



Universidad de Oviedo

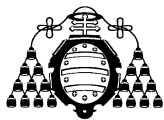
**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**Análisis cuantitativo de péptidos/proteínas intactos o  
modificados post-traduccionamente mediante HPLC y  
Espectrometría de masas**

**LAURA CID BARRIO**

**Julio 2016, Oviedo**



**JORGE RUIZ ENCINAR**, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado "Análisis cuantitativo de péptidos/proteínas intactos o modificados post-traduccionalmente mediante HPLC y Espectrometría de masas" ha sido realizado por la alumna Laura Cid Barrio bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 14 de Julio de 2016

Fdo: Jorge Ruiz Encinar

## AGRADECIMIENTOS

---

Me gustaría agradecer al Dr. Jorge Ruiz Encinar, por darme la oportunidad de elaborar este proyecto e iniciarme en el campo de la investigación.

Gracias, al estudiante de doctorado Francisco Calderón Celis por su supervisión, consejos, paciencia y ayuda recibida durante estos meses de realización del proyecto.

Por otra parte, agradecer al Dr. Juan José Calvete, jefe del Laboratorio de Venómica Estructural y Funcional del Instituto de Biomedicina de Valencia, por ofrecernos la oportunidad de trabajar con muestras reales de venenos de serpiente así como proporcionar la información y conocimientos necesarios sobre venómica, un campo desconocido para mí hasta la fecha.

Por último, agradecer a mis compañeros del Máster y sobre todo a mis “vecinitos” por los buenos momentos pasados juntos y el apoyo recibido durante la realización del trabajo.

# ÍNDICE

---

1. INTRODUCCION .....	1
1.1. Aspectos generales.....	1
1.2. Estudio de las proteínas .....	1
1.3. Cuantificación de proteínas.....	2
1.3.1. Métodos clásicos .....	3
1.3.2. Espectrometría de masas .....	4
1.3.3. Cuantificación relativa de proteínas empleando espectrometría de masas	4
1.3.4. Cuantificación absoluta de proteínas.....	8
1.4. HPLC-ICPMS.....	8
1.4.1. Análisis de compuestos que contienen azufre.....	9
1.4.2. Problemas en el acoplamiento entre HPLC e ICPMS.....	10
1.4.3 Análisis mediante dilución isotópica.....	11
1.5 Venómica .....	12
2. OBJETIVOS:.....	14
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	15
3.1. Instrumentación y reactivos.....	15
3.1.1. Instrumentación .....	15
3.1.2. Reactivos y material .....	16
3.2. Procedimiento.....	16
3.2.1. Preparación de disoluciones .....	16
3.2.2. Parámetros instrumentales.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Certificación de los estándares de azufre: .....	18
4.1.1. Certificación del trazador de <sup>34</sup> S mediante IDA.....	18
4.1.2. Certificación del patrón interno BOC-Metionina .....	21
4.2. Optimización de la separación cromatográfica.....	22
4.2.1. <i>Naja nigricollis</i> .....	24
4.2.2. <i>Micropechis ikaheka</i> .....	26
4.3. Cálculo del Flujo másico empleando IDA post-columna .....	27
4.4. Cálculo de la recuperación cromatográfica.....	29
4.4.1. <i>Naja nigricollis</i> .....	29
4.4.2. <i>Micropechis ikaheka</i> .....	31

4.5. Identificación de las distintas especies mediante espectrometría de masas molecular	32
4.5.1. <i>Naja nigricollis</i> .....	32
4.5.2. <i>Micropechis ikaheka</i> .....	36
4.6. Cuantificación absoluta de proteínas .....	38
4.6.1. <i>Naja nigricollis</i> .....	38
4.6.2. <i>Micropechis ikaheka</i> .....	41
5. CONCLUSIONES .....	45
6. BIBLIOGRAFÍA .....	46

# 1. INTRODUCCION

---

## 1.1. Aspectos generales

El término proteoma fue acuñado por Mark R. Wilkins en 1994 como el conjunto de proteínas de un organismo biológico determinado en un momento dado. El término se aplicó a una gran cantidad de sistemas biológicos distintos. A partir del concepto de proteoma se creó el término proteómica que se entiende como el estudio del proteoma.<sup>1</sup>

La secuenciación completa del DNA ha sido uno de los avances más importantes en las últimas décadas, lo que ha permitido conocer el genoma. Si bien las proteínas se encuentran codificadas en el genoma, una mayor cantidad de mRNA no se puede relacionar directamente con una mayor expresión de la proteína correspondiente ni las modificaciones que ésta posee. El hecho de que el proteoma tenga una naturaleza dinámica (al contrario que el genoma, el cual tiene una naturaleza estática), aumenta la complejidad de su estudio ya que las proteínas que se expresan o modifican a lo largo de tiempo, cambiando su abundancia, estructura, interacciones... Además estas proteínas pueden ser modificadas después de su traducción (modificaciones post-transcripcionales).<sup>2,3</sup>

Desde la creación del término proteómica se han desarrollado multitud de técnicas para el estudio de las proteínas en distintos sistemas biológicos. En el reciente avance del estudio del proteoma han influido de manera crítica dos técnicas analíticas: en primer lugar la espectrometría de masas (MS), con el desarrollo de las fuentes de ionización suaves, como electrospray (ESI) o matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), y la miniaturización y automatización de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Estas técnicas proporcionan una poderosa herramienta en el estudio dinámico y espacio-temporal de las actividades de las proteínas, pudiendo determinar de esta manera su misión en procesos biológicos y enfermedades.<sup>4</sup>

## 1.2. Estudio de las proteínas

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes y diversas. Éstas están presentes en todas las células e intervienen en todos los procesos biológicos. Son polímeros de aminoácidos, en los que cada residuo aminoácido está unido al siguiente a través de un enlace

peptídico (Figura 1). En la naturaleza hay 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas, siendo todos ellos  $\alpha$ -aminoácidos.<sup>5</sup>

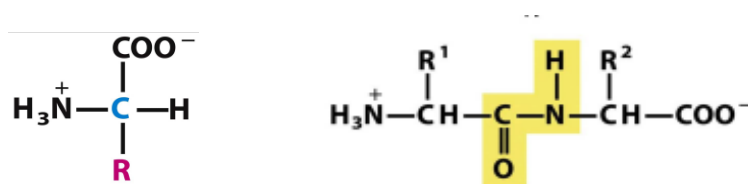


Figura 1: Estructura de un aminoácido. El grupo R o cadena lateral unido al carbono  $\alpha$  es característico de cada aminoácido. Esquema de un enlace peptídico entre dos aminoácidos.

La función de las proteínas depende de su conformación espacial y esta, a su vez, viene determinada por la secuencia de aminoácidos que la forman.

La actividad de las proteínas no está solamente controlada por la velocidad de síntesis y degradación de las mismas, sino también por procesos covalentes selectivos y específicos. Estas modificaciones de carácter covalente son conocidas como modificaciones post-traduccionales PTMs, las cuales modulan las interacciones moleculares, la localización de las proteínas y su estabilidad.<sup>6,7</sup> Se conocen 300 tipos diferentes de PTMs de las que destacan la fosforilación, metilación, glicosilación, acetilación o sulfonación. Durante el proceso de modificación la proteína incrementa o disminuye su peso molecular con respecto al calculado según la secuencia de aminoácidos que ésta posee. Las modificaciones proteicas suelen ser no homogéneas y a partir de un único gen puede llegar a obtenerse una gran cantidad de productos diferentes como resultado de un splicing alternativo y la combinación de distintas modificaciones. Por tanto, la cantidad de proteínas con una única modificación puede ser solamente una pequeña fracción de la cantidad de proteína total.<sup>8</sup>

Además de las PTMs, existen otras dificultades en el análisis de proteínas. Una de ellas es el amplio rango dinámico de expresión de dichas proteínas, pudiendo llegar éste a un rango desde 1 a 10<sup>6</sup> proteínas por célula. Otra de las dificultades es el tamaño de del sistema que se analiza, como por ejemplo una única célula, donde el contenido de proteína puede llegar a ser del orden de pg.<sup>9</sup>

### 1.3. Cuantificación de proteínas

El objetivo principal de la proteómica es la identificación y cuantificación de todas las proteínas y sus variantes en cualquier tipo de célula bajo las características de interés.<sup>10</sup> La mayor parte de los primeros avances en proteómica estaban centrados en el desarrollo de métodos de identificación de una gran cantidad de proteínas.<sup>2</sup> A pesar de que las estrategias

desarrolladas en proteómica basadas en espectrometría de masas son capaces de identificar un elevado número de proteínas, muchos cambios producidos en un sistema biológico no se pueden detectar con este tipo de técnicas de identificación; si no que es necesario proporcionar una información cuantitativa.<sup>11</sup>

Se describen a continuación las distintas metodologías para la cuantificación de proteínas desde los métodos clásicos hasta los desarrollados recientemente.

### 1.3.1. Métodos clásicos

Los métodos clásicos están basados en la separación de proteínas empleando electroforesis en gel de poliacrilamida en 2 dimensiones (2D-PAGE, 2 dimensional polyacrylamide gel electrophoresis).<sup>12</sup> Esta técnica ha sido la más eficaz en proteómica tanto cualitativa como cuantitativa hasta la evolución de la espectrometría de masas en este campo.<sup>13</sup>

Una vez realizada la separación se revela el gel empleando colorantes, moléculas fluorescentes o isótopos radioactivos, lo que permite determinar de manera aproximada la cantidad de proteína presente en el gel.<sup>2</sup> Pero el uso de esta técnica tiene importantes limitaciones: es necesaria una elevada resolución en la separación de las proteínas en el 2D gel, está limitado a proteínas abundantes y solubles en agua, no revela la identidad de las proteínas separadas.<sup>14</sup>

La técnica Western Blot consiste en el uso de anticuerpos marcados enzimáticamente a fin de detectar la(s) proteína(s) de interés. Esta técnica requiere una separación previa mediante SDS-PAGE eliminando así el uso de isótopos radioactivos. Sin embargo tiene como inconveniente la necesidad de patrones específicos y de un anticuerpo específico para cada proteína.<sup>15</sup>

Por otra parte, se pueden cuantificar las proteínas de manera absoluta mediante la técnica ELISA. Esta técnica consiste en un inmunoensayo enzimático heterogéneo basado en la detección de conjugados de un antígeno o anticuerpo con un enzima inmovilizados sobre una fase sólida. De manera que, al añadir el sustrato del enzima se obtiene un producto coloreado que se puede cuantificar espectrofotométricamente. Esta metodología tiene como desventaja la necesidad de patrones específicos y anticuerpos específicos que reconozcan la proteína de interés.<sup>16</sup>



### 1.3.2. Espectrometría de masas

La reciente evolución en la cuantificación de proteínas se debe enormemente al desarrollo de nuevas metodologías empleando espectrometría de masas. Durante años la espectrometría de masas ha sido la técnica analítica por excelencia para el análisis de biomoléculas. La elevada precisión de la medida permite distinguir entre especies muy semejantes y, la espectrometría de masas en tándem (MSMS) permite la obtención de información estructural a partir de los iones moleculares que son aislados y fragmentados.<sup>3</sup>

Al contrario que en electroforesis en gel, las metodologías desarrolladas mediante espectrometría de masas están basadas en la separación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y el análisis mediante espectrometría de masas molecular, habitualmente ionización por electrospray (ESI-MS) o también por matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-MS).<sup>2,17</sup>

Sin embargo, la espectrometría de masas molecular no es directamente un método cuantitativo, puesto que la relación entre la cantidad de proteínas o péptidos y la señal obtenida en ESI y MALDI es compleja debido a la diferente eficiencia de ionización de las distintas proteínas o péptidos y la gran influencia de otras especies o sales presentes.<sup>2</sup>

Debido a esta limitación, la mayoría de los métodos de cuantificación empleando espectrometría de masas molecular desarrollados hasta la fecha son relativos. La cuantificación empleando espectrometría de masas se basa en la medida de intensidad de señal de las muestras marcadas con isótopos estables o usando métodos libre de marcas.<sup>13,18</sup>

### 1.3.3. Cuantificación relativa de proteínas empleando espectrometría de masas

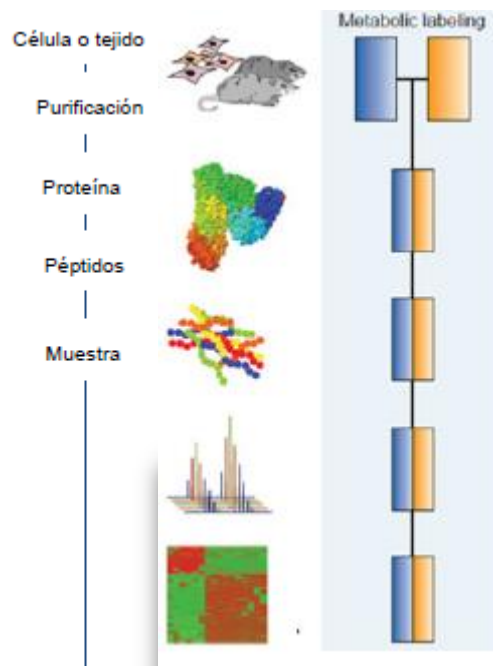
En proteómica cuantitativa el marcaje con isótopos estables permite la identificación/cuantificación de péptidos equivalentes y fragmentos peptídicos empleando un determinado incremento en la masa debido a las marcas. La marca isotópica no afecta a las propiedades de la proteína o péptido marcado, sino que eluyen al mismo tiempo en la columna de cromatografía de líquidos, seguido de un análisis mediante espectrometría de masas.<sup>19,20</sup>

El espectro de masas nos permite determinar la diferencia de masa existente entre los péptidos o proteínas. La cuantificación se lleva a cabo por comparación de las intensidades de las señales de los péptidos/proteínas sin marcar y marcados obtenidas en el espectro.<sup>14</sup>

De acuerdo con las propiedades de los reactivos marcados empleados, el marcaje con isótopos estables puede dividirse en marcaje metabólico, químico y de catálisis enzimática.<sup>20</sup>

### 1.3.3.1 Marcaje metabólico

La estrategia más empleada para la introducción de isótopos estables en proteínas mediante marcaje metabólico se realiza durante el crecimiento de la célula, se conoce como SILAC (Stable Isotope Labeling by Aminoacids in Cell culture) y fue introducido por Mann en 2002.<sup>21</sup> A continuación, Figura 2, se muestra la incorporación de marcaje isotópico vía metabólica.



*Figura 2: Marcaje metabólico de dos líneas celulares cuyos proteomas se pretende comparar cultivados en medios normales (color azul) y enriquecidos (color rojo). Analizando los péptidos resultantes de la digestión enzimática mediante espectrometría de masas*

El método consiste en sintetizar proteínas en un medio donde existe uno o varios aminoácidos marcados isotópicamente, que es incorporado en las distintas proteínas expresadas gracias al metabolismo de las células del medio. Los aminoácidos más empleados son  $^{13}\text{C}_6$ -arginina (Arg) y  $^{13}\text{C}_6$ -lisina (Lys). Esto permite asegurar que al menos uno de los aminoácidos de los péptidos trípticos contenga al menos un aminoácido marcado. Por lo que se conoce la diferencia de masa introducida en los péptidos.<sup>14</sup>

Se emplean dos poblaciones de células: una en un medio que contiene aminoácidos sin marcar o “ligeros” y otra en un medio con aminoácidos marcados o “pesados”. Ambas poblaciones se mezclan pudiendo ser sometidas a métodos de separación o purificación para su posterior análisis. De manera que los péptidos de distintas muestras, pueden ser

cuantificadas por comparación de la intensidad de los picos de los péptidos “ligero” o sin marcar y “pesado” o marcado.<sup>19,20</sup>

### 1.3.3.2. Marcaje químico

Las proteínas y péptidos contienen una gran cantidad de grupos funcionales, como por ejemplo los grupos amino o carboxilo. El marcaje se puede producir mediante una reacción química entre estos grupos funcionales y determinados reactivos macados isotópicamente. En el mercado existen distintos tipos de marcadores isotópicos de origen químico.<sup>20</sup>

#### ICAT (Isotope-Coded Affinity Reagents)

Este método fue introducido por primera vez en 1999 para la comparación cuantitativa del nivel de expresión de determinadas proteínas extraídas de dos muestras distintas de un mismo sistema biológico.<sup>22</sup>

Los reactivos ICAT, cuya estructura se muestra en la Figura 3, constan de tres partes: un grupo de afinidad (biotina), empleado para la purificación de péptidos marcados con el reactivo; un grupo de unión, parte que puede incorporar los isótopos estables, y un grupo reactivo, iodoacetamida, que reacciona con el grupo tiol de los residuos de cisteína.<sup>20</sup>

