

CAPÍTULO 10

TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA EL ESTUDIO DE LÍPIDOS Y MEMBRANAS

Carolina Bagnato

10.1. Partición de Fases y Solubilidad de Lípidos

Los lípidos son un grupo diverso de moléculas que cumplen variadas funciones celulares que van desde formar parte de las membranas celulares, constituir una de las principales formas de reserva energética hasta intervenir en complejos sistemas de señalización celular. Desde el punto de vista químico se los define como un grupo heterogéneo de moléculas que se caracterizan por ser solubles en solventes orgánicos y por presentar una baja solubilidad en agua. Una descripción sobre los criterios y la clasificación de los lípidos comúnmente utilizada se puede consultar en el capítulo 8 del presente libro. La función y estructura química de los distintos tipos de lípidos pueden consultarse en los libros de texto de bioquímica (Lehninger, 2013).

Los lípidos, al igual que otras sustancias, experimentan fenómenos de partición al ser expuestos a mezclas de líquidos inmiscibles por los que presentan diferente afinidad. El concepto de partición implica la disolución y distribución de un compuesto de manera selectiva entre las dos fases de un sistema de solventes. Esta idea puede graficarse por la *ley de Distribución* o *ley de Partición* que establece que: Si a un sistema heterogéneo de dos fases líquidas se le agrega un tercer componente soluble en ambas fases este se distribuirá, en cada una de ellas, de forma tal que el cociente resultante de dividir las concentraciones en cada fase será una constante que solo dependerá de la temperatura. La distribución de un compuesto entre las fases responde a las diferencias de solubilidad que un compuesto presenta en cada una de dichas fases lo que refleja el grado de similitud en la estructura química del compuesto con una u otra fase.

Solubilidad de los lípidos

En su conjunto los lípidos se definen como un grupo heterogéneo cuya característica común es su baja o poca afinidad por el agua y por presentar una gran afinidad y solubilidad en solventes orgánicos tales como hidrocarburos, cloroformo, benceno y alcoholes. Como se explica en el capítulo 8, los lípidos forman un grupo de sustancias químicamente diversas pero con una propiedad física común que es la de ser poco o nada solubles en agua, son hidrofóbicos. Los lípidos, en general, pueden ser disueltos por solventes químicamente similares y con propiedades de momento dipolar parecidas a la de los lípidos. Pese a esta generalización, cabe destacar que hay diferencias remarcables en los distintos tipos de lípidos que determinan variabilidad en el comportamiento de los mismos en un solvente o una mezcla de solventes dada. Por ejemplo, muchos lípidos tales como ácidos grasos y fosfolípidos son anfipáticos característica que aumenta el momento dipolar del lípido lo cual hace que mejore su solubilidad, en agua. En tanto que, por ejemplo, esto no sucede con los lípidos neutros tales como los triacilglicéridos. La heterogeneidad en estructura química de los lípidos determina que no se pueda generalizar sobre las propiedades de solubilidad de los mismos. Sin embargo, gran parte de las propiedades físico-químicas de las distintas clases de lípidos, simples y complejos, responden a la de los ácidos grasos que son uno de sus principales componentes. Los ácidos grasos, ácidos carboxílicos de cadena larga, son moléculas anfipáticas formadas por una región polar, el grupo ácido que a pH neutro se encuentra dissociado con una carga negativa, y una cadena carbonada, de longitud variable que constituye la región apolar. A su vez, la cadena carbonada puede ser saturada o insaturada. La región de la cabeza con el grupo funcional carboxilo determina la afinidad del ácido graso por solventes polares y la cadena carbonada contrarresta este efecto disminuyendo la solubilidad en agua o solventes polares. La longitud de cadena y la presencia y número de dobles enlaces afectan la solubilidad de los ácidos grasos: a

mayor longitud de cadena disminuye la solubilidad en agua y solventes orgánicos polares, en tanto que la presencia de dobles enlaces la aumenta. Las propiedades de solubilidad de la cadena carbonada de un ácido graso son extensivas a los lípidos que estos constituyen. Sin embargo, cabe destacar que pueden existir en los lípidos otros grupos que se encuentren contribuyendo a las propiedades de solubilidad de los mismos. Este resulta ser el caso en los lípidos polares. Al igual que sucede con los ácidos grasos, los fosfolípidos también son moléculas anfipáticas y presentan, dependiendo del grupo de cabeza polar y tipo de ácidos grasos presentes, distinto grado de solubilidad en solventes orgánicos polares e incluso en mezclas con cierto porcentaje de agua. Por su parte los triacilglicéridos son lípidos neutros, insolubles en agua, que muestran buena solubilidad en solventes como cloroformo o hexano así como alcoholes. Sin embargo, al igual que el resto de lípidos que hemos mencionado la solubilidad variará con la composición de ácidos grasos.

10.2. Extracción de Lípidos Totales

El análisis de los lípidos que se encuentran formando parte de los sistemas biológicos implica la separación de los distintos lípidos, clases y especies, la identificación de los mismos y su cuantificación. Para esto resulta fundamental extraer los lípidos de las matrices complejas en las que se encuentran. El paso previo al análisis, la extracción, es imprescindible para la caracterización de los lípidos de un sistema determinado o de cierta condición fisiológica y/o patológica. Si esta no se realiza de manera adecuada se genera la degradación, pérdida y/o formación de artefactos en los extractos. En este sentido, es importante en cada paso del proceso de extracción tomar precauciones de modo de evitar la hidrólisis de los lípidos así como la autooxidación de los ácidos grasos insaturados.

Existen distintos sistemas desarrollados para la extracción de lípidos totales; la elección de uno u otro dependerá de las características de la matriz de donde los lípidos deben ser extraídos, que varía dependiendo de si se trata de tejido

animal, vegetal o de algún tipo particular de microorganismo. Otro factor que será determinante para decidir qué sistema de extracción se utilizará es la información que se pretende obtener de la muestra. Si lo que se quiere es analizar un tipo particular de lípido en el cual el tejido en cuestión se encuentra enriquecido, el método de extracción será orientado a esa clase de lípido y no se necesitará de una extracción exhaustiva. En tanto que si lo que se pretende es obtener un análisis detallado de las clases y especies de lípidos en la muestra se requerirá, muy probablemente, de la combinación de métodos lo que complejizará el proceso de extracción. En la siguiente sección se presentan los conceptos relacionados a la extracción de lípidos y se detallan las principales técnicas utilizadas en la actualidad.

