



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Determinación de oxilipinas mediante UHPLC-MS/MS

Autora: Cristina Asensio Pérez

Tutores: David Balgoma Hernando

María del Rosario Iglesias Álvarez

Año 2024

Quiero agradecer a mi tutor David, por ser la guía de este proyecto, por su dedicación y ayuda. Sus conocimientos y experiencia han sido fundamentales para la elaboración de este trabajo.

A mi tutora Rosario, por su apoyo y ánimo. Gracias por tu disponibilidad y tu implicación.

A Javi y Alma, por su ayuda, paciencia y disposición.

A mis padres, por ser mi pilar fundamental, que, gracias a su amor incondicional y sus valores, han hecho que todo lo que me proponga lo consiga. A mi madre, por su apoyo incondicional y a mi padre, un gran referente para mí, que desde el cielo espero que estés orgulloso de mí.

A mi familia, por estar siempre y confiar en mí.

A mis amigos, por apoyarme y escucharme siempre. Gracias por acompañarme en esta etapa.

Índice:

Resumen.....	5
Abstract.....	7
Listado de acrónimos.....	9
1. Introducción.....	13
1.1. Diversidad estructural de las oxilipinas.....	13
1.2. Ácidos grasos precursores de las oxilipinas.....	16
1.3. Rutas de biosíntesis de las oxilipinas.....	19
1.4. Producción de oxilipinas por macrófagos.....	20
1.5. Análisis de las oxilipinas.....	21
1.5.1. Extracción en fase sólida (SPE).....	21
1.5.2. Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem (UHPLC-MS/MS).....	22
2. Objetivos.....	24
3. Métodos y materiales.....	25
3.1. Material, reactivos e instrumentación.....	25
3.1.1. Material biológico.....	25
3.1.2. Estándares internos deuterados.....	25
3.1.3. Oxilipinas.....	25
3.1.4. Muestras biológicas.....	25
3.1.5. Material y reactivos químicos.....	26
3.1.6. Instrumentación.....	26
3.2. Software.....	27
3.3. Cultivo y mantenimiento de las células.....	27
3.4. Preparación de las disoluciones.....	27
3.4.1. Preparación de una disolución multipatrón.....	27
3.4.2. Preparación de disoluciones de los estándares internos (ISs).....	28
3.4.3. Línea de calibrado.....	28
3.5. Muestras biológicas con diferentes tratamientos de inflamación de bajo grado.....	29
3.6. Extracción en fase sólida, SPE.....	31
3.7. Extracto de medio de cultivo dopado antes de la extracción en fase sólida.....	33
3.8. Extracto de medio de cultivo dopado después de la extracción en fase sólida.....	33
3.9. Determinación mediante UHPLC-MS/MS.....	34
4. Resultados y discusión.....	37
4.1. Línea de calibrado.....	37
4.2. Cuantificación del efecto matriz, recuperación y eficiencia.....	39

4.3. Cuantificación de las oxilipinas en sobrenadantes de macrófagos activados.....	42
5. Conclusiones.....	46
6. Bibliografía.....	48
Anexos	51

Resumen.

Las oxilipinas son una clase de lípidos bioactivos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, conocidos por su papel en la regulación de la inflamación y otras funciones fisiológicas cruciales como la regulación de la presión arterial. Debido a su diversidad estructural y baja abundancia en muestras biológicas, su análisis representa un desafío significativo. Tradicionalmente, los métodos de análisis de estas moléculas han incluido inmunoensayos, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de líquidos con detectores de matriz de diodos o fluorescencia, y electroforesis capilar con detectores de matriz de fotodiodos. Sin embargo, estos métodos han demostrado tener sensibilidades bajas y limitaciones en la precisión y especificidad. Para superar estas limitaciones, se ha desarrollado un método analítico basado en cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) con monitoreo de múltiples reacciones (MRM). Este enfoque avanzado permite la caracterización y cuantificación precisa de oxilipinas en muestras biológicas. En este contexto, se realizaron estudios específicos para la cuantificación de oxilipinas nativas y estándares internos deuterados. Se construyó una línea de calibrado con diferentes niveles de concentración para evaluar la sensibilidad, el rango lineal, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Además, se llevó a cabo la extracción en fase sólida (SPE) de sobrenadantes de células RAW 264.7 tratadas con LPS, así como de medios de cultivo dopados, para determinar el efecto matriz, la recuperación y la eficiencia del método. Este método UHPLC-MS/MS con el modo de trabajo MRM ha demostrado ser altamente sensible y preciso, con la capacidad de analizar perfiles complejos de oxilipinas en muestras biológicas, lo que abre nuevas oportunidades en el campo de la lipidómica biomédica y la investigación de procesos inflamatorios.

Abstract.

Oxylipins are a class of bioactive lipids derived from polyunsaturated fatty acids, known for their role in regulating inflammation and other crucial physiological functions such as blood pressure regulation. Due to their structural diversity and low abundance in biological samples, their analysis poses a significant challenge. Traditional methods for analyzing these molecules have included immunoassays, thin-layer chromatography (TLC), liquid chromatography with diode array or fluorescence detectors, and capillary electrophoresis with photodiode array detectors. However, these methods have shown low sensitivities and limitations in precision and specificity. To overcome these limitations, an analytical method based on ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with multiple reaction monitoring (MRM) has been developed. This advanced approach allows for precise characterization and quantification of oxylipins in biological samples. In this context, specific studies were conducted for the quantification of native oxylipins and deuterated internal standards. A calibration curve was constructed with different concentration levels to evaluate sensitivity, linear range, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). Additionally, solid-phase extraction (SPE) was performed on supernatants from LPS-treated RAW 264.7 cells and spiked culture media to assess matrix effects, recovery, and method efficiency. This UHPLC-MS/MS method with MRM has proven to be highly sensitive and accurate, capable of analyzing complex profiles of oxylipins in biological samples, thus opening new avenues in biomedical lipidomics and inflammatory process research.

Listado de acrónimos.

- 11,12-DiHETrE: (\pm)11,12-dihydroxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic acid.
- 11,12-EpETrE: 11,12-epoxy-(5Z,8Z,14Z)-eicosatrienoic acid.
- 12,13-diHOME: (\pm)12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid.
- 12,13-EpOME: (\pm)12(13)- epoxy-9Z-octadecenoic acid.
- 12-HEPE: (\pm)-12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid.
- 12-HETE: (\pm)12-hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid.
- 12-KETE: 12-oxo-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoic acid.
- 13-HODE: (\pm)-13-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid.
- 13-KODE: 13-oxo-9Z,11E-octadecadienoic acid.
- 14-HDoHE: (\pm)14-hydroxy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-docosahexaenoic acid.
- 15-HEPE: (\pm)15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-eicosapentaenoic acid.
- 15-HETE: (\pm)15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid.
- 15-KETE: 15-oxo-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid.
- 17-HDoHE: (\pm)17-hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid.
- 18-HEPE: (\pm)-18-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid.
- 5-HEPE: (\pm)-5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid.
- 5-HETE: (\pm)5-hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid.
- 5-KETE: 5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid.
- 6-keto-PGF_{1 α} : 9 α ,11 α ,15S-trihydroxy-6-oxo-prost-13E-en-1-oic acid.
- 8,9-DiHETrE: (\pm)8,9-dihydroxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid.
- 8,9-EpETrE: (\pm)8,9-epoxy-5Z,11Z,14Z-eicosatrienoic acid.
- 8-HDoHE: (\pm)8-hydroxy-4Z,6E,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoic acid.
- 8-HEPE: (\pm)-8-hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid.
- 9,10-DiHOME: (\pm)9,10-dihydroxy-12Z-octadecenoic acid.

9,10-EpOME: (\pm)9,10-epoxy-12Z-octadecenoic acid.

9-HODE: (\pm)-9-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid.

9-KODE: 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid.

AA: Arachidonic acid.

ACN: Acetonitrile.

AcOH: Acetic acid.

COX: Cyclooxygenase.

CXP: Collision cell exit potential.

CYP: Cytochrome P450.

d: Deuterium.

DHA: Docosahexaenoic acid.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DP: Drift Potential.

EP: Entrance Potential.

EPA: Eicosapentaenoic acid.

ESI: Electrospray Ionization.

FBS: Fetal Bovine Serum.

GC: Gas Chromatography.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

IBGM: Instituto de Biomedicina y Genética Molecular.

ISs: Internal standards.

LA: Linoleic acid.

LC: Liquid chromatography.

LLE: Liquid-liquid extraction.

LOD: Limit of Detection.

LOQ: Limit of Quantification.

LOX: Lipoxygenase.

LPS: Lipopolysaccharide.

LTB₄: 5S,12R-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraenoic acid.

LTI: Laboratorio de Técnicas Instrumentales.

LXA₄: 5S,6R,15S-trihydroxy-7E,9E,11Z,13E-eicosatetraenoic acid.

m/z: mass-to-charge ratio.

ME: Matrix effect.

MeOH: Methanol.

mL: Milliliter.

mL/min: Milliliter/minute.

MRM: Multiple Reaction Monitoring.

N₂: Nitrogen.

ng: Nanogram.

nM: Nanomolar.

Nº: Number.

P/S/G: Penicillin/ Streptomycin/ Glutamine.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PE: Extraction Efficiency.

PGD₂: 9 α ,15S-dihydroxy-11-oxo-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid.

PGE₂: 9-oxo-11 α ,15S-dihydroxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid.

MW (g/mol): Molecular weight in gram/mol.

PUFAs: Polyunsaturated Fatty Acids.

QqQ: Triple Quadrupole.

Q1: Precursor m/z.

Q3: Product. m/z.

R²: Coefficient of Determination.

RE: Recuperation effect.

RMN: Nuclear Magnetic Resonance.

RT: Retention time.

S/N: Signal/Noise.

SPE: Solid Phase Extraction.

TLC: Thin-Layer Chromatography.

TLR: Toll-like Receptor.

TXA₂: 9S,11S-epoxy,15S-hydroxy-thromboxa-5Z,13E-dien-1-oic acid.

TXB₂: 9 α ,11,15S-trihydroxythromba-5Z,13E-dien-1-oic acid.

UHPLC-MS/MS: Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.

V: Volts.

μ L: Microliters.

ω -3: Omega-3.

ω -6: Omega-6.

1. Introducción.

Las oxilipinas son compuestos lipídicos bioactivos y son moléculas anfipáticas¹ que se originan mediante rutas biosintéticas que implican la oxidación catalítica de ácidos grasos poliinsaturados, también conocidos como PUFAs. En la actualidad, las oxilipinas mejor caracterizadas provienen de los mamíferos y las plantas.

Desde un punto de vista de la señalización biológica, tienen una vida media corta y actúan localmente mediante interacciones con receptores. En concreto, participan en numerosos procesos fisiológicos como la regulación de la presión arterial. Específicamente, en el sistema inmunitario innato, modulan la inflamación, el reclutamiento celular, la señalización del dolor y la fiebre. Además, están implicadas en la progresión de enfermedades complejas tales como cáncer, aterosclerosis y artritis reumatoide².

En la actualidad se han identificado más de 100 especies moleculares distintas de oxilipinas. Esta diversidad surge de la amplia variedad de ácidos grasos precursores y las diversas vías metabólicas que las sintetizan. En los siguientes apartados se presentan sus ácidos grasos precursores y sus rutas de síntesis. Por último, se presentan los métodos utilizados para el análisis de estas moléculas bioactivas.

1.1. Diversidad estructural de las oxilipinas.

La estructura de las oxilipinas puede ser muy diversa. La diversidad estructural está relacionada con su función biológica¹. Entre ellas, destaca la inflamación, lo que las convierte en un área de gran interés en la investigación biológica y biomédica.

Otro factor que hace que las oxilipinas presenten una amplia diversidad estructural se debe a las diferentes enzimas y procesos metabólicos que las generan.

Las oxilipinas que derivan de la oxidación del ácido araquidónico se denominan eicosanoides, los cuales se asocian a la inflamación, incluyendo calor, hinchazón enrojecimiento y pérdida de función, aunque también tienen funciones homeostáticas³.

Las principales familias de oxilipinas que han sido identificadas hasta la actualidad son las siguientes:

- **Prostanoides:**
 - **Prostaglandinas:** son moléculas que tienen un ciclopentano con átomos de oxígeno y dos cadenas alifáticas, se derivan de la oxidación del ácido araquidónico. Por acción de sintetisas específicas se forman prostaglandinas biológicamente activas, siendo la

PGD₂, PGE₂ y 6-keto-PGF_{1α}, las más estudiadas⁴. Son moléculas de señalización de vida media corta, que actúan como mensajeros autocrinos y paracrinos. Sus principales funciones se desarrollan en el sistema nervioso central como la regulación de la memoria, el sueño, la fiebre y el dolor, considerando que están muy relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.⁵ A continuación, en la Figura 1 se muestra la estructura de la oxilipina PGE₂.

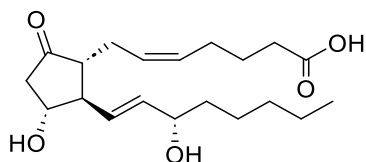


Figura 1. Estructura de la oxilipina PGE₂.

- **Tromboxanos:** tienen en común un esqueleto de 20 carbonos. Se originan cuando la enzima tromboxano A-2 sintetasa, presente en los trombocitos y en los pulmones, convierte la PGH₂ en TXA₂, conocido por su potente capacidad para inducir la agregación de los trombocitos. El TXA₂ es un producto activo pero inestable que se transforma en TXB₂, un producto estable pero inactivo⁴. En la Figura 2 se puede observar la estructura del TXB₂.

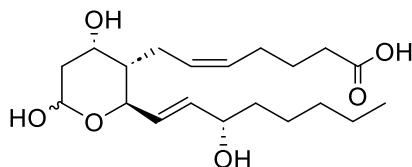


Figura 2. Estructura la oxilipina TXB₂.

- **Leucotrienos:** son moléculas acíclicas y oxigenadas y se encontraron en los leucocitos. Se liberan en el tejido pulmonar con una sustancia de reacción lenta de la anafilaxia, un mediador de los síntomas del asma. Hasta ahora se han descrito cinco leucotrienos: LTA₄, LTB₄ (figura 3), LTC₄, LTD₄ y LTE₄, donde el 4 nos indica la presencia de cuatro dobles enlaces en las diferentes moléculas⁴. Son potentes broncoconstrictores, incrementan la permeabilidad vascular y vénulas postcapilares y estimulan la secreción de moco⁶.

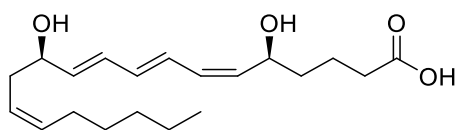


Figura 3. Estructura de la oxilipina LTB₄.

- **Epóxidos de ácidos grasos (EpFAs):** modulan un conjunto diverso de funciones fisiológicas que incluyen la inflamación y la nocicepción, entre otras. La regulación de los EpFAs ocurre principalmente a través de la liberación, biosíntesis y transformación enzimática por el epóxido hidrolasa soluble (sEH). Su papel en la modulación de la inflamación ha sido demostrado en modelos de enfermedades que incluyen patologías cardiovasculares y dolor inflamatorio, pero se extiende a la neuroinflamación y las enfermedades neuroinflamatorias⁷. Un ejemplo de epóxido de ácidos grasos es 8,9-EpETrE y se muestra en la siguiente figura:

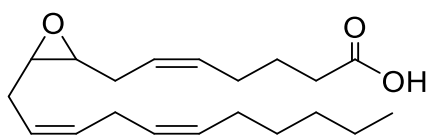


Figura 4. Estructura de la oxilipina 8,9-EpETrE.

- **Hidroxiácidos grasos:** un tipo de oxilipinas que incorporan uno o varios grupos hidroxilo en su estructura. Poseen una potente actividad antiinflamatoria e inmunoreguladora. Destaca la oxilipina 13-HODE (figura 5) y 9-HODE en efectos fisiológicos, como la modulación de la inflamación⁸.

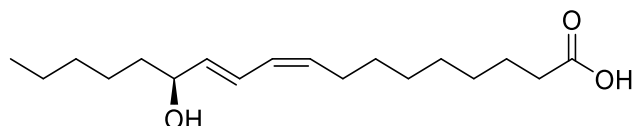


Figura 5. Estructura de la oxilipina 13-HODE.

- **Oxoácidos grasos:** otro tipo de oxilipinas que incorporan uno o varios grupos funcionales oxo en su estructura. Al igual que el resto de oxilipinas, estas también intervienen en la modulación de la inflamación y la respuesta inmune⁹.

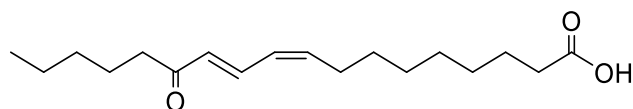


Figura 6. Estructura de la oxilipina 13-KODE.

1.2. Ácidos grasos precursores de las oxilipinas.

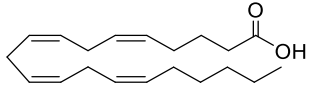
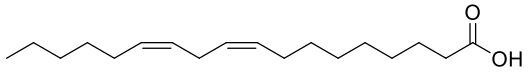
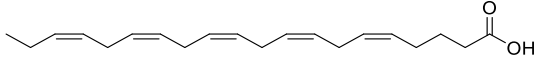
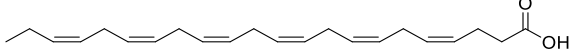
Los ácidos grasos se tratan de los lípidos más simples. Su estructura química está formada por ácidos carboxílicos con cadenas carbonadas de 4 a 36 átomos de carbono que pueden presentar enlaces sencillos o múltiples (por lo general, enlaces dobles). Cuando tenemos ácidos grasos poliinsaturados, los dobles enlaces casi nunca se encuentran conjugados, teniendo una configuración generalmente cis.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son los precursores de las oxilipinas, los más importantes y usados en el análisis de las oxilipinas se encuentran explicados a continuación y recogidos en la Tabla 1.

- **Ácido Araquidónico (AA) (20:4):** donde la notación 20:4 se refiere a un ácido graso de 20 átomos de carbono y 4 insaturaciones. Este ácido graso, se forma a partir del ácido linoleico, un ácido graso esencial. Se trata de un ácido graso poliinsaturado ω -6 constituyente de los fosfolípidos de las membranas celulares y se trata de un precursor clave para la síntesis de algunas oxilipinas como los leucotrienos, el tromboxano y prostaglandinas. Es un componente esencial en nuestra dieta y su metabolismo y regulación son de gran importancia en la fisiología y patología humanas. Se encuentra en el hígado, el cerebro, los órganos glandulares y las grasas de los depósitos animales, pero en menores cantidades en las grasas de depósito de los humanos³. El AA y sus metabolitos ejercen papeles importantes en diversos procesos biológicos como la transducción de señales, la contracción del músculo liso, la regulación del equilibrio homeostático, la quimiotaxis, la proliferación y diferenciación celular y la apoptosis¹⁰. Se ha demostrado que los cambios en los niveles de AA en el organismo corresponden a la síntesis de eicosanoides, las oxilipinas derivadas del AA¹¹.
- **Ácido linoleico (LA) (18:2):** también es un ω -6 desempeñando un papel vital en la salud humana cardiovascular, cerebral y cutánea. Se incluye en los principales alimentos de origen vegetal, especialmente en aceites. Es un componente importante de las membranas celulares contribuyendo en su integridad y fluidez¹². Así mismo, se puede transformar en AA a través de reacciones enzimáticas para que este produzca eicosanoides. Estudios afirmaron que el ácido linoleico dietético reducía los niveles de colesterol en sangre y, por tanto, disminuiría el riesgo del desarrollo de aterosclerosis, por lo que, organizaciones como la Asociación Americana del Corazón recomiendan aumentos de ingesta de grasas poliinsaturadas¹³.

- **Ácido eicosapentanoico (EPA) (20:5):** ácido graso del ω -3 y se encuentra en ciertos pescados azules. Interviene en la regulación funcional cerebral (señal celular y riego sanguíneo neuronal), el desarrollo óptimo del cerebro y la vista. Este es un precursor del DHA¹⁴.
- **Ácido docosahexanoico (DHA) (22:6):** otro ácido ω -3 similar al EPA. Se involucra en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso central, incluido el cerebro, y desempeña un papel muy importante en la visión y la función inmunológica. Forma parte de las membranas celulares y es también muy importante para el desarrollo visual durante la gestación¹⁴.

