



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**Monitoreo de compuesto volátiles durante interacciones planta-
microorganismo en tiempo real**

Tesis que presenta

I.B.Q. Héctor Guillén Alonso

Para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

Biotecnología de plantas

Director de tesis: Dr. Robert Winkler

Irapuato, Guanajuato, México.

Julio 2017

El trabajo "Monitoreo de compuestos volátiles durante interacciones planta-microorganismo en tiempo real" fue realizado en el Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de CINVESTAV Unidad Irapuato.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada para realización de este trabajo.

Al CINVESTAV Unidad Irapuato por todas las facilidades e infraestructura dadas durante mi maestría para la realización de este proyecto.

Al Dr. Robert Winkler por su confianza, guía y enseñanza a lo largo de este camino.

Al Dr. José Juan Ordaz Ortiz y al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro, les agradezco el tiempo dedicado y sus observaciones que permitieron mejorar el trabajo aquí presentado.

Al personal administrativo y de mantenimiento por su ayuda.

A la auxiliar de investigación del laboratorio María Teresa Carrillo R. Por el apoyo técnico.

A la técnico en Investigación Ma. Isabel Cristina Elizarraraz Anaya por su apoyo técnico.

A José Antonio Cisneros Durán por las excelentes fotografías.

Al Ingeniero Raúl Pérez López por su ayuda con todos los equipos electrónicos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Sandra Martínez, Abigail Moreno, Josaphat Montero, Daniel Cazares, Raúl Alcalde, Orlando Camargo, Hugo Medina, Cesaré Ovando y Roberto Gamboa, Lourdes Macías e Idolina quienes siempre estuvieron en la mejor disposición de ayudarme.

A mis amigos (de más reciente adquisición) Judith, Gaby, Ale, Vale y Antolin con quienes compartí esta gran aventura que fue la maestría.

A los chicos de verano por tenerme paciencia para explicarles: Pau, Alejandro, Diana, Iris, Odi y Vero.

A mis amigos Andrea Gómez Balderas, Manuel Ayala, Roberto Ayala, Brenda Ríos, Cristian Segura, Diocelina Badillo, Jovanna Michelle, Rhocio Canales, Margarita López y Karen Elizabeth, que siempre han estado a mi lado en todo momento.

A toda mi familia quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, especialmente a mi mamá Noemí Alonso y mi papá Alonso Guillén por su

excelente guía, paciencia y enseñanzas, a mis tíos: Griselda, Oscar, Jesús, Pati, Luís, Héctor, Cita, Toño, Martha, Ceci, quienes siempre tuvieron la paciencia para enseñarme algo nuevo.

A mis hermanas Noemí Álvarez y Yolanda Álvarez y mis cuñados Alfonso Ruiz y Fernando Olache que siempre han estado impulsándome a cumplir mis sueños.

A mis sobrinos José Pablo, María y Luis Fernando, quienes siempre estuvieron dispuestos a aprender cosas nuevas de mi persona.

A mis abuelos Mercedes Moreno y Jesús Alonso y mi tío Luis Alonso quienes a pesar de hoy no estar conmigo contribuyeron enormemente a cumplir con este logro.

A todos los proveedores que siempre estuvieron en la mejor disposición de ayudarnos a resolver problemas y a crear herramientas.

A todas las personas que siempre han participado de forma positiva en ayudar a que el día de hoy termine con éxito este proyecto.

A dos ángeles que siempre han estado conmigo en todo momento: **Andrea Gómez Balderas** y **Arely Judith Zarate Villagómez**.

A mi madre **Noemí Alonso Moreno** por siempre apoyarme incondicionalmente.

“No se trata de llegar al final del viaje,
si no de disfrutar cada etapa de este,
lo bueno, lo malo, lo extraño...
todo lo que permita aprender algo nuevo.

Así es como el día de hoy
llego al final de esta aventura
sin remordimientos
pues he disfrutado cada instante
de esta grandiosa travesía.”

Índice

Resumen	VIII
Abstract	VII
1 Introducción	1
1.1 COVs en interacciones con plantas.....	1
1.2 Flujo de trabajo para la medición de COVs.....	2
1.2.1 Captura de COVs.....	2
1.2.2 Separación de COVs.....	2
1.2.3 Medición de COVs	2
1.2.4 Identificación de COVs.....	3
1.2.5 Consideraciones de la técnica.....	3
1.3 Monitoreo de COVs	3
1.3.1 SIFT-MS	3
1.3.2 PTR-MS	4
1.3.3 e-nose	4
1.3.4 MIMS	4
1.4 Monitoreo continuo de COVs en la actualidad	5
1.4.1 Optimización de sistemas tradicionales para una mejor resolución temporal	5
1.5 Espectrometría de masas con ionización ambiental	5
1.5.1 Nano-DESI-MS	5
1.5.2 Plasma de baja temperatura	6
1.6 Interacción <i>Trichoderma-Arabidopsis</i> como modelo de estudio	7
2 Justificación	8
3 Definición de proyecto.....	9
4 Objetivo.....	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos específicos	10
5 Metodología.....	11
5.1 Materiales	11

5.1.1 Impresora y filamentos de impresión 3D	11
5.1.2 Material biológico.....	11
5.1.3 Reactivos.....	11
5.2 Estandarización de la sonda de LTP	12
5.3 Esterilización de semillas de <i>A. thaliana</i> para identificación de 6-PP	13
5.4 Crecimiento de <i>A. thaliana</i>	13
5.5 Infección de <i>A. Thaliana</i> con <i>T. atroviride</i> para identificación de 6-PP.....	14
5.6 Determinación del compuesto 6-fenil-α-pirona (6-PP) con MESF en GC-MS	14
5.7 Determinación de 6-PP utilizando LTP-MS	14
5.8 Crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>A. thaliana</i>	16
5.9 Cinética de 6-PP y otros COVs con LTP-MS en interacción <i>Arabidopsis-Trichoderma</i>	16
5.9.1 Cinética	16
6 Resultados.....	18
6.1 Estandarización de la sonda LTP	18
6.2 Identificación de 6-PP mediante GC-MS	20
6.3 Identificación de 6-PP mediante LTP-MS.....	20
6.4 Cinética de la molécula 6-PP	21
6.5 Procesamiento de datos	23
6.5.1 Pre-tratamiento	23
6.5.2 Normalización	24
6.6 Normalización de datos de la cinética de la molécula 6-PP.....	27
6.7 Identificación de otros COV's previamente reportados	28
7 Discusión	30
7.1 Limitaciones de técnicas convencionales para monitoreo en tiempo real de COVs.....	30
7.2 Ionización ambiental	30
7.3 Resolución temporal.....	31
7.4 Perfiles metabólicos sin alteraciones por manipulación.	31
7.5 Monitoreo de COVs <i>in-vivo</i>	31
7.6 Cinética de metabolitos de interés.....	32
7.7 Estandarización de datos	32

7.8 Monitoreo de COVs en interacción planta-microorganismo en tiempo real e <i>in-vivo</i> con una técnica novedosa: LTP-MS	33
8 Conclusiones	35
9 Perspectivas	36
10 Bibliografía	37
11 Productos científicos	40
11.1 Artículo.....	41
11.2 Poster XXXI Congreso Nacional de Bioquímica, Aguascalientes, 2016.....	46
11.3 Poster Plant Biology, Honolulu, Hawaii, 2017.....	47
12 Anexos	48
Anexo I: Programa de normalización de datos en R	48
Anexo II: Parámetros de impresión para los diferentes filamentos	57

Resumen

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son moléculas de bajo peso molecular (50-200 Da) que se encuentran en forma de vapor en condiciones ambientales. En el mundo de la biología funcionan como respuesta a diferentes estímulos, en diferentes intervalos de tiempo, que abarcan desde segundos hasta días.

Las técnicas convencionales para medición de COVs utilizando espectrometría de masas (MS) requieren de dos fases que interfieren de manera importante su monitoreo en organismos biológicos.

La fase de captura posee alta afinidad por pocas moléculas, las concentraciones mínimas de captura dependen de la capacidad de adsorción de la fibra hacia una molécula en específico, no es apta para moléculas que se emiten por tiempos cortos (minutos) y el sistema para la captura puede saturarse sin notarlo.

La fase de separación de las moléculas capturadas, requiere de tiempo para poder realizarse y solo se puede hacer por lotes.

La conjunción de ambas fases resulta en la pérdida de información durante la emisión de COVs, como el momento en el que son emitidos. Factores que no permiten conocer de manera fiel, el comportamiento en sistemas biológicos.

En el laboratorio de análisis bioquímico e instrumental se ha desarrollado un sistema de ionización ambiental, el plasma de baja temperatura (LTP), capaz de mejorar la manera en que se monitorean los COVs en organismos, para ello se estandarizó esta técnica y se desarrolló un software, que en su conjunto permiten monitorear COVs de forma cercana a la realidad.

La aplicación de LTP-MS descrita en este trabajo, utilizando el sistema *Trichoderma-Arabidopsis*, logró reducir en 26 horas detección de la producción de la molécula volátil 6-Pentil- α -Pirona (6-PP). Las técnicas convencionales como MEFS-GC-MS logran su detección tras 72 horas, mientras que utilizando LTP-MS se logró identificar su producción a las 46 horas. El uso de esta técnica no requirió de tratamiento previo de la muestra, permitiendo monitorear moléculas *in-vivo* y en tiempo real.

Abstract

Volatile Organic Compounds (VOCs) are molecules with low molecular weight (50-200 Da) which are in gas phase in ambient conditions. In biology, its function in response to stimuli, in different time intervals, from seconds to days.

Conventional techniques to VOCs measurement by mass spectrometry (MS) require two steps, capture and separation, that interfere with *in-vivo* molecule monitoring.

Capture process shows high affinity for selected molecules. It is not fit to capture molecules in low concentration or those that are emitted by short time lapses, and the system could be saturate without noticing.

Separation phase of captured molecules it is time consuming and can be done only in batches.

As a result of both steps information is lost during VOCs emission, such as the moment in which they are released. This reflects as a non realistic measurement compared to what is happening in real time.

In the laboratory of biochemical and instrumental analysis we developed a Low-Temperature Plasma (LTP) based ambient ionization source for mass spectrometry, to improve the way VOCs are monitored in organisms, for this purpose we standardized this technique and developed a software, which let us monitor VOCs in closer way to reality.

We use a *Trichoderma-Arabidopsis* system, reducing up to 26 hours the detection of production of the volatile molecule 6-Pentil- α -Pirona (6-PP). Conventional techniques such as SPME-GS-MS can detect 6-PP in 72 hours, while using LTP-MS we can detect it at 46 hours. This technique does not require pre-treatment of the sample and let us monitor molecules *in-vivo* and in real time.

1 Introducción

1.1 COVs en interacciones con plantas

Los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) son moléculas de bajo peso molecular (50 a 200 Da) [1], con estructuras primarias constituidas en su mayoría por carbono, a las que se les pueden añadir elementos como H, N, O, F, S, Cl y Br [2]. Entre sus características fisicoquímicas resalta su facilidad para pasar a fase gaseosa en condiciones normales de presión y temperatura: 0.001kPa y 20 °C respectivamente, condiciones de vaporización para la mayoría de las moléculas denominadas como COVs [3].

Los COVs

Los COVs pueden ser emitidos de manera constitutiva o durante interacciones de plantas con otros organismos. La detección de estos compuestos por otras plantas cercanas puede inducir respuestas de defensa tempranas contra un estímulo específico, considerado como un sistema de alerta. Los COVs proporcionan información de la condición biológica en que se encuentra un organismo [4].

Las plantas bajo herbivoría poseen diferentes sistemas de defensa mediados por volátiles, que abarcan la liberación de compuestos con el fin de repeler a los herbívoros, hasta la emisión de compuestos cuyo objetivo es atraer a depredadores naturales de aquellos organismos que se están alimentando de la planta [5].

Reportes indican que las plantas que sufren ataques de herbívoros, poseen perfiles de compuestos volátiles diferenciales de aquellas que son dañadas mecánicamente o que no han sido dañadas [4]. De igual forma existen interacciones benéficas para los microorganismos, así como para las plantas que son mediadas por COVs, un ejemplo ampliamente estudiado son las interacciones entre hongos y plantas. Las plantas se ven favorecidas por un aumento en su biomasa y una mejora en su sistema de defensa ante patógenos, el hongo es beneficiado obteniendo alimento y residencia como producto de la relación [3].

1.2 Flujo de trabajo para la medición de COVs

Los COVs medidos por espectrometría de masas utilizan un conjunto de técnicas que involucra una fase de captura, separación, medición e identificación de moléculas. Existen algunas modificaciones de estas técnicas, sin embargo, el flujo de trabajo es similar, cambiando el tratamiento de la muestra (fase de captura). A continuación, se describe el flujo de trabajo de una de las técnicas convencionales más utilizadas para el monitoreo de COVs (MEFS-GC-MS) [6].

1.2.1 Captura de COVs

La micro-extracción en fase sólida (MEFS) permite capturar COVs. Utiliza una membrana de sílice cubierta con una fase estacionaria, que es expuesta a una fase acuosa o gaseosa hasta alcanzar el equilibrio entre el analito en la muestra. El analito capturado se desorbe en el puerto de inyección de la cromatografía de gases [7].

1.2.2 Separación de COVs

Las moléculas se desorben de la membrana en la que se encuentran aplicando gradientes de temperaturas que facilitan el desprendimiento de los compuestos de la microfibra, las temperaturas utilizadas abarcan desde 45 °C hasta 300 °C. La desorción es realizada dentro un puerto de inyección, los compuestos liberados son transportados a una columna de cromatografía de gases (GC), en donde se procede a su separación, son liberados continuamente dependiendo de la temperatura.

1.2.3 Medición de COVs

Una vez separados los compuestos en el cromatógrafo de gases son detectados en un espectrómetro de masas, en este se añaden cargas (ioniza) a las moléculas formando iones que son conducidos al interior del espectrómetro en condiciones de vacío utilizando campos electromagnéticos como guías. Dependiendo de la relación masa/carga (m/z), las moléculas son conducidas al detector, donde son registradas

las intensidades y la información es enviada a la computadora que se encargará de generar los espectros de masas.

1.2.4 Identificación de COVs

Gracias a las bases de datos con las que cuentan los espectrómetros de masas o en su defecto a colecciones con acceso público, es posible realizar la identificación de las moléculas que se pretenden analizar, en base a tres criterios principales: tiempo de retención en la columna, relación m/z de las moléculas y patrones de fragmentación tras aplicar una cantidad de energía conocida al ion de interés.

1.2.5 Consideraciones de la técnica

El uso de técnicas como MEFS-GC-MS toma tiempos considerables para la captura (horas e incluso días) y separación (minutos u horas) de los compuestos volátiles.

Existen técnicas complementarias de MEFS que requieren una fase extra de concentración de la muestra [8] teniendo resultados en horas o días, dependiendo del sistema y de la complejidad de las moléculas que se desean medir.

MEFS-GC-MS es una técnica altamente específica para la detección de algunos COVs ya que depende de la afinidad y grado de saturación de la fibra haciendo de esta técnica una herramienta poco apta para la identificación de compuestos novedosos [4].

1.3 Monitoreo de COVs

1.3.1 SIFT-MS

Una técnica utilizada ampliamente para la detección de COVs es la espectrometría de masas de tubo de flujo iónico seleccionado o SIFT-MS por sus siglas en inglés (Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry). Tiene la cualidad de poder monitorear COVs en tiempo real y por periodos prolongados de tiempo, sin necesidad de pre-concentración o tratamiento previo de la muestra. Uno de los usos reportados fue para la medición de metabolitos gaseosos, producidos por bacterias crecidas en cultivos sanguíneos [9].

1.3.2 PTR-MS

La reacción de transferencia de protón acoplado a masas (PTR-MS) es ideal para el monitoreo de gases liberados por organismos, ioniza las moléculas orgánicas que se encuentran en fase gaseosa y posteriormente las moléculas cargadas son detectadas por un analizador, por ejemplo, un cuadrupolo. El uso de esta técnica requiere conocer los COVs que se desean monitorear, así como respectivos estándares para la comparación e identificación de las moléculas [10]. Para las pruebas funcionales de esta técnica se han medido hidrocarburos aromáticos y aldehídos [11]. También se ha comprobado su funcionamiento para el monitoreo de volátiles producidos por hongos [3].

1.3.3 e-nose

El sistema e-nose es una técnica que recientemente ha cobrado importancia en el monitoreo de COVs en tiempo real e *in-situ*. Esta tecnología se encuentra en desarrollo y su principal inconveniente al presente recae en la capacidad para monitorear simultáneamente múltiples compuestos. El desarrollo del sistema e-nose tiene como objetivo el monitoreo de gases residuales tras la combustión de la gasolina [12].

1.3.4 MIMS

La técnica *Membrane Introduction Mass Spectrometry* (MIMS) requiere el uso de membranas altamente selectivas para introducir la muestra al analizador de masas, su principio de funcionamiento recae en absorber, difundir y evaporar la muestra a través de la membrana que se encuentra por un lado en condiciones ambientales y por el otro en condiciones de vacío. Esta técnica permite trabajar de forma continua o por lotes, se desarrolló en un inicio para realizar la medición de oxígeno y carbono *in-situ* durante la cinética de la fotosíntesis, posteriormente se utilizó para el análisis de sistemas fotoquímicos y mediciones *in-vivo* de gases disueltos y compuestos orgánicos en sangre [13].

1.4 Monitoreo continuo de COVs en la actualidad

Actualmente existen diversos estudios que requieren del monitoreo de COVs de forma continua, sin embargo, el tiempo de resolución comúnmente es alrededor de horas y en condiciones sumamente controladas, por lo que se logran obtener mejores resultados temporales, sacrificando datos fieles a la realidad.

Las técnicas que resuelven la resolución temporal son altamente selectivas para el monitoreo de alguno de los COVs que son emitidos por sistemas biológicos, impidiendo conocer con precisión el comportamiento de todas las moléculas

1.4.1 Optimización de sistemas tradicionales para una mejor resolución temporal

En 2009 Jansen y colaboradores [14], realizaron el monitoreo continuo de monoterpenos (COVs) en plantas de jitomate inoculadas con un hongo, demostrando cambios en el flujo de COVs dependientes del tiempo, causados por *Botrytis cinera*. La planeación del experimento permitió obtener una resolución temporal del orden de magnitud de horas, alcanzaron una velocidad de 1 hora/medición. El método utilizado incorpora un sistema acarreador de COVs mediante el flujo de aire limpio y una cromatografía de gases que permite separar los COVs para su detección. Los experimentos realizados por este grupo de investigación se realizaron en condiciones altamente controladas dentro del laboratorio, distando mucho de las condiciones reales de cultivos en los que una interacción de esta naturaleza ocurriría.

1.5 Espectrometría de masas con ionización ambiental

1.5.1 Nano-DESI-MS

Nano-DESI-MS por sus siglas en inglés (Desorption Electro Spray Ionization) es una técnica con una gran resolución temporal (segundos), que con las adaptaciones adecuadas es posible realizar análisis superficiales *in-situ* dentro de la muestra, sin necesidad de tratamiento previo [15].

La implementación de técnicas como nano-DESI-MS o similares, requieren del uso de solventes y alto voltaje directamente sobre muestra. En sistemas biológicos el

uso de ambas condiciones repercute en la alteración del organismo, por que es estrategia altamente destructiva, el uso de solventes puede resultar en la detección incorrecta de algunos de los compuestos de interés. Además, impide realizar segundo análisis sobre el mismo punto de la muestra para lograr un monitoreo del sistema biológico a largo plazo.