Almacenamiento y preservación de la muestra previo a la extracción de lípidos

Como regla general, para evitar cambios en la composición original del contenido de lípidos en células y tejidos, se sugiere que la muestra se procese de manera inmediata para la extracción de lípidos. Esta precaución resulta crítica en aquellos tejidos donde se registra una alta actividad de enzimas lipolíticas. En caso de que la extracción no se realice de inmediato, el material a extraer debe ser congelado rápidamente y guardado a -20°C en atmósfera de nitrógeno, sin embargo no se recomienda un almacenamiento prolongado. El riesgo en el almacenamiento surge debido a que, durante el proceso de congelamiento, las estructuras celulares se alteran y liberan enzimas que originalmente no se hallan en contacto con los lípidos y, una vez liberadas, pueden actuar degradando y modificándolos. La presencia abundante de intermediarios tales como, ácidos grasos libres, monoacilglicéridos, diacilglicéridos y ácido fosfatídico son un claro indicio de degradación lipídica. Las oxidaciones también contribuyen a la pérdida de lípidos en general debido a que cuando se oxidan pueden fijarse a proteínas de membrana, lo que los mantiene unidos a estructuras celulares no extraíbles (Christie, 1982).

Extracción por solventes

Cuando pensamos en la extracción de lípidos a partir de una matriz compleja hay dos aspectos fundamentales a tener en cuenta: 1) la extracción debe ser lo más exhaustiva posible, y 2) se debe realizar de modo tal de evitar la co-extracción de compuestos no lipídicos. Esto significa que el procedimiento que se utilice debe mantener un compromiso entre una extracción máxima y la no co-extracción de contaminantes. En caso de que lo último no sea posible y exista una co-extracción significativa, se deben considerar pasos de lavado y/o remoción de los compuestos contaminantes (Christie, 1982). La extracción implica la separación selectiva de un compuesto determinado del resto de componentes del entorno. Esto se logra mediante la separación del compuesto del seno de la mezcla por acción de un solvente que lo disuelve selectivamente. Cuando el compuesto a extraer se halla en contacto con dos fases líquidas, se establece un equilibrio de distribución del mismo entre dichas fases. La distribución del compuesto entre una u otra fase depende de sus propiedades de partición y solubilidad entre dos fases líquidas y la eventual adsorción a la matriz en que se encuentra (Halim, 2012). En función de su estructura química los lípidos muestran diferencias de solubilidad en distintos solventes. Un solvente será capaz de extraer los lípidos de un tejido o una matriz compleja si logra sobrepasar las interacciones y fuerzas moleculares que mantiene unidos los lípidos al resto de componentes y estructuras celulares. Por este motivo no resulta trivial predecir el comportamiento de un determinado solvente para la extracción de lípidos. Debido a que constituyen un conjunto de compuestos heterogéneo, la capacidad de extracción por un solvente dado también dependerá del tipo de lípido que se intente extraer. De manera general podemos decir que los lípidos simples suelen formar grandes agregados donde se concentran formando fuertes asociaciones entre sí, tal es el caso de las gotas de lípidos en tejidos de reserva. En contraposición, los lípidos complejos se encuentran formando parte de las membranas celulares donde interactúan íntimamente con otras macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos. Estas asociaciones están gobernadas por interacciones débiles

del tipo fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas. Otro factor que puede afectar la eficiencia de extracción de lípidos son los eventuales impedimentos físico-mecánicos, tal como sucede en los tejidos u organismos unicelulares que poseen pared celular: tejidos vegetales, bacterias y hongos. Estructuras como la pared celular representan una barrera para el ingreso de solventes orgánicos al interior de la célula, interfiriendo en la interacción del solvente con los lípidos a extraer. Esto también resulta un problema en tejidos animales donde la matriz extracelular puede llegar a ser muy densa y compleja. Estas estructuras representan superficies de interacción y eventual adsorción para los lípidos, lo que afecta el proceso de extracción. Es por todo esto que, en muchos casos, resulta necesario el pre-tratamiento del tejido para su extracción.

Para poder extraer los lípidos de un tejido, el solvente debe tener cierto carácter polar pero no tanto como para reaccionar con los lípidos o excluir a los lípidos neutros en el proceso de extracción. Como se mencionó anteriormente, el solvente no debe sólo poder solubilizar a los lípidos a extraer sino que debe ser capaz de vencer las interacciones moleculares entre los lípidos y las otras moléculas en el interior celular. Considerando esto, un solvente debería tener, idealmente, cierto carácter polar y apolar al mismo tiempo. En la realidad los mejores sistemas de extracción son los que surgen de la combinación de dos o más solventes. Numerosas combinaciones de alcoholes (etanol, metanol, isopropanol, butanol, etc.) con otros solventes orgánicos (cloroformo, hexano, diclorometano, dietileter, etc.) han sido probadas en distintas proporciones para la extracción de lípidos mostrando buenos resultados en distintos tejidos. La mezcla cloroformo: metanol (2:1 v/v), ha sido evaluada exhaustivamente y representa en la actualidad la técnica de referencia. Este sistema es conocido como método de extracción de Folch (Folch, 1957). Una variante de este es el método de Bligh y Dyer (B&D), es el segundo más usado en la extracción de lípidos y, desde su introducción a fines de la década del 50, se ha utilizado intensamente en la extracción de lípidos de distintos tejidos y tipos celulares (Bligh, 1959).

El método de Folch consiste en la extracción de lípidos del tejido utilizando una mezcla de solventes de composición cloroformo: metanol: solución acuosa (8:4:3 v/v/v). De manera similar el método de B&D consiste en la extracción de lípidos del tejido utilizando una mezcla de solventes de composición cloroformo: metanol: agua (1:2:0,8 v/v/v). En ambos casos, el procedimiento implica la homogeneización del tejido con la mezcla de solventes de modo tal de promover la disolución y extracción de los lípidos de la matriz. Luego de un período de incubación, que dependerá del tejido o muestra de partida, se deja estabilizar la mezcla para obtener la formación de las fases orgánica y acuosa. La fase acuosa se retira en tanto que la orgánica se recupera y en esta los lípidos disueltos. El método de B&D surgió como una alternativa económica para la extracción de fosfolípidos de tejidos con bajo contenido lipídico y alto contenido de agua. Si bien la técnica se desarrolló para la extracción de tejido muscular de pescado, se ha demostrado que puede utilizarse en cualquier tejido con un alto contenido de agua (alrededor del 80%).

Se han realizado trabajos con el objetivo de comparar ambos métodos que han arrojado resultados interesantes. Es de destacar que, en muestras con un contenido menor al 2% de lípidos, ambos métodos funcionan con eficiencias muy similares. Sin embargo, a medida que el porcentaje de lípidos aumenta, por encima del 3% se comienza a observar una mayor eficiencia de extracción por el método de Folch (Iverson, 2001). La Figura 10.1 muestra un esquema comparando ambos métodos.

