

### EXPLORANDO LA ASOMBROSA COMPLEJIDAD QUÍMICA DE LA MATERIA A LA LUZ DE LA ESPECTROSCOPIA/ESPECTROMETRÍA ANALÍTICA.

Alfredo Sanz Medel  
Catedrático Jubilado

Departamento de Química Analítica Universidad de Oviedo

Oviedo, enero de 2022

#### 1. A MODO DE INTRODUCCIÓN

Intentando adecuar este artículo-legado al propósito que me indicó el Editor de la Revista, Prof. Enrique Barrado: “trata de sistematizar y simplificar tu legado científico, tras tus cinco décadas de esfuerzo investigador hasta la jubilación definitiva en 2018”, me gustaría hacer unos cuantos comentarios breves de especial relevancia para tal propósito.

Comenzaré por referirme, a modo de introducción, a detalles importantes de mi educación universitaria, una pieza clave para entender mejor mi fascinación, creciente con los años, por la Química Analítica instrumental.

¿Por qué Química, Analítica, Espectroquímica y Plasmas?

Mi predilección por la Química fue temprana, decidida y claramente vocacional, sobre todo después de mis primeras prácticas de laboratorio en el colegio de los jesuitas en Navarra. La curiosidad por conocer la naturaleza misma de la materia de la que estamos hechos, indagando los elementos y moléculas químicas que la constituyen, tuvo siempre un fuerte atractivo a lo largo de toda mi vida. Naturalmente, para tal conocimiento químico eran indispensables las herramientas adecuadas, las técnicas de Análisis Químico, cuanto más sensibles y selectivas tanto mejor. Había que elegir para hacer el doctorado, tras finalizar mi bachillerato superior y la carrera de Químicas en Zaragoza (con Premio Extraordinario y Cruz de Alfonso X el Sabio, en 1969), entre las limitadas técnicas instrumentales disponibles en el Departamento de Química Analítica que dirigía el Prof. D. Julián Bernal... Con su ayuda elegí, sin demasiadas vacilaciones, la Espectroscopía Analítica como eje de mi Tesis Doctoral. Es decir, se puede considerar que mi iniciación real a la investigación científica tuvo lugar en la Universidad Zaragoza a finales de los 60. La herramienta concreta de análisis fue la Espectrometría Molecular Óptica (absorción y fluorescencia en el Vis-UV para la determinación de Nb en ciertos minerales y aleaciones del metal) y dicho trabajo fue distinguido con un Premio Extraordinario a tesis doctorales.

En todo caso, fue en el Imperial College of Science and Technology de Londres, llevando a cabo mi postdoctorado bajo la extraordinaria dirección del Prof. T.S. West, donde mi mente se abrió hacia el desarrollo de instrumentación analítica novedosa (un tema apenas existente a principios de los 70 en nuestras universidades españolas).

Dicho trabajo sobre sistemas sencillos para la generación de átomos excitados de la muestra y medida final por

fluorescencia atómica en un CFAR (carbon filament atom reservoir) fue decisivo para guiar mi investigación posterior. De hecho, ya de vuelta a España como profesor interino en la Universidad Complutense de Madrid, me convertí en un convencido defensor de la Espectrometría Atómica como base de técnicas analíticas elementales de gran sensibilidad y futuro.

Con tales ideas inicié en Madrid mi trabajo de dirección de tres tesis doctorales, combinando ya el empleo de las técnicas de la Espectroscopía más comunes entonces (de naturaleza molecular) con las técnicas emergentes (atómicas/elementales) del momento.

Tras las oposiciones a Agregado, y una vez instalado ya en Oviedo a finales de 1978, mi fascinación por los “plasmas” como nuevas y eficaces fuentes de atomización/ionización/excitación fue creciendo, a medida que salían nuevos trabajos demostrando sus excepcionales características analíticas. Para entonces ya iban apareciendo los primeros plasmas comerciales ICP-OES: ICP (Inductively Coupled Plasmas) – OES (Optical Emission Spectrometry), que utilizaban argón como gas formador del plasma.

Mi entusiasmo y determinación de introducir dichas técnicas, entonces de vanguardia, en nuestra investigación analítica en Oviedo culminó con la concesión de un proyecto nacional y la adquisición del primer ICP-OES instalado en una universidad española (inicios de los 80). Pronto quedé fascinado por el increíble poder analítico del ICP-OES, frente a la llama y otros tipos de plasmas de baja potencia que habíamos ya empezado a investigar en nuestro laboratorio, en colaboración con colegas físicos, tales como el MIP (Microwave Induced Plasma) o bien la GD (Glow Discharge), mucho más económicos que el ICP.

Fue bastantes años más tarde cuando finalmente conseguimos adquirir un ICP-MS, como complemento lógico al ICP-OES: es decir, un plasma ICP de argón para producir iones elementales (fuente de iones) y un detector de las masas de tales iones (concretamente un analizador cuadrupolo MS para llevar a cabo las medidas).

De este modo progresivo nos fuimos adentrando en el mundo prometedor de la Espectrometría de Masas, pero inicialmente para análisis elemental; es decir, la fuente ICP condicionaba ya la información química obtenida a iones atómicos (elementos químicos). Sin duda podíamos hacer análisis rápidos, multielemento y de excepcional sensibilidad, pero restringidos como en ICP-OES al análisis de los elementos de la Tabla Periódica.