1.5.2 Plasma de baja temperatura

El plasma de baja temperatura (LTP) es una fuente de ionización ambiental [16] , su diseño actual es reconocido como un estándar en el ámbito académico [17] debido a la disponibilidad al público del modelo 3D con fines no lucrativos en internet (<http://www.bioprocess.org/3D-LTP/LTP%20Parts.zip>), su bajo costo de producción y que los resultados obtenidos en este modelo de sonda permiten ser replicados en otros laboratorios [18]. Actualmente se sigue desarrollando y perfeccionado el diseño de la sonda en el Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental (LABI) del CINVESTAV Unidad Irapuato, cuenta con una patente nacional y tres internacionales (MX2012011702, US2015262804, EP2904629, WO2014057409). Uno de los primeros reportes del uso de la sonda de LTP realizado en el laboratorio en su tesis de doctorado por el Dr. Roberto Gamboa y colaboradores [19] fue hacer imágenes de la distribución de metabolitos de chile. Muchos de los compuestos encontrados abarcan rangos de m/z correspondientes a COVs, además el uso de la sonda de LTP permitió encontrar múltiples compuestos no reportados en la literatura a pesar de utilizar un modelo ampliamente estudiado.

En base a los estudios realizados en el LABI se ha demostrado la capacidad de la sonda de LTP para ionizar moléculas suavemente, es decir evita la destrucción de la molécula al ionizarla con baja energía. La ionización por LTP es ideal para la búsqueda de nuevas moléculas, ya que permite obtener información de los iones padre y su patrón de fragmentación resultando más sencillo la identificación los compuestos medidos.

1.6 Interacción *Trichoderma-Arabidopsis* como modelo de estudio

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso utilizado frecuentemente en sistemas de biocontrol. Estimula el crecimiento de plantas al favorecer la formación de raíces secundarias y ayuda a combatir enfermedades en las plantas de formas directas e indirectas [20]. *T. atroviride* produce una molécula volátil llamada 6-Pentil- α -pirona (6-PP), principal responsable de los beneficios producidos en plantas que interactúan con *Trichoderma* [21].

Arabidopsis thaliana se ha utilizado como una planta modelo para el estudio científico, no solo para comprender el universo de las plantas, si no de la biología en general [22]. Una cualidad de particular interés, es su capacidad para establecer interacciones con microorganismos e insectos que pueden ser benéficas o perjudiciales para la planta [23].

La interacción entre *Trichoderma* y *Arabidopsis* tienen un efecto peculiar en la producción de la molécula 6-PP. Establecida la interacción *Trichoderma* incrementa la emisión de 6-PP de un 58 % de COVs totales a un 69%, tras 5 días de interacción, cuando *Trichoderma* ha logrado alcanzar las raíces de *Arabidopsis* [21].

2 Justificación

Las limitaciones tecnológicas actuales impiden seguir el cambio de perfiles metabólicos en tiempos biológicamente relevantes como: una etapa en el ciclo de vida o como respuesta a un estrés específico.

3 Definición de proyecto

EL proyecto pretende superar las limitaciones tecnológicas que impiden el monitoreo en tiempo real de los COVs emitidos por organismos biológicos. La implementación del sistema de LTP-MS, que es una técnica novedosa de ionización ambiental, requiere de una estandarización que permita obtener datos reproducibles.

La estandarización consiste en tener un diseño unificado y eficiente de la sonda de LTP, desarrollo de muestreo y el tratamiento de los datos obtenidos.

El principal problema a resolver en esta técnica es el comportamiento de la ionización que, debido a las condiciones ambientales, sufre afecciones en la eficiencia de ionización, haciendo imposible la comparación de las mediciones realizadas a diferentes horas del día y entre días.

Para probar la eficiencia de la técnica de LTP-MS se utilizará una molécula ampliamente estudiada, el 6-PP producido por *T. atroviride* cuyo comportamiento puede ser alterado por la interacción con *A. thaliana*. La implementación exitosa de esta técnica permitirá conocer el comportamiento real del 6-PP, tanto en concentraciones más acertadas, como en el punto de inicio de su producción.

4 Objetivo

4.1 Objetivo general

Estandarizar el uso del LTP-MS para el monitoreo de perfiles metabólicos en tiempo real.

4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el diseño de la sonda de LTP.
- Realizar cinéticas en tiempo real de COVs ionizados ambientalmente con plasma de baja temperatura acoplada a espectrometría de masas.
- Desarrollar software eficiente que permita monitorear moléculas en tiempo real.
- Hacer pruebas de concepto con un modelo biológico.

5 Metodología

5.1 Materiales

5.1.1 Impresora y filamentos de impresión 3D

La impresora de extrusión 3D utilizada para la producción de la sonda de LTP es de la marca Makermex, modelo MM1, con capacidad de 20 cm³ aproximadamente.

Los filamentos para impresión en 3D para la estandarización de la sonda de LTP fueron comprados en la empresa Makermex localizada en León, Guanajuato. Los filamentos utilizados fueron: policarbonato (PC), ácido poliláctico (PLA), una combinación de tres monómeros de plásticos para uso especial de ingeniería conformada por acrilonitrilo, butadieno y estireno (ABS) y un poliuretano térmico especial flexible patentado (NinjaFlex).

5.1.2 Material biológico

El material biológico requerido para la parte de la interacción de *Trichoderma-Arabidopsis* fue proporcionado por dos laboratorios altamente especializados en cada sistema biológico.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo columbia 0 fueron proporcionadas por el laboratorio de la Dra. Nayelli Marsch Martínez de CINVESTAV-Irapuato.

La cepa de *Trichoderma atroviride* fue proporcionada por el laboratorio a cargo del Dr. Alfredo Herrera Estrella del LANGEBIO, Irapuato.

5.1.3 Reactivos

Los reactivos utilizados para la preparación de los ensayos y durante los análisis, son de grado laboratorio para su uso durante la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*. Los reactivos utilizados para espectrometría de masas son de grado HPLC:

- Medio de cultivo Murashige y Skoog-MS (SIGMA).
- Metanol 99.92% (FERMONT)
- Bacto™ Agar (BD)
- HCL 37% para ajuste de pH (SIGMA ALDRICH)
- KOH 85% (SIGMA ALDRICH)

- Cloro (uso comercial)

5.2 Estandarización de la sonda de LTP

Se realizaron diferentes versiones de modelos 3D de la sonda de LTP para determinar el mejor diseño que cumpliera con los requisitos de: fácil impresión, menor definición para no requerir impresoras de gran detalle, formas simples y sin partes aéreas. Las impresiones para el prototipo se realizaron en el software Cura versión 14.12.1[24] con poco relleno y bajo detalle. Se usó el material plástico PLA, por ser un material pensado para prototipos por su bajo costo y relativa facilidad

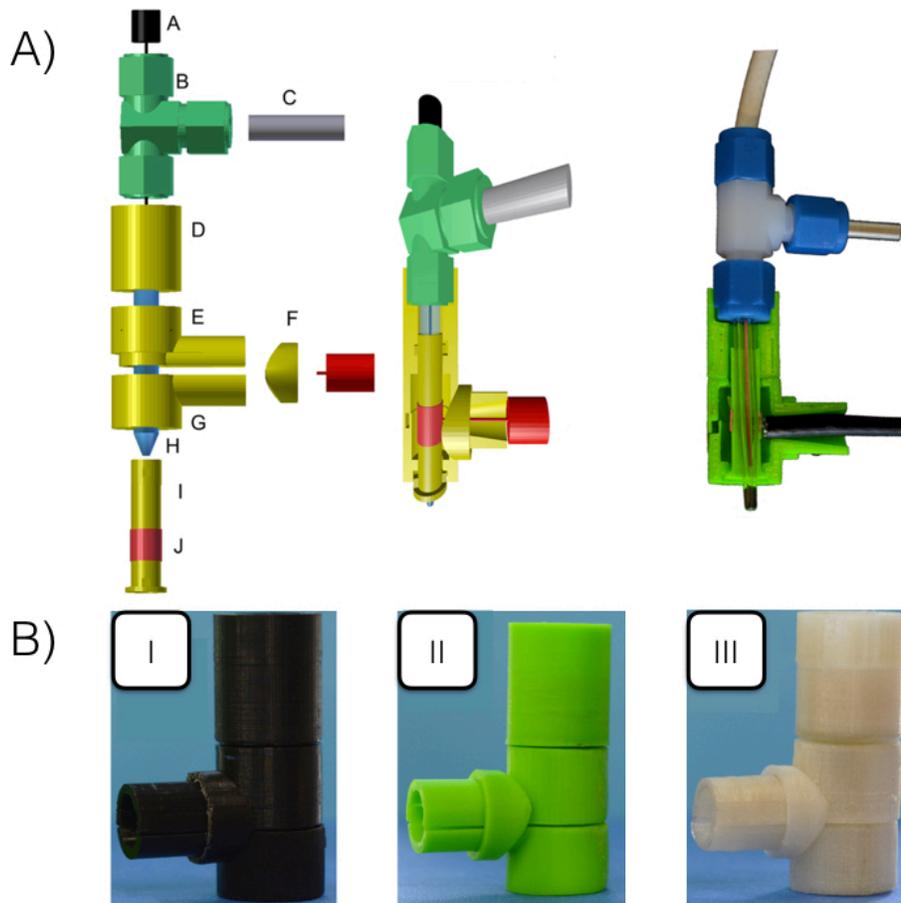


Figura 1. Diseño 3D de la sonda del LTP y piezas impresas utilizando la impresora 3D Makermex MM1. A) elector interno (-); B) T de unión; C) Entrada de Helio; D) Conector a T; E) Parte superior de T de sujeción; F) Anillo de seguridad; G) Parte inferior de T de sujeción H) Segunda barrera dieléctrica; I) Primera barrera dieléctrica; J) Electrodo externo (+). I) Prototipo en PLA; II) Prototipo en ABS; III) Prototipo en PC. (Martínez Jarquín. 2016).

para reciclarse. Los parámetros de impresión para cada filamento se muestran en el anexo II.

Una vez determinado el diseño final de la sonda (Figura 1 A), se probaron diferentes materiales plásticos para determinar el más conveniente en base a la resistencia al calor generado por el alto voltaje, calidad de impresión en alto detalle y relleno del 100%, y lo más importante de todo, el ruido generado por el material. Se utilizaron los materiales: PLA, ABS, NinjaFlex y PC (Figura 1B).

Ya determinado el modelo 3D final y el material ideal de impresión, se determinaron los parámetros de impresión y la disposición espacial para la impresión de cada pieza, para obtener una impresión homogénea y con la mínima cantidad posible de aire al interior de la pieza para evitar el cambio de propiedades de la sonda. Los parámetros finales de impresión se pueden consultar en el apéndice II.

5.3 Esterilización de semillas de *A. thaliana* para identificación de 6-PP

Las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas previamente para evitar contaminación por microorganismos, la desinfección se realizó colocando semillas en un tubo eppendorf, se lavaron con una solución de etanol 70% v/v con agitación por un periodo de 1 min, se decantó la solución de etanol y se agregó 1 mL de solución de cloro 20% v/v, se agitó y se dejó reposar durante 7 min, se decantó y se realizaron 4 lavados con agua desionizada estéril, finalmente se suspendieron las semillas en 300 μ L de agua estéril y se guardaron en refrigeración para vernalización y se cubrió el tubo con papel aluminio para evitar germinación a causa de la luz. Para su siembra se dejaron en refrigeración por al menos 3 días.

5.4 Crecimiento de *A. thaliana*

Las semillas estériles de *A. thaliana*, fueron germinadas y crecidas en placas con 0.2X de agar MS, 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar y con un pH de 5.7, ajustado con soluciones diluidas de HCl o KOH. En cada placa fueron sembradas 10 o 20 plantas. Las placas fueron colocadas en un ángulo de 65° respecto a la horizontal para permitir el crecimiento adecuado de las raíces y hojas, las placas con las

plantas se colocaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16:8 horas luz:obscuridad a una temperatura de 22 °C durante 5 días.

5.5 Infección de *A. thaliana* con *T. atroviride* para identificación de 6-PP

Pasados 5 días de la siembra de *A. thaliana* en las placas, se inocularon esporas de *T. atroviride* contadas previamente siguiendo la metodología para conteo de esporas en cámara de Neubauer. La concentración de esporas utilizadas para la primera determinación de 6-PP fue de 1×10^6 , una vez determinada la sensibilidad de medición del equipo se utilizaron 8×10^4 esporas.

5.6 Determinación del compuesto 6-fenil- α -pirona (6-PP) con MESF en GC-MS

Los análisis para la identificación del 6-PP se realizaron en el laboratorio de fitobioquímica del departamento de biotecnología y bioquímica a cargo del Dr. Jorge Molina Torres en CINVESTAV unidad Irapuato. El análisis se realizó en los días 3 y 5, días en que se reporta una mayor concentración de los volátiles de interés[21]. Para la determinación del 6-PP se realizó una MEFS con exposición de la fibra por 1 hora, se desorbió a una temperatura de 230 °C para introducir los compuestos a una columna Agilent 19091S-433 HP-5ms y utilizar una detección de COVs por GC-MS con las condiciones en columna del equipo de GC-MS fue de 45 °C al comienzo de la corrida, con un incremento de 9 °C/min hasta alcanzar 250 °C manteniendo la temperatura por 1 minuto y disminuyendo hasta 220 °C.

Utilizando la base de datos NIST (National Institute of Standards and Technology) se logró la identificación de 6-PP con un tiempo de retención de 14.5 min.

5.7 Determinación de 6-PP utilizando LTP-MS

Se realizó la medición del 6-PP mediante LTP-MS utilizando el sistema *Trichoderma-Arabidopsis* tras 3 y 5 días de interacción, la medición se realizó exponiendo el sistema al plasma de acuerdo con la configuración que se muestra

en la figura 2. Para evitar la contaminación del sistema se trabajó bajo zona estéril, limpiando todo con etanol al 70%, y abriendo las cajas cerca de mecheros.

Se utilizó una placa de movimiento para mantener la misma distancia en cada muestra y medición con respecto al rayo del plasma y la entrada al espectrómetro de masas, para disminuir variaciones causadas por diferencias de distancias entre entrada de la muestra al equipo, posición del plasma y posición de la muestra durante medición.

Durante la medición se encontró el ion de m/z 167.083 correspondiente con el peso de la molécula de 6-PP + [H⁺], ionización característica al utilizar LTP como fuente de ionización [25], se obtuvo el patrón de fragmentación aplicando energía (30 eV) al ion de m/z 167 y se comparó con patrones de fragmentación de estándares depositados en la base de datos de NIST, para la identificación de la molécula de interés.

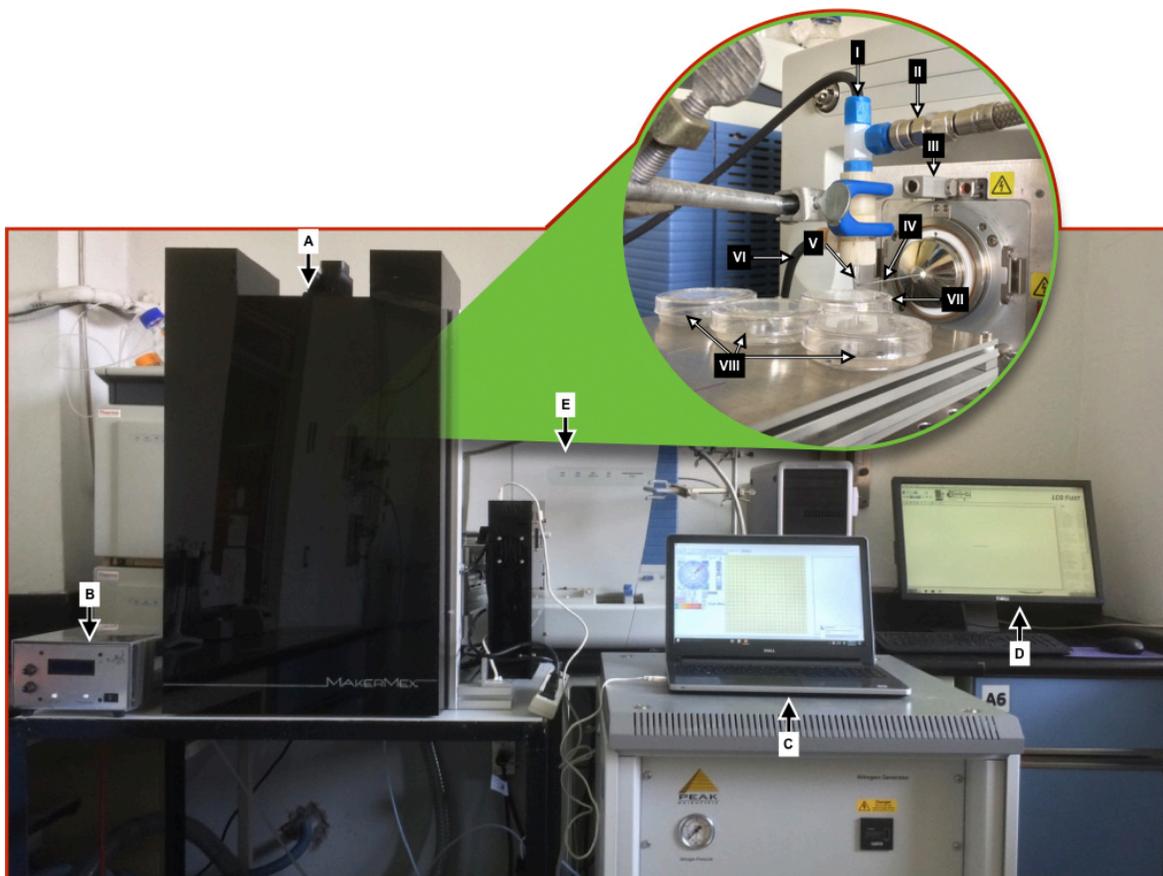


Figura 2. Disposición general del equipo para el muestreo y disposición sobre el robot muestreador. A) Robot muestreador; B) Fuente de poder (10kV); C) software controlador del robot muestreador; D) Software controlador del equipo de masas E) Espectrómetro de masas (Trampa de iones). I) Alto voltaje positivo; II)

Helio; III) Switch ambiental; IV) Ion transfer; V) Plasma de baja temperatura; VI) Tierra de alto voltaje; VII) Caja petri con estándar (metanol grado HPLC); VIII) Muestra con tres réplicas. VII y VIII se encuentran en cajas petri con medio de cultivo en las mismas condiciones y concentraciones.

5.8 Crecimiento de *Trichoderma atroviride* y *A. thaliana*

Se sembraron 20 semillas de *A. thaliana* por caja con triplicado en condiciones estériles y se mantuvieron en cámaras de crecimiento por 5 días a 24 °C, con un fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad, al quinto día se dejaron únicamente 10 plantas por caja para la estandarización de las condiciones de medición. Posteriormente se inoculó una cantidad de 8×10^4 esporas de *T. atroviride* y se conservó el sistema en condiciones ambientales para medir los COVs a partir del momento de inoculación con *T. atroviride*.

5.9 Cinética de 6-PP y otros COVs con LTP-MS en interacción *Arabidopsis-Trichoderma*

Se realizaron mediciones a lo largo de la interacción *Arabidopsis-Trichoderma* durante 3 días realizando 4 mediciones por día, antes de cada medición se tomó un espectro de estándar interno (metanol) en adelante llamado simplemente estándar a menos que se precise otra cosa. El estándar es necesario ya que al realizar las mediciones en condiciones ambientales, existe ruido que provoca una ionización particular de las condiciones del momento, haciendo no comparables las diferentes mediciones a lo largo del tiempo. Posteriormente, se midió la muestra por triplicado, repitiendo esta operación para cada medición en los diferentes tiempos.

5.9.1 Cinética

Se desarrolló un código en el laboratorio que permite realizar cinéticas para visualizar los datos de una forma simple. Con esto se pudo identificar el comportamiento de uno o múltiples metabolitos de interés producidos por el sistema *Arabidopsis-Trichoderma*. Así mismo es capaz de identificar las moléculas que presuntamente son más interesantes en base a su relación de m/z , o dependiendo de la intensidad de esta.

Para fines de este estudio son aquellas moléculas que tienen una mayor concentración (el 6-PP cubre cerca del 70% de COVs totales emitidos), es posible adaptar el código a aquellas moléculas que su cinética tenga mayores variaciones respecto a dos tiempos específicos o a lo largo del tiempo, cambios que solo son detectables en momentos muy específicos (segundos, minutos u horas) como posible respuesta a algún estrés específico.