Tabla 1. Ácidos grasos precursores de las oxilipinas.

PUFAs	Abreviatura	Fórmula molecular	Abreviatura formula molecular	Estructura
Ácido araquidónico	AA	$C_{20}H_{32}O_2$	20:4	
Ácido linoleico	LA	$C_{18}H_{30}O_2$	18:2	
Ácido eicosapentaenoico	EPA	$C_{20}H_{30}O_2$	20:5	
Ácido docosahexaenoico	DHA	$C_{22}H_{32}O_2$	22:6	

1.3. Rutas de biosíntesis de las oxilipinas.

La acción de señalización de las oxilipinas es potente pero su estabilidad es baja, por lo que no se almacenan en el cuerpo, pero sí se sintetizan de nuevo y se regulan de forma estricta. Su biosíntesis implica la transformación de los ácidos grasos poliinsaturados en diversas moléculas bioactivas mediante diversas enzimas¹⁵:

- **Ciclooxigenasas (COX):** transforman el ácido araquidónico libre, en PGH₂, un precursor de varias prostaglandinas como la PGE₂ y tromboxanos como TXA₂. Además, las COX también pueden producir metabolitos hidroxilados como 11-HETE a partir del ácido araquidónico o 9-HODE a partir del ácido linoleico¹⁵. Existen dos isoformas COX-1 (constitutiva) y COX-2 (inducible)¹⁶.
- **Lipoxigenasas (LOX):** catalizan la formación de ácidos grasos con grupos hidroperoxi que se reducen a grupos hidroxilados. Metabolizan el ácido araquidónico para formar HETEs de cadena media, incluyendo otros metabolitos como leucotrienos y lipoxinas¹⁵.
- **Citocromo P450 (CYP):** originalmente eran conocidas por sus papeles en el metabolismo de xenobióticos y tienen actividad de epoxigenasa u ω-hidroxilasa. Las enzimas ω-hidroxilasas metabolizan el ácido araquidónico y generan HETEs terminales, mientras que la epoxigenasa metaboliza el ácido araquidónico y genera EpETrEs y DiETrEs y también el ácido linoleico generando EpOMEs¹⁵.
- **Síntesis no enzimática:** rutas donde no se involucra la acción de ninguna enzima específica, pero se generan oxilipinas mediante otro tipo de reacciones. Algunos ejemplos son la oxidación espontánea de los PUFAs cuando están expuestos al oxígeno atmosférico o especies reactivas que contengan oxígeno (ROS). También reacciones de ciclo adición o interacciones con especies reactivas como el peróxido de hidrógeno o radicales hidroxilos¹⁷.

La principal fuente de oxilipinas son las rutas generadas por vías enzimáticas mediadas por COX, LOX y CYP.

En la siguiente figura se muestra un esquema general de la biosíntesis de las principales oxilipinas:

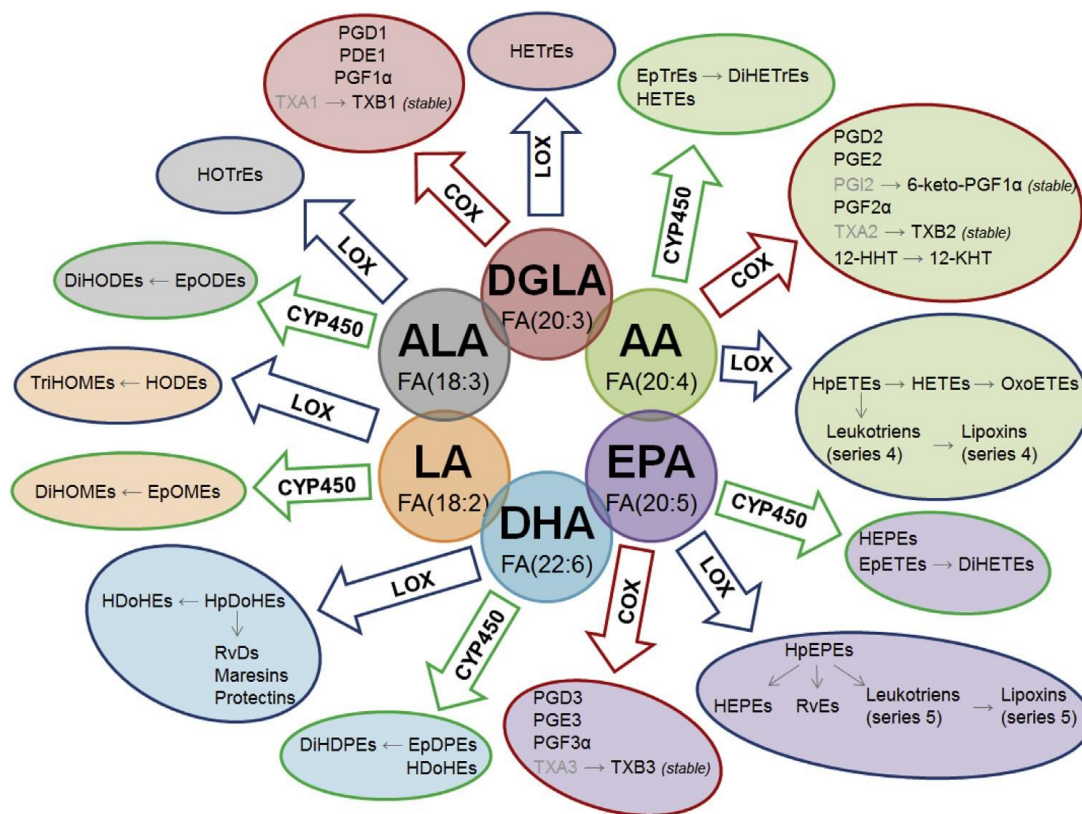


Figura 7. Biosíntesis de las principales oxilipinas. Figura tomada de Cebo et al.¹⁸

1.4. Producción de oxilipinas por macrófagos.

Un macrófago es un tipo de glóbulo blanco que rodea y destruye los microorganismos, elimina las células muertas y estimula la acción de otras células del sistema inmunitario¹⁹.

Los macrófagos producen una serie de prostaglandinas derivadas del ácido araquidónico en respuesta a estímulos del receptor tipo Toll (TLR), pero las prostaglandinas específicas y las cantidades producidas después de la estimulación difieren marcadamente entre los macrófagos según su origen y el método de aislamiento; de modo que existen diferencias en la producción de prostaglandinas entre los macrófagos peritoneales inducidos por tioglicolato y los macrófagos derivados de médula ósea, así como entre los macrófagos primarios y una línea celular de macrófagos transformados²⁰.

Se ha demostrado que el acoplamiento funcional de la sintasa de TXA₂ y la sintasa de PGD₂ con COX-1, casi todas en el retículo endoplasmático, producen preferentemente eicosanoides TXA₂ y PGD₂ durante la estimulación a corto plazo de macrófagos peritoneales de rata. Además, la sintasa de PGE₂ y la sintasa PGI₂ están acoplados con COX-2 en la membrana perinuclear, y producen PGE₂ y PGI₂ durante la fase tardía de la respuesta inducida LPS, un liposacárido o endotoxina de la pared celular de bacterias Gram negativas, que actúa como un

potente inductor de la respuesta inflamatoria. Este tratamiento tiene como objetivo estudiar el perfil de las oxilipinas producidas según las condiciones específicas del tratamiento con LPS. Para evaluar este efecto, las células se tratan con diferentes concentraciones específicas de LPS durante distintos periodos de tiempo para inducir la respuesta inflamatoria²⁰.

1.5. Análisis de las oxilipinas.

Las oxilipinas se caracterizan por su baja estabilidad, similitud estructural y a menudo por su baja concentración en las muestras, lo que supone un gran desafío en su investigación y requiere realizar un enfoque dirigido¹. Por ello, en estos últimos años, se han desarrollado nuevos métodos de extracción y análisis de oxilipinas. Tradicionalmente, los métodos de análisis de oxilipinas se basaban en inmunoensayos, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con un detector de matriz de diodos o fluorescencia y electroforesis capilar con un detector de matriz de fotodiodos. Pero, debido a la baja sensibilidad de estos métodos de análisis han sido sustituidos por métodos modernos basados en la espectrometría de masas (MS) combinada con cromatografía de líquidos (LC) y cromatografía de gases (GC). La cromatografía de gases requiere derivatizar los compuestos lo que limita su aplicación²¹. Estos métodos nos permiten identificar cualitativamente y cuantitativamente diferentes niveles de concentración de oxilipinas en muestras biológicas.

1.5.1. Extracción en fase sólida (SPE).

Para obtener una buena recuperación del analito objetivo y la reproducibilidad requerida para un análisis preciso posterior, es fundamental seleccionar un método de extracción adecuado. Los principales métodos de extracción son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). Este último es el más utilizado debido a la abundante disponibilidad de sorbentes (fase sólida) y disolventes²². Ambos métodos de extracción se han agrupado según las características del material biológico analizado (cultivos celulares, tejidos, biofluidos). Para lograr una cuantificación precisa es crucial tener una buena calidad de recolección, almacenamiento y métodos de extracción debido a estos niveles bajos de concentración de oxilipinas de las muestras biológicas. La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de extracción y purificación²³ que se encarga de separar selectivamente los analitos de interés de la muestra original, eliminando los posibles interferentes de la matriz de la muestra.

La metodología a seguir consta de cuatro etapas principales²⁴ que se esquematizan en la Figura 8:

- **Acondicionamiento del cartucho:** se utiliza un disolvente adecuado como metanol (MeOH) para eliminar el aire y solvatar los puntos activos para interacción más efectiva con los analitos. A continuación, se pasa otro disolvente con polaridad similar a la muestra para equilibrar el sorbente con el disolvente para mejorar la retención del analito.
- **Paso de muestra:** generalmente, antes del paso de muestra, esta necesita un pretratamiento para favorecer la retención cuantitativa del analito.
- **Lavado:** se eliminan los interferentes con una mezcla de agua y un bajo porcentaje de disolvente orgánico que hayan podido quedarse retenidos en el sorbente y los componentes de la matriz que han quedado embebidos.
- **Elución:** se hace pasar un disolvente capaz de romper las interacciones analito-sorbente para arrastrar los analitos de interés.

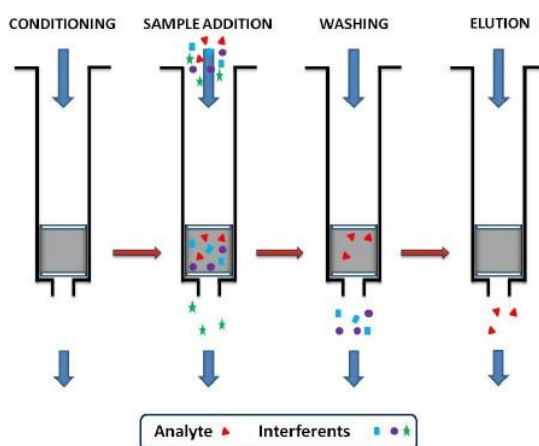


Figura 8. Procedimiento de la extracción en fase sólida (SPE). Figura tomada de Oscar Nuñez et al.²⁴

1.5.2. Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem (UHPLC-MS/MS).

La determinación de oxilipinas mediante la cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem (UHPLC-MS/MS) con monitoreo de reacción múltiple (MRM) es el método más utilizado para analizar oxilipinas²⁵. Este método es necesario para la separación de múltiples isómeros (por ejemplo, PGE₂ y PGD₂) y para alcanzar los límites de detección adecuados (rango pM-nM).

Debido a la complejidad de las muestras biológicas, las diferencias en la eficiencia de ionización y la intensidad de la señal de cada analito, se emplean estándares internos marcados isotópicamente para una cuantificación precisa.¹

La separación cromatográfica mediante UHPLC más común de oxilipinas se lleva a cabo con una columna de fase inversa C18 debido a la afinidad de estas por la fase estacionaria y a su separación y reproducibilidad.

La detección cromatográfica más utilizada es un sistema de espectrometría de masas acoplado a un cromatógrafo de ultra-alta resolución, el cual nos permite monitorizar y cuantificar los analitos estudiados que para poder ser analizados deben estar ionizados en fase gaseosa. Para ello se utiliza un interfaz, el cual está formado por un sistema de introducción de muestra donde una aguja bombea la muestra, formando una neblina de gotas hacia una cámara de nebulización a presión atmosférica, donde sufren la desolvatación lo que disminuye el tamaño de gota, y la fuente de ionización, donde se aplica un voltaje para la ionización de los analitos. Se utiliza más comúnmente en la determinación de oxilipinas una fuente blanda y desorción, como un sistema de electrospray (ESI) en modo negativo, en la cual se forma un aerosol donde se encuentran tanto los analitos como el disolvente. Sobre el capilar de ionización se aplica un potencial eléctrico y a su vez, se introduce N₂, el gas de secado, el cual se va a encargar de eliminar el disolvente²⁶.

Como analizador de masas, para analizar oxilipinas, lo más común es un triple cuadrupolo (QqQ), donde se separan los iones en función de su masa/carga (m/z) empleando un ultra vacío con el fin de evitar las colisiones de los analitos con otras partículas gaseosas.

En el primer cuadrupolo (Q₁), se selecciona la m/z del precursor de cada oxilipina y se fragmenta en la celda de colisión (q) mediante una energía de colisión aplicada por el gas N₂ en altas condiciones de energía lo que nos permite monitorizar dos de las transiciones (ión padre-fragmento) que son características de cada compuesto. En el segundo cuadrupolo (Q₃) selecciona la m/z de los iones fragmento²⁶.

La primera transición, también denominada *quantifier*, se selecciona como la más intensa y la utilizada para identificar y cuantificar el compuesto cromatográficamente, se trata del ión empleado para el cálculo del límite de detección y límite de cuantificación. Y la segunda transición, también denominada *qualifier*, menos intensa, para confirmar que el compuesto aparece al mismo tiempo de retención que en la transición de cuantificación.

Como elemento final, en el detector, se detecta el ión de interés a través del suministro de una señal eléctrica proporcional a la concentración del compuesto²⁶.

Los parámetros de análisis del espectrómetro de masas son característicos de cada analito y son los siguientes:

- La masa del pseudoión molecular o el precursor (Q1).
- La masa del fragmento o producto (Q3).
- El potencial de entrada al espectrómetro de masas (DP), nombre específico de un equipo Sciex.
- La energía de colisión para la fragmentación al pseudoión molecular (CE).
- El potencial de salida de la celda de colisión (CXP) que focaliza los iones antes de su entrada al tercer cuadrupolo, nombre específico de un equipo Sciex.
- El voltaje EP (potencial de extracción) necesario para la colimación inicial de los iones.

En la siguiente figura se observan los parámetros comentados anteriormente para un analizador de masas de la marca Sciex:

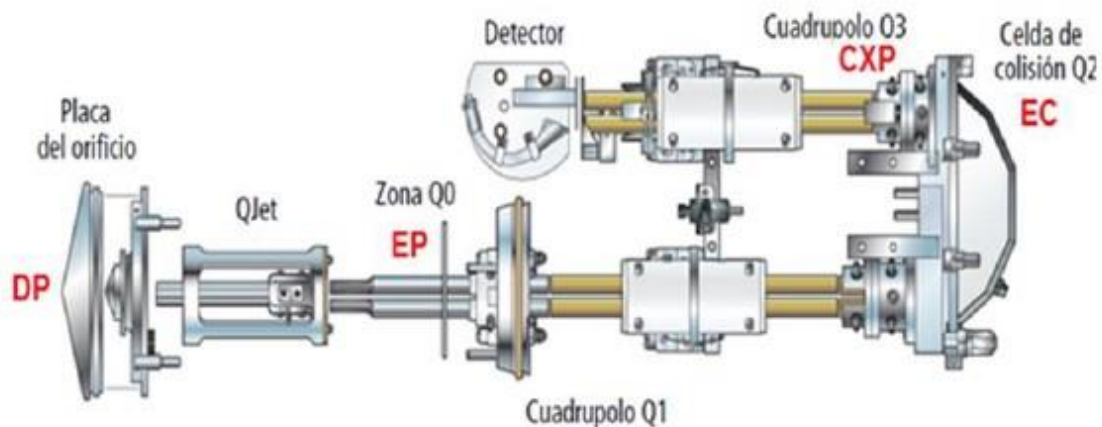


Figura 9. Parámetros de análisis de un espectrómetro de masas Sciex.

2. Objetivos.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal desarrollar un método para la determinación y cuantificación de oxilipinas mediante UHPLC-MS/MS.

Para ello, el primer objetivo específico fue realizar la línea de calibrado utilizando diferentes niveles de concentración para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación. Esto incluyó la sensibilidad del método y la determinación del rango lineal de la curva de calibrado.

El segundo objetivo específico fue evaluar el rendimiento de extracción, el efecto matriz y la eficiencia del método en medio de cultivo como matriz.

El objetivo final fue cuantificar las oxilipinas secretadas por macrófagos activados.

3. Métodos y materiales.

3.1. Material, reactivos e instrumentación.

3.1.1. Material biológico.

Las muestras de células que se utilizaron proceden de la línea celular RAW 264.7. Esta línea celular se mantuvo en medio DMEM suplementado con FBS al 10% (v/v).

En la siguiente tabla se muestra el material y los reactivos utilizados para el mantenimiento, tratamiento y cultivo de las células.

Tabla 2. Material y reactivos biológicos.

Material	Reactivos
Micropipetas, Gilson Pipetman.	LPS, Sigma.
Microtubos, Gilson.	Medio DMEM completo (10% FBS, 1% P/S/G), Capricorn Scientific.
Placas adherentes de 6 pocillos (9,6 cm ² /pocillo), Corning	Medio DMEM pobre en suero (0.5% FBS, 1% P/S/G), Capricorn Scientific.
Puntas de micropipetas, Fisher Scientific.	Medio DMEM sin suero (1% P/S/G), Capricorn Scientific.
Tubos cónicos de 15 mL, Corning.	PBS, Fisher Scientific.
	Trypan Blue Dye, Bio-Rad.

3.1.2. Estándares internos deuterados.

Los estándares internos deuterados se compraron en la casa comercial Cayman Chemical como mixes de 4-5 oxilipinas deuteradas y vienen recogidas en la tabla 10 en anexos.

3.1.3. Oxilipinas.

Estas oxilipinas también se han adquirido de la casa comercial de Cayman Chemical y se encuentran en la tabla 11 de anexos.

3.1.4. Muestras biológicas.

Las muestras utilizadas fueron sobrenadantes extraídos de células RAW 264.7 activados con LPS en diferentes concentraciones (1, 5, 10, 100 y 1000 ng/mL) y extractos de medios de cultivo.

3.1.5. Material y reactivos químicos.

Tabla 3. Material y reactivos químicos.

Material	Reactivos
Cartuchos SPE C18 (100 mg / 3 mL), Phenomenex.	Agua Milli Q, Millipore.
Matraces aforados de 1 y 2 mL.	MeOH LC-MS, Fisher Scientific.
Micropipeta P10 de desplazamiento positivo, Gilson Pipetman.	ACN LC-MS, Fisher Scientific.
Micropipeta P1000, Gilson Pipetman.	Ácido fórmico LC-MS, Fisher Scientific.
Micropipeta P200, Gilson Pipetman.	AcOH, LC-MS, Fisher Scientific.
Microtubos de 1.5 y 2 mL, Gilson.	
Pipetas de 5 y 10 mL.	
Pipetas pasteur de vidrio.	
Probeta 100 ml, Fisher Scientific.	
Puntas para las micropipetas, Fisher Scientific.	
Tubos cónicos de 15 mL, Corning.	
Viales cromatográficos de 2 mL, Fisher Scientific.	

3.1.6. Instrumentación.

Tabla 4. Instrumentos empleados.

Instrumentos
Bomba de vacío.
Cámara de extracción en fase sólida de 12 puertos.
Campana de flujo laminar.
Centrífuga 5415R, Eppendorf.
Equipo Automated Cell Counter TC20TM, Bio-RAD.
Incubador termostatzado de CO ₂ .
Mezclador vortex, VWR.
Microscopio Leica.
Purificador de agua ultrapura (MiliQ), Milli-Q Advantage A10 de Merck Millipore.

UHPLC-MS/MS (UHPLC ExionLC AD con inyector automático y espectrómetro de masas SCIEX 6500+).

Evaporador al vacío (speed-vac) Concentrator Eppendorf.