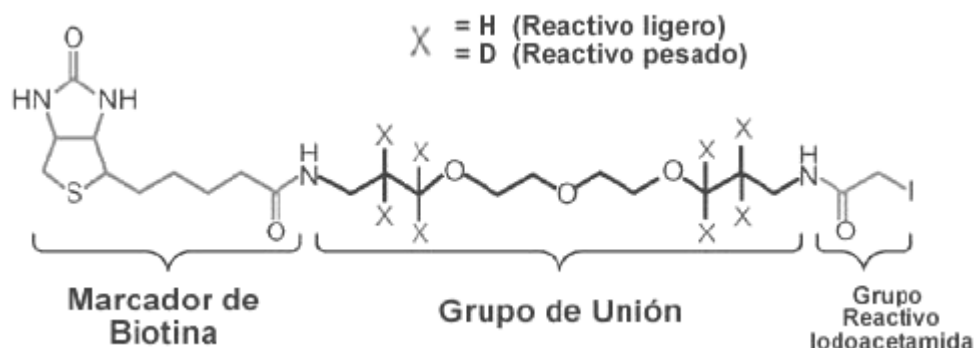
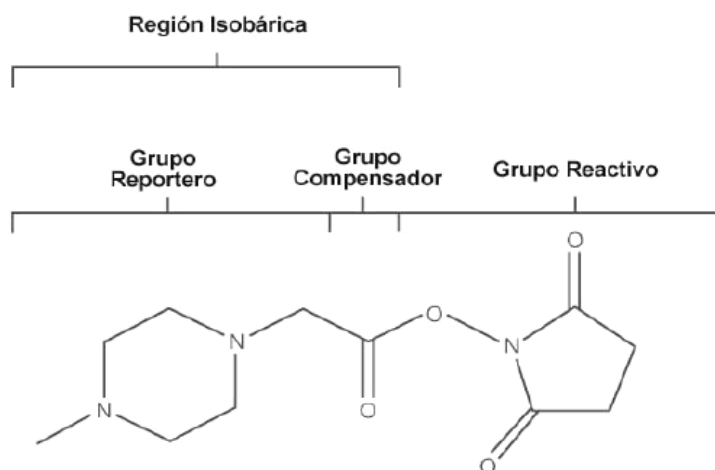


Figura 3: Estructura del reactivo ICAT con sus tres partes: marcador de biotina, grupo de unión donde se ubican los 8 átomos de H en la versión ligera o 8 átomos de D en la pesada y grupo reactivo (iodoacetamida)

El procedimiento llevado a cabo es el siguiente: se poseen dos muestras de dos estados celulares distintos, por ejemplo células sanas y enfermas, se tratan con los reactivos ICAT “ligero” y “pesado”. Se mezclan ambas poblaciones y se digieren químicamente. Los péptidos obtenidos se separan por afinidad entre la biotina, que contenía el reactivo ICAT, y la estreptavidina y se analizan por espectrometría de masas. La abundancia relativa entre el estado sano y enfermo de los péptidos se determina por la relación de intensidades entre los péptidos marcados con el reactivo “pesado” y el “ligero”.<sup>19</sup>

### iTRAQ (Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification)

Siguiendo el éxito del marcaje ICAT, se desarrollaron una nueva generación de reactivos de marcaje isotópico denominados iTRAQ, introducidos en 2003.<sup>23</sup> Estos marcadores contienen tres regiones (Figura 4): una región reporter, una región de normalización y una región reactiva.<sup>20</sup>



*Figura 4: Estructura del reactivo iTRAQ, marcador isobárico. El grupo reporter presenta diferente masa en los distintos reactivos de marcaje y esta diferencia de masa es compensada por el grupo compensador, de forma que existe una región isobárica donde la masa de los reactivos se mantiene constante.*

El grupo amino reactivo de los marcadores iTRAQ reacciona covalentemente con el grupo amino terminal libre y con los grupos amino de residuos de lisina.<sup>19</sup> La introducción de estos marcadores produce péptidos marcadores isobáricamente, por tanto no se distinguen en masa. Solamente después de una fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem se distinguen estas marcas. Esta metodología permite al mismo tiempo la identificación y la cuantificación relativa.<sup>14</sup>

#### *1.3.3.3. Marcaje enzimático*

Los péptidos pueden ser marcados con isótopos estables mediante digestión enzimática. Concretamente con una digestión enzimática con tripsina en presencia de  $H_2^{18}O$ , de forma que se cataliza el reemplazo de dos átomos de  $^{16}O$  en el extremo C-terminal de los péptidos proteolíticos por dos átomos de  $^{18}O$ .<sup>19,20</sup>

La incorporación de dos átomos de  $^{18}O$  en el extremo C-terminal produce una diferencia de 4 Da en la masa de los péptidos. Este método tiene como desventaja es la eficiencia en el marcaje, ya que distintos péptidos se marcan en distinta extensión.<sup>14</sup>

### 1.3.4. Cuantificación absoluta de proteínas empleando espectrometría de masas

La cuantificación relativa explicada hasta el momento no proporciona información sobre cantidad absoluta o la concentración de las proteínas en muestras biológicas puesto que la respuesta del espectrómetro es diferente para cada péptido/proteína y está influenciada por la matriz de la muestra.<sup>24</sup>

Los métodos basados en espectrometría de masas molecular empleando marcaje con isótopos estables permiten la cuantificación absoluta por comparación de la señal del MS con la de los estándares.<sup>24</sup> Estos métodos son conocidos como AQUA (Absolute Quantification)<sup>25</sup> y QconCAT (Quantification Concatamer).<sup>26</sup> En ellos se usan proteínas o péptidos sintéticos análogos al que se quiere determinar. La diferencia de masa entre el sintético y el natural depende del isótopo pesado que se emplee para el marcaje, ambos eluyen juntos en una separación cromatográfica y la eficiencia de ionización es la misma.<sup>19</sup> Estos métodos tienen como desventaja fundamental la necesidad del conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína o péptido y la posterior síntesis de sus análogos marcados.<sup>14</sup>

## 1.4. HPLC-ICPMS

La espectrometría de masas elemental con fuente de plasma de acoplamiento inductivo es una técnica ampliamente reconocida para el análisis no sólo de metales sino también de compuestos organometálicos y biomoléculas. Esta técnica puede emplearse para el análisis de proteínas ya que éstas contienen heteroátomos, elementos distintos a C, H, O y N, como por ejemplo S, P, Se o metales.<sup>2,9,27</sup>

La fuente de ICP, desarrollada a principios de los años 80<sup>28</sup> consiste en un plasma a elevada temperatura, entre 6000 y 10000 K, y está formado por una elevada densidad de electrones y átomos de Ar que se emplean para la volatilización, atomización e ionización de la muestra. Todos los enlaces químicos presentes en la muestra se rompen y los distintos elementos/isótopos de los elementos se ionizan. Por tanto, las señales proporcionadas por el ICP-MS son independientes de la estructura y directamente proporcionales a la cantidad del elemento.<sup>29</sup> Esto hace necesario una separación de las especies que contienen el elemento de interés previa a su introducción en el ICP-MS, puesto que éste es incapaz de diferenciar la molécula de la que proceden los elementos detectados.<sup>18</sup>

El empleo de una fuente ICP para la ionización permite una detección muy sensible y exacta del heteroátomo de interés (S, P, Se,...) presente en el péptido o proteína.<sup>30,31</sup>

La muestra introducida en el ICP-MS se encuentra, habitualmente, en forma líquida después de una separación mediante HPLC.<sup>30</sup> El acoplamiento de la cromatografía líquida con ICP-MS es sencillo, mediante una conexión directa de la salida de la columna al nebulizador.<sup>18</sup>

#### 1.4.1. Análisis de compuestos que contienen azufre

El azufre está presente solamente en dos aminoácidos naturales: cisteína (Cys) y metionina (Met). Éstos tienen una abundancia acumulada de alrededor de un 5% sobre el total de aminoácidos presentes en las proteínas de un organismo eucariota.<sup>30</sup> Esto provoca que estadísticamente cada 20 aminoácidos en la secuencia de la proteína, 1 contiene azufre y por tanto, muchos de los péptidos tripticos formados también lo contendrán. Este hecho unido a los bajos límites de detección que se pueden alcanzar con determinados equipos de ICP-MS, mínimos efectos de matriz, amplio rango lineal y medida de relaciones isotópicas, hacen de la cuantificación de azufre una metodología alternativa para la cuantificación de proteínas.<sup>2,32</sup>

Sin embargo, existen problemas en la determinación de azufre mediante HPLC acoplado a ICPMS. En primer lugar, el elevado potencial de ionización del S (10,335 eV) conduce a una baja eficiencia de ionización, alrededor de un 10%. Además, el azufre es un elemento que presenta fondos muy altos. Por último, cabe destacar la existencia de interferencias poliatómicas, las cuales aumentan los límites de detección para el elemento haciendo necesario el uso de ICPMS especiales.<sup>32-34</sup> Las interferencias poliatómicas derivadas de la medida de S monitorizando m/z 32 se pueden separar del isótopo de interés mediante el empleo de sistemas con alto poder de resolución como el ICPMS de doble enfoque, que permite eliminarlas. También se pueden eliminar empleando una celda de colisión presurizada con un gas, como por ejemplo oxígeno.<sup>32,35</sup> De este modo el  $^{32}\text{S}^+$  reacciona con el oxígeno formando  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  (m/z 48) permitiendo así eliminar las interferencias producidas a m/z 32.<sup>29</sup>

Basada también en el uso de una celda de colisión con un gas reactivo en la determinación mediante ICPQMS, el uso del ICPQQQ permite eliminar también las interferencias poliatómicas pero de forma más eficiente.<sup>29,36,37</sup> El empleo de un triple cuadrupolo permite trabajar en modo MS/MS, típicamente empleado en masas molecular, pero empleando la celda de colisión no con el objetivo de la rotura de moléculas sino para la formación de nuevas especies mediante una reacción.<sup>33</sup> El equipo consta de dos cuadrupolos y una celda de colisión o reacción que situada entre ambos.

La medida de compuestos de azufre empleando este equipo es la siguiente: el primer cuadrupolo (Q1) actúa como un filtro de masas, seleccionando únicamente la m/z 32. De esta

manera pasarán tanto los iones correspondientes a  $^{32}\text{S}^+$  como las interferencias ( $^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{15}\text{N}^{17}\text{O}^+$ ,  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$ ,  $^{14}\text{N}^{18}\text{O}^+$ ). La reacción del  $\text{O}_2$  con los iones que llegan a la celda de colisión y la formación de los correspondientes óxidos, permite separar las interferencias de los iones de interés, ya que la reacción es más eficiente con  $^{32}\text{S}^+$  que con las correspondientes interferencias poliatómicas. En el segundo cuadrupolo (Q2) se fija la  $m/z$  48, que se corresponde con el ion  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ . En la Figura 5 se muestra un esquema del proceso.

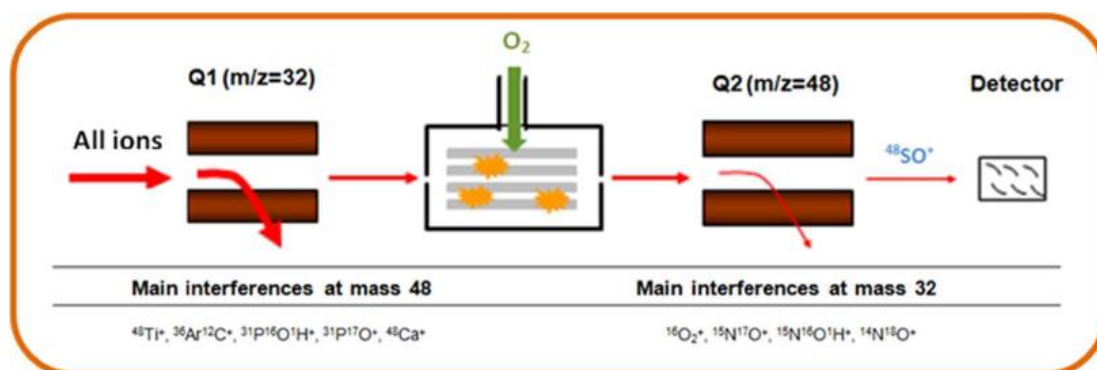


Figura 5: Esquema de funcionamiento del ICPQQQ en modo MS/MS para la eliminación de las interferencias poliatómicas en la medida de azufre

El primer nivel de selección producido al fijar en Q1  $m/z$  32, provoca que la medida en Q2 esté libre de las interferencias correspondientes a  $m/z$  48, de manera que se reduce la señal del fondo y por tanto, los límites de detección obtenidos son mucho más bajos.

#### 1.4.2. Problemas en el acoplamiento entre HPLC e ICPMS

Como se ha comentado con anterioridad, es necesario el uso de una técnica de separación para la detección de biomoléculas mediante ICPMS, debido a que al destruirse las diferentes especies en el plasma, no se puede distinguir la presencia de las diferentes especies de un mismo elemento presente en muestras complejas.

Se han propuesto distintos acoplamientos al ICPMS. El primero de ellos es la ablación laser (LA) que se puede utilizar para el análisis directo de elementos y relaciones isotópicas de cualquier clase de muestras sólidas.<sup>2</sup> En este caso la separación previa se realiza mediante electroforesis en gel.

Sin embargo, el acoplamiento más empleado es con cromatografía de líquidos, concretamente con fase reversa. A pesar de la sencillez del acoplamiento, las condiciones cromatográficas limitan su aplicabilidad. El empleo gradientes de fase reversa, donde el contenido de materia orgánica de la fase móvil aumenta con la gradiente, afecta a la eficiencia de ionización del plasma y puede llegar incluso a apagarlo.<sup>38</sup> Se elimina este problema con la

adición de un flujo auxiliar de O<sub>2</sub> al plasma, lo cual requiere el uso de conos de platino. De esta manera la materia orgánica se destruye más fácilmente en el ICP. <sup>18,29</sup> Por otra parte, la disminución del flujo de introducción de la muestra con HPLC capilar y nano disminuye la cantidad de materia orgánica introducida en el plasma. <sup>38</sup>

Otra problemática del acoplamiento radica en la compatibilidad del flujo a la salida de la columna cromatográfica con el flujo requerido por el nebulizador. <sup>41</sup> Esta disminución de flujos provoca que el acoplamiento entre HPLC capilar y el ICP se complique, debido a que los flujos son muy inferiores a los requeridos por los nebulizadores convencionales (0,1-1 mL/min). El empleo de un micronebulizador aumenta la eficiencia, puesto que se introduce toda la muestra en el plasma. <sup>39</sup> En la Figura 6 se muestra un esquema del acoplamiento.

Además, con el uso del nebulizador de consumo total se minimiza la influencia de la eficiencia de ionización en la señal obtenida mediante ICPMS, puesto que ésta puede encontrarse afectada por la estructura del compuesto. De esta manera, se garantiza que la respuesta instrumental es independiente de la especie, lo que es fundamental para el desarrollo de metodologías de cuantificación. <sup>27</sup>

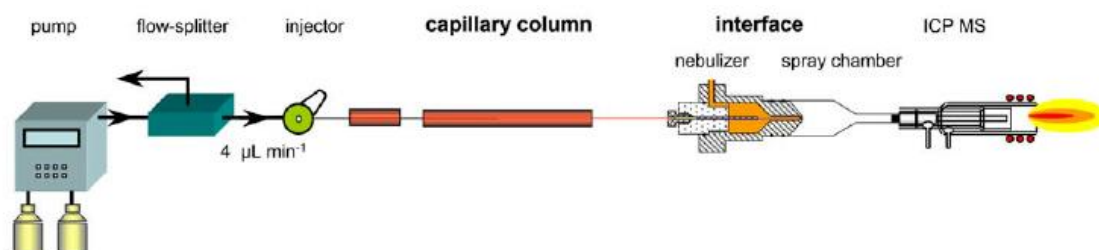


Figura 6: Acoplamiento capHPLC-ICP-MS<sup>39</sup>

### 1.4.3 Análisis mediante dilución isotópica

La dilución isotópica es un método primario, basado en la adición de especies enriquecidas isotópicamente en la disolución que contiene el analito. <sup>40</sup> El marcaje puede realizarse mediante un método específico, en el que se añade el analito marcado isotópicamente, para lo cual es necesario conocer la estructura del mismo. La introducción puede llevarse a cabo también, mediante un método inespecífico, donde la forma química del trazador puede ser distinta a la de las especies que quieren determinar. <sup>2</sup> En este último, se añade un flujo constante que contiene la especie enriquecida isotópicamente. <sup>35</sup>



Con esta segunda metodología el marcaje isotópico se produce después de la separación cromatográfica de las especies y se corrige por tanto cualquier variación de la sensibilidad producida durante el análisis. Sin embargo, no corrige cualquier pérdida de analito que ocurra antes de la mezcla del trazador con la muestra. Por tanto, la cuantificación de las especies está condicionada por las etapas de preparación de muestra (si la hay) y la obtención de una recuperación cuantitativa en la separación cromatográfica.<sup>31</sup>

La adición de un flujo post-columna de <sup>34</sup>S como trazador permite la cuantificación absoluta de los compuestos que contienen azufre, después de una separación cromatográfica de las distintas especies que contienen dicho elemento sin el empleo de un trazador específico para cada compuesto.<sup>33</sup>