Una vez identificados los iones de las moléculas con mayores concentraciones son ordenadas en forma descendiente para posteriormente elegir las de acuerdo al lugar que ocupen en el total de iones detectados. Conociendo la relación m/z de la molécula que nos interesa ya sea por su masa específica o por su nivel de concentración relativa, se grafica el comportamiento de la concentración a lo largo del tiempo.

Es posible graficar el comportamiento del ion en las tres réplicas biológicas de forma predeterminada, dentro de la misma gráfica e incluso se puede comparar sus valores antes y después de normalizar los datos. Si se requiere monitorear un mayor número de réplicas se pueden realizar modificaciones simples dentro del código que permitan añadir tantas réplicas sean necesarias. También es posible ver el comportamiento de múltiples iones de interés simultáneamente.

6 Resultados

6.1 Estandarización de la sonda LTP

El diseño de la sonda de plasma busca obtener un modelo funcional, económico, reproducible, fácil de elaborar y de sustituir en caso de que alguna pieza se rompa. Para lograr la optimización de la sonda se buscó el mejor material para su elaboración. El policarbonato (PC) resultó ser el mejor material probado (figura 1 B-III), debido a sus cualidades como dureza, resistencia a altas temperaturas y el menor desprendimiento de compuestos volátiles que puedan intervenir durante el análisis de muestras. Por el contrario, se identificó el material NIJAFlex como el material menos óptimo para imprimir la sonda ya que no es resistente a la temperatura generada por el alto voltaje y se quema, produciendo orificios en la sonda. Por su parte, el ABS y el PLA (figura 1 B-I-II), son materiales que no se recomiendan por el nivel de ruido que generan al liberar muchos compuestos plásticos debido a la alta temperatura, los cuales interfieren con el análisis ambiental al introducir más ruido del que ya se tiene de forma natural.

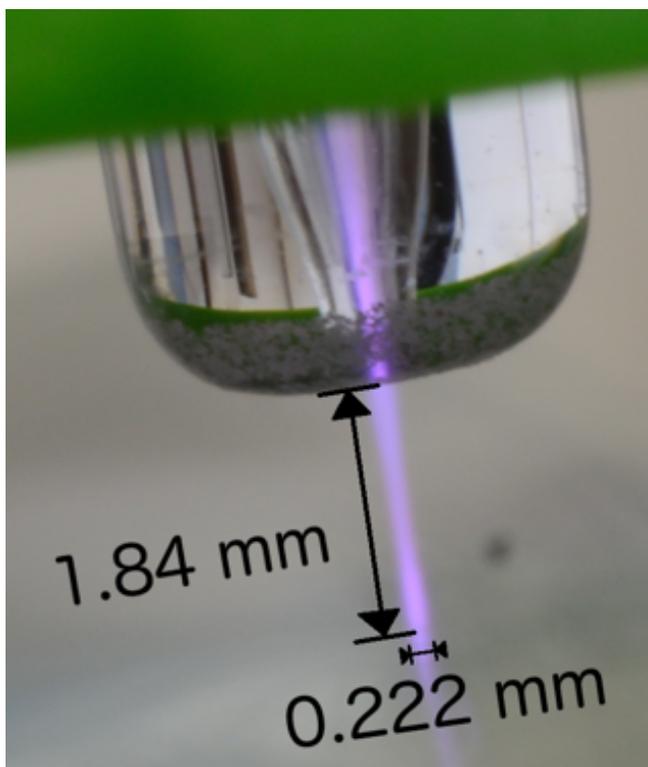


Figura 3. Estandarización de la sonda de LTP con utilizando PC y con dimensiones del rayo de 1.84 mm de largo y 222 μ m de diámetro. (Martínez-Jarquín. 2016)

La caracterización del rayo de plasma generado por la doble barrera dieléctrica tras aplicar voltaje (figura 4) arrojó temperaturas inferiores a 30 °C (figura 5) cuando se utiliza a 10 kV, con una frecuencia de 11 kHz, el diámetro del plasma es cercano a los 222 μm y el largo mide cerca de 1.88 mm, el diámetro del plasma depende de la punta utilizada, pudiendo hacer adaptaciones para puntos más finos o robustos, según sean las necesidades del análisis.

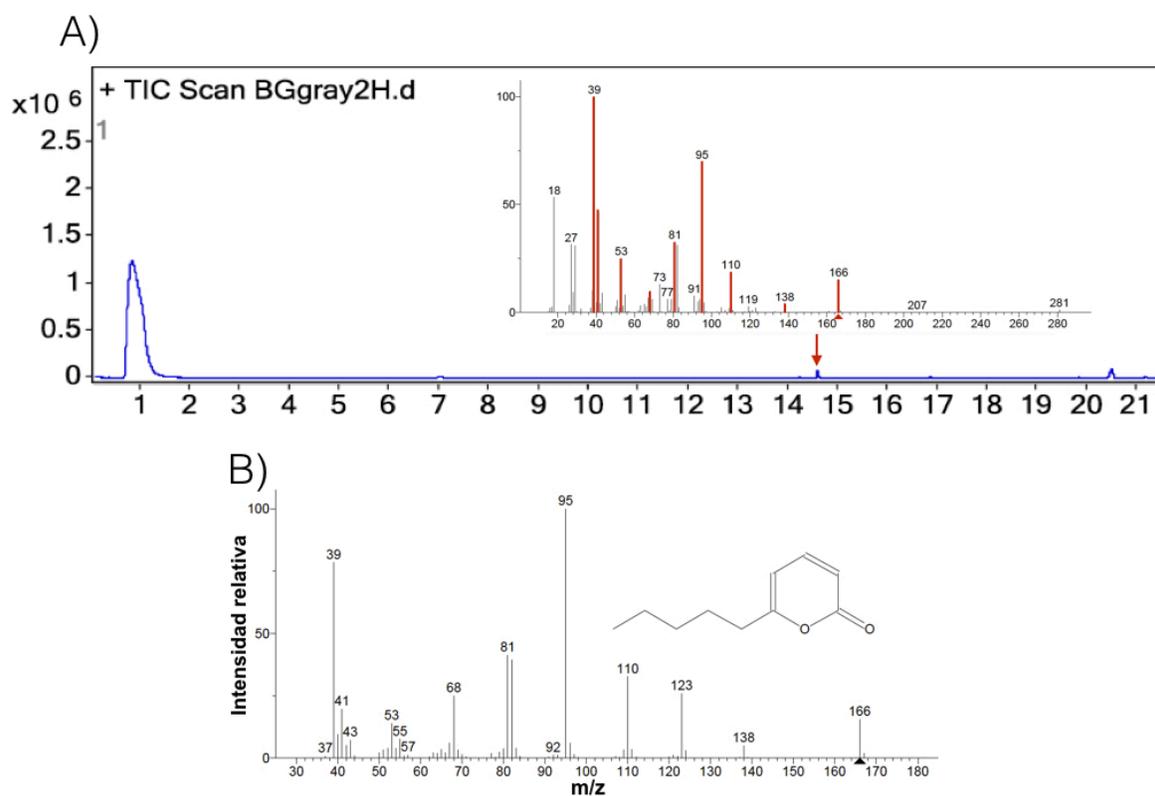


Figura 4. Identificación de 6-PP utilizando cromatografía de gases acoplada a masas. A) cromatograma con identificación de compuestos de interés al minuto 12 y espectro de masas de compuestos encontrados. Se resaltan en color rojo los fragmentos que coinciden con el patrón de fragmentación del estándar del 6-PP. Se identificó al ion 166 como molécula madre del 6-PP; B) Espectro de masas de estándar de 6-PP.

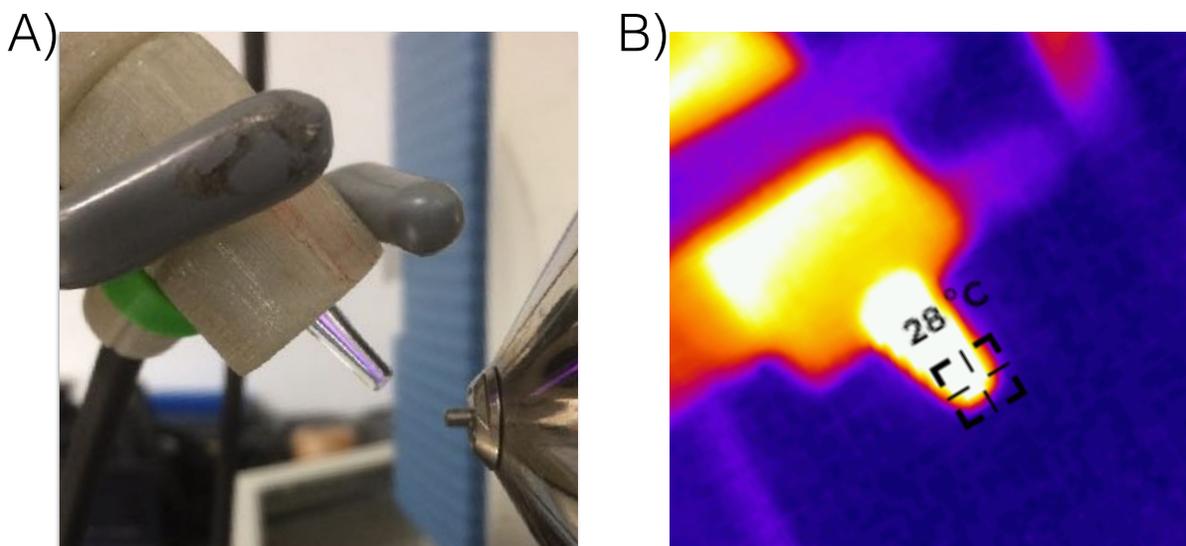


Figura 5. Medición de temperatura del plasma de baja temperatura. A) Vista en espectro de luz visible de la Sonda de LTP. B) Vista de la sonda de LTP en luz infrarroja para determinar temperatura, la punta que contiene el plasma se encuentra a una temperatura de 28 °C.

6.2 Identificación de 6-PP mediante GC-MS

Utilizando el sistema *Trichoderma-Arabidopsis* tras 3 días de interacción se logró identificar la molécula 6-PP utilizando la microextracción en fase sólida y posteriormente realizando una corrida en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas figura 6. Durante la cromatografía de gases se obtuvo un pico al minuto 14 aproximadamente que indica la presencia de compuestos de interés. El pico obtenido a los 14 minutos fue analizado inmediatamente por espectrometría de masas resultando en la identificación de 6-PP, en base al patrón de fragmentación obtenido, el cual se analizó utilizando la base de datos de NIST [26] incluida en el software del equipo.

6.3 Identificación de 6-PP mediante LTP-MS

Tras 3 días de interacción del sistema *Trichoderma-Arabidopsis* se determinó la presencia del 6-PP utilizando la sonda de LTP como fuente de ionización ambiental acoplada a espectrometría de masas. Esta prueba permitió identificar un ion con m/z de 167 que coincide con la protonación de la molécula de 6-PP (masa=166 + H^+), además se obtuvo su patrón de fragmentación.

Los patrones de fragmentación de la molécula de 6-PP obtenidos a partir del uso de la sonda de LTP se compararon con los patrones de fragmentación de la base de datos del NIST y se obtuvieron patrones similares (figura 6) al usar fuentes de ionización diferentes (plasma e impacto electrónico).

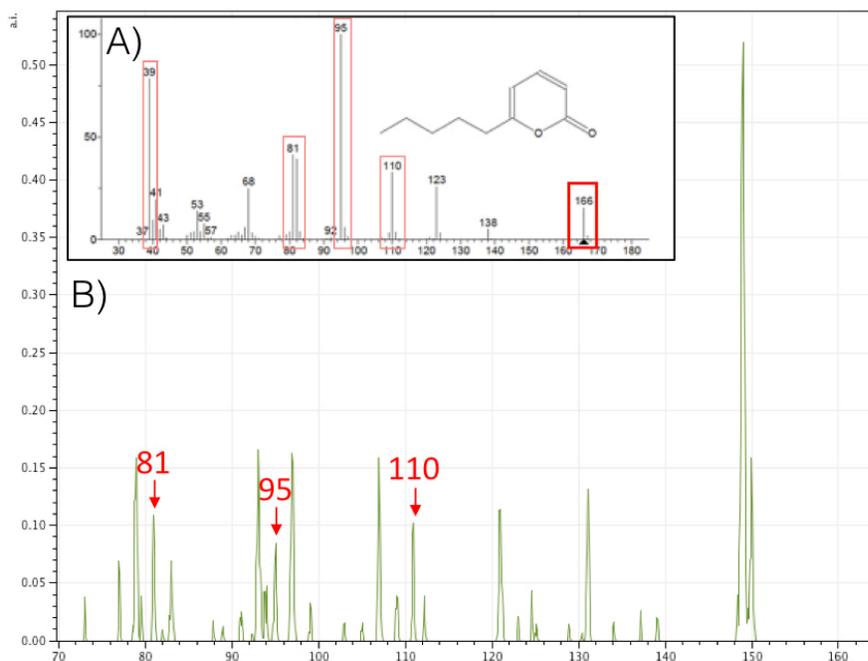


Figura 6. Identificación de 6-PP utilizando plasma de baja temperatura (LTP) acoplado a masas. A) Patrón de fragmentación de 6-PP depositado en la base de datos de NIST. B) patrón de fragmentación a partir del ion padre obtenido por ionización con LTP

6.4 Cinética de la molécula 6-PP

Se realizó una medición blanco (T0), con LTP-MS, de una placa con agar MS 0.2 X antes de ser inoculada con *Trichoderma*. Una segunda placa con estándar de referencia de intensidades de concentración conocida (metanol). Se inocularon 3 placas con agar MS 0.2 X con 8×10^4 esporas de *Trichoderma* en un ambiente estéril y se tomó el primer espectro (T1) de la muestra con LTP-MS, se continuaron tomando espectros durante 3 días, hasta que se detectó el comienzo de la producción de 6-PP, es decir a las 46 horas.

La figura 7 muestra la cinética de la molécula de 6-PP obtenida hasta la hora 46, para las tres réplicas biológicas se encontró un cambio significativo entre la hora 33 y 46.

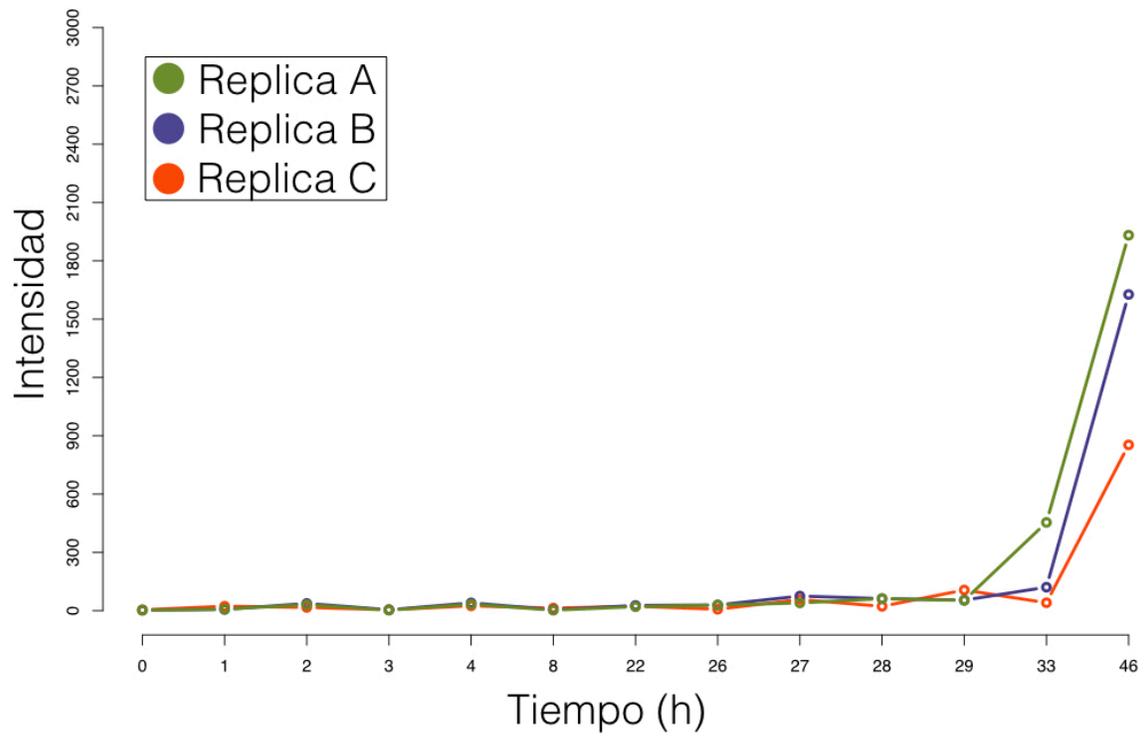


Figura 7. Cinética de la molécula de 6-PP utilizando LTP-MS. Tres réplicas biológicas sembradas en placas con medio MS 0.2 X, adicionado con: 30 g/L de sacaras y 7 g/L de agar y con un ajuste de pH a 5.7 utilizando HCl o KOH. y 80,000 esporas de *T. atroviride*.

6.5 Procesamiento de datos

Los datos obtenidos se convirtieron a formato libre (.mzML) utilizando el programa MSConvert versión 2.0.

Los parámetros para la conversión de archivos fueron: Output format: mzML, Binary encoding precisión: 32-bit, las casillas activadas fueron: Write index, Use zlib compression y TPP compatibility, el filtro utilizado fue Ms Levels con levels: 1- .

Con los datos en formato mzML se procesaron con ayuda del lenguaje de programación R, versión 3.2 y posteriores, la figura 8 muestra el flujo de trabajo que se siguió para darle el tratamiento a los datos colectados en el espectrómetro de masas. El programa para el procesamiento de los datos se muestra en Anexo I.

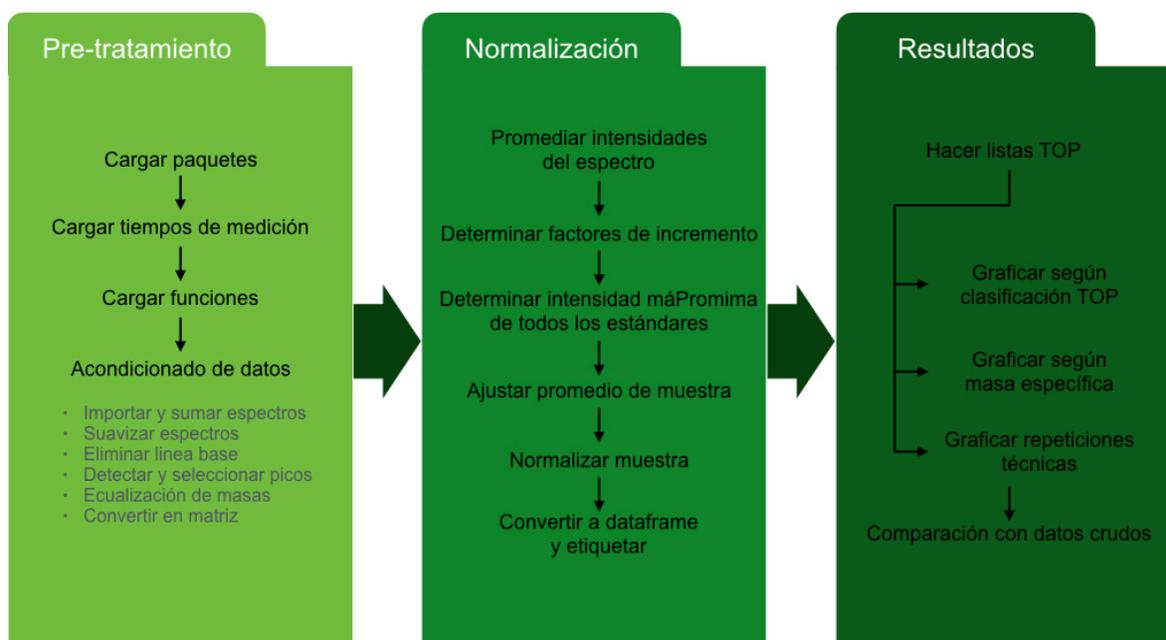


Figura 8. Flujo general de tratamiento de datos para las fases de pre-tratamiento, normalización y resultados.