3.2. Software.

- Analyst.
- Excel.
- Sciex OS.
- R.
- Word.

3.3. Cultivo y mantenimiento de las células.

Las células que se han utilizado para llevar a cabo el tratamiento de muestra con LPS provienen de la línea celular RAW 264.7 y se han estado cultivando por Javier Blanco, doctorando en el grupo de investigación, durante 3 días en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ en el Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM) hasta su utilización.

Para que las células crezcan adecuadamente se debe cambiar su medio de cultivo cada 2 a 3 días con medio DMEM completo (10% FBS, 1% P/S/G) con el fin de reponer nutrientes y eliminar productos de deshecho.

La duplicación de las células RAW 264.7 se realiza en torno a las 16-18 horas en frascos de cultivo de 75 cm² y completo puede alcanzar de 30 a 40 millones de células.

Para utilizar las células en el tratamiento con LPS y aislar los sobrenadantes se deben sembrar las células en un medio DMEM pobre en suero (0.5% FBS, 1% P/S/G) para que estas se dividan lo menos posible.

Las muestras se han estado cultivando en medio alto en glucosa. Se siembran 1 millón de células por pocillo en placas de 6 pocillos.

3.4. Preparación de las disoluciones.

La preparación de todas las disoluciones de oxilipinas se llevó a cabo en el Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM) y se conservaron en viales a -20°C.

3.4.1. Preparación de una disolución multipatrón.

Para preparar una disolución multipatrón, previamente se llevaron a cabo pruebas para determinar de manera aproximada el límite de detección de las oxilipinas seleccionadas. Este

proceso fue muy importante para establecer las concentraciones mínimas detectables de cada oxilipina en las muestras analizadas. A partir de los resultados obtenidos, se procedió a determinar las concentraciones óptimas de cada oxilipina que deben estar presentes en la disolución multipatrón. Esta etapa garantizó que cada compuesto estuviera dentro de un rango lineal de detección adecuado para nuestro instrumento y obtuviéramos una línea de calibrado robusta y confiable desarrollada para proporcionar resultados precisos y reproducibles durante el análisis cuantitativo de las muestras.

Finalmente, se preparó una disolución multipatrón de oxilipinas no deuteradas en metanol (MeOH), denominada OX_Disoluciónmadre_Mix1, en la cual la concentración de las oxilipinas oscila entre 1500 y 3000 nM, siendo esta última la concentración para los linoleatos. Además, se realizó una dilución 1:200 de esta disolución para crear una nueva, denominada OX_Disoluciónmadre_Mix2. Esta medida se adoptó para realizar los puntos de menor concentración en la línea de calibrado.

3.4.2. Preparación de disoluciones de los estándares internos (ISs).

Se realizaron dos disoluciones adicionales para dopar la línea de calibrado y utilizarlas en las muestras. La primera consistió en una mezcla de estándares internos en MeOH, con una concentración aproximada de 600 nM cada uno, denominada OX_ISs_600nM. Para la segunda disolución, se realizó una dilución de la disolución OX_ISs_600nM para obtener una concentración nominal de 200 nM de cada estándar, designada como OX_ISs_200nM.

Los estándares internos deuterados tienen las propiedades fisicoquímicas más parecidas posibles a los analitos nativos. Por ello, son la mejor opción para corregir tanto el efecto de la extracción, como la cromatografía y la ionización para optimizar la precisión y la exactitud del método.²

3.4.3. Línea de calibrado.

Para la preparación de la línea de calibrado se emplearon las disoluciones OX_Disoluciónmadre_Mix1 y OX_Disoluciónmadre_Mix2. Para los niveles más concentrados, es decir, del 1 a 5, se utilizó la disolución OX_Disoluciónmadre_Mix1 y para los niveles menos concentrados, es decir, del 6 al 10, se empleó la disolución OX_Disoluciónmadre_Mix2.

Cada punto de la línea de calibrado se preparó en matraces aforados de 1 mL, donde se añadió el volumen especificado de la disolución correspondiente según la tabla 5. Además, en cada punto se añadieron 33,3 µL de la disolución OX_ISs_600nM para alcanzar una concentración aproximada de 20 nM de cada estándar interno, 500 µL de agua mili-Q, y se completó el volumen con MeOH hasta el enrase.

Se realizó una regresión lineal ponderada 1/x, donde x es la concentración de analito.

Tabla 5. Línea de calibrado con los diferentes niveles de concentración.

Nivel de concentración	Disolución	µL
		Disolución
Nivel 1	OX_Disoluciónmadre_Mix1	400
Nivel 2	OX_Disoluciónmadre_Mix1	200
Nivel 3	OX_Disoluciónmadre_Mix1	80
Nivel 4	OX_Disoluciónmadre_Mix1	20
Nivel 5	OX_Disoluciónmadre_Mix1	7
Nivel 6	OX_Disoluciónmadre_Mix2	400
Nivel 7	OX_Disoluciónmadre_Mix2	160
Nivel 8	OX_Disoluciónmadre_Mix2	50
Nivel 9	OX_Disoluciónmadre_Mix2	16
Nivel 10	OX_Disoluciónmadre_Mix2	8

Los niveles de concentración de cada oxilipina varían de forma general desde 0,06 nM a 1200 nM y se encuentran recogidos en la Tabla 12 de los anexos.

3.5.Muestras biológicas con diferentes tratamientos de inflamación de bajo grado.

Javier Blanco realizó el siguiente tratamiento de las células:

Se sembraron 3 placas de 6 pocillos cada una, a razón de 1×10^6 células por pocillo, es decir, 18 millones de células RAW 264.7 y se realizó un tratamiento de inflamación de bajo grado utilizando diferentes concentraciones de LPS para determinar y cuantificar las oxilipinas generadas mediante UHPLC-MS/MS. A continuación, se desarrolla el protocolo experimental aplicado.

Una vez sembradas las células en las placas se dejaron durante toda la noche añadiendo 2 ml de medio DMEM pobre en suero en cada pocillo.

Pasadas las 22 horas, se cambió el medio de las células a medio DMEM sin suero (1% P/S/G). Después de 2 horas se realizó el tratamiento con LPS en el que se tratan las células a diferentes concentraciones específicas durante distintos periodos de tiempo para inducir la respuesta inflamatoria, recogidas en la tabla 6 que hace referencia a una placa. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis detallado y cuantitativo de las oxilipinas generadas en cada tratamiento mediante UHPLC-MS/MS.

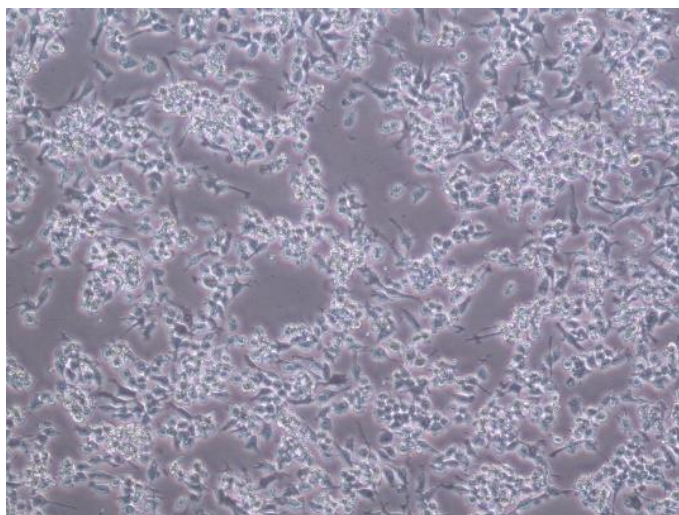
El LPS se disolvió en PBS estéril a una concentración inicial de 1 mg/ml realizando las diferentes diluciones para cada concentración teniendo un volumen final de 2 μ L en cada pocillo. Para el control se añadieron 2 μ L de PBS estéril.

Tabla 6. Tratamiento de las células con diferentes concentraciones de LPS en ng/mL.

C	1	5
10	100	1000

Las células se trataron en esas condiciones durante 18 horas y pasado este tiempo se aislaron los sobrenadantes en microtubos de 1.5 mL, se centrifugaron a 12.000 g durante 2 minutos para eliminar posibles residuos, células muertas principalmente, y se congelaron a -20°C para evitar su degradación para días posteriores realizar la extracción en fase sólida y realizar los análisis correspondientes mediante UHPLC-MS/MS.

A continuación, se muestra una imagen de unas células a las que se les ha aplicado el tratamiento de LPS en mayor concentración, observando que los macrófagos activados se encuentran alargados debido al tratamiento que se les ha aplicado.



*Figura 10. Activación de los macrófagos tras el tratamiento de 1000 ng/mL de LPS.
Imagen obtenida mediante un microscopio con un aumento 20X.*

3.6.Extracción en fase sólida, SPE.

El equipo utilizado para la realización de la extracción en fase sólida es una cámara de extracción en fase sólida con configuración de 12 puertos conectado a una bomba de vacío tal como se muestra en la siguiente figura:

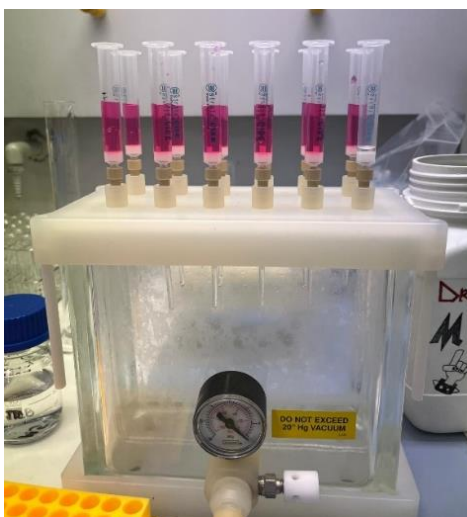


Figura 11. Cámara de vacío empleada para la extracción en fase sólida (SPE).

Se utilizan cartuchos SPE C18 desechables específicos donde se retienen los analitos de interés para extraerlos.

El proceso seguido en cada cartucho SPE fue el siguiente²¹:

- 1. Activación del cartucho:** se adicionaron 3 mL aproximadamente de MeOH y se deja que vaya cayendo por gravedad.
- 2. Acondicionamiento del cartucho:** se añadieron 3 mL H₂O Mili-Q.
- 3. Paso de muestra:** se tomaron 1.5 mL del sobrenadante o extracto del medio de cultivo el con la micropipeta P1000 y se transfirió a un microtubo de 1.5 mL.
Se centrifugó el extracto a 12000 rpm durante 1 minuto y se añadieron 10 µL con la pipeta de desplazamiento positivo de la disolución de los estándares internos, OX_ISs_200nM.
Se añadieron 150 µL de MeOH al 10%, 75 µL de AcOH al 10% y se mezcló con el vortex durante 20 segundos aproximadamente.
Se transfirió al cartucho SPE C18 y se dejó pasar la muestra.
- 4. Lavado:** se añadieron 3 mL de MeOH al 10% en H₂O por las paredes de cada cartucho.
- 5. Secado:** se conectó el sistema de vacío durante 5 minutos para eliminar el H₂O.
- 6. Elución:** se adicionó 1 mL de MeOH y se recogió en microtubos.
- 7. Evaporación del disolvente:** los extractos se evaporaron a vacío (Figura 12) durante 2-3 horas, si quedara algo de disolvente, generalmente agua, se evaporó con un flujo de nitrógeno hasta sequedad.
- 8.** Se resuspendieron los extractos en 100 µL de MeOH/H₂O (50:50).
- 9.** Se agitaron mediante vortex durante 10 segundos aproximadamente.
- 10.** Se centrifugó a velocidad máxima durante 2 minutos.
- 11.** Se transfirieron 90 µL al vial de inyección con inserto de 200 µL.
- 12.** Se congelaron los viales a -20°C hasta el día del análisis en el UHPLC-MS/MS.



Figura 12. Speed-vac.

3.7.Extracto de medio de cultivo dopado antes de la extracción en fase sólida

Se tomaron 6 muestras de medio de cultivo sin suero. Para ello, se realizó un tratamiento de muestra, explicado en el paso 3 del procedimiento de la extracción en fase sólida y, además, se añadieron volúmenes específicos para dopar las muestras utilizando 2 niveles de concentración de la disolución OX_Disoluciónmadre_Mix1 utilizada anteriormente para preparar la línea de calibrado. Los volúmenes que se añadieron de la disolución OX_Disoluciónmadre_Mix1 con la pipeta de desplazamiento positivo se encuentran recogidos en la Tabla 7.

Es decir, 3 muestras se doparon para obtener el nivel de concentración final 2 y las otras 3 se doparon para obtener el nivel de concentración final 4.

Tabla 7. Dopado de extractos con nivel de concentración final antes de SPE.

Muestra	Nivel de concentración final	μL añadidos disolución OX_Disoluciónmadre_Mix1
1	Nivel 2	20
2	Nivel 4	2

3.8.Extracto de medio de cultivo dopado después de la extracción en fase sólida.

Se tomaron otras 9 muestras de medio de cultivo sin suero, pero estas se doparon después de la extracción en fase sólida. 3 extractos fueron blancos de extracción, 3 se doparon para obtener la concentración final del nivel de concentración 2 y las otras 3 para el nivel de concentración 4.

El tratamiento de estos extractos de medio de cultivo sigue el mismo procedimiento que las muestras dopadas antes de la extracción en fase sólida, con la excepción del momento en que se adiciona la disolución OX_Disoluciónmadre_Mix1 para doparlas. En este caso, la adición se realiza antes de resuspenderlas en MeOH/H₂O (50:50), utilizando el volumen correspondiente a cada nivel de concentración que se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Dopado de extractos con nivel de concentración final después de SPE.

Muestra	Disolución madre	Nivel de concentración final	μL Disolución madre	μL MeOH	μL H ₂ O
Blanco	-	-	-	50	50
1	OX_Disoluciónmadre_Mix1	2	20	30	50
2	OX_Disoluciónmadre_Mix1	4	2	48	50

3.9. Determinación mediante UHPLC-MS/MS.

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de las oxilipinas mediante cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid:



Figura 13. UHPLC-MS/MS empleado para determinación de las oxilipinas del Laboratorio de Técnicas Instrumentales.

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo la determinación de 32 oxilipinas mediante UHPLC-MS/MS con 21 estándares internos deuterados con unas condiciones de separación cromatográfica y la utilización de transiciones MRM específicas para la identificación y cuantificación precisas de las oxilipinas.

La separación cromatográfica fue llevada a cabo con un UHPLC Sciex ExionLC con una columna de fase inversa HSS T3 (100 x 2.1 mm, 1.8 μm), + T3 Van Guard pre-column (5 x 2.1 x 1.8 μm). Durante el análisis la columna se mantuvo a 40°C.

La fase móvil A consistió en una mezcla de H₂O/ACN (95:5) con un 0.1% de ácido fórmico y la fase B consiste en ACN con un 0.1% de ácido fórmico, de proporciones variables según el gradiente cromatográfico utilizado, el cual se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Gradiente cromatográfico de la fase móvil.

Tiempo/min	A%	B%
1	75	25
2	60	40
4	40	60
5	30	70
6	25	75
7	20	80
8	15	85
11	100	0
14	75	25
18	75	25

Se utilizó un gradiente de 18 minutos para separar 53 oxilipinas en el cual la primera oxilipina eluye a partir del minuto 4.94, la 6-keto-PGF_{1 α} .

El flujo de la fase móvil se mantuvo constante durante todo el análisis a 0.3 mL/min y para el volumen de inyección se realizaron pruebas previas. El volumen de inyección seleccionado fue de 10 μ L.

La detección se llevó a cabo con un sistema de espectrometría de masas acoplado a un cromatógrafo de ultra-alta resolución. Su modo de trabajo fue MRM (monitorización de reacciones múltiple). En este caso se utilizó una fuente electrospray (ESI), Ion Drive Turbo V, en modo negativo. Los parámetros de la fuente de ionización fueron:

- Flujo de N₂ (gas de nebulización): 45 unidades.
- Capilar de ionización o voltaje del electrodo: 4500V.
- Gas cortina, N₂: 35 unidades.
- Gas de secado: 45 unidades.
- Temperatura de secado: 400°C.

Como analizador de masas se utilizó un triple cuadrupolo (QqQ) Sciex 6500+, donde se separaron los iones en función de su relación masa/carga (m/z).

Como elemento final se encuentra el detector, un multiplicador de electrones continuo, el cual nos permite detectar el ion de interés suministrando una señal eléctrica proporcional a la concentración del compuesto.

En la tabla 13 situada en los anexos, se muestran los diferentes parámetros de operación óptimos tales como los tiempos de retención² para cada compuesto, la masa del pseudoion molecular o el precursor (Q_1), la masa del fragmento o producto (Q_3), el potencial de entrada al espectrómetro de masas (DP) y la energía de colisión para la fragmentación al pseudoion molecular (CE)²¹.

Aparte, el potencial de salida de la celda de colisión (CXP) con un valor de -11V y el voltaje EP a 10V, los cuales se mantuvieron constantes. El tiempo de observación para cada transición se ajustó de forma automática para obtener 12 puntos de adquisición por pico cromatográfico. Para la adquisición de datos se empleó el software Analyst y para el tratamiento de datos se utilizó el software Sciex OS.

3.10. Tratamiento de datos.

Se generaron cromatogramas en los que se representa la intensidad de la señal frente al tiempo de retención. Estos cromatogramas se procesaron y se integraron mediante el software Sciex OS, cuantificándose el área de los picos cromatográficos.

Los picos cromatográficos fueron integrados automáticamente por el software y revisados manualmente para correcciones necesarias.

Para la determinación de los tiempos de retención de las oxilipinas mediante UHPLC-MS/MS, se consultó el artículo científico de Guan-yuan Chen². Los tiempos de retención son cruciales para la correcta identificación y cuantificación de los compuestos.

Para asegurar una identificación y cuantificación de las oxilipinas, se seleccionaron múltiples transiciones de producto para cada compuesto. Por ello, se consultó el artículo científico de Yan Wang²¹. La selección de estas transiciones es crucial para mejorar la especificidad y sensibilidad del análisis UHPLC-MS/MS.

Para la determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) nos basamos en los criterios de la Comisión Europea 2002/657/EC²⁷.

Para determinar el efecto matriz (ME), el efecto de recuperación (RE) y la eficiencia del proceso se realizó la consulta en el artículo científico de Malgorzata Cebo¹⁸.

4. Resultados y discusión.

4.1. Línea de calibrado.

El método desarrollado fue parcialmente validado²⁷, incluyendo la linealidad y la sensibilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 14 en los anexos junto con las líneas de calibrado para cada analito.

La línea de mejor ajuste de la curva de calibrado para cada oxilipina se obtuvo utilizando un factor de ponderación $1/x$, para mejorar la precisión y exactitud de la cuantificación de las oxilipinas a lo largo de un amplio rango de concentraciones. Este factor de ponderación $1/x$ nos asegura que los puntos de bajas concentraciones contribuyan más significativamente al ajuste de la línea de calibrado.

A la vista de los resultados obtenidos se van a comentar cada uno de los parámetros calculados.

La sensibilidad se define como la pendiente de la línea de calibrado para cada analito. Una pendiente más pronunciada nos indica una mayor sensibilidad. Por lo que como podemos ver en los resultados obtenidos varían desde 0.013-0.865, lo que nos indica que para los analitos con mayor pendiente serán más fácilmente detectables y cuantificables a bajas concentraciones. En cambio, para analitos con menor sensibilidad, estos tienen una respuesta baja en el sistema de detección, lo que dificulta para analitos en bajas concentraciones. Se han obtenido bajas sensibilidades para 6-keto-PGF_{1 α} , 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 8,9-EpETrE, 12,13-EpETrE, 9-HODE, 13-HODE, 9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME, 5-HEPE, 12-HEPE, 15-HEPE, 18-HEPE, 8-HDoHE, 14-HDoHE y 17-HDoHE, lo que implica que para posteriores análisis sería conveniente aumentar la concentración de estos analitos, teniendo en cuenta que muchos pertenecen a la misma familia, lo que nos facilitará la detección de estos analitos.

El coeficiente de determinación (R^2) refleja una buena linealidad para la mayoría de los analitos con $R^2 > 0.99$, excepto para las oxilipinas 12-KETE y la LXA₄ donde R^2 era menor con un valor de 0.98, pero de manera general, nos indica un buen ajuste lineal para la mayoría de los analitos analizados.

