y la estabilidad de las matrices propuestas para analitos sulfatados en el modo negativo de análisis por espectrometría de masa. Para estos estudios se utiliza la NCT como representante de esta familia de hidratos de carbono. Con fines comparativos se estudia el cambio de estos tres parámetros con las matrices clásicas y sus LIMs conteniendo TEAM y BAM como representantes de los LIMs estudiados en este capítulo. Dados los resultados obtenidos anteriormente, el análisis de estos parámetros se realiza sobre los LIMs en relación molar ácido:amina 1:1 y utilizando como el método de preparación de la muestra sólida la técnica de capas sucesivas descrita en la parte experimental.

La Tabla 2 resume los resultados obtenidos para el LOD y el rango dinámico de la NCT con las matrices ECHCA, ESA y ZSA y sus LIMs con TEAM y BAM. Los resultados se expresan como pmol de analito depositado sobre el electrodo porta muestras. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 38 como intensidad absoluta del ion diagnóstico en función del cambio

de concentración del analito en la solución depositada sobre el electrodo porta muestras para cada una de las matrices.

Tabla 2. Límite de detección (LOD) y rango dinámico (linealidad) de NCT en modo iónico negativo. Ion monitoreado [NCT-Na]⁻

| Nº | Matriz | NCT | |
|----|------------|------------------|-----------------------------|
| | | LOD ^a | Rango dinámico ^a |
| 1 | ECHCA | 490 | 490 a 4990 |
| 2 | ECHCA.TEAM | 24,95 | 24,95 a 249,5 |
| 3 | ECHCA.BAM | 24,95 | 49,9 a 490 |
| 4 | ESA | 24,95 | 24,95 a 490 |
| 5 | ESA.TEAM | 4,99 | 4,99 a 49,9 |
| 6 | ESA.BAM | 4,99 | 24,95 a 490 |
| 7 | ZSA | 2,49 | 4,99 a 249,5 |
| 8 | ZSA.TEAM | 4,99 | 4,99 a 49,9 |
| 9 | ZSA.BAM | 24,95 | 49,9 a 490 |

^a LOD y Rango Dinámico. Indicado como pmol de analito depositado sobre el electrodo porta muestra; S/R ≥ 4.

En el caso del ECHCA, la baja eficiencia en el proceso de DI de la NCT se ve reflejado en un LOD de más de un orden de magnitud que el observado para sus LIMs ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM. Si bien en los tres casos el rango de linealidad abarca un orden de magnitud de concentraciones, los LIMs presentan un rango dinámico a concentraciones menores que el ECHCA, debido al aumento en la eficiencia de DI de la NCT (Tabla 2 entradas 1 a 3). En la Figura 38 se observa claramente la diferencia en la eficiencia de DI del analito entre la matriz ECHCA y sus LIMs, ya que para cada concentración de NCT analizada la intensidad del ion diagnóstico es mayor en los LIMs que en la matriz ácida. En el caso de las matrices ECHCA.TEAM y ECHCA.BAM a partir de los 0,9 mg/ml de NCT, la señal se vuelve insensible al aumento de la concentración del analito en la muestra. A concentraciones mayores se obtiene una intensidad prácticamente constante con una ligera tendencia a la disminución de la misma (datos no mostrados).

El mismo tipo de comportamiento se observa para las matrices ESA, ESA.TEAM y ESA.BAM, donde la mejora en la DI del analito de los LIMs frente a la matriz ácida, genera LOD más bajos que el obtenido para el ESA (Tabla 2 entradas 4 a 6). El LIM ESA.TEAM presenta un rango lineal a bajas concentraciones mientras que el ESA y ESA.BAM presentan un rango lineal a mayor concentración. Esta diferencia entre los LIMs se debe a que a bajas concentraciones el ESA.BAM genera iones de S/R > 4, bien identificables, pero el aumento de la intensidad del mismo no responde de forma lineal con el aumento de la concentración del analito en la muestra. A concentraciones mayores a 0,9 mg/mL la señal del ion diagnóstico se vuelve constante con la matriz ESA.TEAM mientras que con las matrices ESA y ESA.BAM la señal empieza a decaer

(datos no mostrados). En el caso del ZSA y sus LIMs, el cambio observado en el LOD también está relacionado con el cambio en la eficiencia de la matriz. En este caso la disminución de la intensidad de los iones con los LIMs ZSA.TEAM y ZSA.BAM con respecto al ácido ZSA, se traduce en un aumento en el LOD, siendo mayor para el LIM con BAM en un orden de magnitud más que lo observado para el ZSA (Tabla 2 entradas 8 a 9).

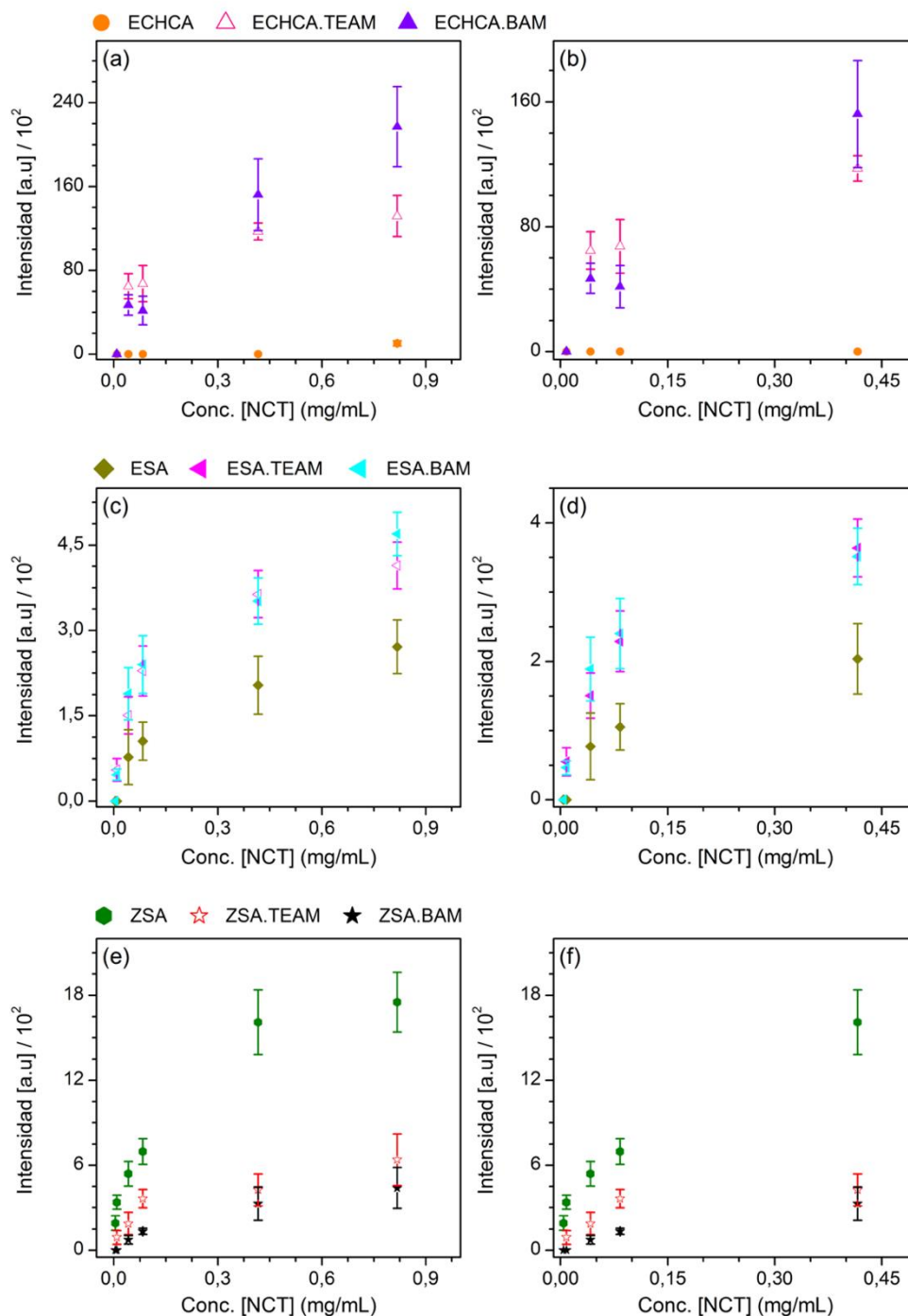


Figura 38. Intensidad absoluta vs. concentración. Analito: NCT, ion monitoreado: [NCT-Na]⁺. Matrices: (a,b) ECHA, ECHA.TEAM y ECHA.BAM, (c,d) ESA, ESA.TEAM y ESA.BAM y (e,f) ZSA, ZSA.TEAM y ZSA.BAM. Modo lineal negativo (L, -). (a,c,e) Todo el rango de concentraciones estudiado. (b,d,f) Ampliación de la región de comportamiento lineal.

En la Figura 38e se observa claramente como al aumentar la concentración de NCT en la muestra la señal se vuelve independiente de este aumento alcanzando un valor constante, cuando la concentración es mayor a 0,9 mg/mL los LIMs muestran un ligero decaimiento de la señal mientras que en el ZSA la señal sigue aproximadamente constante (datos no mostrados).

Este mismo efecto se observa en el DHB y sus LIMs, ya que el aumento en la eficiencia de DI de la NCT en estos últimos se ve reflejado en una disminución de casi un orden de magnitud en el LOD de la NCT en comparación con la matriz ácida sola (Tabla A2.2 entradas 4 a 6). El rango dinámico sufre la misma modificación, disminuyendo en casi un orden de magnitud el límite inferior de concentración, lo que genera un aumento en el rango de concentraciones donde la dependencia de la intensidad de la señal es aproximadamente lineal al aumento de concentración de la NCT en la muestra (Tabla A2.2). En la Figura A2.38 c y d se muestran estos datos y se observa que por encima de 0,9 mg/mL la señal diagnóstico en los LIMs derivados del DHB muestran un decaimiento de la señal mientras que en el DHB la señal se mantiene aproximadamente constante (datos no mostrados). En el caso del nHo y sus Lis, se observa una disminución en el LOD de casi dos órdenes de magnitud entre las matrices nHo.TEAM y nHo.BAM con respecto al nHo solo. Esto también se ve reflejado en el rango dinámico como una disminución en el límite inferior de concentraciones con respuesta lineal (Tabla A2.2 entradas 1 a 3). En la Figura A2.38a y b se observa gráficamente la dependencia de la intensidad de la señal $[NCT-Na]^+$ con la concentración del analito en la muestra, a concentraciones mayores la intensidad de la señal tiende a volverse constante independientemente del aumento de la concentración de la NCT.

La estabilidad de las matrices en modo lineal negativo se estudió de forma comparativa entre las matrices y sus LIMs. El objetivo de este análisis es evaluar como varía la intensidad de la señal diagnóstico en sucesivos disparos (*shots*) en un punto fijo de la muestra. En las Figuras 39, 40 y A2.39 se grafican los resultados obtenidos como intensidad del ion $[NCT-Na]^+$ en función del número total de *shots* aplicados para las matrices ECHCA, ESA, ZSA, nHo y DHB en comparación con sus LIMs con TEAM y BAM respectivamente.

En el caso del ECHCA, la baja eficiencia en la desorción y ionización de la NCT, en estas condiciones experimentales, no nos permite realizar un análisis de la estabilidad de la matriz. El LIM ECHCA.BAM presenta una mayor estabilidad de la señal que la matriz ECHCA.TEAM, la cual decae a un 50% de la intensidad inicial entre los 40 y 50 disparos, mientras que la señal con la matriz ECHCA.BAM alcanza este valor a los 60 disparos. Sin embargo, a partir de los 90 *shots* la señal tiende a alcanzar un valor ligeramente constante e igual para ambas matrices (Figura 39).

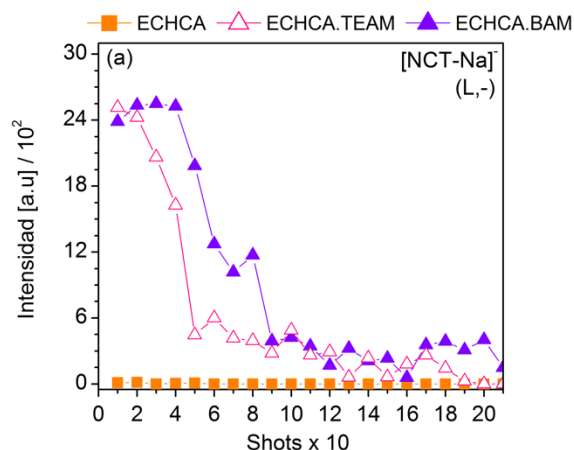


Figura 39. Estabilidad de las matrices. Intensidad del ion monitoreado vs. Número de disparos (*shots*). Analito: NCT, Ion monitoreado: $[NCT-Na]^+$. Matrices: ECHCA (■), ECHCA.TEAM (△) y ECHCA.BAM (▲). Modo lineal negativo (L, -).

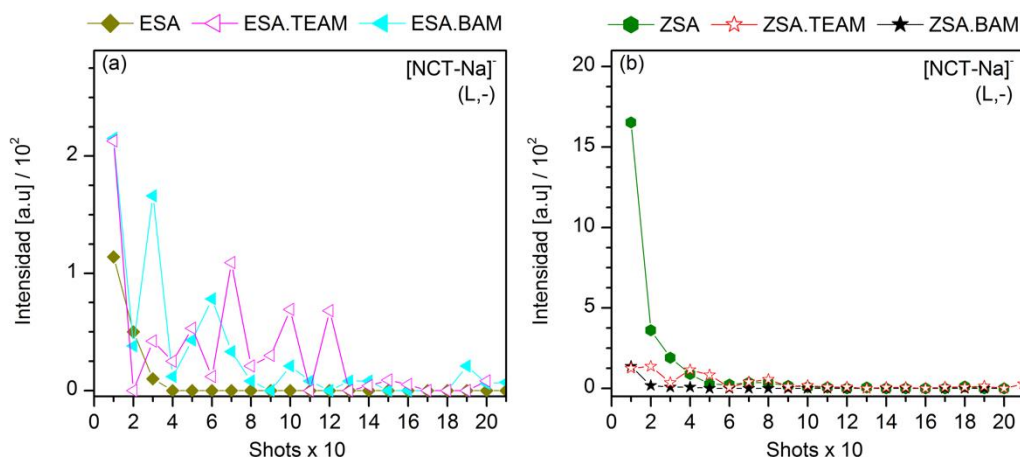


Figura 40. Estabilidad de las matrices. Intensidad del ion monitoreado vs. Número de disparos (*shots*). Analito: NCT, Ion monitoreado: $[NCT-Na]^+$. Matrices: (a) ESA (◆), ESA.TEAM (△), ESA.BAM (▲) y (b) ZSA (●), ZSA.TEAM (☆), ZSA.BAM (★). Modo lineal negativo (L, -).

El ESA presenta un decaimiento abrupto de la señal en los primeros 30 disparos y tiende a cero a partir de los 40. Mientras que los LIMs derivados del mismo presentan un comportamiento distinto, ya que en *shots* sucesivos la señal aumenta y disminuye, este comportamiento se mantiene hasta los 160 disparos aproximadamente (Figura 40a). Si bien con los sucesivos disparos la intensidad máxima que alcanza la señal va disminuyendo, siempre se mantiene por encima de la intensidad obtenida con el ESA, esto hace que, en la sumatoria de 200 disparos, los LIMs produzcan una mayor intensidad del ion diagnóstico que el ESA. El ZSA tiene un comportamiento similar al ESA, con una caída muy abrupta de la señal en los primeros 10 a 20 *shots*, tendiendo a cero a partir de los 40, sin embargo, la intensidad del ion es alta

comparada con la obtenida para el ESA o los LIMs derivados del ZSA. El LIM ZSA.BAM presenta una muy baja intensidad de señal que decae rápidamente a cero, mientras que con la matriz ZSA.TEAM la intensidad es baja, pero se mantienen ligeramente estable hasta los 60 *shots* donde luego cae a cero. A pesar de este comportamiento en la sumatoria global de 200 *shots* la intensidad del ion resulta mucho mayor para el ZSA que para sus LIMs (Figura 40b).

En la Figura A2.39a vemos que tanto el nHo como la matriz nHo.TEAM presentan una velocidad de decaimiento similar alcanzando un valor del 50% de la intensidad inicial entre los 40 y los 50 disparos. A pesar de esto, el nHo.TEAM entra en una zona de intensidad aproximadamente constante con una ligera tendencia a la disminución a partir de los 60 disparos mientras que el nHo empieza a tender a cero rápidamente. Por el contrario, el nHo.BAM tiene una velocidad de decaimiento muy baja, donde la intensidad del ion permanece prácticamente constante en los *shots* sucesivos en el rango estudiado, lo que demuestra la gran estabilidad de la misma. Por el contrario, el DHB presenta una mejor estabilidad que sus LIMs. Si bien la intensidad de la señal diagnóstico con el DHB es baja, esta permanece prácticamente constante con una ligera tendencia a la disminución con los sucesivos *shots*, mientras que los LIMs presentan una muy alta intensidad en los primeros disparos y luego la señal cae rápidamente a cero (Figura A2.39b). Esto da como resultado global, en la suma de 200 *shots*, que los LIMs DHB.TEAM y DHB.BAM producen una intensidad ligeramente mayor que el DHB, aunque este último sea más estable.

2.3.2.4 Mezclas de matrices E/Z

Dada la experiencia previa en nuestro grupo de investigación^{6,7}, y los ejemplos estudiados en este capítulo, puede decirse que los ácidos Z-cinámicos siempre han demostrado un mejor desempeño como matriz MALDI para el estudio de hidratos de carbono que el correspondiente isómero *E*. Sin embargo, en el caso del ECHCA y de los análogos halogenados E-4ClCHCA y E-4FCHCA no ha sido posible, en el marco de este trabajo, analizar la eficiencia como matriz MALDI de los isómeros ZCHCA, Z-4ClCHCA y Z-4FCHCA en comparación con los correspondientes ácidos *E*. Esto se debe a la dificultad de separar el isómero *Z* del *E*, ya sea por el método descrito por Salum y col.⁴⁹ o por otras técnicas cromatográficas. La fácil conversión térmica de las formas *Z*- a las *E*-, tanto de los ácidos libres como de sus respectivos LI, sería la principal causa de esta dificultad.

Por otro lado, ha sido estudiado por nuestro grupo de investigación el cambio en la eficiencia de DI entre las matrices ácidas *E* y *Z*-cinámicos, individualmente y como parte de mezclas conteniendo ambos isómeros *E* + *Z*, ya sean mezclas pre preparadas con los compuestos

puros o por fotoisomerización en solución del isómero E, hasta alcanzar mezclas aproximadamente 1:1 $E+Z$ ⁶⁵. Estos estudios llegaron a la conclusión de que el aumento en la eficiencia en la DI en EM MALDI, tanto de analitos neutros como sulfatados, dependen de la presencia del isómero Z-cinámico en la matriz mezcla. Si bien el ZSA ha demostrado ser mejor matriz que el ESA, las mezclas ESA + ZSA muestran un comportamiento muy similar al ZSA. Conclusiones similares se obtuvieron utilizando otros ácidos cinámicos como matrices (CUM, FE, etc.)⁶⁵. En base a esta experiencia, se decide evaluar el cambio en la eficiencia en el proceso de DI de los isómeros Z del CHCA, 4ClCHCA y 4FCHCA de forma indirecta. Para ello se evalúa de forma comparativa como cambia la intensidad de un ion diagnóstico entre la matriz E y una matriz mezcla compuesta por ambos isómeros ($E+Z$) para cada uno de los ácidos. En este caso las mezclas $E+Z$ se obtienen por fotoisomerización en solución del isómero E, comercialmente disponible, como se detalla en la parte experimental 2.2.1.

En la Figura 41 se muestran los resultados obtenidos como imágenes MALDI de la β CD y la NCT con las matrices ECHCA y en la mezcla E/Z-ECHCA utilizando el método sándwich de preparación de la muestra sólida. El mapeo químico superficial se realiza censando los iones en modo lineal positivo [β CD+Na]⁺ y en lineal negativo [NCT-Na]⁻ en distintos puntos de la muestra. Estos resultados nos permiten analizar tanto el cambio en la intensidad del ion diagnóstico, como el cambio en la distribución del mismo en la muestra cuando en la matriz está presente el isómero Z. Como podemos ver en esta figura, la presencia del isómero ZCHCA en la matriz mezcla E/Z-CHCA genera un aumento en la eficiencia de DI de 36% en la β CD y 47% para la NCT, en relación con lo obtenido con la matriz clásica ECHCA. Esto indicaría que el ácido ZCHCA presenta un mejor desempeño como matriz para el estudio de estos hidratos de carbono que su isómero E, lo cual en la mezcla se evidencia como un aumento en la intensidad del ion diagnóstico. Si bien no hay un cambio muy significativo en la distribución del ion diagnóstico entre la matriz ECHCA y la mezcla de ambos isómeros, se observa una ligera tendencia a una mayor producción del mismo en los bordes del *spot* cuando el isómero ZCHCA está presente en la matriz (Figura 41b y d); este cambio en la distribución de iones es consistente con el cambio observado entre las matrices ESA y ZSA (Figuras 18a, 19a, 34a y 35a).

El mismo tipo de experimento descrito anteriormente para la β CD se realiza utilizando los análogos halogenados del ECHCA. En la Figura 42 se muestran los resultados obtenidos para el ion [β CD+Na]⁺ utilizando las matrices E-4ClCHCA y E-4FCHCA y las mezclas $E+Z$ de cada uno de ellos obtenidos por fotoisomerización en solución de la matriz comercial. A diferencia de los descrito anteriormente, la presencia del isómero Z en las matrices mezclas de ambos compuestos halogenados no presenta una mejora en la eficiencia de DI de la β CD en

estas condiciones experimentales, por el contrario, se observa una disminución de entre 20 y 30% de la intensidad del ion diagnóstico cuando se utiliza la matriz *E+Z* en comparación con lo obtenido con el isómero *E* solo. En este caso no se observa un cambio significativo o una tendencia en el cambio de la distribución del ion del analito en el *spot* al pasar de la matriz *E* sola a la mezcla de ambos isómeros.

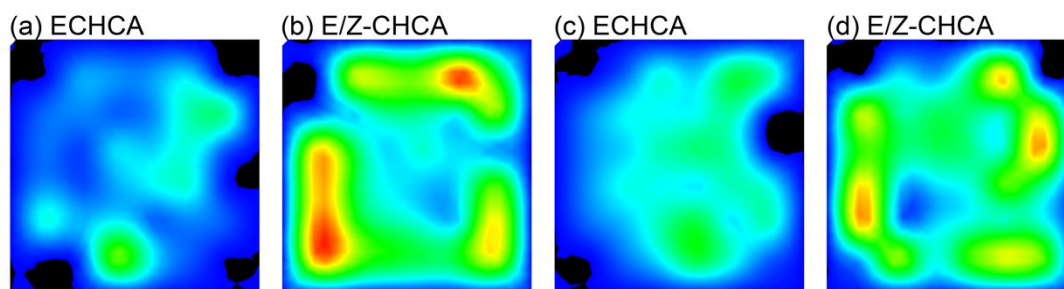


Figura 41. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). (a-b) Ion monitoreado: $[M+Na]^+$, analito: β CD, modo de análisis lineal positivo. (c-d) Ion monitoreado: $[M-Na]^-$, analito: NCT, modo de análisis lineal negativo. Matrices: (a,c) ECHCA, (b,d) E/Z-CHCA. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 192×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

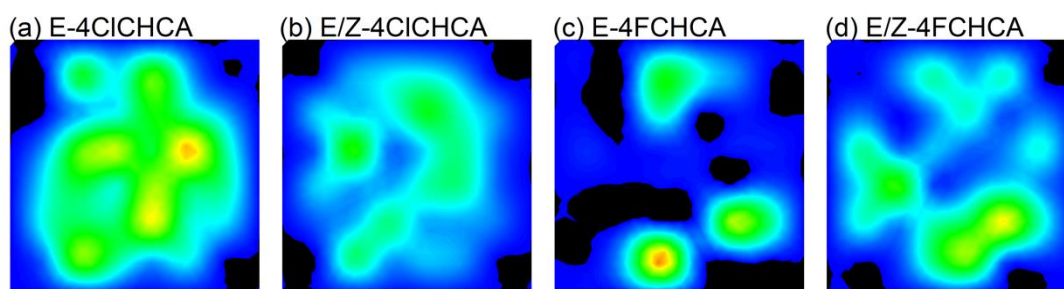


Figura 42. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) E-4ClCHCA, (b) E/Z-4ClCHCA, (c) E-4FCHCA y (d) E/Z-4FCHCA. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 11×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

2.4 CONCLUSIONES

Los LIMs propuestos en este capítulo, derivados de las matrices ácidas ECHCA, ESA y ZSA sufren un corrimiento hipsocrómico en sus espectros de absorción UV-Visible en solución metanólica en comparación con la absorbancia del ácido solo, producto de la formación del anión carboxilato (condiciones de Beer-Lambert). Este corrimiento de la longitud de onda del máximo de absorción, va acompañado de una disminución del coeficiente de absorptividad molar a 355 nm de los LIMs en comparación con los cromóforos que lo componen. Sin embargo, en

todos los casos la absorptividad molar a 355 es distinta de cero, siguiendo el orden: $\epsilon_{\text{ECHCA}} > \epsilon_{\text{ECHCA.Am}} > \epsilon_{\text{ESA}} > \epsilon_{\text{ESA.Am}} > \epsilon_{\text{ZSA}} > \epsilon_{\text{ZSA.Am}}$.

El mismo tipo de comportamiento se observa en los espectros de reflectancia difusa, donde el LI presenta un corrimiento del espectro de absorción hacia menores longitudes de onda en comparación con el ácido constituyente. A pesar de esto tanto los LIs derivados del ECHCA como del ESA presentan buena absorción a 355 nm. Sin embargo, el corrimiento hipsocrómico del LI derivado del ZSA es mayor que en los otros LI lo que produce una disminución significativa de la absorbancia del sólido. La diferencia en el porcentaje de reflectancia entre el ECHCA y sus LIs y entre el ESA y su LI es de entre 2 y 3%, mientras que para el ZSA y su LI esta diferencia es de 23%. Esta pérdida de absorbancia a 355nm del LI ZSA.BAM podría ser una de las causas de la disminución en la eficiencia en el proceso de DI de los analitos estudiados.

Los espectros LDI de los LI de tipo ácido:amina, independientemente de la amina que se utilice como contra ion, no generan necesariamente espectros de masa limpios de ruido de fondo en todo el rango de análisis. Lo que se observa en el rango de m/z 0 a 500 en modo lineal positivo, en general, es una disminución de la intensidad de los iones propios del ácido, tanto del ion molecular protonado $[M+H]^+$ como del producto de deshidratación del mismo. En algunos casos, dependiendo del LI, se observa la aparición del ion correspondiente a la amina protonada y algunos otros iones no identificados propios de la matriz. En particular los LIMs derivados del ZSA, en estas condiciones experimentales, generan espectros de masa completamente limpios de ruido de fondo. En todos los casos, el aumento de la proporción de amina en el LI (ácido:amina 1:2) hace que la disminución de los iones característicos del ácido sea aún mayor, generando en algunos casos la desaparición completa de los mismos, mientras que se observa un aumento de la intensidad del ion protonado de la amina y las otras señales propias del LI.

En rango de m/z mayores (500 a 1500) no hay una tendencia generalizada de cómo cambia el espectro LDI de los LIMs en comparación con la del ácido solo. En algunos casos no se observan cambios, en otros casos se observan un aumento de la intensidad de las señales o una disminución de las señales propias del ácido y/o la aparición de nuevos iones. Este tipo de observaciones es difícil de analizar debido a la naturaleza incógnita de los iones que aparecen en este rango de m/z .

En modo lineal negativo los ácidos ECHCA y DHB en presencia de una amina no presentan cambios significativos en el espectro LDI en el rango de m/z de 0 a 500, mientras que

a rangos mayores se observa una disminución de los iones propios del ácido. En cambio, los LIMs derivados de los ácidos ESA y ZSA si presentan una disminución de los iones propios del ácido en el rango de m/z de 0 a 500, generando espectros de masa con menor ruido que el espectro de masa del correspondiente ácido.

En ningún caso, de todos los estudiados, se observan iones de tipo ácido+amina que muestre la presencia del LI intacto en fase gaseosa. Este tipo de comportamiento puede explicarse dado el carácter completamente iónico de estas matrices. En solución el equilibrio ácido-base genera una alta concentración de las especies iónicas que dan lugar a la matriz de tipo líquido iónico, estos iones que permanecen como tal en estado sólido al producirse el proceso de ablación láser son separados entre si por el campo eléctrico en la cámara de ionización que direcciona los iones al analizador dada su carga y el modo de operación del equipo en el momento del análisis. El carácter iónico de estas matrices también explica la disminución de la intensidad en modo lineal positivo de las señales propias de la matriz ácida ($[M+H]^+$ y $[M-H_2O+H]^+$) en presencia de una base. Nuevamente, la formación del LI genera la disminución en la muestra sólida de la especie neutra del ácido, especie a partir de la cual se ionizaría para dar el ion molecular del ácido protonado $[M+H]^+$ en el proceso de DI. Este efecto se ve exacerbado al aumentar la proporción de amina en el LI lo que genera un desplazamiento del equilibrio ácido-base hacia la formación de la base conjugada del ácido, generando en casi todos los casos estudiados una desaparición total de las señales propias de la matriz ácida. El caso extremo que se observa para los LIMs derivados del ZSA, generando espectros de masa limpios de ruido de fondo, puede deberse también a una menor absorbancia de estos LIMs a 355 nm en comparación con el ácido solo o con los LIMs derivados del isómero *E*. Sin embargo, el carácter iónico de estas matrices, no permitiría explicar las observaciones sobre los LDI en modo lineal negativo, ya que uno esperaría que se produzca un aumento de las señales propias del ácido. Sin embargo desde el punto de vista de su aplicación como matrices MALDI, este resultado es muy importante ya que tornan a este modo de análisis como de mayor utilidad para analitos de LMW.

Por otro lado, los espectros LDI del nHo y sus LIMs no presentan este mismo comportamiento, ya que en ningún caso la presencia de una amina en la matriz genera un cambio significativo en la intensidad de los iones propios del nHo ni en el número de iones presentes en el espectro. Esta observación puede explicarse debido al carácter no iónico de esta matriz donde el nHo actúa como un ácido muy débil.

Los estudios comparativos sobre la eficiencia en el proceso de DI de hidratos de carbono neutros de bajo peso molecular, entre las matrices clásicas y los LIMs que las contienen,

en el modo iónico positivo de análisis, conducen a las siguientes observaciones: (i) los LIMs derivados de las matrices ECHCA, ESA y nHo presentan una mejora en la eficiencia de DI de los hidratos de carbono estudiados en comparación con la matriz clásica, siendo mayor las diferencias observadas entre el ECHCA y sus LIMs. (ii) El aumento de la concentración de la amina en el LIMs no genera un cambio significativo en la intensidad del ion diagnóstico en comparación con los LIMs en relación molar 1:1, sin embargo, se observa en algunos casos una ligera tendencia a la disminución global de la intensidad del espectro de masa obtenido cuando se utilizan LIMs en relación molar 1:2. (iii) Los LIMs derivados del ZSA presentan una disminución en la eficiencia de DI de estos analitos en relación a la matriz ácida sola. (iv) Los efectos contrapuestos en la eficiencia de DI observados en los LIMs derivados del ESA y ZSA, genera espectros de masa con iones diagnósticos en el mismo orden de magnitud independientemente del cromóforo que componga al LIM. El mismo tipo de comportamiento se observa también en otros pares de isómeros *E* y *Z* de ácidos cinámicos utilizados como componentes de LIMs (*E* y ZFE y *E* y ZCUM). (v) los LIMs derivados del DHB, a diferencia del resto de las matrices descriptas, no presentan un único comportamiento, para la β CD algunos LIMs no presentan diferencias significativas o tienden a disminuir la eficiencia en el proceso de DI en comparación con el DHB solo. Sin embargo, para la M7 se observa un ligero aumento en la eficiencia de DI en los LIMs. (vi) En algunos casos se observan diferencias significativas en el valor de intensidad del ion diagnóstico en los distintos LIMs estudiados, sin embargo, no existe una relación clara entre el cambio en el proceso de DI, ni en la magnitud de ese cambio, con la naturaleza de la amina que se utilice como contraión. A pesar de esto, llama la atención que en algunos casos se ha observado que los LIMs formados con TBAM como contraión (ECHCA.TBAM, DHB.TBAM, EFE.TBAM, ZFE.TBAM, ECUM.TBAM y ZCUM.TBAM) generan una muy marcada disminución en la intensidad del ion diagnóstico que rompe con la tendencia observada en el resto de los LIMs (ESA.TBAM, ZSA.TBAM y nHo.TBAM).

La mejora generalizada como matriz MALDI del ECHCA.amina, ESA.amina y nHo.amina para el análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular en comparación con las matrices clásicas solas, probablemente se debe al contacto estrecho entre la matriz y la amina, lo que genera una nueva estructura cromofórica con propiedades físico-químicas más apropiadas para el rol de matriz MALDI. Para las matrices ácidas ECHCA y ESA y las aminas alifáticas utilizadas, esta nueva unidad cromofórica puede ser descripta, dadas sus propiedades ácido-base, como la especie iónica $[\text{Ácido-H}]^- \cdot [\text{Amina+H}]^+$. El comportamiento diferenciado de los LIs ácido.TBAM, con respecto al resto de los LIs, puede deberse al grado de empaquetamiento de la red cristalina. En los ácidos ECHCA, DHB, *E*/ZFE y *E*/ZCUM, al tener un menor volumen molecular presentarían

un empaquetamiento del sólido más compacto y por lo tanto la forma en que se acomodarían los iones en la red estaría más restringida, esto evitaría el contacto estrecho entre la matriz y la TBAM, una amina voluminosa. En el caso del E/ZSA, el empaquetamiento del sólido estaría más expandido debido a la presencia de ambos grupos metoxilo en el anillo aromático, lo que permitiría el contacto estrecho entre ambas unidades (catión.anión) y por lo tanto se observa un comportamiento común independientemente de la amina.

En el caso del nHo, la baja acidez que presenta ($pK_{aH_2O} = 14,5^{40,58,66}$) hace imposible la formación de la matriz iónica en estado fundamental en presencia de una amina alifática, por lo que se podría pensar el contacto estrecho entre el nHo y la amina como una estructura supramolecular con interacciones no covalentes, en especial la formación de puentes de hidrógeno. El gran aumento de la acidez del nHo en el estado electrónico excitado ($pK_{aH_2O}^* = 7,7^{40,66}$), hace que la estructura iónica de tipo $[nHo-H]^- \cdot [Amina+H]^+$ pueda darse luego de la absorción de la radiación láser en el proceso MALDI, por lo que es consistente no observar en el espectro LDI de estas matrices clústeres de tipo $[nHo+amina+H]^+$.

En el caso particular de las matrices ZSA.amina, esta nueva unidad cromofórica de carácter iónico puede formarse, pero en este caso las propiedades físico-químicas no son las apropiadas para el rol de matriz. En particular la disminución de la absorbancia en solución como en fase sólida de estos LI en comparación con la matriz ácida, está de acuerdo con que se observe una disminución en la eficiencia de DI del analito.

Dadas las propiedades ácido-base del DHB y las aminas alifáticas, el nuevo cromóforo puede ser planteado como una especie de carácter iónico al igual que las matrices ECHCA.amina y ESA.amina. Sin embargo, llama la atención el efecto contrapuesto en la eficiencia de DI observado en los LIMs derivados del DHB dependiendo del azúcar que se analice. Esto puede deberse a que el proceso de DI en MALDI no está condicionado únicamente por las propiedades físico-químicas de la matriz, sino también por las interacciones entre la matriz y el analito en estudio⁶⁰. De esto deriva que, interacciones desfavorables entre los LI derivados del DHB y la β CD sean las causas de la tendencia a disminuir la eficiencia en el proceso de DI en comparación con la matriz ácida sola, rompiendo así con la creencia y tendencia observada que los LIMs funcionan generalmente como mejor matriz que las matrices clásicas.

Por otro lado, el hecho de que las aminas alifáticas constituyentes de estos LI no interaccionen directamente con la radiación del láser en el proceso de DI en MALDI, podría ser la razón de porqué, el cambio y la magnitud de este cambio en la eficiencia de DI de la matriz no se relacione directamente con la naturaleza de la amina que se utiliza.

Una de las ventajas descripta en la literatura de los LIMs en comparación con las matrices clásicas ha sido la mejora en la homogeneidad de la muestra sólida para ser analizada por EM MALDI⁸, refiriéndose a la homogeneidad visual u óptica. El análisis del mapeo químico superficial por MALDI nos permite analizar el cambio en la distribución del analito en las distintas matrices y relacionar esto con el cambio en la solidificación observada ópticamente de las muestras sólidas. Los estudios desarrollados en este capítulo han demostrado claramente que no existe una correlación directa entre el cambio en la homogeneidad óptica de la matriz con el cambio en la distribución del analito en la muestra sólida. En ninguno de los LIMs analizados se observa una mejora en la homogeneidad química de la muestra en relación a lo obtenido con la matriz sola. En todas las matrices estudiadas se detectaron zonas de mayor producción de iones del analito en la muestra (puntos dulces o *sweet spots*). La forma de distribución del analito en la muestra es característico de cada matriz y no necesariamente se relaciona con la forma de cristalización macroscópica de la misma. En algunos casos el aumento de la homogeneidad óptica observada, por ejemplo, en los LIMs derivados del ESA y ZSA que tienen el aspecto de una solución sólida a nivel macroscópico, no se ve reflejado en el mapeo químico superficial de ninguno de los analitos estudiados.

Por otro lado, se observa que el método de preparación de la muestra no modifica de forma significativa la forma de distribución de iones del analito en la muestra sólida. Esto puede deberse a que, tanto en el método de capas sucesivas como en el método mezcla, al agregar alícuotas de cada una de las soluciones (matriz, analito o matriz+analito) dejando evaporar el solvente entre alícuotas sucesivas, produce una disolución parcial del sólido previamente depositado sobre el electrodo. Esto genera, que independientemente del método de preparación de la muestra sólida, siempre hay una única solución que incluye todas las alícuotas agregadas, desde donde se evapora el solvente en condiciones normales de presión y temperatura para dar la muestra sólida. De esto deriva que la solidificación de la muestra analito-matriz o la co-cristalización de ambos depende únicamente de las interacciones entre ellos y seguramente de las condiciones ambientales de evaporación del solvente.

Un hecho experimental que llama nuestra atención es la diferencia en la intensidad obtenida para el ion diagnóstico entre ambos métodos de preparación de la muestra sólida en las matrices ECHCA, DHB, nHo y sus LIMs. Estas matrices presentan una disminución de la señal correspondiente al ion diagnóstico de entre 50 y 25% cuando la muestra sólida se prepara según el método mezcla. Este comportamiento no es generalizado ya que, en el caso de las matrices ESA, ZSA y sus LIMs no se observan diferencias significativas en cuanto a la intensidad absoluta de la señal con ambos métodos de preparación de la muestra.

Por su parte, las matrices halogenadas E-4ClCHCA y E-4FCHCA no siguen la misma tendencia en el cambio en la eficiencia de DI de los analitos que lo observado en su análogo ECHCA, tanto como pertenecientes a un LIMs como en las mezclas E/Z obtenidas por fotoisomerización en solución. Esto puede deberse a la conocida foto-reactividad de los compuestos halo-aromáticos, que en el estado electrónico excitado pueden mediante ruptura homolítica y especialmente heterolítica de la unión Ar-X dar lugar a reacciones de sustitución nucleofílica tanto con grupos amina en el caso de LIMs, como con los hidroxilos de los analitos⁶⁷. Esta vía de desactivación competiría con la vía característica de los procesos MALDI.

El estudio de hidratos de carbono sulfatados en el modo negativo de análisis con las matrices clásicas y los LIMs derivadas de estas, lleva a las mismas conclusiones descriptas anteriormente. Sin embargo, presentan algunas particularidades propias del caso. La naturaleza lábil de los grupos sulfatos permite una alta descomposición en la fuente de ionización (ISD) de estos azúcares (fragmentación). Si bien en algunos casos los LIMs ECHCA.amina, ESA.amina y ZSA.amina se comportan como una matriz más caliente que la matriz clásica sola, la ISD no se vuelve un factor negativo de estas matrices, es decir, que el porcentaje de descomposición en la fuente sigue siendo bajo. En particular, los LIMs con TBAM como contraíón no presentan el mismo tipo de comportamiento que el resto de los LIMs propuestos en este capítulo, ya que producen una descomposición importante de estos azúcares en la fuente, lo que genera una desventaja de esta matriz con respecto a las matrices clásicas. Por el contrario, la matriz nHo en presencia de una amina alifática, cualquiera de ellas, produce una menor descomposición de estos azúcares, haciendo que estas matrices se comporten como más frías que el nHo solo. Esto confiere una gran ventaja en las matrices de tipo nHo.amina, ya que no solo se observa una mejora en la eficiencia de DI de estos analitos, sino que también, se observa una menor descomposición de los mismos.

Otra particularidad de estos analitos es la formación del clúster de tipo [NCT+amina-H₂O-Na]⁻, donde la amina involucrada pertenece a la matriz LI que se utilice para el análisis. Este tipo de clúster se observa con los LIMs con las aminas EOHAM, BAM y BOHAM. En los dos primeros casos la formación de este clúster es poco importante, generando iones de muy baja intensidad, mientras que en el caso de los LIMs con BOHAM la formación de este complejo se vería favorecido generando iones muy intensos. El hecho de aumentar la relación molar de amina en el LIMs genera un aumento significativo de estos complejos azúcar+amina, que en algunos casos produce la desaparición completa del ion molecular del analito. Estas particularidades del analito dificultan su análisis, ya que, tanto la fragmentación en la fuente como la formación de complejos analito-matriz producen una disminución en la intensidad del

ion diagnóstico utilizado para el análisis comparativo de la eficiencia en la DI del analito por cada matriz.

Los resultados de este capítulo, además, permiten reafirmar y profundizar los conocimientos desarrollados en nuestro grupo de investigación en relación a la eficiencia y aplicaciones de los estereoisómeros de los ácidos cinámicos como matrices MALDI en el estudio de hidratos de carbono de bajo peso molecular. De esto surge, además de la ya descrita mejora en la eficiencia en el proceso de DI de los isómeros *Z* en comparación con los *E* de los ácidos sinapínico, cumárico y ferúlico, que el isómero ZCHCA también genera este efecto, mejorando la intensidad del espectro MALDI de los azúcares estudiados. Si bien la matriz ZCHCA no pudo ser aislada, su aplicabilidad y eficiencia pudo ser evaluada como parte de una mezcla *E/Z*-CHCA generada por fotoisomerización en solución del isómero *E*. Asimismo, el cambio en la geometría de la matriz entre el ESA y ZSA, genera un cambio muy marcado en la forma de distribución del analito en la muestra, que se condice con el cambio de cristalización de la matriz en el electrodo porta muestra (imagen óptica). Esto refuerza la idea de que la forma de distribución del analito en la muestra depende del tipo de interacciones entre la matriz y el analito. Si bien el ESA y ZSA tiene el mismo número y tipo de grupos funcionales, el cambio en la orientación espacial de los mismos genera una interacción diferenciada con el analito y por lo tanto una eficiencia como matriz y una distribución en la muestra diferente.

2.5 REFERENCIAS

- 1 R. C. Beavis, T. Chaudhary and B. T. Chait, *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 156–158.
- 2 R. C. Beavist and B. T. Chait, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989, **3**, 432–435.
- 3 T. W. Jaskolla, W. D. Lehmann and M. Karas, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 12200–12205.
- 4 R. Cramer, *Advances in MALDI and Laser-Induced Soft Ionization Mass Spectrometry*, Springer, Switzerland, 2016th Edi., 2016.
- 5 S. Tambe, H. Blott, A. Fülöp, N. Spang, D. Flottmann, S. Bräse, C. Hopf and H. D. Junker, *Anal Bioanal Chem*, 2017, **409**, 1569–1580.
- 6 M. L. Salum, L. M. Itovich and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, **48**, 1160–1169.

- 7 M. L. Salum, S. L. Giudicessi, T. Schmidt De León, S. A. Camperi and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2017, **52**, 182-186.
- 8 D. W. Armstrong, L. K. Zhang, L. He and M. L. Gross, *Anal Chem*, 2001, **73**, 3679–3686.
- 9 V. S. Kumar Kolli and R. Orlando, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, **10**, 923–926.
- 10 J. A. Crank and D. W. Armstrong, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, **20**, 1790–1800.
- 11 A. Tholey and E. Heinzle, *Anal Bioanal Chem*, 2006, **386**, 24–37.
- 12 P. Kobylis, P. Stepnowski and M. Caban, *Microchemical Journal*, 2021, **164**, 105983.
- 13 Y. Fukuyama, in *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology*, S. Handy (ed.), *Liquid Matrices in MALDI-MS*. Cap. 17, p. 361-374. INTECH, Croatia. 2011.
- 14 X. Zhao, S. Shen, D. Wu, P. Cai and Y. Pan, *Anal Chim Acta*, 2017, **985**, 114–120.
- 15 P. Kobylis, P. Stepnowski and M. Caban, *Microchemical Journal*, 2021, **164**, 105983.
- 16 P. Kobylis, H. Lis, P. Stepnowski and M. Caban, *J Mol Liq*, 2019, **284**, 328–342.
- 17 P. Kobylis, M. Kasprzyk, A. Nowacki and M. Caban, *J Mol Liq*, 2022, **349**, 118106.
- 18 C. D. Calvano, A. Monopoli, T. R. I. Cataldi and F. Palmisano, *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**, 4015–4038.
- 19 Z. Qiao and F. Lissel, *Chem Asian J*, 2021, 868–878.
- 20 M. Persike, M. Zimmermann, J. Klein and M. Karas, *Anal Chem*, 2010, **82**, 922–929.
- 21 S. I. Snovida and H. Perreault, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21**, 3711–3715.
- 22 Y.-H. Lai and Y.-S. Wang, *Mass Spectrometry*, 2017, **6**, S0072–S0072.
- 23 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 2021, 1–158.
- 24 Y. Gholipour, H. Nonami and R. Erra-Balsells, *Anal Biochem*, 2008, **383**, 159–167.
- 25 Y. Gholipour, S. L. Giudicessi, H. Nonami and R. Erra-Balsells, *Anal Chem*, 2010, **82**, 5518–5526.
- 26 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 1999, **18**, 349–450.
- 27 Y. Fukuyama, S. Nakaya, Y. Yamazaki and K. Tanaka, *Anal Chem*, 2008, **80**, 2171–2179.
- 28 H. N. Abdelhamid, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2017, **89**, 68–98.

- 29 X. Zhao, S. Shen, D. Wu, P. Cai and Y. Pan, *Anal Chim Acta*, 2017, **985**, 114–120.
- 30 X. L. Pei, Y. Y. Huang, C. Gong and X. Xu, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, **45**, 1155–1163.
- 31 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 2012, **31**, 183–311.
- 32 Y. Dai, R. M. Whittall, C. A. Bridges, Y. Isogai, O. Hindsgaul and L. Li, *Carbohydr Res*, 1997, **304**, 1–9.
- 33 Y. Fukuyama, M. Ciancia, H. Nonami, A. S. Cerezo, R. Erra-Balsells and M. C. Matulewicz, *Carbohydr Res*, 2002, **337**, 1553–1562.
- 34 H. Nonami, K. Tanaka, Y. Fukuyama and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**, 285–296.
- 35 H. Nonami, S. Fukui and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, **32**, 287–296.
- 36 M. E. Monge, M. R. Negri, A. A. Kolender and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21**, 2638–2646.
- 37 M. Barboza, V. G. Duschak, Y. Fukuyama, H. Nonami, R. Erra-Balsells, J. J. Cazzulo and A. S. Couto, *FEBS Journal*, 2005, **272**, 3803–3815.
- 38 M. Landoni, V. G. Duschak, V. J. Peres, H. Nonami, R. Erra-Balsells, A. M. Katzin and A. S. Couto, *Mol Biochem Parasitol*, 2007, **154**, 22–29.
- 39 A. C. Casabuono, A. D’Antuono, Y. Sato, H. Nonami, R. Ugalde, V. Lepek, R. Erra-Balsells and A. S. Couto, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, **20**, 2175–2182.
- 40 R. Erra-Balsells and H. Nonami, *Environment Control in Biology*, 2002, **40**, 55–73.
- 41 E. M. Rustoy, Y. Sato, H. Nonami, R. Erra-Balsells and A. Baldessari, *Polymer (Guildf)*, 2007, **48**, 1517–1525.
- 42 M. R. L. Paine, B. L. J. Poad, G. B. Eijkel, D. L. Marshall, S. J. Blanksby, R. M. A. Heeren and S. R. Ellis, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2018, **57**, 10530–10534.
- 43 F. P. Y. Barré, B. S. R. Claes, F. Dewez, C. Peutz-Kootstra, H. F. Munch-Petersen, K. Grønbæk, A. H. Lund, R. M. A. Heeren, C. Côme and B. Cillero-Pastor, *Anal Chem*, 2018, **90**, 14198–14206.
- 44 H. Yang, S. N. Jackson, A. S. Woods, D. R. Goodlett, R. K. Ernst and A. J. Scott, *J Am Soc Mass Spectrom*, , DOI:10.1021/jasms.0c00201.

- 45 M. C. Biondic and R. Erra-Balsells, *J Photochem Photobiol A Chem*, 1990, **51**, 341–353.
- 46 Bhawna, D. Dhingra, A. Pandey and S. Pandey, *J Photochem Photobiol A Chem*, 2021, **406**, 112991.
- 47 T. F. Vert, Z. Sanchez and O. A. Torrent, *Journal of Photochemistry*, 1983, **23**, 355–368.
- 48 M. W. Towers, J. E. McKendrick and R. Cramer, *J Proteome Res*, 2010, **9**, 1931–1940.
- 49 M. L. Salum, C. J. Robles and R. Erra-Balsells, *Org Lett*, 2010, **12**, 4808–4811.
- 50 H. Nonami, S. Fukui and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, **32**, 287–296.
- 51 M. L. Salum, P. Arroyo Mañez, F. J. Luque and R. Erra-Balsells, *J Photochem Photobiol B*, 2015, **148**, 128–135.
- 52 T. Porta, C. Grivet, R. Knochenmuss, E. Varesio and G. Hopfgartner, *Journal of Mass Spectrometry*, 2011, **46**, 144–152.
- 53 A. E. Fazary and Y. H. Ju, *J Solution Chem*, 2008, **37**, 1305–1319.
- 54 M. L. Salum, *Comunicación personal*, DQO-CIHIDECAR (CONICET), FCEN - Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, 2018.
- 55 F. Rived, M. Rosés and E. Bosch, *Anal Chim Acta*, 1998, **374**, 309–324.
- 56 C. Perinu, B. Arstad, A. M. Bouzga and K. J. Jens, in *2nd Post Combustion Capture Conference (PCCC2)*, 2013.
- 57 S. J. Vevelstad, A. Grimstvedt, H. Knuutila, E. F. da Silva and H. F. Svendsen, *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2014, **28**, 156–167.
- 58 M. Balón, J. Hidalgo, P. Guardado, M. A. Muñoz and C. Carmona, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1993, 99–104.
- 59 M. Mank, B. Stahl and G. Boehm, *Anal Chem*, 2004, **76**, 2938–2950.
- 60 R. B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, Second Edi., 2010.
- 61 K. Hiraoka, *Fundamentals of mass spectrometry*, Springer, New York, 2013, vol. 9781461472.
- 62 S. Ackloo, J. K. Terlouw, P. J. A. Ruttink and P. C. Burgers, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001, **15**, 1152–1159.

- 63 J. Zaia, J. E. McClellan and C. E. Costello, *Anal Chem*, 2001, **73**, 6030–6039.
- 64 R. Erra-Balsells and H. Nonami, *Environment Control in Biology*2, 2008, **46**, 65–90.
- 65 M. L. Salum, T. Schmidt De León and R. Erra-Balsells, *Analytical Methods*, 2015, **7**, 8478–8483.
- 66 M. C. Biondic and R. Erra-Balsells, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1997, 1323–1328.
- 67 P. Klán and J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*, Wiley, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom, 2009.

Capítulo 3 : Líquidos iónicos con norharmano como matrices en MALDI-MS. Análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular.

3.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en la introducción del Capítulo 2, en el presente capítulo nos focalizamos en el estudio de LIMs usando como partes constituyentes las matrices ácidas clásicas y el nHo como generador del contraión. A diferencia de los LIs preparados con aminas alifáticas, en estos LIs ambos constituyentes tienen la capacidad de absorber la radiación del láser. En todos los casos se realiza un estudio comparativo entre el desempeño como matriz de los LIs ácido.nHo con respecto a las matrices clásicas (ácido y nHo) por separado y LIs de tipo ácido.BAM que ya han sido descriptos en el capítulo anterior. Las Figuras A3.1-A3.24 y la Tabla A3.1 mencionadas en este capítulo se encuentran en el Anexo 3.

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 Materiales y métodos

Las β -carbolinas: 9H-pirido[3,4-b]indol (nor-harmano, nHo) y 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indole (harmano, Ho), el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB), los ácidos: *E*-4-hidroxi- α -cianocinámico (ECHCA), *E*-4-cloro- α -cianocinámico (*E*-4ClCHCA), *E*-4-flúor- α -cianocinámico (*E*-4FCHCA) y *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ESA); la *n*-butilamina (BAM) y la Piridina (Py) fueron provistas por Aldrich (USA). La estructura de estos compuestos y su masa exacta se muestra en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 18.

La sal disódica neocarratetraosa-4¹,4³-disulfato (NCT) fue provista por Sigma-Aldrich (USA). Los azúcares: glucosa (Glc), maltotetraosa (M4), maltopentaosa (M5), maltohexaosa (M6), maltoheptaosa (M7), isopropil- β -D-1-tiogalactósido (IPSG) y las maltosas cíclicas: β -ciclodextrina (β CD), hepta(O-metil)- β -ciclodextrina (M β CD), hepta(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM β CD), hepta(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina (TM β CD) y hepta(2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina ((OHP) β CD) se obtuvieron de Sigma Chemical, Tokyo, Japón. Los fructanos: sacarosa ó sucrosa (F2) y 1F-fructofuranosilnstosa (F5) fueron provistos por Wako Pure Chemical, Japón. Las estructuras generales de los carbohidratos estudiados y su peso molecular se muestran en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 21.

Todos los solventes orgánicos (J. T. Baker grado HPLC), fueron utilizados sin previa purificación. Se utilizó agua de muy baja conductividad (grado Milli-Q).

El ácido Z-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ZSA) fue sintetizado según el protocolo descrito por Salum y colaboradores¹, brevemente detallado en el capítulo 2 sección 2.2.1. Los líquidos iónicos con BAM, nHo y Ho se prepararon según el protocolo descrito en el capítulo 2 sección 2.2.1. En el caso del LI, Ácido.Py, se prepara disolviendo el ácido en una solución equimolar de Py en MeOH. La solución se mantiene en el sonicador por 10 min y se utiliza directamente sin evaporación del solvente a presión reducida.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y la morfología de la superficie (SEM) de las matrices clásicas y de los LI propuestos como matrices se obtuvieron utilizando los equipos detallados en el capítulo 2 (2.2.1).

3.2.2 Preparación de muestras para espectrometría de masa MALDI

Ver los detalles experimentales en la correspondiente sección del capítulo 2 (2.2.2).

3.2.3 Límite de detección (LOD)

Ver los detalles experimentales en la correspondiente sección del capítulo 2 (2.2.3).

3.2.4 Estabilidad de los LIMs.

Ver los detalles experimentales en la correspondiente sección del capítulo 2 (2.2.4).

3.2.5 Espectrometría de masa MALDI

Los experimentos fueron llevados a cabo según lo descrito en la sección experimental del capítulo 2 (2.2.5). En cada caso la fluencia del láser se optimiza para obtener una alta relación señal ruido (S/R), mínima fragmentación del ion precursor y una buena resolución, en la matriz que requiriese el umbral de fluencia más alto para la volatilización/ionización de un dado analito. Esta fluencia (información en el epígrafe de cada figura) se dejó fija para los experimentos comparativos entre grupo de matrices (ver como ejemplo la Figura A3.1 del anexo de este capítulo, Anexo 3 (pág. 321)).

Algunos analitos fueron seleccionados para realizar experimentos de fragmentación selectiva, MS/MS (denominado modo LIFT en este equipo), tanto en modo iónico positivo como en modo iónico negativo. El modo LIFT fue operado con una fluencia del láser del 30% para la selección del ion precursor (ionización MALDI suave) y un 80% para su fragmentación (ionización MALDI fuerte; MS/MS). Los resultados fueron analizados usando el software FlexAnalysis desarrollado por Bruker para este equipo.

3.2.6 Mapeo químico superficial por espectrometría de masa MALDI (imágenes MALDI-MS)

El estudio de la homogeneidad de las muestras sólidas por MALDI preparadas con las matrices estudiadas (ECHCA, DHB, ESA, ZSA, nHo, ECHCA.nHo, ECHCA.BAM, DHB.nHo, DHB.BAM, ESA.nHo, ESA.BAM, ZSA.nHo y ZSA.BAM) se llevó a cabo obteniendo imágenes iónicas

de su superficie por MALDI-MS. Ver los detalles experimentales en la correspondiente sección del capítulo 2 (2.2.6). Las muestras fueron preparadas siguiendo la metodología de capas sucesivas, depositando 0,5 μL de la solución acuosa de βCD sobre la matriz ya depositada sobre el porta muestras. Para los LIM se utilizaron con fines comparativos dos concentraciones diferentes (0,005 y 0,01 M).

3.2.7 Espectroscopía de absorción UV-visible y reflectancia difusa

Ver los detalles experimentales en la correspondiente sección del capítulo 2 (2.2.7).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Caracterización de las matrices

Se analizaron las propiedades físicas de los nuevos líquidos iónicos comparándolas con las de las matrices cristalinas constituyentes de su estructura: punto de fusión (p.f.), espectro de ^1H -RMN, espectro de absorción UV-visible en solución y el espectro de reflectancia difusa en el estado sólido.

En la Tabla 1 se detallan los puntos de fusión medidos para cada una de las matrices evaluadas. Los puntos de fusión fueron obtenidos a partir del análisis de los compuestos por calorimetría de barrido diferencial (DSC) que se discuten en el capítulo 4 de esta tesis o utilizando el método de Fisher-Johns, especificado en cada caso. Como se observa en la Tabla 1 para el ECHCA y el ESA los puntos de fusión del LI ácido.nHo es menor que el punto de fusión de sus componentes y cercano al punto de fusión de sus LIs con BAM como fuente del contraión. Por el contrario, el LI ZSA.nHo muestra un aumento del punto de fusión con respecto al ZSA y una disminución con respecto al del nHo. Ambos LIs del ZSA poseen p.f. similares.

Tabla 1. Puntos de fusión de las matrices estudiadas.

| Matriz | p.f. [$^{\circ}\text{C}$] | Matriz | p.f. [$^{\circ}\text{C}$] | Matriz | p.f. [$^{\circ}\text{C}$] |
|-----------|----------------------------------------------|---------|-----------------------------|---------|-----------------------------|
| nHo | 202 ^a | | | | |
| ECHCA | 264 ^a | ESA | 195-202 ^a | ZSA | 114-117 ^a |
| ECHCA.BAM | 178 ^a | ESA.BAM | 145 ^a | ZSA.BAM | 132 ^a |
| ECHCA.nHo | 168-176 ^a 165-166 ^b | ESA.nHo | 140-142 ^b | ZSA.nHo | 135-137 ^b |

^a p.f. estimado por DSC. ^b p.f. medido en el equipo Fisher-Johns.

Los espectros de ^1H -RMN de los compuestos usados como matrices y su descripción espectroscópica se encuentran en el anexo de este capítulo, Anexo 3, para el caso del ECHCA y sus LIs (Figuras A3.2 y A3.3) y para los isómeros geométricos del SA y sus LIs (Figuras A3.4 y A3.5). Los espectros de ^1H -RMN de las matrices muestran que el LI ECHCA.nHo presenta una desprotección de los protones del nHo, generando un corrimiento de las señales a frecuencias

mayores (mayor δ). Esta desprotección de los protones se debe al carácter catiónico del nHo por protonación del nitrógeno piridínico en presencia de un ácido. De la misma forma los protones correspondientes al ácido presentan un pequeño corrimiento hacia frecuencias menores (menor δ) producto del aumento de la densidad electrónica del carboxilato; esto se condice con la tendencia observada en el LI ECHCA.BAM, aunque en este último los corrimientos observados son mucho mayores. En el caso de los LIs SA.nHo, para ambos isómeros, no se observa un cambio significativo en los corrimientos observados para los protones tanto del nHo como de los ácidos ESA y ZSA. Sin embargo, en los LIs SA.BAM, los protones correspondientes al ácido si presentan un corrimiento a menores valores de δ producto de la formación del carboxilato. El carácter iónico de estas matrices y por lo tanto el grado de corrimiento observado en los espectros de ^1H -RMN depende de la acidez relativa entre los componentes de la mezcla². Es por esto que las matrices ácido.BAM presentan mayor carácter iónico que las matrices ácido.nHo, debido a que la basicidad de la BAM ($\text{pK}_{\text{aH}_2\text{O}} = 10,6$)³ es mayor a la del nHo ($\text{pK}_{\text{aH}_2\text{O}} = 7,9$)^{4,5} y por lo tanto se observan corrimientos mayores en el espectro de ^1H -RMN. De la misma forma la matriz ECHCA.nHo presenta mayor carácter iónico que las matrices SA.nHo que presentan un nulo o muy débil carácter iónico lo que se ve reflejado en la magnitud de los corrimientos observados en los espectros de ^1H -RMN (ECHCA ($\text{pK}_{\text{aH}_2\text{O}} = 1,17$)⁶ y ESA ($\text{pK}_{\text{aH}_2\text{O}} = 4,47$)⁷). Kobylis y col.² establecen que un $\Delta\text{pK}_{\text{a}}$ entre los componentes de la mezcla mayor a 3,65 es suficiente para crear una matriz iónica, sin embargo, este criterio no puede ser utilizado para predecir el estado físico de la mezcla el cual debe ser evaluado a distintas temperaturas. Según el criterio establecido por estos autores las matrices ECHCA.nHo, ECHCA.BAM, ESA.BAM y ZSA.BAM pueden ser clasificadas como matrices iónicas sólidas (MISs), mientras que las matrices ESA.nHo y ZSA.nHo pueden ser clasificadas como matrices no iónicas sólidas (MNISs). A pesar de esta nueva clasificación de las matrices introducida por Kobylis y col.² en 2019, a lo largo del desarrollo de este trabajo de tesis se utiliza la nomenclatura clásica LIs y LIMs introducida por Armstrong y col.⁸ en 2001 para hacer referencia a las matrices que surgen de la combinación de un ácido y una base orgánica, independientemente del estado de agregación de la mezcla a temperatura ambiente.

En las Figuras 1, A3.6 y A3.7 se muestran los espectros de absorción UV-Vis de las nuevas matrices propuestas ácido.nHo en comparación con las matrices sólidas constituyentes y la matriz ácido.BAM que ya ha sido descrita en el capítulo anterior de este trabajo. También se muestran y analizan los espectros de absorción UV-Vis de una serie de compuestos análogos con fines comparativos. Los espectros de absorción UV-Visible realizados en solución (metanol, Figura 1a), muestran que el espectro del LI ECHCA.nHo es prácticamente igual a la suma de los

espectros de absorción de los cromóforos constituyentes (ECHCA y nHo en sus formas neutras e iónicas, $[\text{ECHCA-H}]^-$ y $[\text{nHo+H}]^+$). En la región de 300 a 400 nm el espectro es similar al del ECHCA más la especie desprotonada $[\text{ECHCA-H}]^-$: $\epsilon_{(355\text{nm})}$ (metanol) $1,45 \times 10^4$ para el ECHCA.nHo y $1,19 \times 10^4$ para el ECHCA. Esto se debe a que en dicha región el coeficiente de absorptividad molar del ECHCA es un orden de magnitud mayor que el del nHo: $\epsilon_{(355\text{nm})}$ (metanol) $2,59 \times 10^3$. Por la misma razón en la zona de 200 a 300 nm el espectro del LI es similar al del nHo neutro más $[\text{nHo+H}]^+$, debido a la diferencia en la absorptividad molar de ambos componentes, ECHCA y nHo. Este mismo comportamiento se observa también para el LI DHB.nHo (Figura A3.6). En ambos casos la única y pequeña diferencia observada es un hombro alrededor de 310 nm con $\epsilon_{(310\text{nm})}$ (metanol) que difiere según el ácido utilizado. Esta banda se debe a la forma iónica $[\text{nHo+H}]^+$, que presenta un corrimiento de las bandas de absorción a mayores longitudes de onda⁹, cuya concentración en la solución depende de la fuerza del ácido constituyente del LI (ácido.nHo). En el caso de los LIs ESA.nHo y ZSA.nHo, esta diferencia en el espectro de absorción, en comparación con los componentes por separado, no se observa. Por lo que el espectro de absorción de las mezclas SA.nHo puede ser descrito prácticamente como la suma de los espectros de absorción de los componentes neutros (Figura A3.6).

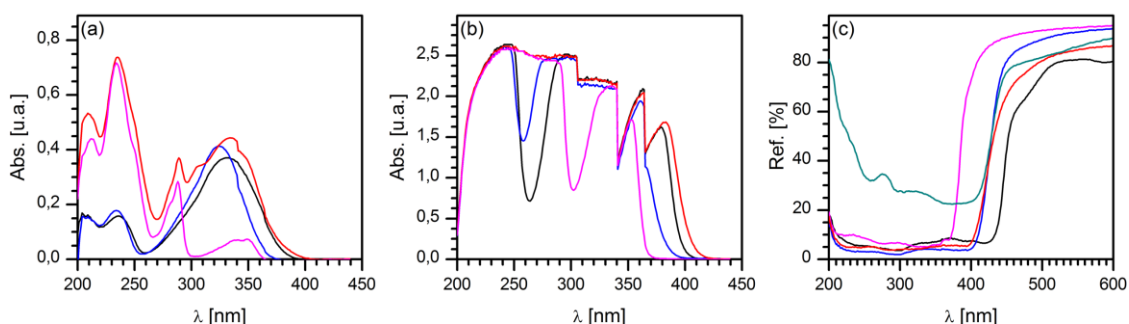


Figura 1. Espectros de Absorción UV-Vis para las matrices ECHCA (negro), nHo (rosa) y los LIs ECHCA.BAM (azul), ECHCA.nHo (rojo) y nHo.HCl (verde). Concentraciones: (a) 2×10^{-5} M y (b) 2×10^{-3} M, solvente: metanol. (c) Espectro de reflectancia difusa UV-Vis de los compuestos sólidos.

Como se describió anteriormente, para todos los ácidos la presencia de una amina alifática produce un corrimiento hipsocrómico del espectro debido a la formación y estabilización del anión carboxilato por solvatación con el solvente polar prótico utilizado¹⁰⁻¹² (Figuras 1, A3.6 y A3.7). En la Tabla A3.1 del Anexo3 se detallan los valores de λ_{max} para todas las matrices estudiadas y su correspondiente $\epsilon_{(\lambda_{\text{max}})}$ así como también los valores de $\epsilon_{(310\text{nm})}$ y $\epsilon_{(355\text{nm})}$. Todos estos espectros fueron obtenidos en solución metanólica 10^{-5} M (condiciones de Beer-Lambert^{13,14}). Este mismo análisis se realizó aumentando la concentración de las matrices por

encima de las condiciones de Beer-Lambert (10^{-3} M; Figuras 1, A3.6 y A3.7). En todos los casos, a medida que se ensanchan las bandas de absorción se observa más claramente un corrimiento batocrómico para los LIs ácido.nHo con respecto a sus componentes individuales neutros y consistente con la presencia de la especie $[nHo+H]^+$. En concordancia con esto, el corrimiento observado es mucho mayor para los ácidos E-4ClCHCA ($pK_{aH_2O} = 0,81$)⁶, E-4FCHCA, DHB ($pK_{aH_2O} = 2,97$)² y ECHCA ($pK_{aH_2O} = 1,17$)⁶ y muy pequeño para ambos isómeros del SA (ESA, $pK_{aH_2O} = 4,47$)⁷, por ser estos últimos los ácidos más débiles. En estas condiciones los LI con BAM presentan un corrimiento hipsocrómico similar al observado en condiciones de Beer-Lambert^{13,14}.

Si bien el estudio de los espectros de absorción UV-Vis permite diferenciar entre las matrices neutras y las iónicas, no es una buena herramienta para determinar el grado de ionicidad de estas nuevas matrices, sin embargo, su estudio es necesario para determinar si las nuevas matrices propuestas pueden o no absorber la radiación del láser utilizado en el proceso MALDI^{2,12}. Cabe destacar que independientemente de los corrimientos de las bandas de absorción descriptos, tanto las matrices cristalinas como los LIs con BAM y con nHo absorben en general eficientemente a 355 nm (Figuras 1, A3.6 y A3.7), longitud de onda de emisión del láser utilizada en el proceso de desorción/ionización MALDI. Esta observación se corroboró en fase sólida por medio del análisis del espectro de reflectancia difusa UV-Vis de los compuestos nHo, nHo.HCl, ECHCA y sus LIs con BAM y nHo (Figura 1c), confirmándose así los comportamientos predichos sobre interacción con luz UV-Vis a 355 nm realizados a partir de las soluciones metanólicas concentradas (10^{-3} M). Como se ve en esta figura, se incluyó como compuesto modelo el compuesto iónico nHo.HCl por tener en su estructura la unidad $[nHo+H]^+$ y así comparar la ubicación de la región de absorción de este cromóforo y la especie neutra en estado

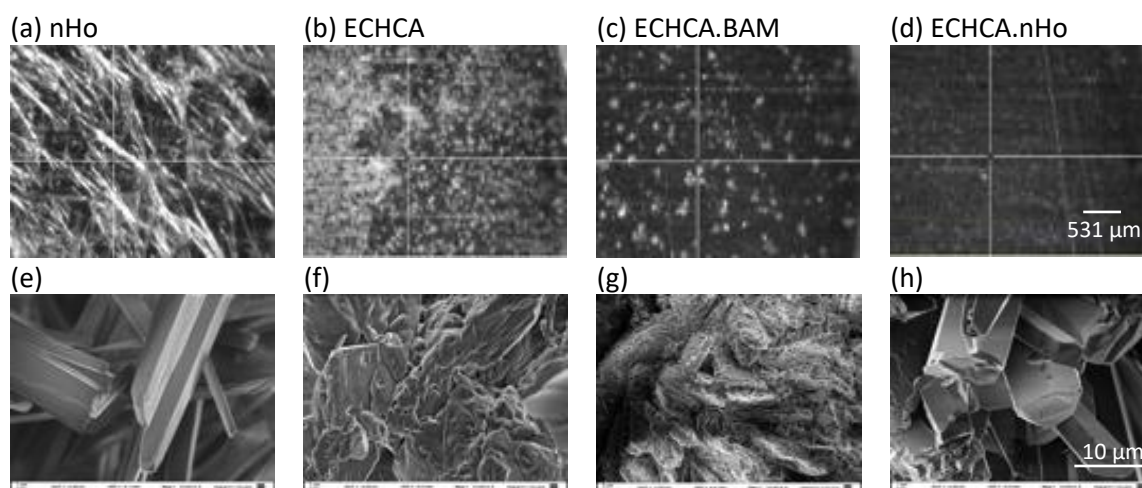


Figura 2. (a-d) Imágenes ópticas de las matrices MALDI depositadas sobre el electrodo porta muestras, imagen tomada en el centro del *spot* (Escala 0,5 cm = 531 μm). (e-h) Imágenes SEM de las matrices MALDI (Ampliación: 10.00 kX, Escala 1 cm = 10 μm). (a,e) nHo, (b,f) ECHCA, (c,g) ECHCA.BAM y (d,h) ECHCA.nHo.

sólido. La coincidencia entre la región activa del LI ECHCA.nHo con los cromóforos constituyentes $[\text{nHo}+\text{H}]^+$ y $[\text{ECHCA}-\text{H}]^-$ (obtenido a partir del LI ECHCA.BAM) es bien clara.

Para comparar la morfología de las matrices MALDI una vez depositadas en el electrodo porta muestras según el protocolo de capas sucesivas descrito en la sección experimental, se tomaron imágenes ópticas dentro del mismo equipo Bruker Ultraflex II TOF/TOF; estas imágenes se muestran en las Figuras 2, 3, 4 y 5 para las matrices ECHCA, DHB, ESA, ZSA y sus LIs con BAM y nHo. En la Figura A3.8 se muestran las imágenes ópticas de una serie de compuestos análogos al ECHCA y al nHo y sus LIs derivados. Estas imágenes dan una idea macroscópica de la forma en que solidifican las matrices luego de la evaporación del solvente a temperatura ambiente y presión atmosférica. En la Figura 2a se observa que el nHo adquiere la forma de una abundante cantidad de agujas finas entrecruzadas que cubren toda la superficie del *spot*. A diferencia de éste, el ECHCA solidifica como pequeños aglomerados distribuidos aleatoriamente sobre toda la superficie (Figura 2b). En el caso del LI ECHCA.BAM, se observan aglomerados más grandes y homogéneos que en el caso del ECHCA, distribuidos de forma más espaciada entre si (Figura 2c), en cambio el LI ECHCA.nHo tiene el aspecto de una solución sólida homogéneamente distribuida en el *spot* (Figura 2d). Estos cambios morfológicos observados al pasar de las matrices sólidas tradicionales a sus LIs con BAM o nHo difieren dependiendo de la matriz ácida que se use como constituyente (ej., DHB, ESA, ZSA, E-4ClCHCA y E-4FCHCA). Con excepción del DHB (Figura 3b-d), en todos los casos se observa un aumento de la homogeneidad óptica en los LIs siendo esta mayor para los LIs ácido.nHo. En el particular caso de los isómeros geométricos del SA, el ESA solidifica como pequeños agregados distribuidos en todo el *spot* a diferencia del ZSA que solidifica en los extremos del *spot* formando un anillo (perímetro circundante); cuando se prepara el LI con nHo en ambos casos se observa el aspecto de una solución sólida distribuida en todo el *spot* (Figuras 4 y 5). En el caso de los derivados fluorado y clorado del ECHCA, se observa nuevamente una mejora en la homogeneidad en los LIs con nHo, observándose una solidificación pareja sobre todo el *spot*. Sin embargo y a diferencia de lo que se observa para el LI ECHCA.nHo, estos compuestos no se muestran como una solución sólida o vidrio (Figura A3.8). Al cambiar la naturaleza de la base en el LI ECHCA.nHo por su análogo Ho, se observa el mismo tipo de cambio en la forma en que solidifica la matriz en comparación con sus componentes por separado, observándose un aumento en la homogeneidad óptica en forma de una solución sólida (Figura A3.8). En la Figura 2e-h se muestran las imágenes SEM de los compuestos nHo, ECHCA, ECHCA.BAM y ECHCA.nHo. Si bien el cambio morfológico microscópico que se observa en las distintas matrices es significativo, no se correlaciona directamente con las observaciones macroscópicas.

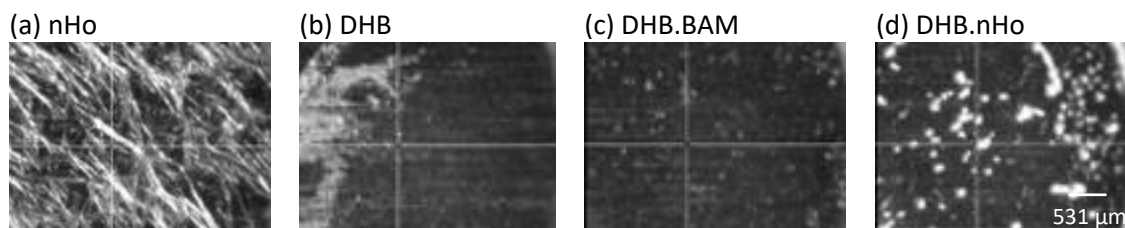


Figura 3. Imágenes ópticas de las matrices MALDI depositadas sobre el electrodo porta muestras: (a) nHo, (b) DHB, (c) DHB.BAM y (d) DHB.nHo. Imagen tomada en el centro del *spot*. Escala 0,5 cm = 531 μ m

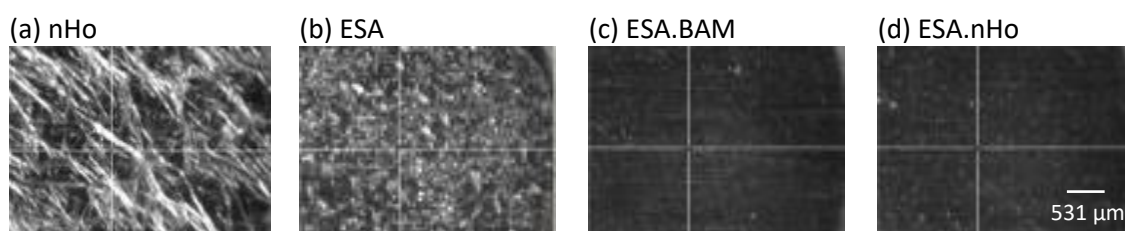


Figura 4. Imágenes ópticas de las matrices MALDI depositadas sobre el electrodo porta muestras: (a) nHo, (b) ESA, (c) ESA.BAM y (d) ESA.nHo. Imagen tomada en el centro del *spot*. Escala 0,5 cm = 531 μ m

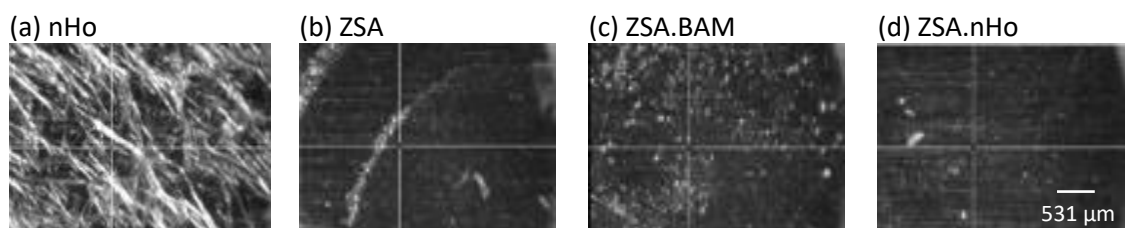


Figura 5. Imágenes ópticas de las matrices MALDI depositadas sobre el electrodo porta muestras: (a) nHo, (b) ZSA, (c) ZSA.BAM y (d) ZSA.nHo. Imagen tomada en el centro del *spot*. Escala 0,5 cm = 531 μ m

3.3.2 Análisis por espectrometría de masa MALDI

3.3.2.1 Desorción/ionización láser de los compuestos usados como matrices (LDI)

Como se mencionó en el Capítulo 2 de este trabajo, es necesario en la propuesta de nuevas matrices estudiar el espectro de masa que surge luego de la excitación electrónica (LDI) de la misma. Con fines comparativos, los experimentos LDI de las matrices se realizaron en las mismas condiciones experimentales que se utilizaron en los estudios de espectrometría de masa UV-MALDI descriptos en la sección experimental 3.2.5 para el análisis de los hidratos de carbono. En las Figuras 6 y 7 se muestran de forma comparativa los espectros de masa LDI en el modo de análisis iónico lineal (L), positivo (+) y negativo (-), de las matrices clásicas nHo, ECHCA y de los LIs ECHCA.BAM y ECHCA.nHo. En las Figuras A3.9 y A3.10 se muestran los espectros de

masa LDI para los derivados halogenados del ECHCA, E-4ClCHCA y E-4FCHCA y de sus LIs con BAM y nHo como fuente del contraíón.

El espectro LDI del ECHCA (Figura 6b) muestra los picos correspondientes a las especies protonada $[M+H]^+$ y más sodio del ácido $[M+Na]^+$ a m/z 190 y 212 respectivamente. El pico base del espectro corresponde a la deshidratación del ácido $[M-H_2O+H]^+$ a m/z 172. También aparecen clústeres a m/z mayores como el dímero $[2M+H]^+$ a m/z 379. En la región de m/z 500 a 1500 se observan algunos clústeres de intensidad variable aproximadamente a m/z 800 (Figura 7b). A diferencia de este, el espectro LDI del nHo presenta como único ion la especie protonada $[M+H]^+$ a m/z 169 (Figura 6a). En el caso del espectro LDI del LI ECHCA.nHo llama la atención que solo se observa la señal correspondiente a la forma protonada del nHo y ninguno de los típicos clústeres observados para el ECHCA en el rango de m/z 0 a 500 (Figura 6d), mientras que en rangos de m/z mayores se observan clústeres de baja intensidad que presentan una distancia en m/z de aproximadamente 210 unidades (estructura no asignada) (Figura 7d). A diferencia del LI con nHo, cuando se utiliza BAM como fuente del contraíón, el espectro LDI en el rango de m/z de 0 a 500 cambia significativamente observándose los típicos iones del ECHCA aunque de menor intensidad (un orden de magnitud menor) mientras que en rangos de m/z mayores se observan los mismos clústeres con una distancia en m/z de 210 unidades, pero de mucho mayor intensidad (un orden de magnitud mayor) (Figuras 6c y 7c, respectivamente).

En modo negativo los espectros LDI de las matrices nHo y ECHCA presentan muy pocas señales. En ambos casos se observa la pérdida de protón $[M-H]^-$, y en el caso del ECHCA se observa además el fragmento típico de ácidos $[M-CO_2-H]^-$, de muy baja intensidad. En este modo los espectros LDI de los LI, tanto con BAM como con nHo, son muy similares al espectro del ECHCA, observándose el ion $[M-H]^-$ y clústeres no identificados en el rango de m/z 500 a 1500 (Figuras 6 e-h y 7 e-h).

En el caso de los ácidos E-4ClCHCA y el E-4FCHCA, en modo positivo presentan muy poca cantidad de señales en el rango de m/z 0 a 500 mientras que el LI con nHo solo muestra el ion correspondiente al nHo protonado a m/z 169 (Figuras A3.9b y d y A3.10b y d, respectivamente). En rango de valores de m/z mayores, el ácido solo presenta algunos clústeres de baja intensidad que en presencia de nHo se ven aumentados. A diferencia de este LI, el uso de BAM como fuente del contraíón limpia el espectro de señales propias de la matriz en todo el rango de m/z . En modo negativo, como era de esperar, ambos ácidos presentan el ion molecular desprotonado $[M-H]^-$ y el fragmento producto de la descarboxilación $[M-CO_2-H]^-$ (Figuras A3.9f y A3.10f). Estas señales junto al ion de m/z 167 correspondiente al $[M-H]^-$ del nHo se observan para los LI con nHo (Figuras A3.9h y A3.10h). En el rango de m/z 500 a 1500, al igual que en

modo positivo, los ácidos presentan una serie de clústeres no identificados de baja intensidad que se intensifican significativamente en presencia del nHo. En el caso del LI con BAM se observa el mismo comportamiento que en modo positivo (espectro limpio de señales en todo el rango de m/z estudiado). Al contrario de los resultados observados para el LI ECHCA.nHo, en el E-4ClCHCA.nHo y el E-4FCHCA.nHo, la presencia del nHo no produjo un claro efecto de eliminación de las señales propias del ácido en el espectro LDI.

En la Figura A3.11 se muestran los espectros LDI en el modo iónico de análisis lineal (L) positivo (+) para las matrices nHo, DHB, ESA y ZSA y los Lis con BAM y nHo. Los espectros de masa de los isómeros ESA y ZSA son muy similares. En modo positivo se observan los iones correspondientes al ácido protonado $[M+H]^+$, más sodio $[M+Na]^+$ y el producto de deshidratación del ácido $[M-H_2O+H]^+$ a m/z 225, 247 y 207 respectivamente. También se observa el dímero protonado $[2M+H]^+$, aunque como pico de muy baja intensidad a m/z 471 (Figura A3.11e y h). En el rango de m/z de 500 a 1500 se observan una serie de clústeres no identificados que generan un espectro complejo. Al igual que lo observado con el LI del ECHCA, el uso del nHo como fuente del contraión produce la desaparición de las señales propias del ácido, observándose como pico base del espectro el ion $[M+H]^+$ del nHo y con una muy baja intensidad del aducto con sodio $[M+Na]^+$ del ácido (Figura A3.11g y j). Por encima de las 500 unidades de m/z los clústeres del ácido ven disminuida su intensidad en presencia del nHo, aunque de todas formas persisten. A diferencia del espectro LDI del LI ECHCA.nHo, en los espectros del ESA.nHo y ZSA.nHo se observa el ion correspondiente al ion molecular protonado del LI $[SA.nHo+H]^+$ a m/z 393 (Figura A3.11g y j). El uso de BAM en el LI del SA produce una disminución de la intensidad de las señales propias del ácido, pero no desaparecen como en el caso del LI con nHo (Figura A3.11f y i). El mismo comportamiento se observa en el espectro LDI del DHB y su LI con nHo, en este caso la señal del LI protonado $[DHB.nHo+H]^+$ a m/z 393 se convierte en el pico base del espectro (Figura A3.11d). Este comportamiento puede deberse al grado de ionicidad de estos compuestos. Mientras mayor sea el carácter iónico de la mezcla ($>\Delta pK_a$), mayor es la proporción de la sal presente en la matriz ($[ECHCA-H]^- \cdot [nHo+H]^+$), esta estructura no sobrevive luego del proceso de DI en MALDI independientemente de la estabilidad del par iónico o del grado de descomposición del mismo en la fuente. Sin embargo, mientras menor sea el carácter iónico de la mezcla ácido.amina, mayor será la proporción de las especies neutras formando complejos unidos por interacciones supramoleculares no iónicas, en especial la formación de puentes de hidrógeno entre la matriz ácida (DHB, ESA, ZSA) y el nHo, cuya estructura puede sobrevivir al proceso de DI y por lo tanto ser detectado como el ion molecular ($[\text{ácido.nHo}+H]^+$)¹⁵⁻¹⁸.

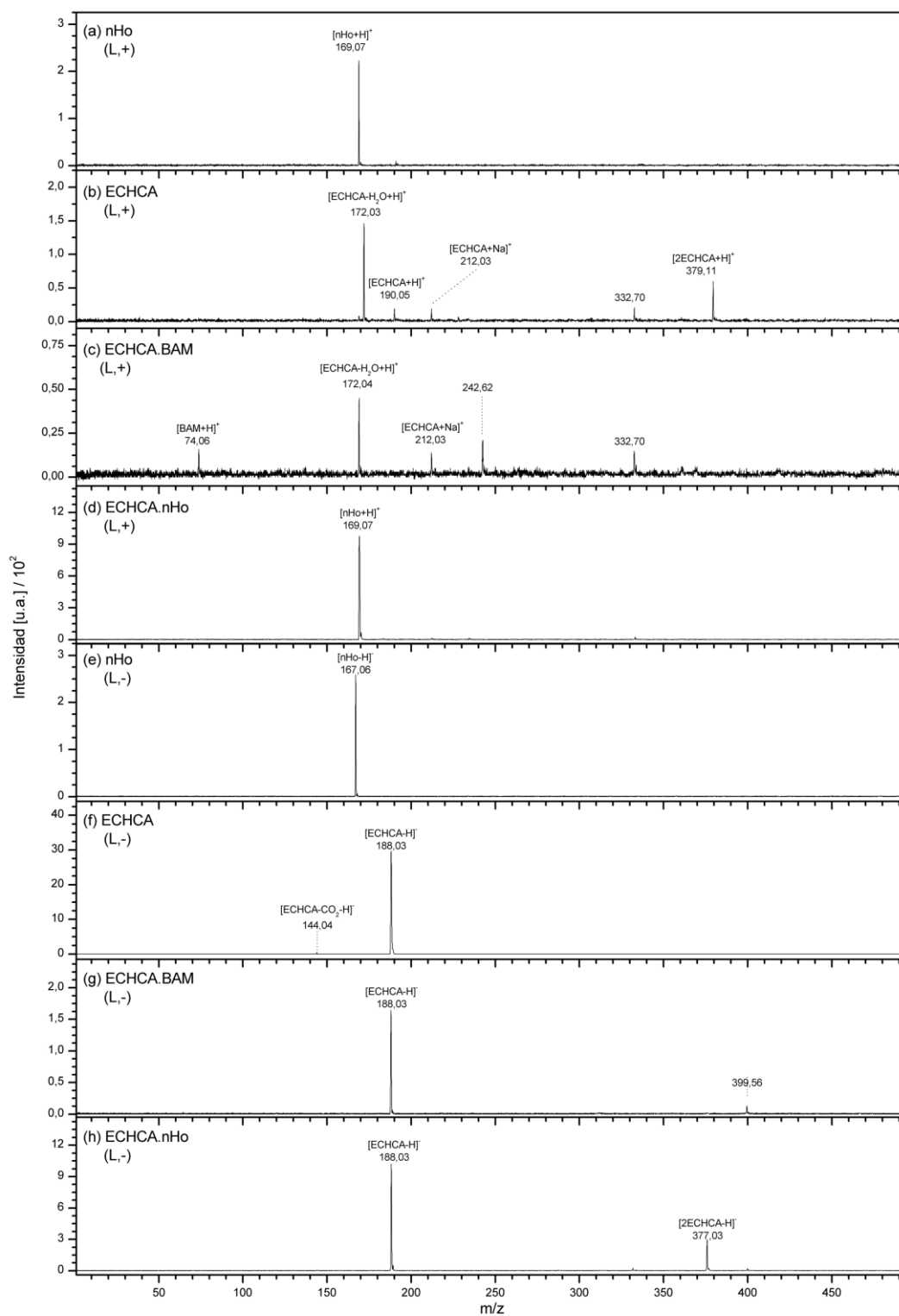


Figura 6. Espectros de masa LDI: (a, e) nHo, (b, f) ECHCA, (c, g) ECHCA.BAM y (d, h) ECHCA.nHo. Modo lineal positivo (L,+): a-d; modo lineal negativo (L,-): e-h. Rango: m/z 0 a 500. Fluencia del láser: 20%.

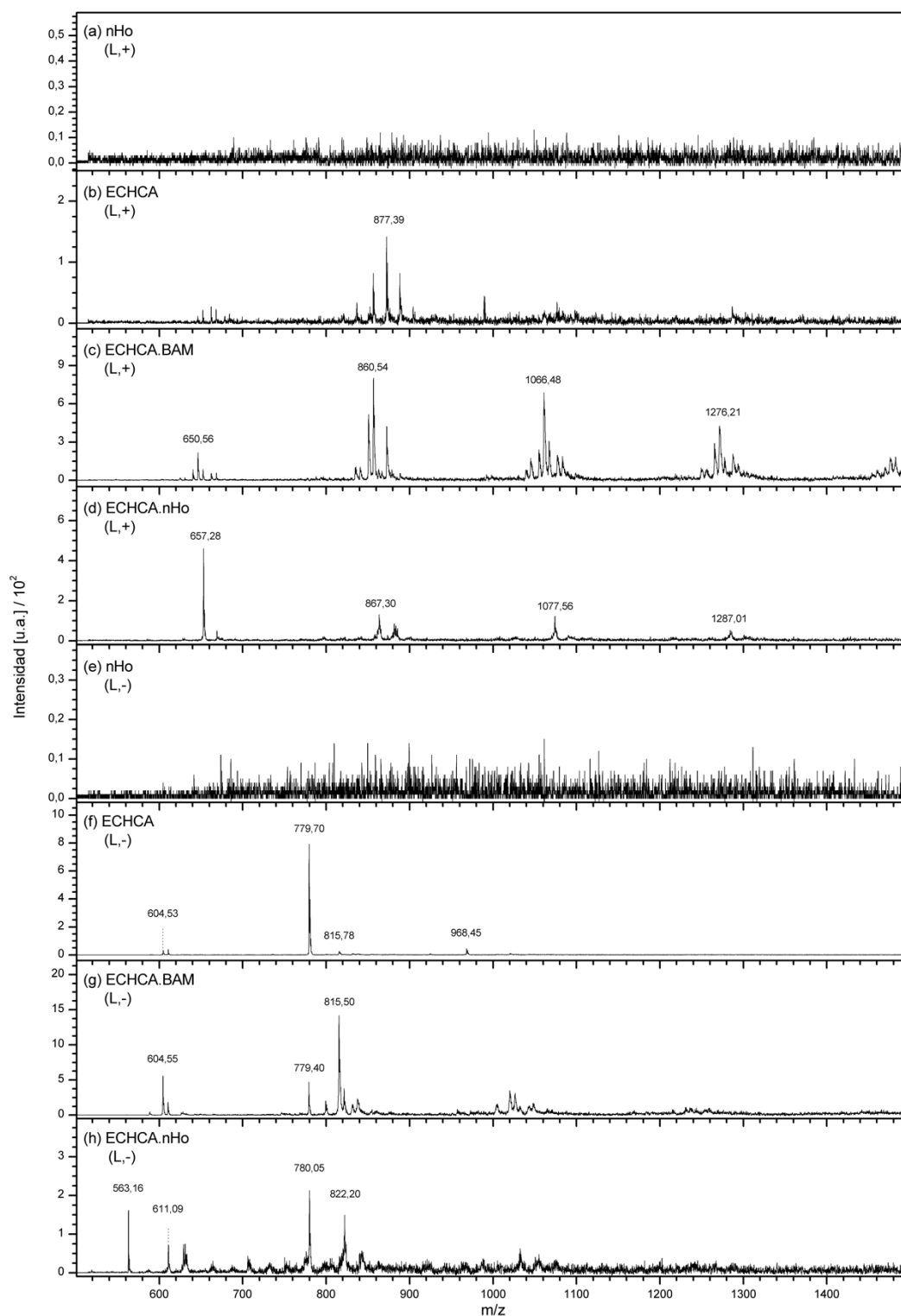


Figura 7. Espectros de masa LDI: (a, e) nHo, (b, f) ECHCA, (c, g) ECHCA.BAM y (d, h) ECHCA.nHo. Modo lineal positivo (L,+): a-d; Modo lineal negativo (L,-): e-h. Rango: m/z 500 a 1500. Fluencia del láser: 20%.

3.3.2.2 Carbohidratos Neutros

Para realizar el estudio comparativo de la posible aplicación como matrices MALDI de los nuevos LI constituidos por una matriz ácida clásica (ECHCA, ESA, DHB) y el nHo como fuente del contraíón, se evaluó su desempeño como matriz para una serie de carbohidratos de bajo peso molecular neutros disponibles comercialmente: fructanos, maltosas, tiosacáridos, ciclodextrinas nativas y ciclodextrinas substituidas.

Como ejemplo, en la Figura 8, se muestran los espectros de masa MALDI de la β -ciclodextrina (β CD), obtenidos en modo lineal positivo con las distintas matrices estudiadas. Se utilizó el método de capas sucesivas para la preparación de la muestra sólida matriz:analito como se detalla en la sección 3.2.2. Se muestra el rango de m/z 1000 a 1350 donde se observan las señales asignadas a los aductos con sodio y con potasio de la β CD ($[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$). Como es sabido la eficiencia en la desorción/ionización (DI) de cada carbohidrato como especie monosodiada ($[\beta\text{CD}+Na]^+$) y los clústeres adicionales observados dependen de una serie de factores experimentales, entre ellos la matriz que se utilice^{19–22}. Por tal motivo, en este estudio comparativo se analizan en las mismas condiciones experimentales las matrices comerciales de referencia como el nHo (Figura 8a) y el ECHCA (Figura 8b) y el LI propuesto como matriz ECHCA.nHo (Figura 8d). Complementariamente se incluye como matriz de referencia el LI ECHCA.BAM, el cual ya ha sido descrito en la literatura y en el capítulo 2 de este trabajo para el análisis de carbohidratos (Figura 8c)²³. Como se concluye del análisis de los espectros presentados en la Figura 8, el LI ECHCA.nHo presenta una mayor eficiencia en la DI del analito intacto, produciendo una señal de mayor intensidad para el aducto con sodio $[M+Na]^+$ que la observada en los procesos de DI inducidos por las matrices ECHCA y nHo individualmente. En este caso el LI presenta una eficiencia, expresada como intensidad de la señal monitoreada $[\beta\text{CD}+Na]^+$, aproximadamente un orden de magnitud mayor que el ECHCA y el nHo individualmente, siendo esta mayor, incluso, que la que resultaría de la simple suma de los valores de intensidad de ambas matrices por separado. Esto sugiere la existencia en el LI ECHCA.nHo de un efecto cooperativo beneficioso entre el ECHCA y el nHo que mejora su eficiencia como matriz, pudiendo ser este efecto de índole fotofísico y/o térmico. En la comparación con el comportamiento del LI ECHCA.BAM (Figura 8c), surge que ambos Lis presentan una eficiencia de DI similar, bastante buena, y mejor respecto a las matrices clásicas ECHCA y al nHo.

También se incluyó en este estudio el DHB, ya que es una matriz clásica ampliamente utilizada para el análisis de hidratos de carbono^{22,24–26} y sus Lis con BAM, que ha sido descrito en la literatura como LIM en MALDI-MS^{23,27} y nHo como fuente del contraíón. En este caso el

DHB presenta espectros con una buena relación S/R para el ion aducto con sodio $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$, siendo esta del mismo orden de magnitud que las producidas tanto por el nHo y el ECHCA, sin embargo, a diferencia de este último la presencia del nHo en el LI DHB.nHo no genera una mejora clara en su desempeño como matriz, alcanzando niveles de intensidad de la señal monitoreada $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ del mismo orden de magnitud que el DHB o el nHo por separado. Por el contrario, el LI DHB.BAM presenta una muy marcada disminución de la intensidad del ion monitoreado, casi al nivel del ruido del espectro de masa. Esto recuerda resultados descriptos hace ya algún tiempo sobre la desactivación del DHB como matriz MALDI en su forma de sal sódica²⁸. Evidentemente la diferencia de basicidad del $\text{NaOH} > \text{BAM} > \text{nHo}$ (en el estado electrónico fundamental) explicaría el comportamiento observado para los LIs del DHB.

Como es sabido las matrices MALDI clásicas del tipo ácido cinámico comerciales (isómero geométrico *E* o *trans*), como el ESA^{22,28,29}, no resultan eficientes para el estudio de hidratos de carbono, especialmente, de bajo peso molecular no solo por presentar una pobre eficiencia en la DI del analito sino también por la gran cantidad de señales propias de la matriz en el rango de m/z 0 a 1500. Sin embargo, hoy en día gracias a las nuevas generaciones de instrumentos MALDI de alta resolución, estas matrices han sido revalorizadas para el estudio de compuestos de bajo peso molecular^{22,30}. Al igual que en el caso del ECHCA, han sido descriptos LI para la matriz ESA con distintas aminas alifáticas y aromáticas aplicadas al estudio de péptidos, proteínas y algunos hidratos de carbono^{8,23}. Como un aporte al diseño racional de nuevas matrices MALDI dentro de la familia de los ácidos cinámicos en 2013 Salum y colaboradores demostraron que el ZSA es una matriz más eficiente para el estudio de hidratos de carbono²⁹ y péptidos³¹ de bajo peso molecular (LMW) que su isómero geométrico ESA.

A modo de ejemplo, en la Figura 8h se muestra que la matriz ESA tiene una eficiencia de DI para este analito menor al ECHCA y al nHo, mientras que el ZSA supera en más del doble a la intensidad del ESA para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ (Figura 8k). Como se concluyó en el capítulo anterior, la presencia de BAM en el LI de ambos isómeros presenta un efecto contrapuesto, con la matriz ESA.BAM (Figura 8i) se observa una mejora respecto de la matriz ESA mientras que el ZSA.BAM (Figura 8l) presenta una significativa disminución en la intensidad del mismo ion. Para el caso de los LI con nHo y al igual que lo observado para el DHB, el LI ESA.nHo y ZSA.nHo no presentan una mejora significativa, ya que alcanza una intensidad para la señal de la especie $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ del mismo orden de magnitud que al usarse nHo solo (Figura 8 j y m, respectivamente).

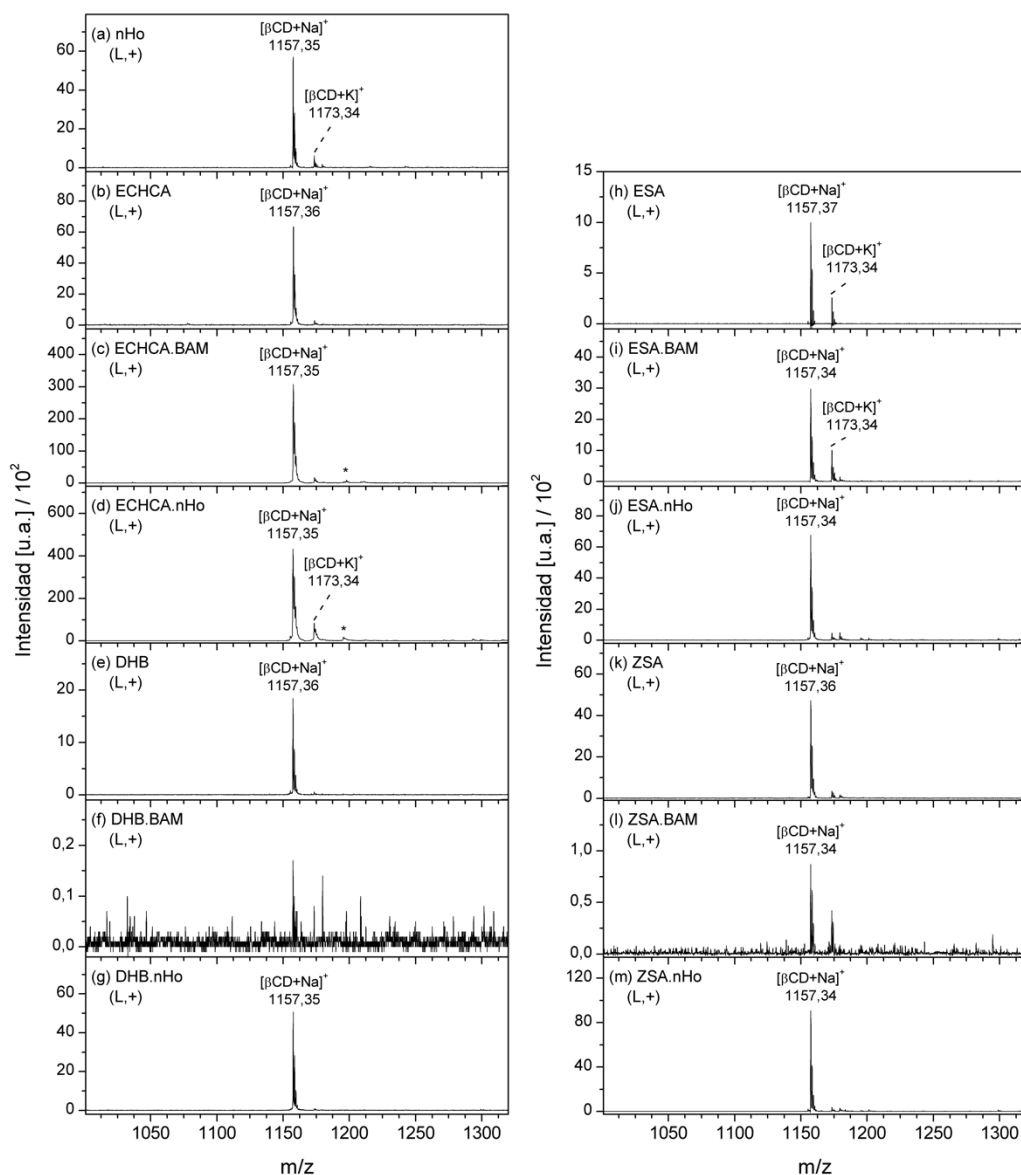


Figura 8. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM, (d) ECHCA.nHo, (e) DHB, (f) DHB.BAM, (g) DHB.nHo, (h) ESA, (i) ESA.BAM, (j) ESA.nHo, (k) ZSA, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 20%. * Clúster de estructura desconocida. Ion diagnóstico: $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$

Complementariamente, en todos los casos, se realizaron experimentos en el modo iónico de análisis reflectrón positivo (R, +). Los correspondientes espectros de masa obtenidos en este modo se muestran en la Figura A3.12 a-m. Independientemente del aumento en la sensibilidad y resolución propios de este modo de análisis, la tendencia observada en las relaciones de intensidad del ion diagnóstico $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ entre las distintas matrices se mantiene igual a lo descrito en el modo lineal.

A modo de resumen, en la Figura 9 se muestra la intensidad porcentual obtenida por EM MALDI del ion diagnóstico $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en cada una de las matrices estudiadas en el modo

iónico de análisis lineal positivo. En esta figura se representa la intensidad como una relación porcentual respecto a la máxima intensidad obtenida para el grupo de matrices comparado. En esta figura se observa claramente una diferencia significativa en el proceso de DI en el caso del LI ECHCA.nHo comparado con el que tiene lugar en las matrices clásicas ECHCA y nHo en experimentos separados. Distinto es el caso para las demás matrices estudiadas, donde en presencia de nHo se observa un ligero aumento de intensidad de la señal con respecto a la producida por la matriz ácida sola, pero que resulta del mismo orden de magnitud que la obtenida con el nHo como tal o a la suma de ambas contribuciones.

El estudio de otros azúcares LMW neutros, de la familia de las maltosas y fructosas cuyos resultados se incluyen en el Anexo 3 (Figura A3.13 (a) β CD, (b) M7, (c) M6, (d) M5, (e) F5 y (f) M4), muestran la misma tendencia en cuanto a la eficiencia de DI relativa para las distintas matrices que la descrita anteriormente para la β CD. En todos los casos el ECHCA.nHo presenta una mejor eficiencia en el proceso de DI en comparación al obtenido con sus componentes neutros por separado, tanto en el modo de análisis lineal como reflectrón. Si bien el LI ECHCA.BAM para estos azúcares presenta en muchos casos una intensidad levemente mayor para la señal del ion molecular $[M+Na]^+$ que el LI ECHCA.nHo, se puede concluir que estadísticamente en ambos casos el orden de magnitud de la intensidad del ion diagnóstico es similar, no exhibiendo en la mayoría de los casos diferencias significativas entre los comportamientos de ambos LI. En las Figuras 9 y A3.13a se muestra la reproducibilidad inter día de los resultados obtenidos para la β CD con las matrices estudiadas.

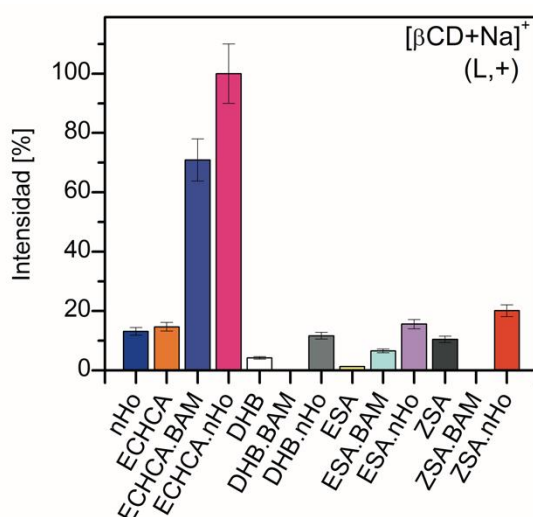


Figura 9. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 20%.

En el estudio del comportamiento de compuestos como nuevas matrices MALDI, es necesario complementar el análisis con experimentos del tipo MS/MS. Como todos los analizadores de tipo TOF (PSD) y TOF/TOF^{20,32}, el equipo utilizado para realizar los experimentos aquí descritos, hace uso de la fragmentación (MS/MS) debida a la generación de iones metaestables (iones en estados vibracional excitado) de fragmentación lenta, tardía, que no ocurre dentro de la cámara de ionización (fragmentación en la fuente, ISD) sino durante su análisis (*post source decomposition*, PSD). En este sentido los iones precursores y sus fragmentos formados en una zona libre de campo eléctrico (región a la deriva o *drift region*) viajan juntos como la misma velocidad a través del TOF, lo que permite seleccionarlos de la mezcla de iones generadas en la fuente (ISD). Luego, para poder diferenciar el ion precursor y sus fragmentos, el equipo cuenta con un dispositivo denominado LIFT (nombre de fantasía de su patente Bruker) que aumenta la energía cinética de estos iones por el efecto de un campo eléctrico, lo que los acelera y reenfoca al segundo TOF (zona libre de campo) donde son discriminados por su masa³².

En este sentido la matriz cumple un rol clave en este tipo de fragmentación ya que no solo determina la cantidad de iones producidos durante la DI del analito sino también en la producción de iones metaestables del analito que luego se fragmentan dentro del analizador TOF. Dentro del grupo de carbohidratos neutros de LMW estudiados, se seleccionó la β CD, M7 y M5 para realizar experimentos en el modo MS/MS para comparar el comportamiento de las matrices propuestas con las matrices clásicas. Los espectros de masa del ion precursor y sus fragmentos en el modo iónico de análisis positivo se muestran en las Figuras 10, A3.14 y A3.15.

En la Figura 10 se muestran los espectros MS/MS para la β CD usando las matrices clásicas y sus LIs con nHo. En todos los casos se observa el típico patrón de fragmentación de hidratos de carbono del tipo polihexosas en modo iónico positivo, con la pérdida repetitiva de la unidad estructural de m/z 162 ($[M+Na-(162)]_{n=1 \text{ a } 6}$), debidas a la ruptura de uniones glicosídicas. La intensidad absoluta de las señales presenta una distribución de valores gaussiana con un máximo en $n=4$. Si bien este esquema de fragmentación se repite en todas las matrices estudiadas, el LI ECHCA.nHo presenta intensidades absolutas mayores que las obtenidas con las matrices constituyentes, se observan intensidades de más del doble que las que se obtienen con las matrices ECHCA y nHo por separado (Figura 10 c, b y a, respectivamente). Esto muestra que la matriz además de generar una gran cantidad de iones precursores también produce una eficiente transferencia de energía, generando una gran cantidad de iones metaestables que resultan luego en una mayor cantidad de iones fragmentos. En el caso DHB.nHo (Figura 10e), si bien la formación del ion precursor es baja, se observan fragmentos de alta intensidad, pero del mismo orden de magnitud que el DHB solo (Figura 10d).

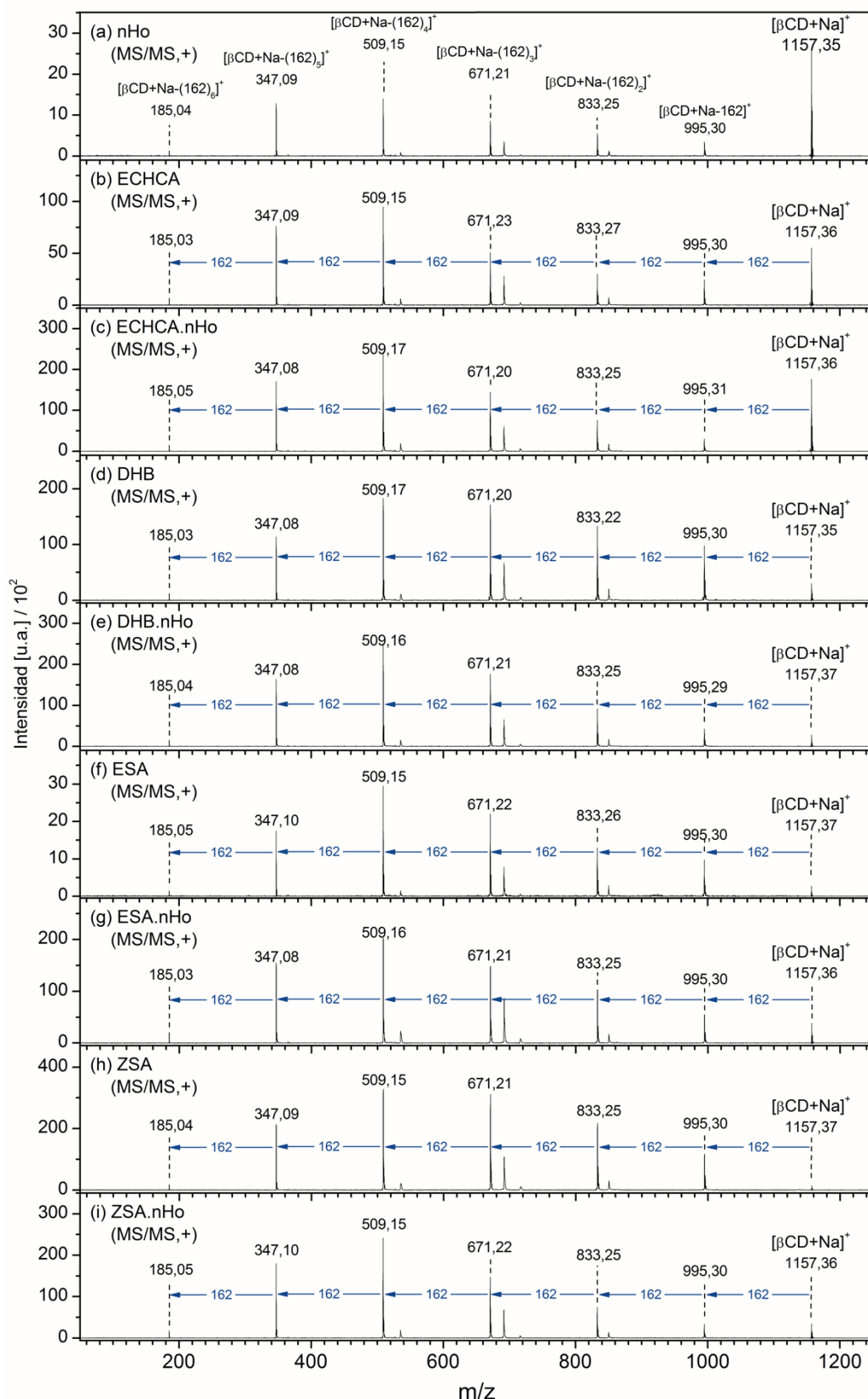


Figura 10. Espectros de masa MALDI MS/MS. Matriz: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.nHo, (d) DHB, (e) DHB.nHo, (f) ESA, (g) ESA.nHo, (h) ZSA e (i) ZSA.nHo. Modo LIFT positivo (+). Ion precursor [βCD+Na]⁺ = 1157,36 m/z. Fluencia del láser: para detección del ion precursor 30% y para su fragmentación 80%.