En todo caso, la disponibilidad de ICP-OES e ICP-MS hicieron viables múltiples colaboraciones en

aplicaciones multidisciplinares e interdisciplinares (en los campos de Materiales, Medioambiente, Nutrición, Farmacología y Biomedicina). En este punto conviene recordar nuevamente que tales técnicas no permitían abordar, en principio, los problemas moleculares y, por tanto, quedaban fuera los atractivos estudios químicos sobre la magnífica complejidad molecular característica en Biomedicina, Biología y Bioquímica, tras los millones de años de desarrollo de la vida sobre este planeta. Sin discusión, sería deseable que las espléndidas características analíticas del ICP (OES y sobre todo MS) pudieran extenderse de forma realista al análisis químico de gran sensibilidad en moléculas más o menos complicadas (temas de extraordinaria importancia y actualidad como son el análisis de trazas de azúcares, lípidos, péptidos, proteínas, drogas, medicamentos, etc). Es indiscutible que el desarrollo de técnicas de análisis cada vez más poderosas posibilitan estudios cada vez más profundos para desentrañar los “misterios”, elementales y/o moleculares, que rigen la vida (y, por extensión, a combatir retos actuales que enfermedades y pandemias plantean a la supervivencia de los humanos sobre la Tierra, como la COVID19). En esa línea, las técnicas de plasma, particularmente el ICP-MS, podrían aportar caminos de estudio alternativos de gran trascendencia con tal de que permitieran hacer “Especiación química” de los elementos, es decir, responder a preguntas como ¿cuáles son las especies químicas concretas (moléculas) en las que se hallan los elementos analizados por ICP? ¿cuál es su papel y concentraciones en cada caso en la vida real?, ¿son tales elementos “esenciales” o son tóxicos? Preguntas todas de interés enorme en campos tan importantes como la Biología o la Biomedicina.

Un excelente ejemplo de esta importancia actual de ciertas especies químicas (biomoléculas) y de su uso práctico posterior en la Medicina, es el uso de los “biomarcadores”: moléculas clave cuya medida permite llevar a cabo con fiabilidad el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento continuado de un determinado tratamiento médico de muchas enfermedades (p.e. cáncer). Hoy es posible llevar a cabo tales tareas analíticas complementando a los ICP (utilizados para una detección final robusta) con técnicas de separación acopladas en línea, adecuadas en cada caso, llamadas “técnicas híbridas”.

Dichas técnicas híbridas, p.e. “high pressure liquid chromatography” en (HPLC)-ICP-MS o “field flow field fractionation” (4F)-ICP-MS, ofrecen a día de hoy un potencial analítico extraordinario. Potencial que se refuerza si se emplean de una forma complementaria a las técnicas moleculares clásicas (p.e. “Electrospray-Masas”, ESI-MS).

Como se ilustra en este artículo al final, para el caso del cáncer de mama y el biomarcador “Prostate Specific Antigen” (PSA), estas técnicas híbridas están evolucionando rápidamente y convirtiéndose en un campo de investigación analítica muy activo y fructífero; en particular para utilizar la excepcional sensibilidad analítica alcanzada para el diagnóstico temprano

(“diagnóstico precoz”): con esa información temprana es posible una actuación médica inmediata, incrementando grandemente la probabilidad de la eventual curación.

Por todo ello, estudios colaborativos con profesionales de la sanidad y utilizando técnicas analíticas de detección MS, híbridas y complementarias constituyen ya una tendencia muy clara y prometedora: emplear los plasmas analíticos para la resolución de problemas reales muy complejos que requieren información química cuantitativa muy sensible e información cualitativa lo más completa posible (elemental, molecular, estructural).

## 2. EL GRUPO DE ESPECTROMETRIA ANALITICA EN OVIEDO

Tras mi estancia postdoctoral en el Imperial College of Science and Technology de Londres, y mi estreno como Profesor interino en el Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid (donde pude dirigir mis tres primeras tesis doctorales) ya tenía claro que la Universidad de Oviedo podría muy bien ser ese Departamento de Química Analítica ideal donde hacer realidad mis sueños: iniciar con plena responsabilidad como profesor numerario el tipo de docencia e investigación de calidad que deseaba, a la altura de la que había tenido la suerte de experimentar fuera de nuestras fronteras.

Como es natural, para conseguirlo de forma seria y realista era preciso conseguir los medios económicos necesarios (a través de proyectos autonómicos, nacionales, europeos o colaboraciones con empresas) y los personales precisos (investigadores y colaboradores motivados y dispuestos a cambiar las cosas). Ninguno de los dos aspectos fue fácil en un país como el nuestro, nada convencido de la enorme trascendencia (para sus ciudadanos del momento y para su futuro) de crear estructuras diseñadas para hacer buenos científicos y empezar a producir Ciencia realmente competitiva. No era extraño entonces (y no está resuelto ahora) que las posibles fuentes de financiación en España fueran pocas y el montante económico concedido demasiado escaso (frente a la situación, p.ej. en U.K. o Francia). Había que esforzarse mucho para tratar de garantizar el éxito final, a través de buenas puntuaciones de los censores de proyectos, largas conversaciones para convencer a los empresarios para invertir en nuestros proyectos colaborativos, etc). Paralelamente se hacía imprescindible una selección cuidadosa de futuros doctorandos, su preparación/motivación adecuadas en pos de la originalidad científica, importancia real de la Tesis y entusiasmo por el trabajo a realizar. Con paciencia y tesón fue consolidándose, creciendo poco a poco con los años, el que sería Grupo de Investigación en Espectrometría Analítica de Oviedo, un grupo de científicos motivados, sólido y de creciente prestigio internacional.

Sin dejarnos amilanar por las dificultades del empeño, fue creciendo el número de sus miembros sin problemas de género (al 50% en hombres y mujeres más o menos a lo largo de los años), siempre en base a unos criterios de

selección muy claros para todos: talento, motivación y entusiasmo por el trabajo con el objetivo de hacer avanzar la Ciencia y el Conocimiento analítico... De este modo el número total de miembros activos del Grupo de Espectrometría Analítica llegó a superar los 35 a finales de 2017.