Por otro lado, el rango lineal, se define como el intervalo de concentraciones para las que se ha demostrado que el método sigue un comportamiento lineal, es decir, desde la concentración marcada por el límite de detección hasta que se pierde la linealidad en la línea de calibrado, como se observa en la Figura 25.

El límite de detección es la cantidad mínima de analito que proporciona un pico perfectamente diferenciable del ruido de fondo y se ha definido según la Comisión Europea 2002/657/EC²⁷ en la que la relación señal/ruido (S/N) de los analitos debe ser superior a 3. En vista a los resultados obtenidos, se podrán detectar menores concentraciones de analito, por ejemplo, para la PGE₂, con un valor de 5.00×10^{-4} , ya que presenta un límite de detección destacablemente bajo frente al resto. También nos indica que es muy sensible y se pueden detectar trazas muy pequeñas del analito en muestras.

Para el límite de cuantificación, la mínima cantidad de analito que se puede cuantificar de manera precisa y reproducible y según la Comisión Europea 2002/657/EC la relación S/N debe de ser superior a 10. De la misma manera el analito que se cuantifica en concentraciones más pequeñas es la PGE₂.

Los cromatogramas de todas las oxilipinas del nivel 5 se encuentran recogidos en los anexos (Figura 28-Figura 58), observándose picos cromatográficos de baja asimetría excepto para la oxilipina TXB₂.

También se representan las líneas de calibrado de las oxilipinas PGE₂, PGD₂ y 6-keto-PGF_{1 α} en los anexos, como Figura 25, 26 y 27, donde se ha eliminado el punto de mayor concentración para mejorar la linealidad de la curva de calibrado, ya que muestran desviaciones significativas de la línea recta esperada. Su exclusión nos proporcionó una mejor correlación lineal para el resto de los datos, lo cual resultó muy importante para la obtención de resultados cuantitativos y confiables.

Para el caso del cromatograma de la oxilipina 11,12-EpETrE, se observa un pico doble, lo que se denomina una coelución, donde el segundo pico es la presencia de un posible isómero de esta especie ya que la transición MRM no es única para cada oxilipina. Para la confirmación de este posible isómero se podrían utilizar técnicas basadas en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ya que nos proporcionan información detallada de la estructura y configuración de los isómeros, confirmando las diferencias en la posición de los grupos funcionales o en la geometría de los dobles enlaces²⁸. En nuestro caso se confirmó gracias a la segunda transición para identificar la oxilipina correspondiente de manera selectiva.

Además, cabe destacar la forma de pico de la oxilipina TXB₂, se muestra en la Figura 14, donde observamos un pico cromatográfico no gaussiano, pero que también se optimizó. Esta forma de pico se debe a la alta temperatura del cromatógrafo donde se produce un equilibrio cetoenólico del TXB₂²⁹. Si mantuviéramos el cromatógrafo a baja temperatura observaríamos dos picos

bien definidos, diferenciando las dos especies del equilibrio cetoenólico, pero hemos realizado todo el análisis a la misma temperatura.

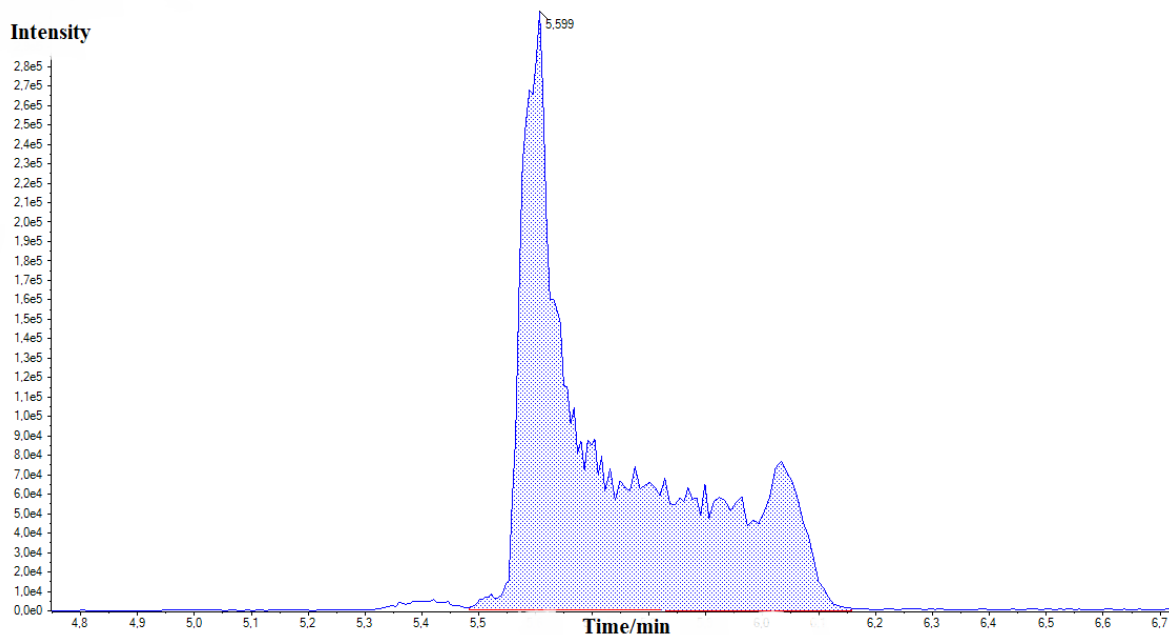


Figura 14. Cromatograma del TXB₂.

4.2. Cuantificación del efecto matriz, recuperación y eficiencia.

Se llevó a cabo la cuantificación del efecto matriz, la recuperación de los analitos y la eficiencia del método en muestras de medios de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

El efecto matriz (ME) mide la influencia de la matriz del medio de cultivo sobre la señal del analito³⁰. Se ha calculado mediante la siguiente fórmula teniendo en cuenta el área de los blancos de extracción:

$$ME = \frac{\text{Área dopada después de la extracción}}{\text{Área}_{\text{patrón}}}$$

Ecuación 1. Efecto matriz.

El efecto de la recuperación (RE) se refiere a la eficiencia con la cual se ha recuperado un analito específico durante el proceso de la extracción³⁰. Se ha calculado mediante la siguiente ecuación:

$$RE = \frac{\text{Área}_{\text{dopada antes de la extracción}}}{\text{Área}_{\text{dopada después de la extracción}}}$$

Ecuación 2. Efecto de la recuperación.

Por último, la eficiencia (PE), se define como la proporción del analito que se recupera y detecta correctamente durante el proceso de extracción en relación con la cantidad teórica del analito³⁰. Se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$PE = \frac{\text{Área}_{\text{dopada antes de la extracción}}}{\text{Área}_{\text{patrón}}} = ME \cdot RE$$

Ecuación 3. Eficiencia

Para visualizar las diferencias de los parámetros calculados entre las diferentes oxilipinas, se realizaron los siguientes gráficos de barras comparativos.

- **Efecto matriz (ME):**

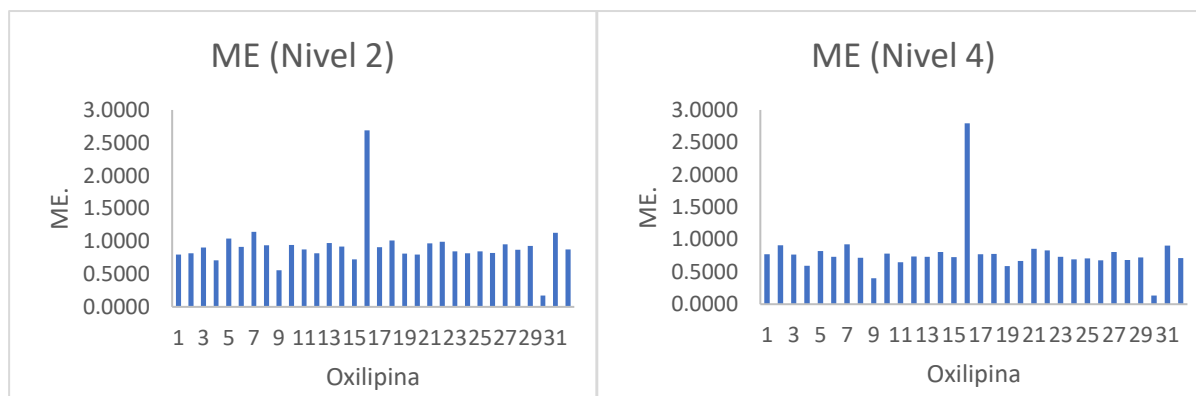


Figura 15. Gráfico comparativo ME nivel 2. Figura 16. Gráfico comparativo ME nivel 4.

A la vista de los resultados obtenidos en la tabla 15 de manera general observamos valores de efecto matriz muy cercanos a 1, lo que nos indica que la matriz no interfiere de manera significativa sobre la señal del analito a excepción de dos casos específicos explicados a continuación.

Para la oxilipina 14-HDoHE, el efecto matriz tiene un valor <1 en ambos niveles de concentración final, concretamente de 0.17 y 0.13, respectivamente, lo que nos indica la reducción de la señal por consecuencia de la matriz, es decir, la matriz interfiere negativamente, disminuyendo la señal detectada. Este efecto negativo de la matriz se ha podido deber a un interferente de la matriz.

También, para la oxilipina 13-HODE, se ha observado que el efecto matriz tiene un valor >1, 2.69 y 2.79, respectivamente para cada nivel de concentración, lo que nos indica que la matriz aumenta la señal del analito, es decir, los componentes de la matriz tienen un efecto positivo,

intensificando la señal detectada. Se produce un aumento de la ionización, es decir, los componentes de la matriz favorecen la ionización durante la espectrometría de masas.

- **Efecto recuperación (RE):**

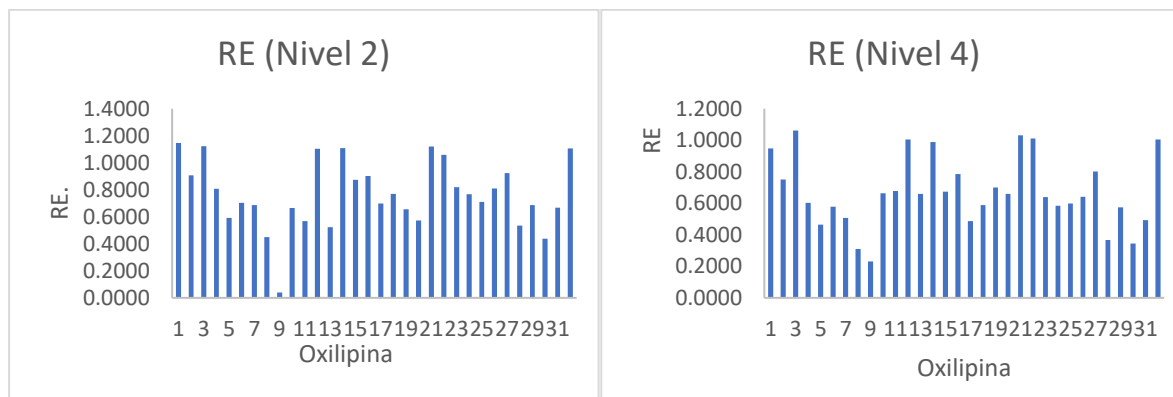


Figura 17. Gráfico comparativo RE nivel 2. Figura 18. Gráfico comparativo RE nivel 4.

De manera general, en vista a los resultados obtenidos, en la gran mayoría de las oxilipinas se observan valores alrededor de 0.75-0.8 lo que nos indica que los analitos extraídos se han recuperado de manera aceptable, aunque no de manera perfecta ya que para una recuperación completa se obtendría un valor de 1, como es el caso de la oxilipina TXB₂.

En cambio, para la oxilipina 12-KETE, según el valor obtenido, hay una baja recuperación del analito, lo cual nos indica una recuperación incompleta del analito como consecuencia de la ineficiencia del proceso de extracción o a la baja estabilidad química de esta oxilipina, debido a que durante el proceso de extracción la especie se ha podido degradar o transformarse por condiciones como el pH, temperatura o tiempo de almacenamiento.

Para una mejora en la recuperación de los analitos se deberían revisar y cambiar las condiciones empleadas para la extracción de las oxilipinas.

- **Eficiencia del proceso:**

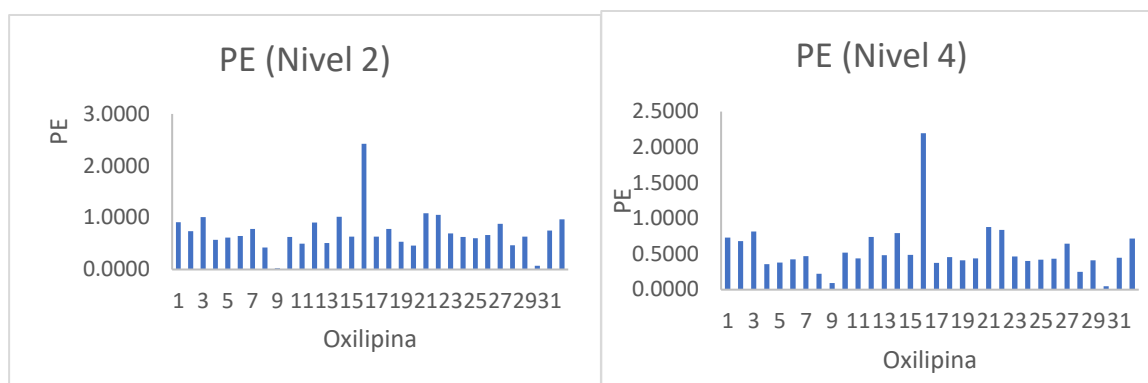


Figura 19. Gráfico comparativo PE nivel 2. Figura 20. Gráfico comparativo PE nivel 4.

Observando las gráficas anteriores, se observa que se ha obtenido una buena eficiencia, lo que nos indica que el método utilizado es efectivo para recuperar y detectar la mayoría de las oxilipinas.

Destacan por baja eficiencia las oxilipinas 12-KETE y 14-HDoHE, lo que nos indica que ha habido problemas en la extracción de estos analitos o interferencia con la matriz en la extracción.

Para mejorar la eficacia del método, como se ha comentado anteriormente, se podrían cambiar las condiciones de extracción y posiblemente las condiciones cromatográficas.

4.3. Cuantificación de las oxilipinas en sobrenadantes de macrófagos activados.

Para la cuantificación de las oxilipinas en los sobrenadantes de macrófagos activados, se realizaron gráficos de cajas y bigotes.

La identificación y cuantificación de las oxilipinas generadas se llevó a cabo mediante UHPLC-MS/MS, observando los cromatogramas donde se identificaban picos específicos para cada especie. Las oxilipinas determinadas fueron: PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1 α} , 15-HETE, 9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME, 9-HODE, 13-HODE y TXB₂.

En los gráficos de cajas y bigotes, el eje y representa la concentración de la oxilipina en el sobrenadante en nM, mientras que el eje x se indica la concentración de LPS añadida en cada tratamiento.

A la vista de los gráficos de cajas y bigotes obtenidos se procede a su interpretación.

Para las oxilipinas PGE₂ y PGD₂, sus concentraciones en los sobrenadantes aumentan con el incremento de la concentración de LPS. A concentraciones bajas de LPS (1 y 5 ng/mL), la concentración de estas oxilipinas es baja y presenta poca variabilidad. A concentraciones más altas de LPS (100 y 1000 ng/mL), la concentración de las oxilipinas aumenta significativamente, mostrando mayor variabilidad y algunos valores atípicos.

Para la oxilipina 6-keto-PGF_{1α} se muestra una tendencia ascendente con el aumento de la concentración de LPS, aunque no es tan pronunciada como para el caso de la PGE₂ y PGD₂. A concentraciones bajas de LPS (1, 5 y 10 ng/mL) no se detecta esta oxilipina.

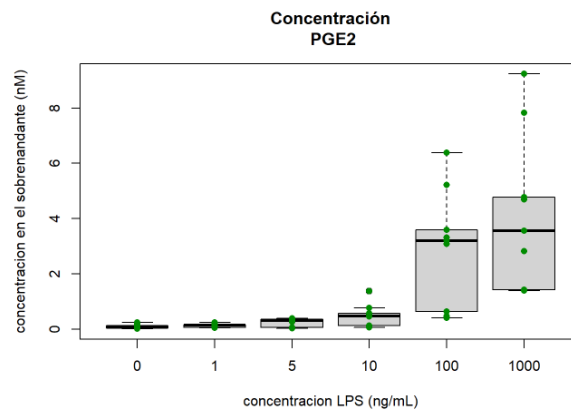


Figura 21. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina PGE₂.

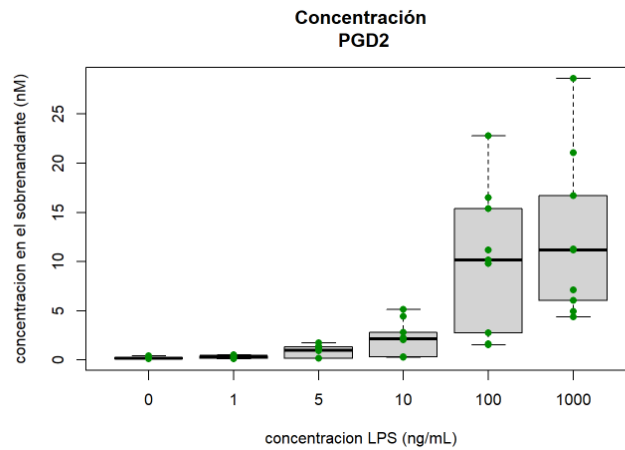


Figura 22. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina PGD₂.

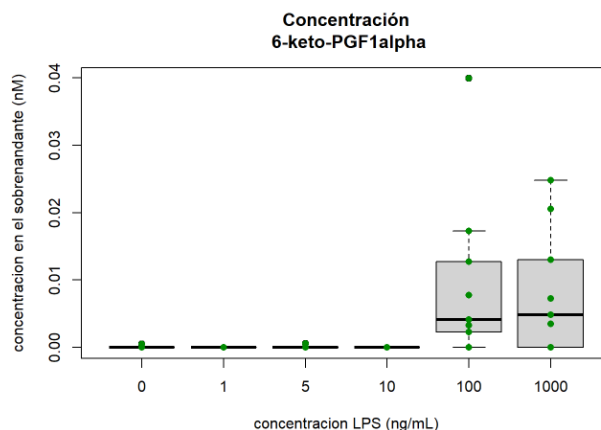


Figura 23. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina 6-keto-PGF_{1α}.

La oxilipina 15-HETE también incrementa con mayores concentraciones de LPS. En niveles bajos de concentración de LPS (1 y 5 ng/mL), la concentración de esta oxilipina es baja con poca variabilidad. En concentraciones altas de LPS (100 y 1000 ng/mL), hay un aumento significativo en la concentración de 15-HETE y en la variabilidad de los datos, incluyendo algunos valores atípicos.

Para los linoleatos (9-HODE, 13-HODE, 9,10-DiHOME y 12,13-DiHOME) no hay una tendencia clara de aumento o disminución de la concentración de estas especies con el tratamiento de LPS lo que nos indica que no se induce una respuesta de estas oxilipinas ante el estímulo inflamatorio.

Para la oxilipina 15-HETE y los linoleatos, los gráficos de cajas y bigotes se sitúan en los anexos (Figura 59 – Figura 63).

Para el caso de la oxilipina TXB₂, su concentración en los sobrenadantes de macrófagos activados aumenta significativamente con la concentración de LPS, mostrando una clara dependencia del estímulo inflamatorio. La variabilidad en la concentración de TXB₂ también aumenta con mayores concentraciones de LPS.

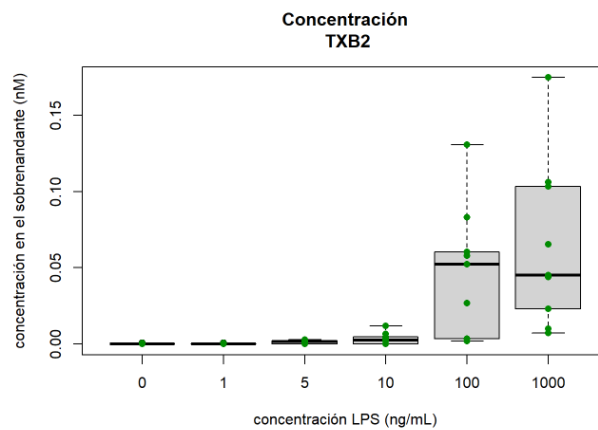


Figura 24. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina TXB₂.

