



**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ISÓMEROS POSICIONALES DEL ÁCIDO  
PALMITOLEICO (16:1n-7) EN MUESTRAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES  
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

***Autor: Ramón Francia Yanguas***

***Tutor/es:***

***Jesús Balsinde Rodríguez (IBGM)***

***Alfonso Pérez Encabo (Uva)***

## Índice

Abstract .....	2
Resumen.....	3
Introducción breve sobre los antecedentes y estado actual del tema .....	4
Ácidos grasos.....	4
Abreviaturas empleadas en el texto .....	6
Lípidos en la célula .....	6
Análisis GC/MS .....	9
Cromatografía de gases .....	9
Espectrometría de masas (MS).....	10
Objetivos y plan de trabajo, justificación de la pertinencia del mismo .....	11
Materiales y métodos.....	14
1. Materiales .....	14
2. Equipos.....	16
3. Cultivo celular.....	17
4. Análisis del contenido total de proteínas: Método Bradford .....	19
5. Adición de patrones internos.....	21
6. Extracción de lípidos totales de la muestra: protocolo Bligh & Dyer.....	21
7. Separación de lípidos por cromatografía en capa fina (TLC preparativa).....	23
8. Derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos (FAMES) .....	25
9. Derivatización de FAMES a 4,4-dimetiloxazolinas.....	26
10. Calibrado del equipo .....	28
11. Análisis FAMES con GC/MS .....	28
Resultados .....	31
Análisis del contenido de ácidos grasos en la muestra de células lisadas como FAME por GC/MS.....	31
Análisis patrones GC/MS como FAMES.....	41
Análisis patrones GC/MS como DMOX .....	44
Análisis de los DMOX obtenidos a partir de las muestra de FAMES .....	56
Conclusiones.....	63
Bibliografía.....	64
Tablas y figuras.....	68

## Abstract

Palmitoleic acid (cis-9-hexadecenoic acid, 16:1n-7) is a fatty acid frequently found esterified in neutral lipids and phospholipids of a large number of eukaryotic cells. This fatty acid has recently received much interest due to their bioactive properties, which seem to go far beyond its mere participation in the formation of biomembranes.

It has been suggested recently that palmitoleic acid may function as a hormone that, secreted by the Adipocyte (adipocytokine) regulate the hepatic metabolism of lipids. However the molecular mechanism by which this would happen is far from being known. One of the biggest questions that arise is to establish the active form of palmitoleic acid which gives account of its biological activity (free fatty acid, ester, a thioester, an amide, etc)

Palmitoleic acid possesses several positional isomers, such as 16:1n – 10 or 16:1n - 9. In general, the distribution and relative amount of each isomer in cells and tissues is unclear, mainly due to most chromatographic techniques used for lipid separation are not able to resolve. The existence of isomers of palmitoleic acid in cells and tissues leads to consider that part of the biological activity attributed to the fatty acid can reside, at least in part in one of its isomers. To answer this question, a method of analysis that allows the identification and quantification of these isomers in biological samples is required.

Using GC/MS, previous works of the receiver group were able to separate the peak of palmitoleic acid in two peaks in the majority of biological samples measured as methyl esters, indicating the presence of at least two isomers of this fatty acid. However its molecular identity cannot be established a priori since each of those two peaks obtained may contain more than one isomer and not all isomers are in all samples. Thus, a structural analysis using dimethyloxazolines (DMOX) derivatives from fatty acid is necessary to unambiguously determine all palmitoleic acid isomers.

## Resumen

El ácido cis-9-hexadecenoico o ácido palmitoleico es un ácido graso que se encuentra con frecuencia esterificado en lípidos neutros y fosfolípidos de un gran número de células eucarióticas. Este ácido graso ha recibido mucho interés recientemente debido a sus propiedades bioactivas, que parecen ir mucho más allá de su mera participación en la formación de biomembrana. Se ha sugerido recientemente que el ácido palmitoleico podría funcionar como una hormona que, secretada por el adipocito (adipoquina) regularía el metabolismo hepático de los lípidos. Sin embargo el mecanismo molecular por el que esto sucedería dista mucho de ser conocido. Una de los mayores interrogantes que se plantea es establecer cuál es la forma activa del ácido palmitoleico que da cuenta de su actividad biológica (el ácido graso libre, un éster, un tioéster, una amida, etc).

El ácido palmitoleico posee varios isómeros posicionales, tales como el 16:1*n*-10, o el 16:1*n*-9. En general se desconoce cuál es la distribución y cantidad relativa de cada uno de estos isómeros en células y tejidos, lo que es debido fundamentalmente a que la mayoría de técnicas cromatográficas empleadas para la separación de lípidos no es capaz de resolver estos isómeros. La existencia de isómeros de ácido palmitoleico en células y tejidos lleva a plantearse la posibilidad de que parte de la actividad biológica atribuida a dicho ácido graso pueda residir, al menos en parte, en alguno de sus isómeros. Responder a esta cuestión requiere establecer un método de análisis que permita la identificación y cuantificación de cada uno de estos isómeros en muestras biológicas.

Utilizando GC/MS, trabajos previos del grupo receptor consiguen desdoblar el pico de ácido palmitoleico en dos picos en la mayoría de muestras biológicas ensayadas cuando se analizan ésteres metílicos, indicando la presencia de, al menos, dos isómeros de este ácido graso. Sin embargo su identidad molecular no se puede establecer a priori ya que cada uno de esos dos picos obtenidos podría contener más de un isómero y no todos los isómeros están en todas las muestras. Se hace pues necesario recurrir a un análisis estructural mediante análisis de dimetiloxazolinas (DMOX) derivados de los ácido grasos.

## Introducción breve sobre los antecedentes y estado actual del tema

### Ácidos grasos

Según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) los ácidos grasos se nombran en función del número de carbonos de la cadena hidrocarbonada. En el caso de presentar insaturaciones estas se describen especificando la configuración del doble enlace (cis/trans) y a continuación se especifican los carbonos en los que se encuentran las insaturaciones contando desde el carbono carboxílico.

De acuerdo a esta nomenclatura el ácido palmitoleico, por ejemplo, que presenta una única insaturación en el C<sub>9</sub> se nombraría así: Acido cis-9 hexadecenoico.

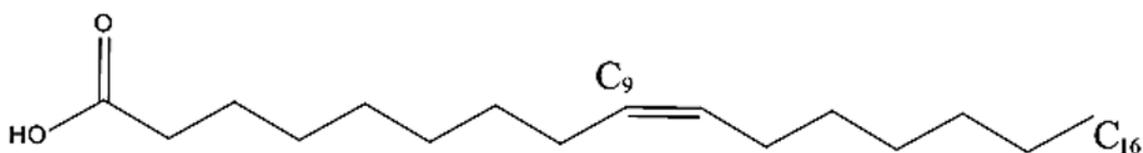


Figura 1. Ácido palmitoleico. Presenta 16 carbonos, y un doble enlace en el carbono 9, por lo tanto queda descrito por la abreviatura 16:1n-7.

Por otro lado los ácidos grasos se describen también por una abreviatura de acuerdo con esta nomenclatura, que consta del número de carbonos de la cadena hidrocarbonada seguida del número de insaturaciones que presenta y por último se especifica la familia a la que pertenece el ácido graso. Para determinar este último valor se resta el número del carbono del último doble enlace del número total de carbonos (n) de la cadena. Siguiendo con el ejemplo anterior el ácido palmitoleico vendría descrito de la siguiente manera:

$$16(\text{número de carbonos de la cadena}) - 9(\text{posición del doble enlace}) = 7$$

El ácido palmitoleico vendría descrito por la abreviatura: 16:1n-7.

Existen muchos ácidos grasos, de los cuales se presentan algunos en la tabla 1 junto a sus abreviaturas y nombres triviales.

Nomenclatura sistemática	Nombre trivial	Abreviatura
<b>Ácidos grasos saturados</b>		
butanoico	butírico	4:0
hexanoico	caproico	6:0
octanoico	caprílico	8:0
decanoico	cáprico	10:0
dodecanoico	laurico	12:0
tetradecanoico	mirístico	14:0
hexadecanoico	palmítico	16:0
octadecanoico	esteárico	18:0
eicosanoico	araquídico	20:0
docosanoico	behénico	22:0
<b>Ácidos grasos monoinsaturados</b>		
9-hexadecenoico	palmitoleico	16:1n-7
6-hexadecenoico	sapiénico	16:1n-10
6-octadecenoico	petroselínico	18:1n-12
9-octadecenoico	oleico	18:1n-9
11-octadecenoico	cis-vaccénico	18:1n-7
13-docosanoico	erúcico	22:1n-9
15-tetracosenoico	nervónico	24:1n-9
<b>Ácidos grasos poliinsaturados</b>		
9,12-octadecadienoico	linoleico	18:2n-6
6,9,12-octadecatrienoico	γ-linolénico	18:3n-6
9,12,15-octadecatrienoico	α-linolénico	18:3n-3
5,8,11,14-eicosatetraenoico	araquidónico	20:4n-6
5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	EPA	20:5n-3
4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	DHA	22:6n-3

Tabla 1. Recopilación de algunos ácidos grasos biológicamente importantes junto a su nomenclatura recomendada por la IUPAC y su nombre trivial así como la abreviatura correspondiente. Se sobreentiende que los dobles enlaces descritos presentan configuración cis. Además los ácidos grasos poliinsaturados reflejados en la tabla presentan insaturaciones separadas por dos carbonos (metil interrumpidos) de manera que no son enlaces conjugados.

## Abreviaturas empleadas en el texto

GC – <i>Cromatografía de gases</i>	DMOX - <i>Dimetiloxazolinás</i>
MS – <i>Espectrometría de masas</i>	TFAA - <i>Anhídrido trifluoroacético</i>
LD – <i>Gotas lipídicas</i>	C/M - <i>cloroformo/metanol</i>
PL - <i>Fosfolípidos</i>	DMEM - <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DAG - <i>Diacilglicerol</i>	FBSi - <i>Suero fetal bovino inactivado</i>
TAG - <i>Triacilglicerol</i>	HPLC – <i>Cromatografía líquida de alta eficacia</i>
CE - <i>Ésteres de colesterol</i>	Rf – <i>Grado de avance</i>
FAME – <i>Ésteres metílicos de los ácidos grasos</i>	Tr - <i>Tiempo de retención</i>
TLC – <i>Cromatografía en capa fina</i>	

## Lípidos en la célula

Habitualmente se ha considerado que los papeles que desempeñan los ácidos grasos en la célula son principalmente como unidades estructurales, constituyentes mayoritarios de las membranas celulares y como unidades de reserva energética. Si bien esto es cierto, a su vez es muy limitado ya que hay evidencias de que los ácidos grasos y los lípidos en los que se encuentran tienen una amplia gama de funciones, participando en procesos claves de regulación y homeostasis en la célula, relacionados con el sistema inmune y como precursores de hormonas relacionadas con la inflamación. Se ha descubierto que una regulación anormal del metabolismo lipídico está vinculada a enfermedades de tipo metabólico, tales como diabetes o aterosclerosis entre otras [1, 2].

Los ácidos grasos pueden encontrarse en la célula como ácidos grasos libres, o formando estructuras más complejas unidas a diferentes moléculas tales como glicerol o colesterol. En este trabajo se estudió por un lado el contenido total de lípidos de la célula fuese cual fuese su procedencia, y por otro se hizo el análisis por separado de los ácidos grasos presentes en la célula como fosfolípidos, diacilglicerol, triacilglicerol y ésteres de colesterol.

Es conveniente recordar cómo están constituidas estas estructuras, así como su función en la célula y su abundancia:

- Fosfolípidos: compuestos anfipáticos formados por una molécula de glicerol triplemente sustituidos por dos moléculas de ácido graso y un grupo fosfato. Se han caracterizado como componentes estructurales de la membrana celular, como componentes detergentes de los ácidos biliares, además de ser intermediarios en la síntesis de sustancias de señalización celular y en procesos de activación de enzimas.
- Diacilglicerol: compuestos formados por una molécula de glicerol esterificada por dos unidades de ácido graso en las posiciones 1,2 o 1,3. Se ha descrito su función como intermediario de procesos de señalización celular. [3, 4]
- Triacilglicerol: debido a la esterificación de los tres grupos hidroxilo del glicerol con ácidos grasos, iguales o no entre sí. Constituyen la mayor reserva energética animal y vegetal.
- Ésteres de colesterol: formadas por una molécula de colesterol esterificada con un ácido graso. Su función es evitar la toxicidad de altas dosis de colesterol libre, así como actuar de reserva para la síntesis de hormonas esteroideas en células esteroideogénicas.

Es necesario por tanto caracterizar correctamente la bioquímica de estos compuestos y de las estructuras que forman, su relevancia en los procesos en los que están involucrados así como sus mecanismos de regulación y mantenimiento de la homeostasis de la célula.

Dependiendo de la función de la célula así como de su naturaleza, su composición lipídica varía. Esta composición es característica del tipo de célula estudiada, ya que aparte de aquellos que conforman su composición esencial, otros pueden provenir del entorno o la dieta y otros pueden ser sintetizados en el interior de la célula de *novo*, como respuesta a ciertas condiciones o estímulos.

Una de las posibles estrategias a seguir para poder obtener información acerca de su relevancia en distintos procesos es la estimulación de células en cultivo, de diferentes maneras, con el fin de determinar que ácidos grasos se ven alterados por qué factores y en qué medida, para poder relacionarlos con sus posibles funciones y su bioquímica.

Para ello es necesario contar con métodos de análisis que permitan identificar y cuantificar de manera fiable y reproducible los ácidos grasos presentes en las células.

Los métodos empleados tradicionalmente para este análisis presentan limitaciones sobre todo a la hora de determinar la posición de las insaturaciones en la cadena hidrofóbica de los ácidos grasos. Es el caso de ciertos isómeros del ácido 16:1, del que se han descrito varios isómeros: n-7, n-10, n-9 y n-5. De éstos isómeros cabe destacar los dos primeros, dada su relevancia biológica.

El ácido palmitoleico o cis-9 hexadecenoico, es el isómero del 16:1 más descrito presente en la mayoría de las células eucariotas. Éste ácido graso, componente habitual de grasas animales y aceites de semillas, procede de la desaturación del ácido palmítico (16:0) vía estearoil-CoA desaturasa. Se han descrito muchas posibles funciones [5, 6] para este ácido graso que van desde el almacenamiento a procesos de señalización, algunas de las cuales se comentan brevemente a continuación:

Se ha demostrado que una dieta rica en 16:1n-7 contribuye al aumento del colesterol “malo” o colesterol de lípidos de baja densidad. Así el palmitoleico estaría actuando como un ácido graso saturado, a pesar del doble enlace [7].

Por otro lado, se ha definido como marcador bioquímico en el metabolismo de ácidos grasos, al actuar como indicador de la actividad de ciertas encimas (desaturasas), y como señalizador de variaciones en la síntesis de ácidos grasos en la grasa blanca [2, 5, 8] .

Además se ha relacionado con el cáncer, ya que se ha comprobado que puede relacionarse la información obtenida de la actividad de la desaturasa a partir del 16:1n-7 con el riesgo de desarrollo de cáncer [9, 10].

En segundo lugar cabe destacar el 16:1n-10 [11, 12], o ácido sapiénico que debe su nombre a haber sido descrito por primera vez en humanos. El ácido sapiénico es un componente mayoritario del sebo humano secretado por las glándulas sebáceas de la piel. Éste ha de ser producido por el organismo ya que, salvo algunas plantas, no aparece en otras especies por lo que no procede de la dieta. Para determinar la función de este ácido graso [13] se han planteado dos posibilidades: por un lado se asocia al exceso de sebo y por otro lado se ha propuesto una función potente contra determinadas bacterias asociadas con el acné [14] y la dermatitis [15].

## Análisis GC/MS

### *Cromatografía de gases*

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación en la cual la fase móvil es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente o un líquido retenido en un soporte sólido (columna empaquetada) o impregnando las paredes de una columna capilar. Esta técnica solo es aplicable a compuestos volátiles o fácilmente volatilizables, lo cual supone un inconveniente, teniendo que recurrir en ocasiones a reacciones de derivatización para obtener productos de fácil volatilización. La información se obtendrá en forma de cromatograma, una representación de la señal del detector, que va a ser función directa de la concentración frente al tiempo. A través del cromatograma se determina el tiempo de retención, parámetro que será la base de la identificación por comparación de estos datos con los correspondientes a compuestos puros medidos en las mismas condiciones. Además a través de la altura de los picos del cromatograma y del área bajo estas curvas obtenidas puede realizarse el análisis cuantitativo de los compuestos cromatografiados, por ejemplo refiriendo éstas a los valores obtenidos para un patrón interno de concentración conocida.

La introducción de la muestra líquida en el cromatógrafo se lleva a cabo mediante inyección en el portal de inyección. El proceso de introducción de muestra ha de ser reproducible, por ello es conveniente el empleo de inyectores automáticos. La inyección puede realizarse en régimen Split o Splitless en función de factores tales como la cantidad de muestra o el tipo de columna elegido.

Durante el proceso son varias las temperaturas a tener en cuenta, en primer lugar la del portal de inyección, que debe ser capaz de volatilizar inmediata y completamente la muestra sin degradarla, y en segundo lugar la temperatura durante la carrera puede ser constante (separación isoterma) o variar a lo largo del tiempo, siguiendo una rampa de temperatura programada.

El detector en cromatografía de gases puede ser de varios tipos, ha de ser capaz de detectar la presencia de compuestos diferentes al gas portador. Esa información es una señal eléctrica que se traduce en el cromatograma final. Un sistema con elevada sensibilidad es el conformado por un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas [16].

## *Espectrometría de masas (MS)*

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la detección de iones derivados de moléculas, basada en la detección estos por la relación entre la masa molecular y la carga ( $m/z$ ).

En un análisis por espectrometría de masas tienen lugar, de forma general, cuatro etapas: ionización de los compuestos, la fragmentación de éstos, su separación en función de su masa/carga y su detección. Un espectrómetro de masas está constituido principalmente por 4 módulos: un sistema de entrada de la muestra, una fuente de ionización, un analizador de masas y por último un detector de esos iones. El proceso de ionización es diferente en función de la fuente de ionización empleada, pudiéndose distinguir fuentes duras como por ejemplo la ionización por impacto electrónico, y fuentes de ionización blandas, como por ejemplo fuentes de ionización química.

En cuanto al proceso de separación de iones, tiene lugar en el analizador que puede ser de cuadrupolo, de trampa iónica o de tiempo de vuelo. Por último la detección se da cuando los fragmentos ionizados y separados llegan al detector.

En este trabajo se empleó un equipo constituido por un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas. En este caso la introducción de la muestra en el espectrómetro de masas se realiza desde el final de la columna de separación, con la muestra ya volatilizada. La fuente de ionización en este caso fue de impacto electrónico, una fuente de fase gas, cuya función es ionizar las moléculas por medio de un haz de electrones de elevada energía procedentes de un filamento incandescente y acelerados por medio de una diferencia de potencial. Las moléculas procedentes del sistema de introducción de muestras atraviesa el haz de electrones de elevada energía y al colisionar se pueden dar varios procesos tales como la pérdida de uno o varios electrones, la disociación de la molécula o la captación de un electrón. Es la pérdida de un electrón el proceso primario más probable, que da como resultado la formación de un ion radical denominado ion molecular de masa igual al peso molecular de la especie. Posteriormente este ion molecular puede fragmentarse de distintas maneras como consecuencia del exceso de energía comunicada, dando lugar a un espectro característico que recoge esos fragmentos.

## Objetivos y plan de trabajo, justificación de la pertinencia del mismo

El objetivo del trabajo es la obtención de un perfil preciso de los ácidos grasos presentes en una determinada línea celular empleando para ello un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, con el fin de caracterizar qué ácidos grasos se encuentran en ese tipo de células, así como en qué proporción y forma. Se obtiene así datos de la composición lipídica de la célula en un estado basal para cotejarlos con la información obtenida de igual manera tras estimular a la célula. De esta manera es posible comprobar qué variaciones relevantes en la proporción y estado de los ácidos grasos se ha producido en la célula y en qué medida. Así puede obtenerse información sobre la función de esos lípidos en la célula como intermediarios en reacciones de importancia biológica.

Otro frente de interés es la posible función de ciertos ácidos grasos como señalizadores para la activación de procesos de generación de gotas lipídicas. Las gotas lipídicas (LD) son orgánulos presentes en prácticamente todos los tipos de células. Consisten en una partícula de superficie esférica formada por una monocapa de fosfolípidos con inclusiones proteicas. En su interior encierra lípidos neutros, en su mayoría triacilglicerol y ésteres de colesterol. Habitualmente se ha considerado que su función principal era como almacén de energía, sin embargo se ha demostrado que poseen una mayor relevancia al estar relacionadas con procesos de regulación de la célula y con el desarrollo de ciertas enfermedades [17-21]. Para conocer como varía la composición de estas LD en función del estímulo al que se exponga a la célula será necesario realizar un análisis de la composición lipídica de éstas, y por lo tanto el método empleado para este análisis ha de ser capaz de diferenciar perfectamente las especies presentes.

Los ácidos grasos libres presentan muchas dificultades para ser analizados por GC/MS ya que son poco volátiles y la fragmentación daría espectros poco claros para la determinación, además de ser reactivos por lo que podrían degradarse con facilidad, por ejemplo oxidándose al aire. Teniendo esto en cuenta y que en la célula los ácidos grasos se encuentran unidos a residuos tales como glicerol o colesterol, dando lugar a compuestos más complejos, se lleva a cabo un proceso de transmetilación que obtiene como productos los ésteres metílicos de los distintos ácidos grasos presentes en la muestra. La finalidad de esta derivatización es

separarlos de estos residuos y obtener compuestos de mayor volatilidad y estabilidad química. Los ésteres metílicos son compuestos de menor reactividad y de mayor volatilidad, lo cual facilita la conservación de la muestra así como su separación por cromatografía de gases.

Los FAMES permiten la identificación de especies por comparación con tiempos de retención de estándares analíticos puros de los compuestos a analizar. En el caso de no poder resolver el análisis cromatográficamente se procede al estudio del espectro de fragmentación registrado por el detector de masas.

Se considera que los metil esterres de los ácidos grasos no permiten la identificar la posición exacta de los dobles enlaces en la cadena [22], cuando son menos de tres instauraciones, debido en gran parte a la capacidad de migración del par de electrones durante la ionización.

Con el objetivo de subsanar este problema y poder distinguir entre isómeros posicionales, se recurre a compuestos capaces de estabilizar la carga y así obtener más información del espectro.

En esta línea se plantean distintas posibilidades de derivatización de los ácidos grasos o los esterres metílicos de éstos a compuestos con nitrógeno, dada la capacidad de este de estabilizar la distribución de cargas. En la bibliografía consultada se recogen diferentes derivatizaciones que permitirían diferenciar isómeros posicionales, entre las cuales para la realización de este trabajo se ha elegido la síntesis de dimetiloxazolininas a partir de los FAMES [23-28]. Para llevar a cabo esta derivatización se consultaron varias propuestas, la mayoría de las cuales suponen reacciones que requieren condiciones agresivas de reacción. Esto se traduce en un peor resultado en el análisis por GC/MS, por ello en este experimento se eligió el protocolo descrito por Svetashev [26], protocolo de síntesis de DMOX que parte de las FAMES y presenta reacciones a baja temperatura. Además permite un doble análisis cuantitativo como FAMES y cualitativo como DMOX.

Con esta segunda derivatización se busca resolver aquellos picos del cromatograma que por la existencia de especies que coeluyen no pueden atribuirse a una determinada especie. Es el caso de ciertos isómeros del ácido palmitoleico cuyos picos se solapan o coeluyen, de manera que no puede determinarse exactamente de qué isómeros de posición se tratan ni en qué proporción se encuentran.