Como muestra la fotografía de grupo (ver Fig.1) era una auténtica delicia verlos a todos juntos.



Figura 1.- El Grupo de Espectrometría Analítica de la Universidad de Oviedo.

Muy revelador también era el hecho de que por esas fechas más de media docena de los primeros doctorandos del Grupo ya habían conseguido brillantemente su Cátedra de Química Analítica. La semilla ya estaba fructificando porque cada uno de ellos ha seguido la estela en forma espléndida iniciando sus propios grupos de investigación con las herramientas analíticas aprendidas, pero cada vez más especializadas, incluyendo: Isótopos Estables y Espectrometría de Masas, Fotoluminiscencia y Nanopartículas, Cromatografía y Análisis Clínico, Espectrometría en Descargas Luminescentes, etc.

Un último aspecto no menos revelador de la solidez y eficacia a lo largo de los años de nuestra investigación en el Grupo fue la realización y defensa de más de 70 Tesis Doctorales dirigidas y/o codirigidas hasta mi jubilación. La formación de tantos Ph.D., que fueron repartiéndose año tras año por países, universidades y empresas diversas, constituye también un hito muy especial a tener en cuenta en el legado global.

Para finalizar este apartado no sería justo, en mi recorrido académico y vital, olvidarme de reconocer el inmenso papel que jugó mi familia "biológica" en la construcción de la familia numerosa de investigadores a la que hemos aludido hasta aquí. Sin duda, mi familia fue siempre un pilar fundamental, un apoyo constante y seguro en el día a día de trabajo en la Universidad.

Vaya aquí, pues, en primer lugar mi profundo agradecimiento a Esther, mi mujer, que siempre respaldó mis inquietudes académicas y soportó estoicamente mis ausencias, originadas por tantos viajes, conferencias, congresos o visitas a empresas para discutir ideas

colaborativas donde pudiera ser útil nuestra investigación.

Nunca agradeceré lo suficiente su comprensión y cariño incondicional y, por si fuera poco, nuestros tres hijos tan "europeos"(en toda la extensión de la palabra):"

-Victoria, catedrática hoy de Biología Celular del Cáncer, Universidad Queen Mary en Londres (UK).

-Alfredo, junior, veterinario y Director Global de Marketing (Dairy), Empresa multinacional de alimentación NUTRECO, con cuartel general en Utrecht (Holanda).

-Adrián, biólogo, científico de número en el Instituto de Genética Experimental, Centro Helmholtz, en Múnich (Alemania).

En perspectiva, mirando hacia atrás tantos años transcurridos desde nuestra llegada a la Universidad de Oviedo en 1978, creo que mi familia (ver la foto en Fig. 2) jugó un papel clave en el éxito científico general reconocido al Grupo de Espectrometría Analítica de la Universidad de Oviedo.



Figura 2.- Familia Sanz-Medel ("núcleo duro")

### 3. LÍNEAS MAESTRAS DE LA INVESTIGACIÓN DEL GRUPO DE OVIEDO

El buen oficio de un investigador en Ciencia en general lleva consigo una evolución constante a lo largo de los años de trabajo: los descubrimientos científicos, hoy cada vez más frecuentes, las necesidades de nuevos conocimientos para afrontar los desafíos de la sociedad moderna, etc, cambian y progresan con rapidez a todos los niveles (laboratorios, universidades, empresas). Incluso con el tiempo también progresa la disposición política de nuestros gobernantes a invertir en Ciencia, particularmente en conocimientos prácticos que se entienden más cercanos al ciudadano de a pie. Todo esto son circunstancias que deben conocerse de cerca para mejorar el conjunto de nuestra investigación en la Universidad. Es más, en mi opinión, el otro aspecto de un buen profesor (como enseñante) requiere ir incorporando paralelamente en el aula aquellas partes de nuestra investigación o la de otros, con tal de que sea suficientemente trascendente. Una docencia universitaria moderna y de calidad exige al profesor ser

capaz de transmitir al estudiante la curiosidad científica, el entusiasmo por saber más, la necesidad de la innovación y del progreso a través de ella. El binomio investigación/docencia solo alcanza su plenitud, sin embargo, si incorporamos un tercer factor: la colaboración con nuestro entorno creador de riqueza (industrial y empresarial), un aspecto a menudo olvidado en el mundo académico, a pesar de la importancia crítica para un país de tales sinergias.

Por todo ello, no debe extrañar que las diferentes líneas de investigación en nuestro Grupo a lo largo de medio siglo hayan sido bastante variadas y numerosas, pero manteniendo cierta progresión lógica en el tiempo.

Hay que hacer notar también que esa evolución temporal progresiva ha descansado en excelentes colaboradores, en medios económicos públicos y privados y en la ilusión mantenida de mejorar nuestra ciencia analítica nacional.

Dicho todo lo anterior, y teniendo en cuenta la limitación de espacio, podríamos resumir las líneas maestras más relevantes de nuestra investigación en el Grupo de Espectrometría Analítica, a lo largo de los años, como sigue:

1. Fotoluminiscencia y Sensores de Fibra Óptica
2. Nueva Instrumentación para el Análisis: fuentes espectroquímicas atómicas, detectores elementales ópticos y de masas.
3. Análisis Directo de Sólidos vía plasmas espectroquímicos.
4. Nanociencia y Nanotecnología Analíticas.
5. El plasma ICP (OES y de MS) para trazas y ultratrazas: aplicación en Biomedicina y en Nutrición humana.
6. Nuevas Técnicas "Híbridas" para la especiación elemental en moléculas.
7. Desde la "especiación" a la determinación absoluta de proteínas (heteroatom-tagged proteomics).