Los resultados obtenidos de estas oxilipinas en los sobrenadantes de macrófagos activados son cruciales para comprender mejor la producción de oxilipinas en respuesta a estímulos inflamatorios.

5. Conclusiones.

- Se ha desarrollado y parcialmente validado un método analítico basado en UHPLC-MS/MS con modo de trabajo MRM para la detección, caracterización y cuantificación de las oxilipinas en muestras biológicas.
- Las diferencias en los tiempos de retención (RT) no fueron suficientes para identificar los isómeros y, en muchos casos, varias especies coeluyen debido a que la transición MRM no es única para cada oxilipina. Esto resalta la importancia de tener una segunda transición para identificar cada oxilipina de manera selectiva y mejorar la precisión en la identificación.
- Se logró caracterizar y cuantificar oxilipinas nativas usando estándares internos deuterados, utilizando una línea de calibrado para evaluar parámetros clave como la sensibilidad, el rango lineal, el LOD y el LOQ. Esto proporciona una base sólida para estudios futuros sobre la función biológica y los roles de las oxilipinas en diferentes contextos fisiológicos y patológicos.
- Para la especie 12-KETE se obtuvo un efecto de recuperación bajo, lo que indica la necesidad de investigar las causas subyacentes en futuros estudios.
- Además, de manera general, para obtener mayor recuperación de las oxilipinas, se deberían cambiar las condiciones de la extracción en fase sólida e incluso las condiciones cromatográficas para así aumentar la eficiencia del proceso y garantizar resultados más precisos y confiables en estudios futuros.
- El método desarrollado ha sido aplicado con éxito en estudios de inflamación de bajo grado utilizando células que proceden de la línea celular RAW 264.7 tratadas con LPS. Se evaluaron efectos de matriz, recuperación y eficiencia del método, lo que respalda su robustez y aplicabilidad en estudios biológicos complejos.
- Este trabajo abre nuevas oportunidades en el campo de la lipidómica biomédica al permitir el análisis exhaustivo de perfiles de oxilipinas. La capacidad de analizar estos compuestos con alta sensibilidad y precisión podría contribuir significativamente a la comprensión de procesos inflamatorios.
- En un futuro se añadirán un mayor número de oxilipinas para una caracterización más completa de estas moléculas en sistemas biológicos complejos. Esta ampliación, además favorecerá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades inflamatorias y terapéuticas, así como, la artritis reumatoide y el asma.

6. Bibliografía.

1. *High-Throughput Metabolomics: Methods and Protocols*. vol. 1978 (Springer New York, New York, NY, 2019).
2. Chen, G. & Zhang, Q. Comprehensive analysis of oxylipins in human plasma using reversed-phase liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with heatmap-assisted selection of transitions. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 367–385 (2019).
3. Manuel Daniel Díaz Muñoz. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y DE mPGES-1 EN MACRÓFAGOS: IMPLICACIÓN EN ACTIVACIÓN, MIGRACIÓN Y DESARROLLO DE ATEROSCLEROSIS. (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, Madrid, 2007).
4. Dr. RODRIGO YEPEZ M. PROSTAGLANDINAS, ENDOPEROXIDOS, TROMBOXANOS Y LEUCOTRIENES. *PROSTAGLANDINAS ENDOPEROXIDOS TROMBOXANOS LEUCOTRIENES* 15 (1983).
5. Martínez-Canabal, A. & Rivas-Arancibia, S. Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *Facultad de Medicina, UNAM* **48**, 8 (2005).
6. Zamora, M. B., Zamora, D. E. S. & Pérez, V. M. Leucotrienos y antileucotrienos en medicina basada en la evidencia. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2015 62 3 157-162 6 (2015).
7. Wagner, K. M., McReynolds, C. B., Schmidt, W. K. & Hammock, B. D. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Ther.* **180**, 62–76 (2017).
8. ZUBIA MENDOZA, Eva; *et al.* Uso de oxilipinas y sus derivados como agentes antiinflamatorios. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/macrofago> (2014).
9. David L. Nelson y Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W.H. Freeman, 2017).
10. José Alberto López Domínguez. Efecto de la restricción calórica, el envejecimiento y el componente graso de la dieta sobre la señalización apoptótica en tejidos mitóticos y postmitóticos de rató. (Universidad de Córdoba, Córdoba, 2013).
11. Dr. Andrés O. Pérez Ruiz,¹ Dra. Liulia Cartaya Padrón,² Dr. Víctor Valencia Fernández,³ Dra. Vivian Sanjurjo Gámez⁴, & y Teresita Ilisástigui Ortueta. BIOSÍNTESIS DE LOS PRODUCTOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA INFLAMACIÓN. *Rev Cuba. Estomatol* 199835256-61 (1998).
12. Beorlegui, C. de B., Carro, C. Á., Cachaldora, P. & Rebollar, P. G. CALIDAD SENSORIAL DE HUEVOS Y CARNE DE AVES ENRIQUECIDOS EN ACIDOS GRASOS OMEGA-3 Y ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO. (2005).
13. Carrero, J. J., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J. & Jiménez, J. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr Hosp* (2005).

14. RAFAEL J. SERRA SIMAL. Metabolismo de los lípidos. *WebFisio* <https://www.webfisio.es/books/metabolismo/metabolismo-de-los-lipidos/>.
15. Nayeem, M. A. Role of oxylipins in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **39**, 1142–1154 (2018).
16. Salido, M. *, Abásolo, L. *, & Bañares, A. Revisión de los antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2.
17. Sara M^a Martínez Sánchez. Moléculas bioactivas de origen animal y vegetal para modular la función endotelial, homeostasis e inflamación en condiciones patológicas. Biopéptidos y oxilipinas. (Universidad Católica de Murcia, Murcia, 2020).
18. Cebo, M., Fu, X., Gawaz, M., Chatterjee, M. & Lämmerhofer, M. Micro-UHPLC-MS/MS method for analysis of oxylipins in plasma and platelets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **189**, 113426 (2020).
19. Instituto Nacional del Cáncer & de los Institutos Nacionales de la Salud. Macrófagos. *Científica* <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/macrofago>.
20. Dennis, E. A. & Norris, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 511–523 (2015).
21. Wang, Y., Armando, A. M., Quehenberger, O., Yan, C. & Dennis, E. A. Comprehensive ultra-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric analysis of eicosanoid metabolites in human samples. *J. Chromatogr. A* **1359**, 60–69 (2014).
22. Badenas, A. P., Icardo, M. C. & Paz, J. L. L. TRABAJO FINAL DE CARRERA. (UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE GANDÍA INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL, Gandia, 2011).
23. Peña, A., Morales, J. & Labastida, C. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA EN LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES: APLICACIÓN A ORGANISMOS MARINOS. *Univ. Nac. Autónoma México México* **19**, (2003).
24. Lucci, P., Pacetti, D., Nunez, O. & G., N. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. in *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis* (ed. Calderon, L.) (InTech, 2012). doi:10.5772/47736.
25. Unión Europea FOOD-OXYLIPIN-TOX. *Impact of Food Ingredients and Contaminants on Endogenous Inflammation Mediators – Targeted Metabolomics of the Eicosanoid Pathway*. <https://cordis.europa.eu/article/id/174979-our-food-affects-the-communication-and-regulation-within-our-body/es> (2007).
26. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. (Cengage Learning, Av. Santa Fe, núm. 505, piso 12 Col. Cruz Manca, Santa Fe C.P. 05349, México, D.F., 2018).
27. LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2002/657/CE: Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo

en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *D. Of. Las Comunidades Eur.* (2002).

28. Katrin Strassburg & Annemarie M. L. Huijbrechts & Kirsten A. Kortekaas & Jan H. Lindeman & Theresa L. Pedersen & Adrie Dane & Ruud Berger & Arjan Brenkman & Thomas Hankemeier & John van Duynhoven & Eric Kalkhoven & John W. Newman & Rob J. Vreeken & Strassburg, K., Huijbrechts, A.M.L., Kortekaas, K.A. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. (2012).

29. Balgoma, D. *et al.* Quantification of Lipid Mediator Metabolites in Human Urine from Asthma Patients by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Controlling Matrix Effects. *Anal. Chem.* **85**, 7866–7874 (2013).

30. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019–3030 (2003).

Anexos

Tabla 10. Estándares internos (ISs).

N°	Nombre común	Fórmula	PM (g/mol)	Estructura
1	11 β -PGF _{2α} -d ₄	C ₂₀ H ₃₀ D ₄ O ₅	358.5	
2	PGF _{2α} -d ₄	C ₂₀ H ₃₀ D ₄ O ₅	358.5	
3	13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α} -d ₄	C ₂₀ H ₃₀ D ₄ O ₅	358.5	
4	13,14-dihydro-15-keto-PGE ₂ -d ₄	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₅	356.5	
5	13,14-dihydro-15-keto-PGD ₂ -d ₄	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₅	356.5	

6	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂ -d ₄	C ₂₀ H ₂₄ D ₄ O ₃	320.5	
7	20-HETE-d ₆	C ₂₀ H ₂₆ D ₆ O ₃	326.5	
8	14,15-EpETrE-d ₁₁	C ₂₀ H ₂₁ D ₁₁ O ₃	331.5	
9	11,12-EpETrE-d ₁₁	C ₂₁ H ₂₃ D ₁₁ O ₃	343.5	
10	PGD ₂ -d ₄	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₅	356.5	
11	PGE ₂ -d ₄	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₅	356.5	

12	6-keto-PGF _{1α} -d ₄	C ₂₀ H ₃₀ D ₄ O ₆	374.5	
13	5-HETE-d ₈	C ₂₀ H ₂₄ D ₈ O ₃	328.5	
14	12-HETE-d ₈	C ₂₀ H ₂₄ D ₈ O ₃	328.5	
15	15-HETE-d ₈	C ₂₀ H ₂₄ D ₈ O ₃	328.5	
16	12,13-DiHOME-d ₄	C ₁₈ H ₃₀ D ₄ O ₄	318.5	
17	13-HODE-d ₄	C ₁₈ H ₂₈ D ₄ O ₃	316.5	
18	13-KODE-d ₃	C ₁₈ H ₂₇ D ₃ O ₃	297.5	
19	12,13-EpOME-d ₄	C ₁₈ H ₂₈ D ₄ O ₃	300.5	

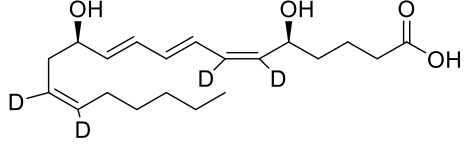
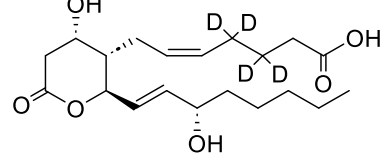
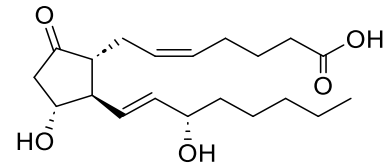
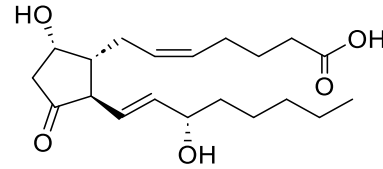
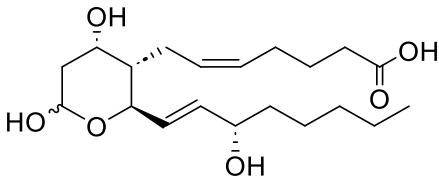
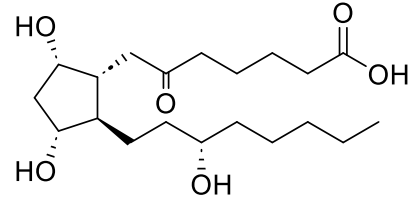
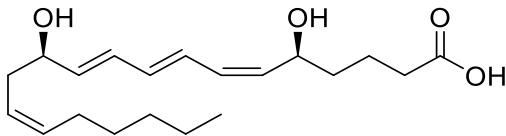
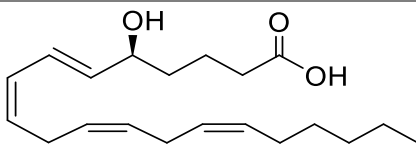
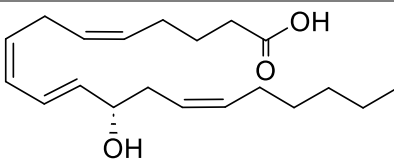
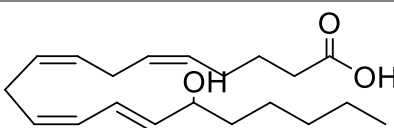
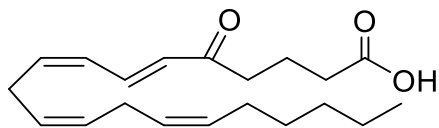
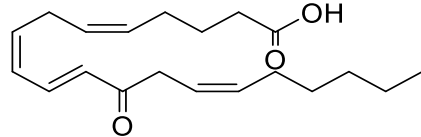
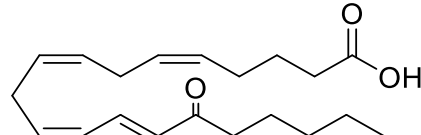
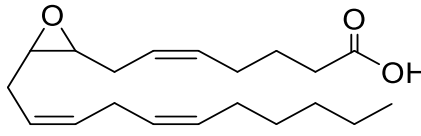
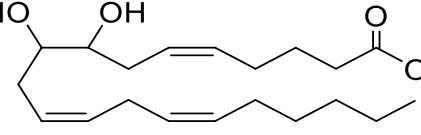
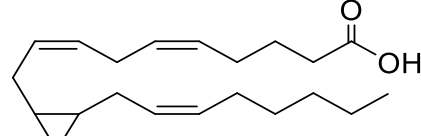
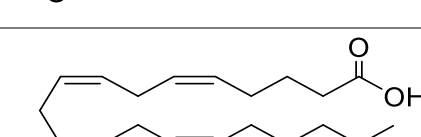
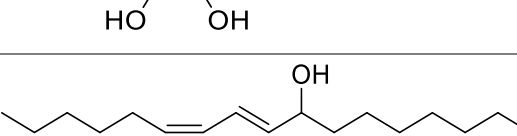
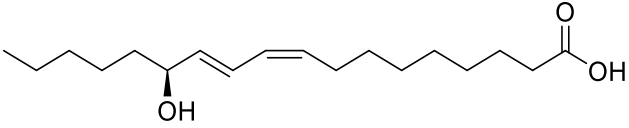
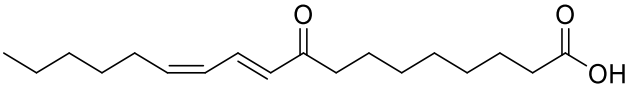
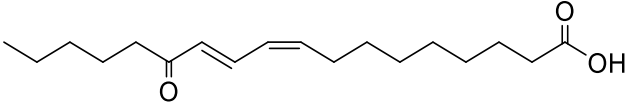
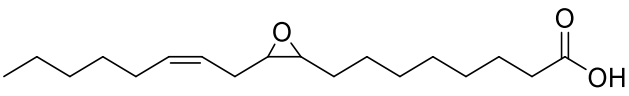
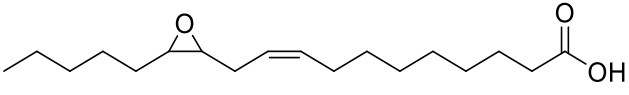
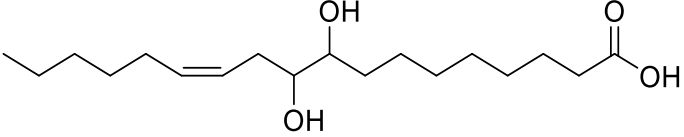
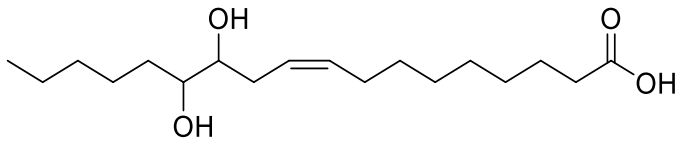
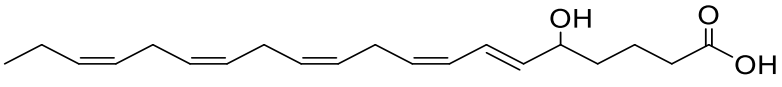
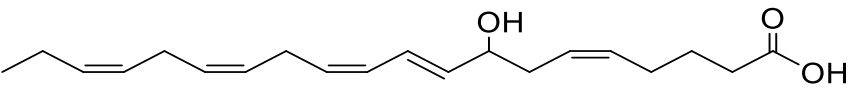
20	LTB ₄ -d ₄	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₄	340.5	
21	TXB ₂ -d ₄	C ₂₀ H ₂₈ D ₄ O ₆	374.5	

Tabla 11. Oxilipinas.

N°	Nombre común	Fórmula Molecular	PM (g/mol)	Ácido graso precursor	Subclase de oxilipina	Estructura
1	PGE ₂	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.5	AA	Prostaglandina	
2	PGD ₂	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.5	AA	Prostaglandina	
3	TXB ₂	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	370.5	AA	Tromboxano	

4	6-keto-PGF _{1α}	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	370.5	AA	Prostaglandina	
5	LTB ₄	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336.5	AA	Leucotrieno	
6	5-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	320.5	AA	Hidroxiácido graso	
7	12-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	320.5	AA	Hidroxiácido graso	
8	15-HETE	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	320.5	AA	Hidroxiácido graso	
9	5-KETE	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.5	AA	Oxoácido graso	

10	12-KETE	$C_{20}H_{30}O_3$	318.5	AA	Oxoácido graso	
11	15-KETE	$C_{20}H_{30}O_3$	318.5	AA	Oxoácido graso	
12	8,9-EpETrE	$C_{20}H_{32}O_3$	320.5	AA	Epóxido ácido graso	
13	8,9-DiHETrE	$C_{20}H_{34}O_4$	338.5	AA	Hidroxiácido graso	
14	11,12-EpETrE	$C_{20}H_{32}O_3$	320.5	AA	Epóxido ácido graso	
15	11,12-DiHETrE	$C_{20}H_{34}O_4$	338.5	AA	Hidroxiácido graso	
16	9-HODE	$C_{18}H_{32}O_3$	296.5	LA	Hidroxiácido graso	

17	13-HODE	$C_{18}H_{32}O_3$	296.5	LA	Hidroxiácido graso	
18	9-KODE	$C_{18}H_{30}O_3$	294.4	LA	Oxoácido graso	
19	13-KODE	$C_{18}H_{30}O_3$	294.4	LA	Oxoácido graso	
20	9,10-EpOME	$C_{18}H_{32}O_3$	296.5	LA	Epóxido de ácido graso	
21	12,13-EpOME	$C_{18}H_{32}O_3$	296.5	LA	Epóxido de ácido graso	
22	9,10-DiHOME	$C_{18}H_{34}O_4$	314.5	LA	Hidroxiácido graso	
23	12,13-DiHOME	$C_{18}H_{34}O_4$	314.5	LA	Hidroxiácido graso	
24	5-HEPE	$C_{20}H_{30}O_3$	318.5	EPA	Hidroxiácido graso	
25	8-HEPE	$C_{20}H_{30}O_3$	318.5	EPA	Hidroxiácido graso	

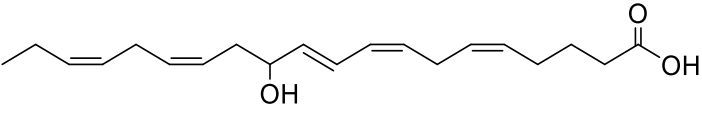
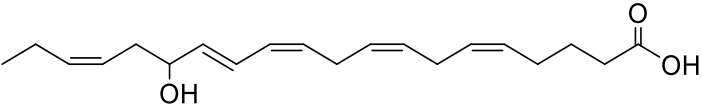
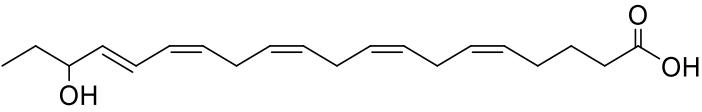
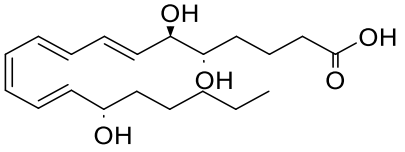
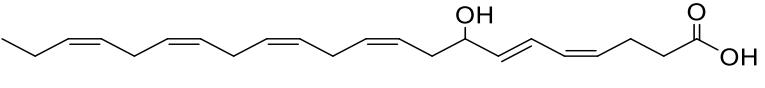
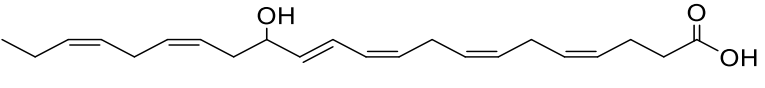
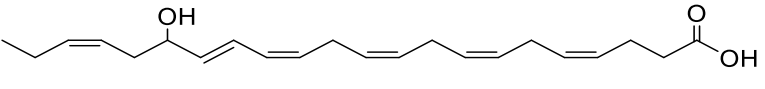
26	12-HEPE	$C_{20}H_{30}O_3$	318.5	EPA	Hidroxiácido graso	
27	15-HEPE	$C_{20}H_{30}O_3$	318.5	EPA	Hidroxiácido graso	
28	18-HEPE	$C_{20}H_{30}O_3$	318.5	EPA	Hidroxiácido graso	
29	LXA ₄	$C_{20}H_{32}O_5$	352.5	AA	Lipoxina	
30	8-HDoHE	$C_{22}H_{32}O_3$	344.5	DHA	Hidroxiácido graso	
31	14-HDoHE	$C_{22}H_{32}O_3$	344.5	DHA	Hidroxiácido graso	
32	17-HDoHE	$C_{22}H_{32}O_3$	344.5	DHA	Hidroxiácido graso	

Tabla 12. Niveles de concentración de la línea de calibrado.