El plan de trabajo será, enumerado por etapas, el siguiente:

- Obtención de la muestra: cultivo de la línea celular en el laboratorio
- Tratamiento de la muestra:
  - Cantidad de muestra tomada
  - Lisado de las células de la muestra
  - Determinación del contenido en proteínas de la muestra
  - Extracción de lípidos de la matriz biológica
  - Separación de las clases de lípidos en función de su Rf, su pertenencia a un tipo u otro de estructura dentro de la célula
  - Derivatización como FAMES
  - Derivatización como DMOX
- Análisis por GC/MS
  - Análisis muestras como FAME
  - Análisis de patrones como FAMES
  - Derivatización de patrones y muestras a DMOX
  - Análisis patrones como DMOX
  - Análisis muestras como DMOX

## Materiales y métodos

### 1. Materiales

#### 1.1. Cultivo celular

Células RAW264.7 *American Type Culture Collection (ATCC)*.

Medio DMEM de *Lonza*

Suero fetal bovino inactivado por choque térmico (FBS<sub>i</sub>) de *Gibco*

L-glutamina de *Gibco*

Penicilina de *Gibco*.

Estreptomicina de *Gibco*.

DMSO extrapuro de *Scharlab*

Frascos de cultivo celular de *BD Biosciences*

Raspadores de células de *BD Biosciences*

#### 1.2 Disolventes orgánicos y reactivos líquidos

##### 1.2.1 Determinación del contenido en proteínas

Albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos y endotoxinas de *Sigma-Aldrich*

Reactivo Bradford Bio-Rad Protein Assay de *Bio-Rad*

##### 1.2.2 Extracción, separación y análisis de lípidos

Agua MilliQ ultrapura de *Millipore*

Cloroformo de calidad HPLC de *Thermo Fischer*

Metanol de calidad HPLC de *Thermo Fischer*

*n*-Hexano de calidad HPLC de *Sigma-Aldrich*

Dietileter de *Scharlab*

Ácido acético glacial de *Scharlab*

Acetona extrapura de *Scharlab*

KOH en metanol anhidro, 0.5 M (preparado por pesada de KOH de *Scharlab* disuelto en metanol de calidad LC/MS de *Thermo Fischer*)

### 1.2.3 Derivatización de los lípidos

Metanol anhidro 99,8% de *Sigma Aldrich*

Ácido clorhídrico 35% (p/p)

Ácido clorhídrico en metanol 3N de *Sigma Aldrich*

2-amino-2-metil-1-propanol de *Sigma Aldrich*

Metóxido de sodio de *Sigma-Aldrich*

Anhídrido trifluoroacético de *Sigma Aldrich*

Benceno extrapuro de *Scharlab*

Propionato de metilo de *Sigma Aldrich*

### 1.3 Gases

Nitrógeno extrapuro de *Air liquide*

Helio extrapuro de *Air liquide*

Argón extrapuro de *Air liquide*

Dióxido de carbono extrapuro de *Air liquide*

### 1.4 Lípidos

#### 1.4.1 Estándares internos para espectrometría de masas

<b>Patrones internos empleados</b>			
<b>Para identificar</b>	<b>Especie</b>	<b>nmol/muestra</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Fosfolípidos</b>	1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina	6	Sigma Aldrich
<b>Diglicéridos</b>	1,2 diheptadecanoil-sn-glicerol	5	Sigma Aldrich
<b>Triglicéridos</b>	1,2,3 triheptadecanoil-sn-glicerol	5	Sigma Aldrich
<b>Ésteres de colesterol</b>	Colesteril erucato	10	Sigma Aldrich

Tabla 2. Relación de patrones internos empleados para la cuantificación posterior, junto con la cantidad empleada y la procedencia

#### 1.4.2 Patrones para la separación por TLC

<b>Patrones para la separación por TLC</b>		
<b>Para identificar</b>	<b>Especie</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Fosfolípidos</b>	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina	Sigma Aldrich
<b>Diglicéridos</b>	1,2 dioleil-sn-glicerol	Sigma Aldrich
<b>Triglicéridos</b>	1,3 palmitoil-2-sn-oleoilglicerol	Sigma Aldrich
<b>Ésteres de colesterol</b>	Colesteril erucato	Sigma Aldrich

Tabla 3. Relación de patrones empleados para la separación por TLC, junto con su procedencia.

#### 1.4.5 Estándares de calibración en espectrometría de masas

Mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos de *Supelco*

Ácido cis-7- hexadecenoico metil éster de *Larodan*

Ácido cis-6- hexadecenoico metil éster de *Larodan*

Ácido cis-11- hexadecenoico metil éster de *Larodan*

Ácido trans-9- hexadecenoico metil éster de *Larodan*

## 2. Equipos

### 2.1 Cromatografía de gases/espectrometría de gases

Cromatógrafo de gases Agilent 7890 acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5975C de impacto electrónico (EI, 70eV), equipado con un inyector automático Agilent 7693.

Columna: Agilent DB23 (60mx250µm diámetro interno x0.15µm de espesor de película) cuya fase estacionaria es de [(50%-cianopropil)-metilpoloxilosano].

Software de control y análisis de datos: Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation.

### 2.2 Medida de absorbancia

Espectrofotómetro Eppendorf de *Biophotometer plus*

### 2.3 Balanza de precisión

Explorer Pro de *Ohaus*

### 2.4 Evaporación de disolventes

Concentrator 5301 de *Eppendorf*

### 2.5 Reacciones a temperatura controlada

Baño con agitación SW22 de *Julabo*

### 3. Cultivo celular

Para este trabajo la línea celular elegida fue RAW264.7, una línea celular de tipo macrófago, proveniente de tejido tumoral de ratón, de un tumor inducido por el retrovirus de leucemia murina de Abelson. Las RAW264.7 han sido estudiadas extensamente como modelo para el estudio del metabolismo lipídico de la célula [29-32].

Esta línea celular presenta morfología de macrófago y es de tipo adherente. Para su cultivo requieren medio compuesto por: medio DMEM suplementado al 10%(v/v) en suero fetal bovino inactivado por choque térmico (FBS<sub>i</sub>), 2mM de L-glutamina, penicilina 100U/ml y estreptomicina 100µg/ml.

Estos suplementos se conservan a -20°C, en alícuotas preparadas para este uso.

El cultivo se realiza en frascos de cultivo medianos, que permanecen en un incubador a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub>/aire (1:19) humidificada.

El cultivo es un proceso delicado, ya que pueden darse muchas complicaciones que alteren el crecimiento de la población de células, tales como contaminaciones, exceso o defecto de células en el interior del frasco, la diferenciación celular como consecuencia de diferentes estímulos producidos por su manipulación o por la presencia de otras células, así como variaciones en la composición de la atmósfera del incubador, que pueden traducirse en fluctuaciones de la tasa de crecimiento celular.

Dada la susceptibilidad de los cultivos celulares a la contaminación y para prevenir cualquier alteración en la composición de las células cultivadas, todo el proceso de manipulación de los cultivos se realizan en campanas esterilizadas y con material estéril de un solo uso.

El proceso de cultivo celular es el siguiente:

En primer lugar para cada tipo de célula se utiliza un medio diferente, el que reúna las condiciones óptimas para que la población celular crezca en cultivo. En el caso de las células empleadas para este experimento, RAW264.7 se emplea medio completo DMEM, con suero fetal bovino inactivado que aporta los nutrientes necesarios a la célula y antibióticos para reducir la susceptibilidad de las células a contaminación.

Las RAW264.7 son células de tipo adherente, esto es, se disponen en el interior del frasco en capas unidas íntimamente a la pared de éste, disponiéndose inicialmente en una monocapa sobre ésta. Requieren estar en todo momento cubiertas por el medio.

En segundo lugar se realiza el sembrado de las células iniciales del cultivo, para ello se parte de una alícuota de células criopreservada a  $-180^{\circ}\text{C}$  en congelador de nitrógeno líquido, con 5% (v/v) dimetil sulfóxido (DMSO) extrapuro en medio de cultivo para evitar la formación de cristales de hielo a tan baja temperatura. El DMSO es tóxico para las células, por lo que tras descongelar las células es preciso eliminarlo convenientemente. La alícuota descongelada se trasvasa, a un tubo de centrifugado Falcon, y, con pipeta estéril se añaden 5ml de medio gota a gota sobre ésta. A continuación se centrifuga a 1300 rpm durante 5` con el fin de eliminar el DMSO y células muertas que quedan en el medio, obteniendo un pellet en el fondo, correspondiente a las células. Se elimina el sobrenadante con pipeta y se resuspende el pellet con medio.

En tercer lugar la solución obtenida se transfiere en su totalidad al frasco de cultivo, se añade medio hasta el volumen final conveniente para el número de células estimado en la alícuota y se mantiene en el incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para células RAW264.7 se ha estimado por medio del seguimiento del crecimiento de varios cultivos a distintas concentraciones, que el intervalo de concentraciones en los que el cultivo es óptimo, ya que presenta una tasa de crecimiento mayor y más estable, se sitúa entre las  $2 \cdot 10^5$  y  $1.2 \cdot 10^6$  células/ml de medio.

Las RAW264.7 requieren para su recuento un proceso de separación de la pared del frasco de cultivo, este proceso puede llevarse a cabo bien con tripsina que interfiere químicamente con las uniones célula-pared, o bien raspando mecánicamente la superficie del frasco de cultivo, proceso más agresivo que debe realizarse con cuidado ya que puede afectar al estado de las células.

El recuento de las células se realiza empleando una cámara de Neubauer, un dispositivo de vidrio con un patrón sobre el que se coloca un vidrio cubre y se deposita la muestra de células. El sistema se coloca en el microscopio, se cuentan las células de los cuadrantes de la cámara y se extrapola el recuento al volumen total del frasco de cultivo. Esta medida da un valor aproximado. Para facilitar el proceso de contaje puede usarse Trypan Blue, una solución de tinción que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana tiñéndolas, permitiendo un contaje más fiable.

Las células tumorales crecen indefinidamente, por lo que para mantener la concentración óptima para su crecimiento será necesario realizar diluciones, con el fin de mantener un stock de células en buenas condiciones.

#### 4. Análisis del contenido total de proteínas: Método Bradford

Para la cuantificación de proteínas en la muestra se siguió el protocolo Bradford de análisis de proteínas [33]. En primer lugar se tomó una muestra correspondiente a  $6 \cdot 10^6$  células.

Para ello, partiendo del frasco de cultivo de entre el 70 y el 80% de confluencia, y habiendo comprobado que el estado de las células es el adecuado en el microscopio, se procede al raspado mecánico de las células adheridas a la pared del frasco, con un raspador de células estéril, quedando las células suspendidas en el medio. Se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión de células y se contaron en una cámara de Neubauer. A partir del dato de concentración de células así obtenido se calcula el volumen de solución equivalente a los  $6 \cdot 10^6$  células requeridos para el experimento, se pipetea dicho volumen en un Falcon y se centrifuga 5' a 1500rpm. Dado que se busca determinar la concentración total de proteínas en la muestra el primer paso es asegurar el lisado de las células, para ello, sobre el pellet obtenido tras la centrifugación, se añaden 400  $\mu$ l de agua MilliQ a 4°C de manera que por choque osmótico la membrana celular se rompa. Para asegurar el lisado se lleva a cabo un proceso de ultrasonificación. La intensa agitación genera millones de burbujas que al chocar con la membrana la destruyen: proceso de cavitación. Este lisado ha de aplicarse en frío para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicadas pueden romperse incluso enlaces covalentes. En este caso se dieron 2 pulsos de 18s de ultrasonidos al 26% de intensidad en un equipo de 20kHz.

El análisis cuantitativo se lleva a cabo con una línea de calibrado de un patrón externo, en este caso una proteína, albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos y endotoxinas.

Para la cuantificación de la proteína se llevó a cabo el método Bradford para análisis de proteínas, un método colorimétrico basado en el cambio del máximo de absorbancia de 465 a 594 nm que sufre el azul de Coomassie (G-250) al unirse a las proteínas en medio ácido. La solución vira de un color pardo a un azul intenso. Las medidas se realizaron a 595nm en el espectrofotómetro.

Se emplea el reactivo Bradford Bio-Rad Protein Assay que consiste en una disolución que contiene azul de Coomassie. El valor de absorbancia obtenido es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

En primer lugar se diluye la disolución Bradford comercial de acuerdo a:

$$V_{Bradford} = 0,2xV_f$$

$$V_{agua\ MilliQ} = 0.7xV_f$$

Siendo  $V_f = n^{\circ}total$  (muestras + puntos de la recta patrón) + 2

Para la recta patrón se prepararon alícuotas a las siguientes concentraciones:

$\mu\text{l BSA}$	Bradford diluido ( $\mu\text{l}$ )	Agua MilliQ ( $\mu\text{l}$ )
<b>0</b>	900	100
<b>1</b>	900	99
<b>3</b>	900	97
<b>5</b>	900	95
<b>7</b>	900	93
<b>10</b>	900	90

Tabla 4. Preparación de los puntos de la recta patrón de BSA.

Las medidas de absorbancia se realizan a 595nm preparándose de igual manera las muestras y las disoluciones para la línea de calibrado. Se obtiene una recta patrón como la representada en la Figura 2, a partir de la cual se obtiene, por extrapolación lineal, el contenido de proteínas de la muestra.

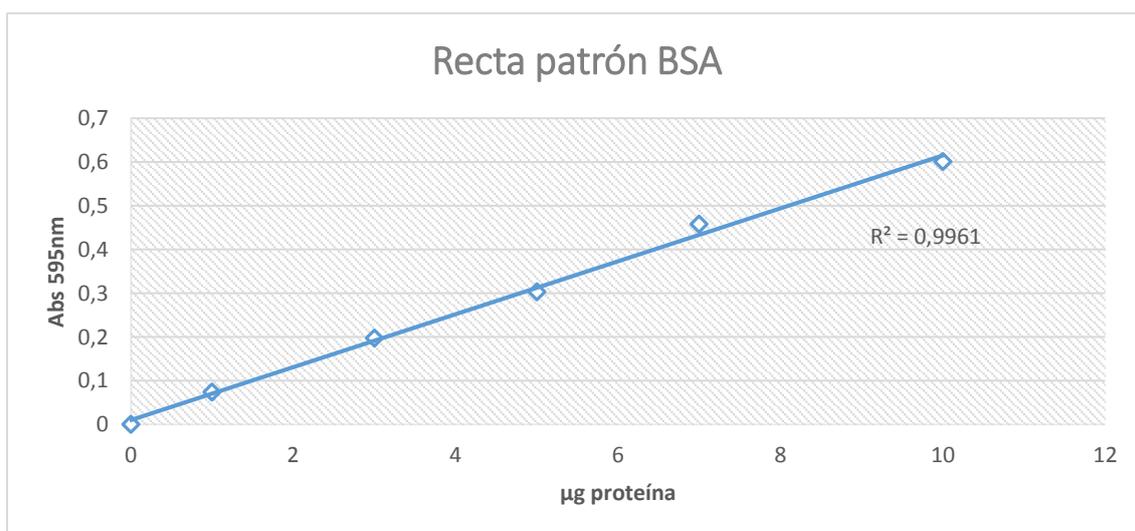


Figura 2. Recta patrón BSA. Relaciona absorbancia y  $\mu\text{g}$  de proteína.

## 5. Adición de patrones internos

Para poder llevar a cabo la cuantificación de los ácidos grasos así como determinar el rendimiento final de los procesos de derivatización se añade un patrón interno a la muestra, que no se encuentre en ésta de forma natural.

Como patrones internos se eligieron los ácidos 17:0 y 22:1n-9, siendo ambos ácidos grasos que no se encuentran en estas células naturalmente. Para introducirlos como patrón interno han de encontrarse constituyendo fosfolípidos, diacilglicerol, triacilglicerol y ésteres de colesterol, con el fin de poder luego calcular el rendimiento del proceso total para cada fracción lipídica por separado.

Se prepara previamente una mezcla de los distintos patrones, para posteriormente añadirlo sobre la muestra de células lisadas.

Los patrones empleados, recogidos en la tabla 2, se añaden sobre la muestra de células lisadas.

Al final del análisis se refiere la concentración final del patrón, calculada gracias a la línea de calibrado de esa especie y al área descrita para ese pico, con la cantidad inicial añadida a la muestra, pudiendo calcular así el rendimiento total del proceso. Posteriormente, teniendo en cuenta el rendimiento del proceso, se calculan las concentraciones iniciales de cada ácido graso en la muestra y se refiere el resultado a la cantidad total de proteínas de la muestra.

## 6. Extracción de lípidos totales de la muestra: protocolo Bligh & Dyer

Dado que en la muestra están presentes todos los componentes de la célula, se trata de una matriz compleja, de la que solo son relevantes para este experimento los lípidos presentes en la célula. Por esta razón se procede a la extracción de los lípidos de la muestra, siguiendo el protocolo Bligh & Dyer [34], basado en el carácter anfipático de los lípidos realizando procesos de extracción líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad.

Partiendo de 150 µl de la muestra de células lisadas, con los patrones internos ya añadidos, tomando inicialmente  $6 \times 10^6$  de células y de contenido en proteínas conocido, se inicia la extracción en un eppendorf de 1,5 ml añadiendo 3.75 volúmenes de una mezcla cloroformo/metanol (C/M) 1:2 (v/v), y se agita con vortex vigorosamente.

A continuación se añaden, 1,25 volúmenes de cloroformo y 1,25 volúmenes de agua MilliQ siendo la proporción final  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  1:1:0,9 por volumen. Se agita enérgicamente en vortex durante 3' para extraer los lípidos de la fase acuosa a la orgánica y se centrifuga para separar ambas fases. La centrifugación se realizó a 4°C durante 5' a 12000 rpm.

Se obtienen dos fases, una acuosa arriba y otra orgánica, abajo. Se extrae la fase clorofórmica y se transfiere a un tubo eppendorf de 1,5ml.

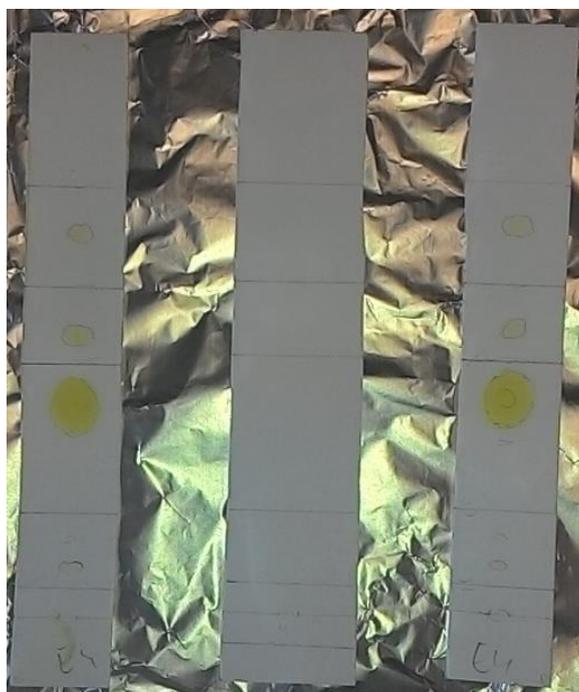
Se evapora el cloroformo y se procede a una segunda extracción de la fase acuosa con 2 volúmenes de cloroformo, de la misma manera que en el caso anterior y finalmente se reúnen la fase extraída con el volumen extraído anteriormente. En este punto las muestras pueden conservarse a -20°C o evaporar por centrifugación a vacío hasta sequedad y continuar con el proceso.



Por otra parte en una cámara de desarrollo se preparó la fase móvil del sistema cromatográfico, hexano/dietileter/ácido acético (70:30:1). Es importante asegurar que la atmosfera de la cubeta de desarrollo está saturada por el vapor de la fase móvil. Para ello se introdujo papel de filtro en la cubeta y se dejó el sistema equilibrándose durante 2 horas.

Tras este tiempo, se introduce la placa en la cámara de desarrollo homogeneizado, y se mantiene hasta que finalice el ascenso de la fase móvil por la misma. En este momento se extrae con pinzas la placa de la cámara de desarrollo, se seca al aire y se cortan los extremos correspondientes a los patrones pinchados. Estos se introducen en una cámara de revelado que contiene  $I_2$  sólido en equilibrio con su vapor. Tras revelarse se marcaron las manchas correspondientes con lápiz y se dejaron al aire con el fin de que el yodo depositado en la placa sublime y se elimine de ésta.

Finalmente se colocan ambos extremos a los lados del tramo central de la placa inicial, correspondiente al total de la muestra, se delimitan las zonas de la placa de cada fracción lipídica con lápiz y se procede a raspar la sílice de éstos sectores con ayuda de una espátula. Los fosfolípidos no migran de la posición inicial de pinchado, el resto avanzara tanto más en la placa cuanto menor sea su polaridad (figura 4).



*Figura 4. Placa ya revelada con ambos extremos recortados que permiten delimitar el avance los distintos lípidos en la fase estacionaria.*

La sílice raspada se introduce en un tubo eppendorf y se lleva a cabo la extracción de los lípidos de la sílice como sigue:

En el caso de los fosfolípidos se hace una primera extracción con C/M 1:2, se añade 1 ml, se agita con vortex 3' y se centrifuga 5' a 13200 rpm con el fin de que toda la sílice quede en el fondo del tubo eppendorf. Se extrae la fase orgánica y se trasvasa a un nuevo tubo eppendorf. Se realiza una segunda extracción con 1 ml de C/M 1:1 de la misma manera. Se reúnen ambas fases.

Se procede de igual manera para DAG, TAG y CE que en el caso de los fosfolípidos, pero en estos casos la primera extracción se lleva a cabo con C/M 1:1 y la segunda con C/M 2:1.

#### 8. Derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos (FAMES)

Como se explicó anteriormente, los ácidos grasos en la célula se encuentran de diversas formas, unidas por enlace éster a moléculas de glicerol y colesterol entre otras. Por ello y dado que los ácidos carboxílicos no presentan unas cualidades adecuadas para el análisis por cromatografía de gases, se lleva a cabo la derivatización a FAMES de los ácidos grasos de la muestra [36].

Para ello el protocolo seguido es el siguiente:

- Resuspender el extracto seco, obtenido evaporando las muestras de lípidos extraídos de las células anteriormente, con 50  $\mu$ l de C/M 2:1.
- Se trasvasa a un tubo de ensayo de cristal roscado.
- Se inicia la reacción con 0,5 ml de KOH en MeOH anhidro, 0.5 M, se sellan los tubos con parafilm y se mantiene a 37°C y con agitación durante 1 hora en un baño.

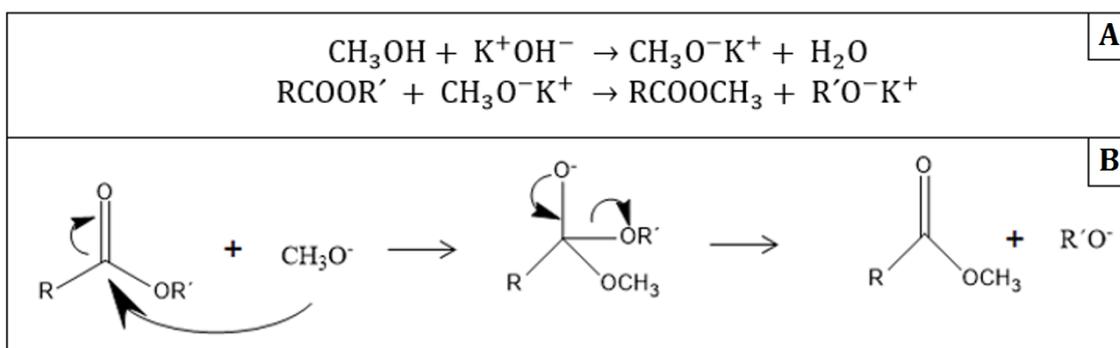


Figura 5. A.- Reacción de transesterificación: en primer lugar el metanol en medio básico da lugar al metóxido potasio. En segundo lugar el metóxido de potasio reacciona con el éster. B.- Mecanismo de la reacción: se corresponde con una reacción de adición nucleofila del metóxido de potasio al carbono carbonílico y la posterior eliminación del grupo OR'.

- Finalizado el proceso, se neutraliza con un volumen de HCl.
- Dada la naturaleza apolar de los ésteres metílicos se extraen con hexano, por duplicado añadiendo 1ml de hexano en frío, agitando en vortex y centrifugando a 13200 rpm, recogiendo la fase orgánica y trasvasándola a un nuevo eppendorf.