## 1.5 Venómica

En el estudio de la proteómica cuantitativa que se ha comentado a lo largo de la introducción, uno de las aplicaciones en auge actualmente es el estudio de los venenos de animales. Las secreciones venenosas son producidas por una gran variedad de especies animales, tanto vertebrados como invertebrados, donde los más destacados son las serpientes, arañas y escorpiones. Normalmente, los péptidos y proteínas representan los componentes más abundantes y relevantes de estos venenos.<sup>41,42</sup> La aplicación de las ciencias “ómicas” (como la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica) al estudio de los venenos ha provocado el nacimiento de una nueva rama, la venómica.<sup>43</sup> Existen alrededor de 3150 especies de serpientes en todo el mundo (incluyendo los océanos), exceptuando unas pocas islas, ambientes fríos y de elevada altitud.<sup>44</sup>

El envenenamiento por mordedura de serpiente constituye un importante problema de salud a nivel mundial, sobre todo en países tropicales y subtropicales.<sup>45</sup> La mortalidad debida a mordedura de serpiente es difícil de estimar, debido a que en muchos de estos países no se informa sobre ello de forma adecuada. A pesar de esto existen estudios que estiman que hay al menos 421.000 casos de envenenamiento y 20.000 muertes al año. Estos datos, obtenidos a partir de bases de datos incompletas y hospitales, se encuentran muy por debajo de los valores reales. La incidencia real de la mordedura de serpiente a nivel mundial ronda los 2 millones y las muertes provocadas por envenenamiento las 100.000.<sup>46</sup> A pesar de la existencia de un tratamiento efectivo, la administración de un suero antiofídico, la escasa producción y distribución de antídotos eficaces, unido a la falta de recursos económicos de los países afectados no evita estas defunciones.<sup>44</sup>

La proteómica ha revolucionado la investigación de la organización estructural y funcional de los seres vivos. Un conocimiento detallado del proteoma de los venenos y sus efectos patológicos son requisitos indispensables para identificar las toxinas responsables del cuadro fisiopatológico del envenenamiento. La complejidad específica de cada veneno radica no sólo en el tipo y si no también en la abundancia de las toxinas que expresa. Por lo tanto, se requieren nuevas estrategias proteómicas para dilucidar la composición de los venenos de serpientes y llevar a cabo su cuantificación para así poder determinar la efectividad de los antídotos existentes, tanto comerciales como experimentales, en neutralizar las toxinas de dichos venenos.<sup>47</sup> Existen dos aspectos muy relevantes en la preparación de los antídotos: la selección adecuada de las especies de serpiente para la recolección del veneno y la correcta manipulación, caracterización e identificación de los venenos. La identificación y cuantificación de las distintas especies que forman parte del veneno permite determinar con exactitud los efectos que éste tendrá sobre las víctimas y la preparación de antídotos más efectivos.<sup>45</sup>

El método comúnmente empleado para la identificación y cuantificación de proteínas individuales o familias de proteínas presentes en muestras de veneno consiste en determinar espectrofotométricamente las especies obtenidas de una separación cromatográfica previa empleando fase reversa, monitorizando la señal de absorbancia del enlace peptídico 215-220 nm.<sup>48</sup> Empleando la ley de Lambert-Beer ( $A=\epsilon cl$ , donde A es la absorbancia,  $\epsilon$  el coeficiente de absortividad molar en  $M^{-1} cm^{-1}$ , c la concentración de la especie en M y l la longitud de paso óptico en cm) se obtiene como resultado el “porcentaje de enlace peptídico total presente en el pico cromatográfico). Cuando coeluyen varias especies en el mismo pico cromatográfico, estas se determinan por densimetría después de una separación mediante SDS-PAGE con un revelado empleando tinción con Coomassie. Mientras que, la presencia de distintas especies en la misma banda del gel se estima mediante las intensidades de los iones relativos de los tres iones de los péptidos más abundantes asociados a cada proteína obtenidos mediante espectrometría de masas en tándem. Esto proporciona el porcentaje en peso de los componentes del veneno.

El empleo de esta metodología de cuantificación implica el conocer con exactitud el valor de  $\epsilon$  para cada una de las proteínas, siendo este un dato difícil de calcular ya que, no solo depende de la cantidad de enlaces peptídicos sino de los aminoácidos que conforman la especie. Por lo tanto, dependiendo de la secuencia de aminoácidos que conforme la proteína, las abundancias obtenidas a partir de las medidas espectroscópicas estarán más o menos alejados del valor real.<sup>49</sup> Esta desventaja hace necesario el desarrollo de nuevas metodologías de cuantificación de proteínas más exactas.

## 2. OBJETIVOS

---

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de una metodología de cuantificación absoluta de proteínas empleando capHPLC-ICP-QQQ sin la necesidad de emplear patrones específicos y su aplicación a la cuantificación de compuestos de azufre en muestras reales, en este caso venenos de serpiente.

Para llevar a cabo este objetivo analítico global se abordarán los siguientes objetivos parciales:

- Optimización de la separación cromatográfica de las distintas especies de azufre que se encuentran en la muestra.
- Identificación de las especies presentes en la muestra y determinación de la estequiometría S/proteína mediante ESI-QTOF.
- Cuantificación de las proteínas intactas contenidas en la muestra empleando un patrón genérico que contiene azufre, un flujo post-columna de  $^{34}\text{S}$  e ICPMS.

Por otro lado, desde el punto de vista académico, mediante este Trabajo Fin de Máster se pretende:

- Conocer los fundamentos y manejo de las técnicas instrumentales empleadas, en este caso cromatografía de líquidos, espectrometría de masas elemental y espectrometría de masas molecular y
- Familiarizarse con el análisis mediante dilución isotópica.
- Desarrollar la capacidad crítica para la correcta interpretación de los resultados obtenidos, pudiendo sacar conclusiones de los mismos.
- Desarrollo de la capacidad de trabajo tanto individual como en equipo y la capacidad de solucionar problemas.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

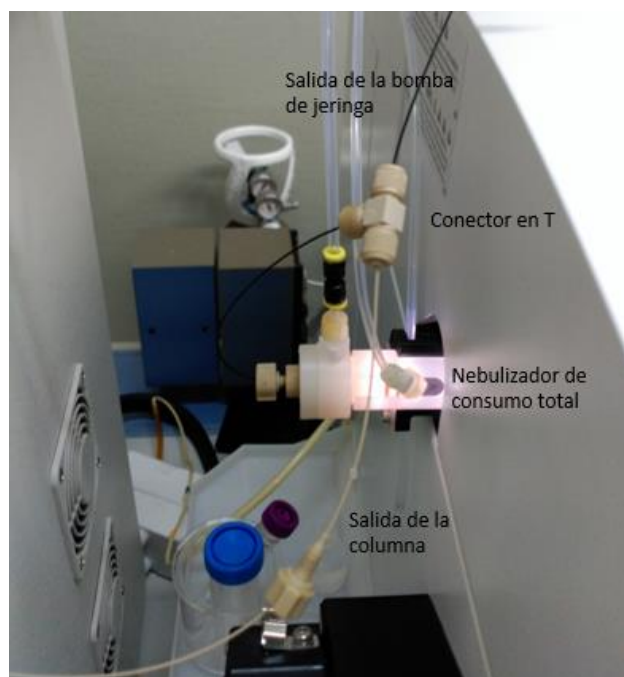
---

### 3.1. Instrumentación y reactivos

#### 3.1.1. Instrumentación

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo con un sistema HPLC capilar Agilent 1200 series (Alemania). La columna cromatográfica usada es una BIOshell™ A400 protein C4 (Sigma- Aldrich, Suiza) de 15 cm de longitud, 0,3 mm de diámetro interno y 3,4  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Los cromatogramas se realizaron a elevada temperatura, para ello se emplea un horno de columna Spark Holland (Mistral, Países bajos).

El flujo post-columna se añade empleando una jeringa Hamilton de 1 mL acondicionada por una bomba de jeringa digital KDS 410 (KD Scientific, EEUU). Para ello se emplea un conector en forma de T de 1/32" (Upchurch, EEUU) con un volumen muerto nulo. A esta T se unen el capilar que proviene de la columna (50 $\mu\text{m}$  d. i.) y el que proviene de la bomba de jeringa (100  $\mu\text{m}$  d.i.), al mismo tiempo la T se conecta al nebulizador mediante un capilar (75  $\mu\text{m}$  d. i.). El montaje experimental descrito se observa en la Figura 7.



*Figura 7: Montaje experimental del acoplamiento de cromatografía y dilución isotópica post-columna*

Se empleó un ICP-MS triple Quad 8800 de Agilent (Japón), Figura 8. El acoplamiento entre el capHPLC y el ICP se llevó a cabo con un nebulizador de consumo total de Agilent. El gas portador es Argon con un flujo de gas opcional de  $\text{O}_2$  que se añade directamente a la cámara de nebulización. Como gas de reacción se emplea  $\text{O}_2$ .



Figura 8: Esquema de los componentes del ICPQQQ

Para la identificación de las proteínas contenidas en la muestra de veneno se emplea un equipo ESI-QTOF Impact II™ Bruker corporation (Bremen, Alemania). Este equipo se acopla al sistema de capHPLC descrito con anterioridad.

### 3.1.2. Reactivos y material

Las disoluciones se preparan con agua MilliQ empleando un sistema ChemLabour Millipore (EEUU) con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . El acetonitrilo Optima LC/MS de Fisher Scientific (EEUU) se emplea como fase móvil B en la separación cromatográfica. Como par iónico para la separación se emplean ácido fórmico suministrado por Merk KGaA (Alemania). El patrón certificado de S para ICP de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  fue suministrado por Merck (Alemania). Para la cuantificación de compuestos de azufre se emplea como patrón interno BOC-Metionina-OH (BOC-Met) proporcionada por Sigma-Aldrich (Suiza). El patrón enriquecido de  $^{34}\text{S}$  (98,80%) empleado en el flujo post-columna está suministrado por ISOFLEX USA (EEUU).

Las muestras reales utilizadas son proporcionadas por el Dr. Juan José Calvete, director del laboratorio de venómica estructural del instituto de Biomedicina de Valencia (España) en forma de liofilizado y son almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

## 3.2. Procedimiento

### 3.2.1. Preparación de disoluciones

Fases móviles de fase reversa: Fase móvil A se prepara añadiendo 1 mL de ácido fórmico en 500 mL de agua MilliQ (0,2%). La fase móvil B empleada se prepara por adición de 600  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico en 300 mL de acetonitrilo (0,2%).

Disolución del patrón de BOC-Met: se disuelven 3 mg en 1 mL de agua MilliQ.

Tratamiento de muestras reales: las muestras de veneno se reciben en forma de liofilizado. Para su disolución se toma el total de veneno que se solubiliza en agua Milli Q, esta disolución resultante de centrifuga durante 2 min a 13000 rpm. Se toma el sobrenadante del que se hacen alícuotas para su almacenamiento a -20 °C.

### 3.2.2. Parámetros instrumentales

Se exponen a continuación, Tabla 1 y

Tabla 2, los parámetros empleados durante el análisis tanto del ICP-QQQ como del ESI-QTOF.

Tabla 1: Parámetros de medida del ESI-QTOF

<b>Parámetro</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor</b>
<i>End plate offset</i>	V	500
<i>Capillary</i>	V	4000
<i>Nebulizer</i>	psi	4,4
<i>Dry gas</i>	L/min	3,0
<i>Dry temperature</i>	°C	200
		300-
<i>Mass interval</i>		3000
<i>Spectra rate</i>	Hz	1,0

Tabla 2: Condiciones experimentales del ICP-QQQ

	<b>Parámetro</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor</b>
<i>ICP-MS</i>	<i>RF</i>	W	1550
	<i>Sampling depth</i>	mm	8
	<i>Carrier gas flow rate</i>	L/min	0,85
	<i>Makeup gas flow rate</i>	L/min	0
	<i>Option gas flow rate</i>	L/min	0,16
	<i>Cell gas</i>		O <sub>2</sub>
	<i>Cell gas flow rate</i>	mL/min	0,25
<i>Extraction lens</i>	<i>Extract 1</i>	V	-3
	<i>Extract 2</i>	V	-190
	<i>Omega</i>	V	8,7
	<i>Omega Bias</i>	V	-100
	<i>Q1 Bias</i>	V	-1

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1. Certificación de los estándares de azufre

Antes de comenzar con la cuantificación de proteínas, es necesaria la certificación del contenido de azufre de los estándares empleados, tanto el trazador de  $^{34}\text{S}$  como el patrón genérico (BOC-Met). Para la certificación de la concentración del trazador se emplea la dilución isotópica empleando para ello un patrón de S inorgánico. Mientras que para la determinación de la concentración del BOC-Met se realiza una curva de calibrado utilizando, también, un patrón de S inorgánico.

#### 4.1.1. Certificación del trazador de $^{34}\text{S}$ mediante IDA

Como resultado de las diferencias en la eficiencia en la extracción, en la transmisión y la detección de los iones en función de su masa, las medidas de las relaciones isotópicas mediante ICP-MS muestran una desviación con respecto al valor real. Este efecto, conocido como discriminación de masa, se produce por una transmisión preferencial de los isótopos más pesados y debe ser compensado en la medida de las relaciones isotópicas.<sup>40</sup>

Existen distintas formas de determinar este factor de discriminación de masa. La primera de ellas es emplear un patrón interno. Se emplea como patrón interno un elemento con una masa similar del cual se conocen con exactitud sus relaciones isotópicas. Este patrón se añade a la muestra, de manera que este elemento sufrirá una discriminación de masa similar a la del elemento de interés. El factor de discriminación (K) calculado empleando esta metodología, se aplica a la medida de las relaciones isotópicas del elemento que se estudia. La segunda metodología de determinación de este factor es la estandarización externa. En ella se calcula del factor de discriminación para una disolución que contiene un patrón isotópico del elemento de interés del cual se conocen con exactitud su composición. Finalmente, este factor de aplica a la medida de las relaciones isotópicas del elemento bajo estudio.

El empleo de una estandarización externa tiene como desventaja la variación que puede sufrir el factor de discriminación con el tiempo. Esto no ocurre con el uso de un patrón interno sobre la muestra, ya que el patrón y la muestra se analizan al mismo tiempo. Para la obtención de unos resultados más exactos con un patrón externo se mide la muestra precedido y seguido por el patrón, esto se conoce como bracketing. Con la medida del patrón antes y después de la muestra se obtienen dos valores de K, que reflejan la variación de éste con el tiempo, empleando una media de los dos para la corrección de las relaciones isotópicas medidas en la muestra.

Para el cálculo del factor K se emplea un patrón de S natural analizado al principio y al final de las medidas, cuatro réplicas para cada uno. Con esto se determina el factor K evaluando su estabilidad con el tiempo. Por otra parte, se analizan 3 disoluciones del trazador de  $^{34}\text{S}$  y 3 muestras de una mezcla de la disolución del trazador y el patrón de S natural, también cuatro réplicas de cada una (Figura 9). Las medidas se realizan mediante Inyección en flujo (FIA) empleando como gas portador Argon 0,85 L/min y el nebulizador de consumo total.

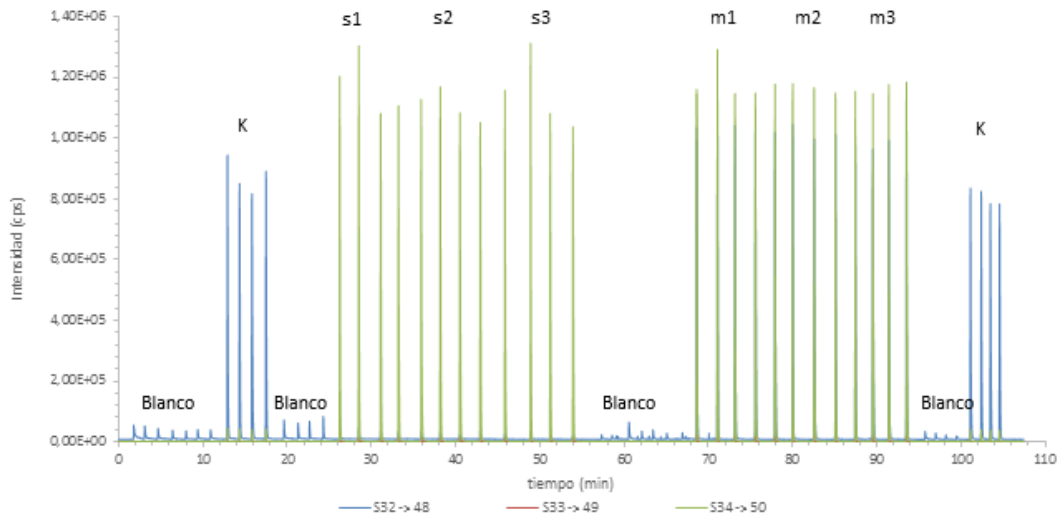


Figura 9: FIAgrama del trazador (s), la mezcla (m) y el patrón de S empleado para el cálculo del factor de discriminación (K). Se miden tres disoluciones distintas tanto del trazador como de la mezcla, con cuatro réplicas para cada una.

