

IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS SIMPLES EN JUGO DE TALLO DE MAÍZ UTILIZANDO DIESI Y UN ANALIZADOR DE TRAMPA LINEAL EN MS

M. García Flores[§]; R. Winkler; G.M.L. Ruiz Aguilar; A. Tiessen

Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Molecular. Departamento de Ingeniería Genética. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato. México. [§]Autor responsable: masterfoodscience@live.com recibido 29 abril 2015, aceptado 30 de noviembre de 2015.

Artículo Científico

RESUMEN

La espectrometría de masas representa una de las metodologías referentes en estudios de detección e identificación de metabolitos contenidos en muestras de tallo de maíz, donde los carbohidratos representan la mayor proporción. En el jugo del tallo de maíz se encuentra el contenido celular de dicho tejido de la planta. El analizador de masas LTQ-FLEET, conocido como trampa lineal, equipado con la ionización directa por *electrospray*, nos permitió hacer la determinación de las huellas metabólicas de las muestras de maíz sometidas a análisis y con dichos patrones de fragmentación logramos determinar los iones típicos para cada muestra de maíz bajo los tratamientos de control y bajo nitrógeno. Lo anterior nos permitió hacer una previa selección de variedades de maíz cultivadas bajo condiciones diferentes de aporte nitrogenado. Características analíticas como son la elevada reproducibilidad, sensibilidad, resolución y

precisión del equipo que se utilizó en nuestro trabajo son algunas de las ventajas de la técnica MSⁿ en modo de ionización negativa lo que nos permitió también cuantificar iones e identificar fragmentos que resultan de la reacción química en fase gaseosa de cada uno de los carbohidratos analizados. Se utilizaron cuatro diferentes sustancias de naturaleza básica con el fin de evaluar su capacidad de ionización: cloruro de litio 0.005 M, con el que se detectaron las ionizaciones más abundantes en por ciento de la señal base, hidróxido de amonio 0.010 M, fluoruro de sodio y fluoruro de amonio 0.001 M. Nuestra base de datos actualizada incluye los patrones de fragmentación de sacarosa, glucosa y fructosa con y sin la utilización de agentes ionizantes.

Palabras clave: Trampa lineal, MSⁿ, carbohidratos, ionizantes.

ABSTRACT

Mass spectrometry is one of the methodologies relating to studies of detection and identification of metabolites contained in corn stalk samples, where carbohydrates represent the largest proportion. In the cornstalk juice is the cellular content of that plant tissue. The mass analyzer LTQ-FLEET, known as linear trap, equipped with direct *electrospray* ionization, let us to determine the metabolic fingerprints of the corn samples subjected to analysis and with such fragmentation patterns we determined the typical ions for each corn sample under control and low nitrogen treatments. This allowed us to make a preliminary selection of maize varieties grown under different conditions of nitrogen supply. Analytical characteristics such as high reproducibility, sensitivity,

resolution and accuracy of the equipment used in our analytical work are some of the advantages of the technique MSⁿ in negative ionization mode which also allowed us to quantify and identify the ion fragments resulting from the chemical reaction in gas phase of each of the carbohydrates tested. Four different basic in nature substances were used in order to assess their ionization ability: lithium chloride 0.005M, with the most abundant ionizations detected, ammonium hydroxide 0.010 M, sodium fluoride and ammonium fluoride 0.001 M. Our updated database fragmentation patterns include sucrose, glucose and fructose with and without the use of ionizing agents.

Keywords: linear trap, MSⁿ, carbohydrates, ionizing.

INTRODUCCIÓN

Los azúcares son los productos primarios de la fotosíntesis y realizan múltiples papeles en las plantas al actuar como moléculas energéticas y transportadoras de carbón, hormonas que actúan como factores de señalización, función osmótica y fuente de materiales a partir de los cuales las plantas sintetizan proteínas, polisacáridos, aceites y material celulósico. Los azúcares libres de mayor abundancia en plantas son los disacáridos, sacarosa y maltosa, y los monosacáridos, glucosa y fructosa (Haldford *et al.*, 2011). La glucosa y la maltosa tienen un grupo aldehído libre cuando se representa en forma de cadena, mientras que la fructosa tiene un grupo ceto libre. La presencia de

estos grupos carbonilo significaría que la glucosa y fructosa pueden actuar como agentes reductores, por ejemplo, en las reacciones de Maillard, Benedict y Fehlings y, por lo tanto, se les conoce como azúcares reductores (Haldford *et al.*, 2011)(Figura 1). Glucosa y fructosa son metabolitos clave en investigación científica de cultivos, debido a su síntesis en plantas, conversión y reconversión en polisacáridos, moléculas de señalización, participación en la reacción de Maillard con efectos en sabor, color y formación de contaminantes no deseados, como la acrilamida, y factores que afectan su acumulación.