Debido a la naturaleza diversa de los tejidos y/o material a extraer, así como la co-existencia de distintos tipos de lípidos, resulta difícil encontrar un sistema de solventes que extraiga de manera eficiente los lípidos polares y los neutros. Esto se debe, en gran medida, a que la eficiencia de extracción depende de la polaridad del solvente y de los lípidos. Por ejemplo los lípidos polares, tales como fosfolípidos o glicolípidos, son más solubles en solventes polares como alcoholes y tienden a ser menos solubles en solventes no polares tales como el hexano. Sucede lo inverso con los lípidos neutros, resultan más solubles en solventes apolares que en los polares. En este sentido, los sistemas de solventes a base de cloroformo y metanol han mostrado buenos resultados. Sin

embargo, es importante resaltar que existe una búsqueda en el desarrollo de sistemas de solventes alternativos que se ajusten a necesidades específicas en la extracción de distintos tipos de lípidos y que utilicen solventes menos tóxicos que la mezcla cloroformo: metanol. Este es el caso de los trabajos en los que se utiliza isopropanol: hexano en proporciones 2:3 (Halim, 2011). Para procesos industriales que requieren de grandes cantidades de solvente de extracción, la búsqueda de sistemas alternativos se torna particularmente relevante.

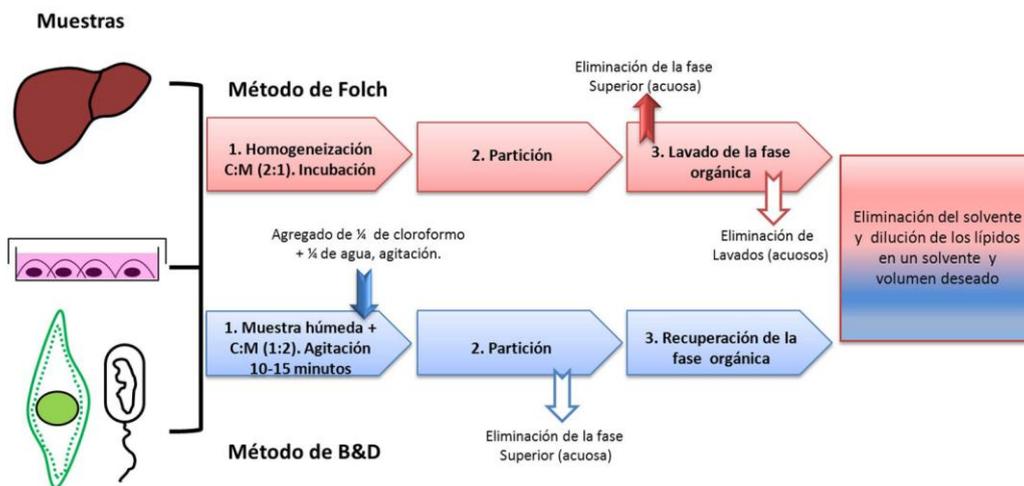


Figura 10 .1. Extracción por solventes. C:M cloroformo: metanol, B&D: Bligh y Dyer.

Independientemente del método que se utilice, hay una serie de consideraciones generales a tener en cuenta respecto del procedimiento. Una vez recuperada la fase orgánica que contiene los lípidos, el solvente debe ser eliminado por evaporación al vacío. Una vez evaporado el solvente, el extracto no debe guardarse seco; se debe resuspender en solvente orgánico, comúnmente hexano, en atmósfera de argón o nitrógeno libre de oxígeno, a una temperatura igual o inferior a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Extracción por fluidos supercríticos

Una variante de la técnica de extracción por solventes es la que utiliza fluidos supercríticos conocida como SFE del inglés *Supercritical Fluid Extraction*. La

extracción de compuestos hidrofóbicos por fluidos supercríticos es una técnica emergente que podría reemplazar, en algunos casos, a la extracción por solventes convencional. Esta técnica utiliza solventes en su estado supercrítico. Cuando la temperatura y la presión de un fluido se llevan a valores superiores al punto crítico, T_c y P_c respectivamente, el compuesto entra en estado supercrítico y adquiere un comportamiento particular con características del estado líquido y gaseoso (King, 1998). Uno de los solventes más utilizado en la actualidad en este procedimiento es el dióxido de carbono debido a que es relativamente inerte, inocuo, fácil de conseguir y a que se puede trabajar a baja temperatura, resultando ideal para la extracción de compuestos termosensibles. Las propiedades de fluido supercrítico se logran trabajando a 72,9 atmósferas y 31,1 °C de temperatura o por encima de estos valores donde queda definida una región supercrítica. La Figura 10.2.A muestra un esquema del equipo utilizado en este tipo de extracción. El material a extraer se coloca en el vaso de extracción, este posee un dispositivo para calentar y se conecta a una bomba que entrega el CO_2 a una presión mayor que P_c . Luego el vaso extractor se calienta por encima de la T_c del CO_2 , alcanzando las condiciones del estado supercrítico. El CO_2 en estado supercrítico ($\text{CO}_2\text{-SC}$) viaja sobre la superficie de la muestra solubilizando los lípidos. En este procesos se logra la disolución de los lípidos en el CO_2 supercrítico debido a que este forma un complejo [$\text{CO}_2\text{-SC}/\text{lípidos}$]. El complejo se desplaza hacía un vaso colector que se encuentra en condiciones ambiente de presión y temperatura. A partir de este punto se recupera el solvente en estado gaseoso y los lípidos extraídos en un precipitado libre de solvente. Al igual que en la extracción por solventes convencional, esta técnica también puede utilizar la mezcla de solventes para mejorar y/o maximizar la extracción de lípidos o, mejor aún, para acoplar reacciones como la de derivatización de ácidos grasos para su posterior análisis. En este sentido, se han desarrollado protocolos en los que al CO_2 se agregan alcoholes, tales como metanol o etanol (McDaniel, 1999). Esto resulta en una mejor extracción de lípidos polares y, en algunos casos, se utiliza para acoplar al proceso de extracción el de derivación de los ácidos grasos concretamente la formación de metil-ésteres. Este método posee una serie de

ventajas para la extracción de lípidos: 1) La técnica posibilita una transferencia de masa de los lípidos favorable debido a que presenta una mayor penetración de la muestra, que los solventes en su estado normal, aumentando el rendimiento en menos tiempo. Una mayor extracción también se ve favorecida por un mejor coeficiente de difusión del soluto en el fluido supercrítico en comparación con el de un solvente convencional. 2) Una vez alcanzada la zona crítica para el solvente, la temperatura y la presión se pueden variar de modo tal de aumentar el poder de solvatación, que es función de la densidad del solvente. 3) El modo de eliminación del solvente resulta sencillo debido a que,