El factor de discriminación de masa, que se emplea para la corrección de las relaciones isotópicas. A partir de las medidas corregidas en el trazador (s1, s2, s3) se determinan las abundancias isotópicas de S en el trazador. Finalmente a partir de las medidas de las relaciones en la mezcla (m1, m2, m3) y la ecuación de la dilución isotópica (Ecuación 1)<sup>50</sup> se calcula la concentración de  $^{34}\text{S}$  en el trazador.

$$C_s = C_t \frac{W_t Aw_s A_t^a}{W_s Aw_t A_s^b} \frac{R_M - R_t}{1 - R_M R_s} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde,  $C_s$  es la concentración de azufre en la muestra,  $C_t$  la concentración de azufre en el trazador,  $W_s$  y  $W_t$  corresponden al peso de la muestra y el trazador respectivamente,  $Aw_s$  y  $Aw_t$  los pesos atómicos de la muestra y el trazador,  $A_t^a$  la abundancia de  $^{34}\text{S}$  en el trazador,  $A_s^b$  la abundancia de  $^{32}\text{S}$  en la muestra,  $R_M$  la relación  $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$  en la mezcla,  $R_t$  la relación  $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$  en el trazador y  $R_s$  es la relación  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  en la muestra.



Como ya se ha comentado anteriormente, antes de la aplicación de la ecuación 1, es necesario determinar el factor de discriminación K, según la Ecuación 2<sup>51</sup>

$$\ln\left(\frac{R_{exp}}{R_{teo}}\right) = K \cdot \Delta M \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde  $R_{exp}$  es la relación isotópica de azufre experimental y  $R_{teo}$  la relación teórica, K el factor de discriminación de masa que se pretende calcular y  $\Delta M$  la diferencia de masa entre los isótopos.

Las abundancias isotópicas de la muestra ( $A_s^b$ ), se calculan según la siguiente ecuación:

$$A_s^b = \frac{100}{\sum R_s} \quad (\text{Ecuación 3})$$

En la ecuación anterior,  $A_s^b$  corresponde a la abundancia del isótopo de referencia en la muestra en porcentaje y  $R_s$  las relaciones isotópicas de S.

El peso atómico del azufre en el trazador ( $Aw_t$ ) se calcula teniendo en cuenta las abundancias isotópicas de los distintos isótopos de azufre, haciendo una media de las tres medidas de la disolución de trazador estudiadas. Los resultados obtenidos son los siguientes: 2,128%  $^{32}\text{S}$ , 1,101%  $^{33}\text{S}$  y 96,772%  $^{34}\text{S}$ .

A partir de los datos mostrados en la Figura 9, las ecuaciones anteriores y sabiendo que la concentración del patrón de azufre natural es de 8,693 ppm, se obtienen los resultados recogido en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados experimentales obtenidos para el cálculo de la concentración de S en el trazador

	<b>Relación isotópica <math>^{34}\text{S}/^{32}\text{S}</math></b>	<b>Relación isotópica <math>^{33}\text{S}/^{32}\text{S}</math></b>	<b>K (%)</b>	<b>Ws</b>	<b>Wt</b>	<b>As <math>^{32}\text{S}</math></b>	<b>As <math>^{33}\text{S}</math></b>	<b>As <math>^{34}\text{S}</math></b>	<b>Ct (ppm)</b>
<i>k</i>	0,048	0,0081	-3,5	-	-	-	-	-	-
<i>s1</i>	46,876	0,4610	-	-	-	2,538	1,102	96,360	-
<i>s2</i>	43,011	0,5500	-	-	-	2,099	1,099	96,802	-
<i>s3</i>	52,571	0,6515	-	-	-	1,747	1,101	97,152	-
<i>m1</i>	1,195	-	-	0,2111	0,2061	-	-	-	9,801
<i>m2</i>	1,221	-	-	0,2083	0,2062	-	-	-	9,606
<i>m3</i>	1,259	-	-	0,205	0,206	-	-	-	9,637
<i>k</i>	0,047	0,0084	-4,9	-	-	-	-	-	-

El factor de discriminación de masa (K) se calcula teniendo en cuenta los valores obtenidos para todas las relaciones isotópicas, es decir,  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  y  $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$ . El factor K aplicado para la corrección de las relaciones isotópicas es la media de los valores de K obtenidos al comienzo y al final.

Según los datos de la tabla anterior y la ecuación 1, se calcula la concentración de azufre en el trazador para cada una de las disoluciones. El resultado final obtenido para la concentración de azufre en el trazador con su incertidumbre se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentración del trazador de  $^{34}\text{S}$  calculada empleando dilución isotópica. La incertidumbre corresponde a una desviación estándar ( $n=3$ )

	<b>[S] ppm</b>
trazador	$9,68 \pm 0,11$

#### 4.1.2. Certificación del patrón interno BOC-Metionina

El patrón interno de azufre empleado para la cuantificación, se certifica mediante calibración externa empleando otra vez el sistema de microinyección en flujo. Se prepara un calibrado con un patrón de S natural de concentraciones 0, 25, 50, 200, 200 y 300 ppb de S, cada disolución se mide 4 veces (Figura 10). Posteriormente se calcula la concentración de S de la disolución de BOC-Met a partir de la representación de la intensidad de los puntos del calibrado frente a la concentración. Cabe destacar que es posible calcular la concentración de BOC empleando una recta de calibrado con S inorgánico debido a que la respuesta del instrumento es independiente de la especie.

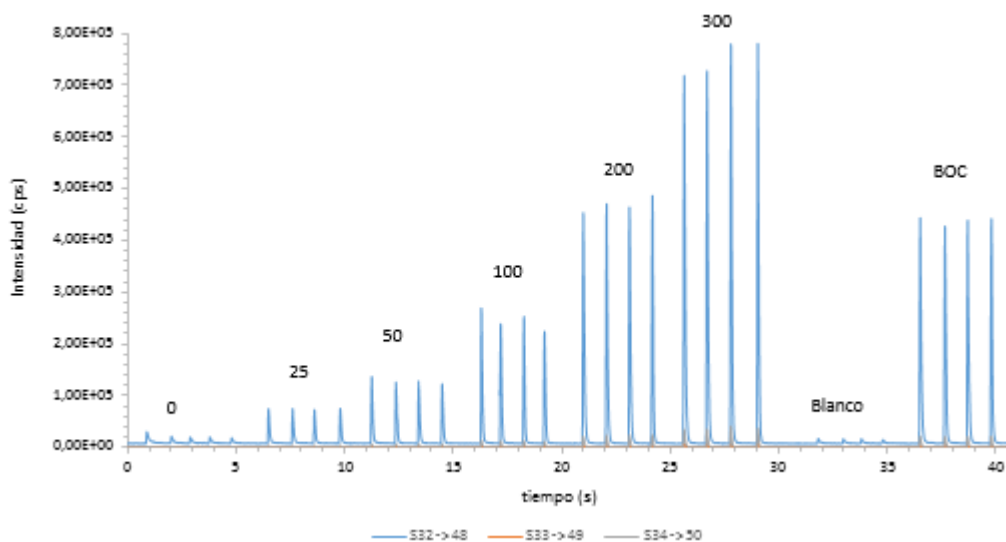


Figura 10: FIograma del calibrado de S y disolución de BOC-Met

A partir de los datos extraídos de la figura anterior y sabiendo que la concentración real de las disoluciones son: 0, 22, 43, 82,169 y 271 se crea la curva de calibrado correspondiente (Figura 11).

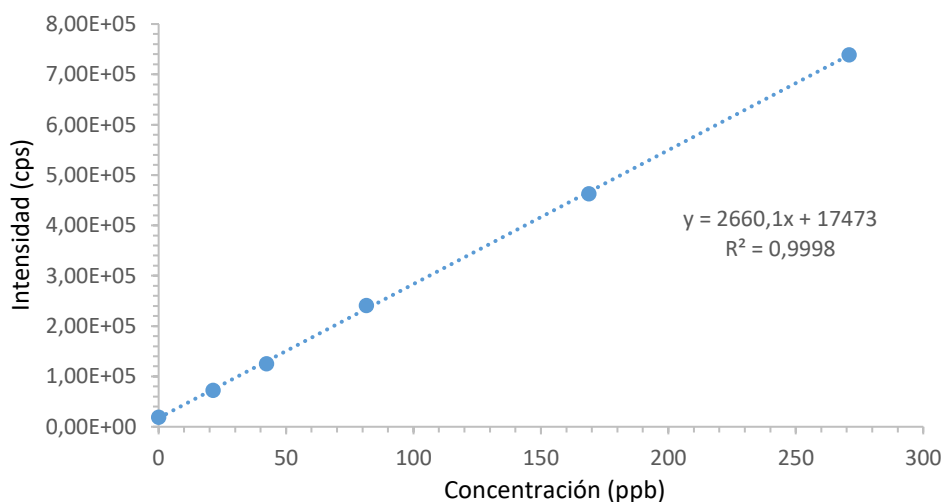


Figura 11: Curva de calibrado de S inorgánico.

Con los datos obtenidos de la curva de calibrado y los valores de intensidad de las réplicas de la disolución de BOC-Met, se calcula la concentración de ésta (Tabla 5).

Tabla 5: Concentración de BOC-Met. La incertidumbre corresponde a una desviación estándar (n=4)

	<b>[S] ppb</b>
BOC-Met	157 ± 3

#### 4.2. Optimización de la separación cromatográfica

Se describe a continuación la optimización de la separación de las distintas especies que contiene azufre presentes en las muestras reales. Existen ciertos parámetros que se pueden modificar en cromatografía de líquidos con el objetivo de conseguir mejores separaciones.

La eficiencia de la columna cromatográfica se expresa en función del número de platos teóricos (N), que se define como  $N = H/L$ , donde H es la altura de plato teórico y L la longitud de la columna. Mientras que el término H se define según la ecuación de Van Deemter:<sup>51</sup>

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_M + C_S) \cdot u \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde, A es el término de difusión de Eddy, B la difusión longitudinal y  $C_M$  y  $C_S$  se refieren a la resistencia a la transferencia de masa, la resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil y estacionaria respectivamente, y u es la velocidad lineal de flujo. A diferencia de cromatografía de gases, donde el valor del coeficiente de difusión de la fase móvil es elevado, el término B afecta en mucha menor medida al valor de H que los demás términos. Por tanto, los términos que se deben tener en cuenta para conseguir una altura de plato teórico menor, es decir, una mayor eficiencia son los términos A y C.

El término A de difusión se reduce considerablemente con el tipo de columna empleada. La fase estacionaria de la columna está formada por partículas con un núcleo sólido rígido recubierto de una capa porosa que contiene los grupos C4. Una fase estacionaria más compacta debido a este tipo de partículas junto con la presencia de un núcleo sólido en las mismas, hacen que la diferencia entre las trayectorias de difusión de los analitos sean más cortas, por tanto se reduce el término de difusión A. La Figura 12, se muestra un esquema con las diferencias en el término A de la ecuación de Van Deemter con el empleo de partículas convencionales y las nuevas partículas con núcleo sólido. Además, el empleo de una columna con un diámetro menor (capilar), hace que la diferencia existente entre los posibles caminos tomados por los analitos sea mucho menor que con el empleo de columnas convencionales, debido a la disminución del efecto muro.

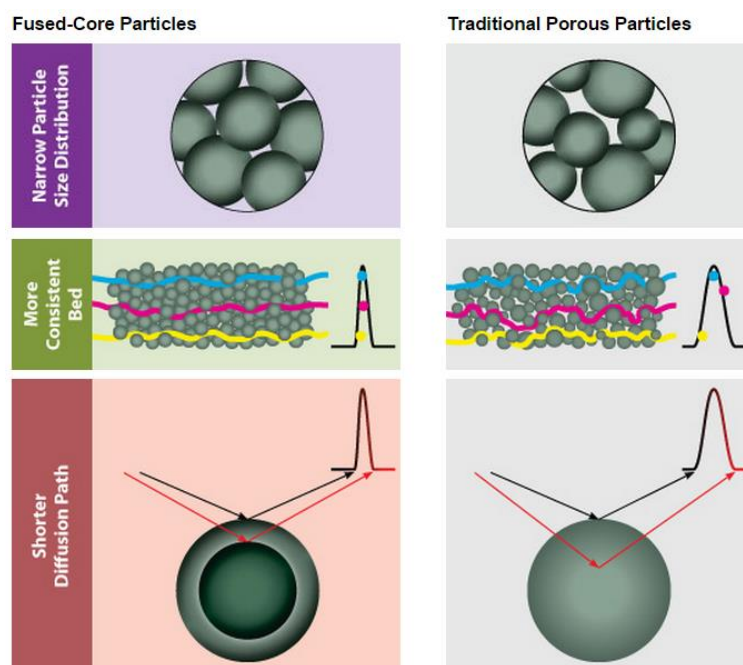


Figura 12: Efecto sobre el término A de la Ecuación de Van Deemter con el uso de una columna capilar.  
Fuente: SigmaAldrich

Otro factor a tener en cuenta en la optimización de la eficacia es la temperatura que, a pesar de no tener tanta influencia como en cromatografía de gases, aumenta el poder de elución de la fase móvil, reduciendo el tiempo de análisis y el porcentaje de fase orgánica necesaria para la elución de los compuestos. Esto se debe a la influencia de la temperatura en la viscosidad y la difusión de la fase móvil, que afecta al término C de la ecuación de Van Deemter. Un aspecto importante a tener en cuenta al modificar la temperatura es la posible degradación tanto de la fase estacionaria de la columna como la de los analitos de interés. En este caso la degradación de los compuestos no es tan importante, puesto que éstos son

destruidos en el plasma, persistiendo la información elemental. Por lo tanto, los parámetros a optimizar según lo explicado siguiendo la ecuación de Van Deemter son: la temperatura, las fases móviles de fase reversa empleadas, el gradiente y el flujo de fase móvil. Tanto la temperatura, como las fases móviles y el par iónico óptimos para la separación empleado fueron determinadas en estudios anteriores en el grupo de investigación<sup>52</sup>, siendo estos 80 °C, fase móvil A Agua/ácido fórmico 0,2% y fase móvil B ACN/ácido fórmico 0,2%.

#### 4.2.1. *Naja nigricollis*

El análisis de muestras complejas empleando ICPMS hace necesario, como se detalla en el apartado 1.4, una separación previa de las especies presentes en la muestra, debido a la naturaleza del instrumento. Por tanto, el primer paso para la cuantificación de las biomoléculas es la optimización de la separación cromatográfica.

Se realiza un estudio de las mejores condiciones de separación modificando el gradiente empleado y el flujo de fase móvil. En la Figura 13 se encuentran algunos de las separaciones llevadas a cabo.

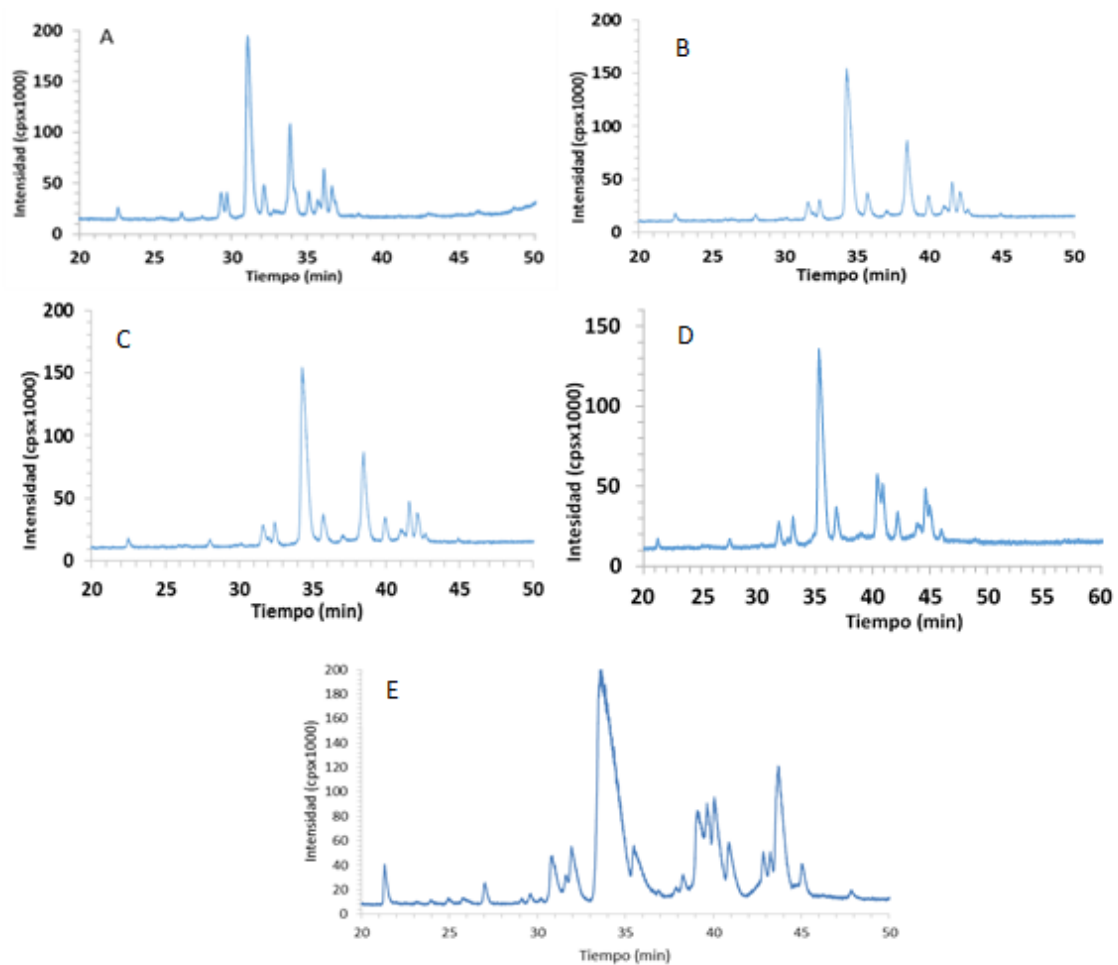


Figura 13: Optimización de la separación cromatográfica para la muestra *N. nigricollis* modificando el gradiente y el flujo de fase móvil, empleando una columna C4 a 80oC

A continuación, Tabla 6, se recogen las condiciones de la separación para cada uno de los cromatogramas anteriores.