Oxilipina	Nivel de concentración/nM									
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6	Nivel 7	Nivel 8	Nivel 9	Nivel 10
PGE₂	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
PGD₂	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
TXB₂	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
6-keto-PGF_{1α}	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
LTB₄	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
5-HETE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
12-HETE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
15-HETE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
5-KETE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
12-KETE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
15-KETE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
8,9-EpETrE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
8,9-DiHETrE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
11,12-EpETrE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
11,12-DiHETrE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
9-HODE	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
13-HODE	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
9-KODE	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
13-KODE	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
9,10-EpOME	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
12,13-EpOME	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
9,10-DiHOME	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
12,13-DiHOME	1200	600	240	60	21	6	2.4	0.75	0.24	0.12
5-HEPE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
8-HEPE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
12-HEPE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
15-HEPE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06

18-HEPE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
LXA₄	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
8-HDoHE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
14-HDoHE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06
17-HDoHE	600	300	120	30	10.5	3	1.2	0.375	0.12	0.06

Tabla 13. Parámetros MRM optimizados para cada oxilipina.

N°	Compuesto	RT (min)	m/z		DP (V)	CE (V)	Nombre IS
			Precursor	Producto			
1	PGE ₂	5.98	351.2	271.1; 315.1	-50	-23	PGE ₂ -d ₄
2	PGD ₂	6.16	351.21	271.1; 189.1	-50	-23	PGD ₂ -d ₄
3	6-keto-PGF _{1α}	4.94	369.2	163.1; 245.1	-60	-34	6-keto-PGF _{1α} -d ₄
4	LTB ₄	7.49	335.2	195.1; 151.1	-45	-23	LTB ₄ -d ₄
5	5-HETE	9.61	319.2	115.1; 257.1	-40	-20	5-HETE-d ₈
6	12-HETE	9.46	319.2	179.1; 257.1	-50	-19	12-HETE-d ₈
7	15-HETE	9.18	319.2	219.1; 257.1	-40	-19	15-HETE-d ₈
8	5-KETE	10.19	317.2	203.1; 273.1	-60	-22	13-KODE-d ₃
9	12-KETE	9.69	317.2	153.1; 273.1	-50	-23	13-KODE-d ₃
10	15-KETE	9.47	317.2	113.1; 273.1	-20	-25	13-KODE-d ₃
11	8,9-EpETrE	10.39	319.2	155.1; 257.1	-30	-18	11-12-EpETrE-d ₁₁
12	8,9-DiHETrE	8.35	337.2	127.1; 185.1	-30	-27	20-HETE-d ₆
13	11,12-EpETrE	10.31	319.2	167.1; 179.1	-30	-17	11-12-EpETrE-d ₁₁
14	11,12-DiHETrE	8.2	337.2	167.1; 319.1	-40	-25	20-HETE-d ₆
15	9-HODE	9.01	295.2	171.1; 233.1	-60	-23	13-HODE-d ₄
16	13-HODE	8.99	295.2	195.1; 277.1	-60	-23	13-HODE-d ₄
17	9-KODE	9.48	293.2	185.1; 249.1	-50	-28	13-KODE-d ₃
18	13-KODE	9.33	293.2	113.1; 249.1	-50	-29	13-KODE-d ₃

19	9,10-EpOME	10.11	295.21	171.1; 277.1	-60	-21	12,13-EpOME-d ₄
20	12,13-EpOME	10.04	295.21	195.1; 277.1	-50	-23	12,13-EpOME-d ₄
21	9,10-DiHOME	7.81	313.2	201.1; 277.1	-50	-29	12,13-diHOME-d ₄
22	12,13-DiHOME	7.71	313.2	183.1; 195.1	-50	-29	12,13-diHOME-d ₄
23	5-HEPE	8.87	317.2	115.1; 255.1	-30	-22	15-HETE-d ₈
24	8-HEPE	8.7	317.2	155.1; 255.1	-50	-29	15-HETE-d ₈
25	12-HEPE	8.77	317.2	179.1; 255.1	-30	-19	15-HETE-d ₈
26	15-HEPE	8.64	317.2	219.1; 255.1	-40	-19	15-HETE-d ₈
27	18-HEPE	8.46	317.2	215.1; 259.1	-60	-20	13-HODE-d ₄
28	LXA ₄	6.38	351.2	115.1; 235.1	-20	-21	PGD ₂ -d ₄
29	8-HDoHE	9.51	343.2	109.1; 189.1	-40	-20	5-HETE-d ₈
30	14-HDoHE	9.32	343.2	205.1; 281.1	-30	-18	12-HETE-d ₈
31	17-HDoHE	9.2	343.21	281.1; 201.1	-20	-19	15-HETE-d ₈
32	TXB ₂	5.75	369.2	169.1; 195.1	-50	-22	TXB ₂ -d ₄
33	11 β -PGF _{2α} -d ₄	5.6	357.2	197.1	-50	-35	-
34	PGF _{2α} -d ₄	5.81	357.21	197.1	-50	-35	-
35	13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α} -d ₄	6.48	357.2	187.1	-80	-28	-
36	13,14-dihydro-15-keto-PGE ₂ -d ₄	5.98	355.2	113.1	-40	-26	-
37	13,14-dihydro-15-keto-PGD ₂ -d ₄	6.84	355.2	211.1	-40	-26	-
38	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂ -d ₄	6.18	319.2	203.1	-30	-20	-
39	20-HETE-d ₆	8.6	325.2	281.1	-50	-24	-

40	14,15-EpETrE-d ₁₁	10.04	330.2	175.1	-40	-19	-
41	11,12-EpETrE-d ₁₁	10.26	330.2	167.1	-50	-19	-
42	PGD ₂ -d ₄	6.17	355.2	275.1	-50	-23	-
43	PGE ₂ -d ₄	5.98	355.21	275.1	-50	-23	-
44	6-keto-PGF _{1α} -d ₄	4.89	373.2	167.1	-60	-34	-
45	5-HETE-d ₈	9.57	327.2	116.1	-40	-20	-
46	12-HETE-d ₈	9.42	327.2	184.1	-50	-19	-
47	15-HETE-d ₈	9.14	327.2	226.1	-40	-19	-
48	12,13-DiHOME-d ₄	7.7	317.2	185.1	-50	-29	-
49	13-HODE-d ₄	8.98	299.2	198.1	-60	-23	-
50	13-KODE-d ₃	9.32	296.2	198.1	-50	-29	-
51	12,13-EpOME-d ₄	10.01	299.21	198.1	-50	-23	-
52	LTB ₄ -d ₄	7.48	339.2	197.1	-45	-23	-
53	TXB ₂ -d ₄	5.55	373.2	169.1	-50	-22	-

Tabla 14. Resultados de la validación parcial del método para cada oxilipina.

Regresión						
Oxilipina	Fórmula	R²	LOD/nM	LOQ/nM	Sensibilidad	Rango lineal/nM
PGE ₂	y= 0.067x + 0.141	0.994	5.00E-04	1.67E-03	0.067	5.00E-04 - 300
PGD ₂	y= 0.108x + 0.014	0.992	1.13E-01	3.78E-01	0.108	1.13E-01 - 300
6-keto-PGF _{1α}	y= 0.069x + 0.006	0.996	3.07E-02	1.02E-01	0.064	3.07E-02 - 300

LTB ₄	$y = 0.118x + 0.004$	0.998	2.89E-02	9.65E-02	0.118	2.89E-02 - 300
5-HETE	$y = 0.047x + 0.004$	0.998	3.17E-01	1.06E+00	0.047	3.17E-01 - 300
12-HETE	$y = 0.065x + 0.003$	0.996	1.95E-01	6.51E-01	0.065	1.95E-01 - 300
15-HETE	$y = 0.034x + 0.002$	0.999	3.01E-01	1.00E+00	0.034	3.01E-01 - 300
5-KETE	$y = 0.424x + 0.009$	0.993	9.71E-01	3.24E+00	0.424	9.71E-01 - 300
12-KETE	$y = 0.476x + 0.026$	0.985	6.27E-01	2.09E+00	0.476	6.27E-01 - 300
15-KETE	$y = 0.865x + 0.038$	0.993	8.35E-01	2.78E+00	0.865	8.35E-01 - 300
8,9-EpETrE	$y = 0.020x + 0.002$	0.998	5.21E-01	1.74E+00	0.02	5.21E-01 - 300
8,9-DiHETrE	$y = 0.313x + 0.012$	0.999	1.41E-01	4.71E-01	0.313	1.41E-01 - 300
11,12-EpETrE	$y = 0.048x + 0.004$	0.999	5.35E-01	1.78E+00	0.048	5.35E-01 - 600
11,12-DiHETrE	$y = 0.600x + 0.025$	0.999	1.55E-01	5.17E-01	0.6	1.55E-01 - 300
9-HODE	$y = 0.045x + 0.031$	0.996	1.47E+00	4.90E+00	0.045	1.47E+00 - 300
13-HODE	$y = 0.065x + 0.067$	0.998	3.15E+00	1.05E+01	0.065	3.15E+00 - 300
9-KODE	$y = 0.208x + 0.099$	0.995	3.32E+00	1.11E+01	0.208	3.32E+00 - 300
13-KODE	$y = 0.360x + 0.375$	0.994	4.99E+00	1.66E+01	0.36	4.99E+00 - 300
9,10-EpOME	$y = 0.118x + 0.038$	0.998	6.05E-01	2.02E+00	0.118	6.05E-01 - 240
12,13-EpOME	$y = 0.116x + 0.005$	0.998	1.70E+00	5.68E+00	0.116	1.70E+00 - 240
9,10-DiHOME	$y = 0.070x + 0.017$	0.999	6.80E-01	2.27E+00	0.07	6.80E-01 - 300
12,13-DiHOME	$y = 0.071x + 0.015$	0.999	5.37E-01	1.79E+00	0.071	5.37E-01 - 300
5-HEPE	$y = 0.023x + 7.862e-4$	0.997	1.05E-01	3.49E-01	0.023	1.05E-01 - 300
8-HEPE	$y = 0.013x + 9.252e-4$	0.997	8.13E-02	2.71E-01	0.013	8.13E-02 - 300

12-HEPE	$y = 0.036x + 0.001$	0.999	1.06E-01	3.55E-01	0.036	1.06E-01 – 300
15-HEPE	$y = 0.035x + 0.001$	0.999	9.84E-02	3.28E-01	0.035	9.84E-02 – 300
18-HEPE	$y = 0.036x + 0.001$	0.999	1.20E-01	4.00E-01	0.036	1.20E-01 – 600
LXA ₄	$y = 0.204x + 0.016$	0.984	1.61E-02	5.37E-02	0.204	1.61E-02 – 120
8-HDoHE	$y = 0.023x + 8.251e-4$	0.998	3.02E-01	1.01E+00	0.023	3.02E-01 – 300
14-HDoHE	$y = 0.024x + 0.001$	0.997	1.17E-01	3.91E-01	0.024	1.17E-01 – 300
17-HDoHE	$y = 0.022x + 0.002$	0.999	1.98E-01	6.60E-01	0.022	1.98E-01 – 300
TXB ₂	$y = 0.054x + 0.01$	0.998	1.34E-02	4.45E-02	0.054	1.34E-02 – 300

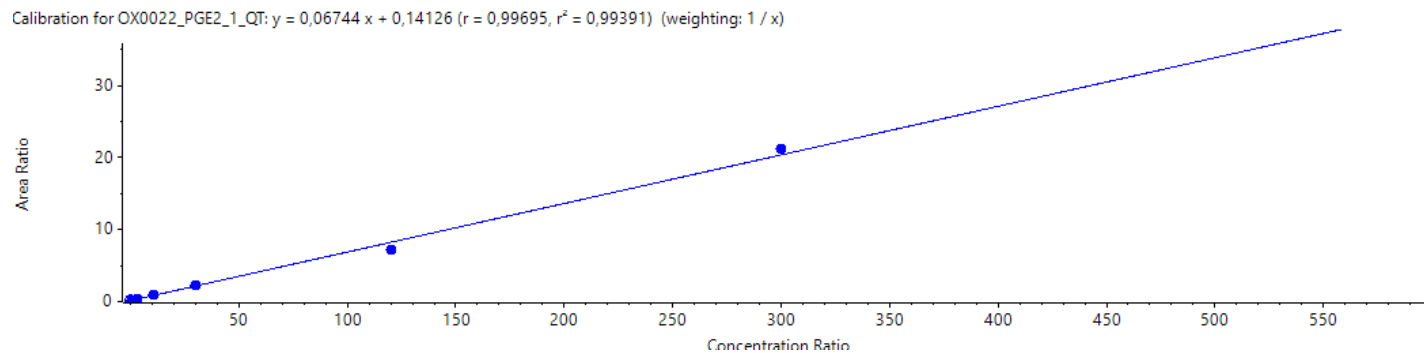


Figura 25. Nivel 5 de la línea de calibrado de la PGE₂.

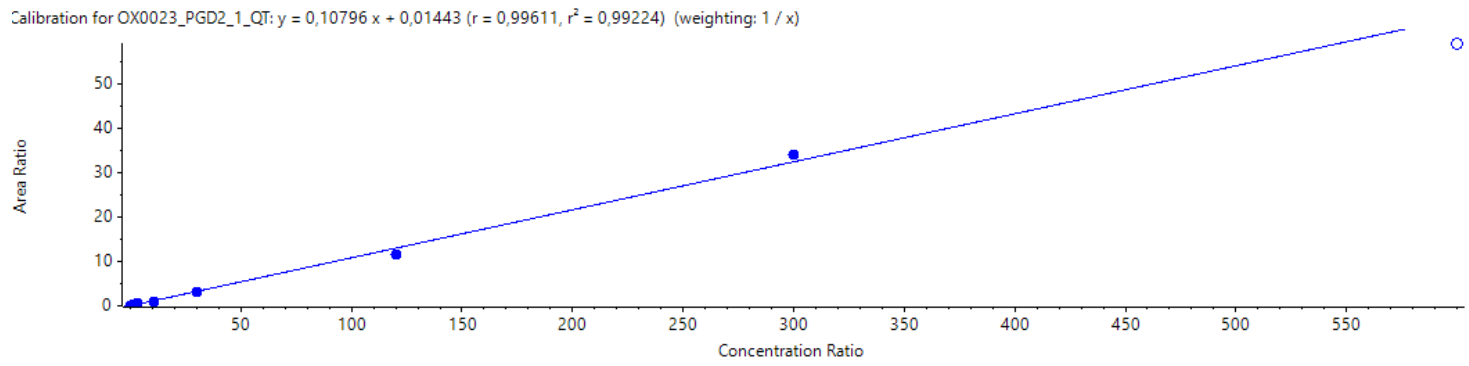


Figura 26. Nivel 5 de la línea de calibrado de la PGD₂.

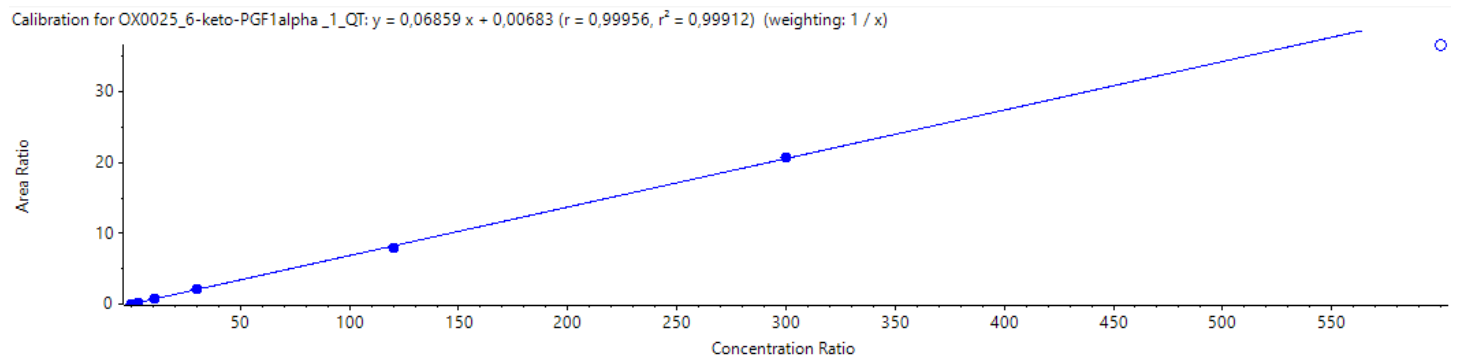


Figura 27. Nivel 5 de la línea de calibrado de la 6-keto-PGF_{1α}.

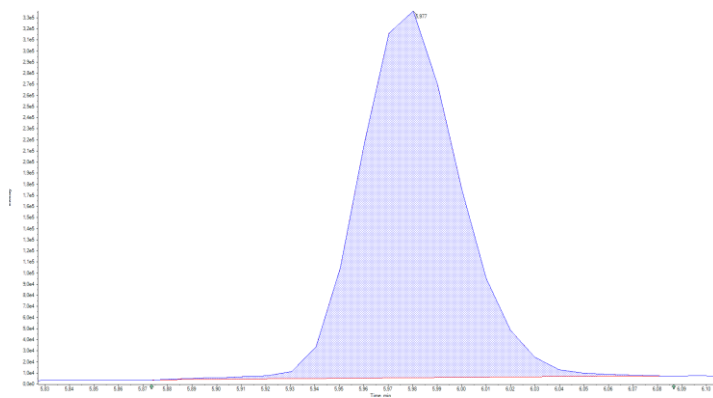


Figura 28. Cromatograma PGE₂ nivel 5 de la línea de calibrado.

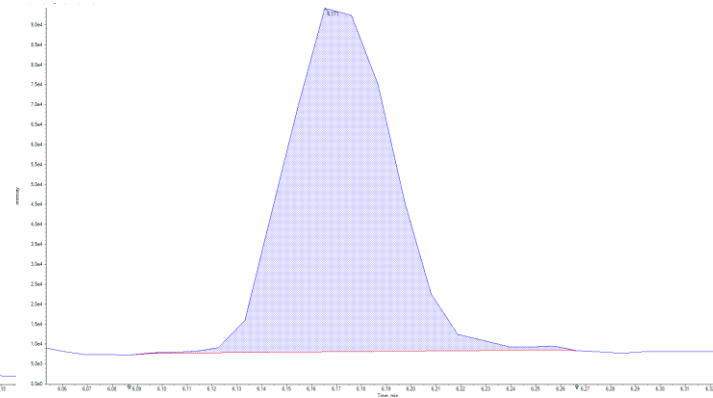


Figura 29. Cromatograma PGD₂ nivel 5 de la línea de calibrado.