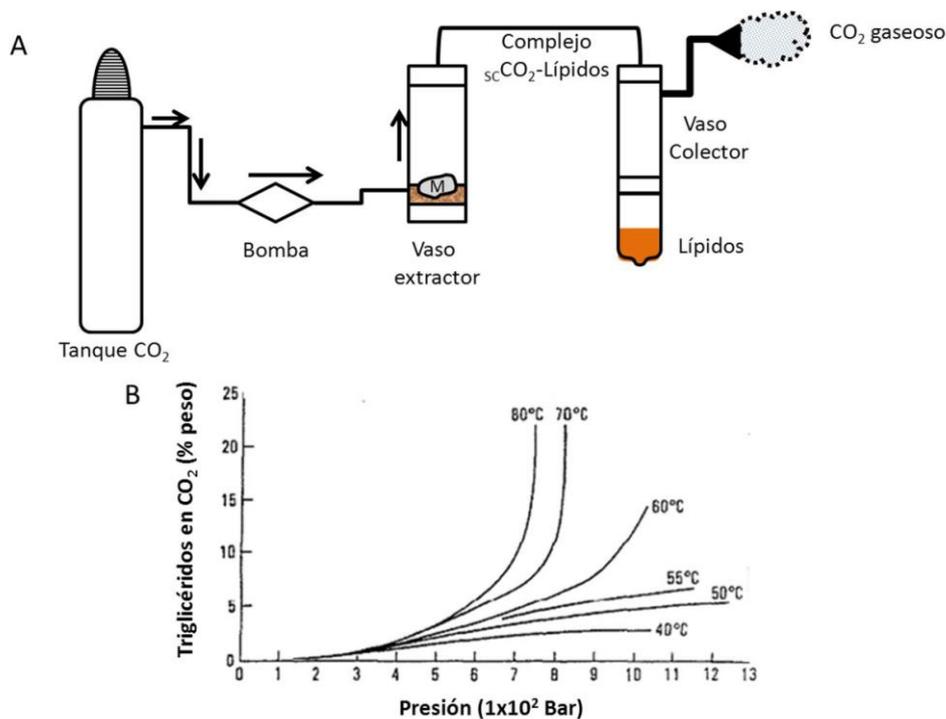


Figura 10.2. Extracción por Fluidos Supercríticos en dióxido de carbono. A. Esquema del equipo utilizado en la extracción por fluidos supercríticos. M: muestra. B. Solubilidad de triacilglicéridos de porotos de soja como función de la presión y temperatura (Reproducido y adaptado de *Journal Of AOAC International* Vol. 81 pp. 9-17, 1998 y con permiso de Jerry W. King).

una vez terminado el proceso de extracción, la muestra se lleva a condiciones tales de presión y temperatura que permiten recuperar el solvente en fase gaseosa y el extracto crudo de lípidos puros. La extracción por fluidos supercrítico se ha utilizado con buenos resultados en la extracción de distintos tipos de lípidos y, en la actualidad, la técnica se ha optimizado de modo tal de

mejorar los rendimientos. El gráfico de la Figura 10.2.B muestra los resultados obtenidos para la extracción de triacilglicéridos de porotos de soja en diferentes condiciones de presión y temperatura (King, 2002). En este se puede ver claramente cómo la modificación de los parámetros en la región supercrítica del CO₂ puede mejorar la eficiencia de la extracción.

Extracción en fase sólida

El término extracción en fase sólida alude al aislamiento de compuestos, en este caso lípidos, mediante la adsorción o partición del soluto entre una fase sólida y una líquida. Estas fases corresponden a la fase estacionaria y la fase móvil, respectivamente. La separación de los componentes de la muestra dependerá de las características de la fase estacionaria. Un sistema de extracción en fase sólida consiste típicamente en una columna formada por la fase estacionaria que, generalmente, adsorbe los compuestos de interés presentes en la mezcla, en tanto el resto de componentes pasan a través de la columna arrastrados por la fase móvil. Luego los componentes retenidos en la columna son liberados mediante una serie de lavados con solventes que compiten con la fase estacionaria solubilizando los lípidos. Este sistema puede operar de manera inversa, es decir, adsorbiendo los contaminantes no lipídicos. En este caso los lípidos se recuperan con el pasaje de la fase móvil a través de columna. En el caso de la extracción de lípidos, los sistemas suelen estar formados por una fase estacionaria, constituida por un soporte conocido como ODS del inglés *Octadecilsylane* o C18, sobre la cual se hacen pasar distintos solventes correspondientes a la fase móvil. La columna de ODS representa un material apolar, hidrofóbico, por lo que resulta útil para la separación y aislamiento de lípidos. Las porciones alifáticas de los lípidos interactúan con las colas no polares del material C18 mediante interacciones hidrofóbicas, fuerzas de dispersión y/o de Van der Waals. De esta manera los lípidos, presentes en medio acuoso, quedan retenidos en la fase estacionaria. Los compuestos más polares y, entre ellos, los contaminantes no lipídicos

atraviesan la columna acompañando la fase móvil que suele ser un solvente polar, algún alcohol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, o una mezcla de estos solventes con agua (Christie, 1992). La técnica de extracción en fase sólida encuentra distintas aplicaciones en la bioquímica de lípidos. La Figura 10.3 esquematiza los principales pasos y materiales utilizados en la técnica con columnas de ODS. Esta técnica puede emplearse con distintos objetivos: 1) Para la extracción de lípidos totales de matrices complejas tales como distintos tipos de tejidos. En este caso un extracto crudo proveniente del tratamiento de la muestra con solventes, por ejemplo cloroformo: metanol, se aplica sobre el reservorio de la columna de ODS. La muestra se eluye con una mezcla de metanol: agua y se recuperan los lípidos. La elución con distintas mezclas y proporciones de solventes puede permitir, además de la extracción, la separación de las distintas clases de lípidos presentes en la muestra. 2) Se utiliza en la separación y/o pre-fraccionamiento de mezclas complejas de lípidos con fines preparativos. La técnica se emplea en la separación y preparación de lípidos con diferentes propiedades de polaridad. Entonces un extracto proveniente de la extracción con solventes, por ejemplo por el método de Folch, puede ser separado de modo tal de obtener distintas fracciones conteniendo los lípidos neutros, los fosfolípidos ácidos, el colesterol, y así sucesivamente. Una vez que se obtienen las fracciones estas pueden ser separadas y analizadas por otras técnicas cromatográficas. 3) Finalmente, la técnica se ha aplicado con éxito para la extracción de mezclas complejas de determinados tipos de lípidos con características polares, como en el caso de glicolípidos, leucotrienos, prostaglandinas y eicosanoides. Un ejemplo del último caso resulta ser la extracción de lípidos complejos polares, tales como los gangliósidos (Marcia, 1980), que suelen quedar en la fracción acuosa durante la extracción en procedimientos del tipo Folch. En estos casos se utiliza la extracción en fase sólida para extraer los lípidos que quedaron solubilizados en la fase acuosa. Se toma la fracción acuosa de la extracción por Folch y se la hace pasar por una columna de ODS, los glucolípidos quedan retenidos en la columna y son eluidos mediante el pasaje de una mezcla cloroformo: metanol.