6.5.1 Pre-tratamiento

Los paquetes utilizados en el tratamiento de datos fueron: MALDIquant, MALDIquantForeign y ggplot2, que permiten realizar el tratamiento previo a espectros de masas, importar/exportar espectros de masas y graficar respectivamente. Posteriormente se guardó la información de los tiempos de

medición y se cargan las funciones que se utilizarán a lo largo del tratamiento de los datos, las cuales se describirán en las siguientes secciones

El primer paso para el tratamiento de datos es la importación de los archivos en formato mzML y la suma de los 10 espectros de cada medición del estándar y de cada una de las réplicas biológicas por separado. La suma de espectros permite reducir el ruido aleatorio generado por el equipo y el ambiente.

Se realizó un suavizado y corrección de la línea base como parte del pretratamiento de datos, que permitirá obtener un análisis más certero de la información obtenida. La alineación de picos hace coincidir las masas de los picos detectados en los diferentes tiempos de muestreo, este paso es crucial ya que el error del equipo puede producir un desfase de picos entre cada medición con un margen de error de $\pm 0.3 m/z$, lo que arroja miles de picos con relación de masa carga diferentes a pesar de ser el mismo ion.

Se realizó la detección y selección de picos y se eliminaron los picos propios del ruido y del ambiente, teniendo en cuenta un valor en la relación de señal/ruido de 3, es decir, se seleccionaron aquellos picos cuyas intensidades fueran el triple a lo considerado como ruido del equipo.

Se ecualizaron las masas de los espectros en base al error de medición propio del equipo de $\pm 0.3 m/z$. La información de todas las mediciones realizadas se guardaron en forma de matriz para poder procesarse.

6.5.2 Normalización

Para la parte de la normalización se dividen en dos grupos principales. El primero con todos los espectros correspondientes al estándar, el segundo grupo de datos con los espectros correspondientes a las muestras, durante la normalización se aplican pasos a un grupo o a otro o a ambos simultáneamente, la figura 9 muestra un resumen del diagrama general de la normalización, muestra gráficamente el paso e indica sobre qué grupo se aplicó cada paso.

Se obtuvo el promedio de cada espectro de cada medición tanto del estándar como de la muestra, durante este punto se pretende disminuir picos demasiado intensos que no sean propios de la muestra deseada y que hayan pasado el sistema de

pretratamiento. El segundo paso consiste en determinar el factor de incremento que indica el número de veces que es necesario multiplicar el promedio del espectro para alcanzar la intensidad del pico, esto se aplica para cada pico detectado, de esta forma se mantiene la relación que existe entre todos los picos del espectro tras la normalización.

El tercer paso se aplica solamente al estándar, de todos los promedios previamente calculados de cada uno de los espectros, es elegido el mayor, teóricamente es el punto en el que el equipo posee mayor sensibilidad en condiciones ambientales, obteniendo valores más fieles a los reales.

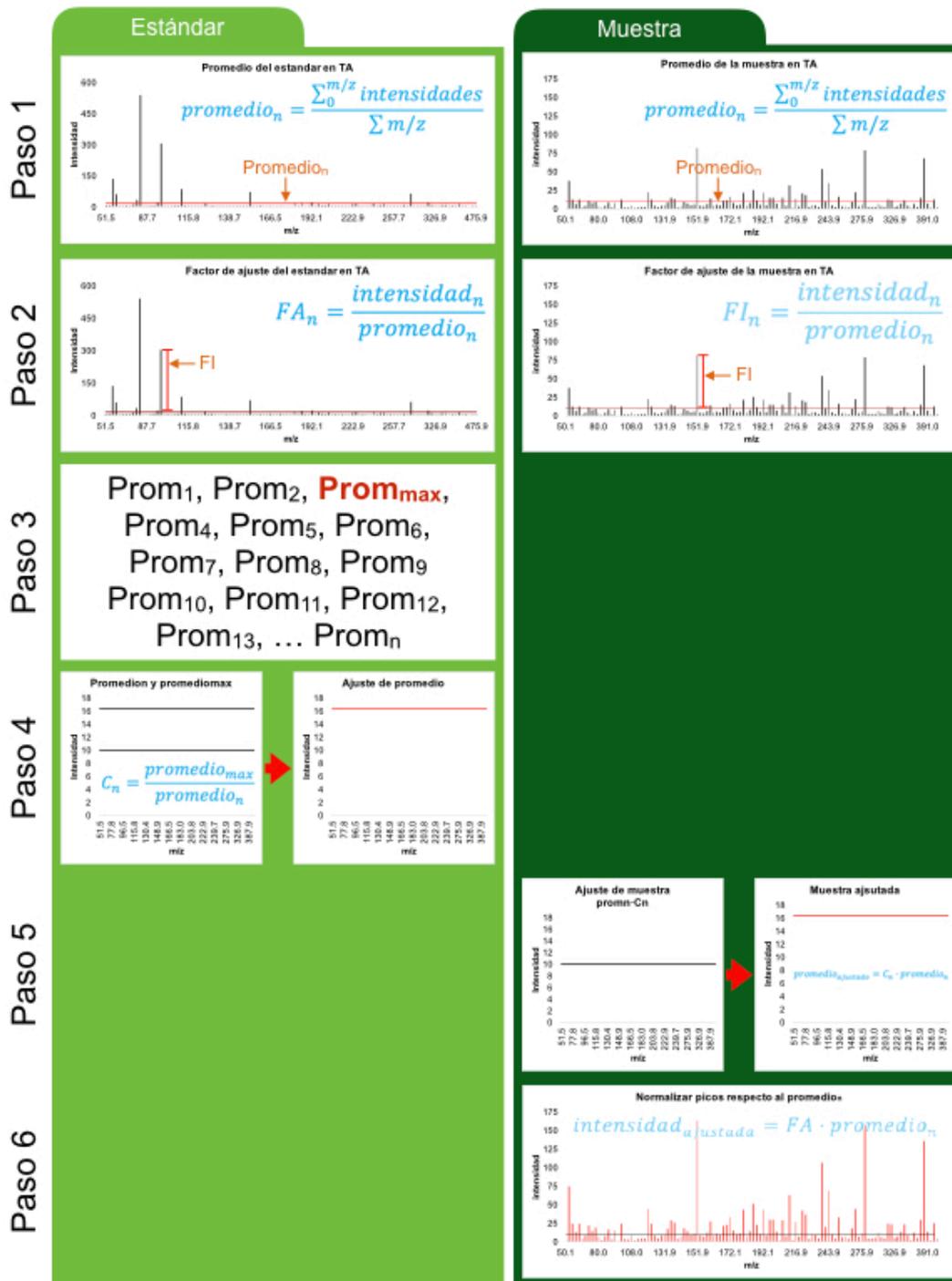


Figura 9. Normalización de mediciones en los diferentes tiempos respecto al tiempo del estándar con mayor intensidad promedio. Se resalta de color rojo lo que sucede gráficamente en cada paso **Paso 1**: Promedio del espectro **Paso 2**: Determinación del factor de incremento; **Paso 3**: Promedio máximo de estándares; **Paso 4**: Obtención de C_n ; **Paso 5**: Normalización del promedio de las muestras; **Paso 6**: Obtención de picos normalizados.

Es posible realizar la normalización con respecto a cualquier promedio por ejemplo al primero que se obtuvo, esto permitiría normalizar los datos en tiempo real y poder tener intensidades comparables al momento, pudiendo monitorear el incremento o decremento de una molécula en base al inicio de la medición, el principal inconveniente de este método es no tener la certeza de que las intensidades reportadas son las verdaderas. Sin embargo provee la información suficiente para poder detectar aumentos en la concentración de un compuesto en tiempos específicos.

El cuarto paso se realiza únicamente en el estándar para determinar la constante (C_n) por la cual es necesario multiplicar un promedio_n para obtener la misma intensidad que el promedio máximo que ha sido seleccionado como el punto de normalización del estándar, el cual no cambia de concentración a lo largo del tiempo.

El quinto paso permite extrapolar la información obtenida de la variación de la medición estándar a la muestra. Conociendo qué tanto cambió el promedio del estándar entre cada medición con respecto al punto de normalización (C_n), Como el tiempo entre cada medición es muy poco $< 1s$, se asume que el equipo y el ambiente permanecen estables y se considera la misma variación para estándar y la muestra, para realizar este proceso se ajusta cada medición en la muestra multiplicando el promedio por C_n .

El paso final consiste en obtener las intensidades reales de los iones del espectro de la muestra, respetando las proporciones que existían entre ellos antes de normalizar los datos. Esta función se logra multiplicando FA de cada pico por el promedio que fue ajustado en el paso anterior.

6.6 Normalización de datos de la cinética de la molécula 6-PP

Los datos fueron normalizados de acuerdo con la metodología descrita en materiales y métodos utilizando R y siguiendo el flujo de trabajo descrito en el anexo I. La figura 10 muestra el resultado de la cinética de la molécula de 6-PP con valores normalizados.

La normalización se realizó en base al estándar interno de concentración conocida (metanol) y se aplicó la estandarización para las tres réplicas biológicas simultáneamente.

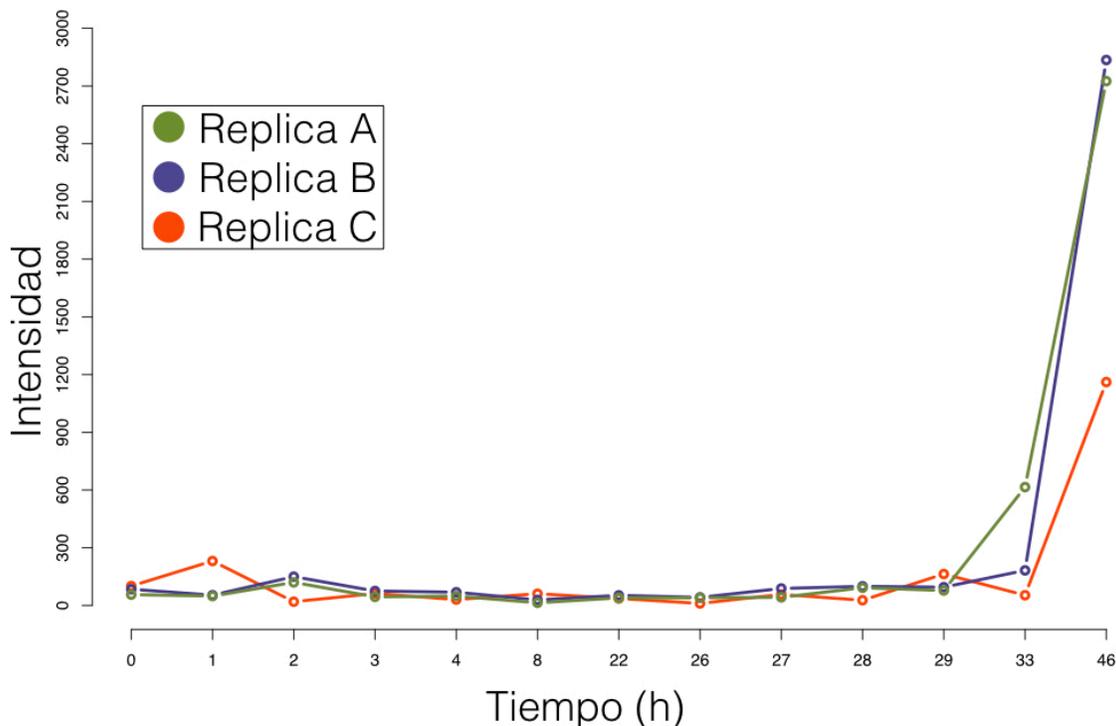


Figura 10. Cinética tras la estandarización de la molécula 6-PP utilizando el código desarrollado en este trabajo. Se utilizaron tres réplicas biológicas que permiten demostrar la reproducibilidad de la técnica al obtener valores similares entre réplicas.

6.7 Identificación de otros COV's previamente reportados

Se encontraron iones con una relación de masa carga correspondiente a los descritos por Garnica y colaboradores [21]. Los iones corresponden en valor de m/z con a moléculas reportadas producidas en la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*. La figura 11 muestra un espectro de masas con los presuntos iones que se identificaron, se debe tomar en cuenta que cuando se ioniza utilizando la sonda de LTP, los iones suelen presentar una protonación que implica el incremento de una unidad en la relación m/z comparado con la masa de la molécula debido a la adición de un protón.

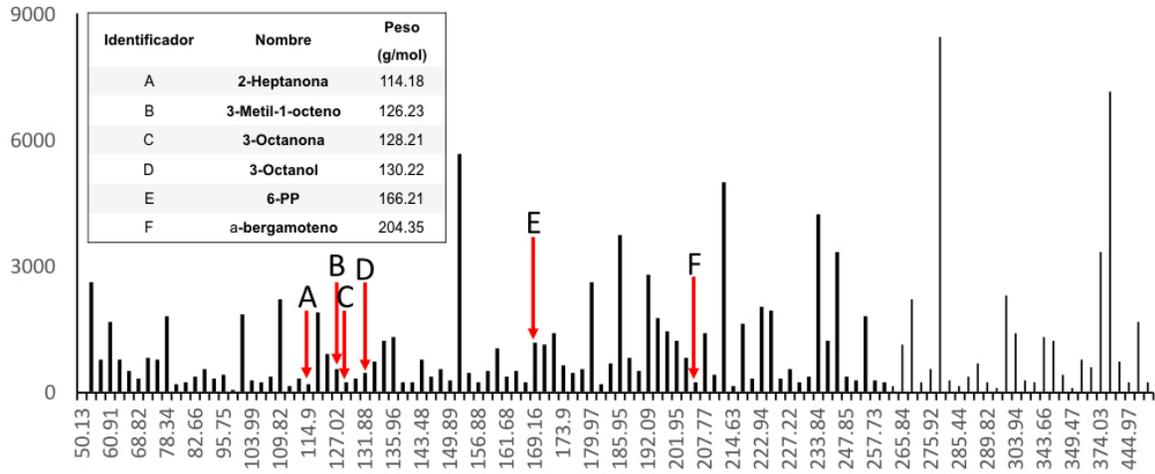


Figura 11. Candidatos de iones reportados en estudios anteriores durante la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*, detectados a los 5 días de interacción. La relación m/z corresponde al uso de la técnica de ionización ambiental de LTP-MS [21].

7 Discusión

7.1 Limitaciones de técnicas convencionales para monitoreo en tiempo real de COVs

El uso de técnicas actuales en la medición de COVs requieren de capacitación ya que de no ser realizada con los cuidados requeridos se obtienen resultados poco fieles a la realidad, incluso se puede perder información.

Para el caso particular de la técnica de MEFS-GC-MS que fue comparada con LTP-MS, se identificaron tres problemas principales, para su uso en el monitoreo de volátiles en tiempo real:

- 1 Fácil saturación con agua de la fibra, resultando en la nula captura de COVs de interés.
- 2 Pérdida de moléculas por la selectividad de la fibra, repercutiendo en la pérdida de información del sistema biológico.
- 3 Largos tiempos de captura y separación para la identificación de las moléculas, al menos 1.3 horas entre ambas fases para el caso específico de este experimento (1 hora de exposición de la fibra para la adsorción de compuestos y 20 minutos para cromatografía de gases). El tiempo exposición y de separación, puede llegar a incrementarse a la magnitud de días dependiendo de las concentraciones de estas y las condiciones ambientales.

7.2 Ionización ambiental

El uso estandarizado de la sonda de plasma de baja temperatura permitirá obtener resultados reproducibles con mayor facilidad, así como un fácil acoplamiento a espectrómetros de masas donde sea posible desmontar la fuente de ionización en la actualidad prácticamente cualquier equipo, de esta forma es posible utilizar el diseño en prácticamente cualquier laboratorio, a un bajo costo, ya que la sonda está diseñada para poder ser ensamblada por cualquier persona y disponible para su descarga mediante internet.

La ionización ambiental puede jugar un papel altamente importante en el avance de análisis *in-vivo* e *in-situ*.

7.3 Resolución temporal

Las herramientas que se desarrollaron a lo largo de este trabajo ahora permiten realizar mediciones de COVs en tiempo real eliminando dos variables que retrasan el monitoreo en tiempo real; la captura y el tratamiento de la muestra.

El uso de LTP-MS no requiere de preparación, tiempo de captura ni separación de la muestra, también permite utilizarse directamente sobre el organismo sin causar daño.

Se dio un salto tecnológico, ya que se logró mejorar la resolución temporal hasta 35,000 veces en comparación con técnicas convencionales como MEFS GC-MS. Se logró reducir el tiempo de la toma de muestra del rango de horas, en el mejor de los casos, al universo de los milisegundos. Esta resolución temporal permite medir e identificar situaciones que ocurren en cuestión de segundos, como es el caso de la primera barrera de defensa de las plantas [27].

7.4 Perfiles metabólicos sin alteraciones por manipulación.

Las mediciones de los compuestos volátiles realizadas mediante la técnica LTP-MS no requieren del uso de solventes o del tratamiento de la muestra que pueden resultar en estrés y en la destrucción de la muestra. Los datos recolectados en las mediciones son producto únicamente del sistema biológico y de las condiciones ambientales. Al eliminar los sistemas de captura y retención, no se filtran los compuestos detectados, cualquier compuesto volátil es candidato a ser detectado sin importar sus características físico-químicas.

Los datos arrojados por LTP-MS normalizados son representativos de la condición del organismo en el momento en el que se realizó la medición.

7.5 Monitoreo de COVs *in-vivo*

El uso de LTP-MS evita situaciones como poca afinidad de los solventes por compuestos específicos, degradación o transformación de la muestra por contacto

con condiciones específicas como diferencia de temperatura o pH, conjunto de factores que favorecen la modificación del perfil metabólico real de la muestra. Así mismo el nulo uso de solventes reduce la alteración en el sistema biológico, disminuyendo ruido técnico, que pudieran conllevar a la interpretación errónea de los resultados obtenidos, esta misma reducción de intervención con el sistema biológico permite realizar mayor número de pruebas ya que el sistema no se ha visto modificado por agentes ajenos al fenómeno de interés.

7.6 Cinética de metabolitos de interés

El monitoreo de una o múltiples moléculas a lo largo del tiempo en un sistema biológico es de especial interés ya que brinda información de las condiciones en las que se encuentra el organismo ya sea que se encuentre sano, o que esté en alguna condición de estrés por un agente que pudiera ser de naturaleza biológica o ambiental.

Existen cambios en los perfiles metabólicos en diferentes rangos de tiempo que abarcan desde segundos hasta días. El poder monitorear uno o varios metabolitos simultáneamente, permite identificar los factores que están alterando al organismo, como aquellas variables que favorecen el incremento de moléculas de interés, permitiendo maximizar su producción. Es posible encontrar identificadores propios de daño específico, que permitirá tomar las medidas adecuadas para combatir o disminuir los síntomas y evitar su propagación.

Es posible determinar el momento en que ocurre el suceso de interés con una alta precisión de tiempo y con el uso de técnicas complementarias como la microscopia, poder identificar las características morfológicas del o los organismo.

7.7 Estandarización de datos

La estandarización de datos permite realizar correcciones en las intensidades de los iones detectados (figura 12).

Con los datos normalizados es posible hacer comparaciones directamente entre las diferentes mediciones a lo largo del tiempo. Tras obtener una curva de calibración

de concentraciones con un estándar es posible medir la concentración de las moléculas directamente sin importar del día ni las condiciones de la medición, ayudando a tener datos más fieles a los verdaderos. El estándar utilizado para normalizar las intensidades, no afecta al sistema biológico ya que las mediciones se realizan por separado y en tiempo inferiores a 5s, lo que mantiene las condiciones entre ambas mediciones estables.