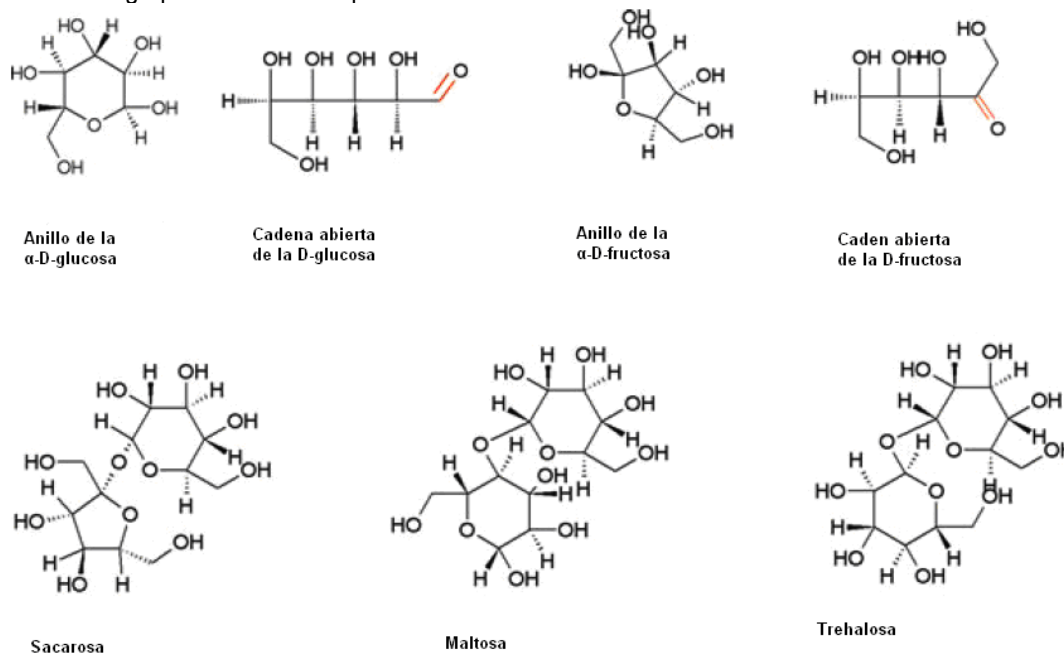


Figura 1. Estructuras de glucosa y fructosa en forma de anillo y cadena abierta, y de disacáridos (sacarosa, maltosa y trehalosa). Los grupos carbonilo de glucosa y fructosa se muestran en color rojo (Fuente: Haldford *et al.*, 2011).

La sacarosa, formada por glucosa y fructosa, es el disacárido más abundante en granos y tubérculos, así como en otros tejidos de la planta; también existen ciertos organismos que no sintetizan o acumulan sacarosa. La sacarosa es la forma de transporte de azúcar en la planta, debido a que la solución de sacarosa tiene viscosidad relativamente baja, que facilita las tasas altas de translocación. La glucosa es el monosacárido más abundante en el tejido aéreo de

la planta de maíz excepto el grano, y es poco frecuente en tubérculos (Haldford *et al.*, 2011). La espectrometría de masas es una herramienta que se emplea para determinar la naturaleza físico-química de biomoléculas con una amplitud de aplicaciones, inclusive carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las ventajas por las que la espectrometría de masas es utilizada de esta manera, son su alta sensibilidad y precisión con datos que facilitan el conocimiento de la

estructura molecular de metabolitos contenidos en muestras biológicas. La dificultad para lograr una buena ionización, se ha superado por la aplicación combinada de inyección directa con ionización de electro ionización (DIESI-MS) de muestras convertidas de fase líquida en iones gaseosos, que supera en gran medida las técnicas utilizadas con anterioridad (Vandell y Limbach, 2010). La ionización de moléculas por electrospray produce iones protonados con un nivel de fragmentación reducido y es considerada como una técnica de ionización suave. La obtención de espectrogramas que presentan iones múltiples, debido a la adición masiva de iones hidrógeno o iones metálicos (potasio o sodio) a la molécula, es una de las grandes ventajas de la ionización por *electrospray*. La ventaja anterior facilita el uso de analizadores con rango limitado de una relación masa/carga (m/z). Por otra parte, la presencia de cargas múltiples en los espectrogramas puede dificultar su interpretación, sobre todo cuando se analizan mezclas de varios sustratos biológicos (Vandell y Limbach, 2010). Actualmente, la medición de la masa de una molécula es relativamente rutinaria y los resultados de alta precisión; la masa molecular obtenida experimentalmente puede ser revisada en bases de datos disponibles (Kegg; Swiss-Prot) y la molécula identificada. El uso común de la espectrometría de masas consiste en determinar la estructura de moléculas mediante análisis de pequeños fragmentos de la molécula original, para lo cual se cuenta con dos enfoques para generar la secuencia que permita definir los componentes necesarios. El enfoque indirecto, "*bottom up*", consiste en generar la información por reacciones químicas o enzimáticas. El tratamiento químico, o digestión enzimática de la molécula intacta, resulta en un número de fragmentos pequeños con posibilidad de ser analizados con la espectrometría de masas. El enfoque directo, "*top down*", implica fragmentación del analito en la fase gaseosa. El proceso de fragmentación puede ser inducido por desorción o ionización o producido por colisión de la molécula parental con un flujo de gas inerte o por choque en superficies (Vandell y Limbach, 1999). Al proceso de disociación molecular mediante choque con moléculas neutras o superficies, se le conoce como espectrometría de masas en *tandem* (MS/MS). En el sistema de trampa de iones se aplican colisiones de baja energía (Niessen, 2010). MS/MS tiene aplicación analítica especial en combinación con técnicas de

