

Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray*

Desorption electrospray ionization ambient mass spectrometry

► Alicia Beatriz Pomilio¹, Eduardo Alberto Bernatén², Arturo Alberto Vitale³

1. Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Investigadora Superior de CONICET. Directora del Área de Bioquímica Estructural y Espectroscopía RMN de PRALIB (UBA y CONICET).
2. Ingeniero Agrónomo, UBA, Profesional Principal de CONICET.
3. Doctor en Ciencias Químicas, UBA, Investigador Independiente de CONICET.

PRALIB (UBA y CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB), Universidad de Buenos Aires (UBA), Junín 956, C1113AAD Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
E-mail: pomilio@ffyb.uba.ar

Todos los autores contribuyeron de igual manera a este trabajo.

Resumen

La espectrometría de masas (MS) en condiciones ambientales es un campo nuevo de gran utilidad y de rápido crecimiento que provee espectros de masas de alta sensibilidad directamente a partir de superficies a presión atmosférica. Para ello se utilizan diversas técnicas de ionización, entre ellas: la ionización por desorción con electrospray (DESI: *desorption electrospray ionization*), el análisis directo en tiempo real (DART: *direct analysis in real time*), la ionización por desorción asistida por plasma (PADI: *plasma assisted desorption ionization*) y la ionización extractiva por electrospray (EESI: *extractive electrospray ionization*). Este trabajo se refiere en particular a los fundamentos y aplicaciones de DESI-MS con espectrometría de masas de imágenes. Entre otras aplicaciones, DESI es utilizado para el análisis directo de medicamentos y formulaciones farmacéuticas, muestras de fluidos biológicos, análisis forense, impresiones digitales, alimentos, cultivos de bacterias, identificación y distribución espacial de compuestos químicos en tejidos de origen animal y vegetal, y análisis de biomarcadores moleculares. Se destaca la posibilidad de combinación con cromatografía en capa delgada y con electroferogramas a fin de identificar mediante espectrometría de masas los compuestos presentes. Esta técnica no requiere preparación de las muestras y no implica el uso de matrices de ionización. Esto simplifica enormemente el procedimiento experimental y evita la redistribución de los analitos durante la deposición de la matriz. Se discute el análisis forense realizado con DESI-MS y DESI-MS/MS, respecto a: la detección de explosivos y agentes simulantes de guerra química en superficies sólidas cerca o a distancia del espectrómetro, análisis de telas o vestimenta en busca de explosivos y drogas, análisis de imágenes para la verificación de documentos, análisis sobre piel humana, análisis de residuos de disparos, análisis de gases tóxicos industriales y de agentes simulantes de guerra, de destilados de petróleo y de polímeros sintéticos. Se analizan las aplicaciones efectuadas en el campo de la lipidómica, proteómica y metabolómica. Por último, se brinda la información existente sobre el análisis cuantitativo realizado mediante DESI-MS.

Palabras clave: espectrometría de masas ambiental * ionización por desorción con electrospray * análisis directo * análisis forense * distribución de compuestos químicos en los tejidos * cultivos de bacterias * productos farmacéuticos * huellas dactilares * proteómica * lipidómica * análisis cuantitativo

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Summary

Ambient mass spectrometry is a useful and rapidly growing new field that provides high sensitivity mass spectra directly from surfaces at atmospheric pressure. Various ionization techniques, including desorption electrospray ionization (DESI), direct analysis in real time (DART), plasma assisted desorption ionization (PADI) and extractive electrospray ionization (EESI) have been used. This paper refers particularly to the fundamentals and applications of DESI-MS based on imaging mass spectrometry. Among other applications, DESI is used for direct analysis of drugs and pharmaceutical formulations, samples of biological fluids, forensics, fingerprints, food, cultures of bacteria, identification and spatial distribution of chemicals in animal and plant tissues, and molecular biomarkers. It highlights the possibility of combination with thin layer chromatography and electropherograms to identify the compounds by mass spectrometry. This technique requires no sample preparation, and does not involve the use of matrix of ionization. It simplifies greatly the experimental procedure and avoids the redistribution of analytes during matrix deposition. The forensic analysis carried out by DESI-MS and DESI-MS/MS is discussed, including the detection of explosives and chemical warfare agents on solid surfaces near or at a distance from the mass spectrometer, analysis of fabric or clothing for explosives and drugs, image analysis for verification of documents, analysis of human skin, gunshot residue analysis, analysis of toxic gases and industrial warfare agent simulants, petroleum distillates and synthetic polymers. Applications in the field of lipidomics, proteomics, and metabolomics are analyzed. Finally, current information on the quantitative analysis performed by DESI-MS is provided.

Keywords: *ambient mass spectrometry * desorption electrospray ionization * direct analysis * forensics * chemical distribution in tissues * bacteria cultures * pharmaceuticals * fingerprints * proteomics * lipidomics * quantitative analysis*

Introducción

La espectrometría de masas es una técnica que se utiliza en química para obtener las estructuras químicas de los compuestos orgánicos bajo estudio (Química Estructural). Es decir que la primera y principal aplicación es y ha sido la identificación de compuestos puros en el campo de la Química Orgánica.

La utilización de los espectrómetros de masas se extendió al campo inorgánico, a la determinación de isótopos, a la Geología, a la Astrofísica, Astronomía, Biología, Bioquímica y más recientemente a la Medicina (1).

Cuando la espectrometría de masas se combina con una técnica separativa, ya sea cromatográfica o electroforética, se puede proceder al análisis de mezclas, cuyos componentes son separados en una primera etapa por la técnica cromatográfica seleccionada, por ejemplo: cromatografía gas-líquido (CGL) cromatografía líquida de alta resolución: CLAR (en inglés: *High-Performance Liquid Chromatography*: HPLC) (2) o en el correspondiente equipo de electroforesis, como por ejemplo: Electroforesis Capilar (EC) (3) (4). Por medio de una interfase los componentes de esa mezcla, ya separados, son introducidos en el espectrómetro de masas. Actualmente se comercializan los equipos compactos, tal que se introduce la muestra y luego se obtienen los espectros de masas de aquellos picos de interés. Los espectros de masas los puede interpretar un químico orgánico especialista en

espectroscopía, o bien, si son compuestos conocidos, se pueden comparar con los espectros de la base de datos que traen los instrumentos comerciales.

En la espectrometría de masas convencional la muestra se introduce en una cámara de volatilización de alto vacío (*ca.* 10^{-2} Torr), donde es vaporizada, ingresando a continuación en la cámara de ionización (*ca.* 10^{-7} Torr). La ionización de la molécula puede llevarse a cabo por distintos modos, siendo el más común, el de impacto electrónico (*electron impact mass spectrometry*: EI-MS), que se basa en impactar a la molécula con un haz de electrones de alta energía, 70 eV (electrónvoltios). Por este impacto la molécula queda como un ión radical por la pérdida de un electrón, dando lugar al ión molecular: M^+ (que corresponde al peso molecular de la molécula) (Fig. 1). Como M^+ tiene un gran exceso de energía, entonces puede fragmentarse generando un nuevo ión radical o simplemente un ión. A continuación seguirá fragmentándose mediante rupturas homolíticas y heterolíticas, según la estructura del compuesto en estudio, dando iones y también iones radicales dentro de un esquema de fragmentación (5).

Los fragmentos cargados (iones e iones radicales) son acelerados y desviados por un fuerte campo magnético que afecta su recorrido dando como resultado una trayectoria curvilínea. Los iones y los iones radicales son colectados, detectados y cuantificados, con gran exactitud y sensibilidad, en función de la relación masa/carga (m/z).

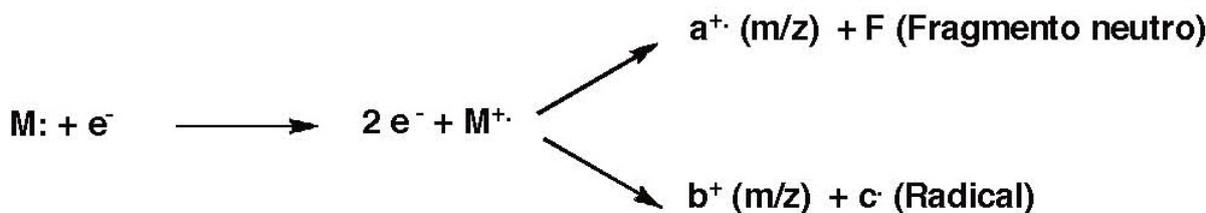


Figura 1. Primera etapa de las fragmentaciones en EI-MS.

La intensidad de cada señal corresponde al porcentaje de abundancia relativa de ese fragmento. Así se obtiene el correspondiente espectro de masas por impacto electrónico, que corresponde a: % de abundancia relativa vs. valores de m/z . La interpretación de ese espectro de masas se realiza teniendo en cuenta las señales correspondientes a los iones y los iones radicales y también, considerando las fragmentaciones posibles. Todo esto conducirá a la estructura del compuesto en estudio.

La aplicación de la espectrometría de masas a las grandes biomoléculas y polímeros sintéticos, así como a glicósidos y moléculas lábiles se ha visto restringida debido a la baja volatilidad y/o a la inestabilidad térmica de estos materiales (6). Estos problemas se han superado en gran medida a través del desarrollo de técnicas de ionización suave, tales como: ionización química (*chemical ionization*: CI-MS), espectrometría de masas de iones secundarios (*secondary-ion mass spectrometry*: SIMS), desorción de campo (*field desorption*: FD-MS), bombardeo con átomos rápidos (*fast atom bombardment*: FAB-MS), ionización por electrospray (*electrospray ionization*: ESI-MS) y desorción/ionización de la matriz asistida con láser (*matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*: MALDI-MS) (7). La técnica MALDI-MS, en particular, permite en la actualidad la determinación de la masa de grandes biomoléculas y polímeros sintéticos de masa molar superior a 200.000 Daltons (200 kDa) mediante ionización y vaporización sin degradación. Se mejora notablemente cuando se usa MS acoplado a otros MS (en *tándem*), por ejemplo: MALDI-TOF-MS/MS, que se usa en Proteómica (8).

La espectrometría de masas tiene importantes ventajas en velocidad, sensibilidad y especificidad con respecto a otros métodos de análisis químico y tiene aplicación de valor en diferentes campos científicos. Sin embargo, está limitada, en parte, por los requisitos de preparación de la muestra antes del análisis. En la mayoría de los casos, la muestra debe ser colocada al vacío para el análisis (por ejemplo: MALDI) o disuelta o extraída en un solvente y rociada (por ejemplo: ESI) dentro del espectrómetro de masas.

El requerimiento de introducir la muestra en el sistema de vacío restringe las posibilidades de realizar mediciones *in situ*.

Recientemente se ha logrado un gran avance en espectrometría de masas con DESI-MS debido a la posibilidad de examinar muestras fuera del sistema de vacío en

el medio ambiente (a presión atmosférica) con un mínimo de preparación de la muestra.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN POR DESORCIÓN CON ELECTROSPRAY (DESI-MS: DESORPTION ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY)

La sigla DESI corresponde en inglés a *desorption electrospray ionization*, es decir ionización por desorción con electrospray (electroasperjado o rocío generado electrónicamente). DESI se refiere a una técnica de ionización desarrollada recientemente para usar en el espectrómetro de masas o combinado con éste, en particular con espectrometría de masas de imágenes.

En DESI (Fig. 2), las gotitas cargadas eléctricamente y los iones producidos a partir del electrospray son dirigidos por un chorro de gas (*gas jet*) de alta velocidad a la muestra de interés, impactan sobre la superficie y el analito se disuelve en esas gotitas cargadas eléctricamente. Debido al impacto se generan iones de los componentes de la muestra, llamadas gotitas secundarias, que son expulsadas de la superficie y recogidas en el tubo iónico de transferencia o en la entrada a presión atmosférica de un espectrómetro de masas comercial, donde se las analiza.

Los espectros de masas resultantes son similares a los espectros de masas ESI. La composición del solvente del aerosol, el flujo del gas, la magnitud del voltaje aplicado, el ángulo de impacto, así como varias distancias correspondientes a la alineación del aerosol con respecto a la superficie y desde la superficie a la entrada del espectrómetro de masas son variables que pueden ser modificadas para lograr un rendimiento óptimo.

Se usa un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS: *high resolution mass spectrometer*) para la detección de los compuestos y sus metabolitos.

El experimento DESI se realiza en segundos, con alto rendimiento y en condiciones ambientales, y además, DESI-MS logra la sensibilidad y la especificidad del espectrómetro de masas.

DESI fue desarrollada en el laboratorio de Química Analítica del Prof. R. G. Cooks en el Departamento de Química y Centro de Desarrollo de Instrumentación Analítica de la Universidad de Purdue, West Lafayette, Indiana, EE.UU. (9) (10). Actualmente la fuente iónica con este tipo de ionización (Omni Spray™) es comerciali-

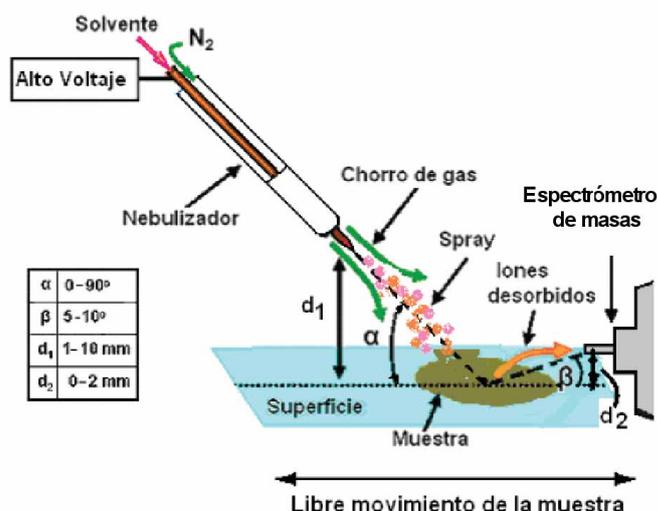


Figura 2. Configuración experimental de DESI. Se indican el ángulo α del aerosol y el llamado ángulo β "de despegue".

zada por Prosofia Inc., Indianápolis, Indiana, EE.UU., y es el miembro principal de una nueva familia de métodos de ionización.

Otros métodos utilizados en este grupo de técnicas de ionización son: desorción con láser y post-ionización con electrospray (*electrospray-assisted laser desorption/ionization*: ELDI) (11), análisis directo en tiempo real (*direct analysis in real time*: DART) (12) y la sonda de análisis de sólidos a presión atmosférica (*atmospheric pressure solids analysis probe*: ASAP) (13).

Las características analíticas de DESI hacen que pueda aplicarse a moléculas grandes y pequeñas, para análisis *in vivo* e *in situ* y análisis de alto rendimiento, y en particular, para obtener perfiles químicos. Existen evidencias tanto de un mecanismo heterogéneo de transferencia de carga como de un mecanismo de ionización por despegue mediante gotitas (*a droplet pick-up mechanism of ionization*) (14). No requiere preparación de las muestras, posee velocidad, selectividad y sensibilidad.

Recientemente, se caracterizó un sistema de espectrómetro de masas en miniatura (Fig. 3) con trampa rectilínea de iones con control inalámbrico, peso total de 5,0 kg con baterías, con menos de 35 W de potencia y con dimensiones de 22 cm de longitud por 12 cm de ancho por 18 cm de altura (15). Se detallaron el diseño y la construcción de este espectrómetro de masas, incluido el analizador de masas, el sistema de vacío, el sistema electrónico y los sistemas de adquisición y procesamiento de datos. El espectrómetro de masas es compatible con varios tipos de fuentes de ionización interna y diversas fuentes de ionización, como: ESI, APCI y DESI, que se emplean para ionización externa, a presión atmosférica. Estas fuentes externas están acopladas a un espectrómetro de masas en miniatura vía una interfase capilar que se opera en forma discontinua denominada: interfase discontinua a presión atmosférica (*discontinuous atmospheric pressure interface*) para maximizar el transporte de iones (15).



Figura 3. Uno de los espectrómetros de masas portátiles.

Se examinó el comportamiento del espectrómetro de masas para moléculas grandes y pequeñas, obteniéndose límites de detección en ppb tanto con ionización interna como con los modos de ionización externa. Se demostró también la capacidad de la espectrometría de masas en *tándem* y el análisis *in situ* rápido mediante una variedad de compuestos y de fuentes de ionización. Se analizaron moléculas de proteína como moléculas protonadas en forma múltiple con relación m/z de hasta 1500 Da/carga (15).

Se continuó con el desarrollo de los llamados espectrómetros de masas portátiles, en miniatura, con trampa iónica, que adquieren gran velocidad de análisis. Sin embargo, estos espectrómetros de masas pequeños no son útiles si la eficiencia en el comportamiento está muy comprometida (16).

Se conocen varios trabajos con ensayos de superficies para el análisis DESI. Así por ejemplo: se determinaron los límites de detección (LODs) y otras características analíticas para seis compuestos diferentes ensayados utilizando cuatro tipos de superficies. Los LODs de los compuestos estuvieron en el rango de fmoles-pmoles (pg-ng). Se mejoraron aún más los LODs para cada compuesto en la superficie de gel de sílice poroso (pSi) mediante la aplicación de calor a la superficie durante la aplicación de la muestra, lo cual produjo LODs tan o más bajos que los obtenidos con polimetacrilato de metilo (PMMA) y politetrafluoretileno (PTFE) (17). Se usaron con éxito las placas de UTLC (*Ultra-Thin-Layer Chromatography*) como un medio rápido de separación cromatográfica antes del análisis por DESI-MS (17).

También se aumentó la velocidad de análisis, asociada con el secado de las muestras en solución mediante el calentamiento suave de la superficie pSi. La presencia de sales en la muestra no produjo supresión de la señal del analito con cualquiera de las superficies (17).

Asimismo, se estudiaron los mecanismos involucrados en el proceso DESI y se indicaron las implicancias de estos aspectos mecanísticos para optimizar la utilidad analítica de este método rápido y muy simplificado de análisis químico.

Se examinaron los fenómenos de colisión ión/superficie en el régimen hipertermal de energía de colisión (1-100 eV), con énfasis en los procesos químicos asociados con el impacto de iones pequeños orgánicos y biológicos en las superficies funcionalizadas de monocapa auto-ensamblada. Las colisiones inelásticas pueden llevar a la excitación del ión proyectil y pueden causar fragmentación, un proceso conocido como *disociación inducida por la superficie*, que es útil en el análisis químico utilizando MS/MS (18).

Las colisiones reactivas que se producen entre los iones gaseosos y las superficies dependen de la naturaleza química de los participantes en la colisión. Estas reacciones pueden ser utilizadas para las modificaciones químicas seleccionadas de superficies, así como para el análisis de la superficie (18).

Se da especial énfasis al *aterrizaje suave del ión* (*ion soft-landing*), otro tipo de iones de interacción ion/superficie, en la que el ión proyectil aterriza intacto en la superficie, ya sea como la molécula neutra correspondiente o, interesante, pero menos común, en la forma de ión mismo. El experimento de aterrizaje suave del ión permite la espectrometría de masas preparativa; por ejemplo: la preparación de compuestos biológicos puros mediante el uso del espectrómetro de masas como un dispositivo de separación. Después de la separación, los iones de masa seleccionada son recogidos mediante aterrizaje suave, en diferentes puntos espaciales. Si el experimento se realiza utilizando un medio líquido adecuado, en el caso de algunas proteínas, al menos, se mantiene la actividad biológica (18).

Se utilizaron simulaciones de dinámica de fluidos en multifases numéricas para cuestionar el comportamiento de la colisión de gotas sobre una superficie (gotitas primarias) y la formación resultante de progenie de gotas (gotitas secundarias) en una superficie ambiental, sujeta a las condiciones de DESI. La comparación con resultados experimentales previos confirma que un evento de transferencia de momento sobre una superficie húmeda es suficiente para reproducir las propiedades conocidas de la progenie de gotas (19).

Recientemente, se investigó la distribución de carga depositada en las superficies en DESI-MS mediante un aparato de medición de carga estática con un voltaje de salida proporcional a la densidad de carga local en la superficie. Mediante el barrido de la sonda a lo largo de la superficie y tomando mediciones a intervalos fijos, se pudo trazar una imagen de contorno de la densidad de carga relativa que refleja la distribución de carga en la superficie.