### 9. Derivatización de FAMEs a 4,4-dimetiloxazolinas

La derivatización a FAMEs permite separar e identificar la mayoría de las especies de ácidos grasos presentes en la muestra, sin embargo presenta limitaciones para asegurar la posición exacta del doble enlace. Además se considera que los espectros de fragmentación de los metil ester de los ácidos grasos con menos de tres insaturaciones son idénticos por lo que, si dos especies no se separan como FAME por cromatografía (coeluyen) no podría determinarse con precisión la composición de la señal correspondiente. Para poder resolver este problema se plantea una segunda derivatización, que permita identificar de forma precisa la posición de los dobles enlaces a partir de los espectros de fragmentación obtenidos. En este trabajo, como se explicó anteriormente, se optó por la síntesis de dimetiloxazolinas a partir de los ester metílicos de los ácidos grasos extraídos de las células cultivadas.

Para ello se siguió el protocolo de preparación de 4,4 dimetiloxazolinas de ácidos grasos poliinsaturados de Svetashev [26], descrito a continuación por etapas:

- Partiendo de la muestra de FAMES, se evapora el hexano hasta sequedad y se resuspende con 120  $\mu$ l de una disolución benceno/2-amino-2-metil-1-propanol al 50% en volumen.
- La mezcla se transfiere a un bote ámbar, ya que el intermedio de reacción, las 2 acilmetilpropanolamidas son fotosensibles.
- A continuación se añaden 20  $\mu$ l de metóxido de sodio, base que supondrá el inicio de la reacción.
- Se hace atmósfera de  $N_2$  y se mantiene durante 16h a 22°C con agitación.
- Finalizado el tiempo de reacción se extraen las 2 acilmetilpropanolamidas con 0,5 ml de agua MilliQ y 0,5 ml de hexano/dietileter 9:1(v/v) agitando con vortex 3' y centrifugando a 3000rpm 5'a 16°C. Posteriormente se extrae una segunda vez con 0,5 ml de hexano/dietileter.
- Se reúnen las fases extraídas y se evapora el disolvente hasta sequedad por centrifugación a vacío.
- Se resuspende el extracto seco con 150  $\mu$ l de anhídrido trifluoroacético (TFAA), que promueve el cierre del ciclo y la formación de la oxazolina final.
- Se trasvasa a un tubo de ensayo roscado, se hace atmosfera inerte y se deja reaccionar por 45 min a 50°C en un baño con agitación.
- Finalizado el proceso se evapora el TFAA con chorro de  $N_2$ , se añade 1ml de agua y 1 ml de hexano con el fin de arrastrar los reactantes sobrantes y separarlos de las DMOX.
- Se lava con hexano por duplicado y puede analizarse ya en el GC/MS.



Figura 6. Proceso de formación de las 4,4 dimetiloxazolinas: en primer lugar al tratar los ésteres metílicos con el AMP y el metóxido de sodio se forman las 2 acilmetilpropanolamidas, y posteriormente el anhídrido trifluoroacético promociona el cierre del ciclo dando lugar a las DMOX.

## 10. Calibrado del equipo

Para poder hacer un análisis cuantitativo exacto se hicieron líneas de calibrado con los FAME comerciales especificados en el apartado de materiales. El intervalo de cantidad de estándar con el que se hicieron las líneas fue desde 1 hasta 25 pmol.

## 11. Análisis FAMEs con GC/MS

La separación de los derivados de ácidos grasos fue llevada por cromatografía de gases empleando para ello el equipo anteriormente descrito en el apartado de equipos.

La rampa de temperatura del proceso queda recogida en la siguiente tabla:

Tiempo carrera (minutos)	Temperatura (°C)
0	50
1	50
6	175
32,67	215
34,67	235
39,67	235

*Tabla 5. Rampa de temperaturas programada para el método de análisis por GC/MS. La rampa de temperaturas es la misma tanto para el análisis de FAMEs como para DMOX.*

Se inyecta 1 µl de muestra en modo splitless. El portal de inyección se mantuvo a 250°C. La temperatura de la línea de transferencia entre el final de la columna y la fuente de ionización del espectrómetro de masas se mantuvo a 250°C y el cuadrupolo y la fuente de ionización a 150 y 230 °C respectivamente. Como gas portador se usó helio que se mantuvo a una presión constante de 26.1 psi (experimentando un descenso del flujo introducido en columna a medida que aumenta la temperatura para mantener la presión constante).

La adquisición de datos se inicia tras los primeros 5 minutos después de la inyección, con un doble propósito: no registrar la señal producida por el disolvente de la muestra y proteger el filamento de la fuente de ionización. La identificación fue llevada a cabo en modo TIC (Total Ion Current) y la cuantificación en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM). En el modo TIC se hace un barrido de masas desde  $m/z=0$  a  $m/z=450$ . En este modo de trabajo la señal correspondiente a cada tiempo de retención corresponde a la suma de las señales de todos los iones en el intervalo de  $m/z$  seleccionadas que llegan al detector en ese momento.

La identificación de cada compuesto se lleva a cabo por comparación con los tiempos de retención de los 44 estándares de FAMEs empleados para el calibrado del equipo y con la base de datos MS library spectra del NIST (National Institute of Standards and Technology).

La identificación se lleva a cabo también con el espectro de masas obtenido, detectando los iones característicos producidos por las FAMEs bajo impacto electrónico, ampliamente descritos en la bibliografía [23, 25, 26, 37, 38] y recogidos en la tabla 5.

Por otro lado la cuantificación se lleva a cabo en el modo SIM, empleando para cada analito de interés los iones fragmentos característicos, recogidos para FAMEs y DMOX en la tabla 6.

Tipo de ácido graso	Derivado	Fragmentos característicos	Fragmentos característicos
		para identificación (m/z)	para cuantificación (m/z)
<b>Saturados</b>	<i>FAME</i>	74; 87; [M+-29]; [M+-31]; [M+-43]	74; 87
<b>Monoinsaturados</b>	<i>FAME</i>	74; 83; [M+-32]; [M+-74]; [M+-116]	74; 83
<b>Diinsaturados</b>	<i>FAME</i>	67; 81; [M+-31]; [M+-74]	67; 81
<b>Poliinsaturados</b>	<i>FAME</i>	67; 79; 91	67; 79; 91
<b>Isómeros del ac.Palmitoleico</b>	<i>FAME</i>	74; 83; 152.2; 194.2; 236.2; 268.1	152.2; 194.2; 236.2; 268.1
<b>Todos</b>	<i>DMOX</i>	113; 126	Solo cualitativo
<b>Isómeros del ac.Palmitoleico</b>	<i>DMOX</i>	113; 126; 166.1; 167.1; 168.1; 180.1; 194.1; 208.1; 222.1; 236.1; 264.1	Solo cualitativo

Tabla 6. Relación de fragmentos característicos de los espectros de fragmentación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos y de sus dimetiloxazolininas correspondientes.

La cuantificación de cada especie de FAME se realizó a partir del dato de la integración del área bajo cada curva del pico cromatográfico correspondiente, información que devuelve el software citado, permitiendo una integración automática del espectro y una integración manual pico por pico.

Con el dato del área obtenido para el patrón interno puede obtenerse la concentración de patrón final, extrapolando en la línea de calibrado correspondiente. Con este dato y el valor conocido de concentración inicial de patrón se calcula el rendimiento total del proceso.

Así, a partir de los datos de concentración final para cada especie obtenidos a partir del área y las líneas de calibrado se obtiene la concentración final de cada especie, y conociendo el rendimiento total del proceso se calcula la concentración inicial de cada especie.

## Resultados

### Análisis del contenido de ácidos grasos en la muestra de células lisadas como FAME por GC/MS

#### Contenido total de ácidos grasos

En primer lugar se analizaron muestras correspondientes al contenido total de lípidos transmetilados de la célula sin hacer separación previa por clases de lípidos, obteniéndose:

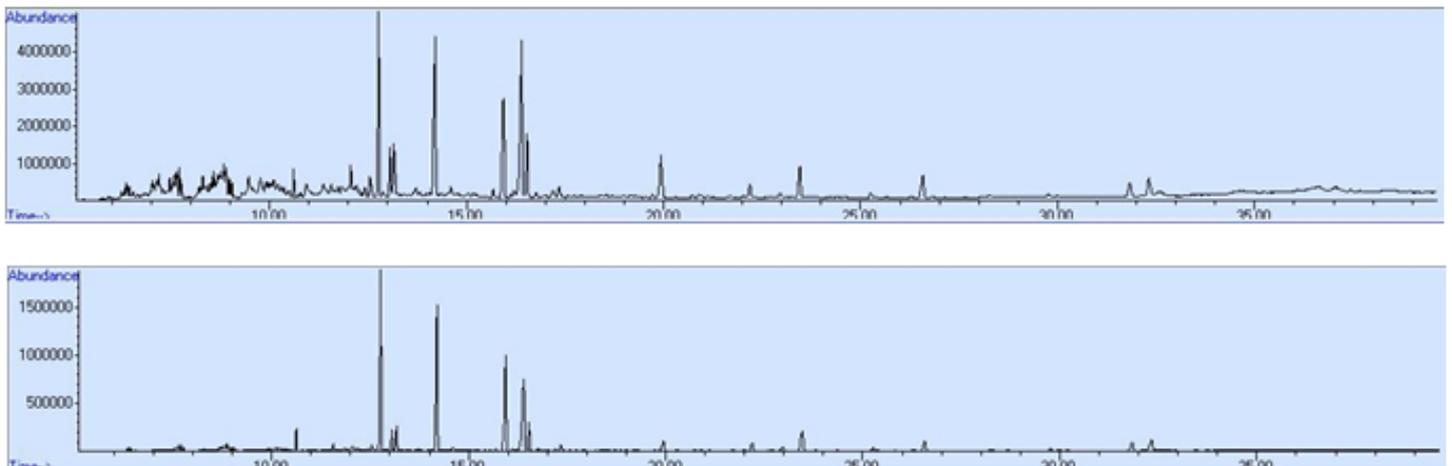


Figura 7. Cromatogramas obtenidos tras el análisis de la muestra correspondiente al contenido total de lípidos de la muestra de células inicial como ésteres metílicos. El cromatograma superior corresponde al modo TIC, el de abajo a modo SIM.

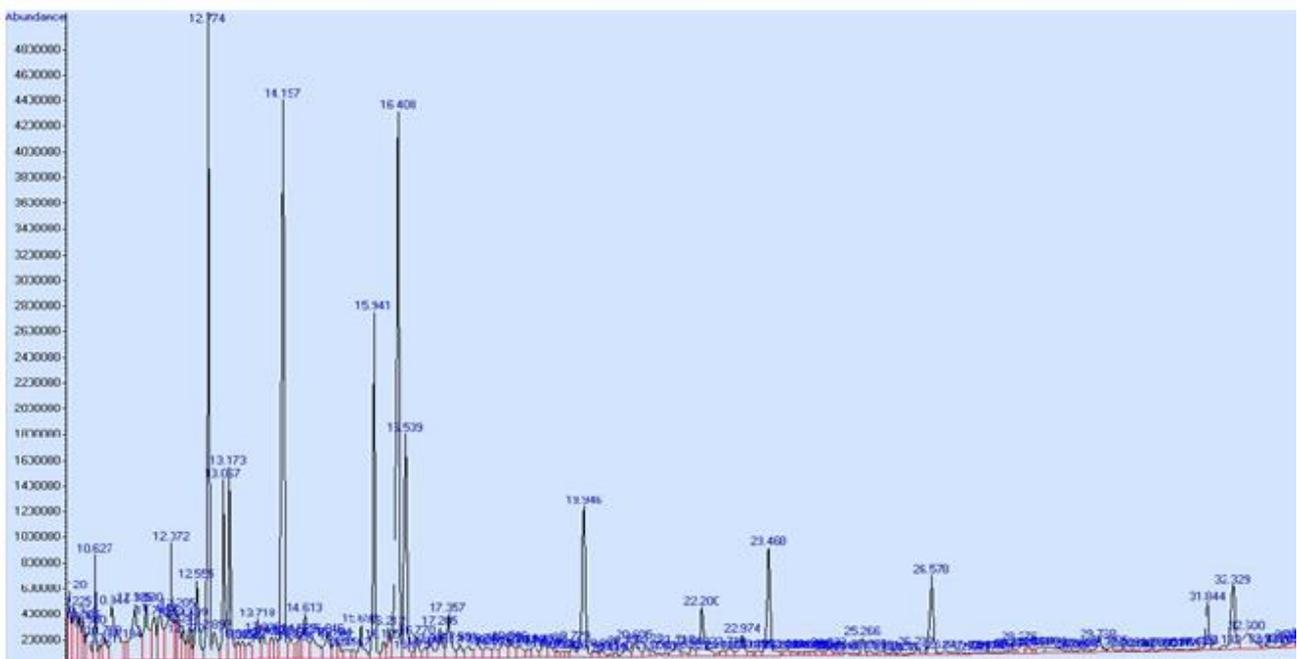


Figura 8. Cromatograma integrado y ampliado.

Cotejando los tiempos de retención observados en la figura 8 con la línea de calibrado realizada más próxima al momento del análisis, se asignó cada pico al ácido graso correspondiente.

A partir de los datos obtenidos se elabora un perfil de los ácidos grasos presentes en la muestra, referidos al contenido total de proteína de la muestra, siendo:

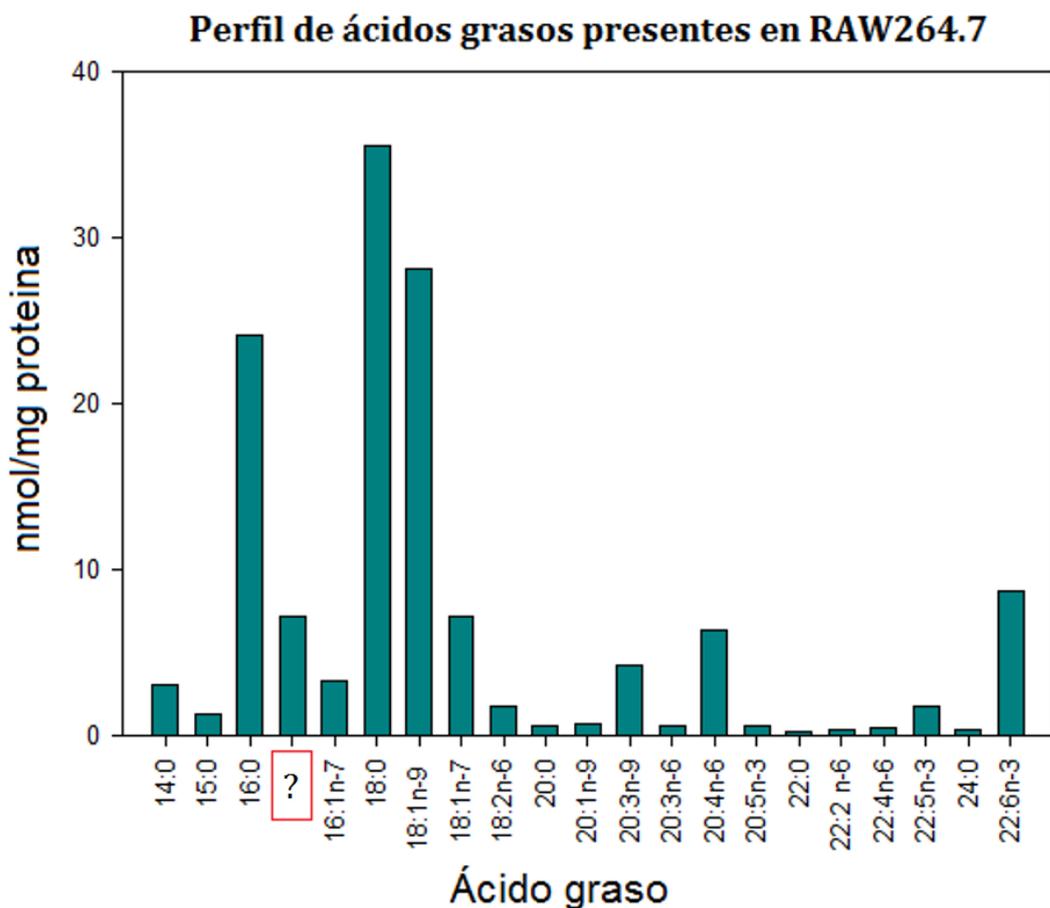


Figura 9. Perfil de ácidos grasos presentes en la muestra de células correspondientes a la línea celular RAW264.7. Se representó como ? la señal obtenida para un tiempo de retención de 13.059, al no poderse determinar a qué especie corresponde.

La mayoría de los picos obtenidos pueden caracterizarse sin problemas por comparación de los tiempos de retención, sin embargo, el pico que aparece a 13,059 minutos, no puede ser atribuido a ninguna de las especies empleadas en el calibrado. Observando que el tiempo de retención al que aparece esta entre el correspondiente al palmítico y al palmitoleico y que observando el espectro de fragmentación es claro que se trata de un éster metílico de un ácido monoinsaturado, se atribuye a un isómero posicional del 16:1n-7 del que se han descrito varios. Por lo tanto es necesario determinar de qué especie se trata. Este será a partir de ahora denominado pico problema.

A continuación se realizó el mismo análisis por GC/MS pero de las fracciones lipídicas separadas como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos:

*Análisis fracción de fosfolípidos como FAMES*

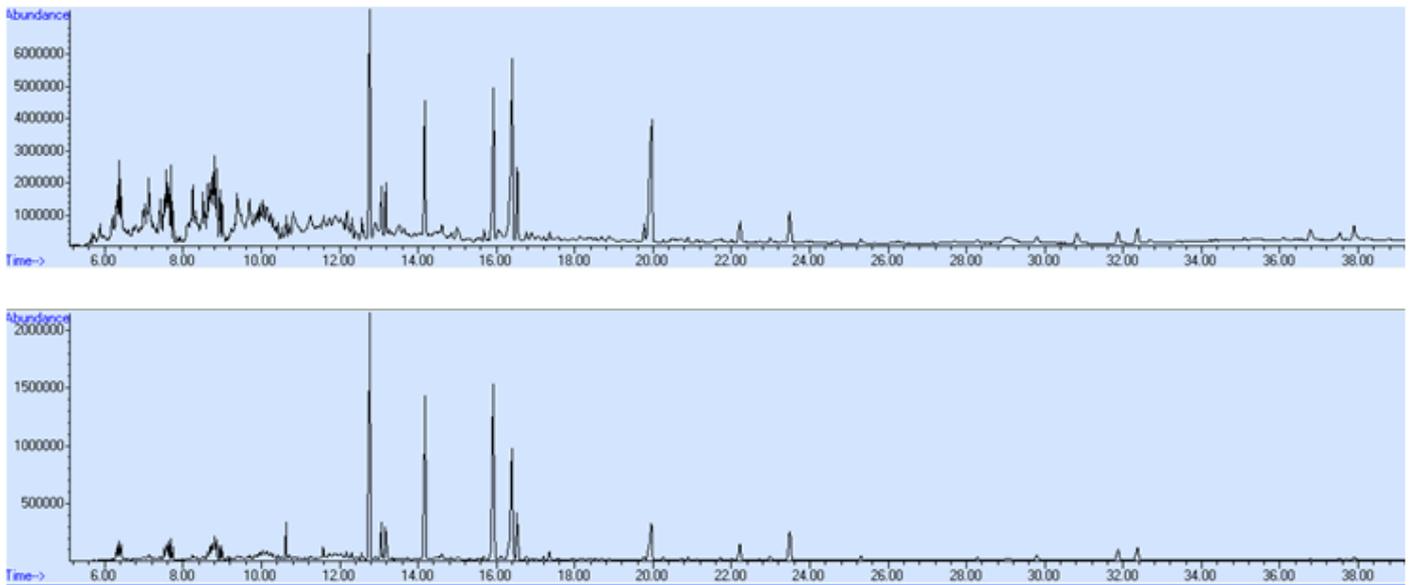


Figura 10. Cromatogramas obtenidos tras el análisis de la fracción de fosfolípidos como FAMES. Arriba en modo TIC, abajo en modo SIM.

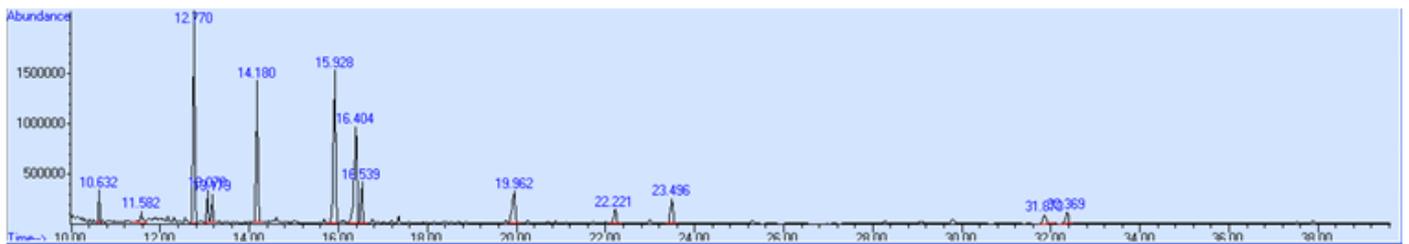


Figura 11. Cromatograma modo SIM integrado

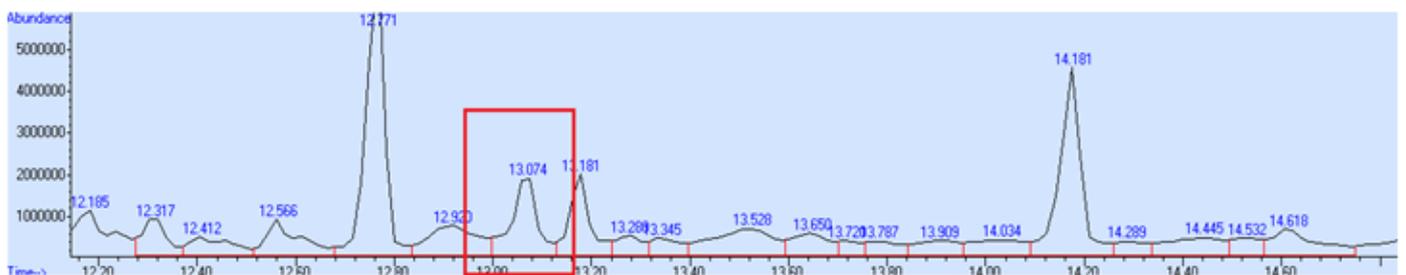


Figura 12. Detalle del pico problema correspondiente a un isómero del ácido 16:1.

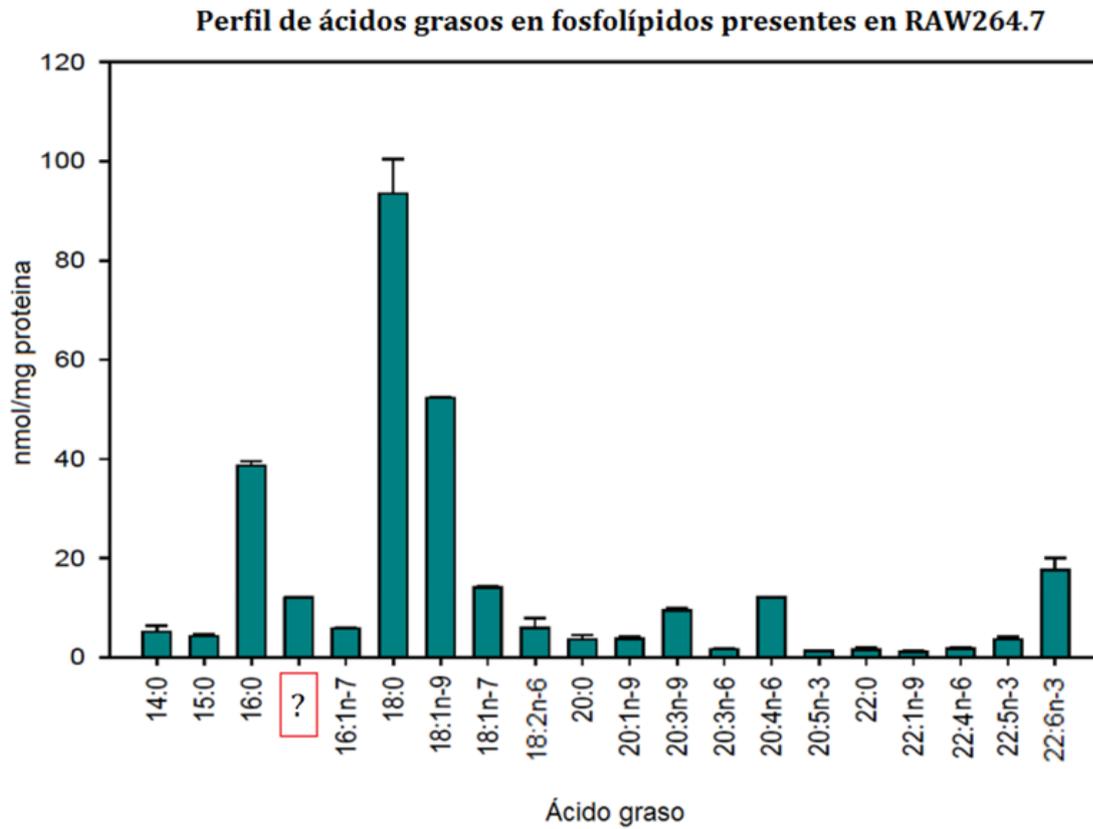


Figura 13. Perfil de ácidos grasos obtenidos para la fracción de fosfolípidos analizada como FAMES representa el resultado de promediar los valores obtenidos para dos muestras, con la correspondiente desviación estándar de ambos resultados.