ionización suaves, que permiten obtener información de la molécula intacta, sin observar fragmentación. El método MS/MS en una trampa de iones es diferente de los analizadores de sector y triple cuadrupolo; mientras que en el último las diferentes etapas del proceso, la selección del ion precursor, disociación inducida por colisión (CID) y análisis de iones producto, se desarrollan en diferentes regiones físicas del instrumento. En una trampa de iones, estas etapas se realizan de manera consecutiva dentro de la misma trampa de iones, conocido como "*tandem en tiempo*" en lugar de "*tandem en espacio*". En comparación con el triple cuadrupolo y de manera especial con el instrumento conocido como sector, la trampa de iones es más eficiente en la producción de iones producidos a partir del ion parental. Sin embargo, el proceso CID vía excitación por resonancia, de mayor eficiencia en términos de conversión numérica, generalmente resulta en un ion principal en el espectro de masas. Otros fragmentos de iones son observados en el sistema de trampa después de varias etapas de MS/MS. El desarrollo de mejores interfaces y de comunicación de dispositivos entre ionización por *electrospray* (ESI) y MS, es uno de los principales objetivos de la tecnología; se hacen esfuerzos enfocados a elevar tanto la eficiencia de ionización en ESI como la eficiencia en la transmisión de iones en la interfaz ESI-MS, donde la mayoría de iones se pierden (>90%) (Tang et al., 2010). Actualmente, los experimentos en metabolómica están soportados por diversas técnicas de espectrometría de masas, que permiten analizar diferencias entre muestras biológicas de organismos. En nuestro caso de estudio, la mejora a las plantas cultivadas en campo bajo diferentes condiciones de fertilización nitrogenada se logran por selección de variedades que mejor se adaptan a condiciones de cultivo. Mediante el análisis de los espectrogramas es posible identificar los iones típicos de una muestra para utilizarlos como marcadores bioquímicos. En el proceso de búsqueda de dichos iones característicos, es preciso realizar pruebas con ionizantes y modos de lectura disponibles en el espectrómetro. El propósito del trabajo, es encontrar las condiciones óptimas de operación del equipo que permitan detectar e identificar los iones de metabolitos presentes en un estándar primero y, después, en una muestra biológica, con la finalidad de obtener la huella metabólica de los extractos de diversos tejidos u órganos de una planta, de manera confiable y económica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los carbohidratos que se utilizaron en el estudio fueron adquiridos a SIGMA con las siguientes identificaciones numéricas únicas (CAS): glucosa D(+), 50-99-7 - C₆H₁₂O₆ - 180.16 g/mol, 50-99-7; fructosa D(-), 57-48-7 - C₆H₁₂O₆ - 180.16 g/mol. Los solventes que se usaron fueron agua desionizada y metanol. El agua fue desionizada y el metanol grado HPLC. Al considerar que los niveles de concentración de azúcares reductores de jugo de tallo de maíz se encuentran en un nivel de 0.30 a 2.36 mg/mL (Juárez, 2012), se prepararon soluciones de 1 mg/mL de cada carbohidrato disueltos en agua y metanol. Las sustancias ionizantes fueron: a) cloruro de litio 5 mM (CAS, 7447-41-8), 42.39 g/mol, LiCl; b) hidróxido de amonio 10mM (CAS, 1336-21-6), 35.05 g/mol, NH₄OH; c) fluoruro de sodio 1mM (CAS, 7681-49-4), 41.9881 g/mol, NaF; d) fluoruro de amonio 1 mM (CAS, 12-12-501-8), 37.04 g/mol, NH₄F y; e) ácido fórmico 10mM (CAS, 64-18-6), 46.03 g/mol, CH₂O₂. Los niveles de concentración de los ionizantes utilizados se basaron en datos experimentales del Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental del CINVESTAV-Irapuato (López, 2013). En la lectura de estándares (en modo positivo y negativo), se utilizó una relación de dilución 50/50 v/v (agua/metanol) para el solvente y, antes de la inyección en la unidad de electrospray, se mezclaron las soluciones con cada sustancia ionizante, en una relación de 1% del ionizante, v/v, filtrándose con fluoruro de polivinilideno (pvdf) de 0.45 µM. En la lectura de muestras de jugo de tallo de maíz se utilizaron 10 µL de muestra y 990 µL de H₂O (factor de dilución: 1:100). En la Figura 2. *Izquierda*, se presenta el diagrama de flujo del experimento y etapas para la transformación de archivos y lectura con el programa TOPPAS view. Los archivos en formato de texto son adecuados para análisis posteriores con el software en R. El espectrómetro de masas que se utilizó se muestra en la Figura 2. *Derecha*. Las condiciones de operación del espectrómetro de masas (con trampa de iones lineal tipo cuadrupolo) LTQ-FLEET, son las que recomienda el fabricante Thermo Scientific de México para lectura de muestras de metabolitos con la opción MS-MS. Mediante el empleo del programa TOPPAS-VIEW se generaron los espectrogramas de cada solvente, agua desionizada y metanol, así como los estándares de glucosa y fructosa con cada ionizante: cloruro de litio,