En el caso del ESA en presencia de nHo (Figura 10g) se observa una mejora significativa (un orden de magnitud mayor) en la intensidad de los fragmentos respecto a sus constituyentes, este mismo efecto no se observa para el caso del ZSA que al igual que para el DHB la eficiencia en la formación de los iones fragmento en el LI con nHo (Figura 10i) es del mismo orden de magnitud que el ácido solo. Si bien el LI ESA.nHo, al igual que la matriz ESA, presenta una baja eficiencia en la generación del ion precursor, el hecho de que el ESA.nHo mejore sustancialmente la formación de iones metaestables hace suponer que la presencia del nHo mejora la transferencia de energía matriz-analito en el proceso de ablación. De todas formas, esta contribución no es lo suficientemente importante para generar una mejora satisfactoria a la hora de evaluar el desempeño global de este LI como matriz MALDI. Esta misma tendencia se observa para los otros azúcares seleccionados. En la Figura A3.14 se muestran los espectros MS/MS para M7 con las matrices nHo, ECHCA y ECHCA.nHo, ya que este LI es el que resulta ser más promisorio. En esta figura se observa además de la pérdida de unidades de m/z 162 a partir del ion $[M7+Na]^+$, también la pérdida de 162 unidades de m/z a partir de la especie $[M+Na]^+$ deshidratada $[M+Na-18-(162)_{n=1 \text{ a } 6}]^+$. En la Figura A3.15 se muestran los resultados obtenidos para el analito M5, donde además de los dos patrones de fragmentación anteriores $[M+Na-(162)_{n=1 \text{ a } 4}]^+$ y $[M+Na-18-(162)_{n=1 \text{ a } 4}]^+$, se observan señales que responden al patrón estructural $[M+Na-60-(162)_{n=1 \text{ a } 3}]^+$, aunque de muy baja intensidad. En este caso además de la ruptura de uniones glicosídicas y deshidratación típica de hidratos de carbono, se agrega con cierta contribución una ruptura de tipo retro-cíclica (Diels Alder)²⁸, también típica de los hidratos de carbono.

En forma complementaria se seleccionaron una serie de β -ciclodextrinas sustituidas comerciales como ejemplos de muestras más complejas. Estas β CD con los grupos OH modificados, son mezclas de compuestos con diferente grado de sustitución. Las estructuras de los compuestos M β CD, DM β CD, TM β CD y (HOP) β CD que se utilizaron en este estudio se muestran en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 21. En la Figura 11 se muestran comparativamente los espectros de masa obtenidos para la (HOP) β CD con las matrices nHo, ECHCA, DHB, ESA y ZSA y sus respectivos LIs ácido.nHo analizados en el modo lineal positivo. A pesar de que el peso molecular de la mono-hidroxipropil- β -ciclodextrina es 1192 Da ($[M+Na]^+ = 1215 \text{ m/z}$), el producto comercial es una mezcla de poli-hidroxipropil- β -ciclodextrina de formula (HOP) $_n\beta$ CD con n que varía de 1 a 9, mostrando así un espectro con señales con una diferencia de m/z constante de 58 unidades y con una distribución gaussiana con un máximo para n=5 (1447 m/z).

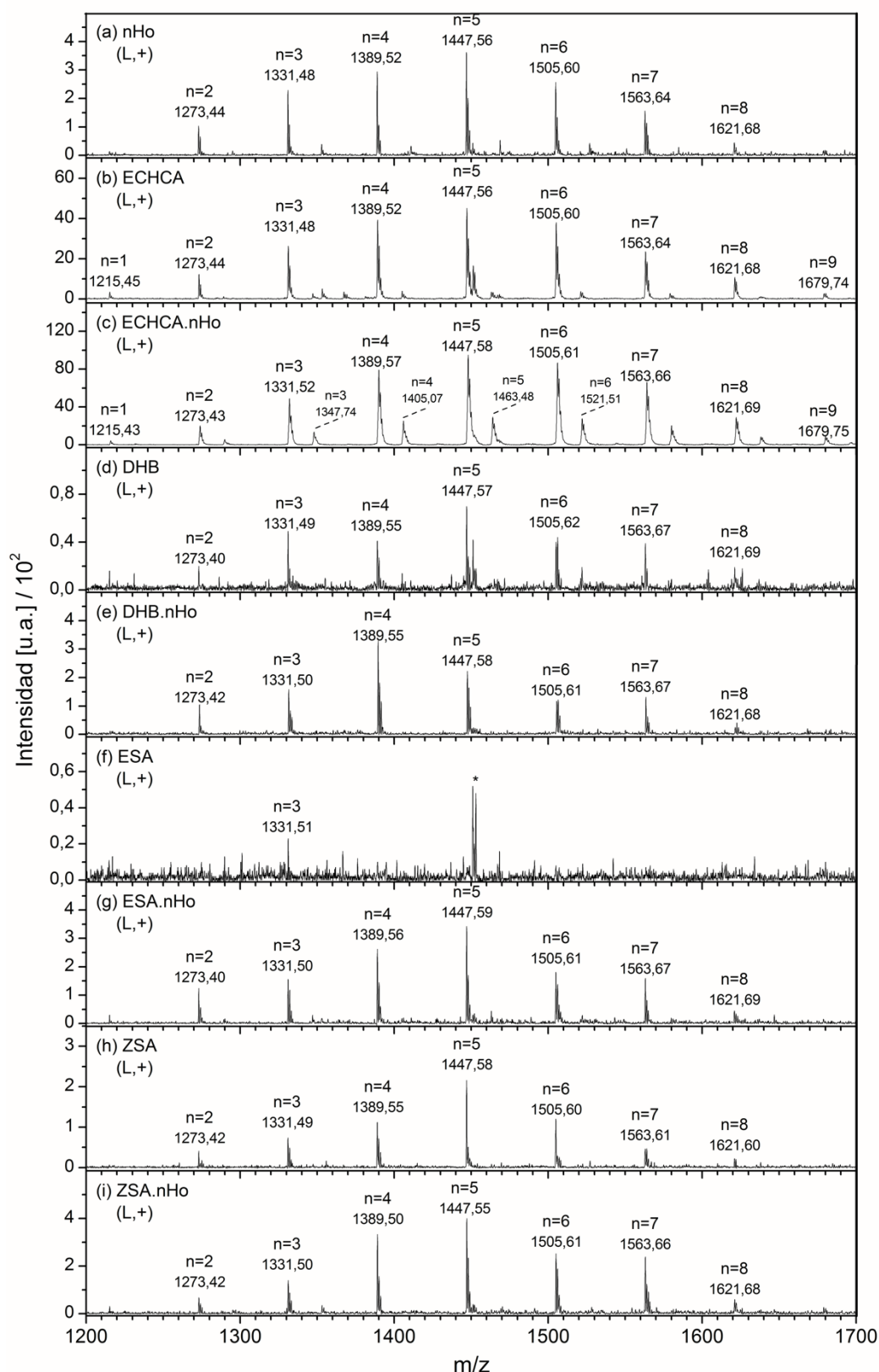


Figura 11. Espectros de masa MALDI. Analito: $(\text{HOP})_n\beta\text{CD}$. Matriz: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.nHo, (d) DHB, (e) DHB.nHo, (f) ESA, (g) ESA.nHo, (h) ZSA e (i) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (+). $(\text{HOP})_n\beta\text{CD} = (\text{HOP})_{1-9}\beta\text{CD}$, ej. $[(\text{HOP})_5\beta\text{CD}+\text{Na}]^+ = 1447 \text{ m/z}$ y $[(\text{HOP})_5\beta\text{CD}+\text{K}]^+ = 1463 \text{ m/z}$. Fluencia del láser 20%.

Los valores de eficiencia en el proceso de DI del analito de los LIs propuestos como matrices con respecto a las partes neutras que lo componen, siguen la misma tendencia que la descrita anteriormente. Al usarse el LI ECHCA.nHo se observa mayor intensidad para las señales de todos los iones, concretamente más del doble de los valores observados para el ECHCA y el nHo por separado (Figura 11c, b y a, respectivamente). Por el contrario, la diferencia de intensidad observada con los LIs DHB.nHo, ESA.nHo y ZSA.nHo no es significativa ya que se registran valores de intensidad para las señales en el mismo orden de magnitud que lo observado para el nHo solo. Realizados estos experimentos en modo reflectrón positivo, independientemente del aumento de sensibilidad y resolución de este modo, la tendencia observada es la misma.

Los resultados obtenidos con las otras β -cliclodextrinas sustituidas se muestran en el Anexo 3. En la Figura A3.16 se muestra los espectros MALDI de la DM β CD en ambos modos de análisis (lineal y reflectrón). Al igual que la (HOP) β CD, la DM β CD es una mezcla compleja con fórmula $(\text{CH}_3)_{n=13-18}\beta\text{CD}$ que presenta un pico base para $n=14$, en este caso la falta de un correcto patrón isotópico se debe a la superposición de señales entre los iones aductos con sodio y potasio $[(\text{CH}_3)_{n+1}\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ y $[(\text{CH}_3)_n\beta\text{CD}+\text{K}]^+$ generadas para cada especie. En este ejemplo se puede ver claramente el aumento de la resolución del modo reflectrón comparado con el modo lineal, pero siempre mostrando la misma tendencia de los resultados, siendo el LI ECHCA.nHo el que presenta la mejor eficiencia en el proceso de DI y el único que exhibe un efecto cooperativo entre sus componentes que hace que el LI sea mucho mejor matriz que sus componentes por separado. Otros ejemplos de muestras complejas evaluados, en ambos modos de análisis, fueron la M β CD (Figura A3.17) y la TM β CD (Figura A3.18) las que en realidad son mezclas de especies de fórmula molecular $(\text{CH}_3)_{n=9-16}\beta\text{CD}$ y $(\text{CH}_3)_{n=20-21}\beta\text{CD}$ respectivamente. Nuevamente, los mejores resultados se obtienen con la matriz ECHCA.nHo.

Por otro lado, se seleccionaron tres azúcares neutros, la Glc, el tiosacárido IPSG y el fructano sacarosa ó sucrosa (F2) para estudiar la eficiencia en el proceso de DI de las matrices propuestas en el rango de m/z entre 0 y 500. Como se muestra en la Figura A3.19, en los espectros de masa MALDI de la Glc no se observa para las distintas matrices el mismo tipo de comportamiento (eficiencia DI) que el descrito anteriormente para los oligosacáridos estudiados. En este caso los LI ECHCA.BAM y ECHCA.nHo producen señales de baja intensidad para el ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ menores que la producida por el ECHCA (Figura A3.19 c, d y b respectivamente). Comportamientos similares se observan tanto en modo de análisis lineal como en el modo reflectrón (Figura A3.20 c, d y b respectivamente). Una conclusión análoga

surge del análisis de los espectros obtenidos con DHB y su LI con nHo (Figuras A3.19 y A3.20 e-g). Cuando se analizan comparativamente el conjunto de espectros obtenidos para el tiomonosacárido IPSPG, se observa el mismo comportamiento que el descripto para la Glc en relación a las intensidades obtenidas con las diferentes matrices probadas (Figura A3.21). Por el contrario, cuando el análisis se realiza con los espectros obtenidos para el disacárido F2, la tendencia observada en el cambio de la intensidad del ion $[M+Na]^+$ según la matriz es similar a la observada para el caso de los oligosacáridos descriptos anteriormente (β CD, M7, M6, etc.). Nuevamente un efecto cooperativo entre ECHCA y nHo que estaría operando en el LI ECHCA.nHo vuelve a manifestarse en una mejora significativa del proceso de DI, observándose una duplicación de la intensidad de las señales obtenidas en comparación con las matrices clásicas que lo componen (Figura A3.22).

Un comentario especial requiere el caso del ESA y ZSA y sus LIs. En el caso del ESA.BAM la eficiencia de DI es mayor que para el ESA mientras que en el caso del ZSA.BAM respecto del ZSA la relación de intensidades es la opuesta ($DI_{ZSA.BAM} < DI_{ZSA}$). Por otra parte, los LI del ESA y ZSA con nHo presentan una mayor eficiencia DI que los ácidos neutros, pero del mismo orden de magnitud que la matriz nHo (Figuras A3.19 h-m y A3.20 h-m). Este comportamiento puede generalizarse a prácticamente todos los analitos aquí estudiados.

A modo de resumen, en la Figura 12 se grafica la intensidad promedio porcentual obtenida por EM MALDI del ion $[M+Na]^+$ en cada una de las matrices estudiadas para los tres azúcares: (a) Glc, (b) IPSPG y (c) F2. Se observa claramente como existe un límite inferior en el valor de m/z del analito para ser analizado con la matriz ECHCA.nHo y que se observe una mejora significativa en el proceso de DI respecto de sus componentes por separado. Es ampliamente conocido que cada matriz MALDI funciona de forma óptima para cierto tipo de analito y en cierto rango de peso molecular, siendo así que matrices que funcionan muy bien para cierto tipo de analito y en cierto rango de m/z , pueden no funcionar con el mismo tipo de analito, pero en otro rango de peso molecular²³. Los LIMs descriptos en la literatura, si bien han logrado expandir los rangos de peso moleculares con respecto a las matrices clásicas, no han sido exentos de estos límites²³. Es importante recordar en este punto que, en el estudio de analitos de bajo peso molecular, la reducción o eliminación de las señales propias de la matriz es de vital importancia para la identificación de las señales correspondientes a éste, especialmente en muestras incógnitas. Como se mencionó en la sección 3.3.2.1 el LI ECHCA.nHo presenta una disminución de las señales propias de la matriz acida (ECHCA) tal cual se observa en los espectros MALDI de la Glc (Figura A3.20).

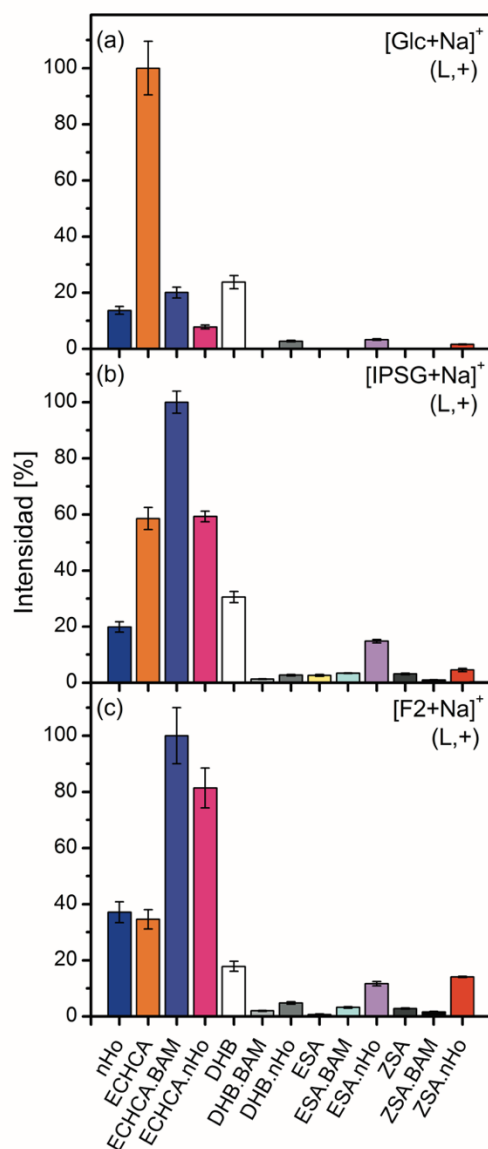


Figura 12. Intensidad normalizada de la señal $[M+Na]^+$ en función de las matrices estudiadas para los hidratos de carbono: (a) Glc, (b) IPSPG y (c) F2. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 20%.

Dado los resultados realmente promisorios obtenidos con el LI ECHCA.nHo en el estudio de hidratos de carbono, en un amplio rango de pesos moleculares, decidimos expandir este estudio incursionando en el comportamiento de ciertos análogos halogenados comerciales del ECHCA como constituyentes ácidos de LIs con nHo como fuente del contraíón. Estos derivados halogenados fueron preparados y probados como matrices MALDI para polipéptidos por el grupo de Karas en 2008³³ e inclusive como integrante de un LI por Cramer en 2010³⁴, en un trabajo donde las conclusiones sobre las posibles ventajas de este LI no son claras. En el capítulo anterior de este trabajo se probaron los LIs de los ácidos E-4ClCHCA y E-4FCHCA con BAM para el estudio de azúcares, no dando buenos resultados. Como se resume en la Figura 13,

los resultados obtenidos para los analitos β CD y M7 muestran que si bien el E-4ClCHCA no es una buena matriz para estos hidratos de carbono LMW y el nHo presenta un buen desempeño para su análisis, el LI E-4ClCHCA.nHo alcanza valores de intensidad para el ion molecular $[M+Na]^+$, de más del doble que las obtenidas para el nHo como matriz. Esta diferencia significativa de intensidad observada entre la matriz iónica y las matrices clásicas constituyentes, indica nuevamente un efecto cooperativo entre los componentes de la misma que mejora las propiedades fotofísicas y/o térmicas de la matriz que la hace más eficiente en el proceso de DI. Los espectros de masa MALDI se muestran en la Figura A3.23 (a-d y h-k). En la literatura ha sido descrito el LI del E-4ClCHCA con 3-aminoquinolina como una eficiente matriz para el estudio de péptidos y proteínas^{19,34}, pudiendo hacer un paralelismo con el LI propuesto con nHo como fuente del contraión.

Por el contrario, como se puede ver también en la Figura 13 y en los espectros de masa mostrados en la Figura A3.23 (e-g y l-n), el ácido E-4FCHCA y sus LIs aquí estudiados muestran un muy bajo desempeño como matrices. Los LIs con BAM y con nHo, muestran una cierta mejora con respecto a la matriz ácida, pero ambos muestran un desempeño inferior al del nHo como matriz. En este caso no existe un efecto cooperativo entre ambos constituyentes del LI que como resultado mejore su eficiencia en el proceso DI. La presencia de halógenos en la posición 4 del anillo aromático de la estructura cinámica del ácido podría afectar la fotofísica tanto de la unidad cinámica como del nHo que se encuentran como par iónico en contacto íntimo en la unidad estructural del LI $[(ArCOO)^-(nHoH)^+]$, usado como matriz.

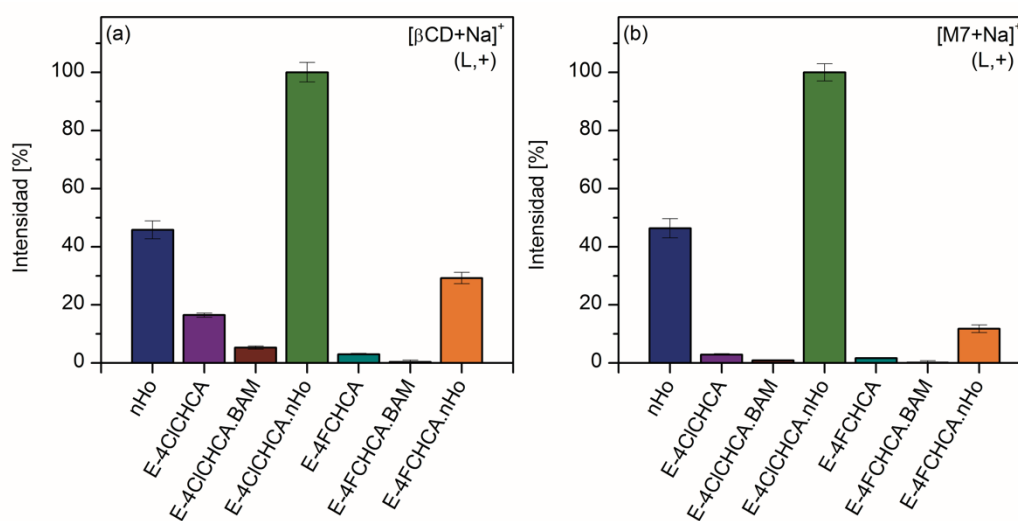


Figura 13. Intensidad normalizada del ion $[M+Na]^+$ en función de las matrices estudiadas para los hidratos de carbono: (a) β CD y (b) M7. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%.

3.3.2.2.1 Mapeo químico superficial por EM MALDI

Como se mencionó en el capítulo anterior, el mapeo químico de iones por espectrometría de masa MALDI (imágenes MALDI-MS) nos permite evaluar el cambio en la distribución de producción de iones del analito en las matrices iónicas propuestas en comparación con las matrices clásicas. De esta forma se analiza el cambio de la homogeneidad química de las muestras en las distintas matrices y se correlaciona esto con los cambios observados a nivel macroscópico en la solidificación de las mismas (imágenes ópticas), analizadas en la sección 3.3.1. El análisis de la homogeneidad química se realiza tomando un ion diagnóstico, característico del analito, y censando la intensidad del mismo en distintas partes de la muestra como se detalla en la sección experimental 3.2.6.

En las Figuras 14 a 17 se muestran las imágenes MALDI-MS para el ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ con las matrices ácidas clásicas ECHCA, DHB, ESA y ZSA en comparación con el nHo y con los LIs ácido.BAM y ácido.nHo. La intensidad porcentual graficada está normalizada a la máxima intensidad obtenida para el ion diagnóstico con las cuatro matrices comparadas en la figura (Int. máxima detallada en el epígrafe de cada figura).

En la Figura 14 se puede observar que, además del aumento en la intensidad de la señal diagnóstico en los LIs en comparación con las matrices clásicas, el LI ECHCA.nHo presenta una mejora en la homogeneidad química de la muestra con respecto a sus constituyentes ECHCA y nHo como matrices individuales. A diferencia de las matrices nHo, ECHCA y ECHCA.BAM (Figura 14a, b y c) donde se observan zonas de la muestra donde la producción de iones es mayor (*hot spots; sweets spots*), el LI ECHCA.nHo presenta una gran abundancia de puntos dulces distribuidos de forma homogénea en toda la muestra (distribución de tipo radial) (Figura 14d). Esto permite que el analito sea fácilmente detectable a la hora de realizar el experimento, mejorando también la reproducibilidad de la señal obtenida en disparos sucesivos del láser sobre la misma muestra y en las réplicas analíticas de la misma muestra. Esto se ve reflejado en una menor desviación estándar para la señal promedio cuando se utiliza como matriz el LI ECHCA.nHo frente a las otras matrices evaluadas, tal cual puede observarse en todas las figuras presentadas (intensidad normalizada de la señal en función de las matrices). Como se mencionó en el capítulo anterior, una muestra homogénea químicamente requiere necesariamente que la intensidad de la señal del analito en todo el *spot* no muestre diferencias significativas. Este aumento de la homogeneidad química en el LI ECHCA.nHo se condice con el aumento de la homogeneidad óptica descrito para esta matriz en la Figura 2d.

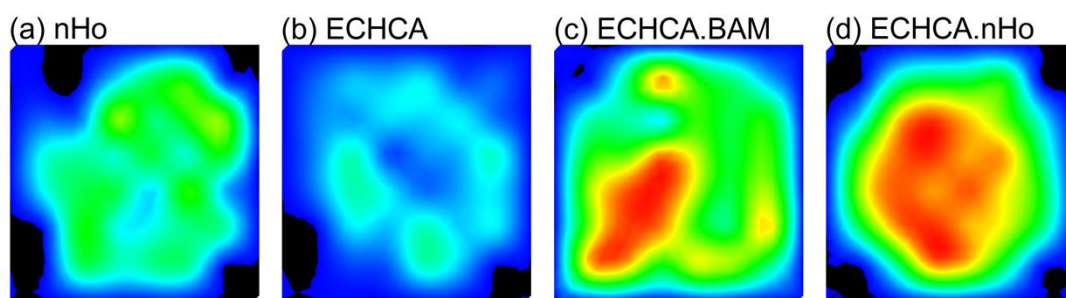


Figura 14. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM y (d) ECHCA.nHo. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 500×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 20%.

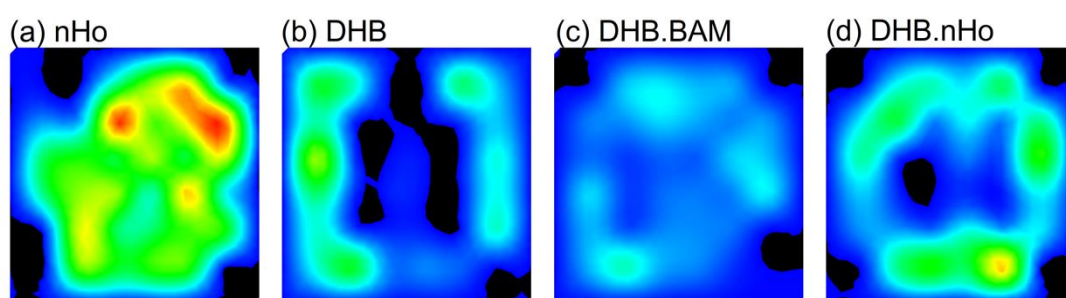


Figura 15. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (*spot*) (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) DHB, (c) DHB.BAM y (d) DHB.nHo. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 200×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 20%.

En el caso del DHB no se observa un aumento de la homogeneidad de la muestra cuando se usan los LI DHB.BAM o DHB.nHo (Figura 15 b, c y d respectivamente). Por el contrario, tanto el ácido neutro como sus LIs presentan en los bordes del *spot* zonas claras donde la producción de iones del analito es mayor, en semejanza a un anillo discontinuo. En el caso de los isómero ESA y ZSA (Figuras 16 y 17, respectivamente) la presencia de nHo en el LIM ESA.nHo y ZSA.nHo, muestra tanto para la intensidad de la señal monitoreada como para la homogeneidad del analito un comportamiento muy similar a lo obtenido con el nHo solo como matriz. En ninguno de los tres casos (DHB.nHo, ESA.nHo y ZSA.nHo) existe una correlación directa de la imagen MALDI con la imagen óptica de la solidificación de estas matrices descritas en las Figuras 3, 4 y 5.

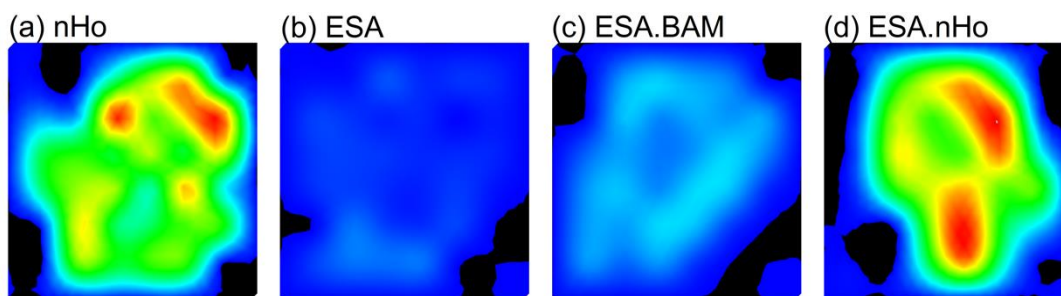


Figura 16. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (*spot*) (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) ESA, (c) ESA.BAM y (d) ESA.nHo. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 200×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 20%.

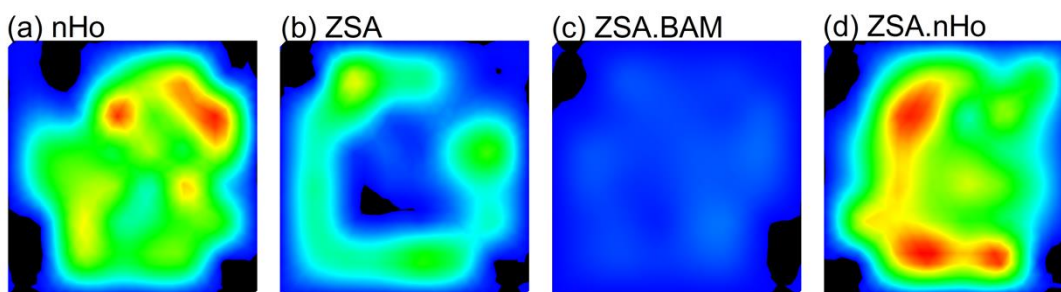


Figura 17. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (*spot*) (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) ZSA, (c) ZSA.BAM y (d) ZSA.nHo. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 200×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 20%.

3.3.2.2.2 Rango dinámico y límite de detección

El rango dinámico y el límite de detección (LOD) de las matrices utilizadas en el análisis de azúcares neutros se realizó en modo lineal positivo, tomando como ejemplo de esta familia de azúcares a la β CD. Este análisis apunta principalmente a la caracterización del LI ECHCA.nHo, el cual ha sido, en todos los ejemplos mostrados, la matriz que muestra una mejora significativa de la DI respecto de la de las especies componentes del LI como matrices por separado. El análisis se realizó en forma comparativa con el LI ECHCA.BAM, el cual ya había sido descrito en la literatura como una matriz LI que mejora las propiedades del ECHCA como matriz para el estudio de péptidos y proteínas⁸ e inclusive hidratos de carbono^{22,23}. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para las matrices clásicas nHo, ECHCA y los LIs ECHCA.BAM y ECHCA.nHo. Se monitoreó la intensidad de la señal del ion $[\beta\text{CD}+Na]^+$. El rango dinámico especificado en la Tabla 2 hace referencia al intervalo de concentraciones en el que la intensidad de la señal del analito responde en forma lineal a los cambios de concentración de la muestra,

con una relación S/R aceptable ($S/R \geq 4$). El LI ECHCA.nHo, además de mostrar una mayor eficiencia en el proceso DI, presenta un LOD mayor (detección de menores concentraciones de analito) y un rango dinámico ligeramente mayor que el ECHCA y el nHo individualmente, incluso mayor que el LI ECHCA.BAM. Ambos LIs presentan una mayor eficiencia de DI, logrando obtener una mayor intensidad de la señal monitoreada para una dada concentración de analito (Figura 18 a y b). Para la mayoría de las matrices la intensidad de la señal se vuelve insensible a los cambios de concentración del analito para valores mayores a 0,5 mg/mL (Figura 18a). Para concentraciones mayores (aproximadamente $> 1,0$ mg/mL) la eficiencia de DI comienza a disminuir probablemente debido a la disminución de la homogeneidad de la muestra y/o formación de clústeres por agregados moleculares del analito.

Un comportamiento diferente se observó para los isómeros ESA y ZSA y sus respectivos LIs con BAM y nHo. Para el par ESA.nHo y ZSA.nHo, si bien la intensidad de la señal del analito es del mismo orden de magnitud que la generada por el nHo y mayor a la del ácido ESA y ZSA individualmente, los LI presentan un menor rango dinámico y un LOD y sensibilidad similar al del nHo solo (Figura 18 c y e), no mostrando una mejora en comparación con las unidades estructurales por separado.

Tabla 2. Límite de detección (LOD) y rango dinámico (linealidad) de β CD en modo iónico positivo. Ion monitoreado $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$.

| Nº | Matriz | β CD | |
|----|-----------|------------------|-----------------------------|
| | | LOD ^a | Rango dinámico ^a |
| 1 | nHo | 3,55 | 3,55 a 35,5 |
| 2 | ECHCA | 7,1 | 14,2 a 71,3 |
| 3 | ECHCA.BAM | 3,55 | 3,55 a 35,5 |
| 4 | ECHCA.nHo | 1,78 | 1,78 a 35,5 |
| 5 | ESA | 7,1 | 7,1 a 71,3 |
| 6 | ESA.BAM | 3,55 | ----- |
| 7 | ESA.nHo | 3,55 | 3,55 a 17,75 |
| 8 | ZSA | 3,55 | 3,55 a 17,75 |
| 9 | ZSA.BAM | 3,55 | ----- |
| 10 | ZSA.nHo | 3,55 | 7,1 a 17,75 |

^a LOD y Rango dinámico. Indicado como pmol de analito depositado sobre el electrodo porta muestra; $S/R \geq 4$.

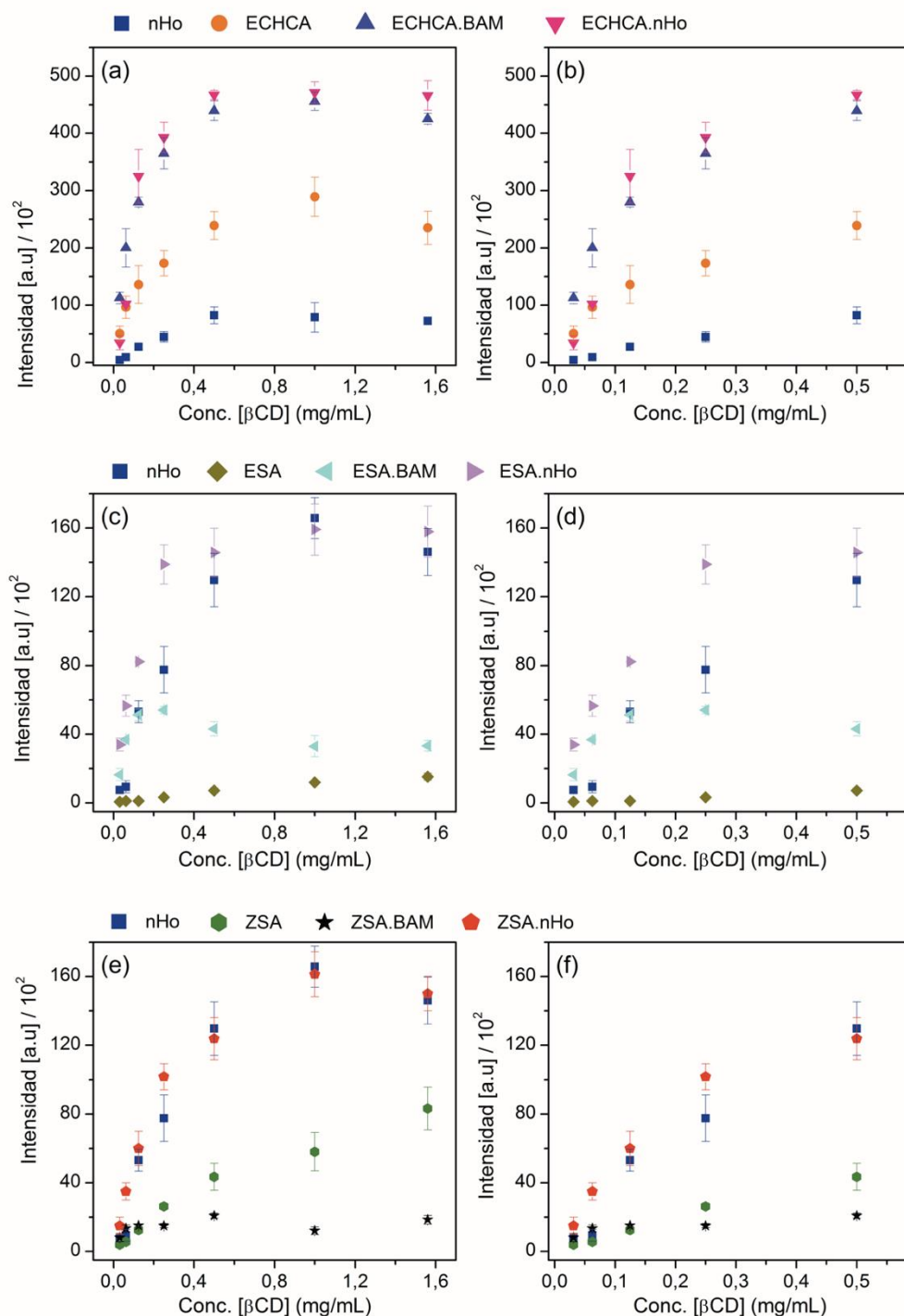


Figura 18. Intensidad absoluta vs. concentración. Analito: β CD, Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Matrices: (a,b) nHo, ECHCA, ECHCA.BAM y ECHCA.nHo, (c,d) nHo, ESA, ESA.BAM y ESA.nHo y (e,f) nHo, ZSA, ZSA.BAM y ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L, +). (a,c,e) Todo el rango de concentraciones estudiado. (b,d,f) Ampliación de la región de comportamiento lineal.

3.3.2.2.3 Experimentos MALDI con matrices modelo análogas al ECHCA.nHo

Se realizaron un conjunto de experimentos adicionales y específicos, utilizando compuestos modelo seleccionados de manera de ayudar a interpretar y comprender las particulares propiedades del LI ECHCA.nHo como matriz detallada anteriormente.

En primer lugar, se seleccionó el nHo.HCl ya que este compuesto iónico tiene como tal la misma estructura unitaria $[\text{nHo}+\text{H}]^+$, que se encuentra en la matriz iónica propuesta ECHCA.nHo, siendo la diferencia clave que el contraión, en este caso el $[\text{Cl}]^-$, no absorbe la radiación del láser utilizado. Como está descrito en la literatura y en la sección 3.3.1 de este capítulo, tanto el nHo como la especie protonada ($[\text{nHo}+\text{H}]^+$), si bien muestran espectros de absorción UV-vis diferentes, ambos absorben a 355 nm en solución⁹. Para corroborar este comportamiento en estado sólido se registraron los espectros de reflectancia difusa UV-vis de ambos compuestos (Figura 1c). Con fines comparativos se incluyó al LI ECHCA.BAM en estas mediciones, ya que en este compuesto hay un único cromóforo, la unidad carboxilato, que absorbe a 355 nm (Figura 1c). En la Figura 19 se muestran los espectros de masa obtenidos para el βCD utilizando las matrices (a) nHo, (b) nHo.HCl, (c) ECHCA y (g) ECHCA.BAM. Se observa que el nHo.HCl en modo iónico positivo disminuye considerablemente su eficiencia como matriz MALDI, con una disminución de la intensidad de la señal y por lo tanto de la eficiencia de DI de casi un orden de magnitud. Sin embargo, como ya habíamos visto el LI ECHCA.BAM ve incrementada su eficiencia como matriz. Esta tendencia se ve reflejada en la intensidad porcentual normalizada del ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ en las distintas matrices estudiadas en la Figura 20.

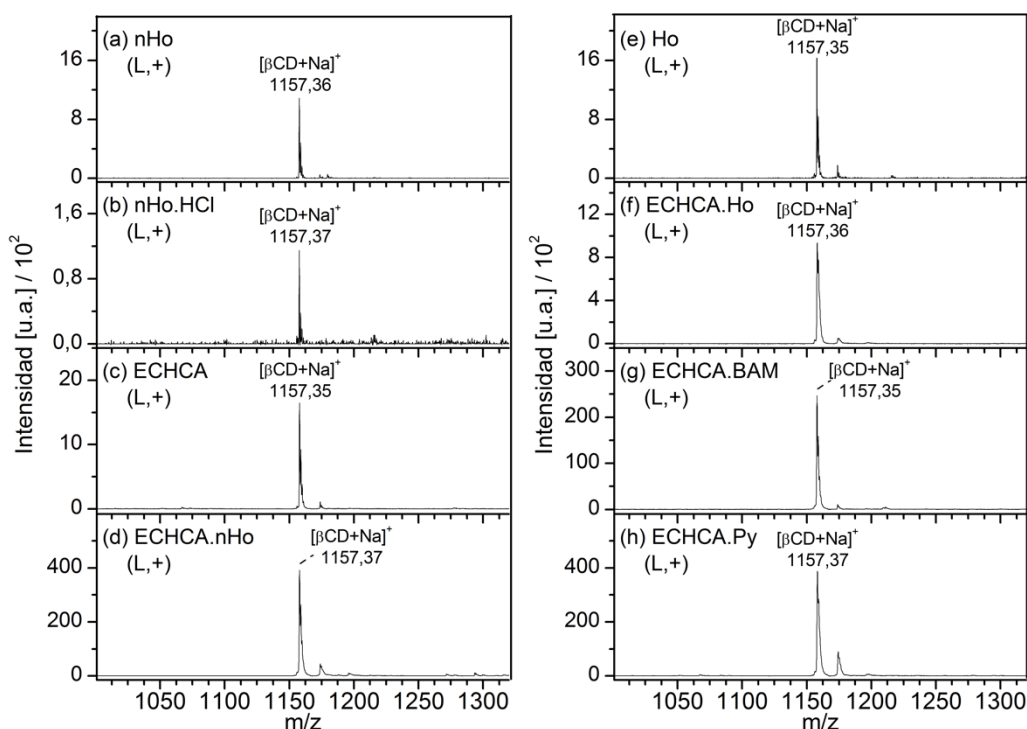


Figura 19. Espectros de masa MALDI. Analito: βCD . Matrices: (a) nHo, (b) nHo.HCl, (c) ECHCA, (d) ECHCA.nHo, (e) Ho, (f) ECHCA. Ho, (g) ECHCA.BAM y (h) ECHCA.Py. Modo de análisis: Lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 20%.

Frente a la posibilidad que en el LI ECHCA.nHo el efecto real del nHo sea simplemente su carácter básico en el estado electrónico fundamental y/o el muy aumentado en el estado

electrónico excitado (inducción de reactividad de la matriz LI ECHCA.nHo por acción de la radiación UV-vis), agregamos al estudio dos posibles bases, vinculados estructuralmente al nHo, para preparar nuevos LI del ECHCA. Estas bases son el hermano (Ho) ($pK_{aH_2O} = 7,7$)³⁵ y la piridina (Py) ($pK_{aH_2O} = 5,22$)³, las cuales cuentan estructuralmente con la unidad responsable del carácter básico del nHo. El Ho, miembro de la familia de las β -carbolinas que presenta un grupo metilo como sustituyente en la posición C-1 del nHo (ver estructura en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 18), ya ha sido descrita por nuestro grupo de investigación como matriz MALDI para el estudio de oligosacáridos sulfatados³⁶. En el caso del par Ho y el $[Ho+H]^+$ ambos presentan espectros de absorción UV-vis similares al del par nHo y $[nHo+H]^+$ respectivamente, con importante absortividad molar en solución a 355 nm³⁷. Por su parte la piridina (Py), base ampliamente utilizada en química orgánica no presenta absorción a 355 nm ni en su forma neutra ni en su forma protonada $[Py+H]^+$ ^{38,39} (Figura A3.7 e y f). En la Figura 19 se muestran los espectros de masa de la β CD para las matrices (c) ECHCA, (d) ECHCA.nHo, (e) Ho, (f) ECHCA.Ho y (h) ECHCA.Py. En la Figura 20 se resumen los resultados obtenidos como intensidad normalizada porcentual del ion diagnóstico obtenido con las distintas matrices. En comparación con el nHo, el Ho presenta un peor desempeño como matriz en estas condiciones experimentales. Además, como constituyente del LI ECHCA.Ho, no genera un efecto cooperativo positivo que mejore significativamente la eficiencia en el proceso de DI, ya que la intensidad de la señal monitoreada es del mismo orden de magnitud que la obtenida con el ECHCA solo. Si bien el carácter iónico $(\Delta pK_a)^2$ de estas matrices es similar (ECHCA.nHo y ECHCA.Ho), dado los valores de pK_a tan cercanos de las bases, la diferencia en el cambio de comportamiento, en relación a la eficiencia de DI, puede deberse a factores estéricos. En el caso del Ho el metilo en el C-1 de la unidad piridínica dificulta la aproximación de los grupos ionizables de ambas unidades (-COOH y N-piridínico), lo que impediría el contacto íntimo entre ambas estructuras y por lo tanto el efecto cooperativo que se observa en caso del ECHCA.nHo en el proceso de DI.

Finalmente, si bien la Py no funciona como matriz MALDI por si sola ya que no absorbe fotones a 355 nm, el LI ECHCA.Py presenta un incremento significativo de la intensidad de la señal diagnóstico, un orden de magnitud mayor que lo observado en el ECHCA individualmente. En este caso, el carácter iónico de esta matriz es menor que en el LI ECHCA.nHo dado el menor carácter básico de la Py. Sin embargo, ambas matrices iónicas presentan un comportamiento similar en la eficiencia de DI por MALDI para este analito. Este hecho demuestra que, efectivamente el LI ECHCA.nHo actúa como un nuevo cromóforo con mejores propiedades para cumplir con la función de matriz MALDI, probablemente porque la posición relativa de los

grupos ionizables de ambas unidades estén lo suficientemente próximos espacialmente como para generar un efecto cooperativo entre las formas aniónicas y catiónicas, tanto en estado electrónico fundamental como en el estado electrónico excitado. Por lo tanto, el efecto observado del aumento de eficiencia de DI del ECHCA.nHo no sería la simple suma de las eficiencias de dos matrices que actúan individualmente en la misma muestra.

Si bien el LI ECHCA.Py muestra un aumento significativo de la intensidad de la señal, su falta de homogeneidad en la distribución del analito en el *spot* y la dificultad de obtener y mantener estable en el tiempo este LI, debido al bajo carácter iónico del mismo y a la alta volatilidad de Py en las condiciones de vacío de la cámara MALDI, determina que no sea una matriz de elección a la hora de efectuar estos experimentos. Sin embargo, pese a estas limitaciones, el estudio comparativo del comportamiento de ECHCA.Py, ECHCA.Ho y ECHC.nHo y el conocimiento de la fotofísica y la fotoquímica de las tres bases, nos permitirá hacer un análisis más detallado de las posibles causas de la llamativa mejora de las dos matrices iónicas ECHCA.nHo y ECHCA.BAM.

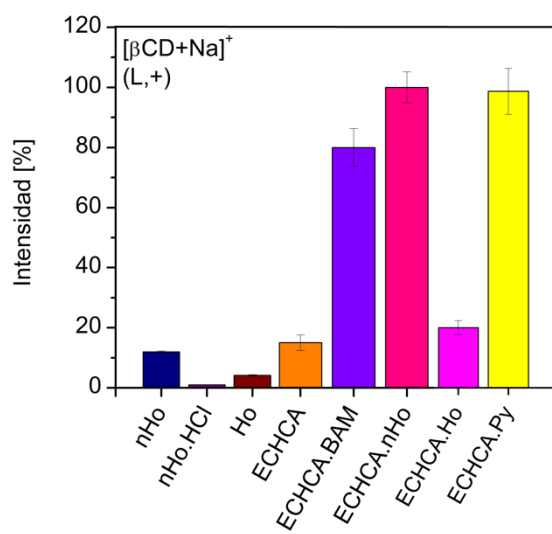


Figura 20. Intensidad normalizada de la señal del ion $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 20%.

3.3.2.3 Carbohidratos Sulfatados

El análisis de oligosacáridos sulfatados fue realizado por espectrometría de masa MALDI en el modo iónico negativo y con las trayectorias lineal y reflectrón. Como se discutió en el capítulo anterior, estos hidratos de carbono muestran una eficiencia de ionización mayor en el modo negativo debido a la presencia del grupo sulfato en su estructura que estabiliza particularmente a su forma aniónica $[\text{R}-\text{OSO}_3]^{-40,41}$. Como ejemplo, en la Figura 21, se muestra el espectro de masa obtenido en modo negativo de la neocarratetraosa-4¹,4³-disulfato disódica

(NCT; peso molecular = 834,62 Da) utilizando las matrices nHo, ECHCA y los LIs ECHCA.BAM y ECHCA.nHo. La aplicación de estas matrices demostró que ambos LIs muestran un mejor desempeño en el proceso de DI, alcanzando valores de intensidad para el ion monitoreado $[NCT-Na]^-$ de más del doble que los obtenidos con las matrices clásicas nHo y ECHCA. Si bien el LI ECHCA.nHo muestra una eficiencia de DI ligeramente mayor al LI con BAM, esta diferencia no es significativa comparado con lo observado con las matrices ECHCA y nHo. Cuando se utiliza el ECHCA como matriz, el ion molecular intacto $[M-Na]^-$ se detecta como una señal de baja intensidad comparada con las señales propias de la matriz en esa región y el correspondiente fragmento de m/z 709 formado durante el proceso MALDI a partir del ion molecular (ISD), se detecta como una señal con muy baja relación S/R. Las señales correspondientes a clústeres propios de la matriz de intensidad importante se indican con * (ej. en la Figura 21 la señal a m/z 799 pico base en esta región del espectro). Para la familia de los hidratos de carbono sulfatados la fragmentación en modo negativo muestra como proceso predominante la disociación de los grupos sulfato dando lugar a nuevas señales debidas a la pérdida de la unidad SO_3 desde el ion $[M-Na]^-$ ^{28,42}. Esta fragmentación se ve muy favorecida por razones termodinámicas y entrópicas debido a la labilidad de la unión O-S. Así, en el modo lineal se detecta la fragmentación rápida que ocurre durante el proceso MALDI dentro de la cámara de ionización (ISD). Los fragmentos más importantes de esta familia de azúcares son del tipo $[M-Na-nSO_3Na+nH]^-$. Para la NCT el fragmento de m/z 799 es el de estructura con $n = 1$ de fórmula $[NCT-Na-SO_3Na+H]^-$ (ver Figura 21 y A3.24)^{40,41}.

El conjunto de resultados presentados para la NCT nos permite concluir que, en estas condiciones experimentales, optimizadas como las más suaves, tanto el nHo como el LI ECHCA.nHo se comportan como matrices calientes, induciendo en la NCT una fragmentación en la cámara de ionización (ISD) importante, a diferencia del ECHCA y el LI ECHCA.BAM donde la fragmentación en la fuente es menor. El carácter de “matriz caliente” del nHo mostrado en los análisis MS/MS de oligosacáridos sulfatados ha sido descrito tiempo atrás en la literatura^{29,41,42}.

Para completar este análisis de resultados, en la Figura A3.24 se muestran los espectros de masa obtenidos para la NCT usando como matrices los análogos halogenados del ácido α -cianocinámico, E-4ClCHCA y el E-4FCHCA, y sus LIs con BAM y con nHo. A diferencia de los casos descritos anteriormente donde siempre el nHo era la matriz que requería la mayor fluencia umbral para mostrar buena relación S/R en comparación con el ECHCA y sus LIs, estos análogos clorado y fluorado del ECHCA tienen un umbral de fluencia más alto. Es por esto que en estos experimentos se fija la fluencia del láser en un valor de 40%, fluencia a la cual se logra

la DI de la NCT con la matriz E-4ClCHCA. Sin embargo y a pesar del aumento de la fluencia del láser no es posible obtener la señal asociada al ion $[NCT-Na]^-$ con la matriz E-4FCHCA. Como es sabido, aumentos mayores en la fluencia del láser producen un aumento significativo de la ISD.

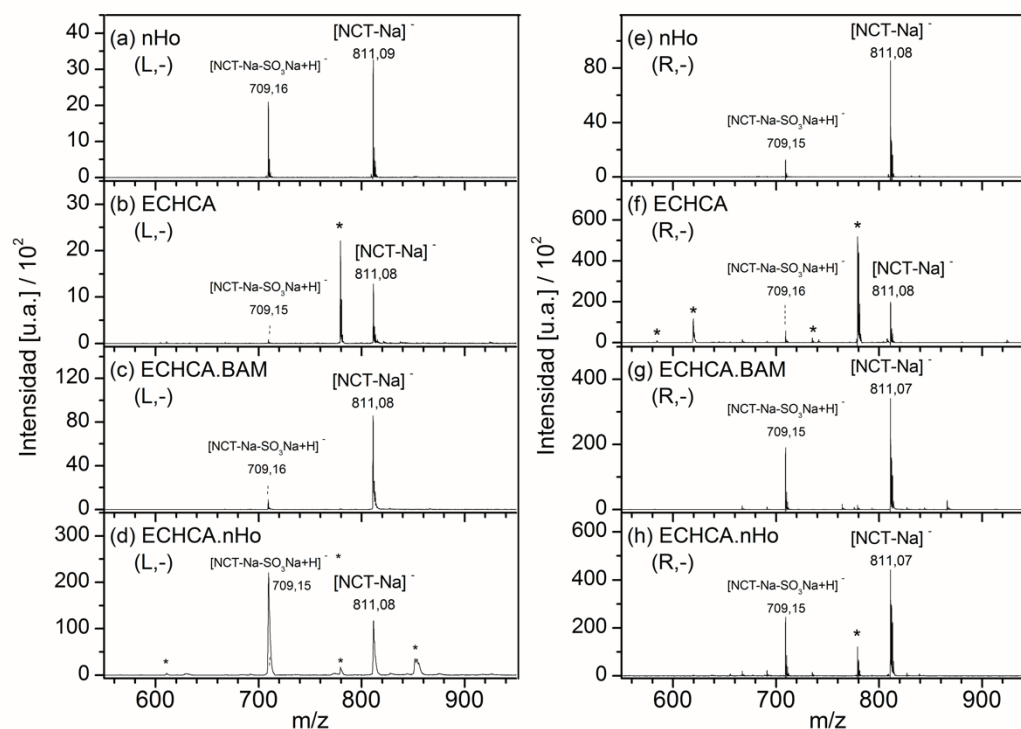


Figura 21. Espectros de masa MALDI. Analito: NCT. Matrices: (a, e) nHo, (b, f) ECHCA, (c, g) ECHCA.BAM y (d, h) ECHCA.nHo. Modo lineal negativo (L, -): a-d; Modo reflectrón negativo (R, -): e-h. Fluencia del láser: 20%.

En el caso del E-4ClCHCA, en la Figura A3.24 se muestran los espectros obtenidos a 20% y 40% de fluencia del láser (Figura A3.24 (a-g) y (h-n) respectivamente). Un hecho interesante se observa en el caso del LI E-4ClCHCA.nHo, donde si bien la intensidad de la señal correspondiente al ion $[NCT-Na]^-$ es del mismo orden de magnitud que para el nHo (Figuras 22b y A3.24 d y a), la intensidad relativa de la señal observada a m/z 709 (fragmento 1 de la NCT), se ve significativamente disminuida en el LI E-4ClCHCA.nHo. Es decir que el LI se comporta como una matriz más fría que las unidades estructurales que la componen, reduciendo la ISD del analito. En este caso la presencia de ambos componentes genera un efecto de enfriamiento de la matriz para el análisis de hidratos de carbono sulfatados. A pesar de este aspecto positivo, en los estudios comparativos entre matrices para el análisis de este tipo de hidratos de carbono, el LI ECHCA.nHo siempre presentó un mejor desempeño (eficiencia DI y S/R) como matriz MALDI que sus derivados clorado y fluorado. A modo de resumen, las gráficas de las intensidades normalizadas del ion $[NCT-Na]^-$ en función de las matrices utilizadas se muestran en la Figura 22.

A diferencia de lo observado para el derivado clorado, la presencia del E-4FCHCA parece inhibir casi por completo la capacidad del nHo para volatilizar e ionizar a la NCT en modo negativo. Nuevamente y como ya se dijo, se observa claramente que la eficiencia en el proceso de DI del LI ECHCA.nHo es mayor a la simple suma de las eficiencias individuales del ECHCA y el nHo solos y mayor a la obtenida con E-4ClCHCA, E-4FCHCA y sus LI. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas en la sección 3.3.2.2 relacionada con el análisis de hidratos de carbono neutros.

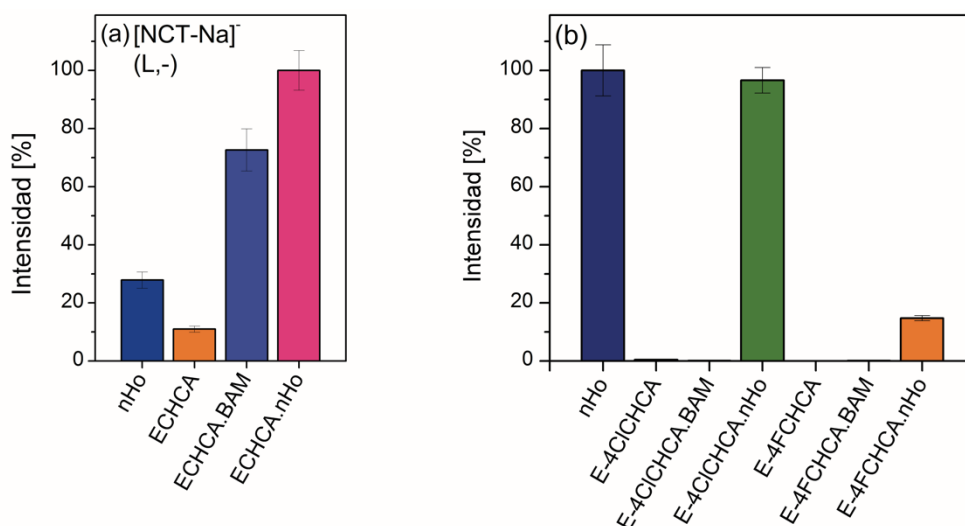


Figura 22. Intensidad normalizada del ion $[M-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas. Analito: NCT. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: (a) 20% y (b) 40%.

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados descritos en este capítulo demuestran que los nuevos LI candidatos a matrices MALDI preparados usando como constituyentes los ácidos cinámicos y otras matrices ácidas clásicas y el nHo como base fuente del contraión, no muestran un comportamiento común y que su desempeño como matriz depende de la naturaleza de la matriz ácida en cuestión. En este sentido el cambio en el grado de ionicidad de las distintas matrices propuestas puede ser el responsable del cambio observado en la eficiencia de DI en relación a los componentes por separado. Al disminuir la fuerza del ácido ($pK_{aE-4ClCHCA} < pK_{aECHCA} < pK_{aDHB} < pK_{aESA}$) en relación a la base (nHo), disminuye el carácter iónico del compuesto por lo que se modifica la naturaleza de las interacciones intermoleculares entre las unidades componentes de la matriz, pasando de interacciones iónicas a interacciones de tipo no covalentes (enlace puente de hidrógeno, fuerzas de Wan der Waals). Este cambio en las interacciones modifica las propiedades físico-químicas de la matriz y por lo tanto su eficiencia en el proceso de DI, a pesar de que todas ellas absorben eficientemente la radiación del láser utilizado en el proceso MALDI.

Como se desarrolló en el capítulo anterior, proponer una nueva matriz MALDI y tratar de comprender su comportamiento, implica no solo evaluar su eficiencia en el proceso de DI para un tipo de analito (familia) sino también evaluar sus propiedades físico-químicas y las de las muestras matriz-analito preparadas, como la homogeneidad de las mismas, la capacidad de la matriz de minimizar la descomposición en la fuente (ISD) del analito y la cantidad e intensidad de señales propias de la matriz, lo cual se vuelve muy relevante para su aplicación en el análisis de compuestos de bajo peso molecular (LMW). En el caso de las matrices iónicas ECHCA.nHo, E-4ClCHCA.nHo y E-4FCHCA.nHo los espectros LDI tanto en el modo de análisis positivo o negativo pueden interpretarse como la supervivencia de los iones preformados de la matriz durante la ablación y evolución de la pluma, dando lugar a la separación de las unidades estructurales $[\text{ácido-H}]^-[n\text{Ho}+\text{H}]^+$. De esta forma se detectan mayoritariamente en el modo positivo de análisis el patrón iónico característico del nHo y en el modo negativo de análisis el patrón característico al ácido. Esto puede observarse como una mejora en el espectro LDI de la mezcla con respecto a lo que se esperaría obtener si se sumaran los espectros LDI de los componentes por separado. Para los isómeros ESA y ZSA y para el DHB, si bien la presencia del nHo en el LI disminuye las señales propias del ácido neutro como matriz individual, estas no desaparecen completamente como en el caso del ECHCA. Por el contrario, aparecen nuevas señales correspondientes a la unidad supramolecular ácido.nHo, que como se mencionó anteriormente sobrevive al proceso de DI gracias a su carácter no iónico. En los espectros LDI de estas especies, por encima de m/z 500 la cantidad de señales observadas en el LI con nHo es la misma que para el ácido solo, aunque en el LI se ve disminuida su intensidad. Esto puede deberse al bajo carácter iónico de estas mezclas donde coexisten tanto especies iónicas como neutras.

El estudio morfológico macroscópico (imágenes ópticas) de los LIs propuestos y el mapeo superficial de iones por EM MALDI (imagen MALDI-MS) muestran que ambas propiedades no necesariamente se correlacionan entre sí y deben ser evaluadas individualmente. En el caso del ECHCA.nHo se observa un gran aumento de la homogeneidad óptica en comparación con sus componentes por separado que se condice con el aumento en la homogeneidad química observada en la imagen MALDI-MS, esto mejora la reproducibilidad de los resultados en la misma muestra y en sus réplicas analíticas y facilita el desarrollo experimental. Sin embargo, esto no es generalizado para todos los LIs evaluados. En el caso de los LIs ESA.nHo y ZSA.nHo el aumento de la homogeneidad óptica en la solidificación de la matriz no condiciona un aumento en la homogeneidad en la producción de iones de analito en todo el *spot*.

Para todos los oligosacáridos estudiados el LI ECHCA.nHo ha demostrado ser una mejor matriz que sus constituyentes por separado. Estas conclusiones se replican en todos los modos de análisis (positivo, negativo, lineal y reflectrón), como así también en el modo MS/MS que, en nuestro caso (MALDI-TOF/TOF), la producción de iones fragmentos está relacionado directamente con la matriz utilizada. Esta marcada diferencia en la eficiencia de desorción/ionización que se observa para el LI ECHCA.nHo respecto del ECHCA y el nHo por separado no se reproduce en los otros LIs propuestos ya que la intensidad obtenida para el ion diagnóstico en LIs no supera la intensidad obtenida con algunos de sus componentes solos. Un caso especial es el del LI E-4ClCHCA.nHo, que en modo positivo presenta una mejora significativa del proceso de desorción/ionización respecto de sus componentes por separado, pero este comportamiento no se repite en modo negativo ya que la intensidad de la señal del ion molecular intacto es del mismo orden de magnitud que la obtenida para nHo como matriz. Sin embargo, este LI demostró ser una matriz más fría que sus constituyentes, logrando disminuir drásticamente la descomposición en la fuente del analito. Cuando se comparan los resultados obtenidos en modo positivo para los LIs con nHo que conservan el núcleo ácido α -cianocinámico, la naturaleza del sustituyente en el anillo aromático de éste podría estar jugando un rol determinante en su eficiencia como matriz (siendo la tendencia en la intensidad de la señal: ácido α -ciano-4-OH-cinámico > ácido α -ciano-4-Cl-cinámico >> ácido α -ciano-4-F-cinámico), pudiendo ser este efecto de índole fotofísico.

La superioridad del ECHCA.nHo como matriz MALDI para el análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular probablemente se debe al contacto íntimo de las unidades estructurales que lo componen, que por sus propiedades ácido-base (ΔpK_a), puede ser descrito como la sal $[ECHCA-H]^-.[nHo+H]^+$, formando así una nueva estructura cromofórica con propiedades fotofísicas y térmicas más apropiadas para el rol de matriz MALDI. Sin embargo, el carácter iónico no es la única propiedad a tener en cuenta para mejorar la eficiencia en el proceso de DI. Del estudio comparativo con bases análogas estructuralmente al nHo, como Ho y Py, surge que es necesario un contacto íntimo entre ambas unidades estructurales en el LI para generar un efecto cooperativo que resulte en un aumento de la eficiencia en la DI, mayor a la suma de lo que se obtendría con ambos componentes por separado. Esta información es de suma importancia a la hora de evaluar las propiedades fotofísicas, fotoquímicas y térmicas de las matrices para tratar de comprender su funcionamiento. Una particularidad del nHo es el aumento drástico de su carácter básico en el estado electrónico excitado, lo que modifica significativamente el carácter iónico del par en contacto ácido-base que constituye la mezcla^{4,43,44}, lo que podría modificar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de la mezcla. En

los capítulos siguientes se describirán estudios comparativos de diversas propiedades para LI y sus partes componentes con el objetivo de dilucidar si existe una correlación en los cambios de estas propiedades y su eficiencia como matriz MALDI.

3.5 REFERENCIAS

- 1 M. L. Salum, C. J. Robles and R. Erra-Balsells, *Org Lett*, 2010, **12**, 4808–4811.
- 2 P. Kobylis, H. Lis, P. Stepnowski and M. Caban, *J Mol Liq*, 2019, **284**, 328–342.
- 3 F. Rived, M. Rosés and E. Bosch, *Anal Chim Acta*, 1998, **374**, 309–324.
- 4 R. Erra-balsells and H. Nonami, *Environment Control in Biology*, 2002, **40**, 55–73.
- 5 M. Balón, J. Hidalgo, P. Guardado, M. A. Muñoz and C. Carmona, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1993, 99–104.
- 6 T. Porta, C. Grivet, R. Knochenmuss, E. Varesio and G. Hopfgartner, *Journal of Mass Spectrometry*, 2011, **46**, 144–152.
- 7 A. E. Fazary and Y. H. Ju, *J Solution Chem*, 2008, **37**, 1305–1319.
- 8 D. W. Armstrong, L. K. Zhang, L. He and M. L. Gross, *Anal Chem*, 2001, **73**, 3679–3686.
- 9 O. I. Tarzi, Director: Rosa Erra-Balsells N° 4015, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2006.
- 10 M. L. Salum, P. Arroyo Mañez, F. J. Luque and R. Erra-Balsells, *J Photochem Photobiol B*, 2015, **148**, 128–135.
- 11 H. N. Abdelhamid, *Methods Protoc*, 2018, **1**, 1–31.
- 12 H. N. Abdelhamid, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2016, **77**, 122–138.
- 13 M. Klessinger and J. Michl, *Excited states and photochemistry of organic molecules*, VCH Publishers, Inc, New York, 1995, vol. 53.
- 14 N. J. Turro, V. Ramamurthy and J. C. Scaiano, *Principles of Molecular Photochemistry: An Introduction*, University Science Books, Sausalito, 2009.
- 15 J. L. Casas-Hinestroza, M. Bueno, E. Ibáñez and A. Cifuentes, *Anal Chim Acta*, 2019, **1081**, 32–50.
- 16 P. Kobylis, M. Kasprzyk, A. Nowacki and M. Caban, *J Mol Liq*, 2022, **349**, 118106.

- 17 M. Beaufour, D. Ginguené, R. Le Meur, B. Castaing and M. Cadene, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, **29**, 1981–1994.
- 18 F. Chen, B. Gülbakan, S. Weidmann, S. R. Fagerer, A. J. Ibañez and R. Zenobi, *Mass Spectrom Rev*, 2016, **35**, 48–70.
- 19 R. Cramer, *Advances in MALDI and Laser-Induced Soft Ionization Mass Spectrometry*, Springer, Switzerland, 2016th Edi., 2016.
- 20 R. B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, Second Edi., 2010.
- 21 K. Hiraoka, *Fundamentals of mass spectrometry*, Springer, New York, 2013, vol. 9781461472.
- 22 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 2020, **39**, 586–679.
- 23 J. A. Crank and D. W. Armstrong, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, **20**, 1790–1800.
- 24 B. Stahl, M. Steup, M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal Chem*, 1991, **63**, 1463–1466.
- 25 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 2018, **37**, 353–491.
- 26 H. J. An and C. B. Lebrilla, *Mass Spectrom Rev*, 2011, **30**, 560–578.
- 27 M. Mank, B. Stahl and G. Boehm, *Anal Chem*, 2004, **76**, 2938–2950.
- 28 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 1999, **18**, 349–450.
- 29 M. L. Salum, L. M. Itovich and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, **48**, 1160–1169.
- 30 C. D. Calvano, A. Monopoli, T. R. I. Cataldi and F. Palmisano, *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**, 4015–4038.
- 31 M. L. Salum, S. L. Giudicessi, T. Schmidt De León, S. A. Camperi and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2017, **52**, 182–186.
- 32 Bruker Daltonik GmbH, *Manual*, 2006, **0**, 54.
- 33 T. W. Jaskolla, W. D. Lehmann and M. Karas, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 12200–12205.
- 34 M. W. Towers, J. E. McKendrick and R. Cramer, *J Proteome Res*, 2010, **9**, 1931–1940.
- 35 M. C. Biondic and R. Erra-Balsells, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1997, 1323–1328.

- 36 H. Nonami, K. Tanaka, Y. Fukuyama and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**, 285–296.
- 37 T. Etienne, T. Very, E. A. Perpète, A. Monari and X. Assfeld, *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, **117**, 4973–4980.
- 38 I. Kaljurand, T. Rodima, I. Leito, I. A. Koppel and R. Schwesinger, *Journal of Organic Chemistry*, 2000, **65**, 6202–6208.
- 39 M. Lökov, S. Tshepelevitsh, A. Heering, P. G. Plieger, R. Vianello and I. Leito, *European J Org Chem*, 2017, **2017**, 4475–4489.
- 40 Y. Fukuyama, S. Nakaya, Y. Yamazaki and K. Tanaka, *Anal Chem*, 2008, **80**, 2171–2179.
- 41 Y. Fukuyama, M. Ciancia, H. Nonami, A. S. Cerezo, R. Erra-Balsells and M. C. Matulewicz, *Carbohydr Res*, 2002, **337**, 1553–1562.
- 42 M. Ciancia, Y. Sato, H. Nonami, A. S. Cerezo, R. Erra-Balsells and M. C. Matulewicz, *Arkivoc*, 2005, **2005**, 319–331.
- 43 M. C. Biondic and R. Erra-Balsells, *J Photochem Photobiol A Chem*, 1990, **51**, 341–353.
- 44 T. F. Vert, Z. Sanchez and O. A. Torrent, *Journal of Photochemistry*, 1983, **23**, 355–368.

Capítulo 4 : Estabilidad térmica de las matrices MALDI estudiadas.

4.1 INTRODUCCIÓN

Como se describió en el capítulo introductorio de este trabajo, el proceso MALDI se basa en una cascada muy compleja de eventos desencadenados por una rápida absorción de energía, entregada por un pulso láser del orden de los nanosegundos. La irradiación láser genera estados excitados que inician múltiples procesos de relajación y distribución de energía, la liberación conjunta de moléculas de analito y de matriz desde una fase condensada a la fase gaseosa, así como la ionización primaria y secundaria de esas moléculas que finalmente producen iones del analito intacto en cantidades detectables. Existe un gran consenso en que la sensibilidad del análisis por esta técnica está determinada tanto por las propiedades fisicoquímicas del sistema analito/matriz (absortividad, afinidad protónica, relación molar analito-matriz, potenciales de ionización, etc) como también por los parámetros de irradiación¹⁻⁶. Muchos esfuerzos se han realizado con el objetivo de clarificar tanto los mecanismos de ionización como la etapa inicial de eyección del material desde la fase sólida. En este sentido se estudia tanto la cinética como la termodinámica y la química de las especies involucradas en estos procesos⁶⁻⁹.

Para la eyección del material de la fase condensada a la fase gaseosa se proponen dos mecanismos. En el primero de ellos denominado desorción térmica, la eyección del material es impulsada por la sublimación del mismo causada por el incremento de la temperatura en la superficie de la muestra en una ventana muy corta de tiempo. En este proceso las moléculas de matriz vibracionalmente excitadas se desprenden rápidamente de las capas superiores y el analito incorporado en las mismas es arrastrado a la fase gaseosa. Por encima de la temperatura umbral esto lleva a una transición de fase casi completa desde la fase sólida a la gaseosa de las capas superiores de la muestra. Este modelo predice que la energía interna de las partículas eyectadas es directamente dependiente de la temperatura alcanzada en la superficie debido a la irradiación del láser y los procesos de relajación térmicos^{6,10,11}.

El segundo de los modelos, llamado comúnmente ablación, describe una perturbación explosiva de un volumen muy grande de muestra inducido por un sobrecalentamiento rápido (ventana muy corta de tiempo) de la misma. En este modelo, la cantidad de energía entregada por el pulso láser supera ampliamente el consumo de todas las vías de desactivación térmica (fusión, sublimación, transporte de energía), lo que permite un calentamiento supercrítico de la superficie. La tensión térmica de la muestra conduce al proceso de ablación que involucra todo el volumen de la misma. Esto genera la expulsión de moléculas individuales, pero también de

grandes agregados de material (clústeres) que luego pueden desintegrarse en etapas posteriores de desarrollo de la pluma de ablación^{6,10,12,13}.

En este sentido Karas^{4,8} y Jaskolla⁸ propusieron un modelo de ionización primaria que hoy en día se conoce como el modelo de clústeres (en inglés "*The Cluster Model*") aunque en sus orígenes se denominó "afortunados sobrevivientes" (en inglés "*The lucky survivors*"). En este modelo se propone que los iones están preformados en la fase sólida y se liberan por desorción/ablación a la fase gaseosa. Se considera que la neutralización de estos iones durante la evolución de la pluma es muy grande por lo que los iones detectados son sobrevivientes muy afortunados. Dada la naturaleza neutra de la materia, la separación de cargas en este modelo se atribuye a las fuerzas mecánicas durante el proceso de ablación. Algunos de los grandes clústeres de material eyectados desde la muestra presentan un exceso aleatorio de carga, los cuales se descomponen liberando los iones en fase gaseosa. Este tipo de separación de cargas requiere un evento fuertemente ablativo. En condiciones de vaporización fototérmica suave (desorción) la cantidad de iones liberados sería muy pequeña, debido a que la energía interna no sería suficiente como para liberar los iones desde el clúster. Dentro de los clústeres la carga puede migrar de una especie a otra ya sea por transferencia de protones, cationes o electrones. Dependiendo de la movilidad de estos portadores de carga, las reacciones secundarias de ionización pueden equilibrarse dando los iones más favorables termodinámicamente. Este modelo no cubre todo el rango de condiciones experimentales en la que se observan iones por MALDI, ya que se ha demostrado que pueden observarse iones a fluencias del láser en la que no se observa la formación de clústeres (régimen de desorción térmica)¹.

En relación a esto, Talroze y col.¹⁴⁻¹⁸ desarrollaron un modelo llamado asistencia neumática o burbuja expansiva, en el cual proponen la separación mecánica de los iones preformados durante la eyección del material, asistido por la formación de burbujas de gas bajo la superficie. Cuando estas explotan, se expulsan pequeñas gotas o fragmentos de muestra, que luego evolucionan a lo largo de la pluma para dar los iones individuales, al igual que en el modelo de clústeres. Este modelo se basa en que algunas matrices MALDI pueden descomponerse térmicamente en especies de bajo peso molecular, generando sobrepresión a la temperatura de descomposición de las mismas. En particular, muchas matrices MALDI son ácidos carboxílicos que se sabe que se descomponen a temperaturas moderadas. En estas matrices se ha descrito que la emisión de dióxido de carbono inducido por el láser aumenta con el aumento de la fluencia. Sin embargo, muchas matrices MALDI no se descomponen térmicamente, por lo que este modelo tiene una aplicación limitada. Los autores proponen que las presiones generadas por las burbujas producto de la descomposición de las matrices podrían convertir un evento de

desorción en uno de ablación, aumentando así el rendimiento en la formación de iones. Sin embargo, si la fluencia del pulso láser es lo suficientemente alta como para que la ablación se produzca sin descomposición, entonces este modelo de asistencia neumática se hace despreciable.

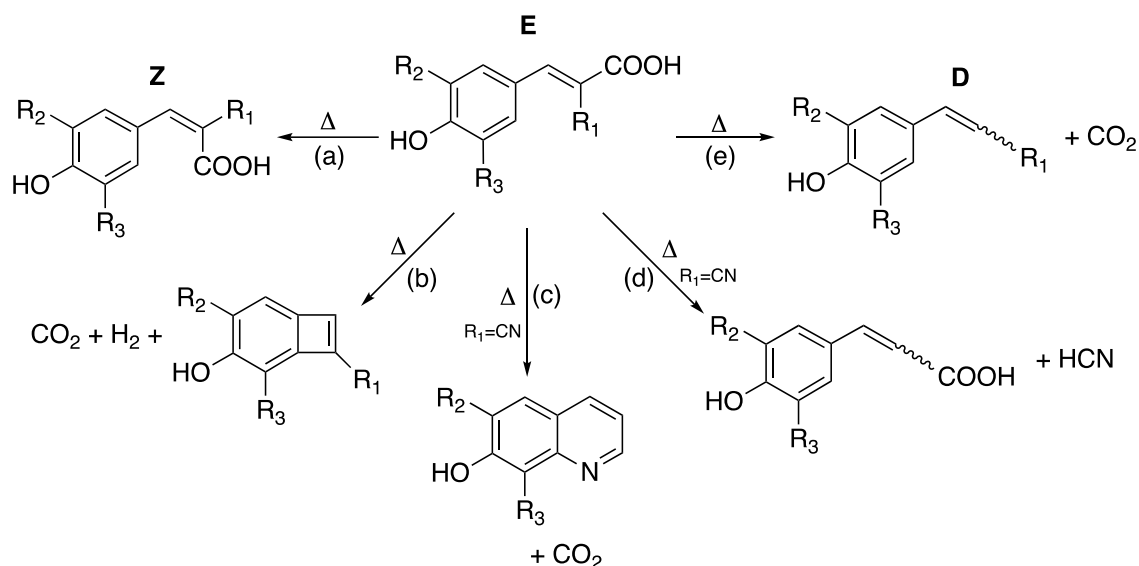
Como es descripto en los capítulos anteriores del presente trabajo, es ampliamente conocido que durante los experimentos MALDI se observa una disminución en la intensidad de las señales, tanto de la matriz como del analito, con los sucesivos disparos sobre una misma posición en la muestra. La tasa de disminución de la señal con el número de disparos es dependiente tanto de la fluencia del láser de irradiación como de la matriz que se utilice. Beavis y col.¹⁹ sugirieron que esta disminución en la intensidad de los iones producidos en experimentos con la matriz ácida *E*-4-hidroxi- α -cianocinámico (ECHCA) puede deberse a reacciones entre la matriz y el analito o con otras especies presentes.

En un esfuerzo por entender estos procesos Fournier y col. realizaron varios estudios sobre los efectos de la irradiación láser en la ablación, la producción de iones y las modificaciones superficiales de dos matrices MALDI, el ácido *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ESA)²⁰ y el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB)²¹. Los experimentos de desorción/ionización láser (LDI) del ESA y el posterior análisis de la superficie irradiada por espectrometría de masa con ionización química, indicaron que la muestra luego de la ablación en su superficie, es principalmente el derivado descarboxilado del ácido sinapínico. Esto generaría una disminución en la producción de iones con los sucesivos disparos sobre una misma posición debido a la descomposición de la matriz en especies con menor (o nulo) coeficiente de absortividad molar a la longitud de onda de irradiación. Sin embargo, en el estudio del DHB no se observa degradación química de la matriz en la superficie ablacionada por lo que la producción de iones no se ve afectada con la consecutiva irradiación de la muestra.

Es por esto que el conocimiento de la estabilidad térmica y las posibles reacciones químicas inducidas a altas temperaturas de los compuestos usados como matrices MALDI juega un rol importante para entender porque algunas matrices son más resistentes a la ablación mientras que otras, luego de pocos disparos disminuyen significativamente la producción de iones^{22,23}.

En este sentido Tarzi y col.^{24,25} realizaron un estudio exhaustivo sobre la estabilidad térmica y fotoquímica de algunas matrices cristalinas ampliamente utilizadas en espectrometría de masa MALDI. En este trabajo estudiaron la estabilidad térmica de las matrices THA, DHB, nHo, ECHCA, ESA, entre otras. Con excepción del ECHCA y el ESA, todas las otras matrices son estables

térmicamente hasta la temperatura de fusión. Para ambas matrices de tipo ácido cinámico los autores proponen una serie de posibles reacciones térmicas unimoleculares (Esquema 1), entre las que se encuentran la isomerización $E \rightarrow Z$ (a), la descarboxilación (e), la descarboxilación seguida de una ciclación (b y c) y la pérdida del grupo ciano en el caso del ECHCA (d). En el caso de este último, luego de la fusión se obtiene una mezcla del ácido de partida y de los isómeros E/Z del producto descarboxilado. La presencia de estas especies se corroboró en la superficie de la muestra luego de la irradiación láser en los experimentos LDI. Los autores determinan que la mezcla de isómeros producto de descarboxilación del ECHCA no inducen un eficiente proceso de desorción/ionización (ablación) en comparación con el ácido de partida. Esta podría ser la causa de la descrita desaparición de las señales del ECHCA y el analito en los sucesivos disparos del láser en los experimentos MALDI. En el caso del ESA, los autores describen que el principal cambio térmico que se observa al calentar hasta el punto de fusión el ESA comercial (ESA comercial: 98%, E/Z -SA 5:1) es la isomerización $Z \rightarrow E$. También observan la formación de producto descarboxilado, aunque como un proceso de muy bajo rendimiento. Por otro lado, establecen que tanto el ECHCA como el ESA presentan una gran estabilidad fotoquímica al ser irradiados en fase sólida con una fuente de radiación UV (355 nm)²⁴. En la literatura está descrito que el comportamiento térmico y fotoquímico de los compuestos usados como matrices MALDI puede modificarse dependiendo de las interacciones con el analito¹. Estas interacciones son dependientes tanto de la estructura química de los mismos como de los métodos de preparación de la muestra. En este sentido Tarzi y col.²⁵ evalúan el comportamiento térmico tanto de las matrices MALDI comerciales tal cual son provistas por el fabricante, como el del sólido obtenido por recristalización del mismo en MeOH:H₂O 1:1 (solvente típico para la preparación de muestras en experimentos MALDI-MS). En ninguno de los casos, observan cambios significativos en el tipo y proporción de los productos de reacción. Los autores concluyen que la descarboxilación no es una propiedad general de las matrices MALDI que contienen un ácido carboxílico (ej. ECHCA, DHB y ESA). En este mismo trabajo los autores postulan que los compuestos cristalinos que se comportan como buenas matrices MALDI son fotoquímicamente estables y su principal vía de desactivación desde el estado electrónico excitado es la no radiativa, liberando calor rápidamente al medio induciendo la desorción/ablación de la muestra. Si la liberación de calor al medio es lenta, la ablación no es eficiente y por lo tanto se produce un aumento de la temperatura en la superficie. Esto llevaría a la fusión o sublimación de la muestra, junto con la descomposición térmica de la misma si la matriz o el analito son termolábiles.



Esquema 1. Posibles reacciones unimoleculares de descomposición térmica de ácidos cinámicos. ESA ($\text{R}_1 = \text{H}$, R_2 y $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$) y ECHCA ($\text{R}_1 = \text{CN}$, R_2 y $\text{R}_3 = \text{H}$). (a) Isomerización; (b y c) Descarboxilación y ciclación; (d) Decianuración; (e) Descarboxilación.^{24,25}

Dado el importante rol propuesto en la literatura a los procesos de desactivación térmica desde el estado electrónico excitado de las matrices MALDI en el proceso de desorción/ionización de un dado analito, se decide continuar con el estudio de la estabilidad térmica de las distintas matrices y desarrollar comparativamente el de sus LIs probados como matrices. Este estudio se aborda en dos formas complementarias: en primer lugar en solución para conocer los productos de reacción térmica de las matrices en este medio. En segundo lugar en fase sólida tratando de imitar las condiciones experimentales del proceso MALDI y poder relacionar los productos formados luego del calentamiento y sus mecanismos con los observados en solución. Los estudios de estabilidad térmica apuntan a evaluar las posibles diferencias entre matrices con distintos grupos funcionales, isómeros estructurales, isómeros geométricos y mezclas de matrices. Las Figuras A4.1-A4.20, el Esquema A4.1 y la Tabla A4.1 mencionadas en este capítulo se encuentran en el Anexo 4.

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 Materiales y métodos

El 9H-pirido[3,4-b]indol (nor-harmano, nHo), clorohidrato de 9H-pirido[3,4-b]indol (nor-harmano+HCl, nHo.HCl), el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (ácido gentísico, DHB), los ácidos *E*-cinámicos: ácido *E*-4-hidroxi- α -cianocinámico (ECHCA), ácido *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido *E*-sinapínico, ESA), ácido *E*-3,4,5-trimetoxicinámico (E-345TMCA), ácido *E*-2,4,5-trimetoxicinámico (E-245TMCA), ácido *E*-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido *E*-ferúlico, EFE),

ácido *E*-4-metoxi-3-hidroxicinámico (ácido *E*-isoferúlico, EiFE), ácido *E*-4-metoxi- α -cianocinámico (E-4MCHCA), ácido *E*-3,4-dihidroxicinámico (ácido *E*-caféico, ECAF), ácido *E*-4-hidroxicinámico (ácido *E*-cumárico, ECUM), ácido *E*-2-hidroxicinámico (E-2HCA), ácido *E*-2-metoxicinámico (E-2MCA), ácido *Z*-2-metoxicinámico (Z-2MCA), ácido *E*-3-hidroxicinámico (E-3HCA), ácido *E*-3-metoxicinámico (E-3MCA), ácido *E*-cinámico (ECA), ácido *E*-4-clorocinámico (E-4ClCA), ácido *E*-3,4-metilendioxicinámico (E-34DIOCA), ácido *E*-4-cloro- α -cianocinámico (E-4ClCHCA), ácido *E*-4-flúor- α -cianocinámico (E-4FCHCA), ácido *E*- α -metilcinámico (E α MECA), ácido *E*-4-nitrocinámico (E-4NOCA), clorohidrato del ácido *E*-4-aminocinámico (E-4NCA.HCl), la amina *n*-butilamina (BAM) y el LI ECHCA. BAM fueron provistas por Sigma-Aldrich (USA) y utilizados sin previa purificación. La estructura de estos compuestos se muestra en la sección Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 18.

Los ácidos *Z*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ZSA), *Z*-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ZFE), *Z*-4-hidroxicinámico (ZCUM) y *Z*-3,4,5-trimetoxicinámico (Z-345TMCA) fueron sintetizados según el protocolo descrito por Salum y colaboradores²⁶, como se detalló en los capítulos anteriores (capítulo 2). Por otro lado, las mezclas de los isómeros *E/Z*-3MCA, *E/Z* α MCA, *E/Z*-CHCA, *E/Z*-4ClCHCA y *E/Z*-4FCHCA se obtienen por irradiación a 310 nm como se describe en la sección experimental del capítulo 2. Se realiza una cuantificación relativa de la proporción de ambos isómeros en la mezcla, por medio de la comparación del área de la señal correspondiente al H β de ambos isómeros en el espectro de ¹H-RMN. En el caso del *E/Z*-3MCA se obtiene una mezcla 20:80 (% *E*: *Z*), mientras que para el *E/Z*-CHCA la mezcla es 56:44 (% *E*: *Z*) y para el *E/Z*- α MCA la relación porcentual es de 50:50 (% *E*:*Z*). En los otros dos casos (4ClCHCA y 4FCHCA) se obtienen mezclas de ambos isómeros, más un pequeño porcentaje de producto descarboxilado. Este pequeño porcentaje puede deberse al leve calentamiento de la solución por las lámparas de irradiación. Las mezclas *E*:*Z*:D que se obtienen son 47:34:19 y 50:37:13 respectivamente.

Los líquidos iónicos se prepararon según lo descrito en la sección experimental del capítulo 2 sección 2.2.1. Todos los solventes utilizados de grado HPLC (J. T. Baker) fueron utilizados sin previa purificación. Se utilizó agua de muy baja conductividad de grado MiliQ.

4.2.2 Estabilidad térmica en solución. Calentamiento por microondas

Los estudios de estabilidad térmica en solución se realizaron por calentamiento con microondas (MW). La irradiación por MW se llevó a cabo en un reactor de 850 Watts de potencia (Monowave 300, Anton Parr. Graz, Austria) (CIHDECAR-CONICET. DQO, FCEN, UBA). Los viales y los septum fueron provistos por la misma empresa, específicamente para este equipo. Estos experimentos se realizan en un vial cerrado de 4, 10 o 30 mL de volumen total, donde se solubiliza una dada cantidad del compuesto a estudiar en 2, 5 o 15 mL de solvente, dependiendo

del vial utilizado, para poder así alcanzar la concentración especificada en cada caso. La concentración de las soluciones estudiadas en este capítulo va desde 4 a 12 mM. La solución se calienta por irradiación con microondas hasta alcanzar la temperatura máxima deseada y se mantienen a dicha temperatura por un dado periodo de tiempo. La temperatura máxima teórica posible a usar está determinada por la presión de vapor del solvente y la presión máxima que resiste el vial cerrado, por debajo de esta temperatura la elección de la misma es una variable experimental especificada en cada caso. Al igual que la temperatura, el tiempo de reacción se selecciona dependiendo del experimento y se informa en cada caso, típicamente se utilizan tiempos de entre 10 a 60 min de irradiación. El calentamiento se realiza bajo el modo “calienta lo más rápido posible” (*Heat as fast as possible*). Este modo genera un pico de potencia de aproximadamente 800 W en el primer minuto de calentamiento y luego decae a una potencia mínima para mantener la temperatura máxima alcanzada (entre 20 y 30 W). La solución se mantiene con agitación constante a 600 rpm. Luego de finalizado el tiempo de irradiación la solución se enfría bajo un flujo de nitrógeno (o aire) hasta alcanzar los 55 °C. El solvente se remueve a presión reducida y el producto obtenido se caracteriza por cromatografía en capa delgada (CCD) de sílica gel (fase móvil (FM) especificada en cada caso) y por espectroscopia ¹H-RMN en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). La cuantificación relativa porcentual de los productos se realiza en relación a la suma que incluye a los compuestos sin reaccionar, más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I). La cuantificación se realiza por espectroscopia ¹H-RMN del crudo de reacción comparando las integrales de los protones del doble enlace exocíclico del sistema α-β-insaturado tanto del ácido cinámico como del correspondiente producto descarboxilado de tipo estirénico (H_α del ácido cinámico (Z o E) y el H₂ del correspondiente estireno).

4.2.3 Estabilidad térmica en fase sólida

4.2.3.1 Termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los estudios en simultáneo de termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) fueron realizados en un equipo Simultaneous Thermal Analyzer (TGA-DSC) Instruments SDT Q600, utilizando crisoles de óxido de aluminio (Departamento de Industrias (DI), FCEN, UBA). Las muestras fueron tratadas bajo un flujo constante de nitrógeno (100 mL/min) desde temperatura ambiente hasta los 300 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min. La masa de la muestra utilizada va desde 2 a 15 mg. A partir de las curvas de TGA se utilizó el programa OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) para calcular la derivada primera de la gráfica de TGA (masa/masa inicial, m/m₀ (%)) en función de la temperatura (dTGA). A partir de estas gráficas se definen la temperatura de inicio del proceso

de descomposición (T_{inicio}) y la temperatura de máxima tasa de conversión (T_{max}) en cada una de las etapas de descomposición. Esta última temperatura está definida como el punto de inflexión en la curva de TGA o como un máximo o un mínimo en la curva de dTGA. Se define como una etapa de descomposición a toda pérdida de masa que ocurre con un cambio en la tasa de conversión en función de la temperatura.

El análisis termogravimétrico (del inglés *Thermo Gravimetric Analysis*, TGA) se realizó en un equipo TGA-51 Shimadzu (CIHDECAR-CONICET. DQO, FCEN, UBA). Los experimentos fueron realizados bajo un flujo constante de nitrógeno (20 mL/min). Para estas mediciones se utiliza aproximadamente 2,000 mg de muestra, la que se deposita en un crisol de platino. La rampa de calentamiento es de 10 °C/min hasta alcanzar la descomposición total de la muestra.

Las calorimetrías de barrido diferencial (DSC) se realizaron en un equipo DSC Q20 de TA *instruments* (CIHDECAR-CONICET. DQO, FCEN, UBA). Las muestras fueron trabajadas bajo un flujo constante de nitrógeno 5.0 (50 mL/min). Se utiliza aproximadamente 2,0000 mg de la muestra en una cápsula cerrada de aluminio (cápsulas Tzero Pan y tapas Tzero Lid) (TA *instruments*, New Castel, USA). El equipo cuenta con un sistema de enfriamiento RCS90. La rampa de calentamiento es de 10 °C/min desde 20 °C en el primer ciclo y desde 30 °C en el segundo ciclo hasta la temperatura máxima determinada previamente para cada compuesto en los experimentos de TGA. Una vez finalizado el calentamiento se recupera el residuo sólido remanente en la cápsula cerrada y se analiza por espectroscopía ^1H -RMN la fracción soluble en DMSO- d_6 obtenida del crudo de reacción. La cuantificación relativa porcentual de los productos de reacción se realiza por ^1H -RMN del crudo de reacción como se describió en la sección anterior. A partir de las curvas de DSC se define la temperatura de inicio y/o temperatura de pico de cada uno de los procesos (T_{inicio} y/o T_{pico} , respectivamente).

4.2.3.2 Escala preparativa (EP)

Los calentamientos a escala preparativa (EP) se realizaron con una plancha calefactora en un baño de arena controlando la temperatura con un termómetro. Para estos experimentos se utiliza entre 10 y 12 mg del compuesto a estudiar colocado en un tubo de ensayo tapado. Se utilizaron tres tipos de protocolos para los tratamientos térmicos: (A) Calentamiento hasta la temperatura seleccionada, (B) dos ciclos de calentamiento hasta la temperatura máxima seleccionada y (C) calentamiento hasta punto de fusión. En los tres casos al llegar a la temperatura deseada se retira inmediatamente el tubo del baño de arena y se lo deja enfriar a temperatura ambiente. La rampa de calentamiento es de 5 °C/min aproximadamente. Las temperaturas seleccionadas para el calentamiento de cada muestra derivan de los estudios de

TGA y DSC descritos en la sección anterior. Se usaron aquellas temperaturas a las que se observaron cambios en la termogravimetría o en la calorimetría de barrido diferencial. Los productos obtenidos luego de cada tratamiento térmico son analizados por espectroscopía ^1H -RMN de la fracción soluble en DMSO-d_6 del crudo de reacción. La cuantificación relativa porcentual de los productos de reacción se realiza por ^1H -RMN.

4.2.3.3 Punto de fusión

Los datos para los ácidos *E*-cinámicos comerciales fueron tomados de las bases de datos: The Human Database (<https://hmdb.ca>), Chemical Book (<https://www.chemicalbook.com>) y del proveedor Sigma-Aldrich-Merck (<https://www.sigmaaldrich.com>). Para los ácidos *Z*-cinámicos ya descritos previamente, fueron tomados de la Ref. 26. En el caso de nuevos ácidos *Z*-cinámicos los p.f. se determinaron en el equipo Fisher-Johns. Los datos se resumen en la Tabla A4.1 del Anexo 4 página 348.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Estabilidad térmica en solución

Para los estudios de estabilidad térmica en solución se utiliza la técnica de irradiación por microondas. Esta técnica ha adquirido particular importancia en los últimos años, especialmente en síntesis orgánica, porque permite reducir los tiempos de reacción, mejora los rendimientos y logra alcanzar temperaturas uniformes en todo el medio de reacción debido a la absorción de la onda electromagnética por el solvente. Además esta técnica permite alcanzar altas temperaturas en ventanas muy cortas de tiempo en comparación con las fuentes de calentamiento tradicionales, aumentando la selectividad en el caso de existir caminos de reacción paralelos^{27,28}.

- Ácidos sinapínicos (ESA y ZSA) y sus LIs con BAM y nHo

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos a partir de los calentamientos por MW de las soluciones de ESA, ZSA y sus LIs con BAM y con nHo como fuente del contra ion. Se prueban dos condiciones experimentales distintas: MeCN como solvente polar aprótico y MeOH como solvente polar prótico. Como se detalló en la sección experimental la temperatura máxima para el calentamiento está determinada por la presión de vapor del solvente y la presión máxima resistida por el vial cerrado, siendo ésta de 200 °C para el MeCN y 150 °C para el MeOH. En ambos casos el tiempo de reacción es de 30 minutos.

Tabla 1. Productos formados y condiciones de reacción en el calentamiento por MW en solución de ESA y ZSA. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización.

| Nº | Compuesto | Solvente | Conc. [mM] | Temp. [°C] | Tiemp. [min] | %D ^a | %I ^a |
|----|-----------|-------------------|------------|------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 1 | ESA | MeCN ^b | 6,3 | 200 | 30 | 100 | 0 |
| 2 | ESA | MeCN | 6,4 | 200 | 30 | 81 | 0 |
| 3 | ESA | MeCN | 6,4 | 150 | 30 | 55 | 0 |
| 4 | ESA | MeCN | 6,2 | 100 | 30 | 35 | 0 |
| 5 | ESA | MeOH | 6,5 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 6 | ESA.BAM | MeCN | 6,5 | 200 | 30 | 100 | 0 |
| 7 | ESA.BAM | MeOH | 6,3 | 150 | 30 | 15 | 0 |
| 8 | ESA.nHo | MeCN | 6,9 | 200 | 30 | 65 | 0 |
| 9 | ESA.nHo | MeOH | 6,8 | 150 | 30 | 10 | 0 |
| 10 | ZSA | MeCN ^b | 6,4 | 200 | 30 | 100 | t ^c |
| 11 | ZSA | MeCN | 6,3 | 200 | 30 | 11 | 81 |
| 12 | ZSA | MeOH | 6,5 | 150 | 30 | 0 | 96 |
| 13 | ZSA.BAM | MeCN | 6,7 | 200 | 30 | 100 | 0 |
| 14 | ZSA.BAM | MeOH | 6,5 | 150 | 30 | 19 | 81 |
| 15 | ZSA.nHo | MeCN | 7,0 | 200 | 30 | 62 | 38 |
| 16 | ZSA.nHo | MeOH | 6,9 | 150 | 30 | 11 | 89 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Tubo nuevo.

^c t= nivel de traza detectados por CCD.

En las Figuras 1, A4.1 y A4.2 (ver Anexo 4 página 348) se muestran los espectros de ¹H-RMN del ácido ESA y de los Lis ESA.BAM, ESA.nHo y de los productos de reacción luego de la irradiación con MW por 30 minutos en solución de MeCN y MeOH. Como puede observarse en la Figura 1b, en MeCN, usando un tubo nuevo de reacción, se produce la descarboxilación del ácido *E*-sinapínico obteniéndose un 100% de conversión. Esto se corrobora en la CCD (FM: acetato de etilo) donde se observa una única mancha como producto de reacción, de mayor Rf que el correspondiente ácido de partida. Con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de este resultado se decide realizar nuevamente la reacción bajo las mismas condiciones experimentales en el mismo tubo utilizado anteriormente. Llama nuestra atención que la reacción no es cuantitativa alcanzándose un 95% de producto descarboxilado, recuperándose un 5% de ácido sin reaccionar. Luego de muchos estudios sobre las variables experimentales que podían influir en el rendimiento de la reacción (ej. concentración, humedad del solvente, volumen de reacción, potencia de irradiación, rampa de calentamiento, etc.) se llega a la conclusión de que los sucesivos usos de un tubo para MW genera una disminución en el rendimiento de esta reacción. Por ejemplo, luego de cuatro usos consecutivos de un mismo tubo de reacción para MW repitiendo estos experimentos, el producto descarboxilado disminuye a

un 81% (dato informado en la Tabla 1 entrada 2 y espectro de ^1H -RMN en la Figura 1c). Usando tubos nuevos o tubos con el mismo número de usos, la reacción es reproducible, obteniéndose valores de producto descarboxilado similares. Sin embargo, a pesar de las diferencias en el rendimiento de la reacción, se puede concluir que en acetonitrilo la única reacción térmica unimolecular observada para el *E*-sinapínico es la descarboxilación del ácido para dar el correspondiente estireno. Por otro lado, la disminución en la temperatura de calentamiento resulta en una disminución en el rendimiento de la reacción de descarboxilación pasando de un 81% de producto descarboxilado a 200 °C a un 35% a 100 °C (Tabla 1 entradas 2 a 4).

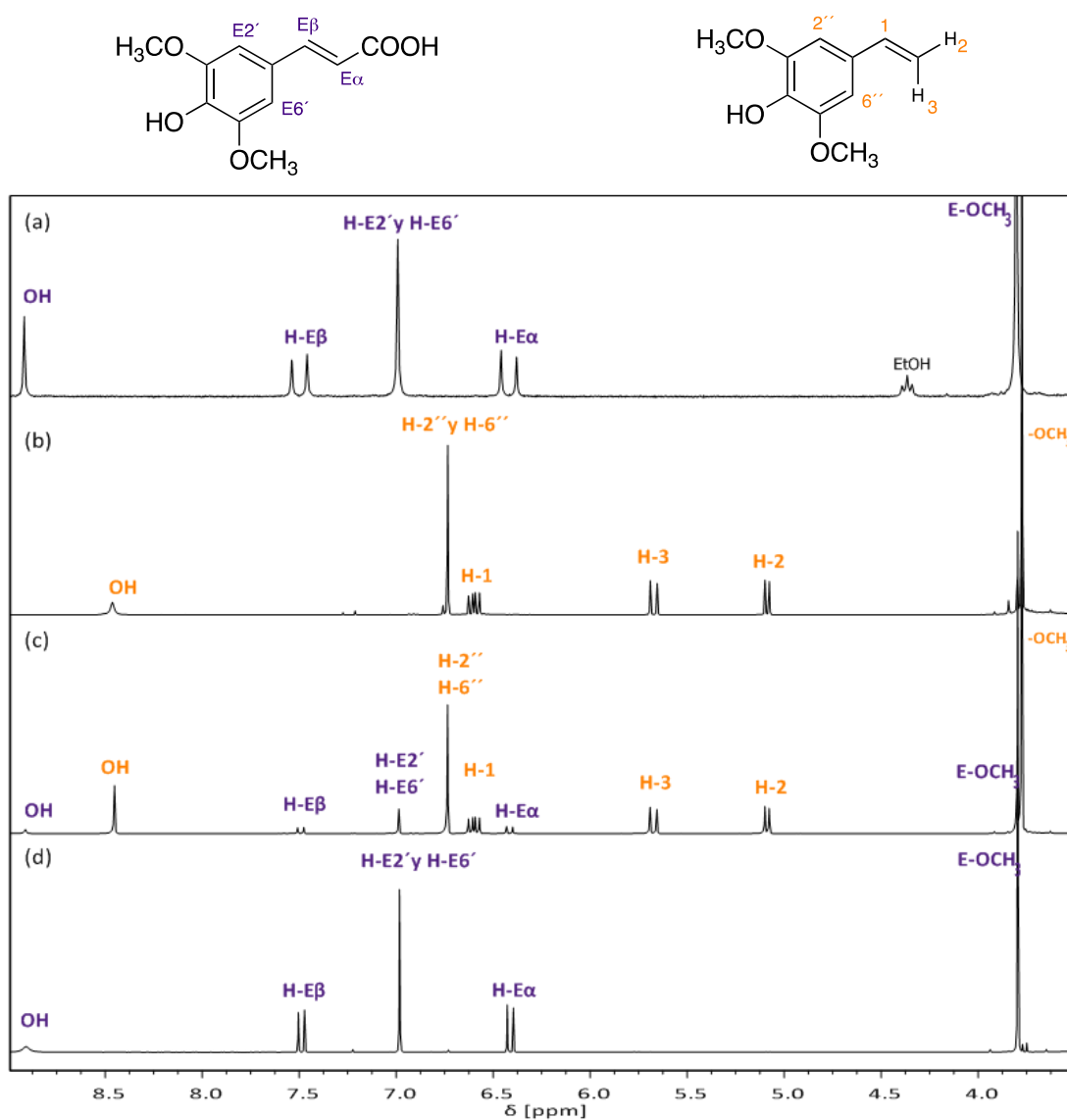


Figura 1. Espectros ^1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) para (a) ESA y los productos formados por irradiación con MW en (b) MeCN (tubo nuevo, 200 °C, 30 min), (c) MeCN (tubo viejo, 200 °C, 30 min) y (d) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ^1H -RMN: (a) 200 MHz, (b-d) 500 MHz, solvente: DMSO-d_6 .

Se evaluó también el efecto de la concentración en las posibles reacciones térmicas del ESA. Se realizó la misma reacción en MeCN a 200 °C durante 30 minutos de soluciones 15 y 30 mM de ESA, tanto en tubo nuevo como en tubo viejo. En ningún caso se observan grandes diferencias en los porcentajes obtenidos del producto descarboxilado y tampoco se observa la formación de otros productos. El hecho de trabajar en soluciones diluidas permite favorecer los procesos unimoleculares frente a otros tipos de reacciones.

Distinto es el caso de la reacción térmica en MeOH a 150 °C por 30 min, en este caso, el ESA presenta una gran estabilidad, no observándose ningún tipo de reacción. Esto se corrobora por ¹H-RMN (Figura 1d) y por CCD (FM: Acetato de etilo) donde se observa una única mancha con igual R_f que el compuesto de partida. En estas condiciones experimentales, la estabilidad térmica del ácido *E*-sinapínico es independiente del tubo para MW que se utilice (nuevo o viejo). De la misma forma, no se observa reacción alguna al disminuir la temperatura de calentamiento ni al aumentar la concentración del ácido en la solución.

Por otro lado, se decide evaluar la estabilidad térmica del ESA en otro tipo de solventes que permitan alcanzar una temperatura de 200 °C en un tubo cerrado para MW. Se probaron soluciones de isobutanol, acetato de etilo y cloro-benceno como ejemplos de solventes de distinta polaridad y con distinta capacidad de formar puentes de hidrógeno con el analito. Las reacciones se realizaron en las mismas condiciones experimentales optimizadas para el MeCN (6 mM, 200 °C, 30 min). En ninguno de los casos se observa reacción, recuperándose el 100% del compuesto de partida. Estos resultados se corroboran por ¹H-RMN y CCD (FM: Acetato de etilo) (datos no mostrados).

En presencia de una base como la BAM (Figura A4.1) o el nHo (Figura A4.2), la descarboxilación térmica del ESA sigue siendo la única reacción observada. Con BAM el porcentaje de producto descarboxilado en MeCN, usando un tubo viejo, es el 100%, no quedando rastros de la amina luego de la evaporación del solvente a presión reducida. En presencia de nHo la descarboxilación en MeCN en un tubo viejo es menor, alcanzando el 65%. A diferencia de lo observado en el calentamiento del ESA en MeOH, en presencia de una base la descarboxilación térmica si tiene lugar, aunque como un proceso de bajo rendimiento. En presencia de BAM el rendimiento de la reacción en MeOH es de 15% y con nHo del 10% (Tabla 1 entradas 7 y 9). Tanto en MeCN como en MeOH, el nHo no presenta ninguna transformación química en estas condiciones experimentales, quedando como parte de la mezcla analizada luego del calentamiento. También se estudió la estabilidad térmica del nHo solo, observándose que no hay reacción en ninguna de las condiciones experimentales aquí probadas (datos no mostrados).

Por otro lado, se estudiaron los productos de reacción obtenidos luego del calentamiento en solución del isómero geométrico ZSA y sus LIs con BAM y nHo como fuentes del contraíón. Como se ha mencionado en la literatura²⁹ y en los capítulos anteriores de esta tesis, tanto el ZSA como sus LIs ZSA.BAM y ZSA.nHo han sido probados como posibles matrices MALDI para el estudio de hidratos de carbono de bajo peso molecular. Es por eso que se estudia de forma comparativa la estabilidad térmica en solución de ambos isómeros tanto solos como pertenecientes a los LIs evaluados como matrices MALDI. En las Figuras 2, A4.3 y A4.4 se muestran los espectros de ¹H-RMN del ácido ZSA, de sus LIs ZSA.BAM y ZSA.nHo y de los productos de reacción obtenidos luego de la irradiación con MW por 30 minutos de las soluciones en MeCN y MeOH.

Como puede observarse en la Figura 2, el ZSA en MeCN, en un tubo de reacción nuevo, se descompone para dar 100% del producto descarboxilado. Por CCD (FM: Acetato de Etilo), se observa una pequeña mancha con igual R_f que el isómero ESA, evidentemente en una proporción tal que se encuentra fuera del límite de detección de la técnica de ¹H-RMN. Al realizar la irradiación en un tubo viejo de reacción lo que se observa es la formación del isómero ESA mayoritariamente y un pequeño porcentaje de producto descarboxilado, 81% y 11%, respectivamente (Tabla 1, entrada 11). Por otro lado, el calentamiento en MeOH del ZSA produce únicamente la isomerización térmica, dando como producto de reacción un 96% del ESA. Esto muestra que desde el ZSA otra vía de reacción térmica posible es la isomerización para dar el isómero geométrico termodinámicamente más estable. La particular diferencia en los rendimientos de reacción en MeCN, observados al utilizar un tubo nuevo o un tubo viejo de reacción, lejos de perjudicar el análisis, permitió generar la hipótesis que en el caso del ZSA primero ocurre una isomerización térmica a la forma *E* (*trans*) y luego desde ésta descarboxila. En solución de MeOH, donde el ESA no descarboxila, lo que se observa es la isomerización $Z \rightarrow E$ y la acumulación de este isómero.

Por otro lado, el ZSA en presencia de una base como la BAM (Figura A4.3) o el nHo (Figura A4.4) muestra el mismo tipo de reacciones térmicas que las descritas anteriormente. En MeCN la descarboxilación térmica se ve favorecida, incluso en un tubo viejo de reacción, alcanzando un 100% de producto descarboxilado en solución con BAM, mientras que con nHo se forma un 62% del producto descarboxilado y un 38% del isómero *trans*. En MeOH además de la isomerización $Z \rightarrow E$, se observa producto descarboxilado, 11% en solución con nHo y 19% con BAM. Esto indica que la presencia de una base en el medio de reacción cataliza la descarboxilación. En MeCN, esto se evidencia como un aumento en el rendimiento de la

reacción, mientras que en MeOH aparece el producto descarboxilado, el que en ausencia de la base no se observa.

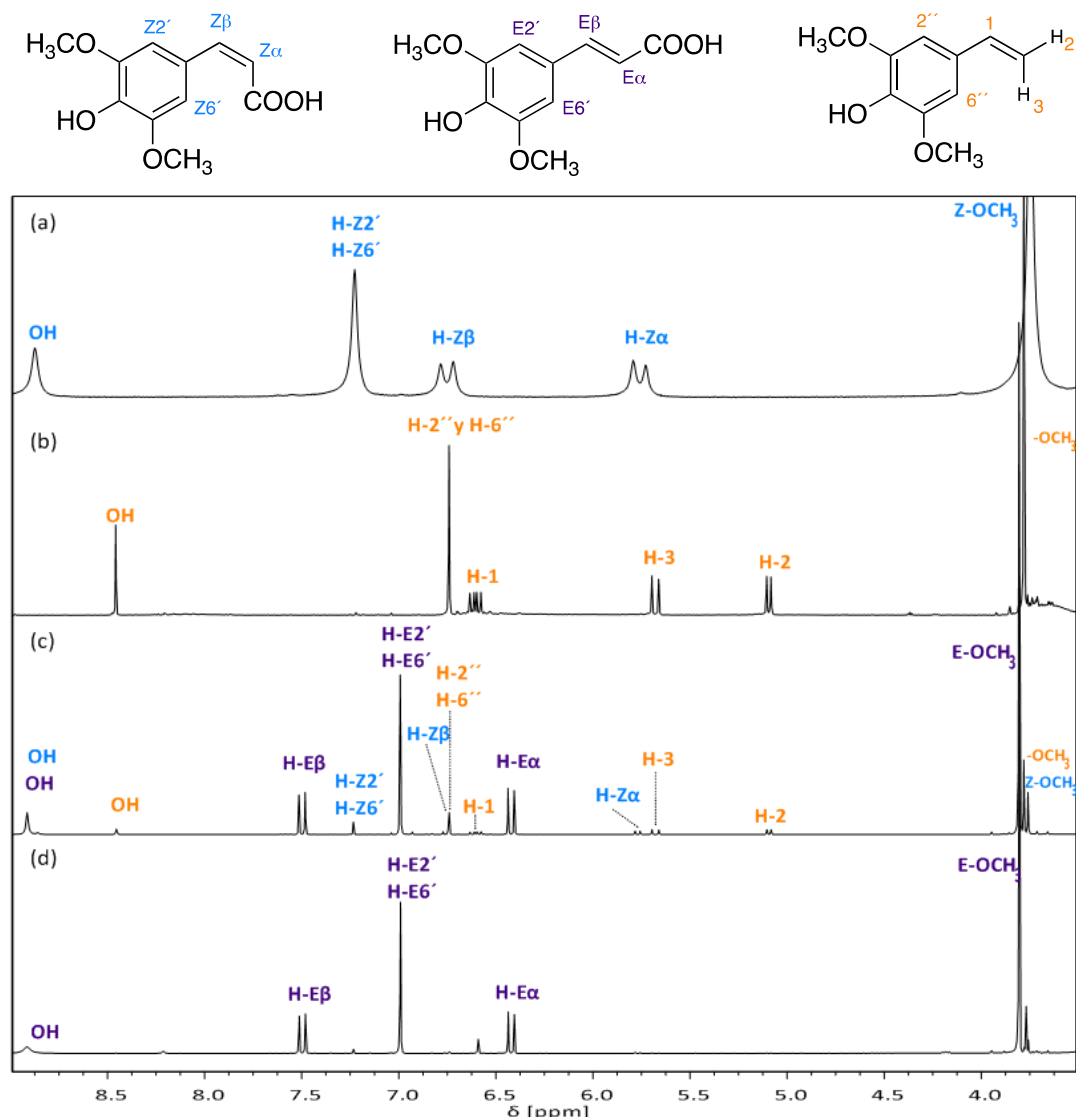


Figura 2. Espectros ^1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) para (a) ZSA y los productos formados por irradiación con MW en (b) MeCN (tubo nuevo, 200 $^{\circ}\text{C}$, 30 min), (c) MeCN (tubo viejo, 200 $^{\circ}\text{C}$, 30 min) y (d) MeOH (150 $^{\circ}\text{C}$, 30 min). Espectros ^1H -RMN: (a) 200 MHz, (b-d) 500 MHz, solvente: $\text{DMSO-}d_6$.

- Ácidos férulicos (EFE y ZFE) y ácidos cumáricos (ECUM y ZCUM).

El ácido férulico y el ácido cumárico, en sus formas geométricas *Z* y *E* (*cis* y *trans*), tal cual se detalla en el capítulo 2, fueron estudiados como matrices MALDI para el análisis de hidratos de carbono²⁹. Al igual que el ácido sinapínico, ambos poseen en su estructura un sustituyente hidroxilo (-OH) en posición *para* del anillo aromático del núcleo de tipo ácido cinámico. En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos luego de los calentamientos por MW de los ácidos EFE, ZFE, ECUM y ZCUM en distintas condiciones experimentales. Dado los

resultados obtenidos anteriormente para el ESA, donde no se observan cambios significativos en el rendimiento y en el tipo de reacción con la concentración del analito, se trabaja a una concentración aproximada 6,5 mM. De la misma forma se decide trabajar a la temperatura máxima de calentamiento de cada solvente para evitar disminución en el rendimiento de la reacción.