Tabla 6: Condiciones cromatográficas de los cromatogramas de la Figura 13 para la muestra *N. nigricollis*.

<b>A</b>		<b>B</b>		<b>C</b>		<b>D</b>		<b>E</b>	
<b>tiempo (min)</b>	<b>%B</b>	<b>tiempo (min)</b>	<b>%B</b>	<b>tiempo (min)</b>	<b>%B</b>	<b>tiempo (min)</b>	<b>%B</b>	<b>tiempo (min)</b>	<b>%B</b>
0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
5	2	5	2	5	2	5	2	5	2
13	10	13	10	13	10	13	10	13	10
41	30	53	30	53	30	63	30	63	30
48	90	60	90	60	90	70	90	70	90
53	90	65	90	65	90	75	90	75	90
56	2	68	2	68	2	78	2	78	2
<b>Flujo (µL/min)</b>	<b>3,5</b>	<b>Flujo (µL/min)</b>	<b>3,5</b>	<b>Flujo (µL/min)</b>	<b>4,5</b>	<b>Flujo (µL/min)</b>	<b>4,5</b>	<b>Flujo (µL/min)</b>	<b>3,5</b>

A la vista de los cromatogramas obtenidos y la complejidad de la muestra se debe llegar a una situación de compromiso que proporcione la mejor separación para todas las especies. Se elige como mejor separación el cromatograma E de la Figura 13 debido a que con esta separación se consigue la separación de un mayor número de especies.

#### 4.2.2. *Micropechis ikaheka*

Análogamente a la muestra anterior, se realiza un estudio de las mejores condiciones de separación modificando el gradiente y el flujo de fase móvil empleadas en la cromatografía. En la Figura 14 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos.

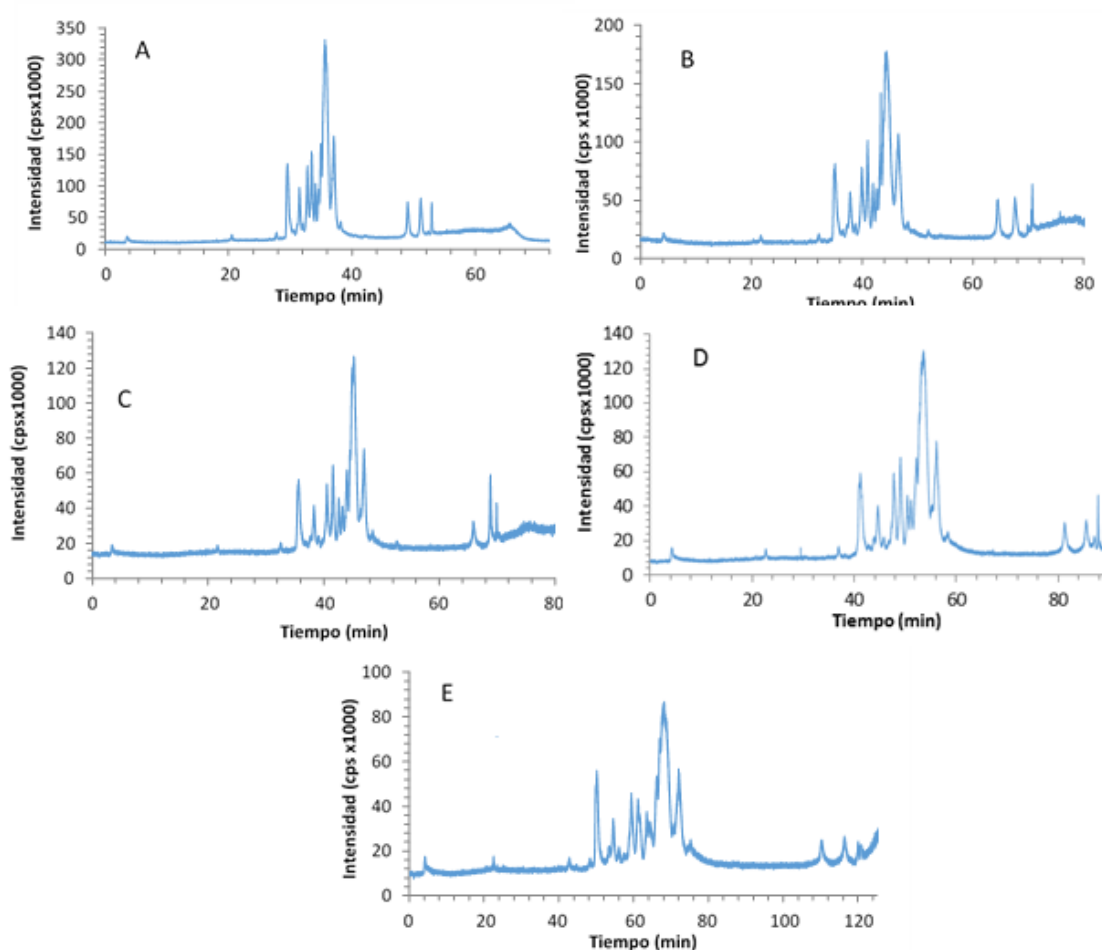


Figura 14: Optimización de la separación cromatográfica para la muestra *Micropechis ikaheka* modificando el gradiente y el flujo de fase móvil, empleando una columna C4 a 80°C

En la, Tabla 7 se recogen las condiciones para cada uno de los cromatogramas mostrados en la figura anterior.

Tabla 7: Condiciones cromatográficas de la optimización de la separación para la muestra *Micropechis Ikaheka*. Los cromatogramas correspondientes se muestran en la Figura 14

A		B		C		D		E	
tiempo (min)	%B	tiempo (min)	%B	tiempo (min)	%B	tiempo (min)	%B	tiempo (min)	%B
0	2	0	2	0	2	0	2	0	2
5	2	5	2	5	2	5	2	5	2
13	10	13	10	13	10	13	10	13	10
46	30	63	30	63	30	80	30	113	30
53	90	70	90	70	90	87	90	120	90
58	90	75	90	75	90	90	90	125	90
62	2	78	2	78	2	92	2	128	2
Flujo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	4,5	Flujo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	3,5	Flujo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	4,5	Flujo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	4,5	Flujo ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	4,5

A partir de los cromatogramas obtenidos con las condiciones empleadas se toman como mejores condiciones de separación las correspondientes al cromatograma B recogido en la Figura 14. Debido a la complejidad de la muestra y el elevado número de especies contenidas en la muestra se debe llegar a una situación de compromiso entre las distintas especies, de manera que con un solo cromatograma se obtenga la mayor cantidad de información posible. De nuevo, la elección de estas condiciones de separación se debe a la separación de un número mayor de especies, aunque éstas no se encuentren completamente resueltas.

### 4.3. Cálculo del Flujo másico empleando IDA post-columna

Como ya se ha comentado en la introducción, con el objetivo de corregir los cambios de sensibilidad asociados al gradiente cromatográfico de fase reversa, se emplea dilución isotópica post-columna. Para ello, se añade un flujo constante de un trazador de  $^{34}\text{S}$  después de la columna. La corrección se lleva a cabo calculando la relación entre la señal de  $^{32}\text{S}$  y la señal de  $^{34}\text{S}$ , para ello se monitoriza la señal de las transiciones  $32 \rightarrow 48$  y  $34 \rightarrow 50$ . A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 15 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Un cromatograma de intensidades donde se aprecia este aumento de la sensibilidad y el cromatograma con corrección de sensibilidad que se obtiene representando la relación de las señales correspondientes a las transiciones  $32 \rightarrow 48$  y  $34 \rightarrow 50$ .



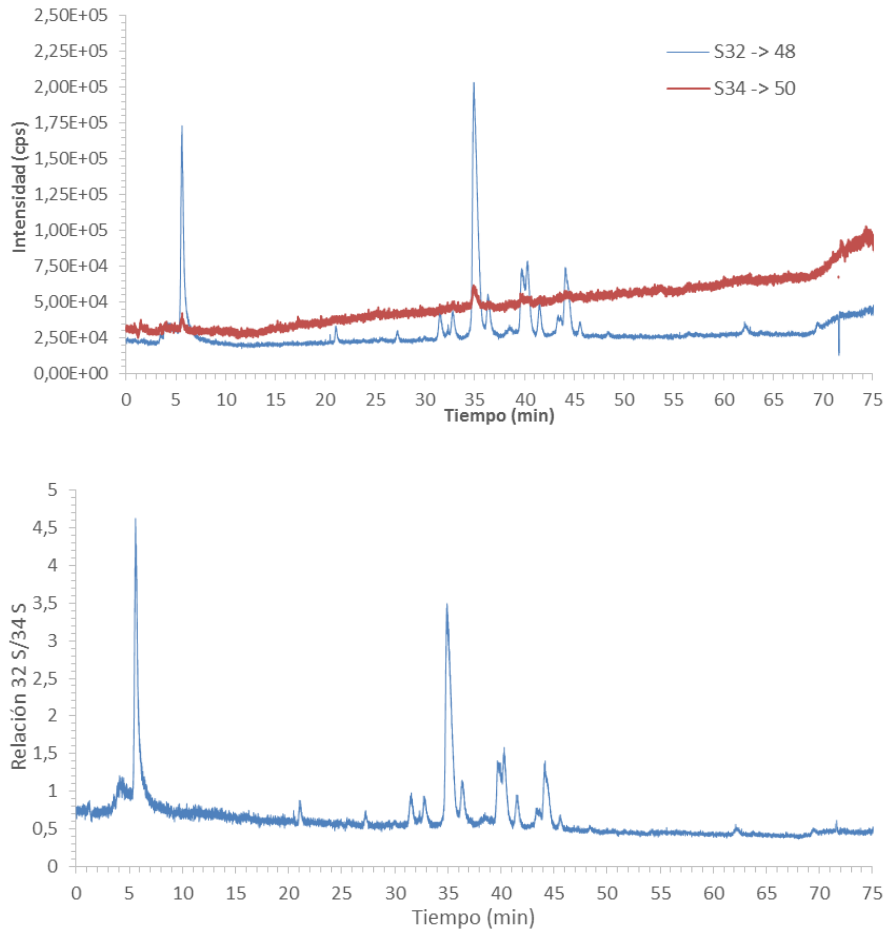


Figura 15: Cromatogramas de una muestra real. A) Cromatograma sin corrección de la sensibilidad de  $^{32}\text{S}$  (línea azul) y  $^{34}\text{S}$  (línea roja). B) Cromatograma después de corregir el aumento de sensibilidad con la relación  $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ . Las separaciones se llevaron a cabo empleando fase reversa, con una columna C4 a  $80^\circ\text{C}$ , empleando como fases móviles agua y ACN 0,2% ácido fórmico, con un gradiente de 0-2, 5-2, 13-10, 53-30, 60-90, 65-95, 98-2 (Tiempo, % fase móvil B)

Además, es necesario transformar el cromatograma de la relación isotópica con el tiempo en flujo másico, de manera que se pueda obtener la cantidad de azufre con la integración de cada pico cromatográfico. La transformación se lleva a cabo con la siguiente ecuación:

$$M_m = C_t \cdot d_t \cdot f_t \frac{A_{w_m}}{A_{w_t}} \frac{A_t^b}{A_m^a} \frac{R_M - R_t}{1 - R_M R_m} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde  $M_m$  es el flujo másico de la muestra en  $\text{ng S}/\text{min}$ ,  $C_t$  la concentración de trazador,  $f_t$  el flujo del trazador en  $\text{mL}/\text{min}$  y  $d_t$  la densidad del trazador en  $\text{g}/\text{mL}$ . De manera que después del empleo de la ecuación anterior la integración de cada uno de los picos cromatográficos nos proporciona la masa del elemento monitorizado, en este caso la cantidad de S.

#### 4.4. Cálculo de la recuperación cromatográfica

Al cuantificar por integración directa de los picos del cromatograma de flujo másico, es necesario tener en cuenta la recuperación de la columna, puesto que este factor afecta a la concentración de proteína calculada. Por lo tanto, es necesario asegurar que bajo las condiciones de medida, la recuperación cromatográfica es cuantitativa para cualquier especie. Debido a la complejidad de nuestras muestras y la falta de patrones específicos para cada una de las especies, no es posible el cálculo individual para cada especie. Sin embargo, es posible calcular la recuperación para todas las especies presentes en la muestra sin necesidad de patrones específicos. Con el objetivo de demostrarlo se llevan a cabo dos análisis para las muestras: un análisis cromatográfico y un análisis directo por inyección en flujo. Ambos, el cromatograma y el FIograma se convierten en flujo másico. La integración de todos los picos cromatográficos nos proporciona la cantidad de S total que eluye de la columna. La comparación de esta cantidad con la obtenida de la integración del único pico de S obtenido en FIA (todas las especies llegan juntas al plasma) proporciona la recuperación de proteína de la columna empleando la ecuación siguiente.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Área cromatografía}}{\text{Área FIA}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Evidentemente, la Ecuación 6 sólo es válida cuando se asegura la sensibilidad constante a lo largo de todo el gradiente. Esto se consigue empleando la dilución isotópica post-columna

##### 4.4.1. *Naja nigricollis*

Aplicando lo explicado se calcula la recuperación cromatográfica para la primera de las muestras, *Naja Nigricollis*, realizando un FIA donde se inyectan un blanco y la muestra (cuatro veces cada uno de ellos) y una separación cromatográfica (por duplicado). El cromatograma y FIograma obtenidos se muestran en la Figura 16 y Figura 17.

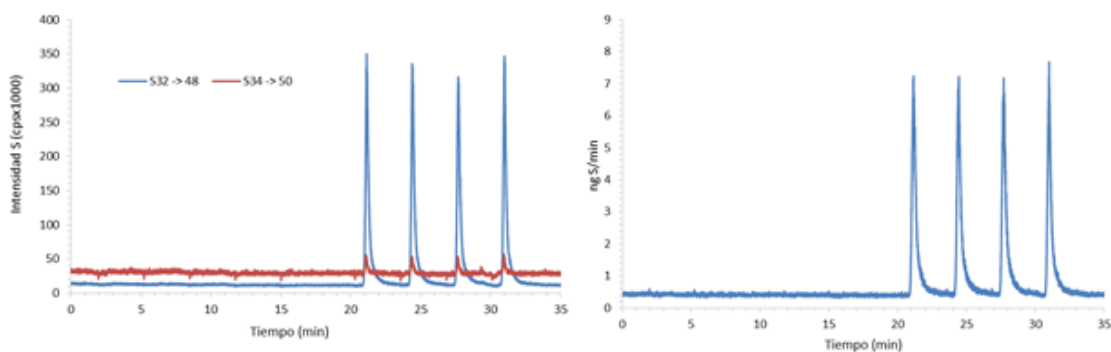


Figura 16: FI Agrama de la muestra *N. nigricollis* con un flujo de 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  de fase móvil, un flujo post-columna de trazador (798 ppb) de 1,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A la izquierda FI Agrama de las señales de  $^{32}\text{S}$  (línea azul) y  $^{34}\text{S}$  (línea roja). A la derecha conversión del FI Agrama a flujo másico

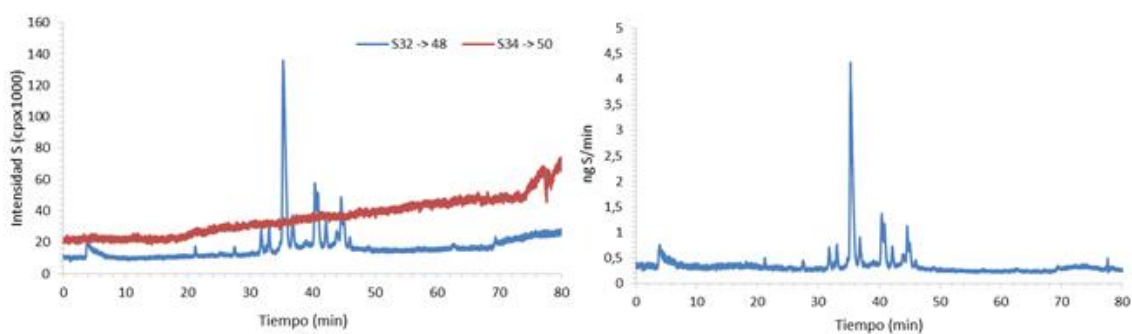


Figura 17: Cromatograma de la muestra *N. nigricollis*. A la izquierda cromatograma de las señales de  $^{32}\text{S}$  (línea azul) y  $^{34}\text{S}$  (línea roja). A la derecha conversión del cromatograma a flujo másico. Las separaciones fueron llevadas a cabo empleando una columna C4 a 80°C, con un flujo de fase móvil de 4,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , fase móvil A agua/0,2% ácido fórmico y fase móvil B ACN/0,2% ácido fórmico, con un gradiente de fase reversa de 0-2, 5-2, 13-10, 63-30, 70-90, 75-90, 78-2 (tiempo - % fase móvil B) y un flujo post-columna de trazador (798 ppb) de 1,5  $\mu\text{L}/\text{min}$

Por integración del FI Agrama anterior obtenemos la cantidad de azufre en la muestra y en el caso del cromatograma obtenemos la cantidad de azufre que eluye de la columna, empleando la Ecuación 6 se calcula la recuperación cromatográfica que se encuentra recogida en la Tabla 8.