hidróxido de amonio, fluoruro de sodio, fluoruro de amonio y ácido fórmico, en modo positivo y negativo, con el fin de evaluar el grado de ionización de los reagentes y de ambas opciones de lectura. Los espectrogramas de las muestras de jugo de tallo de maíz fueron leídos mediante MS-MS en modo negativo con el cloruro de litio, por ser la mejor sustancia ionizante previo análisis de la huella metabólica del grupo de ionizantes en los dos modos de lectura, negativo y positivo (datos no mostrados); el criterio de selección para utilizar el cloruro de litio consistió en comparar el nivel de intensidad (%) representado en el eje "y" del espectrograma. La obtención y revisión de espectrogramas MS-MS se hizo con el software Excalibur de Thermo Scientific. Los espectrogramas obtenidos en la primera etapa de lectura en MS-MS, fueron registrados en formato mzXML, el cual permite el manejo directo de los datos generados en diferentes plataformas informáticas, con el fin de identificar los iones padres de los fragmentos. El híbrido de maíz utilizado en el experimento es CV-702 de CIMMYT. La muestra de jugo de tallo se obtuvo con un extractor industrial hecho en México. Del tallo de maíz se corta la sección que comprende dos internodos hacia arriba y dos internodos hacia abajo de la posición de la inflorescencia femenina. El volumen de inyección manual es de 100 µL y después de 1 minuto para estabilizar el flujo de iones se hace la lectura. Las lecturas son el resultado de 6 barridos de los iones durante 1 minuto en el intervalo de 15 a 2000 m/z, con 3 repeticiones técnicas.

Respecto a las lecturas de las muestras de jugo de tallos de plantas de maíz recientemente cosechadas, tratadas con dosis alta de 400 kg/ha y baja de fertilizante nitrogenado en forma de urea, lograda ésta última dosis por la supresión de nitrógeno durante los últimos cuatro años.

Los tres carbohidratos, junto con las muestras de jugo de tallo de maíz, se inyectaron en el espectrómetro de masas sin el uso de ionizante y sin uso de trampa lineal, y fueron detectados e identificados por comparación con los fragmentos característicos de dichos carbohidratos, a partir de espectrogramas previamente adquiridos con los estándares de fructosa y glucosa y ionizadas con cloruro de litio (fructosa y glucosa en modo negativo y con MS-MS).

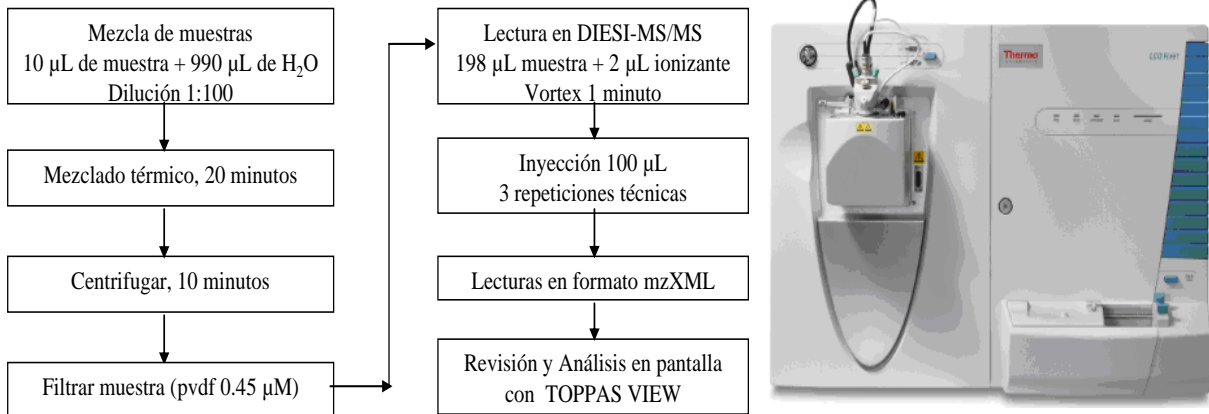


Figura 2. Izquierda. Diagrama de flujo de tratamiento de muestras de jugo de tallo de maíz para su lectura en el espectrómetro de masas LTQ-FLEET, MS-MS.mzXML es un formato que homogeniza el manejo de datos en diferentes plataformas informáticas. pvdf es un filtro de membrana de fluoruro de polivinilideno de 0.45µM. Derecha. Espectrómetro de masas LTQ-FLEET, Thermo Scientific México. Características: Intervalo de lectura 15 a 200 m/z; Capacidad en MS Scan, MSⁿ; Cambio de polaridad, <100 mseg entre modos positivo y negativo, en capacidad de Scan; Resolución, 0.3 FWHM; Voltaje, 230V; Peso (métrico), 120kg; Descripción del equipo, LTQ FLEET - Espectrómetro de masas con trampa de iones (Thermo Scientific, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los patrones de fragmentación de glucosa y fructosa que se observaron en registros gráficos de lectura son diferentes para cada uno de los ionizantes, sin embargo, se pudo determinar de manera previa la masa molecular de la glucosa y fructosa, de acuerdo a la relación m/z de los iones de mayor abundancia. En

las Figuras 3, 4 y 5 se muestran los espectrogramas MS-MS de los estándares de fructosa en modo negativo y positivo, así como el estándar de glucosa en modo negativo, respectivamente (datos experimentales).