#### 4. EJEMPLOS ILUSTRATIVOS DE NUESTRA INVESTIGACIÓN DE LOS ÚLTIMOS AÑOS

De las 7 líneas maestras de investigación detalladas arriba he seleccionado aquí tres ejemplos concretos de nuestra investigación de los últimos años, tratando de ilustrar el tipo de investigación de vanguardia realizado en el Grupo hasta mi jubilación como Profesor Emérito en 2018. Se trata, como es lógico, de una selección muy personal en la idea de ilustrar de cerca en qué modo el empleo de los plasmas como fuentes espectroquímicas elementales también posibilita estudios de moléculas realmente complejas y así abordar la resolución de problemas químicos reales de gran importancia y creciente actualidad en la sociedad moderna.

Con dicha idea he escogido los dos primeros ejemplos para ilustrar el concepto moderno denominado "heteroatom-tagged proteomics", es decir, proteómica guiada por heteroátomos, sin necesidad del empleo de patrones proteicos específicos (4.1) y su evolución aprovechando la emergente Nanoanalítica, "nanoanalytics-heteroatom-tagged proteomics" (4.2).

Se trata de un camino novedoso, complementario al empleo del "Electrospray-Masas" (pero la detección final es vía ICP-MS), para conseguir una herramienta alternativa capaz de realizar una Proteómica cuantitativa de sensibilidad excepcional, cuando fuera necesaria, si se recurre a la amplificación de las señales en el ICP-MS vía nanopartículas. El tercer ejemplo elegido (4.3) me pareció adecuado para ilustrar nuestra preocupación, constante a lo largo de muchos años, por desarrollar no solo métodos analíticos con instrumentos comerciales, sino también diseño y desarrollo de nueva instrumentación analítica con características analíticas especiales, en este caso particular para el análisis directo de sólidos y de la concentración en profundidad de los perfiles en materiales en capas (p.ej. "depth profile analysis" de placas solares), prácticamente sin tratamientos previos. En este tercer ejemplo (4.3) empleamos plasmas de menor energía que el ICP, en concreto descargas luminiscentes GD en modo pulsado como fuentes espectroquímicas que se acoplan a un detector de masas (MS) de "tiempo de vuelo" (TOF), especialmente rápido y adecuado para la detección de tales señales transitorias producidas en la excitación en la GD pulsada. Este sistema GD-TOF-MS es capaz de medir con precisión y fiabilidad la intensidad de los "pulsos" de iones producidos en lapsos de tiempo muy cortos. De hecho, permite la medida de intensidades de los pulsos en diferentes instantes de los mismos y a diferentes tiempos en un pulso dado: al inicio, en la meseta y al final del mismo. De estas tres medidas muy rápidas se puede inferir, por pulso: a) información elemental (inicio del pulso); b) información de iones/fragmentos moleculares (en la meseta del pulso) y c) información del ion molecular característico del compuesto (al final del pulso) de un modo cuasi-simultáneo.

El alcance práctico de esta atractiva tecnología está todavía por evaluar de forma sistemática en problemas reales, pero ya ha aparecido en el comercio un instrumento pionero ("Plasma Profiling", PGD-TOF-MS, de Horiba-Jobin Yvon) de estas características. Este modo de estudiar elementos y moléculas ionizadas de un elemento químico concreto en una muestra dada en el mismo instrumento y de forma prácticamente simultánea es muy novedoso y podría utilizarse ventajosamente en los campos más variados del análisis instrumental. Además, este último ejemplo de nuestra investigación más reciente me permite ilustrar el permanente espíritu de colaboración con las empresas de instrumentación analítica, nuestro esfuerzo para llevar a cabo un tipo de investigación claramente aplicado y con ambición de contribuir al desarrollo de nuevos instrumentos para análisis; es decir, con una proyección económica a corto plazo en nuestra área de conocimiento.

A continuación, pues, pasamos a detallar brevemente tres ejemplos ilustrativos (4.1, 4.2 y 4.3) del trabajo investigador de los últimos años, seleccionados para esta publicación concreta. El hilo conductor será el moderno empleo analítico de los Plasmas con detección por

Espectrometría de Masas para el análisis de elementos, isótopos, iones, nanopartículas e incluso biomoléculas de gran complejidad química (p.ej. proteínas, de forma directa o previa derivatización adecuada, a niveles excepcionalmente bajos de la concentración de la biomolécula).

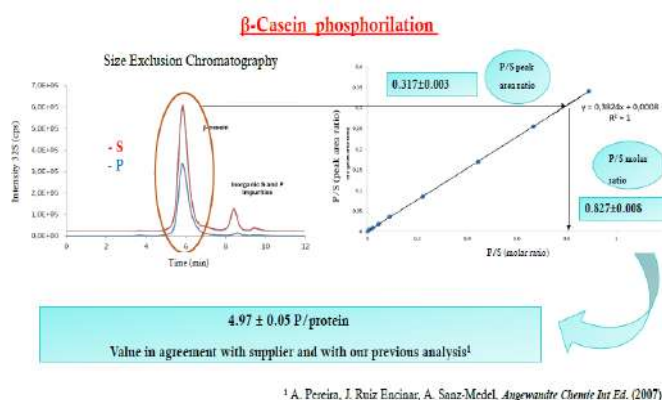
**4.1. HPLC-ICP-MS para Proteómica cuantitativa de gran sensibilidad y selectividad vía heteroátomos (“heteroatom-tagged Proteomics”).**

Una extensión reciente del concepto de Proteómica vía ICP-MS de los heteroátomos, denominada genéricamente “heteroatom-tagged proteomics”, consiste en su aplicación a la determinación precisa de la concentración de proteínas y péptidos sin tener que recurrir a patrones de calibración específicos de cada compuesto, como suele ser necesario en el trabajo habitual con ESI-MS o MALDI-MS. Precisamente este es uno de los retos actuales en Proteómica: conseguir la cuantificación absoluta de proteínas a muy bajas concentraciones para entender a fondo sus funciones biológicas e interacciones en la salud y la enfermedad.