Tabla 8: Recuperación cromatográfica de la muestra *N. nigricollis*. La incertidumbre se corresponde con una desviación estándar ( $n=2$ ).

<b><i>Naja Nigricollis</i></b>	
Recuperación (%)	$97 \pm 3$

Como se observa en la tabla anterior, el resultado obtenido demuestra que la recuperación cromatografía es cuantitativa en las condiciones de medida.

#### 4.4.2. *Micropechis ikaheka*

De la misma manera que en el caso anterior, se calcula la recuperación para la muestra *Micropechis ikaheka* siguiendo el mismo procedimiento. A continuación, Figura 18 y Figura 19, se muestran el FIograma y cromatograma para dicha muestra real.

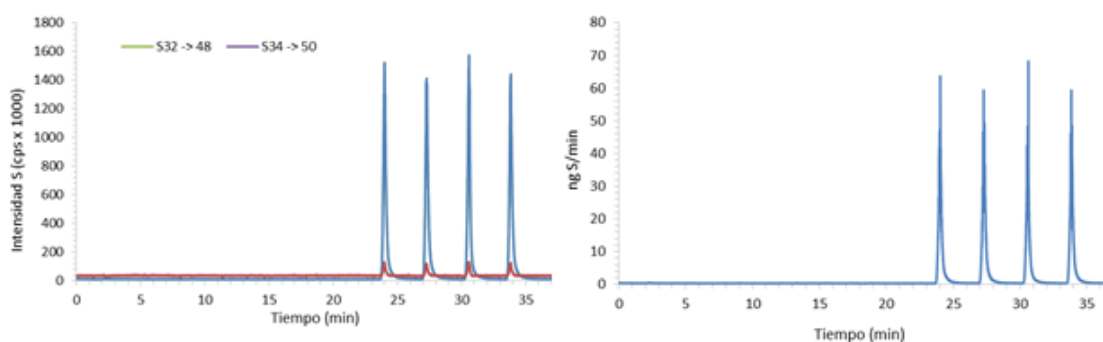


Figura 18: FIograma de la muestra *Micropechis ikaheka* con un flujo de 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  de fase móvil, un flujo post-columna de trazador (798 ppb) de 1,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A la izquierda FIograma de las señales de  $^{32}\text{S}$  (línea azul) y  $^{34}\text{S}$  (línea roja). A la derecha conversión del FIograma a flujo másico

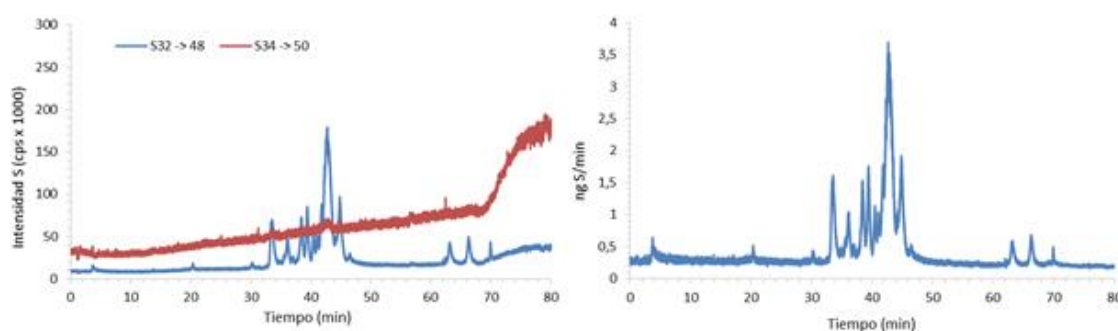


Figura 19: Cromatograma de la muestra *Micropechis ikaheka*. A la izquierda cromatograma de las señales de  $^{32}\text{S}$  (línea azul) y  $^{34}\text{S}$  (línea roja). A la derecha conversión del cromatograma a flujo másico. Las separaciones fueron llevadas a cabo empleando una columna C4 a 80°C, con un flujo de fase móvil de 4,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , fase móvil A agua/0,2% ácido fórmico y fase móvil B ACN/0,2% ácido fórmico, con un gradiente de fase reversa de 0-2, 5-2, 13-10, 63-30, 70-90, 75-90, 78-2 (tiempo - % fase móvil B) y un flujo post-columna de trazador (798 ppb) de 1,5  $\mu\text{L}/\text{min}$

A partir de los resultados mostrados en las figuras anteriores se calcula la recuperación cromatográfica (Tabla 9) del mismo modo que con la muestra anterior.

Tabla 9: Recuperación cromatográfica de la muestra *Micropechis Ikaheka*. La incertidumbre se corresponde con una desviación estándar ( $n=2$ ).

<b><i>Micropechis Ikaheka</i></b>	
Recuperación (%)	98 $\pm$ 5

En este caso, la recuperación cromatográfica para esta muestra es de nuevo cuantitativa. Estos resultados de recuperación cuantitativa son muy importantes ya que este parámetro es uno de los limitantes para llevar a cabo cuantificación de proteínas mediante análisis de la proteína intacta.

#### 4.5. Identificación de las distintas especies mediante espectrometría de masas molecular

Además del análisis elemental de ICP-MS se lleva a cabo en paralelo un análisis molecular empleando ESI-QTOF con las condiciones cromatográficas optimizadas para cada muestra. Como se ha comentado, una de las desventajas del uso de ICP es la pérdida de información estructural de las especies. Este problema se soluciona con un análisis mediante espectrometría de masas molecular con una fuente de electrospray, que permite la identificación de las especies por determinación de la masa exacta de cada una de las especies presentes en la muestra (y en el caso de ser requerido un análisis estructural por MSMS). Una vez obtenidos los valores de masa exacta se comparan con los valores de masa calculados para cada muestra, que se encuentran en la base de datos del “National Center for Biotechnological Information” (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Una vez conocida la secuencia de aminoácidos de las proteínas presentes en la muestra, se puede transformar la cantidad de azufre de cada uno de los picos cromatográficos en cantidad de proteína de una manera sencilla.

##### 4.5.1. *Naja nigricollis*

El análisis mediante espectrometría de masas molecular se llevan a cabo usando las mismas condiciones cromatográficas elegidas en el apartado 4.2.1. En la Figura 20 se muestra el cromatograma obtenido con ESI-QTOF, con la numeración correspondiente a las proteínas identificadas, que se proporcionarán más adelante en la Tabla 10.

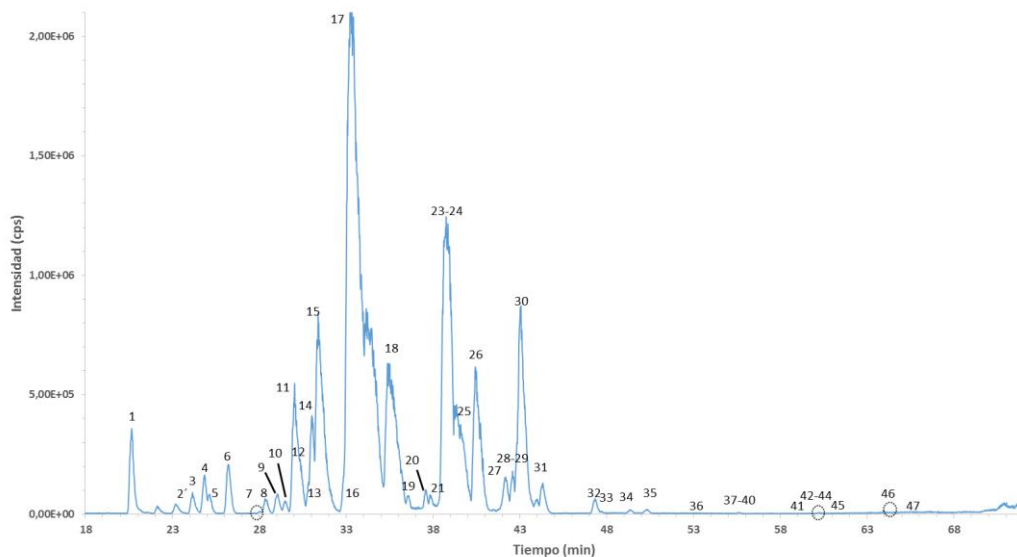


Figura 20: Cromatograma obtenido mediante ESI-QTOF empleando una columna C4, 80 °C, un flujo de 3,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  y un gradiente de 0-2, 5-2, 13-10, 63-30, 70-90, 75-90, 78-2 (tiempo,% fase móvil B)

En la figura anterior se encuentra el cromatograma obtenido en las condiciones óptimas elegidas con el ICP empleando ESI. En el cromatograma muestra las 47 especies encontradas. Para su identificación mediante bases de datos es necesario el cálculo de la masa exacta.

Al tratarse de una fuente de electrospray se producen iones con múltiples cargas de cada una de las especies presentes en la muestra, de manera que en el espectro de masas se aprecian diferentes  $m/z$  de la misma proteína que se corresponden con las cargas del ion formado (patrón de cargas). Si la resolución del equipo es suficiente y la masa de la proteína no demasiado elevada, se puede obtener en las distintas  $m/z$  el patrón isotópico de la proteína. Esto permite el cálculo de la masa exacta de dos maneras diferentes: empleando el patrón isotópico o el patrón de cargas en caso de que la resolución no sea suficiente.

Empleando el patrón isotópico el procedimiento a seguir es el siguiente: se calcula la carga de la especie por diferencia entre los picos. La diferencia entre dos picos contiguos debería ser 1 ( $\Delta m/z=1$  cuando  $z=1$ ), de manera que si la diferencia es menor que 1 la carga también será distinta de la unidad. Una vez obtenida la carga se calcula la masa exacta multiplicando la relación  $m/z$  del primer pico del patrón isotópico, es decir la masa monoisotópica, por el número de cargas y restando el número equivalente de protones a las cargas. En la Figura 21 se muestra, a modo de ejemplo, el patrón isotópico para la especie que se corresponde en el cromatograma anterior con la proteína número 15 a un tiempo de retención de 31,4 minutos.

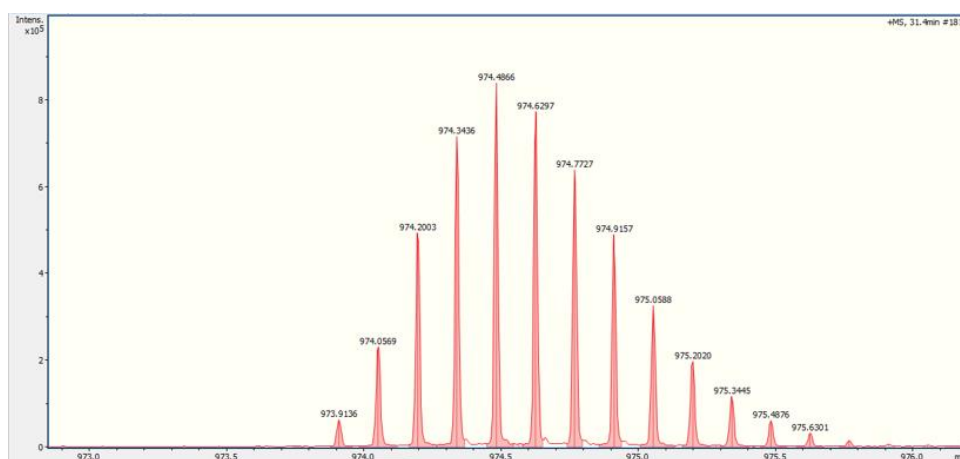


Figura 21: Patrón isotópico del pico mayoritario de la muestra *N. nigricollis* mostrado en el cromatograma de la Figura 20

A partir del patrón isotópico anterior se obtiene el valor de la masa exacta para la especie, en este caso es de 6810,3 Da.

Si la resolución no es la suficiente para separar claramente los componentes del patrón isotópico se emplea el patrón de cargas. En este caso para el cálculo se emplea la diferencia entre conjuntos de picos para el cálculo de la masa y la carga de la proteína, empleando las siguientes ecuaciones.

$$\frac{m}{z} = x ; \frac{m+1}{z+1} = y \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde x es la relación m/z menor e y es la m/z mayor. A continuación, Figura 22, se muestra el patrón de cargas para especie que corresponde al número 44 del cromatograma anterior que eluye a un tiempo de retención de 60,3 minutos.

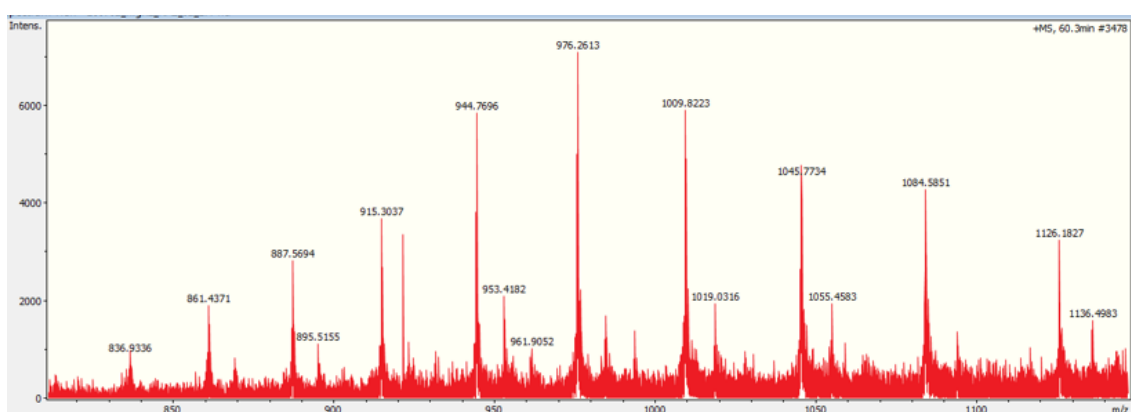


Figura 22: Patrón de cargas de un pico minoritario de la muestra *N. Nigricollis* mostrado en el cromatograma de la Figura 20

Resolviendo el sistema de ecuaciones resultante con los datos obtenidos a partir de la figura anterior se determina la masa exacta de la proteína, en este caso el resultado es 29257,3 Da. Análogamente a los casos anteriores se identifican todas las especies contenidas en la muestra de veneno mediante el cálculo de la masa exacta.

Principalmente en los venenos de serpiente se encuentran entre 3 y 4 familias de proteínas. Las principales son las 3FTx, o 3-finger toxins, las cuales son toxinas no enzimáticas. Otra familia son las fosfolipasas (PLA2), las cuales tienen actividad citotóxica. En menor grado se encuentran metaloproteinasas (SVMPs, snake venom metalloproteinases), endonucleasas, y otras proteínas minoritarias de elevado peso molecular (30-50 KDa).

Aunque para realizar la identificación de las proteínas es necesario el empleo de bases de datos, como se mencionó anteriormente, se puede realizar una primera asignación de la familia a la que pertenece cada proteína en base a su peso molecular, siguiendo las directrices del experto en proteómica con el cual se colabora en este estudio, el Dr. Juan José Calvete. De esta forma, las FTx tienen una masa molecular entre 6 y 7 KDa, las PLA2 de alrededor de 13

KDa, las SVMPs de 42-50 KDa y las endonucleasas de alrededor de 30 KDa. Según estos datos, en la Tabla 10 se muestran cada una de las proteínas identificadas en la Figura 20 con sus pesos moleculares.