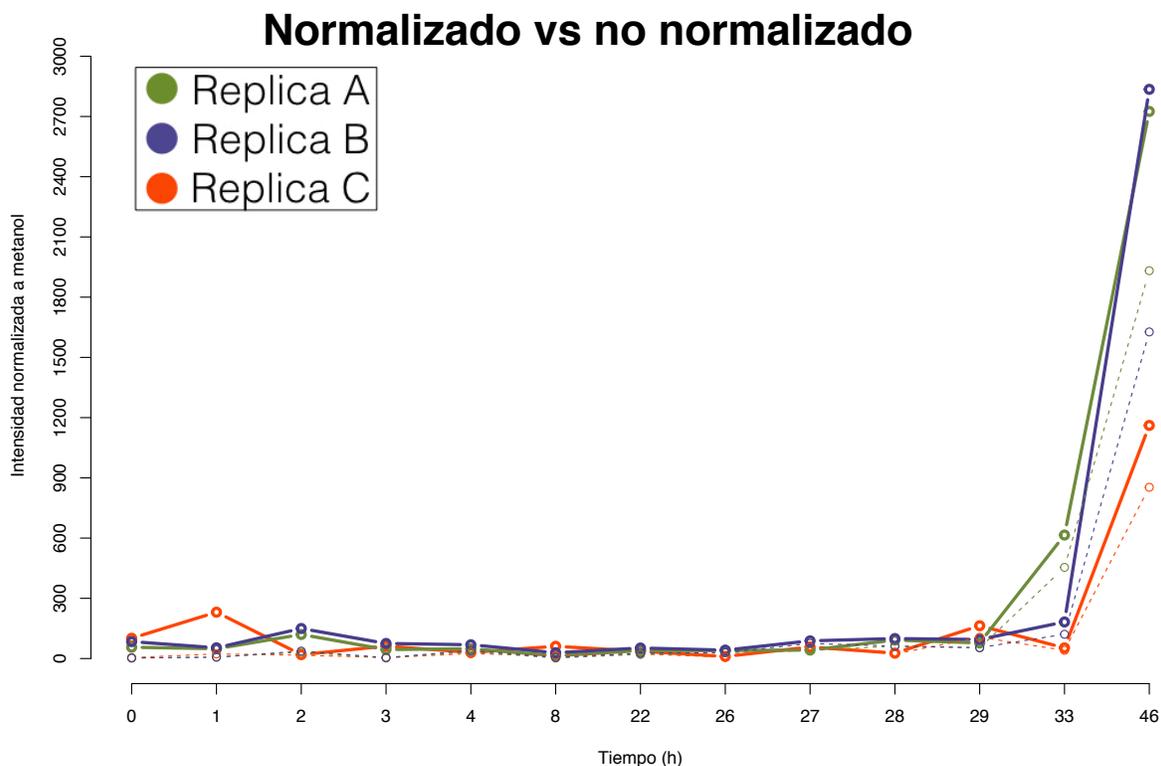


Figura 12. Comparación de intensidades del ion 167. Las líneas punteadas muestran las intensidades sin normalizar y las líneas solidas las intensidades de las réplicas normalizadas.

7.8 Monitoreo de COVs en interacción planta-microorganismo en tiempo real e *in-vivo* con una técnica novedosa: LTP-MS

Estudios previos reportados por Garnica y colaboradores [21] donde utilizan técnicas convencionales muestran que *T. atroviride* comienza la producción de la molécula 6-PP 72 horas posteriores a la inoculación 1,000,000 de esporas de *Trichoderma* y 10 plantas de *Arabidopsis* en condiciones controladas de temperatura y luz.

Contrastantemente con el uso de la técnica de LTP-MS y un adecuado tratamiento de datos nosotros detectamos la molécula de 6-PP desde la inoculación con *Trichoderma*, mostrando una mejora técnica importante para el monitoreo de volátiles como la molécula de 6-PP. También se logró monitorear la molécula *in-vivo* y en el mismo sistema a lo largo del tiempo, teniendo un mejor acercamiento al comportamiento real de los organismos.

El uso de esta novedosa técnica permitió encontrar el punto de la producción del 6-PP cerca de la hora 46, 26 horas antes que técnicas convencionales (figura 13), resolución temporal importante cuando se estudian las interacciones biológicas mediadas por COVs.

La técnica de LTP-MS para el monitoreo de COVs en tiempo real propuesta en este trabajo permite realizar cinéticas de compuestos volátiles con resoluciones temporales en el orden de segundos, es decir tenemos el comportamiento de una(s) molécula(s) cercano a la realidad, abriendo un sin fin de posibilidades para poder comprender de mejor manera como se dan las interacciones biológicas y así poder aprovechar estas interacciones para fines que convengan a la sociedad.

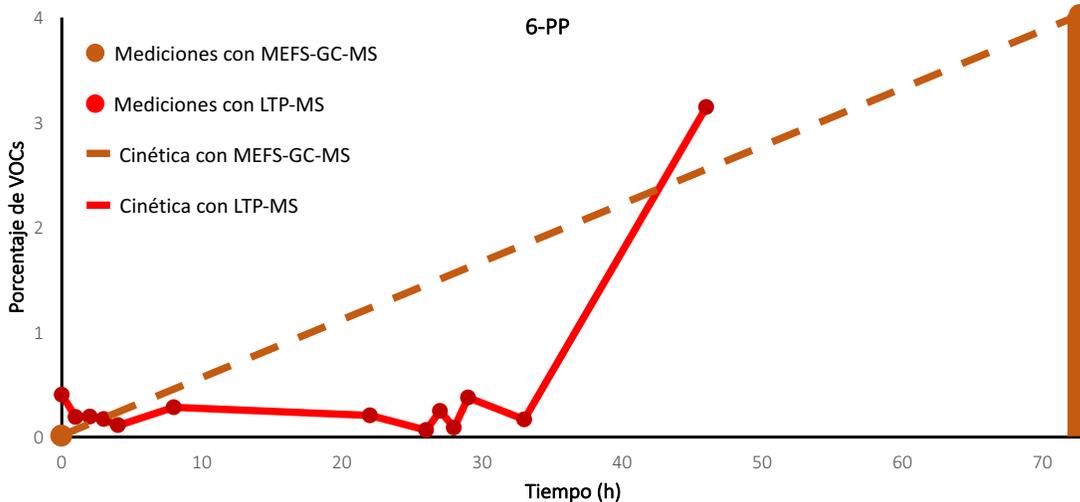


Figura 13. Comparación de resolución temporal entre técnicas MEFS-GC-MS y LTP-MS. El uso de LTP-MS permite obtener la cantidad mediciones que se deseen con resoluciones de alrededor de 200 ms, y es posible detectar el comienzo de la producción de 6-PP. Mientras que la técnica MEFS-GC-MS solu muestra una línea recta entre dos mediciones. Con resolución mínima de 1 hora.

8 Conclusiones

El monitoreo de perfiles de COVs en tiempo real e *in-vivo* resulta de especial interés cuando se trabaja con organismos vivos, ya que nos permite conocer su condición biológica.

Las técnicas convencionales para el monitoreo de COVs, no permiten conocer el comportamiento de volátiles de manera fiel a la realidad por alguna de las siguientes razones; alteran las condiciones en que se encuentra el organismo al usar solventes o tratar la muestra, los métodos de captura de COVs son altamente selectivos y no es posible obtener una muestra representativa, o requieren tiempos prolongados para realizar la captura y separación de los compuestos volátiles, teniendo como consecuencia la pérdida de información temporal de un momento específico.

El desarrollo de técnicas novedosas como el LTP-MS, permite conocer el comportamiento temporal de COVs, sin alterar el sistema biológico. Al tratarse de una técnica de ionización ambiental es preciso eliminar los ruidos producidos por las condiciones ambientales, para ello se desarrolló un software que permite comprar los datos de forma directa, entre cada medición.

El desarrollo del presente trabajo permitió monitorear la molécula 6-PP en la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*, a lo largo del tiempo y fue posible detectar el comienzo de su producción alrededor de las 43 horas tras la inoculación con *Trihcoderma*, 26 horas antes de lo reportado.

La utilización de LTP-MS en el monitoreo de moléculas en el que su comportamiento se relaciona temporalmente con alguna función biológica, como en la colonización por hongos, permite conocer con mayor precisión como ocurren las interacciones en la naturaleza.

9 Perspectivas

Gracias al avance en la estandarización de la sonda del LTP, ahora los datos obtenidos en los análisis son replicables, además el tratamiento de datos permite realizar monitoreo de COVs en tiempo real con una alta aproximación a la realidad tanto en tiempo como en concentraciones de estos compuestos, por tanto, esta técnica abre un nuevo panorama para el estudio de moléculas en sistemas biológicos, algunas de las cuales son enlistadas a continuación.

- Miniaturización del equipo de espectrometría de masas y acoplamiento a la técnica de ionización ambiental, que permita monitorear la salud de un cultivo para tomar las medidas adecuadas en caso de alguna condición dado como enfermedad o estrés biótico o abiótico del cultivo, con el fin de prevenir pérdidas económicas.
- Expandir el uso de la técnica de LTP-MS para el monitoreo de COVs con tiempos de emisión biológicamente relevantes.

10 Bibliografía

- [1] A. E. Rivero Angarita, "Inductores bióticos de la resistencia de las plantas a enfermedades," in *Inducción de resistencia en plantas Interacción: Planta-Patógeno*, Universida., Tolima, 2010, pp. 134–135.
- [2] R. Hester and R. Harrison, "Sources, Distribution, and Fates of VOCs in the Atmosphere," in *Volatile Organic Compounds in the Atmosphere*, The Royal Society of Chemistry, 1995, p. 2.
- [3] S. U. Morath, R. Hung, and J. W. Bennett, "Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential," *Fungal Biol. Rev.*, vol. 26, no. 2–3, pp. 73–83, 2012.
- [4] P. W. Pare and J. H. Tumlinson, "Update on plant-insect interactions plant volatiles as a defense against insect herbivores," *Plant Physiol.*, vol. 121, no. October, pp. 325–331, 1999.
- [5] A. Kessler, "Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature," *Science (80-.)*, vol. 291, no. 5511, pp. 2141–2144, 2001.
- [6] E. Tait, J. D. Perry, S. P. Stanforth, and J. R. Dean, "Identification of Volatile Organic Compounds Produced by Bacteria Using HS-SPME-GC – MS," pp. 363–373, 2014.
- [7] H. Prosen and L. Zupanc, "Solid-phase microextraction," vol. 18, no. 4, pp. 272–282, 1999.
- [8] S. Matysik, O. Herbarth, and A. Mueller, "Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents," *Chemosphere*, vol. 76, no. 1, pp. 114–119, 2009.
- [9] R. A. Allardyce, V. S. Langford, A. L. Hill, and D. R. Murdoch, "Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS)," 2005.
- [10] D. Ezra, J. Jasper, T. Rogers, B. Knighton, E. Grimsrud, and G. Strobel, "Proton transfer reaction-mass spectrometry as a technique to measure volatile emissions of *Muscodor albus*," *Plant Sci.*, vol. 166, no. 6, pp. 1471–1477, 2004.

- [11] A. Jordan *et al.*, “An online ultra-high sensitivity Proton-transfer-reaction mass-spectrometer combined with switchable reagent ion capability (PTR + SRI - MS),” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 286, no. 1, pp. 32–38, 2009.
- [12] H. Kim *et al.*, “Electronic-nose for detecting environmental pollutants: Signal processing and analog front-end design,” *Analog Integr. Circuits Signal Process.*, vol. 70, no. 1, pp. 15–32, 2012.
- [13] N. Srinivasan, R. C. Johnson, N. Kasthurikrishnan, P. Wong, and R. G. Cooks, “Membrane introduction mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 350, no. 3, pp. 257–271, 1997.
- [14] R. M. C. Jansen, M. Miebach, E. Kleist, E. J. van Henten, and J. Wildt, “Release of lipoxygenase products and monoterpenes by tomato plants as an indicator of *Botrytis cinerea*-induced stress,” *Plant Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 859–868, 2009.
- [15] I. Lanekoff *et al.*, “High-speed tandem mass spectrometric in situ imaging by nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 20, pp. 9596–9603, 2013.
- [16] S. Martínez-Jarquín and R. Winkler, “Low-temperature plasma (LTP) jets for mass spectrometry (MS): Ion processes, instrumental set-ups, and application examples,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 89, pp. 133–145, 2017.
- [17] J. Chen, F. Tang, C. Guo, S. Zhang, and X. Zhang, “Plasma-based Ambient Mass Spectrometry: A Step Forward to Practical Applications,” *Anal. Methods*, 2017.
- [18] S. Martínez-Jarquín, A. Moreno-Pedraza, H. Guillón-Alonso, and R. Winkler, “Template for 3D Printing a Low-Temperature Plasma Probe,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 14, pp. 6976–6980, 2016.
- [19] R. Gamboa-becerra, E. Ramírez-chávez, J. Molina-torres, and R. Winkler, “RESEARCH PAPER MSI . R scripts reveal volatile and semi-volatile features in low-temperature plasma mass spectrometry imaging (LTP-MSI) of chilli (*Capsicum annum*),” *Springer*, pp. 5673–5684, 2015.
- [20] H. A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, E. Del-Val, and J. Larsen, “Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in

- the rhizosphere: Interactions with plants,” *FEMS*, no. February, pp. 1–17, 2016.
- [21] A. Garnica-vergara, S. Barrera-ortiz, E. Mu, and J. Raya-gonz, “The volatile 6-pentyl-2 H -pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning,” *New Phytol.*, pp. 1496–1512, 2016.
- [22] D. W. Meinke, J. M. Cherry, C. Dean, S. D. Rounsley, and M. Koornneef, “*Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis.,” *Science.*, vol. 282, no. 5389, pp. 662–679, 1998.
- [23] C. M. J. Pieterse and M. Dicke, “Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology,” *Trends Plant Sci.*, vol. 12, no. 12, pp. 564–569, 2007.
- [24] “Cura 3D Printing Slicing Software.” [Online]. Available: <https://ultimaker.com/en/products/cura-software>. [Accessed: 13-Jun-2017].
- [25] S. Martínez-Jarquín, “Análisis de biomoléculas por espectrometría de masas empleando plasma de baja temperatura como nuevo método de ionización,” p. 145, 2012.
- [26] “Mass Spectrometry Data Center, NIST.” [Online]. Available: <http://chemdata.nist.gov/>. [Accessed: 09-Jun-2017].
- [27] J. B. Runyon, M. C. Mescher, and C. M. De Moraes, “Parasitism by *Cuscuta pentagona* Attenuates Host Plant Defenses against Insect Herbivores,” *Plant Physiol.*, vol. 146, no. 3, pp. 987–995, 2008.

11 Productos científicos

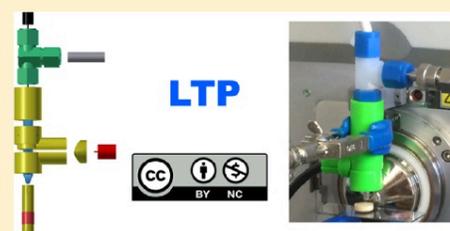
El trabajo realizado a lo largo de este proyecto hasta el momento ha permitido obtener 3 productos científicos para divulgación, un artículo como coautor y 2 posters como primer autor. El artículo describe la estandarización de la sonda de LTP y fue publicado en la revista Analytical Chemistry en el 2016. Por su parte los posters fueron presentados en congresos (XXXI congreso nacional de bioquímica 2016, en Aguascalientes, México y Plant Biology 2017 en Honolulu Hawaii) ambos posters pretenden divulgar el uso de la técnica LTP-MS para el monitoreo de VOC en tiempo real e *in-vivo* utilizando la interacción *Trichoderma-Arabidopsis* como modelo biológico. Los tres trabajos son adjuntados en las siguientes secciones.

Template for 3D Printing a Low-Temperature Plasma Probe

Sandra Martínez-Jarquín, Abigail Moreno-Pedraza, Héctor Guillén-Alonso, and Robert Winkler*

Department of Biotechnology and Biochemistry, CINVESTAV Unidad Irapuato, Irapuato, 36821, Mexico

ABSTRACT: Low-temperature plasma (LTP) ionization represents an emerging technology in ambient mass spectrometry. LTP enables the solvent-free direct detection of a broad range of molecules and mass spectrometry imaging (MSI). The low energy consumption and modest technical requirements of these ion sources favors their employment in mobile applications and as a means to upgrade existing mass analyzers. However, the broad adoption of LTP is hindered by the lack of commercial devices, and constructing personal devices is tricky. Improper setup can result in equipment malfunction or may cause serious damage to instruments due to strong electromagnetic fields or arcing. With this in mind, we developed a reproducible LTP probe, which is designed



exclusively from commercial and 3D printed components. The plasma jet generated by the device has a diameter of about 200 μm , which is satisfactory for the ambient imaging of macroscopic samples. We coupled the 3D-LTP probe to an ion trap analyzer and demonstrated the functionality of the ion source by detecting organic and chemical compounds from pure reference standards, biological substances, and pharmaceutical samples. Molecules were primarily detected in their protonated form or as water/ammonium adducts. The identification of compounds was possible by standard collision-induced dissociation (CID) fragmentation spectra. The files necessary to reproduce the 3D parts are available from the project page (<http://lababi.bioprocess.org/index.php/3d-ltp>) under a dual license model, which permits reproduction of the probe and further community-driven development for noncommercial use ("peer production"). Our reproducible probe design thus contributes to a facilitated adaptation and evolution of low-temperature plasma technologies in analytical chemistry.

Low-temperature plasma ionization mass spectrometry (LTP-MS) enables the analysis of solid, liquid, and gaseous samples under ambient conditions.¹ Published applications include explosives detection,² food analysis,^{3,4} bacteria classification,⁵ drug abuse detection on fluids,⁶ real time monitoring of chemical reactions,⁷ pesticide detection on fruits and vegetables,^{8,9} petroleum crude oil analysis,¹⁰ and the evaluation of micronutrients from surfaces.¹¹

The nondestructive analysis of works of art has also been reported,¹² as well as imaging of the distribution of volatile and nonvolatile compounds from surfaces or organic tissue.^{13–15} Despite the high potential of LTP ionization, there are no commercial devices currently available. Tinkering with an LTP probe is not overly complex. As such, various home-built prototypes with different characteristics have been reported.

The basic design consists of a glass tube as dielectric barrier, an outer electrode connected to a high voltage and high frequency power source, and an inner ground electrode.¹ Various modifications of this construction have been reported: a dual model LTP source,¹⁶ a miniaturized probe with gas cooling,¹⁷ a double dielectric barrier LTP probe,¹⁸ an LTP probe array,¹⁹ a coaxial LTP probe,²⁰ a microhollow cathode LTP probe,²¹ and a microplasma probe.²²

This diversity and uniqueness of special devices makes the implementation of LTP technology and the reproduction of results difficult. To overcome this barrier, we decided to

construct an LTP probe, which can be easily mounted using commercially available and 3D printed components. In this paper, we provide a detailed description of how to assemble the probe and present data on the analytical performance of the LTP source when coupled to a standard ion trap mass spectrometer.

■ DEVICE DESIGN

The LTP probe design is based on a device with adjustable output temperature and variable beam diameter that we previously reported.¹⁸ Table 1 lists the parts necessary for building the 3D-LTP probe; Figure 1A illustrates the assembly.

For rapid prototyping, we used the biodegradable polymer polylactic acid (PLA) and the more heat resistant acrylonitrile butadiene styrene (ABS). However, depending on the printer and the desired properties of the plastic parts, other filaments could also be chosen, such as polycarbonate (PC).

All pieces were modeled using the freeware design software Blender (version 2.74, Blender foundation, <http://www.blender.org>). The 3D drawings were exported in STL format. G-code was then generated using Cura 15.01 (Ultimaker), and

Received: March 14, 2016

Accepted: June 15, 2016

Published: June 15, 2016

Table 1. Components for Building the 3D-LTP Probe

part	description	material	supplier	catalog number
A	inner electrode	copper	Condumex	809218-18AWG
B	union fitting T	PFA	Swagelok	PFA-420-3
C	helium gas entrance	stainless steel	Swagelok	SS-FJ4TA4TA4 ^b
D	T connector	polymer filament	MakerMex	3D printed part ^b
E	top T fitting	polymer filament	MakerMex	3D printed part ^b
F	security ring	polymer filament	MakerMex	3D printed part ^b
G	bottom T fitting	polymer filament	MakerMex	3D printed part ^b
H	second dielectric barrier	polymer filament	MakerMex	3D printed part ^b
I	first dielectric barrier	glass	Pyrex/Kymax	pipette tip
J	outer electrode	aluminum foil	Truper	CALU-9
K ^a	plasma generator circuit		Ramsey Electronics	PG13
L ^a	power supply		Steren Electronics	PRL-25

^aThese items are not displayed in Figure 1. ^bDesign and printing files are deposited at <http://lababi.bioprocess.org/index.php/3d-ltp>.