Tabla 2. Productos formados y condiciones de reacción en el calentamiento por MW en solución de E y ZCUM y E y ZFE. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización.

| Nº | Compuesto | Solvente | Conc. [mM] | Temp. [°C] | Tiemp. [min] | %D ^a | %I ^a |
|----|-----------|-------------------|------------|------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 1 | EFE | MeCN ^b | 6,2 | 200 | 30 | 100 | 0 |
| 2 | EFE | MeCN | 6,1 | 200 | 30 | 86 | 0 |
| 3 | EFE | MeOH | 6,4 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 4 | ZFE | MeCN ^b | 6,5 | 200 | 30 | 8 | 52 |
| 5 | ZFE | MeCN | 6,5 | 200 | 15 | 0 | 84 |
| 6 | ZFE | MeCN | 6,4 | 200 | 30 | 2 | 93 |
| 7 | ZFE | MeCN | 6,4 | 200 | 60 | 5 | 95 |
| 8 | ZFE | MeOH | 6,9 | 150 | 15 | 0 | 72 |
| 9 | ZFE | MeOH | 6,7 | 150 | 30 | 0 | 85 |
| 10 | ZFE | MeOH | 6,6 | 150 | 60 | 0 | 96 |
| 11 | ECUM | MeCN ^b | 6,6 | 200 | 30 | 100 | 0 |
| 12 | ECUM | MeCN | 6,3 | 200 | 30 | 80 | 0 |
| 13 | ECUM | MeOH | 6,3 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 14 | ZCUM | MeCN ^b | 6,3 | 200 | 30 | 100 | 0 |
| 15 | ZCUM | MeCN | 6,7 | 200 | 30 | t ^c | 72 |
| 16 | ZCUM | MeOH | 6,7 | 150 | 30 | 0 | 58 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Tubo nuevo.

^c t= nivel de traza detectado por CCD.

Al igual que lo observado para el ESA, el EFE y el ECUM presentan una única reacción térmica en MeCN, correspondiente a la descarboxilación del mismo. Cuando la reacción se realiza en un tubo nuevo de reacción el rendimiento es del 100%, mientras que, luego de cuatro usos del mismo tubo, el rendimiento cae a un 86 y 80 % respectivamente (Tabla 2 entradas 1, 2, 11 y 12). En MeOH ambos ácidos *E* (*trans*) presentan una gran estabilidad térmica en estas condiciones experimentales, no observándose reacción (Tabla 2 entradas 3 y 13).

En el caso del ZFE, la reacción de calentamiento en MeCN da como producto mayoritario el isómero *E* y un muy bajo porcentaje de producto descarboxilado, incluso en un tubo de reacción nuevo (Tabla 2 entrada 4). El aumento de los tiempos de calentamiento genera una acumulación del isómero *E* y un pequeño aumento en la proporción del correspondiente estireno, sin embargo, la reacción de descarboxilación sigue siendo un proceso de muy baja

eficiencia para este compuesto (Tabla 2 entradas 5 a 7). El calentamiento en MeOH produce una acumulación del isómero *E*, sin observarse formación de producto descarboxilado (Tabla 2 entradas 8 a 10). Por otro lado, el ZCUM descarboxila completamente en solución de MeCN en un tubo nuevo de reacción, mientras que luego de cuatro usos del tubo de reacción el rendimiento de descarboxilación cae al nivel de traza, siendo únicamente detectado por CCD (FM: Acetato de Etilo) como una mancha de igual R_f que el correspondiente estireno (Tabla 2 entradas 14 y 15). Tanto en solución de MeCN (tubo viejo) como en MeOH, la isomerización térmica para dar el isómero termodinámicamente más estable es la reacción más favorable o la única que se observa.

Para ambos ácidos, esto sugeriría que la reacción de descarboxilación en MeCN desde el isómero *E* es la única vía de descomposición térmica posible, alcanzando valores de aproximadamente 80 % para el estireno al igual que lo observado para el ESA. Sin embargo, llama la atención que a pesar de la acumulación del isómero *E* como producto de reacción del calentamiento del isómero *Z* en MeCN, este no descarboxila con la misma eficiencia, incluso aumentando los tiempos de reacción en tubos ya usados. Estos resultados son similares a lo observado para el ZSA (Tabla 1 entrada 11).

- Otros ácidos cinámicos.

Con el objetivo de profundizar el estudio sobre la estabilidad térmica de los ácidos cinámicos, se decide evaluar el comportamiento de un número mayor de estos, con distinto tipo de sustituyentes en el anillo aromático, variando tanto la posición como la naturaleza de los mismos, barriendo así desde sustituyentes donores de electrones a conocidos aceptores. Si bien algunos de estos ácidos cinámicos han sido probados como matrices MALDI, ninguno de ellos ha dado resultados superiores a los obtenidos con los ácidos ECHCA y ESA³⁰. En las Tablas 3 y 4 se resumen los resultados obtenidos para las reacciones de calentamiento de los ácidos cinámicos estudiados adicionalmente. Para llevarlo a cabo, se utilizan las condiciones experimentales descriptas anteriormente.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que en MeOH el isómero *E* presenta una gran estabilidad frente al calentamiento por MW mientras que en MeCN, aquellos compuestos que presentan un grupo hidroxilo en la posición *para* y *orto* del anillo aromático (ESA, EFE, ECUM, ECAF y E-2HCA) descarboxilan para dar el correspondiente estireno. De los experimentos realizados en forma comparativa en un mismo solvente, surge que aquellos compuestos que presentan otro tipo de funcionalización en la posición *para* y *orto* o un grupo

hidroxilo en otra posición del anillo aromático, no presentan reactividad frente a la irradiación por MW en MeCN.

Tabla 3. Productos formados y condiciones de reacción en el calentamiento por MW en solución de distintos ácidos E-cinámicos. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización

| Nº | Compuesto | Solvente | Conc. [mM] | Temp. [°C] | Tiemp. [min] | %D ^a | %I ^a |
|----|------------|-------------------|------------|------------|--------------|------------------|-----------------|
| 1 | ECAF | MeCN ^b | 6,5 | 200 | 30 | 100 ^c | 0 |
| 2 | ECAF | MeCN | 6,4 | 200 | 30 | 12 ^c | 0 |
| 3 | ECAF | MeOH | 6,6 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 4 | EiFE | MeCN ^b | 6,1 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 5 | E-34DIOCA | MeCN | 6,0 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 6 | E-2HCA | MeCN ^b | 6,3 | 200 | 30 | 100 ^c | 0 |
| 7 | E-2HCA | MeOH | 6,5 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 8 | E-3HCA | MeCN ^b | 6,4 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 9 | E-3HCA | MeOH | 6,3 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 10 | E-245TMCA | MeCN ^b | 6,1 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 11 | E-245TMCA | MeOH | 6,5 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 12 | E-4CICA | MeCN | 6,3 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 13 | E-4CICA | MeOH | 6,7 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 14 | ECA | MeCN | 6,1 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 15 | E-4NOCA | MeCN | 6,4 | 200 | 30 | | |
| 16 | E-4NOCA | MeOH | 6,2 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 17 | E-4NCA.HCl | MeCN | 6,4 | 200 | 30 | t ^{c,d} | 0 |
| 18 | E-4NCA.HCl | MeOH | 6,8 | 150 | 30 | 0 ^c | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Tubo nuevo.

^c + Otros productos.

^d t= nivel de traza detectado por CCD.

En el caso particular del calentamiento en MeCN del ácido ECAF (ácido cinámico disustituido en posición *meta* y *para* por grupos hidroxilo) en un tubo de reacción nuevo se observa la presencia de producto descarboxilado, sin rastros del ácido *E* de partida, mientras que en un tubo usado se observa una muy marcada disminución del porcentaje de conversión (Tabla 3 entradas 1 y 2). Sin embargo, no es el único producto de reacción detectado, ya que en el espectro de ¹H-RMN se observa una serie de picos superpuestos, montados sobre una señal ancha, tanto en la zona de los protones aromáticos entre 5,5 y 7,5 ppm, como en la zona de los protones alifáticos entre 0,5 y 2 ppm (datos no mostrados). En la CCD (FM: Acetato de etilo) se observan tres manchas. Una mancha de mayor R_f que el compuesto de partida correspondiente al estireno, una de igual R_f que el compuesto de partida y una mancha retenida en el punto de siembra. Esto sugeriría la formación de un producto de reacción polimérico, que en principio provendría del estireno sustituido y no del compuesto ácido, ya que en MeOH el calentamiento del ácido no muestra reacción (ni formación del estireno correspondiente ni estructuras

probablemente poliméricas) (Tabla 3 entrada 3). La tendencia a la polimerización de estos compuestos estirénicos ha sido descrito en la literatura como característica de la difuncionalización *orto-para*-fenol^{31,32}.

El E-2HCA, ácido cinámico *orto*-hidroxi sustituido, presenta un comportamiento similar. El calentamiento en MeCN produce la descarboxilación completa del mismo para dar el correspondiente estireno (Tabla 3 entrada 6). Sin embargo, en el espectro de ¹H-RMN sumado a este producto se observa una serie de señales superpuestas en la zona entre 6,5 y 8 ppm y otras señales en las zonas de 1 a 2 ppm y de 8 a 10 ppm. En la CCD (FM: Acetato de etilo) se observa una mancha de mayor R_f que el compuesto de partida, correspondiente al producto descarboxilado y otra cercano al punto de siembra, que se asume corresponde a un producto polimérico. En la literatura se describe la descarboxilación térmica del ácido E-2HCA, como un proceso minoritario, mientras que la cumarina resultante de la ciclación del ácido cinámico es el producto mayoritario. Si bien las condiciones de reacción (catálisis orgánica, básica o ácida) son distintas a las aquí estudiadas, en estos trabajos no se reporta la formación de productos poliméricos^{33,34}. Sin embargo en otro trabajo se describe la formación de un polímero como producto secundario en la reacción de descarboxilación térmica del E-2HCA en solución acuosa de hidróxido de sodio³⁵.

Por otro lado el calentamiento tanto en MeCN como en MeOH del ácido E-4NHCA.HCl, también presenta posibles productos poliméricos. En el espectro de ¹H-RMN del producto de reacción en MeCN se observa un pequeño porcentaje de producto descarboxilado y una serie de señales superpuestas entre 6 y 8 ppm y nuevas señales en el rango de 1 a 2,25 ppm. En MeOH no se observa producto descarboxilado y las nuevas señales tienen corrimientos ligeramente distintos a los observados en MeCN. En MeOH se observan una superposición de señales entre 6 y 7,5 y entre 0,75 y 1,5 ppm.

El comportamiento observado para los isómeros *Z* de los ácidos cinámicos aquí estudiados es diferente porque, en aquellos compuestos que presentan un grupo hidroxilo en la posición *para* del anillo aromático (ZSA, ZFE y ZCUM) en MeOH se produce la isomerización térmica dando una mezcla enriquecida en el isómero *E* y en MeCN se observa también la descarboxilación total o parcial del sustrato. Sin embargo, los compuestos que presentan otro tipo de funcionalización (Z-2MCA, Z-3MCA y Z-345TMCA, Tabla 4 entradas 3, 4, 7, 8, 11 y 12) no presentan mayor reactividad en estas condiciones. En el caso del Z-3MCA, se utiliza como solución de partida para el calentamiento una mezcla E+Z-3MCA en relación porcentual 20:80 (E:Z). En este caso se utiliza una mezcla de los dos compuestos obtenidos por foto isomerización en solución del isómero *E*, dada la dificultad experimental para la separación de estos isómeros

ya sea mediante el protocolo descrito por Salum y col.²⁶ (ver sección 4.2.1) o por otras técnicas cromatográficas. Luego del calentamiento, tanto en MeCN como en MeOH, el crudo de reacción es caracterizado por ¹H-RMN obteniéndose la misma proporción relativa de ambos isómeros, indicando que en estas condiciones experimentales no hay isomerización térmica (Tabla 4 entradas 7 y 8).

Tabla 4. Productos formados y condiciones de reacción en el calentamiento por MW en solución de distintos ácidos E y Z-cinámicos. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización.

| Nº | Compuesto | Solvente | Conc. [mM] | Temp. [°C] | Tiemp. [min] | %D ^a | %I ^a |
|----|-----------------------|----------|------------|------------|--------------|-----------------|--------------------|
| 1 | E-2MCA | MeCN | 6,3 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 2 | E-2MCA | MeOH | 6,8 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 3 | Z-2MCA | MeCN | 6,5 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 4 | Z-2MCA | MeOH | 6,3 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 5 | E-3MCA | MeCN | 6,9 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 6 | E-3MCA | MeOH | 6,4 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 7 | E+Z-3MCA ^b | MeCN | 6,2 | 200 | 30 | 0 | 20:80 ^b |
| 8 | E+Z-3MCA ^b | MeOH | 6,2 | 150 | 30 | 0 | 20:80 ^b |
| 9 | E-345TMCA | MeCN | 6,6 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 10 | E-345TMCA | MeOH | 6,7 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 11 | Z-345TMCA | MeCN | 6,0 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 12 | Z-345TMCA | MeOH | 6,1 | 150 | 30 | 0 | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Proporción (%) inicial de la mezcla E:Z = 20:80.

- Ácidos α -cianocinámicos (CHCA, 4MCHCA, 4ClCHCA, 4FCHCA)

Al igual que el ESA, el ECHCA es una de las matrices clásicas más utilizada en espectrometría de masa MALDI, para el estudio de diversos tipos de analitos en un amplio rango de pesos moleculares^{19,36}. Esta matriz conserva el núcleo de ácido cinámico *para* hidroxilo sustituido, pero posee un grupo ciano en el carbono *alfa* del doble enlace exocíclico. Es por eso que se decide estudiar el comportamiento térmico de esta matriz, de su isómero geométrico ZCHCA y de los Lis ECHCA.BAM y ECHCA.nHo, que han sido propuestos en el capítulo 2 y 3 de este trabajo como posibles matrices MALDI. Este estudio se realiza también sobre una serie de compuestos análogos al ECHCA, cambiando la naturaleza del sustituyente en la posición *para* del anillo aromático y en el carbono *alfa* del sistema α - β insaturado. Los resultados de estos estudios se resumen en las Tablas 5 y 6. En este caso, el proceso de descarboxilación da lugar a una mezcla de diastereómeros del tipo: *E* y *Z*-fenil-acrilonitrilo. El porcentaje relativo de cada diastereómero se informa en relación a la cantidad total de producto descarboxilado obtenido en el crudo de reacción.

Tabla 5. Productos formados y condiciones de reacción en el calentamiento por MW en solución del ECHCA y ZCHCA. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización.

| Nº | Matriz | Solvente | Conc. [mM] | Temp. [°C] | Tiemp. [min] | %D ^a (E:Z) ^b | %I ^a |
|----|----------------------|-------------------|------------|------------|--------------|------------------------------------|--------------------|
| 1 | ECHCA | MeCN ^c | 6,5 | 200 | 30 | 100 (79:21) | 0 |
| 2 | ECHCA | MeCN | 6,3 | 200 | 30 | 69 (80:20) | 0 |
| 3 | ECHCA | MeCN | 6,7 | 200 | 20 | 34 (76:24) | 0 |
| 4 | ECHCA | MeCN | 6,4 | 200 | 10 | 18 (78:22) | 0 |
| 5 | ECHCA | MeCN | 6,3 | 150 | 30 | 10 (79:21) | 0 |
| 6 | ECHCA | MeCN | 6,5 | 100 | 30 | 0 | 0 |
| 7 | ECHCA | MeOH | 6,9 | 150 | 30 | t ^d | 0 |
| 8 | ECHCA.BAM | MeCN | 6,4 | 200 | 30 | 100 (80:20) ^e | 0 |
| 9 | ECHCA.BAM | MeOH | 6,7 | 150 | 30 | t ^{d,e} | 0 |
| 10 | ECHCA.nHo | MeCN | 6,5 | 200 | 30 | 100 (76:24) | 0 |
| 11 | ECHCA.nHo | MeOH | 6,6 | 150 | 30 | 10 (60:40) | 0 |
| 12 | E+ZCHCA ^f | MeCN | 6,5 | 200 | 30 | 20 (70:30) | 80:0 ^f |
| 13 | E+ZCHCA ^f | MeOH | 6,2 | 150 | 30 | t ^d | 100:0 ^f |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Proporción (%) de isómeros E y Z del fenil-acrilonitrilo en relación al total de producto descarboxilado (D), cuantificado por ¹H-RMN.

^c Tubo nuevo.

^d t= nivel de traza detectado por CCD.

^e+ Otros productos.

^f Proporción (%) inicial de la mezcla E:Z = 56:44, cuantificado por ¹H-RMN.

En las Figuras 3, A4.5 y A4.6 se muestran los espectros de ¹H-RMN del ácido ECHCA y de los LI ECHCA.BAM, ECHCA.nHo y los productos de reacción luego del calentamiento por MW durante 30 minutos en soluciones de MeCN y MeOH. Al igual que lo observado con el ácido ESA, el calentamiento del ácido ECHCA en MeCN produce la descarboxilación total o parcial del compuesto si el tubo de reacción es nuevo o usado, respectivamente (Figura 3b, c y Tabla 5 entradas 1 y 2). La descarboxilación del ácido ECHCA genera dos productos de reacción, los isómeros E y Z del fenil-acrilonitrilo. Como es de esperar el isómero E, termodinámicamente más estable, es el producto mayoritario en una relación 8:2 (E:Z). En MeCN, tanto la disminución en el tiempo de reacción como la disminución en la temperatura máxima alcanzada, induce una disminución en los rendimientos de reacción; sin embargo, la proporción relativa de ambos isómeros del fenil-acrilonitrilo se mantiene constante (Tabla 5 entradas 3 a 6). En el caso del calentamiento en MeOH el espectro de ¹H-RMN muestra que no hubo reacción térmica (Figura 3d). Sin embargo, la CCD (FM: Hexano:Acetato de Etilo 70:30, 40:60, 25:75 y 0:100), muestra una pequeña mancha de mayor R_f que el compuesto de partida y de igual R_f que el producto obtenido cuando el calentamiento se realiza en MeCN (Tabla 5 entrada 7). Esto indicaría que, incluso en MeOH, el ácido ECHCA descarboxila térmicamente para dar el fenil-acrilonitrilo,

aunque como un proceso de muy baja eficiencia. En estas condiciones cromatográficas, no se logran separar ambos isómeros del producto descarboxilado, observándose como una única mancha.

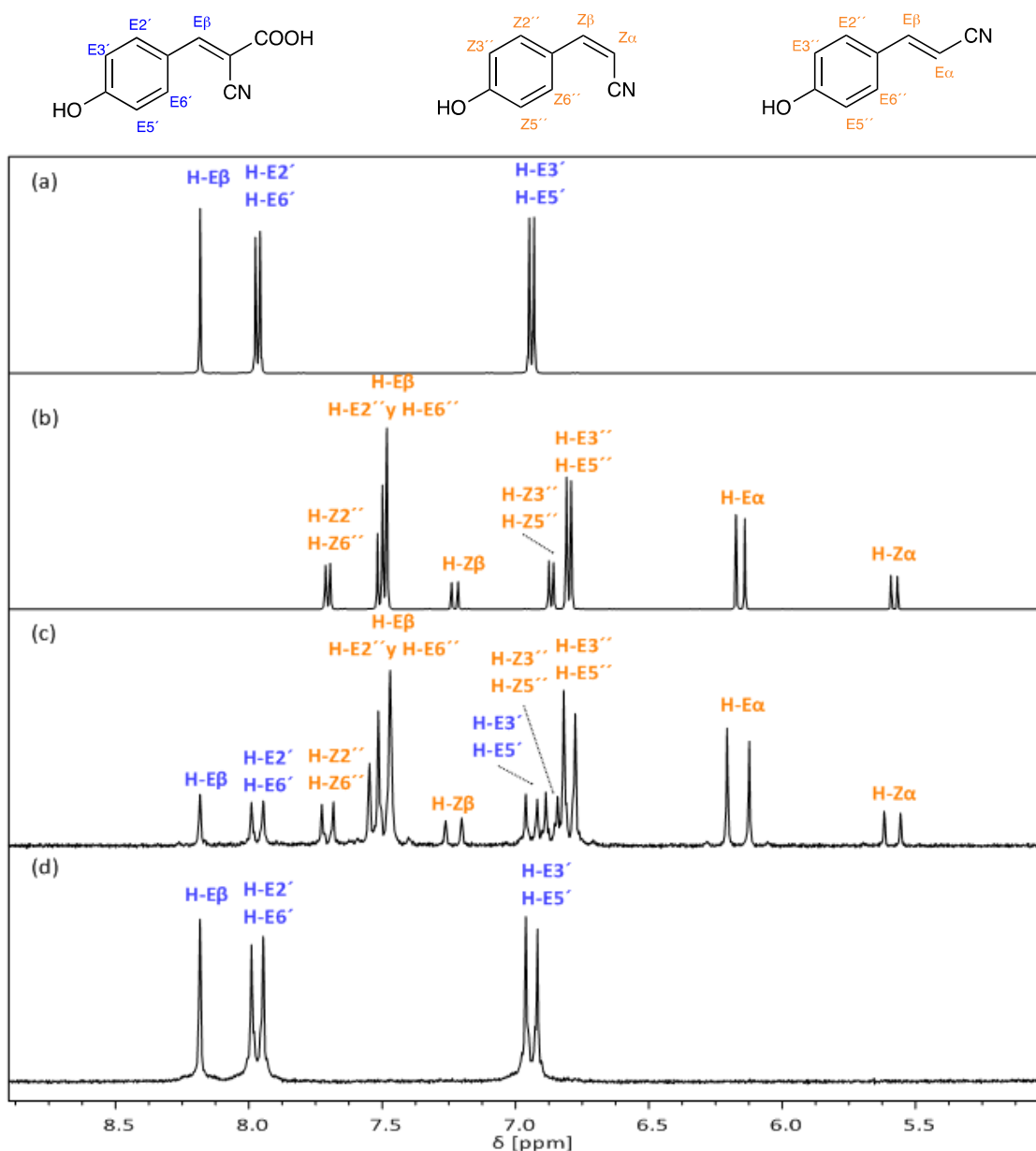


Figura 3. Espectros ^1H -RMN (δ 5-8,9 ppm) para (a) ECHCA y los productos formados por irradiación con MW en (b) MeCN (tubo nuevo, 200 $^{\circ}\text{C}$, 30 min), (c) MeCN (tubo viejo, 200 $^{\circ}\text{C}$, 30 min) y (d) MeOH (150 $^{\circ}\text{C}$, 30 min). Espectros ^1H -RMN: (a y b) 500 MHz, (c y d) 200 MHz, solvente: DMSO-d_6 .

En presencia de una amina, se observa un aumento en el rendimiento de la reacción de descarboxilación térmica, alcanzando un 100% de conversión en MeCN, aún en un tubo de reacción usado (Figuras A4.5b y A4.6b, Anexo 4). Sin embargo, en MeOH el porcentaje de producto descarboxilado no parece aumentar con respecto a la reacción en ausencia de la base,

siempre manteniéndose al nivel de trazas, detectado por CCD (Tabla 5 entradas 9 y 11) y en el caso del ECHCA.nHo por ^1H -RMN (Figura A4.6c). En el caso de la reacción del LI ECHCA.BAM, tanto en MeCN como en MeOH, se genera otro producto no identificado posiblemente originado vía adición de Michael (Figura A4.5).

En la Figura 4 se muestran los espectros ^1H -RMN de la mezcla de isómeros E y Z-CHCA obtenidos por foto isomerización en solución y los productos de reacción térmica obtenidos a partir de la mezcla, en solución de MeCN y MeOH. Luego de la irradiación UV del isómero E, la reacción alcanza el equilibrio fotoestacionario, obteniéndose una mezcla de ambos isómeros en proporción 56:44 (E:Z). Dada la dificultad de separar ambos isómeros, se decide evaluar la reactividad térmica del isómero Z, a partir de la reactividad de la mezcla. Tanto en MeCN como en MeOH se observa la desaparición total del isómero Z y la aparición de un pequeño porcentaje de producto descarboxilado, 20% en MeCN y al nivel de trazas en MeOH (Figura 4b y c, Tabla 5 entradas 12 y 13).

Al igual que lo observado para los otros ácidos cinámicos *para*-hidroxi sustituidos (SA, FE y CUM), el ECHCA descarboxila térmicamente mientras que el isómero ZCHCA isomeriza para dar el del isómero termodinámicamente más estable. Sin embargo, llama la atención el aumento de la reactividad térmica del ECHCA en solución de MeOH con respecto al resto de los ácidos *para*-hidroxicinámicos, que en las mismas condiciones experimentales (150°C 30 min) si bien presentan descarboxilación térmica, esto ocurre como un proceso de muy bajo rendimiento.

Al modificar la sustitución en la posición *para* del anillo aromático de los ácidos α -cianocinámicos, el aumento de la reactividad en comparación a los ácidos cinámicos también resulta evidente. Al cambiar el sustituyente en posición 4 por un grupo metoxilo, en MeCN se observa entre 10 y 27% de producto descarboxilado (Tabla 6 entradas 1 y 2), mientras que esta misma sustitución en un ácido cinámico no modifica la reactividad (E-245TMCA, E-345TMCA, Tabla 3 entradas 11 y 4 y Tabla 4 entrada 9, respectivamente). Otro ejemplo es el E-4ClCHCA que descarboxila en solución de acetonitrilo con un 73% de rendimiento (Tabla 6 entrada 4), mientras que el ácido E-4ClCA no reacciona (Tabla 3 entrada 12). La unidad α -cianocinámica le confiere a la molécula una particular reactividad.

A diferencia de lo descrito para los ácidos cinámicos, la presencia del grupo CN en el carbono α le confiere a esta familia de compuestos una reactividad térmica particular, ya que no solo los que poseen un grupo hidroxilo en posición *para* del anillo aromático dan el producto descarboxilado. En este caso, tanto los compuestos sustituidos en posición *para* con grupos

hidroxilo, como con grupos metoxilo o con los halógenos Cl o F presentan descarboxilación en MeCN a partir del isómero *E* (Tabla 6 entradas 1, 2, 4 y 8).

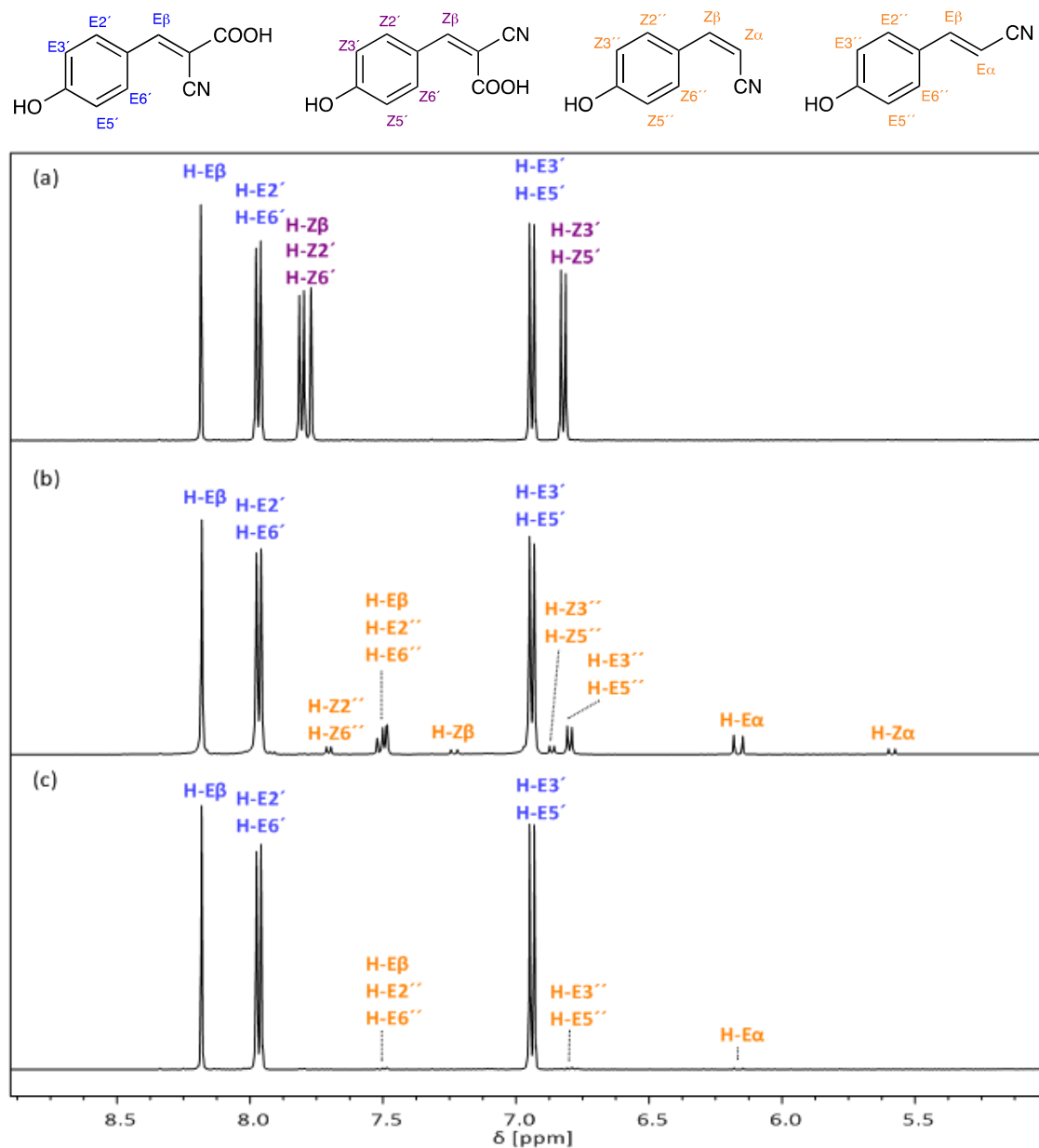


Figura 4. Espectros ¹H-RMN (δ 5-8,9 ppm) para la mezcla (a) E+ZCHCA (56:44 E:Z) y los productos formados por irradiación con MW en (b) MeCN (tubo viejo, 200 °C, 30 min) y (c) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ¹H-RMN: 500 MHz, solvente: DMSO-d₆.

En cuanto a la isomerización térmica, se observa que los isómeros *Z* de los compuestos halogenados presentan isomerización *Z*→*E* en MeOH (Tabla 6 entradas 7 y 11), al igual que lo observado para el ZCHCA. En estos dos casos, la eficiente descarboxilación en MeCN no permite sacar conclusiones con respecto a si existe o no isomerización térmica en este solvente. Sin embargo, dados los resultados descriptos, se presume que la isomerización térmica *Z*→*E* ocurre y desde este isómero se produce la descarboxilación para dar el correspondiente fenil-

acrilonitrilo. En el caso particular de los ácidos 4ClCHCA y 4FCHCA, las mezclas E+Z utilizadas para los estudios de estabilidad térmica tienen un pequeño porcentaje de producto descarboxilado, 13 y 19%, respectivamente. Este compuesto podría originarse como producto de descomposición térmica durante la foto isomerización a 310 nm en MeCN por calentamiento de la solución debido a las lámparas UV (Tabla 6 entradas 6, 7, 10 y 11).

Tabla 6. Productos formados y condiciones de reacción en el calentamiento por MW en solución de análogos al CHCA. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización.

| Nº | Matriz | Solvente | Conc. [mM] | Temp. [°C] | Tiemp. [min] | %D ^a (E:Z) ^b | %I ^a |
|----|--------------------------|-------------------|------------|------------|--------------|------------------------------------|--------------------|
| 1 | E-4MCHCA | MeCN ^c | 6,4 | 200 | 30 | 27 (50:50) | 0 |
| 2 | E-4MCHCA | MeCN | 6,2 | 200 | 30 | 10 (50:50) | 0 |
| 3 | E-4MCHCA | MeOH | 6,8 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 4 | E-4ClCHCA | MeCN | 6,3 | 200 | 30 | 73 (37:63) | 0 |
| 5 | E-4ClCHCA | MeOH | 6,7 | 250 | 30 | 0 | 0 |
| 6 | E+Z-4ClCHCA ^d | MeCN | 6,1 | 200 | 30 | 100 (45:55) | 0 |
| 7 | E+Z-4ClCHCA ^d | MeOH | 6,5 | 150 | 30 | 15 (64:36) ^d | 85:0 ^d |
| 8 | E-4FCHCA | MeCN | 6,8 | 200 | 30 | 23 (70:30) | 0 |
| 9 | E-4FCHCA | MeOH | 6,3 | 150 | 30 | 0 | 0 |
| 10 | E+Z-4FCHCA ^e | MeCN | 6,1 | 200 | 30 | 100 (78:22) | 0 |
| 11 | E+Z-4FCHCA ^e | MeOH | 6,5 | 150 | 30 | 0 | 100:0 ^e |
| 12 | EαMECA | MeCN | 6,3 | 200 | 30 | 0 | 0 |
| 13 | EαMECA | MeOH | 6,3 | 150 | 30 | 0 | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Proporción (%) de isómeros E y Z del fenil-acrilonitrilo en relación al total de producto descarboxilado (D), cuantificado por ¹H-RMN.

^c Tubo nuevo.

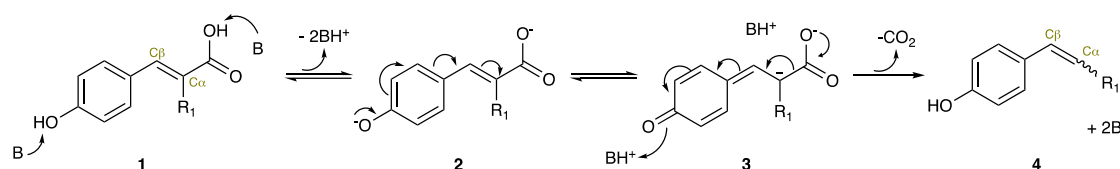
^d Proporción (%) inicial de la mezcla E:Z:D = 47:34:19, cuantificado por ¹H-RMN.

^e Proporción (%) inicial de la mezcla E:Z:D = 50:37:13, cuantificado por ¹H-RMN.

En la literatura se describen dos posibles mecanismos para la descarboxilación de ácidos cinámicos. Uno de ellos es una catálisis orgánica mediada por una base que se puede dar tanto en ausencia de solvente³⁷, en solución³⁷⁻³⁹ e incluso en un soporte sólido³¹, mientras que el otro es una eliminación-β en fase sólida⁴⁰ que no requiere de una catálisis básica. Ambos mecanismos coinciden en el punto que el requerimiento del sustrato para la descarboxilación es la presencia de un sustituyente hidroxilo (-OH) en posición *para* del anillo aromático del ácido cinámico. Este tipo de sustitución permite la formación de un intermediario de tipo quinona que rápidamente descarboxila.

En 1960 Cohen and Jones³⁸ sugieren un mecanismo para la descarboxilación de ácidos *para*-hidroxicinámicos (**1**) catalizado por una base en solución acuosa (Esquema 2), que propone la formación de un di anión (**2**, Ar-O⁻ y COO⁻) que luego genera la formación de un intermediario

de tipo quinona (**3**) a partir del cual se produce la pérdida de dióxido de carbono. Nomura y col. en 2005³⁷ retoma este mecanismo y describe la descarboxilación de otros ácidos *para* y *orto*-hidroxicinámicos mediante el calentamiento por microondas en varios tipos de solventes, e incluso en ausencia del mismo y en presencia de una amplia variedad de aminas. En este trabajo se destaca la necesidad de un sustituyente hidroxilo en posición *orto* o *para* del anillo aromático, así como la importancia del anión carboxilato en el procesos de descarboxilación, ya que un éster del mismo ácido no reacciona. En 2007 Bernini y col.³¹ informan una mejora en los rendimientos de esta reacción al utilizar un soporte sólido (sílica gel y alúmina básica) como medio de reacción. En este caso utilizan 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) como base y el calentamiento lo realizan por MW. Este tipo de mecanismo (Esquema 2), podría explicar los resultados experimentales observados en las reacciones de los ácidos ESA, ZSA y ECHCA en presencia de BAM y nHo en ambos solventes. Sin embargo, este mecanismo no explicaría en primera instancia la descarboxilación de estos ácidos y de los otros ácidos descriptos en esta sección en solución de MeCN por calentamiento en MW.

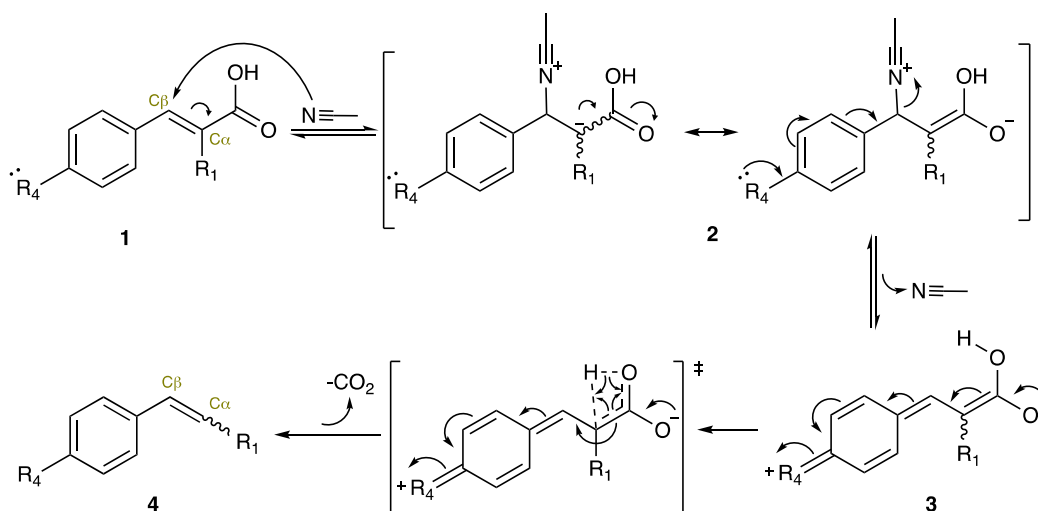


Esquema 2. Mecanismo propuesto en la literatura para la descarboxilación de ácidos cinámicos catalizada por una base^{31,37,38}

Por otro lado, en 2005 Simpson y col.⁴¹ en su intento de sintetizar ácidos *E*-4-hidroxicinámicos a partir de la condensación de 4-hidroxibenzaldehidos con ácido malónico en presencia de una base, observaron únicamente la formación de 4-vinilfenoles. Cuando se utiliza benzaldehído y ácido malónico en presencia de una base, la reacción de Knoevenagel es acompañada por una descarboxilación para dar como producto de reacción el correspondiente ácido *E*-cinámico⁴². Sin embargo, para los 4-hidroxibenzaldehidos, el intermediario de la reacción, mediante una eliminación de la amina en el carbono *beta* asistida por el sustituyente hidroxilo en posición *para* del anillo aromático, forma un intermediario de tipo quinona que nuevamente descarboxila⁴¹. Shina y col.³³ en 2007 describen el mismo tipo de observaciones, mejorando significativamente los rendimientos de obtención de los estirenos, utilizando MW como método de calentamiento de las soluciones. En este trabajo se atribuye el aumento en el rendimiento de la reacción a la estabilización del estado de transición, que es más polar que el material de partida, debido a la estabilización de compuestos polares por efecto de las microondas^{28,33}. En 2010 y 2011 Saenz-Méndez y col.^{34,43} hacen un estudio detallado de las condiciones experimentales y una descripción computacional del mecanismo de reacción

propuesto por Shina. Este estudio respalda la propuesta de que la doble descarboxilación del producto de condensación de Knoevenagel para dar el estireno, es a través de un intermediario de tipo quinona, que se forma por eliminación de la base del β -aminoácido, asistido por el sustituyente hidroxilo en posición *para* del anillo.

El claro efecto del solvente en la descarboxilación de estos ácidos, las observaciones experimentales descritas anteriormente y lo informado en la literatura nos lleva a proponer el mecanismo de reacción mostrado el Esquema 3. En este mecanismo se propone un ataque nucleofílico al C_β del doble enlace exocíclico del ácido cinámico (**1**). En el segundo paso de reacción se produce la eliminación del nucleófilo del intermediario (**2**) asistido por el sustituyente en posición *para* del anillo aromático (R_4) para dar el intermediario tipo quinona (**3**) que rápidamente descarboxila, con una transferencia de protón intramolecular al C_α , para dar el correspondiente estireno (**4**).



Esquema 3. Mecanismo propuesto para la descarboxilación de ácidos cinámicos catalizada por un nucleófilo con asistencia explícita del sustituyente en posición *para*.

Este mecanismo implicaría que el MeCN actúe como nucleófilo. El MeCN es ampliamente utilizado como solvente en química orgánica e inorgánica dada su gran capacidad de disolución, tanto de compuestos polares como de baja polaridad. El acetonitrilo es un importante reactivo en diversos tipos de reacciones, que han sido compiladas detalladamente por Hoff⁴⁴ en un interesante trabajo. La amplia utilidad del MeCN se debe a que los dos átomos de carbono y el nitrógeno poseen diferente reactividad: el protón metílico es ligeramente ácido y puede ser desprotonado para generar un centro nucleofílico, el carbono del triple enlace es ligeramente electrofílico mientras que el par de electrones libres del nitrógeno puede actuar como nucleófilo en reacciones con electrófilos o en coordinación de centros electrofílicos.

En nuestro caso, el acetonitrilo se comportaría como un catalizador nucleofílico a través de un mecanismo similar al descrito en la literatura en el campo de los hidratos de carbono como inductor diastereoselectivo en las reacciones de glicosilación⁴⁵. En estas reacciones, cuando la glicosilación es realizada en acetonitrilo, con un grupo protector no participante en el carbono 2, se observa la formación diastereoselectiva del anómero β (β -D o β -L). Este efecto estereoselectivo se explica por el ataque nucleofílico del acetonitrilo al ion oxocarbenio bajo control cinético para dar lugar al ion α -glicopiranosilacetonitrilio, que luego sufre el ataque nucleofílico del aceptor, por un mecanismo de tipo S_N2 , al carbono anomérico para dar diastereoselectivamente el anómero β del glicósido⁴⁵⁻⁵⁰ (Esquema A4.1a). El acetonitrilo también ha sido descrito en la literatura como nucleófilo en las reacciones de tipo Ritter⁴⁴. En este mecanismo cualquier sustrato capaz de formar un carbocatión, incluso alquenos, sufre la adición del nitrilo para dar un ion nitrilo intermediario, que dependiendo del tratamiento puede sufrir distintas vías de reacción. En su forma original y más conocida el tratamiento del intermediario en medio ácido acuoso genera la hidrólisis del mismo para dar la correspondiente amida^{51,52} (Esquema A4.1b).

Si bien en el mecanismo del Esquema 3, se propone la formación de un enlace C-N por el ataque nucleofílico del MeCN al C_β del ácido cinámico (**1**), dada la baja nucleofilia del N del MeCN y el bajo carácter electrofílico del C_β , se puede pensar el mecanismo como una coordinación del par de electrones del N al carbono C_β . Esto generaría una disminución en la energía necesaria para la formación del intermediario de tipo quinona (**3**), lo que daría lugar a la reacción en este solvente. El hecho experimental de que con los sucesivos usos del tubo de reacción se vea disminuido el rendimiento de esta reacción con estos analitos, lleva a pensar que la reacción de descarboxilación en MeCN está catalizada por el solvente, pero la presencia además de algún componente inorgánico de las paredes del tubo de reacción, el que participaría en la descarboxilación, haciendo que se vea disminuida la energía de activación de la misma y por lo tanto mejorando su rendimiento. Pese a no ser el objetivo de nuestro proyecto de investigación, se efectuaron múltiples experimentos para la comprensión de este fenómeno. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos nos resulta imposible explicar claramente la razón del comportamiento observado. Cabe señalar que se consultó a los representantes locales del equipo, no obteniendo de ellos ninguna referencia o conocimiento de este tipo de resultados.

El mecanismo propuesto en el Esquema 3, implica un primer paso de reacción de un alto costo energético debido a la pérdida de conjugación del sistema π . En este sentido la velocidad de la reacción va a depender del carácter electrofílico del C_β y el poder nucleofílico del catalizador. En este caso el intermediario de reacción **2** es más polar que el material de partida

por lo que se vería estabilizado por la MW, disminuyendo la energía de activación de este paso de reacción. Sin embargo, y a pesar del costo energético del primer paso propuesto, el motor termodinámico de esta reacción es la reacción irreversible correspondiente a la pérdida de una molécula gaseosa de dióxido de carbono, desplazando la reacción hacia la formación del producto **4**. A pesar de esto la reacción requiere altas temperaturas con el fin de superar factores termodinámicos y cinéticos desfavorables⁴³. Si bien la formación del intermediario de tipo quinona (**3**) puede darse tanto en ácidos cinámicos *orto* y *para* hidroxil sustituidos, la reactividad de estos intermediarios no es exactamente la misma, por el contrario las *orto*-quinonas son menos estables que las *para*-quinonas⁵³. Es por esto que cuando se utiliza al ácido *orto*-hidroxicinámico (E-2HCA), otros caminos de reacción pueden estar favorecidos y por lo tanto se observan productos competitivos.

Por otro lado, la obtención de la mezcla de isómeros geométricos *E* y *Z*, en la descarboxilación del ECHCA (Tabla 5 y Figura 3) y de sus análogos (E-4MCHCA, E-4ClCHCA y E-4FCHCA, Tabla 6), ponen en evidencia que la descarboxilación implica el paso por un intermediario de reacción donde la unión C=C adquiere un carácter sigma por el cual puede producirse la libre rotación en torno de esa unión y generar los dos isómeros geométricos del acrilonitrilo correspondiente. Este hecho experimental refuerza el mecanismo propuesto en el Esquema 3 ya que en el intermediario **2** el enlace C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ presenta libre rotación.

En relación a este mecanismo se decide calcular por métodos computacionales el potencial electrostático y la carga atómica de algunos de los ácidos cinámicos aquí estudiados. La geometría optimizada de los distintos ácidos cinámicos se calculó utilizando un método semi-empírico (PM3, UHF, Polak-Ribiere, HyperChem 8) y luego se realizó sobre esta estructura un cálculo de punto único (single point) con un método *Ab initio* (6-31G**, UHF, HyperChem 8) para obtener los valores de cargas atómicas y el potencial electrostático. Los cargas atómicas de los carbonos α y β del doble enlace exocíclico de los ácidos cinámicos se muestran en la Tabla 7 y los potenciales electrostáticos se muestran en las Figuras 5, 6, 7 y A4.7.

Las cargas atómicas listadas en la Tabla 7 muestran claramente que aquellos ácidos E-cinámicos que poseen un sustituyente hidroxilo en posición *orto* o *para* del anillo aromático presentan una carga formal positiva sobre el carbono β del doble enlace exocíclico (Tabla 7, entradas 1, 5, 9 y 11). Esto le confiere al carbono β carácter electrofílico, susceptible a un ataque nucleofílico y/o una coordinación por una especie rica en electrones. Sin embargo, si el sustituyente hidroxilo se encuentra en posición *meta* o se cambia el sustituyente por otro grupo (metoxilo o cloro) en cualquier posición del anillo aromático, el carbono β adquiere una carga formal negativa (Tabla 7, entradas 3, 15, 17 y 19). En la mayoría de los casos se observa una

buena correlación entre el cálculo de las cargas atómicas y el potencial electroestático. En el caso de los ácidos cinámicos ESA, EFE y ECUM, que presentan un carbono β con una carga formal positiva, se observa un mayor potencial electrostático en esa zona (zona azul). Consistente con esto, los ácidos E-345TMCA, EiFE y ECA, que presentan una carga negativa sobre el C_β , muestran una disminución en el potencial electrostático sobre ese carbono (zona verde) (Figuras 5, 6 y A4.7). Esto refuerza la propuesta mecanística para la descarboxilación de los ácidos 4-hidroxicinámicos detallada en el Esquema 3.

Tabla 7. Cálculo de cargas atómicas en los distintos ácidos cinámicos (6-31G**). Estructura general de ácidos cinámicos página 18.

| Nº | Compuesto | Sustituyentes | | | Carga atómica | |
|----|-----------------|------------------|------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | | R ₄ | R ₂ | R ₁ | C _{β} | C _{α} |
| 1 | ESA | OH | H | H | 0,014 | -0,202 |
| 2 | ZSA | OH | H | H | -0,019 | -0,203 |
| 3 | E-345TMCA | OCH ₃ | H | H | -0,006 | -0,184 |
| 4 | Z-345TMCA | OCH ₃ | H | H | -0,023 | -0,205 |
| 5 | EFE | OH | H | H | 0,010 | -0,201 |
| 6 | ZFE | OH | H | H | -0,021 | -0,199 |
| 7 | EiFE | OCH ₃ | H | H | 0,005 | -0,198 |
| 8 | ZiFE | OCH ₃ | H | H | -0,024 | -0,197 |
| 9 | ECUM | OH | H | H | 0,019 | -0,207 |
| 10 | ZCUM | OH | H | H | -0,016 | -0,205 |
| 11 | E-2HCA | H | OH | H | 0,031 | -0,223 |
| 12 | Z-2HCA | H | OH | H | -0,030 | -0,192 |
| 13 | E-2MCA | H | OCH ₃ | H | 0,001 | -0,206 |
| 14 | Z-2MCA | H | OCH ₃ | H | -0,016 | -0,200 |
| 15 | E-3HCA | H | H | H | -0,003 | -0,189 |
| 16 | Z-3HCA | H | H | H | -0,034 | -0,189 |
| 17 | E-3MCA | H | H | H | -0,003 | -0,195 |
| 18 | Z-3MCA | H | H | H | -0,029 | -0,195 |
| 19 | E-4CICA | Cl | H | H | -0,001 | -0,191 |
| 20 | Z-4CICA | Cl | H | H | -0,031 | -0,191 |
| 21 | ECA | H | H | H | -0,009 | -0,197 |
| 22 | ZCA | H | H | H | -0,025 | -0,199 |
| 23 | ECHCA | OH | H | CN | 0,067 | -0,059 |
| 24 | ZCHCA | OH | H | CN | 0,039 | -0,026 |
| 25 | E-4MCHCA | OCH ₃ | H | CN | 0,047 | -0,038 |
| 26 | Z-4MCHCA | OCH ₃ | H | CN | 0,038 | -0,026 |
| 27 | E-4ClCHCA | Cl | H | CN | 0,034 | -0,028 |
| 28 | Z-4ClCHCA | Cl | H | CN | 0,024 | -0,014 |
| 29 | E- α MCA | H | H | CH ₃ | -0,026 | -0,132 |

En el caso de los ácidos EiFE y E-2MCA, que no reaccionan en estas condiciones experimentales, presentan una pequeña carga positiva sobre el carbono β del doble enlace, 0,005 y 0,001 respectivamente (Tabla 7 entradas 7 y 13), sin embargo, el potencial electrostático

de estos compuestos no muestra sobre este carbono una zona de mayor potencial que en el resto de la molécula, indicando que el C_β no es un centro electrofílico (Figuras 6c y A4.7).

A diferencia del isómero *E*, todos los ácidos *Z*-cinámicos, independientemente del tipo y posición del sustituyente en el anillo aromático, poseen una carga formal negativa sobre el carbono β del doble enlace exocíclico (Tabla 7 entradas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22). Sin embargo, en algunos casos se observa un pequeño aumento en el potencial electrostático sobre el C_β en estos isómeros (ej. ZFE, ZiFE y ZCA, Figuras 6b y d y A4.7). A pesar de esto, el pobre carácter electrofílico de este carbono y la geometría no plana de los isómeros *Z* (ver geometrías optimizadas en las Figuras 5, 6 y A4.7) de estos ácidos cinámicos determina que, a pesar de poseer un grupo hidroxilo en posición *para* del anillo aromático, estos no descarboxilan. Esto estaría de acuerdo con el mecanismo propuesto ya que la geometría plana semirrígida del isómero *E* permite un solapamiento óptimo del orbital π necesario para la formación del intermediario quinónico que luego descarboxila.

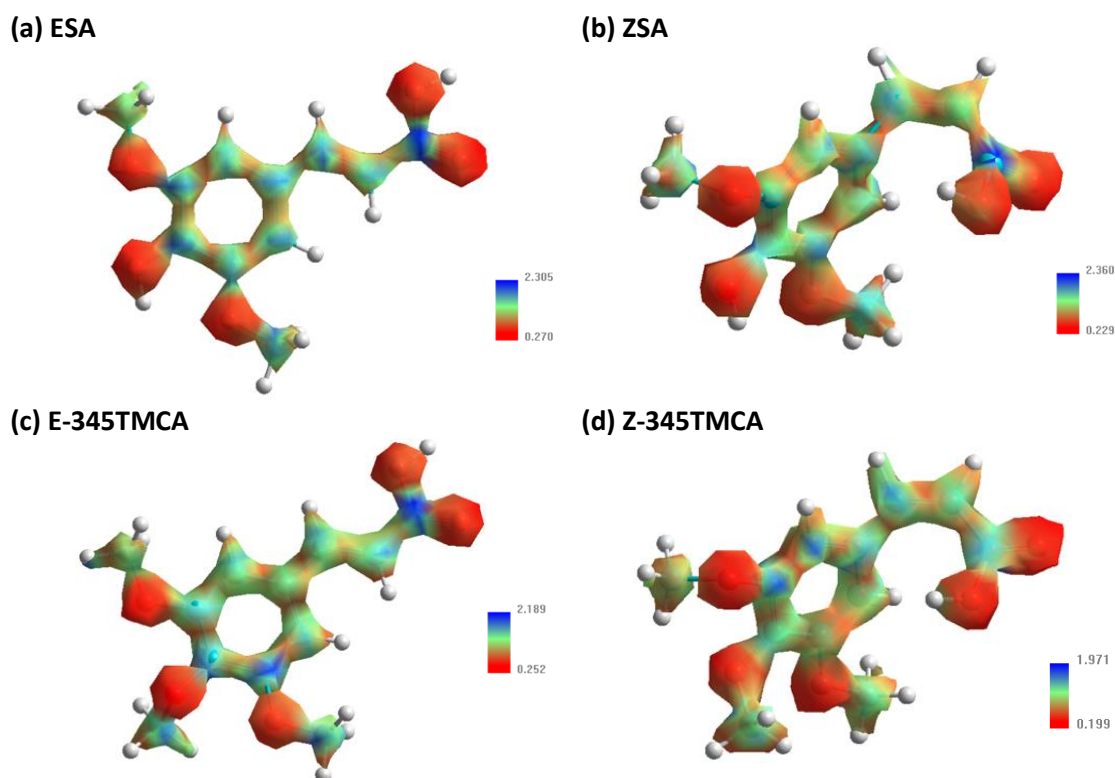


Figura 5. Superficie de potencial electrostático molecular de (a) ESA, (b) ZSA, (c) E-345TMCA y (d) Z-345TMCA. *Ab initio* (6-31G**, UHF, HyperChem 8).

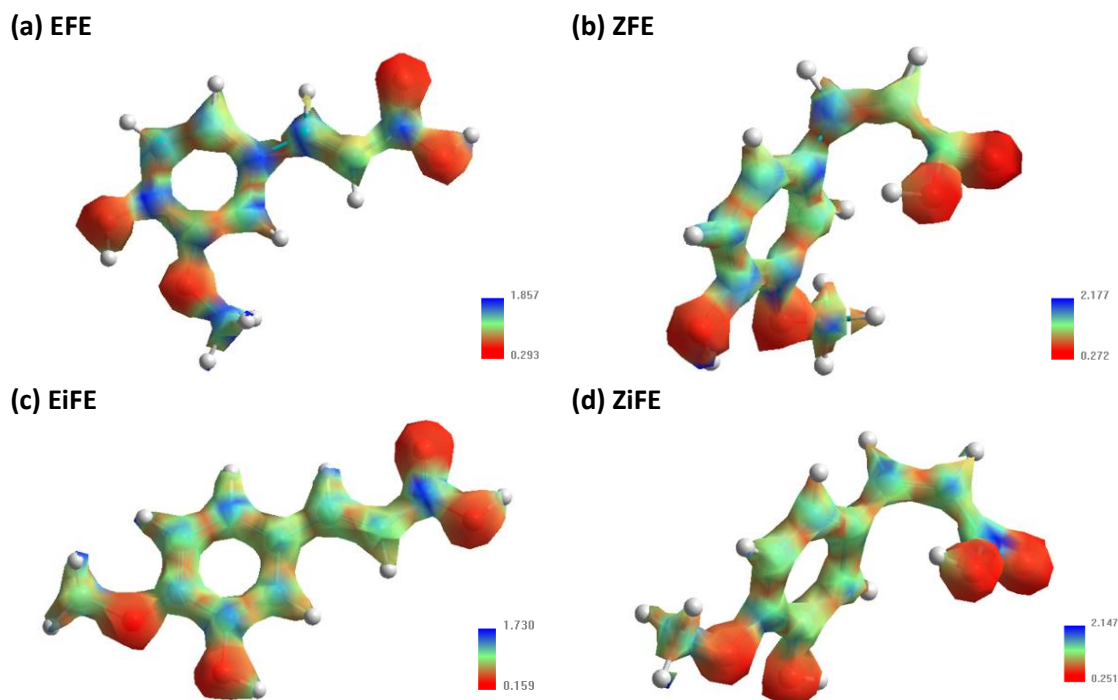


Figura 6. Superficie de potencial electrostático molecular de (a) EFE, (b) ZFE, (c) EiFE y (d) ZiFE. *Ab initio* (6-31G**, UHF, HyperChem 8).

A diferencia de lo observado en los ácidos cinámicos, el grupo ciano presente en el C_α genera una carga formal positiva sobre el C_β en ambos isómeros geométricos del ácido α -cianocinámico, independientemente de si el sustituyente en posición *para* del anillo aromático es un grupo hidroxilo, metoxilo o un halógeno (Tabla 7 entradas 23 a 28). Este resultado es consistente con lo observado en las Figuras 7 y A4.7 donde se observa un aumento en el potencial electrostático sobre este carbono tanto en el E/ZCHCA, como en los pares E/Z-4MCHCA y E/Z-4ClCHCA. Este aumento en el carácter electrofílico del carbono β de los ácidos α -cianocinámicos, en comparación con los ácidos cinámicos descritos anteriormente, induciría un aumento en la reactividad de estos compuestos, observándose como ya se describió, descarboxilación incluso cuando el sustituyente en posición *para* del anillo aromático es un grupo metoxilo o un halógeno. Si bien los isómeros Z presentan un C_β con carácter electrofílico, su geometría no plana impediría la formación del intermediario de tipo quinona porque lo que se presume que en este caso primero se da la isomerización térmica y luego la descarboxilación. Cuando se modifica la naturaleza del sustituyente en el C_α del doble enlace por un grupo metilo, se modifican significativamente las cargas atómicas y el potencial electrostático de la molécula. En este sentido el E- α MCA presenta una carga formal negativa sobre el C_β (Tabla 7 entradas 29) y una disminución en el potencial electrostático sobre este carbono (Figura A4.7), en un acuerdo con lo observado experimentalmente ya que este compuesto muestra una reactividad similar al ECA.

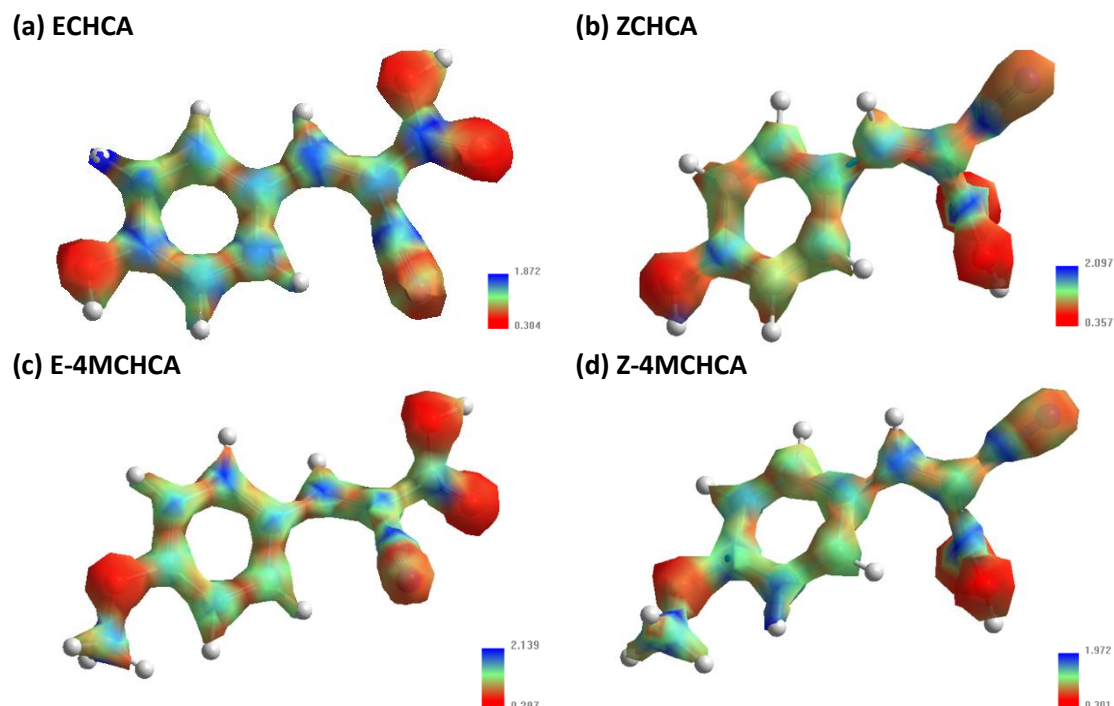
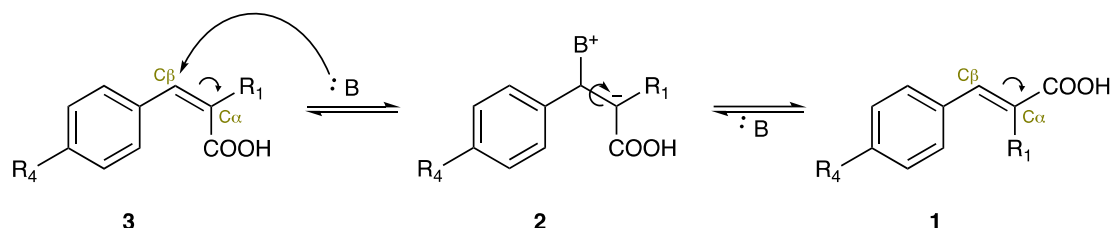


Figura 7. Superficie de potencial electrostático molecular de (a) ECHCA, (b) ZCHCA, (c) E-4MCHCA y (d) Z-4MCHCA. *Ab initio* (6-31G**, UHF, HyperChem 8).

En el caso de la isomerización de alquenos simples, la isomerización $Z \rightarrow E$ está termodinámicamente favorecida dada la gran estabilidad que le confiere al isómero *E* el eficiente solapamiento de orbitales atómicos *p* en el sistema π conjugado gracias a su geometría completamente plana. En la literatura se describen dos posibles mecanismos para la isomerización térmica $Z \rightarrow E$. En el primero de ellos la molécula permanece en el estado electrónico fundamental (S_0), en el cual, superando la energía de activación necesaria para alcanzar un estado de transición de tipo di-radicaloide, situación en la cual el enlace C-C puede rotar, da el isómero *E* termodinámicamente más estable (Figura 8). Este tipo de reacción requiere por lo general una alta energía de activación (E_a)^{54,55}. Sin embargo, hoy en día se conoce que estas reacciones pueden ser catalizadas por una amplia variedad de compuestos (ej: ácidos, bases, halógenos, metales y enzimas^{56,57}). Incluso se propone que muchos cationes inorgánicos y otras especies presentes en la superficie de los tubos de reacción son capaces de catalizar la isomerización $Z \rightarrow E$ produciendo una disminución en la energía de activación y por lo tanto un aumento en la velocidad de la reacción en relación a lo esperado⁵⁵.

Patai y col.⁵⁸ describen la isomerización nucleofílica $Z \rightarrow E$ del éster etílico del ácido *orto*-metoxi- α -cianocinámico (*Z*- α -ciano- β -*O*-metoxifenilacrilato de etilo). El mecanismo para la isomerización es una catálisis en la que se propone un ataque nucleofílico al C_β electrofílico de la especie (**3**) en estado electrónico fundamental. El carbanión (**2**) resultante de este ataque

puede libre rotar y luego por eliminación del nucleófilo producir exclusivamente el isómero *E* (**1**), dado que este es el isómero termodinámicamente más estable. En este trabajo se informa que la catálisis se da con una amplia variedad de nucleófilos, incluso con nucleófilos débiles como etanol o agua. Este mecanismo comparte el primer paso de reacción propuesto en el Esquema 3, con la diferencia que a partir del intermediario **2** se produce la eliminación de :B para dar nuevamente el alqueno en su forma termodinámicamente más estable (**1**) como se muestra en el Esquema 4.



Esquema 4. Mecanismo propuesto por Patai y col. para la isomerización *Z*→*E* de ácidos α -cianocinámicos catalizado por un nucleófilo⁵⁸.

En el segundo mecanismo propuesto para la isomerización térmica de alquenos, la molécula experimenta un cambio en su configuración electrónica (cruce entre sistemas; *inter system crossing*, ISC), pasando desde el estado electrónico fundamental singlete (S_0) al estado electrónico excitado triplete de menor energía (T_1)^{54,55} (Figura 8). Desde este estado, el mecanismo requiere una menor energía de activación que el descrito anteriormente. Como se observa en la Figura 8, la especie diradicaloide representa un mínimo de energía del estado electrónico excitado ($\pi, \pi^* = T_1$) ya que los orbitales *p*, ortogonales entre sí, presentan un mínimo de interacciones de tipo π . Desde este estado la desactivación electrónica al S_0 puede dar cualquiera de ambos isómeros, generándose una acumulación del isómero energéticamente más estable⁵⁵.

En nuestro caso ambos mecanismos son posibles, ya que la irradiación por MW produce un calentamiento rápido del solvente, pudiendo entregar la energía necesaria al compuesto disuelto para superar la E_a en el estado electrónico fundamental y pasar al isómero más estable. La catálisis nucleofílica en el mismo estado puede darse únicamente en aquellas especies donde el isómero *Z* presenta un C_β con carácter electrofílico, como lo que se produciría en el caso de los ácidos α -cianocinámicos (Tabla 7 entradas 24, 26, 28 y Figuras 7 b y d y A4.7) por acción del solvente (MeCN o MeOH). Esta catálisis implicaría una reducción en la energía de activación de formación del intermediario con posibilidad de libre rotación, pudiéndose producir la isomerización a menores temperaturas. En este sentido, se observó que el agregado de 1 equivalente de butilamina (BAM) a temperatura ambiente en la mezcla E+ZCHCA (56 %E 44 %Z),

obtenida por irradiación del isómero *E* en MeCN, produce la isomerización $Z \rightarrow E$ dando como resultado únicamente el isómero más estable. Este mismo comportamiento se observa para todos aquellos compuestos análogos al CHCA que tienen en posición alfa el grupo ciano. Sin embargo, el agregado de butilamina a los isómeros *Z* de los ácidos cinámicos (ZSA, ZFE, ZCUM, ZCA, Z-2MCA y Z-345TMCA) o a la mezcla E+ZαMCA (50%E 50% Z, obtenida por irradiación del isómero *E* en MeCN) no induce isomerización a temperatura ambiente.

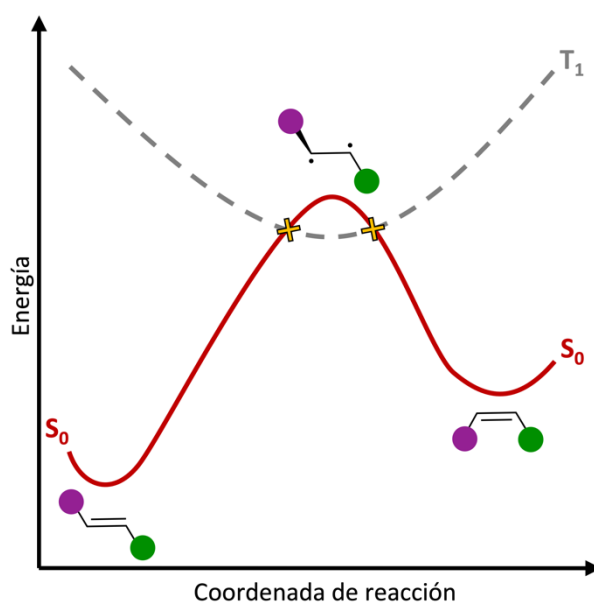


Figura 8. Diagrama de energía potencial para la isomerización $E \rightarrow Z$ de alquenos.^{55,56} Estados electrónicos fundamentales (S_0) y estado electrónico excitado triplete (T_1). Puntos de cruce o isoenergéticos (X).

De la misma forma, al producir la irradiación por MW el calentamiento del solvente, cabe la posibilidad, de que de existir estados vibracionales excitados y electrónicamente excitados iso-energéticos (punto de cruce de los diagramas de energía potencial correspondientes a ambos estados, Figura 8), se pueble este último produciéndose a partir de él la desactivación típica de los estados electrónicos excitados de los alquenos, por medio de la foto-isomerización *Z* a *E* desde el estado T_1 . Los diagramas de energía potencial, tanto del estado electrónico fundamental como de los estados excitados, son dependientes del tipo y posición de los sustituyentes en la unidad estirénica (estructura molecular). Es por esta razón que no todos los compuestos *Z* estudiados isomerizan térmicamente para dar el compuesto *E* en las condiciones de los experimentos realizados bajo MW (Tabla 4, Z-2MCA, Z-3MCA y Z-345TMCA).

Esto permitiría concluir que aquellos ácidos *Z*-α-cianocinámicos que poseen un C_β electrofílico isomerizan térmicamente desde el estado electrónico fundamental mediante una catálisis nucleofílica, que dependiendo de la fuerza del nucleófilo se puede dar a temperatura

ambiente (nucleófilo: BAM o nHo) o a mayores temperaturas (nucleófilo: MeCN o MeOH). Mientras que los ácidos Z-cinámicos, que no poseen un C_β electrofílico, podrían isomerizar térmicamente por medio del ISC entre un estado vibracionalmente excitado del electrónico fundamental y el estado excitado triplete, siempre que presenten puntos de cruce en los diagramas de energía potencial (Figura 8). Este camino de reacción requeriría una menor energía de activación que la isomerización en el estado electrónico fundamental vibracionalmente frío, ya que estos ácidos no mostraron reactividad en condiciones de catálisis nucleofílica.

4.3.2 Estabilidad térmica en fase sólida

En esta sección se describen los resultados de los estudios de estabilidad térmica en fase sólida de los distintos compuestos descritos anteriormente. En este caso los estudios en fase sólida se realizan utilizando las técnicas de termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), ya sea en un análisis en simultáneo de ambas o por separado. El análisis térmico en simultáneo (DSC + TGA) en capsula abierta, se realizó como estudio preliminar para cada una de las muestras, con el objetivo de encontrar la temperatura máxima posible para los estudios de DSC en cápsula cerrada. Los análisis térmicos en capsula abierta no son los métodos más apropiados para medir la estabilidad térmica y/o la entalpía de descomposición de un compuesto^{59,60}, sin embargo, nos permitieron hacer ciertas observaciones cualitativas del proceso de descomposición de cada compuesto sin el riesgo de inducir explosiones en sistemas cerrados. A partir de los resultados obtenidos de los análisis térmicos, se seleccionan algunas temperaturas características de cada compuesto para realizar un calentamiento controlado a escala preparativa y caracterizar los productos de reacción por espectroscopía ^1H -RMN.

- Ácidos sinapínicos (ESA y ZSA) y sus LIs con BAM

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos para el análisis en simultáneo DSC y TGA de los ácidos ESA y ZSA y sus respectivos LIs con BAM. Las curvas de DSC se muestran con los procesos exotérmicos graficados hacia arriba. Las temperaturas de cada uno de los procesos detectados se presentan en la Tabla 9. Estos resultados nos permitieron seleccionar las temperaturas características de cada compuesto, efectuar los calentamientos a escala preparativa (EP) y analizar los crudos de reacción (Figuras A4.8, A4.9, A4.11 y A4.12 y Tabla 8). La cuantificación relativa porcentual de los productos se realiza en relación a la suma de compuesto sin reaccionar, más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I) por ^1H -RMN. Por otro lado, en la Figura 10 se muestran las curvas obtenidas para el ESA y ZSA por DSC en capsula cerrada, luego de dos ciclos consecutivos de calentamiento sobre la misma

muestra y el respectivo espectro ^1H -RMN realizado sobre el crudo resultante al completar el análisis.

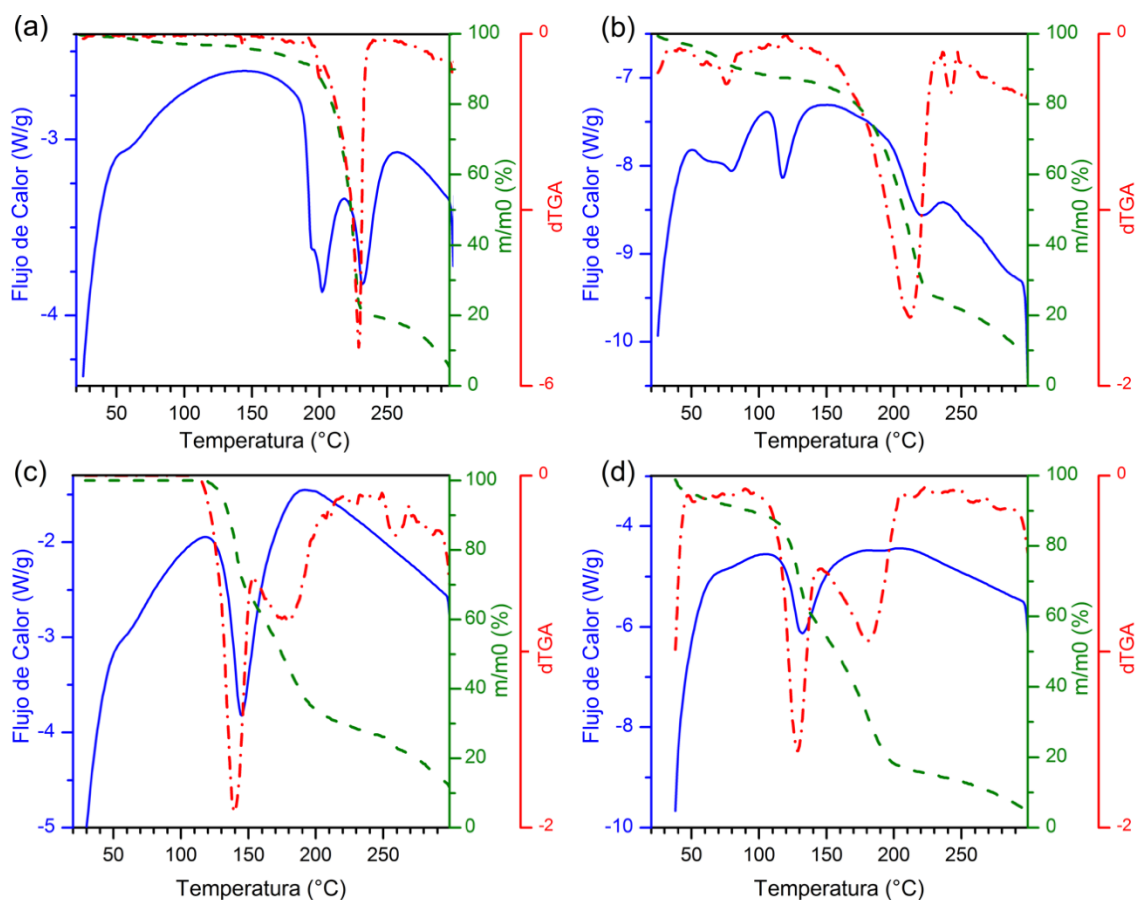


Figura 9. Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja). Compuestos (Literatura p.f./ $^{\circ}\text{C}$): (a) ESA (202⁶¹), (b) ZSA (116-118²⁶), (c) ESA.BAM y (d) ZSA.BAM.

En la curva de DSC del ESA (Figura 9a) se observan al menos dos procesos endotérmicos. El primero de ellos con una temperatura de pico de 202 $^{\circ}\text{C}$ (con un hombro a 194 $^{\circ}\text{C}$) que corresponde a la fusión del compuesto ya que esta temperatura coincide con la informada por el fabricante como p.f.⁶¹. Hasta esta temperatura el TGA muestra una pérdida de masa de aproximadamente 6%, lo cual puede atribuirse a la pérdida de humedad de la muestra. A la temperatura de fusión del compuesto, en la curva de TGA se observa el comienzo de un proceso de descomposición en una etapa cuya temperatura de máxima tasa de conversión es de 230 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{inicio}} = 196$ $^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{max}} = 230$ $^{\circ}\text{C}$, valores obtenidos a partir de la derivada primera de la curva de TGA (dTGA)), temperatura a la cual sucede el segundo proceso endotérmico observado en la curva de DSC.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los calentamientos a escala preparativa (EP) del ESA indican que a partir de los 200 $^{\circ}\text{C}$ se observa un aumento en la proporción del producto

descarboxilado desde 50 a 65 % a los 260 °C. Incluso si se realizan dos ciclos de calentamiento a esta temperatura, sobre la misma muestra, se obtiene mayor porcentaje del correspondiente estireno (Tabla 8 entradas 1 a 4 y Figura A4.8). El estudio de DSC en cápsula cerrada del ESA se realiza hasta 200 °C, ya que a esta temperatura comienza la descomposición del mismo (Figura 10a). En la curva de DSC se observan dos procesos, uno endotérmico a 195 °C durante el calentamiento de la muestra que se atribuye a la fusión del compuesto, este proceso puede no estar bien definido debido a la temperatura de corte del experimento. El segundo proceso, exotérmico, se da durante el enfriamiento de la muestra a 181 y 188 °C, en el primer y segundo ciclo respectivamente. Estos procesos se atribuyen a la cristalización del mismo, cuya diferencia de temperatura puede deberse a un pequeño porcentaje de descomposición del compuesto. Lo interesante de este experimento resulta del análisis por ^1H -RMN de la muestra recuperada. En estos espectros (Figura 10c) se observa que luego de dos ciclos de calentamiento y enfriamiento hasta 200 °C, este no sufre reacción dentro de los límites de detección de la técnica. A diferencia de lo observado a EP, que a 200 °C presenta un 50% de producto descarboxilado, esto puede deberse al error experimental en las mediciones de temperatura en el baño de arena que puede generar zonas de sobrecalentamiento y por eso se observa mayor porcentaje de descarboxilación. Esto nos permitiría concluir que la descomposición del ESA en fase sólida ocurre por descarboxilación del mismo, siendo esta y la fusión del compuesto procesos endotérmicos solapados, si bien la máxima tasa de conversión en la descomposición ocurre luego de la temperatura de fusión, a esta temperatura comienza este proceso.

A diferencia de lo observado para el ESA, su isómero Z presenta en la curva de DSC al menos tres procesos endotérmicos con una temperatura de pico de 79 (con un hombro a 60 °C), 117 y 222 °C (Figura 9b). El primero de ellos puede atribuirse a un cambio en la red cristalina del compuesto, mientras que el segundo de ellos corresponde a la fusión del mismo, ya que esta temperatura coincide con la informada en la literatura²⁶. En la curva de TGA se observa hasta los 100 °C una pérdida de masa de 10% que puede deberse a la pérdida de humedad de la muestra o solvente remanente de la síntesis ocluido y luego entra una zona de menor pendiente hasta los 140 °C donde comienza un proceso de descomposición en una etapa, cuya temperatura de máxima tasa de conversión es de 219 °C ($T_{\text{inicio}} = 140$ °C; $T_{\text{max}} = 219$ °C, valores obtenidos de dTGA) que coincide aproximadamente con el tercer proceso endotérmico observado en la curva de DSC (Figura 9b). Mirando simultáneamente las curvas de DSC y TGA podría interpretarse que el cambio en la red cristalina estaría solapado al proceso de pérdida de masa por pérdida de solvente o humedad ocluido en la muestra. Adicionalmente, los experimentos de calentamiento a EP muestran que por debajo del punto de fusión a 100 °C el

ZSA no reacciona, mientras que aproximadamente a 117 °C se observa la aparición del isómero ESA y un pequeño porcentaje de producto descarboxilado, 36 y 7% respectivamente. Al aumentar la temperatura por encima de la temperatura de descomposición, lo que se observa en el crudo de reacción es mayoritariamente producto descarboxilado, con trazas del isómero *E* y otros productos en baja proporción que no fueron identificados (Figura A4.9 y Tabla 8 entradas 8 a 10).

Tabla 8. Productos de reacción formados por calentamiento en fase sólida a escala preparativa del ESA y ZSA. D= Producto descarboxilado, I=Producto de isomerización.

| Nº | Compuesto | Temp. [°C] | %D ^a | %I ^a |
|----|-----------|------------------|------------------|-----------------|
| 1 | ESA | 200 | 50 | 0 |
| 2 | ESA | 218 | 76 | 0 |
| 3 | ESA | 260 | 65 | 0 |
| 4 | ESA | 260 ^b | 80 | 0 |
| 5 | ESA.BAM | 100 | 64 ^c | 0 |
| 6 | ESA.BAM | 140 | 55 ^c | 0 |
| 7 | ESA.BAM | 260 | 100 ^c | 0 |
| 8 | ZSA | 100 | 0 | 0 |
| 9 | ZSA | 117 | 7 | 36 |
| 10 | ZSA | 260 | 100 ^c | t ^d |
| 11 | ZSA.BAM | 100 | x | x |
| 12 | ZSA.BAM | 130 | x | x |
| 13 | ZSA.BAM | 260 | 100 ^c | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I). Cuantificado por ¹H-RMN.

^b 2 ciclos de calentamiento hasta la temperatura máxima

^c + Otros productos

^d Nivel de trazas.

x = no se cuantifica

Por otro lado, la curva de DSC obtenida para el ZSA en cápsula cerrada hasta 148 °C (Figura 10b) muestra tres procesos endotérmicos durante el primer ciclo de calentamiento. Los dos primeros procesos están superpuestos con una temperatura de pico de 78 °C con un hombro a 84 °C y el tercer proceso a 115 °C. También presenta un proceso exotérmico con un máximo a 124 °C. En el segundo ciclo de calentamiento estas señales desaparecen por completo. Al analizar el crudo de reacción por ¹H-RMN observamos que luego, tanto del primer ciclo de calentamiento como del segundo ciclo, solo se obtiene el isómero ESA, sin rastros del ácido de partida (Figura 10d). Esto implicaría que el proceso exotérmico a 124 °C corresponde a la isomerización térmica $Z \rightarrow E$, obteniéndose a 150 °C únicamente el isómero termodinámicamente más estable. El aparente proceso exotérmico a 131 °C observado durante el enfriamiento de la muestra (Figura 10b), tanto en el primer ciclo como en el segundo, no es

más que el enfriamiento del ESA sólido producto de la isomerización térmica del ZSA. Esto puede observarse claramente en la superposición de las curvas de DSC obtenidas para ambos isómeros que se muestra en la Figura A4.10.

En conjunto estos datos indicarían que el ZSA sólido luego de su fusión ($116-118\text{ }^{\circ}\text{C}$)²⁶ sufre una isomerización térmica ($124\text{ }^{\circ}\text{C}$) para dar el isómero ESA, a partir del cual se produce la descomposición térmica por descarboxilación para dar el correspondiente estireno. Si bien el calentamiento a EP hasta el punto de fusión del ZSA (Tabla 8 entrada 9) muestra isomerización térmica y descarboxilación, aunque como procesos de bajo rendimiento, esto puede deberse al error experimental en la medición de la temperatura en baño de arena por falta de homogeneidad de la temperatura en el mismo, al igual que lo mencionando anteriormente para el ESA.

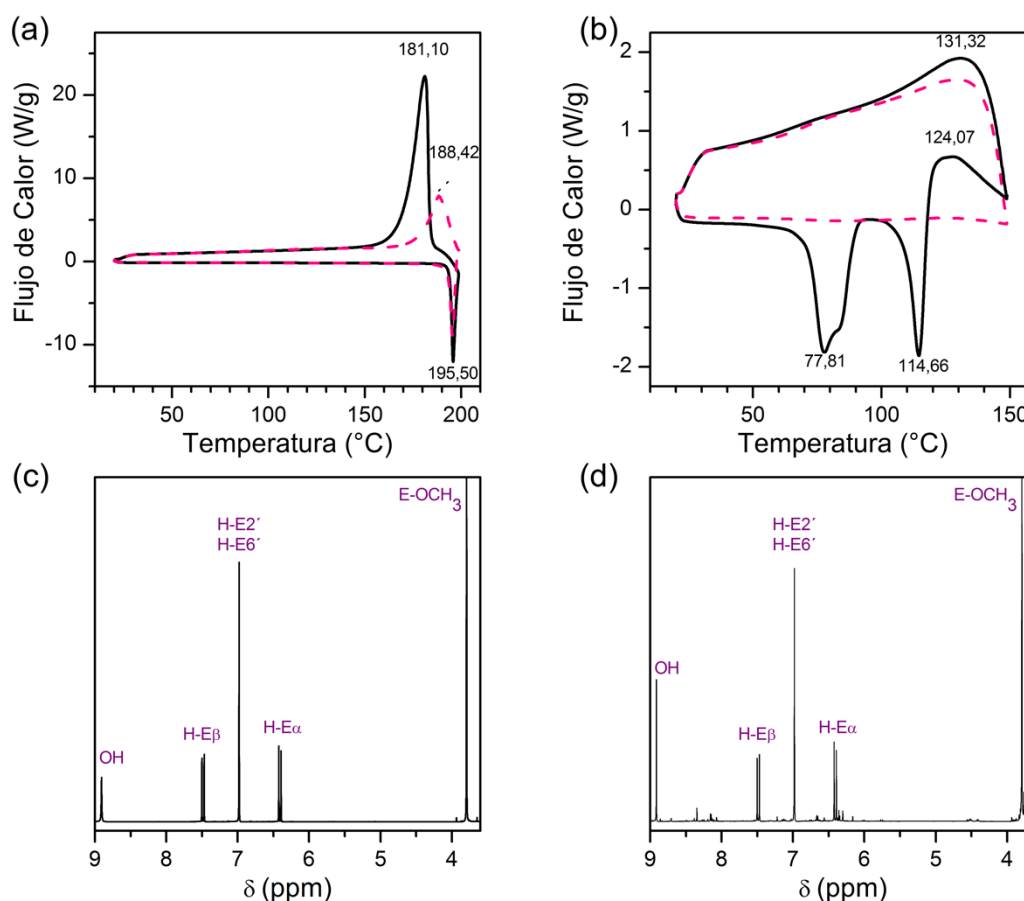


Figura 10. Curvas de DSC (a y b, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), primer ciclo de calentamiento (línea continua negra) y segundo ciclo de calentamiento (línea punteada rosa) y espectros ¹H-RMN del producto luego del segundo ciclo de calentamiento en la DSC. Compuestos (Literatura p.f./^oC): ESA (202^{61}) (a y c) y ZSA ($116-118^{26}$) (b y d).

En el caso de los LIs ESA.BAM y ZSA.BAM se observa, en las curvas de DSC y TGA, un comportamiento similar entre ellos. En la curva de DSC, el LI ESA.BAM presenta un proceso

endotérmico con una temperatura de pico de 145°C ($T_{\text{inicio}} = 120\text{ °C}$) que se atribuye a la superposición del procesos de fusión y descomposición del LI (p.f. 124-127 °C²⁶) (Figura 9c). En la curva de TGA se observa que a los 120 °C comienza el proceso de descomposición que ocurre en dos etapas, cuya primer etapa tiene una temperatura de máxima tasa de conversión a 140 °C ($T_{\text{inicio}} = 120\text{ °C}$; $T_{\text{max}} = 140\text{ °C}$, valores obtenidos a partir de dTGA) con una pérdida de masa de 35% (Figura 9c). Luego de esto en la curva de TGA se observa una segunda etapa de descomposición hasta los 200 °C.

Un comportamiento similar se observa para el LI ZSA.BAM (Figura 9d). En este caso la curva DSC muestra un único proceso endotérmico con una temperatura de pico de 132 °C ($T_{\text{inicio}} = 110\text{ °C}$). Se presume que este pico puede corresponder a la superposición de los procesos de fusión y descomposición del compuesto. En la curva de TGA de este LI (Figura 9d) se observa primero una pérdida de masa de aproximadamente 10 %, que al igual que en los casos anteriores puede deberse a la pérdida de humedad de la muestra o solvente remanente de la síntesis. Luego comienza el proceso de descomposición de la muestra a 100 °C en dos etapas. En la primer etapa se observa una pérdida de masa de entre 25 y 30 % con una temperatura de máxima tasa de conversión de 129 °C ($T_{\text{inicio}} = 100\text{ °C}$; $T_{\text{max}} = 129\text{ °C}$, valores obtenidos de la dTGA) que coincide aproximadamente con la temperatura de pico del proceso endotérmico observado en la curva de DSC. Luego se observa una segunda etapa en la curva de TGA con una pérdida de masa hasta los 200 °C, al igual que lo observado para el LI ESA.BAM.

En el caso de los calentamientos a EP de ambos LI y posterior análisis del crudo de reacción (Figuras A4.11 y A4.12, Tabla 8 entradas 5 a 7 y 13 a 11), se observó que a medida que aumenta la temperatura, aumenta el porcentaje de producto descarboxilado en la mezcla, sin embargo en ambos casos se observa la formación de otros productos no identificados (polimerización de estireno; reacción de Michael de ESA y ZSA). En ambos casos y a todas las temperaturas de calentamiento se observa en el crudo de reacción la presencia de BAM (datos no mostrados). En el caso del LI ZSA.BAM a 100 °C se observa a nivel de trazas el isómero *E*, no pudiendo ser cuantificado, sin embargo estas señales desaparecen por completo al aumentar la temperatura. Los espectros obtenidos para el ZSA.BAM presentan una superposición de señales que dificulta la cuantificación relativa tanto del ácido remanente como del correspondiente estireno.

Esto indicaría, en principio que ambos Lis presentan en simultaneo la fusión y la primera etapa de descomposición del mismo. En ambos casos la pérdida de masa en la primer etapa de descomposición es de entre 25 y 35%, que podría deberse a la pérdida de dióxido de carbono, producto de la descarboxilación del ácido constituyente, en base a los cálculos

estequiométricos⁶² y los resultados en EP, con la correspondiente pérdida en simultaneo de la BAM. Para el caso del LI ZSA.BAM no es posible concluir si previo a la descarboxilación ocurre la isomerización térmica $Z \rightarrow E$, ya que en ningún momento el isómero *E* pudo ser detectado. En comparación con el ácido que lo compone, el LI ESA.BAM presenta una disminución significativa en las temperaturas de fusión (temperatura de pico, T_{pico}) y de descomposición (temperatura de máxima tasa de conversión, T_{max}) (ESA= 202 y 230°C y ESA.BAM= 145 y 142 °C respectivamente), mientras que el LI ZSA.BAM presenta un aumento en el punto de fusión (T_{pico}) y una disminución en la temperatura de descomposición (T_{max}) (ZSA= 117 y 219 °C y ZSA.BAM= 132 y 129 °C, respectivamente). Dado que a la temperatura de fusión de estos LIs se produce una importante descomposición de los mismos, no fue posible realizar los experimentos de DSC en cápsula cerrada para preservar la integridad del equipo.

- Ácidos ferúlicos (EFE y ZFE), ácidos cumáricos (ECUM y ZCUM) y sus LIs con BAM

Con fines comparativos se realizaron los análisis en simultaneo por TGA y DSC en cápsula abierta de los ácidos ferúlicos y cumáricos y sus LIs con BAM como fuente del contraión. Al igual que para el ácido sinapínico, los isómeros *E* y *Z* de estos ácidos han sido descriptos como matrices MALDI²⁹ y sus LIs con BAM⁶³ son evaluados en capítulos anteriores de esta tesis como posibles matrices para el estudio de hidratos de carbono de bajo peso molecular. Estos ácidos cinámicos se asemejan en su estructura por presentar un sustituyente hidroxilo en la posición *para* del anillo aromático. En las Figuras A4.13 y A4.14 se muestran las curvas de TGA, dTGA y DSC obtenidas en el rango de 30 a 300 °C para estos compuestos y en la Tabla 9 se listan las temperaturas de cada uno de los procesos observados para ambos isómeros de los ácidos SA, FE y CUM y sus LIs con BAM.

En el caso del ácido ferúlico se observa un comportamiento muy similar al descripto anteriormente para el ácido sinapínico (Tabla 9 entradas 1 a 8). El EFE presenta dos procesos endotérmicos, el primer de ellos correspondiente a la fusión del sólido (p.f. 169-172 °C)⁶¹ mientras que el segundo corresponde al proceso de descomposición del mismo que ocurre inmediatamente luego de la fusión (T_{pico} = 174 °C y 251 °C, respectivamente) (Tabla 9 entrada 5 y Figuras A4.13a). En la curva de TGA se observa que a la temperatura de fusión del EFE comienza la descomposición del mismo que ocurre en una etapa con una temperatura de máxima tasa de conversión de 242 °C (T_{inicio} = 171 °C; T_{max} = 242 °C, valores obtenidos de la dTGA). El ZFE, en cambio, presenta en la curva de DSC, un proceso endotérmico (T_{pico} = 117 °C) que corresponde a la fusión del sólido (p.f. = 108-111 °C)²⁶. De las observaciones de las curvas de DSC y TGA surge que, luego de la fusión a 140 °C comienza la descomposición del ácido con una temperatura de máxima tasa de conversión a 200 °C (T_{inicio} = 140 °C; T_{max} = 200 °C, valores obtenidos de la dTGA)

(Tabla 9 entrada 7 y Figura A4.13b). Al igual que lo observado para los LIs del SA, el EFE.BAM, en comparación con el EFE, presenta una disminución en la temperatura de fusión y en la temperatura de descomposición (EFE= 174 y 242 °C y EFE.BAM= 138 y 134 °C, respectivamente), mientras que el LI ZFE.BAM, en comparación con el ácido que lo compone, presenta un ligero aumento en el punto de fusión y una disminución en la temperatura de descomposición (ZFE= 117 y 200 °C y ZFE.BAM= 134 y 139 °C, respectivamente) (Tabla 9 entradas 6 y 8 y Figura A4.13c y d, respectivamente). A diferencia de los ácidos, en todos los casos los LIs SA.BAM y FE.BAM se descomponen en dos etapas, donde la primera ocurre en simultáneo con la fusión del mismo. Esta primera etapa de descomposición representa una pérdida de masa de entre 26 y 37 % que podría corresponder a la descarboxilación del ácido junto con pérdida de BAM. Luego se observa la segunda etapa hasta los 190 °C.

Tabla 9. Temperaturas (°C) registradas en el análisis de los ácidos E y Z sinapínicos, ferúlicos, cumáricos y sus LIs con BAM por DSC y TGA, en el análisis en simultaneo en cápsula abierta.

| Nº | Compuesto | p.f. Literatura | DSC | | | TGA | | |
|----|-----------|------------------------------------------------|-----|------------------|-------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| | | | 1º | 2º | 3º | 1º Etapa T inicio ^a | 1º Etapa T max ^a | Nº Etapas ^b |
| 1 | ESA | 185 ²⁶ 202 ⁶¹ | 202 | 232 | ----- | 196 | 230 | 1 |
| 2 | ESA.BAM | 124-127 ²⁶ | 145 | ----- | ----- | 120 | 140 | 2 |
| 3 | ZSA | 116-118 ²⁶ | 79 | 117 | 222 | 140 | 219 | 1 |
| 4 | ZSA.BAM | ----- | 132 | ----- | ----- | 100 | 129 | 2 |
| 5 | EFE | 168-172 ²⁶ 169-172 ⁶¹ | 174 | 251 | ----- | 171 | 248 | 1 |
| 6 | EFE.BAM | 110-113 ²⁶ | 138 | ----- | ----- | 97 | 134 | 2 |
| 7 | ZFE | 108-111 ²⁶ | 117 | ----- | ----- | 140 | 206 | 1 |
| 8 | ZFE.BAM | ----- | 134 | ----- | ----- | 127 | 139 | 2 |
| 9 | ECUM | 214-216 ²⁶ 215-220 ⁶¹ | 224 | ----- | ----- | 200 | 223 | 1 |
| 10 | ECUM.BAM | 133-136 ²⁶ | 159 | ----- | ----- | 130 | 157 | 1 |
| 11 | ZCUM | 123-125 ²⁶ | 135 | 170 ^c | ----- | 130 | 160 | 1 |
| 12 | ZCUM.BAM | ----- | 154 | 163 | ----- | 137 | 163 | 1 |

^a TGA, temperaturas calculadas a partir de la derivada primera de la curva de m/m0 (%) (dTGA) para la primera etapa de descomposición

²⁶ Referencia ²⁶

^b Número de etapas de descomposición observadas en la curva de TGA definidas por la dTGA

⁶³ Informado por el fabricante Sigma-Aldrich-Merck, Referencia ⁶¹

^c Procesos exotérmicos

El ácido cumárico, por otro lado, presenta un comportamiento ligeramente diferente al descrito anteriormente. Para el ECUM se observa un único proceso endotérmico en la gráfica de DSC ($T_{pico} = 224$ °C) que coincide con la temperatura media del proceso de descomposición mostrado en la curva de TGA ($T_{inicio} = 200$ °C; $T_{max} = 223$ °C, valores obtenidos de la dTGA). Esta descomposición ocurre en una única etapa que alcanza a los 300 °C aproximadamente un 50 %

de la masa inicial (Figura A4.14a). En el caso del ZCUM se observa un procesos endotérmico ($T_{\text{pico}} = 135\text{ }^{\circ}\text{C}$) que se atribuye a la fusión del compuesto (p.f. = $123\text{-}125\text{ }^{\circ}\text{C}^{26}$) y un posible proceso exotérmico ($T_{\text{pico}} = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$) que no se encuentra bien definido debido a la falta de una buena línea de base. A la temperatura de fusión del isómero Z comienza el proceso de descomposición en una única etapa cuya temperatura de máxima tasa de conversión es de $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{inicio}} = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{max}} = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$, valores obtenidos de la dTGA) con una pérdida de masa de aproximadamente 50% (Figura A4.14b). En comparación con el ácido solo, el LI ECUM.BAM presenta un menor punto de fusión y menor temperatura de descomposición (ECUM= $224\text{ y }223\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ECUM.BAM= $159\text{ y }157\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente). El LI ZCUM.BAM presenta un ligero aumento en la temperatura de fusión y una temperatura de descomposición similar en comparación con el ZCUM (ZCUM= $135\text{ y }160\text{ }^{\circ}\text{C}$ y ZCUM.BAM= $154\text{ y }163\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente). En ambos casos y a diferencia de los otros LIs descriptos, si bien la descomposición se da en simultaneo con la fusión del compuesto, la descomposición ocurre en una única etapa con una pérdida de masa de 50 % a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura A4.14 c y d).

El conjunto de resultados descriptos muestran que la descomposición tanto del ácido ESA como del EFE ocurre inmediatamente luego de la fusión del mismo, mientras que para el ECUM la descomposición ocurre en simultáneo con la fusión. En el caso de los isómeros Z de estos ácidos se observa que la descomposición ocurre luego de la fusión, siendo en todos los caso a temperaturas menores que las obtenidas para los isómeros E. Con respecto a los LIs, si bien en todos los casos se observa la misma tendencia en relación al aumento o disminución de la temperatura de fusión y descomposición de los LIs en comparación con el ácido constituyente, los LIs derivados de los ácidos SA y FE presentan una descomposición en dos etapas, mientras que en los LIs derivados del CUM la descomposición ocurre en una única etapa. En todos los casos los LIs funden en simultáneo con la descomposición, ya sea con la primer o única etapa observada.

- Otros ácidos cinámicos.

Con fines comparativos se decide extender el estudio del comportamiento térmico en estado sólido de otros ácidos cinámicos, diferenciados tanto por la posición como la naturaleza del o de los sustituyentes. En ese sentido se decide evaluar el comportamiento térmico de ambos isómeros del ácido 345TMCA cuya diferencia estructural con el ácido SA es el cambio del grupo hidroxilo en posición *para* del anillo aromático por un grupo metoxilo. En la Figura A4.15 del Anexo 4, se muestran para ambos isómeros las curvas de DSC y TGA medidas de forma simultánea en cápsula abierta en el rango de $20\text{ a }300\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la Figura 11 se muestran las curvas de DSC obtenidos en dos ciclos de calentamiento consecutivos sobre la misma muestra en

cápsula cerrada hasta 200 °C y el respectivo espectro de ^1H -RMN del crudo de reacción recuperado luego del análisis por DSC.

En la Figura A4.15a, el isómero E-345TMCA presenta tres procesos endotérmicos en la curva de DSC a 128, 140 y 286 °C. Este último se correlaciona con la temperatura de máxima tasa de conversión del proceso de descomposición observado en la curva de TGA ($T_{\text{inicio}} = 200$ °C; $T_{\text{max}} = 283$ °C, valores obtenidos de la dTGA), el cual sucede en una única etapa. Al realizar el calentamiento en cápsula cerrada (Figura 11a), la curva de DSC presenta durante el primer ciclo de calentamiento un pico endotérmico a 127 °C, que se corresponde con la temperatura de fusión informada por el fabricante (p.f.= 125-127 °C)⁶¹. Durante el enfriamiento del primer ciclo no se observan picos exotérmicos correspondientes a la cristalización del sólido fundido. En el segundo calentamiento se observa un pico exotérmico a 96 °C, seguido de dos procesos endotérmicos a 124 y 137 °C mediados por un pico exotérmico a 128 °C. Luego de este calentamiento el análisis del crudo de reacción por ^1H -RMN indica únicamente la presencia del ácido de partida (Figura 11c).

Este tipo de comportamiento térmico sería atribuible a la existencia de distintos polimorfos del ácido E-345TMCA. El polimorfismo en ácidos cinámicos ha sido ampliamente estudiado, principalmente relacionado con la foto dimerización [2+2] en estado sólido^{64,65}. El polimorfismo es la propiedad de un material sólido de existir en distintas formas cristalinas. Cada forma cristalina puede presentar distintas propiedades físicas (punto de fusión, solubilidad, color, dureza, entre otras⁶⁶) e incluso ha sido propuesto que existe correlación entre la distribución de puntos dulces y las formas cristalinas que puede adoptar una matriz en espectrometría de masa MALDI⁶⁷. Los distintos polimorfos de un dado compuesto se obtienen dependiendo del solvente de recristalización, la velocidad de evaporación del solvente y en el caso de los sólidos fundidos, de la velocidad de enfriamiento⁶⁶.

En este sentido cuando el E-345TMCA (Figura 11a), es calentado por primera vez funde a 127 °C un polimorfo menos estable. En algunos casos la forma fundida no cristaliza durante un enfriamiento rápido, en lugar de esto se forma un estado vítreo por lo cual no aparece una señal exotérmica^{62,66}. Durante el segundo calentamiento se observa la cristalización de una forma metaestable ($T = 96$ °C) de menor punto de fusión ($T = 124$ °C). Durante o inmediatamente luego de la fusión de este ocurre la formación ($T = 128$ °C) de los cristales del polimorfo más estable que luego funde a 137 °C.

Los calentamientos a escala preparativa de este compuesto muestran que a la temperatura del punto de fusión no se observa reacción. Al aumentar la temperatura aparece

una pequeña proporción del producto descarboxilado, sin embargo este proceso muestra un bajo rendimiento ya que a 260 °C solo se obtiene un 14% del correspondiente estireno (Tabla 10 entradas 1-3).

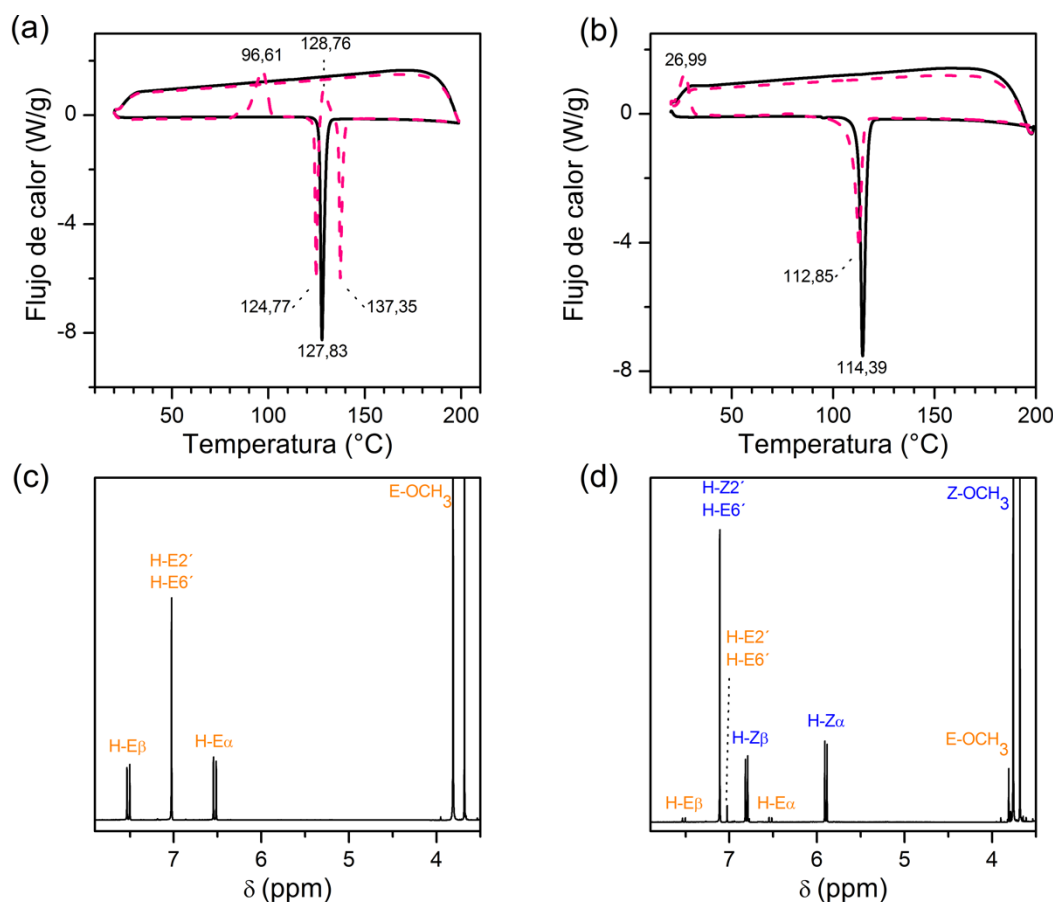


Figura 11. Curvas de DSC (a y b, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), primer ciclo de calentamiento (línea continua negra) y segundo ciclo de calentamiento (línea punteada rosa) y espectros ¹H-RMN del producto luego del segundo ciclo de calentamiento en la DSC. Compuestos (Literatura p.f./°C): E-345TMCA (125-127⁶¹) (a y c) y Z-345TMCA (b y d).

En el caso del isómero geométrico Z-345TMCA se observa en la curva de DSC un proceso endotérmico a 115 °C que se atribuye a la fusión del sólido. Luego de la fusión del compuesto a 180 °C comienza el proceso de descomposición en una única etapa ($T_{\text{inicio}} = 180$ °C; $T_{\text{max}} = 255$ °C, valores obtenidos de la dTGA) (Figura A4.15b). El análisis de DSC en cápsula cerrada muestra en el primer calentamiento la fusión del sólido a 114 °C. A continuación, durante el segundo calentamiento, se observa un proceso exotérmico a 27 °C y finalmente un proceso endotérmico a 112 °C (Figura 11b). Luego de dos ciclos de calentamiento hasta 200 °C se observa en el crudo de reacción un 11% del isómero E (Figura 11d). La presencia de este isómero en la muestra, puede ser el origen de la disminución del punto de fusión del Z-345TMCA observado en el segundo ciclo de calentamiento.

Tabla 10. Productos de reacción formados por el calentamiento en fase sólida a escala preparativa. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización

| Nº | Compuesto | Temp. [°C] | %D ^a | %I ^a |
|----|-----------|---------------|-----------------|-----------------|
| 1 | E-345TMCA | 140 | 0 | 0 |
| 2 | E-345TMCA | 218 | 6 | 0 |
| 3 | E-345TMCA | 260 | 14 | 0 |
| 4 | EiFE | 160 | 0 | 0 |
| 5 | EiFE | 230 | 5 | 0 |
| 6 | EiFE | 260 | 30 | 0 |
| 7 | E-3HCA | 160 | 0 | 0 |
| 8 | E-3HCA | 200 | 0 | 0 |
| 9 | E-3HCA | 260 | 0 | 0 |
| 10 | ECA | 130 | 0 | 0 |
| 11 | ECA | 218 | 0 | 0 |
| 12 | ECA | 260 | 0 | 0 |
| 13 | E-2HCA | 160 | 30 ^b | 0 |
| 14 | E-2HCA | 218 | 66 ^b | 0 |
| 15 | E-2HCA | 280 | 60 ^b | 0 |
| 16 | E-3MCA | 119 | 0 | 0 |
| 17 | E-3MCA | 218 | 0 | 0 |
| 18 | E-3MCA | 280 | 0 | 0 |
| 19 | E-4NOCA | 200 | 0 | 0 |
| 20 | E-4NOCA | 280 | 0 | 0 |
| 21 | E-4CICA | 218 | 0 | 0 |
| 22 | E-4CICA | 250 | 0 | 0 |
| 23 | E-4CICA | 280 | 0 | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma de compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN

^b + Otros productos

El EiFE, isómero de posición del EFE, presenta en posición *para* el grupo metoxilo y en posición *meta* el hidroxilo. En la curva de DSC se observa un proceso endotérmico a 234 °C que se asocia a la fusión de este compuesto (p.f.= 230-236 °C)⁶¹. En este caso, a 220 °C comienza un proceso de descomposición que ocurre en una etapa cuya temperatura de máxima tasa de conversión es de 270 °C ($T_{\text{inicio}} = 220$ °C; $T_{\text{max}} = 270$ °C, valores obtenidos de la dTGA) (Figura 12a). El análisis por DSC en cápsula cerrada muestra la fusión del sólido a 233 °C. Este proceso puede no estar bien definido dada la temperatura de corte del experimento a 240 °C. A pesar de esto, puede observarse que en el segundo ciclo de calentamiento la fusión del sólido ocurre con una variación de entalpía (ΔH), siendo ligeramente menor (Figura 12b). Durante el enfriamiento se observa la cristalización del compuesto a 215 y 209 °C. Estas variaciones entre

el primer y segundo ciclo de calentamiento puede deberse a la aparición de un pequeño porcentaje de producto de descomposición. El análisis del crudo de reacción muestra un pequeño porcentaje de producto descarboxilado (9%, Figura 12c). Al realizar los calentamientos a escala preparativa se observa que al aumentar la temperatura por encima del punto de fusión aumenta la proporción del correspondiente estireno (Tabla 10 entradas 4-6). Por el contrario, el E-3HCA, al no poseer un sustituyente (donor de densidad electrónica) en la posición *para* del anillo aromático, no presenta reactividad térmica en estado sólido como su isómero de posición, ECUM (Figura 13c y Tabla 10 entradas 7 a 9). En este caso la fusión del mismo ocurre a 196 °C (p.f.= 193-195 °C)⁶¹. A esta temperatura comienza un proceso de descomposición en una única etapa con una temperatura de máxima tasa de conversión de 278 °C ($T_{\text{inicio}} = 200$ °C; $T_{\text{max}} = 278$ °C, valores obtenidos de la dTGA). Aproximadamente a esta temperatura se observa el segundo proceso endotérmico en la curva de DSC (Figura 13a). El análisis en cápsula cerrada del E-3HCA muestra que luego de dos ciclos de calentamiento hasta 210 °C no hay reactividad térmica. Este mismo comportamiento se observa para el ECA que no presenta reactividad térmica en todo el rango de temperaturas estudiado (Figura A4.16, Tabla 10 entradas 10 a 12). El análisis TGA y DSC del ECA está descrito en la literatura donde se informa un punto de fusión de 135 °C y una temperatura media de descomposición de 268 °C^{68,69}.

En la Figura A4.17 se muestran las curvas de DSC y TGA obtenidas en simultáneo para el calentamiento de los compuestos E-2HCA, E-3MCA, E-4NOCA y E-4CICA en cápsula abierta. En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos para el calentamiento a escala preparativa de estos sólidos a distintas temperaturas. La fusión del ácido E-2HCA a 225 °C ocurre en simultáneo con la descomposición del mismo en una etapa ($T_{\text{inicio}} = 190$ °C; $T_{\text{max}} = 223$ °C, valores obtenidos de la dTGA). Los calentamientos a escala preparativa de este ácido muestran que a medida que aumenta la temperatura se observa una mayor cantidad de producto descarboxilado. Sin embargo, en el espectro ¹H-RMN se observa una cierta cantidad de ácido intacto y la aparición de otros productos. Esto se observa como una superposición de señales en la zona de los protones aromáticos, pudiendo ser debido a la formación de un producto ciclado o polimérico (vía adición de Michael). A diferencia de este comportamiento, en los calentamientos a EP los ácidos E-3MCA, E-4NOCA y E-4CICA no se detectó reactividad térmica en estado sólido en el rango de temperatura estudiado. Estos dos últimos muestran en la Figura A4.17 c y d, que la descomposición se da de forma simultánea con la fusión.

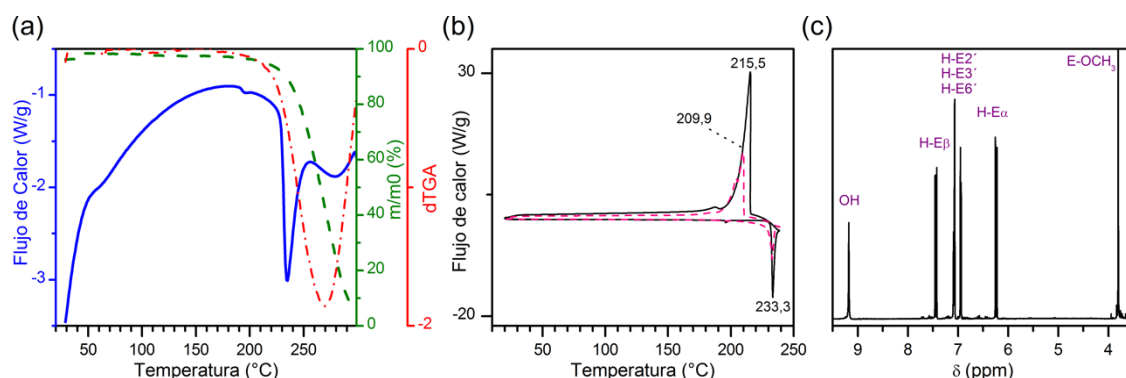


Figura 12. (a) Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja) para el EiFE en cápsula abierta. (b) Curvas de DSC en cápsula cerrada (procesos exotérmicos graficados hacia arriba), primer ciclo de calentamiento (línea continua negra) y segundo ciclo de calentamiento (línea punteada rosa). (c) Espectro ¹H-RMN del sólido remanente luego del segundo ciclo de calentamiento por DSC en cápsula cerrada. Compuesto (Literatura p.f.)/°C: EiFE (230-236)⁶¹.