Las precauciones mencionadas para el almacenamiento de muestras y tejidos previas a la extracción también aplican al guardado y preservación de los extractos. Una vez extraídos los lípidos se encuentran expuestos a la autooxidación y consecuente pérdida de ácidos grasos insaturados. Para evitar estos inconvenientes se recomienda guardar los extractos en contenedores de vidrio, en solventes apolares, a la temperatura de -20 °C o inferior, en una atmósfera libre de oxígeno, y preferentemente en presencia de compuestos antioxidantes.

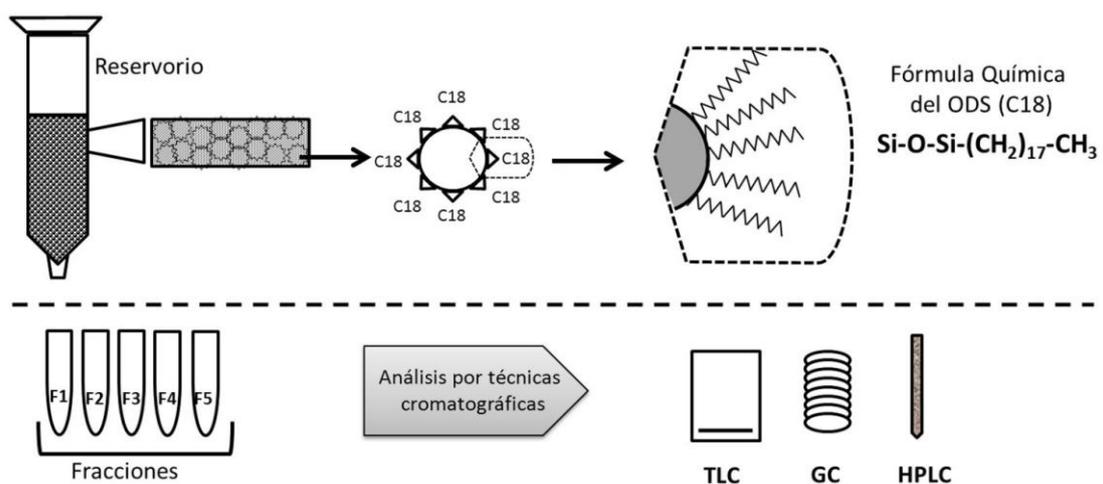


Figura 10.3. Extracción de lípidos en Fase Sólida. ODS: Octadesylsilane; TLC: Cromatografía en capa fina; GC: Cromatografía gaseosa; HPLC: Cromatografía líquida de alta performance.

10.3. Separación y Análisis de Lípidos

Una vez que se ha obtenido el extracto de lípidos del sistema a estudiar, el próximo paso consiste en realizar un análisis de los distintos componentes de la muestra. Esto comprende la separación del extracto en fracciones menos complejas a fin de facilitar su análisis. Las técnicas de cromatografía, con sus distintas variantes, son las de elección al momento de fraccionar y analizar muestras de lípidos. De manera general las podemos clasificar en *cromatografías de partición*, donde se incluyen la cromatografía líquido-líquido y cromatografía gas-líquido, y en *cromatografía de adsorción*, donde

encontramos la cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography, TLC*), cromatografía líquida en columna (*Liquid Chromatography, LC*) y una de sus variantes más importantes, la cromatografía líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). En el siguiente apartado se presenta una descripción de los aspectos más importantes de las técnicas y su utilización en el análisis de lípidos.

Cromatografía gas-líquido

La técnica de cromatografía gas líquido representa una cromatografía de partición en la cual moléculas volatilizadas, en fase gaseosa, se distribuyen y/o particionan entre una fase líquida y otra gaseosa. Los solutos son inyectados en una columna formada por un soporte sólido embebido en un líquido, la fase estacionaria, y son arrastrados a lo largo de la misma por un gas transportador que constituye la fase móvil. En esta cromatografía, las sustancias se separan según sus coeficientes de partición que dependerán de su volatilidad y solubilidad en la fase estacionaria. Esto determina que los solutos pasen distintos tiempos en la fase móvil y en la fase estacionaria en relación a su afinidad por esta última. Finalmente los solutos emergen de la columna y son detectados. Esto permite monitorear y caracterizar la separación de los componentes y eventualmente cuantificarlos (James, 1952; Christie, 1989).

Un cromatógrafo gas líquido consiste en un inyector donde se siembra la muestra, una columna formada por un tubo de vidrio o metálico rellena con un soporte sólido sobre el cual se forma una película de líquido, y un detector que registra los compuestos a medida que van emergiendo de la columna. La figura 10.4.A muestra un esquema de un cromatógrafo gaseoso donde se distinguen las partes mencionadas y cómo se relacionan una con otra. La columna representa la parte central del equipo y es donde se produce la separación de los lípidos. Debido a su estructura, permite la partición de los componentes de la muestra entre las fases estacionaria y móvil. Este proceso de separación es muy eficiente debido a la formación de una fina película de líquido en torno a

las pequeñas partículas de la columna, lo que genera una gran superficie sobre la cual pasa el gas con las sustancias a separar. A medida que la muestra avanza sobre la columna, las moléculas del compuesto particionan entre ambas fases de acuerdo a su coeficiente de distribución o constante K_D . Esta es una constatación de equilibrio que resulta específica para cada compuesto a una temperatura determinada. En el caso de que una mezcla de compuestos se introduzca en el cromatógrafo, los distintos componentes de la mezcla difunden en el líquido según sus coeficientes de partición (K_D) lo que determina que se desplacen por la columna dejándola a diferentes tiempos, lo que se conoce como Tiempo de Retención (T_R). El tiempo de retención representa el tiempo transcurrido medido entre que la muestra entró a la columna, que se registra como un pico característico correspondiente al solvente de la muestra, y el registro de la salida de la columna de un componente dado. La Figura 10.4B muestra un esquema de un cromatograma indicando estos elementos. La diferencia en los tiempos de retención de los distintos compuestos permite su separación. El tiempo de retención resulta ser constante si se mantienen las condiciones en las cuales se lleva a cabo la cromatografía: temperatura, tipo y longitud de columna, gas transportador, etc. y, como depende de la constante de partición, es característico para cada sustancia.

La cromatografía gaseosa se utiliza en el análisis de compuestos susceptibles de ser volatilizados sin sufrir fenómenos de descomposición. Esta técnica se ha aplicado ampliamente al análisis cualitativo y cuantitativo de lípidos y en particular al de ácidos grasos (Gutnikov, 1995). Lo interesante es que, en combinación con otras técnicas de separación y fraccionamiento, tales como la extracción en fase sólida o la cromatografía en capa fina, permite analizar la composición de lípidos formados por la esterificación de alcoholes y ácidos grasos.