*Tabla 10: Identificación de proteínas de la muestra N. nigricollis empleando espectrometría de masa molecular*

<b>Proteína</b>	<b>Tipo</b>	<b>Peso Molecular, Da</b>
1	3Ftx	7066,2
2	3Ftx	7466,6
3	3Ftx	7422,4
4	3Ftx	6858,4
5	3Ftx	6892,6
6	3Ftx	6875,0
7	3Ftx	7768,5
8	3Ftx	7786,5
9	3Ftx	7277,3
10	3Ftx	6750,3
11	3Ftx	7212,3
12	3Ftx	7246,2
13	3Ftx	6826,3
14	3Ftx	6781,4
15	3Ftx	6810,3
16	3Ftx	6766,3
17	3Ftx	6815,3
18	3Ftx	6682,2
19	3Ftx	6732,3
20	3Ftx	6680,2
21	3Ftx	13271,9
22	3Ftx	6882,4
23	PLA2	13229,8
24	3Ftx	6813,3
25	PLA2	13246,9
26	3Ftx	6814,3
27	PLA2	13293,8
28	PLA2	13234,7
29	3Ftx	1473,8
30	3Ftx	7047,3
31	PLA2	13195,7
32	PLA2	13091,2
33	PLA2	13073,2
34	Minoritarias	5314,2
35	Minoritarias	5312,2
36	Minoritarias	50000
37	Minoritarias	19429,3



38	Minoritarias	19039,2
39	Minoritarias	19126,2
40	Minoritarias	19342,3
41	Minoritarias	20000
42	SVMP	46832,9
43	SVMP	46194,7
44	Endonucleasa	29267,5
45	Endonucleasa	29524,7
46	Endonucleasa	25028,3
47	Endonucleasa	25046,3

#### 4.5.2. *Micropechis ikaheka*

De la misma manera que en el caso anterior se emplean las condiciones óptimas de la separación obtenidas empleando ICP-MS para la identificación de las distintas especies presentes en la muestra empleando espectrometría de masas molecular. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 23.

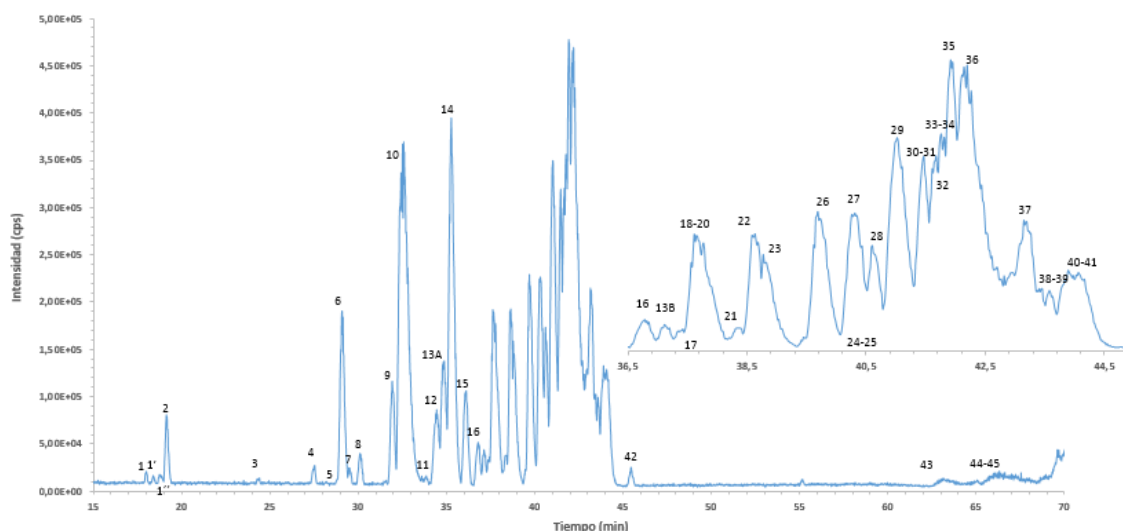


Figura 23: Cromatograma obtenido mediante ESI-QTOF empleando una columna C4, 80 °C, un flujo de 4,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  y un gradiente de 0-2, 5-2, 13-10, 63-30, 70-90, 75-90, 78-2 (tiempo, % fase móvil B). El cromatograma mostrado en la parte derecha se corresponde con una ampliación del cromatograma anterior desde un tiempo de retención de 36,5 hasta 44,5 minutos

En la figura anterior se muestran las 45 especies encontradas. Igual que en caso anterior, para su identificación se calcula la masa exacta para cada una de ellas. Posteriormente, según el peso molecular obtenido para cada especie se asigna a una familia de proteínas. En la Tabla 11 se recogen las proteínas identificadas.

Tabla 11: Identificación de proteínas de la muestra *Micropechis ikaheka* empleando espectrometría de masa molecular

<b>Proteína</b>	<b>Tipo</b>	<b>Peso Molecular, Da</b>
1	3Ftx	6675,8
2	3Ftx	7470,3
3	3Ftx	7515,4
4	3Ftx	6656,1
5	3Ftx	7145,1
6	3Ftx	6638,1
7	3Ftx	6638,1
8	3Ftx	7504,3
9	3Ftx	6546,9
10	PLA2	14032,5
11	PLA2	12380,1
12	3Ftx	7584,4
13	3Ftx	7543,4
14	3Ftx	7822,5
15	3Ftx	7853,5
16	3Ftx	7666,4
13 b	3Ftx	7543,4
17	PLA2	13873,2
18	PLA2	13892,2
19	PLA2	13942,2
20	3Ftx	7525,4
21	PLA2	13991,3
22	PLA2	13358,7
23	PLA2	14008,3
24	PLA2	13879,2
25	PLA2	13916,2
26	PLA2	13897,2
27	PLA2	13766,2
28	3Ftx	7794,6
29	PLA2	14009,2
30	PLA2	14029,2
31	PLA2	13854,2
32	3Ftx	7638,4
33	PLA2	13767,2
34	PLA2	13822,2
35	PLA2	13872,2
36	PLA2	13841,3
37	PLA2	13927,2
38	PLA2	13856,2
39	PLA2	13884,2
40	PLA2	13898,2

41	PLA2	13871,1
42	Minoritaria	5696,8
43	SVMP	51559,5
44	SVMP	49343,0
45	SVMP	49187,5

#### 4.6. Cuantificación absoluta de proteínas

Se realiza la cuantificación absoluta de proteínas empleando dilución isotópica y un patrón interno, BOC-Met, previamente certificado. De la misma manera que en caso del cálculo de la recuperación cromatográfica, para la cuantificación se emplea el cromatograma de flujo másico. A pesar de que la integración de este cromatograma proporciona directamente la cantidad del elemento de interés, se emplea un patrón interno con el objetivo de eliminar cualquier variabilidad producida en el volumen de inyección. Además, corrige las variaciones que vienen del flujo post-columna de trazador, debido a la imposibilidad de controlar la presión en la bomba de jeringa. Los parámetros afectados por este hecho son  $C_t$ ,  $f_t$  y  $d_t$  de la ecuación (ecuación 6) del flujo másico.

De esta manera se obtiene la cantidad de S presente en cada muestra mediante la integración de los picos del cromatograma de flujo másico. La concentración de S se calcula a partir de la relación de áreas de entre cada especie y el patrón interno (BOC-Met), previamente certificado, según la Ecuación 8.

$$\text{Concentración } S \text{ proteína} = \frac{\text{Área de pico proteína}}{\text{Área BOC}} \cdot \text{Concentración BOC} \quad (\text{Ecuación 8})$$

##### 4.6.1. *Naja nigricollis*

Después de la selección de la mejor de separación y la identificación de las distintas especies empleando espectrometría de masas molecular, se determina la cantidad de cada una de las mismas según lo explicado en el apartado anterior. Para ello la muestra se analiza por triplicado, en la Figura 24 se encuentra uno de los cromatogramas obtenidos y su transformación de cromatograma de intensidades a flujo másico. El patrón interno genérico eluye a 6 min.

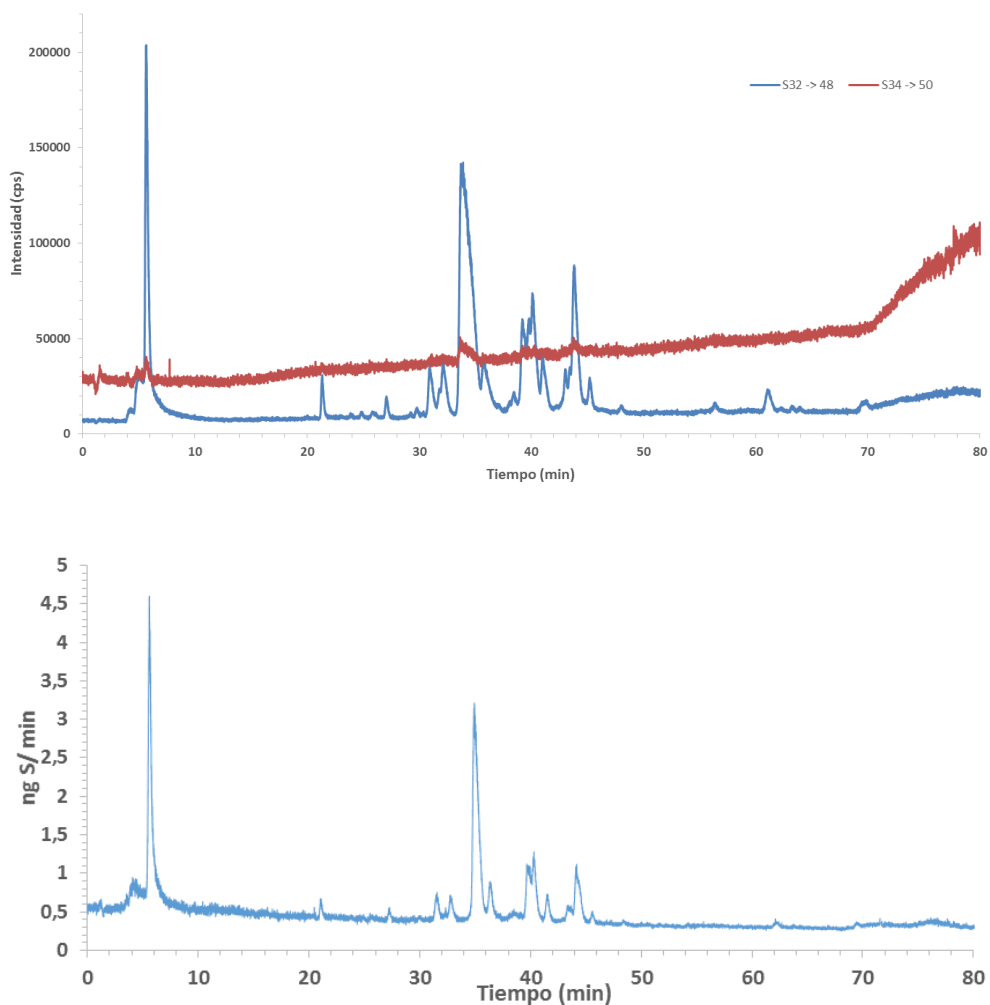


Figura 24: En la parte superior: Cromatograma de intensidades de la muestra *N. nigricollis*. En la parte inferior: Cromatograma de flujo másico. Se emplea una columna C4, 80 °C, con un flujo de 4,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  y con un gradiente de 0-2,5-2,13-10, 63-30, 70-90, 75-90, 78-2 (tiempo,% fase móvil B), 4,83 ppm de patrón interno (BOC-Met) y un flujo post-columna de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  de 798 ppb de trazador.

A partir de la identificación de especies proporcionada por el análisis mediante ESI-MS se determina la concentración de cada proteína (Tabla 12 **Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**). Para ello es necesario conocer el número de azufres que contiene cada proteína, a fin de poder transformar la concentración de azufre en concentración de proteína. En nuestro caso particular, y siguiendo las directrices nuevamente del Dr. Juan José Calvete, se asignó una estequiometría de 10 S/proteína para las FTx, 16 S/proteína para las PLA2, 40 para las SVMs, 8 para las endonucleasas, etc.

La cuantificación de los picos que no están completamente resueltos a línea de base se estima mediante delimitación vertical, lo que conlleva un aumento del error cometido en la cuantificación debido a la integración, que ha de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los

resultados. De igual forma, cabe mencionar que tanto en esta muestra como en la siguiente, en los casos en los que coeluyen varias proteínas, debido a la imposibilidad de determinar la proporción de cada una de ellas en el pico cromatográfico, se cuantifica asumiendo una contribución equitativa de las mismas al pico.

Tabla 12: Cuantificación de las especies presentes en la muestra *N. nigricollis*. La incertidumbre se corresponde a una desviación estándar (n=3)

<b>Proteína</b>	<b>Tipo</b>	<b>Peso Molecular, Da</b>	<b><math>\mu\text{mol prot/g veneno}</math></b>
1	3Ftx	7066,2	0,102 $\pm$ 0,003
2	3Ftx	7466,6	0,018 $\pm$ 0,001
3	3Ftx	7422,4	0,015 $\pm$ 0,001
4	3Ftx	6858,4	0,025 $\pm$ 0,001
5	3Ftx	6892,6	
6	3Ftx	6875,0	0,056 $\pm$ 0,002
7	3Ftx	7768,5	<0,005
8	3Ftx	7786,5	0,009 $\pm$ 0,002
9	3Ftx	7277,3	0,018 $\pm$ 0,001
10	3Ftx	6750,3	0,005 $\pm$ 0,002
11	3Ftx	7212,3	1,75 $\pm$ 0,13
12	3Ftx	7246,2	0,651 $\pm$ 0,016
13	3Ftx	6826,3	
14	3Ftx	6781,4	
15	3Ftx	6810,3	2,145 $\pm$ 0,074
16	3Ftx	6766,3	23,94 $\pm$ 0,67
17	3Ftx	6815,3	
18	3Ftx	6682,2	3,275 $\pm$ 0,086
19	3Ftx	6732,3	0,169 $\pm$ 0,005
20	3Ftx	6680,2	0,150 $\pm$ 0,004
21	3Ftx	13271,9	0,542 $\pm$ 0,014
22	3Ftx	6882,4	3,365 $\pm$ 0,090
23	PLA2	13229,8	
24	3Ftx	6813,3	2,416 $\pm$ 0,063
25	PLA2	13246,9	2,611 $\pm$ 0,068
26	3Ftx	6814,3	2,023 $\pm$ 0,052
27	PLA2	13293,8	0,571 $\pm$ 0,026
28	PLA2	13234,7	0,438 $\pm$ 0,020
29	3Ftx	1473,8	3,58 $\pm$ 0,17
30	3Ftx	7047,3	
31	PLA2	13195,7	0,577 $\pm$ 0,027
32	PLA2	13091,2	0,107 $\pm$ 0,005
33	PLA2	13073,2	<0,005
34	Minoritarias	5314,2	<0,005
35	Minoritarias	5312,2	<0,005

36	Minoritarias	50000	<0,005
37	Minoritarias	19429,3	0,346 ± 0,020
38	Minoritarias	19039,2	
39	Minoritarias	19126,2	
40	Minoritarias	19342,3	
41	Minoritarias	20000	0,010 ± 0,006
42	SVMP	46832,9	0,267 ± 0,01
43	SVMP	46194,7	
44	Endonucleasa	29267,5	
45	Endonucleasa	29524,7	0,137 ± 0,020
46	Endonucleasa	25028,3	0,088 ± 0,009
47	Endonucleasa	25046,3	0,120 ± 0,007

En la tabla anterior se muestran los resultados para la cuantificación de las distintas especies clasificadas por familias, dados en  $\mu$ moles de proteína por gramo de veneno inicial. Debido a la complejidad de la muestra hay proteínas que no se pueden separar en estas condiciones, por lo tanto la cuantificación dada es conjunta. De la misma manera se puede calcular el porcentaje de cada familia presente en la muestra. Los resultados se recogen en la Tabla 13.

Tabla 13: Porcentaje de cada una de las familias presentes en la muestra de *N. nigricollis*. La incertidumbre se corresponde a una desviación estándar ( $n=3$ )

	<b>% familia</b>
3Ftx	71,0 ± 0,5
PLA2	22,7 ± 0,2
SVMP	2,4 ± 0,1
Minoritarias	3,9 ± 0,2

#### 4.6.2. *Micropechis ikaheka*

Análogamente a la muestra anterior, se lleva a cabo la cuantificación de las distintas especies. Se encuentra en la Figura 25 uno de los cromatogramas obtenidos así como su transformación de intensidades en flujo másico.