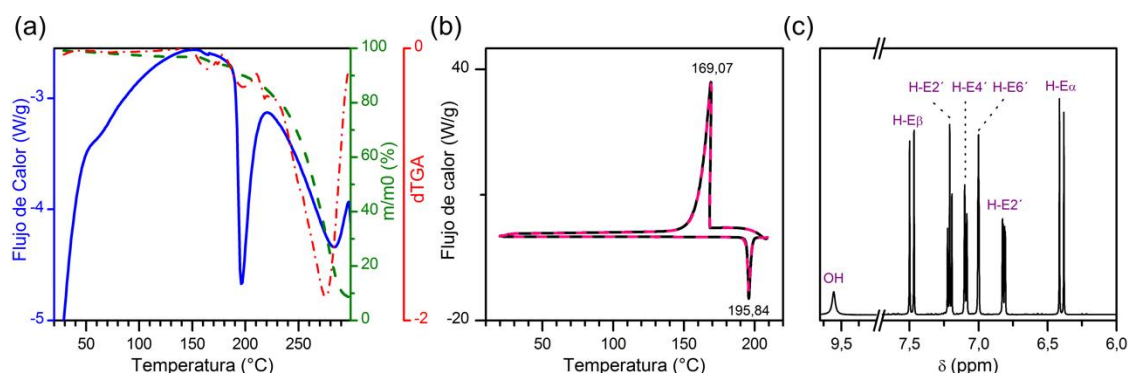


Figura 13(a) Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja) para el E-3HCA en cápsula abierta. (b) Curvas de DSC en cápsula cerrada (procesos exotérmicos graficados hacia arriba), primer ciclo de calentamiento (línea continua negra) y segundo ciclo de calentamiento (línea punteada rosa). (c) Espectro ¹H-RMN del sólido remanente luego del segundo ciclo de calentamiento en la DSC en cápsula cerrada. Compuesto (Literatura p.f.)/°C: E-3HCA (193-195)⁶¹.

- Ácido E-α-cianocinámico (ECHCA) y sus LIs

Para el ECHCA se evalúa su comportamiento térmico en cápsula abierta, tanto solo como constituyente de los LIs ECHCA.BAM, ECHCA.TEAM, ECHCA.TBAM y ECHCA.nHo. Las curvas de DSC y TGA se muestran en las Figuras 14 y A4.18. Los calentamientos a escala preparativa se realizan para el ácido solo y el LI con BAM, utilizando las temperaturas características de cada compuesto seleccionadas en los gráficos de DSC y TGA. Estos resultados se resumen en la Tabla 11.

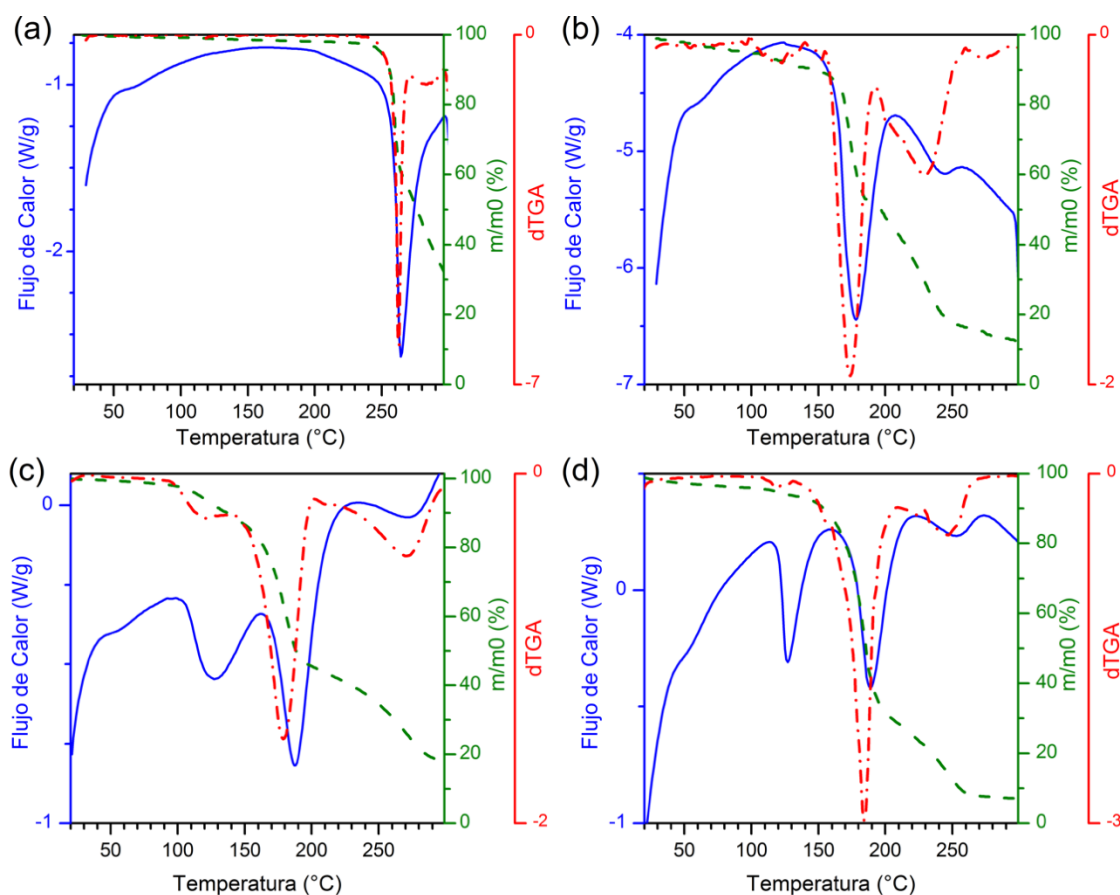


Figura 14. Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja). Compuestos (Literatura p.f./°C): (a) ECHCA (245-250)⁶¹, (b) ECHCA.BAM (170-173)⁶¹, (c) ECHCA.TEAM y (d) ECHCA.TBAM

El ácido ECHCA presenta un proceso endotérmico a 264 °C correspondiente a la fusión del sólido (p.f.= 245-250 °C)⁶¹. Este proceso viene acompañado de una importante descomposición en una etapa, con una temperatura de máxima tasa de conversión de 263 °C ($T_{\text{inicio}} = 245$ °C; $T_{\text{max}} = 263$ °C, valores obtenidos de la dTGA), alcanzando un 30 % de la masa inicial al final del calentamiento (Figura 14a). Los LIs de este ácido muestran una marcada disminución en el punto de fusión del compuesto, requiriendo temperaturas entre 170 y 186 °C dependiendo de la amina que se utilice como fuente del contraión. En todos los casos la fusión de los LIs viene acompañada de la descomposición del compuesto. Se observan al menos dos etapas de descomposición en los LIs, cuya temperatura de máxima tasa de conversión de la primer etapa coincide aproximadamente con los procesos endotérmicos observados en las curvas de DSC (Figuras 14b, c, d y Figuras A4.18 a y b). En particular los LIs ECHCA.TEAM y ECHCA.TBAM presentan otro procesos endotérmico a 126 °C, que puede deberse al fusión de otra estructura cristalina (Figuras 14 c y d). Los calentamientos a EP y el posterior análisis del crudo de reacción por ¹H-RMN muestra que, tanto para el ácido como para el LI con BAM, al

aumentar la temperatura aumenta el porcentaje del producto descarboxilado, obteniéndose en ambos casos un relación 70:30 entre el isómero *E* y *Z* del fenil-acrilonitrilo (Tabla 11).

El crudo de reacción de los experimentos a EP del ECHCA y ECHCA.BAM calentados a 280 y 260 °C respectivamente, fue analizado por Espectrometría de Masa con ionización por electrospray acoplado a un analizador Orbitrap (CEQUIBIEM, CONICET, QB, FCEN, UBA). En el modo iónico negativo de análisis se obtiene, en ambos casos, como pico base del espectro de masa, el correspondiente al fenil-acrilonitrilo a m/z 144, sin rastros del ácido 4-hidroxicinámico (m/z 164) que correspondería a la pérdida de cianuro de hidrógeno. Estos resultados se confirman en el modo iónico positivo de análisis. Por otro lado, se analizaron por desorción térmica acoplada a espectrometría de masa por ionización electrónica (70 eV) los compuestos ECHCA y ECHA.BAM. En ambos casos el perfil iónico obtenido es similar, con un pico base a m/z 44 y una señal de menor intensidad a m/z 145. En ninguno de los dos casos se obtiene la señal a m/z 164. Esto confirma que la descomposición térmica del ECHCA ocurre únicamente por descarboxilación del ácido para dar el fenil-acrilonitrilo como fue descripto por Tarzi y col^{24,25}.

Tabla 11. Productos de reacción formados por el calentamiento en fase sólida a escala preparativa. D = Producto descarboxilado, I = Producto de isomerización

| Nº | Compuesto | Temp. [°C] | %D ^a (E:Z) ^b | %I ^a |
|----|-----------|------------|------------------------------------|-----------------|
| 1 | ECHCA | 218 | 80 (70:30) | 0 |
| 2 | ECHCA | 265 | 90 (70:30) | 0 |
| 3 | ECHCA | 280 | 92 (75:25) | 0 |
| 4 | ECHCA.BAM | 100 | 24 (70:30) | 0 |
| 5 | ECHCA.BAM | 170 | 100 (76:24) | 0 |
| 6 | ECHCA.BAM | 260 | 100 (78:22) | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del ácido sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b % de isómeros *E* y *Z* del fenil-acrilonitrilo en relación al total de producto descarboxilado (D), cuantificado por ¹H-RMN.

En el caso del LI ECHCA.nHo, se observan dos posibles polimorfos dependiendo del solvente de recrystalización. El polimorfo más estable funde entre 172 y 178°C. Esta temperatura coincide con la primera etapa de descomposición observada en TGA con una pérdida de masa de aproximadamente 14%. Cuando se utiliza metanol como solvente de recrystalización aparece en la curva de DSC un polimorfo menos estable que funde a 94,6 °C, sin embargo, cuando el solvente de recrystalización es acetona solo se observa el polimorfo más estable, como puede observarse en la Figura A4.18 c y d, respectivamente. Luego, en la curva de TGA se observa la

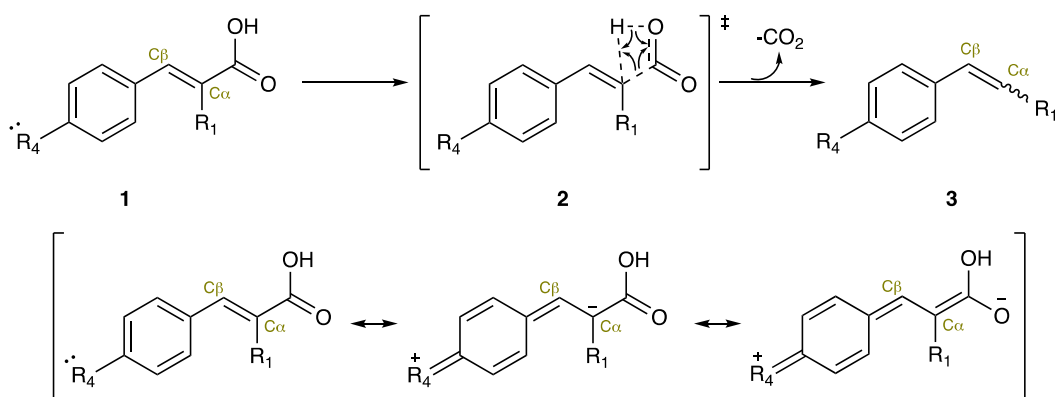
segunda etapa de descomposición con una temperatura de máxima tasa de conversión entre 287 y 290 °C que coincide con el segundo proceso endotérmico observado en la curva de DSC (valores obtenidos de la dTGA). En ambos casos, el análisis ^1H -RMN del crudo de reacción obtenido luego del calentamiento hasta 170 °C en cápsula cerrada por DSC, muestra el 100% de producto descarboxilado, fenil-acrilonitrilo, con una relación *E:Z* 72:28.

Si bien, el nHo es ampliamente utilizado como matriz MALDI cristalina para el análisis de diversos tipos de compuestos⁷⁰⁻⁷⁷, en este trabajo de tesis se lo propone como parte constituyente de un LIM. Es por eso que se decide evaluar su comportamiento térmico en estado sólido usando las técnicas de DSC y TGA, tanto del compuesto neutro como de la especie iónica nHo.HCl, la cual contiene el catión $[\text{nHo}+\text{H}]^+$, especie que sería la predominante en los LIs. Se realizan para el primero los análisis en simultáneo de TGA y DSC en cápsula abierta hasta 300 °C y en cápsula cerrada hasta 210 °C (Figura A4.19). El nHo presenta un pico endotérmico en la curva de DSC a 202 °C que corresponde a la fusión del sólido como se indica en la literatura (p.f.= 198-201 °C)⁷¹ (Figura A4.19a) En la curva de TGA se observa la descomposición completa del mismo en una única etapa ($T_{\text{inicio}} = 217$ °C; $T_{\text{max}} = 286$ °C, valores obtenidos de la dTGA). Cuando se realiza el análisis en cápsula cerrada en el primer ciclo de calentamiento se observa la fusión de la forma cristalina más estable a 202,1 °C, luego se observa un pico exotérmico durante el enfriamiento a 147,5 °C que se atribuye a la cristalización del sólido. En el segundo ciclo de calentamiento aparece la fusión de un polimorfo menos estable a 194,5 °C (Figura A4.19b). El análisis del sólido remanente luego de los dos ciclos de calentamiento en cápsula cerrada indica que el nHo no sufre descomposición térmica hasta los 210 °C (Figura A4.19c). La sal nHo.HCl muestra un aumento significativo del punto de fusión (p.f.= 219-221 °C)⁶¹ en relación al compuesto neutro. En la curva de DSC se observan tres procesos endotérmicos a 57, 108 y 231 °C (Figura A4.20). Los procesos a 57 y 108 °C se atribuyen a la fusión de estructuras cristalinas menos estables, la curva obtenida por TGA muestra a la segunda temperatura una pérdida de masa de aproximadamente 10% que puede deberse a la pérdida de solvente ocluido en la red cristalina. El tercer proceso observado a 231 °C corresponde a la fusión del sólido (p.f.= 232-235 °C)⁷¹. Luego de esto ocurre la descomposición del sólido en una sola etapa. Dado que la temperatura máxima alcanzada en el análisis en simultáneo de DSC y TGA es de 300 °C, no se logra definir la curva de descomposición y por lo tanto no se logra calcular la dTGA. Este análisis nos permite concluir que el ECHCA.nHo se presenta como una nueva unidad, que como se mencionó en el capítulo anterior, puede ser descripto como la sal orgánica $[\text{ECHCA-H}]^- \cdot [\text{nHo}+\text{H}]^+$, resultando así una nueva estructura con propiedades térmicas distintas a las de sus constituyentes.

Estos resultados muestran que la descomposición de ácidos cinámicos en estado sólido ocurre por descarboxilación cuando en posición *orto* o *para* del anillo aromático está presente un sustituyente de tipo hidroxilo o metoxilo, siendo menor el rendimiento en este último caso. La descomposición de ácidos cinámicos *para* sustituidos puede ocurrir en dos etapas, donde la primera de ellas se atribuye a la descarboxilación del mismo o en una única etapa donde la descarboxilación ocurre en simultáneo con la pirólisis del compuesto. El hecho de que la descomposición de la muestra se de en forma simultánea o inmediatamente luego o considerablemente luego de la fusión es una característica propia del compuesto.

En la literatura se proponen dos tipos de mecanismos para las reacciones de descarboxilación en fase condensada por vía térmica. La primera de ellas ocurre mediante una reacción de eliminación *syn*, mientras que la segunda ocurre vía formación de un anión carboxilato⁷⁸.

Kulik y col⁴⁰ realizan un estudio sobre las transformaciones térmicas que muestra el ácido cinámico y sus derivados (ECUM, ECAF y EFE) en fase sólida monitoreado por espectrometría de masa. En este estudio determinan la cinética de descomposición y proponen un mecanismo de eliminación- β a través de un estado de transición cíclico para la descarboxilación de ácidos cinámicos *para*-hidroxi sustituidos. Este mecanismo implica una transferencia de hidrógeno intramolecular a través de un estado de transición cíclico (**2**) como se muestra en el Esquema 5. En este trabajo destacan la necesidad de un sustituyente hidroxilo en posición *para* del anillo aromático, lo que genera un aumento en la densidad de carga del C_{α} del doble enlace exocíclico para facilitar la transferencia intramolecular del hidrógeno durante la eliminación *syn* (Esquema 5).



Esquema 5. Mecanismo de eliminación- β para la descarboxilación de ácidos cinámicos en fase sólida⁴⁰.

Este mecanismo podría extenderse a ácidos cinámicos *para*-metoxi sustituidos como el E-345TMCA y EIFE, ya que el grupo metoxilo también presenta el efecto donador de densidad electrónica el que se explica por efecto resonante. El hecho de que el rendimiento de la descarboxilación sea menor en estos casos puede deberse a que el grupo metoxilo tiene un carácter más débil en el efecto donador de densidad de carga que un grupo hidroxilo. Este mecanismo también puede extenderse al análogo *orto*-hidroxi sustituido como el E-2HCA, aunque en este caso entran en competencia la formación de otro tipo de productos (ej. ciclación-deshidratación, formación de 2-cromanona). En el caso de los LIs, seguramente el mecanismo operante en la descarboxilación es a través del anión carboxilato. En este mecanismo la descarboxilación da lugar a la formación de un carbanión que se protona rápidamente por medio de una reacción ácido-base con el ácido conjugado de la amina.

Los calentamientos de ZSA y Z-345TMCA, muestran que en ambos casos se observa la isomerización térmica $Z \rightarrow E$ en estado sólido, aunque en el último caso como un proceso de bajo rendimiento. En el caso del ZSA se pudo determinar que la isomerización se da antes de la descarboxilación. Sin embargo, a diferencia del mecanismo propuesto en solución, la descarboxilación en fase sólida no requiere necesariamente la geometría plana del isómero E, ya que la transferencia del protón intramolecular en el intermediario **2** puede darse, en principio, desde ambos isómeros (Esquema 5).

4.4 CONCLUSIONES

Matrices MALDI: Estabilidad térmica, reacciones y mecanismos.

Los resultados descritos en este capítulo muestran que aquellos ácidos *E*-cinámicos *orto/para* sustituidos con un grupo donador de electrones por efecto resonante se descomponen térmicamente por descarboxilación del ácido para dar el correspondiente estireno. Independientemente del mecanismo propuesto tanto en solución como en fase sólida, el efecto del sustituyente en posición *orto* o *para* del anillo aromático modifica significativamente la densidad electrónica sobre el doble enlace exocíclico del sistema α - β insaturado lo que favorece el proceso de descarboxilación. Mientras que aquellos compuestos que presentan otro tipo de funcionalización en la posición *para* o un grupo donador de densidad electrónica en posición *meta*, no presentan descarboxilación térmica.

En particular la descarboxilación en solución requiere sustituyentes con un fuerte carácter donador de densidad electrónica por efecto mesomérico, como el grupo hidroxilo. Esto genera un C_β electrofílico susceptible al ataque o coordinación por una especie nucleofílica como

en este caso el solvente, MeCN, generando un intermediario de tipo quinona a partir del cual se produce la descarboxilación del ácido. En particular el grupo ciano en el C $_{\alpha}$ de los ácidos α -cianocinámicos, induce una disminución en la densidad electrónica sobre el C $_{\beta}$ del doble enlace, haciendo que estos compuestos sean más susceptibles al ataque nucleofílico. Este aumento en la reactividad favorece la descarboxilación en solución incluso con la presencia de sustituyentes con un carácter donador de electrones por efecto resonante débil (metoxilo). En particular el mecanismo propuesto para la descarboxilación en solución requiere una geometría totalmente plana para generar el intermediario de tipo quinona con máxima extensión de conjugación. Dado que los isómeros *E* pueden adoptar fácilmente este tipo de geometría, se propone que la descarboxilación ocurre desde el isómero *E* y no del *Z*.

En cambio, en fase sólida la descarboxilación se da tanto con sustituyentes donores de densidad electrónica fuertes como débiles (hidroxilo; metoxilo), aunque en este último caso con menor rendimiento. Estos sustituyentes generan un C $_{\alpha}$ con una densidad de carga negativa que facilita la transferencia de hidrógeno (o protón) intramolecular en la eliminación-*syn*, produciéndose la descarboxilación.

A diferencia de los ácidos, los LIs descarboxilan a través del anión carboxilato, preexistente en el compuesto. Si bien en este trabajo no se corroboró el requerimiento estructural necesario del sustrato para que tenga lugar la descarboxilación por catálisis básica, en la literatura se sugiere la necesidad de un sustituyente con propiedades ácidas en posición *para* para formar el intermediario dianiónico que luego descarboxila. En este mecanismo el rendimiento de la reacción depende de la basicidad de la amina que se utilice como fuente del contraión, siendo mayor el rendimiento cuanto más básica sea la amina (BAM vs. nHo).

En el caso de los ácidos *Z*-cinámicos *para* sustituidos con un grupo hidroxilo presentan isomerización térmica para dar el diastereómero *E*, termodinámicamente más estable. En cambio, si el sustituyente en posición *para* es un grupo metoxilo la isomerización térmica no ocurre en solución, pero si ocurre en fase sólida, aunque como un proceso de bajo rendimiento. En estos casos la isomerización térmica puede darse a través de un estado del tipo electrónico excitado triplete (T $_1$) por medio de un ISC desde el estado fundamental singulete (S $_0$) vibracionalmente excitado, siempre y cuando haya puntos de cruce en los correspondientes diagramas de energía potencial, los cuales son estructuralmente dependientes. Por el contrario, la isomerización térmica de los ácidos *Z*- α -cianocinámicos se da tanto para sustituyentes de tipo hidroxilo como halógenos. En estos el mecanismo operante es una catálisis nucleofílica en el estado fundamental que dependiendo de la fuerza del nucleófilo puede ocurrir a menor o mayor temperatura.

En relación al comportamiento térmico de los ácidos aquí estudiados en comparación con sus LIs se observa que en todos los casos los LIs presentan un descenso en la temperatura de descomposición en comparación con el ácido solo. En el caso de los LIs derivados de los isómeros *E* presentan también una disminución en las temperaturas de fusión, mientras que los LIs derivados del isómero *Z* presentan un aumento en la temperatura de fusión en relación al punto de fusión del ácido constituyente. Cuando la descarboxilación es posible, esta puede ocurrir antes o en simultáneo con la pirólisis lo cual es característico de cada compuesto.

Matrices MALDI: Estabilidad térmica y eficiencia.

Dado que el proceso MALDI tiene lugar en una muestra en estado sólido donde el componente mayoritario que define el comportamiento térmico del conjunto es la matriz, se decidió efectuar estudios de estabilidad térmica de las matrices en una primera aproximación en solución (medio líquido) y en segundo lugar en el estado natural de las mismas como compuestos puros a temperatura ambiente. Estas matrices como moléculas covalentes neutras son sólidos cristalinos con un definido p.f. mientras que sus LI en la mayoría de los casos son líquidos densos, viscosos, compactos, no cristalinos, con p.f. bajos de difícil determinación.

Por lo tanto ambos estudios, DSC y TGA, agregan una descripción necesaria adicional para mejorar la caracterización en el caso de estos últimos.

Sin ser especialistas en el uso de estas técnicas abordamos el estudio con fines netamente comparativos de los comportamientos registrados tanto entre los ácidos neutros cristalinos, como entre estos con sus respectivos LIs y en el grupo de los LIs el de ellos entre si.

Todo este estudio comparativo se hizo teniendo en mente principalmente la información propia en cuanto al comportamiento de estas especies como matrices MALDI (análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular descritos en los capítulos 2 y 3 y polipéptidos también del tipo de LMW⁷⁹) y no dejando de lado información proveniente de la literatura.

Un resultado muy interesante es el que se observó en el caso del ESA y el ZSA. El hecho es que el ESA prácticamente inicia su descomposición durante la fusión, mientras que para el ZSA se determinó que su fusión y el inicio de la descomposición ocurren a diferentes temperaturas y que en ese rango de temperaturas intermedias ocurre la isomerización térmica generándose la forma *E* que en principio sigue funcionando como matriz.

Podría modelarse el evento pensando que luego de un disparo seguido de ablación con aumento drástico de la temperatura local, el cráter formado en el caso del ESA estará recubierto por parte del producto de la descomposición térmica (el correspondiente estireno) que no absorbe la radiación UV del láser (355 nm), mientras que en las mismas condiciones experimentales cuando la matriz en función es el ZSA la superficie fundida remanente cuenta con cierto porcentaje de la forma térmicamente convertida, ESA, que sigue como forma activa (matriz) frente a la radiación UV. El mismo modelo es aplicable para los pares de matrices E y ZCUM y E y ZFE, ya que en ambos casos el isómero Z resultó más eficiente como matriz²⁹ si bien tanto el par de isómeros del CUM como los del FE son matrices MALDI de menor eficiencia que el par del SA.

En resumen, la unidad SA foto reactiva permanece como tal remanente más tiempo en la muestra que se está irradiando en un punto fijo n-veces cuando se usa ZSA que cuando se usa ESA. A esto sumado el menor p.f. del ZSA ambos contribuirían como factores positivos a cimentar el hecho que el ZSA es mejor matriz (más eficiente) que el ESA.

En el caso del par ECUM y ZCUM el conjunto de datos obtenidos por DSC y TGA muestran un comportamiento térmico similar al del par E y ZSA.

En el caso del ECHCA descrito en la literatura como una matriz con problemas debido a su descomposición durante el experimento MALDI²⁴, muestra en su curva de DSC y el termograma (TGA) que claramente la descomposición se inicia durante la fusión. Para esta misma matriz se ha descrito en la literatura⁶³ y nosotros hemos hecho también nuestro aporte (ver Ref. 80 y capítulo 2 y 3 de esta tesis doctoral) que su eficiencia aumenta marcadamente al formar parte del LI ECHCA.BAM y en particular del LI ECHCA.nHo. En el último caso la fusión en si misma con descarboxilación y la descomposición térmica total ocurren desfasadas en la escala de temperatura. En el caso de los LIs ECHCA.TEAM, ECHCA.TBAM y ECHCA.BAM no se produce diferenciación entre la fusión y la descomposición térmica, sin embargo, este último LI resultó en nuestras experiencias una matriz muy conveniente (capítulo 3 y Ref. 80).

Esta falta de uniformidad en lo que respecta a valores relativos de las temperaturas de fusión y descomposición de los LI se observa también si se comparan los LI del ECUM y del ZCUM y del par E y ZFE, ya que ambos funden y descomponen en el mismo rango de temperatura así como se mencionó para el LI ECHCA.BAM a diferencia de lo observado para el caso del ECHCA.nHo.

Lo que tienen en común los LI de las matrices MALDI E-cinámicas es que el punto de fusión sufre una disminución muy drástica pasando por ejemplo para el ECHCA de los 264 °C a

los 178/179-188 °C (contraíón: nHo, BAM, TEAM, TBAM). Cosa parecida ocurre con el ESA cuyo cambio va desde los 206 °C a los 145 °C para el LI ESA.BAM. En el caso de las matrices ECUM y EFE se observa un comportamiento similar.

Cabe recordar que en el caso de los LI de los ácidos Z-cinámicos (ZSA, ZCUM y ZFE) lo que se ve afectada (disminuida) es su probabilidad de absorción de fotones a la λ del láser (coeficiente de absortividad molar a esa λ , capítulo 2 y Ref. 81) razón por la cual su desempeño como matrices es de baja calidad frente a la del ácido neutro Z correspondiente, perdiendo sentido la comparación y discusión de la posible correlación entre su comportamiento térmico y eficiencia como matriz.

Finalmente, si se observan el par de gráficas para el caso del nHo, volvemos a encontrarnos con un claro desfasaje entre los dos eventos térmicos fusión y descomposición. Este desfasaje se observa también en el caso del nHo.HCl, que presenta un mayor punto de fusión que el nHo, pudiendo explicarse esto por el cierto carácter de sal inorgánica que presenta.

Si bien un estudio de este tipo mereció ser abordado frente a la incógnita de si existe un patrón único de comportamiento térmico que define y caracteriza una matriz MALDI eficiente, los resultados descriptos muestran que dicho patrón apriorístico no parecería existir. Así como tampoco el modelo único propuesto hace algunos años que consideraba necesaria la descomposición térmica de la matriz con eyección abundante de CO₂ para producir mayor ablación/desorción la que se refleja en una ionización más eficiente^{1,14}.

El análisis final aquí presentado solo incluye aquellos compuestos que han sido descriptos y usados por diferentes autores como matrices MALDI de una cierta eficiencia.

Los demás ácidos cinámicos fueron incluidos para lograr una mejor comprensión de los factores estructurales que modulan la estabilidad térmica (isomerización, descarboxilación, ciclación, dimerización, etc) y así poder proponer mecanismos de reacción adecuados.

4.5 REFERENCIAS

- 1 R. B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, Second Edi., 2010.
- 2 I. C. Lu, C. Lee, Y. T. Lee and C. K. Ni, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, **8**, 21–39.
- 3 R. Knochenmuss, *Analyst*, 2006, **131**, 966–986.
- 4 M. Karas, M. Glückmann and J. Schäfer, *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, **35**, 1–12.

- 5 K. Dreisewerd, *Chem Rev*, 2003, **103**, 395–426.
- 6 M. Niehaus and J. Soltwisch, *Sci Rep*, 2018, **8**, 1–10.
- 7 R. Knochenmuss, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, **26**, 1645–1648.
- 8 T. W. Jaskolla and M. Karas, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, **22**, 976–988.
- 9 S. Trimpin, B. Wang, E. D. Inutan, J. Li, C. B. Lietz, A. Harron, V. S. Pagnotti, D. Sardelis and C. N. McEwen, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2012, **23**, 1644–1660.
- 10 A. Vertes, R. Gijbels and R. D. Levine, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1990, **4**, 228–233.
- 11 Y. J. Bae and M. S. Kim, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, **8**, 41–60.
- 12 L. V. Zhigilei and B. J. Garrison, *J Appl Phys*, 2000, **88**, 1281–1298.
- 13 D. Perez, L. J. Lewis, P. Lorazo and M. Meunier, *Appl Phys Lett*, 2006, **89**, 3–5.
- 14 V. L. Talroze, R. J. Jacob, A. L. Burlingame, I. O. Leipunsky and M. A. Baldwin, *Adv. Mass Spectrom.*, 2001, **15**, 481–482.
- 15 V. L. Talroze, R. J. Jacob, A. L. Burlingame, I. O. Leipunsky and M. A. Baldwin, in *49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, American Society of Mass Spectrometry, Chicago, Illinois, 2001.
- 16 V. L. Talroze, R. J. Jacob, A. L. Burlingame and M. A. Baldwin, in *48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, American Society of Mass Spectrometry, American Society of Mass Spectrometry, Santa Fe, New Mexico, 2000, p. 144.
- 17 V. L. Talroze, I. O. Leipunsky, A. L. Burlingame and M. A. Baldwin, in *In 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, American Society of Mass Spectrometry, Santa Fe, New Mexico, 2003.
- 18 V. L. Talroze, I. O. Leipunsky, A. L. Burlingame and M. A. Baldwin, in *52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, American Society of Mass Spectrometry, Nashville, Tennessee, 2004.
- 19 R. C. Beavis, T. Chaudhary and B. T. Chait, *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 156–158.
- 20 I. Fournier, J. C. Tabet and G. Bolbach, *Int J Mass Spectrom*, 2002, **219**, 515–523.
- 21 I. Fournier, C. Marinach, J. C. Tabet and G. Bolbach, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, **14**, 893–899.

- 22 J. Zaia, *Mass Spectrom Rev*, 2004, **23**, 161–227.
- 23 D. J. Harvey, *Mass Spectrom Rev*, 2006, **25**, 595–662.
- 24 O. I. Tarzi, H. Nonami and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2009, **44**, 260–277.
- 25 O. I. Tarzi, Director: Rosa Erra-Balsells N° 4015, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2006.
- 26 M. L. Salum, C. J. Robles and R. Erra-Balsells, *Org Lett*, 2010, **12**, 4808–4811.
- 27 J. P. Tierney and P. Lidström, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, 2009, **57**, 1–280.
- 28 L. Perreux and A. Loupy, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 9199–9223.
- 29 M. L. Salum, L. M. Itovich and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, **48**, 1160–1169.
- 30 T. W. Jaskolla, W. D. Lehmann and M. Karas, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 12200–12205.
- 31 R. Bernini, E. Mincione, M. Barontini, G. Provenzano and L. Setti, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 9663–9667.
- 32 R. C. Sovish, *Journal of Organic Chemistry*, 1959, **24**, 1345–1347.
- 33 A. K. Sinha, A. Sharma and B. P. Joshi, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 960–965.
- 34 V. Aldabalde, M. L. Derrudi, D. Gamenara, F. Geymonat, P. Saenz-Méndez, M. Risso and G. Seoane, *Open J Phys Chem*, 2011, **01**, 85–93.
- 35 B. B. Corson, W. J. Heintzelman, L. H. Schwartzman, H. E. Tiefenthal, R. J. Lokken, J. E. Nickels, G. R. Atwood and F. J. Pavlik, *Journal of Organic Chemistry*, 1958, **23**, 544–549.
- 36 C. D. Calvano, A. Monopoli, T. R. I. Cataldi and F. Palmisano, *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**, 4015–4038.
- 37 E. Nomura, A. Hosoda, H. Mori and H. Taniguchi, *Green Chemistry*, 2005, **7**, 863–866.
- 38 L. A. Cohen and W. M. Jones, *J Am Chem Soc*, 1960, **82**, 1907–1911.
- 39 V. Kumar, A. Sharma, A. Sharma and A. K. Sinha, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 7640–7646.
- 40 T. V. Kulik, V. N. Barvinchenko, B. B. Palyanytsya, N. A. Lipkovska and O. O. Dudik, *J Anal Appl Pyrolysis*, 2011, **90**, 219–223.

- 41 C. J. Simpson, M. J. Fitzhenry and N. P. J. Stamford, *Tetrahedron Lett*, 2005, **46**, 6893–6896.
- 42 K. van Beurden, S. de Koning, D. Molendijk and J. van Schijndel, *Green Chem Lett Rev*, 2020, **13**, 349–364.
- 43 E. Bermúdez, O. N. Ventura and P. S. Méndez, *Journal of Physical Chemistry A*, 2010, **114**, 13086–13092.
- 44 B. Hoff, *Synthesis (Stuttg)*, 2018, **50**, 2824–2852.
- 45 D. Crich and M. Patel, *Carbohydr Res*, 2006, **341**, 1467–1475.
- 46 P. Sinaÿ, *Pure and Applied Chemistry*, 1991, **63**, 519–528.
- 47 A. J. Ratcliffe and B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1990, 747–750.
- 48 A. Marra, J. Esnault, A. Veyrières and P. Sinaÿ, *J Am Chem Soc*, 1992, **114**, 6354–6360.
- 49 I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. de Penhoat, J.-M. Mallet, V. Michon and P. Sinaÿ, *Carbohydr Res*, 1993, **246**, 23–41.
- 50 R. R. Schmidt, M. Behrendt and A. Toepfer, *Synlett*, 1990, **1990**, 694–696.
- 51 A. Guérinot, S. Reymond and J. Cossy, *European J Org Chem*, 2012, **2012**, 19–28.
- 52 R. Bishop, in *Comprehensive Organic Synthesis*, Elsevier, 1991, pp. 261–300.
- 53 G. Bouchoux, *Chem Phys Lett*, 2010, **495**, 192–197.
- 54 J. L. Magee, W. Jr. Shand and H. Eyring, *J Am Chem Soc*, 1941, **63**, 677–688.
- 55 J. Saltiel and J. L. Charlton, *Cis–Trans Isomerization of Olefins*, ACADEMIC PRESS, INC., 1980, vol. 42.
- 56 J. J. Molloy, T. Morack and R. Gilmour, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2019, **58**, 13654–13664.
- 57 T. Neveselý, M. Wienhold, J. J. Molloy and R. Gilmour, *Chem Rev*, 2022, **122**, 2650–2694.
- 58 S. Patai and Z. Rappoport, *J Chem Soc*, 1962, 396–403.
- 59 S. P. Green, K. M. Wheelhouse, A. D. Payne, J. P. Hallett, P. W. Miller and J. A. Bull, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2020, **59**, 15798–15802.
- 60 S. P. Green, A. D. Payne, K. M. Wheelhouse, J. P. Hallett, P. W. Miller and J. A. Bull, *Journal of Organic Chemistry*, 2019, **84**, 5893–5898.
- 61 Sigma-Aldrich-Merck, <https://www.sigmaaldrich.com/>.

- 62 P. Gabbott, *Principles and Applications of Thermal Analysis*, Blackwell Publishing, Oxford, 1st Edi., 2008, vol. 59.
- 63 J. A. Crank and D. W. Armstrong, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, **20**, 1790–1800.
- 64 I. Abdelmoty, V. Buchholz, L. Di, C. Guo, K. Kowitz, V. Enkelmann, G. Wegner and B. M. Foxman, *Cryst Growth Des*, 2005, **5**, 2210–2217.
- 65 M. A. Khoj, C. E. Hughes, K. D. M. Harris and B. M. Kariuki, *Cryst Growth Des*, 2013, **13**, 4110–4117.
- 66 B. Perrenot and G. Widmann, *Thermochim Acta*, 1994, **234**, 31–39.
- 67 T. Nishikaze, H. Okumura, H. Jinmei and J. Amano, *Mass Spectrometry*, 2012, **1**, A0006.
- 68 F. S. Murakami, L. S. Bernardi, R. N. Pereira, B. R. Valente, E. C. Vasconcelos, M. A. S. Carvalho Filho and M. A. S. Silva, *Pharm Chem J*, 2009, **43**, 716–720.
- 69 M. R. Zhao, Z. L. Qi, F. X. Chen and X. X. Yue, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2014, **88**, 1081–1084.
- 70 Y. Fukuyama, M. Ciancia, H. Nonami, A. S. Cerezo, R. Erra-Balsells and M. C. Matulewicz, *Carbohydr Res*, 2002, **337**, 1553–1562.
- 71 H. Nonami, K. Tanaka, Y. Fukuyama and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**, 285–296.
- 72 H. Nonami, S. Fukui and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, **32**, 287–296.
- 73 M. E. Monge, M. R. Negri, A. A. Kolender and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21**, 2638–2646.
- 74 M. Barboza, V. G. Duschak, Y. Fukuyama, H. Nonami, R. Erra-Balsells, J. J. Cazzulo and A. S. Couto, *FEBS Journal*, 2005, **272**, 3803–3815.
- 75 M. Landoni, V. G. Duschak, V. J. Peres, H. Nonami, R. Erra-Balsells, A. M. Katzin and A. S. Couto, *Mol Biochem Parasitol*, 2007, **154**, 22–29.
- 76 A. C. Casabuono, A. D’Antuono, Y. Sato, H. Nonami, R. Ugalde, V. Lepek, R. Erra-Balsells and A. S. Couto, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, **20**, 2175–2182.
- 77 E. M. Rustoy, Y. Sato, H. Nonami, R. Erra-Balsells and A. Baldessari, *Polymer (Guildf)*, 2007, **48**, 1517–1525.

- 78 P. Sykes, *A guidebook to mechanism in organic chemistry*, Longman Scientific & Technical, London, Sixth Edit., 1991.
- 79 M. L. Salum, S. L. Giudicessi, T. Schmidt De León, S. A. Camperi and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2017, **52**, 182–186.
- 80 T. Schmidt De León, M. L. Salum and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2019, **54**, 643–654.
- 81 M. L. Salum, P. Arroyo Mañez, F. J. Luque and R. Erra-Balsells, *J Photochem Photobiol B*, 2015, **148**, 128–135.

Capítulo 5 : Estabilidad fotoquímica de las matrices MALDI estudiadas

5.1 INTRODUCCIÓN

Como se describo en la introducción y en repetidas ocasiones durante el desarrollo de este trabajo de tesis, la técnica de ionización MALDI es asistida por la matriz, la cual es la responsable de absorber los fotones irradiados por la fuente láser. La absorción de estos fotones por parte de la matriz, genera estados electrónicos excitados que posteriormente se relajan, redistribuyendo la energía absorbida iniciando los procesos de desorción e ionización. Si bien en la actualidad no existe un único modelo que explique el proceso MALDI, todos los modelos propuestos tienen a la absorción de fotones por parte de la matriz como el evento desencadenante¹. Entre los modelos de ionización propuestos, más relevantes en la actualidad, el efecto de la matriz puede ser descripto como directamente térmico o indirectamente térmico. En estos, la relajación de la matriz por vías no radiativas genera un aumento significativo de la temperatura de la muestra lo que produce la ionización de las especies y/o su desorción. A modo de ejemplo se puede mencionar los modelos de Fluido Polar (PF)², de Transferencia Térmica de Protones (TPT)^{3,4} o el modelo de Clúster (CM)⁵. Mientras que el modelo de Dinámica Química y Física Acoplada (CPCD)⁶ es clasificado como no térmico ya que considera que la ionización de la muestra está relacionado directamente con la ionización fotoquímica de la matriz, como se explicó en la Introducción de esta tesis.

Es por esto que uno de los aspectos a estudiar para comprender el mecanismo de ionización operante en esta técnica, comprende las propiedades de los estados electrónicos excitados de las matrices y los procesos de relajación y de distribución de energía que tienen lugar a partir de estos. Este estudio se realiza comúnmente desde dos perspectivas, por un lado el análisis del espectro electrónico de la matriz, que se inicia con su espectro de absorción, el que debe presentar una absorbancia significativa a la longitud de onda de irradiación del láser y del espectro de emisión luminiscente (fluorescencia, fosforescencia) y no luminiscente o desactivación por vía no radiativa (optoacústica). Por otro lado y en forma complementaria se efectúa el estudio de la fotoestabilidad de las mismas, analizando las reacciones fotoquímicas posibles que son inducidas por la irradiación UV-Vis.

Las matrices clásicas orgánicas de primera generación han recibido la mayor atención en la literatura en cuanto a este abordaje, a diferencia de las matrices de segunda generación. En el caso de los ácidos DHB, ESA y ECHCA, los espectros de absorción y emisión fluorescente fueron estudiados en soluciones diluidas y en estado sólido (film)^{7,8}, donde se describe un desplazamiento del máximo de absorbancia hacia longitudes de onda mayores en el film⁸. El

DHB mostró un aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia en el film, en comparación a la solución, mientras que tanto para el ESA como para el ECHCA no pudo ser detectada su fluorescencia. En este sentido los autores atribuyen a esta propiedad del ECHCA, la baja fluencia necesaria para producir su DI y su alto grado de fragmentación en experimentos de tipo LDI en comparación con otras matrices⁷. Ehring y col.⁹⁻¹¹ estudiaron el espectro electrónico de estas mismas matrices en estado sólido y propusieron que la mayor parte de la energía absorbida por las matrices es devuelta al medio a través de procesos no radiativos, lo que generaría un aumento de la temperatura de la muestra produciendo la DI de la misma. Tarzi y col.¹²⁻¹⁴ realizaron un estudio detallado del espectro electrónico en solución y en estado sólido de estas matrices y otras, analizando su espectro de absorción, emisión fluorescente, excitación y su desactivación por vías no radiativas. En este trabajo los autores observaron que las matrices MALDI presentan un comportamiento fotofísico dispar. Sin embargo, reconocen que todas ellas presentan una desactivación eficiente desde el estado electrónico excitado por vías no radiativas, con liberación de calor rápido al medio. Para algunas matrices, esta vía de desactivación resultó ser más eficiente que para otras.

Como fue descripto en los capítulos 2 y 3 de este trabajo tesis, es sabido que la intensidad de las señales de los iones producidos por MALDI disminuye a medida que aumenta el número de disparos del láser cuando se irradia de forma continua sobre un mismo punto de la muestra¹⁵⁻¹⁷. Como consecuencia, a la fluencia típica de irradiación, la señal del analito desaparece antes de poder utilizar toda la muestra, lo que genera una disminución en la sensibilidad de la técnica. Si bien la utilización de una fluencia muy alta sobre el mismo punto puede producir una recuperación parcial de la intensidad de la señal en los disparos siguientes, nunca se logra obtener la intensidad original. Lin y col.¹⁸ estudiaron este comportamiento para las matrices ECHCA, ESA, EFE y DHB analizando el cambio en la absorbancia, fluorescencia y en la relación entre los iones y las moléculas neutras desorbidas luego de los sucesivos disparos del láser. Los autores observaron una disminución tanto de la cantidad de iones (matriz y analito) como en la cantidad de moléculas neutras desorbidas, así como una disminución en la velocidad promedio de las mismas en los sucesivos disparos del láser. Esto indicaría una disminución en la temperatura superficial que se alcanza luego de la irradiación. La disminución en la intensidad y el corrimiento del espectro de emisión fluorescente hacia longitudes de onda mayores, observado en las matrices luego de la irradiación, sugerirían la aparición de productos fotoquímicos que no son adecuados para su uso como matrices MALDI. Estos productos presentarían una menor sección transversal de absorción UV provocando los cambios en el espectro de masa MALDI. Si bien los autores no observan un cambio en la cantidad de energía

absorbida por parte de la muestra, la disminución en la sección transversal de los productos fotoquímicos generaría un aumento en la profundidad de penetración del láser, por lo que la misma cantidad de energía estaría distribuida sobre un volumen de muestra más grande y por lo tanto resultaría en una disminución de la temperatura superficial alcanzada¹⁸. Este tipo de comportamiento puede ser relacionado con el modelo de ionización térmica^{4,19} (TPT, PF), donde los fotones absorbidos por la matriz son convertidos en energía térmica debido a la baja fluorescencia y a la rápida conversión interna que presentan las matrices. La utilización de una fluencia alta produciría la remoción de estos productos fotoquímicos lo que explicaría la recuperación parcial de la intensidad de la señal.

Dentro de las posibles reacciones fotoquímicas de los ácidos cinámicos se encuentran principalmente la foto dimerización 2+2²⁰⁻²³ y la fotoisomerización *cis-trans*²⁴⁻²⁶. En el primer caso la formación de dímeros 2+2 en torno al doble enlace vinílico de ácidos cinámicos ha sido ampliamente estudiada en estado sólido²⁷ y tiene como requerimiento estructural que los dobles enlaces se encuentren paralelos entre si a una distancia de 4,2 Å²⁸ para poder generar el dímero. En el caso de los ácidos ECHCA y ESA, su estructura cristalina muestra que los dobles enlaces se encuentran a una distancia mayor a 4,2 Å por lo que los dímeros no serían un foto producto mayoritario en estado sólido. Sin embargo, estos productos podrían formarse en la forma fundida que se genera luego de la irradiación láser y el aumento de la temperatura superficial¹⁸. Dado el requerimiento estructural para esta reacción, la producción de estos foto dímeros en soluciones diluidas es poco probable¹². En segundo lugar la fotoisomerización de alquenos ha sido ampliamente descrita en la literatura²⁹ al igual que la fotoisomerización de ácidos cinámicos²⁵. En particular, en nuestro grupo de investigación, Salum y col.²⁶ han estudiado y utilizado la fotoisomerización de alquenos y sus LIs para la síntesis y aislamiento, en un solo paso, de los isómeros Z de una gran variedad de ácidos cinámicos. Este protocolo ha sido utilizado a lo largo de este trabajo de tesis para la síntesis de estos isómeros geométricos. Si bien este tipo de reacción es la principal vía foto reactiva de esta familia de compuestos en solución, esta entra en competencia con un segundo proceso de índole térmico y/o fotoquímico irreversible que da lugar a un producto no apto para su uso como matriz MALDI^{12,18,30}. Este es el caso de la descarboxilación, una vía de disociación con una barrera de energía baja que suele producirse en moléculas que tienen un grupo funcional de tipo ácido carboxílico, como se describió detalladamente en el capítulo 4 de este trabajo de tesis como un proceso térmico. Tarzi y col.¹² en experimentos de espectroscopía optoacústica resuelta en el tiempo e inducida por láser (LIOAS) pudieron corroborar que el ECHCA descarboxila en solución cuando es

irradiado con una fuente láser pulsada de alta fluencia, no siendo detectado este proceso en irradiaciones con una fuente continua de baja potencia.

Por otro lado, la fotofísica y la fotoquímica del nHo y otras β -carbolinas han sido ampliamente estudiadas en la literatura, no solo por su utilidad como matrices MALDI^{31,32} sino por su interés biológico, farmacológico³³⁻³⁵ e incluso por su uso como referencias para fluorescencia³⁶. El nHo es una especie anfótera cuyas propiedades ácido-base cambian drásticamente en el estado electrónico poblado³⁷⁻³⁹ y su principal reactividad fotoquímica está dada por la formación de dímeros a través de un mecanismo de transferencia de electrones en el estado electrónico excitado^{33,40}. En particular la fotoquímica del nHo muestra una desactivación radiativa desde el estado electrónico excitado más eficiente que la mayoría de las matrices de primera generación¹², sin embargo, la desactivación preferencial de esta matriz es la vía no radiativa con liberación de calor rápido al medio, lo que según Tarzi y col.¹² explicaría su eficiente desempeño como matriz MALDI.

Dentro de este contexto y teniendo en cuenta que nuestro grupo de investigación se especializa en fotoquímica orgánica, se decide continuar con el estudio de las propiedades de los estados electrónicos excitados y su desactivación para las distintas matrices MALDI y sus LIs propuestos y estudiados como nuevas matrices. Como primera aproximación y para poder luego realizar un estudio de la foto estabilidad de las distintas matrices, se analizó tanto la fotofísica como la fotoquímica de las mismas en solución. Las Figuras A5.1-A5.9 y el Esquema A5.1 mencionados en este capítulo se encuentran en el Anexo 5.

5.2 EXPERIMENTAL

5.2.1 Materiales y métodos

La β -carbolina 9H-pirido[3,4-b]indol (nor-harmano, nHo) y los ácidos: *E*-4-hidroxi- α -cianocinámico (ECHCA), *E*-4-cloro- α -cianocinámico (E-4ClCHCA), *E*-4-flúor- α -cianocinámico (E-4FCHCA), *E*- α -metilcinámico (E α MECA), *E*-4-metoxi- α -cianocinámico (E-4MCHCA), *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ESA), *E*-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido *E*-ferúlico, EFE), *E*-4-hidroxicinámico (ácido *E*-cumárico, ECUM); la *n*-butilamina (BAM), tributilamina (TBAM), Piridina (Py) y el LI ECHCA.BAM fueron provistas por Sigma-Aldrich (USA) y utilizados sin previa purificación. La estructura de estos compuestos se muestra en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 18. El ácido *Z*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ZSA) fue sintetizado según el protocolo descrito por Salum y colaboradores²⁶, brevemente detallado en el capítulo 2 página 52. Los líquidos iónicos se prepararon según el protocolo descrito en el capítulo 2 y capítulo 3 páginas 52 y 129. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN)

de las matrices clásicas y de los LI se obtuvieron utilizando los equipos detallados en el capítulo 2.

Para el análisis por espectrometría de masa (EM) se utilizó un equipo Q Exactive (Thermo Scientific) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) acoplado a un analizador Orbitrap (CEQUIBIEM-CONICET. DQB, FCEN, UBA). El espectrómetro de masa se utilizó en los modos iónicos de análisis positivo y negativo con un voltaje del capilar de 3,75 y 3,2 kV, respectivamente. El voltaje del cono de muestreo se fijó en 50 V para todos los experimentos. La temperatura del capilar se fijó en 320 °C. El espectrómetro de masa se calibró siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizó una mezcla de cafeína, MRFA (Met-Arg-Phe-Ala), Ultramark 1621 (mezcla comercial de fosfazinas fluoradas) y n-butilamina. Las muestras para ESI-MS se prepararon a dos concentraciones, 0,4 mM y 4 μ M, aproximadamente, en una mezcla de agua:metanol 1:1 (v/v) (agua:MeOH) para ser medidas el mismo día. Las muestras se introdujeron en la fuente ESI por infusión directa (ID) a un flujo de 10 μ L min⁻¹ y cada corrida se adquirió durante 30 segundos. Después de cada análisis, el sistema se purgó 3 veces con solvente para evitar efectos de arrastre. La adquisición y el procesamiento de los datos se llevaron a cabo con el software Thermo Xcalibur 3.0.63 (Thermo Scientific).

Todos los solventes orgánicos (J. T. Baker grado HPLC), fueron utilizados sin previa purificación. Se utilizó agua de muy baja conductividad (grado Milli-Q).

5.2.2 Método general de irradiación

Para las irradiaciones se preparan soluciones de concentración del orden milimolar (mM) (aproximadamente entre 2,5 y 4,5 mM), en una mezcla de solventes acetonitrilo:metanol 95:5 v/v (MeCN:MeOH). Al ser los LIs ligeramente insolubles en MeCN es necesario agregar un pequeño porcentaje de MeOH a la solución para solubilizar completamente el compuesto a temperatura ambiente. Se irradian 10 mL de la solución en un tubo de vidrio Pyrex de 20 mL cerrado con un tapón de goma (Precision Seal, Sigma-Aldrich) y agitación magnética constante. En caso de indicarse, las irradiaciones fueron realizadas bajo atmósfera controlada. Para esto, se coloca una aguja a través del tapón de goma y se burbujea la solución típicamente entre 10 y 30 min (indicado en cada caso) con Argón (Ar) u Oxígeno (O₂). Una vez completado el burbujeo se retira la aguja, dejando presión positiva del gas dentro del tubo cerrado. La solución se irradia entre tres y siete horas con 4 lámparas con un máximo de emisión a 310 nm que emiten un haz casi paralelo a 310 nm (HelioQuartz, 18W). En ninguno de los casos estudiados se observan diferencias en el tipo y proporción de los productos generados con el tiempo de irradiación. Luego de la irradiación el solvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se caracteriza por cromatografía en capa delgada (CCD) de sílica gel (fase móvil (FM) especificada

en cada caso), por espectroscopía ^1H -RMN en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) y en algunos casos por espectrometría de masa ESI-MS (Orbitrap). La cuantificación relativa porcentual de los productos por ^1H -RMN se realiza de la misma forma que la detallada en la sección experimental del capítulo 4.

Para el estudio de las cinéticas de isomerización monitoreadas por ^1H -RMN, se preparan soluciones de concentración 40 mM aproximadamente, en una mezcla de solventes acetonitrilo:metanol deuterados 86:14 v/v (MeCN-d_3 : MeOH-d_4). Se irradian 0,7 mL de la solución en un tubo de borosilicato para RMN por tres horas con 4 lámparas con un máximo de emisión a 310 nm que emiten un haz casi paralelo a 310 nm (HelioQuartz, 18W). Durante la irradiación, los espectros de ^1H -RMN se toman a tiempo de irradiación 0, 30, 60, 120 y 180 minutos. Luego de la irradiación, el tubo de RMN se deja en la oscuridad y se realizan los espectros a tiempo 1, 12, 24 y 72 hs.

5.2.3 Espectroscopía de absorción y emisión (Fluorescencia) UV-Vis

Los espectros de absorción se midieron en un espectrofotómetro Cary UV-Vis 50 equipado con una lámpara pulsada de xenón (Xe) de espectro completo. Los espectros fueron tomados en el rango de 200 a 600 nm, con un intervalo de 1 nm y una velocidad de barrido de 600 nm/min. Las medidas fueron realizadas en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Los espectros de emisión fluorescente corregidos se obtuvieron en un espectrofotómetro Cary Eclipse equipado con dos monocromadores Czerny-Turner y una lámpara pulsada Xe de 15 W (ancho de pulso: 2-3 μs , potencia: 60-75 kW). Los espectros fueron tomados con un intervalo de 1 nm y una velocidad de barrido de 600 nm/min. Los espectros de emisión fluorescente se tomaron usando como longitud de onda de excitación (λ_{exc}) 310 y 355 nm, especificadas en cada caso. Dependiendo de la λ_{exc} , el rango de adquisición fue desde 325 y 380 nm, respectivamente, hasta los 600 nm. Se utilizaron dos tamaños distintos para la ranura de excitación, 5 y 10 nm y para la ranura de emisión 10 nm; estos detalles experimentales son informados en cada caso. Dependiendo de la intensidad de la fluorescencia del compuesto en estudio, se preparan soluciones de concentración 0,1, 1 y 10 μM aproximadamente, en MeCN, MeOH y MeOH:HCl 4,2 mM, indicado en cada caso. Para medir el efecto en el espectro de absorción y emisión de un dado compuesto (ESA, ZSA, ECHCA, ácido dicloroacético DCA) en presencia de otro (BAM, TBAM, nHo, Py), se realizan sucesivos agregados, entre 15 a 35 μL , de una solución concentrada del segundo compuesto directamente en la celda de cuarzo contenedora de la solución del compuesto a estudiar, alcanzando las relaciones molares indicadas en cada caso. La mezcla se homogeniza y se miden los espectros correspondientes.

Todos estos estudios se efectuaron utilizando técnicas en estado estacionario. Se utilizó OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) para el análisis de los datos.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Ácidos sinapínicos (ESA y ZSA), análogos y sus LIs

- Espectro de absorción UV-Vis y emisión fluorescente

En las Figuras A5.1 y A5.2 del Anexo 5 en la página 367 se muestran los espectros de absorción UV-Vis en solución metanólica (rango de 200 a 600 nm, condiciones de Beer-Lambert) junto a los espectros de emisión fluorescente obtenidos por excitación a 310 nm para las matrices ácidas ESA, ZSA y la matriz nHo (rango de 350 a 600 nm) en dos concentraciones distintas. Dadas las propiedades ácido-base de los compuestos estudiados, también se realizan los espectros de absorción y emisión de los mismos a pH ácido, en solución metanólica con ácido clorhídrico 4,2 mM. En las Figuras 1 y 2 se muestran los espectros de absorción y emisión de ambos ácidos en comparación con los obtenidos luego del agregado de BAM y nHo.

En el caso de los ácidos ESA y ZSA, sus espectros de absorción son discutidos en el capítulo 2 de este trabajo de tesis (sección 2.3.1 página 57) y en la literatura⁴¹. Luego de la excitación a 310 nm, ambos ácidos presentan un espectro de emisión con una sola banda con un λ_{max} a 424 nm en MeOH. En medio ácido no se observan cambios en el espectro de absorción pero se observa una disminución en la intensidad de la fluorescencia y un corrimiento batocrómico del máximo de emisión, siendo mayor este corrimiento para el isómero ZSA (ESA $\lambda_{\text{max}} = 437$ nm y ZSA $\lambda_{\text{max}} = 447$ nm) (Figura A5.1). A una solución metanólica 10 μM de estos ácidos se realizaron agregados sucesivos de BAM desde 0,1 μM hasta 1 mM barriendo la relación molar ácido:amina desde 100:1 a 1:100. En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para las mezclas 100:1 y 1:1 en comparación con el espectro del ácido correspondiente.

Para ambos isómeros (ESA y ZSA) se observa un corrimiento a menores longitudes de onda, tanto del máximo de absorción como el de emisión, con el aumento de la concentración de BAM, siendo mayor este corrimiento para el isómero ZSA (ESA: $\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}} = 318$ nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{Emi}} = 424$ nm; ESA.BAM 1:1: $\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}} = 311$ nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{Emi}} = 414$ nm ; ZSA: $\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}} = 296$ nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{Emi}} = 424$ nm; ZSA.BAM 1:1: $\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}} = 282$ nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{Emi}} = 409$ nm). En el caso del isómero ESA, el corrimiento hipsocrómico se ve acompañado de una disminución de la intensidad de la banda de absorción y de fluorescencia (Figura 1a), mientras que en el isómero ZSA, se observa un aumento en la intensidad de las mismas (Figura 1b). Salum y col.⁴¹ atribuyen este comportamiento en el espectro de absorción

a la formación y estabilización por solvatación del anión carboxilato, que se convierte en el cromóforo predominante con el aumento de la concentración de la amina en la solución. Este cromóforo sería el responsable de las bandas de emisión luego de la excitación a 310 nm.

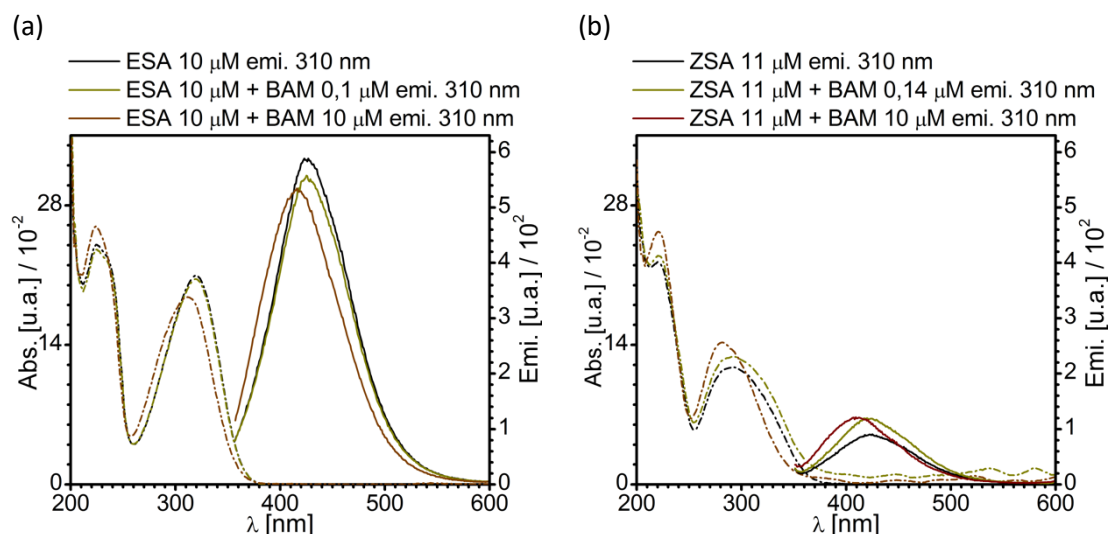


Figura 1. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{exc} = 310$ nm para los compuestos: (a) ESA (negro) y (b) ZSA (negro) con los agregados de BAM en relación molar ácido:amina 100:1 (verde) y 1:1 (marrón). Solvente: MeOH.

Si bien el espectro electrónico del nHo y otras β -carbolinas ya han sido descritos en la literatura^{12,33,42,43}, en este trabajo se realiza el estudio de su espectro de absorción y emisión con fines comparativos, ya que este cromóforo forma parte de los LIs propuestos como matrices en el capítulo 3. El espectro de absorción del nHo en MeOH, como en MeOH:HCl, presenta una serie de bandas de absorción con $\lambda_{max} = 233, 287, 338$ y 350 nm con un hombro a 278 nm. Estas bandas son asociadas a transiciones de tipo $\pi-\pi^*$, mientras que el hombro correspondería a una transición $n-\pi^*$. La banda de menor energía es asignada a transiciones electrónicas $^1S_1 \leftarrow ^1S_0$ y la de mayor energía a una transición $^1S_2 \leftarrow ^1S_0$ ^{12,33}. En MeCN, el espectro de absorción es similar aunque presenta un ligero corrimiento hipsocrómico de los máximos de absorción. Estos desplazamientos concuerdan con el carácter $\pi-\pi^*$ asignado a las bandas y con el cambio de hibridación que induce la formación de puentes de hidrógeno en los solventes polares próticos¹². El espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 310$ nm) en MeOH presenta dos bandas no definidas, la primera de ellas con λ_{max} a 380 nm y la segunda se observa como un hombro con λ_{max} a 440 nm (Figura A5.2a). En medio ácido, se observa la desaparición de la banda a 380 nm y un aumento de la intensidad de la banda a mayor longitud de onda ($\lambda_{max} = 445$ nm) (Figura A5.2c). En MeCN, por el contrario, desaparece la banda de absorción a 445 nm y se produce un aumento de la banda a 380 nm (Figura A5.2b). Este comportamiento se debe al carácter básico del nHo que se

ve aumentado en el estado electrónico excitado (*)) ($pK_a = 7,9$ y $pK_a^* = 12,2$)^{38,40,43}, las dos bandas de emisión se deben a las formas neutras y protonadas, respectivamente⁴⁴. En MeCN la especie mayoritaria es el nHo neutro, en metanol ambas especies se encuentran presentes debido al carácter prótico del solvente⁴⁵ y en medio ácido la especie predominante es el nHo protonado¹².

Al igual que lo realizado con los agregados de BAM, se realizan agregados sucesivos de nHo, desde 0,01 μM hasta 1 μM , a una solución metanólica y en MeOH:HCl de los ácidos ESA y ZSA 10 μM , alcanzando relaciones molares ácido:nHo entre 1000:1 a 10:1. En la Figura 2 se muestran los espectros de absorción y emisión ($\lambda_{exc} = 310$ nm) para la mezcla ácido:nHo en relación molar 100:1 en MeOH y MeOH:HCl, en comparación con las espectros de los compuestos por separado a la misma concentración. Si bien los ácidos ESA y ZSA presentan mayor absorbancia que el nHo a 310 nm (ESA 200 veces más y ZSA 100 veces más), este presenta una banda emisión más intensa (10 y 60 veces mayor para el ESA y ZSA respectivamente) a la misma concentración (1 μM , Figuras A5.1 y A5.2). Esto implica que la β -carbolina se desactiva de forma más eficiente por esta vía que ambos isómeros del ácido sinapínico. Tarzi y col.¹² determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_f) de estas matrices en MeCN, excitando a dos longitudes de onda 337 y 355 nm, siendo los ϕ_f del nHo aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que los del ESA (nHo: $\phi_f^{337} = 0,15$ y $\phi_f^{355} = 0,20$; ESA: $\phi_f^{337} = 0,005$ y $\phi_f^{355} = 0,003$). En este trabajo los autores también determinaron ϕ_f para la especie protonada del nHo, realizando los experimentos en una solución MeCN:HClO₄ 1%, exhibiendo mayor fluorescencia que la especie neutra (nHo+H⁺: $\phi_f^{337} = 0,37$ y $\phi_f^{355} = 0,35$)¹². Dada la mayor eficiencia de fluorescencia del nHo y el nHo+H⁺, en comparación con los ácidos ESA y ZSA, no se pudieron realizar experimentos en condiciones de equiparación de absorbancia, ni experimentos a igualdad de concentraciones y en el caso de las mezclas de ambos, en relaciones molares ácido:nHo superiores a 10:1, ya que en esas condiciones experimentales se produce la saturación del detector.

En la Figura 2a el agregado de nHo a una solución de ESA no genera cambios en el espectro de absorción. Sin embargo, en el espectro de emisión se observa un corrimiento en la banda emisión que se evidencia por la aparición de un punto isobéptico a menores longitudes de onda. Al igual que en el caso anterior, para el ZSA el agregado del nHo no produce cambios significativos en el espectro de absorción, mientras que en el caso de la fluorescencia el aumento en la banda es aproximadamente igual a la suma vertical (a una dada longitud de onda) de la fluorescencia de ambas especies por separado (Figura 2b). Sin embargo llama la atención, en ambos casos, que dado el equilibrio ácido base en solución, no se observe un aumento mayor en la fluorescencia debido a la especie nHo+H⁺. Por esta razón, se realiza el mismo estudio en

MeOH:HCl 4,2 mM, para asegurarse de desplazar el equilibrio del nHo hacia su ácido conjugado (Figura 2c y d). En estos espectros se observa para la mezcla ácido:nHo 100:1 una fluorescencia menor que lo que se esperaría, dada la suma vertical de la fluorescencia de ambos componentes por separado en este solvente, evidenciando un quenching en la desactivación radiativa de las especies.

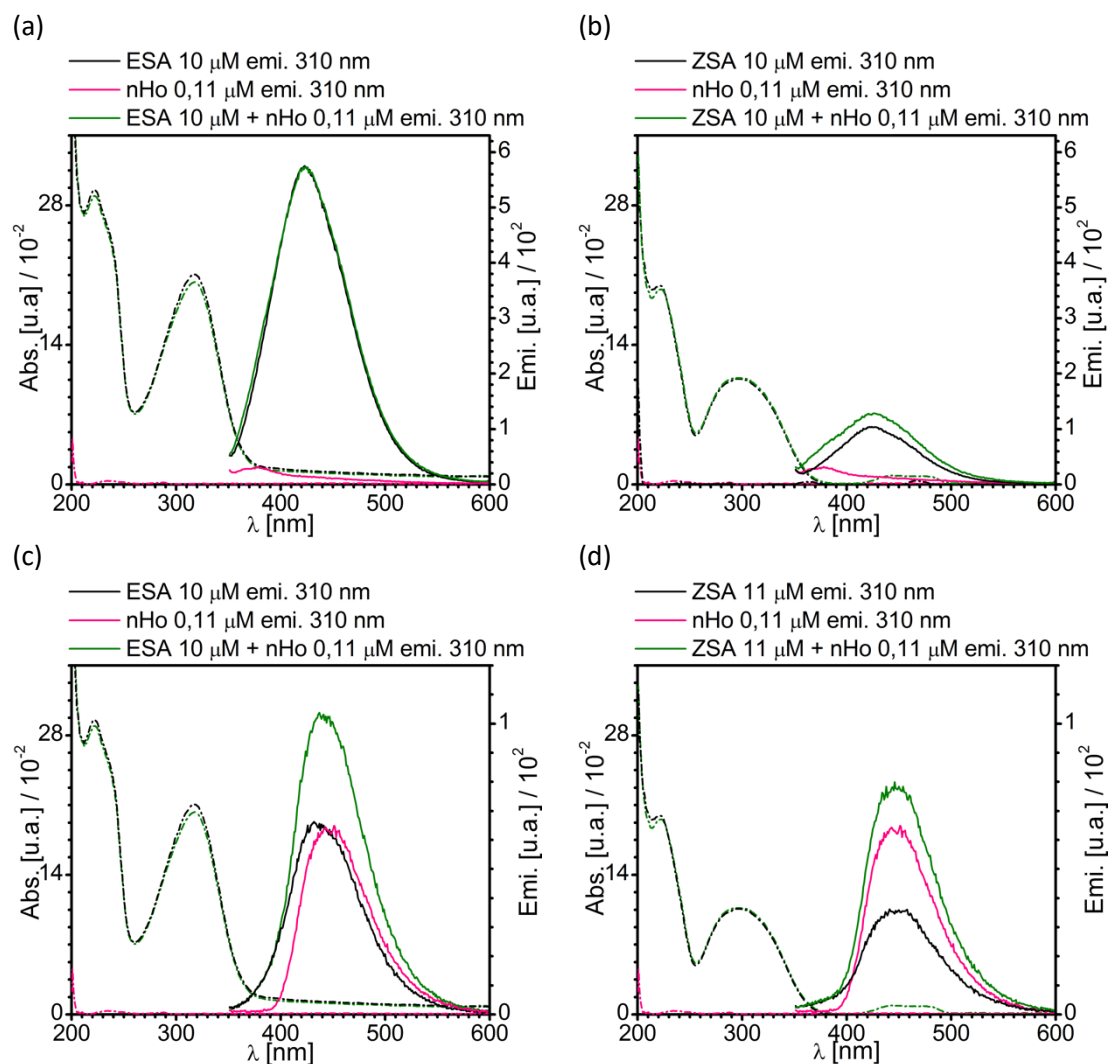


Figura 2. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{exc} = 310$ nm para los compuestos: (a y c) ESA (negro), nHo (rosa) y ESA:nHo 100:1 (verde), (b y d) ZSA (negro), nHo (rosa) y ZSA:nHo 100:1 (verde). Solvente: (a y b) MeOH y (c y d) MeOH:HCl (4,2 mM).

• Fotoquímica

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos a partir de la irradiación en solución de los LIs con nHo y Py derivados de los ácidos ESA, ZSA, ECUM y EFE. En todos los casos informados el tiempo de irradiación es de tres horas. Experimentos con un mayor tiempo de irradiación no presentaron cambios significativos en el número y proporción de los productos

obtenidos. Como describen Salum y col.²⁶, la irradiación de los ácidos *E*-cinámicos o sus LIs con aminas alifáticas en acetonitrilo, con una lámpara de mercurio ($\lambda > 300$ nm), da lugar a la formación de un estado fotoestacionario de la mezcla de ambos isómeros, donde la proporción relativa de estos en la mezcla depende de varios factores²⁹. En particular algunos de los LIs de los ácidos *Z*-cinámicos (ZSA, ZFE y ZCUM) son menos solubles que su isómero *E* y por lo tanto precipitan y pueden ser separados por filtración. Este protocolo es el utilizado en este trabajo de tesis para la preparación de estos compuestos, como se describió en la parte experimental de los capítulos anteriores. Con fines comparativos en la Tabla 1. se detallan los resultados obtenidos por Salum y col.²⁶ en la irradiación de los ácidos cinámicos y sus LIs con BAM, junto a los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 1. Productos formados y condiciones de reacción en la irradiación en solución de ESA, ZSA, ECUM y EFE. I = Producto de isomerización, D = Producto descarboxilado.

| Nº | Matriz | Solvente (v/v) | Conc. [mM] | Atmósfera | %I ^a | %D ^a |
|----|------------------------|------------------|--------------------|-----------|-----------------|-----------------|
| 1 | ESA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,8 | Normal | 41 | 0 |
| 2 | ESA.BAM ²⁶ | MeCN:MeOH | ----- ^b | Normal | 51 ^c | 5 |
| 3 | ESA.nHo | MeCN:MeOH (95:5) | 4,0 | Normal | 50 ^d | 0 |
| 4 | ESA.Py | MeCN:MeOH (95:5) | 3,9 | Normal | 58 | 0 |
| 5 | ZSA.nHo | MeCN:MeOH (95:5) | 4,0 | Normal | 50 ^d | 0 |
| 6 | ZSA.Py | MeCN:MeOH (95:5) | 4,1 | Normal | 59 | 0 |
| 7 | ECUM ²⁶ | MeCN:MeOH | ----- ^b | Normal | 21 | 0 |
| 8 | ECUM.BAM ²⁶ | MeCN:MeOH | ----- ^b | Normal | 36 ^c | 7 |
| 9 | ECUM.nHo | MeCN:MeOH (95:5) | 4,1 | Normal | 62 ^d | 0 |
| 10 | EFE ²⁶ | MeCN:MeOH | ----- ^b | Normal | 33 | 0 |
| 11 | EFE.BAM ²⁶ | MeCN:MeOH | ----- ^b | Normal | 37 ^c | 6 |
| 12 | EFE.nHo | MeCN:MeOH (95:5) | 4,0 | Normal | 57 ^d | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

²⁶ Ref 26 – Salum y Col. *Org. Lett.* 2010, 12 (21), 4808-4811.

^b La referencia informa que la concentración de la solución es de orden mM.

^c Porcentaje del isómero *Z* en solución, parte del isómero *Z* formado precipita como LI.

^d + Otros productos.

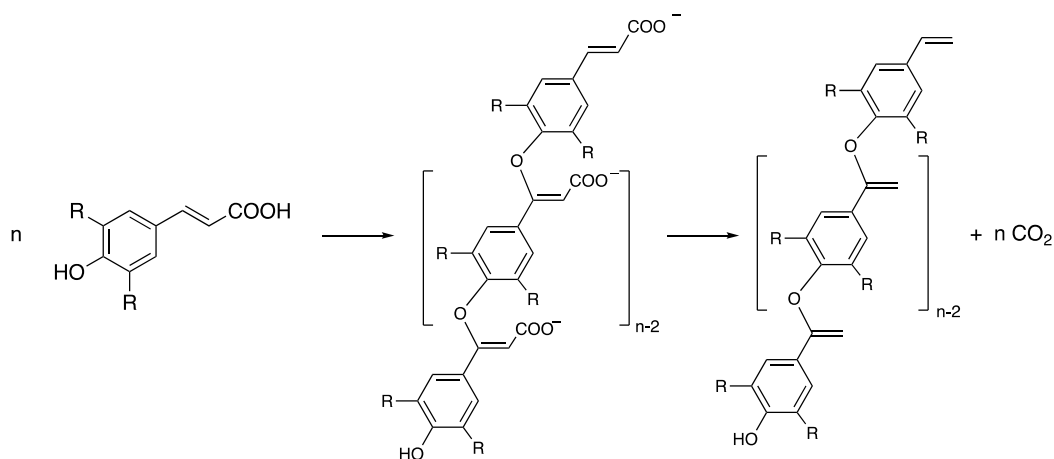
Al igual que los LIs con aminas alifáticas, en el caso de los LIs derivados del ácido sinapínico con nHo y Py como fuente del contra ion, al ser irradiados a 300 nm, se alcanza el equilibrio fotoestacionario, generando una mezcla de ambos isómeros (*E*-/*Z*-) (Tabla 1. entradas 3 a 6). Cabe señalar que los LIs ZSA.nHo y ZSA.Py no precipitan en estas condiciones experimentales. En presencia de una amina alifática se observa también la formación de un pequeño porcentaje de producto descarboxilado, lo que no se observa en presencia de las aminas aromáticas.

En particular al irradiar los LIs ZSA.nHo y ESA.nHo se observa la formación de otros productos minoritarios, detectados por ^1H -RMN, CCD y EM. En el caso del espectro ^1H -RMN se observa la aparición de nuevas señales en la zona de los grupos metoxilos (3,8 a 3,5 ppm) y de los protones aromáticos. También se observa la aparición de una serie de singuletes en la zona de los protones vinílicos (6,6 a 5,7 ppm). En la CCD se observan dos manchas, una con mayor R_f que el compuesto de partida y otra con menor R_f (FM: Acetato de etilo y Acetato de Etilo:MeOH 7:3 v/v). El crudo de reacción fue analizado por EM ESI-Orbitrap y se observó la formación de dímeros y trímeros del ácido por una reacción de tipo adición de Michael⁴⁶, producto del ataque nucleofílico de un monómero por medio del grupo fenólico, al carbono β del ácido carboxílico α - β -insaturado del otro monómero, como se muestra en el Esquema 1. Este tipo de estructura es consistente con la aparición de protones vinílicos sin constante de acoplamiento vecinal. Estos polímeros son detectados tanto solos como formando parte de una unidad supramolecular con nHo. También pueden observarse los productos descarboxilados de estos polímeros, que puede deberse a una reacción secundaria del ataque nucleofílico al doble enlace adyacente al grupo ácido o a la formación del anión carboxilato producto del medio básico, como se describió en el capítulo 4. Los iones más característicos observados en ESI-MS en ambos modos de análisis, además del ion molecular desprotonado del ácido ($[\text{SA-H}]^- = 223 \text{ m/z}$) y del nHo ($[\text{nHo-H}]^- = 167 \text{ m/z}$, $[\text{nHo+H}]^+ = 169 \text{ m/z}$), son: $[\text{SA+nHo+H}]^+ = 393 \text{ m/z}$, $[\text{2SA-2H-CO}_2+\text{nHo+H}]^+ = 571 \text{ m/z}$, $[\text{2SA-2H+nHo+H}]^+ = 615 \text{ m/z}$, $[\text{3SA-4H-CO}_2+\text{Na}]^+ = 647 \text{ m/z}$, $[\text{2SA-2H-CO}_2\text{-H}]^- = 401 \text{ m/z}$ y $[\text{2SA-3H}]^- = 445 \text{ m/z}$. Para ambos LIs los iones observados y la proporción relativa son los mismos.

En ninguno de los casos, en la irradiación de los LIs ZSA.nHo y ESA.nHo, se observan productos de reacción que incorporen la unidad nHo. Sin embargo, al irradiar nHo en MeCN a 300 nm, por medio del espectro de ^1H -RMN se observa la formación de dímeros. La formación de estos dímeros fue descrita por Erra-Balsells y col.^{40,47,48}, donde proponen un mecanismo radicalario, generándose dímeros a partir del radical N^* indólico por formación de nuevos enlaces intermoleculares N-N y N-C, siendo los del último tipo productos minoritarios (Esquema A5.1, Anexo 5). En esta reacción el estado electrónico excitado fotoreactivo se debe a una transferencia intramolecular de energía desde el estado electrónico excitado inicial (π - $\pi^* \rightarrow n$ - π^*), la cual se ve inhibida en condiciones ácidas (ácido acético y HCl). En estos trabajos los autores observaron que la fotodimerización es dependiente del solvente, inhibiéndose en solventes polares próticos. Del análisis de ^1H -RMN de las soluciones irradiadas surge que la proporción del foto dímero se encuentra entre un 21 y 37% en la mezcla final y se observa la desprotección de los hidrógenos H3, H4, H5 y H6, que presentan un corrimiento hacia δ

mayores⁴⁷, mientras que los hidrógenos H1, H8 y H7 sufren un corrimiento hacia δ menores. Esto indicaría que la presencia del cromóforo (ESA o ZSA) en la solución modifica la fotoquímica del nHo como cromóforo aislado.

El comportamiento observado en la irradiación de los LIs E y ZSA.nHo podría explicarse en base a dos posibles mecanismos. El primero de ellos, producto del aumento de la basicidad del nHo en el estado electrónico excitado, permitiría la reacción ácido-base entre el nHo y la fracción fenólica de los ácidos sinapínicos, generando de esta forma el anión fenóxido responsable del ataque nucleofílico al C_β de otro monómero. En este caso la formación de la especie protonada del nHo ($nHo+H^+$) inhibiría su homodimerización. El segundo mecanismo propuesto, involucra una transferencia de electrones a partir del nHo en el estado electrónico excitado (*photoinduced-electron-transfer*, PET²⁹) a un aceptor apropiado, en este caso el ácido SA. Luego de aceptar el electrón transferido por parte del nHo, el anión radical del ácido, ESA^{•-}, ataca al C_β , que presenta la menor densidad de carga, de otra molécula de ESA. En este caso la desactivación del estado electrónico excitado del nHo por PET, generaría el radical catión $nHo^{+•}$, el que sería quencheado en el medio de reacción inhibiéndose su homodimerización. Ambas propuestas involucran un mecanismo de tipo adición de Michael⁴⁶ para generar homodímeros y trímeros del ácido sinapínico.



Esquema 1. Productos poliméricos por reacción de tipo adición de Michael de los ácidos SA y formación de uno de los productos de descarboxilación.

Complementariamente, se utiliza Py para sustituir al nHo, como base modelo del sistema para comparar su comportamiento fotoquímico ya que comparte el núcleo estructural de la función básica del nHo y presenta un pKa similar ($pK_a = 5,23$)⁴⁹, pero no absorbe fotones a la longitud de onda usada en la irradiación. En este caso se observa que luego de la irradiación de los LIs ZSA.Py y ESA.Py no se forman productos secundarios de tipo adición de Michael (¹H-RMN y ESI-Orbitrap). Entre los iones observados en ESI-MS, encontramos el ion molecular

protonado de la Py y del ácido, junto a los aductos con sodio, potasio y el producto de deshidratación del mismo ($[Py+H]^+ = 80$ m/z, $[SA+H]^+ = 225$ m/z, $[SA+Na]^+ = 247$ m/z, $[SA+K]^+ = 263$ m/z, $[SA-H_2O+H]^+ = 207$ m/z). También se identifica el pico correspondiente al LI $[SA+Py+H]^+$ a m/z 304. Para ambos isómeros del ácido SA, los iones observados y su proporción relativa son los mismos.

Por otro lado, luego de la irradiación de LIs ECUM.nHo y EFE.nHo se observa en el espectro de 1H -RMN, además de la fotoimerización, una pequeña proporción de otros productos, no pudiendo ser cuantificados debido a que se encuentran al nivel de la línea de base del espectro. Los espectros de masa, ESI-Orbitrap, realizados sobre el crudo de reacción luego de la irradiación de ambos LIs, no muestran la formación de productos de tipo adición de Michael, como los descritos anteriormente. A diferencia de lo observado en la irradiación de los LIs SA.nHo, en el espectro de masa del ECUM.nHo se pudo identificar el producto de dimerización del nHo a m/z 335 ($[2nHo-2H+H]^+$), aunque en muy baja proporción en comparación con el ion molecular protonado del mismo, el que presenta una intensidad de tres órdenes de magnitud mayor que el dímero.

5.3.2 Ácido α -cianocinámico (ECHCA), análogos y sus LIs (BAM y nHo)

- Espectro de absorción UV-Vis y emisión fluorescente.

En la Figura A5.3 se muestran los espectros de absorción UV-Vis en condiciones de Beer-Lambert, junto a los espectros de emisión obtenidos luego de la excitación a 310 nm de la matriz ECHCA en dos concentraciones distintas en los solventes MeOH, MeOH:HCl 4,2 mM y MeCN. Mientras que en las Figuras 3 y 4 se muestra como cambian estos espectros luego del agregado de BAM y nHo a una solución en MeOH de este ácido. El espectro de absorción del ECHCA presenta dos bandas principales asignadas a transiciones de tipo $\pi-\pi^*$ cuyos máximos en MeOH aparecen a 236 y 332 nm. Dichas bandas corresponden a las transiciones electrónicas $^1S_2 \leftarrow ^1S_0$ y $^1S_2 \leftarrow ^1S_0$, respectivamente. Estas bandas sufren un corrimiento batocrómico al aumentar la polaridad del solvente, siendo los máximos de absorción 241 y 343 nm en MeOH:HCl. Este corrimiento está de acuerdo con el carácter $\pi-\pi^*$ asignado a las bandas¹².

En el caso de la fluorescencia, el ECHCA presenta dos bandas, la primera de muy baja intensidad a 373 nm y la segunda de mayor intensidad a 445 nm en MeOH (Figura A5.3a). Al cambiar el solvente por MeOH:HCl, se observa la desaparición de la banda a menor longitud de onda y una disminución significativa de la fluorescencia de la banda a 445 nm (Figura A5.3c), mientras que en MeCN, se produce la desaparición de la banda a mayor longitud de onda (Figura A5.3b). Tarzi y col.¹², en su estudio de la fluorescencia de esta matriz en MeCN a diferentes

concentraciones, atribuyen estas bandas de emisión a la formación de excímeros, agregados moleculares en estado electrónico excitado ($m = \text{ECHCA}$, $^1[\text{mm}]^*$). Estas nuevas especies en estado electrónico excitado pueden desactivarse por diferentes vías: radiativas (fluorescencia o fosforescencia) y/o no radiativa, regenerando las especies en estado electrónico fundamental ($m + m$) o por transferencia interna de energía ($m^* + m$), transferencia de electrones ($m^{*+} + m^-$), entre otras. La formación del excímero implica la unión supramolecular entre una unidad en el estado electrónico excitado (m^*) y una en estado fundamental (m), en esta interacción el HOMO y el LUMO del nuevo sistema resultante (mm^*) están más próximos en energía, generando transiciones menos energéticas^{29,50,51}. Es por esto que los autores atribuyen la banda a mayor longitud de onda al excímero y a la de menor λ al monómero¹².

Al igual que lo realizado para el ESA y ZSA, se miden los espectros de absorción y emisión del ECHCA en MeOH con agregados sucesivos de BAM barriendo relaciones molares ácido:amina entre 100:1 a 1:100. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para las mezclas 100:1 y 1:1 en comparación con los espectros del ácido.

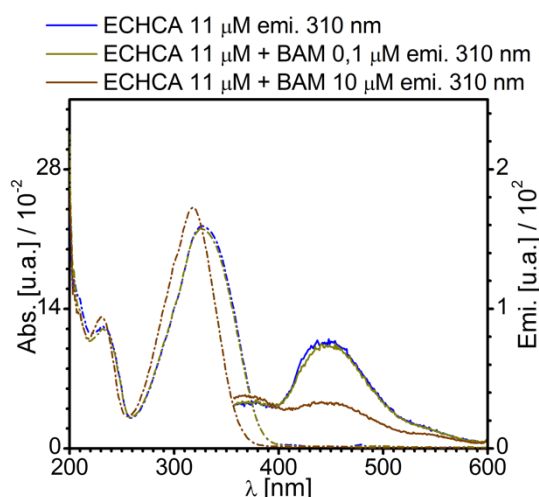


Figura 3. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm para el compuesto ECHCA (azul) con los agregados de BAM en relación molar ácido:amina 100:1 (verde) y 1:1 (marrón). Solvente: MeOH.

Con los agregados sucesivos de BAM a la solución del ácido ECHCA, se observa un corrimiento hipsocrómico del máximo de absorción de ambas bandas, siendo mayor este corrimiento para la banda a mayor λ ($\lambda_{\text{max}} = 230$ y 318 nm), y la aparición de un pequeño hombro a 300 nm. Este comportamiento ya fue descrito en el capítulo 2 y se atribuye a la aparición de la forma aniónica del ECHCA (Figura 3). Por encima de la relación molar 1:1, se observa una disminución en la absorbancia de estas bandas y la aparición de una nueva banda a 380 nm (datos no mostrados). En cuanto a la emisión, con los sucesivos agregados de BAM se observa una

disminución en la intensidad de la banda a 445 nm, hasta su desaparición en relaciones molares ácido:amina superiores a 1:10, y un ligero aumento de la intensidad en la banda a 373 nm. A diferencia de lo que se observa para los ácidos ESA y ZSA, el ECHCA en presencia de una amina pierde en gran medida su desactivación desde el estado electrónico excitado por la vía radiativa (fluorescencia). En particular el LI ECHCA.TBAM como matriz MALDI, ha presentado un comportamiento diferenciado al resto de los Lis ECHCA.amina, es por eso que se decide evaluar el espectro de emisión, con agregados sucesivos de TBAM a una solución en MeOH del ECHCA. En la Figura A5.4 se muestran los resultados de los agregados en relación molar ácido:amina 100:1 y 1:1. El espectro de absorción sufre el mismo efecto que el descrito para la BAM, sin embargo, el espectro de emisión tiene un comportamiento diferenciado. Con los agregados de TBAM, el máximo de emisión sufre un corrimiento hipsocrómico de aproximadamente 30 nm ($\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}$).

También se midieron los espectros de absorción y emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$) obtenidos para los sucesivos agregados de nHo a una solución de ECHCA en MeOH y en MeOH:HCl, alcanzando relaciones molares ácido:nHo entre 1000:1 a 10:1. En la Figura 4 se muestra el resultado obtenido para una mezcla ECHCA:nHo en una relación molar 100:1 en comparación con los espectros de los compuestos solos a la misma concentración. Al igual que los ácidos ESA y ZSA, el ECHCA es un emisor fluorescente débil en comparación con el nHo. Para la misma concentración (1 μM), el ECHCA presenta una absorbancia de más de un orden de magnitud mayor que el nHo a 310 nm, sin embargo, este último presenta una fluorescencia 20 veces mayor que el ECHCA (Figuras A5.2 y A5.3). Esto se ve reflejado en su menor rendimiento cuántico de fluorescencia, siendo en MeCN $\phi_f^{337} = 0,002$ y $\phi_f^{355} < 10^{-3}$ ¹². Es por eso que no se realizan experimentos con equiparación de absorbancias o a igualdad de concentraciones para las mezclas.

En la Figura 4, tanto en MeOH como en MeOH:HCl, no se observan cambios significativos en el espectro de absorción del ácido ECHCA en presencia de nHo. En el espectro de emisión, con el agregado de nHo en MeOH, se observa un aumento de la intensidad de la banda a 445 nm, cuya intensidad es mayor que la suma vertical (a una dada longitud de onda) de la intensidad de fluorescencia del ECHCA y el nHo a esta longitud de onda (Figura 4a). Dado el equilibrio ácido-base entre el ECHCA ($\text{pK}_a = 1,17^{52}$) y el nHo, para dar el anión carboxilato y la especie protonada del nHo ($\text{nHo} + \text{H}^+$), cuyo máximo de emisión es 445 nm y presenta un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia que la especie neutra¹², se considera que el aumento de la fluorescencia observado corresponde al aumento de la proporción relativa de esta especie en la solución. Este mismo comportamiento se observa también al disminuir un orden de magnitud

la concentración del ácido llegando a una relación molar ECHCA:nHo 10:1 (Figura A5.5a), como también modificando el solvente por MeCN. En este solvente la mezcla ECHCA:nHo 100:1 presenta una disminución de la intensidad de la banda a 380 nm, correspondiente a la especie neutra, y un pequeño aumento de la banda a 445 nm debido a la especie protonada (Figura A5.5b). Debido a este equilibrio ácido-base y a que los componentes de la mezcla emiten en la misma zona del espectro, no es posible sacar conclusiones sobre el efecto en la desactivación radiativa de la mezcla de ambos cromóforos, ya que no es posible conocer la concentración exacta de la especie neutra y protonada del nHo en la solución. Es por esto que se realiza el experimento a un pH lo suficientemente ácido (MeOH:HCl 4,2 mM, Figura 4b) como para desplazar el equilibrio ácido-base del nHo completamente hacia su forma protonada, y que luego la presencia del ácido ECHCA en la solución no modifique significativamente la concentración de esta especie. En estas condiciones se observa que la fluorescencia a 445 nm de la mezcla ECHCA:nHo 100:1 es menor que la suma vertical de las intensidades de emisiones de los cromóforos por separado a esta longitud de onda. Esto implicaría que existe un quenching de la fluorescencia cuando ambos cromóforos se encuentran en la solución o que una nueva forma cromofórica es la que se está caracterizando.

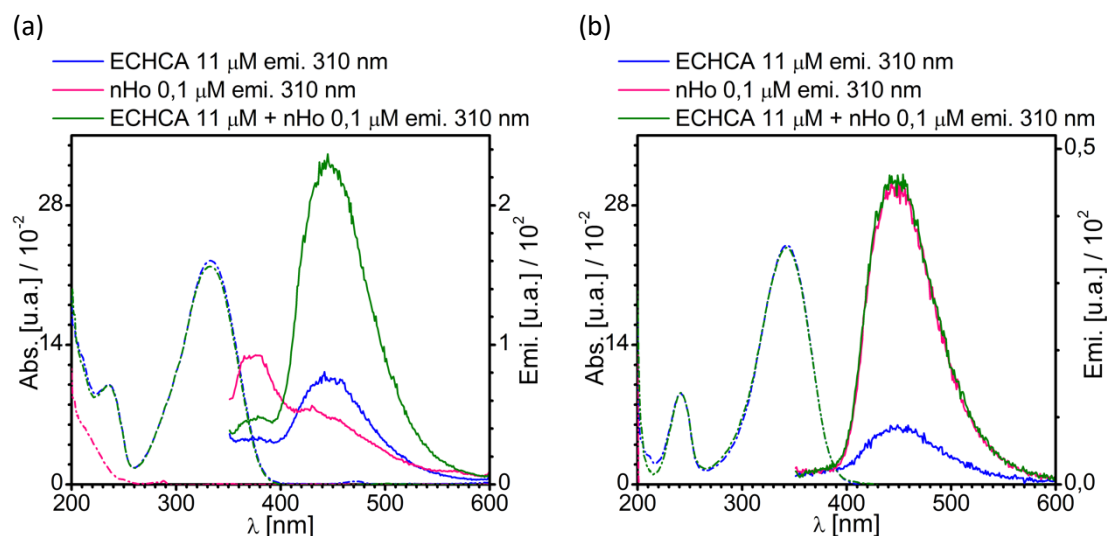


Figura 4. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{exc} = 310$ nm para el compuesto ECHCA (azul), nHo (rosa) y ECHCA:nHo 100:1 (verde). Solvente: (a) MeOH y (b) MeOH:HCl(4,2 mM).

Con el objetivo de comparar el efecto en el espectro de emisión del ECHCA en presencia del nHo, y considerando que en el capítulo 3 se evaluó el LI ECHCA.Py como matriz, se realizaron el mismo tipo de experimentos utilizando la Py como base agregada a una solución metanólica del ECHCA. La Py, en este sentido actúa como una base modelo que no absorbe fotones a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 310$ nm). En este caso se realizaron agregados

sucesivos de Py en un rango de relaciones molares ECHCA:Py entre 100:1 a 1:100. En la Figura A5.6 se muestran los resultados obtenidos para las relaciones molares 100:1 y 1:1. En todo el rango de concentraciones estudiado, el agregado de Py a una solución del ácido ECHCA no genera cambios en el espectro de emisión. En las Figuras A5.7, A5.8 y A5.9 se muestran los espectros de absorción y emisión fluorescente de los análogos halogenados del ECHCA, el E-4ClCHCA y E-4FCHCA en MeOH con los agregados de BAM y nHo. Tanto el espectro de absorción y emisión de estos ácidos es similar al del ECHCA y su comportamiento frente a los agregados de BAM y nHo sigue la misma tendencia que la descripta anteriormente.

- Fotoquímica

Los resultados de las irradiaciones del ECHCA y sus LIs con BAM, nHo y Py se muestran en la Tabla 2. Con el objetivo de caracterizar el estado electrónico excitado fotoreactivo, se decide evaluar el cambio en la proporción de los productos de irradiación bajo atmósfera controlada de oxígeno y argón²⁹, como se indica en la sección experimental.

Tabla 2. Productos formados y condiciones de reacción en la irradiación en solución del ECHCA. I = Producto de isomerización, D = Producto descarboxilado.

| Nº | Matriz | Solvente (v/v) | Conc. [mM] | Atmósfera | %I ^a | %D ^a (E:Z) ^b |
|----|-----------|------------------|------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------------|
| 1 | ECHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Normal | 45 | 0 |
| 2 | ECHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,3 | Argón | 41 | 0 |
| 3 | ECHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Argón (15 min) ^c | 40 | 0 |
| 4 | ECHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,4 | Argón (30 min) | 42 | 0 |
| 5 | ECHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,9 | Oxígeno | 40 | 0 |
| 6 | ECHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 2,2 | Normal | 0 | 8 (50:50) |
| 7 | ECHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 2,4 | Argón | 0 | 10 (50:50) |
| 8 | ECHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 2,5 | Oxígeno | 0 | 6 (50:50) |
| 9 | ECHCA.nHo | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Normal | 0 | 0 |
| 10 | ECHCA.Py | MeCN:MeOH (95:5) | 3,2 | Normal | 0 | 0 |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Proporción (%) de isómeros E y Z del fenil-acrilonitrilo en relación al total de producto descarboxilado (D), cuantificado por ¹H-RMN.

^c Tiempo de burbujeo del gas en el sistema cerrado, en caso de no indicar el tiempo son 10 min.

Luego de la irradiación del ECHCA, se obtiene la mezcla de ambos isómeros en una proporción E:Z 55:45, aproximadamente. En ninguno de los casos evaluados se observa un cambio en el tipo y proporción de los productos de irradiación del ECHCA con el cambio de atmósfera de irradiación, lo que indicaría que el estado fotoreactivo es el estado singulete (Tabla 2 entradas 1 a 5). Como se describió en el capítulo 4, al agregar en el mismo tubo de ¹H-RMN conteniendo la mezcla E+ZCHCA, un equivalente de BAM o nHo, se obtiene la conversión total

al isómero *E* a temperatura ambiente. Esto se debe a la conversión térmica de los isómeros *Z*- α -cianocinámicos, debido una catálisis nucleofílica para dar el isómero *E* termodinámicamente más estable⁵³.

A diferencia del ácido solo, la irradiación de los LIs derivados del ECHCA, tanto con aminas alifáticas como con aminas aromáticas, no presentan fotoisomerización en estas condiciones experimentales (Tabla 2 entradas 6 a 10). En el caso del LI ECHCA.BAM, luego de la irradiación, se observa un pequeño porcentaje de producto descarboxilado. Como se describió en el capítulo 4, este producto puede deberse al calentamiento de la solución debido a las lámparas de irradiación por un mecanismo de catálisis básica y/o una descarboxilación fotoquímica inducida^{54,55}. A diferencia de lo observado en las irradiaciones de los LIs SA.nHo, en este caso no se observa la formación de productos secundarios como la polimerización por adición de tipo Michael.

A partir de estos resultados, se decide estudiar la cinética de la fotoisomerización del ECHCA y sus LIs con BAM, TBAM, nHo y Py en solución por ¹H-RMN, efectuando el monitoreo durante la irradiación y adicionalmente estudiar la estabilidad térmica de las mismas luego de la irradiación. Como se indicó en la parte experimental, esta irradiación se realiza directamente en un tubo de RMN con una solución 40 mM (MeCN-*d*3:MeOH-*d*4 86:14 v/v). Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 5 como un gráfico del porcentaje del isómero *Z* en la solución en función del tiempo, durante y luego de la irradiación.

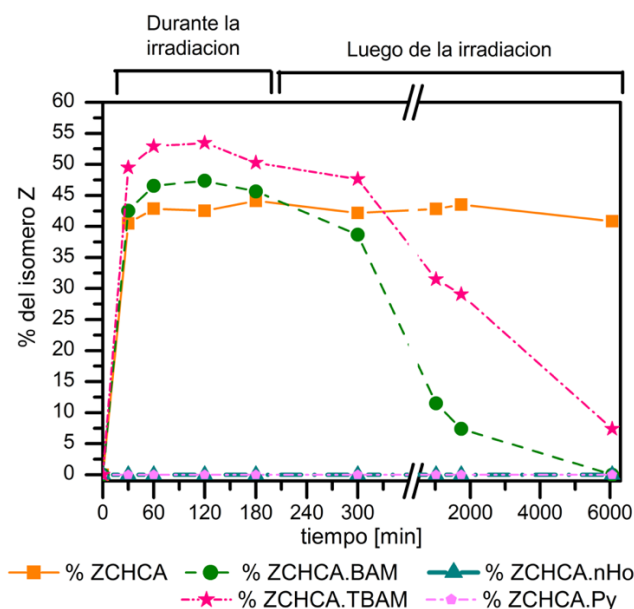


Figura 5. Irradiación del ácido ECHCA (■) y sus LI con BAM (●), TBAM (★), Py (◆) y nHo (▲) a 300 nm en MeCN-*d*3: MeOH-*d*4 86:14 v/v. Monitoreo a distintos tiempos durante y luego de la irradiación por ¹H-RMN.

En la Figura 5 se observa que el tanto el ácido ECHCA como sus LIs con BAM y TBAM, alcanzan el equilibrio fotoestacionario dentro de los primeros 30 minutos de la irradiación y se mantiene aproximadamente constante durante la misma en 43, 45 y 53% de isomerización, en cada uno de los casos respectivamente. Luego de la irradiación, el porcentaje del ácido ZCHCA en la mezcla se mantiene constante, sin embargo, la proporción del ácido Z en presencia de las aminas BAM y TBAM comienza a decaer luego de la irradiación, debido a la conversión térmica $Z \rightarrow E$ del ácido Z- α -cianocinámico por catálisis nucleofílica. Tanto la proporción del ácido Z en el equilibrio fotoestacionario como la velocidad de conversión térmica está determinada por la naturaleza de la base. En este último caso, la catálisis nucleofílica implica el ataque de la amina al C_{β} electrofílico del ácido α - β insaturado⁵³, como se muestra en el Esquema 4 del capítulo 3. En el caso de la TBAM, al ser una base estéricamente impedida es menos nucleofílica que la BAM, es por eso que la velocidad de conversión térmica es menor para la amina terciaria que para la amina primaria. Estos resultados son acordes con los mostrados en la Tabla 2 entradas 6 a 8, que indican que por el tratamiento experimental del crudo de reacción, el mínimo aumento de temperatura de la muestra para la evaporación del solvente a presión reducida, acelera el proceso de conversión, detectándose únicamente el isómero E en el espectro 1H -RMN.

En el caso de la irradiación de los LIs ECHCA.nHo y ECHCA.Py, a diferencia de lo observado para los LIs con aminas alifáticas, en todo el intervalo estudiado no se observa la aparición del isómero Z en la mezcla. Este comportamiento podría deberse a un quenching del estado fotoreactivo que da lugar a la isomerización fotoquímica del ácido ECHCA debido a la presencia de un segundo cuerpo, ya sea en estado electrónico excitado, como puede ser el caso del nHo o en estado el estado electrónico fundamental, como sería el caso de la Py. Este quenching entre los estados electrónicos excitados del ECHCA y el nHo, podría también explicar la falta de reactividad del nHo, no observándose la formación de sus dímeros, o la falta de reacciones secundarias por parte del ácido como las adiciones de tipo Michael descritas anteriormente.

Además se realizaron las irradiaciones de los análogos estructurales del ECHCA, con distintos sustituyentes en la posición *para* del anillo aromático y en el carbono alfa, en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas anteriormente. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Productos formados y condiciones de reacción en la irradiación en solución de análogos al ECHCA. I = Producto de isomerización, D = Producto descarboxilado.

| Nº | Matriz | Solvente (v/v) | Conc. [mM] | Atmósfera | %I ^a | %D ^a (E:Z) ^b |
|----|---------------|------------------|------------|-----------|------------------|------------------------------------|
| 1 | E-4MCHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 2,9 | Normal | 43 | 0 |
| 2 | E-4MCHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 2,7 | Argón | 45 | 0 |
| 3 | E-4MCHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 2,9 | Normal | 0 | 12 (50:50) |
| 4 | E-4MCHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 2,9 | Argón | 0 | 10 (50:50) |
| 5 | EαMECA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Normal | 50 | 0 |
| 6 | EαMECA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Argón | 49 | 0 |
| 7 | EαMECA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 2,8 | Normal | 69 | 0 |
| 8 | EαMECA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 2,9 | Argón | 69 | 0 |
| 9 | E-4ClCHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,6 | Normal | 35 | 15 (60:40) |
| 10 | E-4ClCHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,6 | Argón | 32 | 12 (60:40) |
| 11 | E-4ClCHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,3 | Oxígeno | 37 | 10 (60:40) |
| 12 | E-4ClCHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 3,3 | Normal | X ^{d,e} | X ^{d,e} |
| 13 | E-4ClCHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 3,3 | Argón | X ^{d,e} | X ^{d,e} |
| 14 | E-4FCHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Normal | 29 | t ^c |
| 15 | E-4FCHCA | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Argón | 22 | t ^c |
| 16 | E-4FCHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Normal | 0 ^d | t ^c |
| 17 | E-4FCHCA.BAM | MeCN:MeOH (95:5) | 3,1 | Argón | 0 ^d | t ^c |

^a Rendimiento (%) en relación a la suma del compuesto sin reaccionar más el producto descarboxilado (D) y el producto de isomerización (I), cuantificado por ¹H-RMN.

^b Proporción (%) de isómeros E y Z del fenil-acrilonitrilo en relación al total de producto descarboxilado (D), cuantificado por ¹H-RMN.

^c t= nivel de traza identificado por CCD.

^d+ Otros productos.

^e Se observa la aparición de los productos pero no es posible cuantificar por superposición de señales.

Al igual que lo realizado con el ECHCA, a partir de la mezcla E+Z de los ácidos 4MCHCA, αMECA, 4ClCHCA y 4FCHCA obtenidas por fotoisomerización, se agrega en el mismo tubo de RMN un equivalente de BAM en solvente deuterado. En el caso de los ácidos 4MCHCA, 4ClCHCA y 4FCHCA se observa una conversión total de la mezcla para dar únicamente el isómero E. En el caso del ácido αMECA, la relación molar entre ambos isómeros en la mezcla se mantiene inalterada luego del agregado de la amina.

Estos resultados muestran un comportamiento similar al descrito anteriormente para el ácido ECHCA. Si bien todos los ácidos muestran fotoisomerización para dar el correspondiente isómero Z, la conversión térmica Z→E por catálisis nucleofílica es una propiedad de los ácidos que poseen el grupo ciano en el carbono α (grupo atractor de electrones), independientemente del sustituyente en la posición *para* del anillo aromático. Como se mencionó en el capítulo 4, estos ácidos presentan un C_β electrofílico susceptible al ataque nucleofílico, que da lugar al intermediario con libre rotación C-C para dar el isómero termodinámicamente más estable. Por el contrario, este comportamiento no se observa cuando el sustituyente en el C_α es un grupo

donor de densidad de carga como el grupo metilo, lo que disminuye el carácter electrofílico del C_β . En este caso, el isómero Z es estable térmicamente incluso en presencia de un nucleófilo.

Para estos ácidos se observa una disminución en el porcentaje del isómero Z en el equilibrio fotoestacionario a medida que aumenta el carácter tomador de electrones en la posición *para* del anillo aromático (% ZCHCA \approx Z-4MCHCA > Z-4ClCHCA > Z-4FCHCA).

5.4 CONCLUSIONES

Los resultados experimentales de este capítulo muestran que la presencia de una amina alifática (BAM) genera el mismo efecto en el espectro de absorción de los ácidos ESA, ZSA y ECHCA, generando un corrimiento hipsocrómico producto de la aparición del anión carboxilato en la solución, estabilizado por el solvente. Sin embargo, el efecto en el espectro de emisión luego de la excitación a 310 nm, no es el mismo para todos los ácidos. Mientras que el espectro de emisión de los isómeros del SA sufren un corrimiento a menores λ producto del agregado de la BAM, el ECHCA sufre una pérdida completa de esta vía de desactivación radiativa desde el estado electrónico excitado. Este comportamiento no es generalizado, ya que el agregado de una amina terciaria (TBAM) a la solución del ECHCA no genera esta pérdida de la fluorescencia, por el contrario presenta el mismo tipo de corrimiento hipsocrómico que el observado para el SA.

Al utilizar nHo, una base aromática, para evaluar su efecto en el espectro electrónico de los ácidos (ESA, ZSA y ECHCA y análogos), a pesar de las vicisitudes descriptas para este sistema, se pudo llegar a la conclusión de que existe una disminución en la fluorescencia de las especies producto de la presencia de la otra en la solución (quenching). Este efecto en la desactivación del estado electrónico excitado de los componentes de la mezcla, se debe a una interacción entre los mismos en el estado electrónico excitado ya que ambos absorben radiación a la longitud de onda de excitación. En el caso de modificar la naturaleza de la base, por un compuesto no absorbente (Py), entonces la desactivación desde el estado electrónico excitado del ácido por vías radiativas no se ve modificada.

En cuanto a su fotoquímica, estos ácidos presentan la típica fotoisomerización de alquenos hasta alcanzar un equilibrio fotoestacionario donde la proporción relativa de ambos isómeros dependen de su estructura²⁶, generalmente alrededor del 55:44 % *E:Z*, siendo menor en el caso de los análogos halogenados del ECHCA. Al igual que los ácidos libres, al irradiar los LIs con una amina alifática (BAM) se observa la fotoisomerización de los mismos. En el caso particular de los ácidos cinámicos (ESA, EFE y ECUM), los LIs derivados del isómero Z son estables

térmicamente y además son insolubles en MeCN:MeOH 95:5 %v/v, produciéndose la precipitación de los mismos. A diferencia de estos, los LIs de derivados de los ácidos Z- α -cianocinámicos no son estables térmicamente en condiciones básicas, produciéndose la conversión de los mismos al isómero *E* por un mecanismo de catálisis nucleofílica descrito detalladamente en el capítulo 4. En algunos casos se observa una pequeña proporción de producto descarboxilado que se debe a una reacción de descomposición térmica relacionado al carácter básico de la solución, como se discutió en el capítulo 4.

Al modificar la naturaleza de la amina constituyente del LI por nHo, una base aromática que absorbe fotones a la longitud de onda de irradiación, se observa un comportamiento fotoquímico diferenciado entre ambas familias de matrices. Los ácidos ESA y ZSA, además de la fotoisomerización, presentan reacciones secundarias de polimerización (dímero y trímeros) por reacciones de tipo adición de Michael. Esta adición se debe al efecto del nHo en el estado electrónico excitado, que por el aumento de su basicidad o por la capacidad de transferir electrones, genera especies del ácido ricos en electrones, que actúan como nucleófilos en un mecanismo de tipo adición de Michael al C β del ácido α - β insaturado. Esto quiere decir que si bien la principal vía fotoquímica de estos ácidos es la isomerización, la presencia del nHo genera una vía alternativa a la desactivación de este estado fotoreactivo. Este tipo de reacción entre el estado electrónico excitado del nHo y el SA, genera la desactivación electrónica del nHo lo que inhibe su propia reactividad fotoquímica como cuando se encuentra aislado. Este comportamiento no se repite en las mezclas derivadas de los ácidos ECUM y EFE con nHo o cuando se reemplaza el nHo por la Py que no absorbe fotones a esta λ .

Distinto es el caso del ácido ECHCA, que en presencia de nHo presenta un quenching fotofísico que desactiva los estados electrónicos fotoreactivos, tanto del ácido como del nHo, no observándose reacción química sobre ellos. Este comportamiento se repite al sustituir el nHo por la Py, por lo que este quenching podría originarse tanto en la interacción de los estados electrónicos excitados de ambas especies, ECHCA y nHo, o en la interacción del estado electrónico del ECHCA y el estado fundamental de la Py.

Matrices MALDI: Comportamiento fotoquímico y eficiencia como matrices

En los capítulos 2 y 3 se describe comparativamente el comportamiento como matrices de los ácidos E y ZSA y ECHCA como tales y el de sus LIs conformados por aminas alifáticas y por nHo.

En términos generales (capítulo 2) se observó que la eficiencia de las matrices aumenta al pasar del *E*-ácido al *E*-ácido.amina alifática mientras que disminuye al pasar del *Z*-ácido al *Z*-

ácido.amina alifática. Este comportamiento general se condice con el cambio observado en el espectro de Absorción UV-Vis de los LIs.

A su vez se observó (capítulo 3) que la presencia del nHo como unidad básica en la estructura de los LIs producía efectos muy dispares: un marcado aumento de la eficiencia en el caso del ECHCA en la forma ECHCA.nHo y una disminución de la misma en el caso de ESA y del ZSA. La fotoestabilidad de ECHCA en cierta forma se ve aumentada tanto por la presencia de aminas alifáticas como del nHo en los LIs del mismo, ya que en todos los casos bajo irradiación el ECHCA se mantiene estructuralmente inalterado. Por el contrario tanto el ESA como el ZSA que muestran baja eficiencia como matrices LIs del tipo ácido.nHo resultaron fotoquímicamente inestables bajo irradiación en solución, participando no solamente de la conocida fotoisomerización *E-Z* sino que además participan de reacciones de tipo Michael fotoquímicamente irreversibles, con el consiguiente cambio estructural y cambio de las propiedades fotofísicas de parte del material sólido remanente en el porta muestras que será objeto de nuevos impactos del láser durante el experimento MALDI.