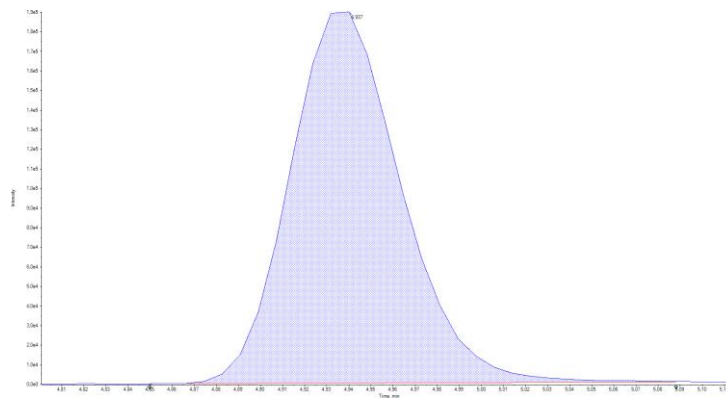


Figura 30. Cromatograma 6-keto-PGF_{1α} nivel 5 de la línea de calibrado.

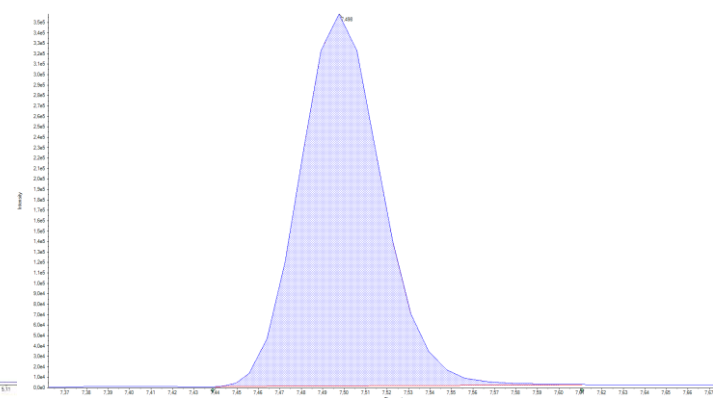


Figura 31. Cromatograma LTB₄ nivel 5 de la línea de calibrado.

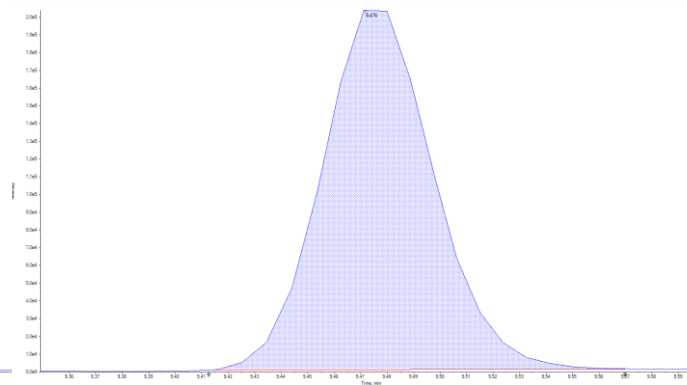
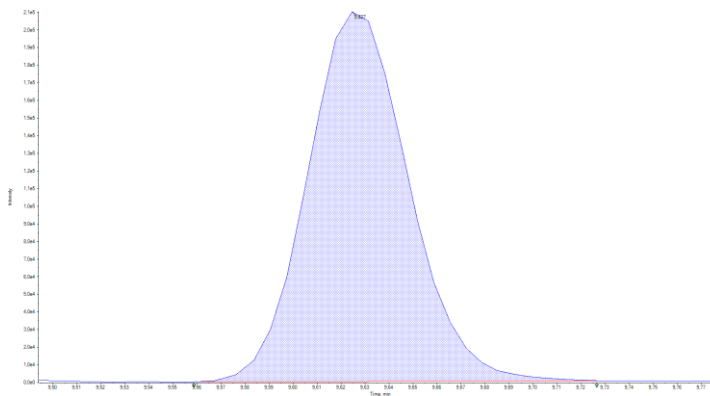


Figura 32. Cromatograma 5-HETE nivel 5 de la línea de calibrado. Figura 33. Cromatograma 12-HETE nivel 5 de la línea de calibrado.

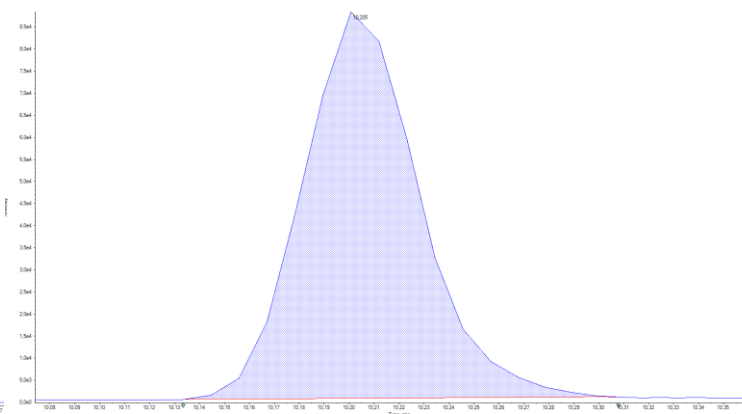
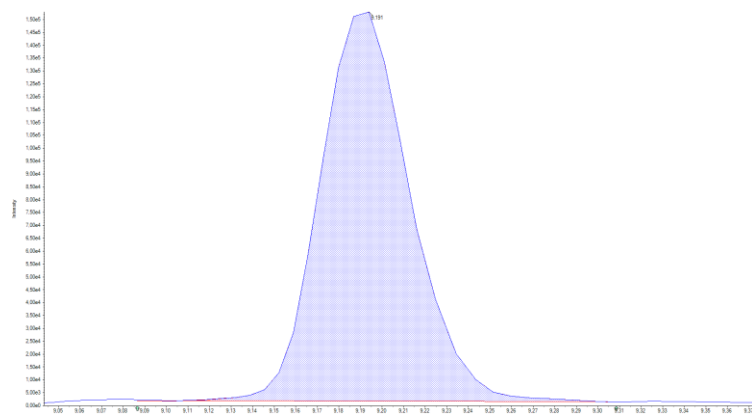


Figura 34. Cromatograma 15-HETE nivel 5 de la línea de calibrado. Figura 35. Cromatograma 5-KETE nivel 5 de la línea de calibrado.

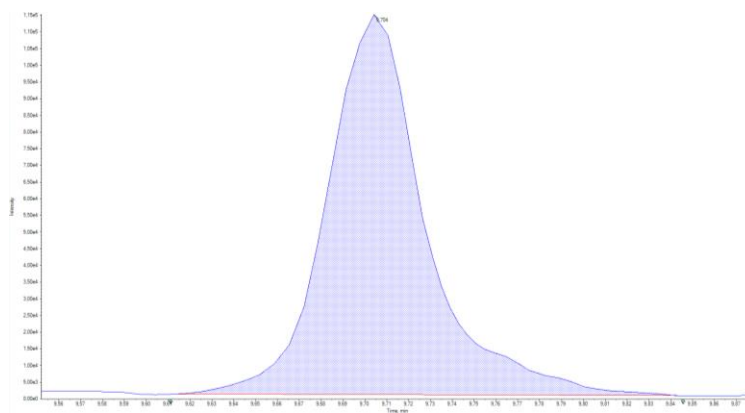


Figura 36. Cromatograma 12-KETE nivel 5 de la línea de calibrado.

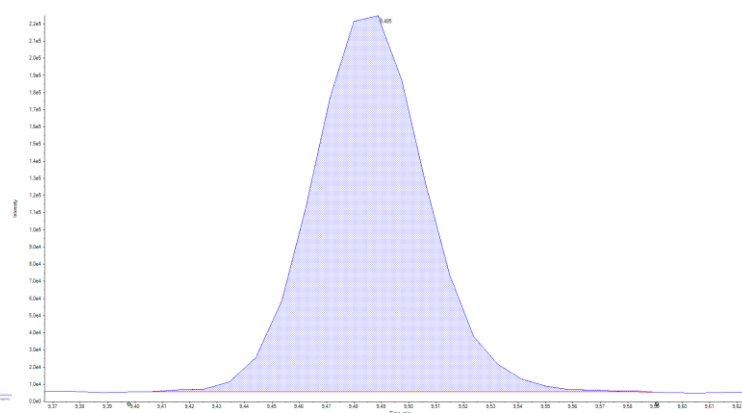


Figura 37. Cromatograma 15-KETE nivel 5 de la línea de calibrado.

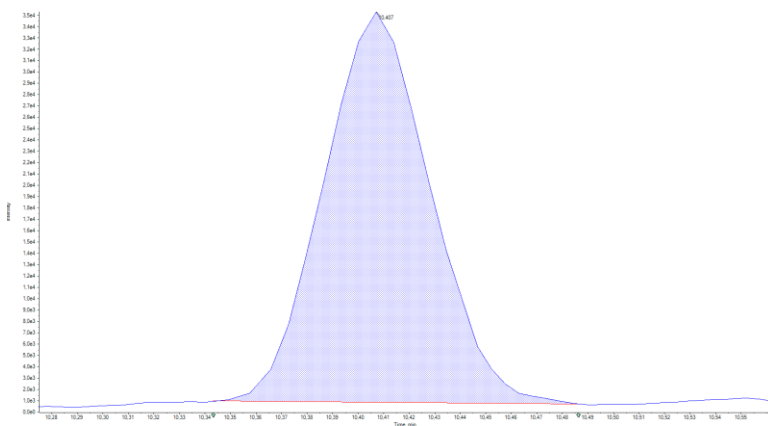


Figura 38. Cromatograma 8,9-EpETrE nivel 5 de la línea de calibrado.

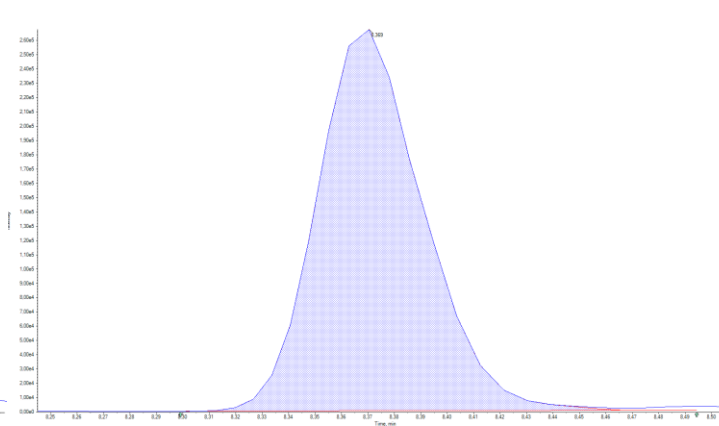


Figura 39. Cromatograma 8,9-DiHETrE nivel 5 de la línea de calibrado.

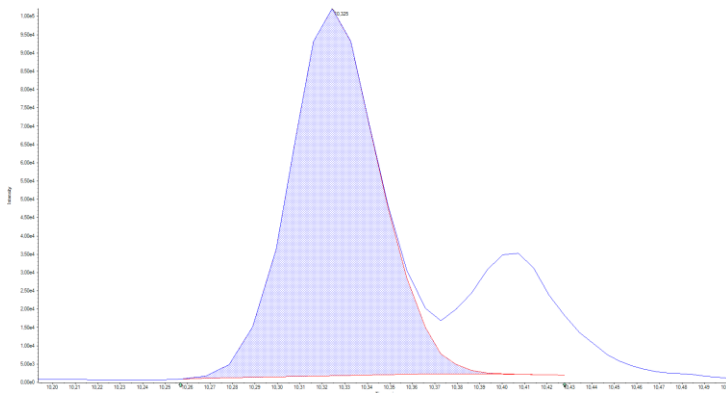


Figura 40. Cromatograma 11,12-EpETrE nivel 5 de la línea de calibrado.

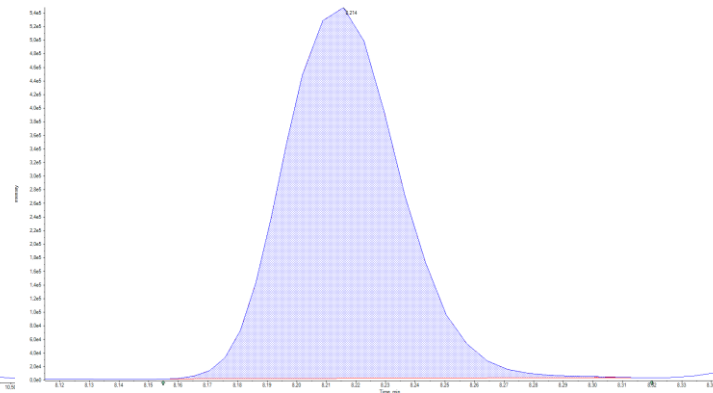


Figura 41. Cromatograma 11,12-DiHETrE nivel 5 de la línea de calibrado.

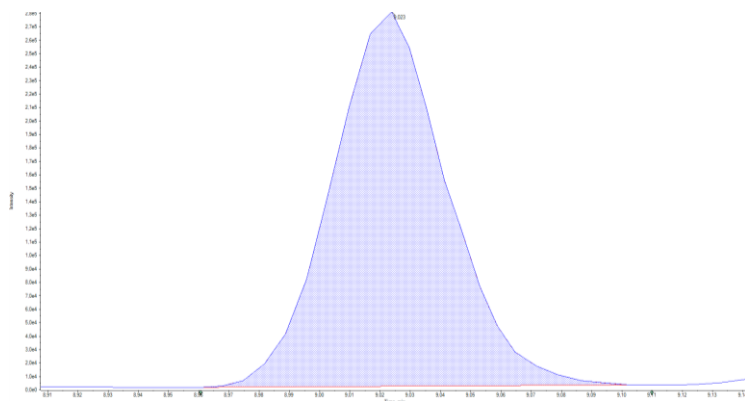


Figura 42. Cromatograma 9-HODE nivel 5 de la línea de calibrado.

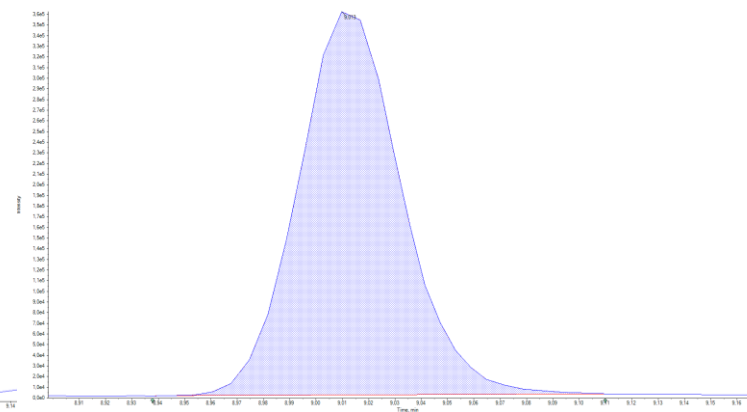


Figura 43. Cromatograma 13-HODE nivel 5 de la línea de calibrado.

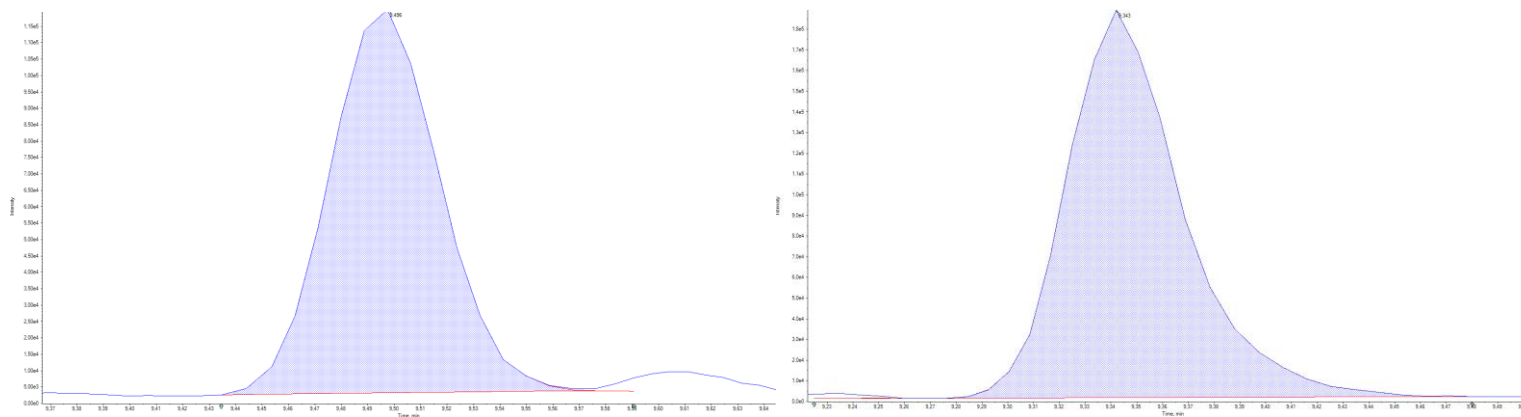


Figura 44. Cromatograma 9-KODE nivel 5 de la línea de calibrado. Figura 45. Cromatograma 13-KODE nivel 5 de la línea de calibrado.

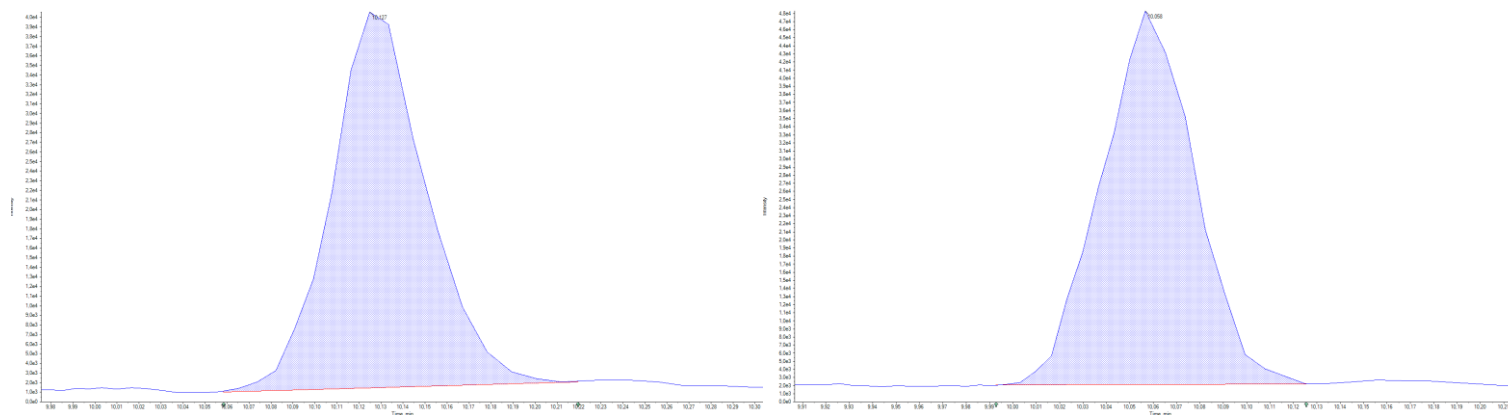


Figura 46. Cromatograma 9,10-EpOME nivel 5 de la línea de calibrado. Figura 47. Cromatograma 12,13-EpOME nivel 5 de la línea de calibrado.

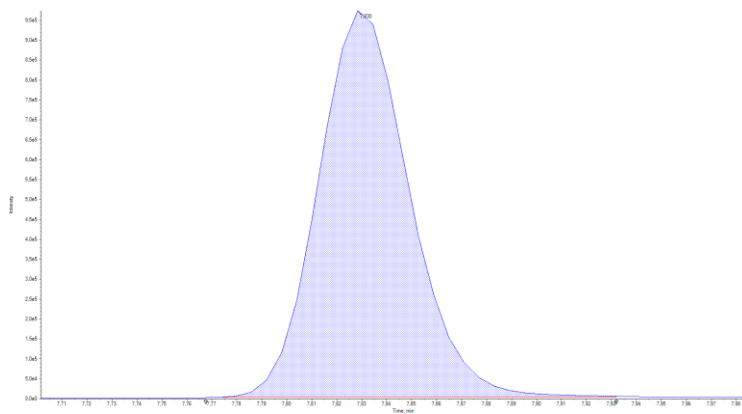


Figura 48. Cromatograma 9,10-DiHOME nivel 5 de la línea de calibrado.