Trataremos de ilustrar aquí brevemente este concepto, basado en el uso de plasmas ICP-MS, para conseguir determinaciones absolutas de proteínas y péptidos a través de la determinación de sus heteroátomos naturales característicos (por ejemplo, S o P).

La tecnología analítica desarrollada para este objetivo consistió en acoplar una técnica de separación adecuada (Capillary Liquid Chromatography, Cap LC) con un detector ICP-MS de gran resolución analítica (gracias al sistema de “triple cuadrupolo”), un ICP-QQQ. Ya años atrás habíamos demostrado el gran potencial analítico de los ICP-QQQ para llevar a cabo el análisis cuantitativo preciso, rápido y fiable de patrones de calibración para azufre y fósforo en péptidos y proteínas en una colaboración con la empresa fabricante de los equipos (1). Dicha técnica “híbrida”, Cap LC-ICP-QQQ, ha permitido también la medida rápida y precisa de relaciones molares P/S en cualquier compuesto orgánico de interés, concretamente en moléculas de gran importancia biológica como son las proteínas, (ver detalle de la validación del método analítico en la Figura 3).

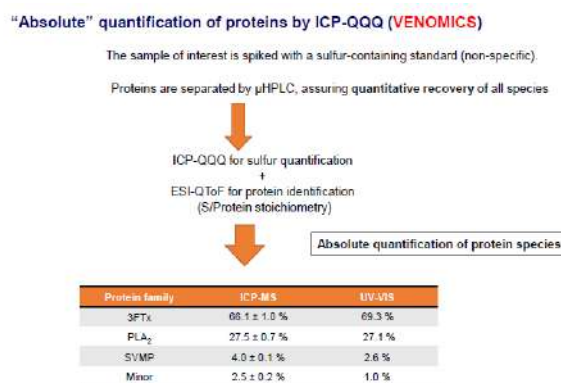
El contenido total de la proteína se determina vía S, mientras su “grado de fosforilación” se calcula ya a partir de la relación P/S en moles obtenida para la misma proteína, ambas medidas realizadas por Cap-LC-ICP-QQQ. Empleando dicha metodología pudimos desarrollar un método general de estandarización para cuantificación “universal” de biomoléculas en general y de proteínas en particular (2). La extensa utilidad de tales métodos ha sido demostrada ya como una nueva herramienta de análisis cuantitativo de pequeñas cantidades de venenos de serpiente, por tanto con gran futuro en el exótico campo de la “venómica” (3) y para la cuantificación “universal” de biomoléculas utilizando MS elementales (ICP-MS) y estándares genéricos (4,5).



1 A. Pereira, J. Ruiz Encinar, A. Saenz-Medel, *Angewandte Chemie Int Ed.* (2007)

Figura 3.- Validación del método de especiación elemental vía Cap LC-ICP-MS: determinación del “grado de fosforilación” en proteínas.

La Figura 4 ilustra un esquema general para realizar este tipo de determinaciones “absolutas” de proteínas.



We were able to absolutely quantify up to 30-50 individual proteins in snake venom samples

Figura 4.- Esquema general para la especiación-determinación “absoluta” de proteínas por ICP-QQQ.

**4.2. Amplificación de la señal analítica, vía Nanopartículas e Inmunoensayos, para “heteroatom-tagged-Proteomics” de sensibilidad extrema.**

Las estrategias de amplificación de señales analíticas a través del empleo de Nanopartículas constituyen hoy un camino novedoso y muy prometedor para perseguir detecciones cada vez más sensibles. Este esfuerzo investigador es clave en la búsqueda de biomoléculas que podrían ser empleadas como biomarcadores de enfermedades de cualquier tipo. En nuestro Grupo habíamos trabajado ya extensamente en Nanoanalítica, pero empleando como señales la fluorescencia y/o la fosforescencia de ciertas nanopartículas (concretamente quantum dots, QDs) acopladas adecuadamente a las biomoléculas a determinar (6). Es bien sabido que tales “marcas” se pueden incorporar con gran selectividad a anticuerpos adecuados (bioconjugación) para la captura de la biomolécula deseada. De esta manera, merced a la reacción de derivatización, conseguimos anticuerpos de captura de biomoléculas marcados con metales (existentes en gran proporción en la nanopartícula) para

su detección amplificada por ICP-MS. Estos “heteroatom-tagged antibodies” resultantes permiten conseguir la selectividad analítica precisa respecto a la proteína y, a la vez, su detección indirecta de elevada sensibilidad por determinación del metal elegido con el ICP-MS (7). Este concepto ha permitido encarar el problema de la gran sensibilidad analítica requerida para abordar el control cuantitativo y robusto de muchos biomarcadores de enfermedades.

Una estrategia química, complementaria a la descrita arriba, hace posible la amplificación ulterior de la “marca” metálica por una manipulación adecuada de la NP: la reducción y deposición masiva catalítica de dicha marca (e.g. Au) sobre la superficie de los QDs. Así, hemos utilizado la reducción y deposición catalítica de Au sobre QDs de “Mn-doped ZnS” (8). Como muestra la Fig. 5, se utiliza una técnica tipo “inmunoassay array” para fijar el anticuerpo primario de la proteína PSA (prostate specific antigen) y el reconocimiento se lleva a cabo en un formato “sandwich- type” con anticuerpos secundarios de reconocimiento y finalmente de los anticuerpos derivatizados con los QDs.