5.5 REFERENCIAS

- 1 R. B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, Second Edi., 2010.
- 2 S. Niu, W. Zhang and B. T. Chait, *J Am Soc Mass Spectrom*, 1998, **9**, 1–7.
- 3 I. C. Lu, C. Lee, Y. T. Lee and C. K. Ni, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, **8**, 21–39.
- 4 I.-C. Lu, K. Y. Chu, C.-Y. Lin, S.-Y. Wu, Y. A. Dyakov, J.-L. Chen, A. Gray-Weale, Y.-T. Lee and C.-K. Ni, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, **26**, 1242–1251.
- 5 M. Karas and R. Krüger, *Chem Rev*, 2003, **103**, 427–439.
- 6 R. Knochenmuss, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2016, **9**, 365–385.
- 7 D. A. Allwood and P. E. Dyer, *Chem Phys*, 2000, **261**, 457–467.
- 8 T. W. Heise and E. S. Yeung, *Anal Chim Acta*, 1995, **299**, 377–385.
- 9 H. Ehring and B. U. R. Sundqvist, *Appl Surf Sci*, 1996, **96–98**, 577–580.
- 10 H. Ehring and B. U. R. Sundqvist, *Journal of Mass Spectrometry*, 1995, **30**, 1303–1310.
- 11 H. Ehring, C. Costa, P. A. Demirev and B. U. R. Sundqvist, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, **10**, 821–824.

- 12 O. I. Tarzi, Director: Rosa Erra-Balsells N° 4015, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2006.
- 13 M. Mesaros, O. I. Tarzi, R. Erra-Balsells and G. M. Bilmes, *Chem Phys Lett*, 2006, **426**, 334–340.
- 14 O. I. Tarzi, L. Di Stéfano, J. E. Argüello, G. Oksdath-Mansilla and R. Erra-Balsells, *Photochem Photobiol*, 2013, **89**, 1368–1374.
- 15 R. C. Beavis, T. Chaudhary and B. T. Chait, *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 156–158.
- 16 I. Fournier, J. C. Tabet and G. Bolbach, *Int J Mass Spectrom*, 2002, **219**, 515–523.
- 17 I. Fournier, C. Marinach, J. C. Tabet and G. Bolbach, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, **14**, 893–899.
- 18 C.-Y. Lin, H.-Y. Lin and C.-K. Ni, *Int J Mass Spectrom*, 2023, **486**, 117011.
- 19 H.-Y. Lin, H. C. Hsu, I.-C. Lu, K.-T. Hsu, C.-Y. Liao, Y.-Y. Lee, C.-M. Tseng, Y.-T. Lee and C.-K. Ni, *J Chem Phys*, 2014, **141**, 164307.
- 20 T. Hoyer, W. Tuszynski and C. Lienau, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, **12**, 13052.
- 21 T. Hoyer, W. Tuszynski and C. Lienau, *Chem Phys Lett*, 2007, **443**, 107–112.
- 22 I. Abdelmoty, V. Buchholz, L. Di, C. Guo, K. Kowitz, V. Enkelmann, G. Wegner and B. M. Foxman, *Cryst Growth Des*, 2005, **5**, 2210–2217.
- 23 M. A. Khoj, C. E. Hughes, K. D. M. Harris and B. M. Kariuki, *Cryst Growth Des*, 2013, **13**, 4110–4117.
- 24 F. A. Haskins and H. J. Gorz, *Arch Biochem Biophys*, 1959, **81**, 204–210.
- 25 G. S. Ušćumlić, V. V. Krstić and M. D. Muškatirović, *J Mol Struct*, 1988, **174**, 251–254.
- 26 M. L. Salum, C. J. Robles and R. Erra-Balsells, *Org Lett*, 2010, **12**, 4808–4811.
- 27 M. D. Cohen, G. M. J. Schmidt and F. I. Sonntag, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1964, 2000.
- 28 G. M. J. Schmidt, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1964, 2014.
- 29 N. J. Turro, V. Ramamurthy and J. C. Scaiano, *Principles of Molecular Photochemistry: An Introduction*, University Science Books, Sausalito, 2009.

- 30 O. I. Tarzi, H. Nonami and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2009, **44**, 260–277.
- 31 H. Nonami, S. Fukui and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, **32**, 287–296.
- 32 H. Nonami, K. Tanaka, Y. Fukuyama and R. Erra-Balsells, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**, 285–296.
- 33 M. C. Biondic, Director Erra Balsells, Rosa, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 1996.
- 34 F. Villarruel, M. P. Denofrio, F. A. O. Rasse-Suriani, F. S. García Einschlag, T. Schmidt De León, R. Erra-Balsells and F. M. Cabrerizo, *J Photochem Photobiol B*, 2019, **199**, 111600.
- 35 F. A. O. Rasse-Suriani, F. S. García-Einschlag, M. Rafti, T. Schmidt De León, P. M. David Gara, R. Erra-Balsells and F. M. Cabrerizo, *Photochem Photobiol*, 2018, **94**, 36–51.
- 36 K. P. Ghiggino, P. F. Skilton and P. J. Thistlethwaite, *Journal of Photochemistry*, 1985, **31**, 113–121.
- 37 M. C. Biondic and R. Erra-Balsells, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1997, 1323–1328.
- 38 R. Erra-Balsells and H. Nonami, *Environment Control in Biology*, 2002, **40**, 55–73.
- 39 M. Balón, J. Hidalgo, P. Guardado, M. A. Muñoz and C. Carmona, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1993, 99–104.
- 40 M. C. Biondic and R. Erra-Balsells, *J Photochem Photobiol A Chem*, 1990, **51**, 341–353.
- 41 M. L. Salum, P. Arroyo Mañez, F. J. Luque and R. Erra-Balsells, *J Photochem Photobiol B*, 2015, **148**, 128–135.
- 42 S. Draxler and M. E. Lippitsch, *J Phys Chem*, 1993, **97**, 11493–11496.
- 43 F. T. Vert, I. Z. Sanchez and A. O. Torrent, *Journal of Photochemistry*, 1983, **23**, 355–368.
- 44 A. Mallick, P. Das and N. Chattopadhyay, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2010, **11**, 62–72.
- 45 D. Reyman, M. H. Viñas, J. M. L. Poyato and A. Pardo, *J Phys Chem A*, 1997, **101**, 768–775.
- 46 L. Chen, L. Zhang, G. Yan and D. Huang, *Asian J Org Chem*, 2020, **9**, 842–862.
- 47 R. Erra-Balsells and A. R. Frasca, *Tetrahedron Lett*, 1984, **25**, 5363–5366.

- 48 R. Erra-Balsells and A. R. Frasca, *Tetrahedron*, 1983, **39**, 33–39.
- 49 M. Lõkov, S. Tshepelevitsh, A. Heering, P. G. Plieger, R. Vianello and I. Leito, *European J Org Chem*, 2017, **2017**, 4475–4489.
- 50 M. Klessinger and J. Michl, *Excited states and photochemistry of organic molecules*, VCH Publishers, Inc, New York, 1995, vol. 53.
- 51 P. Klán and J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*, Wiley, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom, 2009.
- 52 P. Kobylis, H. Lis, P. Stepnowski and M. Caban, *J Mol Liq*, 2019, **284**, 328–342.
- 53 S. Patai and Z. Rappoport, *J Chem Soc*, 1962, 396–403.
- 54 Z. Zeng, A. Feceu, N. Sivendran and L. J. Gooßen, *Adv Synth Catal*, 2021, **363**, 2678–2722.
- 55 M. Lukeman and J. C. Scaiano, *J Am Chem Soc*, 2005, **127**, 7698–7699.

Capítulo 6 : Estudio de complejos moleculares por ESI-MS entre las matrices MALDI ESA y ZSA con carbohidratos.

6.1 INTRODUCCIÓN

Como se describió en los capítulos 2 y 3, la introducción de matrices eficaces en MALDI-MS, como los derivados del ácido cinámico (ej. ácido *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ESA)¹; y ácido *E*- α -ciano-4-hidroxicinámico (ECHCA)²), condujo a la aplicación con éxito de estas en espectrometría de masa. Desde el descubrimiento empírico de esta primera generación de matrices, se han utilizado como matrices otros ácidos cinámicos disponibles en el mercado, así como derivados diseñados y sintetizados de forma racional con diferentes sustituyentes en el anillo bencénico, a las que se denomina matrices de segunda generación^{3,4}. En particular el doble enlace rígido en la estructura molecular de los ácidos cinámicos da lugar a dos isómeros geométricos diferentes, es decir, las formas *E* y *Z*. Salum y col.⁵, sintetizaron ácidos *Z*-cinámicos basados en un novedoso diseño racional para ser ensayados como matrices MALDI. En particular, el ácido *Z*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido *Z*-sinapínico, ZSA) mostró una eficiencia excepcional para el análisis de carbohidratos (Carb) y péptidos pequeños (PM < 1500 Da) en comparación con la forma *E* disponible comercialmente^{6,7}. En este trabajo, los autores se basan en cálculos computacionales para comprender la capacidad de diferentes matrices para generar muestras sólidas homogéneas y promover la ionización del analito (Carb) y para interpretar mejor la estructura tridimensional y el tipo de interacciones entre la matriz y el analito⁶. Los resultados de este trabajo mostraron que la estereoquímica de las moléculas de la matriz y las interacciones analito-matriz pueden cambiar drásticamente a nivel molecular como consecuencia del cambio de geometría en el doble enlace del ácido cinámico⁶. Los autores propusieron la formación de complejos no covalentes [SA+Carb] (1:1; mol/mol) con diferentes estructuras tridimensionales, siendo el complejo [ZSA+Carb] más estable que su isómero [ESA+Carb]. Esta mayor estabilidad del complejo [ZSA+Carb] se relacionó con el mayor número de interacciones intermoleculares de tipo puente de hidrógeno, lo que podría aumentar la homogeneidad de la distribución del analito en la matriz sólida y producir una mayor eficiencia de ionización (EI) del Carb⁶.

En este sentido, la técnica de espectrometría de masa con volatilización e ionización por electrospray (ESI-MS) es una potente herramienta para investigar la formación y estabilidad de complejos no covalentes debido a la suavidad del proceso de ionización. Dado que las uniones no específicas pueden conducir a la formación de macro-iones en ESI^{8,9}, y las interacciones no covalentes preexistentes en solución pueden sobrevivir durante el proceso de

ionización si se utilizan tanto el solvente como las condiciones instrumentales adecuadas, se pueden analizar complejos iónicos no covalentes intactos en fase gaseosa¹⁰. En la literatura se describen diferentes aplicaciones de la técnica ESI-MS para investigar diversos tipos de interacciones moleculares¹⁰, entre ellos interacciones proteína-proteína¹¹, complejos con carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos^{10,12,13}, y complejos de proteína con moléculas pequeñas¹⁴.

La técnica ESI es un método de ionización ampliamente utilizado para el análisis de moléculas mediante el acoplamiento de la cromatografía líquida a la espectrometría de masa (CL-EM), así como por infusión directa (ID-EM) manual y por inyección en flujo (FIA- EM). Sin embargo, aun en la actualidad el proceso ESI todavía no se entiende completamente⁹. La conversión de los analitos presentes en la solución en iones en fase gaseosa determina la respuesta en ESI, que puede diferir en muchos órdenes de magnitud para un conjunto de compuestos con propiedades similares evaluados en las mismas condiciones¹⁵. En este sentido, se han realizado muchos esfuerzos para entender los mecanismos que subyacen en el proceso ESI. Esto ha llevado a al menos cuatro modelos teóricos: el modelo de carga residual (CRM)^{8,16}, el modelo de evaporación de iones (IEM)¹⁷, el modelo de partición del equilibrio (EPM)¹⁸ y el modelo de eyección en cadena (CEM)⁹. Estos modelos proporcionan herramientas para distinguir entre las distintas respuestas en el proceso ESI a los efectos asociados con la instrumentación, la solución del analito y las propiedades del analito. Las diferencias en la EI pueden asociarse con el diseño de la fuente, la composición de la solución, es decir, los solventes y aditivos que afectan al pH, la tensión superficial, la conductividad, la fuerza iónica, y con las propiedades del analito, como la hidrofobicidad (logP), la ionizabilidad (pKa), la polarizabilidad, el estado de carga y el volumen molecular¹⁸⁻²⁰. Si bien la ionización por electrospray en el modo iónico de análisis negativo ha recibido menos atención en los estudios fundamentales que la ionización por electrospray de iones positivos¹⁵, Kaupmees y col.¹⁸ estudiaron la eficiencia de formación de iones negativos en la fuente ESI vía desprotonación de fenoles sustituidos y ácidos benzoicos y exploran la correlación de los valores de EI obtenidos con diferentes propiedades moleculares. Los autores concluyeron que los ácidos más fuertes (es decir, totalmente desprotonados en la solución), producen aniones con carga altamente deslocalizada por lo que presentan una mayor eficiencia de ionización y dan señales más intensas en el espectro de masa ESI de iones negativos.

Hermans y col.¹⁹ realizaron un estudio sistemático de la eficiencia de ionización ESI de 14 aminoácidos derivatizados convenientemente, cambiando específicamente ciertas propiedades fisicoquímicas. Al comparar la respuesta ESI de los distintos derivados, se encontró

que existe una fuerte correlación con el volumen molecular calculado, mientras que la correlación con los valores log P, pKa, y otras propiedades fisicoquímicas fue significativamente menor. Los autores llegaron a la conclusión de que a mayor volumen calculado mayor era la respuesta ESI observada, independientemente de las propiedades fisicoquímicas calculadas o de la naturaleza del aminoácido. Es decir que la respuesta en ESI no sólo es afectada por factores instrumentales, sino también por las propiedades del analito y de la solución, tales como la tensión superficial, la conductividad, la hidrofobicidad (log P), la ionizabilidad (pKa) y, principalmente, el volumen molecular.

En base a lo descrito en la literatura⁶ y a los resultados mostrados en los capítulos 2 y 3 de este trabajo de tesis, donde el ácido ZSA presenta un mayor rendimiento como matriz en comparación con la forma *E* para el análisis de Carb por MALDI-MS y el modelado molecular utilizado para explicar estos resultados⁶, en este capítulo se describirán experimentos ESI-MS por inyección directa (ID) con el objetivo de proporcionar pruebas adicionales para comprender el comportamiento diferencial de la ZSA como matriz MALDI-MS. Por lo tanto, hemos estudiado y comparado el comportamiento de estos ácidos como ligandos para la formación de complejos no covalentes con carbohidratos neutros. Al igual que en los capítulos anteriores, se seleccionaron carbohidratos con diferente estructura y PM para investigar la estabilidad y la capacidad de formación de complejos del ácido ZSA en comparación con su isómero ESA. Además se sintetizó ESA isotópicamente marcado, ácido E-3,5-di(metoxi-d3)-4-hidroxi- cinámico (ESA-*d6*), y se utilizó como ligando de referencia en la comparación. La interpretación de los resultados experimentales en este capítulo se apoyó en cálculos computacionales, revelando factores estructurales (descriptores) que pueden predecir el comportamiento de los ligandos SA, los carbohidratos y de los complejos no covalentes. Las Figuras A6.1-A6.10, Esquemas A6.1-A6.7 y Tablas A6.1-A6.2 mencionadas en este capítulo se encuentran en el Anexo 6.

6.2 EXPERIMENTAL

6.2.1 Materiales y métodos

El ácido *E*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido *E*-sinapínico, ESA) fue provisto por Aldrich (USA) y los carbohidratos glucosa (Glc), maltopentaosa (M5), maltohexaosa (M6), maltoheptaosa (M7) y la β -ciclodextrina (β CD) fueron provistos por Sigma Chemical (Tokyo, Japón). El 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído fue provisto por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los fructanos: fructosa (Frc) y 1F-fructofuranosilnistosa (F5) y las sales cloruro de sodio, 1-metil-imidazol clorohidrato y cloruro de cobre (III) fueron provistas por Wako Pure Chemical (Tokyo, Japón). El metanol deuterado (Metanol-*d4*, MeOH-*d4*) fue provisto por Cambridge

Isotope Laboratories, Inc. (MA, USA). El ácido clorhídrico fue provisto por Kishida Chemical (Tokyo, Japón). Se utilizó metanol (MeOH) de grado LC-MS provisto por Fisher Chemical (Raleigh, NC, USA) y agua ultrapura con 18,2 MΩ·cm de resistividad (Thermo Scientific Barnstead Micropure UV ultrapure water system, Sunnyvale, CA, USA) para preparar las soluciones. La estructura de estos compuestos y los valores de masa exacta se muestran en el apartado Reactivos: Estructura y masa exacta en la página 18 a 22.

6.2.2 Síntesis y caracterización de los ligandos

El ácido Z-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido Z-sinapínico, ZSA) fue sintetizado y caracterizado según el protocolo desarrollado por Salum y colaboradores⁵ y descrito en la sección experimental 2.2.1 en la página 52 del Capítulo 2.

El ácido E-sinapínico marcado isotópicamente con deuterio (ácido E-3,5-di(metoxi-d3)-4-hidroxicinámico, ESA-d6) fue sintetizado en base al método descrito por Yamauchi y colaboradores^{21,22}. La síntesis fue efectuada por este grupo de investigación como parte de un convenio de cooperación, siguiendo en este caso los pasos que se describen a continuación: se disuelve sodio (276 mg) en un matraz con metanol-d4 (3 mL). Luego se añade a la solución 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído (336 mg) y 1-metil-imidazol (1,5 mL). La mezcla se calienta a 130 °C durante 5 min en un recipiente abierto para evaporar el exceso de metanol-d4, luego se agrega cloruro de cobre (III) (113 mg) y se conecta el sistema a un condensador Dimroth. La reacción se continúa durante 1 h y luego se deja enfriar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó hasta pH =3 utilizando ácido clorhídrico y posteriormente se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de cloruro de sodio saturada y se secó con sulfato de sodio anhidro. El solvente se eliminó a presión reducida para obtener el 3,5-di(metoxi-d3)-4-hidroxibenzaldehído (318 mg, rendimiento 82%). Este aldehído (200 mg) se condensó con ácido malónico (133 mg) en piridina (1 mL) con una pequeña cantidad de piperidina (1 gota) a 70 °C durante 5 hs. La mezcla de reacción se acidificó hasta pH =3 con ácido clorhídrico y posteriormente se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secó con sulfato de sodio anhidro. El solvente se eliminó a presión reducida y el producto de reacción se purificó por recristalización con acetona y hexano para obtener el ESA-d6 (105 mg, rendimiento 46%). El producto de reacción fue caracterizado por punto de fusión en un aparato Fisher Jones, por espectroscopía de ¹H-RMN y espectrometría de masa de alta resolución en modo iónico negativo (HRMS/MS; CID (*Collision-induced dissociation*)). La descripción espectroscópica del ESA-d6 se encuentra detallada en el Anexo 6 página 372 Esquema A6.1. La estructura de los compuestos ZSA y ESA-d6 y sus valores de masa exacta se muestran en apartado Reactivos: Estructura y masa exacta (página 18).

6.2.3 Preparación de muestras para ESI-MS

Se prepararon soluciones madres de orden milimolar (mM) de los ácidos ESA, ZSA y ESA-*d6* y de los distintos carbohidratos (Carbs) en varios disolventes (agua, MeOH y mezclas agua:MeOH en diferentes relaciones volumétricas (v/v)). Las soluciones de los ácidos se almacenaron en la oscuridad a baja temperatura (5 °C) para evitar la fotoisomerización *E/Z* y la isomerización térmica *Z*→*E* descrita en los capítulos anteriores. Como se demostró anteriormente el isómero ZSA no se forma durante el proceso MALDI, por el contrario se demostró que un proceso de desactivación no radiativo desde el estado electrónico excitado es más eficiente que la fotoisomerización en estado sólido^{6,23}. A partir de las soluciones madres se prepararon diluciones de concentración micromolar (μM) de los ácidos y los Carbs para ser analizados en el mismo día. Las mezclas de ácido + carbohidratos se prepararon mezclando alícuotas de las soluciones madres correspondientes hasta alcanzar relaciones molares ácido:carbohidrato 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:3. Las diluciones mezcla micromolares se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 5 minutos antes de realizar los experimentos. Cada solución se preparó individualmente por triplicado.

6.2.4 Experimentos de titulación competitiva

Se estudiaron mezclas con proporciones fijas de la relación molar ácido:carb 1:1, 1:2 y 1:3 con ácido = (ZSA+ESA) y con proporción molar variable de ZSA y ESA en la mezcla. Para ello se varió la concentración relativa de los ácidos ESA:ZSA para alcanzar relaciones molares porcentuales 100:0, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70 y 0:100. En todos los casos, la concentración total de ácido en las mezclas se mantuvo constante en 5 μM. Las soluciones se prepararon utilizando agua:MeOH (7:3 v/v). Cada solución se preparó por triplicado. Para evitar un posible efecto de arrastre, se inició el conjunto de experimentos de titulación de forma independiente con un proporción inicial ESA:ZSA de 0:100 y se aumentó progresivamente la concentración de ESA hasta alcanzar el 100%.

6.2.5 Espectrometría de masa ESI (ESI-SQ-EM)

Los experimentos de espectrometría de masa (EM) se realizaron con un equipo Waters SQD2 (Waters Corporation, Manchester, UK) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) acoplado a un analizador de cuadrupolo simple (SQ) (CIBION-CONICET). El espectrómetro de masa se utilizó en sus modos iónicos de análisis positivo y negativo con un voltaje del capilar de 3,5 y 3,0 kV, respectivamente. El voltaje del cono de muestreo se fijó en 50 V para todos los experimentos, excepto para el análisis de los azúcares y las mezclas con Glc y Frc, en el que se fijó un valor de 20 V. La temperatura de la fuente se fijó en 150 °C para los oligosacáridos y en 120 °C para los monosacáridos. El flujo y la temperatura del gas nitrógeno de desolvatación (gas

de secado) se fijó en 600 L h⁻¹ y 300 °C. El flujo de gas del cono se fijó en 10 L h⁻¹. El espectrómetro de masa se calibró en el rango de m/z 20-3023 con una solución de yoduro de sodio y cesio. Los datos se adquirieron en el modo barrido con una duración de 0,2 segundos. Las muestras se introdujeron en la fuente ESI por infusión directa (ID) a un flujo de 10 µL min⁻¹ y cada corrida se adquirió durante 2 minutos. Después de cada análisis, el sistema se purgó 3 veces con solvente para evitar efectos de arrastre. La adquisición y el procesamiento de los datos se llevaron a cabo con el software MassLynx, versión 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

6.2.6 Espectrometría de masa Tandem (ESI-QToF-MS/MS)

Los experimentos de espectrometría de masa tandem MS/MS se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro de masa Xevo G2S QTOF (Waters Corporation, Manchester, UK) con una fuente de ionización por electrospray (CIBION-CONICET). El poder de resolución y la precisión de masa del instrumento fueron de 30.000 fwhm y 0,2 ppm a m/z 554,2615, respectivamente. El espectrómetro de masa se operó en el modo iónico de análisis negativo con un voltaje del capilar aguja de 2,3 kV y un voltaje del cono de muestreo de 30 V. La temperatura de la fuente y del gas de desolvatación se fijaron en 120 y 300 °C, respectivamente. El flujo de gas nitrógeno de desolvatación se fijó en 600 L h⁻¹, y el flujo de gas del cono en 10 L h⁻¹. El espectrómetro de masa se calibró en el rango de m/z 50-1400 utilizando una solución de formiato de sodio 0,5 M preparada en isopropanol/agua (90:10 v/v). Los datos se adquirieron en el modo continuo en el rango de m/z 50 a 1400 con un tiempo de barrido de 0,5 segundos. Las muestras se introdujeron en la fuente ESI mediante infusión directa (ID) a un flujo de 10 µL min⁻¹ y cada corrida se adquirió durante 1,3 minutos. Se analizaron los blancos del solvente entre las distintas muestras para evitar efectos de arrastre en las señales. Los espectros de masa de los iones producto se adquirieron aplicando diferentes voltajes en la celda de colisión (CID): 6, 8, 10, 13, 15, 17, 20 y 30 V. Se utilizó argón de alta pureza (≥ 99,999%) como gas de colisión. La adquisición y procesamiento de los datos se realizaron con el programa MassLynx, versión 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

6.2.7 Análisis de datos

En todos los casos, se prepararon y analizaron tres soluciones independientes de cada muestra. Como los datos presentaban una distribución normal (Shapiro-Wilk, p=0,05), se utilizó una prueba-t (t-test) de dos muestras (p=0,05) para evaluar las diferencias significativas entre los grupos comparados. Se utilizó OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) para el análisis estadístico y para ajustar los datos correspondientes al cambio de intensidad relativa de las especies iónicas [Ácido+Carb-H]⁻ en función del voltaje CID aplicado en los experimentos de MS/MS. Los valores de energía asociados a una caída del 50% (50% de

disociación; ED 50%) en la intensidad del pico (E_{lab50}) se obtuvieron para cada complejo a partir de los datos ajustados con funciones de Boltzmann de tipo Sigmoidal (Tabla 1).

6.2.8 Modelado Molecular

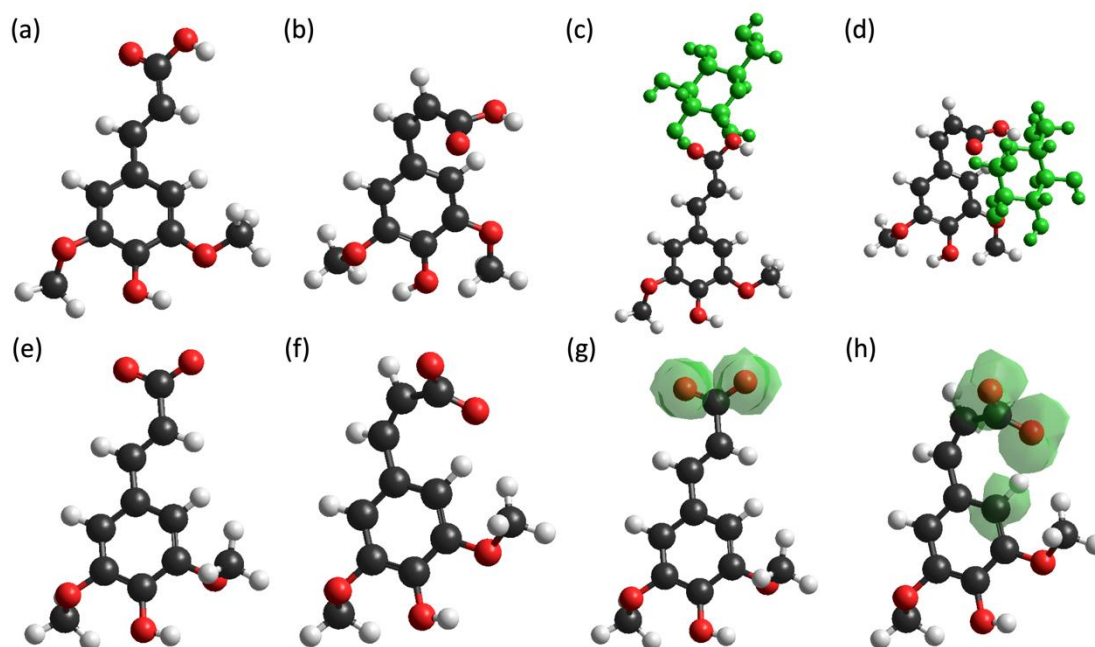
Se realizó la optimización de geometría del estado fundamental sin imponer ninguna restricción de simetría para las especies: ZSA, [ZSA-H]⁻, ESA, [ESA-H]⁻, Glc, [Glc-H]⁻, Frc, [Frc-H]⁻, F5, [F5-H]⁻, M5, [M5-H]⁻, M6, [M6-H]⁻, M7, [M7-H]⁻, β CD y [β CD-H]⁻. Se incluyeron en el análisis tres rotámetros de los grupos metoxilos en posición 3 y 5 para cada isómero del ácido sinapínico y varios isómeros del ion [Carb-H]⁻, para cada carbohidrato con diferente posición del grupo hidroxilo desprotonado (C-O⁻). Los cálculos se realizaron con métodos *ab initio* y semiempíricos. Para los cálculos DFT *ab initio* se utilizó el funcional de intercambio híbrido con gradiente corregido combinado con el funcional de correlación corregido por gradiente, comúnmente conocido como B3LYP, para estos cálculos se utilizó el conjunto de bases estandarizadas 6-311G(d,p) (B3LYP/6-311G(d,p)). Para los cálculos de *single point* se utilizó el conjunto de bases 6-311++G(d,p) con un nivel de teoría B3LYP (B3LYP/6-311++G(d,p)). Todos los cálculos *ab initio* se realizaron con Gaussian09²⁴.

Las propiedades utilizadas para el análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad (QSAR del inglés *Quantitative structure-activity relationship*) (Tablas A6.1 y A.62) y los orbitales moleculares (orbital molecular de mayor energía ocupado (HOMO) y el orbital molecular de menor energía desocupado (LUMO)) (Tablas A6.1 y A6.2), se obtuvieron con el programa HyperChem²⁵, luego de realizar un cálculo de *single point* sobre las geometrías optimizadas de las moléculas, mediante el método semiempírico parametrizado PM3 implementado en el programa HyperChem versión 8.0.10 para Windows (formalismo Hartree-Fock restringido (RHF); carga total: 0 y -1 para especies neutras y aniónicas, respectivamente; multiplicidad: 1; límite de convergencia: 1×10^{-8} ; límite de iteración: 50; acelerar convergencia: on; método CI: ninguno; algoritmo Polak-Ribiere; gradiente RMS: 0,006 Kcal/(Å mol); en vacío).

La geometría optimizada del estado fundamental de las estructuras diméricas (Esquema 1c-d) se calculó utilizando el método semiempírico parametrizado PM3 implementado en HyperChem 8.0.10 para Windows (formalismo Hartree-Fock restringido (RHF); carga total: 0 y -1 para especies neutras y aniónicas, respectivamente; multiplicidad: 1; límite de convergencia: 1×10^{-8} ; límite de iteración: 50; acelerar convergencia: on; método CI: ninguno; algoritmo Polak-Ribiere; gradiente RMS: 0,006 Kcal/(Å mol); en vacío).

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para comprender la disparidad en la eficiencia de los ácidos cinámicos *Z* y *E* como matrices en MALDI-MS, nos centramos en su capacidad de interactuar con los carbohidratos a nivel molecular. Este proceso incluyó la evaluación del ZSA y el ESA como ligandos en la formación de complejos no covalentes con carbohidratos de bajo peso molecular (Carbs) mediante experimentos ESI-MS, así como la posterior evaluación de la estabilidad de dichos complejos a través de experimentos MS/MS. Estos resultados experimentales fueron complementados con un análisis mediante modelado molecular. La estructura molecular del ácido (ESA y ZSA, Esquemas 1 a, b, c y d y A6.2) tiene un impacto significativo en la estereoquímica de los complejos moleculares formados entre los ácidos cinámicos y los Carbs. Esta propiedad puede desempeñar un papel importante en la estabilidad de la interacción no covalente entre las moléculas Ácido:Carb. Por lo tanto, se evaluó y caracterizó la formación de complejos por ESI para el ZSA, se comparó con el ESA y también se utilizó el ESA-*d6* marcado isotópicamente con fines comparativos. Es importante señalar que el ESA tiene un punto de fusión más alto (185 °C)⁵ que el ZSA (116-118 °C)⁵, y que el punto de fusión del ESA-*d6* (185,5 °C) es similar al del ESA.



Esquema 1. Comparación de la geometría optimizada de las moléculas: (a) ESA y (b) ZSA; complejos neutros propuestos (c) [ESA+Glc] y (d) [ZSA+Glc], Glc en verde; especies aniónicas (e) [ESA-H]⁻ y (f) [ZSA-H]⁻; cálculo del HOMO (g) [ESA-H]⁻ y (h) [ZSA-H]⁻ graficados como el cuadrado de la función de onda, mostrados como superficies verdes translúcidas.

6.3.1 Espectro de masa ESI y eficiencia de ionización: ligandos (ZSA, ESA y ESA-d6)

Se llevaron a cabo experimentos ESI-MS utilizando un equipo con analizador de simple cuadrupolo empleando infusión directa (DI-ESI-SQ-MS) en los modos iónicos de análisis positivo y negativo a fin de comparar la respuesta y los tipos de especies iónicas detectadas en soluciones individuales de ZSA, ESA y ESA-d6. Inicialmente, se evaluaron como solventes agua, metanol (MeOH) y las mezclas de agua:MeOH 10:1 a 1:10 (v/v). En el modo de análisis iónico positivo, los iones aductos con sodio (ej. $[\text{ESA}+\text{Na}]^+$; $[\text{ZSA}+\text{Na}]^+$) se detectaron como señales de muy baja intensidad junto con una gran variedad de otros clústeres iónicos, por ejemplo: $[(\text{ESA})_n(\text{Na}^+)_x]$, $[(\text{ESA})_n(\text{Na}^+)_x(\text{K}^+)_z]$, $[(\text{ZSA})_n(\text{Na}^+)_x]$, $[(\text{ZSA})_n(\text{Na}^+)_x(\text{K}^+)_z]$, etc. El número de iones obtenidos y la intensidad relativa de los mismos fue independientemente del solvente utilizado. Por el contrario, las especies desprotonadas de los ácidos, $[\text{ZSA}-\text{H}]^-$, $[\text{ESA}-\text{H}]^-$ y $[\text{ESA-d6}-\text{H}]^-$ se detectaron fácilmente con una buena relación señal/ruido (S/R) en el modo iónico de análisis negativo. Los valores obtenidos para la relación S/R son aproximadamente 1400, 2700 y 3100 para los ácidos $[\text{ESA-d6}-\text{H}]^-$, $[\text{ESA}-\text{H}]^-$ y $[\text{ZSA}-\text{H}]^-$, respectivamente. Al igual que lo observado en el modo de análisis positivo, el valor obtenido para la relación S/R era estable en agua, metanol y las mezclas de agua:MeOH.

En la Figura 1 se muestran las eficiencias de ionización de los distintos ácidos obtenidas para soluciones independientes de concentración creciente usando como solvente agua:MeOH (7:3 v/v). Los espectros de masa se obtuvieron en el modo negativo de análisis en un espectrómetro de masa ESI-SQ-MS como se detalla en la sección 6.2.5. En la Figura 1a se observa que ambos isómeros, ZSA y ESA muestran una eficiencia de ionización (EI) similar con una relación $\text{EI}_{\text{ZSA}}/\text{EI}_{\text{ESA}}$ aproximadamente 1 en el rango de 2-20 μM (Figura 1b). La reproducibilidad inter día para 23 experimentos independientes realizados con soluciones de ácido de 5 μM proporcionó una relación media de 1,0 con una desviación estándar de 0,3 ($\text{SD} = 0,3$). Por otro lado, los experimentos DI-ESI-SQ-MS realizados para soluciones del ácido ESA-d6 bajo las mismas condiciones experimentales (rango de concentración, solvente y parámetros experimentales de la fuente ESI) que los utilizados para el análisis de ZSA y ESA en el mismo día, proporcionaron valores de intensidad casi 2 veces menores para la especie iónica $[\text{ESA-d6}-\text{H}]^-$ (Figura 1a). La relación entre las eficiencia de ionización obtenida para el ZSA o el ESA en comparación con el ESA-d6 fue de aproximadamente 1,75 (Figura 1b).

En general, los isómeros *E* presentan un punto de fusión más alto, una solubilidad más baja, una banda de absorción a mayor longitud de onda y de mayor coeficiente de absortividad molar y, si se trata de un ácido, una menor acidez que la de su isómero *Z*²⁰. En cuanto a la estructura molecular de los ácidos, los aniones que tienen una carga más deslocalizada,

expresada como el diagrama de distribución de probabilidad del orbital molecular de mayor energía ocupado (HOMO) (orbitales; Esquema 1) y una mayor estabilización del orbital (expresado como una menor energía orbital), presentan una interacción más débil con otras moléculas e iones, y tienen una tendencia más baja al emparejamiento de iones. Este es el caso del $[ZSA-H]^-$, como se ilustra en el Esquema 1h y en la Tabla A6.1 (Anexo 6), este muestra una menor energía del HOMO (-4,936 a -5,097 eV) en comparación con la del $[ESA-H]^-$ (-4,519 eV a -4,555 eV). Sin embargo, la energía de solvatación y la interacción con las moléculas de agua, expresadas como energía de hidratación, contribuyen mejorando la estabilidad del ion $[ZSA-H]^-$ en solución acuosa con valores que van desde -9,9 a -10,1 kcal mol⁻¹, en contraste con los -8,4 a -8,9 kcal mol⁻¹ calculados para el $[ESA-H]^-$ (Tabla A6.1). Como se muestra en la Figura 1 a y b, ambos isómeros, ESA y ZSA, presentan una respuesta similar en ESI-MS para todas las concentraciones de ácido evaluadas. Por lo tanto, no sólo la deslocalización de la carga y la estabilización del HOMO juegan un papel en la EI por ESI de estos iones isoméricos, sino que otras propiedades moleculares pueden estar jugando algún tipo de efecto opuesto en el comportamiento de los aniones $[ESA-H]^-$ y $[ZSA-H]^-$, como el área superficial y el volumen, siendo ambos mayores para el $[ESA-H]^-$ (valor máximo 417,9 Å² y 660,8 Å³, respectivamente; Tabla A6.1) que para $[ZSA-H]^-$ (valor máximo 408,7 Å² y 644,6 Å³, respectivamente; Tabla A6.1).

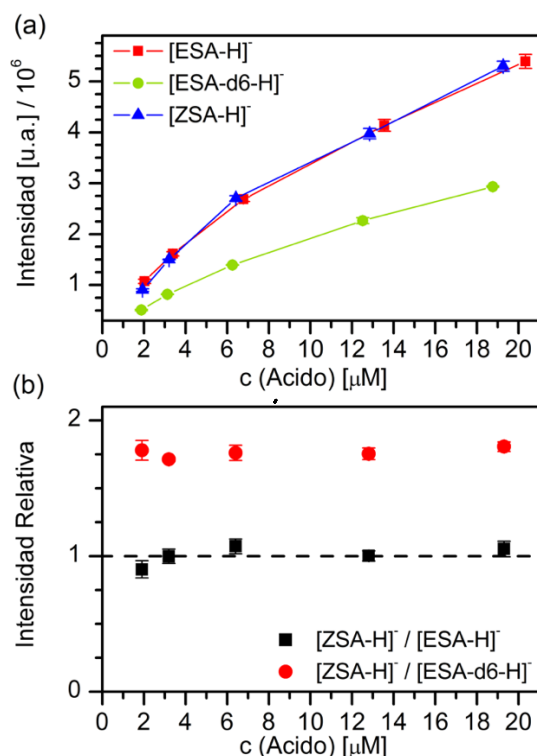


Figura 1. (a) Intensidad absoluta de las especies iónicas: $[ESA-H]^-$ (■), $[ESA-d6-H]^-$ (●) y $[ZSA-H]^-$ (▲) detectadas para diferentes concentraciones de las soluciones de ácido (Ácido: ESA, ESA-d6, ZSA) en agua:MeOH (7:3 v/v). (b) Intensidad relativa del ion $[ZSA-H]^-$ respecto a la intensidad de la señal $[ESA-H]^-$ (■, $[ZSA-H]^-/[ESA-H]^-$) y $[ESA-d6-H]^-$ (●, $[ZSA-H]^-/[ESA-d6-H]^-$) para diferentes concentraciones del ácido en soluciones agua:MeOH (7:3 v/v).

En cuanto al ESA-*d6*, hay que tener en cuenta otros factores para interpretar los resultados observados en ESI-MS en relación a su EI (Figura 1). El origen de los efectos isotópicos en las interacciones no covalentes (interacciones de tipo puente de hidrógeno, iónicas y de van der Waals) se ha atribuido principalmente a las diferencias en las longitudes de los enlaces covalentes C-D frente a los C-H y, en segundo lugar, a los cambios en las propiedades físicas de una molécula como consecuencia de la deuteración, incluyendo la polaridad, la polarizabilidad y el volumen molecular²⁶⁻³¹. Si bien se conoce que estos efectos ocurren, generalmente son considerados insignificantes. Sin embargo, el efecto del deuterio en las interacciones no covalentes depende del sitio y el número de deuterios en la molécula, haciéndose más importante a medida que aumenta el grado de deuteración³⁰. En este estudio, la sustitución de dos grupos CH₃O por dos grupos CD₃O en la estructura molecular del ácido SA produce un fuerte efecto en las propiedades moleculares. La longitud ligeramente menor del enlace C-D frente al C-H da lugar a una capacidad ligeramente mayor de donar densidad de electrones por un efecto inductivo y una menor amplitud de las vibraciones del enlace C-D. Esto genera un menor volumen molecular y una mayor polaridad debido a una mayor densidad de electrones en el anillo aromático, posiblemente este cambio produce interacciones más fuertes entre el analito y el solvente, lo que explica la menor eficiencia de ionización observada en ESI-MS para el ESA-*d6* en comparación con el ESA en agua:MeOH (7:3 v/v) (Figura 1).

6.3.2 Espectro de masa ESI y eficiencia de ionización: carbohidratos (Carbs)

Se seleccionaron diferentes fructanos y maltosas neutras comerciales como carbohidratos modelo para investigar la formación de complejos no covalentes con ESA y ZSA como ligandos. Los experimentos DI-ESI-SQ-MS se llevaron a cabo en los modos iónicos de análisis positivo y negativo, utilizando los diferentes solventes empleados en el estudio con los ligandos. Si bien, generalmente los análisis de Carbs por ESI-MS son realizados en el modo positivo, varios trabajos en la literatura han descrito la detección de las especies [Carbs-H]⁻³²⁻³⁴ al igual que aductos de tipo [Carbs+anión]⁻³⁴⁻³⁶. A pesar de las dificultades asociadas a la ionización de Carb por ESI, debido a su carácter molecular neutro, en este trabajo las especies desprotonadas [Carb-H]⁻ se detectaron con una buena relación S/R utilizando las condiciones experimentales optimizadas para la detección de los ligandos como los iones [ESA-H]⁻ y [ZSA-H]⁻.

En las Figuras 2 y A6.1 se muestra la eficiencia de ionización obtenida para los distintos Carbs estudiados en soluciones independientes de concentración 15 µM usando como solvente agua:MeOH (7:3 v/v). Recientemente, Gallagher y col.³⁷ han estudiado las interacciones moleculares que gobiernan la formación de iones aductos [Carb+Na]⁺ a partir de diferentes mezclas de solventes durante el proceso ESI, utilizando métodos computacionales y

experimentos de ESI-MS. Los autores llegaron a la conclusión de que las mezclas de solventes con un 25% o más de agua en metanol son las mejores para los experimentos de ESI-MS. Los espectros de masa se obtuvieron en el modo negativo de análisis en un espectrómetro de masa ESI-SQ-MS como se detalla en la sección 6.2.5. En estas figuras se muestran tanto la intensidad absoluta de la especie $[\text{Carb-H}]^-$, como la intensidad relativa de este ion con respecto a un estándar externo ($[\text{Carb-H}]^-/[\text{SA-H}]^-$). Los valores de intensidad relativa se obtuvieron utilizando soluciones independientes de ZSA o ESA 5 μM (agua:MeOH 7:3 v/v) como estándares externos para permitir la comparación entre experimentos realizados en distintos días. En estos experimentos se observó la misma tendencia al comparar la respuesta de la especie $[\text{Carb-H}]^-$ (Figura A6.1b) con la intensidad relativa $[\text{Carb-H}]^-/[\text{SA-H}]^-$ (Figuras 2 y A6.1a) para cada uno de los Carbs seleccionados.

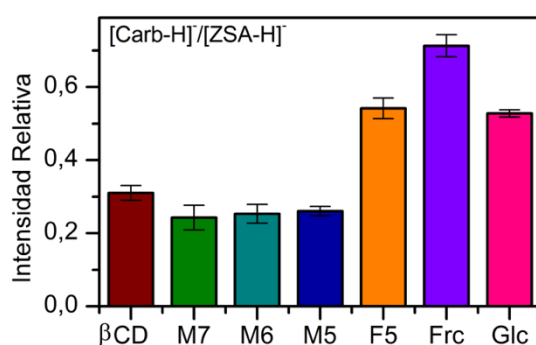


Figura 2. Intensidad relativa de la señal $[\text{Carb-H}]^-$ respecto a la del ion $[\text{ZSA-H}]^-$ ($[\text{Carb-H}]^-/[\text{ZSA-H}]^-$) para cada Carb estudiado. Carb: 15 mM y ZSA: 5 mM en agua:MeOH (7:3 v/v). El ZSA se utilizó como calibrante externo (referencia).

La tendencia observada sugiere que (i) la eficiencia de ionización de los carbohidratos, (El_{Carb}) se reduce para volúmenes moleculares mayores y PM similar, (ii) el fructano se ioniza más eficientemente que la maltosa ($\text{El}_{\text{Frc}} > \text{El}_{\text{Glc}}$; $\text{El}_{\text{F5}} > \text{El}_{\text{M5}}$), mientras que (iii) una maltosa cíclica se ioniza más eficientemente que su equivalente lineal ($\text{El}_{\beta\text{CD}} > \text{El}_{\text{M7}}$).

Se ha demostrado que la eficiencia de ionización en ESI de los glicósidos disminuye a medida que aumenta la masa del glicano³⁸, pero hasta la fecha no se dispone de información clara o sistemática para los carbohidratos simples. Los resultados obtenidos en este capítulo, resumidos en las Figuras 2 y A6.1, muestran que, como tendencia general, la eficiencia de ionización en ESI disminuye a medida que aumenta el volumen del carbohidrato, calculado a partir de su geometría optimizada (Tabla A6.2). En el caso de los pares Frc/Glc, F5/M5 y βCD /M7, se obtuvieron diferentes comportamientos en relación a su EI y pueden interpretarse en términos de la distribución de probabilidad y energía del HOMO calculado, así como de la diferencia de energía entre el orbital molecular más bajo desocupado (LUMO) y el HOMO, (Δ) (Tabla A6.2). En el caso de los carbohidratos neutros con un PM similar (Esquemas A6.3(B), A6.4

y A6.5), cuanto mayor es la estabilidad del HOMO y el valor de Δ , mayor es la EI observada (Tabla A6.2 y Figura 2). Además, cuanto menor es el volumen, mayor es la EI obtenida, excepto para el par Frc/Glc (Tabla A6.2 y Figura 2).

6.3.3 Afinidades de unión en complejos no covalentes [Ácido+Carb]

Los complejos unidos por interacciones no covalente están compuestos por moléculas denominadas huésped y anfitrión, en nuestro caso Ácido y Carb, que interactúan sin "compartir" electrones en la forma de un enlace químico covalente canónico. La constante de disociación, K_d , puede utilizarse para cuantificar la tendencia de un complejo no covalente (por ejemplo, [Ácido+Carb]) a disociarse en sus componentes por separado, con $K_d = 1/K_a = [\text{Ácido}] \times [\text{Carb}] / [\text{Ácido+Carb}]$, siendo K_a la constante de asociación o de afinidad.

Las técnicas de ionización suaves, en particular la técnica por ESI, han tenido un enorme impacto en el análisis por EM de los complejos no covalentes^{10,39}. La técnica ESI permite, bajo condiciones apropiadas, el análisis de las interacciones moleculares entre huésped-anfitrión en fase gaseosa^{39,40}, conservando aproximadamente la forma tridimensional preexistente en solución^{10,39,40}. En base a esta hipótesis, se pueden racionalizar muchas características de los complejos no covalentes, entre ellos la fuerza de unión se puede estimar a través de la EM de ionización suave y los análisis de tipo MS/MS^{41,42}.

Para investigar la capacidad de los ácidos ZSA y ESA en la formación de complejos no covalentes, se seleccionaron siete Carbs neutros. En los espectros de masa ESI de estas mezclas en el modo iónico de análisis positivo se observó que la mayoría de los complejos detectados se debían a la asociación de al menos dos moléculas de ácido, junto con un número variable de moléculas de Carb, y de los iones H^+ , Na^+ y/o K^+ $[\text{Ácido}_n + \text{Carb}_m + H_x + Na_y + K_z]^p+$. En ningún caso se detectaron las especies simples ácido+Carb 1:1, asociadas a un protón o a un sodio mostrando carga única. Sin embargo, el análisis de las mismas soluciones en el modo iónico negativo permitió detectar el complejo $[\text{Ácido+Carb-H}]^-$ con simple carga, con una buena relación señal/ruido. En el caso del Carb M7 los valores de S/R obtenidos fueron aproximadamente 380 y 222 para $[\text{ZSA+M7-H}]^-$ y $[\text{ESA+M7-H}]^-$ respectivamente. En el caso de los complejos formados con otros Carbs, se obtuvieron valores de S/R incluso mayores a los obtenidos con M7. Si bien, fueron detectadas las señales correspondientes a clústeres con solvente, la intensidad de estas se redujo significativamente, o no se detectaron utilizando la mezcla de agua/MeOH (7:3 v/v). Teniendo en cuenta que los solventes orgánicos, como el metanol, el acetonitrilo y el isopropanol, que se suelen utilizar en ESI-MS, destruyen las interacciones no covalentes¹⁰, se evitó el uso de un gran porcentaje de metanol en la mezcla. Por lo tanto, los experimentos se

realizaron utilizando soluciones de agua/MeOH (7:3 v/v), y el espectrómetro de masa se operó en el modo iónico de análisis negativo.

La formación de los complejos $[\text{Ácido}+\text{Carb}-\text{H}]^-$ y su eficiencia de ionización por ESI se evaluaron mediante experimentos de titulación clásicos¹⁰, en donde se fija la concentración del ácido en 5 μM y se varía la concentración del Carb desde 2 hasta 20 μM en soluciones independientes, como se detalla en la sección experimental 6.2.4. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para la maltoheptaosa (M7). En esta figura se grafica la intensidad absoluta de los iones correspondientes a $[\text{Ácido}+\text{Carb}-\text{H}]^-$, $[\text{Carb}-\text{H}]^-$ y $[\text{Ácido}-\text{H}]^-$ (Figura 3a, b y c respectivamente) para diferentes concentraciones de Carb. Como se observa en la figura, la intensidad de los iones desprotonados de los complejos no covalentes sigue la tendencia: $[\text{ZSA}+\text{M7}-\text{H}]^- > [\text{ESA}+\text{M7}-\text{H}]^- > [\text{ESA-}d6+\text{M7}-\text{H}]^-$ para cada relación molar ácido:Carb evaluada. En la Figura 4 se muestra la relación de intensidades obtenida para los complejos no covalentes entre los distintos ácidos y el Carb M7. Los valores obtenidos entre los complejos $[\text{ZSA}+\text{M7}-\text{H}]^- / [\text{ESA}+\text{M7}-\text{H}]^-$ y $[\text{ZSA}+\text{M7}+\text{H}]^- / [\text{ESA-}d6+\text{M7}-\text{H}]^-$ oscilan en el rango de 1,7-2,2 y 3-4,5, respectivamente, en todas las relaciones molares ácido:Carb estudiadas. En la Figura 3c, la tendencia observada en la intensidad de los iones de los ácidos es $[\text{ESA}-\text{H}]^- > [\text{ZSA}-\text{H}]^- > [\text{ESA-}d6-\text{H}]^-$. Es importante señalar que, aunque la ZSA y la ESA mostraron un EI similar (Figura 1), los resultados de la Figura 3c, sugieren que la ZSA participa preferentemente en la formación del complejo no covalente $[\text{ZSA}+\text{M7}]$, explicando así la menor intensidad de la señal correspondiente al ion molecular desprotonado del ZSA en comparación con la del ESA en las mezclas para todas las concentraciones de M7 evaluadas. Estos resultados concuerdan con la tendencia observada en la Figura 3b para la intensidad del ion $[\text{M7}-\text{H}]^-$ en cada una de las mezclas. En este caso la intensidad de la señal detectada fue menor para las mezclas ZSA+M7 que para las mezclas ESA+M7, lo que sugiere que M7 participa más eficientemente en la formación de complejos no covalentes con isómero Z.

Por su parte, el ácido marcado isotópicamente, ESA-*d6*, mostró la EI más baja para todas las relaciones molares estudiadas (Figura 3b), lo que sugiere mecanismos adicionales de estabilización en solución debido a las interacciones ESA-*d6*-agua-metanol, lo que determina una menor volatilización³⁹. En este sentido, la formación de un puente de deuterio, más estable en comparación con un puente de hidrógeno (D---O-solvente, siendo el solvente la mezcla agua:MeOH) contribuye a explicar a nivel molecular estos resultados⁴³.

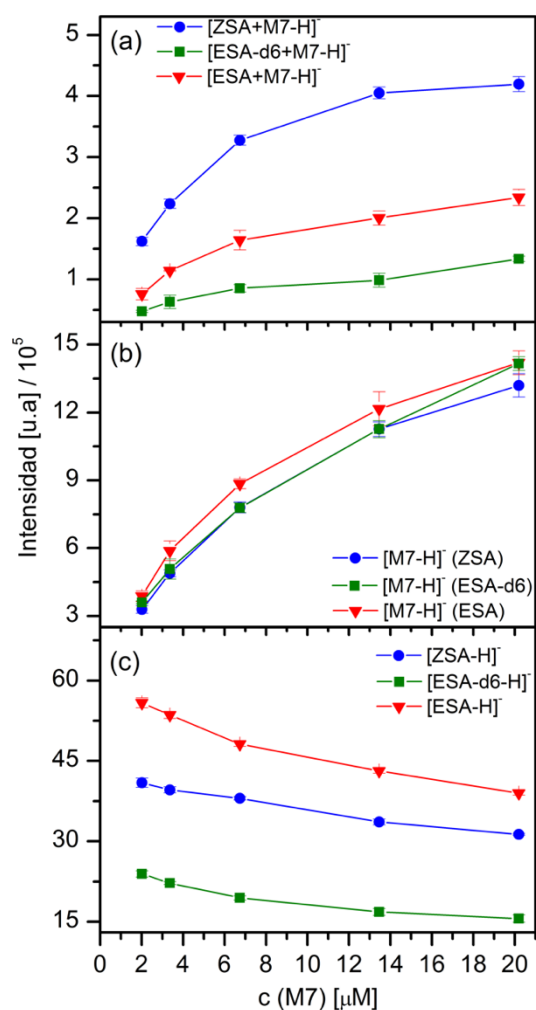


Figura 3. Intensidad absoluta de las especies iónicas (a) $[\text{Ácido}+\text{M7-H}]^-$, (b) $[\text{M7-H}]^-$ y (c) $[\text{Ácido-H}]^-$ detectadas en los experimentos de titulación clásica de los distintos ácidos (Ácido: (●) ZSA, (▼) ESA y (■) ESA-d6) con un carbohidrato (Carb: M7). Ácido, 5 μM ; Carb (M7), de 2 a 20 μM . Solvente: agua:MeOH 7:3 v/v.

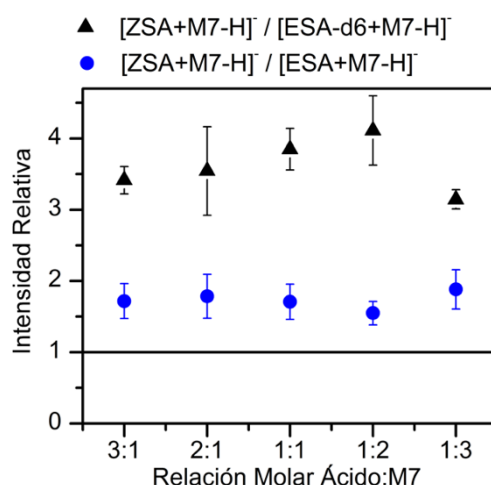


Figura 4. Intensidad de la señal $[\text{ZSA}+\text{M7-H}]^-$ relativa a la del ion $[\text{ESA}+\text{M7-H}]^-$, ((●), $([\text{ZSA}+\text{M7-H}]^- / [\text{ESA}+\text{M7-H}]^-)$), y con respecto al ion $[\text{ESA-d6}+\text{M7-H}]^-$ ((▲), $([\text{ZSA}+\text{M7-H}]^- / [\text{ESA-d6}+\text{M7-H}]^-)$), para diferentes relaciones molares Ácido:Carb. Ácido: 5 μM . Solvente: agua:MeOH 7:3 v/v.

A modo de ejemplo, en la Figura 5 se muestran los espectros de masa ESI-QToF para tres soluciones independientes de M7 con ZSA, ESA y ESA-d6 en una relación molar ácido:M7 1:3, para una concentración de ácido de 5 μ M en agua:metanol 7:3 v/v. En esta figura se observa claramente la formación de los complejos no covalentes con una buena relación S/R, junto a los iones moleculares desprotonados de los ácidos y el Carb.

Al igual que los resultados descriptos anteriormente para el Carb M7, se obtuvieron resultados similares con las maltosas β CD, M6 y M5, el fructano F5 y los monosacáridos Glc y Frc. En todos los casos, la relación de intensidades entre los complejos $[ZSA+Carb-H]^-$ / $[ESA+Carb-H]^-$ fue superior a 1 (Figura A6.2), lo que sugiere que la relación entre las constantes de afinidad de los complejos no covalentes con ZSA y ESA es mayor a uno ($K_{a[ZSA+Carb]}/K_{a[ESA+Carb]} > 1$). En la Figura A6.2a se muestra la reproducibilidad de los resultados inter día para M7. En la Figura 6 se recopilan los valores obtenidos para la relación de intensidades entre los complejos con ZSA y ESA para cada Carb estudiado con la relación molar 1:3 ácido:Carb.

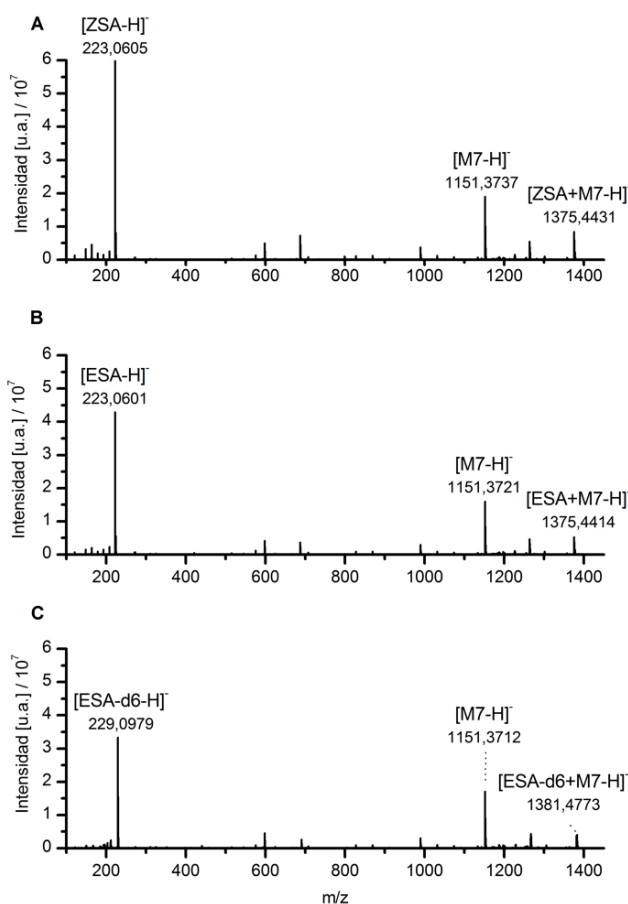


Figura 5. Espectros de masa ESI obtenidos a partir de las mezclas Ácido + Carb. Carb: M7; Ácido: (A) ZSA, (B) ESA y (C) ESA-d6. Relación molar Ácido:Carb 1:3; Ácido: 5 μ M. Solvente, agua:MeOH 7:3 v/v.

En general, la formación del complejo [ZSA+Carb] está más favorecida para los Carbs con mayor PM, y la EI en ESI de los iones [Acid+Carb-H]⁻ sigue esa misma tendencia. Además, para Frc, F5, y βCD, la relación fue ligeramente menor que para Glc, M5, y M7, siendo esta tendencia opuesta a la observada en el EI por ESI de estos carbohidratos, resumida en la Figura 2. Cabe señalar que se realizaron experimentos de control independientes preparando las soluciones a una concentración fija de Carb de 5 μM y variando la concentración de ácido (2-20 μM). En todos los casos, se observaron resultados y tendencias similares a los aquí descriptos.

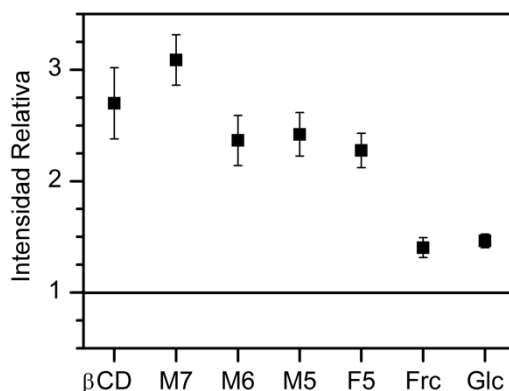


Figura 6. Intensidad de la señal [ZSA+Carb-H]⁻ relativa al ion [ESA+Carb-H]⁻, ([ZSA+Carb-H]⁻/[ESA+Carb-H]⁻), para los diferentes carbohidratos estudiados. Relación molar Ácido:Carb 1:3; Ácido: 5 μM. Solvente: agua:MeOH 7:3 v/v.

6.3.4 Comparación cualitativa de las constantes de unión: titulación competitiva

Con el objetivo de evaluar el efecto competitivo de ambos isómeros, en la interacción en los complejos no covalentes entre los carbohidratos y los ácidos, se preparó una serie de mezclas con una relación molar constante 1:3 ácido:Carb, con ácido = ZSA + ESA. En estos casos se mantuvo la concentración total de ácido en 5 μM, variando la relación porcentual entre los isómeros ZSA y ESA en la mezcla, como se detalla en la sección experimental 6.2.4. Estos experimentos se realizaron por infusión directa de cada mezcla en un equipo ESI-SQ-MS, comenzando con un 100% de ESA y terminando con un 100% de ZSA.

En la Figura 7 se muestran los perfiles de intensidad obtenidos en los experimentos de titulación para el ion complejo [Ácido+Carb-H]⁻ en función de la relación porcentual ZSA-ESA en la mezcla, para los Carbs: βCD, M7, M6, M5 y F5. En esta figura se observa que la intensidad del ion aducto [Ácido+Carb-H]⁻ aumenta con el porcentaje de ZSA en la mezcla, esto sugiere que el complejo [Ácido+Carb] se forma preferentemente con el isómero ZSA en comparación con el ESA cuando ambos ligandos están presentes en la solución, observándose como un aumento en la intensidad de la señal del ion complejo en el espectro de masa. Estos resultados concuerdan

con los descriptos en la sección anterior en los experimentos de titulación clásica, como se ilustra para el Carb M7 en las Figuras 3 y 4 para soluciones independientes (M7+ZSA o M7+ESA). Se llevaron a cabo experimentos de control independientes iniciando el análisis de las titulaciones con soluciones con un 100% de ESA o un 100% de ZSA, en ambos casos los resultados obtenidos en las titulaciones fueron similares, no mostrando diferencias significativas. Esto confirma la ausencia de un efecto de arrastre en el sistema.

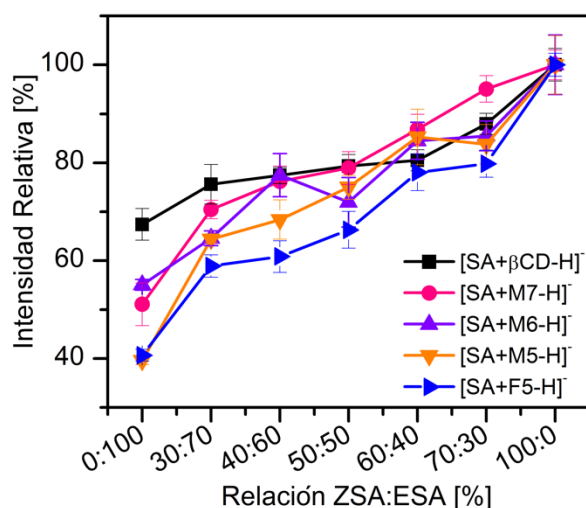


Figura 7. Curvas de titulación competitiva para los carbohidratos: βCD (■), M7 (●), M6 (▲), M5 (▼) y F5 (►). Intensidad relativa del ion [Ácido+Carb-H]⁻ en relación a la intensidad del ion [ZSA+Carb-H]⁻ ($[\text{Ácido+Carb-H}^-]/[\text{ZSA+Carb-H}^-]$) en función de la relación porcentual ZSA:ESA en la mezcla. La relación molar Ácido:Carb 1:3 se mantienen constante. Ácido: ZSA+ESA variando la relación ZSA:ESA de 0:100% a 100:0%.

Además, se realizaron experimentos de titulación competitiva adicionales, modificando la relación molar Ácido:Carb a 1:1 y 1:2. En la Figura A6.3 se muestran estos resultados para el Carb M6 en comparación con los resultados obtenidos con una relación molar Ácido:Carb 1:3. En todos los casos la tendencia observada es similar, no observándose diferencias significativas.

6.3.5 Estabilidad en fase gaseosa de los complejos no covalentes [Ácido+Carb]

Para obtener información adicional sobre la estabilidad de los complejos no covalentes estudiados, se llevaron a cabo experimentos MS/MS usando una CID a diferentes energías de colisión, variando el voltaje de la misma desde 6 V hasta 30 V. Para evaluar la estabilidad en fase gaseosa de los complejos formados con ligandos con diferentes masas, la energía de colisión en el marco de referencia del laboratorio (E_{lab}), definida por el voltaje aplicado en la CID, puede convertirse a la energía del centro de masa ($E(\text{CM})$), definida como la máxima energía transferida durante una sola colisión, mediante la igualdad $E(\text{CM}) = E_{\text{lab}} m/(M + m)$, donde m y

M son las masas del gas neutro de colisión (Ar en este estudio) y del ion precursor, respectivamente^{40,44}. Dado que los ácidos ZSA y ESA son isómeros, el valor de E_{lab50} , la energía de colisión en el marco de referencia del laboratorio cuando el 50% del complejo es disociado, se utilizó directamente en el presente estudio para determinar la estabilidad de estos complejos.

En las Figuras A6.4, A6.5 y A6.6 se muestran los espectros de masa obtenidos por fragmentación de los iones precursores: $[ZSA+Carb-H]^-$, $[ESA+Carb-H]^-$ y $[ESA-d6+Carb-H]^-$ a 8, 15 y 30 V para M7, M5 y F5, respectivamente. En estos espectros se observa como ion producto la aparición del pseudo ion molecular del carbohidrato mayoritariamente, $[Carb-H]^-$. En las Figuras A6.7 y A6.8 se muestran las intensidades relativas de las diferentes especies iónicas detectadas en los experimentos MS/MS realizados a diferentes voltajes en la CID, con M7, M5 y F5. En el caso de las maltosas M7 y M5 se observó un máximo para la señal $[Carb-H]^-$ a 20 V y 15 V en la CID, respectivamente, antes de fragmentarse completamente siguiendo el típico patrón de fragmentación de hidratos de carbono del tipo polihexosas (pérdida repetitiva de la unidad estructural de m/z 162, debidas a la ruptura de uniones glicosídicas y otro tipo de fragmentaciones típicas de azúcares⁴⁵). En el caso de la fructosa F5, la formación del ion producto $[Carb-H]^-$ alcanza un máximo a los 20 V y se mantiene constante ya que en estas condiciones experimentales no se fragmenta. Se utilizaron funciones sigmoideas de Boltzmann para ajustar los datos correspondientes al cambio de intensidad relativa de las especies iónicas $[Ácido+Carb-H]^-$ en función del voltaje aplicado en la celda, para obtener así los voltajes asociados a una caída del 50% en la intensidad de sus señales, como se muestra en la Figura 8 para los Carbs M7, M5 y F5 y en la Figura A6.9 para los monosacáridos Glc y Frc.

En la Figura 8a se observa que el 50% del ion aducto $[ESA+M7-H]^-$ se fragmentó a 16 V, mientras que casi el 70% del ion complejo $[ZSA+M7-H]^-$ permaneció intacto a este mismo valor de voltaje aplicado. La misma tendencia se observa para M5 y F5 (Figura 8b y c). Estos resultados muestran que los complejos formados por M7, M5 o F5 y el ácido ZSA son más estables que los complejos formados con el isómero E, en base a la mayor estabilidad que presenta los iones complejos con ZSA frente a la fragmentación. Sorprendentemente, la presencia de deuterio en la estructura del ESA marcado isotópicamente no pareció afectar a la estabilidad del complejo no covalente con M7, M5 o F5 cuando se utilizó ESA-d6 como ligando (Figura 8). En la Tabla 1 se muestran los valores de voltajes obtenidos para E_{lab50} como medida de la estabilidad en fase gaseosa de los complejos iónicos con ZSA, ESA y ESA-d6. Como se observa en la tabla, los valores de E_{lab50} para los iones complejos con ESA y ESA-d6 son similares, por lo que se asume que la fuerza de unión de los complejos $[ESA+Carb]$ y $[ESA-d6+Carb]$ es similar para cada uno de los diferentes oligosacáridos estudiados. Una posible explicación de

este resultado a nivel molecular se basa en que la localización del punto de interacción entre el huésped y el anfitrión, en estos complejos se da a través del grupo funcional carboxílico, que no se ve afectado por la deuteración de los metoxilos en las posiciones 3- y 5- del anillo aromático (Esquema 1c y d).

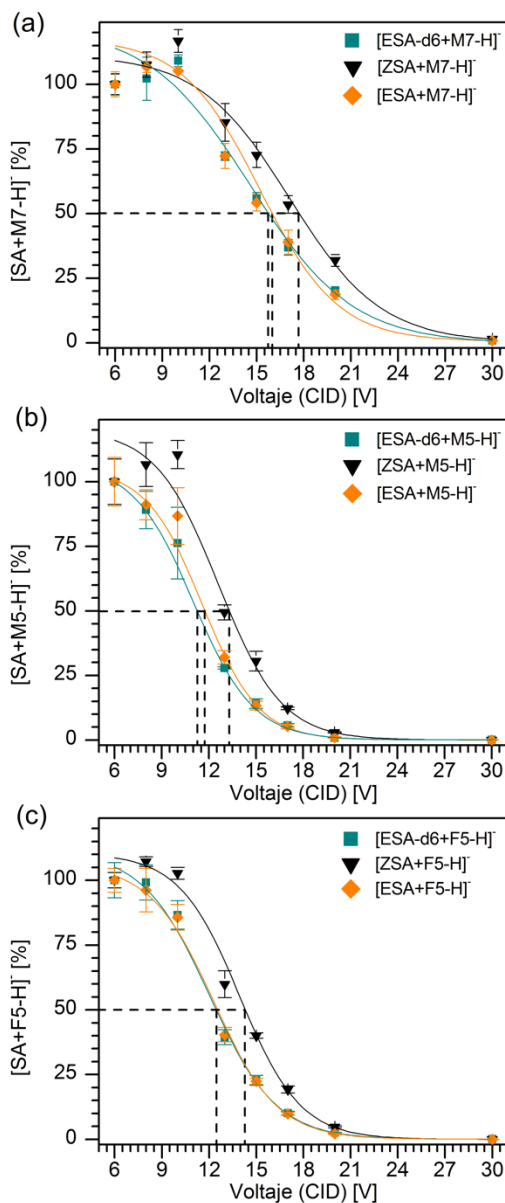


Figura 8. Experimentos MS/MS (CID). Intensidad de las especies [Ácido+Carb-H]⁻ detectadas a diferentes voltajes en relación al valor de intensidad de la señal obtenido al voltaje más bajo aplicado (6 V). Se utilizaron funciones sigmoiales de Boltzmann para ajustar los datos correspondientes. Carbohidratos: (a) M7, (b) M5 y (c) F5. Iones precursores: [ESA-d6+Carb-H]⁻ (■), [ESA+Carb-H]⁻ (◆) y [ZSA+Carb-H]⁻ (▼). Relación molar Ácido:Carb 1:3. Solvente, agua:MeOH (7:3 v/v). Los valores de voltaje asociados a E_{lab50} se indican con líneas punteadas.

Tabla 1. Voltajes asociados a E_{Lab50}^a para los complejos [Ácido+Carb]

| Carbohidrato [Carb] | [ESA+Carb-H] ⁻ [V] | [ESA-d6+Carb-H] ⁻ [V] | [ZSA+Carb-H] ⁻ [V] |
|------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| M7 | 16,0 ± 0,1 | 15,7 ± 0,1 | 17,7 ± 0,1 |
| M5 | 11,7 ± 0,1 | 11,2 ± 0,1 | 13,2 ± 0,1 |
| F5 | 12,5 ± 0,1 | 12,5 ± 0,1 | 14,3 ± 0,1 |
| Glc | 7,3 ± 0,1 | 7,3 ± 0,1 | 7,3 ± 0,1 |
| Frc | 7,6 ± 0,1 | 7,6 ± 0,1 | 7,6 ± 0,1 |

^a Energía de colisión en el marco de referencia del laboratorio cuando el 50% del complejo [Ácido+Carb] es disociado, como medida de la estabilidad en fase gaseosa de los complejos.

En el caso de los monosacáridos Glc y Frc se observó un comportamiento diferente al de los polisacáridos, en cuanto a la fragmentación de los complejos no covalentes. En estos casos, los iones complejos [ZSA+Carb-H]⁻ y [ESA+Carb-H]⁻ mostraron una tendencia similar del grado de fragmentación en función del aumento de los valores de voltaje aplicado (Figuras A6.9 y A6.10). Si bien, la relación de intensidades entre los iones complejos [ZSA+Carb-H]⁻/[ESA+Carb-H]⁻ es mayor a 1, tanto para Glc como para Frc (Figura A6.2c y f), no se observan diferencias para la estabilidad en fase gaseosa de los correspondientes complejos no covalentes (Figuras A6.9). Como se muestra en la Tabla 1, los complejos de estos monosacáridos con ZSA, ESA y ESA-d6 presentan valores E_{Lab50} similares. Si bien estos monosacáridos presentan diferentes E_{Lab50} individuales en soluciones de agua:MetOH (Figuras 2 y A6.2), sus respectivas eficiencias de formación de complejos no covalentes (Figuras 6 y A6.1) y la estabilidad de estos en fase gaseosa son similares.

Como era de esperar, la disociación de los complejos no covalentes (descomposición, fragmentación) aumentó en todos los casos a medida que aumentaba la energía en la CID. En todos los casos, con excepción de los monosacáridos, el ion producto preferente detectado fue el pseudo ion molecular del carbohidrato, [Carb-H]⁻, siendo su intensidad mucho mayor (tres órdenes de magnitud) que la observada para el ion [Ácido-H]⁻ (Figuras A6.4 a A6.8). Por el contrario, los monosacáridos Glc y Frc mostraron un comportamiento opuesto (Figura A6.10), siendo mayor la intensidad para el ion producto [Ácido-H]⁻ que para la especie [Carb-H]⁻. Posiblemente, a nivel molecular esta diferencia se basa en el mayor número de grupos -OH presentes en los polisacáridos M7, M5 y F5 que en los monosacáridos Glc y Frc para la localización y estabilización de la carga negativa, en comparación con la estabilización de la carga negativa proporcionada por el grupo carboxílico de los ácidos. Además, el ion [Carb-H]⁻ puede ganar estabilidad en base al mayor número de modos vibro-rotacionales de los penta- y heptasacáridos, que pueden convertir eficientemente la energía cinética relativa, reduciendo la descomposición de la especie [Carb-H]⁻ por fragmentación. En el caso de los monosacáridos, el

número de grupos hidroxilo se reduce drásticamente, disminuyendo así su capacidad de estabilizar la carga y la posibilidad de liberar la energía cinética. En estos casos, la conocida mayor estabilidad del grupo carboxilato cargado negativamente puede explicar la tendencia observada en la Figura A6.10.

6.3.6 Modelado molecular: estereoquímica, HOMO y propiedades QSAR

Mediante modelado molecular, se investigaron la geometría y la estereoquímica de las especies neutras ZSA y ESA, así como de los iones $[ZSA-H]^-$ y $[ESA-H]^-$ (Tabla A6.1). La geometría optimizada para los isómeros E mostró una molécula preferente plana y rígida (para la estructura con mayor grado de conjugación y por lo tanto más estable), como se muestra en el Esquema 1a, c, e y g, donde los sustituyentes metoxilos e hidroxilo en el anillo aromático pueden definir diferentes rotámeros con un volumen ligeramente diferente (Tabla A6.1 y Esquema A6.2). En cambio, el análisis del isómero Z mostró que el grupo carboxílico rota y se aproxima a los sustituyentes polares metoxilo (CH_3O-) e hidroxilo ($HO-$) situados en C-3 y C-4 del anillo aromático, respectivamente, de la estructura del ácido cinámico de forma sinclinal superpuesta. Esto crea una cavidad limitada por los grupos funcionales sustituyentes polares en C-3, C-4 y C-5, y el grupo carboxílico situado en C- α del doble enlace (es decir, ZSA y $[ZSA+Glc]$ en el Esquema 1 b, d, f y h). Esta cavidad proporciona la distancia necesaria entre los grupos funcionales del ligando, el ácido (carboxilato y metoxilo), y una fracción de nuestro huésped, la unidad monocarbohidrato (ya sea un monosacárido, oligosacárido o polisacárido), para que se dé una interacción estabilizante del tipo puentes de hidrógenos (Esquemas 1d y A6.6). La distorsión espacial mostrada por la especie iónica $[ZSA-H]^-$ estaría particularmente estabilizada por la especial deslocalización de la carga entre el grupo carboxilato y la fracción fenilo en el HOMO del ion $[ZSA-H]^-$, como se muestra en el Esquema 1h.

También se optimizó la geometría de las especies Carb y $[Carb-H]^-$. Para las especies iónicas, se llevó a cabo la desprotonación selectiva de los grupos hidroxilo situados en diferentes posiciones y se compararon los datos obtenidos. Algunos ejemplos de las correspondientes estructuras moleculares optimizadas se muestran en los Esquemas A6.3 a A6.5 y A6.7 y los datos calculados se listan en la Tabla A6.2. En todos los casos, se calcularon y compararon los parámetros QSAR (Tablas A6.1 y A6.2). Estos parámetros son descriptores moleculares que codifican ciertas características y propiedades estructurales que ayudan a correlacionar y cuantificar la estructura electrónica de los compuestos, que rigen las interacciones entre molécula (receptor/ligando)-molécula (huésped).

6.4 CONCLUSIONES

Los resultados de los experimentos ID-ESI-MS y ID-ESI-MS/MS realizados en el modo iónico de análisis negativo y el modelado molecular, proporcionaron información valiosa sobre la estabilidad y estructura de los complejos no covalentes formados por los isómeros geométricos ZSA y ESA con carbohidratos neutros de bajo peso molecular, en fase gaseosa. Si bien los resultados se extrapolan a la fase líquida (SA y Carb en solución) y a la fase sólida (muestra sólida SA+Carb para MALDI-MS) cosa que parece demasiado audaz, dada las características estructurales tanto de los SA como de los Carb no disponíamos de técnicas analíticas alternativas que permitieran hacer un estudio comparativo de los sistemas ESA+Carb y ZSA+Carb en cualquiera de estos estados de agregación. Por lo tanto debe comprenderse que el presente estudio confirma la propuesta de que el ZSA forma complejos moleculares 1:1 con un mayor número de puentes de H e interacciones molécula-molécula que el ESA razón por la cual el sistema resultante es más estable a nivel molecular, independientemente de su estado de agregación.

Así, el isómero *trans*, ESA, con mayor volumen calculado y menor acidez que el isómero *cis*, ZSA, exhibió una eficiencia de ionización ESI experimental similar a este último, sugiriendo que existe otro tipo de factor adicional compensatorio que estaría operando en ESI en soluciones de agua:MeOH 7:3 v/v que hace que ambos isómeros presenten la misma eficiencia de ionización. A pesar de este comportamiento, los experimentos de titulaciones clásicas, realizadas en soluciones paralelas del carbohidrato con cada ligando mostraron que la intensidad de los iones complejos seguía la tendencia $[ZSA+Carb-H]^- > [ESA+Carb-H]^-$ para cada relación molar Ácido:Carb estudiada. En todos los casos la relación de intensidad obtenida entre los complejos $[ZSA+Carb-H]^-/[ESA+Carb-H]^-$ varía entre 1,3 y 2,9. Esto indica que los complejos [SA+Carb] se forman preferencialmente con el ácido ZSA en comparación con el isómero *E*. Es por esto que en las soluciones mezcla se observa una menor intensidad de la señal $[ZSA-H]^-$ en comparación con la especie $[ESA-H]^-$ para todos los valores de concentración de Carb evaluados. Estos resultados concuerdan con los observados en los experimentos de titulación competitiva, donde el complejo [Ácido+Carb] se forma preferentemente con ZSA que con ESA, incluso cuando ambos ligandos están presentes en la solución. Esto condujo a una mayor cantidad de iones complejos detectados en las titulaciones competitivas cuando aumentaba la concentración relativa del ZSA en la mezcla ZSA:ESA.

Por otro lado, la energía de colisión en el marco de referencia del laboratorio, medida como la energía necesaria para que el ion precursor se descomponga a un 50% (E_{lab50}), fue mayor para el complejo ZSA+Carb. Esto está de acuerdo con que los complejos formados con el isómero

ZSA presentan interacciones no covalentes netas más fuertes y mayor estabilidad que los complejos ESA+Carb, con excepción de los complejos formados con los monosacáridos Glc y Frc que presentaron valores E_{lab50} similares.

En especial, los resultados obtenidos con el ligando deuterado ESA-*d6* mostraron que el cambio de volumen y polaridad de la molécula debido a la presencia de tres enlaces C-D en cada grupo $-CD_3O$ puede afectar drásticamente a las interacciones con el solvente y su localización de la gota policargada^{8,15,16} dando lugar a una eficiencia de ionización por ESI diferente a la del ESA, en particular inferior. Esta menor eficiencia de ionización del ácido marcado isotópicamente dificultó su utilización en los experimentos de titulación competitiva con el isómero ZSA para evaluar la formación competitiva de los complejos no covalentes. Sin embargo, es un aporte experimental valioso y un llamado de atención a la hora de interpretar resultados por ESI-MS cuando se usan moléculas deuteradas (ej., experimentos para cuantificación).

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la técnica de ionización ESI-MS puede ser una herramienta útil para estudiar la estabilidad de los complejos matriz-analito y teorizar sobre su efecto en estos sistemas mixtos independientemente del estado de agregación. La profundización de los experimentos comparativos entre las técnicas de ID-ESI-MS y MALDI-MS con familias seleccionadas de matriz-analito puede mejorar nuestra comprensión de las interacciones a nivel molecular entre la matriz MALDI y el analito en estudio y poder correlacionar así esta propiedad con la eficiencia de ionización del analito con dicha matriz MALDI. Por supuesto que siempre que sea posible deben complementarse los estudios de estabilidad con otras técnicas analíticas accesibles apropiadas.

6.5 REFERENCIAS

- 1 R. C. Beavist and B. T. Chait, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989, **3**, 432–435.
- 2 R. C. Beavis, T. Chaudhary and B. T. Chait, *Organic Mass Spectrometry*, 1992, **27**, 156–158.
- 3 T. W. Jaskolla, W. D. Lehmann and M. Karas, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 12200–12205.
- 4 T. Porta, C. Grivet, R. Knochenmuss, E. Varesio and G. Hopfgartner, *Journal of Mass Spectrometry*, 2011, **46**, 144–152.

- 5 M. L. Salum, C. J. Robles and R. Erra-Balsells, *Org Lett*, 2010, **12**, 4808–4811.
- 6 M. L. Salum, L. M. Itovich and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, **48**, 1160–1169.
- 7 M. L. Salum, S. L. Giudicessi, T. Schmidt De León, S. A. Camperi and R. Erra-Balsells, *Journal of Mass Spectrometry*, 2017, **52**, 182–186.
- 8 P. Kebarle and U. H. Verkerk, *Mass Spectrom Rev*, 2009, **28**, 898–917.
- 9 L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez and S. Vahidi, *Anal Chem*, 2013, **1**, 2–9.
- 10 E. B. Erba and R. Zenobi, *Annual Reports on the Progress of Chemistry - Section C*, 2011, **107**, 199–228.
- 11 F. Sobott and C. V. Robinson, *Int J Mass Spectrom*, 2004, **236**, 25–32.
- 12 Y. Li, F. Heitz, C. Le Grimmellec and R. B. Cole, *Anal Chem*, 2005, **77**, 1556–1565.
- 13 S. A. Hofstadler and R. H. Griffey, *Chem Rev*, 2001, **101**, 377–390.
- 14 G. Chevreux, N. Potier, A. Van Dorsselaer, A. Bahloul, A. Houdusse, A. Wells and H. L. Sweeney, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, **16**, 1367–1376.
- 15 M. Oss, A. Kruve, K. Herodes and I. Leito, *Anal Chem*, 2010, **82**, 2865–2872.
- 16 M. Dole, R. L. Hines, L. L. Mack, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, *Macromolecules*, 1968, **1**, 96–97.
- 17 J. V. Iribarne and B. A. Thomson, *J Chem Phys*, 1976, **64**, 2287–2294.
- 18 A. Kruve, K. Kaupmees, J. Liigand and I. Leito, *Anal Chem*, 2014, **86**, 4822–4830.
- 19 J. Hermans, S. Ongay, V. Markov and R. Bischoff, *Anal Chem*, 2017, **89**, 9159–9166.
- 20 M. Eto and Y. Oshima, *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 1960, **24**, 473–480.
- 21 K. Yamauchi, S. Yasuda and K. Fukushima, *J Agric Food Chem*, 2002, **50**, 3222–3227.
- 22 K. Yamauchi, S. Yasuda, K. Hamada, Y. Tsutsumi and K. Fukushima, *Planta*, 2003, **216**, 496–501.
- 23 M. L. Salum, T. Schmidt De León and R. Erra-Balsells, *Analytical Methods*, 2015, **7**, 8478–8483.
- 24 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P.

- Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, 2009.
- 25 HyperChem, 2010.
- 26 L. S. Santos, R. Catharino and M. N. Eberlin, *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, **40**, 127–128.
- 27 S. P. Mirza, P. Krishna, S. Prabhakar, M. Vairamani, D. Giblin and M. L. Gross, *Int J Mass Spectrom*, 2003, **230**, 175–183.
- 28 S. Kato, T. T. Dang, S. E. Barlow, C. H. DePuy and V. M. Bierbaum, *Int J Mass Spectrom*, 2000, **195**, 625–638.
- 29 B. D. Nourse and R. Graham Cooks, *Int J Mass Spectrom Ion Process*, 1991, **106**, 249–272.
- 30 D. Wade, *Chem Biol Interact*, 1999, **117**, 191–217.
- 31 M. Matucha, W. Jockisch, P. Verner and G. Anders, *J Chromatogr A*, 1991, **588**, 251–258.
- 32 M. E. Monge, J. J. Pérez, P. Dwivedi, M. Zhou, N. A. McCarty, A. A. Stecenko and F. M. Fernández, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, **27**, 2263–2271.
- 33 Y. Gholipour, R. Erra-Balsells, K. Hiraoka and H. Nonami, *Anal Biochem*, 2013, **433**, 70–78.
- 34 T. Nakashima, H. Wada, S. Morita, R. Erra-Balsells, K. Hiraoka and H. Nonami, *Anal Chem*, 2016, **88**, 3049–3057.
- 35 R. B. Cole and J. Zhu, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999, **13**, 607–611.
- 36 H. Wada, Y. Hatakeyama, T. Nakashima, H. Nonami, R. Erra-Balsells, M. Hakata, K. Nakata, K. Hiraoka, Y. Onda and H. Nakano, *Sci Rep*, 2020, **10**, 1–11.
- 37 E. I. Calixte, O. T. Liyanage, D. T. Gass and E. S. Gallagher, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, **32**, 2738–2745.

- 38 M. J. Kailemia, L. R. Ruhaak, C. B. Lebrilla and I. J. Amster, *Anal Chem*, 2014, **86**, 196–212.
- 39 Y. Cai, M. C. Concha, J. S. Murray and R. B. Cole, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002, **13**, 1360–1369.
- 40 W. Wei, Y. Chu, R. Wang, X. He and C. Ding, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015, **29**, 927–936.
- 41 P. Bayat, D. Gatineau, D. Lesage, S. Marhabaie, A. Martinez and R. B. Cole, *Journal of Mass Spectrometry*, 2019, **54**, 437–448.
- 42 X. Ma, Z. Wei, X. Xiong, Y. Jiang, J. He, S. Zhang, X. Fang and X. Zhang, *Talanta*, 2012, **93**, 252–256.
- 43 O. B. Mosin, D. A. Skladnev, T. A. Egorova and V. I. Shvets, *Bioorganic Chemistry*, 1996, **22**, 861–874.
- 44 D. Gatineau, A. Memboeuf, A. Milet, R. B. Cole, H. Dossmann, Y. Gimbert and D. Lesage, *Int J Mass Spectrom*, 2017, **417**, 69–75.
- 45 A. O. Chizhov, Y. E. Tsvetkov and N. E. Nifantiev, *Molecules*, 2019, **24**, 2226.

Capítulo 7 : Resumen general y conclusiones

A lo largo de este trabajo de tesis se evaluó la eficiencia como matrices (fotosensibilizadores) en espectrometría de masa MALDI de una serie de líquidos iónicos orgánicos, modificando tanto el componente aniónico como catiónico de los mismos. Los LIs estudiados en este trabajo contienen en su estructura moléculas que ya han sido descritas en la literatura como matrices MALDI, probando dos tipo de combinaciones:

(a) Solo uno de los componentes absorbe la radiación del láser, como las matrices estudiadas en el **Capítulo 2** (Líquidos iónicos con aminas alifáticas como matrices en MALDI-MS. Análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular), donde distintas matrices cristalinas (ESA, ZSA, ECHCA, DHB, nHo) se combinan con aminas alifáticas (EAM, EOHAM, TEAM, BAM, BOHAM, TBAM).

(b) Matrices binarias donde ambos componentes absorben la radiación del láser, como las matrices propuestas en el **Capítulo 3** (Líquidos iónicos con norharmano como matrices en MALDI-MS. Análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular), donde las matrices orgánicas clásicas de carácter ácido se combinan con el nHo, una matriz de carácter anfótero.

En este juego de combinaciones entre ácidos y bases de Brønsted se generan productos con distintos grado de ionicidad que dependen únicamente de la fuerza relativa de los ácidos y bases que los componen (ΔpK_a). Entre las matrices propuestas se pueden clasificar como matrices iónicas sólidas (MIs) a temperatura ambiente las matrices de tipo ESA.amina, ZSA.amina, ECHCA.amina, ECHCA.nHo, DHB.amina y DHB.nHo, mientras que las matrices de tipo nHo.amina, ESA.nHo y ZSA.nHo son clasificadas como matrices no iónicas sólidas (MNISs). En estos casos todas las matrices iónicas o binarias resultaron ser sólidas a temperatura ambiente, sugiriendo que el grado de ionicidad de las mismas no es determinante del estado de agregación, pudiendo encontrarse combinaciones con mayor o menor movilidad de la fase condensada.

Para las matrices iónicas, el carácter iónico se evidencia en sus espectros de masa LDI. En el modo de análisis positivo, por ejemplo, se observa una disminución en los iones propios del ácido y la aparición y/o predominancia de los cationes provenientes de las bases, debido a la preexistencia en la fase condensada de las unidades estructurales $[\text{Ácido-H}]^- \cdot [\text{Amina+H}]^+$. En el caso de las matrices no iónicas, ESA.nHo y ZSA.nHo, lo que se observa en el espectro LDI es la aparición de iones correspondientes a las unidades supramoleculares ácido.nHo, debido a que las interacciones no covalentes entre las subunidades pueden sobrevivir al proceso de DI.

En el caso particular del DHB.nHo, si bien puede ser considerado según la clasificación de Kobylis y col.¹ como una matriz iónica, la aparición del ion $[DHB+nHo+H]^+$ en el espectro LDI indicaría que no existe una transferencia total de carga en la fase condensada o que la sal prótica formada está asociada por interacciones no covalentes fuertes como puentes de hidrógeno. Otro caso singular es el de las matrices no iónicas de tipo nHo.amina, donde en el espectro LDI no se observan los iones correspondientes a las unidades supramoleculares posiblemente debido al aumento de la acidez del nHo^{2,3} en el estado electrónico excitado lo que favorecería la transferencia de protón entre las subunidades en fase gaseosa, luego de la absorción por parte del nHo de la radiación láser.

En el caso de las matrices propuestas, el grado de ionicidad de las mismas no es determinante a la hora de evaluar su eficiencia como matriz en el proceso de DI por MALDI. Es por eso que tanto matrices iónicas ESA.amina, ECHCA.amina, ECHCA.nHo como no iónicas nHo.amina presentan un aumento en la eficiencia como matriz, en comparación con la eficiencia del cromóforo que las constituye, considerando que la absorbancia entre las matrices comparadas no cambia significativamente. A diferencia de estos casos, las matrices iónicas ZSA.amina, presentan una disminución en la eficiencia de DI del analito en comparación con el ZSA debido a una disminución en la absorbancia a la longitud de onda de emisión del láser (355 nm).

La mejora generalizada de las matrices ESA.amina, ECHCA.amina, ECHCA.nHo y nHo.amina, probablemente se deba al contacto estrecho entre ambos componentes, cuya interacción generaría una nueva unidad cromofórica con propiedades físico-químicas más apropiadas para el rol de matriz MALDI, independientemente del tipo de interacción. Esta podría ser de carácter iónico para las matrices iónicas $[(\text{Ácido-H})^- \cdot (\text{Amina+H})^+]$ o simplemente la formación de una estructura supramolecular con interacciones no covalentes fuertes (puentes de hidrógeno) como en las matrices no iónicas.

Esta idea se ve reforzada por el comportamiento diferenciado que presentan los LIs de tipo ácido.TBAM. Si bien las observaciones descriptas en este trabajo de tesis indican que no existe una relación entre el cambio en la eficiencia de las distintas matrices con el cambio en la naturaleza de la amina que se utiliza como fuente del contraión, en las matrices ECHCA.TBAM y DHB.TBAM se observa un comportamiento generalizado de disminución en la producción de iones del analito, contrario a lo observado con el uso de aminas menos impedidas estéricamente. Esta observación podría deberse a que estas matrices presentan un empaquetamiento más compacto con el grupo carboxílico impedido dado los sustituyentes adyacentes (grupo α -ciano en el ECHCA y el grupo *orto* hidroxilo en el DHB) determinando que el

contacto estrecho entre el cromóforo y la TBAM se vea impedido, dado su mayor volumen molecular en comparación con las otras aminas. Este impedimento en el contacto entre ambas subunidades, sería menor en estructuras que presenten un empaquetamiento más expandido como en el caso de las matrices ESA.TBAM, ZSA.TBAM y nHo.TBAM, donde no se observa un cambio significativo de la eficiencia en la DI entre estas matrices en comparación con los LIs con las otras aminas estudiadas. En el caso de los LIs derivados del nHo, el empaquetamiento de tipo helicoidal que presenta, podría generar la cavidad necesaria para el contacto estrecho con la TBAM produciendo una unidad supramolecular que funcione eficientemente como matriz al igual que lo observado con las otras aminas. Este mismo análisis puede ser extendido a la matriz iónica ECHCA.Ho en comparación con la matriz ECHCA.nHo. Si bien dada la fuerza relativa como ácido y base de las subunidades, el ECHCA.Ho puede ser descrito como una sal prótica mayoritariamente ionizada, el sustituyente metilo en el C-1 de la unidad piridínica del Ho generaría un impedimento estérico tal que los iones generados son independientes entre sí.

El comportamiento disruptivo de los LIs derivados del DHB (DHB.amina) para el análisis de distintos hidratos de carbono, agrega a la discusión sobre la eficiencia en el proceso de DI por MALDI el tipo de interacciones entre la matriz y el analito a la hora de evaluar su eficiencia como matriz. De esto deriva el conocimiento empírico de que las matrices que funcionan eficientemente para un dado compuesto pueden no serlo para otro analito⁴. En el **Capítulo 6** (Estudio de complejos moleculares por ESI-MS entre las matrices MALDI ESA y ZSA con carbohidratos) se aborda esta problemática, al analizar las interacciones específicas y la fuerza relativa de las mismas para las matrices orgánicas ESA y ZSA con distintos hidratos de carbono utilizando la técnica ESI-MS. Estos estudios marcan el inicio de una nueva aproximación para la comprensión del funcionamiento de estas matrices, que nos permitió caracterizar la fuerza relativa de las interacciones entre dos matrices isoméricas y distintos azúcares. De este estudio surge que el isómero ZSA genera mayor cantidad de interacciones y más fuertes con los hidratos de carbono que el isómero ESA. Si bien la relación entre esta propiedad y su eficiencia como matriz requiere mayor investigación, consideramos que es un factor relevante a evaluar en el desarrollo de nuevas matrices.

Por su parte, y a diferencia del comportamiento observado para la combinación ECHCA.nHo, las matrices binarias de carácter no iónicas, ESA.nHo y ZSA.nHo, no mostraron un efecto sinérgico en la eficiencia en el proceso de DI en comparación con la suma de las eficiencias de sus componentes por separado. El débil carácter iónico de estas matrices binarias y el impedimento estérico de las mismas puede derivar en una estructura interna del sólido donde mayoritariamente la mezcla ácido base se encuentra sin ionizar y las interacciones por puente

de hidrógeno se ven impedidas por el volumen molecular de ambas subunidades. Esto genera una mezcla de matrices donde ambos cromóforos se comportan como si estuviesen aislados, aportando individualmente a la eficiencia de DI de un dado analito.

Por otro lado, los estudios desarrollados en este trabajo permitieron demostrar claramente que no existe una correlación entre la homogeneidad óptica de la muestra con el mapeo químico superficial de la misma (homogeneidad química). En la mayoría de los LIs estudiados, se observa un aumento en la homogeneidad óptica de la muestra en comparación con la imagen obtenida con sus constituyentes por separado. Sin embargo, este aumento de la homogeneidad óptica no se ve reflejado en una respuesta homogénea en cuanto a la eficiencia en la producción de iones del analito en toda la superficie de la muestra, observándose zonas de mayor producción de iones (*hot spots*). Estas observaciones rompen con la idea generalizada de que los LIs orgánicos generan muestras analito-matriz de mayor homogeneidad que las matrices orgánicas clásicas que los componen, basándose únicamente en la forma de solidificación de las muestras.

De todas las matrices propuestas en este trabajo de tesis, únicamente el ECHCA.nHo presentó un aumento de la homogeneidad química de la muestra en comparación con sus componentes por separado. Esta matriz no solo presenta un aumento en la eficiencia en el proceso de DI para todos los oligosacáridos estudiados, sino que además presenta una distribución normal en la producción de iones del analito en la muestra. Las características de esta matriz, podrían mejorar tanto el límite de detección de la técnica para estos analitos, como se demostró para la β CD en el capítulo 3, como también mejorar la reproducibilidad de los resultados en la misma muestra y en las réplicas analíticas. Todo ello contribuye a la mejora de la calidad del análisis por esta técnica y a la reducción del tiempo del mismo. La potencialidad de esta nueva matriz abre nuevas líneas de investigación para evaluar su aplicabilidad en otras familias de analitos.

En una aproximación para comprender el comportamiento de estos compuestos como matrices MALDI se estudió su comportamiento térmico y fotoquímico. Este interés se basa en que todas las propuestas teóricas más aceptadas en la actualidad⁵, proponen que el proceso MALDI se basa en una cascada de eventos que se inician con la absorción de la radiación láser por parte de la matriz. La matriz en estado electrónico excitado desencadena la redistribución de esa energía, la eyección del material (analito + matriz) desde la fase condensada a fase gaseosa y la ionización primaria y secundaria para dar finalmente los iones intactos detectados. La eyección del material es un procesos térmico que se produce por el incremento rápido de la temperatura en la superficie de la muestra. Es por esto que el estudio de la estabilidad térmica

de las matrices puede brindar información sobre su eficiencia como matriz, incluso, como se mencionó en el **Capítulo 4** (Estabilidad térmica de las matrices MALDI estudiadas), algunos modelos propuestos incluyen la descomposición térmica de las matrices ácidas para generar dióxido de carbono gaseoso como propulsor mecánico de la eyección de material^{6,7}.

Los resultados descritos en el capítulo 4 de este trabajo de tesis mostraron que el requerimiento estructural para que los ácidos cinámicos descarboxilen térmicamente, es la presencia de un grupo donador de densidad electrónica por efecto resonante en la posición *para* del anillo aromático. Este es el caso de las matrices ECHCA y ESA las que se descomponen térmicamente de forma eficiente para dar el correspondiente estireno. Los mecanismos propuestos, basados en la literatura, difieren entre si dependiendo del medio de reacción: (i) en solución la descarboxilación está catalizada por un nucleófilo, (ii) en solución en medio básico la reacción ocurre vía la formación de un dianión producto de la reacción ácido base de los grupos ácidos (ácido carboxílico y fenol) en presencia de una amina, como es el caso de los LIs ECHCA.amina y ESA.amina y (iii) en fase sólida mediante una eliminación *syn*. En el caso particular de los isómeros *Z* previo a la descomposición del sólido ocurre la isomerización térmica $Z \rightarrow E$. En el caso de la matriz ZSA esta reacción puede darse por medio de un ISC entre el estado electrónico fundamental singulete vibracionalmente excitado y el estado electrónico excitado triplete, a través de un punto de cruce isoenergético entre los diagramas de energía potencial.

Si bien la descomposición térmica de las matrices orgánicas clásicas ESA y ECHCA generan eficientemente dióxido de carbono, lo cual podría favorecer la eyección mecánica del material desde la fase condensada a la fase gaseosa como propone Talroze y col.^{6,7}, este comportamiento no es común a todas las matrices ácidas, como por ejemplo el DHB, u otras matrices como el nHo. En el caso de los isómeros ESA y ZSA, se observa un comportamiento térmico diferenciado. Si bien ambos isómeros poseen una temperatura de descomposición similar, en el caso del isómero ESA la descomposición se inicia prácticamente con la fusión, mientras que en el caso del ZSA existe una diferencia mayor entre la fusión y la descomposición, en cuyo rango de temperaturas ocurre la isomerización térmica $Z \rightarrow E$. Dado que el espectro MALDI es una sumatoria de los iones generados en pulsos láser sucesivos, en el caso del ZSA luego de la fusión de la matriz, en la superficie de la muestra se generaría la especie ESA que absorbería eficientemente el próximo pulso láser, generando de esta forma un mayor producción de iones. En el caso del ESA, esto no sucede, ya que inmediatamente luego de la fusión ocurre la descomposición, generando un producto que no absorbe la radiación láser.

En el caso de los LIs derivados de las matrices E-cinámicos, como ESA.BAM, ECHCA.BAM y ECHCA.nHo, su comportamiento térmico en comparación con el/los cromóforo/s constituyente/s, no solo presenta una disminución en la temperatura de fusión y descomposición, sino que además presentan una descomposición en dos etapas. Esta disminución en la temperatura de fusión y descomposición de los LIs en comparación con la matriz ácida, podría indicar una mayor disponibilidad de la energía térmica que fue liberada por la matriz en estado electrónico excitado. Según los modelos de ionización directamente térmicos (TPT)^{8,9} e indirectamente térmicos (LS)¹⁰, esta mayor energía térmica que presenta la fase fundida de los LIs favorecería la formación de los primeros iones por transferencia de protón y/o la desorción/ablación de los iones preformados en la muestra. Otra particularidad que resulta del estudio del comportamiento térmico de estas matrices es que en los LIs la fusión ocurre de forma simultánea con la primer etapa de descomposición, atribuida a la descarboxilación del mismo, a una menor temperatura que las matrices cristalinas. Este proceso podría favorecer la asistencia neumática^{6,7} en la desorción de los primeros iones desde la fase condensada a una menor temperatura, lo que generaría un aumento en la producción de iones y por lo tanto en su eficiencia como matriz. Este análisis comparativo entre los LIMs y las matrices ácidas, es únicamente posible cuando ambas presentan la misma absorbancia a la longitud de onda de emisión del láser, por lo que queda excluido del análisis comparativo la matriz ZSA y sus LIMs.

El estudio del espectro electrónico de los LIs y su estabilidad fotoquímica en comparación con las matrices que los componen no mostraron un comportamiento común y es independiente del grado de ionicidad de las mezclas. Sin embargo, algunos de los resultados del estudio fotofísico y fotoquímico descritos en el **Capítulo 5** (Estabilidad fotoquímica de las matrices MALDI estudiadas) para estas matrices, podrían ser relevantes al analizar su eficiencia en el proceso de DI por MALDI.

En particular el LI ECHCA.BAM presenta una desaparición completa de la banda de emisión fluorescente en comparación con el ECHCA. Si bien no existe una relación directa entre el grado de fluorescencia (rendimiento cuántico de fluorescencia) de las matrices y su eficiencia como matriz¹¹, la pérdida de la misma indicaría que la matriz iónica presenta otras vías de desactivación desde el estado electrónico excitado más eficientes, como ser la desactivación no radiativa o la agrupación de excitones. Esto podría estar relacionado con el aumento en la producción de iones del analito en el LI en comparación con la matriz ácida, como lo teorizan los modelos TPT^{8,9}, LS¹⁰ o CPCD¹². Distinto es el caso de los LIs SA.BAM, donde en ambos casos, la presencia de la amina no produce un cambio significativo en la desactivación radiativa en

comparación con los ácidos solos. En estas tres matrices iónicas la fotoquímica no muestra diferencias en relación a los ácidos solos, por lo que al ser irradiados a 310 nm, solo se observa el producto de fotoisomerización de alquenos $E \rightleftharpoons Z$ junto con algunos productos minoritarios de carácter térmico, como la descarboxilación o en el caso de la matriz ECHCA.BAM (o ECHCA.TBAM), la isomerización térmica $Z \rightarrow E$.

En el caso de las matrices binarias ECHCA.nHo, ESA.nHo y ZSA.nHo, independientemente del grado de ionicidad, ambos componentes absorben la radiación del láser. Bajo irradiación a 310 nm, por separado, los ácidos presentan la típica fotoisomerización de alquenos, mientras que el nHo presenta una fotodimerización. Sin embargo, en la mezcla de ambos, se produce un quenching de los estados fotoreactivos. En el caso de las matrices SA.nHo, se observa además de la isomerización fotoquímica, fotoproductos minoritarios por reacciones de tipo adición de Michael. Estas reacciones se dan por interacción del nHo en estado electrónico excitado con el SA, como se detalló en el capítulo 5. Este quenching del estado electrónico excitado del nHo, inhibe su fotodimerización. Esta nueva vía de desactivación desde el estado electrónico excitado por medio de una reacción química y la generación de nuevos productos con propiedades físico-químicas distintas a las originales, podría estar relacionado con la eficiencia como matrices en MALDI, donde no se observa un efecto cooperativo entre ambas subunidades.

Distinto es el caso de la matriz ECHCA.nHo, donde la irradiación de la mezcla no generan ningún fotoproducto. A si mismo, el estudio del espectro electrónico del ECHCA.nHo, a pesar de la dificultad en la medición del mismo, muestra un quenching en la fluorescencia de ambas subunidades. La suma de estos efectos: i) el quenching fotoquímico de los estados fotoreactivos, que inhibe la isomerización del ácido, la dimerización del nHo o reacciones entre las subunidades y ii) el quenching fotofísico de la desactivación radiativa, implicaría que esta nueva unidad cromofórica redistribuye la totalidad de la energía absorbida por otras vías de desactivación. Al igual que en el caso de los otros LIs, esto podría estar relacionado con la mejora en la eficiencia del proceso de DI cuando se utiliza esta matriz en el análisis de hidratos de carbono.

Si bien el estudio térmico, fotoquímico y fotofísico realizado durante el desarrollo de este trabajo de tesis es una primera aproximación para comprender su comportamiento como matrices MALDI, esta investigación abre nuevas interrogantes a la hora de evaluar las propiedades físico-químicas que debe cumplir una matriz para generar eficientemente la DI de un dado analito. Estas nuevas líneas de investigación implican ampliar el estudio del espectro electrónico de estas matrices con técnicas resueltas en el tiempo y evaluar la desactivación no

radiativa desde el estado electrónico excitado, así como el comportamiento fotofísico y fotoquímico en estado sólido. Los resultados descritos en esta tesis doctoral generaron una nueva hipótesis de trabajo. Esta hipótesis sugiere que, independientemente del grado de ionicidad de la mezcla (es decir, el tipo de interacción entre un ácido y una base de Brønsted), existe un contacto estrecho entre las subunidades a nivel molecular en la fase condensada. Este contacto aumenta la eficiencia en el proceso de DI, teniendo en cuenta que la naturaleza del analito puede modificar este contacto entre las subunidades y, por lo tanto, alterar su desempeño como matriz. Esta hipótesis requiere el análisis espectroscópico en fase condensada tanto de la matriz como de la mezcla matriz más analito.

7.1 REFERENCIAS

- 1 P. Kobylis, H. Lis, P. Stepnowski and M. Caban, *J Mol Liq*, 2019, **284**, 328–342.
- 2 R. Erra-Balsells and H. Nonami, *Environment Control in Biology*, 2002, **40**, 55–73.
- 3 M. C. Biondic and R. Erra-Balsells, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1997, 1323–1328.
- 4 K. Dreisewerd, *Chem Rev*, 2003, **103**, 395–426.
- 5 Y.-H. Lai and Y.-S. Wang, *Mass Spectrometry*, 2017, **6**, S0072–S0072.
- 6 V. L. Talroze, R. J. Jacob, A. L. Burlingame, I. O. Leipunsky and M. A. Baldwin, *Adv. Mass Spectrom.*, 2001, **15**, 481–482.
- 7 V. L. Talroze, R. J. Jacob, A. L. Burlingame, I. O. Leipunsky and M. A. Baldwin, in *49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, American Society of Mass Spectrometry, Chicago, Illinois, 2001.
- 8 I. C. Lu, C. Lee, Y. T. Lee and C. K. Ni, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015, **8**, 21–39.
- 9 I.-C. Lu, K. Y. Chu, C.-Y. Lin, S.-Y. Wu, Y. A. Dyakov, J.-L. Chen, A. Gray-Weale, Y.-T. Lee and C.-K. Ni, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, **26**, 1242–1251.
- 10 M. Karas and R. Krüger, *Chem Rev*, 2003, **103**, 427–439.
- 11 O. I. Tarzi, Director: Rosa Erra-Balsells N° 4015, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2006.
- 12 R. Knochenmuss, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2016, **9**, 365–385.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

Anexos

Líquidos iónicos orgánicos como matrices MALDI para el análisis de hidratos de carbono. Una aproximación térmica, fotoquímica y óptica para la comprensión de su comportamiento.

Lic. Tobías Schmidt De León

Directora de tesis y consejera de estudios: Dra. Rosa Erra-Balsells
Directora asistente: Dra. María Laura Salum

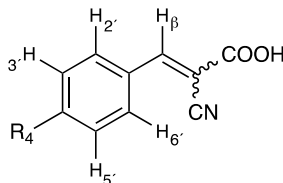
Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica – FCEN – UBA.
CIHIDECAR, CEQUIBIEM. CONICET.

Buenos Aires 2023

Anexo 2 : Capítulo 2 - Líquidos iónicos con aminas alifáticas como matrices en MALDI-MS. Análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular.

Mezclas de ácidos *E*- y *Z*-. Caracterización espectroscópica.

¹H-RMN:



***E*- + *Z*-4-hidroxi- α -cianocinámico (E+ZCHCA):** (500 MHz; (CD₃)₂SO) δ_H 10,75 (s, 1H, E-OH), 10,51 (s, 1H, Z-OH), 8,18 (s, 1H, E-H β), 7,97 (d, J = 8,8 Hz, 2H, E-H2' y E-H6'), 7,81 (d, J = 8,8 Hz, 2H, Z-H2' y Z-H6'), 7,77 (s, 1H, Z-H β), 6,94 (d, J = 8,8 Hz, 2H, E-H3' y E-H5'), 6,82 (d, J = 8,8 Hz, 2H, Z-H3' y Z-H5').

***E*- + *Z*-4-cloro- α -cianocinámico (E+Z-4ClCHCA):** (500 MHz; (CD₃)₂SO) δ_H 8,35 (s, 1H, E-H β), 8,05 (d, J = 8,6 Hz, 2H, E-H2' y E-H6'), 8,00 (s, 1H, Z-H β), 7,72 (d, J = 8,6 Hz, 2H, Z-H2' y Z-H6'), 7,68 (d, J = 8,6 Hz, 2H, E-H3' y E-H5'), 7,53 (d, J = 8,6 Hz, 2H, Z-H3' y Z-H5').

***E*- + *Z*-4-flúor- α -cianocinámico (E+Z-4FCHCA):** (500 MHz; (CD₃)₂SO) δ_H 8,36 (s, 1H, E-H β), 8,13 (dd, J = 8,7, 5,5 Hz, 2H, E-H2' y E-H6'), 7,99 (s, 1H, Z-H β), 7,83 (dd, J = 8,7, 5,5 Hz, 2H, Z-H2' y Z-H6'), 7,45 (t, J = 8,7 Hz, 2H, E-H3' y E-H5'), 7,31 (t, J = 8,7 Hz, 2H, Z-H3' y Z-H5').

Espectroscopía IR:

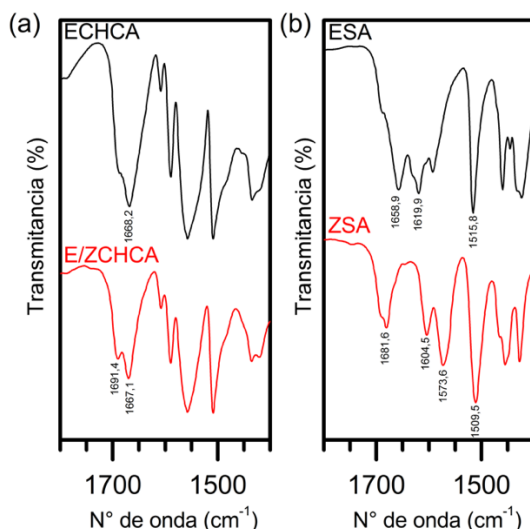


Figura. Espectro FT-IR por reflectancia difusa. (a) ácido ECHCA (negro, superior) y la mezcla E/ZCHCA (rojo, inferior) y (b) ácido ESA (negro, superior) y ZSA (rojo, inferior). Rango: 1400 a 1800 cm⁻¹

***E*-4-hidroxi- α -cianocinámico (ECHCA):** 3293,8 cm⁻¹ (OH (E-COOH)), 2230,3 cm⁻¹ (-CN), 1668,2 cm⁻¹ (C=O (E-COOH)).

***E*- + *Z*-4-hidroxi- α -cianocinámico (E/ZCHCA):** 3298,4 cm⁻¹ (OH (E/Z-COOH)), 2230,9 cm⁻¹ (-CN), 1691,4 cm⁻¹ (C=O (Z-COOH)), 1667,1 cm⁻¹ (C=O (E-COOH)).