De los cromatogramas obtenidos (figuras 10 y 11) se obtiene el perfil de ácidos grasos en fosfolípidos presentes en la muestra, volviendo a aparecer el pico problema, esta vez a un tiempo de retención de 13,074 minutos como se refleja en la figura 12.

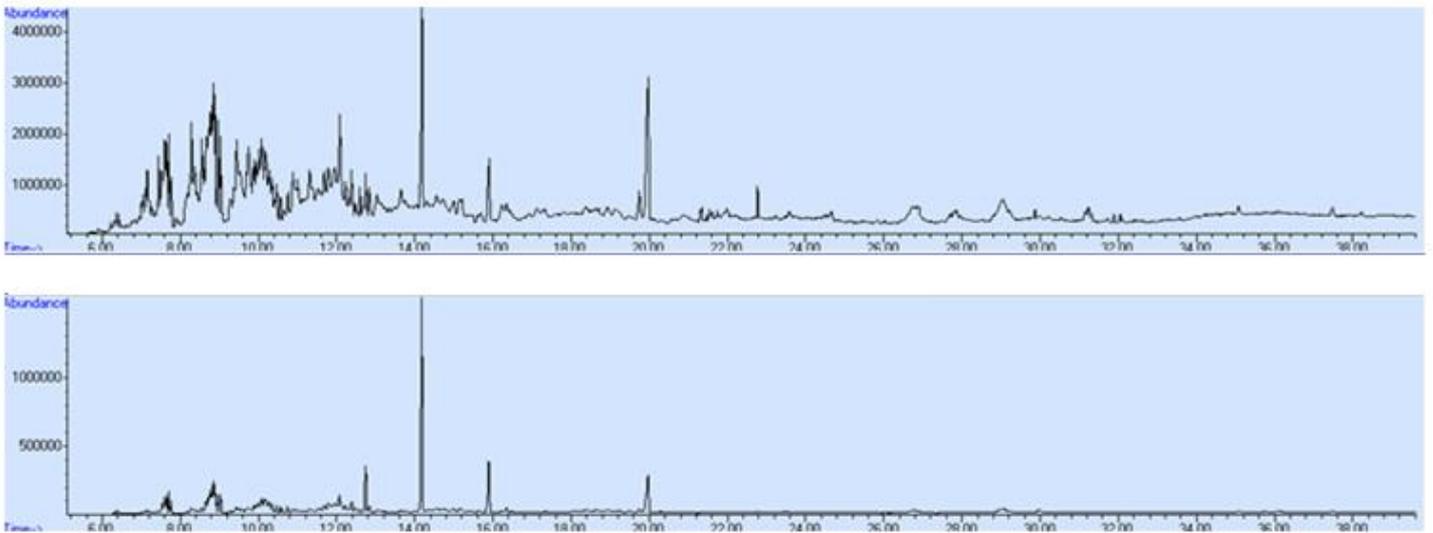
*Análisis fracción diacilglicerol como FAMES*

Figura 14. Cromatogramas correspondientes a la fracción de diglicéridos analizada como FAMES en modo TIC (arriba) y modo SIM (abajo).

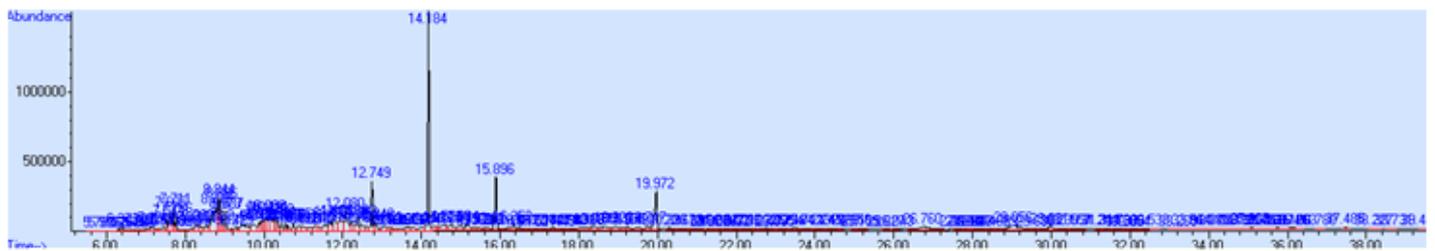


Figura 15. Cromatograma modo SIM integrado.

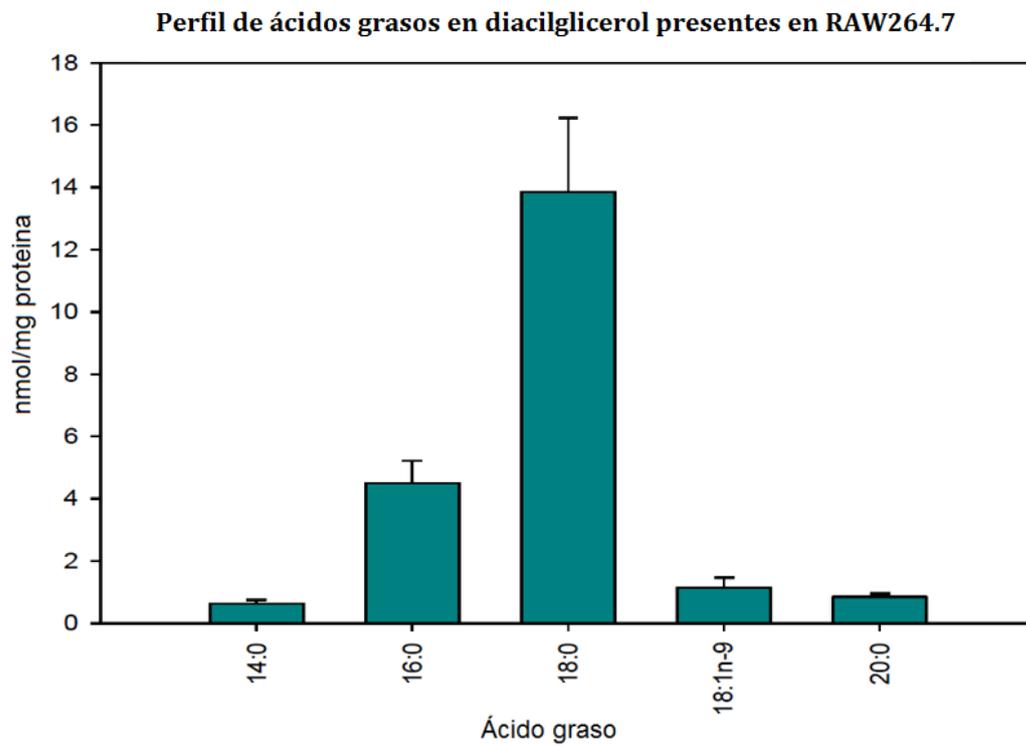


Figura 16. Perfil de ácidos grasos presente en la célula en diacilglicerol, resultado del análisis cuantitativo por duplicado.

Como puede verse en la figura 16, en RAW264.7 el ácido graso mayoritario en diacilglicerol el 18:0 seguido del 16:0.

Análisis fracción de triacilglicerol como FAMES

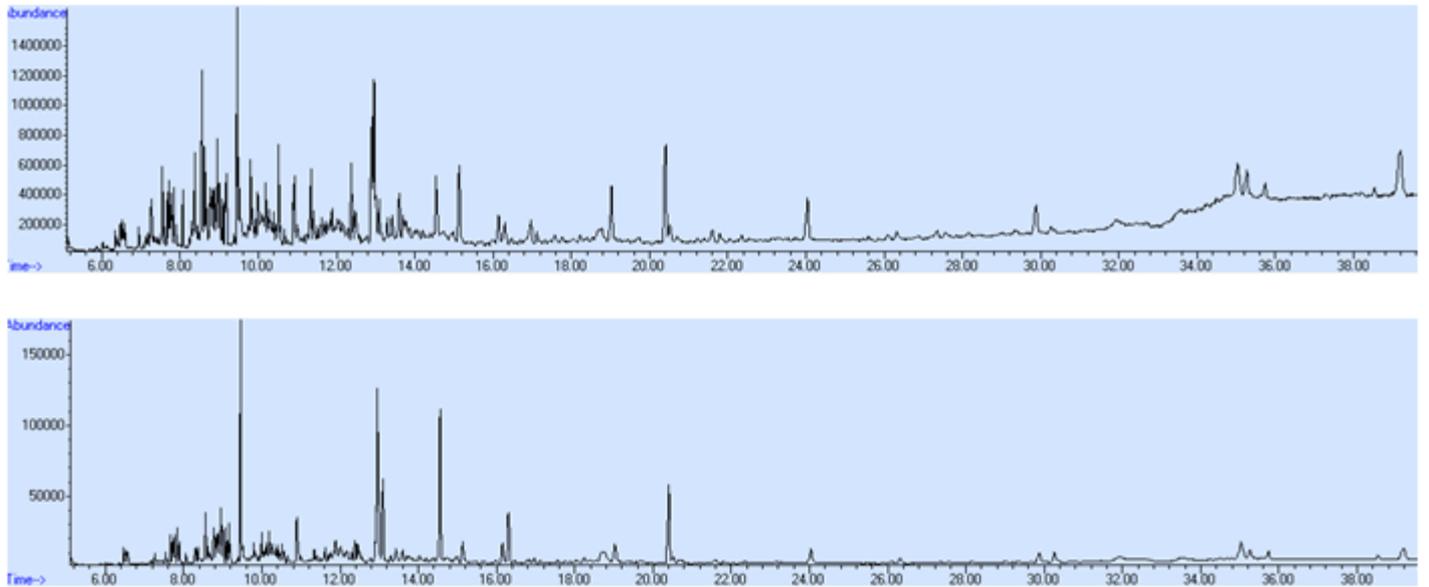


Figura 17. Cromatogramas correspondientes a la fracción de triacilglicerol analizada como FAMES. Modo TIC (arriba) y SIM (abajo).

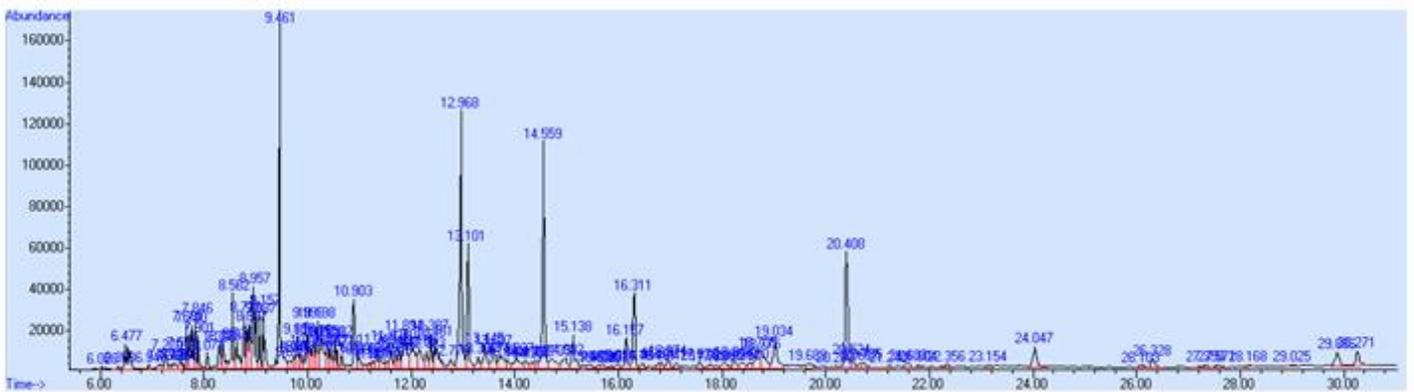


Figura 18. Cromatograma modo SIM integrado.

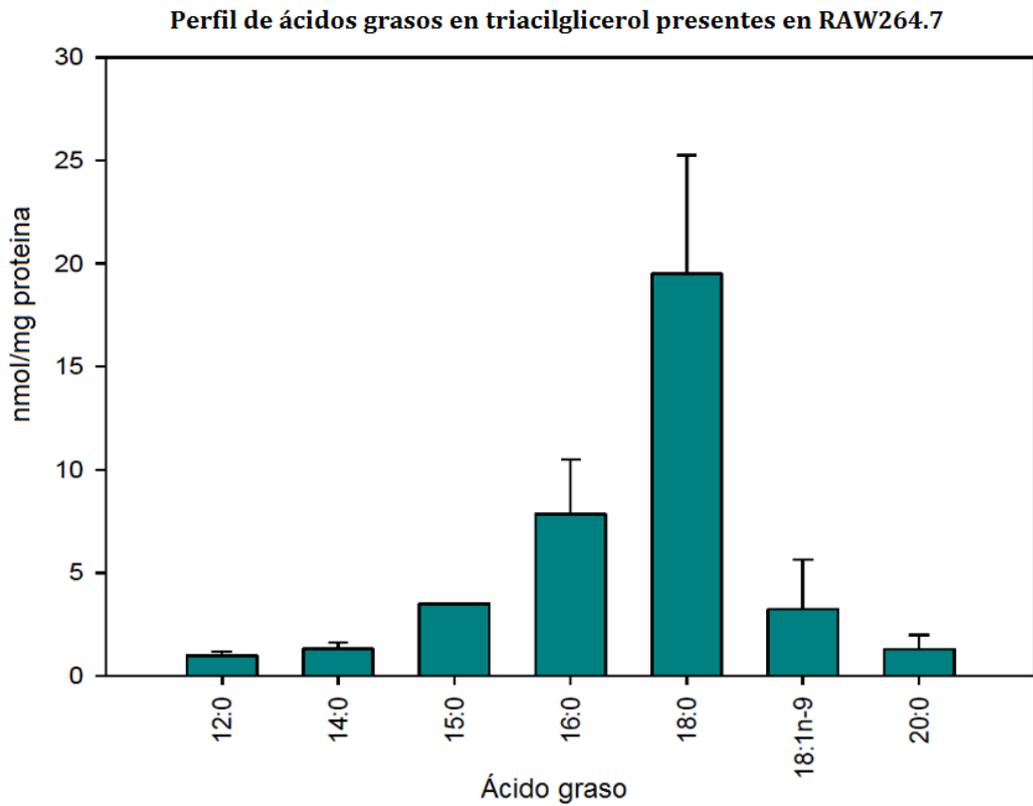


Figura 19. Relación de ácidos grasos presentes en la célula como Triacilglicerol. Correspondiente a datos obtenidos por duplicado.

Al igual que lo observado para la fracción de DAG, en TAG los ácidos grasos mayoritarios son el 18:0 y el 16:0 (figura 19).



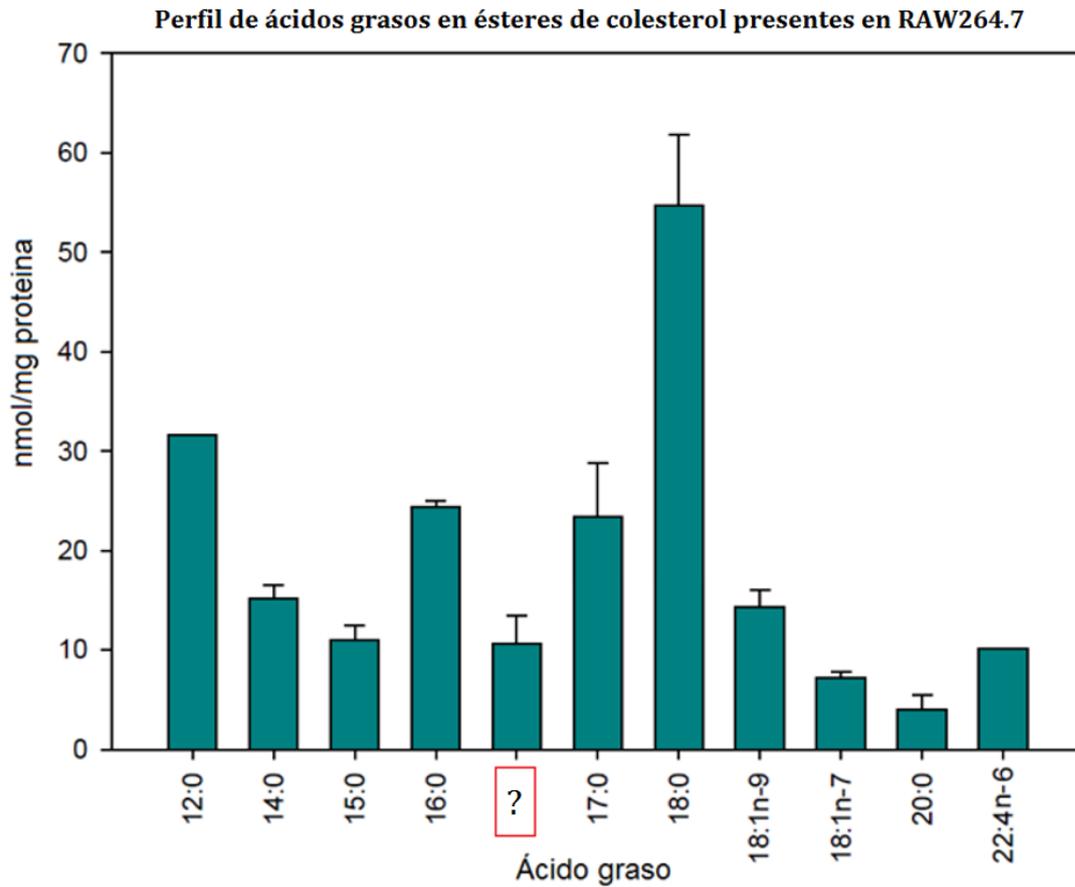


Figura 22. Perfil de ácidos grasos presentes en la célula como ésteres de colesterol. El dato nombrado como 16:1 es un isómero del palmitoleico por determinar.

Como puede observarse en la figura 22, vuelve a aparecer nuestro pico problema asignado a un isómero posicional del 16:1 en una concentración importante en la fracción de ésteres de colesterol.

## Análisis patrones GC/MS como FAMES

Como se ha observado en el apartado anterior, el pico problema, asignado inicialmente a un isómero del 16:1, no puede resolverse a través del cromatograma y dado que con la técnicas cromatográficas empleadas no es posible separar los isómeros de posición de interés, se plantearon diferentes estrategias para abordar el problema:

En primer lugar intentar que los isómeros se separasen como FAMES cromatograficamente variando los parámetros del proceso: cambiar la rampa de temperaturas. Sin embargo, se observó que existía una diferencia de tiempos de retención de apenas 0,004 minutos y por lo tanto no eran distinguibles ambas señales.

La segunda opción fue observar los espectros de fragmentación de los isómeros problema como FAMES con el fin de detectar fragmentos característicos que permitan determinar inequívocamente de que especie se trata. En esta línea se analizaron patrones comerciales de los isómeros del 16:1 de interés, descritos a continuación:

### Ácido 16:1n-9

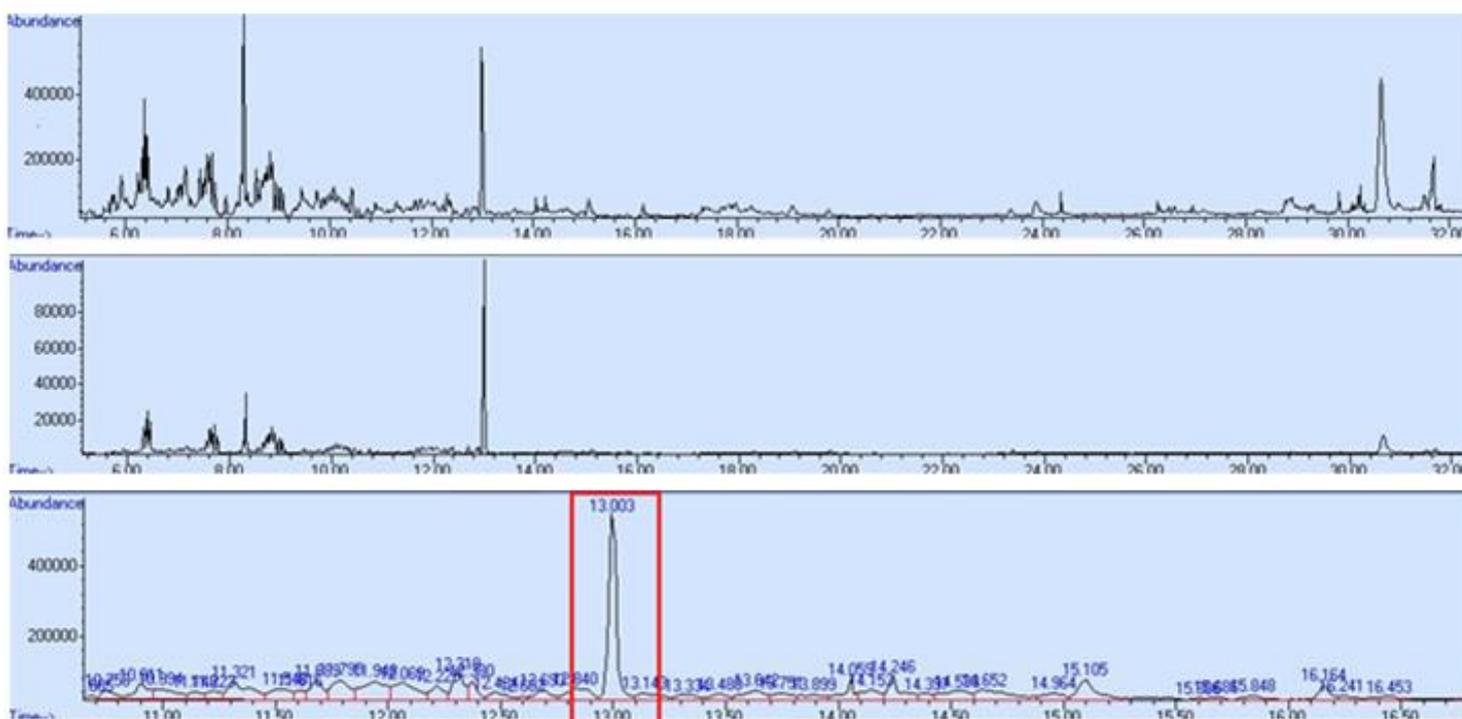


Figura 23. Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1n-9 como FAME. La señal aparece a un tiempo de retención de 13,003 minutos. De arriba a abajo: cromatograma modo TIC, modo SIM y modo SIM integrado destacando el pico correspondiente al estándar analizado.