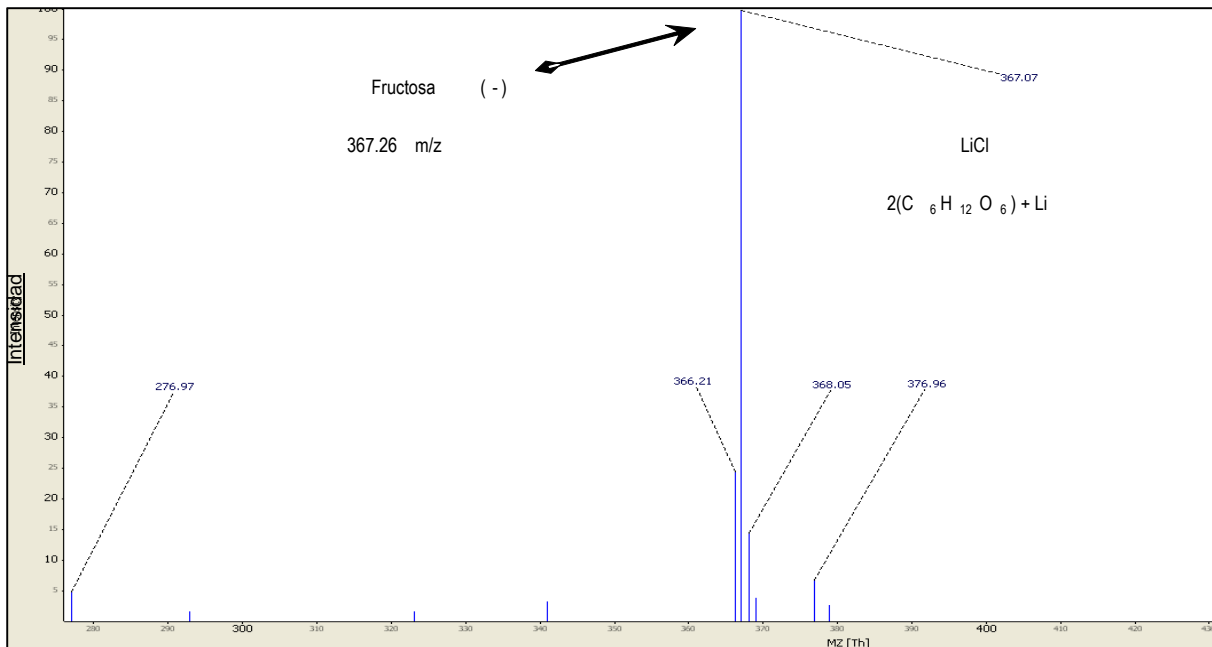


Figura 3. Ion con valor de m/z de 367.26 del estándar de fructosa con ionización en modo negativo (-) y con el ionizante LiCl.