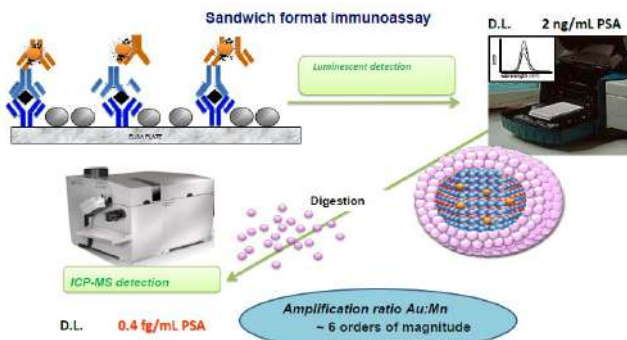


Figura 5.- Esquema del formato “tipo sandwich” del inmunoensayo de reconocimiento de PSA, ilustrando la detección final directa (luminiscente) e indirecta (vía ICP-MS) tras la amplificación química con Au sobre las NPs.

Estos catalizan la última etapa (ver Fig.6) en la que conseguimos la amplificación máxima por el depósito masivo de Au sobre la superficie de esos QDs catalizadores. Tras los adecuados lavados, las marcas de Au amplificadas se disuelven en agua regia y se llevan a la medida final del Au, depositado y redissuelto en condiciones bien controladas, por ICP-MS (como se ve claramente ya en la Fig. 5). De este modo es posible conseguir amplificaciones de hasta millones de veces de la señal, gracias al proceso químico final (8).

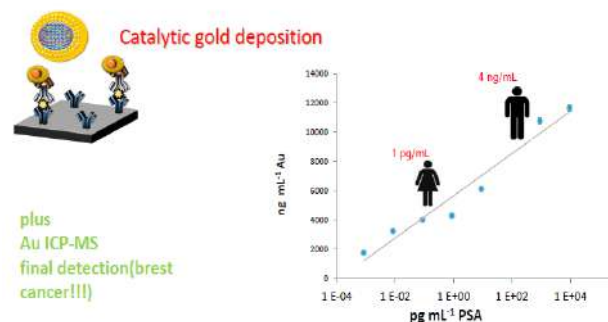
Para concluir este apartado conviene subrayar que este conocido biomarcador, la proteína PSA, es hoy de enorme interés e importancia práctica para el diagnóstico y control del cáncer de próstata e incluso para seguir posibles recurrencias de dicho tipo de cáncer en operaciones del mismo (prostatectomía radical). En este último caso, la concentración de PSA en suero que es preciso llegar a detectar tras la operación, cuanto antes mejor, es mucho más baja al haberse eliminado la

principal fuente biológica de producción de dicho biomarcador proteico. Además, hoy sabemos que la PSA no es exclusiva de hombres sino que también es sintetizada a niveles bajísimos de concentración en mujeres (en el orden de los picogramos/mL ). Es más, sabemos que alteraciones de los valores de PSA en su sangre pueden indicar enfermedades típicamente femeninas como el cáncer de mama e incluso problemas de fertilidad. Es indudable que la disponibilidad de métodos robustos de la sensibilidad necesaria para esta detección constituye hoy un claro reto analítico.



Figura 6.- Amplificación química de la señal en ICP-MS, tras la reducción/deposición catalítica del Au sobre los QDs utilizados.

En nuestros estudios arriba resumidos, basados en el empleo de la estrategia inmunoensayo-NPs- ICP-MS del Au depositado sobre los QDs, hemos comprobado que es posible obtener límites de detección para la PSA a niveles de unos pocos attogramos /mL (8). Es decir, dicho trabajo abre la puerta a estudios futuros de colaboración biomédico-analítica basados en la medida robusta de niveles anormales de PSA en mujeres (usos paralelos al empleo actual de la PSA en cáncer de próstata para hombres).



M. García, J. Ruiz, I.M. Costa & A.Sanz-Medel. Biosensors and Bioelectronics, 85 (2016) 128-134

Figura 7.- Deposición catalítica de Au sobre los QDs para la detección por ICP-MS: una aplicación realista y concreta en la detección precoz del cáncer de mama.

Como muestra la Fig. 7, comprobamos que incluso en la región de concentraciones 0.01-100 pg/mL de PSA es

posible obtener una línea de calibración perfectamente utilizable para tales aplicaciones (con una precisión del 3% para una concentración de PSA de 0.1 pg/mL) de posible diagnóstico precoz del cáncer de mama.

**4.3. Descargas eléctricas luminiscentes de baja presión con detección de Masas (GD - MS): Análisis directo de sólidos.**

En nuestro Grupo hemos estado trabajando muchos años en posibles desarrollos instrumentales utilizando “plasmas a baja presión” (glow discharges, GDs) como fuentes de ionización para una detección final por Espectrometría de Masas (GD-MS). Es decir, una evolución lógica de nuestros primeros trabajos sobre su utilización con detección por Emisión Óptica (GD- OES).

En tales estudios en su conjunto fue crítica la estrecha colaboración con físicos del Grupo de investigación sobre plasmas y láser, hoy GELP, de la Universidad de Oviedo.

Una idea angular de esta colaboración a lo largo de los años fue la investigación de plasmas alternativos al ICP y de menor costo: estudios fundamentales, desarrollos instrumentales y nuevas aplicaciones analíticas de estas descargas eléctricas de menor costo (GDs de baja presión), con detección OES primero y de MS después, constituyeron las bases de esta investigación colaborativa, fructífera y duradera. Refiriéndonos aquí al aspecto más analítico-práctico, el objetivo clave en tal cooperación fue la búsqueda de nuevos métodos para el análisis “directo” de muestras sólidas (es decir, sin la necesidad de disolver la muestra, típico del trabajo en sistemas ICP con nebulización). La aplicación de corriente continua a una GD permite solo el análisis de muestras conductoras, mientras que si se aplica corriente de radiofrecuencias (rf) es posible analizar también muestras semiconductoras y aislantes.