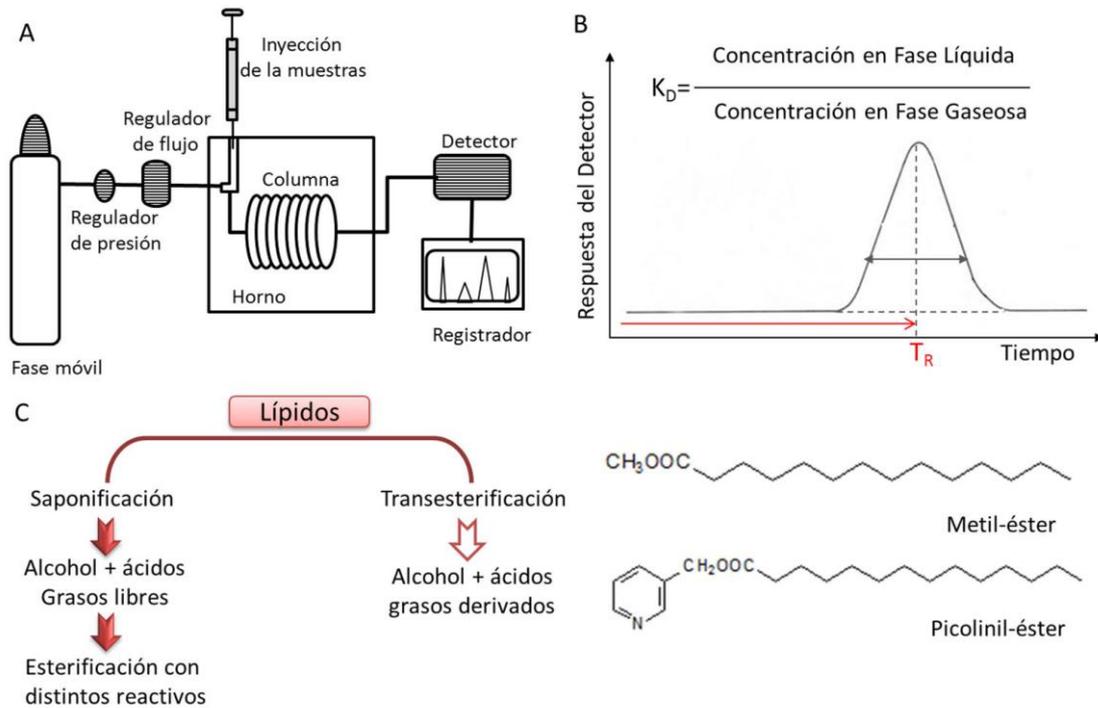


Figura 10.4. Cromatografía Gas Líquido. A. Esquema del cromatógrafo. B. Cromatograma. T_R : tiempo de retención K_D : Coeficiente de Partición. C. Diagrama que indica las posibilidades en la derivación de lípidos y estructura química de dos de los derivados comúnmente utilizados en el análisis por CG de lípidos.

La mayoría de los lípidos son moléculas polares y/o de alto peso molecular lo que no permite el análisis directo por cromatografía gaseosa. Es por eso que las muestras deben ser preparadas y modificadas para su posterior análisis en el cromatógrafo. Las modificaciones consisten en transformar los lípidos en sustancias aptas para la volatilización y en la eliminación de cargas, transformándolos en compuestos de menor peso molecular y apolares. Partiendo de una muestra correspondiente a un extracto de lípidos totales hay distintas opciones para la preparación y derivación de los ácidos grasos de la muestra para su análisis por cromatografía gaseosa. El diagrama de la Figura 10.4C muestra un esquema con las opciones de los procedimientos comúnmente utilizados. El primer paso en el análisis de lípidos formados por ésteres de ácidos grasos consiste en la liberación de los mismos para su derivación. Esto se logra mediante la reacción de hidrólisis del éster en medio básico o reacción de saponificación. Esta reacción libera los ácidos grasos que en medio básico quedan como las sales del ácido. En el paso siguiente de

derivación lo que se hace es eliminar la carga y polaridad del ácido graso. Existen distintas reacciones de derivación, una de las más ampliamente utilizadas es la de formación de ésteres del metanol. Mediante este procedimiento se obtienen los metilésteres de los distintos ácidos grasos presentes en los lípidos de la muestra. Alternativamente, se puede realizar un protocolo de transesterificación entre el lípido y un alcohol de cadena corta obteniendo directamente los ésteres para el análisis (Christie, 1989; Brondz, 2002)

La cromatografía gaseosa permite la separación de una muestra de derivados de ácidos grasos en función de su volatilidad y solubilidad en la fase estacionaria. Los compuestos son detectados a medida que abandonan la columna a distintos tiempos. En este sentido es fundamental conocer las características de la misma ya que, en combinación con la naturaleza de la fase móvil y las condiciones de temperatura, determina la eficiente separación de los ácidos grasos. Existe una gran variedad de columnas que difieren en la forma en cómo se dispone la fase estacionaria y en la composición de la misma que comprende el soporte sólido y el líquido que lo recubre. Las primeras eran empaquetadas, sólidas, pero actualmente tienen un mayor uso las columnas huecas o denominadas columnas abiertas tubulares. Las columnas abiertas representan una parte importante del proceso de optimización de la técnica de cromatografía gaseosa y han ganado popularidad debido a que permiten una mejor separación de la muestra. En cuanto al líquido que embebe al soporte sólido se distinguen, en líneas generales, fases líquidas del tipo i) altamente polares ii) medianamente polares iii) y de baja polaridad. Las columnas utilizadas suelen tener dimensiones de entre 25-30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro. La fase móvil consiste en un gas conocido como gas transportador. La naturaleza y velocidad del gas a utilizar también resultan importantes variables a considerar. El gas debe ser inerte y presentar una velocidad lineal adecuada ya que esto influye en la forma y curva de elución de los compuestos. El hidrógeno es uno de los gases más apropiados debido a que posee una alta capacidad de difusión. En general se usa una combinación de hidrógeno y helio, ambos con un comportamiento similar. Debido a que la

temperatura tiene un marcado efecto en el comportamiento tanto de la fase móvil como del soluto, una vez determinada la temperatura óptima para el sistema con que se trabaja se realizan corridas isotérmicas. Sin embargo, también se utilizan corridas con incrementos programados de temperatura para promover una mejor separación de ciertos ácidos grasos. Los componentes de la muestra que van abandonando la columna son detectados y medidos. Existe una gran variedad de detectores que pueden ser acoplados al cromatógrafo de gases. Los que se utilizan con mayor asiduidad en el análisis de lípidos son el FID, sigla que proviene del inglés *Flame Ionization Detector*, y el espectrómetro de masa. Los resultados del análisis se obtienen en un cromatograma.