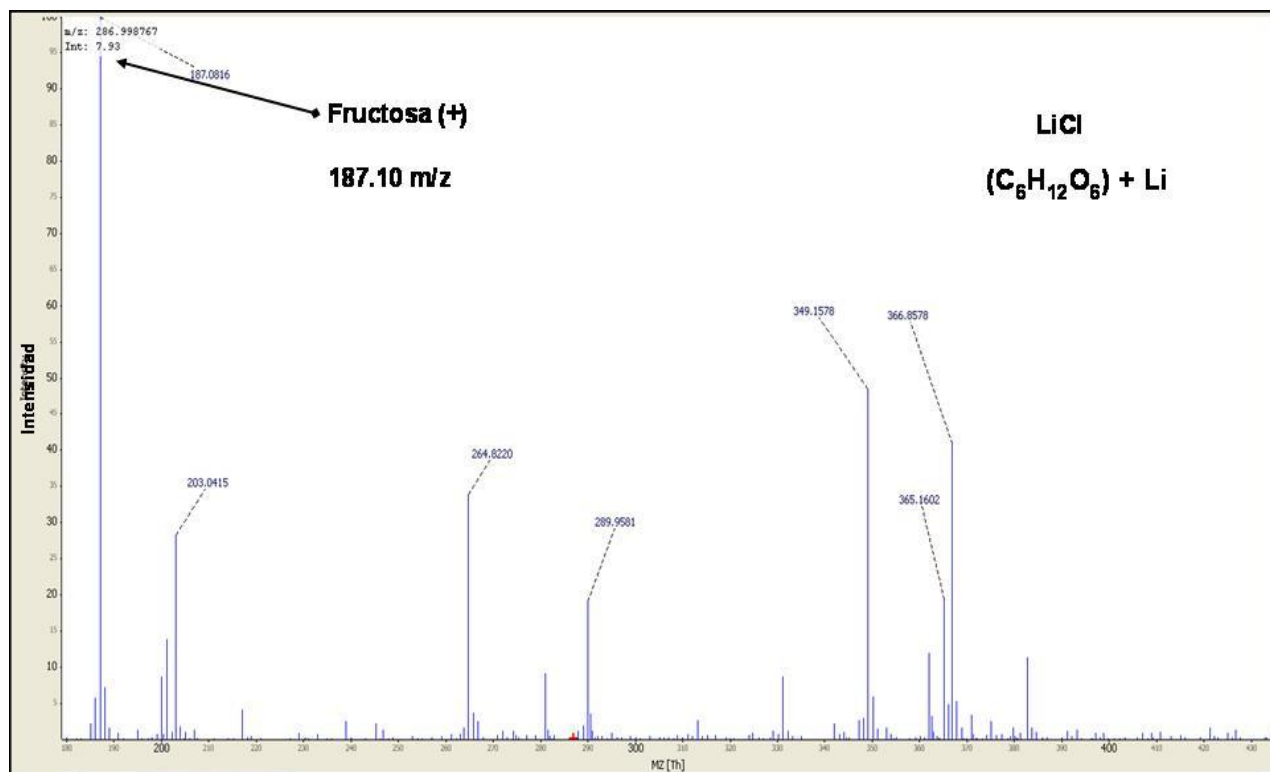


Figura 4. Ion con valor de m/z de 187.10 del estándar de fructosa en modo positivo (+) y con el ionizante LiCl.

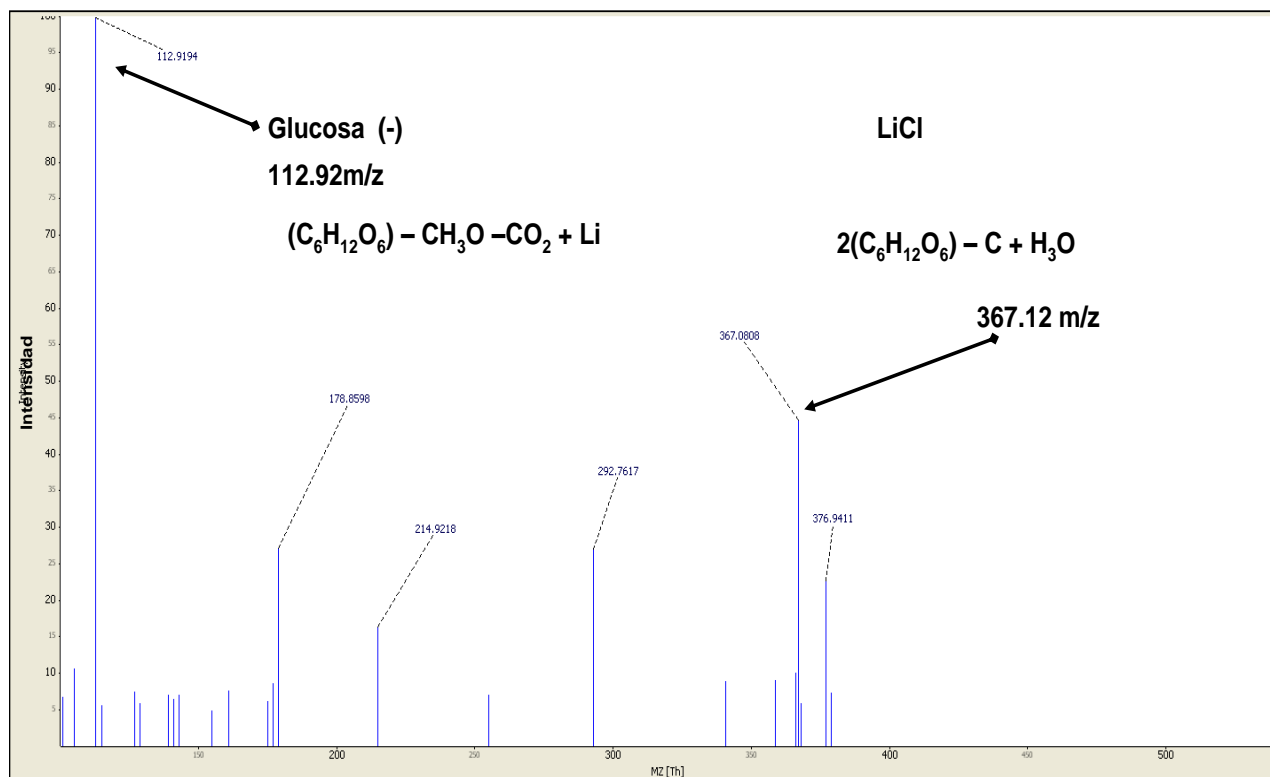


Figura 5. Iones con valores de m/z 112.92 y 367.12, característicos del estándar de glucosa en modo negativo (-) y con el uso del ionizante LiCl.