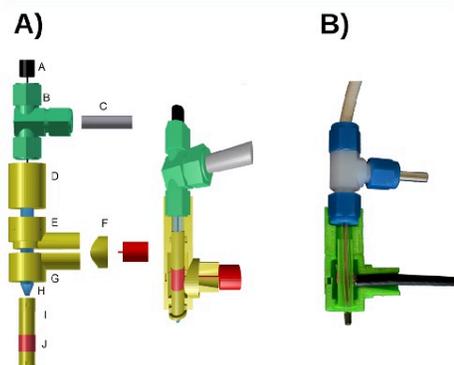


Figure 1. (A) Assembly of the 3D-LTP probe. The parts are specified in Table 1. (B) Cross-cut of a 3D-LTP probe manufactured with acrylonitrile butadiene styrene (ABS) polymer.

the parts were printed using a MM1 Beta RepRap printer (MakerMex, León, Mexico).

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Samples. HPLC grade solvents and vanillin were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Toluca, Mexico). A standard solution with vanillin at 1 mg/mL was prepared with acetonitrile. The solution was placed on a glass slide and exposed directly to the plasma beam. Norecil 600 (Maver, Mexico), Aspirin (Bayer, Mexico), and camphor (Gisel, Mexico) were purchased from a local drug store; complete individual tablets were subjected to LTP-MS analysis. Fresh garlic and cinnamon bark was obtained from a local market (Irapuato, Mexico) and analyzed without any prior sample preparation.

Coupling to an Ion Trap Mass Spectrometer. The 3D-LTP probe was mounted perpendicularly to the ion inlet of an LCQ-Fleet (Thermo Scientific, USA). The LTP device was positioned 3 mm from the MS ion inlet for best signal intensity (Figure 2A). Helium flow was set to 0.4 L/min and regulated

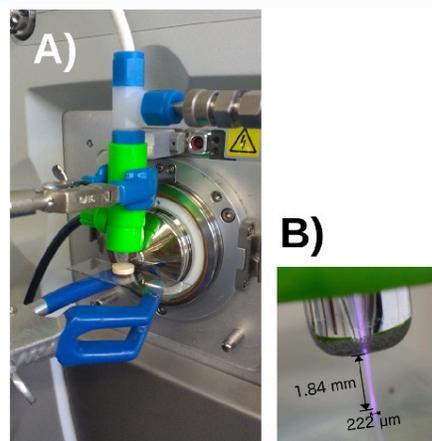


Figure 2. (A) 3D-LTP source coupled to an ion trap mass spectrometer for ambient ionization mass spectrometry (AIMS). (B) Plasma beam with the standard glass insert.

using a gas flow controller (Swagelok, Mexico). The input voltage of the Ramsay PG13 circuit was 10 V, resulting in an output voltage of 8 kV at a frequency of 15 kHz.

The parameters of the mass analyzer were as follows: positive ion mode for an m/z range of 50–500, capillary temperature of 100 °C, capillary voltage of 9.92 V, and tube lens voltage of 75 V. Tandem mass spectrometry (MS/MS) was performed via collision-induced dissociation (CID). Raw data files were converted to mzML format using ProteoWizard²³ and analyzed with mMass version 5.5.0.²⁴

RESULTS AND DISCUSSION

3D-LTP Probe Design. Figure 1B shows the cross-cut of a 3D-LTP probe printed with ABS. Since the glass section of the probe is fully covered by plastic, the probe's mechanical resistance is defined by the 3D printing polymer. Due to the thick polymer insulation, there is no risk of arcing or electric discharges. The design is therefore safe for both the user and the surrounding equipment.

The plasma diameter depends on the inner diameter of the glass insert. With the used 3D printer, technical tolerances were not critical for the assembly (Figure 1B). The beam diameter of the 3D-LTP was $\sim 200 \mu\text{m}$ (Figure 2B), which is sufficient for ambient imaging applications where moderate spatial resolution is required. Below, we present results for the mechanical properties and the analytical performance for 3D-LTP probes produced with PLA, ABS, and PC.

Ambient Ionization Mass Spectrometry. To evaluate the suitability of the 3D-LTP probe for ambient ionization mass spectrometry (AIMS), we coupled an ABS manufactured probe to an ion trap mass analyzer (Figure 2A) and performed

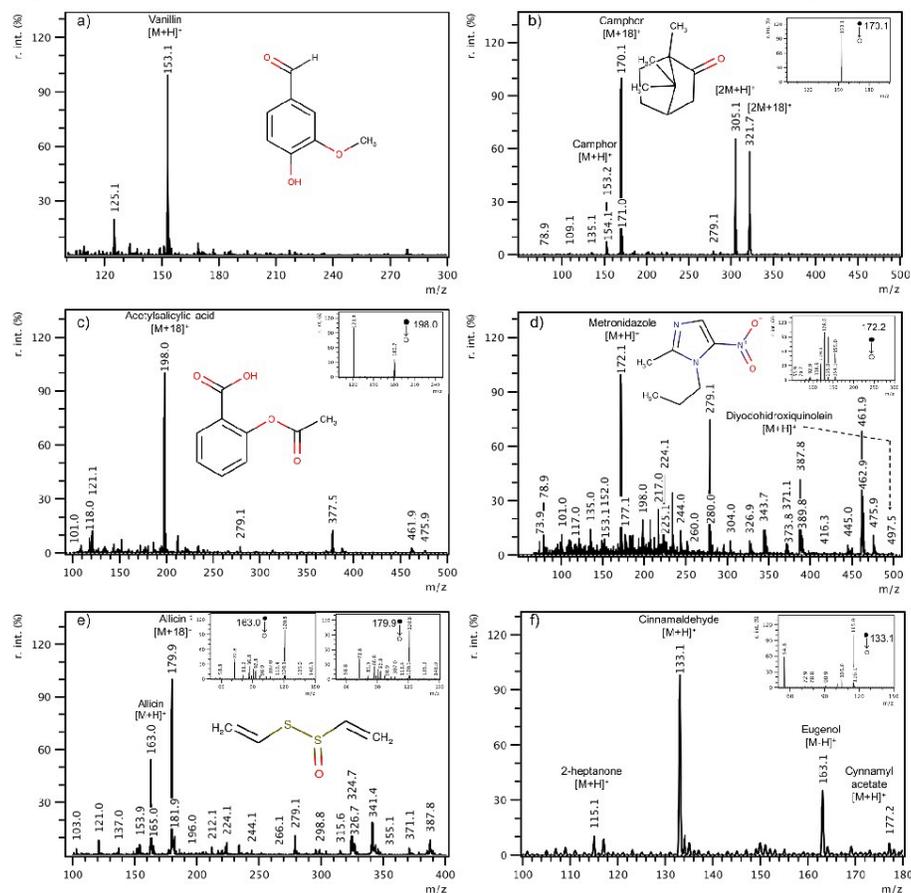


Figure 3. AIMS spectra generated utilizing the 3D-LTP probe: (a) commercial vanillin standard, (b) camphor tablet, (c) Aspirin, (d) Norecil, (e) clove of garlic, and (f) cinnamon bark.

analyses of pure compounds, pharmaceutical substances, and food products. The obtained mass spectra are shown in Figure 3.

Testing a commercial vanillin standard (MW = 152.04 Da; Figure 3a) showed the protonated molecule $[M + H]^+$ as well as a fragment with 125 m/z , which can be attributed to the loss of the carbonyl group. To some extent, the degree of fragmentation could be modified by varying the distance between electrodes.¹ However, the observed fragmentation is tolerable and might even assist in compound identification.

For camphor (MW = 152.23 Da) tablets (Figure 3b), the protonated molecule $[M + H]^+$ was detected, as well as a $[M + 18]^+$ and a $[2M + 18]^+$ signal, which may be either water or ammonium adducts. CID fragmentation of the adduct and the cluster confirmed the identity of the molecule.

Acetylsalicylic acid (MW = 180.04 Da) was detected in aspirin tablets (Figure 3c) as a $[M + 18]^+$ signal, corresponding to a water or ammonium adduct. Norecil is a tablet containing two active ingredients, metronidazole (MW = 171.06 Da) and diiodohydroxyquinolein (MW = 396.95 Da). Metronidazole was detected as a protonated molecule $[M + H]^+$ with a mass-to-charge ratio of 172.1 (Figure 3d). The protonated molecule of diiodohydroxyquinolein (397.9 m/z) appears with relatively low intensity. The noise spectrum indicates the presence of a strong matrix effect, which might originate from the formulation of the pharmaceutical product.

To test the suitability of the 3D-LTP probe for biological samples, different food products were analyzed. Alliin (MW = 162.26 Da) is the molecule responsible for the characteristic smell of garlic. In the mass spectrum of the direct analysis of a clove of garlic (Figure 3e), the protonated molecule $[M + H]^+$

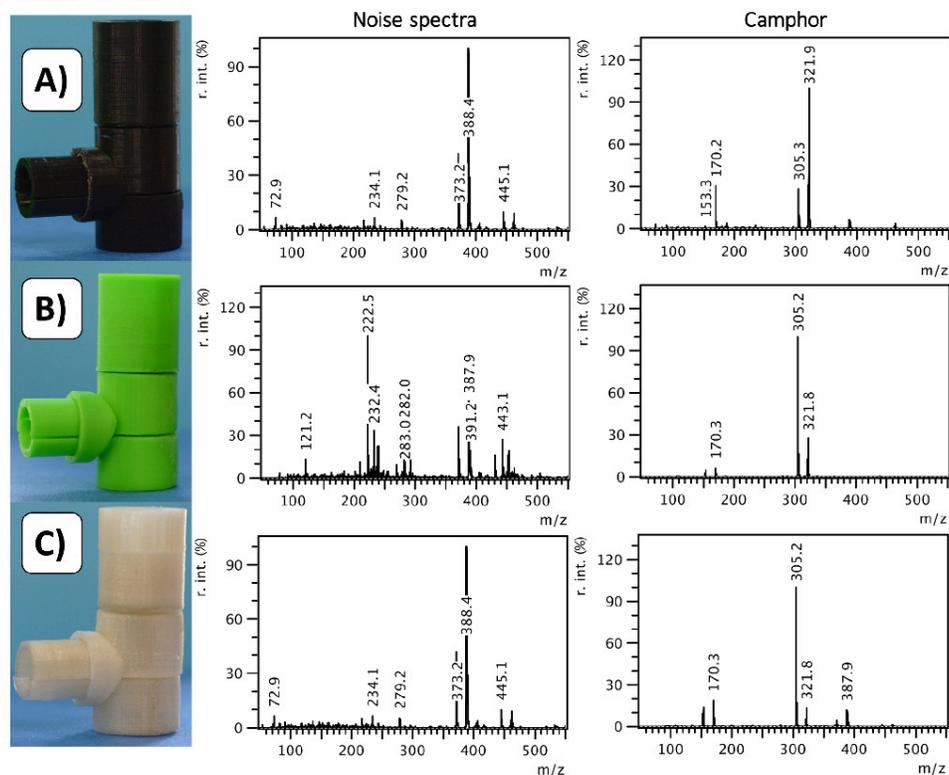


Figure 4. 3D-LTP probes made from different polymers, together with their noise spectra and a sample spectrum. (A) Polylactic acid (PLA). (B) Acrylonitrile butadiene styrene (ABS). (C) polycarbonate (PC).

of allicin and a $[M + 18]^+$ signal (water or ammonium adduct) were detected. Four main components, which are used as commercial markers, were detected in commercial cinnamon bark (Figure 3f). Cinnamaldehyde (MW = 132.05 Da), cinnamyl acetate (MW = 176.08 Da), and 2-heptanone (MW = 114.10 Da) were found as protonated molecules $[M + H]^+$, and eugenol (MW = 164.08 Da) was detected as a deprotonated species $[M - H]^+$, which is consistent with a previously reported ionization product in plasma based ionization sources.²⁵

CID fragmentation studies were performed for all samples except the vanillin standard. The ion transitions of the expected compounds were similar to the ESI-Q-ToF reference spectra deposited in the Mass bank database (<http://www.massbank.jp>).²⁶

In summary, the functionality of the 3D-LTP probe for ambient ionization mass spectrometry was proven using samples of varying complexity. Typically, the compounds of interest were detected as protonated molecules or as $[M + 18]^+$ signals, corresponding to water or ammonium adducts. The possibility to confirm the identity of compounds by standard CID fragmentation spectra suggests that the 3D-LTP probe

could be useful for rapid screening applications, e.g., for quality control of pharmaceuticals and food, homeland defense applications and the identification of illicit drugs.

Series Production of 3D-LTP Probes with Different Polymers. We produced 3D-LTP probes with different polymers, polylactic acid (PLA), acrylonitrile butadiene styrene (ABS), and polycarbonate (PC), to examine the influence of the materials and the repeatability of production. Further, we investigated their chemical noise spectra and sample spectra in AIMS (Figure 4). Printing and polishing of parts were easier with ABS and PC polymers, compared to PLA. At high voltages (above 8000 V), temperatures >60 °C might lead to thermal deformation of PLA, while ABS and PC are more resistant. Thus, the technical suitability of the individual material depends on the desired working range for voltage and temperature.

The 3D-LTP probes of all three materials were functional for AIMS. ABS and PLA probes displayed higher ambient noise levels than the PCA probe. However, for all three 3D-LTP probes, similar sample spectra were obtained, which demonstrates the repeatability of the construction (Figure 4).

From these comparisons, we recommend using PC to produce the 3D printed components of the LTP probe, as it demonstrated advantages for production and operation.

License. To encourage the adoption of low-temperature plasma technology, we chose a dual license model. The design and the related files and information are released under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International Public License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>), which allows reproduction and modification of the probe for noncommercial uses. However, to sponsor further developments, a license must be obtained from our institute prior to any commercial use of the described 3D-LTP probe.

Our choice of license strategy is intended to support the “Commons-Based Peer Production” philosophy, which relies on decentralized, collaborative, and market-independent organization.²⁷

CONCLUSIONS

We describe, in detail, the building of a low-temperature plasma (LTP) probe from commercially available and 3D printed components. The functionality of the 3D-LTP probe for ambient ionization mass spectrometry (AIMS) is demonstrated through the detection and identification of organic compounds from complex matrices, such as pharmaceutical formulations and food products.

The dual license model for the 3D printing files and the probe design permits “Peer Production”, i.e., reproduction of the device and the creation of derivatives for noncommercial use. Altogether, the 3D-LTP template provides an effective and reproducible solution for the implementation of low-temperature ionization in instrumental analysis and additionally may serve as a basis for further developments.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +52 (462) 6239 635. Fax: +52 (462) 624 58 46. E-mail: robert.winkler@cinvestav.mx.

Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): S.M.-J. and R.W. are inventors of the patent application “Non-thermal plasma jet device as source of spatial ionization for ambient mass spectrometry and method of application” (WO 2014/057409).

We created a project page, which provides all files involved in the CAD and the production of the 3D printed parts (.blender, STL, G-Code, and parameter files for different materials) as well as a video demonstrating the building of the probe (see <http://lababi.bioprocess.org/index.php/3d-tp>).

ACKNOWLEDGMENTS

We cordially thank Dr. Barka, SunChrom (Germany), for donating customized ion transfer tubes, Marlon Ontiveros Soto (ISASA, Mexico) for excellent technical support in the coupling of the 3D-LTP probe to the mass analyzer, MakerMex (Mexico) for assistance with 3D printing, and Antonio Cisneros for the professional photographs (in the TOC/abstract graphics and Figures 1, 2, and 4). The study was funded by the CONACYT basic science grant I0017/CB 2010-01/151596 and FINNOVA I010/260/2014. S.M.-J., A.M.-P., and H.G.-A. are thankful for their postgraduate fellowships provided by CONACYT.

REFERENCES

- (1) Harper, J. D.; Charipar, N. A.; Mulligan, C. C.; Zhang, X.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (23), 9097–9104.
- (2) García-Reyes, J. F.; Harper, J. D.; Salazar, G.; Charipar, N. A.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (3), 1084–1092.
- (3) García-Reyes, J. F.; Mazzotti, F.; Harper, J. D.; Charipar, N. A.; Oradu, S.; Ouyang, Z.; Sindona, G.; Cooks, R. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 3057–3062.
- (4) Huang, G.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2009**, No. 5, 556–558.
- (5) Zhang, J. I.; Costa, A. B.; Tao, W. A.; Cooks, R. G. *Analyst* **2011**, *136* (15), 3091–3097.
- (6) Soparawalla, S.; Tadjimukhamedov, F. K.; Wiley, J. S.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2011**, *136*, 4392.
- (7) Ma, X.; Zhang, S.; Lin, Z.; Liu, Y.; Xing, Z.; Yang, C.; Zhang, X. *Analyst* **2009**, *134* (9), 1863–1867.
- (8) Albert, A.; Kramer, A.; Scheeren, S.; Engelhard, C. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 5463.
- (9) Wiley, J. S.; García-Reyes, J. F.; Harper, J. D.; Charipar, N. A.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2010**, *135* (5), 971–979.
- (10) Benassi, M.; Berisha, A.; Romão, W.; Babayev, E.; Römpf, A.; Spengler, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (7), 825–834.
- (11) Stein, M. J.; Lo, E.; Castner, D. G.; Ratner, B. D. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1572–1578.
- (12) Liu, Y.; Ma, X.; Lin, Z.; He, M.; Han, G.; Yang, C.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49* (26), 4435–4437.
- (13) Maldonado-Torres, M.; López-Hernández, J. F.; Jiménez-Sandoval, P.; Winkler, R. J. *Proteomics* **2014**, *102*, 60–65.
- (14) Campbell, D. I.; Dalgleish, J. K.; Cotte-Rodriguez, I.; Maeno, S.; Cooks, R. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (16), 1828–1836.
- (15) Gamboa-Becerra, R.; Ramírez-Chávez, E.; Molina-Torres, J.; Winkler, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (19), 5673–5684.
- (16) Almasian, M.; Yang, C.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 742–748.
- (17) Liu, Y.; Ma, X.; Lin, Z.; He, M.; Han, G.; Yang, C.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 4435–4437.
- (18) Martínez-Jarquín, S.; Winkler, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (5), 629–634.
- (19) Dalgleish, J. K.; Wlekinski, M.; Shelley, J. T.; Mulligan, C. C.; Ouyang, Z.; Graham Cooks, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (1), 135–142.
- (20) Dalgleish, J. K.; Hou, K.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. *Anal. Lett.* **2012**, *45*, 1440–1446.
- (21) Iwai, T.; Kakegawa, K.; Okumura, K.; Kanamori-Kataoka, M.; Miyahara, H.; Seto, Y.; Okino, A. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, S22–S28.
- (22) Bowfield, A.; Bunch, J.; Salter, T. L.; Steven, R. T.; Gilmore, I. S.; Barrett, D. A.; Alexander, M. R.; McKay, K.; Bradley, J. W. *Analyst* **2014**, *139* (21), 5430–5438.
- (23) Kessner, D.; Chambers, M.; Burke, R.; Agus, D.; Mallick, P. *Bioinformatics* **2008**, *24* (21), 2534–2536.
- (24) Strohalm, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (11), 4648–4651.
- (25) Newsome, G. A.; Ackerman, L. K.; Johnson, K. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27* (1), 135–143.
- (26) Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45* (7), 703–714.
- (27) Benkler, Y. *The Wealth of Networks: How Social Production Transforms Markets and Freedom*; Yale University Press: New Haven, CT, 2006.

11.2 Poster XXXI Congreso Nacional de Bioquímica, Aguascalientes, 2016.



Monitoring of volatile organic compounds (VOCs) during plant-microorganism interaction in real time.