A través de la distribución de carga medida y el gradiente derivado de densidad de carga, pudo inferirse el movimiento de las gotas cargadas en el experimento DESI (20). Las mediciones tomadas en distintas condiciones de operación DESI, como: la presión del aerosol, el ángulo, la velocidad de flujo y la distancia de la punta del rociador a la superficie, mostraron que la carga se dispersa sobre un área de unos pocos centímetros cuadrados en condiciones típicas; la desorción efectiva se produjo a partir de un área mucho menor (*ca.* 1 mm²) de mayor densidad de carga. Una mayor presión de gas del nebulizador y una menor distancia de la punta del aerosol a la superficie llevan a la concentración de distribución de carga en un área más pequeña, mientras que los ángulos del aerosol más pequeños favorecen la distribución de carga sobre un área mayor. La presencia de la más alta densidad de carga por delante de la punta del aerosol de DESI y cerca de la entrada al espectrómetro de masas sugirió que las gotitas cargadas se mueven hacia la entrada del espectrómetro mediante las fuerzas neumáticas y mediante la succión del vacío, de acuerdo con los resultados de simulaciones previas. Las observaciones estuvieron de acuerdo con estudios previos, utilizando otras técnicas y confirman el mecanismo aceptado de DESI de "salpicaduras de gotas" (*droplet splashing DESI mechanism*) (20).

Asimismo, se ha desarrollado la llamada *ionización DESI reactiva* o *DESI de reacciones*, la cual permite reconocer rápidamente determinados grupos funcionales en una muestra, o bien, proceder a la derivatización rápida de los compuestos de interés para aumentar la sensibilidad en la detección. En ambos casos, se agrega un reactivo químico adecuado al solvente del aerosol DESI.

Así por ejemplo, el reconocimiento del grupo funcional *cis*-diol se realizó en un experimento de espectrometría de masas ambiental mediante su reacción de complejación selectiva para formar un boronato cíclico (21) (Fig. 4).

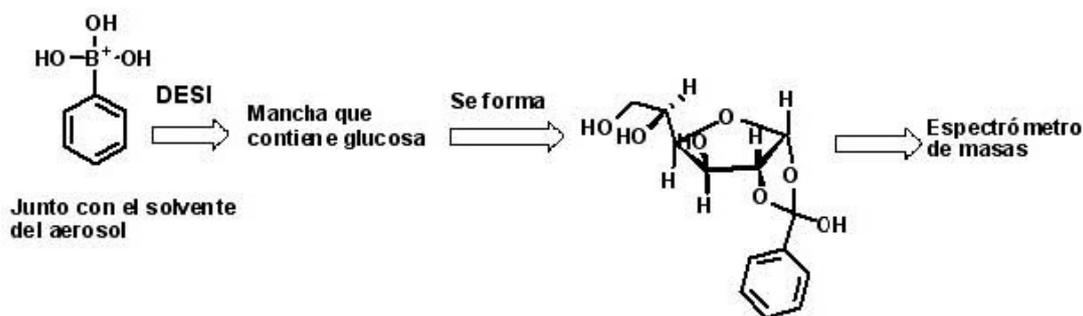


Figura 4. Reacción del ácido fenilbórico con glucosa para formar el derivado borado, del cual se hará el espectro de masas, como reconocimiento del grupo cis-diol presente en la muestra que contiene glucosa.

La desorción selectiva rápida y la derivatización de *D*-lisina ocurre cuando los iones pirilio generados térmicamente reaccionan con la lisina sólida en condiciones ambientales (Fig. 5) (22). Así, la ionización térmica de una variedad de sales orgánicas, como los líquidos iónicos y las sales de metales de transición, se produce a presión atmosférica.

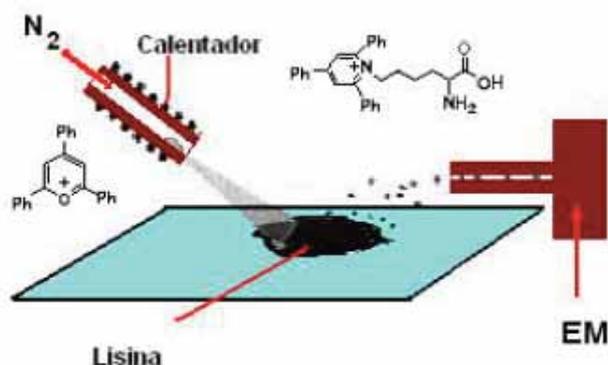


Figura 5. Reacción de los iones pirilio, generados térmicamente en el aerosol, con la lisina presente en la muestra.

También se estudiaron las transformaciones redox en DESI (23).

ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMÁGENES

Antes del desarrollo de DESI, el análisis químico de imágenes se hacía mediante espectrometría de masas de imágenes (IMS: *Imaging mass spectrometry*) basada en MALDI y SIMS, que es una técnica importante para el análisis de secciones histológicas de tejidos biológicos (24) (25). Sin embargo, estas técnicas requieren que la muestra esté confinada en la región de alto vacío del instrumento, que limita severamente cualquier otra manipulación química o física de la muestra, pero que ahora se supera combinando IMS con DESI (DESI-IMS), cuyo desarrollo se describió recientemente (26) (27). Así se puede estudiar la distribución espacial de los componentes de los tejidos naturales, como por ejemplo: fosfolípidos de membrana (28).

En la mayoría de los trabajos sobre DESI-MS se utilizaron espectrómetros de masas cuadrupolares comerciales con trampa de iones. Sin embargo, el uso común de espectrómetros de masas con trampa de iones (*ion trap mass spectrometers*) no es una consecuencia del método, ya que su implementación requiere simplemente una interfase a presión atmosférica, aunque ciertas geometrías de interfase han demostrado que actúan mejor que otras. Además de usarse con espectrómetros de masas con trampa de iones, DESI se ha combinado con cuadrupolos triples (*triple quadrupoles*) (29), instrumentos cuadrupolares de tiempo de vuelo (*quadrupole time-of-flight instruments*) (30), movilidad iónica/tiempo de vuelo (*ion mobility/time-of-flight*) (31) (32), un instrumento prototipo Orbitrap de alta resolución (33) (34), un instrumento híbrido de cuadrupolo lineal con trampa de iones (*a hybrid quadrupole linear ion trap instrument*) (35) y un espectrómetro de masas portátil (36) (37). En este último caso, se puede aumentar la especificidad del instrumento mediante el empleo de las capacidades MS/MS de la trampa de iones, lo cual se demostró para nitrobenzono. Se alcanzaron los límites de detección para el análisis de trazas en el aire del agente simulante de guerra química salicilato de metilo (1,24 ppb) y para nitrobenzono (629 ppt) (36). También se analizaron soluciones de (*D,L*)-arginina 100 μM , (-)-efedrina 10 μM y lomefloxacina 10 μM por electrospray/nanospray (36). Además, DESI-espectrómetro de masas portátil se utilizó para demostrar la detección *in situ* de los ingredientes activos de preparaciones farmacéuticas, alcaloides de tejidos vegetales, explosivos, agentes simulantes de guerra química, productos agroquímicos en una variedad de superficies y monitoreo de aire (37).

Las áreas de investigación como la proteómica y la metabolómica están impulsando la demanda de espectrómetros de masas con rendimiento alto, pero con requisitos bajos de energía, tamaño y costo. Así surgió Orbitrap, basado en un nuevo tipo de analizador de masas inventado por Makarov (33) (34).

La fuente iónica DESI también se ha acoplado a espectrometría de masas con resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier (FT-ICR-MS: *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) para el análisis de alta resolución de proteínas. En particular se usó

DESI-FT-ICR-MS para analizar péptidos y proteínas de 1 a 5,7 kDa (38).

DESI-IMS ofrece ventajas únicas sobre los procedimientos más tradicionales de espectrometría de masas, como: 1) preparación mínima de la muestra; 2) mantenimiento de la muestra en condiciones ambientales fuera del sistema de vacío; 3) análisis rápido y de alto rendimiento; 4) capacidad para la detección *in situ*, e 5) imágenes químicas, sin marcado, con los requerimientos básicos de instrumentación.

Aplicaciones de DESI-MS

Las aplicaciones de DESI-MS corresponden al campo farmacéutico, en particular al análisis rápido de comprimidos o tabletas, al análisis forense, a la metabolómica, a los productos naturales, a la obtención de imágenes químicas bidimensionales de tejidos biológicos y al análisis de impresiones digitales y de cualquier superficie de interés (39) (40).

1) APLICACIÓN AL ANÁLISIS DIRECTO DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Si bien se usó el análisis directo en tiempo real, DART, para productos farmacéuticos (12), DESI acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap de alta resolución (34) resultó ser adecuado para la caracterización de componentes activos en comprimidos farmacéuticos en menos de 1 segundo, con una resolución de 60.000 (34).

En la actualidad, el uso más generalizado de DESI corresponde al análisis de formulaciones farmacéuticas [es decir, comprimidos (30) (31) (33) (34) (41), geles y pomadas (31)] sin separación previa, así como drogas de abuso (estupefacientes) en tabletas (29) (42) y en material vegetal (25). En comparación con el análisis de rutina de productos farmacéuticos, el análisis DESI-MS es rápido, fácil y directo, brindando la posibilidad de hacer contra-pruebas de los componentes en el caso de falsificación, en tiempo real y en cualquier lugar.

Usualmente, se determina el perfil químico rápido de comprimidos farmacéuticos, mediante DESI (Fig. 6), para la identificación de formulaciones potencialmente peligrosas, inseguras o falsificadas. La obtención de la información sobre la masa precisa sólo lleva unos segundos, ya que la técnica DESI no requiere ninguna preparación de la muestra ni extracción previa al análisis por espectrometría de masas (30). Las condiciones de operación experimental que generalmente se usan son: voltaje del electrospray: 4 kV, flujo del solvente: 3 μ L/min, presión del gas: 120 psi, distancia de la punta del aerosol a la superficie (d_1): 3 mm, temperatura de la entrada del espectrómetro de masas: 250 °C, ángulo de impacto del electrospray (α): 65°, ángulo de despegue (β): *ca.* 15°, solvente: metanol-agua (1:1) y tiempo de análisis: *ca.* 5 segundos.



Figura 6. Análisis directo de comprimidos farmacéuticos por DESI-MS

La capacidad de analizar formulaciones farmacéuticas duras o blandas, directamente, mediante DESI combinada con espectrometría de movilidad iónica (IMS: *ion mobility spectrometry*) / espectrometría de masas, como espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS: *time-of-flight mass spectrometry*) en *ca.* 2 minutos demuestra la aplicabilidad potencial de este método para el *screening* farmacéutico de formulaciones con fármacos de bajo peso molecular con alta selectividad sobre el vehículo de formulación.

Se utilizó un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar, modificado, con una célula de movilidad iónica de arrastre para la separación electroforética de los iones en fase gaseosa antes de la detección TOF-MS. La generación de iones de la muestra directamente de los comprimidos y de las formulaciones de crema se efectuó mediante DESI. Se analizaron varias formulaciones de comprimidos de venta libre y de prescripción, como: drogas antagonistas de los receptores H₂ de histamina (ranitidina), analgésicos (paracetamol), opiáceos (codeína) e inhibidores de la aromatasas utilizados en terapias anticáncer (anastrozol) (31). También se determinaron exitosamente los fármacos activos de formulaciones suaves, como: una crema antiséptica (clorhexidina) y un parche de nicotina para la piel (31).

Los límites de detección para los fármacos activos usando el método DESI/IMS/TOF-MS estuvieron en el rango de picomoles a nanomoles. En todos los casos, el uso de la separación con IMS mostró mayor selectividad para la respuesta de los fármacos activos (presentes en concentraciones tan bajas como 0,14% p/p) frente a la respuesta del excipiente, como: polietilenglicol. El análisis por espectrometría de masas en *tándem* (MS/MS) de los iones precursores separados por IMS permitió la confirmación positiva de los fármacos activos con poca pérdida de la eficiencia de movilidad iónica (31).

A modo de ejemplo se indica el análisis directo de un comprimido multivitamínico con DESI-MS (US Pat. 7.335.897, Prosofia, Inc.). Los resultados se muestran en la Fig. 7, donde se ven los iones moleculares de cada uno de los componentes del comprimido en estudio.

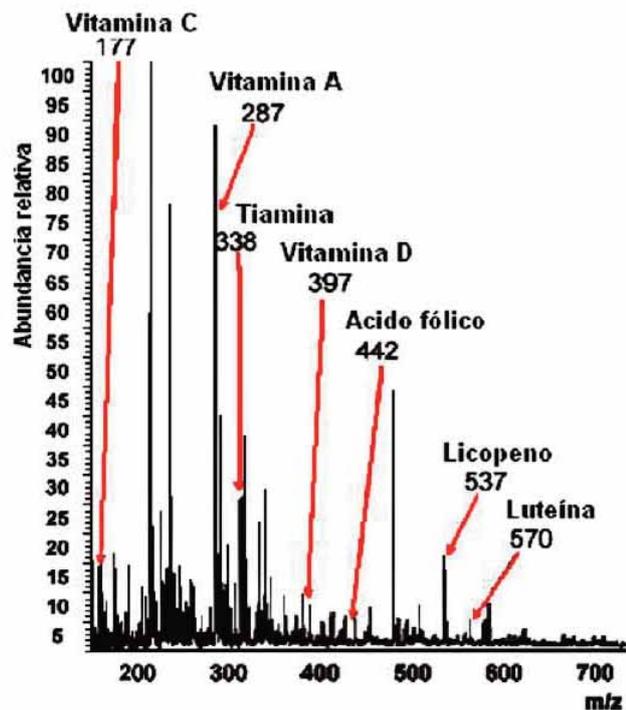


Figura 7. Resultados del análisis directo DESI-MS de un comprimido multivitamínico.

De esta manera, se analizaron veintiún medicamentos comerciales, así como algunas pastillas y polvos ilícitos de éxtasis (Ecstasy) (29). Los espectros MS/MS directos se utilizaron para el análisis de confirmación, con tiempos de análisis generalmente por debajo de 10 segundos por comprimido. Para las tabletas ilícitas de éxtasis, los análisis DESI-MS, GC/MS y LC/MS dieron resultados cualitativos similares para los analitos principales (29).

También se hizo un análisis DESI-MS de comprimidos de Cialis con una sospecha de falsificación. El comprimido auténtico mostraba abundantes picos procedentes de los excipientes farmacéuticos y un pico menos abundante correspondiente a la molécula intacta protonada de tadalafil a m/z 390,2. El comprimido falsificado también presentó la molécula intacta protonada de tadalafil, pero con un pico adicional a m/z 475,3 identificado como sildenafil (Viagra).

Los resultados del muestreo en condiciones ambientales de comprimidos lícitos e ilícitos demostraron la capacidad de la técnica DESI para detectar el principal ingrediente activo (s) o sustancia(s), aún en presencia de otros componentes en mayor concentración (13). Los

datos de espectrometría de masas de barrido completo proporcionaron una identificación preliminar de la determinación de peso molecular, mientras que el análisis rápido utilizando el modo de espectrometría de masas en *tándem* (MS/MS) proveyó datos de fragmentación que, al compararlos con la biblioteca espectral ESI-MS/MS del laboratorio, proporcionaron información estructural y la identificación definitiva del ingrediente(s) activo(s).

El análisis consecutivo de tabletas que contenían diferentes componentes activos indicó que no había contaminación cruzada ni interferencia de una tableta a otra, lo cual demuestra la fiabilidad de la técnica DESI para el muestreo rápido (\geq un comprimido/minuto).

Se detectaron los ingredientes activos para los comprimidos en los que el componente activo representaba menos del 1% del peso total del comprimido, lo que demuestra la sensibilidad de la técnica. También se hizo el muestreo en tiempo real de material vegetal de *Cannabis* (13).

Asimismo, DESI se usó para el análisis de un grupo de productos farmacéuticos y sus conjugados con ácido glucurónico. Se examinaron diferentes solventes para el aerosol y distintas superficies (43). En el modo de iones positivos, los mejores resultados se obtuvieron con agua/metanol/ácido trifluoroacético, mientras que, en el modo de iones negativos, agua/metanol/hidróxido de amonio fue el mejor solvente para el aerosol. De las superficies investigadas, polimetacrilato de metilo (PMMA) dio el mejor rendimiento en términos de sensibilidad. La velocidad de flujo de la solución del aerosol y la distancia de la punta del aerosol a la superficie tendrían efectos significativos sobre la intensidad de la señal.

Los analitos con grupos básicos formaron de manera eficiente moléculas protonadas en el modo de iones positivos, mientras que los analitos ácidos, como los conjugados con ácido glucurónico, formaron señales intensas debido a las moléculas desprotonadas en el modo de iones negativos. La ionización de compuestos neutros fue menos eficiente y, en muchos casos, se logró a través de la formación de aductos con aniones o cationes simples (43).

Recientemente, se exploró la utilidad de DESI para aplicaciones industriales para el caso de la validación de limpieza farmacéutica (*pharmaceutical cleaning validation*). Se creó un sistema DESI no-próximo de gran área para examinar las áreas representativas de las superficies de los recipientes de reacción utilizados en la manufactura de ingredientes productos activos (API: *active product ingredient*) (44). Se acopló un nebulizador de gran área, capaz de un muestreo de un área de *ca.* 2,5 cm², con un tubo de transporte para permitir un muestreo sensible y representativo de API de una superficie de acero inoxidable de 1 m de distancia del espectrómetro de masas. El sistema se utilizó para detectar los APIs: neostigmina, acebutolol, amilorida, amiodarona, ibuprofeno, mon-

telukast, clavulanato de potasio y β -estradiol, a niveles tan bajos como 30-10 ng/cm², que satisfacen los límites aceptables establecidos por la industria farmacéutica. Estos niveles se alcanzaron con superficies similares a las del equipo utilizado en los procesos de manufactura API a una velocidad de 30 segundos por análisis (44).

DESI también se puede acoplar a la cromatografía en capa fina (TLC: *thin-layer chromatography*) con espectrometría de masas (DESI-TLC-MS).

Se escanearon placas de TLC moviéndolas bajo control computarizado, mientras se direccionaba el emisor DESI estacionario cargado con nube de gotas hacia la superficie de la placa. A continuación se obtuvieron los datos espectroscópicos (35).

Se aplicó la técnica en el modo de iones positivos usando un monitoreo con una reacción seleccionada de detección de colorantes de rodamina separados en placas hidrofóbicas de fase reversa C₈ y placas de fase reversa C₂, en el modo de barrido total de iones negativos usando una selección de colorantes FD & C separados en una placa C₁₈ de fase reversa y en el modo de iones positivos de barrido total (m/z 60-300) usando una mezcla de aspirina, acetaminofeno y cafeína de una medicación analgésica de venta libre, separados en una placa de gel de sílice en fase normal con acetato de etilo/ácido acético (99:1) (solvente DESI: metanol) (Figs. 8 y 9) (35).

2) APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS

El análisis DESI-MS de alto rendimiento de muestras de fluidos biológicos, como por ejemplo: orina, para la identificación de metabolitos, está logrando una mayor atención debido al valor potencial de la información sobre pequeñas moléculas características o biomarcadores, como indicadores de enfermedad.

Se detectaron más de 80 metabolitos en orina utilizando DESI mediante DESI-MS, -MS/MS y resonancia magnética nuclear (RMN) logrando la diferenciación entre ratones enfermos (cáncer de pulmón) y ratones sanos (45). Se utilizó análisis de componentes principales (PCA: *Principal component analysis*) para listar los compuestos con valor potencial para ser usados como biomarcadores de las diferencias significativas entre las muestras de orina del control y las muestras de los animales enfermos. Se alcanzaron valores similares de puntuación de PCA con DESI-MS y RMN, utilizando un subconjunto de metabolitos detectados en común (45).