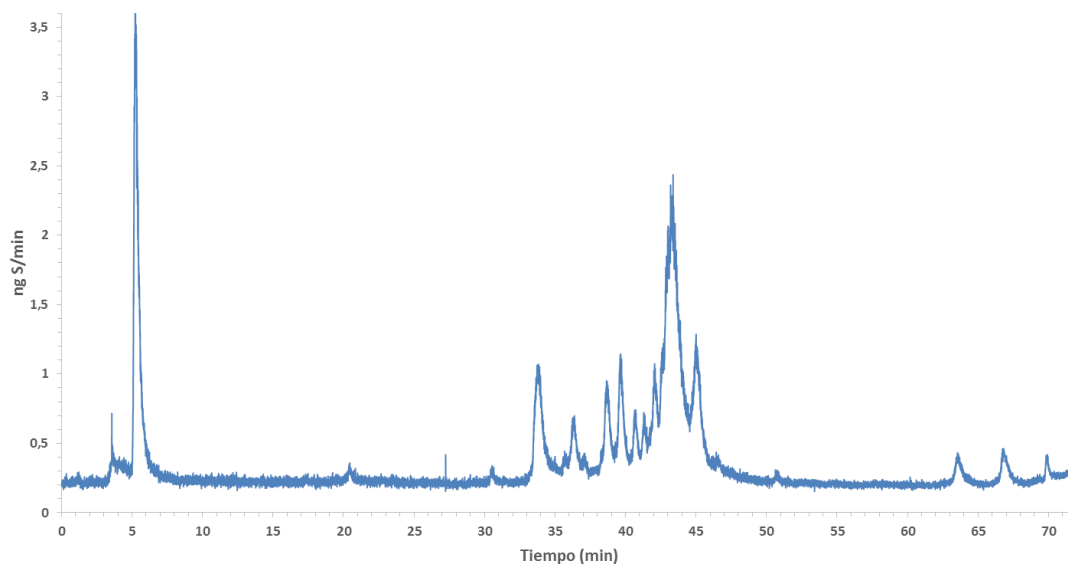
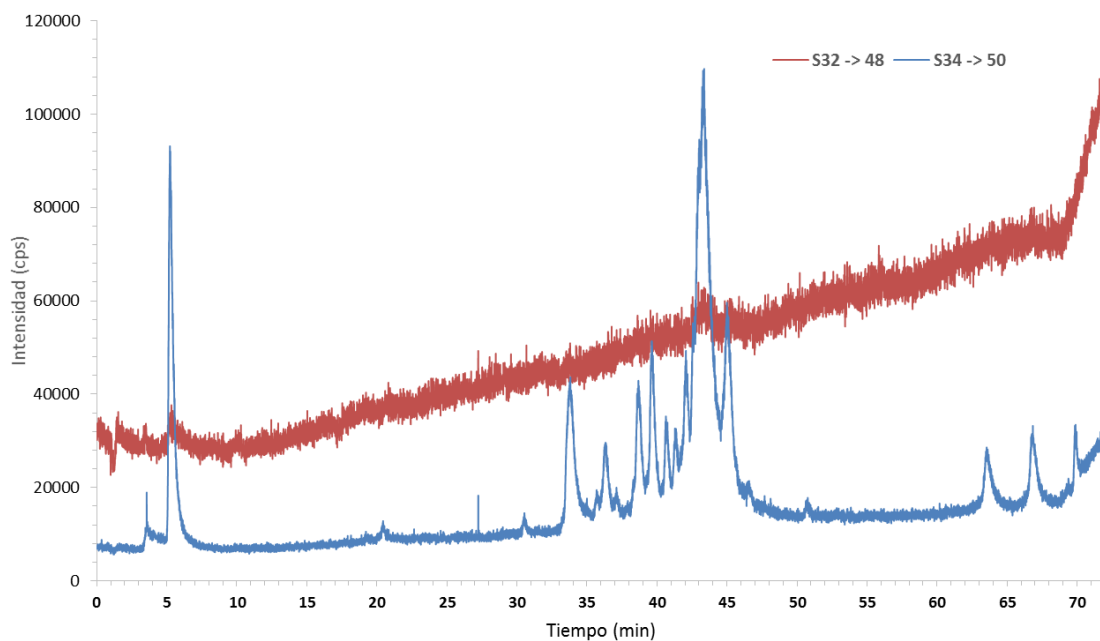


Figura 25: En la parte superior: Cromatograma de intensidades de la muestra *Micropechis ikaheka*. En la parte inferior: Cromatograma de flujo másico. Se emplea una columna C4, 80 °C, con un flujo de 4,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  y con un gradiente de 0-2,5-2,13-10, 63-30, 70-90, 75-90, 78-2 (tiempo,% fase móvil B), 2,94 ppm de patrón interno (BOC-Met) y un flujo post-columna de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  de 798 ppb de trazador.

Siguiendo el mismo procedimiento que en caso anterior se obtiene la cuantificación para las distintas especies que contienen S presentes en la muestra, recogidas en la Tabla 14.

Tabla 14: Cuantificación de las distintas especies para la muestra *Micropechis ikaheka*. La incertidumbre se corresponde con una desviación estándar (n=2)

<b>Proteína</b>	<b>Tipo</b>	<b>Peso Molecular, Da</b>	<b><math>\mu\text{mol prot/g veneno}</math></b>
1	3Ftx	6675,8	0,514 $\pm$ 0,013
2	3Ftx	7470,3	<0,05
3	3Ftx	7515,4	<0,05
4	3Ftx	6656,1	<0,05
5	3Ftx	7145,1	<0,05
6	3Ftx	6638,1	0,729 $\pm$ 0,029
7	3Ftx	6638,1	-
8	3Ftx	7504,3	0,258 $\pm$ 0,015
9	3Ftx	6546,9	0,427 $\pm$ 0,070
10	PLA2	14032,5	6,12 $\pm$ 0,13
11	PLA2	12380,1	0,712 $\pm$ 0,042
12	3Ftx	7584,4	1,206 $\pm$ 0,020
13	3Ftx	7543,4	4,25 $\pm$ 0,11
14	3Ftx	7822,5	1,372 $\pm$ 0,099
15	3Ftx	7853,5	0,824 $\pm$ 0,057
16	3Ftx	7666,4	7,48 $\pm$ 0,28
13 b	3Ftx	7543,4	
17	PLA2	13873,2	
18	PLA2	13892,2	
19	PLA2	13942,2	
20	3Ftx	7525,4	
21	PLA2	13991,3	5,26 $\pm$ 0,18
22	PLA2	13358,7	
23	PLA2	14008,3	
24	PLA2	13879,2	0,99 $\pm$ 0,74
25	PLA2	13916,2	
26	PLA2	13897,2	2,38 $\pm$ 0,13
27	PLA2	13766,2	2,151 $\pm$ 0,053
28	3Ftx	7794,6	7,35 $\pm$ 0,35
29	PLA2	14009,2	
30	PLA2	14029,2	3,23 $\pm$ 0,37
31	PLA2	13854,2	
32	3Ftx	7638,4	
33	PLA2	13767,2	7,4 $\pm$ 1,4
34	PLA2	13822,2	
35	PLA2	13872,2	
36	PLA2	13841,3	12,4 $\pm$ 1,5
37	PLA2	13927,2	4,61 $\pm$ 0,75
38	PLA2	13856,2	2,37 $\pm$ 0,39
39	PLA2	13884,2	



40	PLA2	13898,2	7,85 ± 0,23
41	PLA2	13871,1	
42	SVMP	5696,8	0,144 ± 0,003
43	SVMP	51559,5	<0,05
44	SVMP	49343,0	0,656 ± 0,017
45	SVMP	49187,5	
46	Minoritaria	30000	1,465 ± 0,053
47	Minoritaria	30000	0,127 ± 0,020
48	Minoritaria	30000	0,597 ± 0,043

En la tabla anterior se muestran los resultados para la cuantificación de las especies clasificadas por familias, dados en  $\mu$ moles de proteína por gramo de veneno inicial. Debido a la complejidad de la muestra hay proteínas que no se pueden separar en estas condiciones, por lo tanto, la cuantificación dada es conjunta. Por último, se calcula el porcentaje de cada familia que existe en la muestra. Los resultados se exponen a continuación, Tabla 15.

*Tabla 15: Porcentaje de cada una de las familias presentes en la muestra de *Micropechis ikawena*. La incertidumbre se corresponde con una desviación estándar (n=3)*

<b>Familia</b>	<b>% familia</b>
3Ftx	22,8 ± 0,7
PLA2	67,8 ± 2,5
SVMP	4,7 ± 0,1
Minoritarias	4,7 ± 0,1

## 5. CONCLUSIONES

---

Las conclusiones analíticas extraídas después de la realización del proyecto son las siguientes:

Se propone una metodología de cuantificación de proteína intacta basada en la medida de S mediante ICP-MS después de una separación cromatográfica de las especies, empleado dilución isotópica sin la necesidad de patrones específicos. Para ello se demuestra inicialmente la recuperación cuantitativa de la columna y la capacidad del ESI-QTOF de proporcionar señales de altísima calidad para dichas proteínas intactas y por tanto, su identificación inequívoca. La cuantificación de proteína intacta tiene la ventaja de evitar la etapa de digestión triptica, con sus errores asociados. Dicha metodología se ha aplicado con éxito a muestras reales, en este caso venenos de serpiente proporcionados por jefe del Laboratorio de Venómica Estructural y Funcional del Instituto de Biomedicina de Valencia.

El acoplamiento entre capHPLC con ICP-MS y ESI-QTOF en las mismas condiciones cromatográficas permite la combinación de las dos técnicas para llevar a cabo la cuantificación de manera absoluta de las proteínas contenidas en el veneno de serpiente.

Desde el punto de vista académico se han adquirido las competencias necesarias para el manejo de los equipos empleados y el tratamiento de los datos generados (capHPLC, ICP-QQQ y ESI-QTOF) y la capacidad para llevar a cabo una correcta interpretación de los resultados.

Además, la realización del trabajo ha permitido el desarrollo de las capacidades de trabajo en equipo en el contexto de un grupo de investigación. Así como, gracias a la colaboración realizada con el profesor Juan José Calvete jefe del Laboratorio de Venómica Estructural del Instituto de Biomedicina de Valencia, se ha realizado un trabajo multidisciplinar.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Wasinger, V. C.; Cordwell, S. J.; Cerpa-Poljak, A.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Wilkins, M. R.; Duncan, M. W.; Harris, R.; Williams, K. L.; Humphery-Smith, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995; 16(7): 1090-1094.
2. Wang, M.; Feng, W.; Zhao, Y.; Chai, Z. ICP-MS- based strategies for protein quantification. *Mass Spectrometry Reviews*. 2010; 9(2): 326-348.
3. Patterson, S. D.; Aebersold, R. H. Proteomics: The first decade and beyond. *Nature Genetics*. 2003; 33(S): 311-323.
4. Mallick, P.; Kuster, B. Proteomics: A pragmatic perspective. *Nature Biotechnology*. 2010;28(7):695-.
5. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Principios de bioquímica*. 6ª ed. Barcelona: Omega; 2009.
6. Nørregaard, J. O. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Proteomics*. 2004;8(1):33-41.
7. Cantin, G. T.; Yates, J. R. Strategies for shotgun identification of post-translational modifications by mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1053(1-2): 7-14.
8. Mann, M.; Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature*. 2003; 21(3): 255-261.
9. Sanz-Medel, A.; Montes-Bayon, M.; de la Campa, M.; Encinar, J. R.; Bettmer, J. Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 390 (1): 3-16.
10. Domon, B.; Aebersold, R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nature Biotechnology*. 2010; 20(7): 710-721.
11. Ong, S. E.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Methods*. 2005;1 (5):- 252.
12. Lilley, K. S.; Razzaq, A.; Dupree, P. Two-dimensional gel electrophoresis: Recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002; 6(1): 46-50.
13. Benk, A. S.; Roesli, C. Label-free quantification using MALDI mass spectrometry: Considerations and perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012; 404(4): 1039-1056.

14. Bantscheff, M.; Schirle, M.; Sweetman, G.; Rick, J.; Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007; 389(4): 1017-1031.
15. Raggiaschi, R.; Gotta, S.; Terstappen, G. C. Phosphoproteome analysis. *Bioscience report*. 2005; 25(1-2): 33.
16. Twyman, R. *Principles of proteomics*. 2<sup>a</sup> ed. EEUU: Garland Science; 2013.
17. Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003; 422(6928): 198.
18. Maes, E.; Tirez, K.; Baggerman, G.; Valkenburg, D.; Schoofs, L.; Encinar, J. R.; Mertens, I. The use of elemental mass spectrometry in phosphoproteomic applications. *Mass Spectrometry Reviews*. 2016; 35 (3): 350-360
19. Chahrour, O.; Cobice, D.; Malone, J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015; 113: 2-20.
20. Zhou, Y.; Shan, Y.; Zhang, L.; Zhang Y. Recent advances in stable isotope labeling based techniques for proteome relative quantification. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1365: 1-11.
21. Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristenssens, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular Cell Proteomics*. 2002; 1(5): 376-386.
22. Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. 1999; 17(10): 994-999.
23. Thompson, A.; Schafer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Hamon, C. - Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2003; 75 (8): 1895-1904.
24. Bantscheff, M.; Lemeer, S.; Savitski, M. M.; Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012; 404 (4): 939-965.
25. Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(12): 6940-6945.

26. Beynon, R. J.; Doherty, M. K.; Pratt, J. M.; Gaskell, S. J. Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nature Methods*. 2003; 2 (8): 587-589.
27. Pereira-Navaza, A.; Ruiz-Encinar, J.; Carrascal, M.; Abián, J.; Sanz-Medel, A. Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: Its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures. *Analytical Chemistry*. 2008; 80(5): 1777-1787.
28. Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L.; Taylor, C. E. Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*. 1980; 52(14): 2283-2289.
29. Díez-Fernández, S.; Sugishama, N.; Ruiz-Encinar, J.; Sanz-Medel, A. Triple quad ICPMS (ICPQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Analytical Chemistry*. 2010; 84(14): 5851-5857.
30. Bettmer, J.; Montes-Bayón, M.; Ruiz-Encinar, J.; Fernández-Sánchez, M. L.; Fernández-de la Campa, M. R.; Sanz-Medel, A. The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *Journal of Proteomics*. 2009; 72(6): 989-1005.
31. Sanz-Medel, A. Heteroatom(isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: Screening and quantification of proteins and their post-translational modifications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 391 (3): 885-894.
32. Wang, M.; Feng, W.; Lu, W.; Li, B.; Wang, B.; Zhu, M.; Wang, Y.; Yuan, H.; Zhao, Y.; Chai, Z. Quantitative analysis of proteins via sulfur determination by HPLC coupled to isotope dilution ICPMS with a hexapole collision cell. *Analytical Chemistry*. 2007; 79 (23): 9128-9134.
33. Giner Martínez-Sierra, J.; Galilea San Blas, O.; Marchante Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Sulfur analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2015; 108: 35-52.
34. Rappel, C.; Schaumlöffel D. The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 309(2): 605-615.
35. Heilmann, J.; Heumann, K. G. Development of a species-unspecific isotope dilution GC-ICPMS method for possible routine quantification of sulfur species in petroleum products. - *Analytical Chemistry*; 80 (6): 1952-1961.
36. Hyun-Seok, L.; Sook Heun, K.; Ji-Seon, J.; Yong-Moon, L.; Yong-Hyeon, Y. Sulfur-based absolute quantification of proteins using isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Metrologia*. 2015; 52 (5): 619-627.

37. Schaumlöffel, D.; Giusti, P.; Preud'Homme, H.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Precolumn isotope dilution analysis in nanoHPLC–ICPMS for absolute quantification of sulfur-containing peptides. - *Analytical Chemistry*; 2007; 79(7): 2859-2868.
38. Pereira-Navaza, A.; Ruiz-Encinar, J.; Sanz-Medel, A. Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorous standard and element mass spectrometry. *Angewandte Chemie*. 2007;46 (4): 569-571.
39. Schaumlöffel, D. Capillary liquid separation techniques with ICP MS detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004; 379 (3): 351-354.
40. García Alonso J.I.; Rodríguez González, P. *Isotope dilution mass spectrometry*. UK: RSD Publishing; 2013.
41. Calvete, J. J.; Lomonte, B. A bright future for integrative venomomics. *Toxicon*. 2015; 107: 159-162.
42. Eichberg, S.; Sanz, L.; Calvete J.J.; Pla, D. Constructing comprehensive venom proteome reference maps for integrative venomomics. *Expert Review Proteomics*. 2015; 12 (5): 557-573.
43. Ménez, A.; Stöcklin, R.; Mebs, D. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. *Toxicon*. 2006; 47 (3): 255-259.
44. Calvete, J. J. Next-generation snake venomomics: Protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. *Expert Review Proteomics*. 2014; 11 (3): 315-329.
45. Petras, D.; Sanz, L.; Segura, A.; Herrera, M.; Villalta, M.; Solano, D.; Vargas, M.; Leon, G.; Warrel, D.; Theackton, D.; Harrison, R.; Durfa, N.; Nasidi, A.; Gutierrez, J. M.; Calvete, J. J. Snake venomomics of african spitting cobras: Toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the pan-african EchiTAB-plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. *Journal of Proteome Res*. 2011; 10 (3): 1266-1280.
46. Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B.; León, G. Alape-Girón, A.; Flores-Díaz, N.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Calvete, J. J. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of proteomics*. 2009; 72 (2): 165-182.
47. Calvete, J. J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett*. 2009; 583 (11): 1736-1743.
48. Calvete, J. J. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013; 75: 44-62.
49. Kuipers, B. J. H.; Gruppen, H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative

reverse phase high-performance liquid Chromatography–Mass spectrometry analysis. *J Agric Food Chem.* 2007; 55 (14): 5445.

50. García-Alonso, J. I. Determination of fission products and actinides by inductively coupled plasma-mass spectrometry using isotope dilution analysis: A study of random and systematic errors. *Analytical Chemical Acta.* 1995; 312(1): 57-78.

51. Rodríguez-Castrillón, J. A.; Moldovan, M.; García-Alonso, J. I.; Lucena, J. J.; Garcia-Tome, M. L.; Hernandez-Apaolaza, L. Isotope pattern deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2008; 390 (2): 579-590.

52. Calderón-Celis, F.; Diez-Fernández, S.; Costa-Fernández, J. M.; Ruiz-Encinar, J.; Calvete, J. J.; Sanz-Medel, A. Absolute protein quantification without protein-specific standards by ICP-QQQ and isotope dilution analysis: application to snake venomics. Pendiente de publicación.