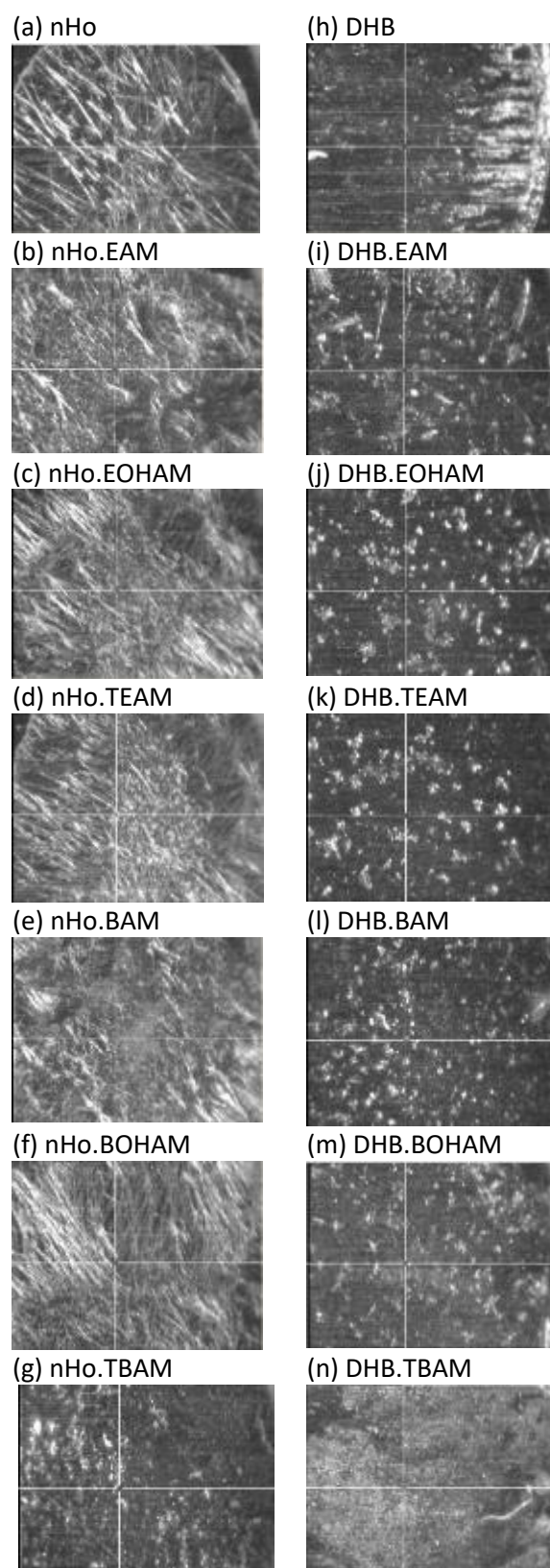


Figura A2.1. Imágenes ópticas de las matrices MALDI depositadas en el electrodo porta muestras: (a) nHo, (b-g) LIMs nHo.amina, (h) DHB, (i-n) LIMs DHB.amina. Imagen tomada en el centro del *spot*.

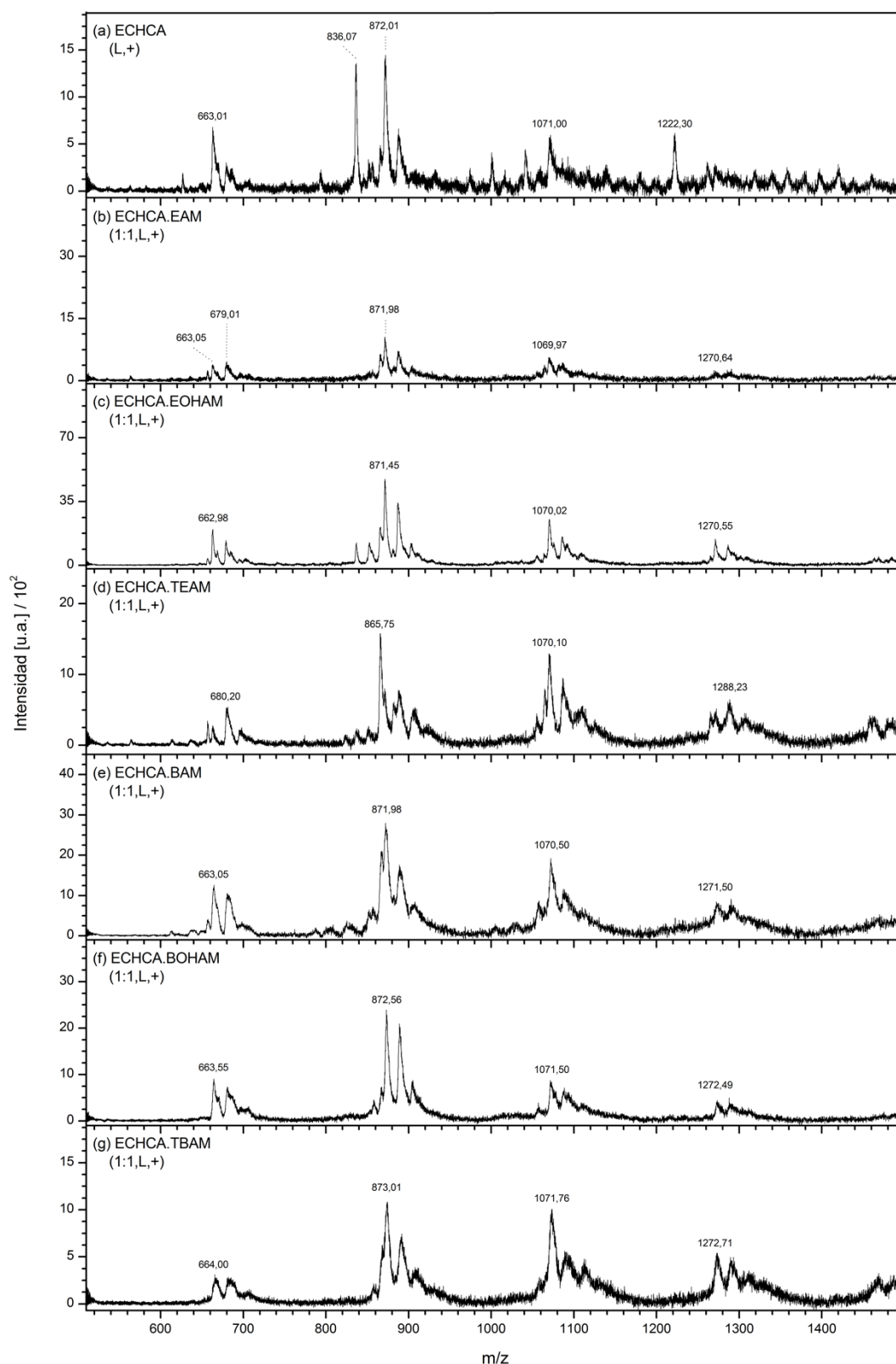


Figura A2.2. Espectros de masa LDI: (a) ECHCA y los LIs en relación molar ácido:amina 1:1: (b) ECHCA.EAM, (c) ECHCA.EOHAM, (d) ECHCA.TEAM, (e) ECHCA.BAM, (f) ECHCA.BOAM y (g) ECHCA.TBAM. Modo lineal positivo (L,+). Rango: m/z 500 a 1500. Fluencia del láser 40%.

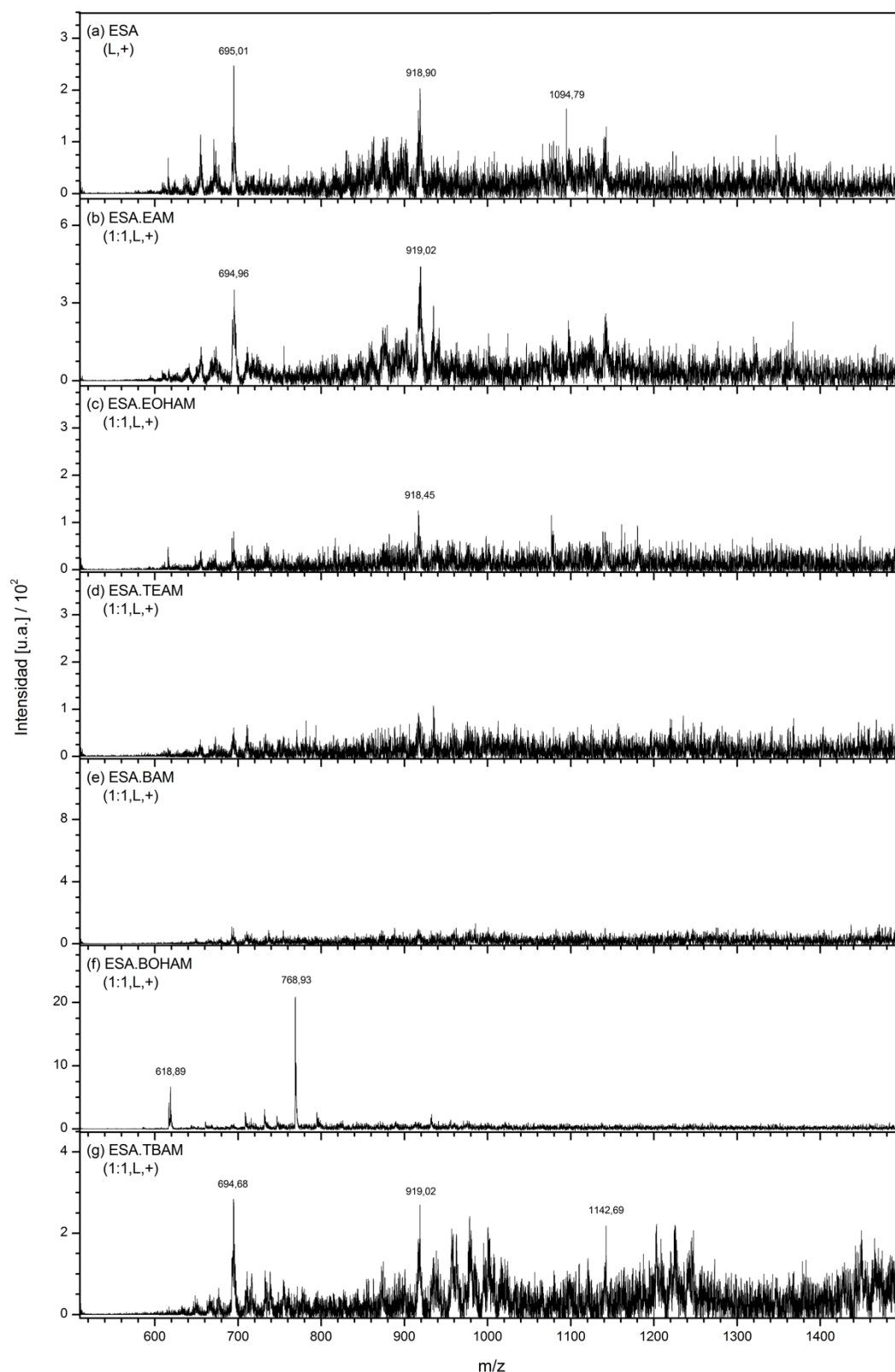


Figura A2.3. Espectros de masa LDI: (a) ESA y los LIs en relación molar ácido:amina 1:1: (b) ESA.EAM, (c) ESA.EOHAM, (d) ESA.TEAM, (e) ESA.BAM, (f) ESA.BOHAM y (g) ESA.TBAM. Modo lineal positivo (L,+). Rango: m/z 500 a 1500. Fluencia del láser 40%.

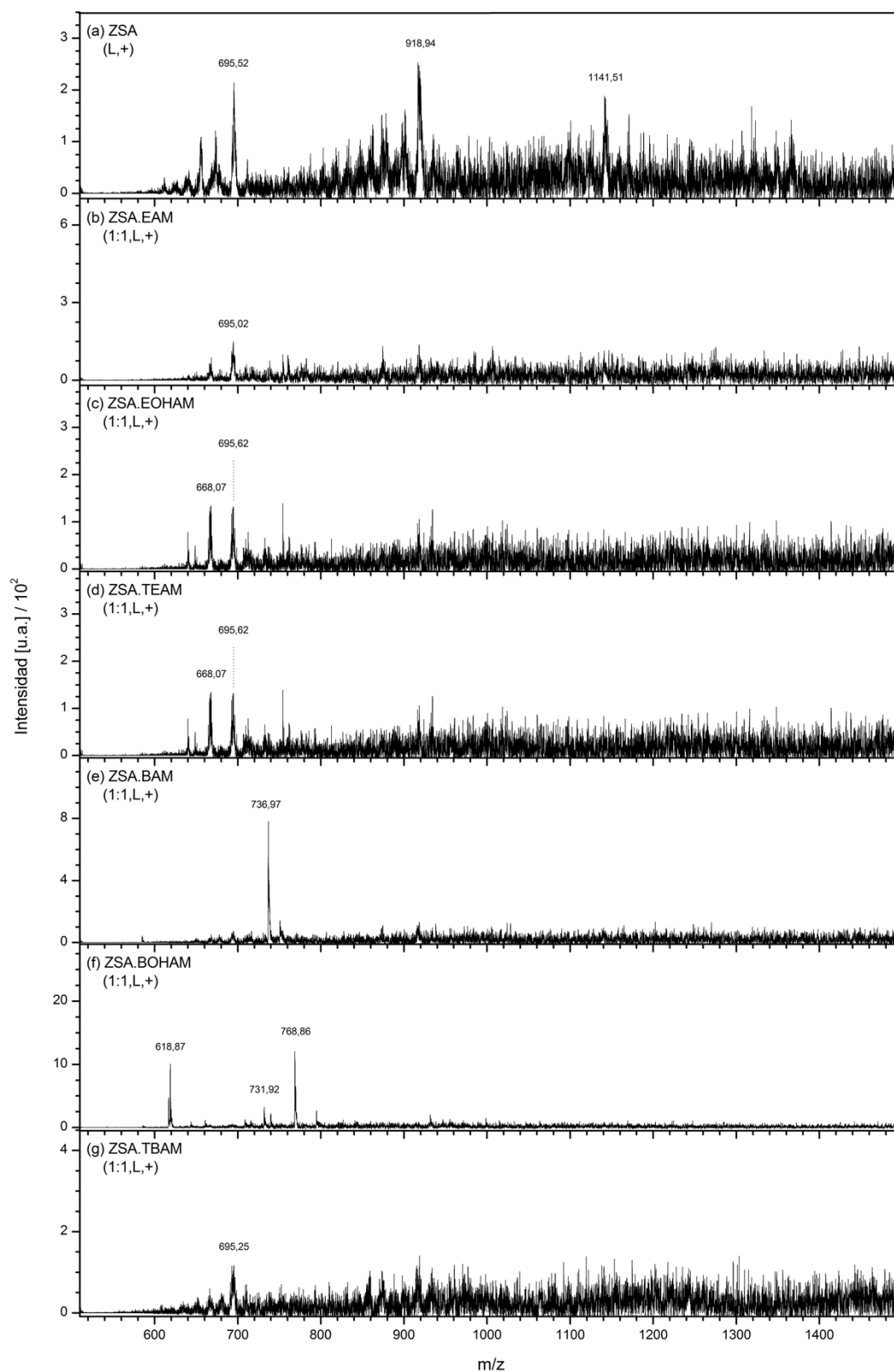


Figura A2.4. Espectros de masa LDI: (a) ZSA y los LIs en relación molar ácido:amina 1:1: (b) ZSA.EAM, (c) ZSA.EOHAM, (d) ZSA.TEAM, (e) ZSA.BAM, (f) ZSA.BOAM y (g) ZSA.TBAM. Modo lineal positivo (L,+). Rango: m/z 500 a 1500. Fluencia del láser 40%.

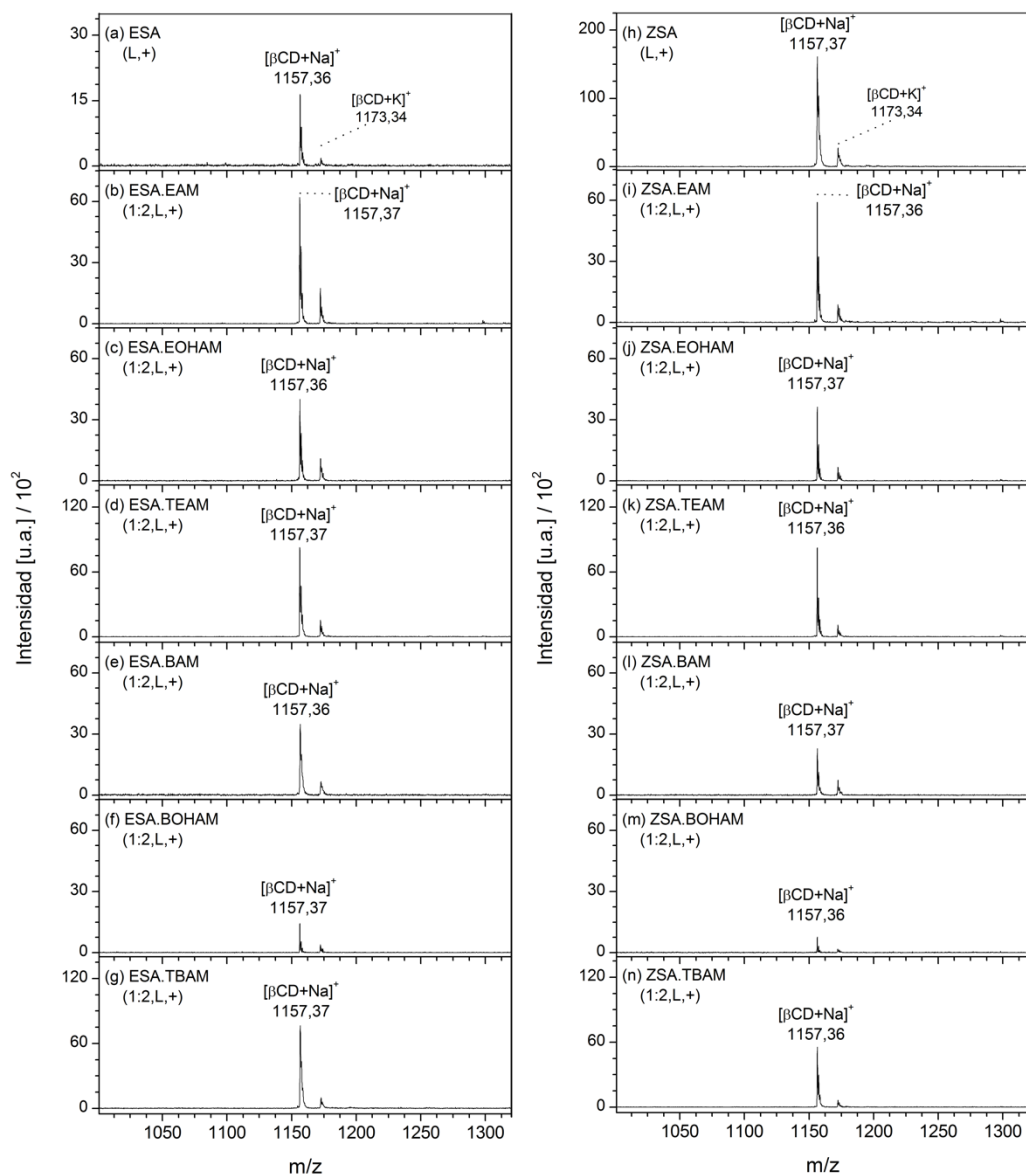


Figura A2.5. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.EAM, (c) ESA.EOHAM, (d) ESA.TEAM, (e) ESA.BAM, (f) ESA.BOAM, (g) ESA.TBAM, (h) ZSA, (i) ZSA.EAM, (j) ZSA.EOHAM, (k) ZSA.TEAM, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.BOAM y (n) ZSA.TBAM. Lis en relación molar ácido:amina 1:2. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 40%

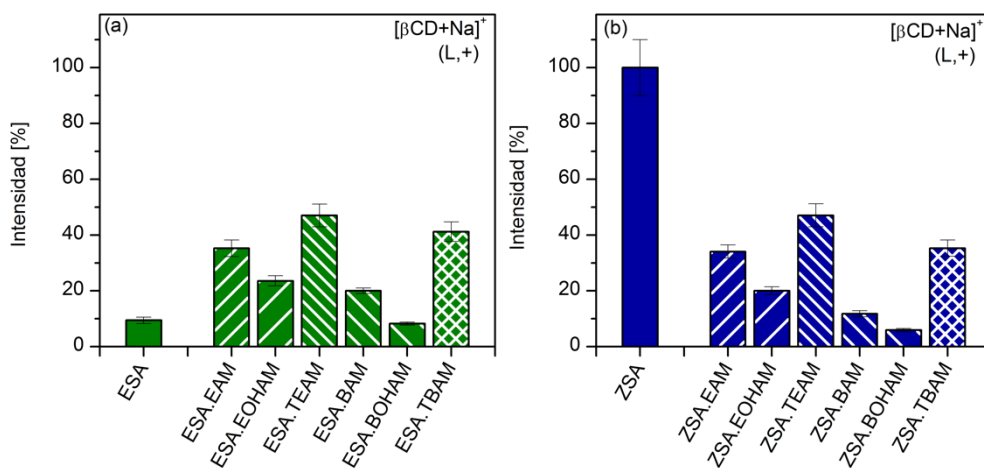


Figura A2.6. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:2.

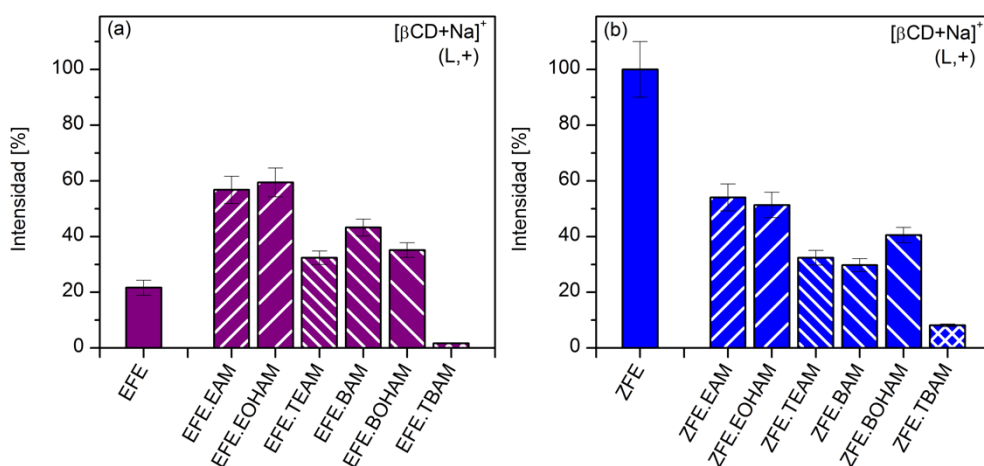


Figura A2.7. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) EFE y los LIMs EFE.amina y (b) ZFE y los LIMs ZFE.amina. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

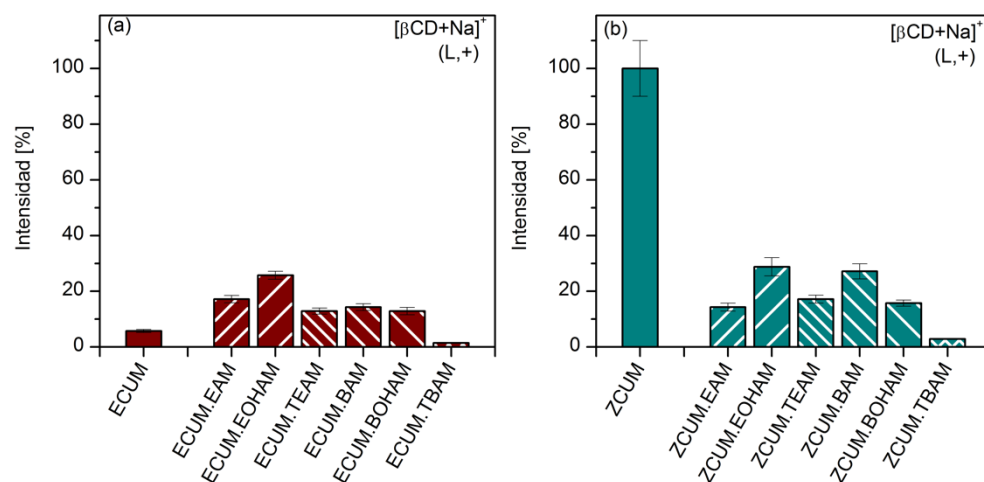


Figura A2.8. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ECUM y los LIMs ECUM.amina y (b) ZCUM y los LIMs ZCUM.amina. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

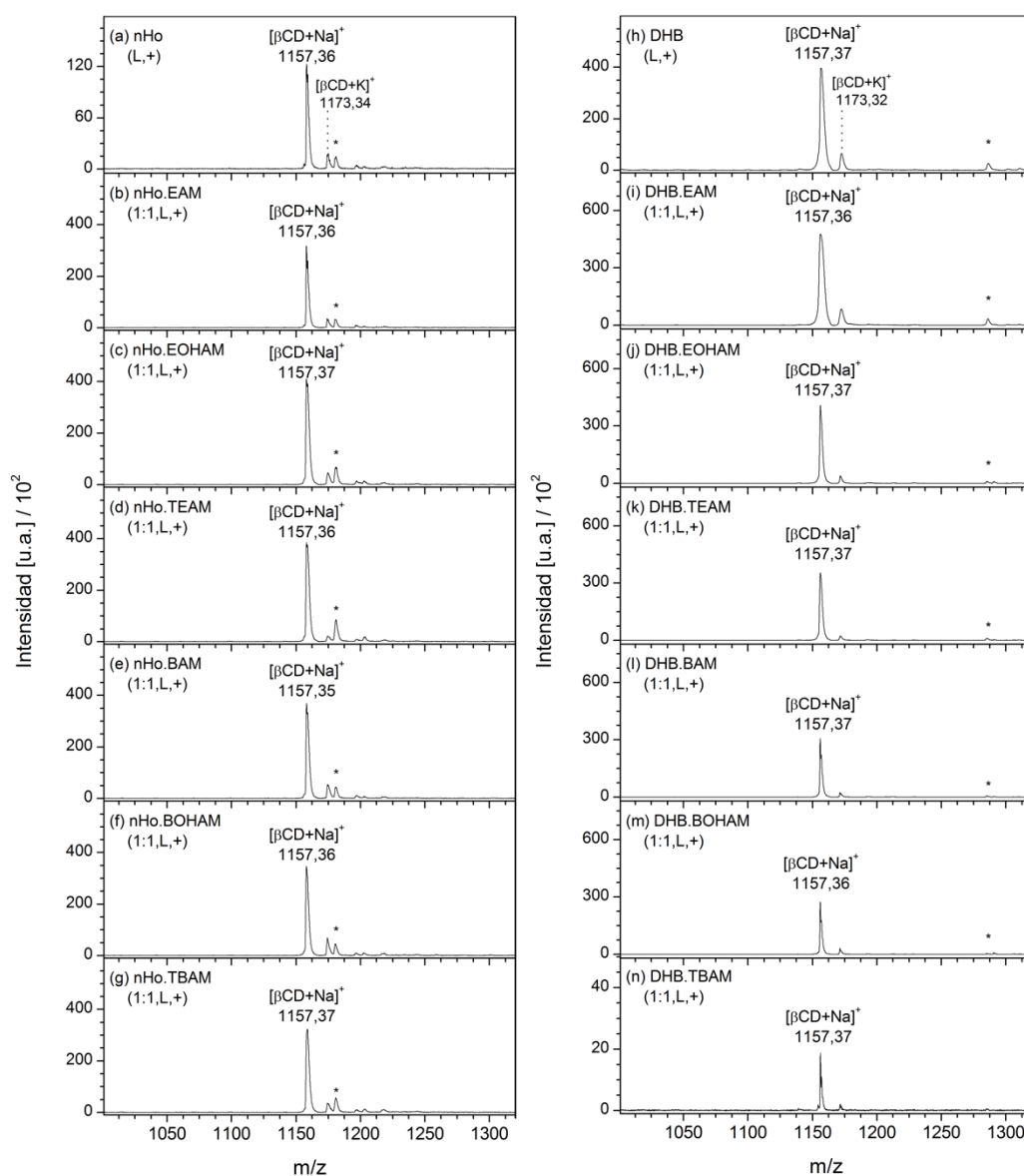


Figura A2.9. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) nHo.EAM, (c) nHo.EOHAM, (d) nHo.TEAM, (e) nHo.BAM, (f) nHo.BOAM, (g) nHo.TBAM, (h) DHB, (i) DHB.EAM, (j) DHB.EOHAM, (k) DHB.TEAM, (l) DHB.BAM, (m) DHB.BOAM y (n) DHB.TBAM. LIs en relación molar ácido:amina 1:1. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 40%

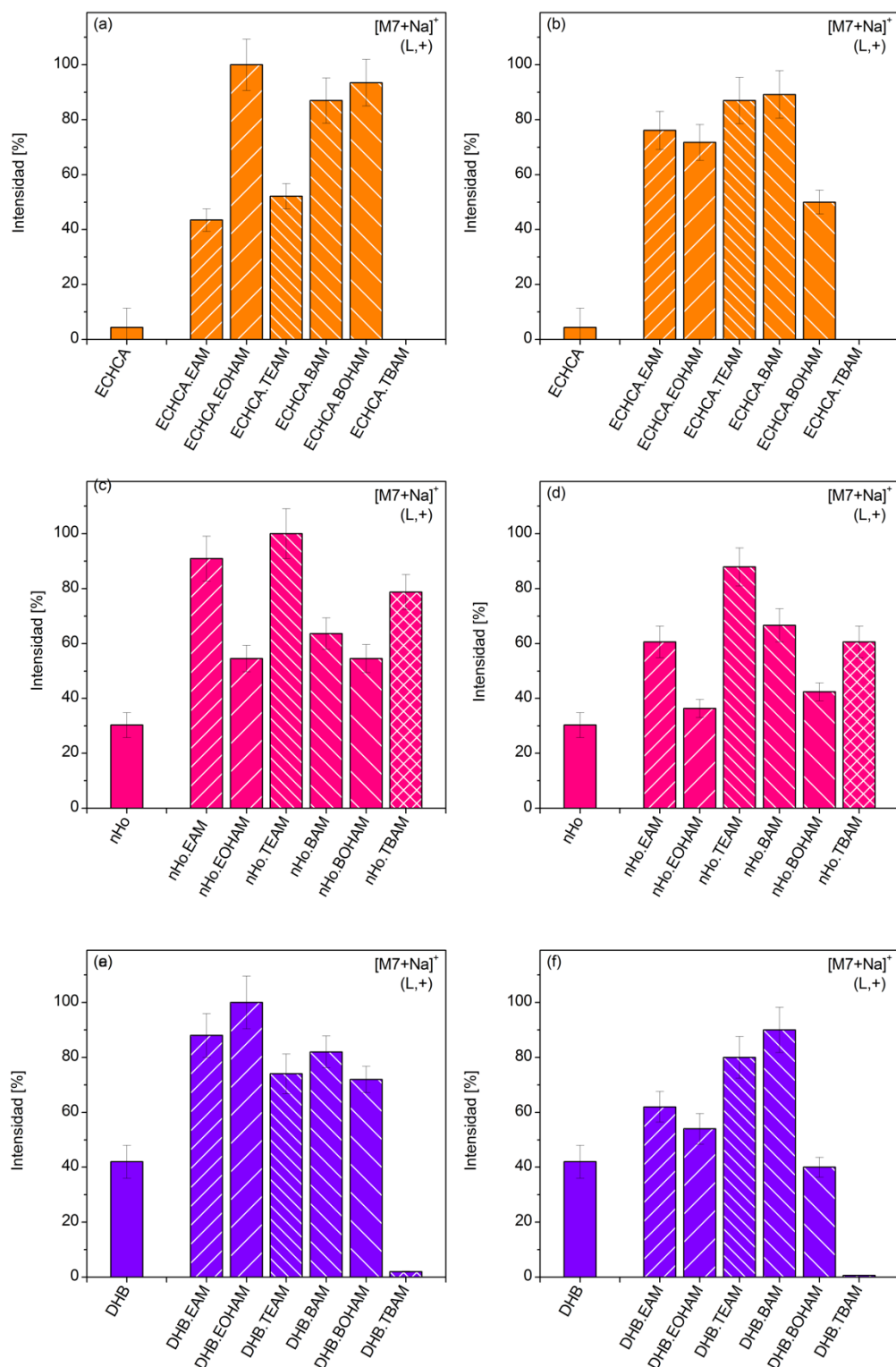


Figura A2.10. Intensidad normalizada de la señal $[M7+Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a-b) ECHCA y los LIMs ECHCA.amina, (c-d) nHo y los LIMs nHo.amina y (e-f) DHB y los LIMs DHB.amina. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina: (a, c y e) 1:1 y (b, d y f) 1:2.

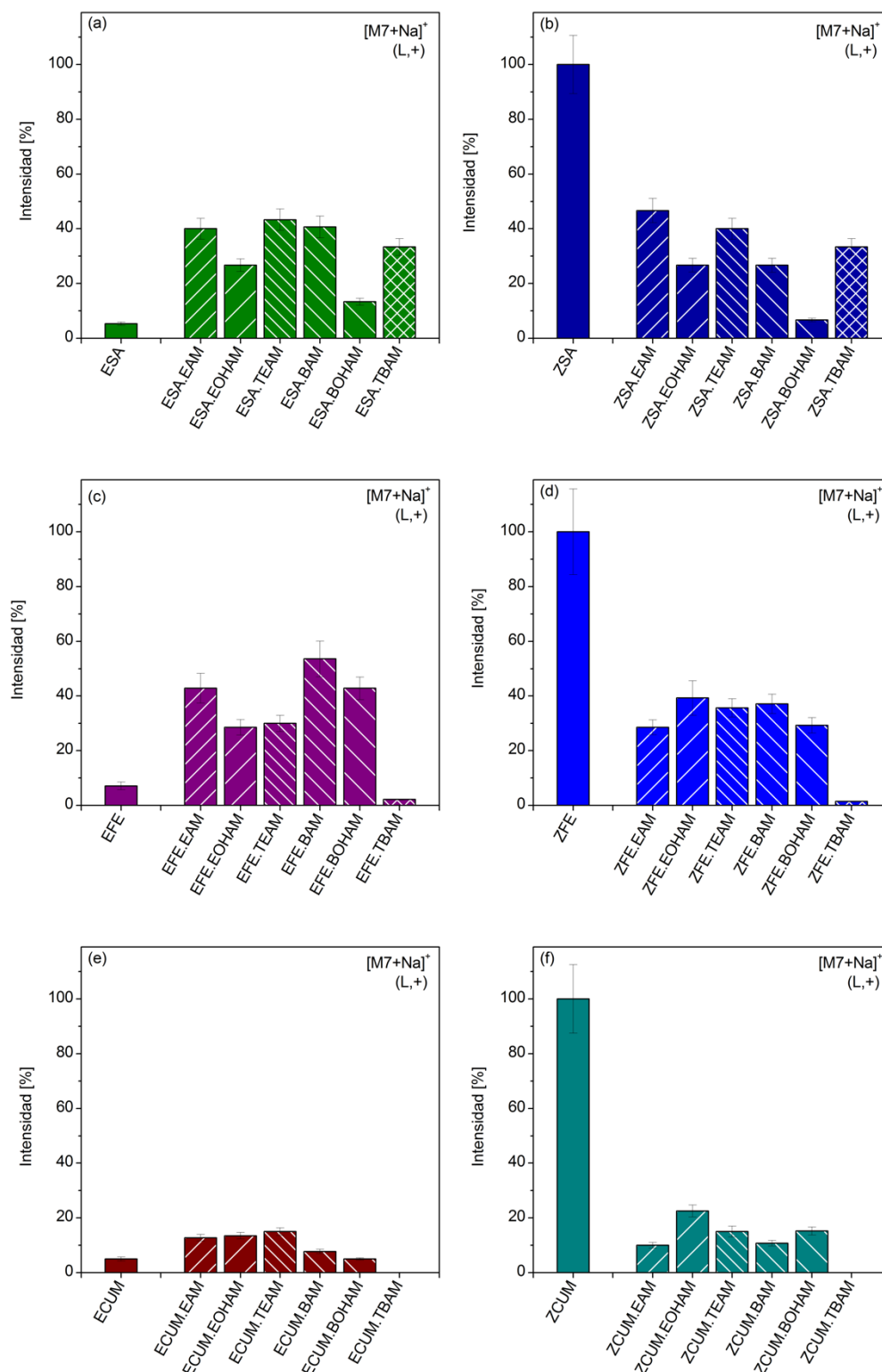


Figura A2.11. Intensidad normalizada de la señal $[M7+Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina, (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina, (c) EFE y los LIMs EFE.amina, (d) ZFE y los LIMs ZFE.amina, (e) ECUM y los LIMs ECUM.amina y (f) ZCUM y los LIMs ZCUM.amina. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

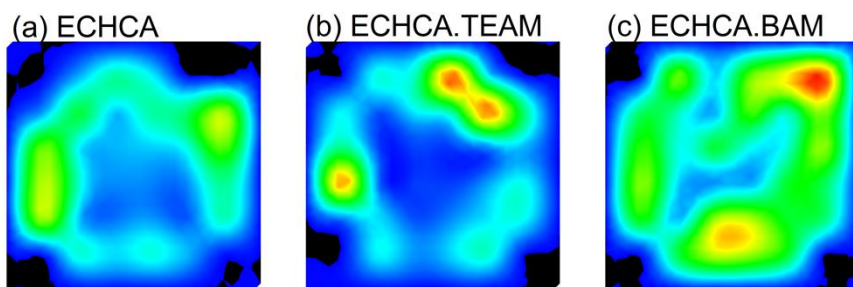


Figura A2.12. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: IPSG. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 173×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

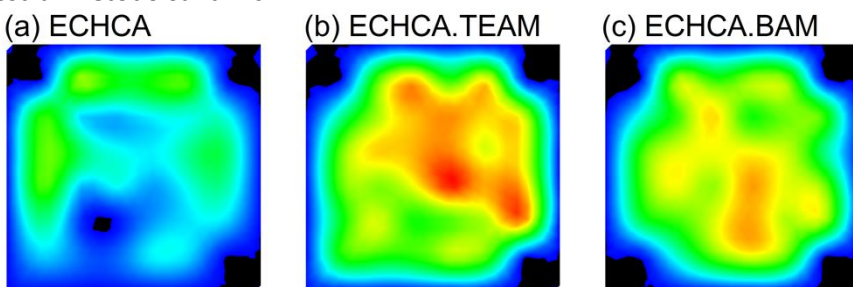


Figura A2.13. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: F2. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 452×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

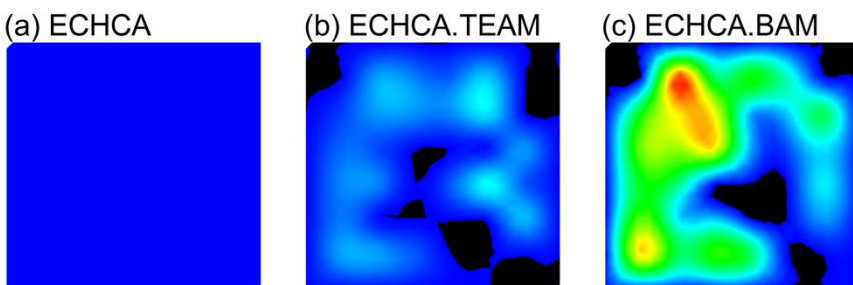


Figura A2.14. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Analito: Inulina ($C_6nH_{10n+2}O_{5n+1}$). Ion monitoreado: $[M+Na]^+ M_{n=13} = (C_{78}H_{132}O_{66})$. Analito: Inulina. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 33×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich.

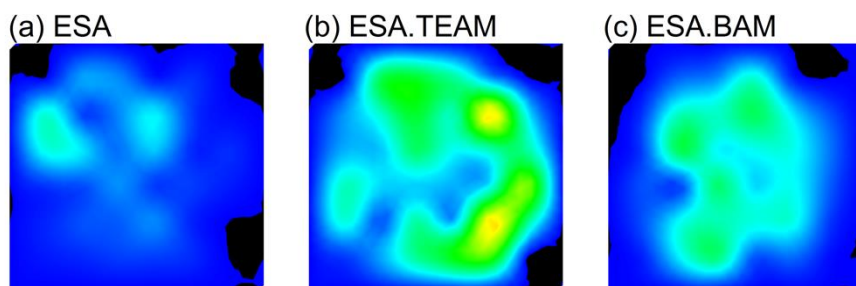


Figura A2.15. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.TEAM y (c) ESA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = $27,2 \times 10^2$ u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla.

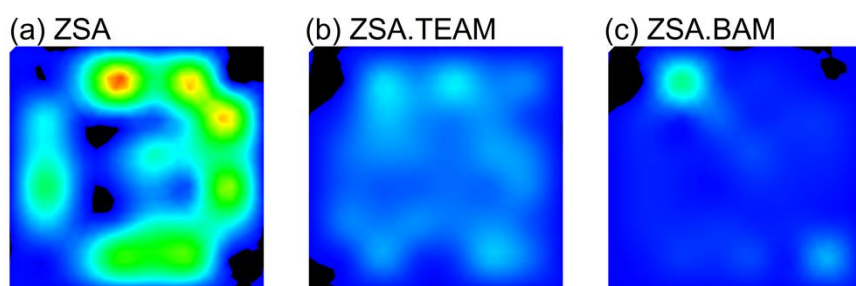


Figura A2.16. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) ZSA, (b) ZSA.TEAM y (c) ZSA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 46×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla

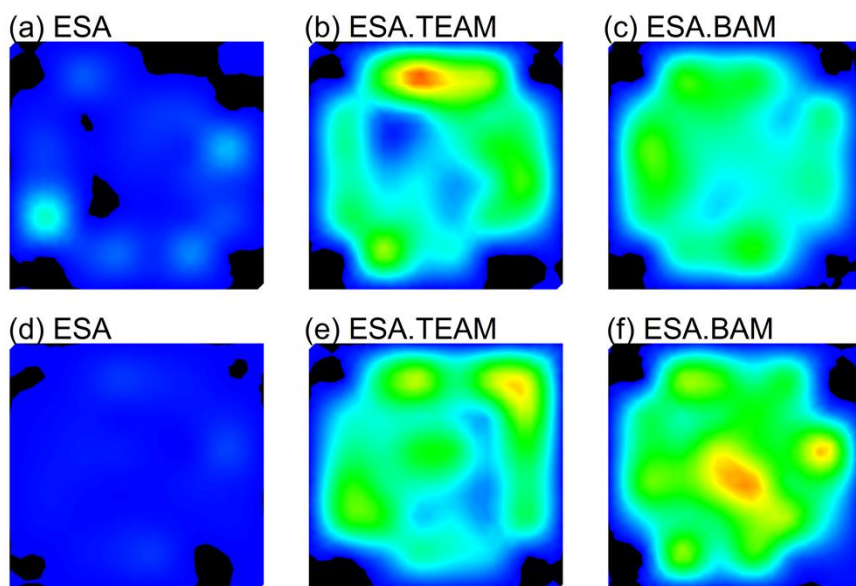


Figura A2.17. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: M7. Matrices: (a y d) ESA, (b y e) ESA.TEAM y (c y f) ESA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 20×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: (a-c) método sándwich y (d-f) método mezcla.

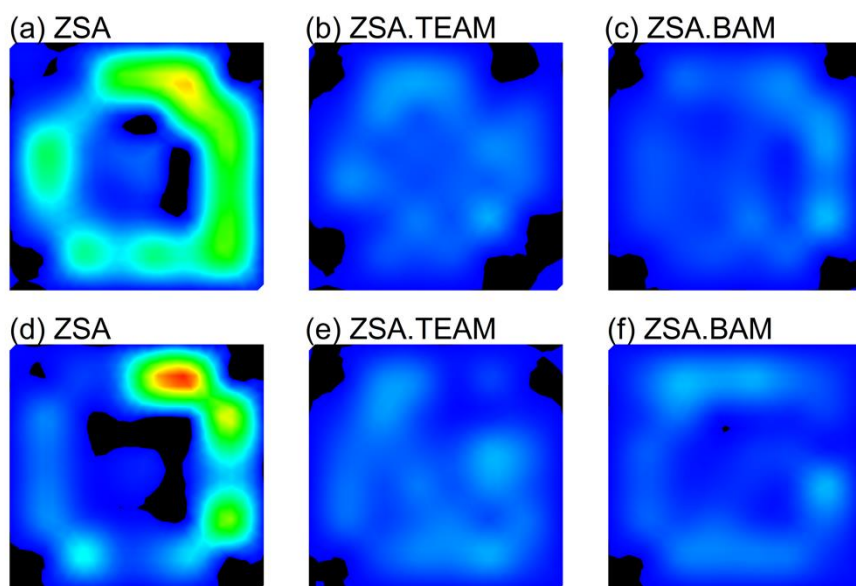


Figura A2.18. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: M7. Matrices: (a y d) ZSA, (b y e) ZSA.TEAM y (c y f) ZSA.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 63×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: (a-c) método sándwich y (d-f) método mezcla.

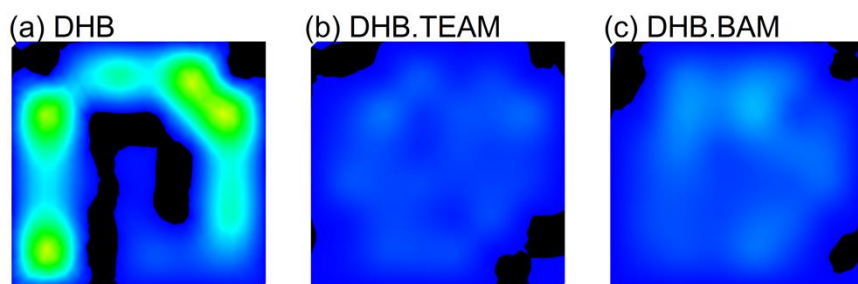


Figura A2.19. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) DHB, (b) DHB.TEAM y (c) DHB.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 135×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla

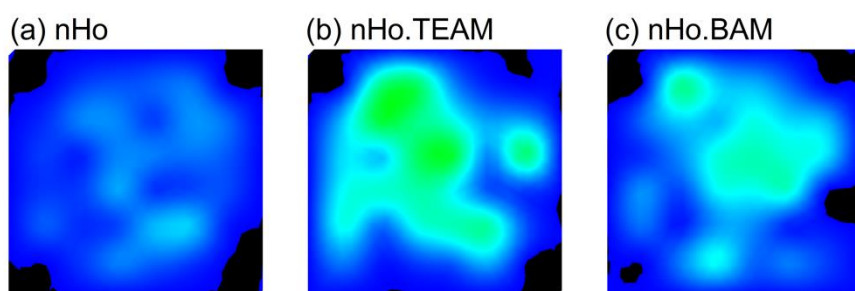


Figura A2.20. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) nHo.TEAM y (c) nHo.BAM. Modo de análisis lineal positivo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 171×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul a 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla

Tabla A2.1. Límite de detección (LOD) y rango dinámico (linealidad) de β CD en modo iónico positivo. Ion monitoreado $[\beta\text{CD}+Na]^+$

| Nº | Matriz | β CD | |
|----|----------|------------------|-----------------------------|
| | | LOD ^a | Rango dinámico ^a |
| 1 | nHo | 2,59 | 2,59 a 25,95 |
| 2 | nHo.TEAM | 2,59 | 2,59 a 51,5 |
| 3 | nHo.BAM | 2,59 | 2,59 a 51,5 |
| 4 | DHB | 2,59 | 2,59 a 51,5 |
| 5 | DHB.TEAM | 5,15 | 2,59 a 259,5 |
| 6 | DHB.BAM | 25,95 | 51,5 a 520 |

^a LOD y Rango Dinámico. Indicado como pmol de analito depositado sobre el electrodo porta muestra; S/R ≥ 4 .

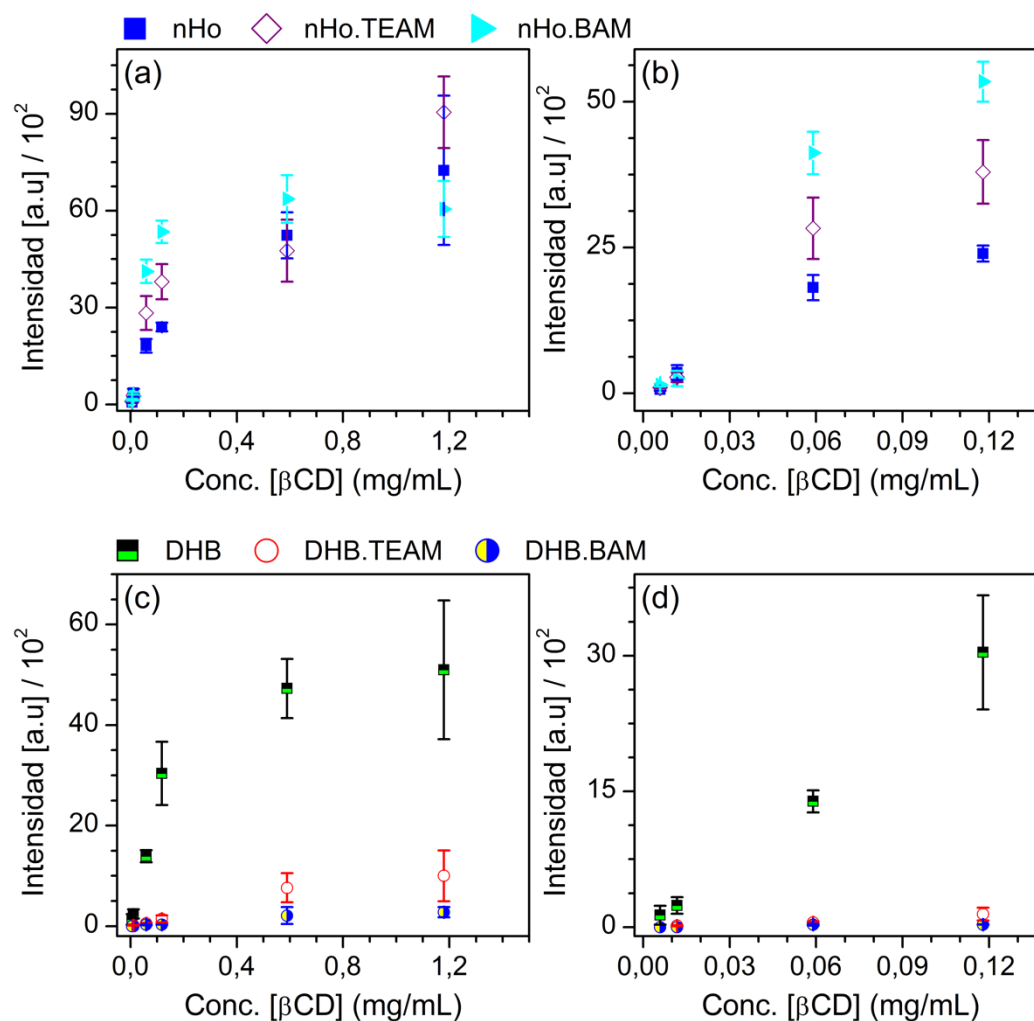


Figura A2.21. Intensidad absoluta vs. concentración. Analito: β CD. Ion monitoreado: $[M+Na]^+$. Matrices: (a,b) nHo, nHo.TEAM y nHo.BAM y (c,d) DHB, DHB.TEAM y DHB.BAM. Modo lineal positivo (L, +). (a,c) Todo el rango de concentraciones estudiado. (b,d) Ampliación de la región de comportamiento lineal.

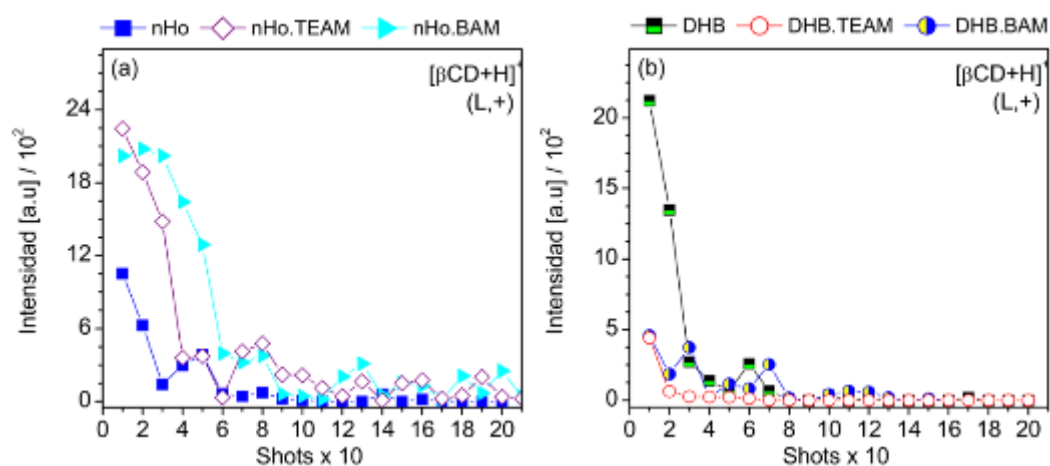


Figura A2.22. Estabilidad de las matrices. Intensidad del ion monitoreado vs. Número de disparos (*shots*). Analito: β CD. Ion monitoreado: $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Matrices: (a) nHo, nHo.TEAM, nHo.BAM y (b) DHB, DHB.TEAM, DHB.BAM. Modo lineal positivo (L, +).

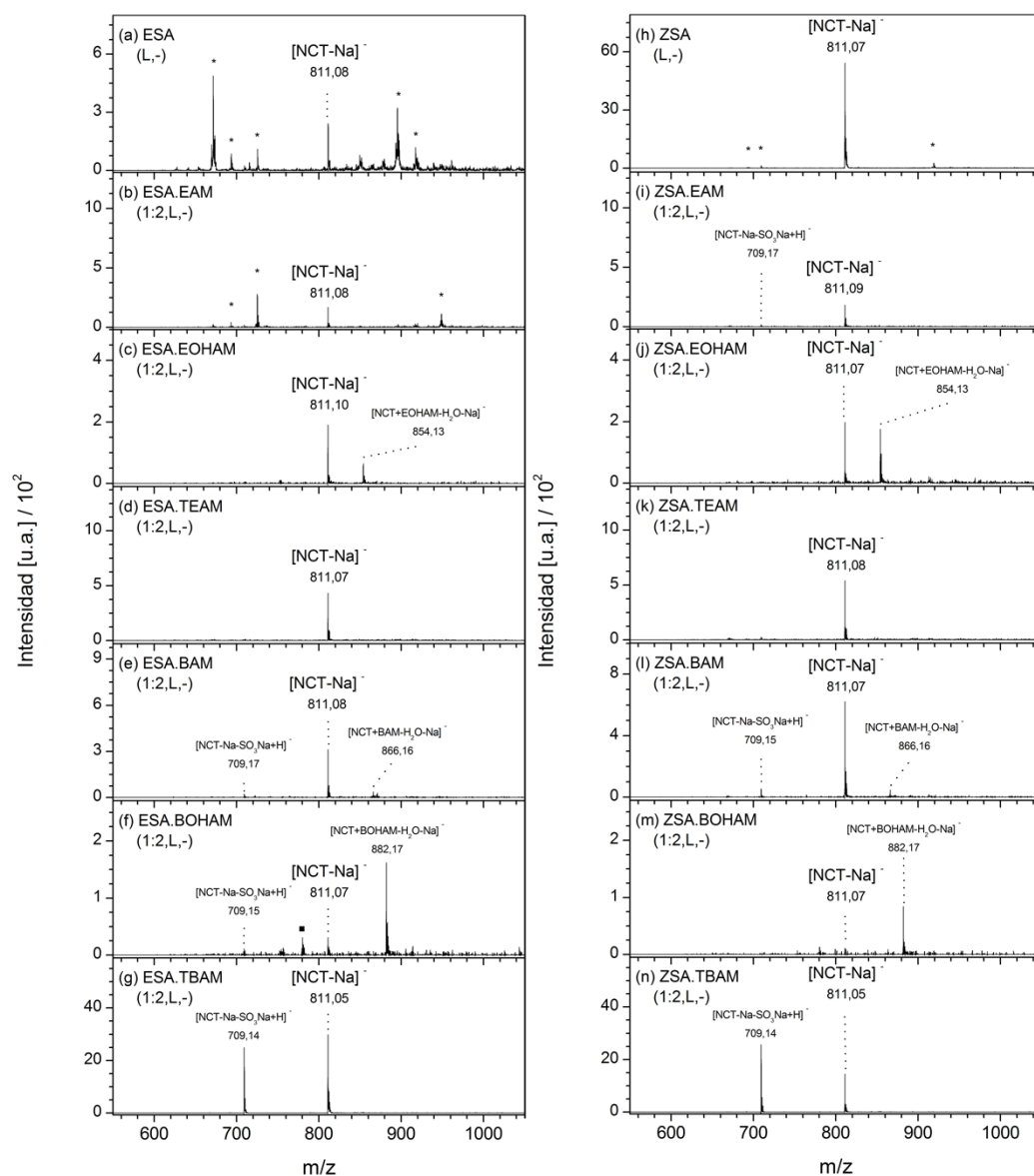


Figura A2.23. Espectros de masa MALDI. Analito: NCT. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.EAM, (c) ESA.EOHAM, (d) ESA.TEAM, (e) ESA.BAM, (f) ESA.BOHAM, (g) ESA.TBAM, (h) ZSA, (i) ZSA.EAM, (j) ZSA.EOHAM, (k) ZSA.TEAM, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.BOHAM y (n) ZSA.TBAM. Lis en relación molar ácido:amina 1:2. Modo lineal negativo (L, -). Fluencia del láser: 40%.

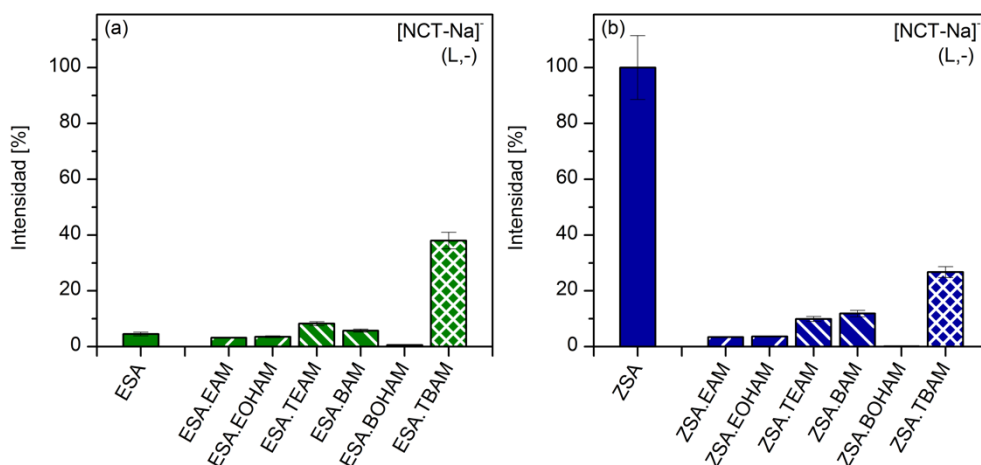


Figura A2.24. Intensidad normalizada de la señal $[NCT-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:2.

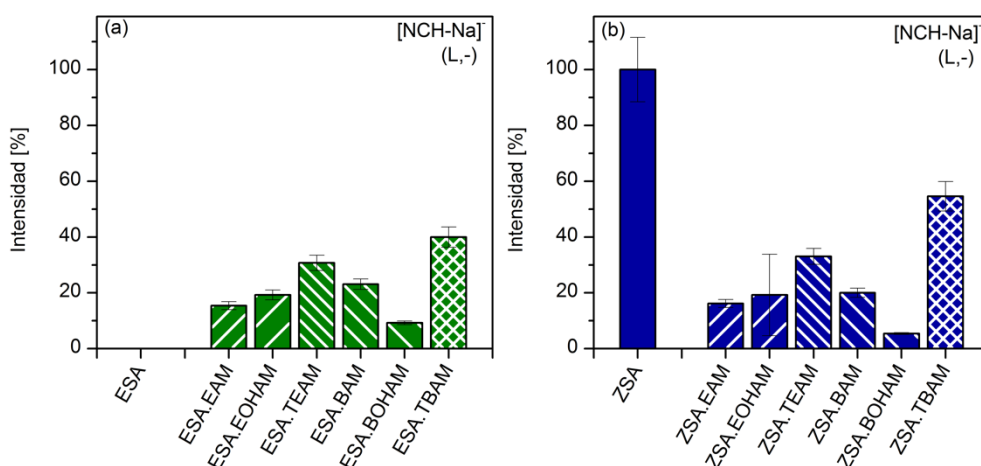


Figura A2.25. Intensidad normalizada de la señal $[NCH-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

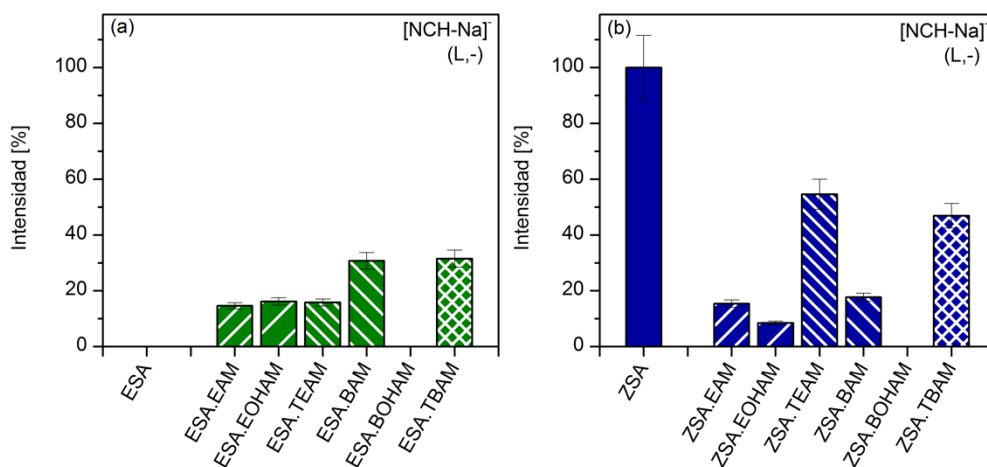


Figura A2.26. Intensidad normalizada de la señal $[NCH-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:2.

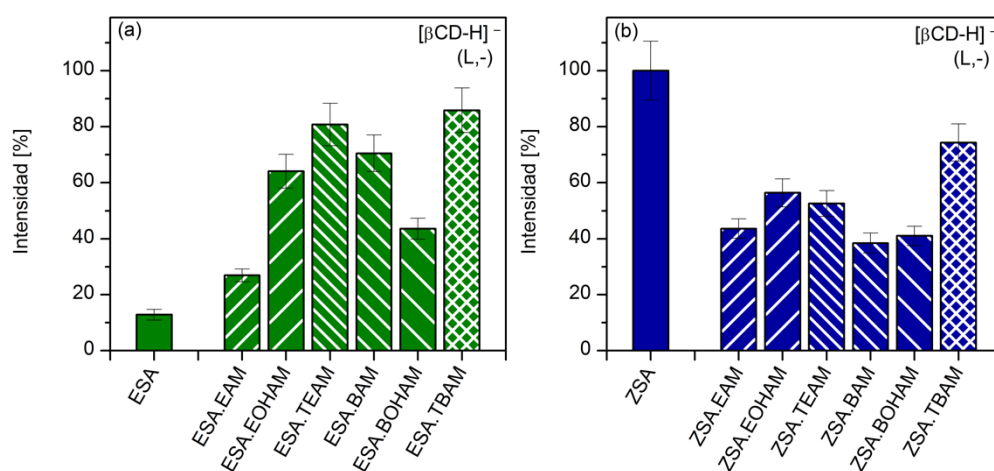


Figura A2.27. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD-H}]^-$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

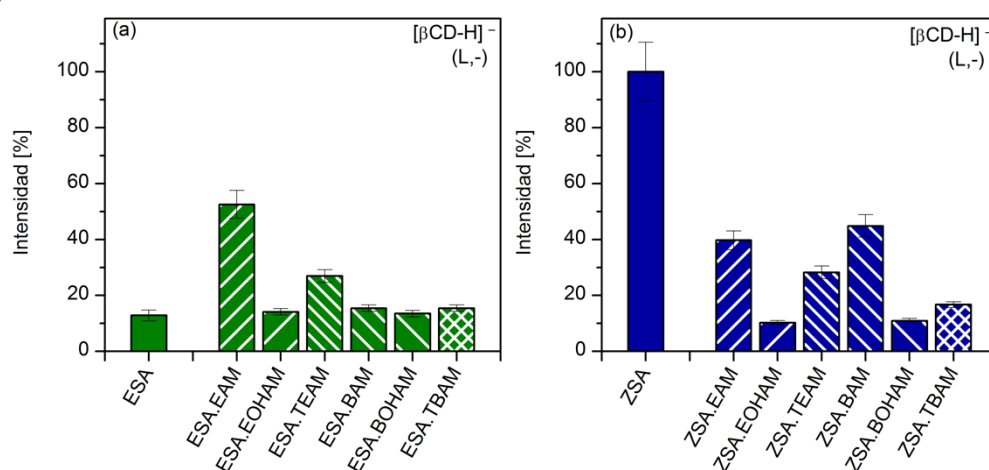


Figura A2.28. Intensidad normalizada de la señal $[\beta\text{CD-H}]^-$ en función de las matrices estudiadas: (a) ESA y los LIMs ESA.amina y (b) ZSA y los LIMs ZSA.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:2.

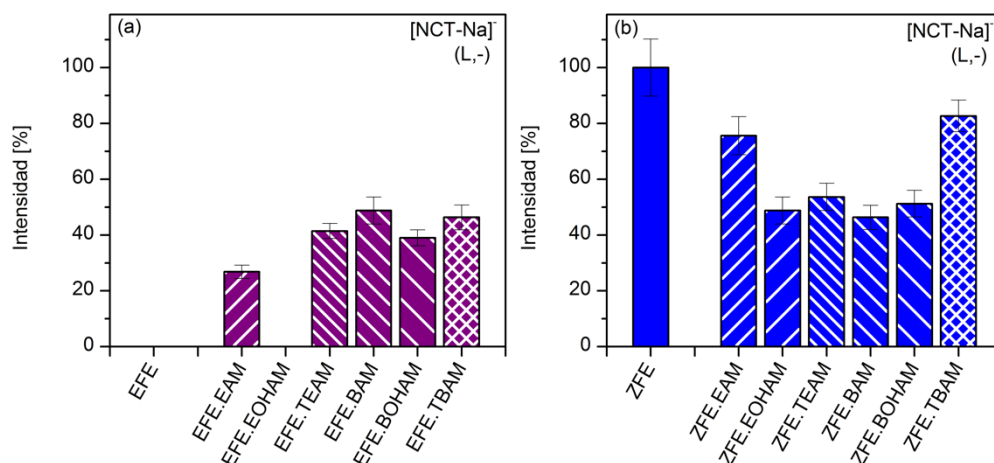


Figura A2.29. Intensidad normalizada de la señal $[NCT-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) EFE y los LIMs EFE.amina y (b) ZFE y los LIMs ZFE.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

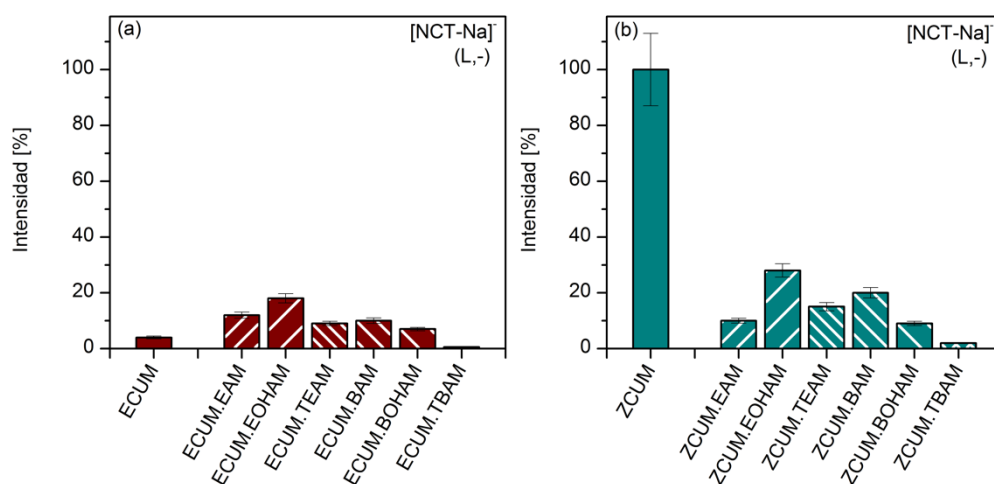


Figura A2.30. Intensidad normalizada de la señal $[NCT-Na]^+$ en función de las matrices estudiadas: (a) ECUM y los LIMs ECUM.amina y (b) ZCUM y los LIMs ZCUM.amina. Modo lineal negativo (L,-). Fluencia del láser: 40%. LIMs en relación molar ácido:amina 1:1.

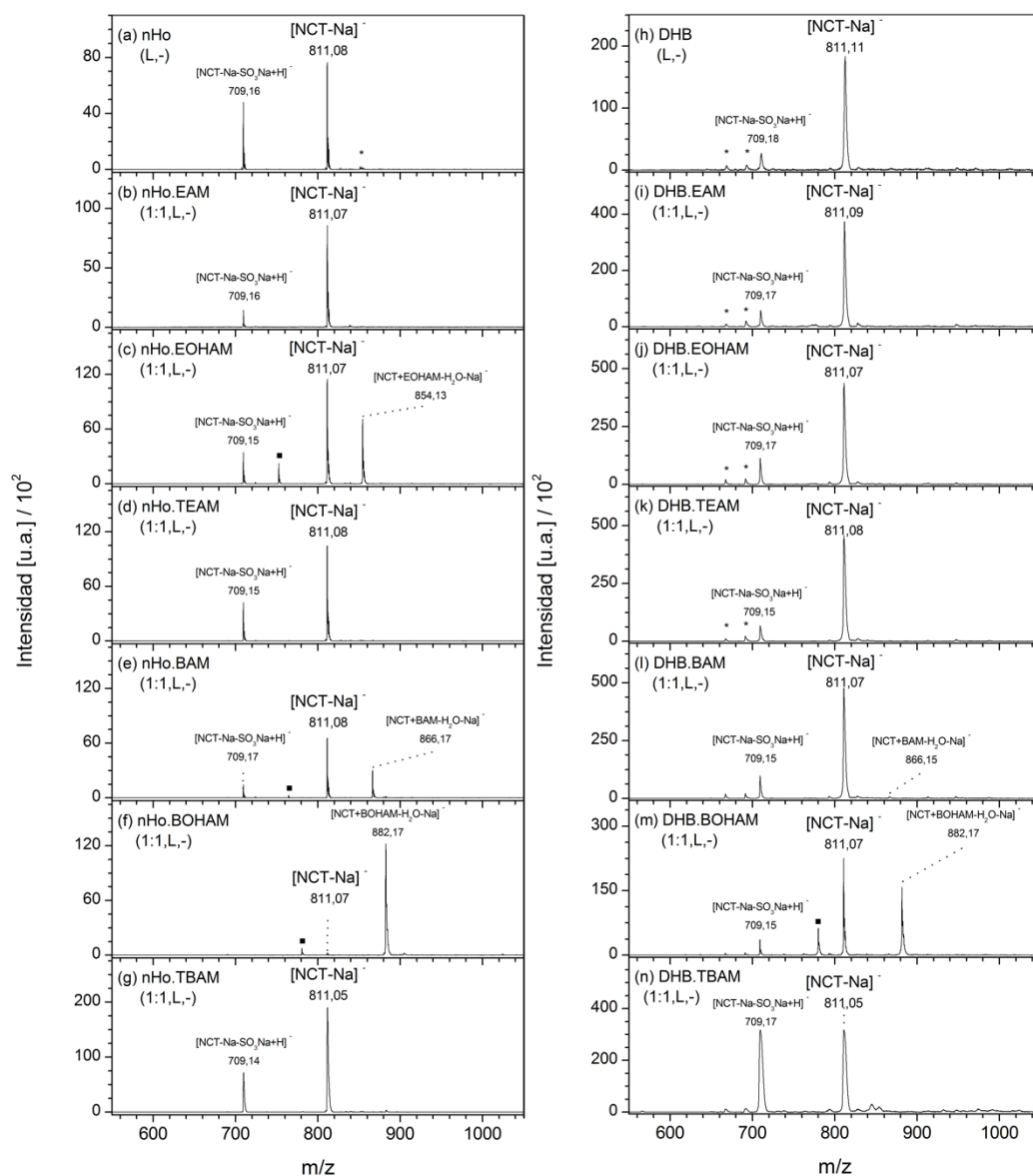


Figura A2.31. Espectros de masa MALDI. Analito: NCT. Matrices: (a) nHo, (b) nHo.EAM, (c) nHo.EOHAM, (d) nHo.TEAM, (e) nHo.BAM, (f) nHo.BOAM, (g) nHo.TBAM, (h) DHB, (i) DHB.EAM, (j) DHB.EOHAM, (k) DHB.TEAM, (l) DHB.BAM, (m) DHB.BOAM y (n) DHB.TBAM. LIs en relación molar ácido:amina 1:1. Modo lineal negativo (L, -). Fluencia del láser: 40%

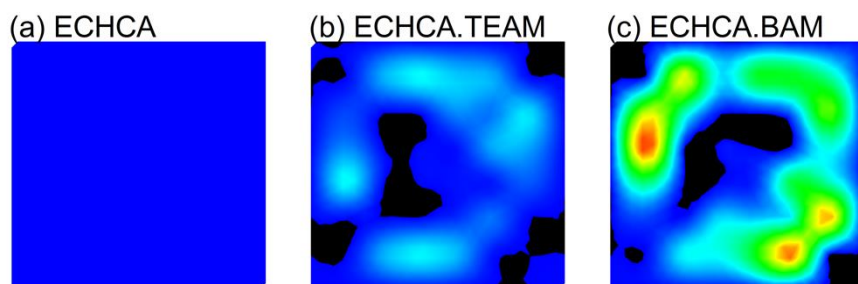


Figura A2.32. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCH. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 101×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich

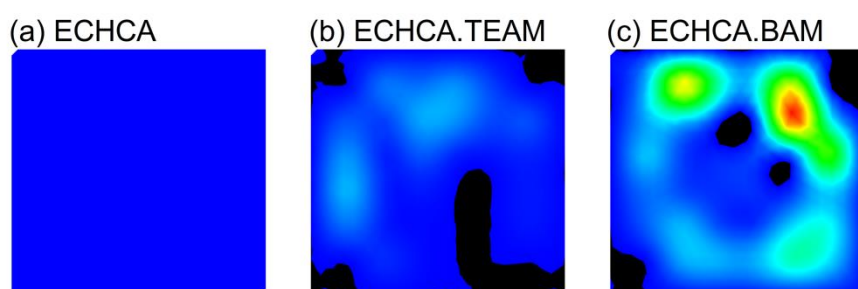


Figura A2.33. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCO. Matrices: (a) ECHCA, (b) ECHCA.TEAM y (c) ECHCA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 104×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método sándwich

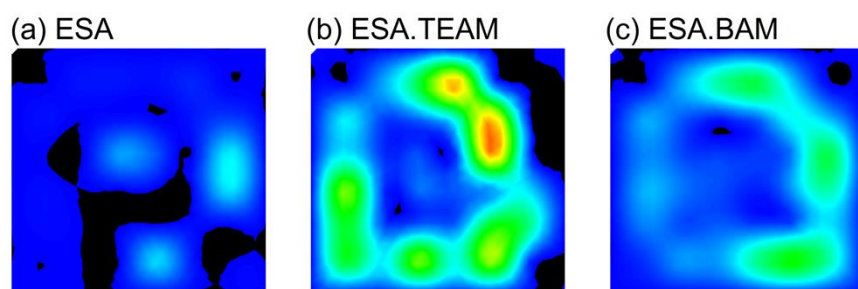


Figura A2.34. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) ESA, (b) ESA.TEAM y (c) ESA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 18×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla

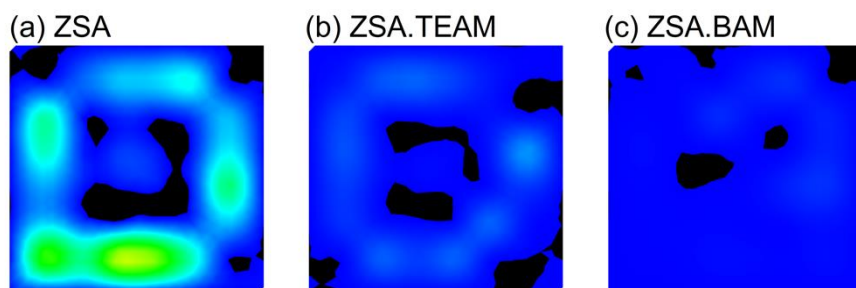


Figura A2.35. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) ZSA, (b) ZSA.TEAM y (c) ZSA.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 91×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla.

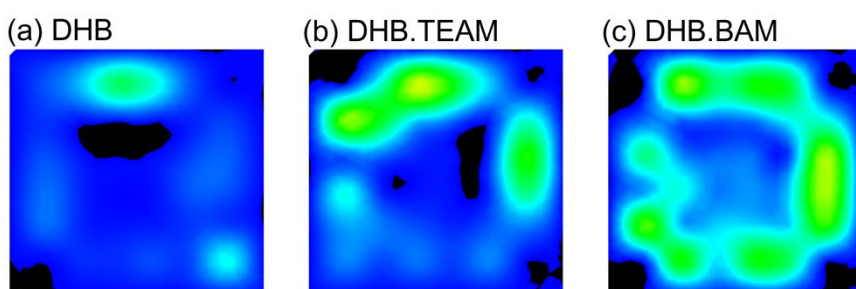


Figura A2.36. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) DHB, (b) DHB.TEAM y (c) DHB.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 70×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla.

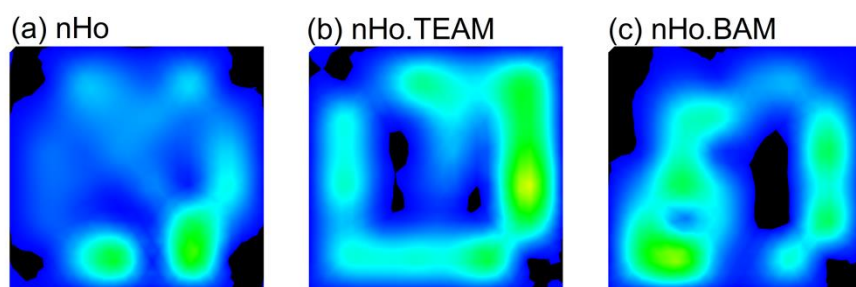


Figura A2.37. Mapa iónico molecular de la superficie de la muestra (imagen MALDI-MS). Ion monitoreado: $[M-Na]^+$. Analito: NCT. Matrices: (a) nHo, (b) nHo.TEAM y (c) nHo.BAM. Modo de análisis lineal negativo. Intensidad normalizada porcentual (Int. Máxima = 200×10^2 u.a.). Escala de intensidad 0% azul 100% rojo. Fluencia del láser: 40%. Preparación de la muestra: método mezcla.

Tabla A2.2. Límite de detección (LOD) y rango dinámico (linealidad) de NCT en modo iónico negativo. Ion monitoreado $[NCT-Na]^-$

| Nº | Matriz | NCT | |
|----|----------|------------------|-----------------------------|
| | | LOD ^a | Rango dinámico ^a |
| 1 | nHo | 24,95 | 24,95 a 490 |
| 2 | nHo.TEAM | 0,25 | 4,99 a 249,9 |
| 3 | nHo.BAM | 0,50 | 4,99 a 49,9 |
| 4 | DHB | 24,95 | 24,95 a 490 |
| 5 | DHB.TEAM | 4,99 | 4,99 a 249,5 |
| 6 | DHB.BAM | 4,99 | 4,99 a 490 |

^aLOD y Rango Dinámico. Indicado como pmol de analito depositado sobre el electrodo porta muestra; S/R ≥ 4 .

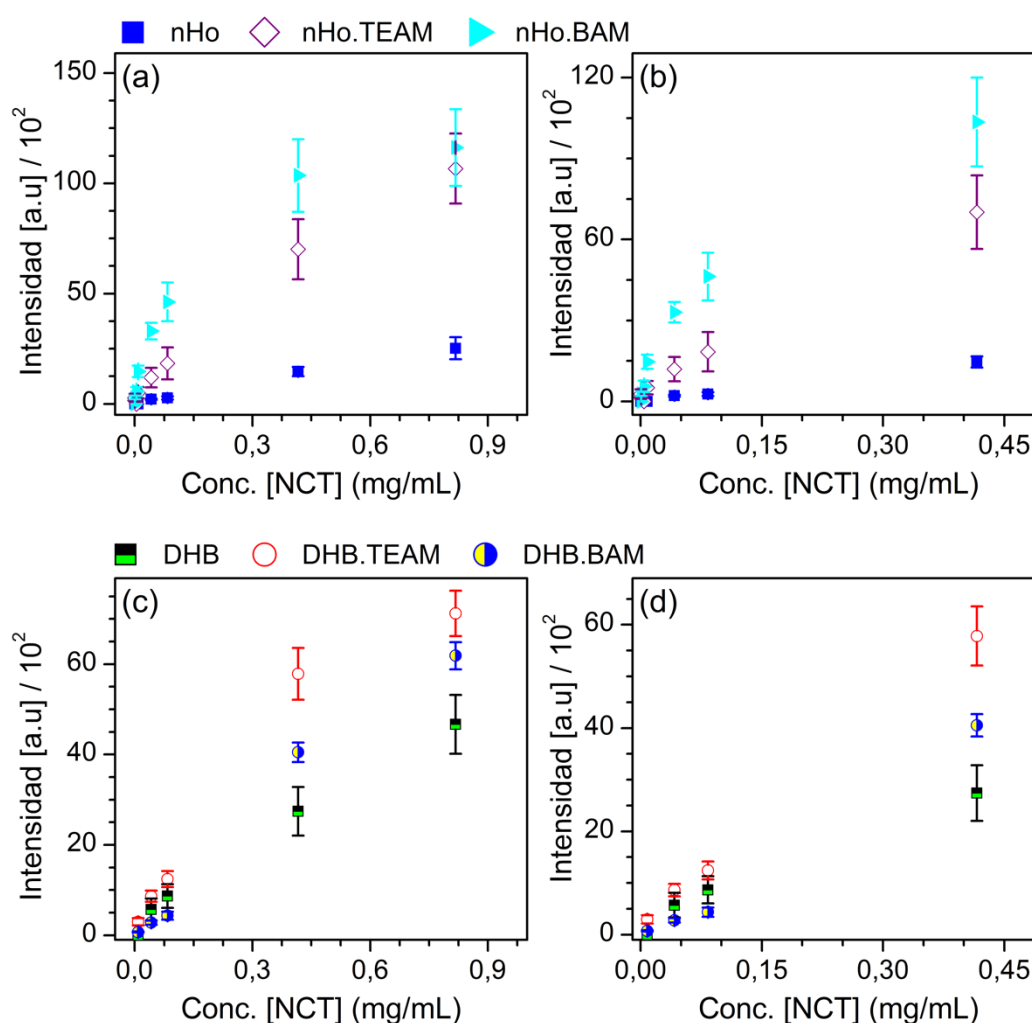


Figura A2.38. Intensidad absoluta vs. concentración. Analito: NCT. Ion monitoreado: $[NCT-Na]^-$. Matrices: (a,b) nHo, nHo.TEAM y nHo.BAM y (c,d) DHB, DHB.TEAM y DHB.BAM. Modo lineal negativo (L, -). (a,c,e) Todo el rango de concentraciones estudiado. (b,d,f) Ampliación de la región de comportamiento lineal.

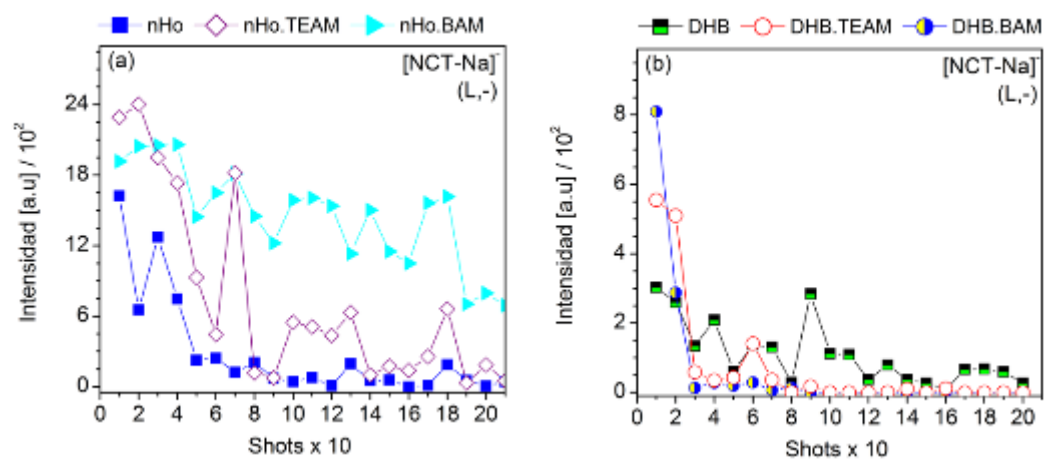


Figura A2.39. Estabilidad de las matrices. Intensidad del ion monitoreado vs. Número de disparos (*shots*). Analito: NCT. Ion monitoreado: [M-Na]⁺. Matrices: (a) nHo, nHo.TEAM, nHo.BAM y (b) DHB, DHB.TEAM, DHB.BAM. Modo lineal negativo (L, -).

Anexo 3: Capítulo 3 - Líquidos iónicos con norharmano como matrices en MALDI-MS. Análisis de hidratos de carbono de bajo peso molecular

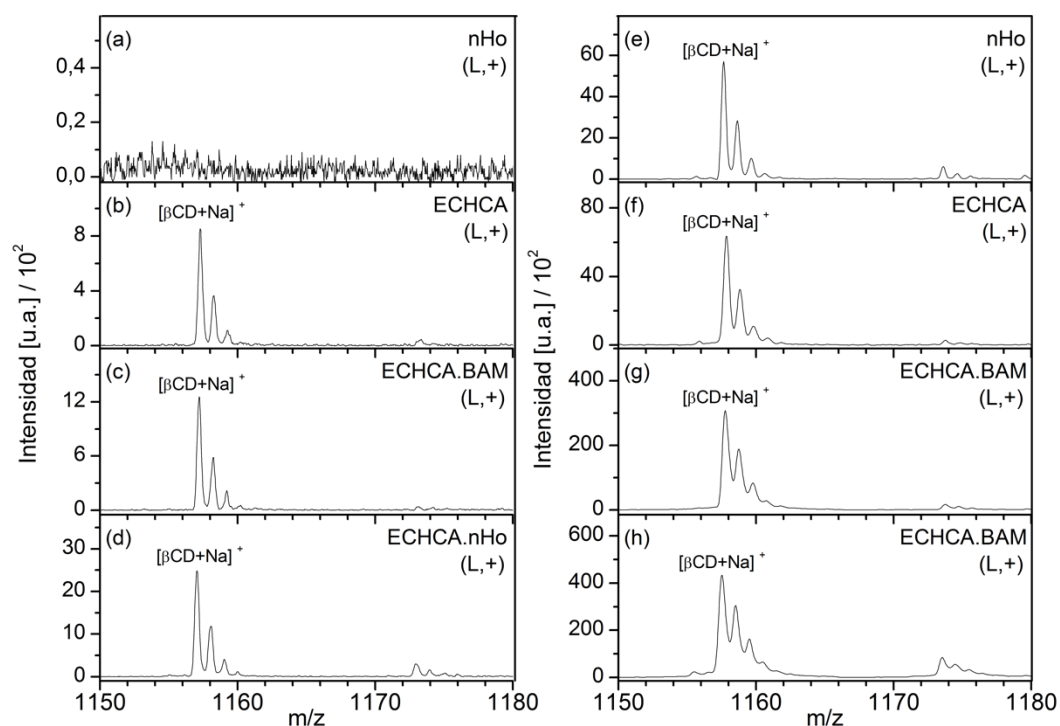


Figura A3.1. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD. Matriz: nHo (a, e), ECHCA (b, f), ECHCA.BAM (c, g) y ECHCA.nHo (d, h). Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 10 % (a-c) y 20 % (d-f). Ion diagnóstico: $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$.

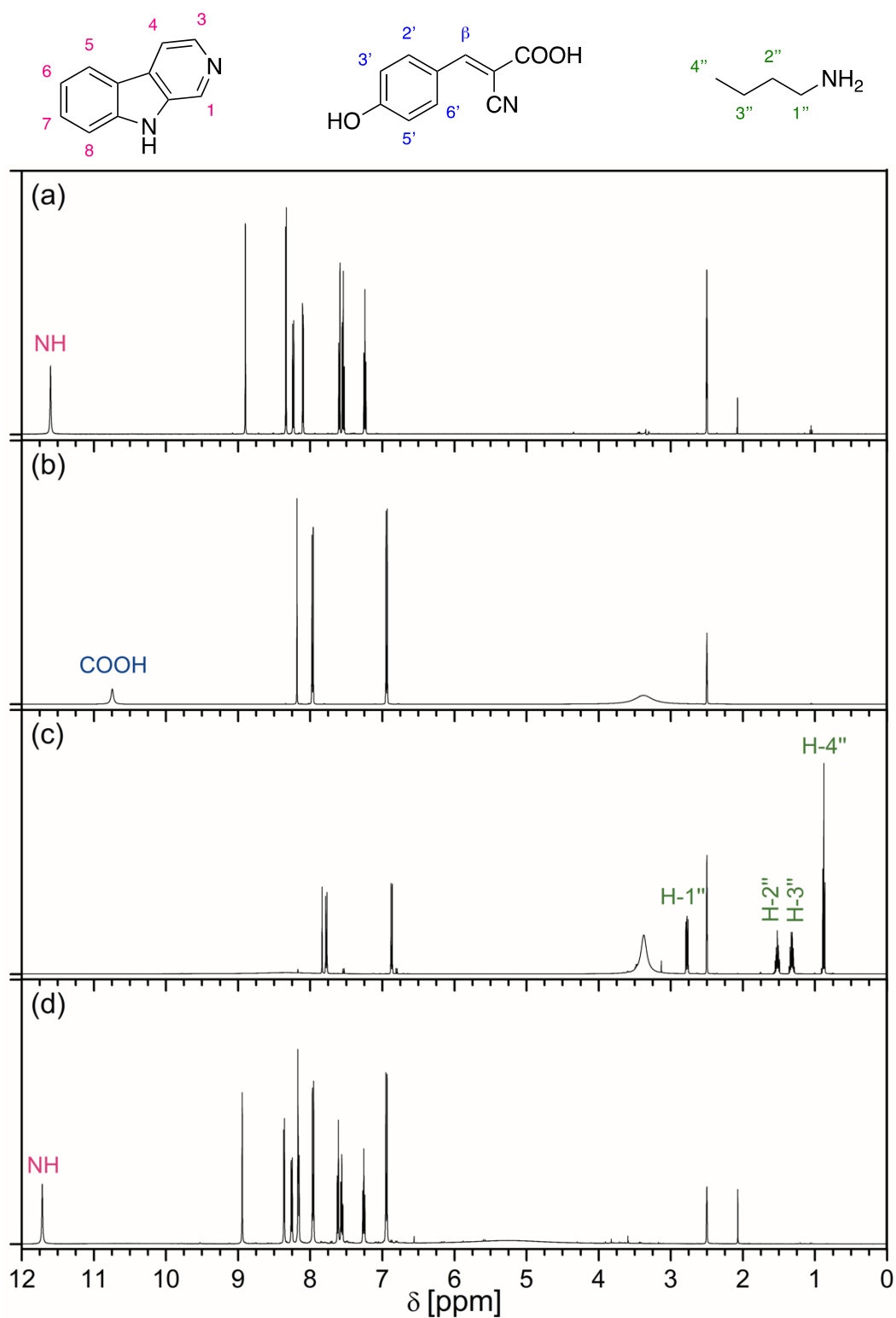


Figura A3.2. Espectros ^1H -RMN (δ 0-12 ppm). (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM y (d) ECHCA.nHo. Solvente: DMSO- d_6 . Bruker Advanced Neo 500 (500 MHz).

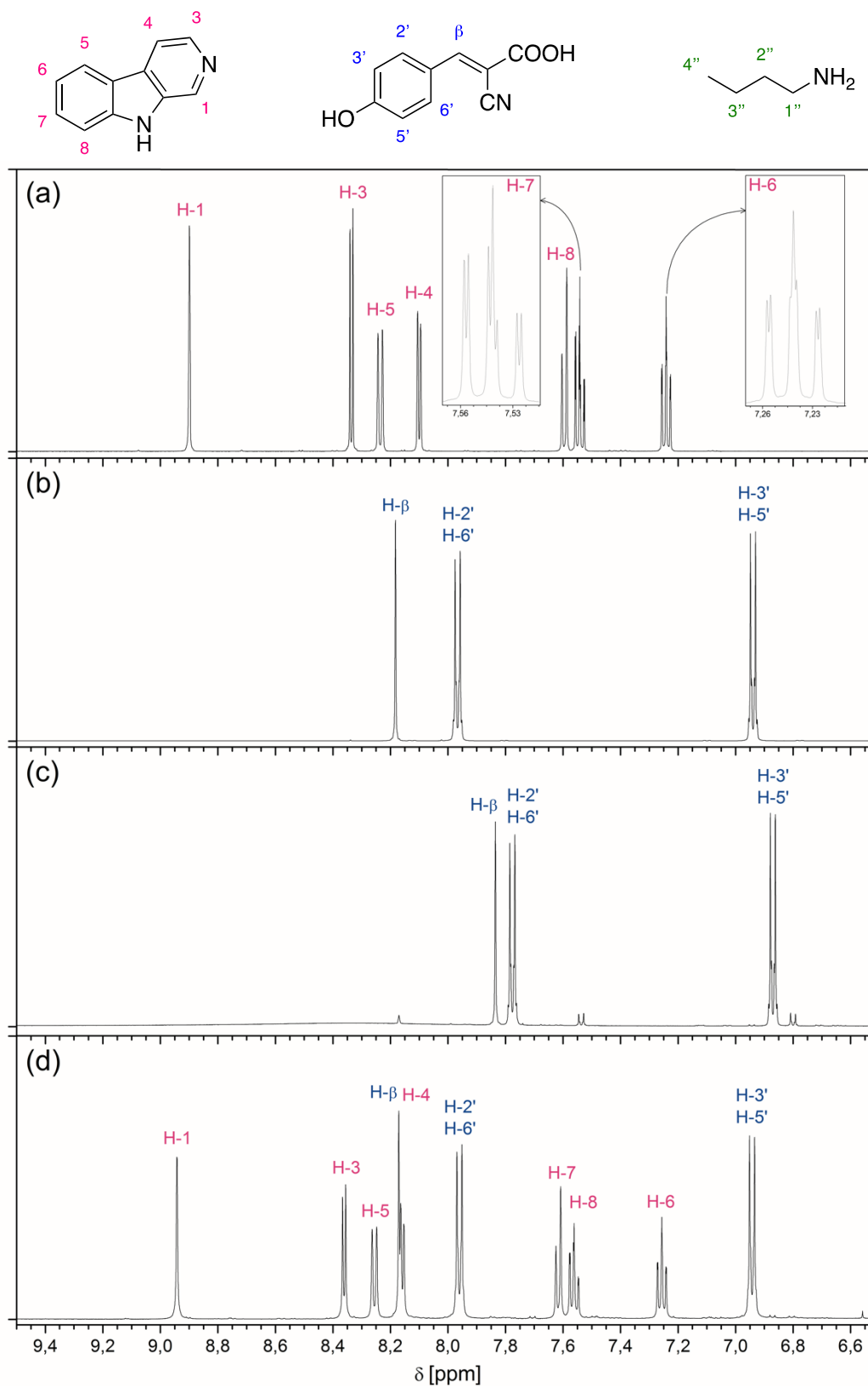


Figura A3.3. Espectros ^1H -RMN (δ 6,5-9,5 ppm). (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM y (d) ECHCA.nHo. Solvente: DMSO- d_6 . Bruker Advanced Neo 500 (500 MHz).

Asignación de las señales observadas por espectroscopía de ^1H -RMN, Figuras A3.2 y A3.3:

(a) nHo. Sólido cristalino, p.f. 202 °C^a (198-201 °C³⁶). ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,60 (s, 1H, NH), 8,90 (s, 1H, H-1), 8,34 (d, $J_{3-4} = 5,2$ Hz, 1H, H-3), 8,24 (d, $J_{5-6} = 7,7$ Hz, 1H, H-5), 8,10 (d, $J_{3-4} = 5,2$ Hz, 1H, H-4), 7,60 (d, $J_{7-8} = 8,3$ Hz, 1H, H-8), 7,54 (m, $J_{7-8} = 8,3$ Hz, $J_{6-7} = 6,9$, $J_{5-7} = 1,2$ Hz, 1H, H-7) y 7,24 (m, $J_{6-7} = 6,9$, $J_{5-6} = 7,7$, $J_{6-8} = 1,1$ Hz, 1H, H-6).

(b) ECHCA. Sólido cristalino, p.f. 264 °C^a (245-250 °C (D)^b). ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,74 (s, 1H, -COOH), 8,18 (s, 1H, H- β), 7,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3' y H-5') y 3,4 (singlete ancho, OH).

(c) ECHCA.BAM Sólido, p.f. 178 °C^a (170-172 °C^b). ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,84 (s, 1H, H- β), 7,78 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3' y H-5'), 2,77 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-1''), 1,52 (q, 2H, H-2''), 1,33 (h, 2H, H-3''), 0,88 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-4'') y 3,4 (singlete ancho, OH).

(d) ECHCA.nHo Sólido, p.f. 168 °C^a, 165-166 °C^c. ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,71 (s, 1H, NH), 8,94 (s, 1H, H-1), 8,36 (d, $J_{3-4} = 5,3$ Hz, 1H, H-3), 8,25 (d, $J_{5-6} = 7,8$ Hz, 1H, H-5), 8,19 – 8,12 (m, 2H, H- β y H-4), 7,96 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 7,62 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-8), 7,57 (m, $J_{7-8} = 8,2$ Hz, $J_{6-7} = 8,1$, $J_{5-7} = 1,0$ Hz, 1H, H-7), 7,26 (m, $J_{6-7} = 8,1$, $J_{5-6} = 7,8$, $J_{6-8} = 1,1$ Hz, 1H, H-6), 6,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3' y H-5').

^a p.f. estimado por DSC – Capítulo 4

^b p.f. indicado por el fabricante, Sigma-Aldrich

^c p.f. medido en el equipo Fisher-Johns

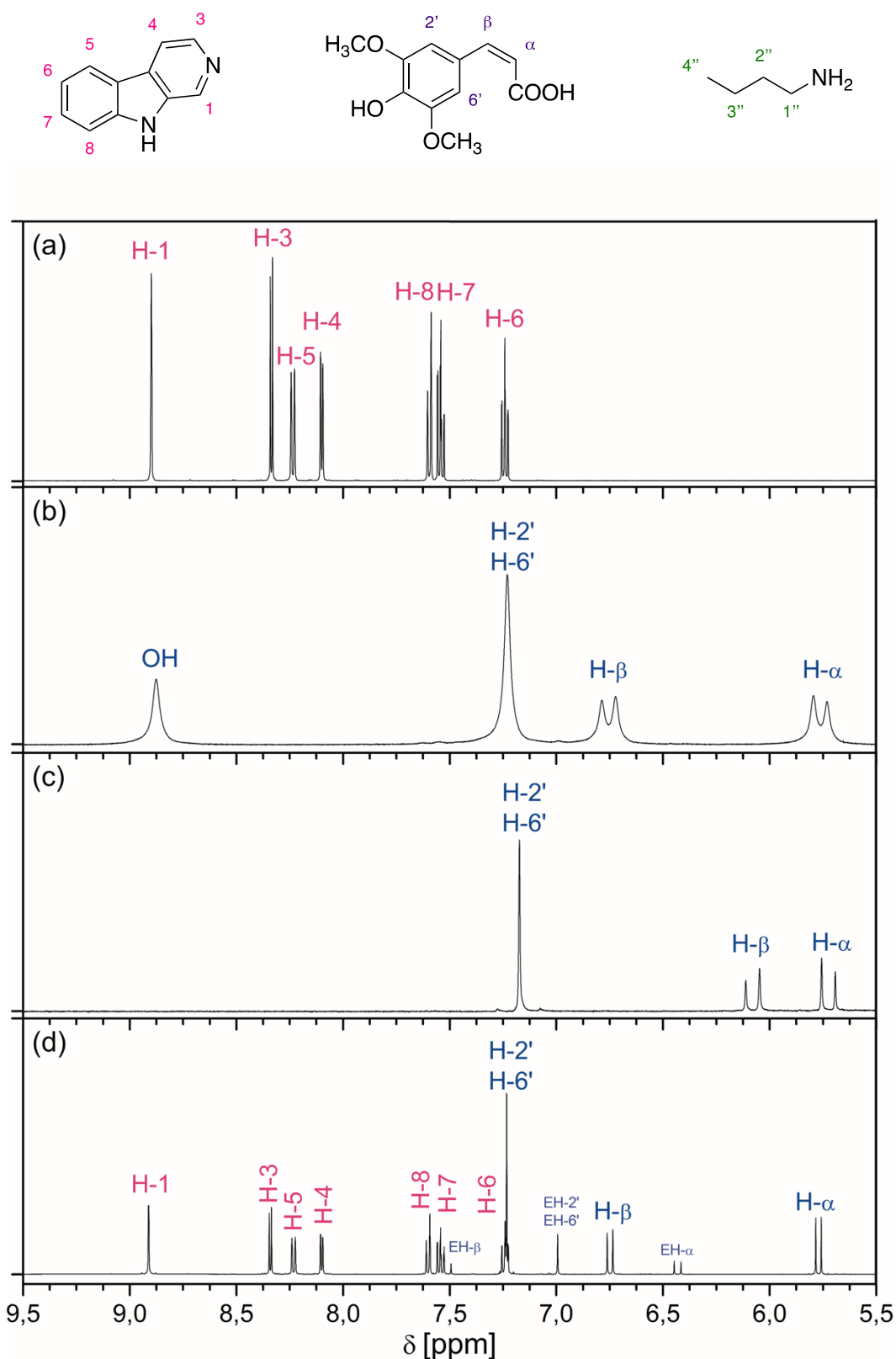


Figura A3.4. Espectros ^1H -RMN (δ 6,5–9,5 ppm). (a) nHo, (b) ZSA, (c) ZSA.BAM y (d) ZSA.nHo. Solvente: DMSO- d_6 . (a y d) 500 MHz, (b y c) 200 MHz.

Asignación de las señales observadas por espectroscopía de ^1H -RMN, Figura A3.4:

(a) Idem Figura A3.2.

(b) ZSA. Sólido cristalino, p.f. 114-117 $^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$ (116-118 $^{\circ}\text{C}^{\text{b}}$). ^1H -RMN (200 MHz, DMSO- d_6) δ 12,35 (s, 1H, -COOH), 8,88 (s, 1H, -OH), 7,23 (s, 2H, H-2' y H-6'), 6,75 (d, $J = 13,0$ Hz, 1H, H- β), 5,76 (d, $J = 13,0$ Hz, 1H, H- α), 3,75 (s, 6H, -OCH₃).

(c) ZSA.BAM. Sólido, p.f. 132 $^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$. ^1H -RMN (200 MHz, DMSO- d_6) δ 7,17 (s, 1H, H-2' y H-6'), 6,08 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, H- β), 5,72 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, H- α), 4,06 (s, señal ancha NH), 3,71 (s, 6H, -OCH₃), 2,67 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-1''), 1,47 (q, 2H, H-2''), 1,26 (h, 2H, H-3''), 0,85 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, H-4'').

(d) ZSA.nHo. Sólido, p.f. 135-137 $^{\circ}\text{C}^{\text{c}}$. ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,61 (s, 1H, NH), 8,92 (s, 1H, H-1), 8,35 (d, $J_{3-4} = 5,2$ Hz, 1H, H-3), 8,23 (d, $J_{5-6} = 7,9$ Hz, 1H, H-5), 8,10 (d, $J_{3-4} = 5,2$ Hz, 1H, H-4), 7,60 (d, $J_{7-8} = 8,2$ Hz, 1H, H-8), 7,53 (t, $J_{7-8} = 8,2$ Hz, 1H, H-7), 7,26-7,23 (m, 3H, H-6, H-2' y H-6'), 6,75 (d, $J = 13,0$ Hz, 1H, H- β), 5,77 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, H- α), 3,75 (s, 6H, -OCH₃). Impureza ESA (10%) δ 7,52 (d, $J_{\alpha-\beta} = 16,0$ Hz, 1H, H- β (ESA)), 6,99 (s, 2H, H-2'(ESA) y H-6'(ESA)), 6,43 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H- α (ESA)), 3,80 (s, 3H, -OCH₃(ESA)).

^a p.f. estimado por DSC – Capítulo 4

^b p.f. indicado por el fabricante, Sigma-Aldrich

^c p.f. medido en el equipo Fisher-Johns

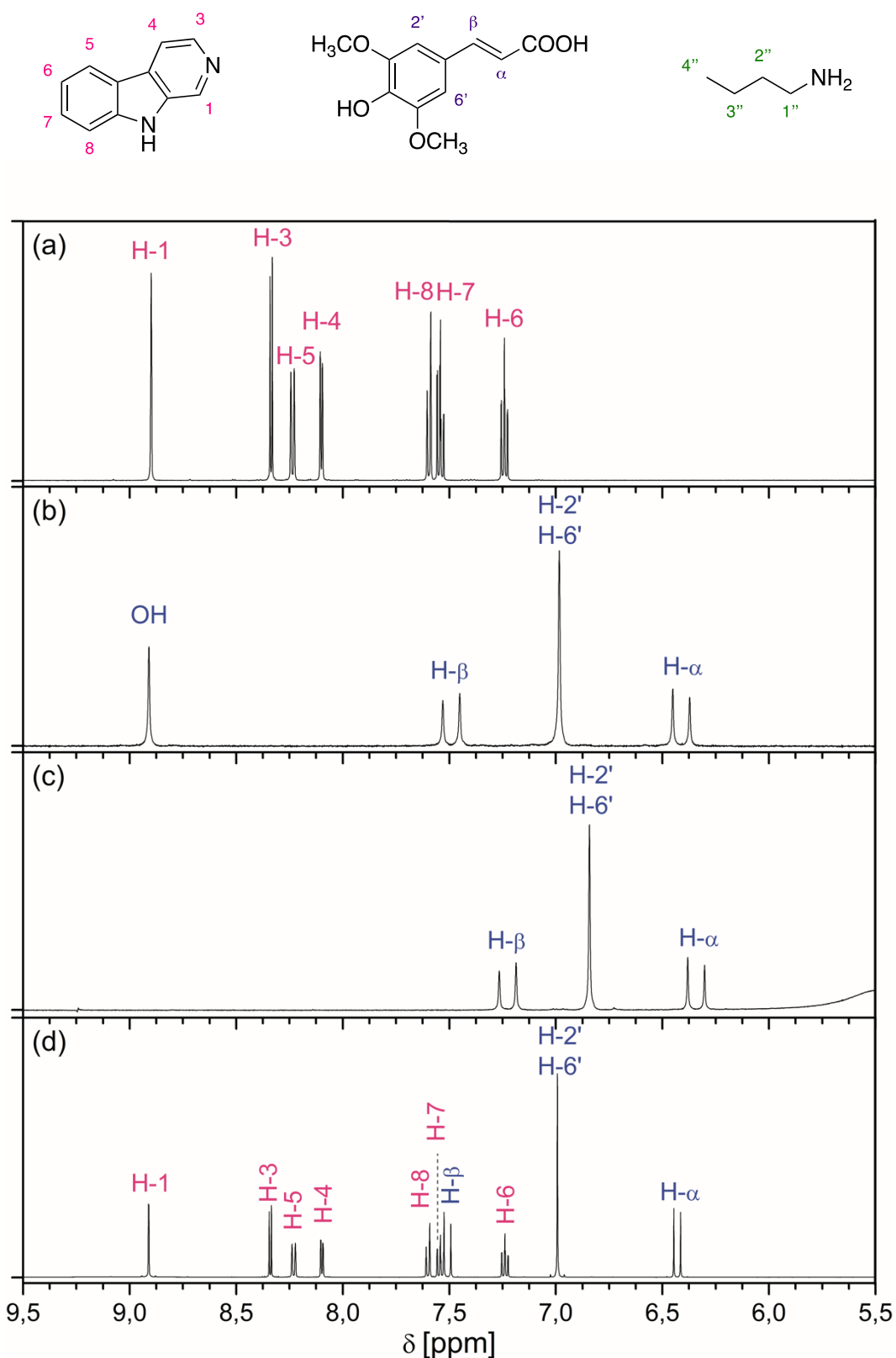


Figura A3.5. Espectros ¹H-RMN (δ 6,5-9,5 ppm). (a) nHo, (b) ESA, (c) ESA.BAM y (d) ESA.nHo. Solvente: DMSO-d₆. (a y d) 500 MHz, (b y c) 200 MHz.

Asignación de las señales observadas por espectroscópica de ^1H -RMN, Figura A3.5:

(a) Idem Figura A3.2.

(b) ESA. Sólido cristalino, p.f. 195-202 °C^a (202 °C^b). ^1H -RMN (200 MHz, DMSO- d_6) δ 12,13 (s, 1H, -COOH), 8,91 (s, 1H, -OH), 7,49 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H- β), 6,98 (s, 2H, H-2' y H-6'), 6,41 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H- α) y 3,78 (s, 6H, -OCH₃).

(c) ESA.BAM. Sólido, p.f. 145 °C^a (124-127 °C¹). ^1H -RMN (200 MHz, DMSO- d_6) δ 7,23 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- β), 6,84 (s, 2H, H-2' y H-6'), 6,34 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H- α), 5,49 (s, señal ancha NH), 3,77 (s, 6H, -OCH₃), 2,71 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, H-1''), 1,50 (q, 2H, H-2''), 1,31 (h, 2H, H-3'') y 0,86 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, H-4'').

(d) ESA.nHo. Sólido, p.f. 140-142 °C^c. ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,61 (s, 1H, NH), 8,91 (s, 1H, H-1), 8,34 (d, $J_{3-4} = 5,2$ Hz, 1H, H-3), 8,24 (d, $J_{5-6} = 6,9$ Hz, 1H, H-5), 8,10 (d, $J_{3-4} = 5,2$ Hz, 1H, H-4), 7,60 (d, $J_{7-8} = 8,2$ Hz, 1H, H-8), 7,55 - 7,49 (m, $J_{7-8} = 8,2$ Hz, $J_{\alpha-\beta} = 15,9$ Hz, 2H, H-7 y H- β), 7,24 (m, $J_{6-7} = 7,9$, $J_{5-6} = 6,9$, $J_{6-8} = 1,1$ Hz, 1H, H-6), 6,99 (s, 2H, H-2' y H-6'), 6,43 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H- α) y 3,80 (s, 6H, -OCH₃).

^a p.f. estimado por DSC – Capítulo 4

^b p.f. indicado por el fabricante, Sigma-Aldrich

^c p.f. medido en el equipo Fisher-Johns

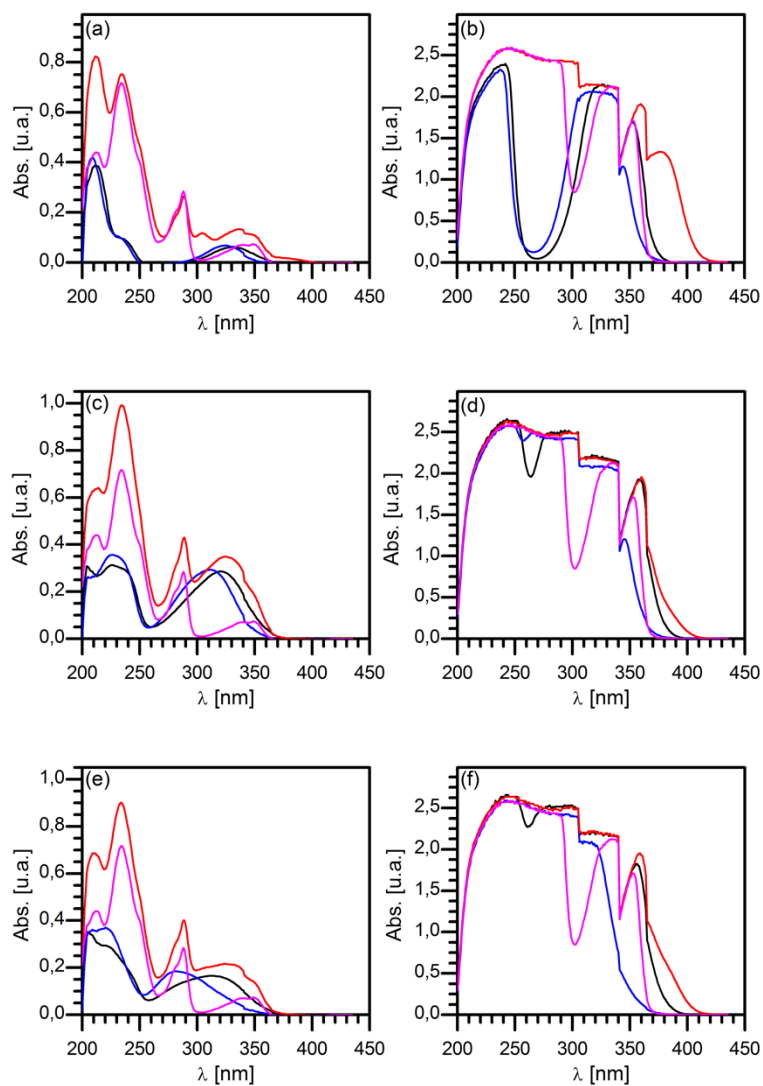


Figura A3.6. Espectros de Absorción UV-Vis para las matrices ácidas (negro), nHo (rosa) y los LIMs ácido.BAM (azul) y ácido.nHo (rojo) para los ácidos: (a, b) DHB, (c, d) ESA y (e, f) ZSA. Solvente: metanol. Concentraciones: (a, c y e) 2×10^{-5} M y (b, d y f) 2×10^{-3} M.