Asimismo, se logró un *screening* rápido de esteroides anabólicos en orina mediante DESI de reactivos con MS/MS. Para ello, se usó hidroxilamina agregada a la solución del aerosol para que reaccionara con el grupo carbonilo de los esteroides durante el proceso de ionización. Se examinaron siete esteroides, incluyendo un glicosteroide (46). DESI de reactivos mejoró significativamente la eficiencia de la ionización de estos esteroi-

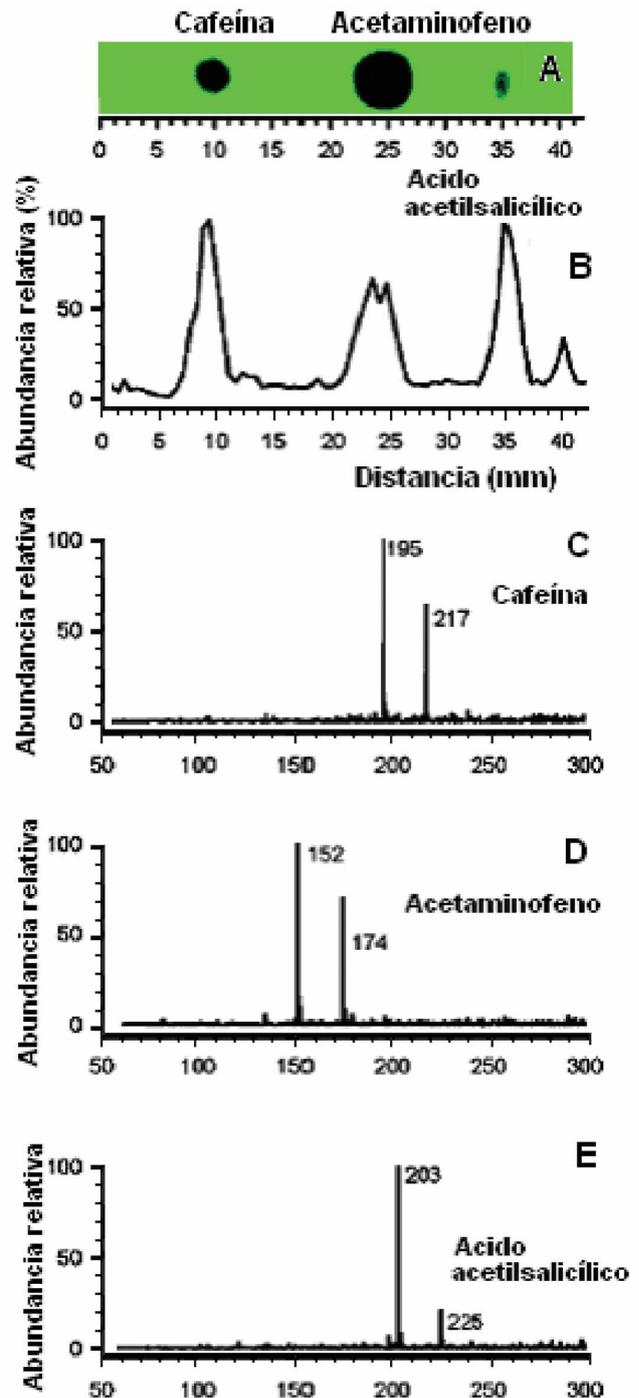
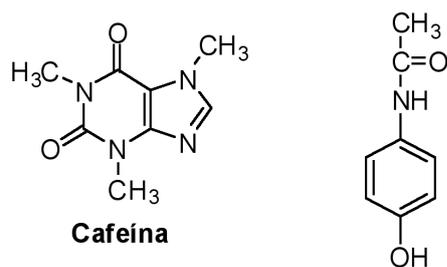


Figura 8. A: Placa cromatográfica de los componentes de un analgésico comercial. B: Placa escaneada. C: Espectro de masas de la cafeína. D: Espectro de masas del acetaminofeno. E: Espectro de masas del ácido acetilsalicílico.

des en orina sin diluir, en comparación con DESI convencional; los efectos de supresión, debido a la matriz de la muestra, fueron mínimos y la matriz de orina no tuvo ningún efecto perjudicial sobre los límites de detección de los esteroides. La espectrometría de masas en *tándem*



Cafeína
 $[M+H]^+ = 195$; $[M+Na]^+ = 217$

Acetaminofeno
 $[M+H]^+ = 152$; $[M+Na]^+ = 174$

Figura 9. Estructuras químicas de cafeína, acetaminofeno y ácido acetilsalicílico con las correspondientes señales en el espectro de masas en el modo de iones positivos.

(MS/MS) permitió confirmar la identificación del analito en este proceso de *screening* rápido (46).

Se observaron el aducto de la reacción ión/molécula y la oxima formada a través de su deshidratación utilizando DESI de reactivos; también se obtuvieron las formas protonadas y con sodio del esteroide ionizado, tanto en DESI de reactivos como en DESI común sin agregar el reactivo (46).

Se probaron papel, vidrio y politetrafluoretileno como sustratos de la muestra, pero el glicosteroide fue ionizado intacto sin hidrólisis sólo en politetrafluoretileno. Los límites de detección para los compuestos puros fueron menores de 1 ng, los rangos dinámicos fueron generalmente de 2 órdenes de magnitud y los tiempos de análisis fueron de sólo unos segundos (46).

Se pudieron alcanzar los niveles de concentración de los cetosteroides en orina que son relevantes para el *screening* de dopaje en deportes (aproximadamente 20 ng/mL) mediante una simple microextracción en fase sólida en un paso de preconcentración (46).

También se aplicó la ionización extractiva por electrospray para el análisis continuo de trazas de compuestos en matrices complejas, como: orina sin diluir, leche y agua contaminada durante largos períodos (47).

Recientemente, se llevó a cabo un análisis directo y rápido de colesterol a presión atmosférica, utilizando DESI-MS de reactivos en muestras secas de suero y cortes de tejido animal (48).

El aldehído de betaína, incorporado en el solvente del aerosol, reaccionó selectiva y rápidamente con el grupo hidroxilo del C-3 del colesterol. Los límites de detección para el colesterol puro y compuestos relacionados fueron de *ca.* 1 ng para una solución de colesterol de 1 µg/mL colocada sobre la superficie. El análisis cuantitativo del colesterol libre en el suero mediante DESI reactivo se demostró con colesterol-d₇ como estándar interno. Se logró el análisis de alto rendimiento de pequeños volúmenes de suero colocados sobre un sustrato adecuado a

una velocidad de análisis de *ca.* 14 segundos por muestra, con una desviación estándar relativa de *ca.* 6% (48).

3) APLICACIÓN AL ANÁLISIS FORENSE

Los métodos de espectrometría de masas ambiental (*ambient MS*) o en condiciones ambientales, se realizan directamente en superficies a presión atmosférica y resultan exitosos para el análisis forense, como: la detección de explosivos en el orden de nanogramos, la detección de explosivos, toxinas y drogas de abuso en las superficies de artículos personales, el análisis de agentes simulantes de guerra química y toxinas ambientales presentes en una variedad de superficies, la composición química de tabletas farmacéuticas falsificadas, la detección de drogas de abuso (estupefacientes) en fluidos biológicos como orina y plasma, el análisis de los metabolitos en el aliento, la verificación de documentos, el análisis de los compuestos presentes en la piel y el análisis de compuestos tóxicos industriales, la presencia de drogas de abuso (estupefacientes) y formulaciones ilícitas, la identificación de huellas dactilares, alimentos (37) (49) (50). Es decir que la especificidad y la sensibilidad de la instrumentación de MS se combinan con la ionización rápida, directa y bajo condiciones ambientales de DESI, haciendo que este procedimiento sea muy apropiado para ser usado en problemas de seguridad interior y para control ambiental.

Los desarrollos recientes en espectrómetros de masas portátiles en miniatura (del tamaño de una caja de zapatos) permiten además la investigación en la escena del crimen (37).

Varios métodos de ionización ambiental se han desarrollado desde 2004, que utilizan diferentes mecanismos para crear iones para el análisis por espectrometría de masas. Recientemente se ha comparado la efectividad de las técnicas más populares y prometedoras de ionización por desorción con electrospray (DESI: *desorption electrospray ionization*), análisis directo en tiempo real (DART: *direct analysis in real time*), ionización por desorción asistida por plasma (PADI: *plasma assisted desorption ionization*) y ionización extractiva por electrospray (EESI: *extractive electrospray ionization*). Dado que el análisis forense, por su propia definición, debe enfrentar a un tribunal de justicia, es esencial que las mediciones sean reproducibles, válidas, trazables y apropiadas para el caso. Se debe garantizar que los métodos utilizados puedan ser acreditados y conformen sistemas y procedimientos de calidad relevante (49).

El pretratamiento mínimo necesario de la muestra se ilustra con ejemplos de análisis de matrices complejas (por ejemplo: alimentos) en varios sustratos (por ejemplo: papel). Los límites bajos de detección alcanzados por la mayoría de los métodos de ionización ambiental para los compuestos de interés forense, ofrecen fácilmente la confirmación cualitativa de la identidad química; en al-

gunos casos, también se dispone de datos cuantitativos. Las aplicaciones forenses de los métodos de ionización ambiental son un campo de investigación creciente y aún hay muchos tipos de aplicaciones que quedan por explorar, en particular las relacionadas con el análisis *in situ*. Los aspectos de la ionización ambiental que están actualmente en fase de rápido desarrollo son la imagen molecular y la mayor especificidad de detección mediante reacción química simultánea y la ionización mediante la adición de reactivos químicos adecuados (50).

a) *Detección de explosivos y agentes simulantes de guerra química en superficies sólidas*

Se detectaron trazas de explosivos en superficies a presión atmosférica mediante DESI-MS (51) y en particular, en telas de algodón o en muestras particuladas mediante desorción térmica y reacciones ión/molécula bajo condiciones ambientales (52). Los iones se transfirieron a un espectrómetro de masas después de la desorción térmica y la ionización química con descarga eléctrica en condiciones ambientales. La especificidad aumentó usando reacciones ión/molécula ambientales o por espectrometría de masas en *tándem* convencional (52).

Las reacciones ión/molécula con acetonitrilo y aire como reactivos se usaron para la detección selectiva de los explosivos nitroaromáticos (52-54) (Fig. 10). Los iones reactivos CH_2CN^+ y CN^+ generados a partir de acetonitrilo y O^- , HO^- y HOO^- producidos a partir del oxígeno del aire, reaccionaron con los compuestos nitroaromáticos en fase vapor y en fase condensada en el curso de la ionización química a presión atmosférica (APCI: *atmospheric pressure chemical ionization*) y la ionización química con desorción a presión atmosférica (DAPCI: *desorption atmospheric pressure chemical ionization*) respectivamente (53).

Las reacciones en fase homogénea y heterogénea dieron lugar a la formación de los mismos aductos aniónicos. Estos aductos presentaron patrones característicos de fragmentación por activación de la colisión, lo cual hace que estos dos reactivos sean valiosos para la detección selectiva de nitroaromáticos en particular, incluidos los explosivos presentes como componentes de mezclas complejas. DAPCI resultó ser un método útil de detección ambiental de explosivos nitroaromáticos adsorbidos en las superficies (53).

Se aplicó DESI al análisis rápido de agentes simulantes de guerra química y explosivos presentes en superficies comunes, como: papel, plástico, tela, metal, etc. (51) (54). Los límites de detección de estos estudios alcanzaron niveles de picogramos a fentogramos para RDX (trinitrohexahidro-1,3,5-triazina), TNT (1,3,5-trinitrotolueno) y DMMP (dimetilmetilfosfonato).

Asimismo, se utilizó DESI-MS para la detección rápida, específica y sensible de pequeñas cantidades del explosivo triperóxido de triacetona (TATP: *triacetone triperoxide*), presente en superficies en condiciones ambientales, me-

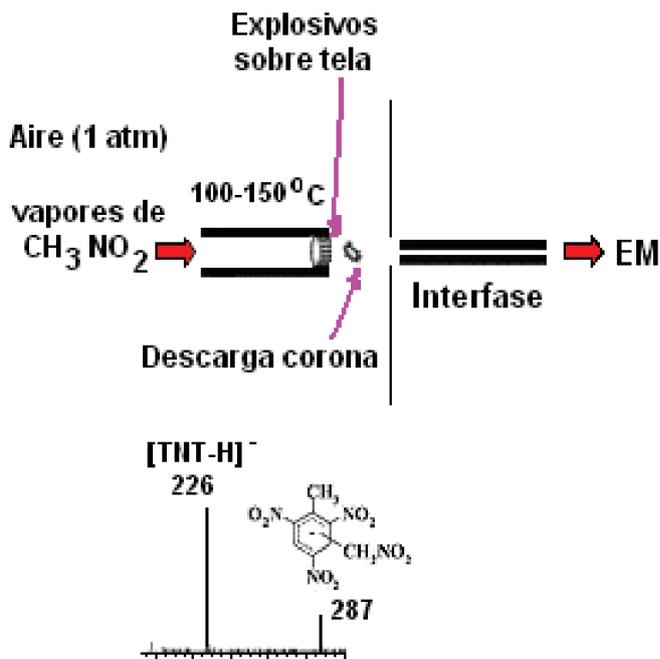


Figura 10. Esquema del procedimiento de desorción térmica y reacciones ión/molécula bajo condiciones ambientales para detectar explosivos en telas. Se muestra el espectro de masas en iones negativos de TNT y el aducto formado con nitrometano.

dante complejación con un metal alcalino en una técnica simple de aerosol (55) (Fig. 11). Se analizó TATP en cartas y sobres de correo.

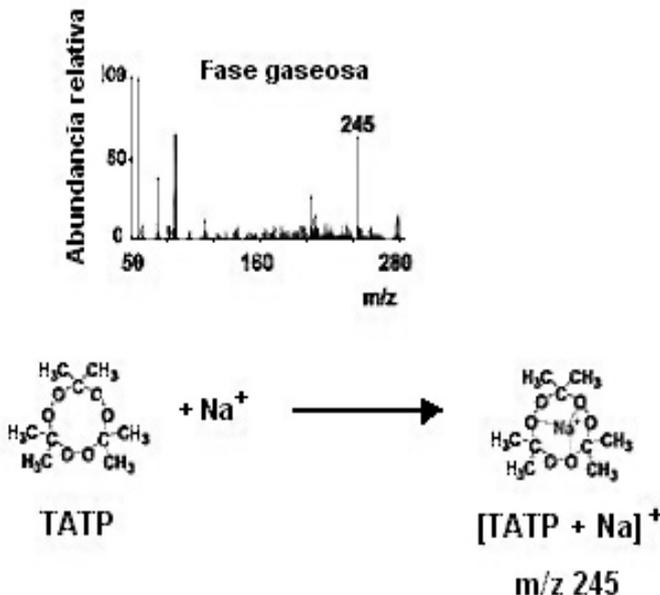


Figura 11. Formación de un complejo del explosivo triperóxido de triacetona (TATP: *triacetone triperoxide*) con sales sódicas para aumentar la sensibilidad del análisis DESI-MS.

b) Análisis de telas en busca de explosivos y drogas

Recientemente, se aplicó DESI-MS al análisis rápido, *in situ*, cualitativo y cuantitativo directo de mezclas de explosivos y drogas en una variedad de telas, como algodón, seda, denim, poliéster, rayón, cuero y sus mezclas (56). Los compuestos analizados fueron los explosivos: trinitrohexahidro-1,3,5-triazina (RDX), octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), tetranitrato de pentaeritritol (PETN) (Fig. 12) y las drogas de abuso: heroína, cocaína y metanfetamina. Los límites de detección correspondieron a picogramos. Los análisis DESI se realizaron sin preparación de la muestra y se llevaron a cabo en presencia de interferencias químicas de matrices comunes, como repelente de insectos, orina y lociones tópicas (56).

Se investigaron los perfiles espaciales y de profundidad para examinar la profundidad de la penetración y la resolución lateral. DESI también fue utilizado para examinar los hisopos de algodón utilizados para la recolección de muestras de seguridad de viajes en el proceso de screening (56). También se informó el análisis cuantitativo de alto rendimiento de determinados analitos en superficies de telas.

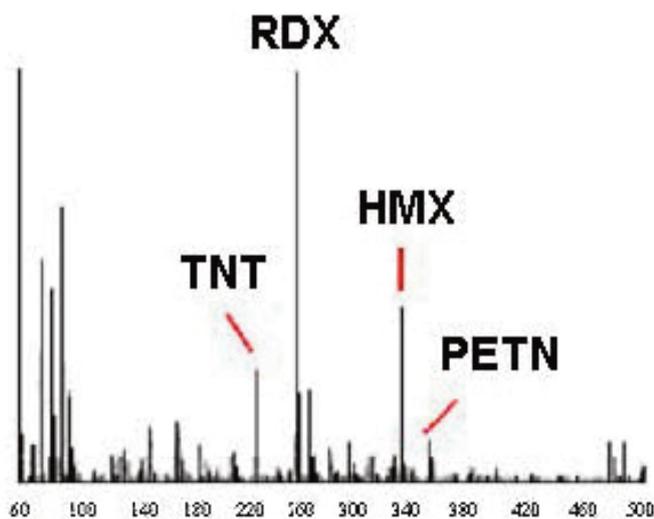


Figura 12. Análisis de explosivos en telas por DESI-MS. Espectro de masas que muestra la presencia de TNT, RDX, HMX y PETN.

c) Análisis de explosivos y agentes simulantes de guerra química a distancia del espectrómetro

DESI-MS se utilizó para la detección selectiva y sensible de trazas de explosivos y de agentes simulantes de guerra química a partir de superficies en condiciones ambientales, pero DESI distante del espectrómetro de masas, a unos 3 metros (57) (Fig. 13). Los resultados fueron satisfactorios, mostrando la posibilidad del uso en aeropuertos para el control de explosivos y agentes simulantes de guerra química.

d) Análisis forense de documentos

DESI-MS se empleó en el análisis forense de documentos. Se examinaron tintas de bolígrafo azul aplicadas a papel común de escritura en condiciones ambientales, sin ningún tipo de preparación previa de la muestra. Cuando se colocaron los documentos escritos en una placa con movimiento automático, se generaron imágenes moleculares en dos dimensiones. Los experimentos de prueba incluyeron la caracterización de un número de falsos simulados y el examen de registros de escritura vieja (58).

Esta aplicación de DESI tiene ventajas sobre las técnicas de extracción en términos de velocidad y de preservación de la muestra. Se evaluaron los efectos de la composición del solvente de desorción, en este caso una mezcla de metanol y agua, y de la velocidad de flujo. Los resultados sugieren que la solubilidad del analito (colorantes Azul básico 7, Violeta básico 3 y Azul Solvente 26) juega un papel importante en la desorción de la superficie del papel. Así, se buscó la presencia de distintas tintas. En el caso de números o palabras escritas con distintas tintas, se pudieron detectar los picos m/z 372,4 y m/z 484,5 correspondientes a dos tintas diferentes superpuestas (58).

e) Análisis sobre piel humana

Se desarrolló una sonda de plasma de baja temperatura (LTP: *low-temperature plasma*) para la ionización de desorción ambiental. Se usó un campo eléctrico de corriente alterna para inducir una descarga de barrera dieléctrica a través del uso de una configuración de electrodos especialmente diseñados (59).

El plasma de baja temperatura se extrae de la sonda, en la que interactúa directamente con la muestra a analizar, desorbiendo y ionizando las moléculas de la superficie en el medio ambiente. Esto permitió realizar experimentos sin dañar a la muestra ni al sustrato subyacente y, en el caso de los análisis biológicos sobre la superficie de la piel, sin una descarga eléctrica ni calentamiento perceptible. Los iones positivos o negativos fueron producidos a partir de un amplio rango de compuestos químicos en estado puro y como mezclas en fase gaseosa, en solución o en fase condensada, usando He, Ar, N₂ o aire del ambiente como gas de descarga. Se produjo una fragmentación limitada, aunque es mayor en los casos de gases de descarga moleculares que en los atómicos (59).

Se demostró la efectividad de la sonda de LTP mediante el registro de espectros de masas y espectros de masas en *tándem* característicos de las muestras que contienen hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) y 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) a partir de superficies de politetrafluoretileno (PTFE) con límites de detección de *ca.* 5 pg. Otras características, cuando se utiliza un espectrómetro de masas comercial con trampa de iones, incluyen un

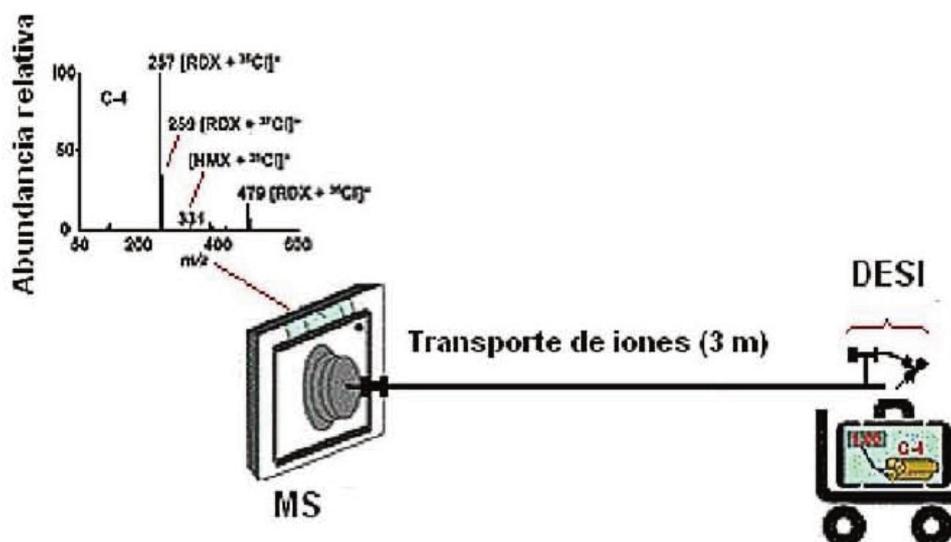


Figura 13. Análisis mediante DESI con el espectrómetro de masas a una distancia de 3 metros. Espectro de masas mostrando la presencia de los explosivos RDX y HMX.

rango dinámico lineal de 3-4 órdenes de magnitud en los casos favorables. Las aplicaciones correspondieron al análisis directo de cocaína en piel humana, la determinación de los componentes activos directamente en las tabletas de drogas y el análisis de compuestos tóxicos y terapéuticos en muestras biológicas complejas (59).