La naturaleza de la fase estacionaria, dada por el líquido en que se haya embebido el soporte sólido, es determinante en el tipo de separación a obtener. Fases líquidas poco o nada polares, permiten la separación de los ésteres de ácidos grasos esencialmente en base a su peso molecular. Variando la composición porcentual de la fase líquida, llevándola a valores bajos de entre 1-3%, se logra la separación de los ácidos grasos insaturados para un mismo número de átomos de carbono. Este tipo de separación también se obtiene con fases líquidas hidrocarbonadas de alto peso molecular que logran separar los ésteres en base a su peso molecular y resolver ácidos grasos insaturados de igual longitud de cadena. Lo que se observa es que los ácidos grasos insaturados eluyen antes que los saturados de igual longitud. Esto se debe a que la presencia del doble enlace aumenta la polaridad del ácido graso, lo cual lo hace menos afín por la fase estacionaria. La menor afinidad se traduce en una elución más temprana. Esto genera un patrón de picos en el cual se ve un *cluster* en torno al ácido graso saturado, no habiendo superposición entre los ésteres insaturados de ácidos grasos de diferente longitud de cadena. El problema de estas fases estacionarias reside en que, como la separación es por peso molecular, puede suceder que la resolución de ácidos grasos insaturados no sea completa. Por el contrario, las fases líquidas polares son especialmente útiles para la separación de estos lípidos ya que permiten una buena resolución entre ácidos grasos de una misma longitud de cadena con diferentes grados de insaturación. En este tipo de columnas los ácidos grasos

se separan en base al número de átomos de carbono y los ésteres de ácidos insaturados eluyen más tarde que sus contrapartes saturadas (Christie, 1982). La identificación de los ácidos grasos se realiza mediante la comparación de sus tiempos de retención con el de ácidos grasos puros, estándares, en iguales condiciones de cromatografía. En general se suele utilizar mezclas de composición conocida, que se obtienen comercialmente, constituidas por metil ésteres de ácidos grasos saturados, mono y poliénoicos. Además, suele ser de mucha utilidad en la identificación de ácidos grasos provenientes de muestras naturales consultar en la literatura estudios donde se ha realizado la caracterización de ese tipo de muestra. Los resultados de estos estudios pueden utilizarse como guías en el análisis de los nuevos resultados. Sin embargo puede suceder que ciertos ácidos grasos de la muestra se presenten como dudosos y que no puedan ser determinados; en ese caso se debe recurrir a la literatura en busca de información sobre datos de medidas de tiempos de retención para los distintos ácidos grasos. En general estos se encuentran en la literatura como: i) tiempos de retención relativos, ii) índice de retención de Kováts, o iii) equivalente de longitud de cadena (ECL, del inglés *Equivalent Chain Length*). El valor más comúnmente utilizado es el de ECL. El ECL surge de la relación lineal entre el logaritmo de los tiempos de retención de una serie de ácidos grasos, saturados no ramificados, y el número de carbonos o longitud de cadena. Esta correlación se obtiene graficando los tiempos de retención de los ácidos grasos saturados versus el valor entero de la longitud de cadena expresado como número de átomos de carbono. Cabe recordar que, los valores de ECL son válidos para realizar determinaciones siempre que se utilice la misma fase estacionaria y en las mismas condiciones. La identificación de ácidos grasos por comparación de los tiempos de retención con auténticos estándares o valores de la literatura de ECL resultan procedimientos sencillos y rápidos. La utilización de estándares tiene otra aplicación fundamental en el análisis de lípidos por cromatografía gaseosa que es la cuantificación de los lípidos analizados (Cruz-Hernandez, 2013). La detección de los compuestos genera una señal en forma de pico o campana a la que corresponde una determinada área que es calculada, integrando

electrónicamente, por el equipo. La cuantificación de los ácidos grasos se obtiene de comparar el área bajo la curva de los distintos componentes de la muestra con el área bajo la curva de un ácido graso estándar, no natural o raro en la naturaleza, que se agrega a la muestra y se utiliza en concentración conocida.

Cromatografía en capa fina.

Las técnicas de cromatografía de adsorción, entre ellas de capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) son de gran utilidad en el estudio y análisis de lípidos. En el siguiente apartado se describe el principio, el método y sus aplicaciones. La cromatografía de adsorción se basa en la adhesión diferencial de los componentes de la muestra sobre un soporte sólido, fase estacionaria, lo que determina la separación de los mismos. Las moléculas interactúan por fuerzas intermoleculares tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van de Waals e interacciones iónicas, con la superficie de la fase estacionaria. En la cromatografía en capa fina los lípidos se separan según su estructura química y polaridad. Las diferencias de polaridad de las distintas clases de lípidos determinan la distribución diferencial entre las fases estacionaria y móvil. En el caso de la cromatografía de adsorción donde la fase estacionaria consiste en sílica observamos que, la presencia de grupos polares en la molécula aumenta la adsorción al soporte sólido. Contrariamente, las colas apolares de los ácidos grasos contribuyen poco o nada en dicha interacción. A medida que progresa la corrida cromatográfica, los lípidos son liberados y arrastrados progresivamente por el solvente (fase móvil) que presenta diferencias de polaridad con el soporte. El solvente compite por las interacciones que las moléculas de lípidos forman con la fase estacionaria y cuando las vence el lípido pasa de la fase estacionaria a la fase móvil. El material adsorbente puede empaquetarse en una columna de vidrio, cromatografía en columna, o disponerse como una fina capa en una placa de vidrio, cromatografía en capa fina (TLC) (Christie, 1982; Dijkstra, 2007). En la

cromatografía en capa fina, la sílica es el adsorbente más común y se encuentra adherida formando una delgada capa (0,25-1 mm) sobre una placa de vidrio. En la actualidad es común utilizar placas comerciales. Los pasos de una cromatografía en capa fina se muestran en la Figura 10.5A.