Ácido 16:1n-10

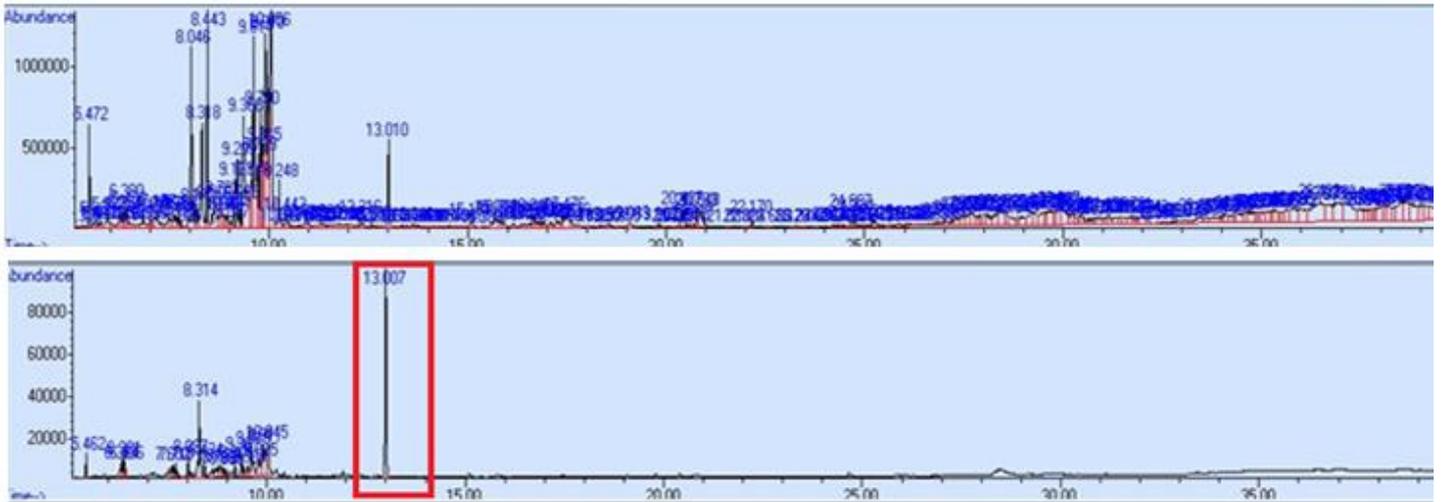


Figura 24. Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1n-10 como FAME. La señal aparece a un tiempo de retención de 13,007 minutos. Arriba modo TIC abajo modo SIM destacando el pico correspondiente al isómero n-10.

Ácido 16:1n-7

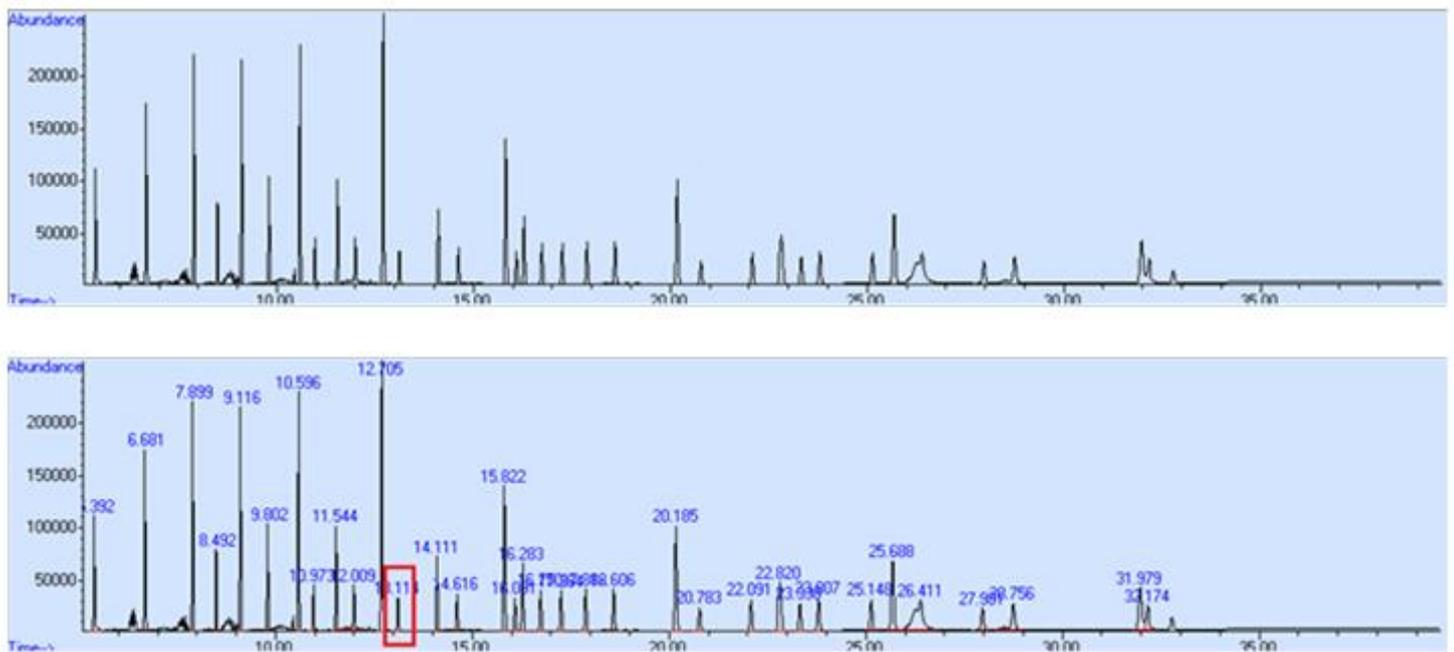


Figura 25. Cromatogramas correspondientes a una mezcla de 37 ácidos grasos, de entre los cuales se destaca la señal correspondiente al 16:1n-7 cis como FAME, Modo SIM sin integrar arriba e integrado abajo.

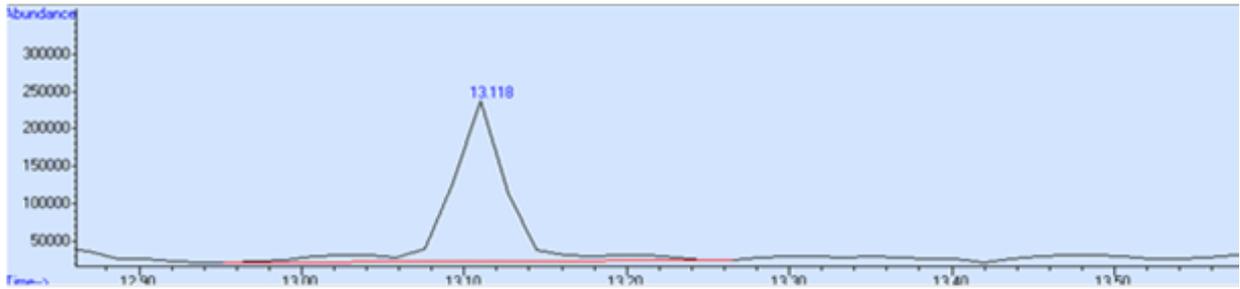


Figura 26. Detalle del pico correspondiente al 16:1n-7. Aparece a un tiempo de retención de 13.118 minutos.

### Ácido 16:1n-7 trans

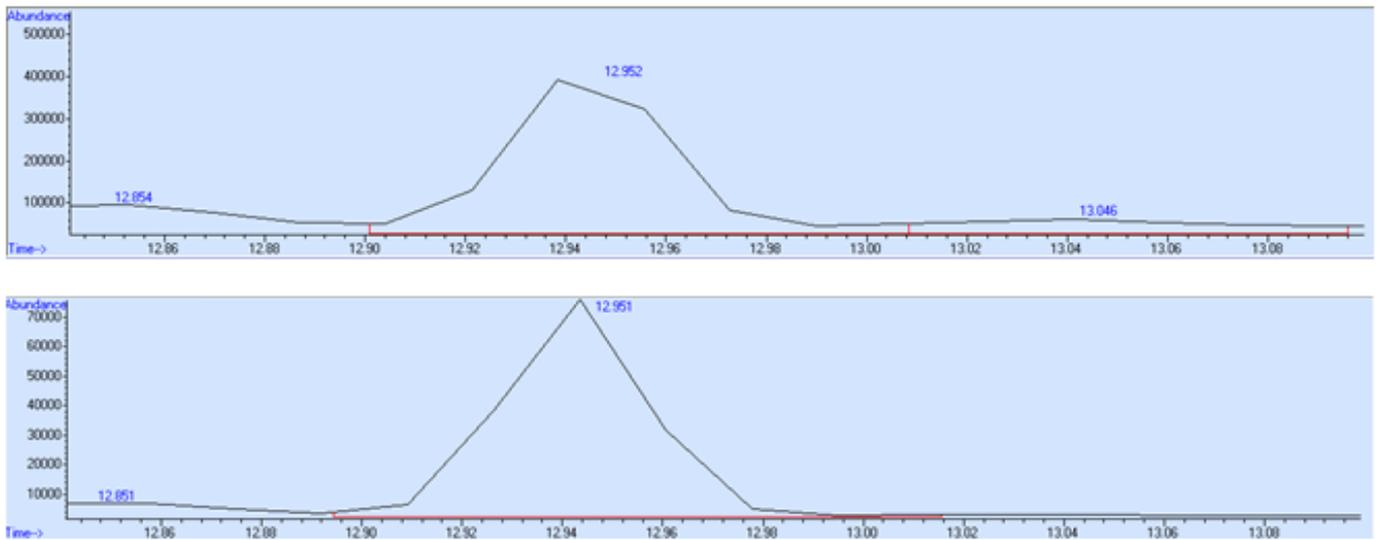


Figura 27. Detalle del pico correspondiente al 16:1n-7 trans. Aparece a un tiempo de retención de 12.951 minutos.

	Tiempo de retención (min)
<b>16:1n-9</b>	13,003
<b>16:1n-10</b>	13,007
<b>16:1n-7</b>	13,118
<b>16:1n-7 t</b>	12,952

Tabla 7. Tiempos de retención de los distintos isómeros del ácido palmítico analizados.

Del análisis de los isómeros del 16:1 se obtiene la siguiente información: los dos estereoisómeros del 16:1n-7, cis y trans, pueden distinguirse como FAMES atendiendo a sus tiempos de retención ya que aparecen separados. Además observando los tiempos de retención (tabla 7) que presentan podemos descartar su presencia en las muestras analizadas de ácidos grasos en RAW264.7. Sin embargo los isómeros n-9 y n-10 coeluyen, y presentan tiempos de retención próximos a nuestro pico problema. Dado que ambos compuestos no pueden ser distinguidos como FAMES únicamente por los tiempos de retención se estudian los espectros de fragmentación obtenidos, no pudiéndose hallar diferencias entre ellos, esto coincide con la teoría descrita en la bibliografía [37] para análisis de FAMES por GC/MS de impacto electrónico, que afirma que los isómeros de ácidos grasos monoinsaturados, como FAMES, producen espectros de fragmentación idénticos por lo que el espectro de masas obtenido no resuelve el problema.

La tercera opción planteada para identificar los distintos isómeros, indistinguibles como FAMES, se basa en una segunda derivatización a un compuesto que permita diferenciar entre isómeros. Como se describió en el apartado de materiales y métodos en este trabajo se optó por el método de obtención de DMOX de Svetashev[26].

Sin embargo, no se hizo un calibrado del equipo para estos compuestos, sino que se analizaron los patrones de los isómeros de interés como DMOX para analizar los espectros de fragmentación que devuelven y emplearlos como medio de identificar posteriormente los isómeros en las muestras extraídas de las células cultivadas. Los espectros obtenidos para los patrones derivatizados a DMOX se presentan a continuación:

### Análisis patrones GC/MS como DMOX

Los patrones, derivatizados a DMOX como se explicó en el apartado de materiales y métodos, se resuspendieron en n-hexano y se pincharon en el GC/MS

Ácido 16:1n-7 como DMOX

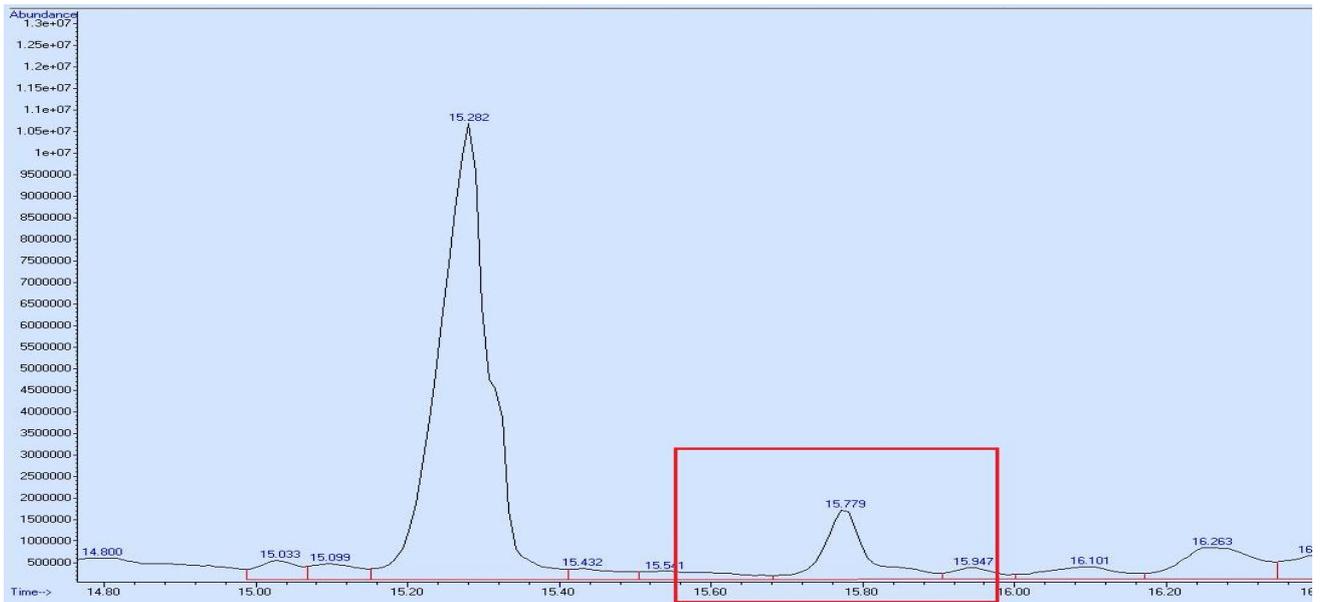


Figura 28. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1n-7 cis tras la derivatización a DMOX.

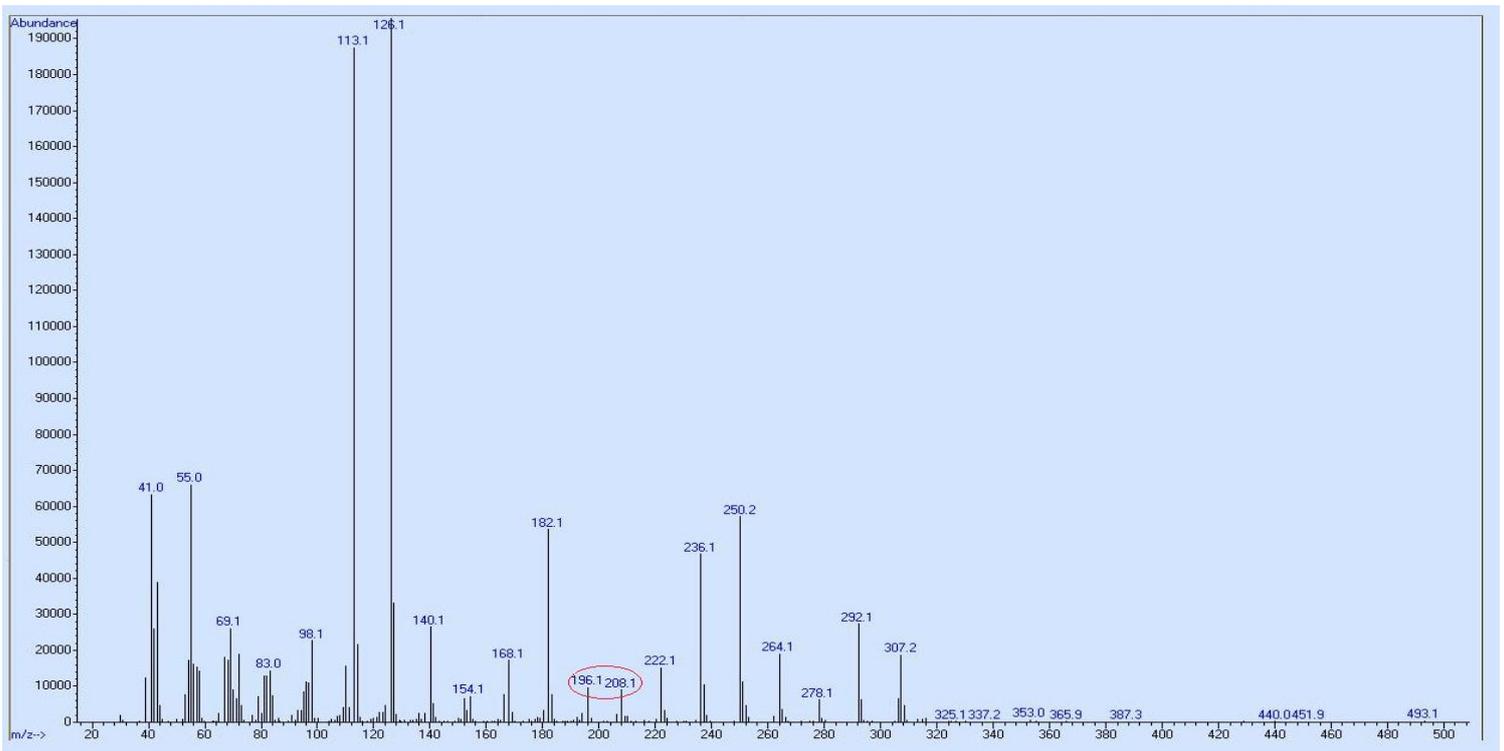


Figura 29. Espectro de masas obtenido para el patrón de 16:1n-7 cis tras la derivatización a DMOX. Se han destacado los fragmentos característicos descritos en la bibliografía.

La señal correspondiente al 16:1n-7 como DMOX aparece a un  $T_r=15,779$  minutos como se refleja en la figura 28.

Información a destacar del espectro de fragmentación (figura 29): la abundancia de los fragmentos característicos de  $m/z$  130 y 126 es prácticamente igual. Por otra parte los fragmentos 196 y 208 determinan la presencia del doble enlace entre  $C_9$  y  $C_{10}$ .

#### *Ácido 16:1n-7 trans como DMOX*

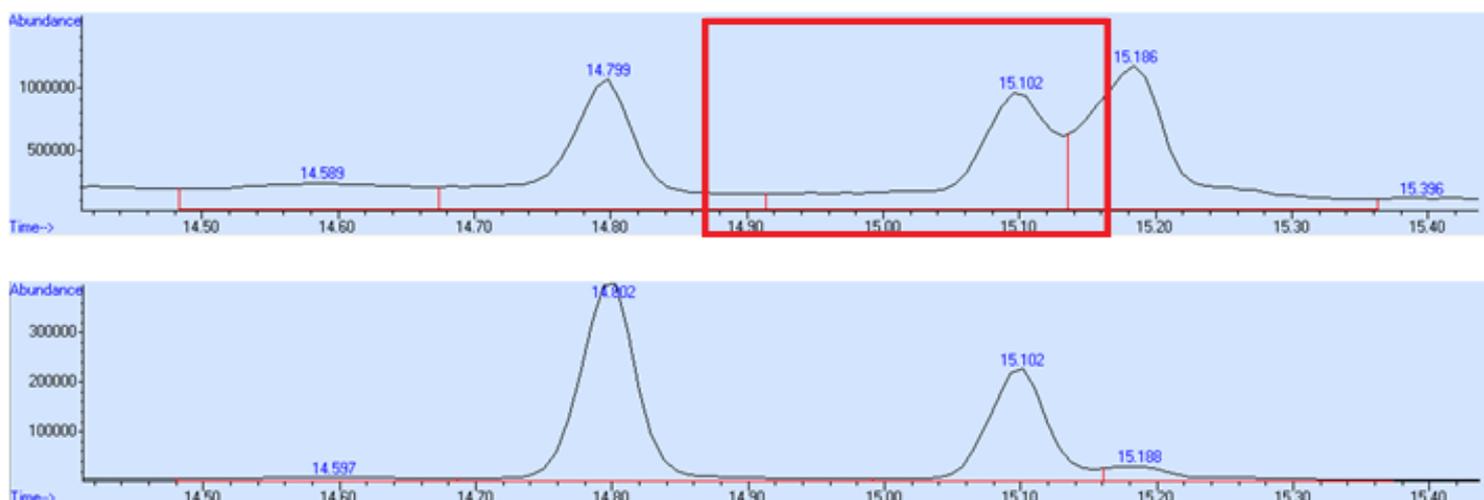


Figura 30. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1n-7 trans tras la derivatización a DMOX.

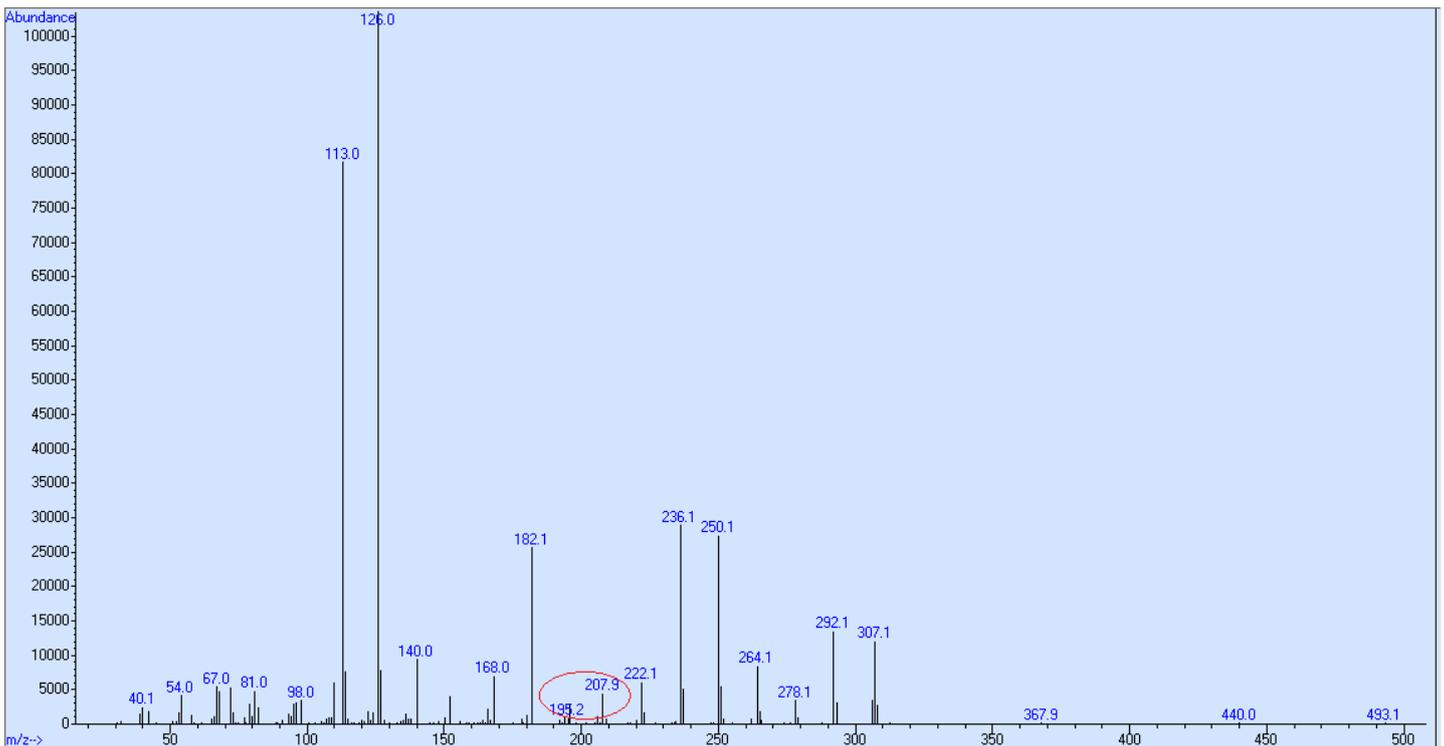


Figura 31. Espectro de fragmentación obtenido para el patrón de 16:1n-7 trans tras la derivatización a DMOX. Se han destacado los fragmentos característicos descritos en la bibliografía

El isómero trans del 16:1n-7, como DMOX, aparece a un tiempo de retención de 15,102 minutos (figura 30). Como se observa en la figura 31, los iones característicos son los mismos que en el caso anterior: la abundancia de los fragmentos de m/z 130 y 126 es prácticamente igual. Por otra parte los fragmentos 196 y 208 aparecen como señales bajas.