Se demostró la ionización de los compuestos químicos directamente en una solución acuosa a granel, con límites de detección de *ca.* 1 ppb. Otras características demostradas del método son el muestreo en una gran área superficial y el control de la fragmentación mediante un simple ajuste de la configuración del electrodo durante la operación (59).

f) Análisis de residuos de disparos de armas de fuego

Recientemente, se desarrolló un método directo y sensible mediante DESI-MS/MS para la detección de centralita de metilo (MC; nombre común: *N,N'*-difetil-*N,N'*-dimetilurea) y centralita de etilo (EC; nombre común: *N,N'*-difetil-*N,N'*-dietilurea) como residuos de disparos que permite la investigación en la escena del crimen. Este método directamente desorbe y detecta los analitos en las superficies sin procesar la muestra. Las transiciones típicas para MC y EC, m/z 241 a m/z 134 y m/z 269 a m/z 148 respectivamente, fueron utilizadas para mejorar la sensibilidad del ensayo (60).

Se demostró que MC y EC pueden ser detectados en diversas superficies, con límites de detección de 5-70 pg/cm². También se evaluaron las interferencias, el tiempo de detección después de haber efectuado un tiro y el número de veces que se lavaron las manos después de haber tirado (60).

Ninguno de los materiales interfirió con los resultados y la ventana de detección para los residuos orgánicos de

disparos fue de hasta 12 horas y las manos pudieron lavarse hasta seis veces. Otras muestras se analizaron para confirmar la confiabilidad de este método y se demostró que podía discriminar tiradores de no-tiradores (60).

Este método debería ser de importancia en la ciencia forense, especialmente en el análisis de residuos de disparos, debido a su simplicidad, alto rendimiento y la detección directa de MC y EC en las manos, la ropa y el pelo de los sospechosos.

g) Análisis de gases tóxicos industriales y de compuestos simulantes de agentes de guerra química

Se evaluó la aplicabilidad de la espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica (API-MS: *atmospheric pressure ionization mass spectrometry*) para analizar en tiempo real niveles bajos de compuestos tóxicos, sobre todo con respecto a las aplicaciones de seguridad pública (61).

Se estudiaron las muestras gaseosas de nueve compuestos tóxicos industriales: NH₃, H₂S, Cl₂, CS₂, SO₂, C₂H₄O, HBr, C₆H₆ y AsH₃, y dos agentes simulantes de guerra química: metilfosfonato de dimetilo (DMMP) y salicilato de metilo (MES). El análisis resultó ser rápido (< 30 segundos), de alta sensibilidad y alta selectividad para estos analitos, con buena precisión, rango dinámico y exactitud (61).

Se implementaron métodos de MS en *tándem* en los casos seleccionados para mejorar la selectividad, la sensibilidad y los límites de detección. Se lograron límites de detección en ppb (partes por billón) y ppt (partes por trillón) para este conjunto de analitos (61).

En todos los casos los límites de detección estuvieron muy por debajo de los *límites de exposición permisi-*

ble para los compuestos, aún en presencia de mezclas complejas agregadas de alcanos. Se obtuvo una respuesta lineal, de hasta varios órdenes de magnitud, en el rango de concentración estudiado (sub-ppb a ppm), con desviaciones estándares relativas inferiores al 3%, independientemente de la presencia de interferentes de alcanos (61).

Se presentaron las curvas de las características operativas del receptor (ROC: *Receiver operating characteristics*) para mostrar la eficiencia comercial entre la sensibilidad, la probabilidad de detección correcta y la tasa de falsos positivos. También se describió un sistema dinámico de preparación de la muestra para la producción de concentraciones de analito en fase gaseosa de 100 ppt a 100 ppm con capacidad de mezclar compuestos en una matriz gaseosa y con control de la humedad relativa y la temperatura (61).

También se usó un espectrómetro de masas en *tándem* portátil, capaz de realizar la ionización química a presión atmosférica (APCI) con una entrada directa de la atmósfera, para el análisis en tiempo real de los compuestos tóxicos en el aire. Los analitos de interés fueron metilfosfonato de dimetilo, arsina, benceno, tolueno, piridina y acetato de vinilo (62).

El análisis fue muy rápido (< 5 segundos) con límites de detección en el orden de subppb (v/v) y rangos dinámicos lineales de varios órdenes de magnitud. Se logró una detección e identificación muy específica, aún en los casos en que el analito estuviera en trazas en una mezcla compleja, con interferentes como: combustibles, lubricantes y productos de limpieza (62).

Se delinearon los efectos de las condiciones ambientales, como temperatura y humedad, y las curvas de las características operativas del receptor (ROC). También se utilizó espectrometría de masas en *tándem*, basada tanto en la disociación inducida por colisión como en las reacciones selectivas ión/molécula a presión atmosférica, para aumentar la selectividad y sensibilidad (62).

h) Análisis de destilados de petróleo

Un analizador de masas en miniatura con trampa de iones se aplicó al análisis de trazas de hidrocarburos y compuestos con heteroátomos en fase vapor y en solución acuosa. Se detectaron y cuantificaron vapores de acetona, ácido acético, acetonitrilo, benceno, butanol, disulfuro de carbono, hexano, diclorometano, naftaleno, tolueno y xilenos mediante sólidos absorbentes de captura y, en algunos casos, mediante el pasaje a través de una interfase de membrana. Se examinaron las soluciones acuosas de benceno, tolueno, xilenos, hexano y un destilado de nafta del petróleo utilizando la interfase de membrana. Se completó la toma de muestras, la detección y la identificación de todos los compuestos en menos de un minuto.

Las muestras en fase gaseosa de tolueno y benceno se detectaron a 200 ppt (límite de detección, LOD) para tolueno y 600 ppt para benceno. La identificación de benceno y xileno en soluciones acuosas se logró fácilmente con LODs de 200 y 400 ppb respectivamente. Se demostró la cuantificación en un rango dinámico lineal de dos órdenes de magnitud para las muestras acuosas y tres órdenes de magnitud para las muestras en fase vapor (63).

Recientemente, también se usó un espectrómetro de masas portátil para el monitoreo en tiempo real de trazas de benceno, tolueno y etilbenceno en el aire a niveles de sub-ppb, con una interfase para ionización química a presión atmosférica (APCI) para el análisis directo de muestras en fase gaseosa (64).

Se alcanzó un límite de detección para benceno de 0,2 ppb para las muestras al aire sin ningún tipo de pre-concentración de la muestra. Los correspondientes límites de detección para tolueno y etilbenceno fueron de 0,5 ppb y 0,7 ppb respectivamente. Estos límites de detección fueron muy inferiores a los niveles de exposición permisibles de los compuestos, incluso en presencia de mezclas complejas agregadas de compuestos orgánicos excediendo los niveles de ppm. Los rangos dinámicos lineales de benceno, tolueno y etilbenceno estuvieron limitados aproximadamente a dos órdenes de magnitud por la saturación de los sistemas electrónicos de detección (64).

Así se pudieron detectar trazas de benceno, tolueno y etilbenceno en presencia de altas concentraciones de vapores orgánicos (64) (Fig. 14).

Recientemente, se estudió la forma de analizar hidrocarburos con DESI-MS, con Orbitrap de alta resolución, realizando una transformación química de los mismos. Las descargas eléctricas generadas deliberadamente durante DESI permitieron un análisis rápido y directo de los destilados del petróleo, al aire libre, a través de la oxidación *in situ* de los hidrocarburos no funcionalizados para generar los correspondientes alcoholes y cetonas (65).

Se incorporó aldehído de betaína a la solución del aerosol DESI para mejorar la sensibilidad de la detección de los productos de oxidación: alcoholes de cadena larga (Fig. 15). El límite de detección para los alcanos ($C_{15}H_{32}$ a $C_{30}H_{62}$) a partir de muestras puras fue de ca. 20 ng. Las oxidaciones y deshidrogenaciones múltiples ocurrieron durante la descarga DESI, pero no se observó la fragmentación del hidrocarburo, aún en el caso de escualano muy ramificado. Usando mediciones de masa exacta, se aplicó la técnica con éxito para el análisis de destilados de petróleo que contenían hidrocarburos saturados (65) (Fig. 16).

Los resultados se compararon con los obtenidos mediante la aplicación de otras técnicas como: GC-MS; GC-FI-TOF-MS (65).

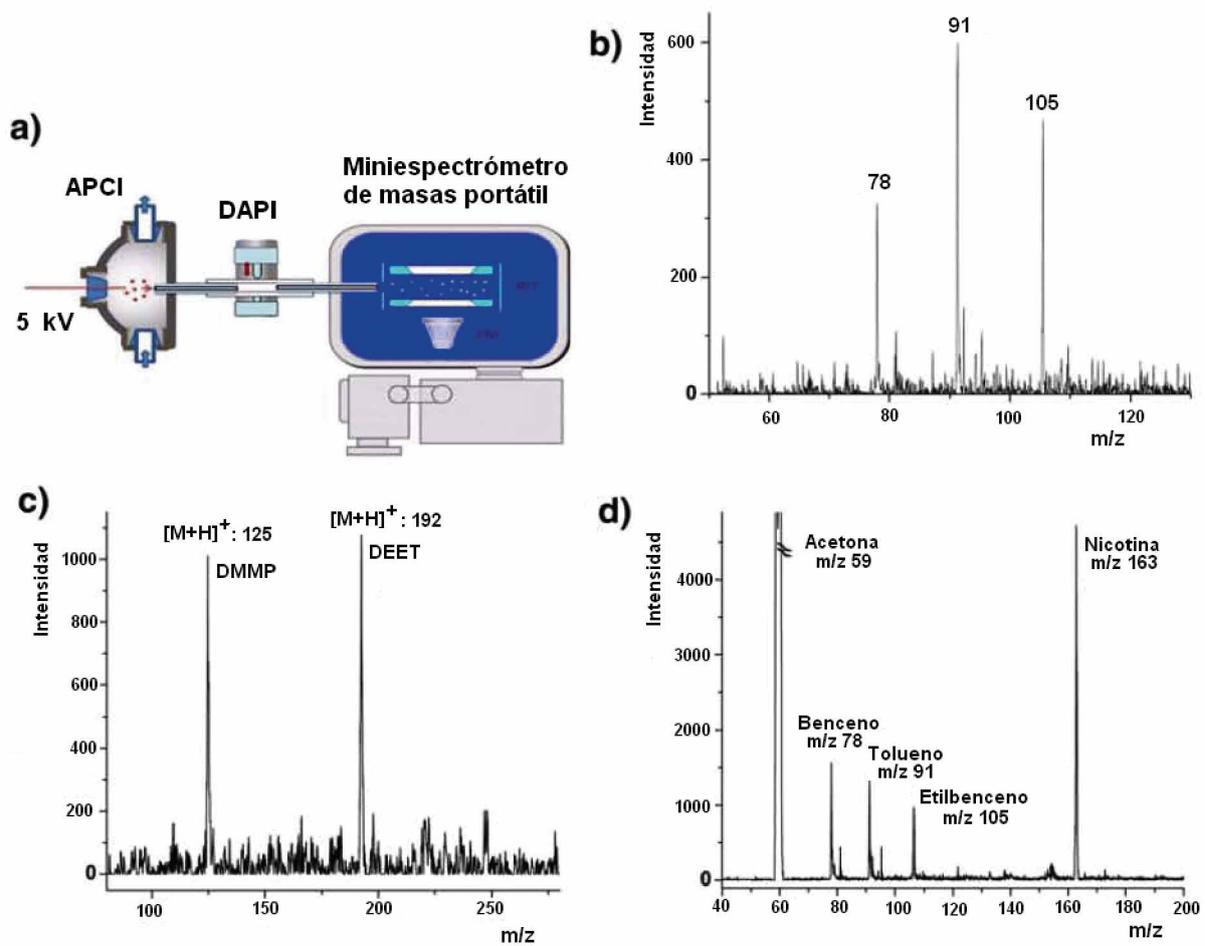


Figura 14. a) Diagrama de APCI/Mini 10.5. b) Espectro de masas de la mezcla de benceno (15 ppb), tolueno (35 ppb) y etilbenceno (60 ppb). c) Espectro de masas de DMMP (65 ppb) y DEET (260 ppb) obtenidos mediante APCI/Mini 10.5. d) Espectro de masas utilizando APCI/Mini 10,5 para benceno (125 ppb), tolueno (150 ppb) y etilbenceno (210 ppb), en presencia de 0,1% de acetona y 500 ppb de nicotina en el aire.

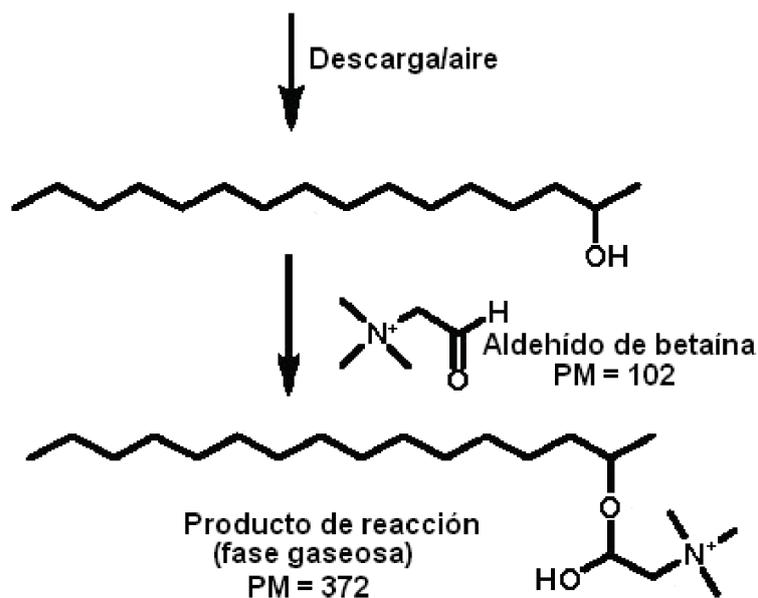


Figura 15. Oxidación in situ de hidrocarburos y reacción del alcohol producido por oxidación con aldehído de betaina.

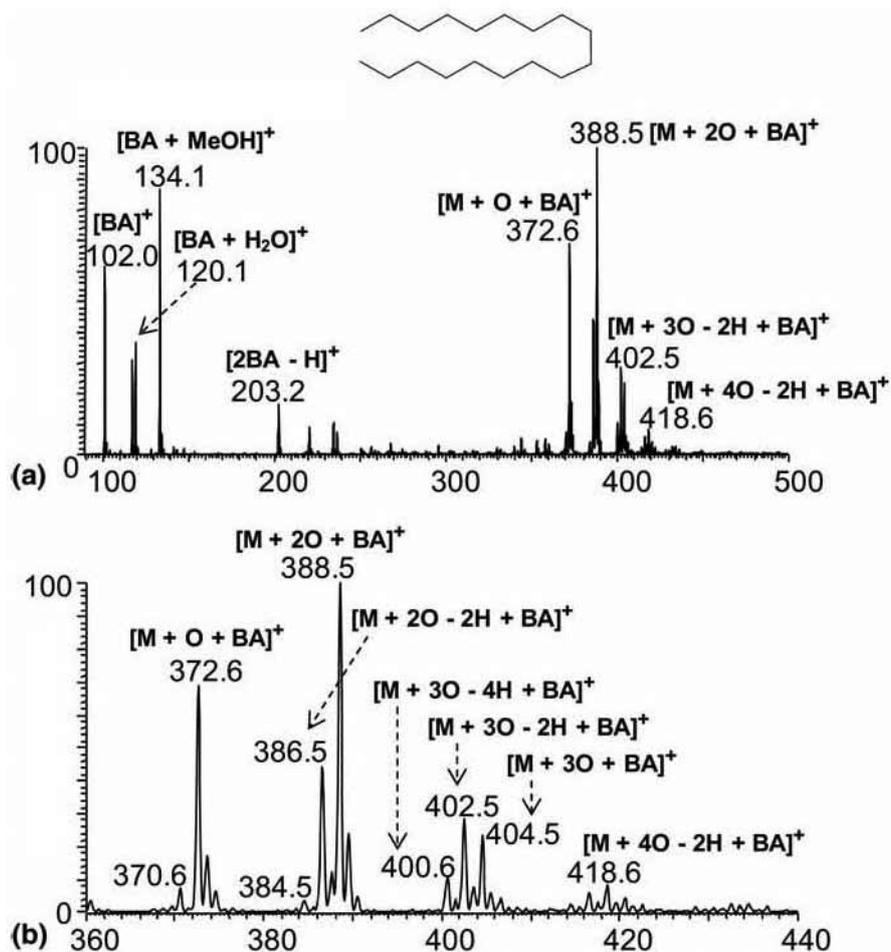


Figura 16. a) DESI reactiva de n-octadecano. b) El mismo espectro en el rango de masa m/z 360-440. Una alícuota de 1 μ L de solución de n-octadecano (200 ppm) disuelto en $CHCl_3$ fue colocada en un portaobjetos para su análisis DESI-MS después de secarse al aire.

1) Aplicación a ciencia de los materiales. Análisis de polímeros sintéticos

Se usaron las dos técnicas de ionización: DESI y ESSI (*electrospray ionization*) con spray electrosónico, para medir los pesos moleculares promedio y la distribución del peso molecular de las muestras de polímeros industriales en fase sólida y en solución (66).

4) ANÁLISIS DE IMPRESIONES DIGITALES

El análisis de las huellas digitales es de gran importancia para las aplicaciones forenses, por lo cual ha sido mencionado anteriormente. Sin embargo, DESI-MS de huellas digitales merece un ítem aparte por sus implicancias criminalísticas, toxicológicas y médicas.

Las huellas dactilares podrían contener más información forense que la simple identificación del sujeto, ya que pueden brindar elementos de prueba de contacto con explosivos o sustancias de abuso. La información química también puede ser útil para resolver la superposición de huellas dactilares de diferentes individuos.

Se utilizó DESI-MS en un modo de imagen para registrar las huellas dactilares con compuestos químicos específicos (67). Durante los experimentos, los voluntarios tocaron soluciones que contenían restos de drogas, como cocaína y cannabinoides (Δ^9 -THC y canabidiol), y de explosivos, como RDX. Después dejaron sus huellas en diferentes superficies (vidrio, papel y plástico). Se generaron huellas digitales con grasa natural (dedos en la frente) que se usaron como blanco. Utilizando DESI-MS se pudieron determinar los restos de las sustancias en las huellas dactilares mediante el registro de los espectros de masas en el modo de perfil de barrido total (m/z 100-600).

Se analizaron las huellas dactilares conteniendo Δ^9 -THC y canabidiol mediante MS/MS (o sea: MS *tándem*), con control de la fragmentación de los iones m/z 313 del precursor. Las condiciones de la fuente DESI fueron las siguientes: presión del jet de gas nitrógeno: 7 bar; ángulo de incidencia: 50-58° respecto a la superficie, solvente del aerosol: metanol:agua (9:1, v/v), flujo: 1,5 μ L/min. Se agregaron soluciones de NH_4OH (para los

experimentos con Δ^9 -THC) y NaCl (para experimentos con RDX) a la solución del aerosol a concentraciones finales de 0,1% y 1mM respectivamente (67).

En ningún caso los contaminantes procedentes de la superficie representaron un problema, ya que la espectrometría de masas de imágenes puede discriminar fácilmente la ubicación de los compuestos químicos, ya sea en la huella digital latente o en la zona circundante.

Los compuestos endógenos pueden competir por la ionización, pero no compiten bien con muchas drogas y explosivos. La supresión iónica afecta a todos los procesos de ionización en espectrometría de masas (MALDI, ESI, SIMS, DESI, etc.). Sin embargo, en DESI la utilización de un solvente apropiado puede minimizar este efecto. Por ejemplo, el uso de solventes polares en el aerosol favorece la desorción de los compuestos polares. En el experimento presentado, dado el sistema de solventes y las cantidades de material en cuestión, no se observaron, ni se esperaban, evidencias de supresión iónica alguna en las huellas dactilares ricas en sebo.