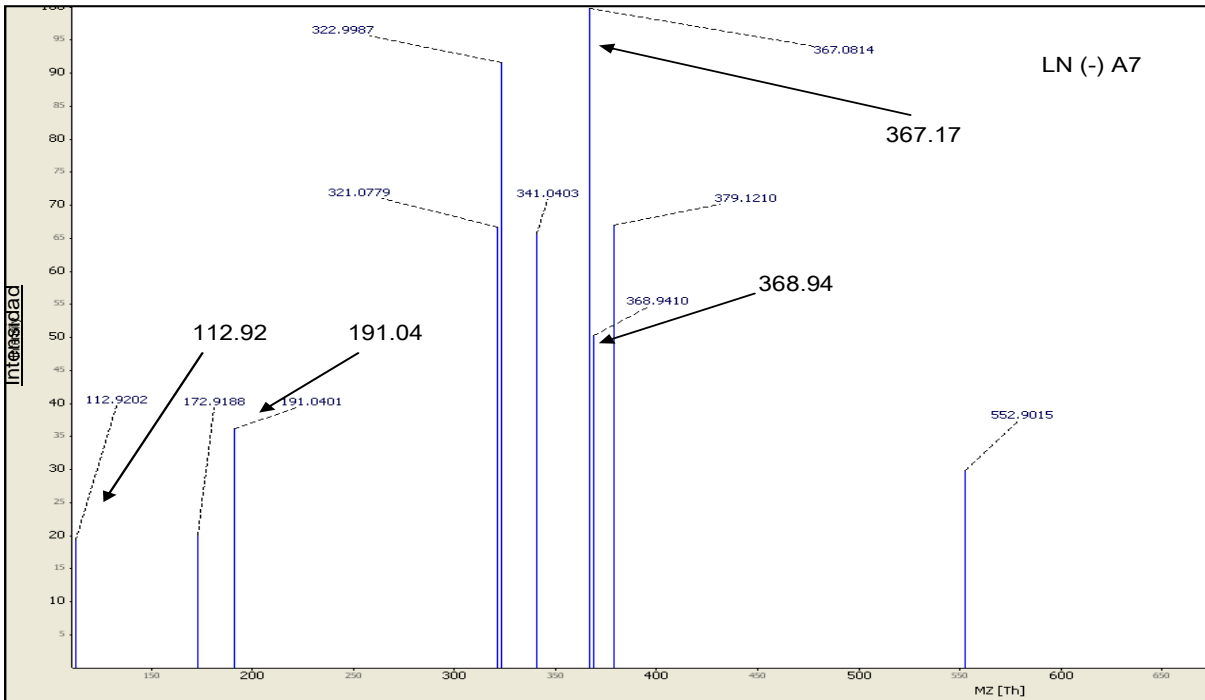


Figura 6. Patrón de ionización de una muestra de jugo de tallo del genotipo de maíz CV-702, fertilizado con un nivel bajo de nitrógeno, con ionización en modo negativo (-) y sin ionizante.

