

ANEXO

PROGRAMA

FUNDAMENTOS Y OBJETIVOS

El curso analiza en profundidad las técnicas de espectrometría de masa

útiles para el estudio de moléculas termolábiles, especialmente de alto peso molecular, incluyendo biomacromoléculas y polímeros sintéticos. Entre ellas, las de mayor uso en la actualidad son las que utilizan como método de ionización (1) la desorción/ionización molecular asistida por una matriz e inducida por un láser ultravioleta (UV-MALDI) y (2) la nebulización bajo la acción de un campo eléctrico o ionización por electro-spray (ESI) agregándose recientemente (3) métodos híbridos de desorción-ionización como PESI, DART y DESI. En todos los casos se trata de un método suave de ionización-volatilización que permite caracterizar masas molares y estructura de macromoléculas aisladas así como su distribución en mezclas de las mismas presentes en soluciones, suspensiones e in situ en sistemas complejos naturales (biosistemas) o sintéticos (perfiles y mapas moleculares por espectrometría de masa).

PROGRAMA

Parte 1: Métodos de ionización

1-El análisis de iones gaseoso moleculares como herramienta analítica, espectrometría de masa (MS). Análisis de bio-macromoléculas por MS. Determinación de pesos moleculares y de estructura química. Fundamento de los métodos de ionización útiles basados en desorción (FD, PD, FAB, SIMS, LD, MALDI, UV-MALDI), en nebulización (ES, TESI, ESI) y desorción-nebulización (PESI, PPESI, DESI). Campo de aplicación de cada uno, ventajas y limitaciones. La problemática de preparación de las muestras para UV-MALDI-MS y ESI-MS y en los demás casos.

2-UV-MALDI: Absorción de sólidos. Excitación con fuentes láser de 266 y 337 nm. Fenómeno de desorción / ionización. Análisis de los iones gaseosos generados. Espectrometría de masa por desorción láser (LD-MS). Uso de fotosensibilizadores (matrices) en la región UV para inducir desorción del aceptor (analito). Espectrometría de masa con desorción/ionización inducida por láser ultravioleta asistida por una matriz (fotosensibilizador) (UV-MALDI-MS). Propiedades de las matrices. Preparación de las muestras. Generación de ion molecular intacto e inducción de fragmentaciones.

3-ESI. Generación de iones moleculares policargados. Modelo de Dole (RMC) (Taylor; Coulomb; Raleigh). Desarrollos de Fenn. Determinación de la relación m/z . Influencia del medio en el proceso ESI (polaridad, pH, sales). Nano-ESI. Z-ESI.

4-Fundamento de los analizadores de iones gaseosos de uso actual (TOF, E-B Q, IT, FTICR, OrbiTrap), campo de aplicación actual, ventajas y limitaciones.

5-La fragmentación como herramienta analítica en espectrometría de masa. Formas de evitarla y formas de inducirla. Accesorios o celdas CAD, CID, ECD (EI), IRMPD, FI (CD). Espectrometría de masa tandem (MSn). Modo de operación PSD en el analizador de “tiempo de vuelo” (TOF-PSD y TOF/TOF). La fragmentación en procesos UV-MALDI y en ESI.

6-Equipamiento comercial actual por combinación de UV-MALDI y de ESI con diferentes analizadores de iones (i) solos (Q, TOF, IT, FTICR, OrbiTrap) o (ii) en tandem (QqQ, Q/TOF, Q/IT, IT/TOF, TOF/TOF, FTICR, Q/FTICR). Criterio para seleccionar la combinación más ventajosa. Posibilidades y limitaciones.

7-Protocolos actuales de trabajo en proteómica y glicómica y otras “ómicas”. Combinación de datos experimentales con banco de datos y programas de simulación (“a novo”). Protocolos de trabajo “bottom-up” y protocolos “top-down”

8- Macromoléculas presentes en superficies naturales o sintéticas. Análisis cualitativo y cuantitativo de su distribución. Perfiles-mapas moleculares de superficies (Imagen por espectrometría de masa; IMS). Posibilidades actuales de IMS: SIMS, LD, MALDI, PESI

y DESI. Aplicaciones. Macromoléculas presentes en célula intacta.

9-Movilidad iónica diferencial en fase gaseosa (Ion Mobility, IM) como accesorio en el espectrómetro de masa (Ion Mobility Mass Spectrometry, IMMS). Fundamento. Diferenciación de especies con idéntico peso molecular y diferente estructura molecular (isómeros). Aplicaciones: moléculas quirales, hidratos de carbono, complejos proteicos, entre otros.

10-Conclusiones. ¿Desorción (UV-MALDI) vs nebulización (ESI) en el campo de las macromoléculas, competencia o complementariedad?

11-La EM atómica como método analítico de alta sensibilidad para detección de heteroátomos complejados en muestras naturales biológicas y sintéticas. Cámaras de ionización ICP, fundamento y características. Equipos comerciales (ICP-Q; ICP-IT; ICP-TOF; ICP-Orbi-Trap). Aplicaciones actuales (alimentos; química forense; análisis clínicos; minería, citometry MS, etc).

Parte 2: Aplicaciones

Determinación de pesos moleculares y de estructuras de bio-macromoléculas (proteínas, nucleótidos, nucleósidos, vitaminas, etc.) y macromoléculas en general. Análisis de modificaciones postraduccionales en proteínas. Análisis de complejos moleculares nativos. Folding y unfolding de proteínas. Análisis de la composición de biopolímeros (oligosacáridos, polisacáridos, lípidos y compuestos glicoconjugados;), determinación de la estructura, del peso molecular y de la relación cuantitativa de los oligómeros. Comparación de UV-MALDI-MS y ESI-MS con otras técnicas de uso en la analítica de macromoléculas (espectrometrías de masa: FD-MS, FAB-MS, SELDI (SALDI), DIOS y SIMS; técnicas cromatográficas: SEC; técnicas electroforéticas). Aplicaciones concretas en el campo de la biología molecular, en el análisis de célula (tejidos) intactos, en la caracterización de biosistemas complejos por sus perfiles metabólicos, en el campo de control de calidad de alimentos, de monitoreo en librerías combinatorias, en organometálicos y en polímeros sintéticos.

BIBLIOGRAFÍA

- J.B. Fenn, Electrospray Wings for Molecular Elephants, Nobel Lecture, <http://www.nobel.se>
- K. Tanaka, The origin of macromolecule ionization by laser irradiation, Nobel Lecture, <http://www.nobel.se>
- F. W. McLafferty and F. Turecek, Interpretation of Mass Spectra, University Science Books, Mill Valley, California (1993).
- J.H. Gross, Mass Spectrometry, Springer (2011), (2017).
- E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry, Principle and Applications

3th edition, Wiley, UK (2007).

- Hillenkamp F, Jasna Peter-Katalinic J (eds) (2007) MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. Wiley-VCH, Weinheim.
- R.B. Cole Electrospray and MALDI Mass Spectrometry. Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications. 2nd edition. Wiley, UK (2010).
- K. Hiraoka (ed.) Fundamentals of Mass Spectrometry, Springer, Science+Business Media New York 2013.
- R. P. Newton and T. J. Walton, Applications of Modern Mass Spectrometry in Plant Science Research, Clarendon Press, Oxford, London (1996)
- D. C. Liebler, Introduction to Proteomics; Tools for the New Biology. Humana Press. Totowa, NJ (2002).
- M. Mann and O. N. Jensen, Proteomic analysis of post-translational modifications (www.nature.com/naturebiotechnology) Vol 21 March 2003