Héctor Guillén-Alonso^{1*} and Robert Winkler¹

¹ Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato (CINVESTAV-Irapuato), Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León 36821 Irapuato Gto. México.
* hector.guillen@cinvestav.mx

Introduction

Volatile organic compounds (VOCs) play an important role in interactions between organisms [1]. VOCs are usually detected by mass spectrometry, but actual technologies have a high cost and require a long time of sampling resulting in lot of data loss of kinetic information. In the Laboratory of Biochemical and Instrumental Analysis (LABI) is focused in the development of new technologies. For example, a 3D printed low temperature plasma (LTP) probe was designed [2], which is an ambient ionization source causing minimal sample damage. With this we were able to find previously unreported molecules in chili plants [3]. Under this premise we pretend to build a portable mass spectrometer, capable of monitoring VOCs in real time, without sample preparation, using a residual gas analyzer (RGA).

Objectives

Design and develop a platform of VOCs analysis in real time without sample preparation employing multiple ionization sources.

Materials and methods

A RGA asamble from a high vacuum pump, a valve for sample inlet, a pressure gauge, an ionization source, an analyzer and a detector. Optimization of ionization has an important role and are configured by single or serial ionization using 2 or 3 sources (LTP, electro impact (EI) and laser) in all possible configurations. Ion detection involves monitoring and recording kinetics in real time from one or many of biological VOCs of interest, using a *Arabidopsis-Trichoderma* system as a biological model.

Results and discussion

The final configuration of the RGA is shown in figure 2. The system is easy to transport and can be used for *in-situ* and *in-vivo* experiments. Currently we are testing the limits.

Conclusions

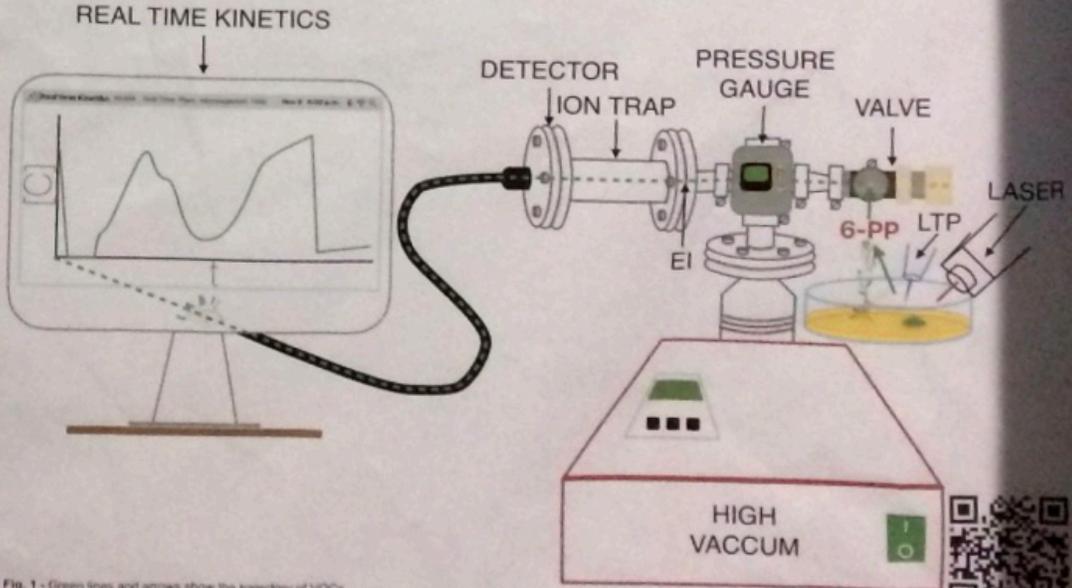
Monitoring of VOCs in real time, can provide important biochemical information e.g. In the study of plant-insect interactions.

References

- [1] Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Vel, E., & Llamas, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: Interactions with plants. *FEMO* (February), 1–17. <http://doi.org/10.1093/femsec/fw026>
- [2] Martínez-Jarquín, S., Moreno-Pedraza, A., Guillén-Alonso, H., & Winkler, R. (2016). Template for 3D Printing a Low-Temperature Plasma Probe. *Analytical Chemistry*, 88(14), 6929–6930. <http://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01019>
- [3] Gamboa-Becerra, R., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J. J., & Winkler, R. (2015). R scripts reveal volatile and semi-volatile features in low-temperature plasma mass spectrometry imaging (LTP-MSI) of chili (*Capsicum annuum*). Springer, 5673–5684. <http://doi.org/10.1007/s00216-015-8744-9>

Acknowledgments

We cordially thank the scholarship from CONACYT. FRONTERAS 2016/814.



REAL TIME KINETICS

DETECTOR, ION TRAP, PRESSURE GAUGE, VALVE, LASER, 6-pp LTP, HIGH VACCUM

Fig. 1 - Green lines and arrows show the trajectory of VOCs.

11.3 Poster Plant Biology, Honolulu, Hawaii, 2017.



Monitoring of Volatile Organic Compounds during *Arabidopsis-Trichoderma* interaction in real-time using Ambient Ionization Mass Spectrometry (AIMS)

Héctor Guillén Alonso, Abigail Moreno Pedraza, Robert Winkler

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato (CINVESTAV-Irapuato), Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León 36821 Irapuato Gto. México. hector.guillen@cinvestav.mx



Introduction

Volatile Organic Compounds (VOCs) in plants are released with different profiles and quantities depending of biotic or abiotic factors. VOCs emitted during plant-microorganism interactions have been widely studied. One of the most analyzed models is *Arabidopsis-Trichoderma*, a molecule 6-pentyl α -pyrone (6-PP) is a molecule plant, involved in the biomass increment and participate in the defense system [1].

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) is the conventional technique to study VOCs and requires four principal steps; capture/concentration, separation, detection and identification, with slight variants. Capture and separation phases are time consuming and very selective [2].

Our laboratory has been working on the development and standardization of a new ionization technique for ambient mass spectrometry base on ionization by Low-Temperature Plasma (LTP-MS). This technique is specially useful for the direct detection of molecules because it does not require sample preparation nor manipulation, no capture or separation phases, allowing an improvement of temporal resolution in the order of seconds [3].

Objectives

Implement and standardization of LTP-MS for monitoring metabolic profiles in plant-microorganism interactions in real time.

Materials and methods

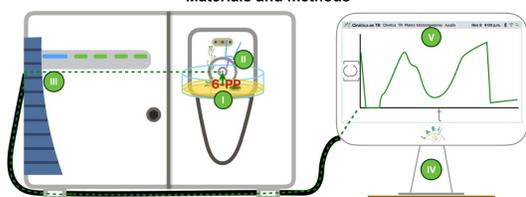


Fig. 1. General methodology. I) 6-PP production by *Trichoderma-Arabidopsis* interaction; II) Ambient ionization using LTP; III) Ion detection in mass spectrometer; IV) Statistical analysis; V) Kinetic in real time.



Fig 2. A) Final design of a 3D printed LTP probe. B) Spatial dimensions of the LTP [3].

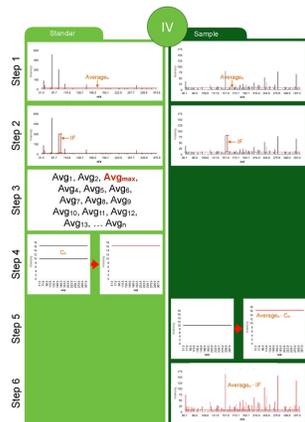


Fig 3. Graphical normalization of LTP-MS data. Methanol is the internal standard. Time between standard and sample measurement requires <1s.

Results and discussion

LTP-MS was used to track the 6-PP molecule. The measurement showed from high repeatability and sensitivity. We detected 6-PP from the first hour after *Trichoderma* inoculation. It possible to determinate a drastically increased at 33 hours (Figure 3A). LTP-MS is ideal to monitor VOCs during interactions, specially when VOCs are release, at specific times.

Ambient conditions are changing along day, facilitating or hindering the volatilization in ionization and sensing, normalization of data is required. This statistical treatment allows us to compare directly between each measurement and to know the concentration of (Figure 3B).

Data normalization does not change the behavior of molecule (Figure 3C), enabling to correct environmental disturbances, and the adjusting of ion intensity based on the non-variable standard.

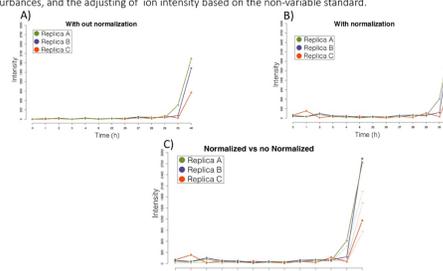


Fig 4. Kinetics of the 6-PP molecule. A) Non-normalized kinetics; B) Normalized kinetics with internal standard; C) Comparison between non-normalized data (transparent lines) and normalized data (solid lines).

LTP-MS improves temporal resolution and open the opportunity to observe punctual changes in VOC concentrations in real time.

Implementing the LTP-MS technique, we observed variations in 6-PP production along time (kinetics), doing a kinetic by SPME-GC-MS results in data loss (Figure 4).

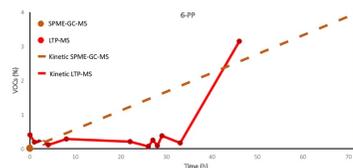


Fig 5. Comparison between LTP-MS and SPME-GC-MS techniques. Using LTP we obtained 13 measurements whereas using SPME only could be collected 2 measurements.

Conclusions

We identified the starting point of production for the 6-pentyl α -pyrone, 26 hours earlier, comparing with conventional techniques such as SPME-GC-MS [1].

LTP-MS allows to monitor a molecule or the complete profile of VOCs from plants in real time and *in-vivo*, with minimal biological disturbance, data with a better temporal resolution, and more similar to real conditions. Delivering analyzed data is crucial to track and compare molecules of interest along time with high reproducibility.

References

- 1) A. Garnica-veigara, S. Barrera-ortiz, E. Mu, and J. Raya-gonz, "The volatile 6-pentyl-2 H-pyran-2-one from *Trichoderma Atrovire* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning." *New Phytol.*, pp. 1496-1512, 2016.
- 2) E. Tait, J. D. Perry, S. P. Stanforth, and J. R. Dean, "Identification of Volatile Organic Compounds Produced by Bacteria Using HS SPME-GC-MS," pp. 363-373, 2014.
- 3) S. Martínez-Jarquín, A. Moreno-Pedraza, H. Guillén-Alonso, and R. Winkler, "Template for 3D Printing a Low-Temperature Plasma Probe," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 14, pp. 6976-6980, 2016.

Acknowledgments

We cordially thank the CINVESTAV and the funding by CONACYT Proyecto: Conacyt FRONTERAS 2015-2/ 814, and CONACYT for scholarship



12 Anexos

Anexo I: Programa de normalización de datos en R

```
1 # Author: Ing. Hector Guillen Alonso, hectorguillen@cinvestav.mx
2 # Version: 4.0
3 # Cambios a la version 2.1: correccion de errores en el script, se anadio y corrigio graficacion de sineticas
4 # Cambios a la version 3.0: correccion de parte de normalizacion
5 # Cambios a la version 4.0: identificacion y eliminacion de iones ambientales
6 # multiples para su comparacion.
7 # Fecha: 2017/02/24
8
9 ## MALDIquant and MALDIquantForeign libraries for MS data processing
10 ## Gibb S, Strimmer K. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data.
11 ## Bioinformatics. 2012 Sep 1;28(17):2270-1. doi:10.1093/bioinformatics/bts447.
12 ## Epub 2012 Jul 12. PubMed PMID: 22796955.
13
14 ~ ##### Librerias #####
15
16
17 library("MALDIquant")
18 library("MALDIquantForeign")
19 library("ggplot2")
20
21
22 ~ ##### Etiquetas con dias de mediciones #####
23
24
25 timeline<-c("D0-13:20", "D0-13:47", "D0-14:40", "D0-15:40", "D0-16:50", "D0-19:25",
26             "D1-9:24", "D2-13:50", "D2-14:47", "D2-15:53", "D2-16:56", "D2-20:36", "D3-9:30")
27
28
29 ~ ##### Fundiones #####
30
31
32 # Funcion para importar y sumar todos los espectros de la medicion
33 ~ importarespectros<-function(samplelist){
34
35     filecounter<-1
36     spectra<-list()
37     mzMLno<-length(samplelist)
38
39     while (filecounter<=mzMLno)
40     ~ {
41         names<-samplelist[filecounter]
42         print(samplelist[filecounter])
43         espectro <- import(samplelist[filecounter])
44         sum <- averageMassSpectra(espectro, method="sum")
45         spectra[[filecounter]]<-sum
46         filecounter<-filecounter+1
47     }
48     spectra
49 }
50
```

```

51
52 # Funcion para exportar archivos a formato csv
53 csvexp<-function(peaks, csvnames){
54
55     csvcount<-1
56
57     while(csvcount<=length(csvnames)){
58         export(peaks[[csvcount]], csvnames[csvcount], type="csv")
59         csvcount<-csvcount+1
60     }
61 }
62
63
64 # Funcion para importar y crear tabla para analisis estadistico
65
66 impcsv<-function(filelistcsv){
67
68     table<-read.csv(filelistcsv[1], header = TRUE)
69     csvcont<-2
70     lengthcsv<-length(filelistcsv)
71
72     while(csvcont<=lengthcsv){
73         tabletemp<-read.csv(filelistcsv[csvcont])
74         table[csvcont+1]<-tabletemp[,2]
75         csvcont<-csvcont+1
76     }
77     table
78 }
79
80
81 # Calcular promedios iniciales
82
83 meantable<-function(intenstable){
84
85     row1<-1
86     lengthtable<-nrow(intenstable)
87     intsmmeans<-c()
88
89     while(row1<=lengthtable){
90         intsmmeans[row1]<-mean(intenstable[row1,])
91         row1<-row1+1
92     }
93     intsmmeans
94 }
95
96
97 # Calcular factores de ajuste de intensidades respecto a su promedio (intensidad/promedio)
98
99 adjfact<-function(datatable, mean){
100

```

```

101  afrcount<-1
102  adfact<-matrix(ncol=ncol(datatable),nrow=nrow(datatable))
103
104  while (afrcount<=nrow(datatable)){
105    adfact[afrcount,]<-mean[afrcount]/(datatable[afrcount,])
106    afrcount<-afrcount+1
107  }
108  adfact
109 }
110
111
112 # Normalizar intensidades (promedio ajustado/factor de ajuste)
113
114 normalint<-function(datatable, normalmeans){
115
116   Normal<-matrix(nrow = nrow(datatable), ncol = ncol(datatable))
117   Ncont<-1
118
119   while (Ncont<=nrow(datatable)){
120     Normal[Ncont,]<-normalmeans[Ncont]/(datatable[Ncont,])
121     Ncont<-Ncont+1
122   }
123   Normal
124 }
125
126
127 ##### Flujo de trabajo #####
128
129 ##### Acondicionamiento de espectros #####
130
131 # Obtener lista de archivos
132 standarfiles<-list.files(pattern="Metanol+")
133 sampleAfiles<-list.files(pattern="MuestraA+")
134 sampleBfiles<-list.files(pattern="MuestraB+")
135 sampleCfiles<-list.files(pattern="MuestraC+")
136 noisefiles<-list.files(pattern="Ruido+")
137
138 # Importacion y suma de espectros del control y las muestras (A,B y C)
139 standars<-importarespectros(standarfiles)
140 sampleA<-importarespectros(sampleAfiles)
141 sampleB<-importarespectros(sampleBfiles)
142 sampleC<-importarespectros(sampleCfiles)
143 noise<-importarespectros(noisefiles)
144
145 # Suavizado
146 standars<-smoothIntensity(standars, method="SavitzkyGolay", halfWindowSize=10)
147 sampleA<-smoothIntensity(sampleA, method="SavitzkyGolay", halfWindowSize=10)
148 sampleB<-smoothIntensity(sampleB, method="SavitzkyGolay", halfWindowSize=10)
149 sampleC<-smoothIntensity(sampleC, method="SavitzkyGolay", halfWindowSize=10)
150 noise<-smoothIntensity(noise, method="SavitzkyGolay", halfWindowSize=10)

```

```

151
152 # Quitar linea base (ajustar intensidades)
153 standars<-removeBaseline(standars, method="SNIP", iterations=100)
154 sampleA<-removeBaseline(sampleA, method="SNIP", iterations=100)
155 sampleB<-removeBaseline(sampleB, method="SNIP", iterations=100)
156 sampleC<-removeBaseline(sampleC, method="SNIP", iterations=100)
157 noise<-removeBaseline(noise, method="SNIP", iterations=100)
158
159 # Alinear picos
160 standars <- alignSpectra(standars, halfWindowSize=20, SNR=2, tolerance=0.3, warpingMethod="lowess")
161 sampleA <- alignSpectra(sampleA, halfWindowSize=20, SNR=2, tolerance=0.3, warpingMethod="lowess")
162 sampleB <- alignSpectra(sampleB, halfWindowSize=20, SNR=2, tolerance=0.3, warpingMethod="lowess")
163 sampleC <- alignSpectra(sampleC, halfWindowSize=20, SNR=2, tolerance=0.3, warpingMethod="lowess")
164 noise <- alignSpectra(noise, halfWindowSize=20, SNR=2, tolerance=0.3, warpingMethod="lowess")
165
166 # Deteccion de picos y seleccion de picos
167 standarspeaks <- detectPeaks(standars, method="MAD", halfWindowSize=10, SNR=2)
168 sampleAspeaks <- detectPeaks(sampleA, method="MAD", halfWindowSize=10, SNR=2)
169 sampleBspeaks <- detectPeaks(sampleB, method="MAD", halfWindowSize=10, SNR=2)
170 sampleCspeaks <- detectPeaks(sampleC, method="MAD", halfWindowSize=10, SNR=2)
171 noisespeaks <- detectPeaks(noise, method="MAD", halfWindowSize=10, SNR=2)
172
173 # Ecuilizacion de masas de espectros (coincidencia en masas de picos)
174 standarspeaks<-binPeaks(standarspeaks, method=c("strict"),tolerance = 0.3)
175 sampleAspeaks<-binPeaks(sampleAspeaks, method=c("strict"),tolerance = 0.3)
176 sampleBspeaks<-binPeaks(sampleBspeaks, method=c("strict"),tolerance = 0.3)
177 sampleCspeaks<-binPeaks(sampleCspeaks, method=c("strict"),tolerance = 0.3)
178 noisespeaks<-binPeaks(noisespeaks, method=c("strict"),tolerance = 0.3)
179
180 # Pasar a matriz
181 standartable<-intensityMatrix(standarspeaks, standars)
182 lstandar<-ncol(standartable)
183 sampleAtable<-intensityMatrix(sampleAspeaks, sampleA)
184 lsampleA<-ncol(sampleAtable)
185 sampleBtable<-intensityMatrix(sampleBspeaks, sampleB)
186 lsampleB<-ncol(sampleBtable)
187 sampleCtable<-intensityMatrix(sampleCspeaks, sampleC)
188 lsampleC<-ncol(sampleCtable)
189 noisetable<-intensityMatrix(noisespeaks, noise)
190 noisetable<-as.data.frame(noisetable)
191 lnoise<-ncol(noisetable)
192
193 # seleccionar picos de ruido potenciales que intervienen
194 noisetable[noisetable<=(max(noisetable)*.1)]<-0
195 noisecount<-1
196 sic<-1
197 noisecnames<-round(names(noisetable[, (colSums(noisetable)>0)]), digits = 0)
198 significantnoise<-matrix(ncol=sum(colSums(noisetable)>0), nrow=nrow(noisetable))
199 while(noisecount<=lnoise){
200 ~   if((sum(noisetable[,noisecount])>0){