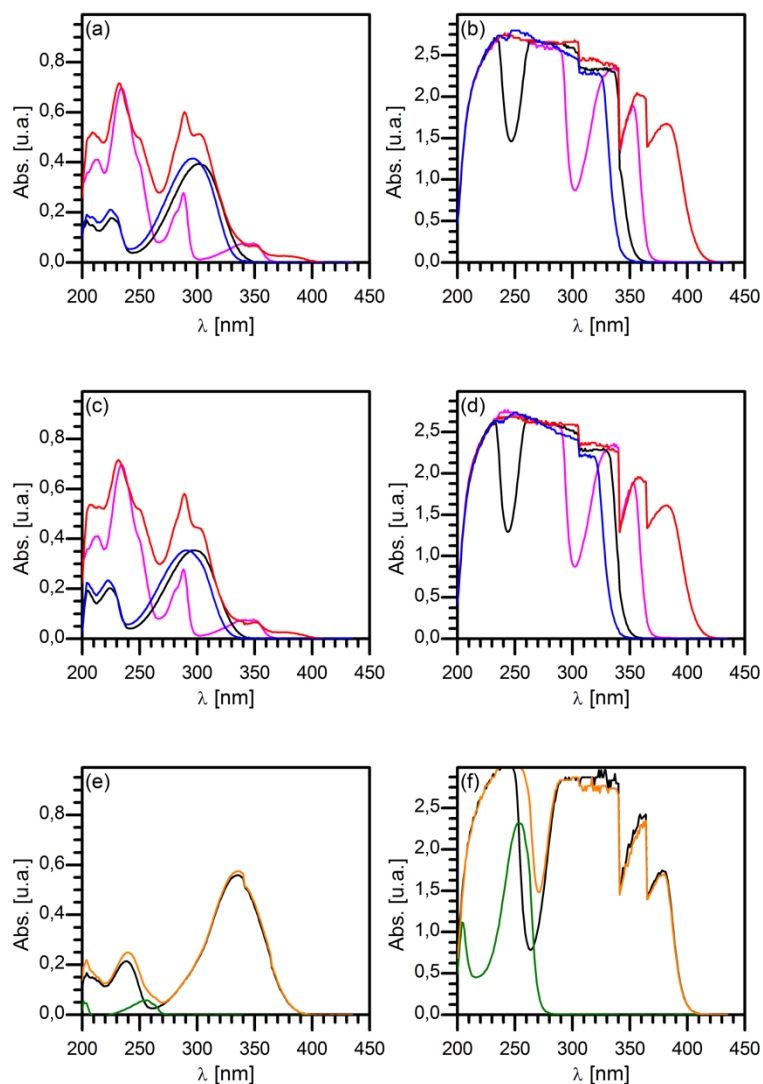


Figura A3.7. Espectros de Absorción UV-Vis para las matrices: (a-d) ácidas (negro), nHo (rosa) y los LIMs ácido.BAM (azul) y ácido.nHo (rojo) para los ácidos: (a, b) E-4ClCHCA, (c, d) E-4FCHCA. (e,f) ECHCA (negro), Piridina (verde) y ECHCA.Py (naranja). Solvente: metanol. Concentraciones: (a, c y e) 2×10^{-5} M, (b, d y f) 2×10^{-3} M.

Tabla A3.1. Espectro de absorción UV-Visible de las matrices estudiadas. Solvente metanol. (h)=hombro.

| Matriz | $\epsilon (\lambda 310 \text{ nm})$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] | $\epsilon (\lambda 355 \text{ nm})$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] | $\epsilon (\lambda_{\text{max}})$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] | λ_{max} [nm] |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| nHo | 8,49 x10² | 2,59 x10³ | 1,02 x10⁴ | 282(h) |
| | | | 1,31 x10 ⁴ | 288 |
| | | | 3,47 x10 ³ | 338 |
| | | | 3,66 x10 ³ | 349 |
| ECHCA | 1,29 x10 ⁴ | 1,19 x10 ⁴ | 1,79 x10 ⁴ | 332 |
| ECHCA.nHo | 1,67 x10 ⁴ | 1,45 x10 ⁴ | 1,79 x10 ⁴ | 288 |
| | | | 1,65 x10 ⁴ | 307(h) |
| | | | 2,14 x10 ⁴ | 334(h) |
| ECHCA.BAM | 1,57 x10 ⁴ | 5,17 x10 ³ | 2,00 x10 ⁴ | 324 |
| E-4ClCHCA | 1,70 x10 ⁴ | 0 | 1,82 x10 ⁴ | 300 |
| E-4ClCHCA.nHo | 2,00 x10 ⁴ | 2,55 x10 ³ | 2,78 x10 ⁴ | 288 |
| | | | 2,37 x10 ⁴ | 300(h) |
| | | | 3,10 x10 ³ | 349 |
| E-4ClCHCA.BAM | 1,55 x10 ⁴ | 0 | 1,92 x10 ⁴ | 296 |
| E-4FCHCA | 1,38 x10 ⁴ | 0 | 1,64 x10 ⁴ | 297 |
| E-4FCHCA.nHo | 1,57 x10 ⁴ | 2,59 x10 ³ | 2,69 x10 ⁴ | 288 |
| | | | 2,08 x10 ⁴ | 297(h) |
| | | | 3,06 x10 ³ | 349 |
| E-4FCHCA.BAM | 1,33 x10 ⁴ | 0 | 1,63 x10 ⁴ | 290 |
| DHB | 1.44 x10 ³ | 1,04 x10 ³ | 3,07 x10 ³ | 331 |
| DHB.nHo | 5,05 x10 ³ | 4,06 x10 ³ | 1,32 x10 ⁴ | 288 |
| | | | 5,84 x10 ³ | 305(h) |
| | | | 6,58 x10 ³ | 336 |
| DHB.BAM | 2,18 x10 ³ | 1,49 x10 ² | 3,32 x10 ³ | 324 |
| ESA | 1,31 x10 ⁴ | 5,00 x10 ³ | 1,43 x10 ⁴ | 320 |
| ESA.nHo | 1,50 x10 ⁴ | 6,35 x10 ³ | 2,14 x10 ⁴ | 288 |
| | | | 1,75 x10 ⁴ | 325 |
| ESA.BAM | 1,46 x10 ⁴ | 1,00 x10 ³ | 1,47 x10 ⁴ | 312 |
| ZSA | 8,17 x10 ³ | 1,93 x10 ³ | 8,17 x10 ³ | 312 |
| ZSA.nHo | 1,00 x10 ⁴ | 4,85 x10 ³ | 1,99 x10 ⁴ | 288 |
| | | | 1,20 x10 ⁴ | 328 |
| ZSA.BAM | 6,04 x10 ³ | 4,26 x10 ² | 9,11 x10 ³ | 280 |

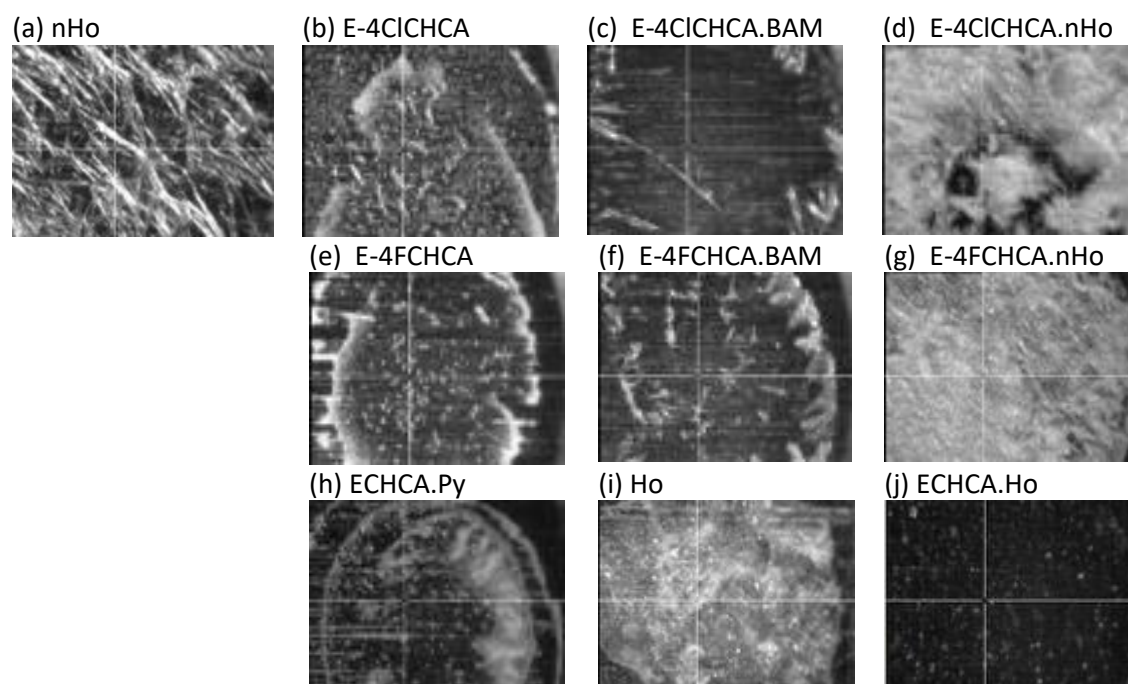


Figura A3.8. Imágenes ópticas de las matrices MALDI depositadas sobre el electrodo porta muestras. Solvente: agua:metanol 35:65 v/v Imagen tomada en el centro del *spot*.

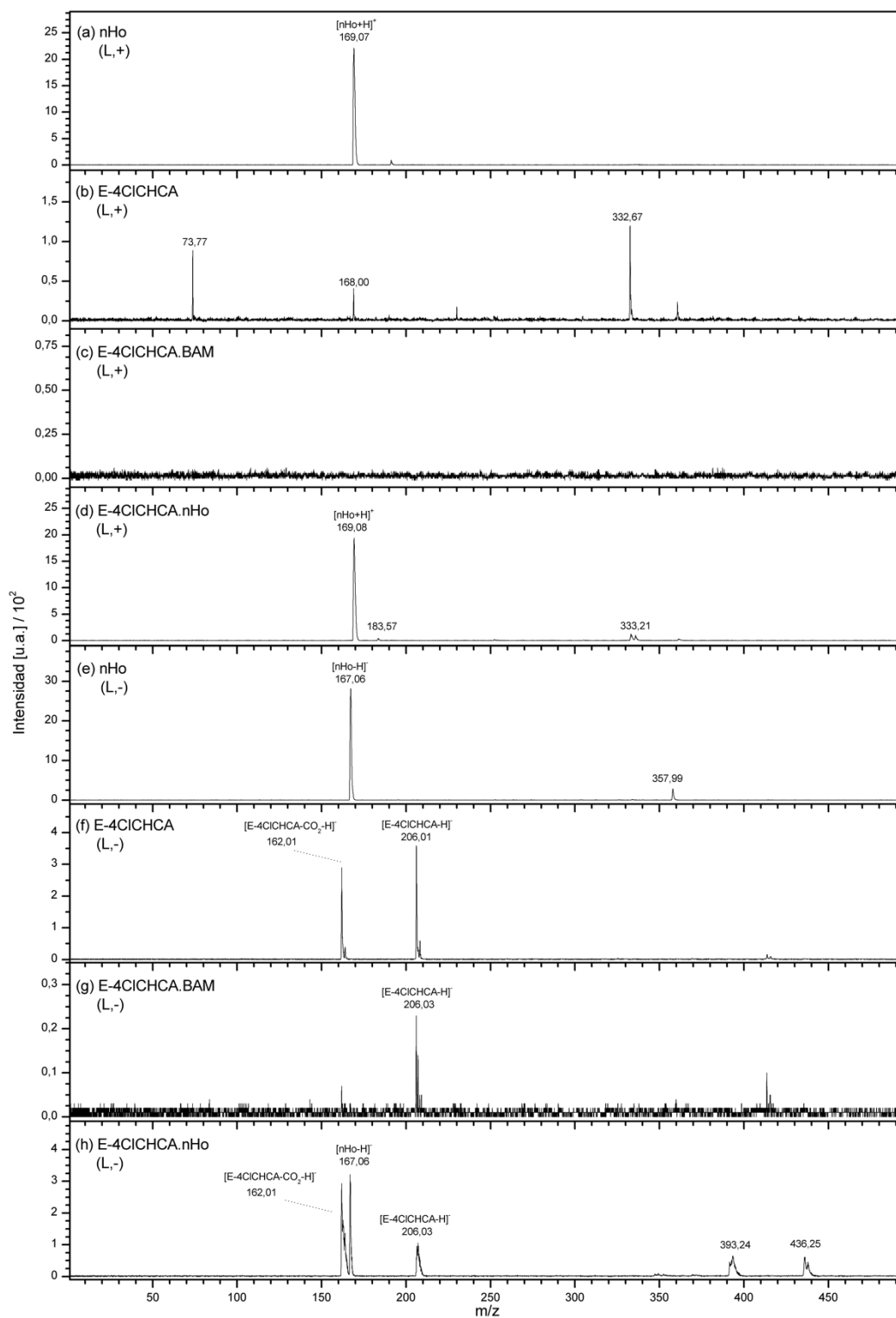


Figura A3.9. Espectros de masa LDI: (a,e) nHo, (b,f) E-4ClCHCA, (c,g) E-4ClCHCA.BAM y (d,h) E-4ClCHCA.nHo. Modo lineal positivo (L,+) a-d; Modo lineal negativo (L,-) e-h. Rango: m/z 0 a 500. Fluencia del láser: 40%.

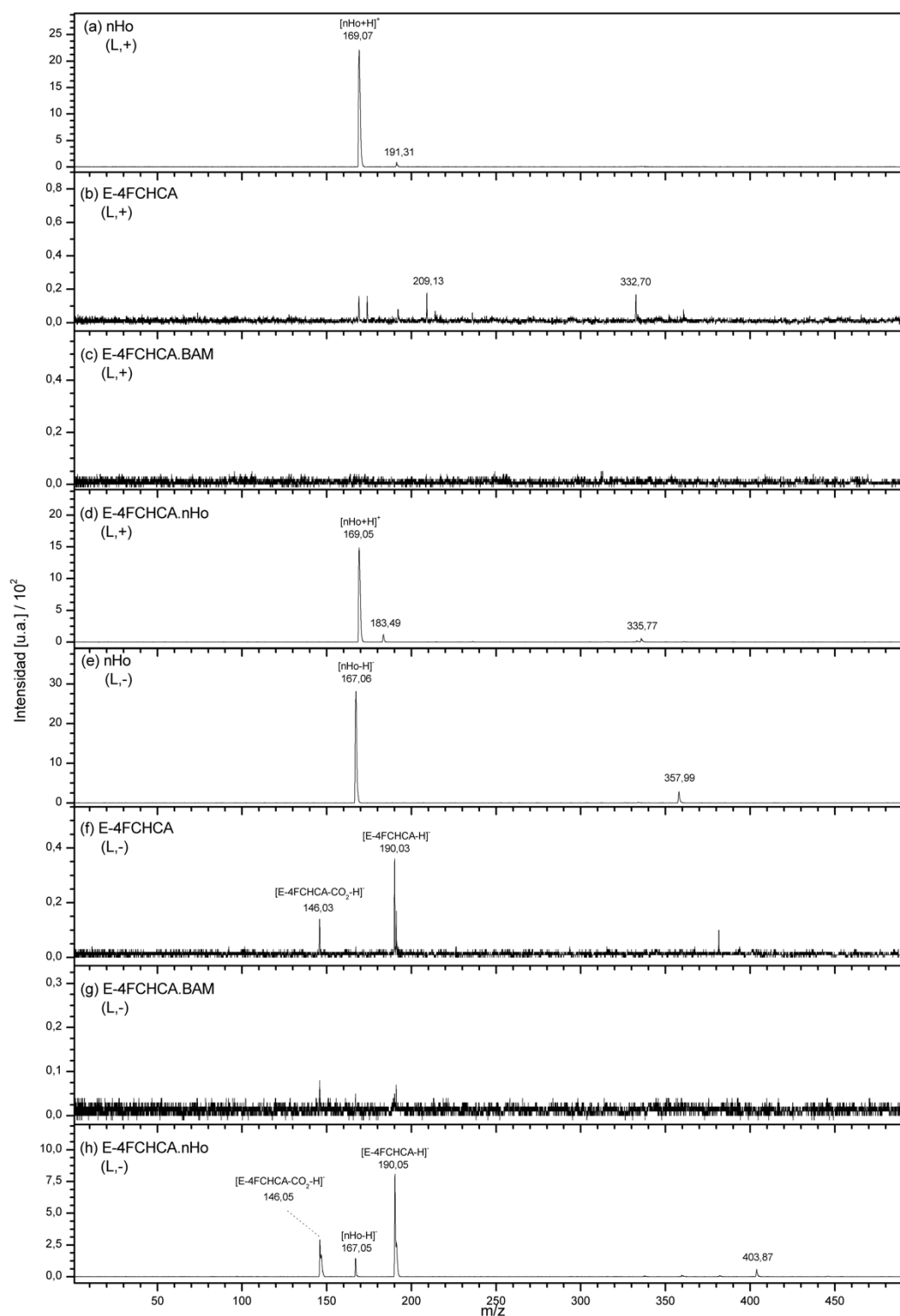


Figura A3.10. Espectros de masa LDI: (a,e) nHo, (b,f) E-4FCHCA, (c,g) E-4FCHCA.BAM y (d,h) E-4FCHCA.nHo. Modo lineal positivo (L,+): a-d; modo lineal negativo (L,-): e-h. Rango: m/z 0 a 500. Fluencia del láser: 40%.

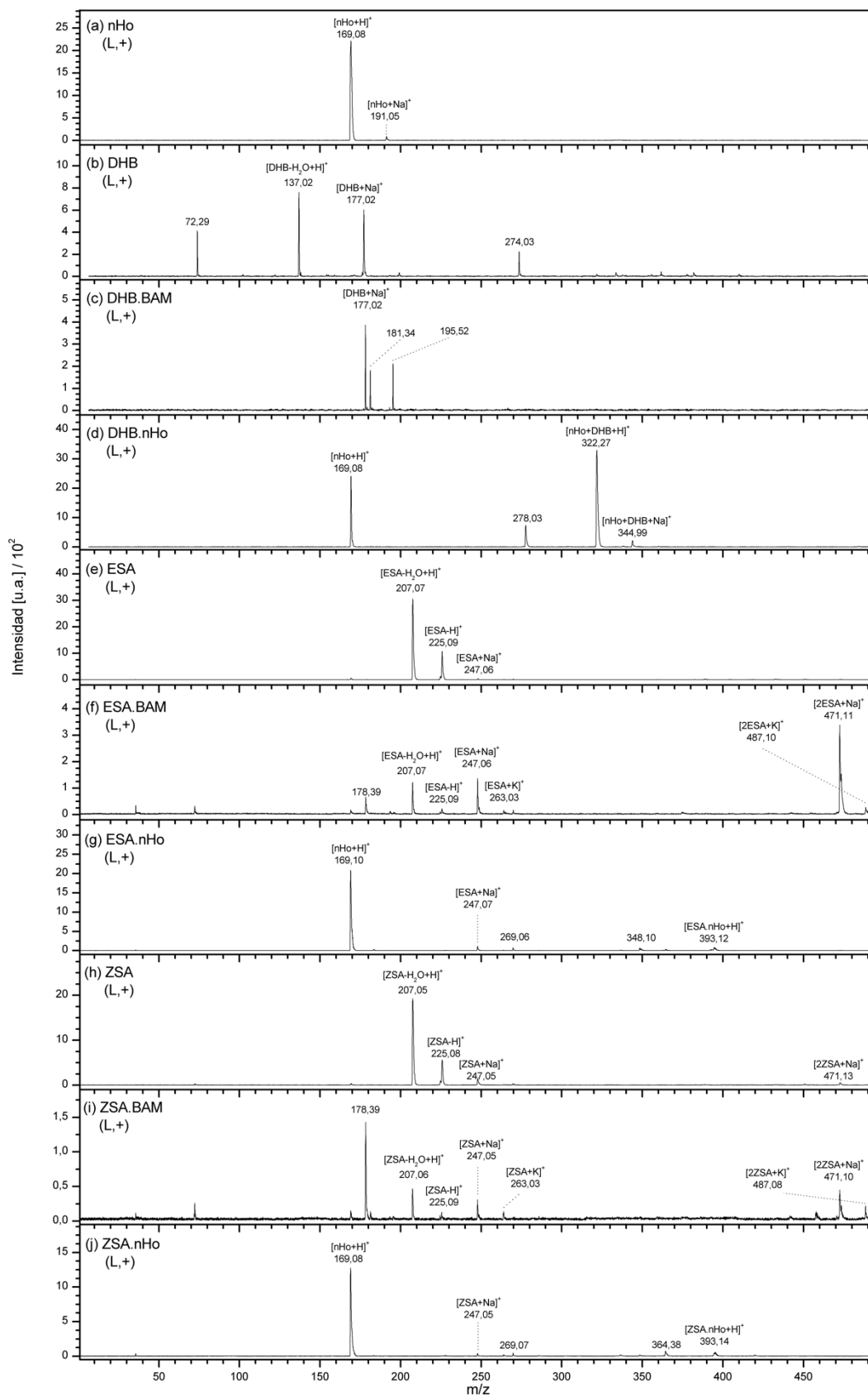


Figura A3.11. Espectros de masa LDI: (a) nHo, (b) DHB, (c) DHB.BAM, (d) DHB.nHo, (e) ESA, (f) ESA.BAM, (g) ESA.nHo, (h) ZSA, (i) ZSA.BAM y (j) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L,+). Rango: m/z 0 a 500. Fluencia del láser: 40%.

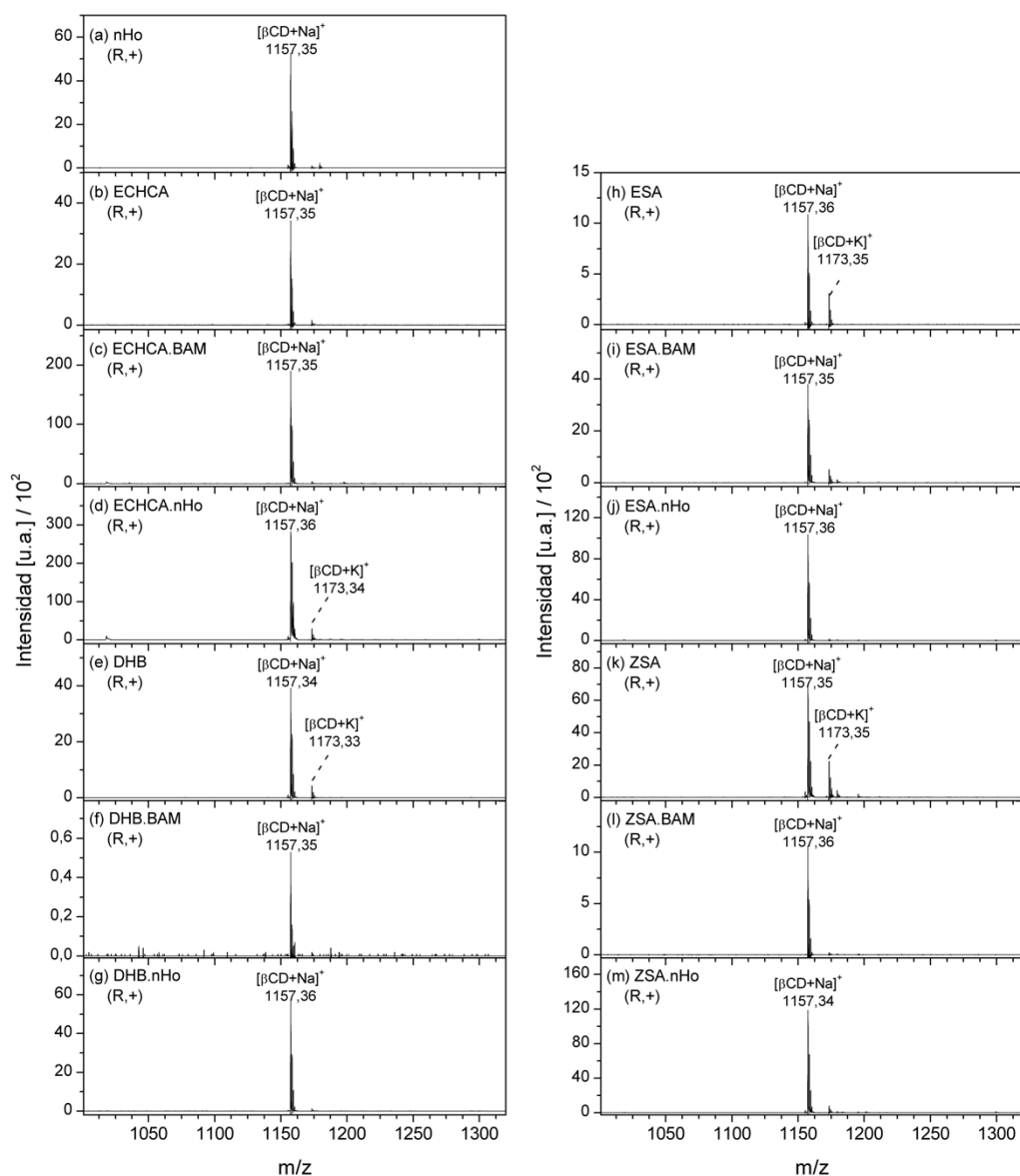


Figura A3.12. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD. Matrices: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM, (d) ECHCA.nHo, (e) DHB, (f) DHB.BAM, (g) DHB.nHo, (h) ESA, (i) ESA.BAM, (j) ESA.nHo, (k) ZSA, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.nHo. Modo reflectrón positivo (R, +). Fluencia del láser: 20%. Ion diagnóstico: $[\beta\text{CD}+\text{Na}]^+$.

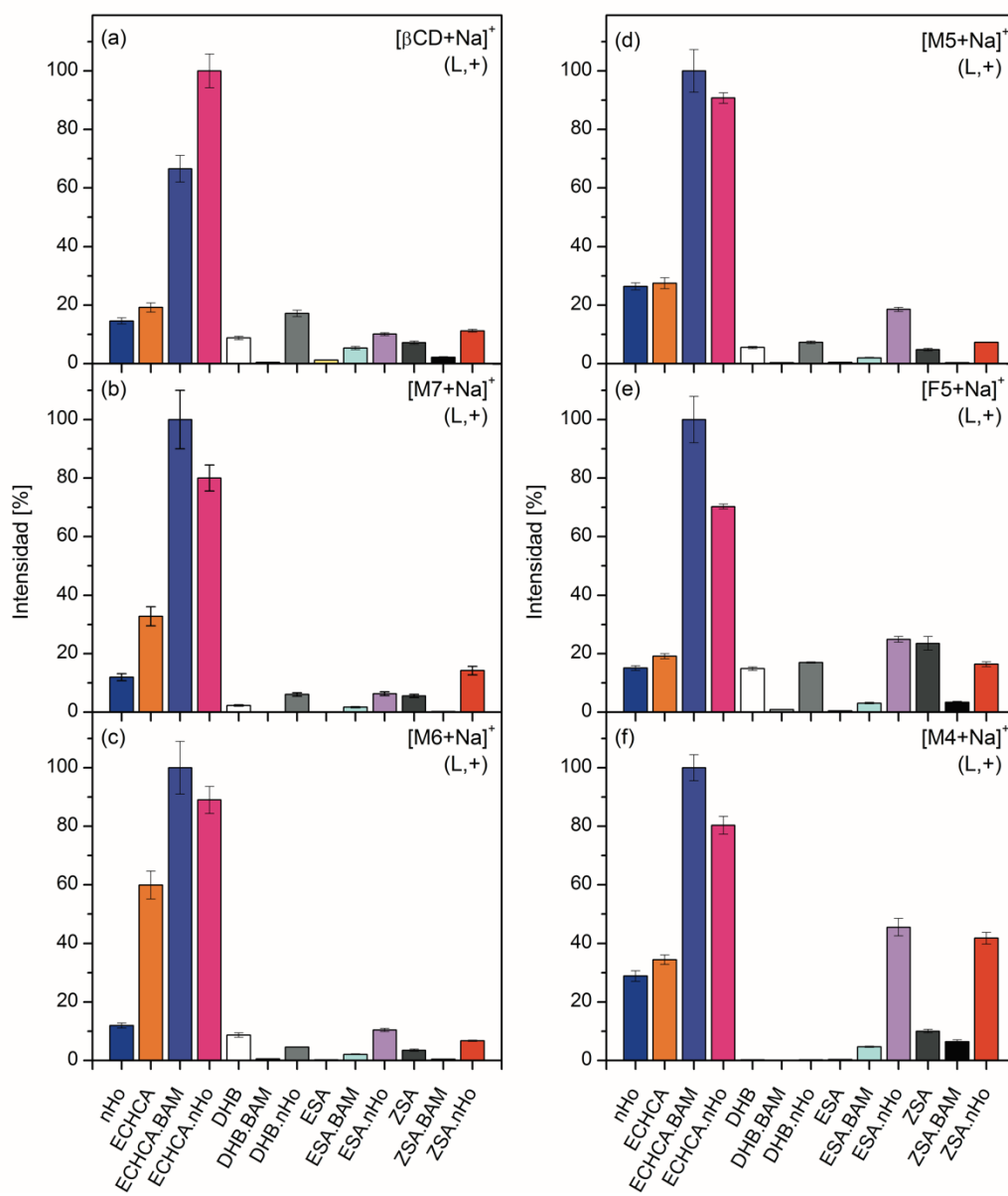


Figura A3.13. Intensidad normalizada del ion $[M+Na]^+$ en función de las matrices estudiadas para los hidratos de carbono: (a) β CD, (b) M7, (c) M6, (d) M5, (e) F5 y (f) M4. Modo lineal positivo (L,+). Fluencia del láser: 20%.

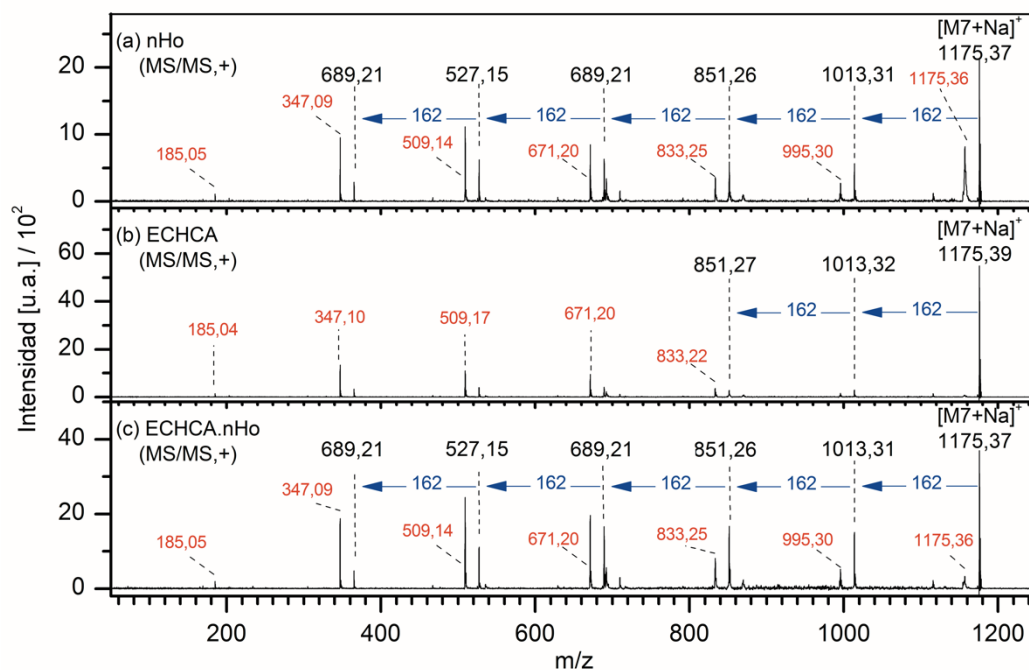


Figura A3.14. Espectros de masa MALDI MS/MS. Matriz: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.nHo. Modo positivo (+). Ion precursor $[M7+Na]^+$ = 1175,37 m/z. Fluencia del láser (valores relativos): para detección del ion precursor 30% y para su fragmentación 80%.

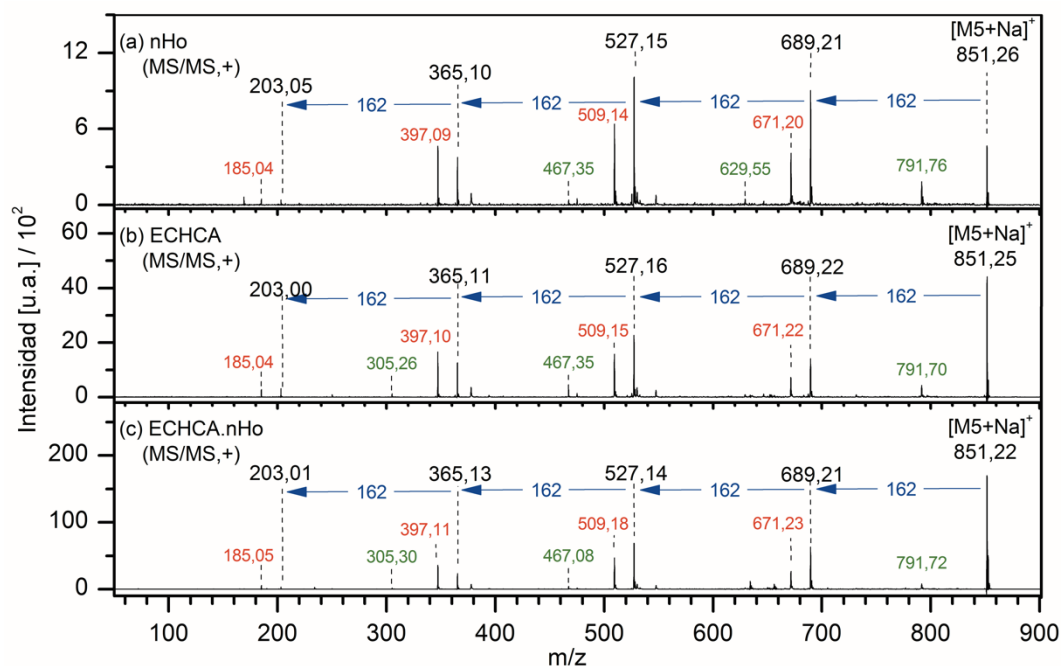


Figura A3.15. Espectros de masa MALDI MS/MS. Matriz: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.nHo. Modo positivo (+). Ion precursor $[M5+Na]^+$ = 851,22 m/z. Fluencia del láser (valores relativos): para detección del ion precursor 30% y para su fragmentación 80%.

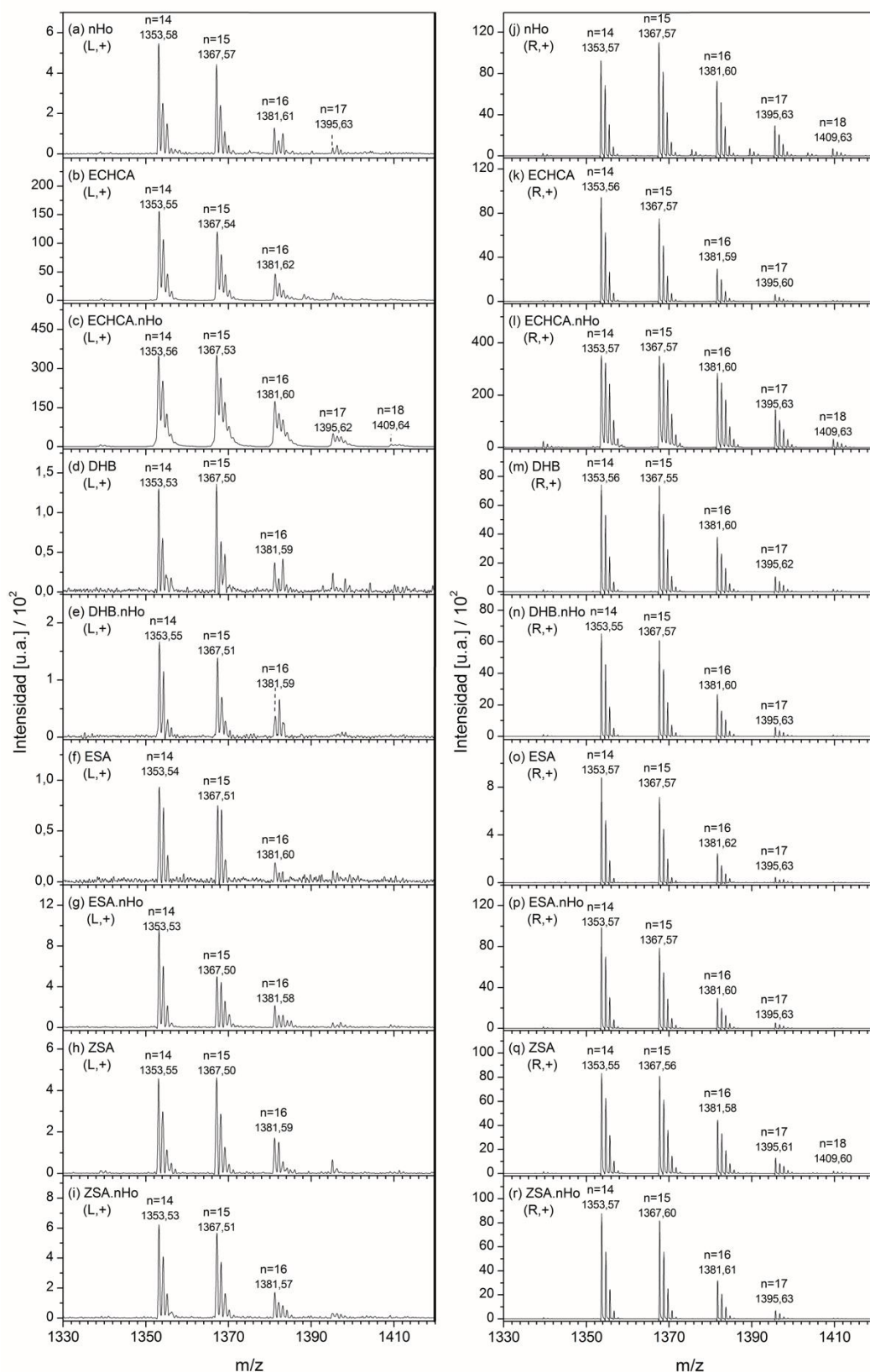


Figura A3.16. Espectros de masa MALDI. Analito: DMβCD. Matriz: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.nHo, (d) DHB, (e) DHB.nHo, (f) ESA, (g) ESA.nHo, (h) ZSA e (i) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L,+): a-i; Modo reflectrón positivo (R,+): j-r. DMβCD = (CH₃)₁₃₋₁₈βCD, ej. [(CH₃)₁₄βCD+Na]⁺ = 1353 m/z. Fluencia del láser 20%.

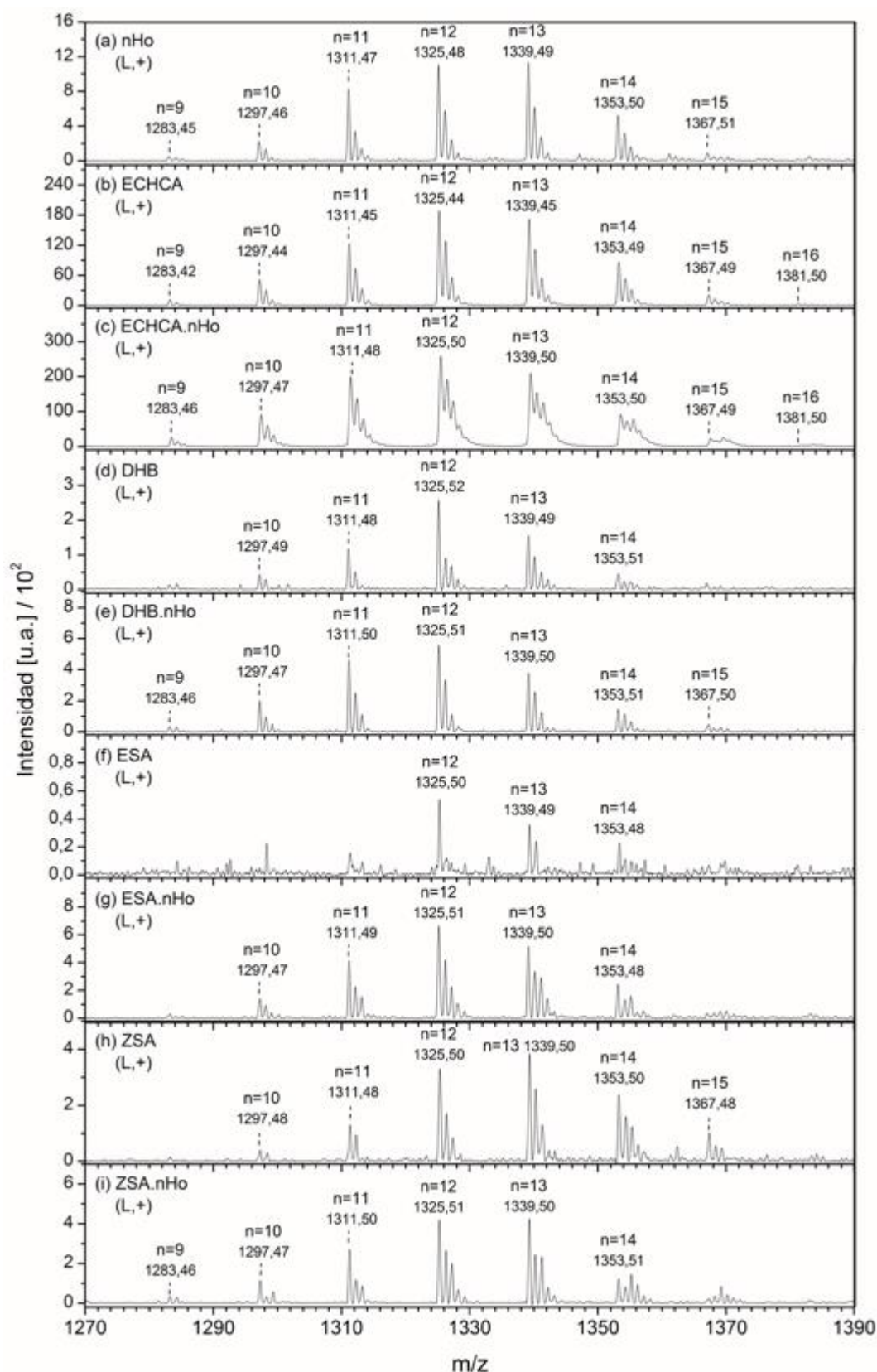


Figura A3.17. Espectros de masa MALDI. Analito: MβCD. Matriz: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.nHo, (d) DHB, (e) DHB.nHo, (f) ESA, (g) ESA.nHo, (h) ZSA e (i) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L,+). MβCD = (CH₃)₉₋₁₆βCD, ej. [(CH₃)₉βCD+Na]⁺ = 1283 m/z. Fluencia del láser 20%.

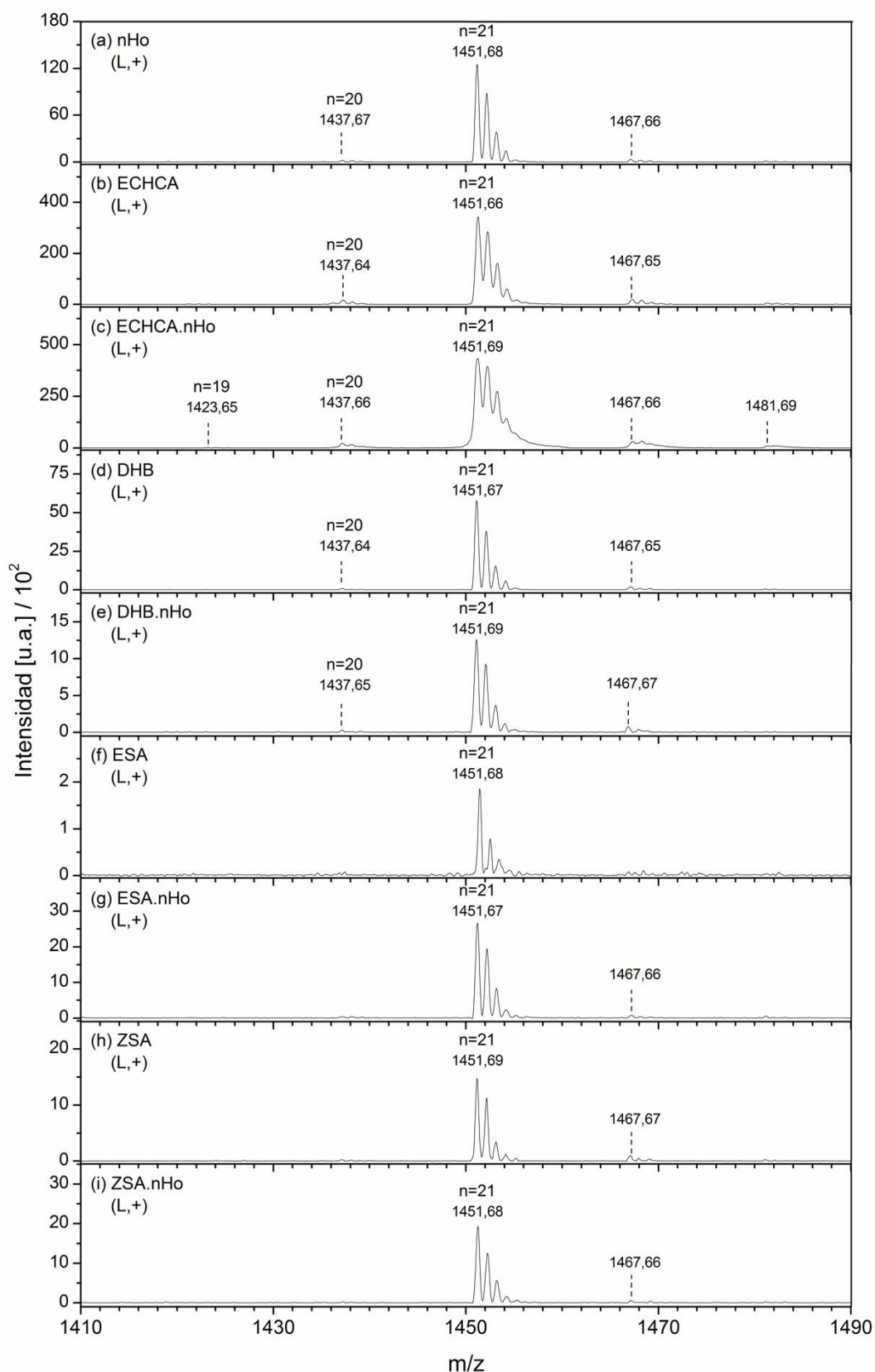


Figura A3.18. Espectros de masa MALDI. Analito: TβCD. Matriz: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.nHo, (d) DHB, (e) DHB.nHo, (f) ESA, (g) ESA.nHo, (h) ZSA e (i) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L,+). TβCD = (CH₃)₂₀₋₂₁βCD, ej. [(CH₃)₂₁βCD+Na]⁺ = 1451 m/z y [(CH₃)₂₁βCD+K]⁺ = 1467 m/z. Fluencia del láser 20%.

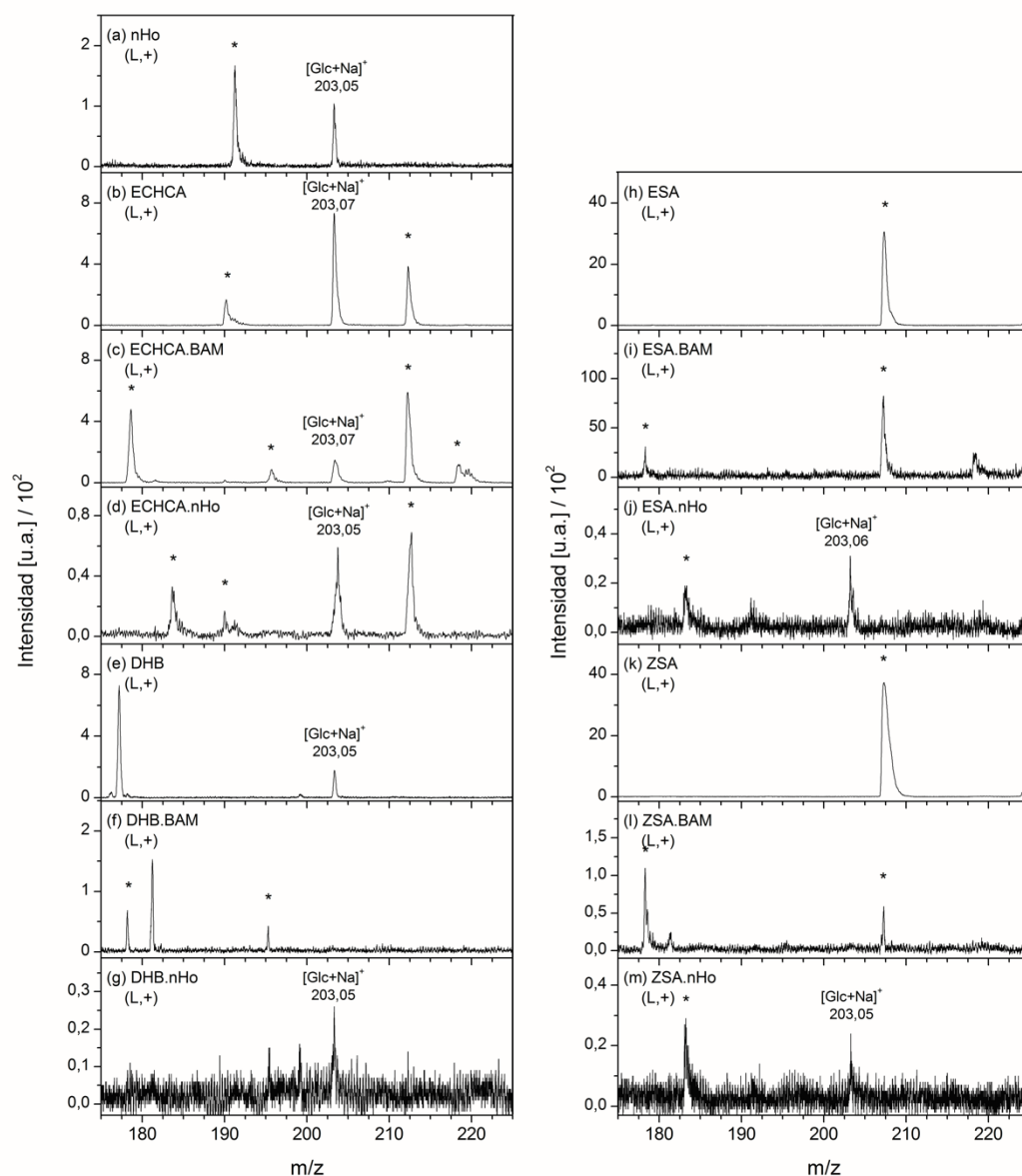


Figura A3.19. Espectros de masa MALDI. Analito: Glc. Matrices: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM, (d) ECHCA.nHo, (e) DHB, (f) DHB.BAM, (g) DHB.nHo, (h) ESA, (i) ESA.BAM, (j) ESA.nHo, (k) ZSA, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 20%.

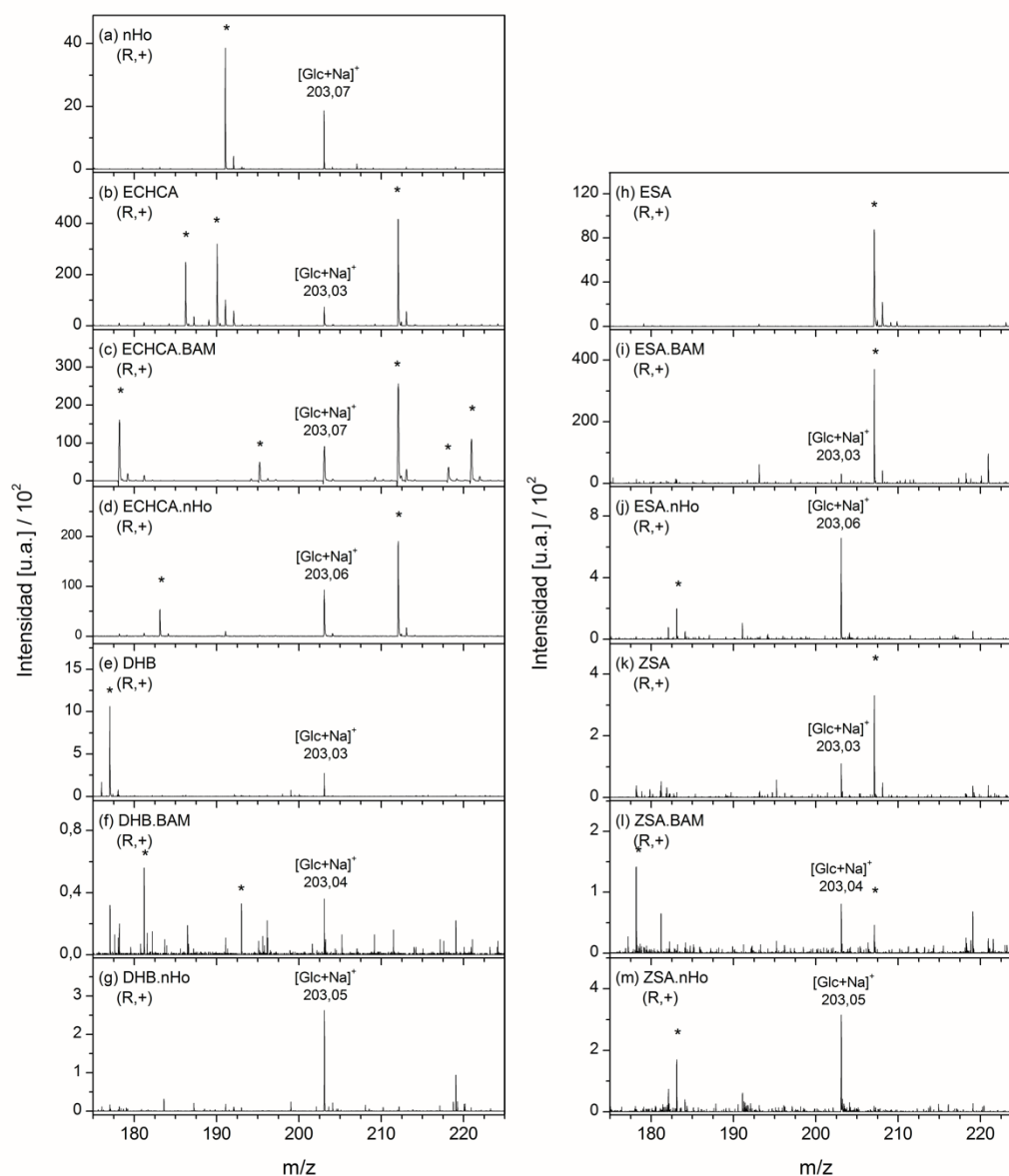


Figura A3.20. Espectros de masa MALDI. Analito: Glc. Matrices: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM, (d) ECHCA.nHo, (e) DHB, (f) DHB.BAM, (g) DHB.nHo, (h) ESA, (i) ESA.BAM, (j) ESA.nHo, (k) ZSA, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.nHo. Modo reflectrón positivo (R, +). Fluencia del láser: 20%.

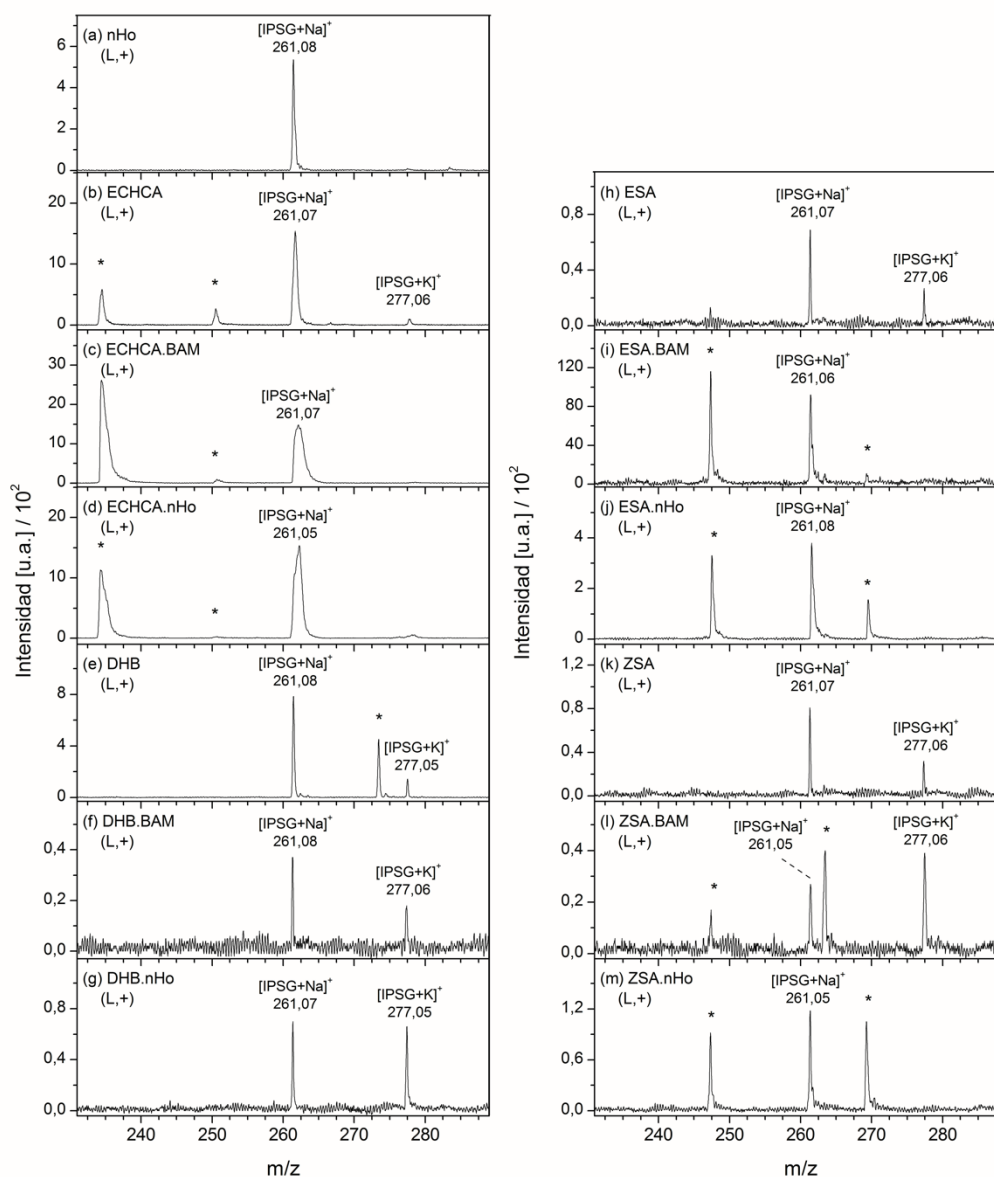


Figura A3.21. Espectros de masa MALDI. Analito: IPSG. Matrices: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM, (d) ECHCA.nHo, (e) DHB, (f) DHB.BAM, (g) DHB.nHo, (h) ESA, (i) ESA.BAM, (j) ESA.nHo, (k) ZSA, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 20%.

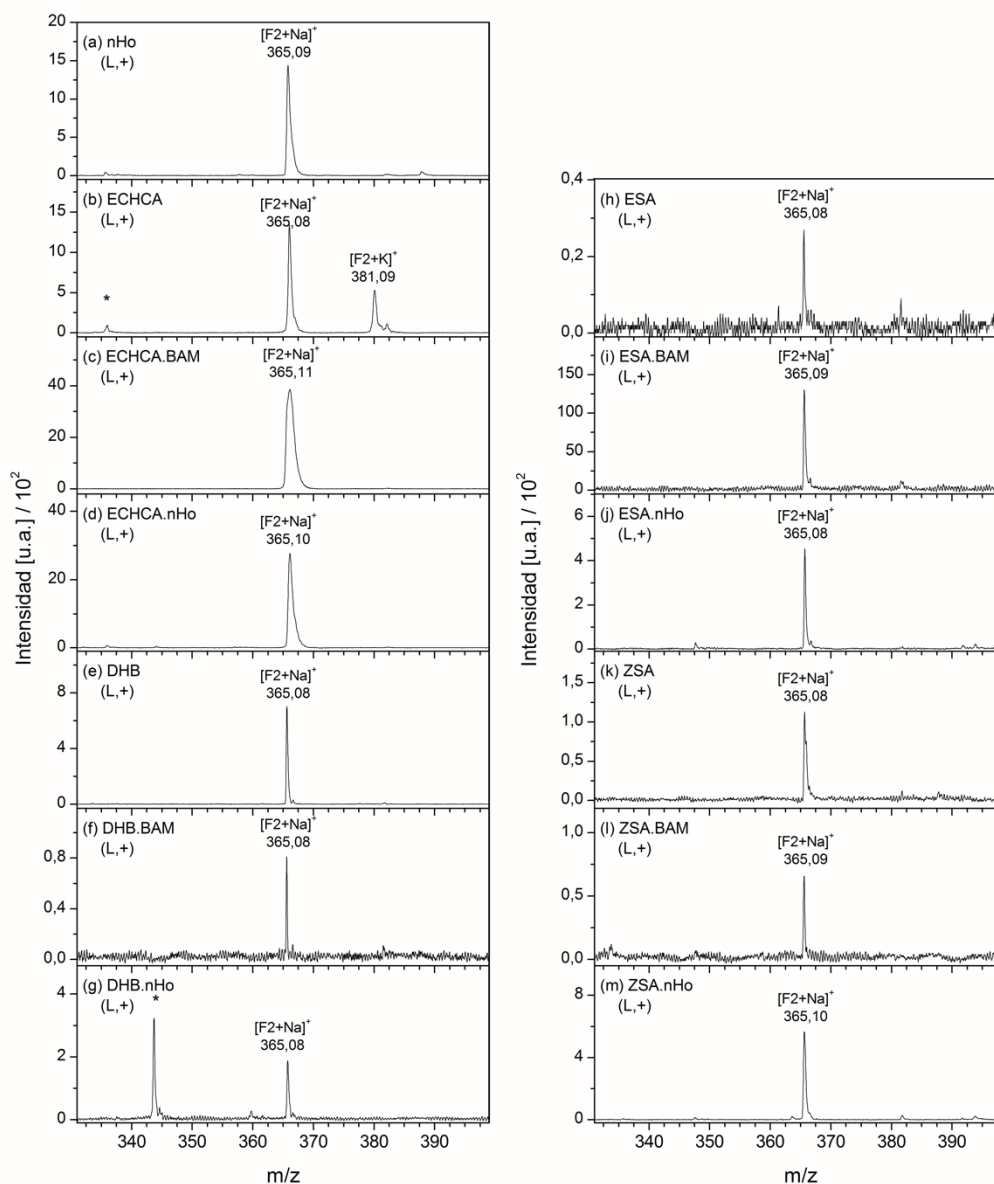


Figura A3.22. Espectros de masa MALDI. Analito: F2. Matrices: (a) nHo, (b) ECHCA, (c) ECHCA.BAM, (d) ECHCA.nHo, (e) DHB, (f) DHB.BAM, (g) DHB.nHo, (h) ESA, (i) ESA.BAM, (j) ESA.nHo, (k) ZSA, (l) ZSA.BAM, (m) ZSA.nHo. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 20%.

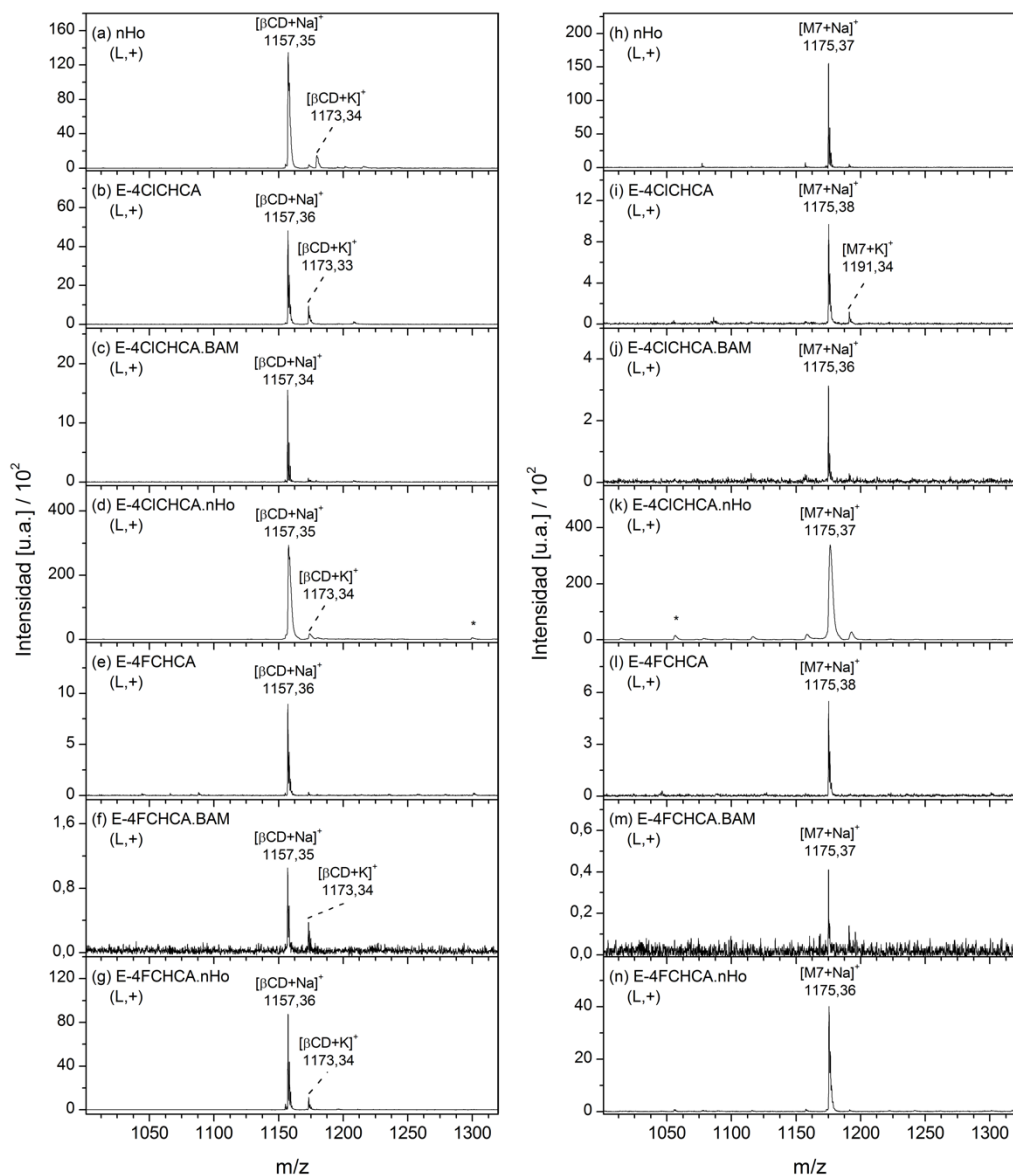


Figura A3.23. Espectros de masa MALDI. Analito: β CD (a-g) y M7 (h-n). Matrices: (a, h) nHo, (b, i) E-4ClCHCA, (c, j) E-4ClCHCA.BAM, (d, k) E-4ClCHCA.nHo, (e, l) E-4FCHCA, (f, m) E-4FCHCA.BAM y (g, n) E-4FCHCA.nHo. Modo lineal positivo (L, +). Fluencia del láser: 40%.

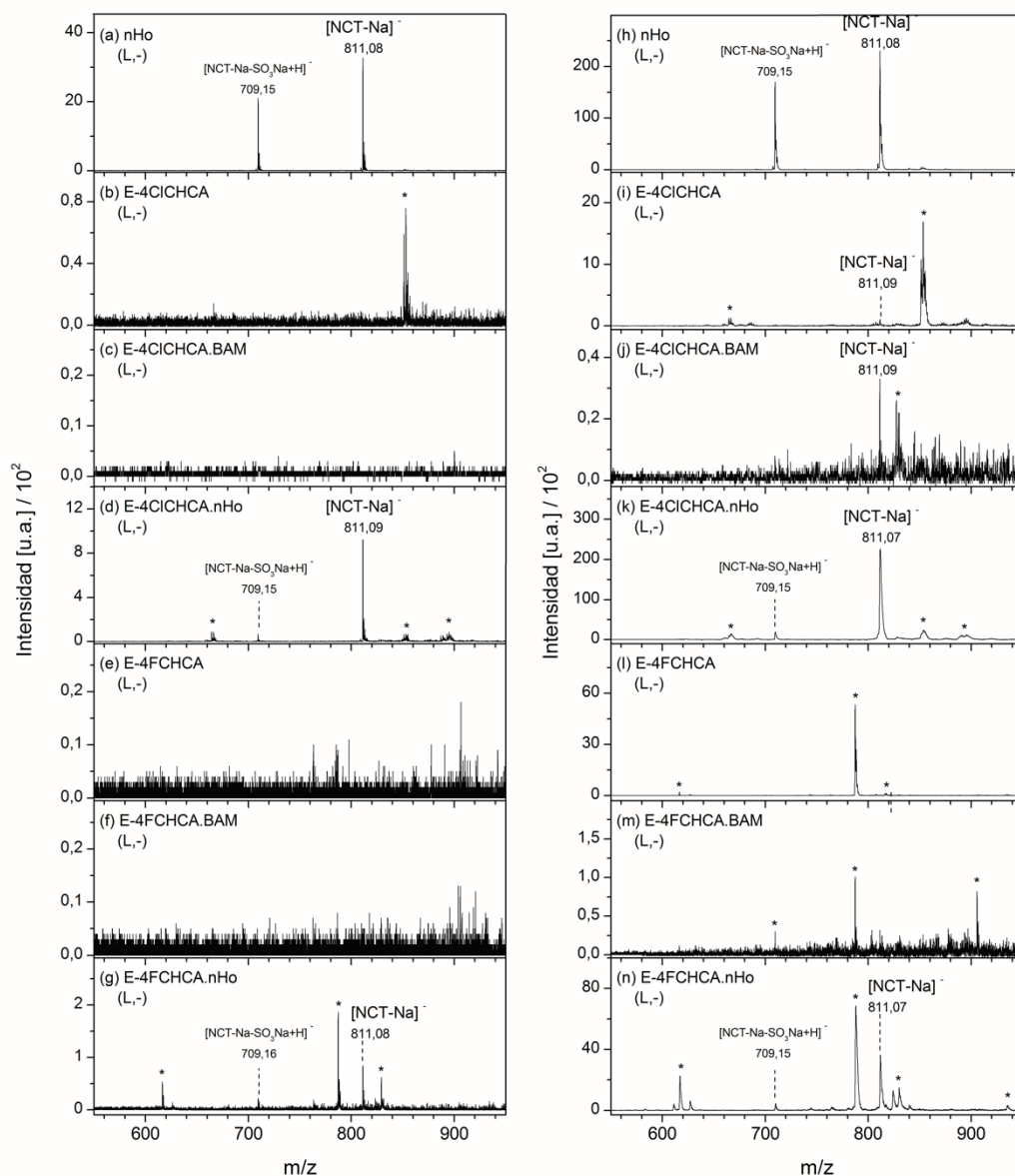


Figura A3.24. Espectros de masa MALDI. Analito: NCT. Matrices: (a, h) nHo, (b, i) E-4ClCHCA, (c, j) E-4ClCHCA.BAM, (d, k) E-4ClCHCA.nHo, (e, l) E-4FCHCA, (f, m) E-4FCHCA.BAM y (g, n) E-4FCHCA.nHo. Modo lineal negativo (L, -). Fluencia del láser: (a-g) 20% y (h-n) 40%.

Anexo 4 : Capítulo 4 - Estabilidad térmica de las matrices MALDI estudiadas.

Los números de las referencias indicados en este anexo corresponden a las referencias del capítulo 4 en la página 225.

Tabla A4.1. Puntos de fusión (°C)

| Ref./ Comp | Salum y Col. ^a | Sigma-Aldrich- Merck ^b | The Human Metabolome Database ^c | Chemical Book ^d | Datos Propios ^e |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| ESA | 185 (202 (D)*) | ≈202 | 192 | ≈202; 195-205 (D) | 202 |
| ZSA | 116-118 | | No disponible | | 117 |
| ECHCA | | 245-250 | | 245-250 | 264 |
| ECUM | 214-216 (210-213*) | 215-220 | 211.5 | 214 (D) | 224 |
| ZCUM | 123-125 | | 134-135 | | 135 |
| EFE | 168-172 (168-172*; 174*) | 169-172 | 168-171 | 168-172 | 174 |
| ZFE | 108-111 | | | | 117 |
| E-345TMCA | | 125-127 | | 125-127 | 127 |
| Z-345TMCA | | | | | 114 |
| EiFE | | 230-236 | | 230 (D) | 234 |
| E-3HCA | | 193-195 | | 193-195 | 196 |
| ECA | 134 (133-135*) | 133; 132-135 | 133 | 133 | 134 |
| E-2HCA | | 217 (D) | No disponible | 217 (D) | 225 |
| E-3MCA | | 116-119 | | 116-119 | 120 |
| E-4NOCA | | 289 (D) | | 200-202 | |
| E-4CICA | | 248-250 | | 248-250 | 251 |
| nHo | | | 199 | 199-201 | 202 |
| nHo.HCl | | 219-221 | | 232-235 | 231 |

^a Ref (26): Salum y Col. *Org. Lett.* 2010, 12 (21), 4808-4811 (Informado de la literatura: * The Merck Index 14th ed. Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, New Jersey. 2006.

^b Ref (61): <https://www.sigmaaldrich.com/>

^c <https://hmdb.ca/>

^d <https://www.chemicalbook.com/>

^e Datos estimados por la técnica DSC

(D) Descomposición

No disponible: El compuesto se encuentra en la base pero no dispone de información sobre p.f.

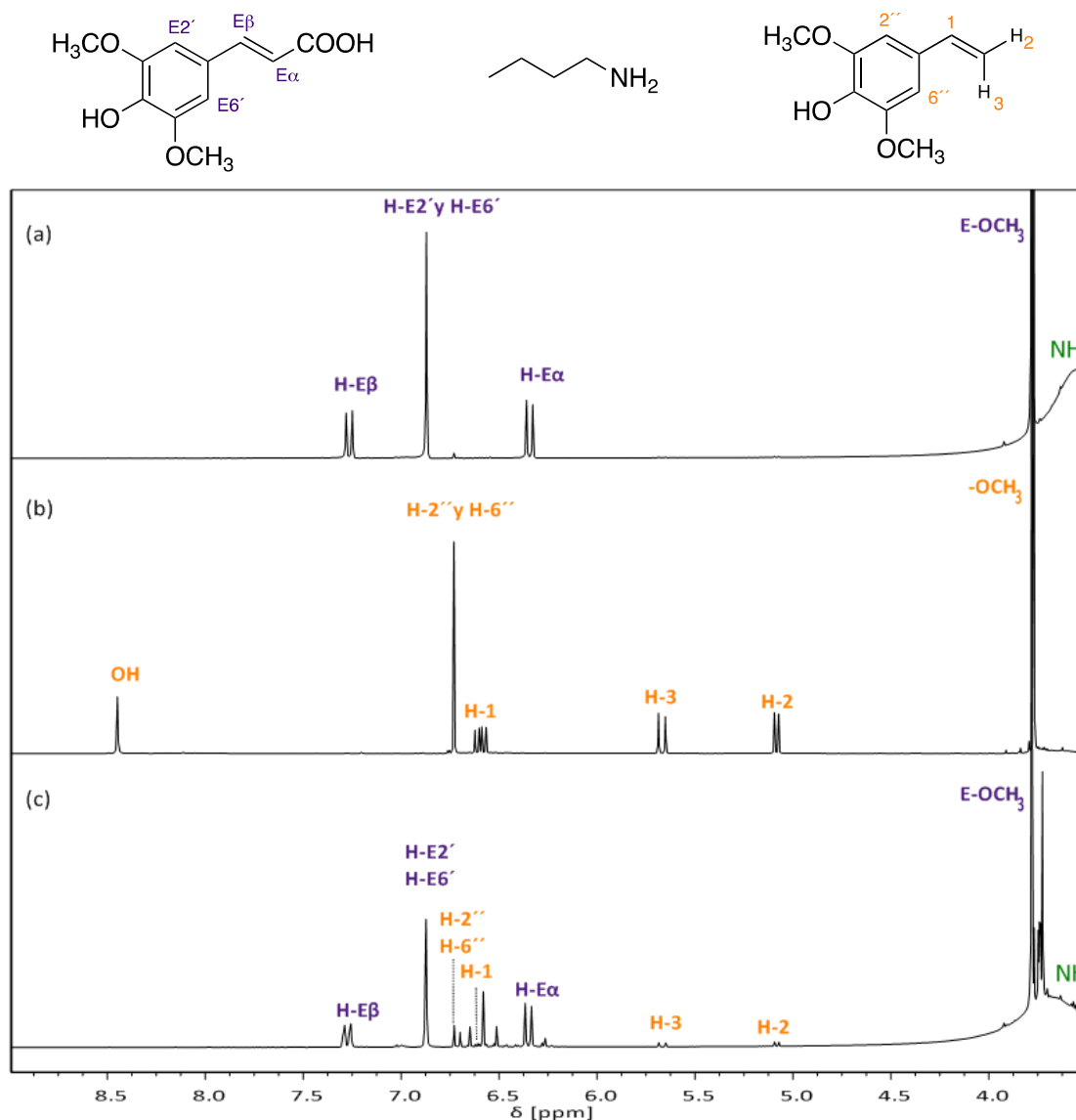


Figura A4.1. Espectros ¹H-RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de (a) ESA.BAM y los productos formados por irradiación por MW en (b) MeCN (tubo viejo, 200°C, 30 min) y (c) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ¹H-RMN: 500 MHz, solvente: DMSO-d₆.

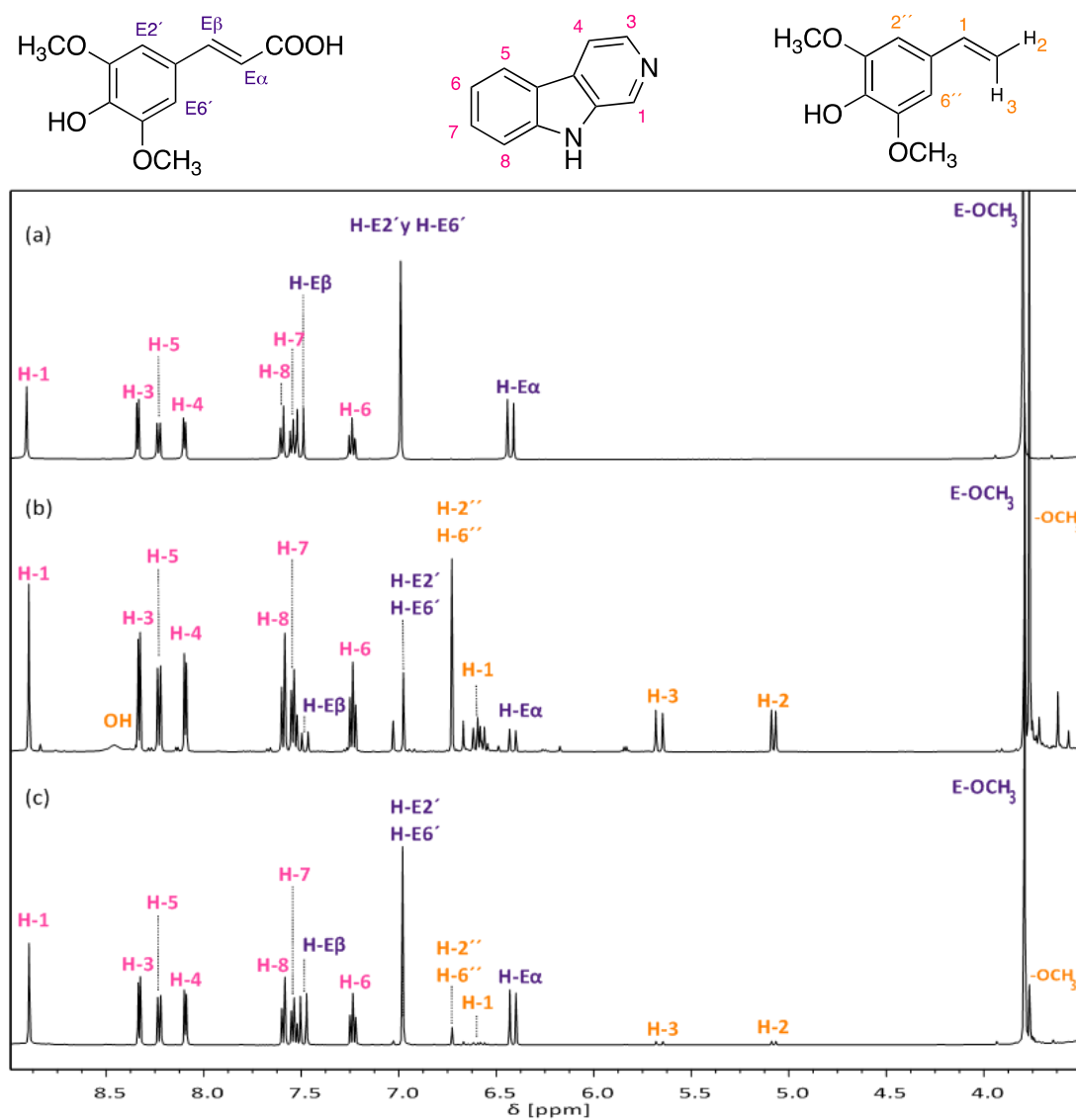


Figura A4.2. Espectros ^1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de (a) ESA.nHo y los productos formados por irradiación por MW en (b) MeCN (tubo viejo, 200°C, 30 min) y (c) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ^1H -RMN: 500 MHz, solvente: DMSO-d_6

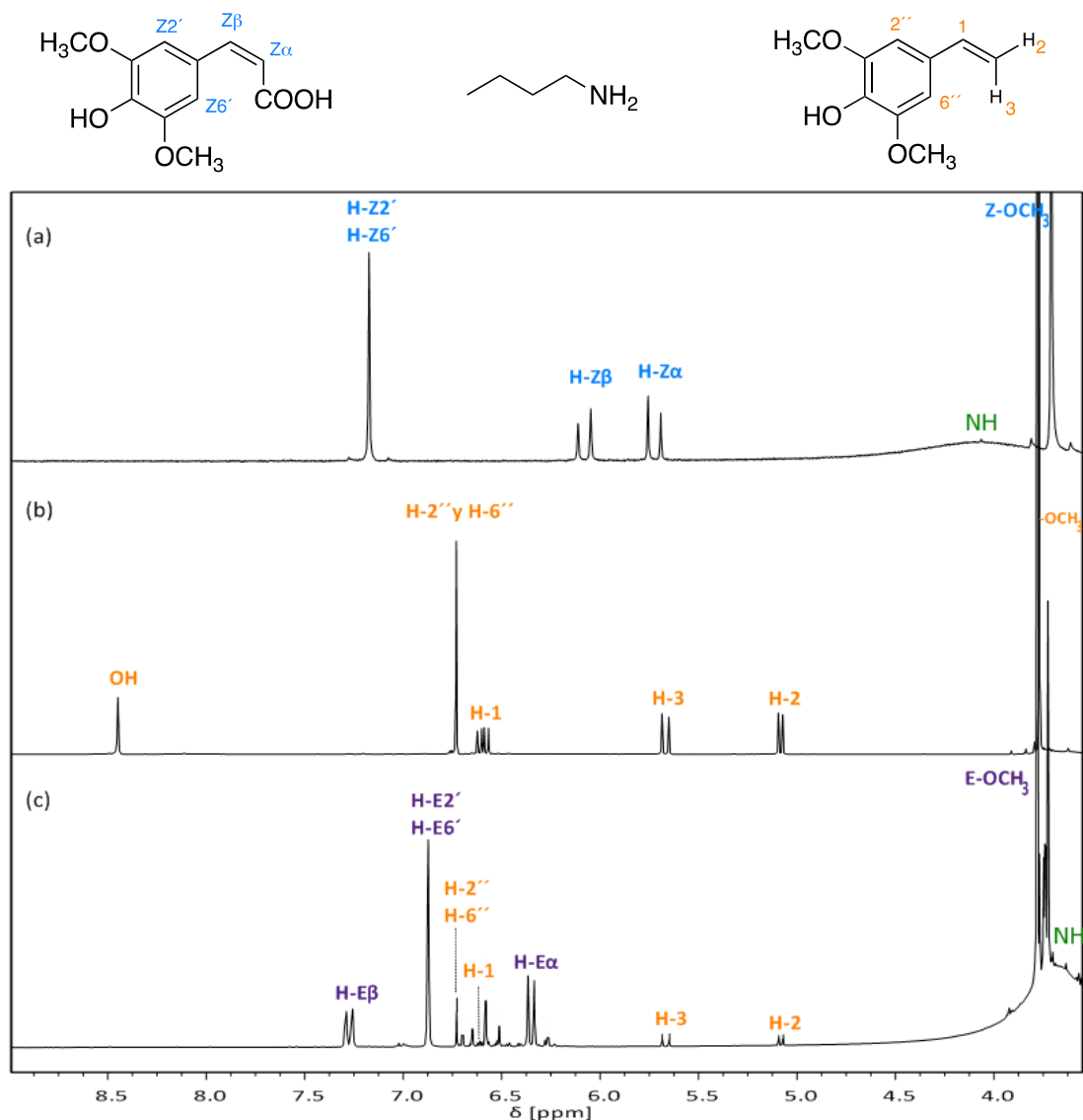


Figura A4.3. Espectros ^1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de (a) ZSA.BAM y los productos formados por irradiación por MW en (b) MeCN (tubo viejo, 200°C, 30 min) y (c) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ^1H -RMN: (a) 200 MHz, (b y c) 500 MHz, solvente: DMSO-d_6

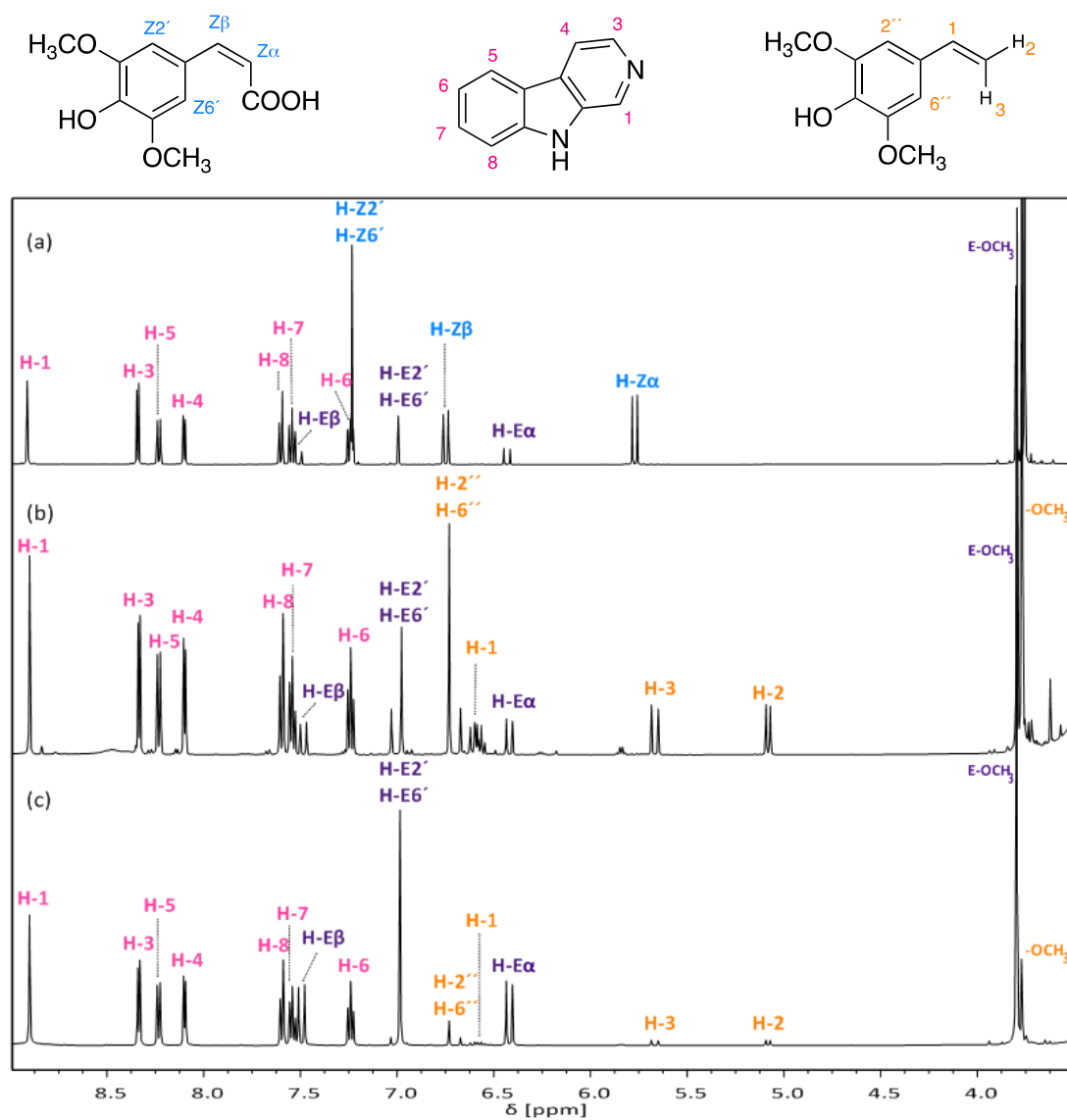


Figura A4.4. Espectros ^1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de (a) ZSA.nHo y los productos formados por irradiación por MW en (b) MeCN (tubo viejo, 200°C, 30 min) y (c) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ^1H -RMN: 500 MHz, solvente: DMSO- d_6

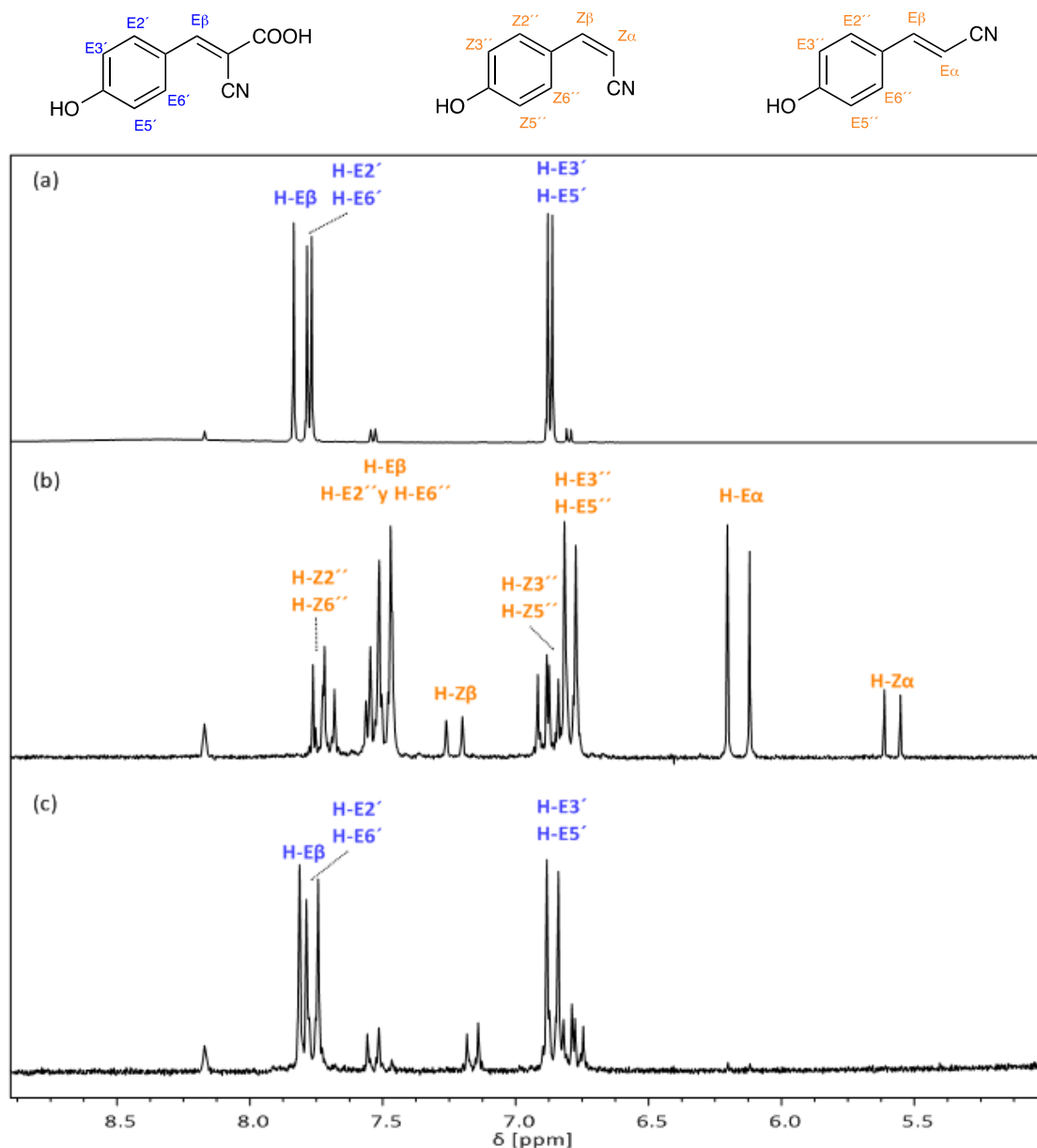


Figura A4.5. Espectros ^1H -RMN (δ 5-8,9 ppm) de (a) ECHCA.BAM y los productos formados por irradiación por MW en (b) MeCN (tubo viejo, 200°C, 30 min) y (c) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ^1H -RMN: (a) 500 MHz, (b y c) 200 MHz, solvente: DMSO- d_6

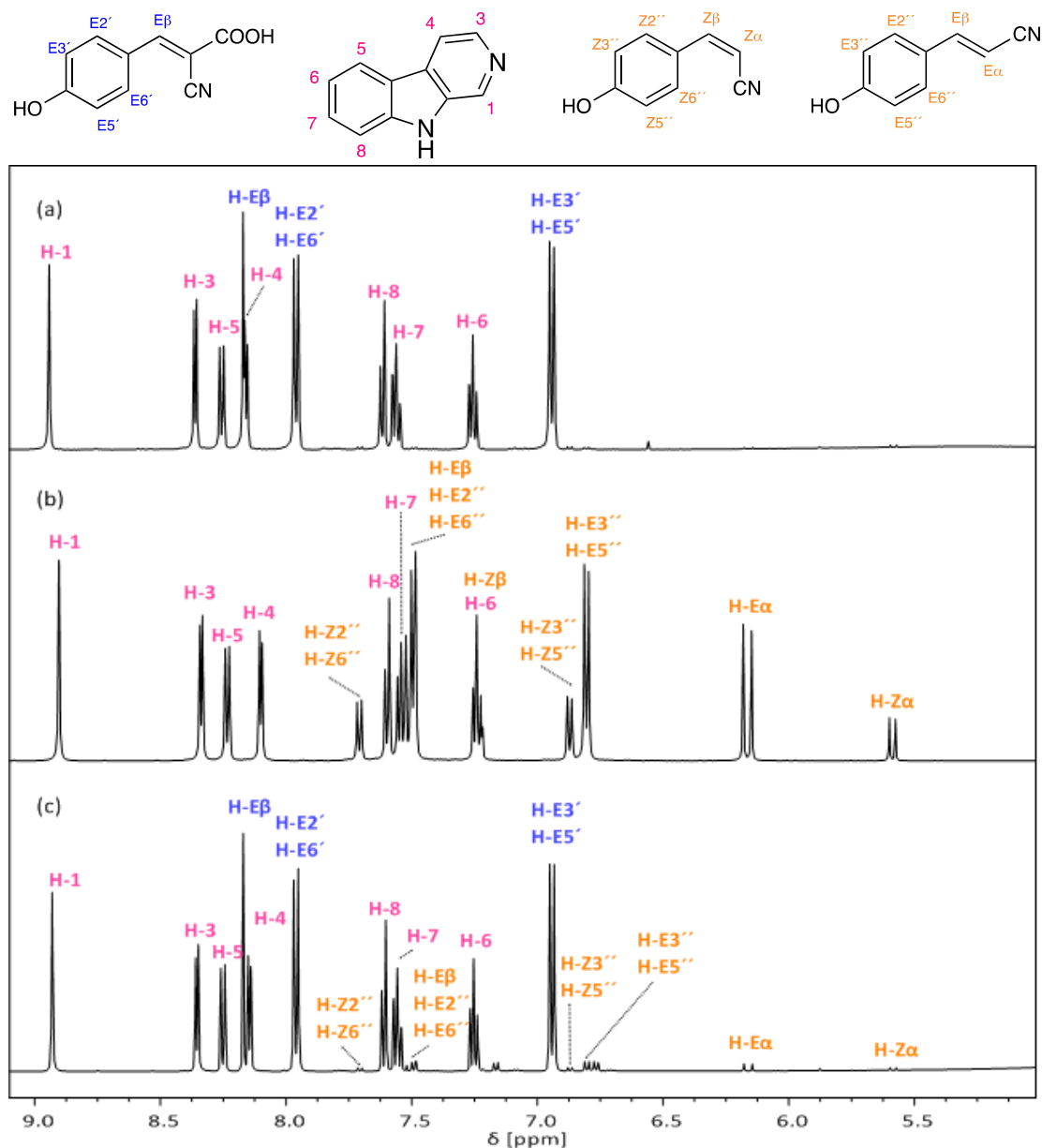
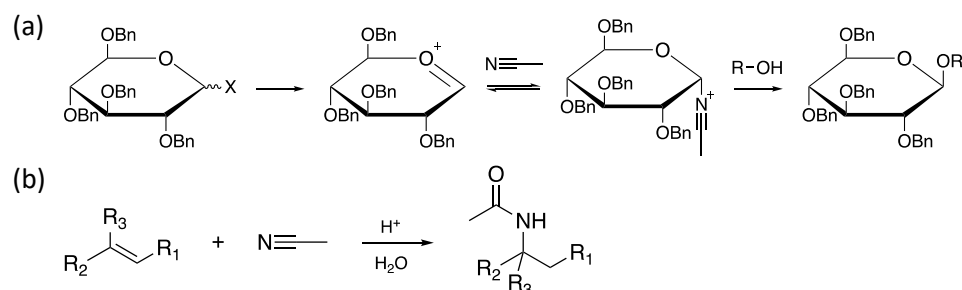
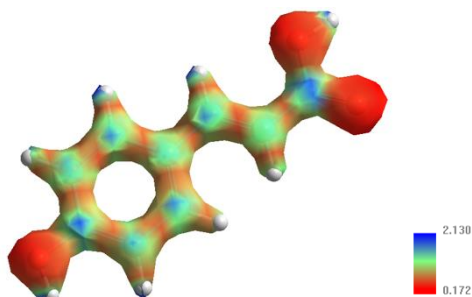


Figura A4.6. Espectros ^1H -RMN (δ 5-8,9 ppm) de (a) ECHCA.nHo y los productos formados por irradiación por MW en (b) MeCN (tubo viejo, 200°C, 30 min) y (c) MeOH (150 °C, 30 min). Espectros ^1H -RMN: 500 MHz, solvente: DMSO- d_6

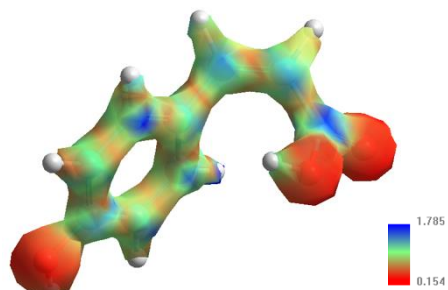


Esquema A4.1. (a) Mecanismo propuesto en la literatura para la reacción de glicosilación mediada por acetonitrilo (Ref. 49 I. Braccini et. al. Carbohydr. Res. 246(1) (1993) 23-41). (b) Ejemplo clásico para la reacción de Ritter (Ref. 51 A. Guérinot et. al. Eur. J. Org. Chem. 2012(1) (2012) 19-28)

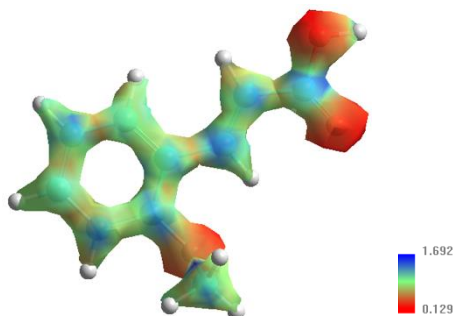
(a) ECUM



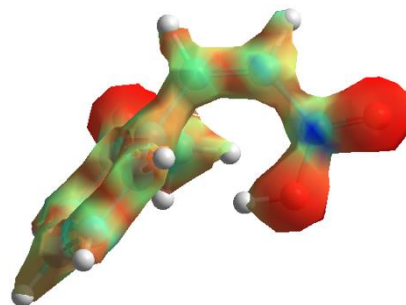
(b) ZCUM



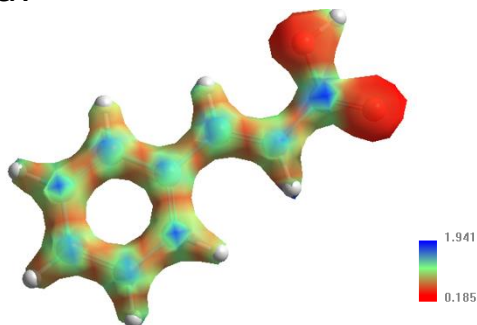
(c) E-2MCA



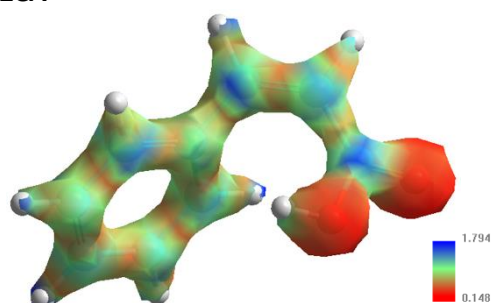
(d) Z-2MCA



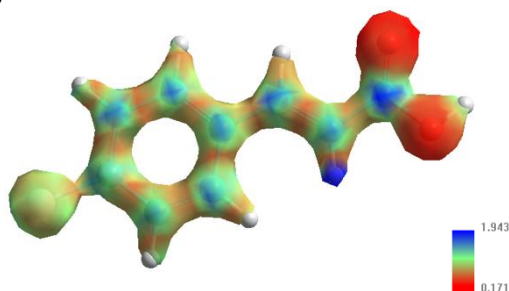
(e) ECA



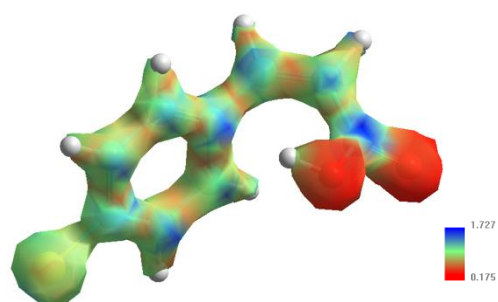
(f) ZCA



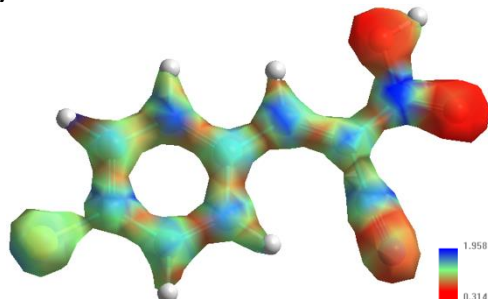
(g) E-4CICA



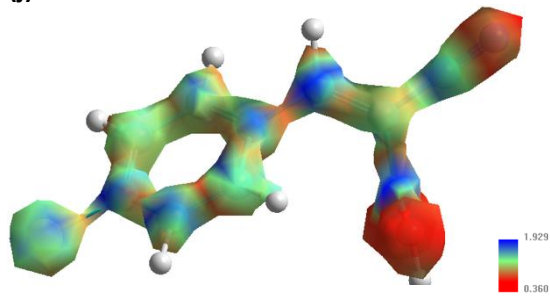
(h) Z-4CICA



(i) E-4ClCHCA



(j) Z-4ClCHCA



(k) E- α MCA

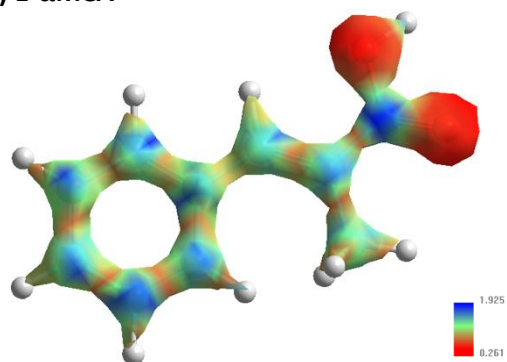


Figura A4.7. Superficie de potencial electrostático molecular. *Ab initio* (6-31G**, UHF, HyperChem 8)

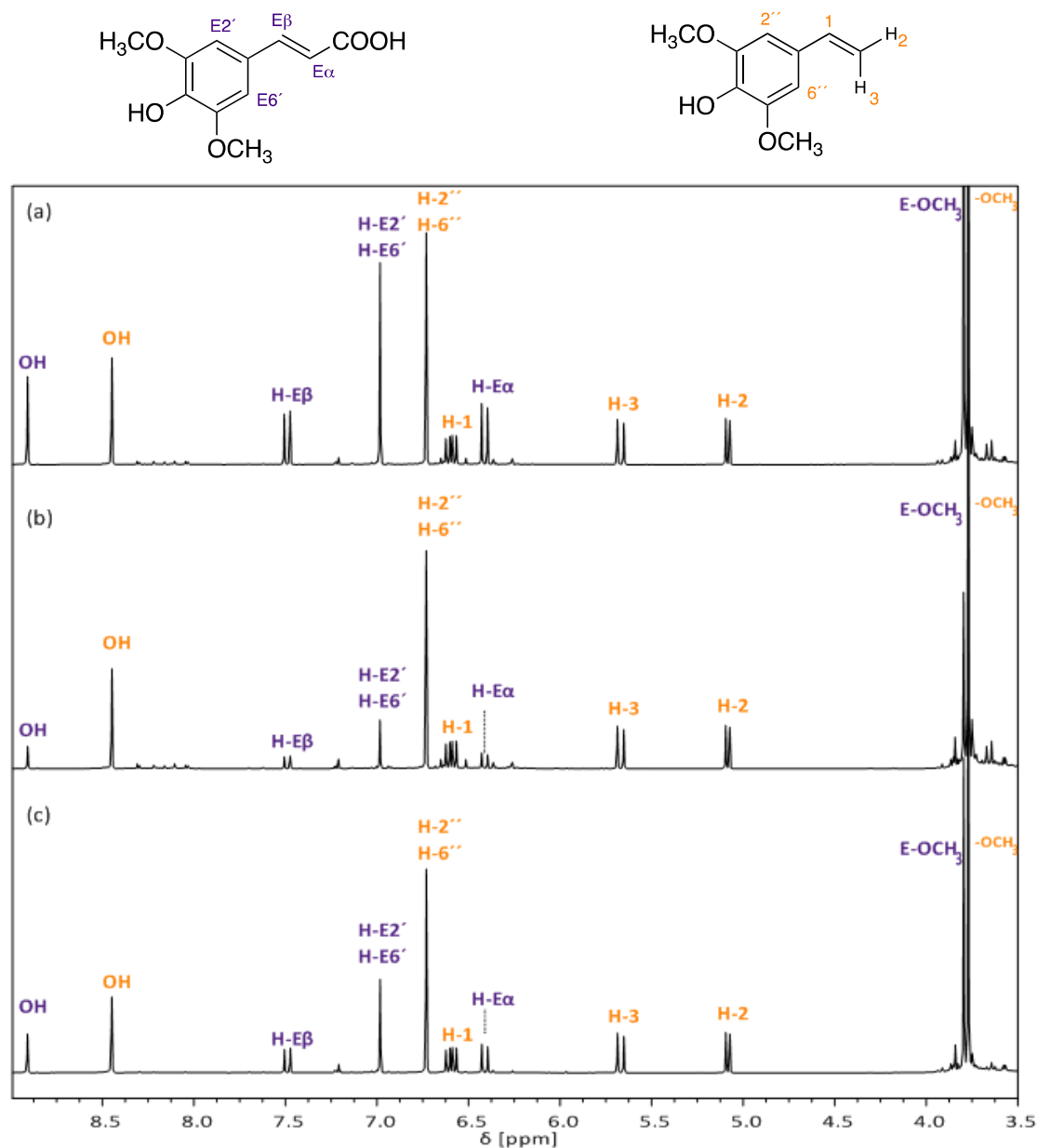


Figura A4.8. Espectros ^1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de ESA y los productos formados por calentamiento en baño de arena hasta (a) 200 °C (p.f.), (b) 218 °C y (c) 260 °C. Espectros ^1H -RMN 500 MHz, solvente: DMSO-d_6 .

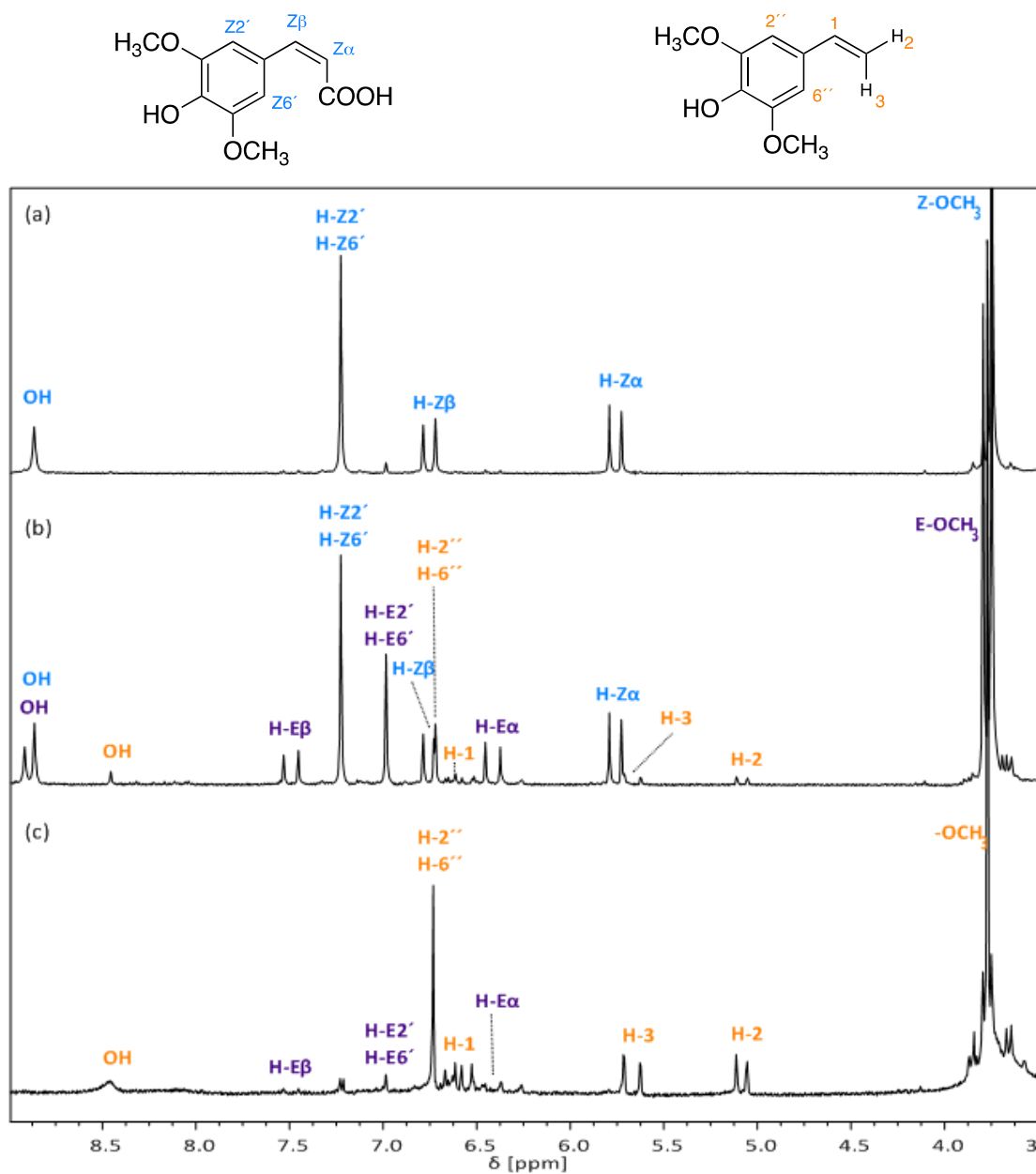


Figura A4.9. Espectros 1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de ZSA y los productos formados por calentamiento en baño de arena hasta (a) 100 °C, (b) 118 °C (p.f.) y (c) 260 °C. Espectros 1H -RMN 200 MHz, solvente: $DMSO-d_6$

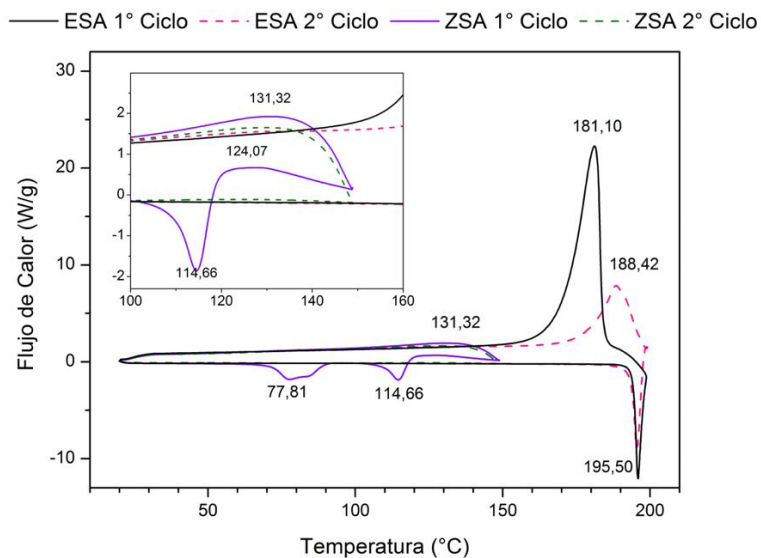


Figura A4.10. Superposición de curvas de DSC (procesos exotérmicos graficados hacia arriba), primer ciclo de calentamiento (línea continua) y segundo ciclo de calentamiento (línea punteada). Inserción: ampliación entre 100 y 160 °C. Compuestos (Literatura p.f./°C): ESA (202)⁶¹ (negro y rosa) y ZSA (116-118)²⁶ (violeta y verde).