#### Ácido 16:1n-9 como DMOX

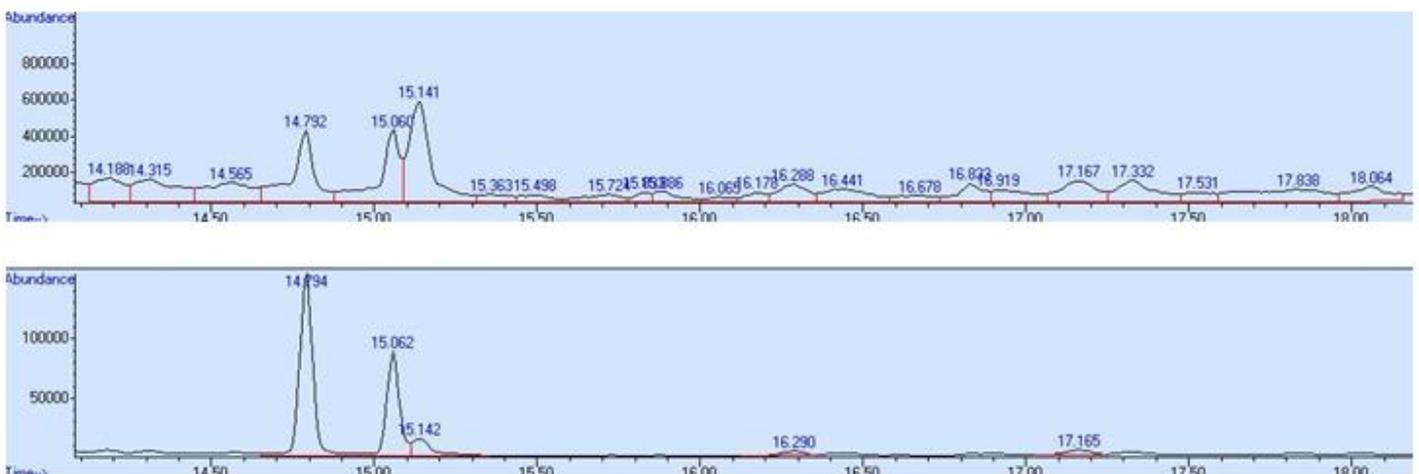


Figura 32. . Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1 n9 tras la derivatización a DMOX, en modo TIC arriba y SIM abajo.

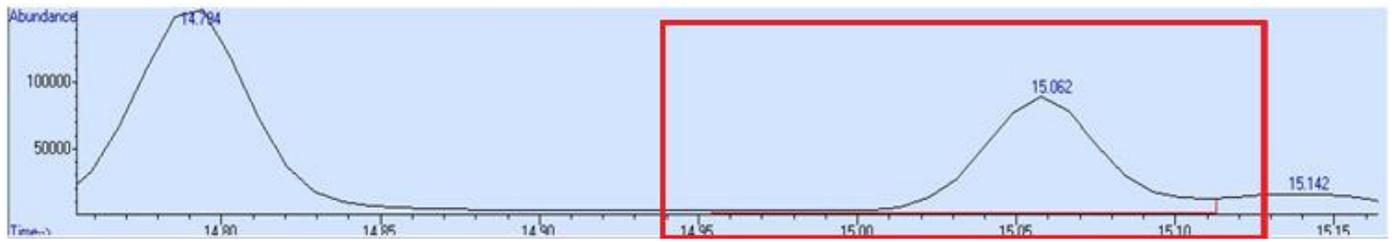


Figura 33. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1n-9 tras la derivatización a DMOX.

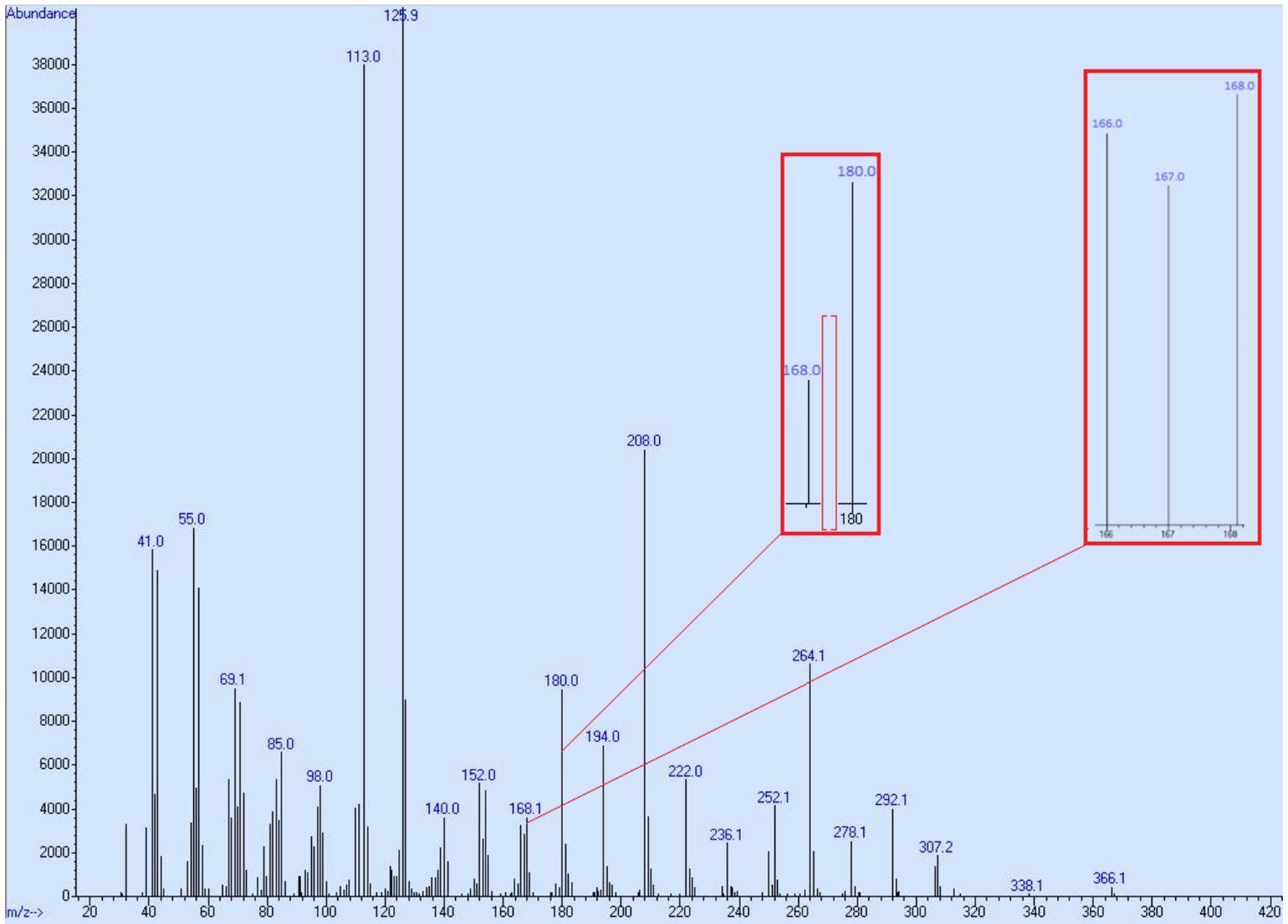


Figura 34. Espectro de masas obtenido para el patrón de 16:1n-9 tras la derivatización a DMOX. Se representan ampliadas las zonas del espectro correspondientes a los fragmentos característicos descritos en la bibliografía, que permiten su identificación inequívoca.

Dado que el ácido graso 16:1n-9 podría ser la especie que aparece en RAW264.7, conviene analizar con detenimiento el espectro obtenido del patrón derivatizado a DMOX representado en la figura 34, ya que los datos extraídos de éste espectro de fragmentación y del correspondiente al n-10 serán las herramientas que se emplearán para resolver el pico problema posteriormente.

Como en todos los espectros de DMOX analizados, los picos base son 113 y 126. Según la bibliografía consultada [22, 25], el fragmento de  $m/z$  113 se corresponde a la reorganización de McLafferty que se produce en muchos ácidos grasos cuando se analiza empleando como fuente de ionización una de impacto electrónico en GC/MS. Por otra parte el fragmento de 126 corresponde a la reorganización del fragmento correspondiente al anillo de la dimetiloxazolina y un resto etilo, que por reacción radicalaria da lugar a un segundo ciclo. Los dos fragmentos correspondientes a los picos base pueden verse claramente en la figura 35.

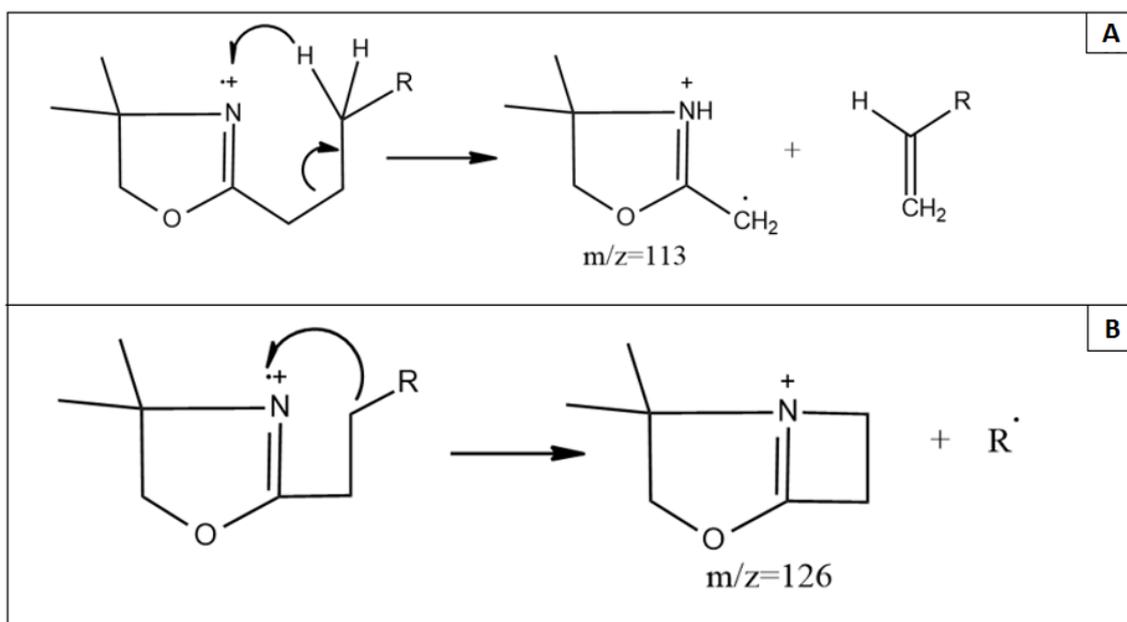


Figura 35. Detalle de la formación tras la fragmentación y posterior reorganización de los fragmentos característicos de DMOX 113 y 126, picos base en todos los espectros de fragmentación obtenidos. A.-Reorganización de McLafferty. B.- Formación del fragmento de  $m/z=126$ .

Puede observarse el ion  $[M]^+=307$  correspondiente al ion molecular. A continuación se observa  $[M-15] = 292$  correspondiente a la molécula inicial tras la pérdida del grupo metilo terminal. A partir de ahí los picos que aparecen a continuación presentan una diferencia constante de 14 una entre sí, correspondientes a la pérdida consecutiva de carbonos de la cadena saturada. Estos se cumple para los picos 292, 278, 264, 250, 236, 222, 208, 194 y 180

pero, esta diferencia deja de ser constante con respecto al siguiente fragmento, que presenta una relación  $m/z$  de 168. Esto nos indica la presencia de una insaturación en el enlace contiguo, al corresponderse con una diferencia de 12 uma. Se cumple aquí la regla empírica enunciada por J.Y. Zhang para detección de insaturaciones en DMOX [22, 23, 38]:

*“Si se encuentra una separación de  $m/z$  de 12 unidades de masa atómica en vez de las 14 habituales entre 2 picos vecinos de  $m/z$  par conteniendo los átomos de carbono  $n-1$  y  $n$  del ácido graso, existe un doble enlace entre los carbonos  $n$  y  $n+1$  de la cadena hidrocarbonada del ácido graso”.*

Si se cuentan el número de fragmentos equidistantes 14 uma hasta la insaturación a partir del ion molecular se obtienen un total de 9 carbonos, esto sitúa el doble enlace entre los carbonos 7 y 8 de la cadena.

Tras la insaturación los fragmentos que aparecen presentan de nuevo una diferencia de 14 uma, correspondiente a la cadena hidrocarbonada.

Todos estos fragmentos pueden visualizarse en la figura 36 fácilmente:

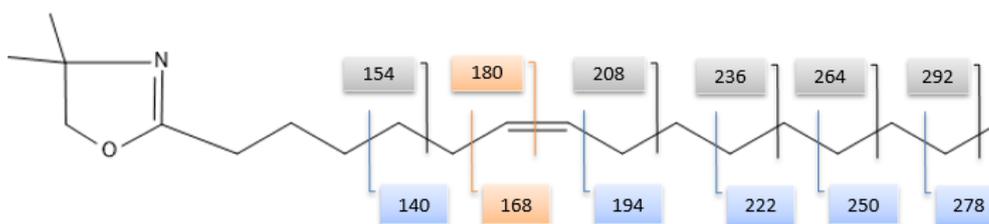


Figura 36. Representación de las posibilidades de fragmentación del 16:1n-9.

Por otra parte en el cromatograma representado en la figura 32 y ampliado en la 33 se observa que la señal correspondiente al 16:1n-9 como DMOX aparece a un tiempo de retención de 15,062 minutos.

En cuanto al espectro de fragmentación obtenido, se van a analizar los fragmentos recogidos en la tabla 6, que posteriormente servirán de diagnóstico en el análisis del espectro de fragmentación de la muestra problema.

En primer lugar se presta atención a los picos base, la abundancia relativa del fragmento de  $m/z$  113 es un poco menor que el de 126.

Por otro lado también se han descrito como fragmentos de importancia para la identificación de los iones 166,167 y 168 que para el 16:1n-9 presentan abundancias similares, siendo de ellos el 168 el más abundante como puede observarse en la Figura 33.

Se observa también que la el pico de m/z 194 aparece bajo y que tanto el fragmento de m/z 208 como el de 264 dan señales altas.

#### Ácido 16:1n-10 como DMOX

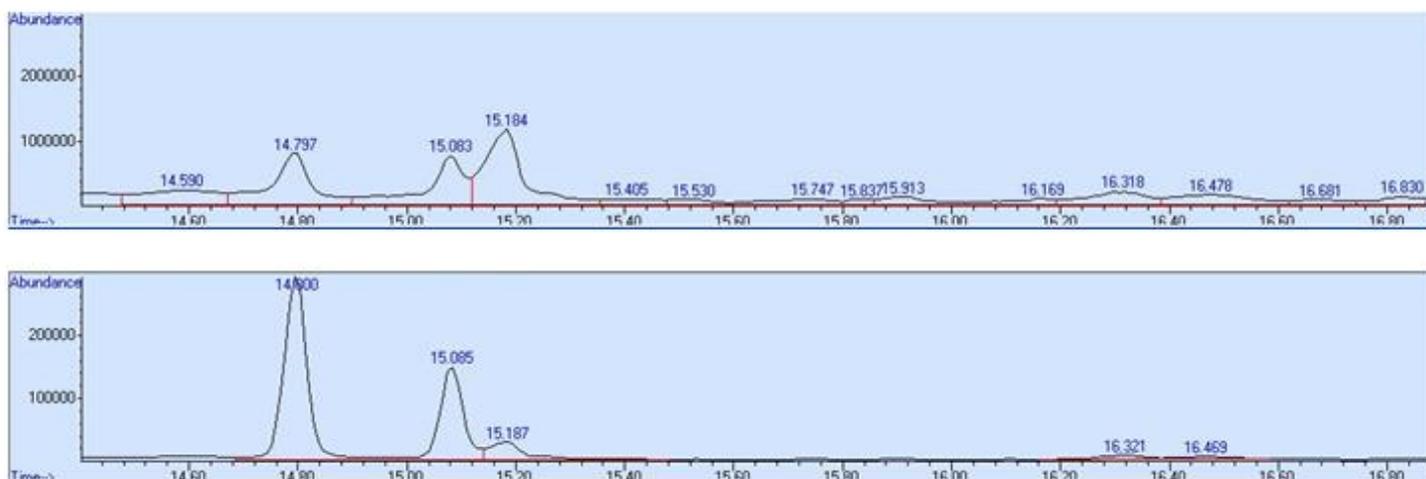


Figura 37. Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1 n10 tras la derivatización a DMOX.

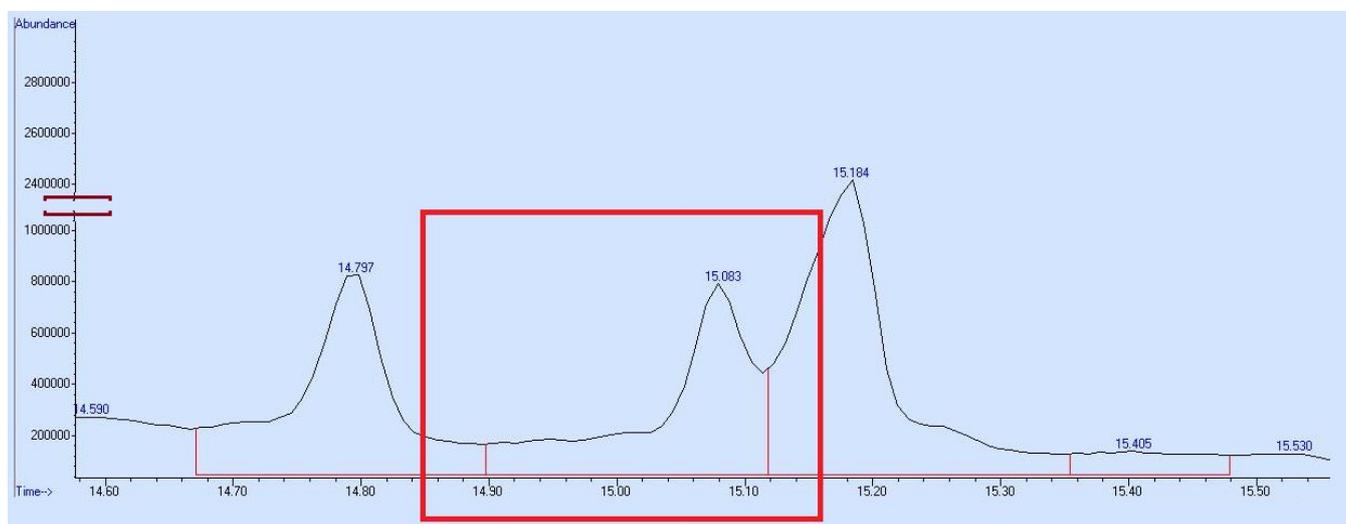


Figura 38. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1 n10 tras la derivatización a DMOX.

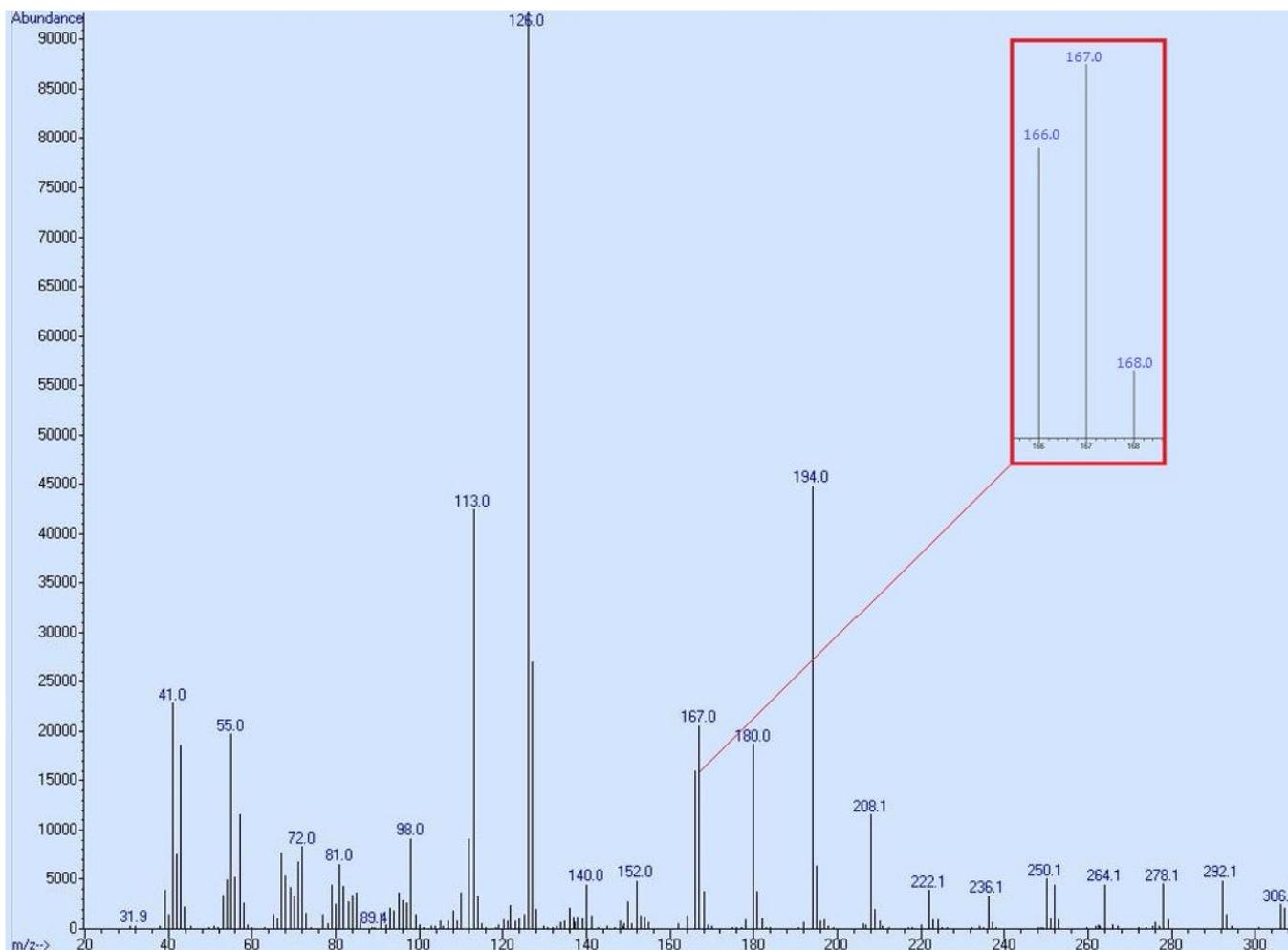


Figura 39. Espectro de masas obtenido para el patrón de 16:1n-10 tras la derivatización a DMOX. Se representan ampliadas las zonas del espectro correspondientes a los fragmentos característicos descritos en la bibliografía, que permiten su identificación inequívoca.

Dado que, junto con el 16:1n-9, el 16:1n-10 presentaba como FAME un tiempo de retención próximo a nuestro pico problema, es necesario analizar en profundidad su espectro de fragmentación como DMOX, ya que como queda recogido en la tabla 8, como DMOX tampoco se separan cromatográficamente los isómeros n-9 y n-10, coeluyen, siendo el tiempo de retención para el isómero 16:1n-10 de 15.083 minutos (figura 38).

Al igual que en los demás casos en la figura 39 puede observarse que los picos base son los correspondientes a los iones de m/z 113 y 126, siendo para el ácido sapiénico la abundancia relativa del fragmento 113 aproximadamente la mitad que la del 126. Como en el caso anterior aparecen el ion molecular  $[M^+]=307$  uma, también puede distinguirse  $[M-1]$  correspondiente al ion molecular tras la pérdida de un átomo de hidrógeno.