En los últimos años esta línea maestra de nuestra colaboración interdisciplinar dentro de la Universidad de Oviedo, el empleo de GDs de baja presión como fuentes de ionización para la detección por GD-MS, se focalizó en el desarrollo, optimización y aplicación de tales descargas eléctricas para la generación de plasmas de bajo coste. En concreto, la generación de plasmas mediante una corriente eléctrica de radiofrecuencias y pulsada (“pulsed radiofrequency GDs”).

La Fig. 8 ilustra, en orden decreciente, la magnitud de la energía suministrada a los átomos/moléculas de la muestra en su interior por diferentes fuentes de ionización ya bien conocidas: puede verse, el ICP y en menor medida las GDs son fuentes “duras”(may energéticas) y originan preferentemente iones elementales; sin embargo, las fuentes más comunes en Espectrometría de Masas convencional son más “blandas”, de modo que lo que llega al detector son fragmentos ionizados de las moléculas analizadas o incluso (p.ej. en MALDI, matrix assisted laser desorption ionization) el ion molecular como tal.

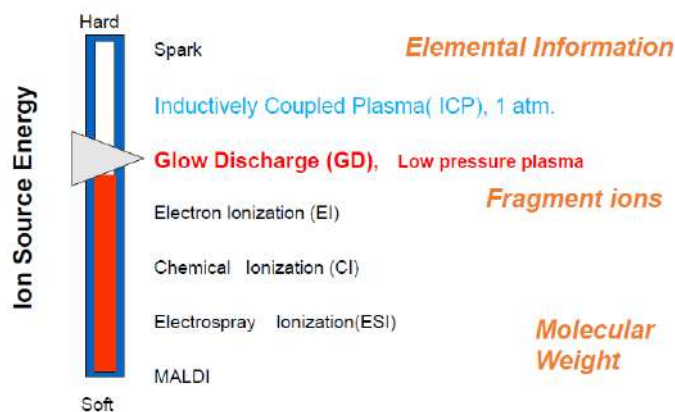


Figura 8.- Energías proporcionadas para la ionización, para MS elemental y molecular, por diferentes fuentes de ionización conocidas.

Sin embargo, en el caso de GDs pulsadas la energía puede ser muy variable a lo largo de un solo pulso de la corriente generadora del plasma. Como V. Majidi demostró tiempo atrás (9), si se dispone de un detector de intensidad muy rápido es posible medir en cada pulso tres situaciones energéticas bien diferenciadas (ver la Fig. 9): al inicio del pulso hay mucha energía y es capaz de producir iones elementales; en la meseta del pulso la energía se estabiliza, de modo que produce ya fragmentos ionizados de la molécula y, finalmente, cuando el pulso termina la energía de ionización disponible es tan baja que se observa solo la generación del ion molecular. Es decir, podríamos tener con el mismo instrumento una cierta especiación de las moléculas de la muestra de forma quasi-simultánea. Para ello, naturalmente, es preciso utilizar un analizador de Masas de gran rapidez y fiabilidad capaz de realizar medidas robustas de la intensidad en las tres regiones clave del pulso (prepeak, plateau y afterpeak de la Fig. 9). Este analizador puede ser un moderno MS de “tiempo de vuelo” (MS-TOF): en estos instrumentos la captación de iones y el procesado subsiguiente de las señales es rapidísimo de modo que permite con fiabilidad la medida en las tres regiones temporales del pulso de forma diferenciada (es decir, la medida de iones atómicos, de fragmentos iónicos y del ion molecular).

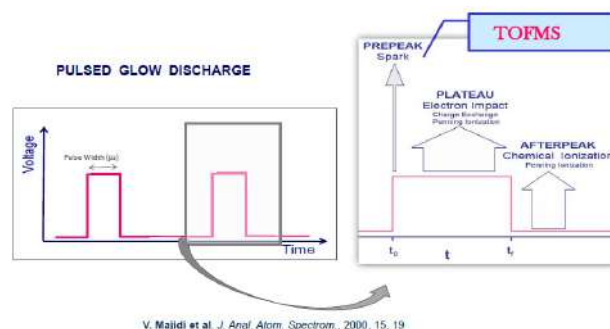


Figura 9.-Capacidad de ionización (energía disponible) en las tres regiones, diferentes en el tiempo, de un pulso de la excitación en GDs pulsadas.

En esta idea básica, parte de nuestra actividad se focalizó en el proyecto europeo, cooperativo y multidisciplinar, financiado por la UE: "New Elemental and Molecular Depth Profiling Analysis of advanced materials by pulsed radiofrequency glow discharge time of flight mass spectrometry" (EMDPA) 2006-2011". Es importante señalar en este punto que esta colaboración europea entre distintos grupos de investigación en países diferentes de la UE y tres empresas fabricantes de instrumentación analítica (Jobin-Yvon, Horiba y Tofwerk), ver la Figura 10, fue una historia de éxito ya que no solo dio lugar a un gran número de artículos científicos publicados (10), sino a la fabricación y eventualmente a la comercialización de un novedoso instrumento, conocido como "Plasma Profiling TOF-MS" y fabricado por la empresa japonesa Horiba Scientific. La proyección aplicada más sobresaliente de dicha instrumentación se centró en dos áreas clave: a) análisis directo de sólidos, en particular para el control estructural en capas, con posible especiación parcial in-situ de capas poliméricas, en células solares fotovoltaicas de Si (11) y b) análisis y caracterización rápida de compuestos orgánicos volátiles por la técnica descrita de radiofrecuencias pulsadas-GD-TOF (12).