Se obtuvieron las imágenes DESI del ácido graso: ácido *cis*-hexadec-6-enoico a partir de una huella digital en el vidrio; la impresión digital de un dedo con ^{37}Cl -RDX sobre plástico; impresión de un dedo con cocaína sobre cinta adhesiva y sobre vidrio; impresión con ácido graso sobre cinta adhesiva; impresión de un dedo con un compuesto químico con m/z 235 presente en ambas impresiones digitales superpuestas, en papel; impresión de un dedo con Δ^9 -THC presente en la primera huella digital en papel; impresión de un dedo bañado con Δ^9 -THC y/o canabidiol, en papel, según lo identi-

ficado por la transición MS/MS única de m/z 313 \rightarrow m/z 245; impresión de un dedo bañado con Δ^9 -THC, que se distingue de canabidiol por la transición MS/MS única de m/z 313 \rightarrow m/z 191; impresión de un dedo bañado con cocaína, en vidrio, en el modo pixel y el modo interpolado (67).

Se muestran los espectros de masas en *tándem* de Δ^9 -THC y canabidiol en la Fig. 17. Las imágenes de las huellas dactilares de los ácidos grasos, ^{37}Cl -RDX (aductos), Δ^9 -THC y canabidiol fueron adquiridas en el modo de iones negativos. Las imágenes de las huellas dactilares de cocaína (moléculas protonadas) fueron adquiridas en el modo de iones positivos (67).

En resumen, se pudieron distinguir a los individuos y sus antecedentes de exposición a productos químicos, tales como drogas de abuso, explosivos o productos de aseo personal.

Asimismo, los autores indicaron que están comenzando un proyecto en gran escala para discriminar entre individuos mediante MS usando compuestos endógenos, como ácidos grasos, aminoácidos y escualeno, presentes en las yemas de sus dedos.

5) ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Se conocen varias publicaciones recientes de aplicación de DESI-MS y DESI-MS/MS al análisis directo de alimentos, a la búsqueda de agroquímicos en alimentos y al análisis de la presencia de melamina en productos lácteos.

Como ejemplo de análisis directo se cita el análisis de aceite de oliva (68). Se utilizó una técnica de ionización ambiental, la sonda de plasma a baja temperatura (LTP),

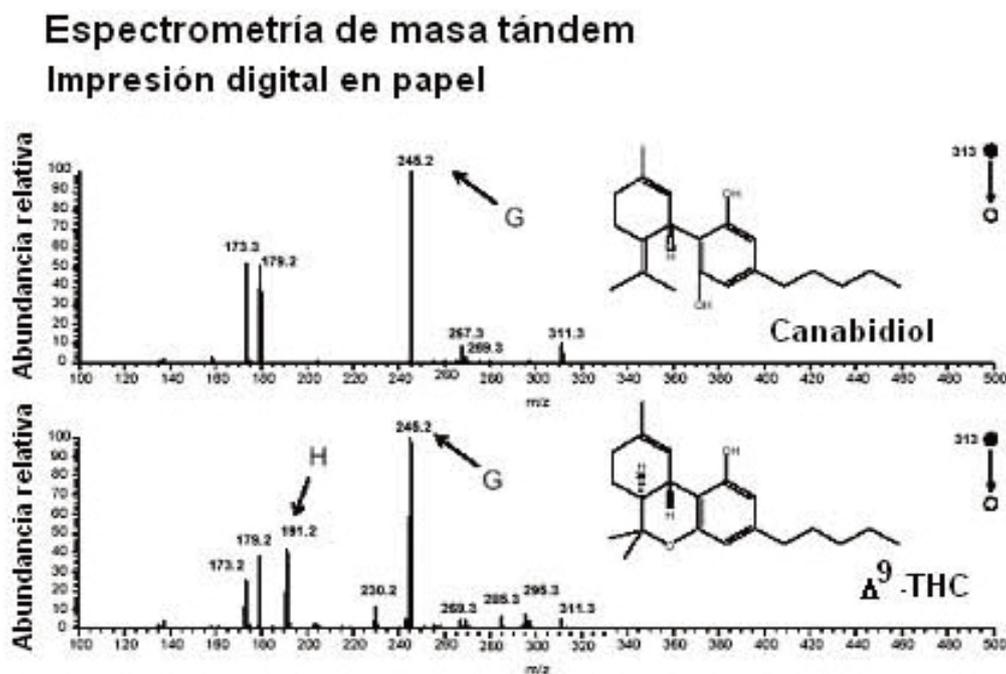


Figura 17. Espectros de masas *tándem* de canabidiol y Δ^9 -THC.

basada en la descarga de barrera dieléctrica, para detectar los componentes menores y en trazas (ácidos grasos libres, compuestos fenólicos y volátiles) del aceite de oliva crudo sin tratar. El método permitió la medición de los ácidos grasos libres (el principal parámetro de control de calidad usado para el grado de aceite de oliva de acuerdo a las categorías de calidad), compuestos bioactivos fenólicos seleccionados y volátiles. Se discutieron y se ilustraron las ventajas y limitaciones del análisis directo de mezclas muy complejas mediante la combinación de ionización ambiental/espectrometría de masas en *tándem* (68).

Los datos muestran la posible aplicación a gran escala de los métodos de análisis directo por espectrometría de masas en la caracterización de aceite de oliva y otros productos alimenticios.

Recientemente, DESI-MS se aplicó al análisis rápido, *in situ*, cualitativo y cuantitativo directo, de (ultra)trazas de compuestos agroquímicos en alimentos (69). Para evaluar el potencial de DESI-MS en el análisis de residuos tóxicos en los alimentos, se seleccionaron 16 compuestos químicos agrícolas representativos de varias clases (plaguicidas, insecticidas, herbicidas y fungicidas): ametryn, amitraz, azoxistrobina, bitertanol, buprofezin, imazalil, metabolito de imazalil, isofenfos-metil, malatión, nitenpyram, procloraz, spinosad, terbutilazina, tiabendazol y tiacloprid.

Se realizaron experimentos DESI-MS y DESI-MS/MS con 3 μ L de la solución colocados sobre superficies suaves de politetrafluoretileno (PTFE) convencional. La optimización del solvente del aerosol llevó al uso de acetonitrilo/agua (80:20, v/v), con ácido fórmico 1%. La mayoría de los compuestos ensayados mostraron notable sensibilidad en el modo de iones positivos, similar a la lograda con espectrometría de masas convencional directa con electrospray (69).

Para evaluar el enfoque propuesto en muestras reales, se realizaron diferentes experimentos, como el análisis DESI-MS/MS directo de cáscaras de frutas y también extractos de frutas/vegetales. Los resultados demostraron que DESI permite la detección y confirmación de trazas de compuestos agroquímicos en muestras comerciales. Además, la confirmación por MS/MS de los plaguicidas seleccionados en extractos vegetales inyectados se obtuvo en niveles absolutos de alrededor de 1 pg para ametryn. La cuantificación de los residuos de imazalil también se realizó utilizando un estándar marcado isotópicamente. Los datos obtenidos estuvieron de acuerdo con los del método de referencia de LC-MS, con valores de desviación estándar relativa (RSD) por debajo del 15% (69).

Los resultados obtenidos demuestran la sensibilidad de DESI puesto que cumple los estrictos requisitos de regulación de pesticidas de la Unión Europea (niveles máximos de residuos) para un gran porcentaje de compuestos estudiados.

En cuanto al análisis de otros contaminantes, este método resultó apropiado para el análisis de melamina en leche. La melamina es un compuesto químico de gran uso industrial en la producción de resinas utilizadas en laminados, colas, adhesivos y plásticos. Se ha usado recientemente como sustancia adulterante para simular un mayor contenido en proteínas en la leche en polvo y otros alimentos.

La ionización ambiental usando una sonda de plasma de baja temperatura (LTP: *low-temperature plasma*) combinada con espectrometría de masas en *tándem* (MS/MS) permitió la detección y cuantificación de melamina en leche en polvo, leche entera y otros productos a niveles inferiores a ppb en tiempos de análisis de unas pocas decenas de segundos (70).

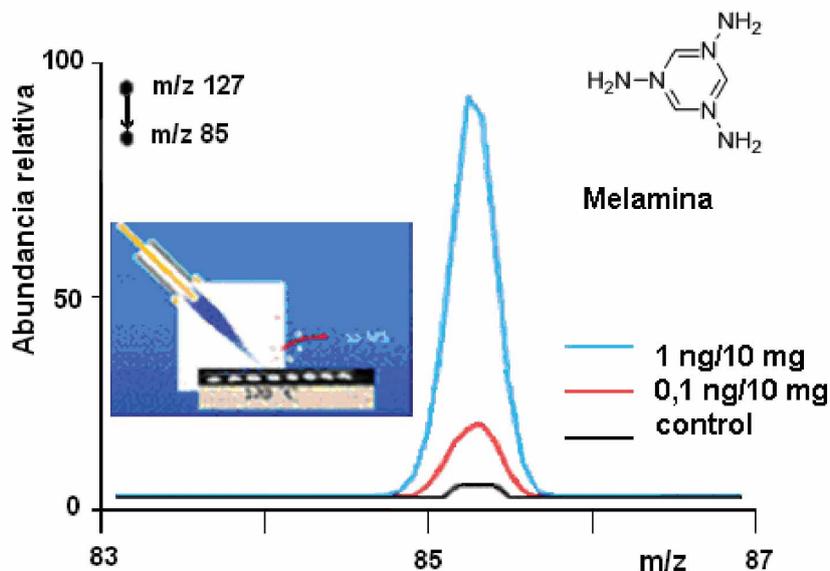


Figura 18. Análisis DESI-MS/MS de melamina en alimentos.

6) APLICACIÓN DE TLC/DESI-MS. ANÁLISIS DE COLORANTES

Ya se ha mencionado el análisis mediante DESI-MS involucrando la cromatografía en capa delgada (TLC) sobre todo al estudiar las diferentes clases de superficies (17) (35).

Sin embargo, este tema merece ser tratado en particular, dada la importancia de poder realizar el análisis cuali y cuantitativo de cromatogramas, así como de electroferogramas.

Las separaciones planas, que incluyen la cromatografía en capa fina (TLC) y electroforesis en gel, son de uso generalizado y de gran alcance para llevar a cabo la separación de mezclas complejas. Para aumentar la utilidad de las separaciones planares, se requieren nuevos métodos que permitan la caracterización *in situ* de los componentes individuales de las mezclas separadas.

En los últimos años han surgido varios muestreos sobre superficies a presión atmosférica y técnicas de ionización para usar con espectrometría de masas, y varios han sido investigados como un medio para leer las separaciones planas mediante espectrometría de masas (71).

Se ejemplificaron: Desorción térmica/ionización; desorción con láser (ablación)/ionización (LD-APCI desorción/ionización): AP-MALDI y AP-LD/SI; sonda de muestreo de superficie por extracción líquida /ionización; sonda de muestreo de superficie por microjunta líquida (LMJ-SSP: *Liquid microjunction surface sampling probe*); desorción por chorro líquido y gaseoso/ ionización; enfoques on-line: elución seguida por ionización.

Se analizaron los esquemas utilizados para la colocación manual de una placa de HPTLC en la corriente de gases de DART, la configuración de ELDI, superficie total de TLC/LMJ-SSP/ESI-MS, la configuración de DESI;

el sistema de CycloGraph conectado a la fuente de iones de ionización química a presión atmosférica APCI-MS y la interfase TLC/ESI-MS (71).

Para poder lograr la optimización de las condiciones experimentales se realizaron variados estudios con colorantes como las rodaminas (Fig. 19) (72) (73).

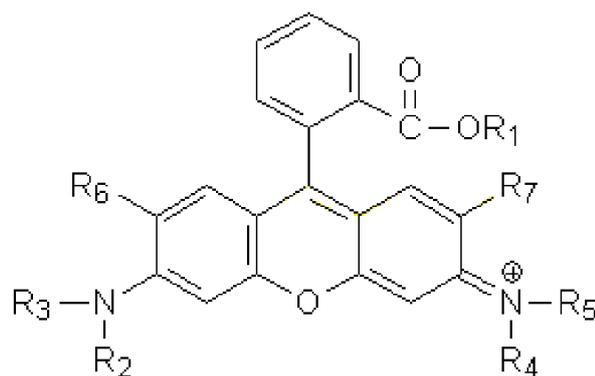
Se usó TLC-DESI-MS con mejoras a un *software* para el control de posicionamiento de la superficie (TLC/MS manos libres) a fin de permitir la toma automática de muestras y de imágenes de los analitos sobre y dentro de una gran área superficial de sustratos (72) (Fig. 20). Se hizo el barrido completo de una calle de TLC (una o múltiples calles) o imágenes de las bandas del analito en una calle de la placa (es decir, múltiples barridos de calles con espaciamiento cercano). También se discutieron aspectos del proceso de post adquisición de datos y los aspectos de despliegue de datos del sistema de software (72).

7) ANÁLISIS DESI-MS DE CULTIVOS DE BACTERIAS

DESI-MS permitió obtener espectros de masas muy reproducibles de microorganismos intactos en condiciones ambientales; la aplicación del análisis de componentes principales a los datos llevó a la diferenciación de sub-especies (74). Así por ejemplo, se obtuvo el espectro de masas característico de cepas de *Escherichia coli*, como: *E. coli* JM109, utilizando como solvente del aerosol DESI metanol-agua (1:1) (Fig. 21) (74).

Se realizó el análisis metabólico en *Escherichia coli* mediante DESI-MS (75).

De esta manera, se analizó la presencia de metabolitos de interés en los extractos de las células bacterianas y en el sobrenadante de *Escherichia coli*. Los metabolitos



<u>6G</u> : R ₁ , R ₂ , R ₄ =CH ₂ CH ₃ ; R ₃ , R ₅ =H; R ₆ , R ₇ =CH ₃	SRM m/z 443 →415
<u>B</u> : R ₁ , R ₆ , R ₇ =H; R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ =CH ₂ CH ₃	SRM m/z 443 →415
<u>123</u> : R ₁ =CH ₃ , R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ , R ₆ , R ₇ = H	SRM m/z 345 →285

Figura 19. Estructuras químicas de las rodaminas estudiadas.

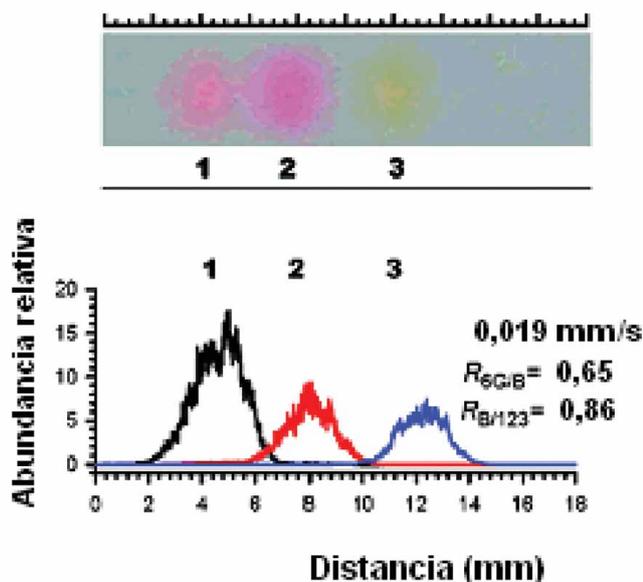


Figura 20. Barrido DESI-MS de las rodaminas separadas por TLC.

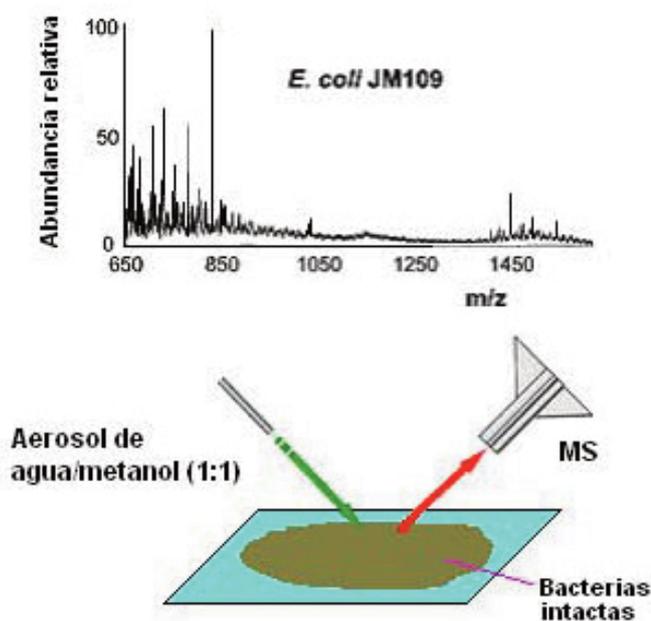


Figura 21. Análisis DESI-MS de una cepa de *Escherichia coli*.

de interés se identificaron mediante MS/MS de los barridos de los iones producto utilizando disociación inducida por colisión (CID) en el modo de iones negativos. Se lograron límites de detección de picogramos para la mayoría de los metabolitos (75).

En un experimento con [$U\text{-}^{13}\text{C}$]-glucosa, en el que se alimentó a *E. coli* con glucosa marcada uniformemente, también se observaron los iones fragmentos correspondientes de los metabolitos marcados en los extractos

para la mayoría de los metabolitos. Hubo evidencias de efectos de matriz, como: la supresión moderada por otros metabolitos en los espectros de los extractos marcados y sin marcar (75).

Para mejorar la especificidad y la sensibilidad de la detección, se llevaron a cabo reacciones químicas *in-situ* optimizadas en condiciones ambientales usando DESI y ionización extractiva por electrospray (EESI: *extractive electrospray ionization*) para compuestos específicos. Este estudio proporcionó la primera indicación de la posibilidad de realizar metabolómica *in situ* de una muestra bacteriana mediante espectrometría de masas de ionización en condiciones ambientales.

Las diferentes células bacterianas presentaron espectros de masas distintivos (Fig. 22).

Se obtuvieron espectros MS/MS de varios iones característicos para cada especie de bacteria observados en el espectro DESI (Tabla 1). (US Pat. 7,335,897 © 2008 Prosolia, Inc.).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* los valores de m/z 244 y m/z 270 correspondieron a los picos de los espectros de masas de iones positivos de las quinolonas sustituidas de la Fig. 23. El valor de m/z 211 en el espectro MS/MS se debe a piocianina ($[M+H]^+ = 211$) (Fig. 24) presente en *Bacillus cereus* y en una muestra de una semana de *P. aeruginosa*.

Tabla 1. Iones característicos observados en distintas especies de bacterias

Bacterias	Espectro de masas: iones característicos (m/z) ⁷
<i>Escherichia coli</i> DH1N	156; 188; 257; 365
<i>Escherichia coli</i> DH1E	156; 188; 257; 365; 428
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	156; 257
<i>Bacillus cereus</i>	156; 189; 211; 227
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	244; 260; 270; 272; 298; 211*

*Pico 211 visto en una muestra de una semana.

Las condiciones de operación experimental que generalmente se usan son: voltaje del electrospray: 4 kV, flujo del solvente: 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, presión del gas: 100 psi, distancia de la punta del aerosol a la superficie (d_1): 1 mm, temperatura de la entrada del espectrómetro de masas: 250 $^{\circ}\text{C}$, ángulo de impacto del electrospray (α): 55 $^{\circ}$, ángulo de despegue (β): ca. 10 $^{\circ}$, solvente: metanol-agua (1:1), material de la superficie: vidrio o portaobjetos y tiempo de análisis: ca. 5 segundos.

8) APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS DE ORIGEN ANIMAL

El análisis directo de muestras mediante ionización a presión atmosférica (API: *atmospheric pressure ionization*) proporciona un método más rápido para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles que los métodos de

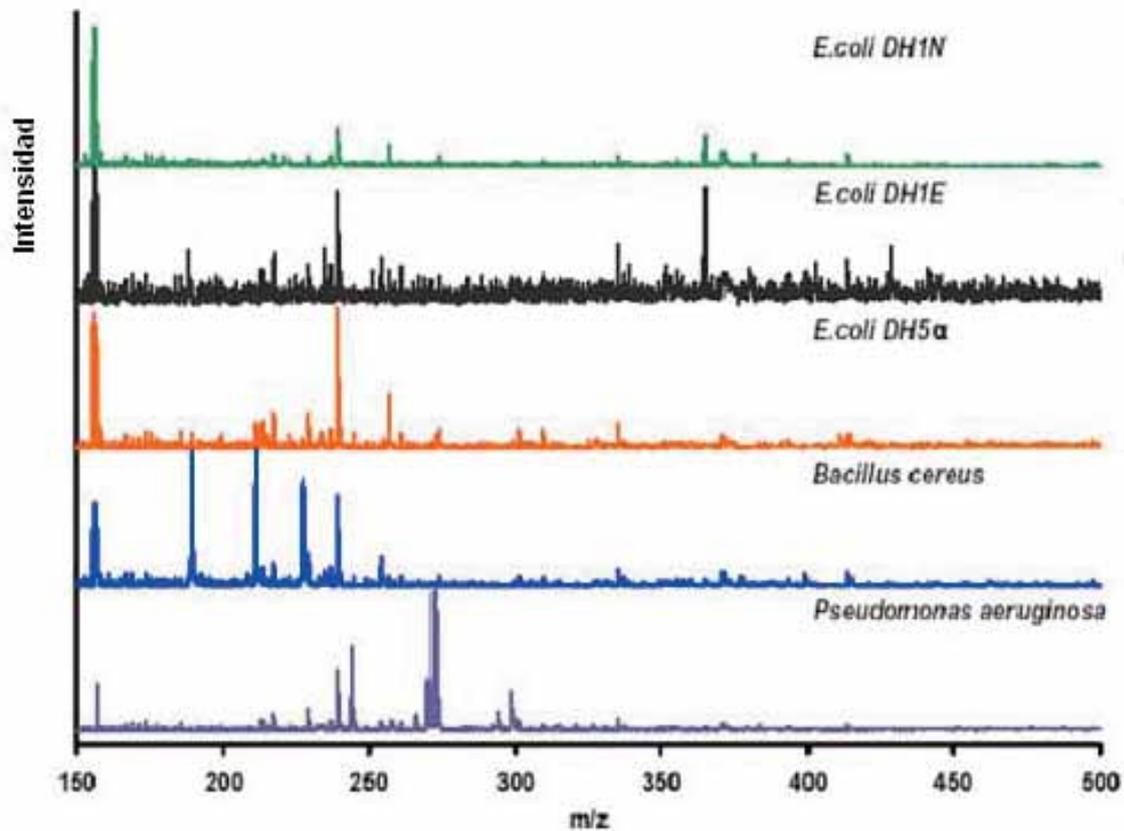


Figura 22. Análisis DESI-MS para distinguir diferentes bacterias.

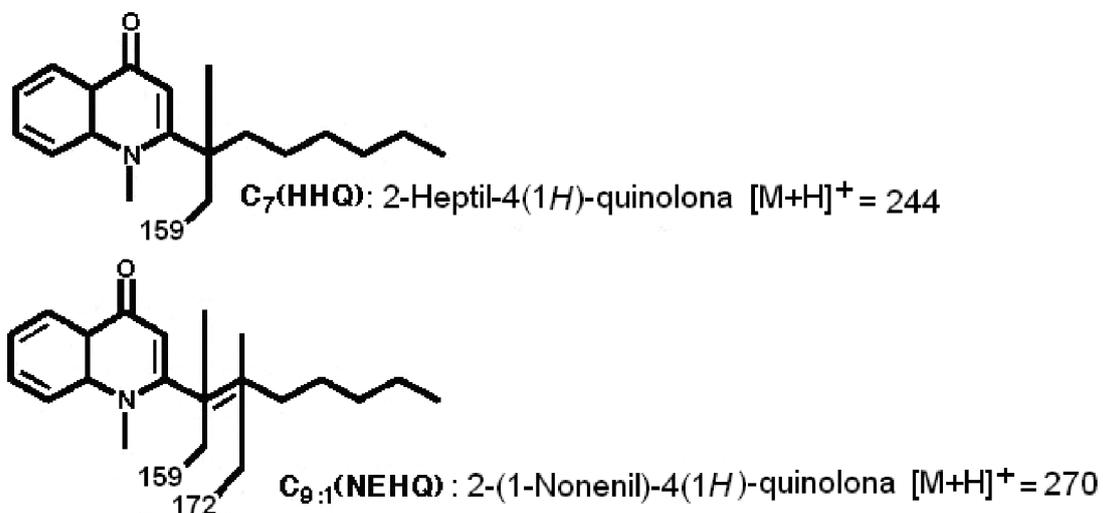


Figura 23. Quinolonas sustituidas responsables de los iones a m/z 244 y m/z 270, presentes en *Pseudomonas aeruginosa*.

muestras sólidas al vacío y puede llevarse a cabo en espectrómetros de masas API comerciales. Con sólo una modificación simple de una fuente de ionización por electrospray (ESI: *electrospray ionization*) o bien, de ionización química a presión atmosférica (APCI: *atmospheric pressure chemical ionization*), se pueden analizar sólidos, así como muestras líquidas, en cuestión de segundos (13).

a) Detección de fármacos en tejidos intactos

Los métodos de ionización ambiental para MS permiten mediciones directas de alto rendimiento de muestras al aire libre. DESI-MS se usa para registrar la intensidad de distribución espacial de un fármaco directamente en cortes histológicos de cerebro, pulmón, riñón y testículo, sin tratamiento químico previo (76).

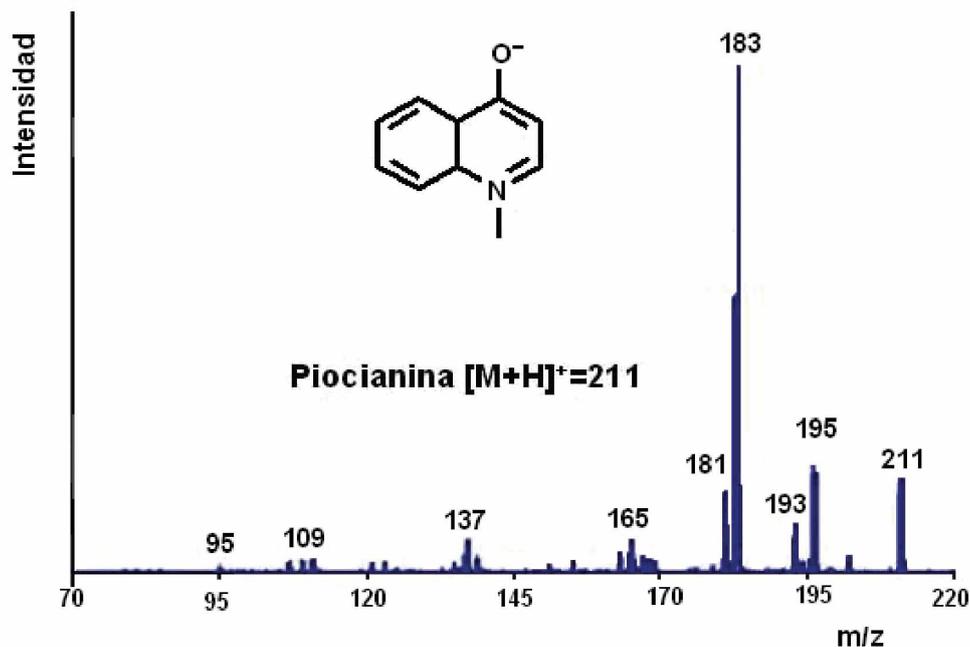


Figura 24. Espectro MS/MS de piocianina ($[M+H]^+ = 211$) presente en *Bacillus cereus* y en una muestra de una semana de *P. aeruginosa*.

También se ha realizado el análisis DESI directo de tejidos vegetales (77) y animales (26) (28). Para tal fin, se usan las secciones delgadas de tejido de preparados para microscopía o nativos, tejidos recién cortados para el análisis mediante DESI-MS. Usando etapas de movimiento controlado electrónicamente y un fino spray DESI, se logran imágenes químicas de las superficies en estudio.

En otros estudios, la resolución espacial lateral obtenida fue de aproximadamente 200 μm , cuando se ensayó mediante el análisis del perfil de tinta sobre papel fotográfico (27).

DESI-MS de imágenes tiene las siguientes ventajas sobre el procedimiento convencional de autorradiografía del organismo completo (*whole-body autoradiography approach*): 1) no se requiere marca radiactiva y 2) permite la detección simultánea de los compuestos originales de las drogas y metabolitos en los tejidos.

Se pueden hacer estudios DESI-MS de tejidos biológicos intactos (28).

El uso de DESI reactivo en el modo de imagen permitió registrar la distribución espacial 2D de fosfolípidos y de colesterol simultáneamente en tejidos de cerebro de rata (48).

Se demostró la aplicación de DESI-MS a imágenes de tejidos con una resolución espacial <400 μm (26). Ejemplo: imágenes de iones seleccionados de lípidos en una sección coronal de 10 μm de cerebro de rata. Cada imagen consistió en 112 x 39 píxeles (4368 espectros de masas completos) con una dimensión de píxel de 150 μm x 300 μm . En las imágenes se vieron las distintas características anatómicas que pueden distinguirse mediante los mapas químicos de lípidos.

Se obtuvieron los espectros de masas completos para cada punto (píxel) de la imagen. La distribución específica de los múltiples analitos detectados en la superficie de los tejidos fue adquirida simultáneamente.

Evidentemente, las aplicaciones que conservan la capacidad de registrar la distribución en el tejido de compuestos exógenos y sus metabolitos asociados resulta ser de una tremenda ventaja en el desarrollo de productos farmacéuticos. Las imágenes químicas mediante DESI tienen esta capacidad y se aplican ventajosamente a la detección sin marcado de drogas y metabolitos en tejidos.

El hecho que las soluciones de la matriz no requieran ser depositadas en la superficie del tejido también presenta una ventaja significativa sobre la técnica MALDI (24). Los dos métodos son, sin embargo, complementarios, ya que MALDI es adecuado principalmente para la detección de moléculas grandes, como péptidos y proteínas, y DESI es muy útil para la detección de moléculas pequeñas, como lípidos, metabolitos y moléculas de fármacos o monodrogas.

El tiempo de análisis depende del tamaño de la superficie a ser analizada y de la resolución deseada. El análisis de los cortes de tejidos de órganos a una resolución de 250 μm suele tardar entre 30 minutos y 2 horas (40).

También se conoce un método que consiste en una introducción rápida de una sonda de sólidos/líquidos, así como una alternativa a DART y DESI para muchos tipos de compuestos. La vaporización de los materiales se produce en la corriente caliente de gas nitrógeno que fluye desde una sonda ESI o de APCI. La ionización de los vapores inducidos térmicamente se produce por descarga

eléctrica bajo condiciones estándares de APCI. La masa exacta y la fragmentación de masa seleccionada muestran la capacidad de obtener iones de tejidos biológicos, monedas y otros objetos colocados en el paso de la corriente de nitrógeno caliente (13).

Así por ejemplo, DESI de imágenes proporcionó la identificación y la distribución de clozapina después de una dosis oral de 50 mg/kg mediante: i) la medición de la abundancia del ion intacto a m/z 327,1 y ii) el monitoreo de la disociación de la droga protonada de m/z 327,1 a su ion producto dominante de m/z 270,1. En los tejidos pulmonares, se realizaron las imágenes DESI en el modo de barrido completo en el rango de m/z 200-1100, proporcionando una oportunidad para la cuantificación relativa mediante el uso de un lípido endógeno para normalizar la respuesta de la señal de clozapina (76).

La presencia de clozapina fue detectada en todos los tipos de tejidos, mientras que la presencia del metabolito *N*-desmetilado se detectó solamente en los cortes de pulmón.

La cuantificación de clozapina en cerebro, pulmón, riñón y de testículos, usando LC-MS/MS, reveló concentraciones 0,05 µg/g (cerebro) hasta un máximo de 10,6 µg/g (pulmón).

Los resultados registrados por DESI-MS y los de LC-MS/MS son concordantes, lo cual es favorable para la utilización de DESI-MS de imágenes en la detección de drogas y metabolitos directamente en tejidos biológicos (76).

b) Aplicación en lipidómica

DESI-MS ha sido utilizada en forma sistemática para caracterizar fosfolípidos, que son especies abundantes en las muestras de tejidos biológicos. Los lípidos desempeñan importantes funciones biológicas y se han observado diferencias en la composición de los mismos en enfermedades como cáncer y Alzheimer. Las imágenes de secciones de tejido fino explotan la capacidad de DESI-MS para el estudio de estos lípidos directamente en la matriz biológica. En MS de imágenes (IMS: *imaging MS*), se registra un espectro de masas en cada píxel mientras se mueve la superficie que contiene la muestra, de manera que se cubre el área entera de la muestra. La información de estos espectros de masas se puede combinar para crear una imagen química 2D de la muestra, uniendo la información sobre la distribución espacial con la información sobre la identidad química de los iones característicos en los espectros de masas.

Así por ejemplo, se usó DESI-MS para obtener la imagen de una gran variedad de muestras de tejidos como el adenocarcinoma de hígado humano, el cerebro de rata, tejido de mama humana y tejido del tumor abdominal canino. En estos estudios se compararon el tejido enfermo y el normal (78).

Recientemente, DESI-MS se utilizó en un modo de imagen para examinar los perfiles de lípidos en cortes de

tejido delgado de carcinoma invasivo espontáneo de células transicionales de vejiga urinaria en caninos (un modelo del cáncer invasivo de vejiga en humanos), así como en el tejido normal adyacente de cuatro perros diferentes. Se identificaron los glicerofosfolípidos y esfingolípidos que aparecieron como señales intensas tanto en el modo de iones negativos como en el modo de iones positivos mediante barridos de los iones productos en espectrometría de masas *tándem* usando disociación inducida por colisión (CID: *collision-induced dissociation*). Se observaron diferencias en la distribución relativa de las especies de lípidos entre el tumor y el tejido normal adyacente tanto en el modo de iones negativos como en el de iones positivos (79).

Se compararon los DESI-MS de imágenes con distribución espacial de glicerofosfolípidos en particular, esfingolípidos y ácidos grasos libres tanto en los modos de iones positivos y negativos con los cortes de tejido seriados teñidos con hematoxilina y eosina (79).

Se observó un aumento en la intensidad absoluta y relativa de al menos cinco glicerofosfolípidos diferentes y tres ácidos grasos libres en el modo de iones negativos y al menos cuatro especies diferentes de lípidos en el modo de iones positivos en la región del tumor en las muestras de los cuatro perros. Además, una especie de esfingolípido presentó mayor intensidad de la señal en el modo de iones positivos en el tejido normal respecto al tejido enfermo. También se usó el análisis de componentes principales para generar imágenes estadísticas de los datos obtenidos en el modo de iones negativos y estas imágenes estuvieron en excelente acuerdo con las imágenes DESI obtenidas a partir de iones seleccionados y también del tejido coloreado con hematoxilina y eosina (79).

También se utilizó DESI-MS para la elaboración de perfiles e imágenes de las placas arteriales (80).

Una de las características de la aterosclerosis es la acumulación de lipoproteínas dentro la pared de los vasos sanguíneos. La composición de los lípidos puede variar entre los ateromas, incluso dentro de un solo individuo y también es dinámica, cambiando a medida que progresa la lesión. Es deseable que el ateroma presente estabilidad, puesto que la ruptura de las placas inestables puede interferir con el flujo normal de sangre al cerebro o al corazón, conduciendo a un accidente cerebrovascular o ataque al corazón.

Mediante DESI-MS en los modos de iones positivos y negativos se detectaron aductos de sodio y cloro respectivamente, de glicerofosfolípidos diacilados (GPCOs), esfingomielinas (SMs) y GPCOs hidrolizadas. Además, se detectaron ésteres de colesterol vía la formación de aductos con cationes amonio. Por último, se obtuvo la imagen del colesterol en el ateroma mediante una derivatización química *in situ* del colesterol con el agregado del reactivo aldehído de betaína directamente en el solvente del aerosol DESI, ya que sino el colesterol sería no iónico y no se detectaría. Los experimentos DESI con

imágenes, en los cuales se determinó la distribución espacial de varias especies químicas mediante el barrido con la sonda DESI a través de una superficie completa de la muestra, reveló que hay regiones ricas en lípidos dentro de las paredes arteriales y las regiones ricas en lípidos parecen tener uno de los dos diferentes perfiles de lípidos. Estas regiones ricas en lípidos probablemente corresponden a las áreas de tejidos en donde se han acumulado las partículas de lipoproteínas. También es posible que la distribución diferente de los lípidos pueda correlacionarse con la estabilidad o vulnerabilidad de esa región en particular de la placa (80).

c) Análisis de órganos completos. Análisis de glándula adrenal

DESI-MS de imágenes a presión atmosférica con una resolución espacial de 200 μm permitió distinguir fácilmente sutiles diferencias en la distribución espacial de compuestos muy relacionados, como norepinefrina y epinefrina y varios lípidos, en las glándulas suprarrenales de porcinos (17 \times 8 mm) y conejos (7 \times 4 mm) adultos. La detección sensible y específica en el curso de DESI de imágenes reveló detalles de la distribución de catecolaminas en la médula y en la corteza suprarrenal porcina; la masa media de adrenalina examinada en cada píxel se estimó en alrededor de 150 pg. La distribución de ácido ascórbico se obtuvo en el modo de iones negativos. Además, la distribución de colesterol, que no puede ser observado mediante DESI convencional, se obtuvo utilizando la reacción *in situ* con aldehído de betaína agregado al aerosol DESI mientras se obtenían las imágenes del tejido de la glándula suprarrenal porcina (81).

Se observaron cuatro tipos característicos de distribución, con cantidades importantes de los componentes

en la médula, la corteza, la zona reticular o en el cuarto caso, siendo la distribución homogénea (Figs. 25 y 26). Los resultados estuvieron de acuerdo con los estudios histológicos, ampliando esa información (81).

9) APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS DE ORIGEN VEGETAL

Con DESI-MS es posible hacer mediciones directas sobre superficies planas, sin o con poca preparación de la muestra. En cuanto a vegetales, se han hecho estudios directos sobre la superficie de frutos, como tomate, porotos, maíz y también sobre hojas, con el objeto de estudiar los componentes endógenos y para buscar contaminantes como agroquímicos en su superficie.

También se analizaron mediante DESI-MS alcaloides (77) y terpenoides. Así por ejemplo, se realizó el análisis directo de las hojas de *Stevia* mediante DESI-MS. La especie *Stevia rebaudiana* es conocida por sus propiedades edulcorantes debidas a la presencia de glicósidos de diterpenos tetracíclicos. Se logró el análisis rápido y directo de los mismos con una cantidad mínima de muestra (ca. 0,15 cm \times 0,15 cm de fragmento de la hoja). Se observaron los componentes característicos de la planta de *Stevia* tanto en el modo de iones positivos como de iones negativos (82).

La presencia de los glicósidos se confirmó vía el análisis por espectrometría de masas *tándem* (MS/MS) usando disociación inducida por colisión (CID: *collision-induced dissociation*) y además por mediciones de masa exacta utilizando un LTQ-Orbitrap. El análisis de hojas secas extraídas con hexano y hojas sin tratar demostró que DESI puede ser utilizado con éxito para analizar fragmentos de hojas sin tratar ya que se obtuvieron perfiles idénticos de ambos tipos de muestras (82).

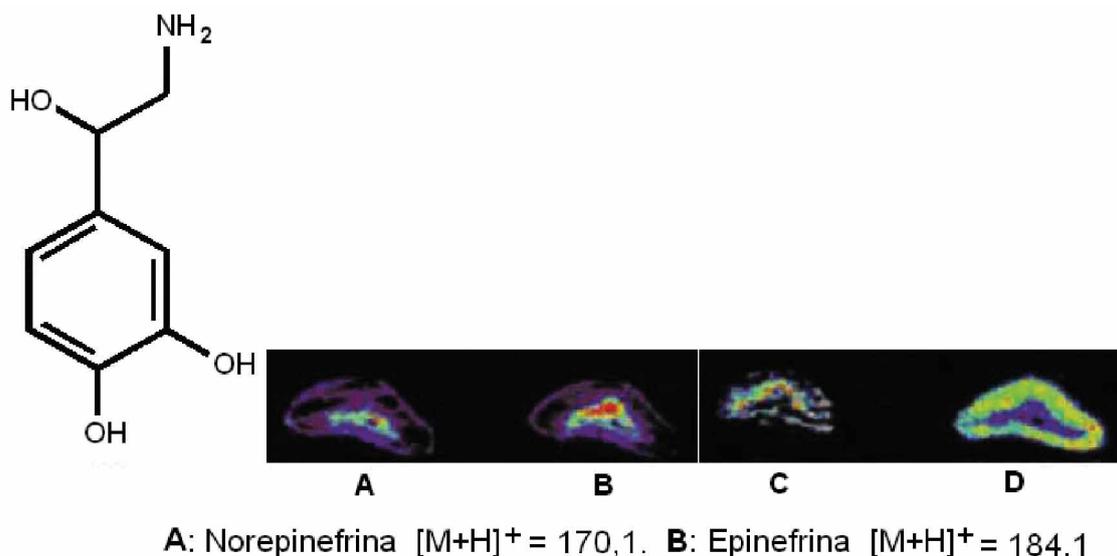


Figura 25. Cuatro tipos característicos de distribución de los componentes en la glándula adrenal: A, B, C y D. Valores correspondientes a norepinefrina y epinefrina en el espectro de masas *tándem* de iones positivos.