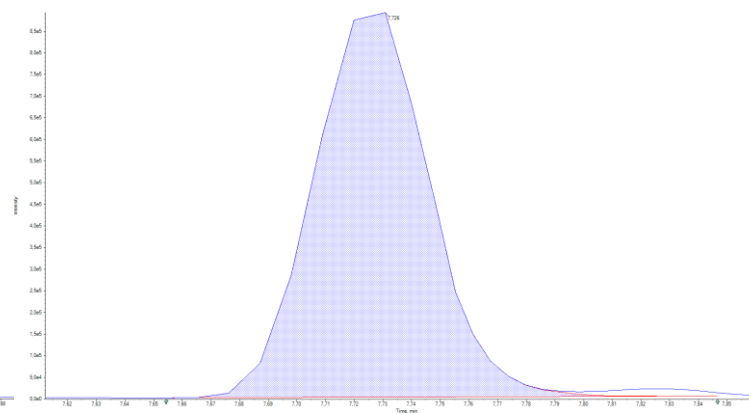


Figura 49. Cromatograma 12,13-DiHOME nivel 5 de la línea de calibrado.

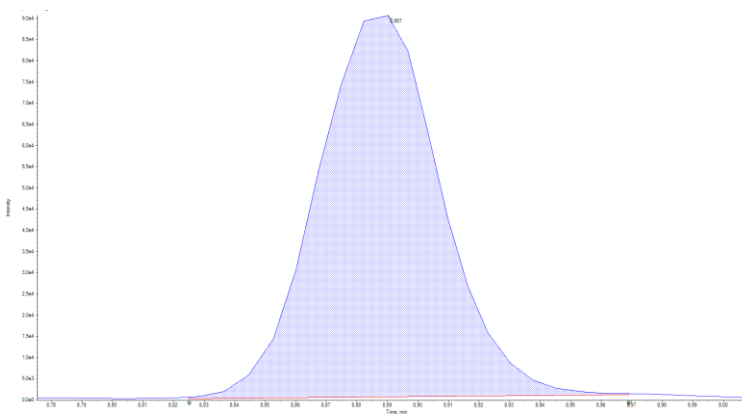


Figura 50. Cromatograma 5-HEPE nivel 5 de la línea de calibrado.

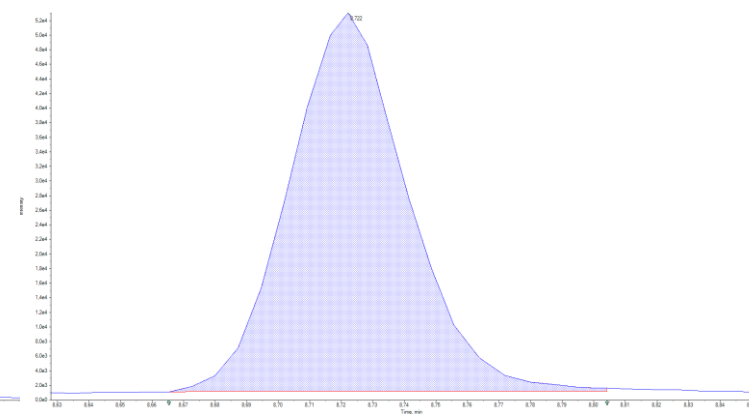


Figura 51. Cromatograma 8-HEPE nivel 5 de la línea de calibrado.

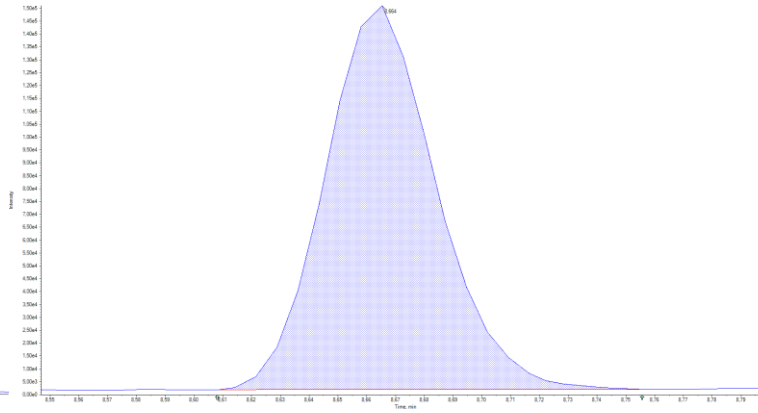
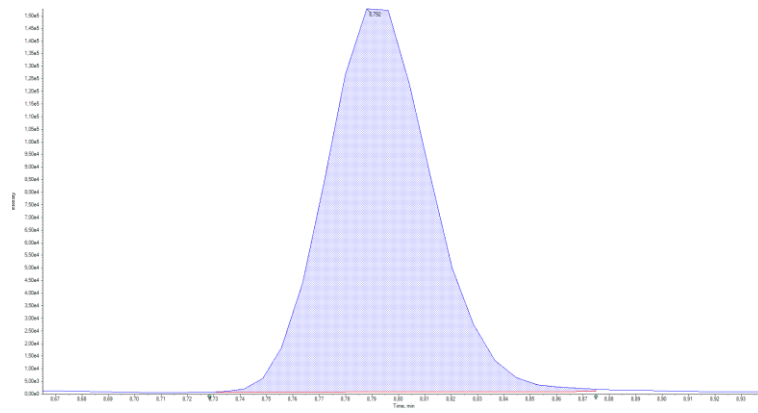


Figura 52. Cromatograma 12-HEPE nivel 5 de la línea de calibrado. Figura 53. Cromatograma 15-HEPE nivel 5 de la línea de calibrado.

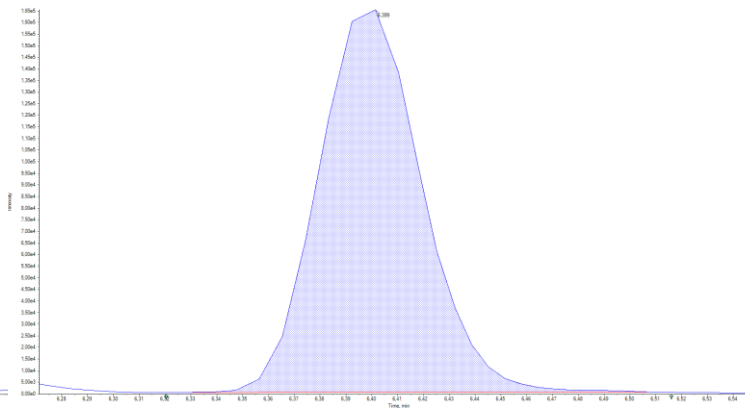
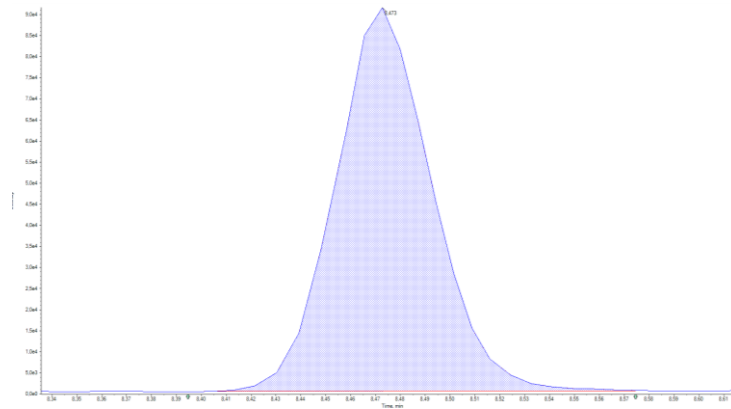


Figura 54. Cromatograma 18-HEPE nivel 5 de la línea de calibrado. Figura 55. Cromatograma LXA₄ nivel 5 de la línea de calibrado.

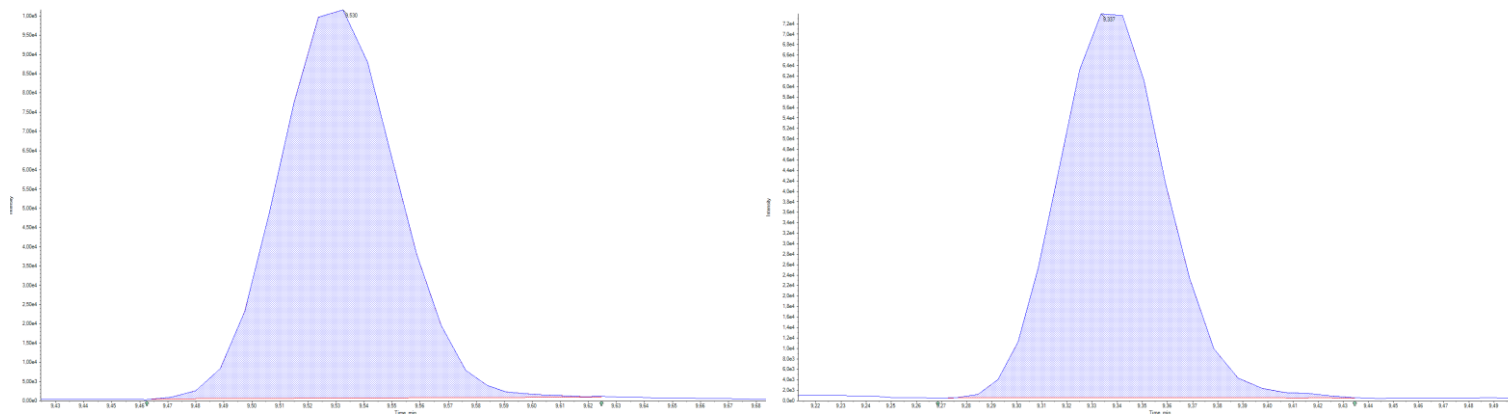


Figura 56. Cromatograma 8-HDoHE nivel 5 de la línea de calibrado. Figura 57. Cromatograma 14-HDoHE nivel 5 de la línea de calibrado.

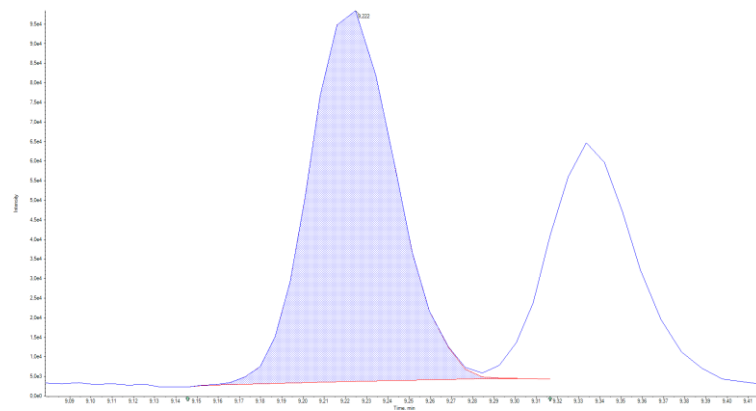


Figura 58. Cromatograma 17-HDoHE nivel 5 de la línea de calibrado.

Tabla 15. Efecto matriz, efecto de recuperación y eficiencia.

Oxilipina	NIVEL 2 (300nM)			NIVEL 4 (30nM)		
	ME	RE	PE	ME	RE	PE
PGE₂	7.96E-01	1.15E+00	9.12E-01	7.71E-01	9.48E-01	7.31E-01
PGD₂	8.16E-01	9.07E-01	7.40E-01	9.12E-01	7.50E-01	6.84E-01
6-keto-PGF_{1α}	9.03E-01	1.12E+00	1.01E+00	7.68E-01	1.06E+00	8.15E-01
LTB₄	7.10E-01	8.08E-01	5.74E-01	5.92E-01	6.03E-01	3.57E-01
5-HETE	1.04E+00	5.92E-01	6.17E-01	8.21E-01	4.64E-01	3.81E-01
12-HETE	9.15E-01	7.04E-01	6.44E-01	7.34E-01	5.78E-01	4.24E-01
15-HETE	1.14E+00	6.86E-01	7.84E-01	9.24E-01	5.07E-01	4.69E-01
5-KETE	9.39E-01	4.50E-01	4.23E-01	7.18E-01	3.10E-01	2.22E-01
12-KETE	5.57E-01	3.96E-02	2.21E-02	4.03E-01	2.31E-01	9.31E-02
15-KETE	9.44E-01	6.65E-01	6.28E-01	7.83E-01	6.63E-01	5.19E-01
8,9-EpETrE	8.77E-01	5.68E-01	4.98E-01	6.50E-01	6.77E-01	4.40E-01
8,9-DiHETrE	8.19E-01	1.10E+00	9.04E-01	7.38E-01	1.00E+00	7.41E-01
11,12-EpETrE	9.73E-01	5.24E-01	5.10E-01	7.32E-01	6.59E-01	4.83E-01
11,12-DiHETrE	9.17E-01	1.11E+00	1.02E+00	8.06E-01	9.88E-01	7.96E-01
9-HODE	7.26E-01	8.73E-01	6.33E-01	7.25E-01	6.73E-01	4.88E-01
13-HODE	2.69E+00	9.02E-01	2.43E+00	2.79E+00	7.86E-01	2.19E+00
9-KODE	9.11E-01	6.97E-01	6.35E-01	7.74E-01	4.87E-01	3.77E-01
13-KODE	1.01E+00	7.70E-01	7.80E-01	7.79E-01	5.88E-01	4.58E-01
9,10-EpOME	8.11E-01	6.57E-01	5.33E-01	5.91E-01	6.99E-01	4.13E-01
12,13-EpOME	7.99E-01	5.74E-01	4.58E-01	6.67E-01	6.60E-01	4.40E-01
9,10-DiHOME	9.70E-01	1.12E+00	1.09E+00	8.54E-01	1.03E+00	8.80E-01
12,13-DiHOME	9.94E-01	1.06E+00	1.05E+00	8.32E-01	1.01E+00	8.40E-01
5-HEPE	8.46E-01	8.18E-01	6.93E-01	7.32E-01	6.40E-01	4.68E-01
8-HEPE	8.15E-01	7.68E-01	6.26E-01	6.90E-01	5.84E-01	4.03E-01
12-HEPE	8.47E-01	7.11E-01	6.02E-01	7.08E-01	5.98E-01	4.23E-01
15-HEPE	8.21E-01	8.11E-01	6.66E-01	6.76E-01	6.42E-01	4.34E-01
18-HEPE	9.52E-01	9.24E-01	8.80E-01	8.05E-01	8.01E-01	6.45E-01
LXA₄	8.70E-01	5.35E-01	4.66E-01	6.84E-01	3.66E-01	2.51E-01
8-HDoHE	9.28E-01	6.86E-01	6.36E-01	7.20E-01	5.75E-01	4.14E-01
14-HDoHE	1.71E-01	4.37E-01	7.46E-02	1.35E-01	3.44E-01	4.64E-02
17-HDoHE	1.13E+00	6.69E-01	7.53E-01	9.05E-01	4.93E-01	4.46E-01
TXB₂	8.74E-01	1.11E+00	9.66E-01	7.14E-01	1.00E+00	7.18E-01

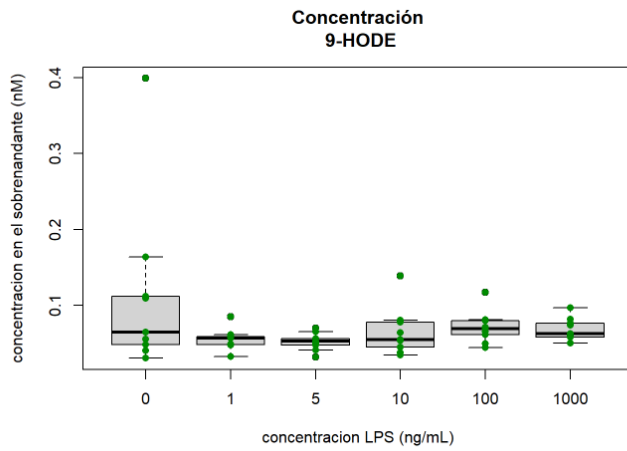


Figura 59. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina 9-HODE.

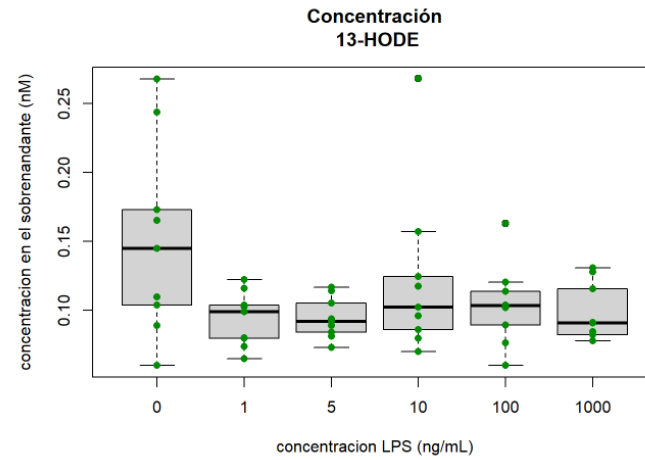


Figura 60. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina 13-HODE.

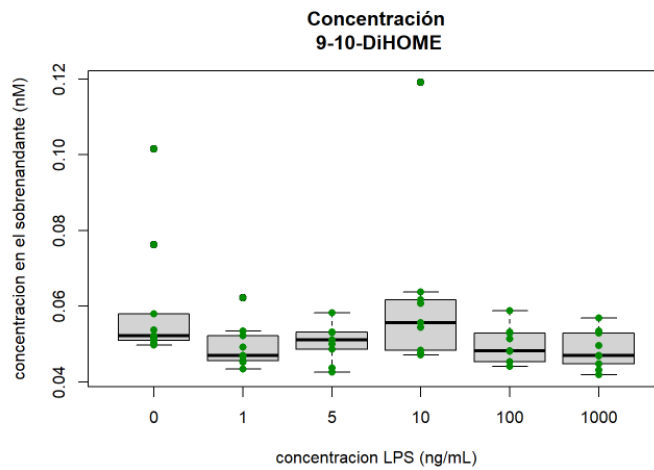


Figura 61. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina 9,10-DiHOME.

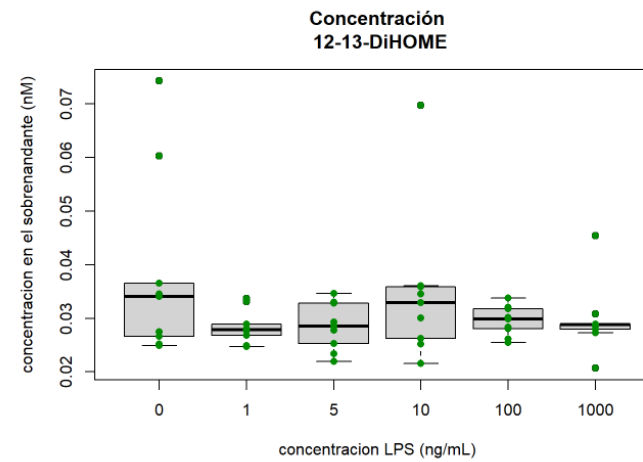


Figura 62. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina 12,13-DiHOME.

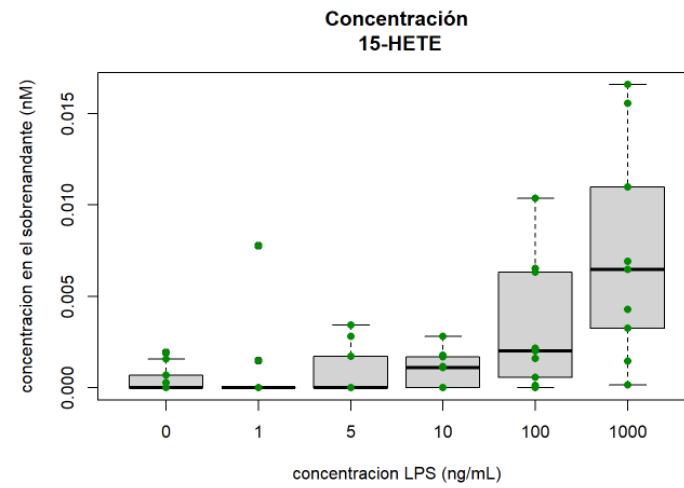


Figura 63. Gráfico de cajas y bigotes para la oxilipina 15-HETE.