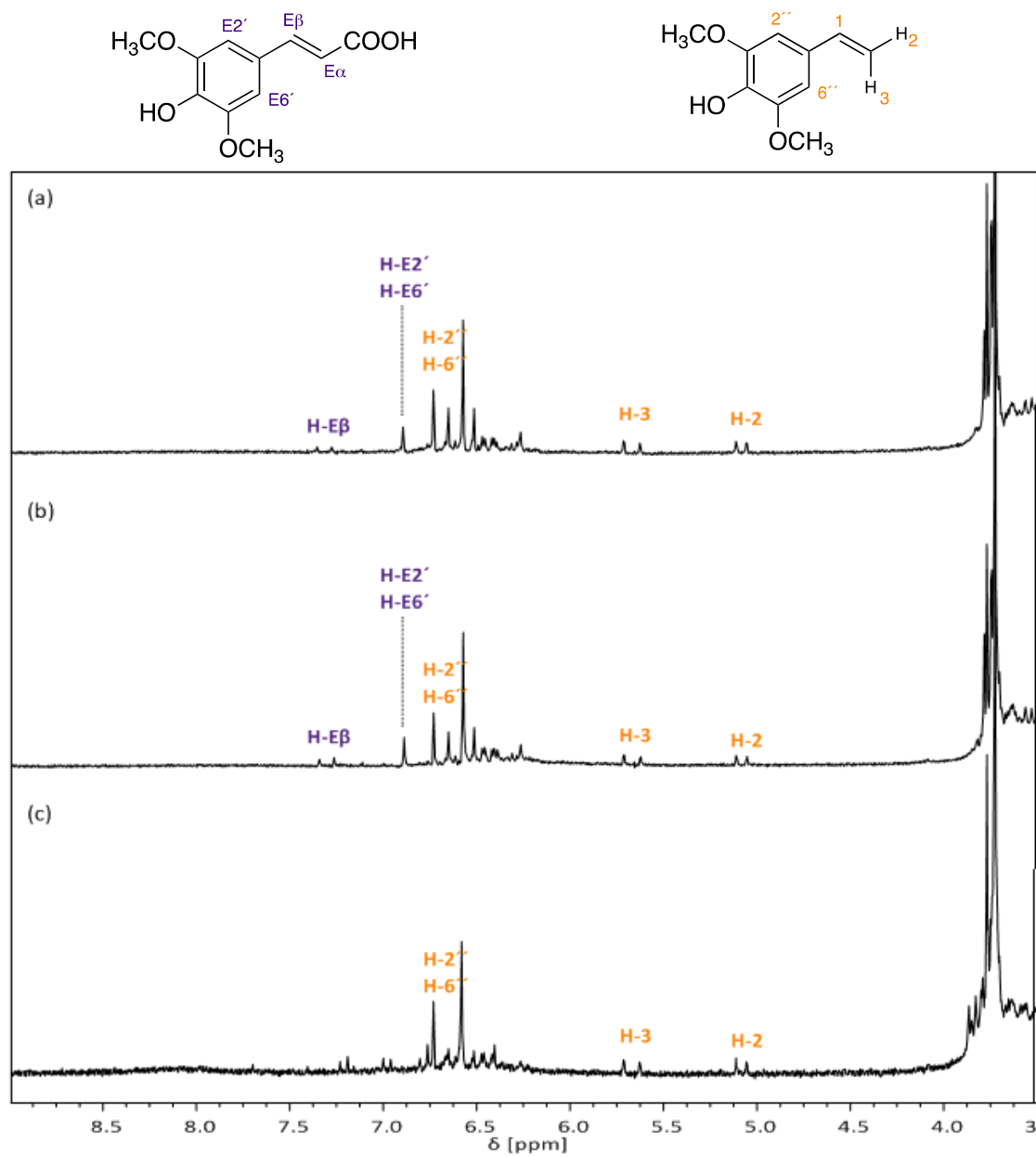


Figura A4.11. Espectros ^1H -RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de ESA.BAM y los productos formados por calentamiento en baño de arena hasta (a) 100 °C, (b) 140 °C (p.f.) y (c) 260 °C. Espectros ^1H -RMN 200 MHz, solvente: DMSO-d_6 .

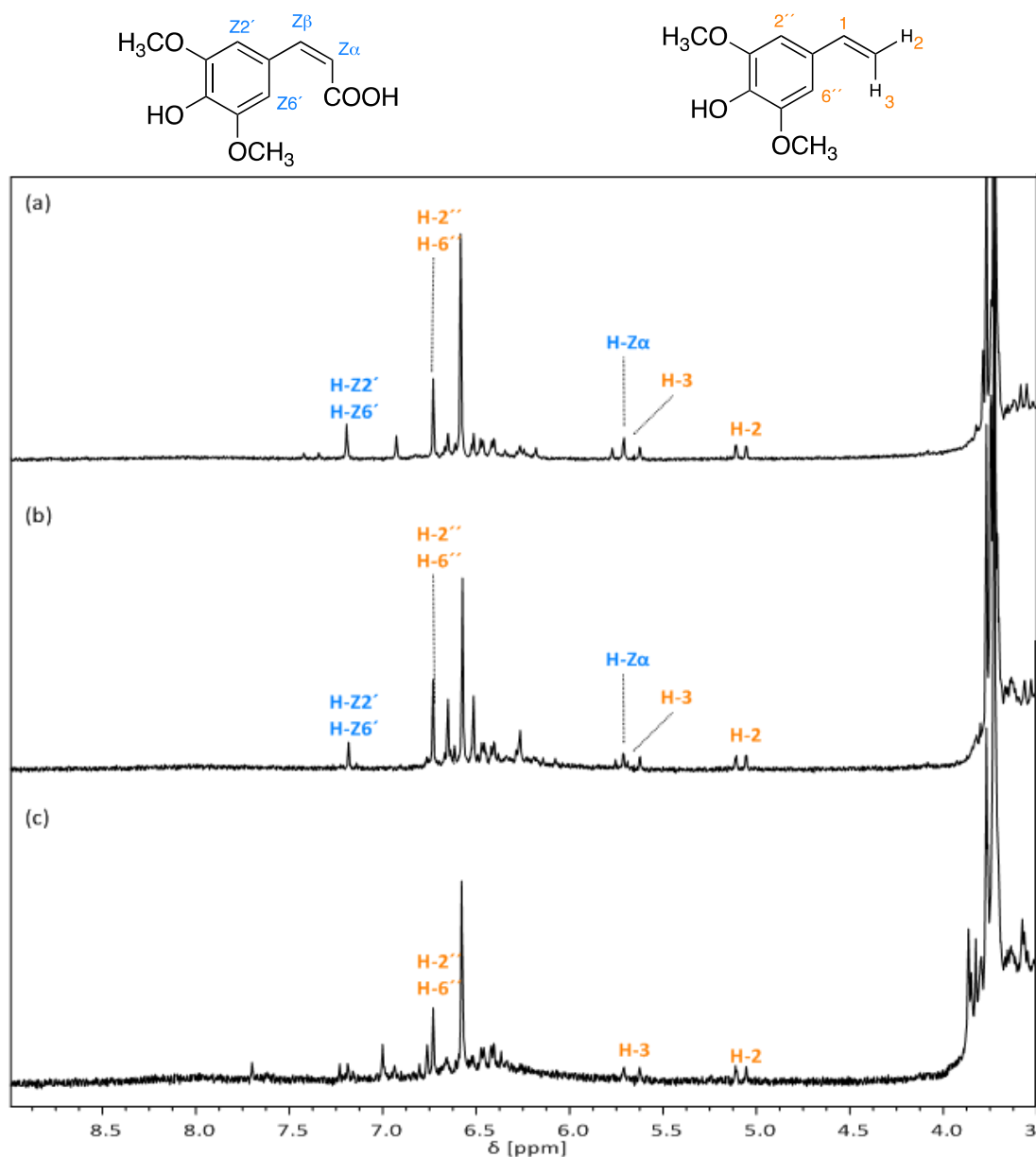


Figura A4.12. Espectros ¹H-RMN (δ 3,5-8,9 ppm) de ZSA.BAM y los productos formados por calentamiento en baño de arena hasta (a) 100 °C, (b) 130 °C (p.f.) y (c) 260 °C. Espectros ¹H-RMN 200 MHz, solvente: DMSO-d₆.

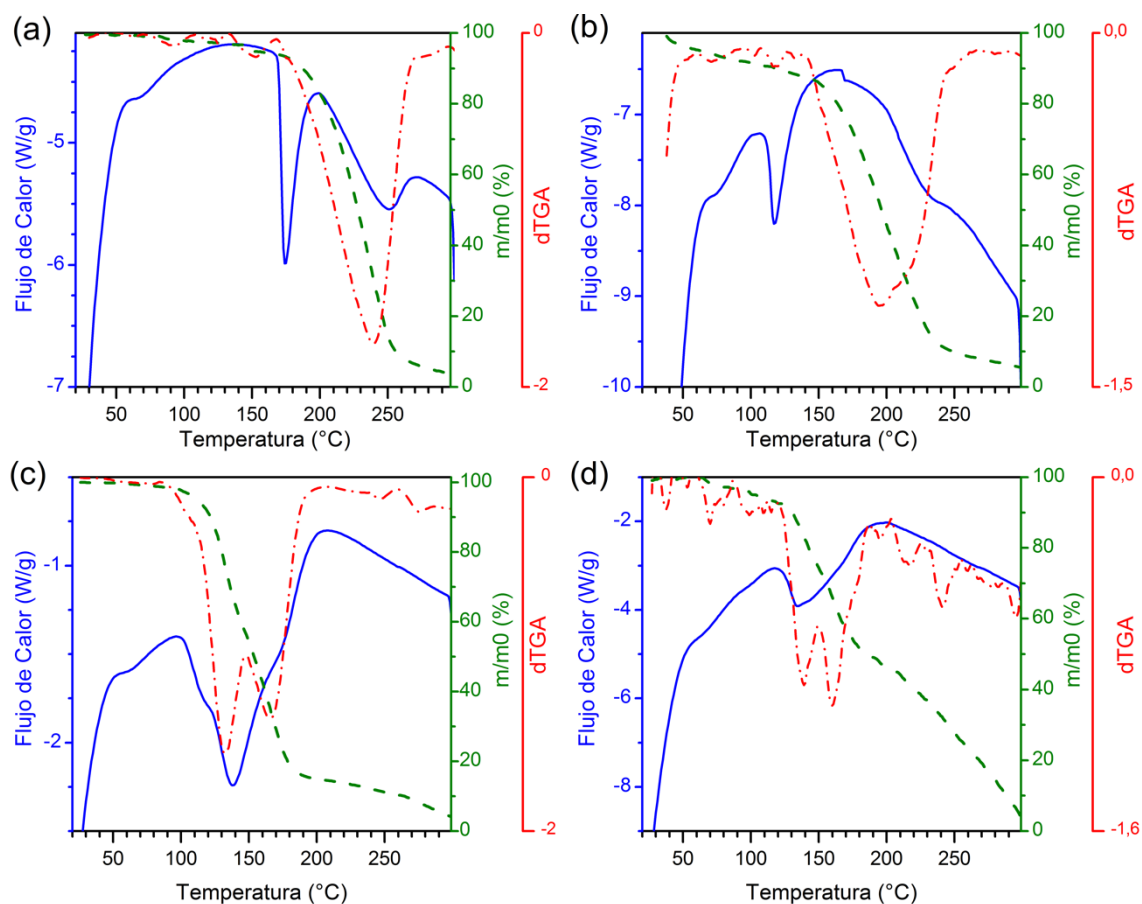


Figura A4.13. Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja). Compuestos (Literatura p.f./°C): (a) EFE (169-172)⁶¹, (b) ZFE (108-111)²⁶ (c) EFE.BAM y (d) ZFE.BAM.

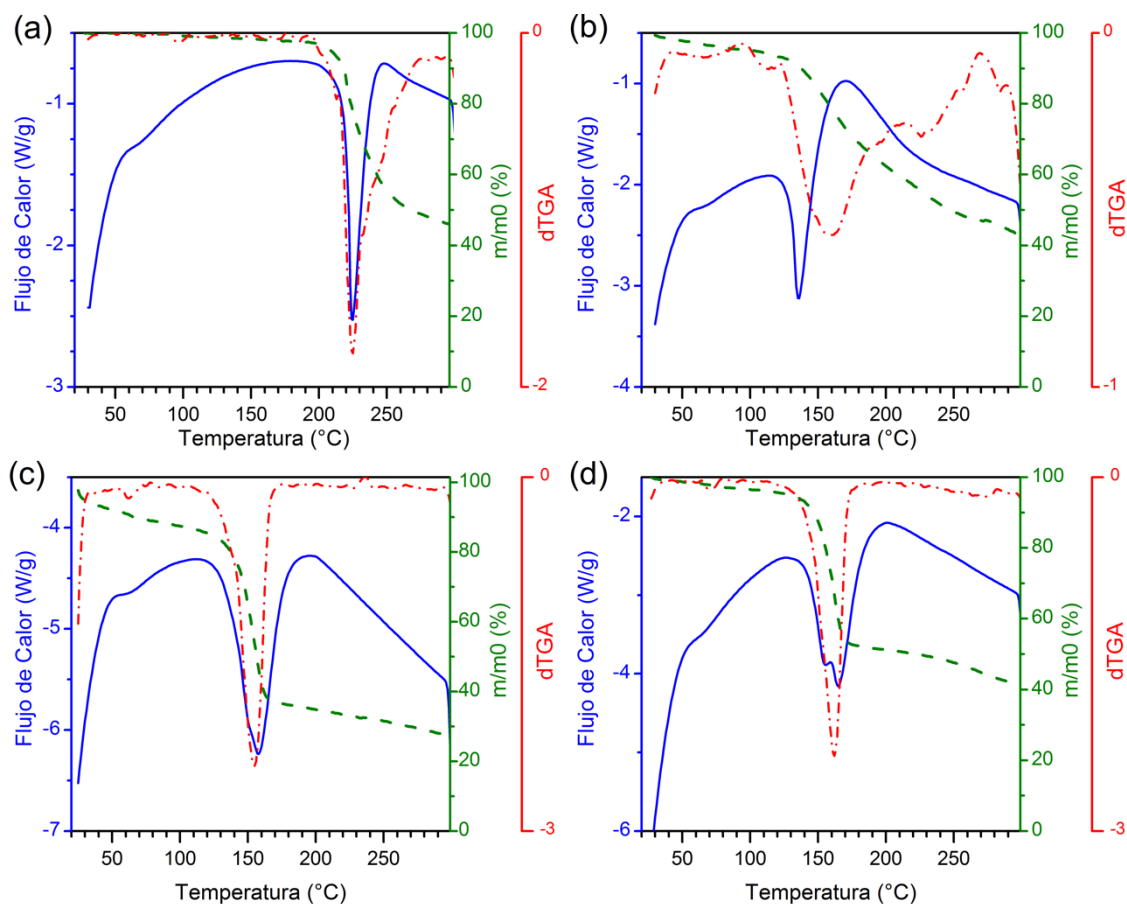


Figura A4.14. Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja). Compuestos (Literatura p.f./°C): (a) ECUM (215-220)⁶¹, (b) ZCUM (123-125)²⁶, (c) ECUM.BAM y (d) ZCUM.BAM.

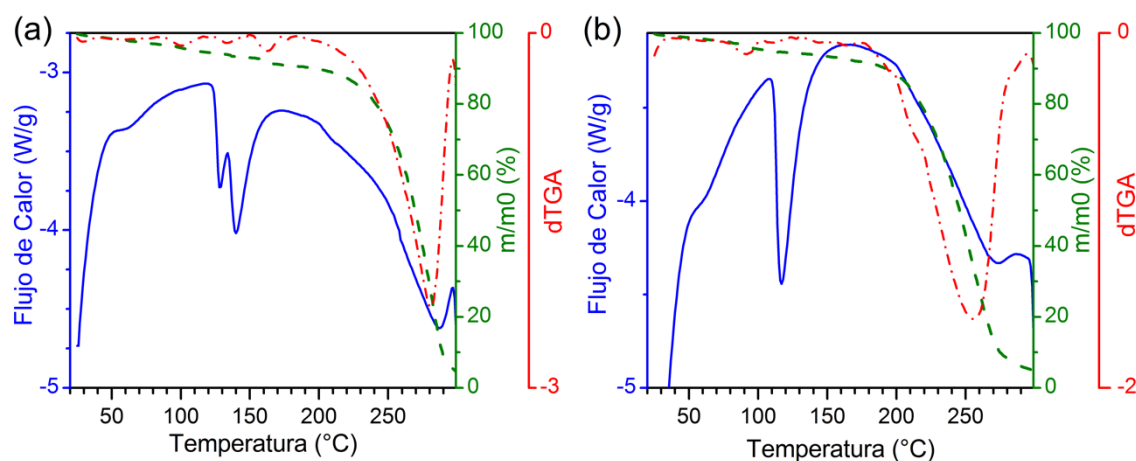


Figura A4.15. Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja). Compuestos (Literatura p.f./°C): (a) E-345TMCA (125-127)⁶¹ y (b) Z-345TMCA.

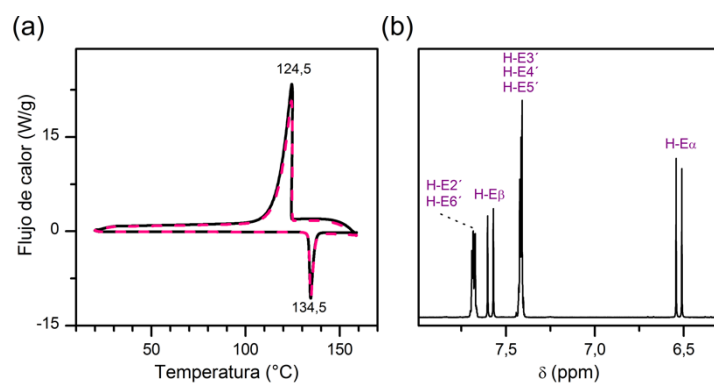


Figura A4.16. (a) Curvas de DSC (procesos exotérmicos graficados hacia arriba), primer ciclo de calentamiento (línea continua negra) y segundo ciclo de calentamiento (línea punteada rosa) y (b) espectro ^1H -RMN del sólido remanente luego del segundo ciclo. Compuesto (Literatura p.f./ $^{\circ}\text{C}$): ECA (132-135)⁶¹

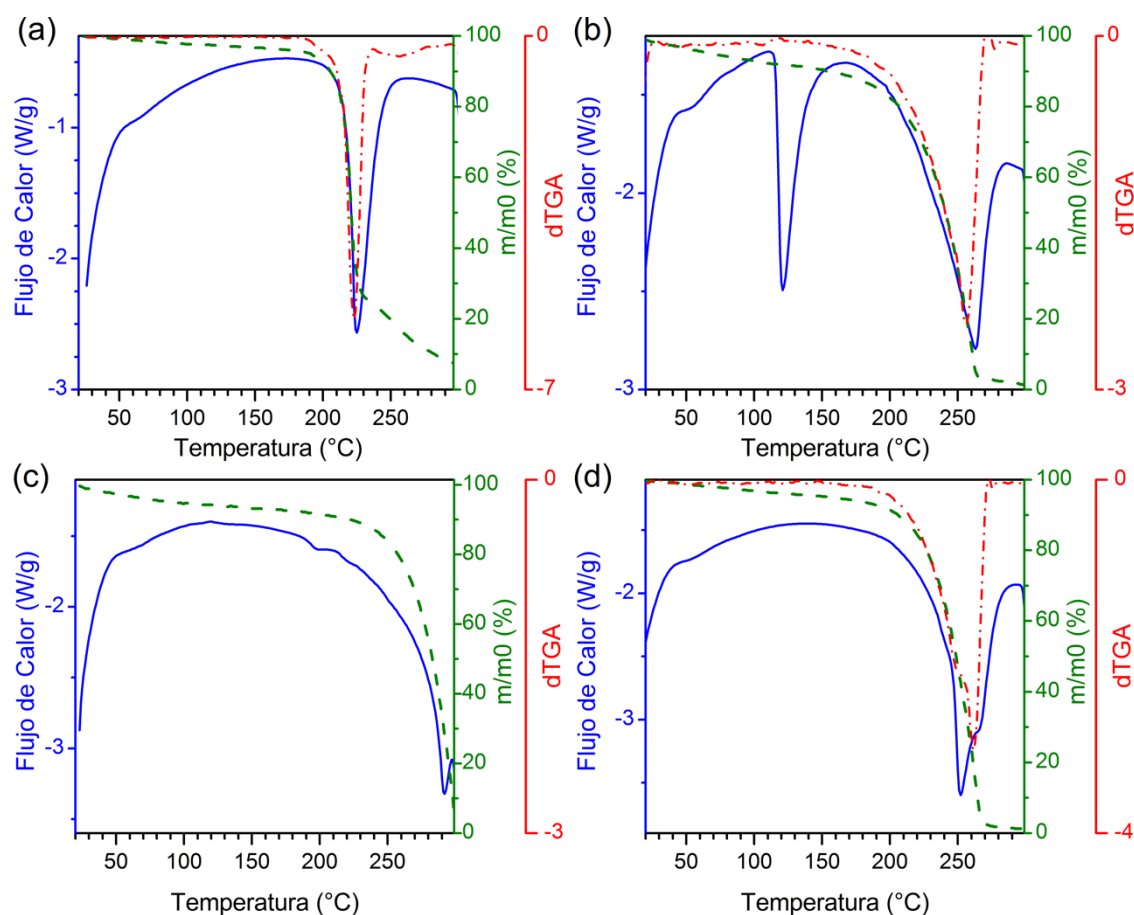


Figura A4.17. Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja). Compuestos (Literatura p.f./ $^{\circ}\text{C}$): (a) E-2HCA (217)⁶¹, (b) E-3MCA (116-119)⁶¹, (c) E-4NOCA (289)⁶¹ y (d) E-4CICA (248-250)⁶¹.

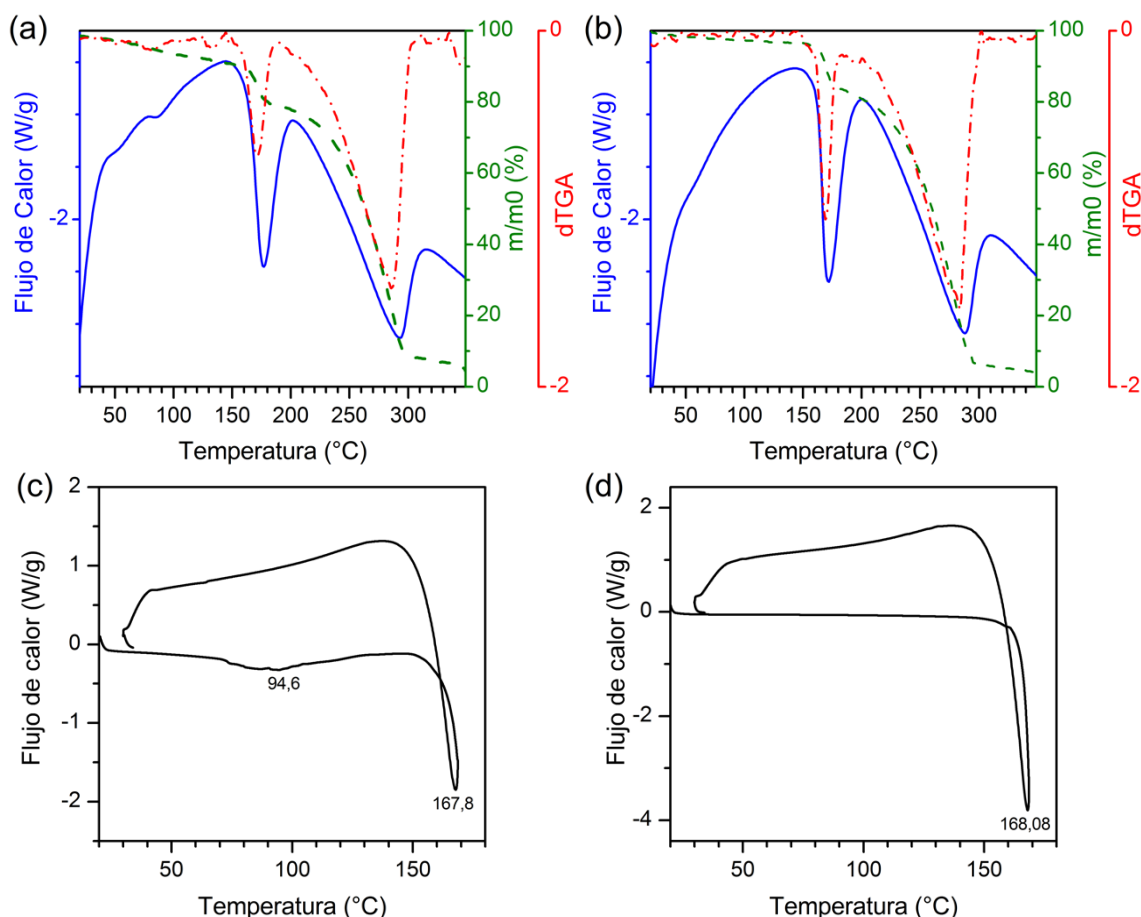


Figura A4.18. (a y b) Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja) obtenidas en cápsula abierta, (c y d) curvas de DSC obtenidas en cápsula cerrada (procesos exotérmicos graficados hacia arriba). Solvente de recrystalización: (a y c) MeOH (b y d) acetona. Compuesto: ECHCA.nHo. (Literatura p.f./°C): ECHCA (245-250)⁶¹; nHo (198-201)⁷¹

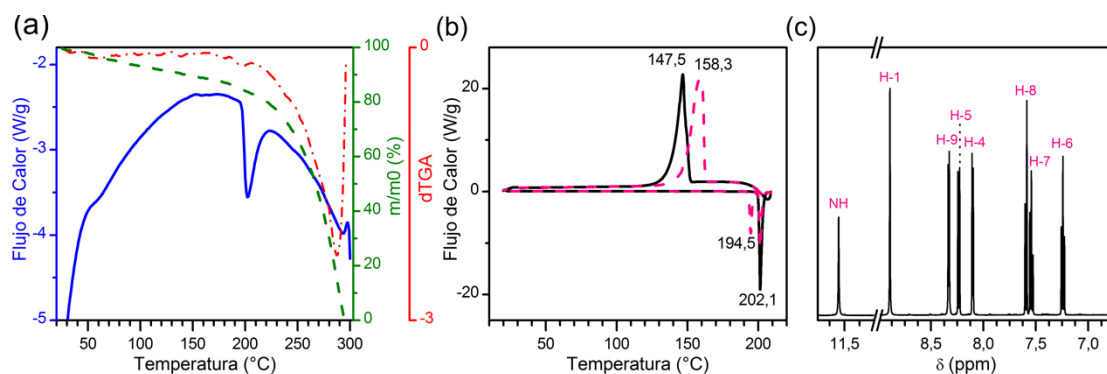


Figura A4.19. (a) Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja) en cápsula abierta. (b) Curva de DSC en cápsula cerrada (procesos exotérmicos graficados hacia arriba), primer ciclo de calentamiento (línea continua negra) y segundo ciclo de calentamiento (línea punteada rosa) y (c) espectro ¹H-RMN sólido remanente luego del segundo ciclo de calentamiento en la DSC en cápsula cerrada. Compuesto (Literatura p.f./°C): nHo (198-201)⁷¹.

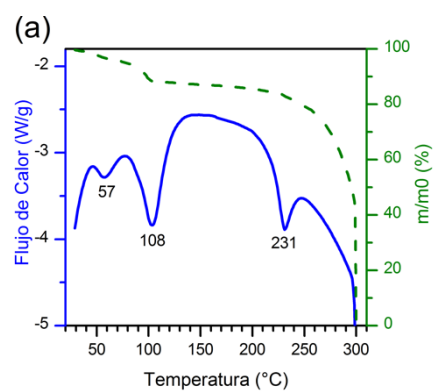


Figura A4.20. (a) Curvas de DSC (línea continua azul, procesos exotérmicos graficados hacia arriba), TGA (línea discontinua verde) y dTGA (línea punteada roja) en cápsula abierta. Compuesto (Literatura p.f./°C): nHo.HCl (219-221)⁶¹.

Anexo 5: Capítulo 5 - Estabilidad fotoquímica de las matrices MALDI estudiadas.

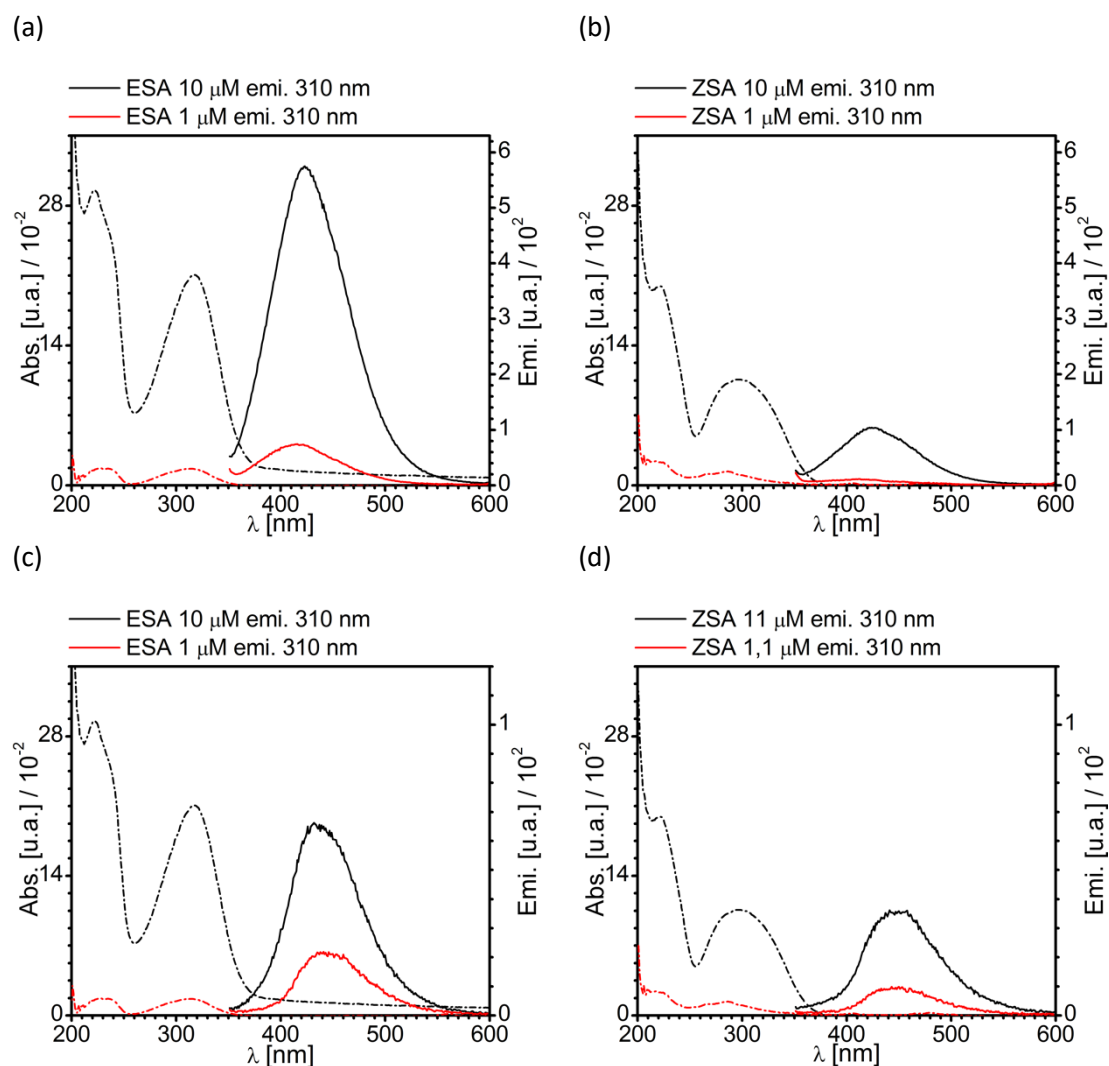


Figura A5.1. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{exc} = 310$ nm para los compuestos: (a y c) ESA y (b y d) ZSA. Concentración: 10 μ M (negro) y 1 μ M (rojo). Solvente: (a y b) MeOH y (c y d) MeOH:HCl(4,2 mM).

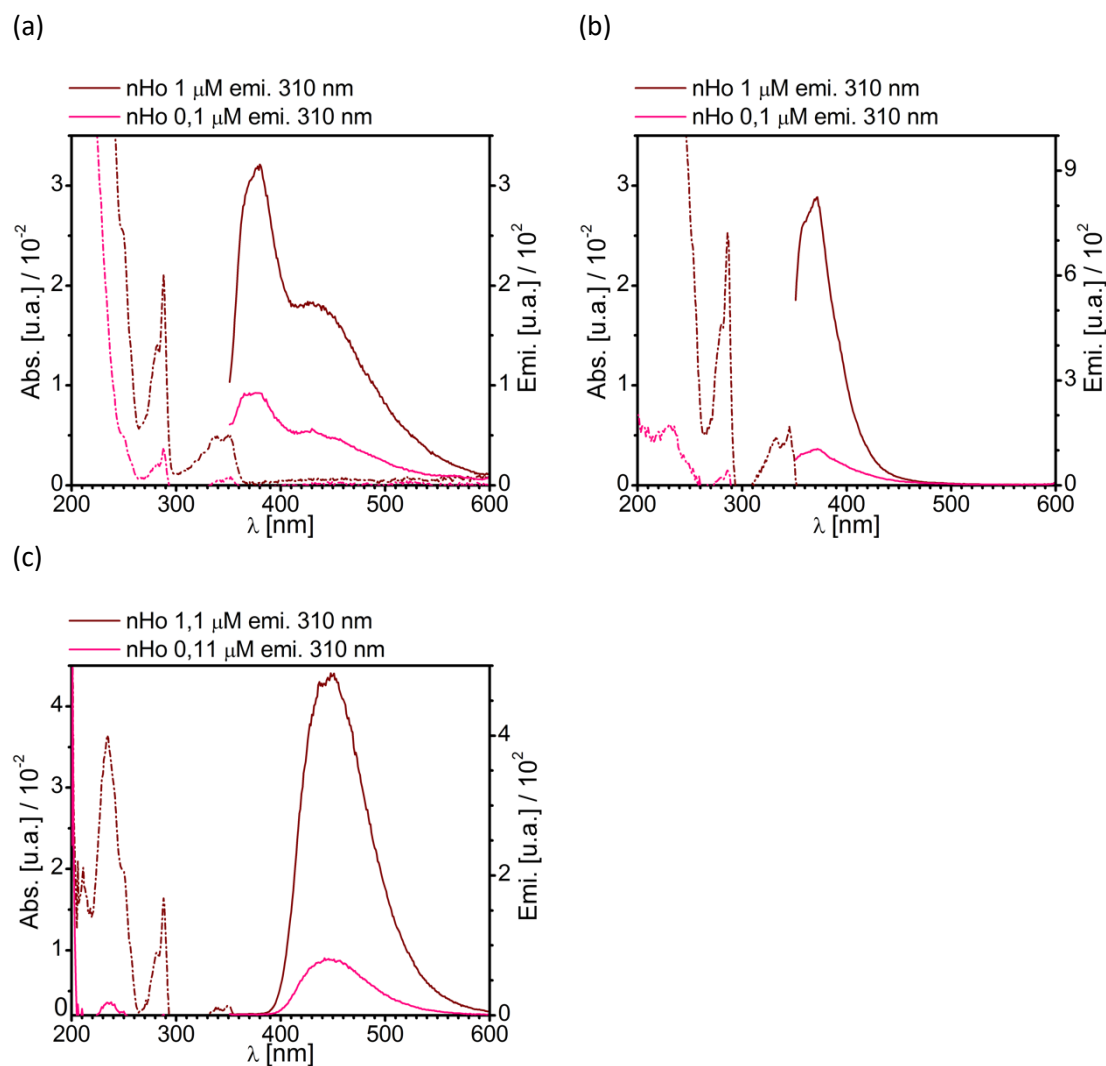
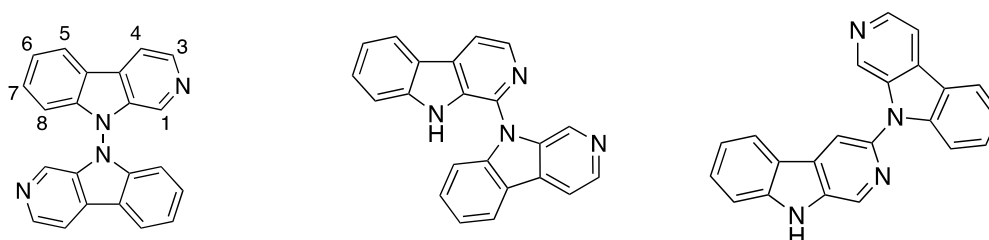


Figura A5.2. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{exc} = 310$ nm para nHo. Concentración: 1 μ M (rojo oscuro) y 0,1 μ M (rosa). Solvente: (a) MeOH, (b) MeCN y (c) MeOH:HCl(4,2 mM).



Esquema A5.1. Estructuras propuestas para la fotodimerización del nHo (Ref. ⁽⁴⁸⁾ R. Erra-Balsells et. al, Tetrahedron, 1983, **39**, 33–39).

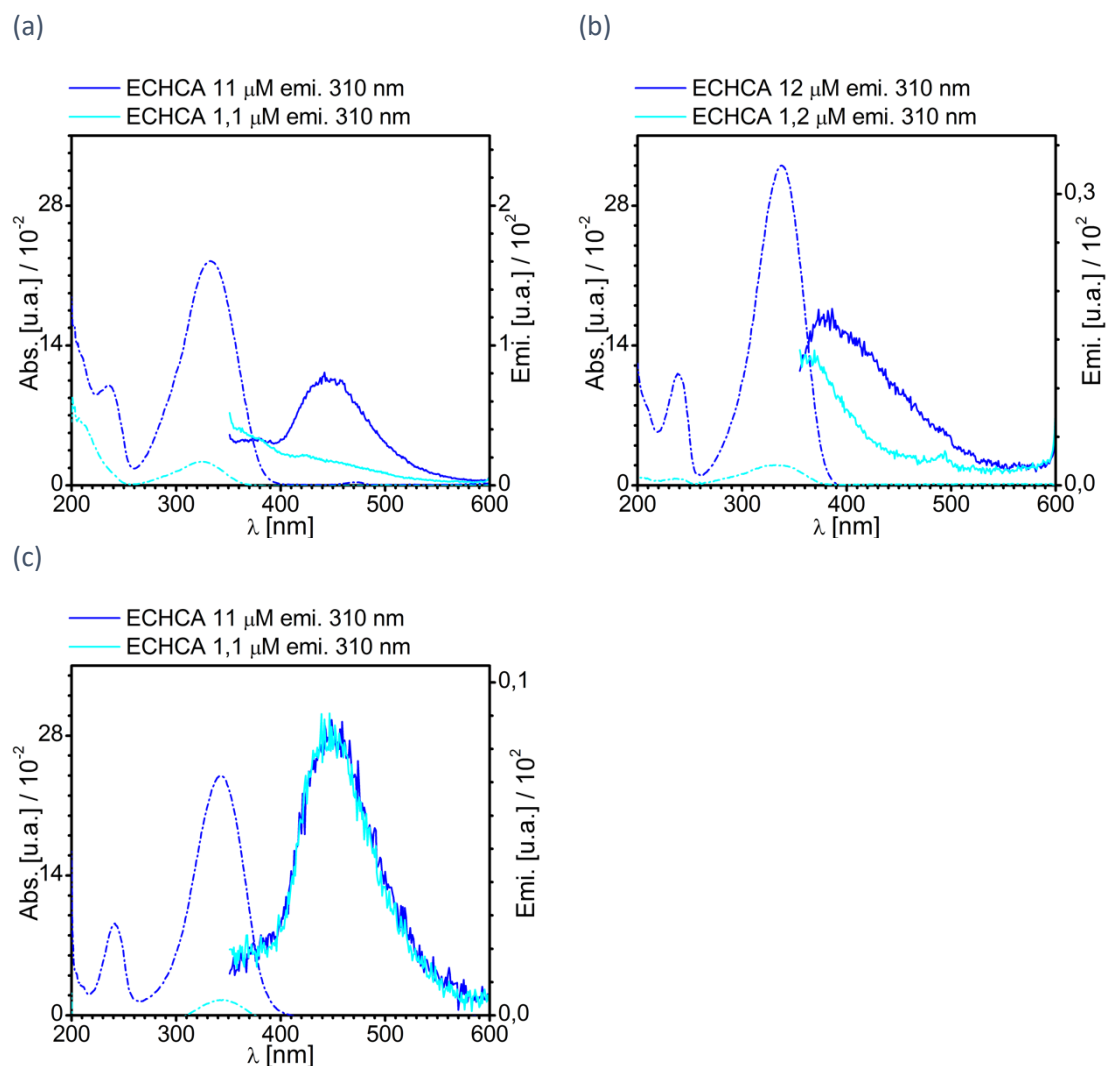


Figura A5.3. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm para ECHCA. Concentración: 11 μ M (azul) y 1,1 μ M (celeste). Solvente: (a) MeOH, (b) MeCN y (c) MeOH:HCl(4,2 mM).

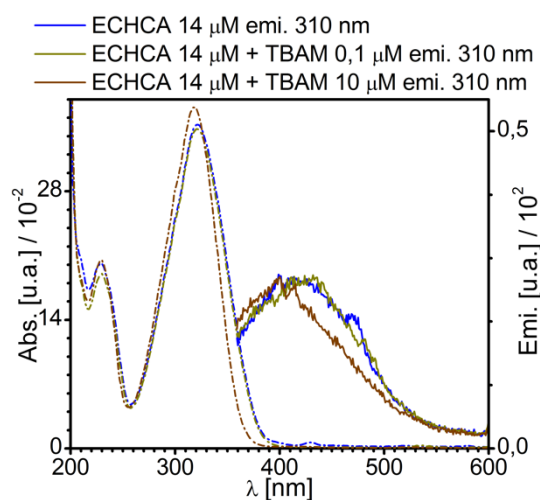


Figura A5.4. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm para el compuesto ECHCA (azul) con los agregados de TBAM en relación molar ácido:amina 100:1 (verde) y 1:1 (marrón). Solvente: MeOH.

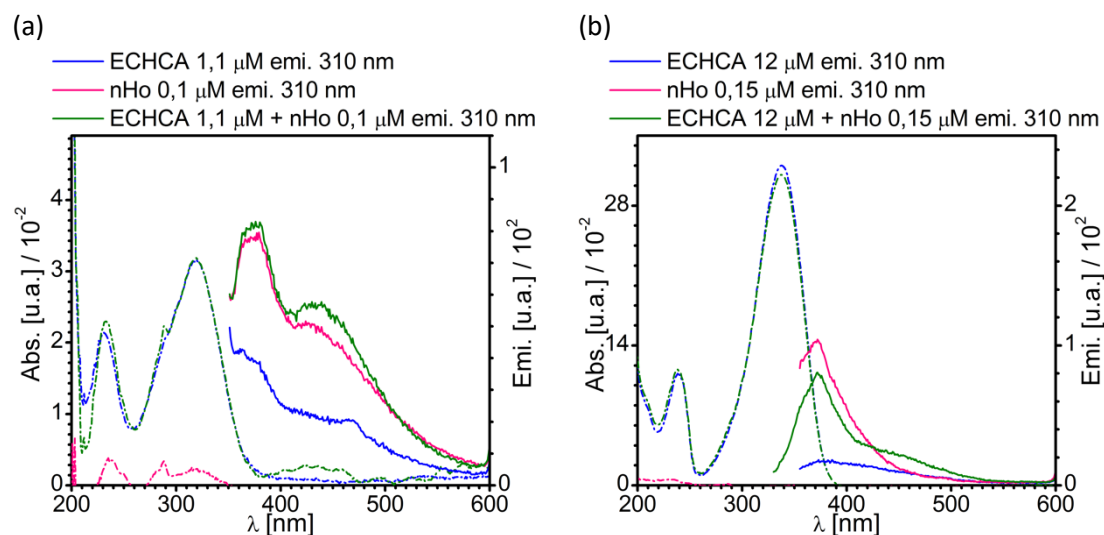


Figura A5.5. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{exc} = 310$ nm para: (a) ECHCA 1,1 μ M (azul), nHo 0,1 μ M (rosa) y ECHCA:nHo 10:1 (verde) y (b) ECHCA 12 μ M (azul), nHo 0,15 μ M (rosa) y ECHCA:nHo 100:1 (verde). Solvente: (a) MeOH y (b) MeCN.

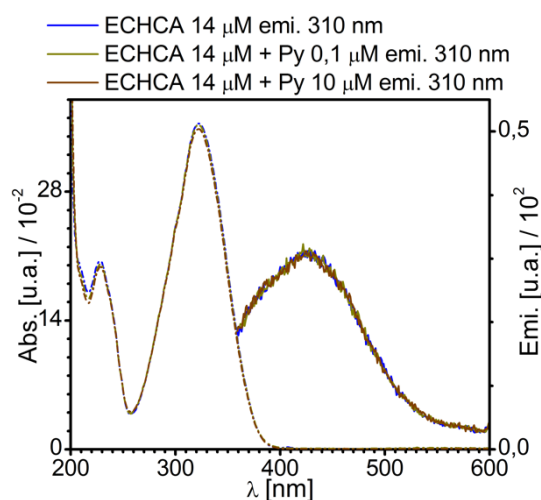


Figura A5.6. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{exc} = 310$ nm para ECHCA (azul) y ECHCA:Py 100:1 (verde), 1:1 (marrón). Solvente: MeOH.

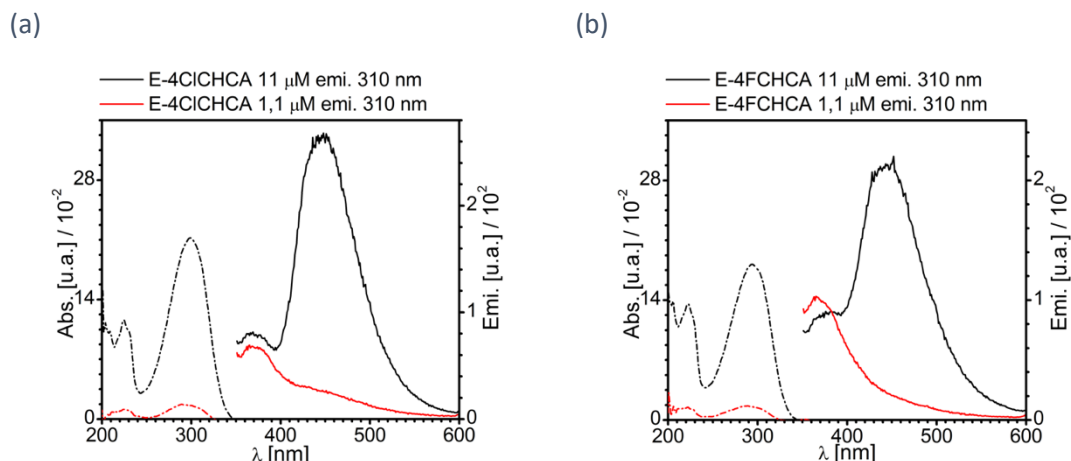


Figura A5.7. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm para los compuestos: (a) E-4ClCHCA y (b) E-4FCHCA. Concentración: 11 μ M (negro) y 1,1 μ M (rojo). Solvente: MeOH.

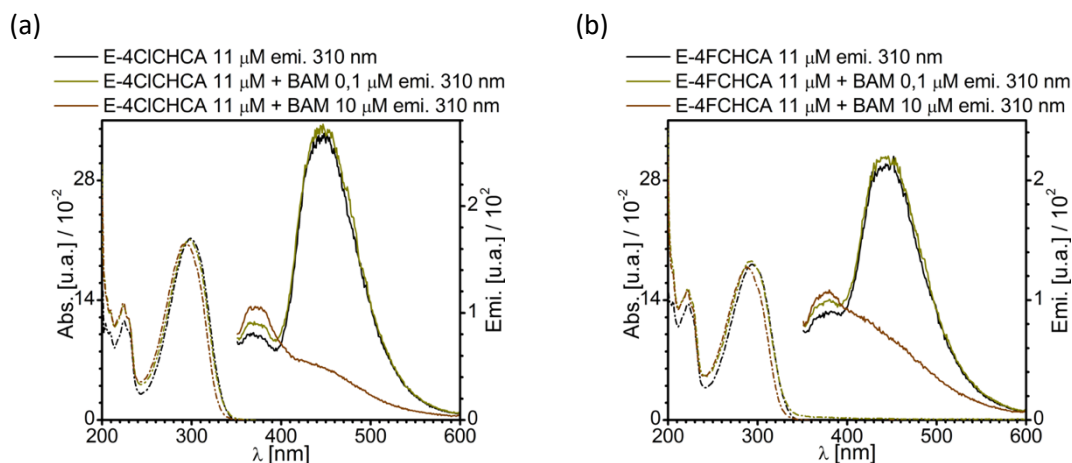


Figura A5.8. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm para los compuestos: (a) E-4ClCHCA (negro) y E-4ClCHCA:BAM 100:1 (verde), 1:1 (marrón) y (b) E-4FCHCA (negro) y E-4FCHCA:BAM 100:1 (verde), 1:1 (marrón). Solvente: MeOH.

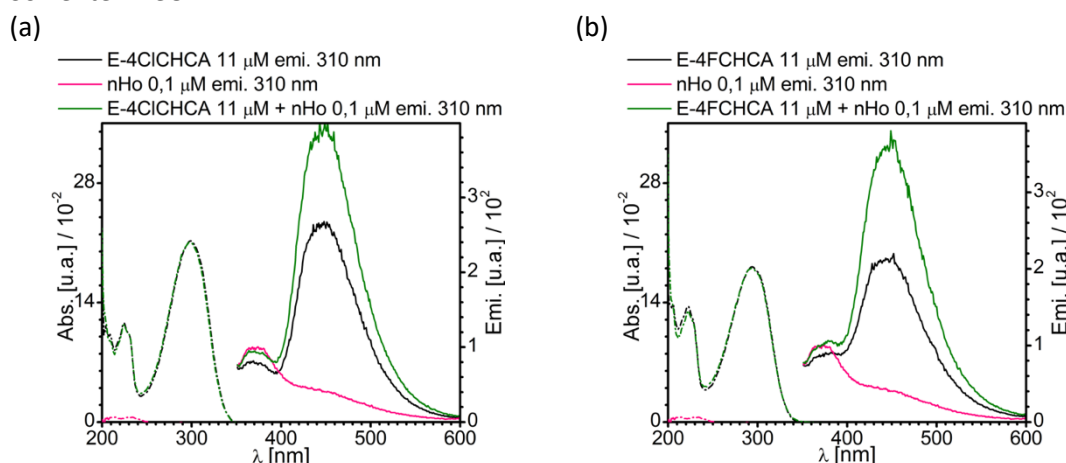
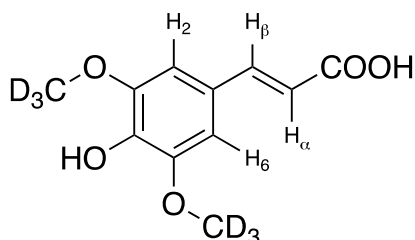


Figura A5.9. Espectros de Absorción UV-Vis (línea punteada) y emisión fluorescente (línea continua) a $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm para los compuestos: (a) E-4ClCHCA (negro), nHo (rosa), E-4ClCHCA:nHo 100:1 (verde) y (b) E-4FCHCA (negro), nHo (rosa), E-4FCHCA:nHo 100:1 (verde). Solvente: MeOH.

Anexo 6 : Capítulo 6 - Estudio de complejos moleculares por ESI-MS entre las matrices MALDI ESA y ZSA con carbohidratos.



Esquema A6.1. Estructura ESA-d6

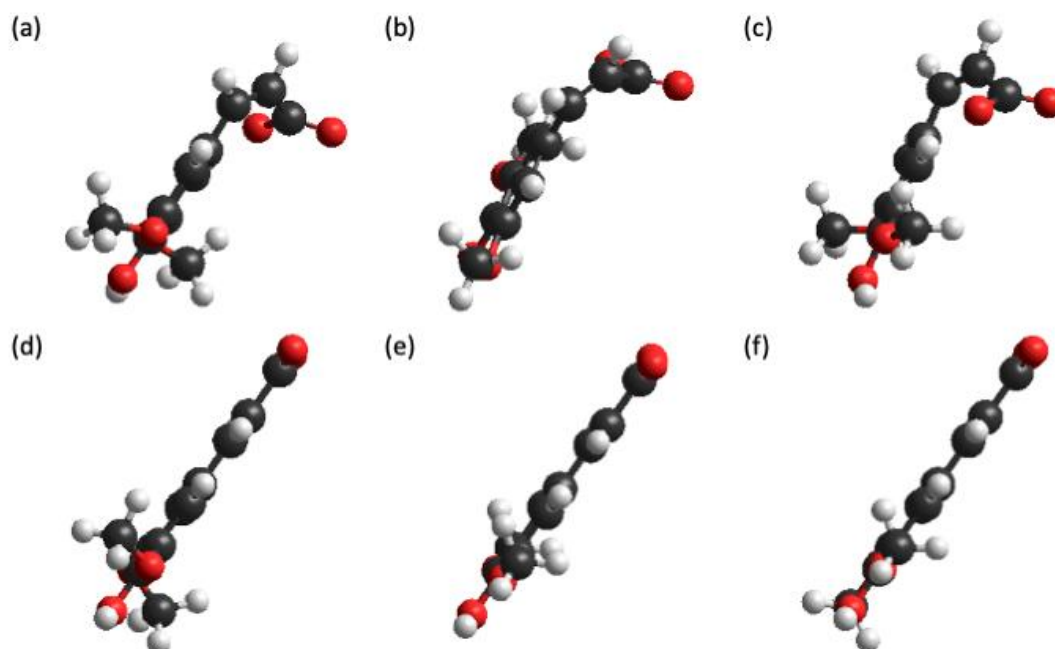
Descripción espectroscópica del ESA-d6:

Ácido E-3,5-di(metoxi-d3)-4-hidroxicinámico (ESA-d6): (p.f. =185,5 °C), ^1H -RMN (500 MHz; acetona-d6; tetrametilsilano (TMS) como patrón interno estándar): δ_{H} (ppm): 6,40 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H_α), 7,01 (s, 2H, H_2 y H_6) y 7,58 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, H_β). HRMS (modo iónico negativo): valor m/z calculado para $[\text{M}-\text{H}]^-$ con $\text{M} = \text{C}_{11}\text{H}_6\text{D}_6\text{O}_5$: 229,0989; m/z experimental: 229,0999. HRMS/MS (modo iónico negativo, CID voltaje: 15 V): ion precursor con m/z 229. 0999 (25%), iones producto con m/z 211,0575 (100%), m/z 193,0148 (27%), m/z 185,1070 (12%), m/z 150,0312 (39%), m/z 149,0244 (23%), m/z 137,0552 (4%), m/z 121,0275 (2%) y m/z 93,0331 (1%).

Tabla A6.1. Modelado Molecular. Energía HOMO y LUMO y propiedades QSAR para ESA y ZSA

| | Compuesto | HOMO Energía (eV) | LUMO Energía (eV) | Δ^* Energía (eV) | M. Dipolar (Debye) | E. Hidrata- ción (kcal/m ol) | LogP | Área Sup. (aprox.) (Å ²) | Área Sup. (Grid) (Å ²) | Vol. (Å ³) | Polari- zabili- dad (Å ³) |
|----|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------------------|------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|
| 1 | ESA | -9,245 | -1,015 | 8,230 | 5,2 | -15,9 | -1,6 | 411,2 | 421,9 | 669,4 | 22,1 |
| 2 | ESAp** | -8,891 | -0,862 | 8,029 | 2,4 | -13,7 | -1,6 | 402,9 | 421,2 | 664,2 | 22,1 |
| 3 | ESApS*** | -8,795 | -0,887 | 7,908 | 0,9 | -14,3 | -1,6 | 409,5 | 421,6 | 665,7 | 22,1 |
| 4 | [ESA-H] ⁻ | -4,548 | 2,484 | 7,032 | 20,0 | -8,9 | -0,2 | 409,7 | 416,8 | 660,8 | 21,6 |
| 5 | [ESAp-H] ⁻ ** | -4,519 | 2,640 | 7,159 | 20,7 | -8,4 | -0,2 | 404,2 | 415,9 | 655,2 | 21,6 |
| 6 | [ESApS-H] ⁻ *** | -4,555 | 2,653 | 7,208 | 18,5 | -8,9 | -0,2 | 410,7 | 417,9 | 656,7 | 21,6 |
| 7 | ZSA | -9,095 | -0,601 | 8,494 | 1,9 | -12,8 | -1,6 | 371,8 | 410,3 | 657,5 | 22,1 |
| 8 | ZSAp** | -8,961 | -0,560 | 8,401 | 2,6 | -12,5 | -1,6 | 368,1 | 412,6 | 654,3 | 22,1 |
| 9 | ZSApS*** | -8,773 | -0,527 | 8,246 | 1,9 | -12,7 | -1,6 | 369,9 | 409,7 | 651,8 | 22,1 |
| 10 | [ZSA-H] ⁻ | -5,097 | 3,100 | 8,197 | 12,2 | -9,9 | -0,2 | 375,6 | 406,7 | 643,9 | 21,6 |
| 11 | [ZSAp-H] ⁻ ** | -4,983 | 3,123 | 8,106 | 11,2 | -10,0 | -0,2 | 374,7 | 404,5 | 644,6 | 21,6 |
| 12 | [ZSApS-H] ⁻ *** | -4,936 | 3,155 | 8,091 | 11,7 | -10,1 | -0,2 | 376,5 | 408,7 | 643,7 | 21,6 |

* Δ = [LUMO-HOMO]; **p, estructura plana: ambos enlaces O-CH₃ en el mismo plano que el anillo aromático. ***ps, estructura plana y posición simétrica de los sustituyentes CH₃O-, elemento de simetría perpendicular al plano del anillo aromático.



Esquema A6.2. Comparación de la geometría optimizada de los distintos rotámeros de los iones [ZSA-H]⁻ (arriba) y [ESA-H]⁻ (abajo) cuyas propiedades QSAR y HOMO se incluyen en la Tabla A6.1. Detalles según la nomenclatura de la Tabla A6.1: [ZSA-H]⁻ (arriba): (a) [ZSA-H]⁻, (b) [ZSAp-H]⁻ y (c) [ZSApS-H]⁻; [ESA-H]⁻ (abajo): (d) [ESA-H]⁻, (e) [ESAp-H]⁻ y (f) [ESApS-H]⁻.

Tabla A6.2. Modelado Molecular. Energía HOMO y LUMO y propiedades QSAR para los carbohidratos estudiados.

| | Compuesto | HOMO Energía (eV) | LUMO Energía (eV) | Δ^* Energía (eV) | M. Dipolar (Debye) | E. Hidrata- ción (kcal/m ol) | LogP | Área Sup. (aprox.) (Å ²) | Área Sup. (Grid) (Å ²) | Vol. (Å ³) | Polar izabil idad (Å ³) |
|----|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------------------|------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|
| 1 | Glu | -10,602 | 2,084 | 12,686 | 1,5 | -22,4 | -1,8 | 235,7 | 318,7 | 489,9 | 14,8 |
| 2 | Frc | -10,930 | 1,862 | 12,792 | 1,5 | -23,2 | -1,8 | 267,9 | 325,1 | 504,8 | 14,8 |
| 4 | M5 | -10,390 | 1,271 | 11,661 | 10,3 | -69,5 | -6,6 | 794,4 | 1021,5 | 1914,6 | 68,5 |
| 3 | F5 | -10,822 | 1,050 | 11,872 | 3,5 | -62,9 | -4,6 | 705,1 | 905,5 | 1801,5 | 68,5 |
| 5 | M6 | -10,423 | 1,239 | 11,662 | 11,2 | -81,1 | -7,8 | 923,9 | 1203,9 | 2268,6 | 81,9 |
| 6 | M7 | -10,264 | 1,374 | 11,638 | 10,2 | -93,9 | -9,1 | 1083,4 | 1379,9 | 2636,3 | 95,4 |
| 7 | βCD | -10,604 | 1,362 | 11,966 | 5,6 | -76,8 | -8,5 | 907,7 | 1175,2 | 2423,3 | 93,9 |
| 8 | [Glu-H] ⁻ | | | | | | | | | | |
| | GluA2** | -4,252 | 6,401 | 10,653 | 6,4 | -20,5 | <0,1 | 238,4 | 312,1 | 475,9 | 14,4 |
| | GluA3** | -3,485 | 6,383 | 9,868 | 5,9 | -20,3 | | 240,2 | 313,6 | 480,2 | |
| | GluA4** | -4,044 | 6,462 | 10,506 | 4,8 | -21,4 | | 242,4 | 312,8 | 476,0 | |
| | GluA6** | -3,748 | 6,310 | 10,058 | 6,9 | -19,9 | | 225,9 | 308,9 | 474,4 | |
| 9 | [Frc-H] ⁻ | | | | | | | | | | |
| | FrcA1** | -3,814 | 6,206 | 10,020 | 6,5 | -19,9 | 0,5 | 260,4 | 319,1 | 485,9 | 14,4 |
| | FrcA2** | -4,490 | 6,613 | 11,103 | 4,5 | -21,1 | | 264,1 | 318,9 | 489,1 | |
| | FrcA3** | -4,174 | 6,559 | 10,733 | 4,6 | -20,8 | | 265,7 | 318,7 | 488,0 | |
| | FrcA4** | -4,325 | 6,416 | 10,741 | 5,5 | -20,9 | | 255,2 | 313,4 | 479,0 | |
| | FrcA6** | -3,156 | 5,610 | 8,766 | 9,8 | -19,3 | | 259,5 | 319,7 | 484,1 | |
| 10 | [F5-H] ⁻ | | | | | | | | | | |
| | F5A33*** | -4,929 | 3,285 | 8,214 | 13,6 | -61,8 | -2,8 | 705,2 | 898,6 | 1787,1 | 68,1 |
| | F5A34*** | -5,021 | 3,306 | 8,327 | 16,5 | -61,3 | | 705,7 | 896,2 | 1790,6 | |
| | F5A36*** | -4,807 | 3,099 | 7,906 | 18,6 | -58,4 | | 677,9 | 895,1 | 1782,8 | |
| | F5A16*** | -5,229 | 3,324 | 8,553 | 11,4 | -61,8 | | 670,9 | 873,2 | 1744,9 | |
| | F5A12*** | -4,417 | 2,752 | 7,169 | 22,9 | -61,8 | | 709,1 | 901,4 | 1788,9 | |
| | F5A13*** | -4,425 | 2,887 | 7,312 | 19,4 | -60,3 | | 688,9 | 895,0 | 1782,7 | |
| | F5A53*** | -5,702 | 3,371 | 9,073 | 6,9 | -61,7 | | 678,9 | 890,9 | 1769,4 | |
| 11 | [M5-H] ⁻ | | | | | | | | | | |
| | M5A32*** | -4,014 | 3,143 | 7,157 | 7,6 | -68,2 | | 801,9 | 1020,5 | 1904,4 | 68,1 |
| | M5A33*** | -4,741 | 3,080 | 7,821 | 9,9 | -67,8 | | 773,6 | 1010,9 | 1897,8 | |
| | M5A36*** | -4,397 | 2,975 | 7,372 | 14,5 | -65,4 | | 768,1 | 1017,9 | 1889,5 | |
| | M5A11*** | -4,239 | 2,366 | 6,505 | 47,5 | -67,1 | | 795,7 | 1019,9 | 1903,5 | |
| | M5A12*** | -4,326 | 2,267 | 6,593 | 46,9 | -67,0 | | 769,1 | 1017,0 | 1885,9 | |
| 12 | [M6-H] ⁻ | | | | | | | | | | |
| | M6A32*** | -4,800 | 2,495 | 7,295 | 24,7 | -78,9 | -6,0 | 915,6 | 1194,7 | 2257,6 | 81,5 |
| | M6A33*** | -4,649 | 2,468 | 7,117 | 22,4 | -79,6 | | 910,6 | 1195,3 | 2251,5 | |
| | M6A36*** | -3,972 | 2,687 | 6,659 | 14,6 | -78,7 | | 917,9 | 1199,4 | 2246,9 | |
| | M6A11*** | -4,183 | 2,082 | 6,265 | 55,1 | -78,8 | | 926,5 | 1198,3 | 2251,8 | |
| | M6A12*** | -4,839 | 2,211 | 7,050 | 46,7 | -77,3 | | 884,5 | 1172,1 | 2224,2 | |
| | M6A16*** | -3,423 | 2,111 | 5,534 | 53,6 | -78,8 | | 925,1 | 1196,1 | 2249,8 | |
| 13 | [M7-H] ⁻ | | | | | | | | | | |
| | M7A42*** | -4,123 | 2,633 | 6,756 | 13,1 | -89,2 | -6,9 | 1086,1 | 1374,3 | 2611,9 | 99,3 |
| | M7A46*** | -4,138 | 2,793 | 6,931 | 12,2 | -86,9 | | 1057,9 | 1362,8 | 2594,4 | |
| | M7A11*** | -4,473 | 2,419 | 6,892 | 43,8 | -87,5 | | 1066,4 | 1361,4 | 2601,5 | |
| 14 | [βCD-H] ⁻ | | | | | | | | | | |
| | βCDA2** | -5,854 | 2,929 | 8,783 | 15,0 | -74,2 | -6,8 | 833,7 | 1132,2 | 2377,9 | 93,5 |
| | βCDA6** | -4,542 | 2,655 | 7,197 | 19,5 | -75,0 | | 886,1 | 1146,7 | 2378,3 | |

* Δ = [LUMO-HOMO]; **CarbAz: z es la posición en la molécula del grupo C-OH cuyo H se elimina para dar la carga negativa. *** CarbAxz: x es la posición del monosacárido en la estructura total de la molécula de Carb; z es la posición en el monosacárido del grupo C-OH cuyo H se elimina.

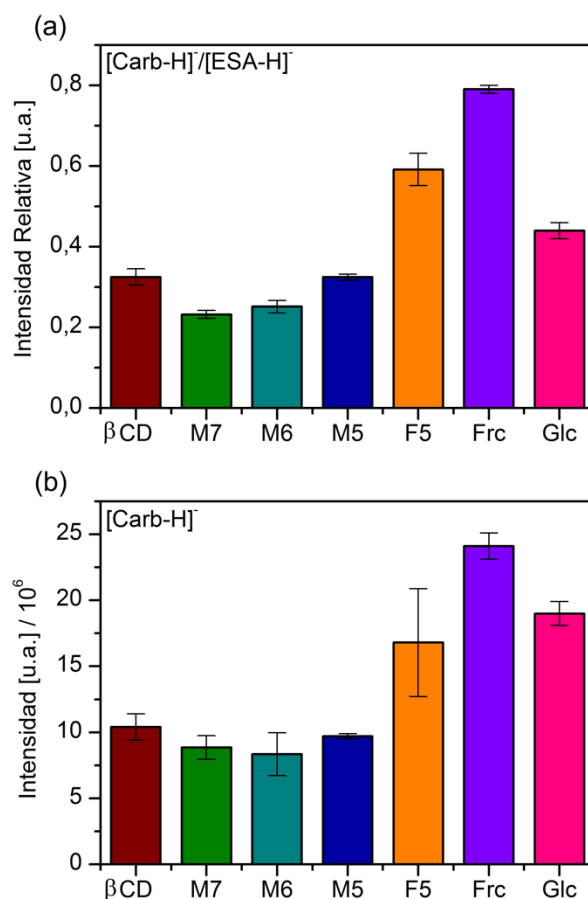
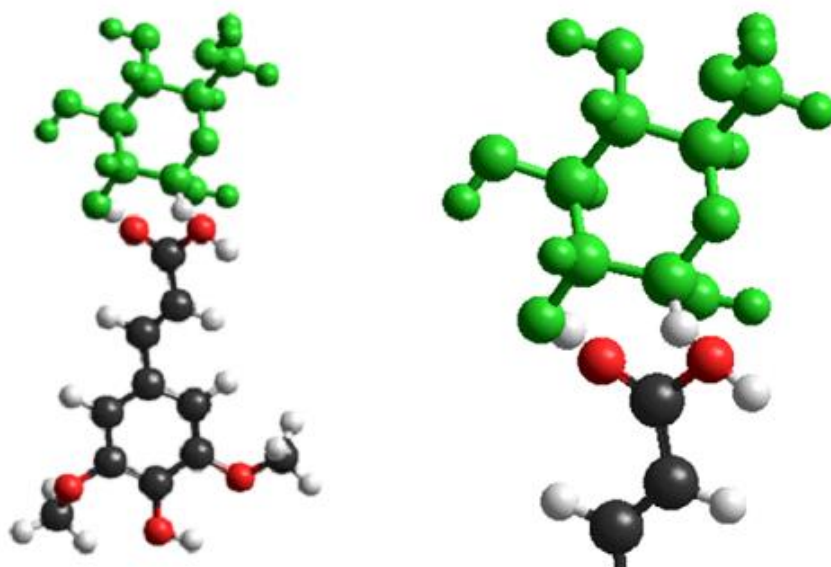
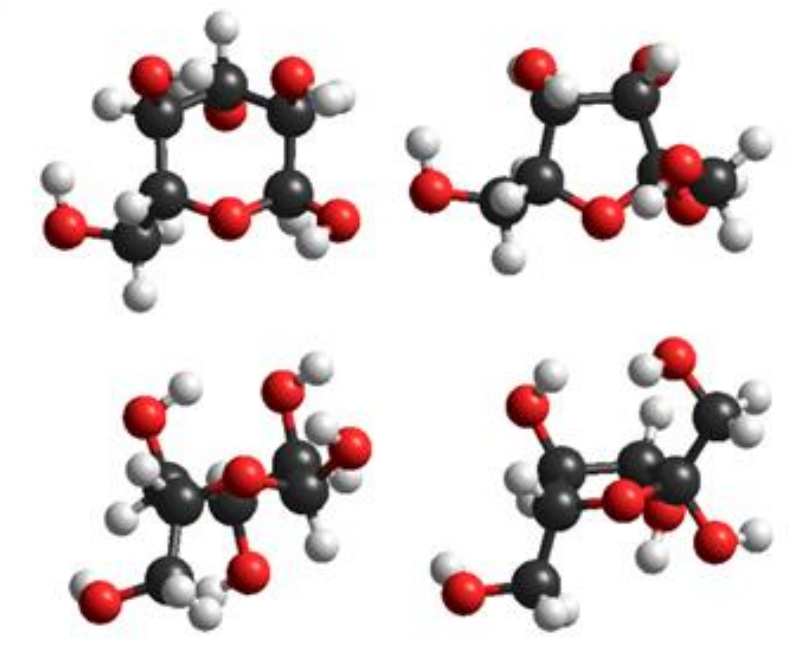


Figura A6.1. (a) Intensidad relativa de la señal $[\text{Carb-H}]^+$ respecto a la del ion $[\text{ESA-H}]^+$ ($[\text{Carb-H}]^+ / [\text{ESA-H}]^+$) y (b) intensidad absoluta de la señal $[\text{Carb-H}]^+$ para cada Carb estudiado. Carb 15 μM y ESA 5 μM en agua:MeOH (7:3 v/v). El ESA se utilizó como calibrante externo (referencia).

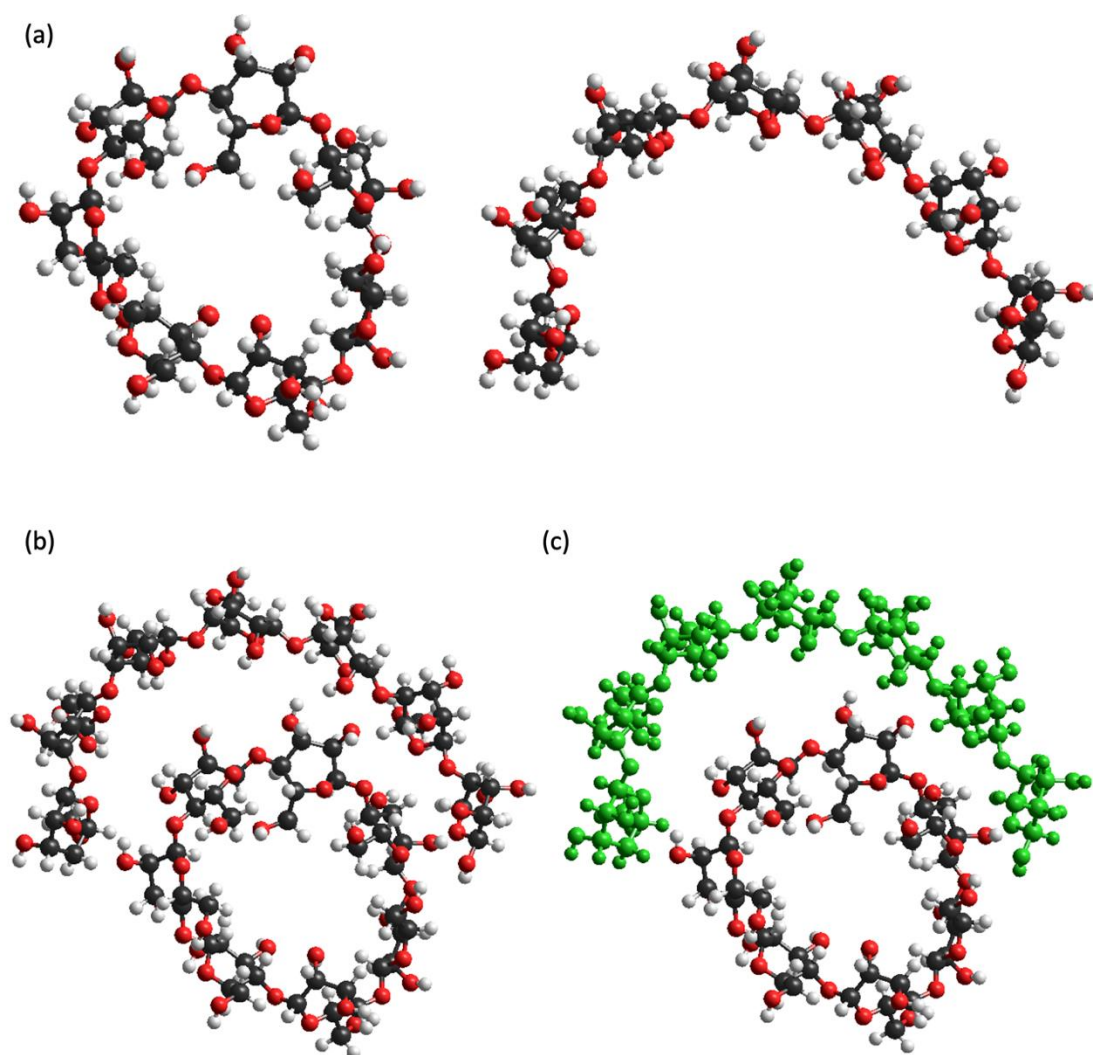
(A)



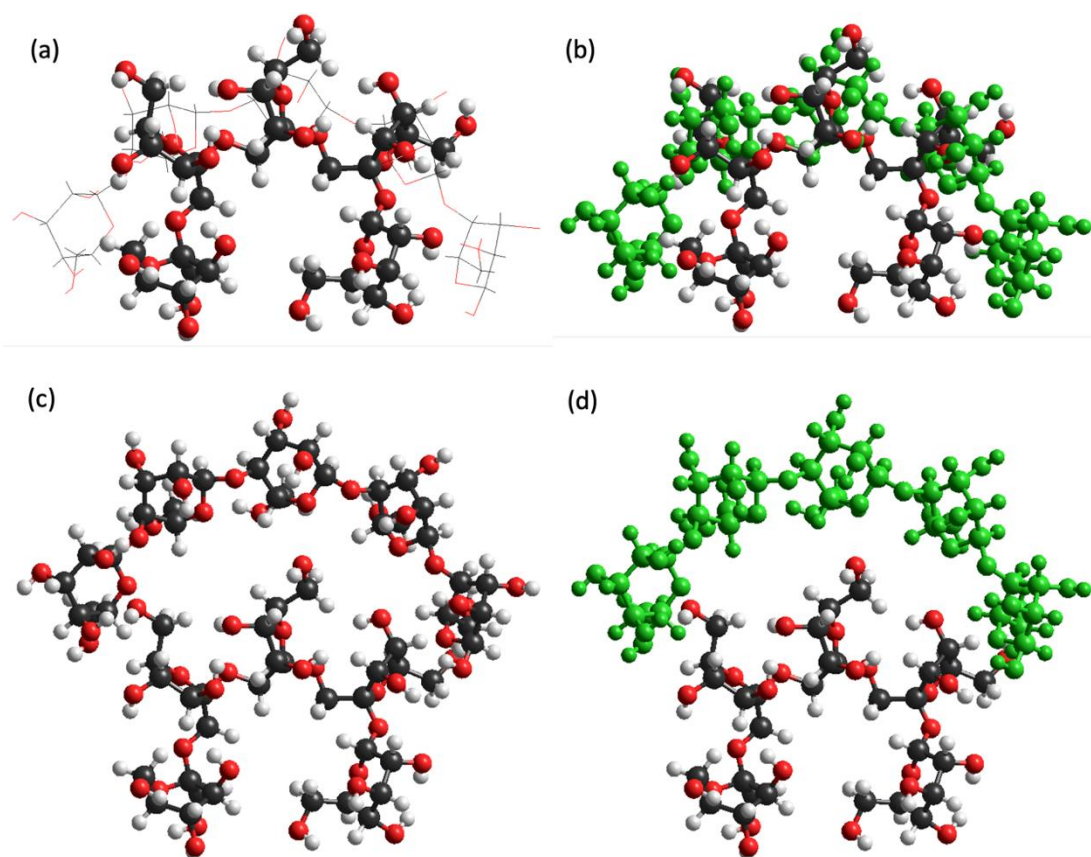
(B)



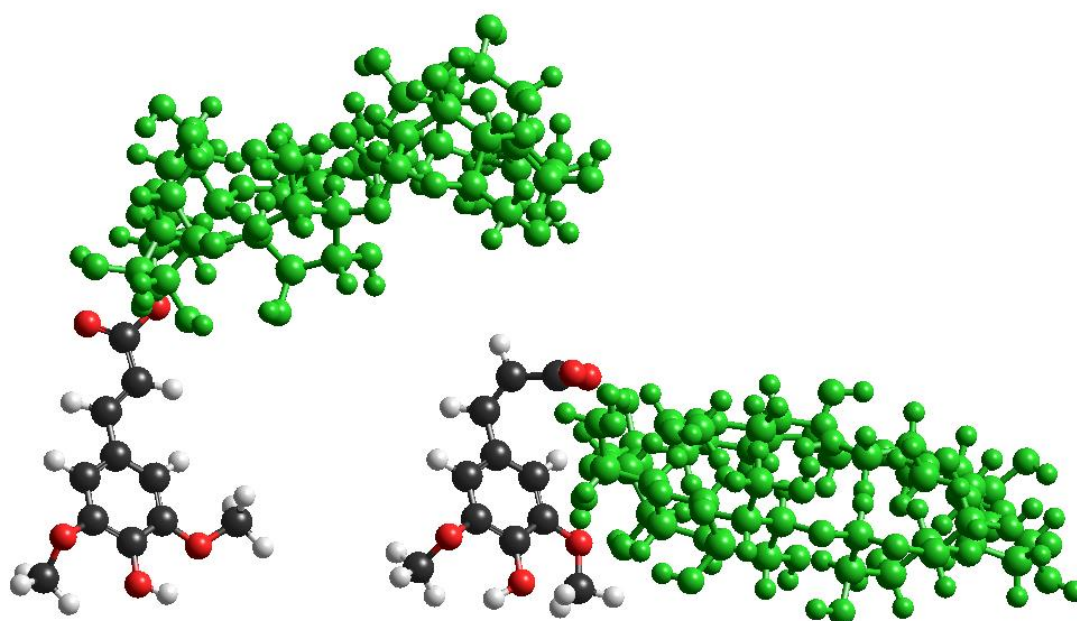
Esquema A6.3. (A) Detalles adicionales del Esquema 1(c) incluido en el texto principal: (izquierda) complejo ESA+Glc 1:1. Glc en verde excepto los dos átomos de H implicados en los puentes de H entre ESA y Glc; (derecha) mejora de la región de interacción de los puentes de H. (B) Comparación de la geometría optimizada de los Carbs Glc (izquierda) y Frc (derecha). Vistas de las moléculas desde dos planos diferentes (arriba: vista superior del anillo; abajo: vista desde el plano perpendicular al anillo).



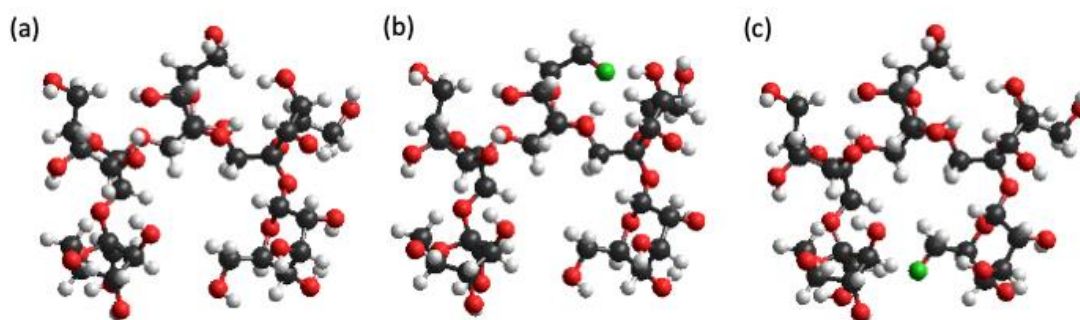
Esquema A6.4. Comparación de la geometría optimizada de los Carbs β CD y M7. (a) β CD (izquierda) y M7 (derecha); (b) M7 (arriba) y β CD (abajo); (c) ídem (b) con M7 en verde.



Esquema A6.5. Comparación de la geometría optimizada de los Carbs F5 y M5: (a) Superposición de las moléculas F5 (palos y bolas) y M5 (esqueleto); (b) Superposición de las moléculas F5 (palos y bolas) y M5 (palos y bolas en verde); (c) M5 (arriba) y F5 (abajo) y (d) M5 (arriba, verde) y F5 (abajo).



Esquema A6.6. Comparación de la geometría optimizada de los complejos [ESA-H]⁺ (izquierda) y [ZSA-H]⁺ (derecha) con βCD, [ESA+βCD-H]⁺ y [ZSA+βCD-H]⁺. βCD en verde.



Esquema A6.7. Comparación de la geometría optimizada de la molécula para F5 (a) y $[F5-H]^-$ (b y c), cuyas propiedades QSAR y HOMO se incluyen en la Tabla A6.2. Detalles según la nomenclatura de la Tabla A6.2: F5 (molécula neutra, a), $[F5-H]^-$ (anión): F5A36 (b), F5A16 (c). En la especie aniónica el oxígeno desprotonado se indica en verde. La distorsión de la geometría de la molécula permite una estabilización especial debido al enlace de hidrógeno formado entre este oxo-ión y un protón perteneciente a un grupo hidroxilo situado espacialmente cerca, a una distancia átomo-átomo $< 2 \text{ \AA}$ (Angstrom).

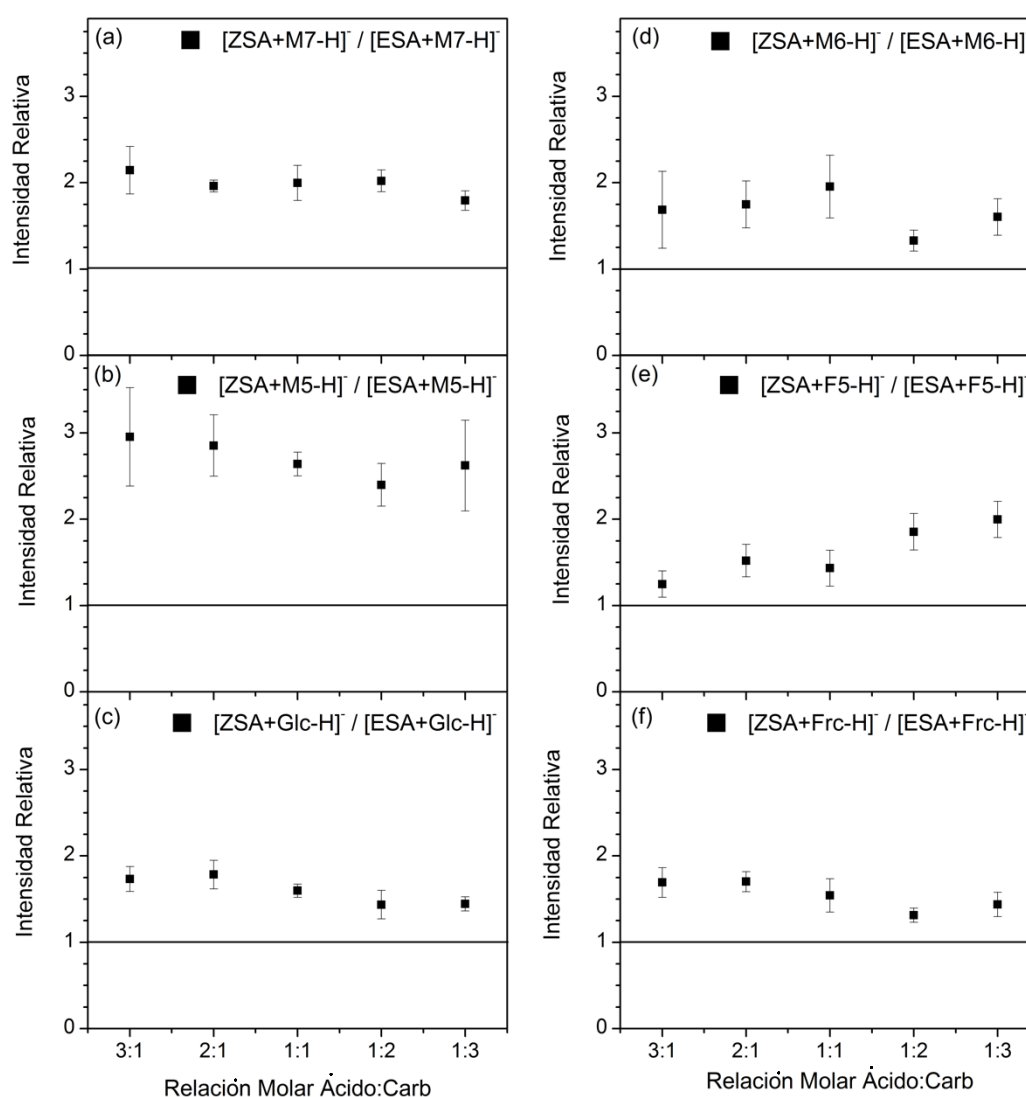


Figura A6.2. Intensidad de la señal $[ZSA+Carb-H]^+$ relativa a la del ion $[ESA+Carb-H]^+$, ($[ZSA+Carb-H]^+ / [ESA+Carb-H]^+$), para diferentes relaciones molares de Ácido:Carb. Concentración de ácido 5 μ M en todos los experimentos. Carbohidratos (Carb) estudiados: (a) M7, (b) M5, (c) Glc, (d) M6, (e) F5 y (f) Frc.

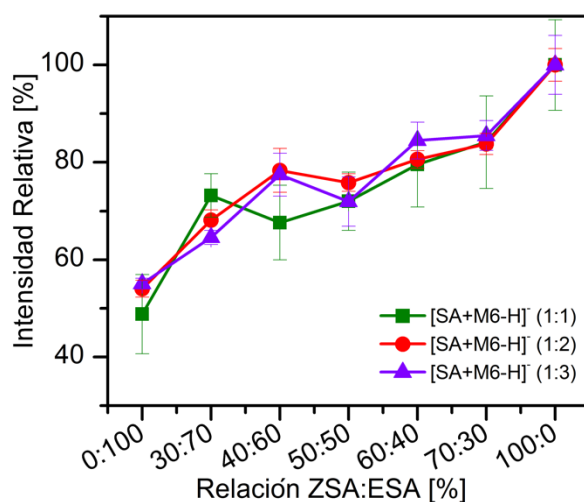
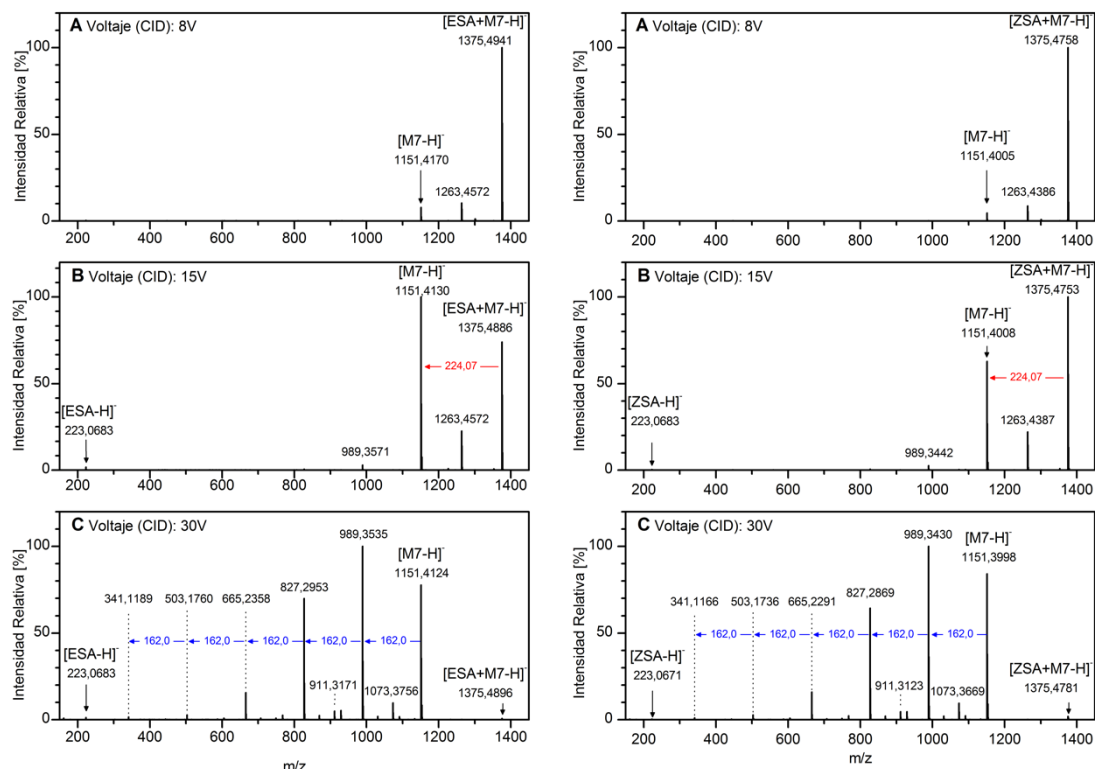
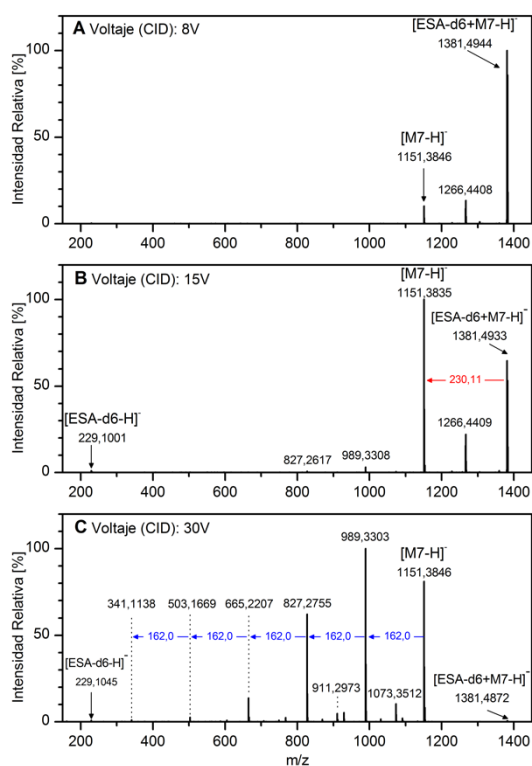


Figura A6.3. Curvas de titulación competitiva para M6. Intensidad relativa del pico $[\text{Ácido}+\text{M6}-\text{H}]^-$ en relación a la intensidad del ion $[\text{ZSA}+\text{M6}-\text{H}]^-$ ($[\text{Ácido}+\text{M6}-\text{H}]^-/[\text{ZSA}+\text{M6}-\text{H}]^-$), en función de la relación porcentual ZSA:ESA en la mezcla. Relación molar Ácido:M6: 1:1 (■), 1:2 (●) y 1:3 (▲). Ácido: ZSA+ESA variando la relación ZSA:ESA de 0:100% a 100:0%.



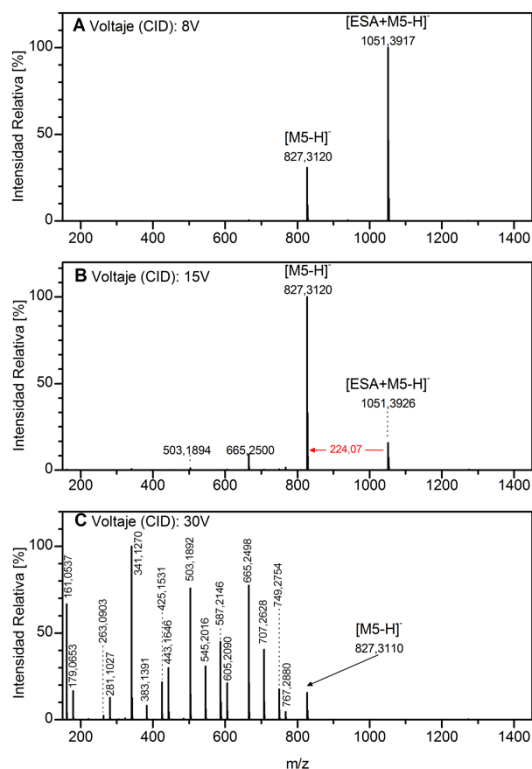
-Espectros MS/MS. Ion precursor: [ESA+M7-H]⁻.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)

- Espectros MS/MS. Ion precursor: [ZSA+M7-H]⁻.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)

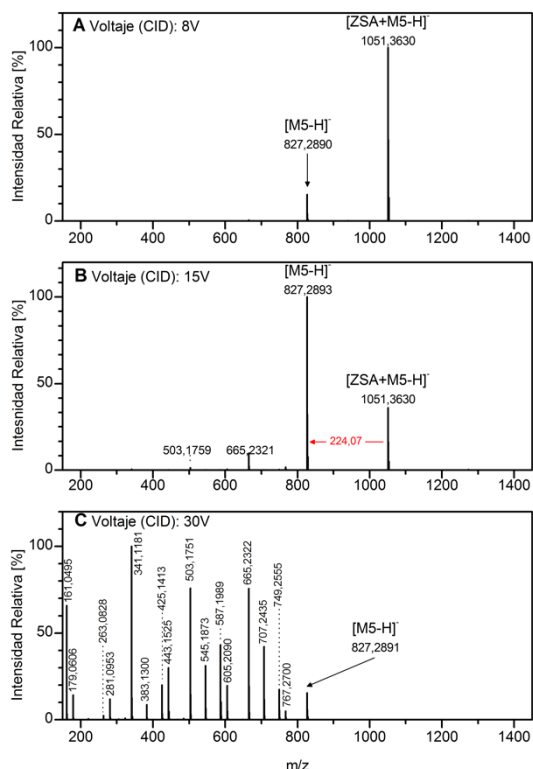


Espectros MS/MS. Ion precursor: [ESA-d6+M7-H]⁻.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)

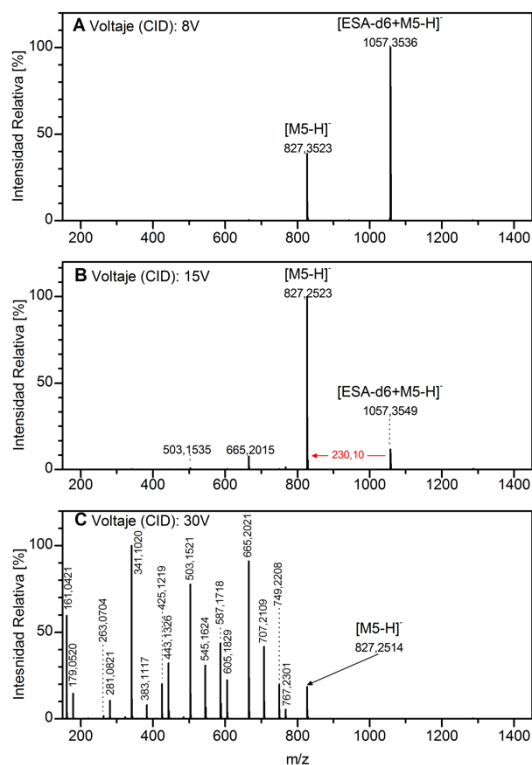
Figura A6.4. Espectros MS/MS. Iones precursores: [ESA+M7-H]⁻, [ZSA+M7-H]⁻ y [ESA-d6+M7-H]⁻. Voltaje CID, 8V, 15V y 30V. Relación molar Ácido:M7 1:3; agua:MeOH 7:3 v/v.



-Espectros MS/MS. Ion precursor: $[ESA+M5-H]^+$.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)

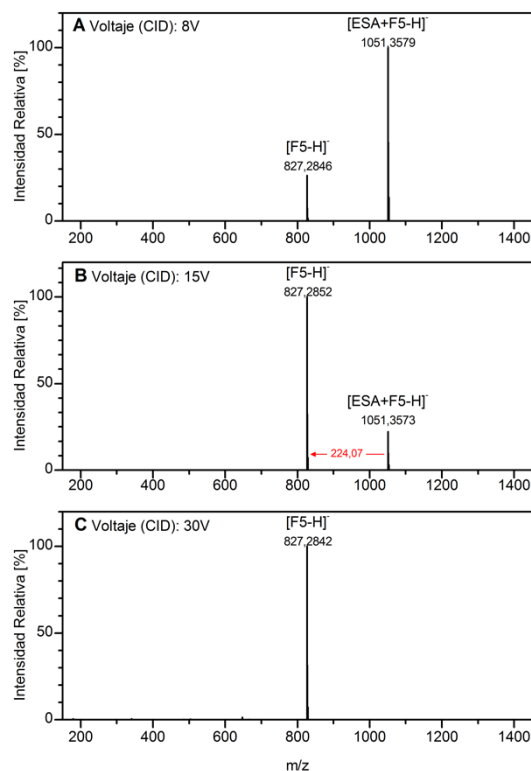


- Espectros MS/MS. Ion precursor: $[ZSA+M5-H]^+$.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)

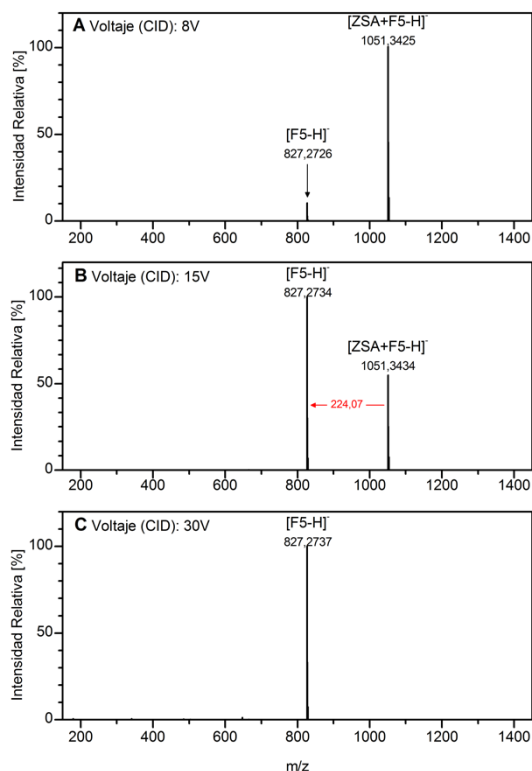


Espectros MS/MS. Ion precursor: $[ESA-d6+M5-H]^+$.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)

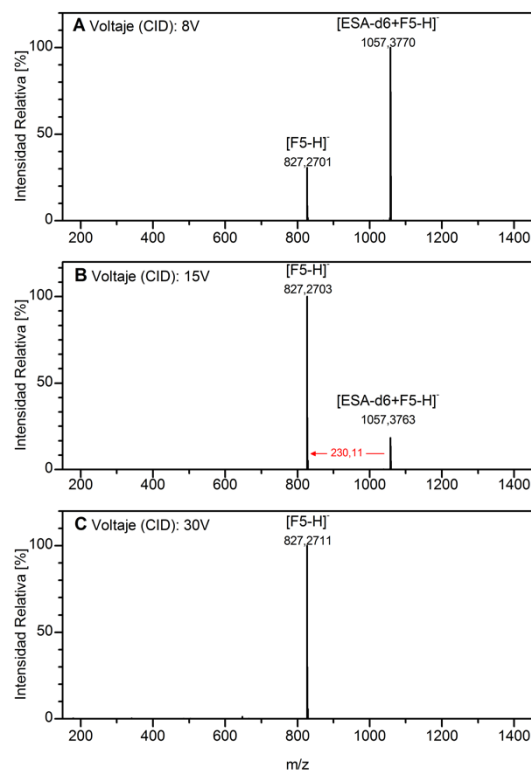
Figura A6.5. Espectros MS/MS. Iones precursores: $[ESA+M5-H]^+$, $[ZSA+M5-H]^+$ y $[ESA-d6+M5-H]^+$. Voltaje CID, 8V, 15V y 30V. Relación molar Ácido:M7 1:3; agua:MeOH 7:3 v/v.



-Espectros MS/MS. Ion precursor: $[ESA+F5-H]^-$.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)



- Espectros MS/MS. Ion precursor: $[ZSA+F5-H]^-$.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)



Espectros MS/MS. Ion precursor: $[ESA-d6+F5-H]^-$.
Voltaje CID, 8 V (A), 15 V (B) y 30 V (C)

Figura A6.6. Espectros MS/MS. Iones precursores: $[ESA+F5-H]^-$, $[ZSA+F5-H]^-$ y $[ESA-d6+F5-H]^-$.
Voltaje CID, 8V, 15V y 30V. Relación molar Ácido:M7 1:3; agua:MeOH 7:3 v/v.

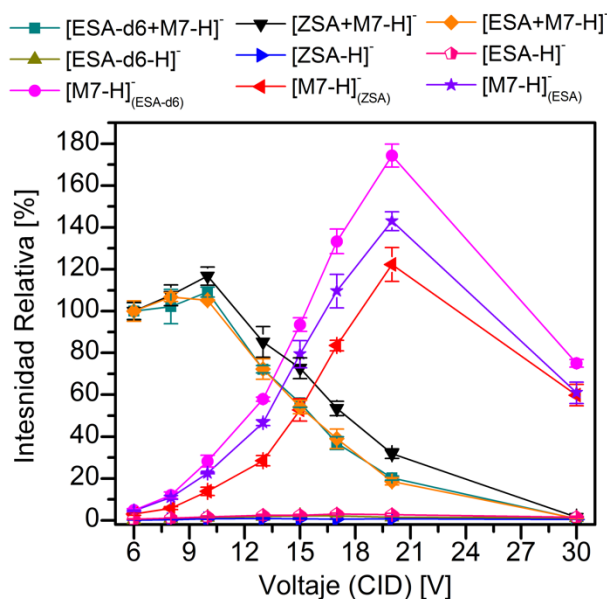


Figura A6.7. Experimentos MS/MS (CID). Intensidad de las especies $[\text{Ácido}+\text{M7-H}]^-$, $[\text{Ácido-H}]^-$ y $[\text{M7-H}]^-$ detectadas a diferentes voltajes en relación al valor de intensidad de la señal obtenida al voltaje más bajo aplicado (6V). Iones precursores $[\text{ESA-d6}+\text{M7-H}]^-$ (■), $[\text{ESA}+\text{M7-H}]^-$ (◆) y $[\text{ZSA}+\text{M7-H}]^-$ (▼). Relación molar Ácido:M7 1:3; agua:MeOH 7:3 v/v.

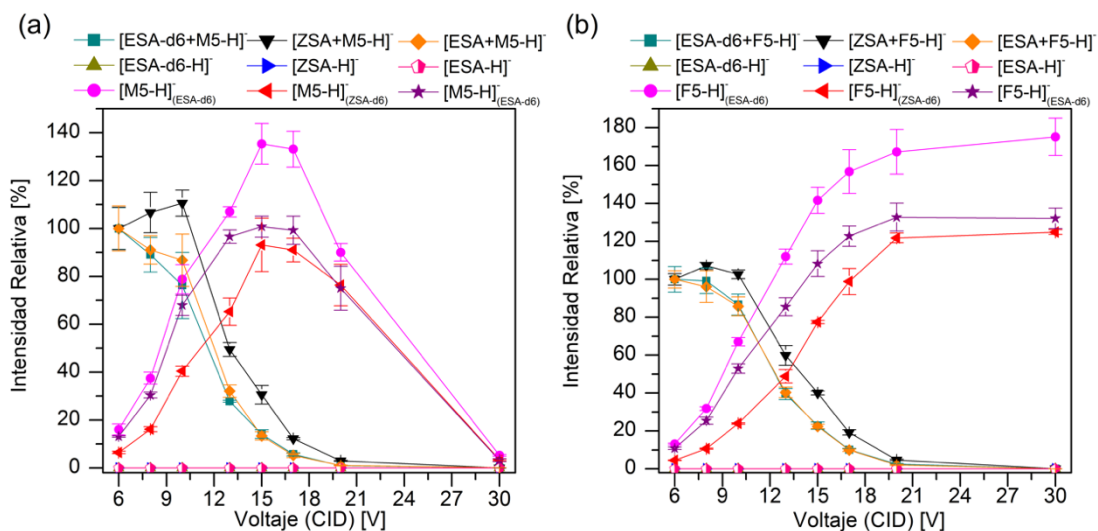


Figura A6.8. Experimentos MS/MS (CID). Intensidad de las especies $[\text{Ácido}+\text{Carb-H}]^-$, $[\text{Ácido-H}]^-$ y $[\text{Carb-H}]^-$ detectadas a diferentes voltajes en relación al valor de intensidad de la señal obtenida al voltaje más bajo aplicado (6V). Iones precursores: (a) Izquierda $[\text{ESA-d6}+\text{M5-H}]^-$ (■), $[\text{ESA}+\text{M5-H}]^-$ (◆) y $[\text{ZSA}+\text{M5-H}]^-$ (▼); (b) Derecha $[\text{ESA-d6}+\text{F5-H}]^-$ (■), $[\text{ESA}+\text{F5-H}]^-$ (◆) y $[\text{ZSA}+\text{F5-H}]^-$ (▼). Relación molar Ácido:Carb 1:3; agua:MeOH 7:3 v/v.

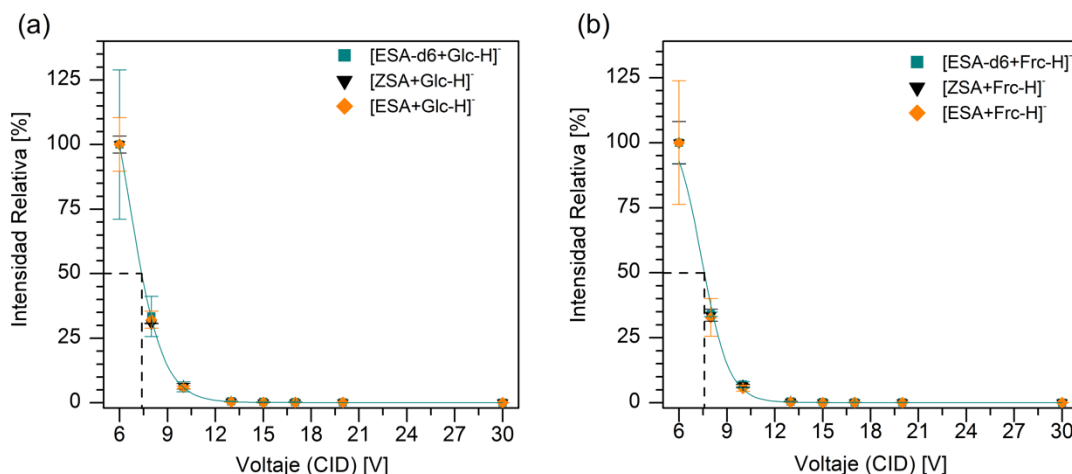


Figura A6.9. Experimentos MS/MS (CID). Intensidad de la especie $[\text{Acid}+\text{Carb}-\text{H}]^-$ detectada a diferentes voltajes en relación al valor de intensidad de la señal obtenida al voltaje más bajo aplicado (6V). Curvas ajustadas con funciones de tipo sigmoidales de Boltzmann. Iones precursores: (a) izquierda $[\text{ESA-d6}+\text{Glc}-\text{H}]^-$ (■), $[\text{ESA}+\text{Glc}-\text{H}]^-$ (◆) y $[\text{ZSA}+\text{Glc}-\text{H}]^-$ (▼); (b) derecha $[\text{ESA-d6}+\text{Frc}-\text{H}]^-$ (■), $[\text{ESA}+\text{Frc}-\text{H}]^-$ (◆) y $[\text{ZSA}+\text{Frc}-\text{H}]^-$ (▼). Relación molar Ácido:Carb 1:3; agua:MeOH 7:3 v/v.

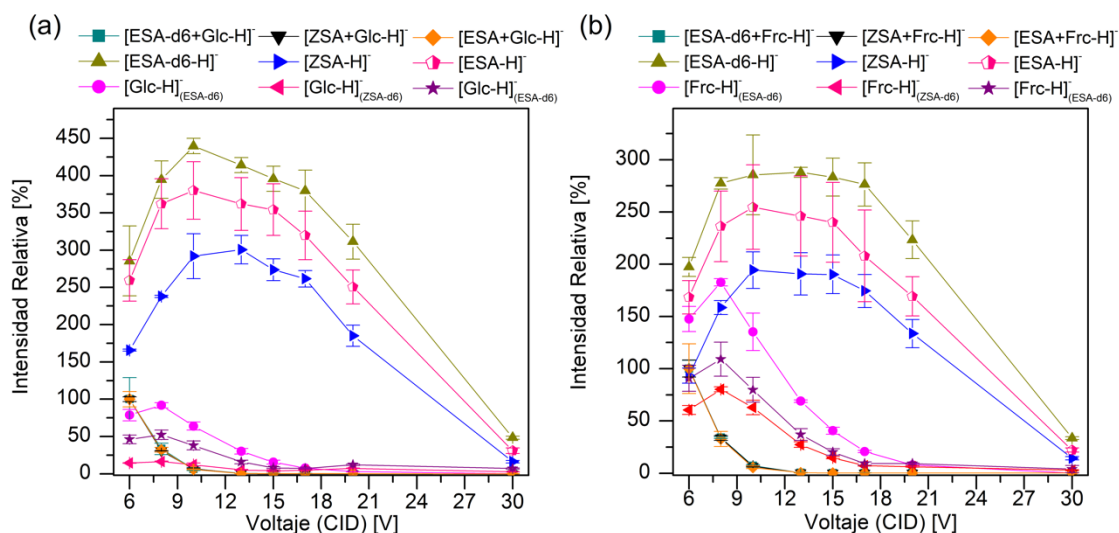


Figura A6.10. Experimentos MS/MS (CID). Intensidad de las especies $[\text{Ácido}+\text{Carb}-\text{H}]^-$. $[\text{Ácido}-\text{H}]^-$ y $[\text{Carb}-\text{H}]^-$ detectadas a diferentes voltajes en relación al valor de intensidad de la señal obtenida al voltaje más bajo aplicado (6V). Iones precursores: (a) izquierda $[\text{ESA-d6}+\text{Glc}-\text{H}]^-$ (■), $[\text{ESA}+\text{Glc}-\text{H}]^-$ (◆) y $[\text{ZSA}+\text{Glc}-\text{H}]^-$ (▼); (b) derecha $[\text{ESA-d6}+\text{Frc}-\text{H}]^-$ (■), $[\text{ESA}+\text{Frc}-\text{H}]^-$ (◆) y $[\text{ZSA}+\text{Frc}-\text{H}]^-$ (▼). Relación molar Ácido:Carb 1:3; agua:MeOH 7:3 v/v.


Lic. Tobías Schmidt De León


Dra. Rosa Erra-Balsells
Directora


Dra. María Lāura Salum
Directora asistente