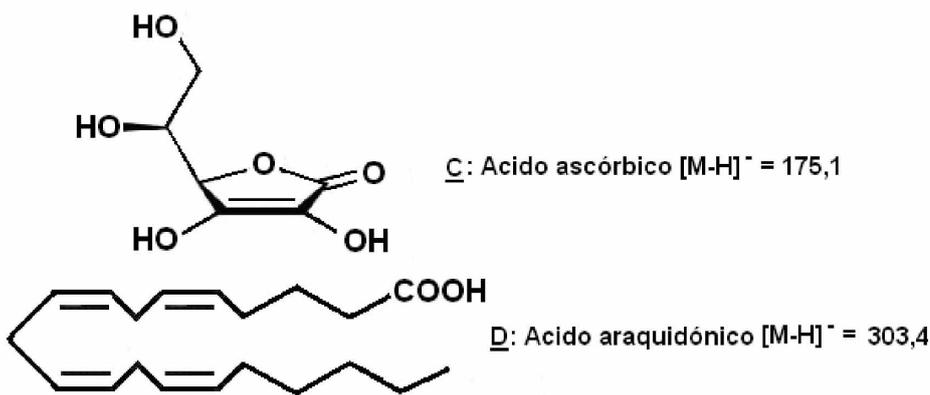


Figura 26. Valores correspondientes a ácido ascórbico y ácido araquidónico en el espectro de masas tándem de iones negativos en glándula adrenal porcina.

Se logró la caracterización y la determinación semi-cuantitativa de los glicósidos mediante el perfil de glicósidos en el espectro de masas completo (Fig. 27).

Además, se confirmó la presencia de glicósidos característicos en un suplemento dietario natural comercial de *Stevia* (82). Este estudio proporciona un ejemplo de la aplicación de DESI al screening directo de materiales vegetales, en este caso, glicósidos diterpénicos.

10) APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE BIOMARCADORES MOLECULARES

Las metodologías basadas en espectrometría de masas están siendo cada vez más utilizadas en el descubrimiento en fase temprana de marcadores moleculares para el diagnóstico de cáncer.

El descubrimiento molecular de los procesos de las enfermedades y la integración con la patología diagnóstica está actualmente en curso. En patología diagnóstica y quirúrgica se podrían aprovechar la sensibilidad y la especificidad de las tecnologías basadas en MS- sobre todo las que proporcionan tanto la identidad por peso molecular como la información espacial directamente a partir del tejido de biopsias.

Se han analizado por DESI-MS distintas familias de compuestos orgánicos distribuidos en variadas superficies, para optimizar las condiciones experimentales y conocer las ventajas y limitaciones de este método. Así por ejemplo, DESI-MS se aplicó al análisis de hidratos de carbono y esteroides, observándose que los límites de detección mejoraron significativamente mediante la adición de bajas concentraciones de sales al solvente del aerosol (83) (Fig. 28).



Figura 27. Análisis de hojas vegetales mediante DESI-MS. Ejemplo de diterpenos tetracíclicos presentes en especies de *Stevia*.

Como se ha visto en este trabajo en la aplicación de DESI-MS a tejidos biológicos, los resultados obtenidos hasta el momento son prometedores para distinguir el tejido enfermo del sano mediante la asignación química obtenida por DESI-MS (26) (28). Por ejemplo: se obtuvieron cambios cualitativos en los perfiles de lípidos que permitieron distinguir la zona con tumor de aquella sin tumor en una biopsia de tejido de adenocarcinoma de hígado (78-80).

En cuanto a estudios metabólicos, los ésteres de *L*-carnitina con acilos de ácidos grasos (acilcarnitinas) son biomarcadores útiles para el diagnóstico de algunos defectos congénitos del metabolismo, siendo usualmente analizados por cromatografía líquida/espectrometría de masas en *tándem* (LC-MS/MS). Recientemente, las acilcarnitinas fueron analizadas por ionización química con desorción térmica a presión atmosférica (APTDCI: *atmospheric pressure thermal desorption chemical ionization*) mediante un espectrómetro de masas *tándem* comercial (APTDCI-MS/MS) (84). El método se basa en la determinación en el modo de barrido del ión precursor de las acilcarnitinas no derivatizadas desorbidas de las muestras mediante un flujo de gas caliente de desolvatación y ionizado mediante una descarga eléctrica. Durante el paso de desorción/ionización la temperatura indujo la degradación de las acilcarnitinas; sin embargo, el fragmento común a todas las acilcarnitinas $[MH-59]^+$ resultó útil para el análisis de su perfil. Los parámetros APTDCI, como el ángulo de incidencia, el flujo y la temperatura del gas, se optimizaron para las acilcarnitinas. Los experimentos se realizaron secando 2 μ L de una mezcla equimolar de acilcarnitinas estándares en un portaobjetos de vidrio. La especificidad se evaluó mediante la comparación de los espectros de los iones producto y los espectros de los iones precursores de m/z 85 de las acilcarnitinas obtenidos por el método APTDCI y por ionización con electrospray con análisis por inyección en flujo (ESI-FIA: *electrospray ionization flow injection analysis*). El método se empleó también para analizar acilcarnitinas extraídas de una mancha patológica de sangre seca y un control. El método permitió el análisis

de muestras biológicas y el reconocimiento de algunas acilcarnitinas que son marcadores de diagnóstico de enfermedades metabólicas hereditarias. El análisis intrínseco de alto rendimiento de los métodos de ionización por desorción en el medio ambiente ofrece una nueva oportunidad ya sea para su posible aplicación en la química clínica y para el *screening* expandido de algunos defectos congénitos del metabolismo (84).

11) ANÁLISIS DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

a) Imagen molecular de muestras biológicas: Localización de péptidos y proteínas usando MALDI-TOF-MS

Primero se usó espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistido por matriz (MALDI-MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) para generar imágenes de iones de muestras en uno o más valores de m/z , brindando así la posibilidad de mapeo de moléculas específicas en las coordenadas bidimensionales de la muestra original.

La alta sensibilidad de la técnica (niveles de sub-femtomoles a attomoles para proteínas y péptidos) permitió el estudio de los procesos bioquímicos organizados que, por ejemplo, ocurren en cortes de tejidos de mamíferos. El espectrómetro de masas se utilizó para determinar los pesos moleculares de las moléculas en las capas superficiales del tejido.

Las moléculas desorbidas de la muestra estaban uniprotonadas, dando un ión a $[M + H]^+$, con M como masa molecular (24).

El procedimiento consistió en recubrir la sección de tejido, o un *blotted imprint* de la sección, con una capa delgada de matriz absorbente de energía y luego analizar la muestra para producir una serie ordenada de espectros de masas, cada uno con valores de m/z nominales, cubriendo un rango de más de 50.000 Da (24).

Las imágenes se desplegaron en valores individuales de m/z como una imagen de iones seleccionados, que localizarían los compuestos individuales en el tejido, o bien, como una suma de imágenes de iones (24).



Figura 28. Análisis DESI-MS de esteroides y azúcares con el agregado de sales sódicas para aumentar la sensibilidad en la detección.

Las imágenes de iones MALDI de secciones de tejido se obtuvieron directamente de los cortes de tejido siguiendo los pasos preparativos y ésto se demostró para el mapeo de la insulina contenida en un islote en una sección de páncreas de rata, los péptidos hormonales en una pequeña área de una sección de la pituitaria de rata y una pequeña proteína unida a la membrana de las células de la mucosa humana (24).

Alternativamente, las impresiones del tejido se analizaron mediante *blotting* de las secciones del tejido sobre objetivos (*targets*) especialmente preparados conteniendo un material absorbente, por ejemplo: esferitas de resina recubiertas con C₁₈. Los péptidos y las pequeñas proteínas se unieron al C₁₈ y crearon una impresión positiva del tejido que se convirtió en imagen mediante el espectrómetro de masas (24).

Esto se demostró por el análisis MALDI de imágenes de iones de regiones del bazo y páncreas de rata y en un área de la pituitaria de rata atravesando las regiones anterior, intermedia y posterior, donde se mapearon los péptidos localizados. En un único espectro del lóbulo anterior/intermedio de una impresión de pituitaria de rata, se observaron más de 50 iones correspondientes a los péptidos presentes en este tejido, así como precursores, isoformas y fragmentos metabólicos (24).

b) Identificación de proteínas en mezclas complejas mediante LC-MS

Hoy en día, la cromatografía líquida/espectrometría de masas 2D (2D-LC-MS) es la técnica que se usa para la identificación de proteínas a partir de muestras complejas de proteoma en muchos laboratorios. Ambos métodos de cromatografía líquida 2D utilizan dos técnicas de separación ortogonal de cromatografía líquida. Las técnicas más utilizadas son cromatografía de intercambio catiónico fuerte para la primera dimensión y separación en fase reversa para la segunda dimensión. Con el fin de mejorar la sensibilidad de la separación en fase reversa se realiza generalmente en la escala de nanoflujo y se utiliza espectrometría de masas como método de detección final. Las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución complementan las técnicas de 2D-gel. Esto es especialmente cierto para la separación en gel de proteínas hidrofóbicas de membrana, que desempeñan un papel importante en las células vivas y son objetivos importantes para futuras drogas farmacéuticas (85).

c) Análisis de proteínas intactas mediante técnicas de desorción/ionización en condiciones ambientales combinadas con espectrometría de masas

El método de espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por electro spray (ELDI: *electrospray-assisted laser desorption/ionization*), que combina la desorción por láser con la post-ionización por electro spray, se aplicó al análisis rápido de materiales sólidos

en condiciones ambientales. Los analitos fueron desorbidos del sólido metálico y los sustratos aislantes mediante un láser pulsado de nitrógeno. La post-ionización con electro spray produjo espectros de masas de alta calidad característicos de ESI-MS, como por ejemplo: proteínas con múltiples cargas. Así se obtuvieron espectros de masas de proteínas intactas usando desorción con láser sin adición de una matriz (11). Se demostró la aplicabilidad con citocromo c bovino y una droga ilícita que contenía metacualona. Así se mostró la utilidad de ELDI para el análisis de proteínas y compuestos orgánicos sintéticos (11).

También se usó DESI-MS con un espectrómetro de masas Orbitrap para la caracterización y la medición de la masa exacta de péptidos (34). Se realizó el análisis directo de alta resolución de péptidos y proteínas mediante el acoplamiento de una fuente de iones de DESI a MS con resonancia de iones de ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR-MS: *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) (38). El diseño de la fuente DESI-FT-ICR-MS se describió en detalle junto con los datos preliminares obtenidos con péptidos y proteínas de 1 a 5,7 kDa (38).

Una ionización suave por electro spray de las proteínas se logró mediante el flujo de gas de alta velocidad de un amplificador de aire para mejorar la desolvatación en ESI convencional y generar iones intactos de la proteína plegada en fase gaseosa. Se hicieron comparaciones entre los espectros ESI de una serie de proteínas modelo, como: ubiquitina, citocromo c, lisozima y mioglobina, en un rango de valores de pH bajo condiciones optimizadas, con y sin un amplificador de aire para lograr un flujo de gas de alta velocidad. Se confirmó el aumento de las señales de los iones informados anteriormente. Además, los picos registrados utilizando el amplificador de aire resultaron ser más angostos, correspondiendo a una desolvatación más completa. También se observaron cambios significativos en la distribución de carga-estado, con un desplazamiento al estado de menor carga en el flujo de alta velocidad. Se exploró la relación entre la distribución observada de carga-estado y la conformación de la proteína mediante la comparación de la carga de los desplazamientos carga-estado y la distribución de los estados de carga para las proteínas que son o no estables en sus conformaciones nativas en soluciones de bajo pH (86).

Los datos sugirieron que la conformación de la proteína nativa o tipo nativa se mantenía, usando el amplificador de aire en todos los casos examinados. Esto se explicó mediante un mecanismo en el que el amplificador de aire crea rápidamente pequeñas gotas a partir de las gotas ESI grandes originales y estas microgotas entonces desolvatan sin un descenso significativo en el pH, causando la retención de la conformación de la proteína plegada. Además, la holoforma de la mioglobina ionizada resultó visible a pH 3,5, que es un valor mucho menor que el mínimo necesario para ver esta forma en ESI

convencional. Estos resultados proporcionan evidencias de la importancia de las condiciones utilizadas en el proceso de desolvatación para la preservación de la conformación de la proteína y sugieren que las condiciones logradas al utilizar flujos de gas de alta velocidad para ayudar a la evaporación de las gotitas y a la desolvatación de los iones, son mucho más suaves que las de los experimentos ESI convencionales (86).

Recientemente, varios fosfo- y sulfopéptidos fueron sometidos a una disociación térmica a presión atmosférica (APTD: *atmospheric pressure thermal dissociation*), que se efectuó mediante el pasaje de los iones de péptidos generados por la ionización por spray electrosónico (ESSI: *electrosonic spray ionization*) a través de un tubo caliente metálico en espiral (87) (Fig. 29). Se observó la secuencia informativa de los fragmentos de iones, con mayor intensidad relativa en APTD en comparación con la disociación inducida por colisión (CID: *collision-induced dissociation*), realizada dentro de la trampa de iones. Se observó un cierto grado de preservación de las unidades de ésteres de fosfato y de sulfato en algunos iones fragmentos en APTD. Los fragmentos neutros generados fuera del espectrómetro de masas fueron analizados adicionalmente vía descarga eléctrica en línea, para proveer información rica y complementaria de la secuencia a la proporcionada por los iones fragmento obtenidos directamente a partir de APTD, aunque se observaron pérdidas completas de los grupos de modificación. La información mejorada de la secuencia primaria de los fosfo- y sulfopéptidos se obtuvo mediante el análisis de los fragmentos iónicos y neutros a partir de APTD en comparación con los iones fragmento provenientes de CID solo. La localización de los sitios de modificación de los fosfo- y sulfopéptidos se logró mediante la combinación de la información estructural adquiridos a partir de APTD y de CID (87).

Cuando se expuso un emisor nanoelectrospray (nanoESI; ionización "suave") primero a un plasma de he-

lio (Fig. 30), y se produjo la ionización, causó la fragmentación significativa y útil del péptido. La aparición de fragmentos iónicos abundantes del péptido en el espectro de masas se atribuyó a la liberación de los electrolitos en la solución. Los grupos fosfato lábiles en el péptido se mantuvieron durante la fragmentación (88).

d) Análisis de digestos de proteínas mediante HPTLC/DESI-MS de imágenes

DESI-MS resultó ser un método muy adecuado para detectar e identificar los péptidos de separaciones en dos dimensiones de digestos trópticos de citocromo c y mioglobina realizadas en hojas de celulosa de HPTLC (89).

Los espectros de masas *tándem* se obtuvieron a partir de los barridos de cada calle de las placas de TLC. Los péptidos y las proteínas fueron identificados usando *software* de búsqueda en una base de datos. Se mapeó la distribución bidimensional de los péptidos identificados para cada digesto de proteínas por separado.

Las coberturas de las secuencias de citocromo c y mioglobina fueron de 81 y 74% respectivamente. Estos resultados se compararon con los determinados mediante HPLC/ESI-MS/MS (89 y 84% respectivamente). El uso de HPTLC/DESI, que es más sensible, mejoró la detección de los péptidos con valores bajos de R_f y mejoró la cobertura de la secuencia. Sin embargo, en estos espectros aparecieron múltiples cargas y más sodiación en relación con los espectros de HPLC/ESI-MS (89). Se intenta superar estos problemas, ya que pueden afectar a la identificación de péptidos por MS/MS.

12) ANÁLISIS CUANTITATIVO MEDIANTE DESI-MS

En este trabajo se han visto varias aplicaciones de DESI-MS, así como modificaciones técnicas que favorecen y amplían los sustratos de investigación.

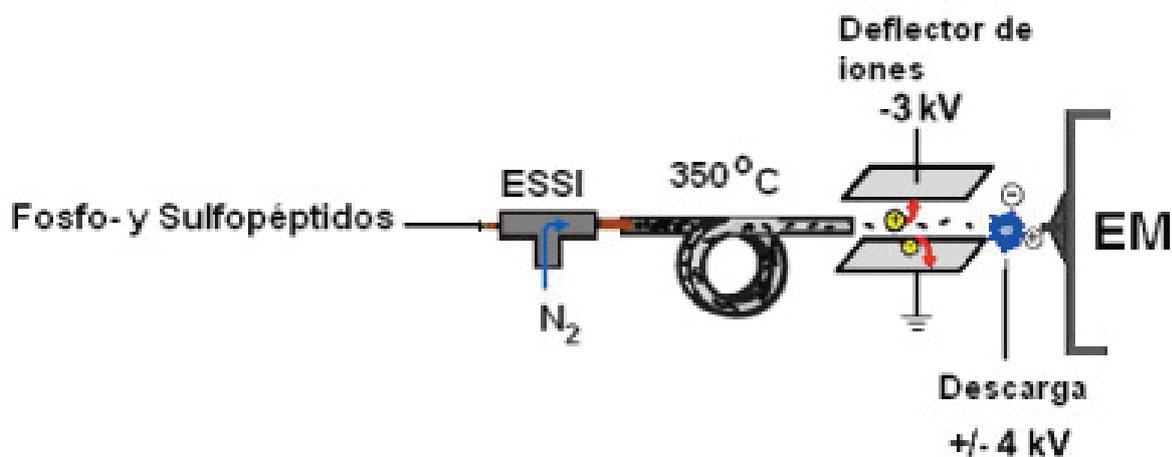


Figura 29. Ionización por spray electrosónico (ESSI) de fosfo- y sulfopéptidos y posterior disociación térmica a presión atmosférica mediante el pasaje de los iones generados por ESSI a través de un tubo caliente metálico en espiral.

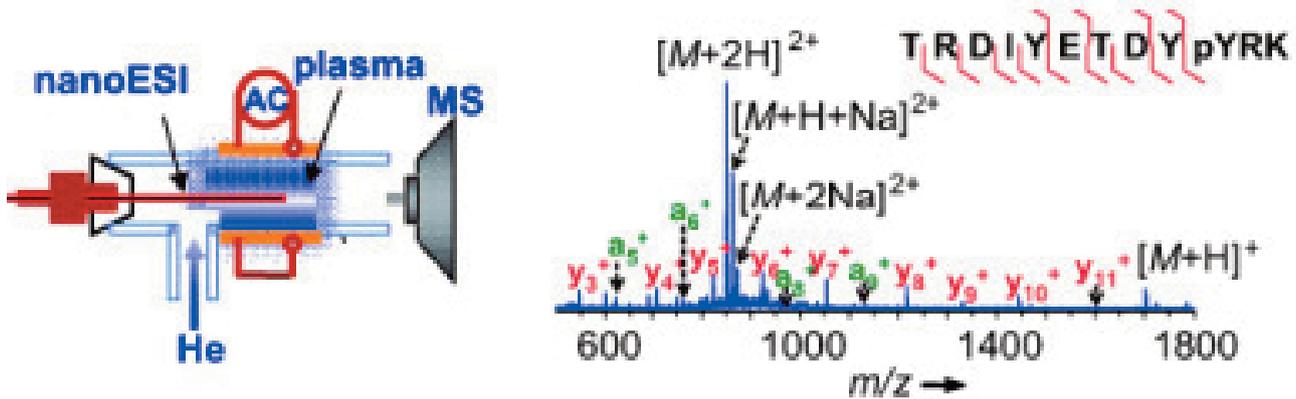


Figura 30. Ionización por nanoelectrospray (nanoESI) con plasma de helio y la fragmentación observada del péptido.

DESI-MS es una técnica emergente para el análisis ambiental, sin embargo, su aplicación a la cuantificación de rutina no se ha explorado suficientemente hasta ahora. Es por ello que, recientemente se efectuó el estudio del análisis cuantitativo de moléculas pequeñas mediante DESI-MS en una superficie de politetrafluoretileno (PTFE) poroso, que presenta menor contaminación cruzada entre las muestras y mejor sensibilidad y estabilidad de la señal en comparación con otras superficies (90).

Los experimentos cuantitativos con 1 μL de soluciones del β -bloqueante propranolol, con propranolol marcado isotópicamente como estándar interno, mostraron una buena correlación lineal ($r^2 > 0,996$) en el intervalo de 0,01-100 μM . La precisión inter-días, basada en la desviación estándar relativa, mediante repeticiones analizadas en tres días diferentes fue de 13% para 0,01 μM y mejor que 7% para los restantes puntos de calibración. La exactitud inter-días, expresada como error relativo, fue mejor que $\pm 7\%$ para todos los puntos de calibración a lo largo de la curva. Estas mediciones día a día sugirieron que DESI-MS puede ser empleado con éxito para el análisis cuantitativo de rutina. También se presentó el uso del análogo atenolol como estándar interno y otras consideraciones que mejorarían la cuantificación de DESI-MS (90).