Al igual que en el espectro del 16:1n-9, aparece  $[M-15]=292$  y a partir de éste las señales siguientes mantienen una diferencia entre sí de 14 uma, correspondientes a la pérdida consecutiva de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada. Esto se cumple como puede verse en la figura 39, para los iones de  $m/z$  292, 278, 264, 222, 208, 194 y 180, pero el siguiente fragmento aparece a una diferencia de 13 uma, es decir de  $m/z = 167$ . Vemos que no se cumple la regla de Zhang, ya que no es una diferencia de 12 y sitúa la diferencia tras el mismo número de carbonos que para el n-9.

Para relacionar visualmente los valores de  $m/z$  definidos con los fragmentos a los que corresponden se incluye la figura 40:

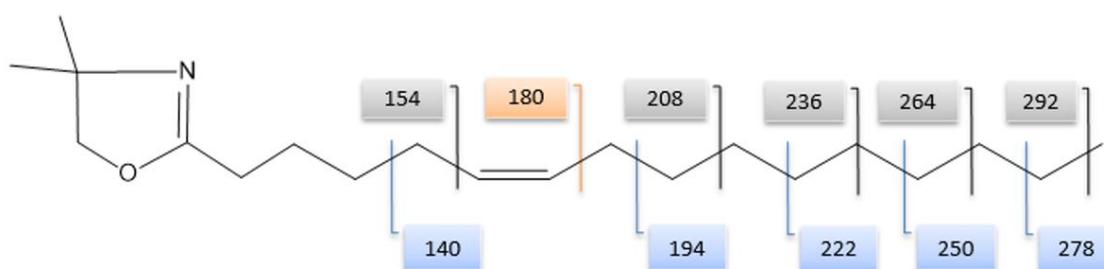


Figura 40. Posibilidades de fragmentación del ácido sapiénico. Imagen explicativa de los fragmentos encontrados en el espectro de masas obtenido.

En la bibliografía consultada [22, 38] se demuestra que la regla de Zhang no se cumple para dobles enlaces anteriores al carbono 7, como hemos podido comprobar con el 16:1n-10. Sin embargo, se ha descrito como fragmento diagnóstico de la presencia de un doble enlace en el carbono 6 en DMOX el fragmento de  $m/z=167$ .

En la Figura 39 se observa que los fragmentos de 166 y 167 son mayores que el de 168 y comparables a la altura del 180. Por otro lado el fragmento de  $m/z= 194$  es bastante abundante, frente a 208 y 264 de baja abundancia.

	Tiempo de retención (min)
<b>16:1n-9</b>	15,062
<b>16:1n-10</b>	15,083
<b>16:1n-7</b>	15,779
<b>16:1n-7 t</b>	15,102

*Tabla 8. Recopilación de los tiempos de retención de los estándares analizados como DMOX.*

Por lo tanto, atendiendo a ciertos fragmentos y a su abundancia relativa, es posible diferenciar a partir del espectro de fragmentación el 16:1n-9 y el 16:1n-10. Esto nos permitirá resolver nuestro pico problema.

En la figura 41 se recogen los sectores de interés de los espectros obtenidos (figuras 34 y 39). La finalidad de ésta figura es ser herramienta para el estudio de los espectros de los ácidos grasos presentes en células RAW264.7 como DMOX.

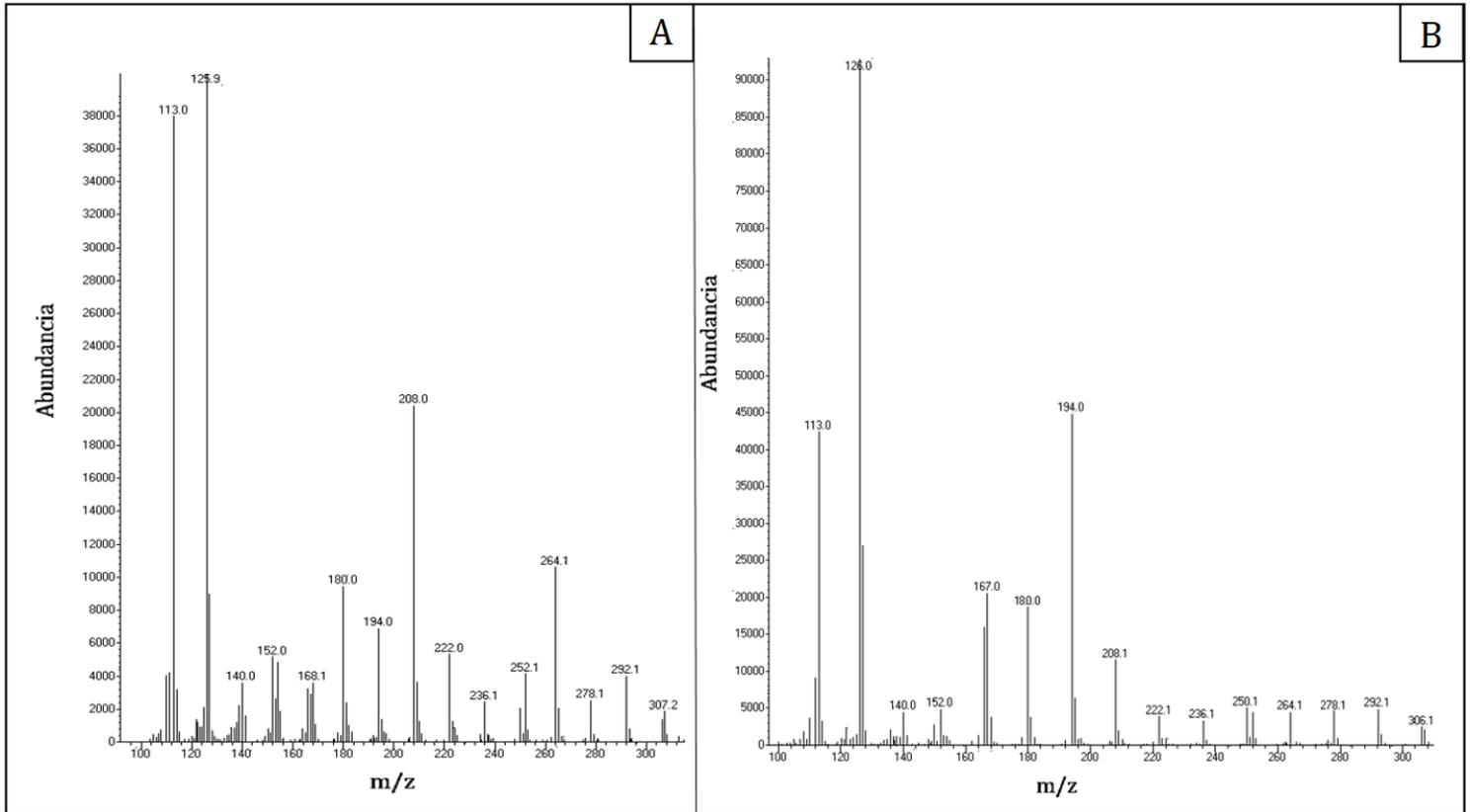


Figura 41. Imagen simplificada de la sección del espectro de masa que permite la identificación de los isómeros n-9 y n-10 del ácido 16:1. A. Espectro de fragmentación correspondiente al 16:1n-9. B. Espectro correspondiente al 16:1n-10.

## Análisis de los DMOX obtenidos a partir de las muestra de FAMES

### *Contenido total de ácidos grasos como DMOX*

Es necesario determinar que isómero del palmitoleico está presente en las RAW264.7. En esta línea se realizó en primer lugar el análisis de los lípidos de la célula sin separar, previamente derivatizados a DMOX como se explica en el apartado de materiales y métodos.

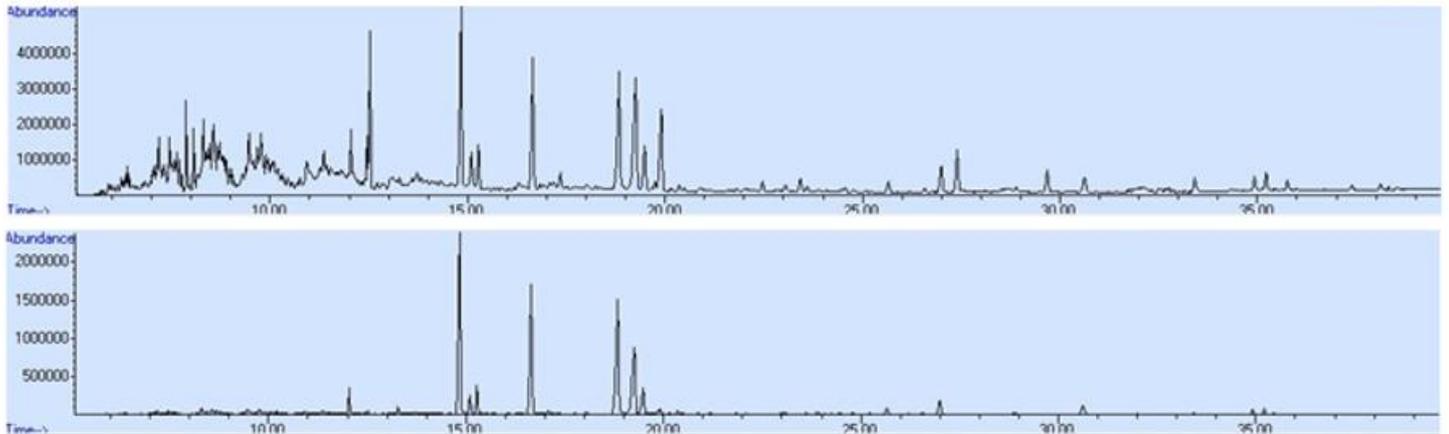


Figura 42. Cromatogramas correspondientes la muestra de ácidos grasos totales presentes en la muestra de células inicial, analizadas como DMOX. Modo TIC y SIM.

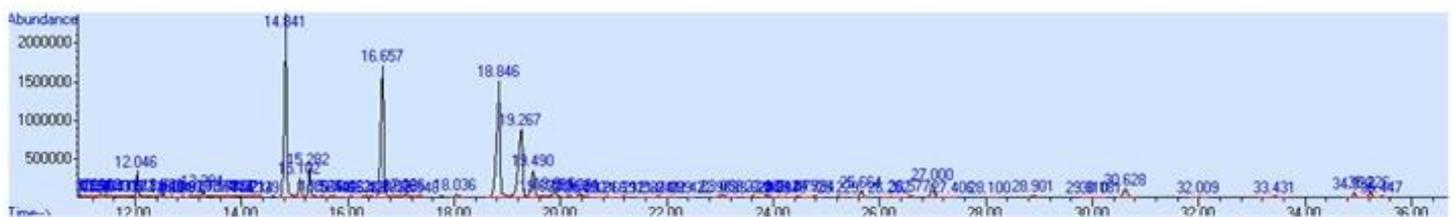


Figura 43. Cromatograma modo SIM integrado

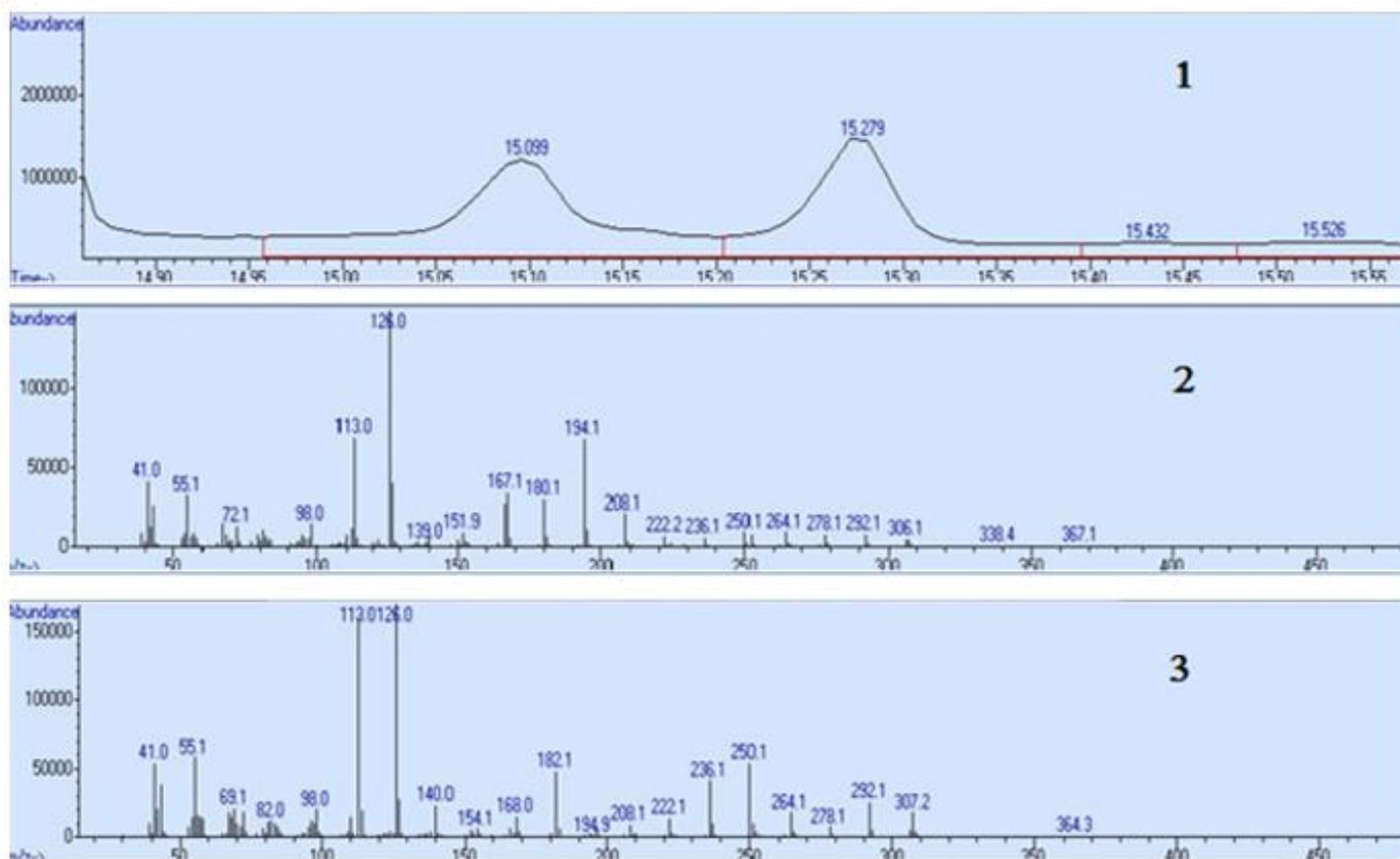


Figura 44. Por orden: 1.-Detalle del cromatograma correspondiente a l pico problema de isómero del palmitoléico; 2.-Espectro de masas de la señal que aparece a 15.096 minutos (16:1n-10); 3.- Espectro de masas correspondiente a la señal a 15.281 minutos (16:1n-7).

Comparando los espectros de fragmentación de cada uno de los picos representados en la figura 44.1, con los obtenidos para los patrones de las distintas especies de 16:1, se puede asignar la señal que aparece a 15.096 min al 16:1n-10 y el de tr=15.281 min al 16:1n-7.

Por lo tanto, en este primer análisis se detecta que el isómero presente en las RAW264.7 es el ácido sapiénico, un ácido graso descrito en humanos. Por otra parte, como es habitual en mamíferos, no aparece el isómero trans del palmitoleico.

Para determinar la distribución del ácido sapiénico en estas células, así como para comprobar si está o no presente el isómero n-9 pero en una proporción mucho menor, se realizó el análisis de las fracciones lipídicas separadas por cromatografía en placa fina, transmetiladas y derivatizadas a DMOX como queda descrito en el apartado de materiales y métodos, obteniéndose:

#### *Análisis fracción de fosfolípidos como DMOX*

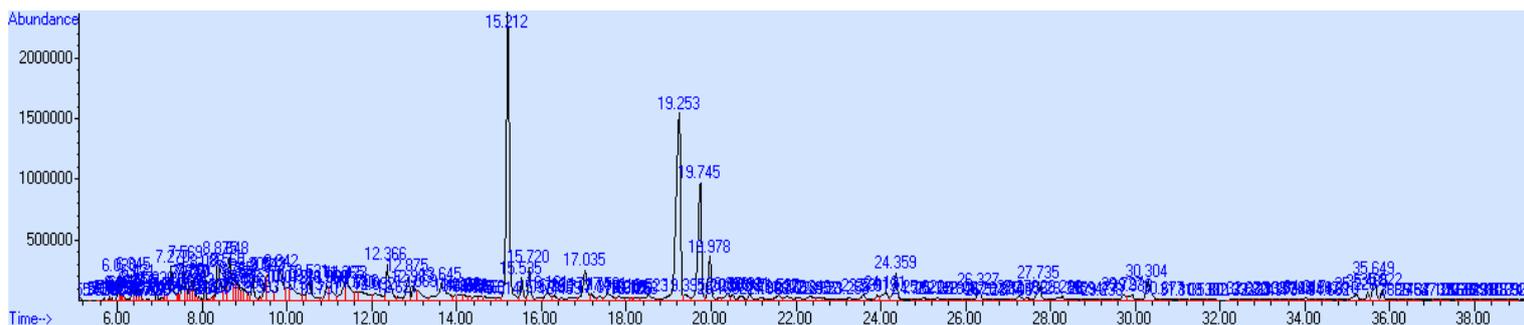


Figura 45. Cromatograma integrado correspondiente a los ácidos grasos presentes como fosfolípidos en la célula, analizados como DMOX.

La señal que aparece a 15.526 min en la figura 45 se corresponde con el ácido graso 16:1n-10, confirmando lo anterior. El isómero que aparece a 15.720 es el 16:1n-7. Esta asignación de picos se puede comprobar comparando los espectros de fragmentación representados en la figura 46 con los obtenidos para los patrones derivatizados a DMOX.(figuras 29 y 41).

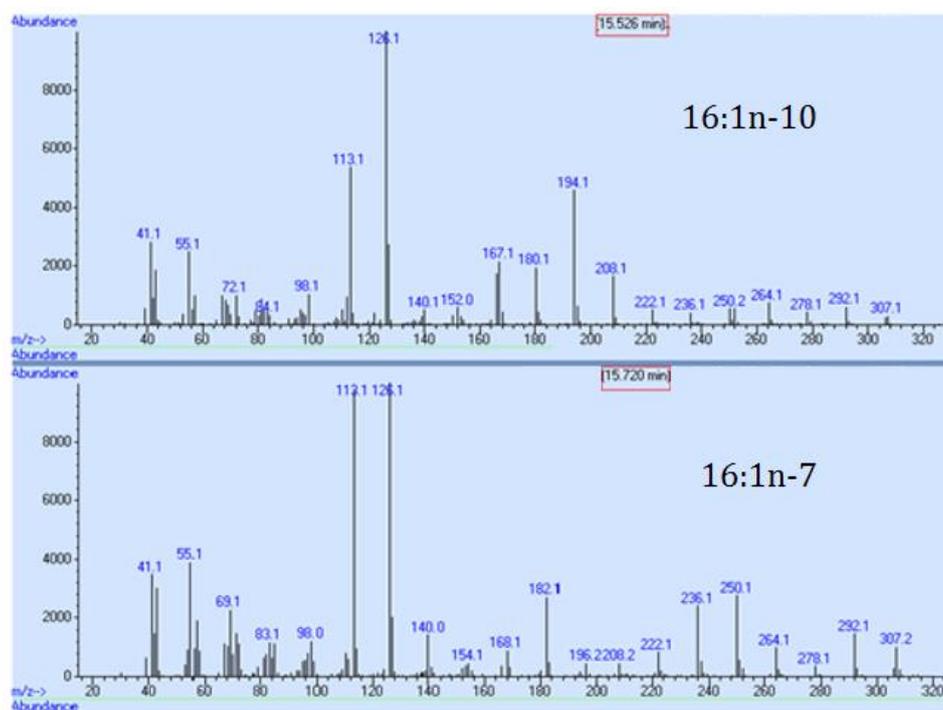


Figura 46. Espectros de fragmentación para las señales que aparecen a 15.526 (arriba) y a 15.720 min (abajo).

Análisis fracción DAG como DMOX

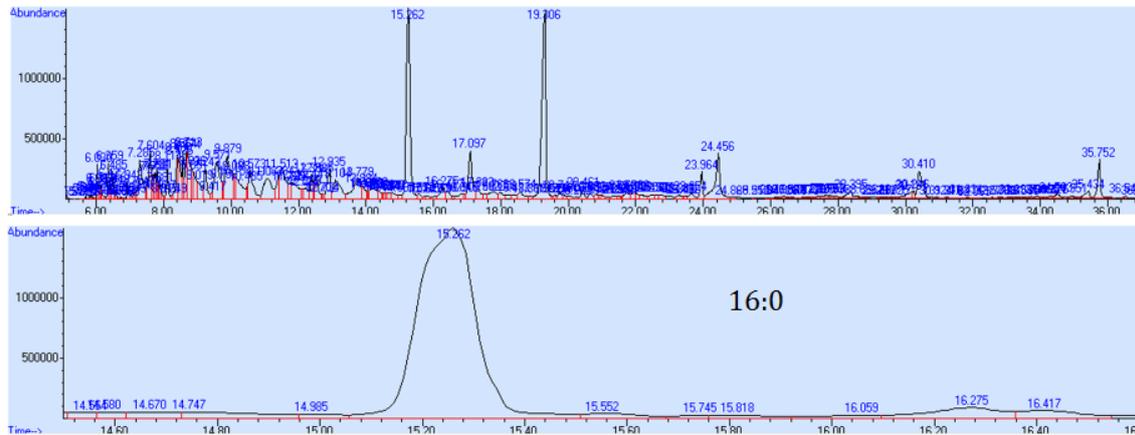


Figura 47. Cromatograma integrado obtenido del análisis de los ácidos grasos presentes en la célula como diacilglicerol, tras la derivatización a DMOX. Abajo, solo se observa la señal correspondiente al ácido hexadecanoico.

Como se observó en FAMES (figura 16), se encontró el ácido hexadecanoico (16:0) pero ninguno de los isómeros del palmitoleico.

Análisis fracción TAG como DMOX

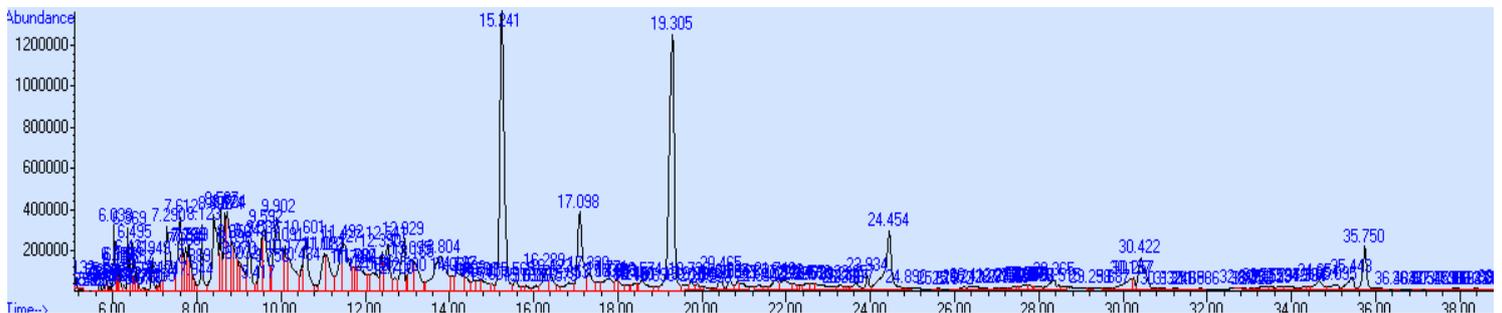


Figura 48. Cromatograma integrado resultante del análisis de la fracción de triacilglicerol analizado como DMOX, realizado en modo SIM.