"New Elemental and Molecular Depth Profiling Analysis of advanced materials by pulsed radiofrequency glow discharge time of flight mass spectrometry" (EMDPA) 2006-2011.

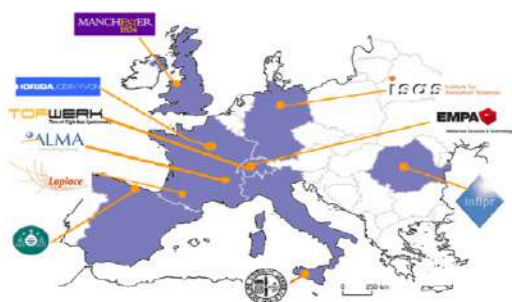


Figura 10.-Distribución geográfica de los diferentes componentes, investigadores y empresas del Proyecto Europeo Cooperativo EMDPA (2006-2011).

Desde estas últimas líneas de mi contribución me gustaría animar a posibles nuevos doctorandos a trabajar en el objetivo de intentar hacer una realidad la promesa de un empleo analítico general de las GDs como herramientas complementarias ventajosas para análisis directo y control rápido de perfiles de concentración y estructuras de materiales estratégicos. Seguir intentando, en definitiva, llegar a realizar nuestros sueños jóvenes sobre plasmas de baja potencia que iniciamos, en la década de los 80 del siglo pasado, en nuestro Grupo de Espectrometría Analítica en Oviedo.

### Agradecimientos.-

No quisiera terminar esta contribución tan especial para mí sin agradecer, sinceramente, a Actualidad Analítica, en particular al Editor Prof. E. Barrado, su amable y generosa invitación y ánimos para embarcarme en esta tarea. También quiero ¿por qué no? dar gracias a la Vida por haberme permitido rodearme de tanta Buena Gente,

en y fuera de mi país, que tanto me animó y apoyó para hacer finalmente una realidad mis sueños de juventud.

### BIBLIOGRAFIA SELECCIONADA

1. Triple Quad ICPMS (ICPQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics. S. Diez, N. Sugishima, J. Ruiz Encinar & A. Sanz-Medel. Analytical Chemistry 84 (2012) 5851.
2. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. Laura Cid-Barrio, Francisco Calderón-Celis, Patricia Abásolo, M.L.Fernández-Sánchez, J.M. Costa-Fernández, J. Ruiz-Encinar & A. Sanz-Medel. TRENDS in ANALYTICAL CHEMISTRY, Vol.104 (2018) 148-159.
3. Elemental Mass Spectrometry for Absolute Intact Protein Quantification without Protein-Specific Standards: Application to Snake Venomics. F. Calderón-Celis, S. Diez-Fernández, J. M. Costa-Fernández, J. Ruiz Encinar, Juan J. Calvete & A. Sanz-Medel. Analytical Chemistry 88 (2016) 9699
4. Enhanced Universal Quantification of Biomolecules Using Element MS and Generic Standards: Application to Intact Protein and Phosphoprotein Determination. F. Calderón-Celis, N. Sugiyama, M. Yamanaka, T. Sakai, S. Diez-Fernández, Juan J. Calvete, A. Sanz-Medel, and J. Ruiz Encinar. Analytical Chemistry 91(1) (2019) 1105
5. Standardization approaches in absolute quantitative Proteomics with Mass Spectrometry. F. Calderón Celis, J. Ruiz Encinar & A. Sanz-Medel. MASS SPECTROMETRY REVIEWS (Wiley), (2017) p 1-23
6. The use of luminescent Quantum Dots (QDs) for optical sensing J.M. Costa Fernández, R. Pereiro & A. Sanz-Medel. TRENDS in ANALYTICAL CHEMISTRY, Vol.25 (2006) 207-218
7. ICP-MS for absolute quantification of proteins for heteroatom-tagged targeted Proteomics. A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, M.L. Fernández-Sánchez, J. Ruiz Encinar. TRENDS in ANALYTICAL CHEMISTRY, Vol.40 (2012) 52-63
8. Highly sensitive Nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: Application to Prostate-specific Antigen quantification. M. García -Cortes, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa Fernández & A. Sanz-Medel. Biosensors and Bioelectronics 85 (2016) 128
9. Explicit chemical speciation by microsecond-pulsed glow discharge-Time of Flight Mass Spectrometry: concurrent acquisition of structural, molecular and elemental information. V. Majidi, M. Moser, C. Lewis, W. Hang & F.L. King. J. Anal. Atom. Spectrom. 15 (2000) 19
10. A comparison of non-pulsed radiofrequency and pulsed radiofrequency Glow Discharge orthogonal Time of Flight Mass Spectrometer for analytical purposes. L. Lobo, J. Pisonero, N. Bordel, R. Pereiro, A. Tempez, P. Chapon, J. Michler, M. Hohl & A. Sanz-Medel. J. Anal. Atom. Spectrom. 24 (2009) 1373
11. Characterization of thin film tandem solar cells by radiofrequency Pulsed Glow Discharge-Time of Flight Mass Spectrometry. B. Fernández, L. Lobo, N. Reininghaus, R. Pereiro & A. Sanz-Medel. Talanta 165 (2017) 289
12. Volatile organic compounds analysis by Pulsed Glow Discharge-Time of Flight Mass Spectrometry: a structural elucidation tool. M. Bouza, J. Fandiño, N. Bordel, R. Pereiro & A. Sanz-Medel. J. Mass. Spectrom. 52 (2017) 561