Se caracterizó una fuente DESI de alto rendimiento recientemente desarrollada en función de su eficiencia en el análisis cuantitativo. Para ello, se analizó una placa con 96 pocillos con productos farmacéuticos en diversas matrices, en una sola corrida de DESI-MS con un tiempo de análisis total de 3 minutos. Estas muestras en solución se examinaron a partir de una tinta de PTFE hidrofóbica impresa en el vidrio. Se caracterizaron exactitud, precisión y límite de detección (LOD) cuantitativos. Se examinaron muestras químicas sin fondo químico de propranolol con propranolol- d_7 como estándar interno y de carbamazepina con carbamazepina- d_{10} como estándar interno. Así se tuvieron dos lotes de muestras de propranolol/propranolol- d_7 en distintas concentraciones en un

medio biológico de orina al 10% o de extracto de lípidos totales de cerebro porcino, con una concentración de lípidos totales de 250 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Las muestras sin fondo químico, examinadas en un tiempo de análisis total de 1,5 segundos/muestra, mostraron buena exactitud y precisión cuantitativa, con un error relativo y desviación estándar relativa por lo general menor de 3% y 5% respectivamente. Las muestras en orina y en el extracto de lípidos requirieron un mayor tiempo de análisis (2,5 segundos/muestra) y dieron valores de desviación estándar relativa de alrededor de 10% y de 4% respectivamente y valores de error relativo menores a 3% para ambos lotes (91).

El límite de detección de propranolol y carbamazepina, cuando se analizaron sin fondo químico, fue de 10 y 30 fmoles respectivamente. El límite de detección de propranolol aumentó a 400 fmoles cuando se lo analizó en orina al 10% y a 200 fmoles en el extracto de lípidos de cerebro (91).

Conclusiones

La técnica DESI combinada con la espectrometría de masas de imágenes tiene la ventaja de ser realizada a presión atmosférica, es decir, fuera del vacío del espectrómetro permitiendo así el análisis *in situ*. Además brinda la caracterización de los compuestos químicos presentes en las superficies en estudio. Es por ello que se habla de *imagen química por DESI-MS*.

Como la desorción/ionización se realiza en condiciones suaves se pueden analizar cuali- y cuantitativamente compuestos de bajo peso molecular, como lípidos, alcaloides, explosivos, esteroides, hidratos de carbono y variados terpenoides, y los de alto peso molecular como péptidos y proteínas.

Se destacan las aplicaciones en el campo forense, médico y de seguridad, el análisis tisular y los aportes a la lipidómica, proteómica y metabolómica. DESI, sin embargo, también crea un debate ético, ya que permite, por

ejemplo: llevar a cabo análisis toxicológicos sin que los afectados se den cuenta.

Las investigaciones en curso abordan cuestiones con relación a la sensibilidad, rendimientos de ionización de compuestos específicos, supresión iónica específica tisular y los efectos de la composición del solvente sobre los rendimientos de la ionización.

Si bien en los últimos años se han realizado aportes significativos en medicina preventiva y etiopatogenia, queda aún un largo camino en metabolómica para cumplir con los objetivos médico-clínicos establecidos inicialmente para DESI-MS.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires (Argentina) por apoyo económico; al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCYT, Argentina) por el acceso a ScienceDirect; a Prosolia Inc. (EE.UU.) por la accesibilidad a sus desarrollos en distintas áreas de aplicación.

Los Dres. Pomilio y Vitale son Miembros de la Carrera de Investigador Científico de CONICET.

El Ing. Bernatené es Miembro de CPA CONICET.

CORRESPONDENCIA

PROF. DRA. ALICIA B. POMILIO

PRALIB (UBA y CONICET)

Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB)

Universidad de Buenos Aires (UBA)

Junín 956

C1113AAD - CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES,

Argentina

E-mail: pomilio@ffybu.uba.ar

Referencias bibliográficas

- Somogyi A. Mass spectrometry instrumentation and techniques. En: *Medical Applications of Mass Spectrometry*. 2008; Chapter 6, pp. 93-140.
- Lemma-Gray P, Valušová E, Carroll CA, Weintraub ST, Musatov A, Robinson NC. Subunit analysis of bovine heart complex I by reversed-phase high-performance liquid chromatography, electrospray ionization-tandem mass spectrometry, and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2008; 382 (2): 116-21.
- Végyvári A, Wetterhall M, Bergquist J. Technologies interfacing capillary electrophoresis to mass spectrometry. En: Edited by Marko-Varga G. *Proteomics and Peptidomics*, 46: New technology platforms elucidating Biology. Lund University, Lund, Sweden, Included in series: *Comprehensive Analytical Chemistry*; Chapter 10, Vol. 46, 2005, pp. 449-85, Elsevier.
- Shimazaki Y, Kishi H, Mori M, Yasuda C, Manabe T. Analysis of hydrolytic activity of phospholipase C α from porcine retina on retinyl ester and phosphatidylcholine using non-denaturing two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2006; 843 (1): 42-6.
- Watson JT, Sparkman OD. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, applications, and strategies of data interpretation*. Fourth edition, Chichester West Sussex: John Wiley & Sons; 2007.
- Siuzdak, G. Peptide and Protein Analysis. En: *Mass Spectrometry for Biotechnology*, San Diego: Academic Press, 1996, Chapter 4, pp. 77-101.
- Harvey DJ. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *Int J Mass Spectrom* 2003; 226 (1): 1-35.
- Hillenkamp F, Peter-Katalinić J. *MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2007. 345 pp.
- Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 2004; 306 (5695): 471-3.
- Cooks RG, Ouyang Z, Takáts Z, Wiseman JM. Ambient mass spectrometry. *Science* 2006; 311 (5767): 1566-70.
- Shiea J, Huang M-Z, HSu H-J, Lee C-Y, Yuan C-H, Beech I, *et al.* Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for direct ambient analysis of solids. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19 (24): 3701-4.
- Cody RB, Laramée JA, Durst HD. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem* 2005; 77 (8): 2297-302.
- McEwen CN, McKay RG, Larsen BS. Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. *Anal Chem* 2005; 77 (23): 7826-31.
- Takáts Z, Wiseman JM, Cooks RG. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J Mass Spectrom* 2005; 40 (10): 1261-75.
- Ouyang Z, Noll RJ, Cooks RG. Handheld miniature ion trap mass spectrometers. *Anal Chem* 2009; 81 (7): 2421-5.
- Kaupilla TJ, Talaty N, Salo PK, Kotiaho T, Kostianen R, Cooks RG. New Surfaces for Desorption Electrospray-Mass Spectrometry: Porous Silicon and Ultra-Thin Layer Chromatography Plates. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20 (14): 2143-50.
- Gologan B, Green JR, Alvarez J, Laskin J, Cooks RG. Ion/surface reactions and ion soft-landing. *Phys Chem Chem Phys* 2005; 7: 1490-500.
- Costa AB, Cooks RG. Simulated splashes: Elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Phys Lett* 2008; 464 (1-3): 1-8.
- Gao L, Li G, Cyriac J, Nie Z, Cooks RG. Imaging of surface charge and the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J Phys Chem C* 2009.
- Chen H, Cotte-Rodríguez I, Cooks RG. *cis*-Diol functional group recognition by reactive desorption electrospray ionization (DESI). *Chem Commun* 2006; 597-9.

22. Chen H, Ouyang Z, Cooks RG. Thermal production and reactions of organic ions at atmospheric pressure. *Angewandte Chemie International Edition* 2006; 45 (22): 3656-60.
23. Benassi M, Wu C, Nefliu M, Ifa DR, Volny M, Cooks RG. Redox transformations in desorption electrospray ionization. *International Journal of Mass Spectrometry* 2009; 280 (1-3): 235-40.
24. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analyst* 1997; 69 (23): 4751-60.
25. Pacholski ML, Winograd N. Imaging with Mass Spectrometry. *Chemical Reviews* 1999; 99 (10): 2977-3006.
26. Wiseman JM, Ifa DR, Song Q, Cooks RG. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* 2006; 45 (43): 7188-92.
27. Ifa DR, Wiseman JM, Song Q, Cooks RG. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *International Journal of Mass Spectrometry* 2007; 259 (1-3): 8-15.
28. Wiseman JM, Puolitaival SM, Takáts Z, Cooks RG, Caprioli RM. Mass spectrometric profiling of intact biological tissues by using desorption electrospray ionization. *Angewandte Chemie-International Edition* 2005; 44 (43): 7094-7.
29. Leuthold LA, Mandscheff J-F, Fathi M, Giroud C, Augsburg M, Varesio E, *et al.* Desorption electrospray ionization mass spectrometry: direct toxicological screening and analysis of illicit ecstasy tablets. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2006; 20 (2): 103-10.
30. Williams JP, Scrivens JH. Rapid accurate mass desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry of pharmaceutical samples. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2005; 19 (24): 3643-50.
31. Weston DJ, Bateman R, Wilson ID, Wood TR, Creaser CS. Direct analysis of pharmaceutical drug formulations using ion mobility spectrometry/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with desorption electrospray ionization. *Analyst* 2005; 77 (23): 7572-80.
32. Myung S, Wiseman JM, Valentine SJ, Takáts Z, Cooks RG, Clemmer DE. Coupling desorption electrospray ionization (DESI) with ion mobility/mass spectrometry for analysis of protein structure: Evidence for desorption of folded and denatured states. *Journal of Physical Chemistry B* 2006; 110 (10): 5045-51.
33. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 2005; 40 (4): 430-43.
34. Hu Q, Talaty N, Noll RJ, Cooks RG. Desorption electrospray ionization using an Orbitrap mass spectrometer: exact mass measurements on drugs and peptides. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2006; 20 (22): 3403-8.
35. Van Berkel GJ, Ford MJ, Deibel MA. Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using desorption electrospray ionization. *Analyst* 2005; 77 (5): 1207-15.
36. Laughlin BC, Mulligan CC, Cooks RG. Atmospheric pressure ionization in a miniature mass spectrometer. *Analyst* 2005; 77 (9): 2928-39.
37. Mulligan CC, Talaty NN, Cooks RG. Desorption Electrospray Ionization with a portable mass spectrometer: *in situ* analysis of ambient surfaces. *Chemical Communications* 2006; 1709-11.
38. Bereman MS, Nyadong L, Fernandez FM, Muddiman DC. Direct high-resolution peptide and protein analysis by desorption electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2006; 20 (22): 3409-11.
39. Ifa DR, Manicke NE, Dill AL, Cooks RG. Latent fingerprint chemical imaging by mass spectrometry. *Science* 2008; 321: 805-805.
40. Wiseman JM, Ifa DR, Venter A, Cooks RG. Ambient molecular imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Nature Protocols* 2008; 3 (3): 517-24.
41. Chen H, Talaty NN, Takáts Z, Cooks RG. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. *Analyst* 2005; 77 (21): 6915-27.
42. Rodriguez-Cruz SE. Rapid analysis of controlled substances using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2006; 20 (1): 53-60.
43. Kauppila TJ, Wiseman JM, Ketola RA, Kotiaho T, Cooks RG, Kostianen R. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and metabolites. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2006; 20 (3): 387-92.
44. Soparawalla S, Salazar GA, Perry RH, Nicholas M, Cooks RG. Pharmaceutical cleaning validation using non-proximate large-area desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2009; 23 (1): 131-7.
45. Chen H, Pan Z, Talaty N, Cooks RG, Raftery D. Combining desorption electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for differential metabolomics without sample separation. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2006; 20 (10): 1577-84.
46. Huang G, Chen H, Zhang X, Cooks RG, Ouyang Z. Rapid screening of anabolic steroids in urine by reactive Desorption Electrospray Ionization. *Analyst* 2007; 79 (21): 8327-32.
47. Chen H, Venter A, Cooks RG. Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation. *Chemical Communications* 2006; 2042-4.
48. Wu C, Ifa DR, Manicke NE, Cooks RG. Rapid, direct analysis of cholesterol by charge labeling in reactive desorption electrospray ionization. *Analyst* 2009; 81 (18): 7618-24.
49. Green FM, Salter TL, Stokes P, Gilmore IS, O'Connor G. Ambient mass spectrometry: advances and applications in forensics. *Surf and Interface Anal* Dec 7 2009. Article online in advance of print.
50. Ifa DR, Jackson AU, Paglia G, Cooks RG. Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry. *Anal Bioanalytical Chemistry* 2009; 394 (8): 1995-2008.
51. Takáts Z, Cotte-Rodriguez I, Talaty N, Chen H, Cooks RG. Direct, trace level detection of explosives on ambient sur-

- faces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Commun* 2005; (15): 1950-2.
52. Popov IA, Chen H, Kharybin ON, Nikolaev EN, Cooks RG. Detection of explosives on solid surfaces by thermal desorption and ambient ion/molecule reactions. *Chem Commun* 2005; 1953-5.
 53. Song Y, Cooks RG. Atmospheric pressure ion/molecule reactions for the selective detection of nitroaromatic explosives using acetonitrile and air as reagents. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20 (20): 3130-8.
 54. Cotte-Rodriguez I, Takáts Z, Talaty N, Chen H, Cooks RG. Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: Sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization. *Anal Chem* 2005; 77 (21): 6755-64.
 55. Cotte-Rodriguez I, Chen H, Cooks RG. Rapid trace detection of triacetone triperoxide (TATP) by complexation reactions during desorption electrospray ionization. *Chem Commun* 2006; 953-5.
 56. Talaty N, Mulligan CC, Justes DR, Jackson AU, Noll RJ, Cooks RG. Fabric analysis by ambient mass spectrometry for explosives and drugs. *Analyst* 2008; 133: 1532-40.
 57. Cotte-Rodriguez I, Cooks RG. Non-Proximate Detection of explosives and chemical warfare agent simulants by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Commun* 2006; 28: 2968-70.
 58. Ifa DR, Gumaelius LM, Eberlin LS, Manicke NE, Cooks RG. Forensic analysis of inks by imaging desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Analyst* 2007; 132: 461-7.
 59. Harper JD, Charipar NA, Mulligan CC, Zhang X, Cooks RG, Ouyang Z. Low-temperature plasma probe for ambient desorption ionization. *Anal Chem* 2008; 80 (23): 9097-104.
 60. Zhao M, Zhang S, Yang C, Xu Y, Wen Y, Sun L, *et al.* Desorption electrospray tandem MS (DESI-MSMS) analysis of methyl centralite and ethyl centralite as gunshot residues on skin and other surfaces. *J Forensic Sci* 2008; 53 (4): 807-11.
 61. Cotte-Rodríguez I, Justes DR, Nanita SC, Noll RJ, Mulligan CC, Sanders NL, *et al.* Analysis of gaseous toxic industrial compounds and chemical warfare agent simulants by atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Analyst* 2006; 131: 579-89.
 62. Mulligan CC, Justes DR, Noll RJ, Sanders NL, Laughlin BC, Cooks RG. Direct monitoring of gaseous toxic compounds in air using a Portable Mass Spectrometer. *Analyst* 2006; **131**: 556-67.
 63. Sokol E, Edwards KE, Qian K, Cooks RG. Rapid hydrocarbon analysis using a miniature rectilinear ion trap mass spectrometer. *Analyst* 2008; 133: 1064-71.
 64. Huang G, Gao L, Duncan J, Harper JD, Sanders NL, Ouyang Z, *et al.* Direct detection of benzene, toluene, and ethylbenzene at trace levels in ambient air by atmospheric pressure chemical ionization using a handheld mass spectrometer. *J Amer Soc Mass Spectrom* 2009.
 65. Wu C, Qian K, Nefliu M, Cooks RG. Ambient analysis of saturated hydrocarbons using discharge-induced oxidation in desorption electrospray ionization. *J Amer Soc Mass Spectrom* 2009.
 66. Nefliu M, Venter A, Cooks RG. Desorption electrospray ionization and electrosonic spray ionization for solid- and solution-phase analysis of industrial polymers. *Chem Commun* 2006; 888-90.
 67. Ifa DR, Manicke NE, Dill AL, Cooks RG. Latent fingerprint chemical imaging by mass spectrometry. *Science* 2008; 321 (5890): 805-805.
 68. García-Reyes JF, Mazzoti F, Harper JD, Charipar NA, Oradu S, Ouyang Z, *et al.* Direct olive oil analysis by low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009; 23 (19): 3057-62.
 69. JF García-Reyes JF, Jackson AU, Molina-Díaz A, Cooks RG. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for trace analysis of agrochemicals in food. *Anal Chem* 2009; 81 (2): 820-9.
 70. Huang G, Ouyang Z, Cooks RG. High-throughput trace melamine analysis in complex mixtures. *Chem Commun* 2009; 556-8.
 71. Pasilis SP, Van Berkel GJ. Atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for direct coupling of planar separations with mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009; article in press.
 72. Van Berkel GJ, Kertesz V. Automated sampling and imaging of analytes separated on thin-layer chromatography plates using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78 (14): 4938-44.
 73. Kertesz V, Ford MJ, Van Berkel GJ. Automation of a surface sampling probe/electrospray mass spectrometry system. *Anal Chem* 2005; 77: 7183-9.
 74. Song Y, Talaty N, Tao AW, Pan Z, Cooks RG. Rapid ambient mass spectrometric profiling of intact, untreated bacteria using desorption electrospray ionization. *Chem Commun* 2007: 61-3.
 75. Jackson AU, Werner SR, Talaty N, Song Y, Campbell K, Morgan JA, *et al.* Targeted metabolomic analysis of *Escherichia coli* by desorption electrospray ionization and extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 2008; 375 (2): 272-81.
 76. Wiseman JM, Ifa DR, Zhu Y, Kissinger CB, Manicke NE, Kissinger PT, *et al.* Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 (47): 18120-5.
 77. Talaty N, Takats Z, Cooks RG. Rapid *in situ* Detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst* 2005; 130: 1624-33.
 78. Dill AL, Ifa DR, Manicke NE, Ouyang Z, Cooks RG. Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization. *J Chromatogr B* 2009; 877 (26): 2883-9.
 79. Dill AL, Ifa DR, Manicke NE, Costa AB, Ramos Vara JA, Knapp DW, Cooks RG. Lipid profiles of canine invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder and adjacent normal tissue by desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2009; 81 (21): 8758-64.

80. Manicke NE, Nefliu M, Wu C, Woods JW, Reiser V, Hendrickson RC, *et al.* Imaging of lipids in atheroma by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2009; 81 (21): 8702-7.
81. Wu C, Ifa DR, Manicke NE, Cooks RG. Molecular imaging of adrenal gland by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 2010; 135 (1): 28-32.
82. Jackson AU, Tata A, Wu C, Perry RH, Haas G, West L, *et al.* Direct analysis of *Stevia* leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 2009; 134: 867-74.
83. Kauppila TJ, Talaty N, Jackson AU, Kotiaho T, Kostianen R, *et al.* Carbohydrate and steroid analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Commun* 2008; 2674-6.
84. Paglia G, D'Apolito O, Corso G. Precursor ion scan profiles of acylcarnitines by atmospheric pressure thermal desorption chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22 (23): 3809-15.
85. Nägele E, Vollmer M, Hörth P, Vad C. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Rev Proteomics* 2004; 1 (1): 37-46.
86. Yang P, Cooks RG, Ouyang Z, Hawkridge AM, Muddiman DC. Gentle protein ionization assisted by high-velocity gas flow. *Anal Chem* 2005; 77 (19): 6174-83.
87. Eberlin LS, Xia Y, Chen H, Cooks RG. atmospheric pressure thermal dissociation of phospho- and sulfopeptides. *J Amer Soc Mass Spectrom* 2008; 19 (12): 1897-905.
88. Xia Y, Ouyang Z, Cooks RG. peptide fragmentation assisted by surfaces treated with a low-temperature plasma in nanoESI. *Angew Chemie Int Ed* 2008; 47 (45): 8646-9.
89. Pasilis SP, Kertesz V, Van Berkel GJ, Schulz M, Schorcht S. HPTLC/DESI-MS imaging of tryptic protein digests separated in two dimensions. *J Mass Spectrom* 2008; 43 (12): 1627-35.
90. Ifa DR, Manicke NE, Rusine AL, Cooks RG. Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22 (4): 503-10.
91. Manicke NE, Kistler T, Ifa DR, Cooks RG, Ouyang Z. High-throughput quantitative analysis by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Amer Soc Mass Spectrom* 2009; 20 (2): 321-5.

Aceptado para su publicación el 15 de junio de 2010