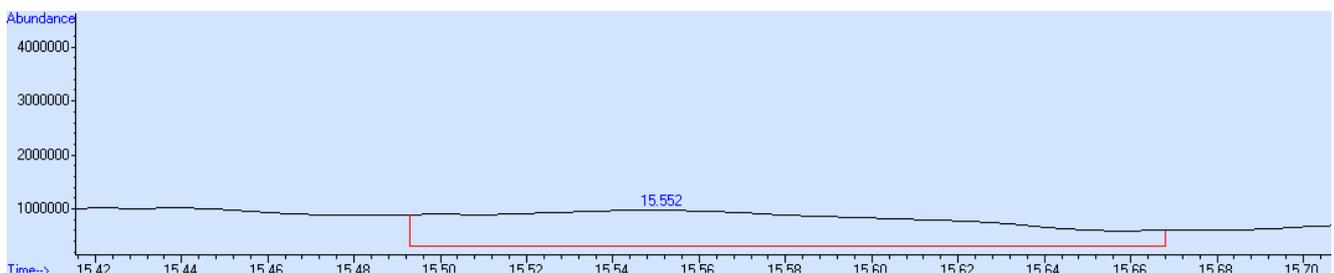


Figura 49. Detalle de la señal del cromatograma anterior correspondiente al problema.

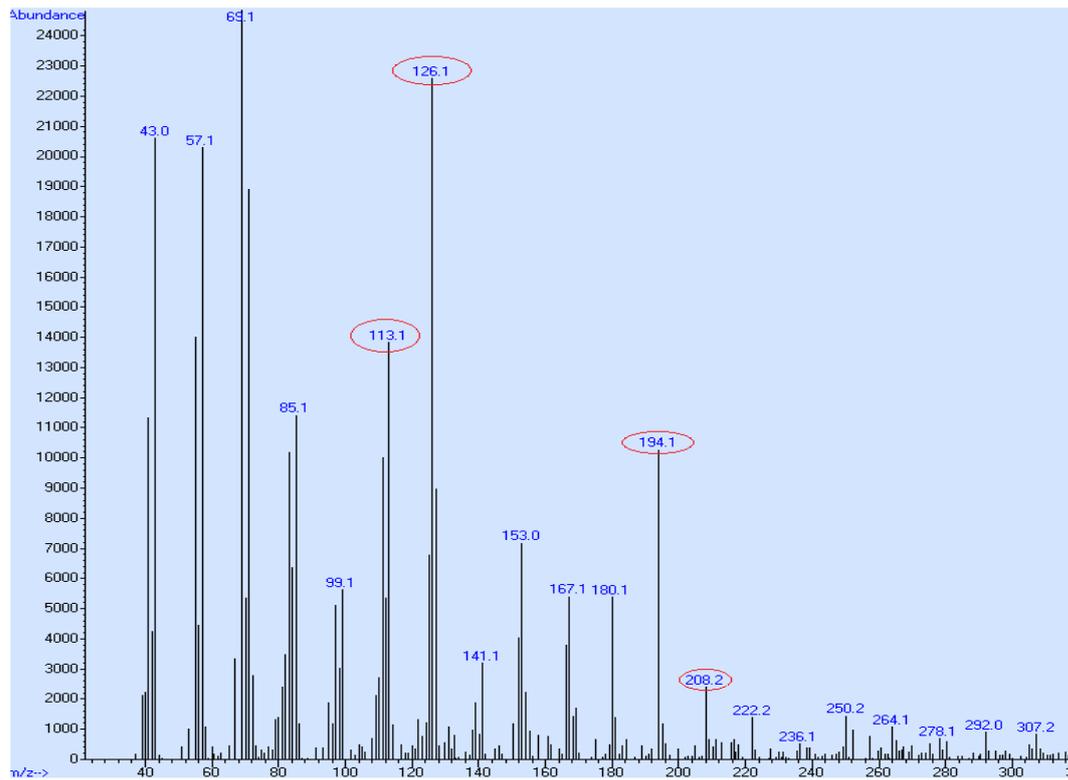


Figura 50. Espectro de masas de la señal a 15.552 min de tiempo de retención. Observando los fragmentos característicos puede determinarse que se trata del ácido sapiénico.

También en TAG el isómero encontrado del palmitoleico es el ácido sapiénico como queda reflejado en la figura 50, aunque en una proporción muy reducida.

Análisis fracción CE

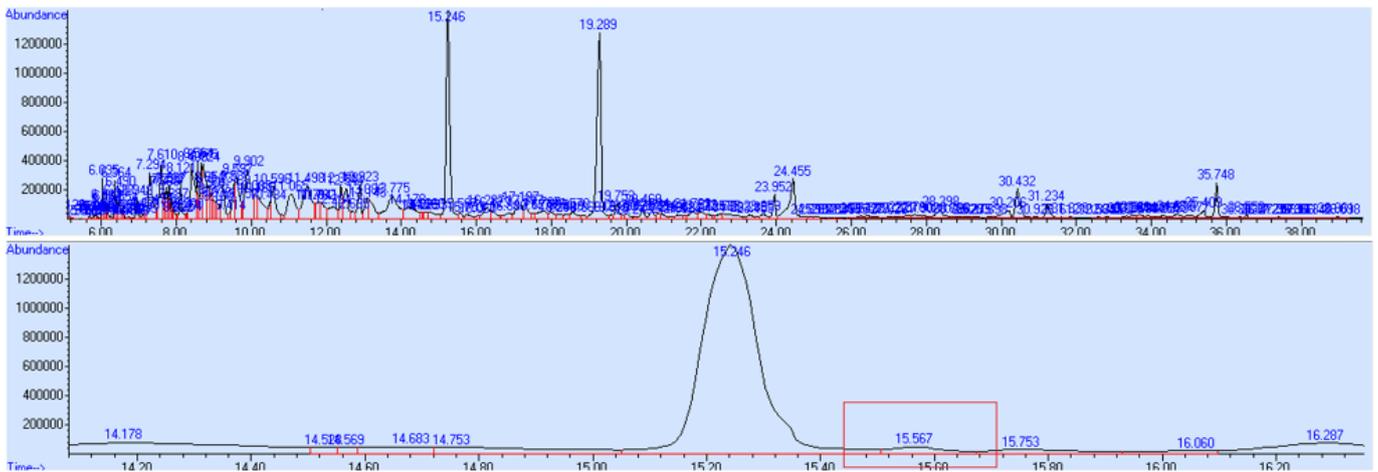


Figura 51. Arriba: cromatograma integrado de los ácidos grasos presentes como ésteres de colesterol analizados como DMOX; abajo: detalle de la señal correspondiente al 16:1.

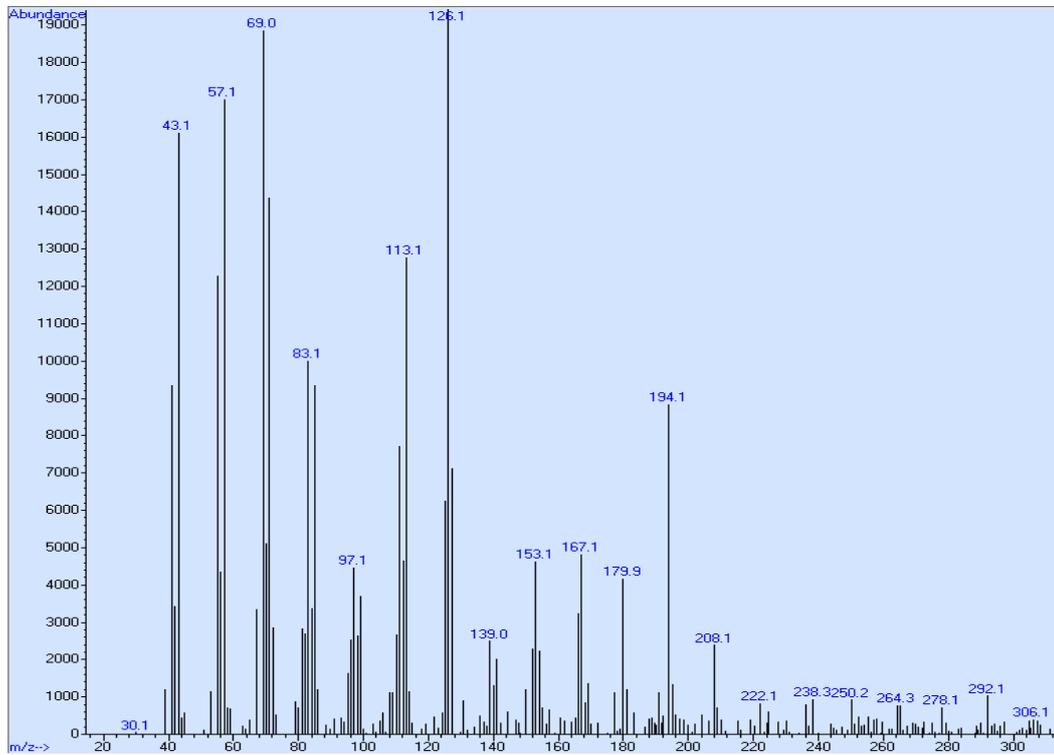


Figura 52. Espectro de masas del pico obtenido a 15.567 minutos ampliado.

Una vez más, al estudiar el espectro de fragmentación (figura 52) del pico problema del cromatograma obtenido para los ácidos grasos en CE como DMOX (figura 51), se observa que la especie encontrada es el ácido sapiénico.

## Conclusiones

En primer lugar, la composición de ácidos grasos de una línea celular puede determinarse prácticamente en su totalidad por GC/MS previa derivatización a FAMES. Este método permite una buena separación entre las especies por cromatografía de gases, sin embargo, cuando dos especies coeluyen, no permite resolver el espectro obtenido analizando el espectro de fragmentación, ya que para ácidos grasos con menos de tres insaturaciones, el espectro de fragmentación es el mismo, porque puede darse la migración del doble enlace por la estructura en el proceso de ionización. Es el caso de dos isómeros del ácido palmitoleico, n-9 y n-10.

Para resolver este problema puede llevarse a cabo una segunda derivatización, en este caso obteniendo dimetiloxazolininas de los ácidos grasos, que permite detectar los isómeros analizando el espectro de fragmentación obtenido atendiendo a ciertos fragmentos de m/z determinada. Los compuestos así analizados presentan tiempos de retención mayores respecto a sus equivalentes como FAMES y el rendimiento total del proceso tiene un rendimiento bajo. El análisis de las especies como DMOX solo es válido como análisis cualitativo.

En segundo lugar, para la línea celular estudiada RAW264.7, la composición lipídica en su estado basal es la descrita en la Figura 9, siendo el isómero encontrado para el palmitoleico el 16:1n-10, un ácido graso descrito en seres humanos y que hemos detectado en macrófagos de ratón.

## Bibliografía

- [1] J.E. Kanter, K.E. Bornfeldt, Inflammation and diabetes-accelerated atherosclerosis: myeloid cell mediators, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 24 (2013) 137-144.
- [2] D. Mozaffarian, H. Cao, I.B. King, R.N. Lemaitre, X. Song, D.S. Siscovick, G.S. Hotamisligil, Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes, *The American journal of clinical nutrition*, 92 (2010) 1350-1358.
- [3] T.O. Eichmann, A. Lass, DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol-stereochemistry, metabolism, and signaling, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, (2015).
- [4] Y.K. Kaneko, T. Ishikawa, Diacylglycerol Signaling Pathway in Pancreatic beta-Cells: An Essential Role of Diacylglycerol Kinase in the Regulation of Insulin Secretion, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38 (2015) 669-673.
- [5] H.G. Cao, K. Mayers, J.R. Wiest, M.M. Watkins, S.M. Hotamisligil, G. S, Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism, *Cell*, 134 (2008) 933-944.
- [6] E.D. Fabiani, The true story of palmitoleic acid: Between myth and reality, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113 (2011) 809-811.
- [7] P. Nestel, P. Clifton, M. Noakes, Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men, *Journal of lipid research*, 35 (1994) 656-662.
- [8] T. Scherer, J. O'Hare, K. Diggs-Andrews, M. Schweiger, B. Cheng, C. Lindtner, E. Zielinski, P. Vempati, K. Su, S. Dighe, T. Milsom, M. Puchowicz, L. Scheja, R. Zechner, S.J. Fisher, S.F. Previs, C. Buettner, Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis, *Cell metabolism*, 13 (2011) 183-194.
- [9] V. Chajes, Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., The fatty acid desaturation index of blood lipids, as a biomarker of hepatic stearoyl-CoA desaturase expression, is a predictive factor of breast cancer risk., *Curr. Opin. Lipidol*, 22 (2011) 6-10.
- [10] N. Scaglia, Igal, R. A., Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells., *J. Biol. Chem*, 280 (2005) 25339-25349.
- [11] A. Pappas, Epidermal surface lipids, *Dermato-endocrinology*, 1 (2009) 72-76.

- [12] D.I. Wilkinson, Variability in composition of surface lipids. The problem of the epidermal contribution, *The Journal of investigative dermatology*, 52 (1969) 339-343.
- [13] C.L. Fischer, Blanchette, D. R., Brogden, K. A. , Dawson, D. V. , Drake, D. R., Hill, J. R., Wertz, P. W., The roles of cutaneous lipids in host defense, *Biochimica et biophysica acta*, 1841 (2014) 319-322.
- [14] J.J. Wille , A. Kydonieus Palmitoleic Acid Isomer (C16:1Δ6) in Human Skin Sebum Is Effective against Gram-Positive Bacteria, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 16 (2003) 176-187.
- [15] Hiroyuki Araki, Y. Sugai, H. Takigawa, Improvement of Atopic Dermatitis by Human Sebaceous Fatty Acids and Related Lipids, *Atopic Dermatitis*, InTech, 2012.
- [16] W. Skoog, Holler y Crouch *Química Analítica*, 7ª ed., Mc Graw Hill, 2001.
- [17] A.B.-T. Gubern, M Casas, J Barneda, D Masgrau, R Picatoste, F Balsinde, J Balboa, M. A Claro, E, Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A2, *The Journal of biological chemistry*, 284 (2009) 5697-5708.
- [18] C.R. Guijas, J. P.; Rubio, J. M.; Balboa, M. A.: Balsinde, J., Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation, *Biochimica et biophysica acta*, 1841 (2014) 1661-1671.
- [19] S.K.R. Natarajan, K. Ganesan, M. Feng, D. McVicker, B. L. McNiven, M. A.Osna, N. A. Mott, J. L. Casey, C. A. Kharbanda, K. K., Structure, function and metabolism of hepatic and adipose tissue lipid droplets: implications in alcoholic liver disease, *Current molecular pharmacology*, (2015).
- [20] K. Tauchi-Sato, S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, T. Fujimoto, The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 44507-44512.
- [21] C. Guijas, G. Perez-Chacon, A.M. Astudillo, J.M. Rubio, L. Gil-de-Gomez, M.A. Balboa, J. Balsinde, Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes, *J Lipid Res*, 53 (2012) 2343-2354.
- [22] L. Fay, Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4- dimethyloxazoline derivatization, *Journal of Chromatography*, 541 (1991) 89-98.

- [23] J.Y. Zhang, Q.T. Yu , B.N. Liu, Z.H. Huang, Chemical modification in mass spectrometry IV—2-alkenyl-4,4-dimethyloxazolines as derivatives for the double bond location of long-chain olefinic acids., *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, 15 (1988) 33-34.
- [24] W. W. Christiea, G. W. Robertsona, W. C. McRobertsb, J.T.G. Hamiltonb, Mass spectrometry of the 4,4-dimethyloxazoline derivatives of isomeric octadecenoates (monoenes), *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, (2000).
- [25] J.T. Hamilton, W.W. Christie, Mechanisms for ion formation during the electron impact-mass spectrometry of picolinyl ester and 4,4-dimethyloxazoline derivatives of fatty acids, *Chemistry and physics of lipids*, 105 (2000) 93-104.
- [26] V.I. Svetashev, Mild method for preparation of 4,4-dimethyloxazoline derivatives of polyunsaturated fatty acids for GC-MS, *Lipids*, 46 (2011) 463-467.
- [27] C.O. Kangani, D.E. Kelley, One pot direct synthesis of amides or oxazolines from carboxylic acids using Deoxo-Fluor reagent, *Tetrahedron Letters*, 46 (2005).
- [28] C.O. Kangani, D.E. Kelley, R.W. Evans, Synthesis and mass spectrometry of benzoxazoline, dimethyloxazoline and 4-phenyloxazoline derivatives of polyunsaturated fatty acids, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 21 (2007) 2129–2136.
- [29] C. Guijas, A.M. Astudillo, L. Gil-de-Gomez, J.M. Rubio, M.A. Balboa, J. Balsinde, Phospholipid sources for adrenergic acid mobilization in RAW 264.7 macrophages. Comparison with arachidonic acid, *Biochimica et biophysica acta*, 1821 (2012) 1386-1393.
- [30] J. Pindado, J. Balsinde, M.A. Balboa, TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway, *Journal of immunology*, 179 (2007) 4821-4828.
- [31] M.R. Maurya, S. Gupta, X. Li, E. Fahy, A.R. Dinasarapu, M. Sud, H.A. Brown, C.K. Glass, R.C. Murphy, D.W. Russell, E.A. Dennis, S. Subramaniam, Analysis of inflammatory and lipid metabolic networks across RAW264.7 and thioglycolate-elicited macrophages, *J Lipid Res*, 54 (2013) 2525-2542.
- [32] C.A. Rouzer, P.T. Ivanova, M.O. Byrne, S.B. Milne, L.J. Marnett, H.A. Brown, Lipid profiling reveals arachidonate deficiency in RAW264.7 cells: Structural and functional implications, *Biochemistry*, 45 (2006) 14795-14808.
- [33] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1976) 248-254.

- [34] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37 (1959) 911-917.
- [35] B.S. Fuchs, R Teuber, K Eibisch, M Schiller, J, Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state, *Journal of chromatography. A*, 1218 (2011) 2754-2774.
- [36] K. Ichihara, C. Yamaguchi, H. Nishijima, K. Saito, Preparation of FAME from sterol esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80 (2003) 833-834.
- [37] W.W. Christie, Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids, *Lipids*, 33 (1998) 343-353.
- [38] V. Spitzer, Structure analysis of fatty acids by gas chromatography--low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives--a review, *Prog Lipid Res*, 35 (1996) 387-408.

## Tablas y figuras

Figura 1. Ácido palmitoleico

Figura 2. Recta patrón albumina.

Figura 3. Esquema preparación placa de sílice para la TLC preparativa.

Figura 4. Placa de sílice ya revelada.

Figura 5. Reacción de transesterificación.

Figura 6. Formación de las DMOX.

Figura 7. Cromatograma muestra de ácidos grasos presentes en RAW246.7 independientemente de su estado en la célula. Modos TIC y SIM.

Figura 8. Cromatograma anterior integrado.

Figura 9. Perfil de ácidos grasos presentes en la muestra de células correspondientes a la línea celular RAW264.7.

Figura 10. Cromatogramas obtenidos tras el análisis de la fracción de fosfolípidos como FAMES. Arriba en modo TIC, abajo en modo SIM.

Figura 11. Cromatograma SIM integrado.

Figura 12. Detalle del pico problema correspondiente, en principio, a un isómero del 16:1.

Figura 13. Perfil de ácidos grasos obtenidos para la fracción de fosfolípidos analizada como FAMES

Figura 14. Cromatogramas correspondientes a la fracción de diglicéridos analizada como FAMES en modo TIC (arriba) y modo SIM (abajo).

Figura 15. Cromatograma modo SIM integrado.

Figura 16. Perfil de ácidos grasos presente en la célula en diacilglicerol, resultado del análisis cuantitativo por duplicado.

Figura 17. Cromatogramas correspondientes a la fracción de triacilglicerol analizada como FAMES. Modo TIC (arriba) y SIM (abajo).

Figura 18. Cromatograma modo SIM integrado.

Figura 19. Relación de ácidos grasos presentes en la célula como Triacilglicerol.

Figura 20. Cromatogramas correspondientes a la fracción de ésteres de colesterol analizada como FAMES. Modo TIC y SIM.

Figura 21. Cromatograma correspondiente al modo SIM integrado.

Figura 22. Perfil de ácidos grasos presentes en la célula como esteres de colesterol.

Figura 23. Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1n-9 como FAME.

Figura 24. Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1 n10 como FAME

Figura 25. Cromatogramas correspondientes a una mezcla de 37 ácidos grasos, de entre los cuales se destaca la señal correspondiente al 16:1n-7

Figura 26. Detalle del pico correspondiente al 16:1n-7.

Figura 27. Detalle del pico correspondiente al 16:1n-7 trans.

Figura 28. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1n-7 tras la derivatización a DMOX.

Figura 29. Espectro de masas obtenido para el patrón de 16:1 n7 cis tras la derivatización a DMOX.

Figura 30. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1n-7 trans tras la derivatización a DMOX.

Figura 31. Espectro de fragmentación obtenido para el patrón de 16:1n-7 trans tras la derivatización a DMOX.

Figura 32. Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1 n9 tras la derivatización a DMOX, en modo TIC arriba y SIM abajo.

Figura 33. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1n-9 tras la derivatización a DMOX.

Figura 34. Espectro de masas obtenido para el patrón de 16:1n-9 tras la derivatización a DMOX.

Figura 35. Detalle de la formación tras la fragmentación y posterior reorganización de los fragmentos característicos de DMOX 113 y 126.

Figura 36. Representación de las posibilidades de fragmentación del 16:1n-9.

Figura 37. Cromatogramas correspondientes al patrón de 16:1 n10 tras la derivatización a DMOX.

Figura 38. Detalle de la señal correspondiente al patrón de 16:1 n10 tras la derivatización a DMOX.

Figura 39. Espectro de masas obtenido para el patrón de 16:1 n10 tras la derivatización a DMOX.

Figura 40. Posibilidades de fragmentación del ácido sapiénico

Figura 41. Imagen simplificada de la sección del espectro de masa que permite la identificación de los isómeros n-9 y n-10 del ácido 16:1.

Figura 42. Cromatogramas correspondientes la muestra de ácidos grasos totales presentes en la muestra de células inicial, analizadas como DMOX. Modo TIC y SIM.

Figura 43. Cromatograma modo SIM integrado.

Figura 44. Por orden: 1.-Detalle del cromatograma correspondiente a l pico problema de isómero del palmitoléico; 2.-Espectro de masas de la señal que aparece a 15.096 minutos (16:1n-10); 3.- Espectro de masas correspondiente a la señal a 15.281 minutos (16:1n-7).

Figura 45. Cromatograma integrado correspondiente a los ácidos grasos presentes como fosfolípidos en la célula, analizados como DMOX.

Figura 46. Espectros de fragmentación para las señales que aparecen a 15.526 (arriba) y a 15.720 min (abajo).

Figura 47. . Cromatograma integrado obtenido del análisis de los ácidos grasos presentes en la célula como diacilglicerol, tras la derivatización a DMOX.

Figura 48. Cromatograma integrado resultante del análisis de la fracción de triacilglicerol analizado como DMOX, realizado en modo SIM.

Figura 49. Detalle de la señal del cromatograma anterior correspondiente al problema.

Figura 50. . Espectro de masas de la señal a 15.552 min de tiempo de retención.

Figura 51. . Arriba: cromatograma integrado de los ácidos grasos presentes como ésteres de colesterol analizados como DMOX; abajo: detalle de la señal correspondiente al 16:1.

Figura 52. Espectro de masas del pico obtenido a 15.567 minutos ampliado

Tabla 1. Recopilación de algunos ácidos grasos biológicamente importantes junto a su nomenclatura recomendada por la IUPAC y su nombre trivial así como la abreviatura correspondiente

Tabla 2. Relación de patrones internos empleados para la cuantificación posterior, junto con la cantidad empleada y la procedencia.

Tabla 3. Relación de patrones empleados para la separación por TLC, junto con su procedencia.

Tabla 4. Preparación de los puntos de la recta patrón de BSA.

Tabla 5. Rampa de temperaturas programada para el método de análisis por GC/MS .La rampa de temperaturas es la misma tanto para el análisis de FAMES como para DMOX.

Tabla 6. Relación de fragmentos característicos de los espectros de fragmentación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos y de sus dimetiloxazolinias correspondientes.

Tabla 7. Tiempos de retención de los distintos isómeros del ácido palmitoleico analizados

Tabla 8. Recopilación de los tiempos de retención de los estándares analizados como DMOX.