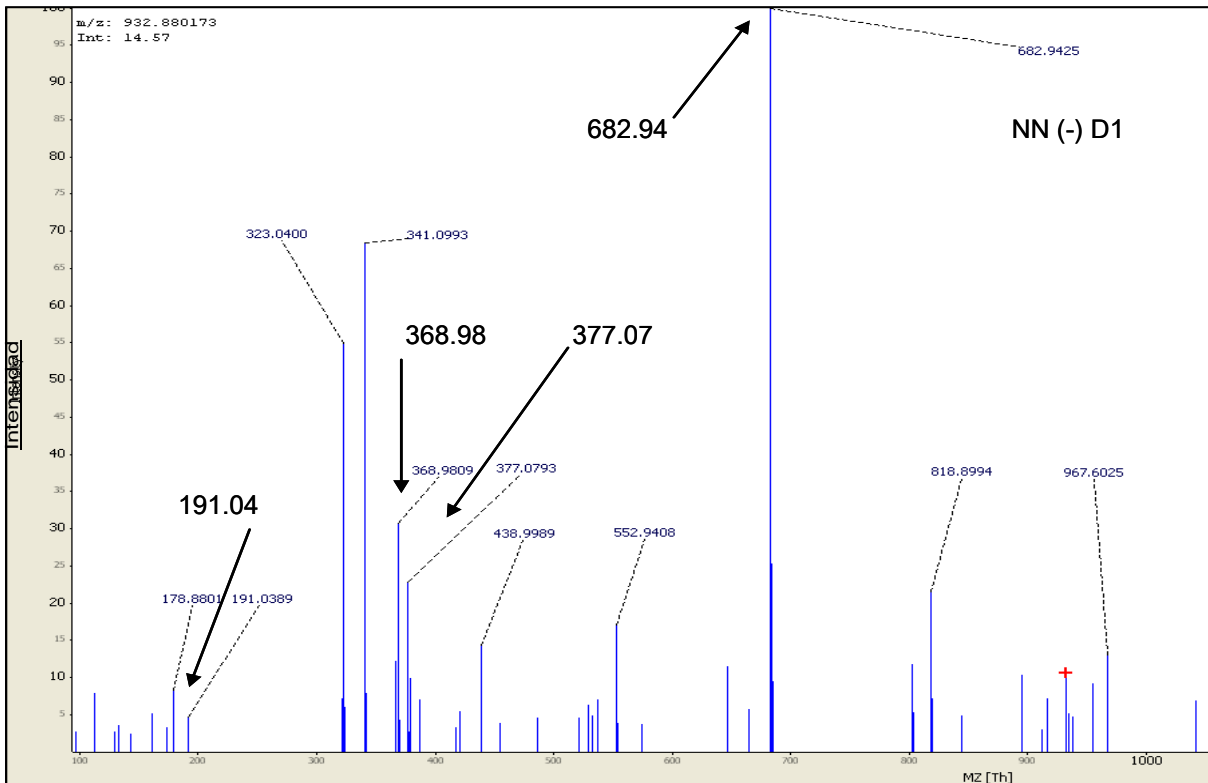


Figura 7. Patrón de ionización de una muestra de de jugo de tallo del genotipo de maíz CV-702, fertilizado con un nivel alto de nitrógeno, con ionización en modo negativo (-) y sin ionizante.

Se observaron patrones de ionización que presentan los siguientes valores m/z : fructosa (-) 187.10 y 367.17 m/z ; glucosa (-) 112.92 y 367.12 m/z y sacarosa (+): 365.17. La capacidad del método de ionización por *electrospray* (ESI) para producir fragmentos de los iones quedó así evidenciada (Vandell y Limbach, 1999). En las Figuras 6 y 7 se observan las diferencias en abundancia de respuesta de las plantas a los tratamientos experimentales, dosis alta y baja de nitrógeno, para cada ión detectado (datos

experimentales). Es importante resaltar que a falta de bases de datos con los cuales hacer un trabajo de validación directa, la comparación de los fragmentos obtenidos de los carbohidratos estándar con los registrados de las muestras de jugo de tallo de maíz, facilita la identificación de los carbohidratos en las muestras de jugo. Con los espectrogramas obtenidos del experimento, ahora se dispone de un listado de iones característicos para cada carbohidrato analizado.

CONCLUSIONES

El espectrómetro de masas LCQ-FLEET es un equipo adaptable a las opciones de trabajo con diferentes parámetros y grados de operación y por los resultados de fragmentación iónica de las moléculas parentales en los modos de lectura positivo y negativo. La técnica MS-MS permite modelar la estructura de moléculas orgánicas. El analizador de trampa lineal de iones permite obtener alta reproducibilidad, sensibilidad, resolución, precisión y, además, la posibilidad de aplicación cuantitativa. El cloruro de litio es el mejor ionizante para obtener espectrogramas con altos

niveles de abundancia de iones para la fructosa y glucosa; sin embargo, las muestras de jugo de tallo de maíz pueden ser leídas sin ionizante, lo cual reduciría el costo del método por eliminación de etapas previas de tratamiento de muestras. El método desarrollado para lectura de carbohidratos es económico y confiable, derivado de las ventajas de operación del analizador de trampa de iones y la ionización por *electrospray* de inyección directa DIESI-MS, en espectrometría de masas MSⁿ.

Martín García Flores agradece el apoyo otorgado por el CONACYT para la realización de estudios de Doctorado en el programa de Biotecnología de Plantas del CINVESTAV-Unidad Irapuato.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haldford NG; Curtis TY; Muttucumaru N; Postles J; Mottram DS (2011). Sugars in crop plants. *Annals of Applied Biology*. 158: 1-25.
- Juárez CS (2012). The stem as a dynamic carbohydrate reservoir in maize. Tesis de Maestría en Biotecnología de Plantas. Cinvestav. Irapuato.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (1995). Fuente: www.genome.jp/kegg/compound/ Consulta: Octubre 27, 2014.
- López LD (2013). Prácticas del Laboratorio de Análisis Bioquímico Instrumental. Cinvestav. Irapuato.
- Niessen WMA (1999). MS – MS and MSⁿ. Hyphen MassSpec Consultancy, Leiden, The Netherlands. Elsevier Ltd. Pp. 1404-1410.
- Swiss-Prot (2002). Fuente: www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/madanm/pres/swiss2.htm. Consulta: Octubre 27, 2014.
- Tang K; Page JS; Kelly RT; Marginean I (2010). *Electrospray ionization in Mass Spectrometry*. Biological Sciences Division, Pacific Northwest National Laboratory. Richland, WA. USA. Elsevier Ltd. pp 467-473.
- ThermoScientific (2014). Fuente: www.thermoscientific.com/en/product/lcq-fleet-ion-trap-mass-spectrometer.html Consulta: Abril 3, 2014.
- TOPPAS-VIEW (2010). Fuente: <http://openms.sourceforge.net/documentation/>. Consulta: Octubre 27, 2014.
- Vandell VE; Limbach PA (2010). *Overview of Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. Elsevier Ltd. pp. 84-87.