```

```

201     significantnoise[,sic]<-noisetable[,noisecount]
202     sic<-sic+1
203   }
204   noisecount<-noisecount+1
205 }
206 significantnoise<-as.data.frame(significantnoise)
207 names(significantnoise)<-noisecnames
208
209 ##### Normalizacion #####
210
211
212 # Promedio de intensidades antes de normalizar
213 standarmeans1<-meantable(standartable)
214 sampleAmeans1<-meantable(sampleAtable)
215 sampleBmeans1<-meantable(sampleBtable)
216 sampleCmeans1<-meantable(sampleCtable)
217
218
219 # Factores de ajuste respecto al promedio (promedio/intensidad)
220 sampleAadjtable<-adjfact(sampleAtable, sampleAmeans1)
221 sampleAadjtable[which(sampleAadjtable>100000)]<-0
222 sampleBadjtable<-adjfact(sampleBtable, sampleAmeans1)
223 sampleBadjtable[which(sampleBadjtable>100000)]<-0
224 sampleCadjtable<-adjfact(sampleCtable, sampleAmeans1)
225 sampleBadjtable[which(sampleBadjtable>100000)]<-0
226
227
228 # Intensidad maxima de todos los promedios del estandar
229 maxstandmean1<-max(standarmeans1)
230
231 # Normalizacion de estandares (promedio maximo de estandares/promedio de estandares)
232 Nstandar<-maxstandmean1/standarmeans1
233
234 # Ajustar promedios de muestras
235 sampleAmeansN<-Nstandar*sampleAmeans1
236 sampleBmeansN<-Nstandar*sampleBmeans1
237 sampleCmeansN<-Nstandar*sampleCmeans1
238
239 # Normalizar valores de muestras
240 NormalA<-normalint(sampleAadjtable,sampleAmeansN)
241 NormalA[which(NormalA>100000)]<-0
242 NormalB<-normalint(sampleBadjtable,sampleBmeansN)
243 NormalB[which(NormalB>100000)]<-0
244 NormalC<-normalint(sampleCadjtable,sampleCmeansN)
245 NormalC[which(NormalC>100000)]<-0
246
247 # Convertir a dataframe y nombrar renglones y columnas
248 Anames<-round(as.numeric(colnames(sampleAtable)),digits = 2)
249 NormalA<-as.data.frame(NormalA, row.names=timeline)
250 colnames(NormalA)<-Anames

```

```

251 Bnames<-round(as.numeric(colnames(sampleBtable)),digits = 2)
252 NormalB<-as.data.frame(NormalB, row.names=timeline)
253 colnames(NormalB)<-Bnames
254 Cnames<-round(as.numeric(colnames(sampleCtable)),digits = 2)
255 NormalC<-as.data.frame(NormalC, row.names=timeline)
256 colnames(NormalC)<-Cnames
257 ##### Graficas #####
258
259
260 # Promedios de intensidades para hacer TOP
261 isampleA<-colMeans(NormalA)
262 isampleB<-colMeans(NormalB)
263 isampleC<-colMeans(NormalC)
264
265
266 # Hacer vector con top de intensidades
267 topA<-order(isampleA,decreasing = TRUE)
268 topB<-order(isampleB,decreasing = TRUE)
269 topC<-order(isampleC,decreasing = TRUE)
270
271
272 # Obtener iones encontrados
273 ionA<-colnames(NormalA)
274 ionB<-colnames(NormalB)
275 ionC<-colnames(NormalC)
276
277
278 ##### Casificacion TOP #####
279
280 # Graficar ion de interes segun top
281 top_interes<-1 #Elegir que top es el que se quiere ver
282
283 maxintA<-max(c(max(NormalA[1:(nrow(NormalA))],topA[top_interes]])))
284 maxintA<-round((maxintA+(maxintA*.1)),digits = -2)
285 muestreosA<-length(NormalA[1:(nrow(NormalA))],topA[top_interes])
286 ymarcksA<-seq(0,maxintA, round((maxintA/10),digits = -2))
287
288 masaA<-ionA[topA[top_interes]]
289 massA<- "Mass"
290 masaA<-round(as.numeric(gsub("X", "", masaA)),digits=2)
291 nombreA<-c(masaA,masaA)
292
293
294 plot(NormalA[,topA[top_interes]],
295      type="b", main=nombreA, xlab="Muestreo",
296      ylab="intensidad normalizada a metanol", col="red",axes=F)
297 axis(1, at=c(1:muestreosA),labels = timeline )
298 axis(2, at=ymarcksA, labels = ymarcksA)
299
300 maxintB<-max(c(max(NormalB[1:(nrow(NormalB))],topB[top_interes]])))

```

```

301 maxintB<-round((maxintB+(maxintB*.1)),digits = -2)
302 muestresB<-length(NormalB[1:(nrow(NormalB)),topB[top_interes]])
303 ymarcksB<-seq(0,maxintB, round((maxintB/10),digits = -2))
304
305 masaB<-ionB[top_interes]
306 massB<- "Mass"
307 masaB<-round(as.numeric(gsub("X","",masaB)),digits=2)
308 nombreB<-c(massB,masaB)
309
310 plot(NormalB[,topB[top_interes]],
311      type="b", main=nombreB, xlab="Muestreo",
312      ylab="intensidad normalizada a metanol", col="red",axes=F)
313 axis(1, at=c(1:muestresB),labels = timeline )
314 axis(2, at=ymarcksB, labels = ymarcksB)
315
316 maxintC<-max(c(max(NormalC[1:(nrow(NormalC)),topC[top_interes]])))
317 maxintC<-round((maxintC+(maxintC*.1)),digits = -2)
318 muestresC<-length(NormalC[1:(nrow(NormalC)),topC[top_interes]])
319 ymarcksC<-seq(0,maxintC, round((maxintC/10),digits = -2))
320
321 masaC<-ionC[top_interes]
322 massC<- "Mass"
323 masaC<-round(as.numeric(gsub("X","",masaC)),digits=2)
324 nombreC<-c(massC,masaC)
325
326 plot(NormalC[,topC[top_interes]],
327      type="b", main=nombreC, xlab="Muestreo",
328      ylab="intensidad normalizada a metanol", col="red",axes=F)
329 axis(1, at=c(1:muestresC),labels = timeline )
330 axis(2, at=ymarcksC, labels = ymarcksC)
331
332
333 ##### TOP por Masa especifica #####
334
335
336 # Seleccionar ion de interes de tabla guardada en variable
337 # sampleXtable donde X representa una muestra dada
338
339
340 ion_interesMA<-4 #ion de interes A
341 ion_interesMB<-5 #ion de interes B
342 ion_interesMC<-4 #ion de interes C
343
344 maxintMA<-max(c(max(NormalA[1:(nrow(NormalA)),ion_interesMA]))
345 maxintMA<-maxintMA+(maxintMA*.1)
346 muestresMA<-length(NormalA[1:(nrow(NormalA)),ion_interesMA])
347 ymarcksMA<-seq(0,maxintMA, round((maxintMA/10),digits = -2))
348
349 masaA<-ionA[ion_interesMA]
350 masaA<-round(as.numeric(gsub("X","",masaA)),digits=2)

```

```

351 masaA<- "Mass"
352 nombreAi<-c(masaA,masaA)
353
354 plot(NormalA[1:(nrow(NormalA)),ion_interesMA],
355      type="b", main=nombreAi, xlab="Muestreo",
356      ylab="intensidad normalizada a metanol", col="red",axes=F)
357 axis(1, at=c(1:muestruosMA),labels = timeline )
358 axis(2, at=yvarcksMA, labels = yvarcksMA)
359
360 maxintMB<-max(c(max(NormalB[1:(nrow(NormalB)),ion_interesMB]))
361 maxintMB<-maxintMB+(maxintMB*.1)
362 muestruosMB<-length(NormalB[1:(nrow(NormalB)),ion_interesMB])
363 yvarcksMB<-seq(0,maxintMB, round((maxintMB/10),digits = -2))
364
365 masaB<-ionB[ion_interesMB]
366 masaB<-round(as.numeric(gsub("X","",masaB)),digits=2)
367 massB<- "Mass"
368 nombreBi<-c(masaB,masaB)
369
370 plot(NormalB[1:(nrow(NormalB)),ion_interesMB],
371      type="b", main=nombreBi, xlab="Muestreo",
372      ylab="intensidad normalizada a metanol", col="red",axes=F)
373 axis(1, at=c(1:muestruosMB),labels = timeline )
374 axis(2, at=yvarcksMB, labels = yvarcksMB)
375
376 maxintMC<-max(c(max(NormalC[1:(nrow(NormalC)),ion_interesMC]))
377 maxintMC<-maxintMC+(maxintMC*.1)
378 muestruosMC<-length(NormalC[1:(nrow(NormalC)),ion_interesMC])
379 yvarcksMC<-seq(0,maxintMC, round((maxintMC/10),digits = -2))
380
381 masaC<-ionC[ion_interesMC]
382 masaC<-round(as.numeric(gsub("X","",masaC)),digits=2)
383 massC<- "Mass"
384 nombreCi<-c(masaC,masaC)
385
386 plot(NormalC[1:(nrow(NormalC)),ion_interesMC],
387      type="b", main=nombreCi, xlab="Muestreo",
388      ylab="intensidad normalizada a metanol", col="red",axes=F)
389 axis(1, at=c(1:muestruosMC),labels = timeline )
390 axis(2, at=yvarcksMC, labels = yvarcksMC)
391
392
393 ##### Comportamiento de 3 muestras #####
394
395
396 ion_interesA<-4
397 ion_interesB<-4
398 ion_interesC<-4
399
400 masaA<-ionB[ion_interesB]

```

```

401 masaA<-round(as.numeric(gsub("X","",masaA)),digits=2)
402 massA<- "Mass"
403 nombreAi<-c(massa,masaA)
404
405 max<-max(c(max(NormalA[1:(nrow(NormalA)),ion_interesA]),
406           max(NormalB[1:(nrow(NormalB)),ion_interesB]),
407           max(NormalC[1:(nrow(NormalC)),ion_interesC])))
408 maxint<-max+(max*.1)
409 muestreos<-length(NormalA[1:(nrow(NormalA)),ion_interesA])
410 ymarcks<-seq(0,maxint, round((maxint/10),digits = -2))
411
412 # Colores de grafico
413 acol<-"orangered"
414 bcol<-"olivedrab2"
415 ccol<-"skyblue2"
416
417 plot(NormalA[1:(nrow(NormalA)),ion_interesA],
418      type="b", main=nombreAi, xlab="Tiempos de muestreo",
419      ylab="Intensidad normalizada a metanol", col=acol, ylim=c(0,maxint), xlim=c(1,muestreos),axes=F)
420 axis(1, at=c(1:(muestreos)),labels = timeline )
421 axis(2, at=ymarcks, labels = ymarcks)
422 points(1, (max-(max*.1)), pch = 21, lwd = 1.3, cex = 1.5, col=acol)
423 text(2.13,(max-(max*.1)) , "Muestra A Normalizada", cex = 1, font = 1, col = acol)
424 # Graficar Muestra B
425 lines(NormalB[1:(nrow(NormalB)),ion_interesB], col=bcol, type="b")
426 points(1, (max-(2*max*.1)), pch = 21, lwd = 1.3, cex = 1.5, col=bcol)
427 text(2.13,(max-(2*max*.1)) , "Muestra B Normalizada", cex = 1, font = 1, col = bcol)
428 # Graficar Muestra C
429 lines(NormalC[1:(nrow(NormalC)),ion_interesC], col=ccol, type="b")
430 points(1, (max-(3*max*.1)), pch = 21, lwd = 1.3, cex = 1.5, col=ccol)
431 text(2.13,(max-(3*max*.1)) , "Muestra C Normalizada", cex = 1, font = 1, col = ccol)
432
433
434 # Comparacion con intensidades no normalizadas
435 # Graficar Muestra A
436 lines(sampleAtable[1:(nrow(sampleAtable)),ion_interesA], col="brown3", type="b")
437 points(1, (max-(1.5*max*.1)), pch = 21, lwd = 1.3, cex = 1.5, col="brown3")
438 text(1.6,(max-(1.5*max*.1)) , "Muestra A", cex = 1, font = 1, col="brown3")
439 # Graficar Muestra B
440 lines(sampleBtable[1:(nrow(sampleBtable)),ion_interesB], col="olivedrab4", type="b")
441 points(1, (max-(2.5*max*.1)), pch = 21, lwd = 1.3, cex = 1.5, col="olivedrab4")
442 text(1.6,(max-(2.5*max*.1)) , "Muestra B", cex = 1, font = 1, col="olivedrab4")
443 # Graficar Muestra C
444 lines(sampleCtable[1:(nrow(sampleCtable)),ion_interesC], col="slateblue4", type="b")
445 points(1, (max-(3.5*max*.1)), pch = 21, lwd = 1.3, cex = 1.5, col="slateblue4")
446 text(1.6,(max-(3.5*max*.1)) , "Muestra C", cex = 1, font = 1, col="slateblue4")

```

Anexo II: Parámetros de impresión para los diferentes filamentos

Material: PLA		
Parámetro	Valor	Observación
Altura de capa (mm)	0.28	
Grosor de pared (mm)	0.8	
Activar retracción	Si	Cuando se atora el filamento es recomendable desactivar esta opción
Altura de primera y última capa (mm)	0.8	Cuando se rellena el modelo al 100%, se omite esta opción
Densidad de relleno (%)	100	Se recomienda rellenar al 100% para prototipos finales. Si se desea ahorrar material se puede imprimir desde 10 %
Velocidad de impresión (mm/s)	50	Puede variar de 40 a 60 dependiendo de la calidad de la impresión, a menor velocidad, mayor definición.
Temperatura de impresión (°C)	210	El mejor resultado se obtuvo con 210 °C, su rango va desde 170 °C a 230 °C
Temperatura de la cama (°C)	60	
Soporte	Tocar superficie	Activar solo para piezas con partes aéreas
Adhesión a la plataforma	Brim	Se recomienda activar siempre esta opción (al menos 10 vueltas)
Diámetro del filamento (mm)	2.95	Para filamentos con diámetro de 3 mm
Flujo (%)	100	Incrementar flujo si se taba la boquilla de extrusión
Tamaño de la boquilla (mm)	.4	Boquilla de la impresora

Velocidad de retracción (mm/s)	25	
Distancia (mm)	8	
Capa inicial (mm)	0.2	
Relleno de capa inicial (%)	100	
Cortar objeto a la altura (mm)	0	No se recomienda imprimir las piezas por partes
Sobrelapado de extrusión (mm)	0.15	
Velocidad de viaje (mm/s)	60	Usar velocidad máxima posible según el modelo de impresora
Velocidad de primera capa (mm/s)	28	Entre mas bajo el valor, ayuda a obtener una mejor pieza al tener un buen soporte en la base.
Enfriamiento (s)	0	Iniciar enfriamiento al momento de comenzar a imprimir
Activar enfriamiento de ventilador	Si	

Material: ABS		
Parámetro	Valor	Observación
Altura de capa (mm)	0.1	
Grosor de pared (mm)	1.2	
Activar retracción	No	Si se activa puede causar tapones en la boquilla
Altura de primera y última capa (mm)	1.2	Cuando se rellena el modelo al 100%, se omite esta opción

Densidad de relleno (%)	100	Se recomienda rellenar al 100% para prototipos finales. Si se desea ahorrar material se puede imprimir desde 10 %
Velocidad de impresión (mm/s)	40	Puede variar de 40 a 60 dependiendo de la calidad de la impresión, a menor velocidad, mayor definición.
Temperatura de impresión (°C)	230	El mejor resultado se obtuvo con 230 °C, su rango va desde 210 °C a 270 °C
Temperatura de la cama (°C)	80	
Soporte	Tocar superficie	Activar solo para piezas con partes aéreas
Adhesión a la plataforma	Brim	Se recomienda activar siempre esta opción (al menos 10 vueltas)
Diámetro del filamento (mm)	2.95	Para filamentos con diámetro de 3 mm
Flujo (%)	100	Incrementar flujo si se taba la boquilla de extrusión
Tamaño de la boquilla (mm)	.4	Boquilla de la impresora
Velocidad de retracción (mm/s)	20	
Distancia (mm)	6	
Capa inicial (mm)	0.3	
Relleno de capa inicial (%)	100	
Cortar objeto a la altura (mm)	0	No se recomienda imprimir las piezas por partes
Sobrelapado de extrusión (mm)	0.15	
Velocidad de viaje (mm/s)	60	Usar velocidad máxima posible según el modelo de impresora

Velocidad de primera capa (mm/s)	30	Entre mas bajo el valor, ayuda a obtener una mejor pieza al tener un buen soporte en la base.
Enfriamiento (s)	0	Iniciar enfriamiento al momento de comenzar a imprimir
Activar enfriamiento de ventilador	No	No activar ventilación ya que provoca deformación en las piezas por el choque de temperatura.

Material: PC		
Parámetro	Valor	Observación
Altura de capa (mm)	0.32	
Grosor de pared (mm)	1.2	
Activar retracción	Si	Cuando se atora el filamento es recomendable desactivar esta opción
Altura de primera y última capa (mm)	1.2	Cuando se rellena el modelo al 100%, se omite esta opción
Densidad de relleno (%)	100	Se recomienda rellenar al 100% para prototipos finales. Si se desea ahorrar material se puede imprimir desde 10 %
Velocidad de impresión (mm/s)	20	Puede variar de 40 a 60 dependiendo de la calidad de la impresión, a menor velocidad, mayor definición.
Temperatura de impresión (°C)	280	El mejor resultado se obtuvo con 280 °C, su rango va desde 270 °C a 300 °C
Temperatura de la cama (°C)	80	Se recomienda 100 °C sin embargo nuestra impresora no alcanza la temperatura pero bastó con 80 °C.
Soporte	Tocar superficie	Activar solo para piezas con partes aéreas

Adhesión a la plataforma	Brim	Se recomienda activar siempre esta opción (10 vueltas)
Diámetro del filamento (mm)	2.89	Para filamentos con diámetro de 3 mm
Flujo (%)	90	Incrementar flujo si se taba la boquilla de extrusión
Tamaño de la boquilla (mm)	.4	Boquilla de la impresora
Velocidad de retracción (mm/s)	20	
Distancia (mm)	6	
Capa inicial (mm)	0.3	
Relleno de capa inicial (%)	100	
Cortar objeto a la altura (mm)	0	No se recomienda imprimir las piezas por partes
Sobrelapado de extrusión (mm)	0.15	
Velocidad de viaje (mm/s)	60	Usar velocidad máxima posible según el modelo de impresora
Velocidad de primera capa (mm/s)	30	Entre mas bajo el valor, ayuda a obtener una mejor pieza al tener un buen soporte en la base.
Enfriamiento (s)	0	Iniciar enfriamiento al momento de comenzar a imprimir
Activar enfriamiento de ventilador	No	No activar ventilación ya que provoca deformación en las piezas por el choque de temperatura.

Material: NINJAFlex		
Parámetro	Valor	Observación

Altura de capa (mm)	0.1	
Grosor de pared (mm)	0.8	
Activar retracción	Si	Cuando se atora el filamento es recomendable desactivar esta opción
Altura de primera y última capa (mm)	0.8	Cuando se rellena el modelo al 100%, se omite esta opción
Densidad de relleno (%)	100	Se recomienda rellenar al 100% para prototipos finales. Si se desea ahorrar material se puede imprimir desde 10 %
Velocidad de impresión (mm/s)	20	Puede variar de 40 a 60 dependiendo de la calidad de la impresión, a menor velocidad, mayor definición.
Temperatura de impresión (°C)	217	El mejor resultado se obtuvo con 217 °C.
Temperatura de la cama (°C)	50	
Soporte	No	Debido a su configuración elástica es sumamente difícil desprender las rebabas.
Adhesión a la plataforma	Brim	Se recomienda activar siempre esta opción (10 vueltas)
Diámetro del filamento (mm)	2.85	Para filamentos con diámetro de 3 mm
Flujo (%)	100	Incrementar flujo si se taba la boquilla de extrusión
Tamaño de la boquilla (mm)	.4	Boquilla de la impresora
Velocidad de retracción (mm/s)	15	
Distancia (mm)	3	
Capa inicial (mm)	0.3	
Relleno de capa inicial (%)	100	

Cortar objeto a la altura (mm)	0	No se recomienda imprimir las piezas por partes
Sobrelapado de extrusión (mm)	0.15	
Velocidad de viaje (mm/s)	150	Usar velocidad máxima posible según el modelo de impresora
Velocidad de primera capa (mm/s)	20	Entre mas bajo el valor, ayuda a obtener una mejor pieza al tener un buen soporte en la base.
Enfriamiento (s)	0	Iniciar enfriamiento al momento de comenzar a imprimir
Activar enfriamiento de ventilador	No	No activar ventilación ya que provoca deformación en las piezas por el choque de temperatura.