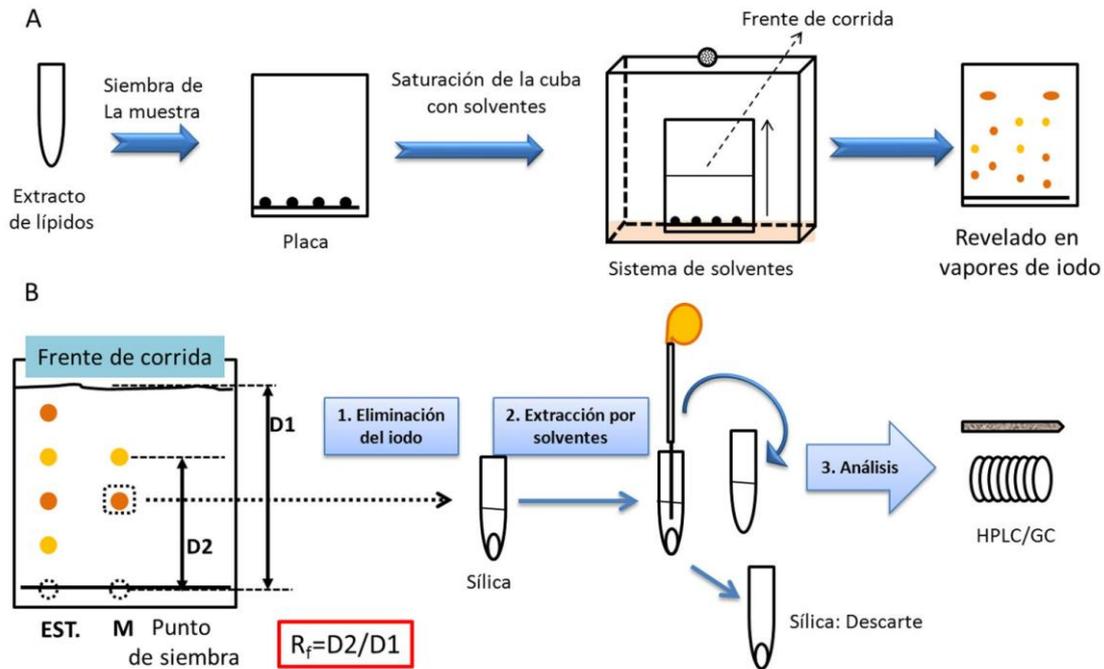


Figura 10.5. Cromatografía en capa fina (TLC). A. Esquema con los pasos de la TLC. B. Análisis de la placa. EST: Estándar; M: muestra; D: distancia 1 y 2. R_f : Retardation Factor, HPLC: Cromatografía líquida de alta performance; GC: Cromatografía gaseosa.

La cromatografía en capa fina presenta una gran versatilidad y numerosas aplicaciones (Touchstone, 1995; Fuchs 2011). El hecho de poder combinar distintos adsorbentes y sistemas de solventes, junto a lo inmediato de la visualización de resultados, la sencillez y los bajos costos de operación, la han transformado en una de las técnicas más utilizadas en el análisis de lípidos. Esta cromatografía se aplica a la separación y análisis de muestras complejas de lípidos conteniendo ácidos grasos, lípidos simples, colesterol y sus ésteres, así como lípidos complejos. La técnica se emplea con fines analíticos y/o preparativos, en ambos casos resulta fundamental la separación y la identificación de los lípidos presentes en la muestra. Debido a la gran variabilidad que se observa en los valores del factor R_f , del inglés *Retardation Factor*, merced a diferencias poco reproducibles en el estado de hidratación y

activación de la placa y diferencias entre distintos proveedores resulta inevitable la utilización de estándares para la identificación de los lípidos. Por otra parte la utilización de estándares permite, además de la identificación, la cuantificación de los lípidos en la muestra.

Como los lípidos son incoloros se debe recurrir a algún tipo de agente químico que nos permita visualizarlos. Estos pueden reaccionar de manera selectiva con un grupo funcional característico presente en algunos lípidos o de manera general con todos los lípidos presentes en la muestra. Los distintos agentes a utilizar pueden ser destructivos o no destructivos, lo que resulta importante al momento de elegir un tipo de revelador ya que con los segundos se podrán recuperar los lípidos de la placa para posteriores análisis. Algunos de los agentes no específicos y no destructivos más comúnmente utilizados son la 2,7-diclorofluoresceína y la rodamina, ambas permiten visualizar los lípidos bajo la luz ultravioleta. A estos dos compuestos se puede agregar la utilización de vapores de yodo que al entrar en contacto con los lípidos generan un patrón de manchas marrones sobre la placa que se visualiza a simple vista. Entre los métodos de visualización destructivos se destaca el de *charring* o carbonizado. En este los lípidos presentes en la placa son expuestos a una solución ácida y llevados a altas temperaturas lo que determina su carbonización. El resultado se ve como una mancha parda-oscura sobre la placa que representa el depósito de carbono presente en el lípido. Adicionalmente, las manchas pueden ser raspadas y cuantificadas por fotodensitometría.

Resulta muy útil de esta técnica el hecho de que una vez que los lípidos se han separado y detectado por métodos no destructivos pueden ser recuperados del adsorbente. Para esto se delimita la banda en la placa y se raspa la sílica correspondiente a cada una de estas en tubos separados. Los lípidos son extraídos con solventes y sometidos a posterior análisis por técnicas que permitan su identificación y cuantificación, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida de alta performance o cualquiera de estas técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masa (Figura 10.5B).

Cromatografía líquida de alta performance

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) es un tipo de cromatografía en la que los componentes de una mezcla pasan a través de una columna, fase estacionaria, conforme se hace pasar un solvente, fase móvil, que va separando los distintos compuestos. Las moléculas de la mezcla se separan según sus propiedades de partición, solubilidad, entre las fases estacionaria y móvil. La principal diferencia entre este tipo de cromatografía líquida y la cromatografía en columna común reside en que el solvente se hace pasar por la columna a alta presión por acción de una bomba haciendo que la separación sea más eficiente. Un equipo para HPLC consiste típicamente en un reservorio del solvente, fase móvil, conectado a una bomba y esta al inyector. Luego encontramos una columna donde se separan los componentes y finalmente un detector (Figura 10.6A). Existen diferentes tipos de columnas para la HPLC, lo que le da una gran versatilidad a la técnica. Las diferentes columnas permiten utilizar este tipo de cromatografía en el modo de adsorción, de partición o incluso de intercambio iónico. Debido a estas posibilidades, la técnica de HPLC se emplea en el análisis de todo tipo de lípidos. Se usa para ácidos grasos provenientes de lípidos simples y complejos e incluso para el análisis de estos lípidos intactos. Sin embargo, las principales aplicaciones en la literatura se encuentran para ácidos grasos y fosfolípidos (Borch, 1975; Olsson, 1997). Sumado a la variedad de fases estacionarias y múltiples fases móviles, la HPLC cuenta con la ventaja de que trabaja a temperatura ambiente lo cual la hace muy útil para sustancias termolábiles. Dependiendo de la muestra y el tipo de lípidos que se quiera separar se selecciona una u otra fase estacionaria. La mayoría de estudios y análisis de lípidos por HPLC se realizan utilizando columnas de fase reversa formadas por cadenas alquílicas de distintas longitudes, de 4 a 30 átomos de carbono (C4-C30), unidas a una base de microesferas de sílica. Sin embargo, también se encuentran estudios donde se utilizan fases estacionarias constituidas por sílica, ósea de fase directa o fase normal, que se aplican principalmente para la separación de clases de lípidos,

por ejemplo lípidos simples de lípidos complejos y/o esteroides. Las columnas de fase reversa se utilizan para el análisis de ácidos grasos y la separación de especies dentro de una clase de lípido particular, por ejemplo, especies de fosfatidilcolina que difieren en la composición de ácidos grasos. El grado de retención y selectividad de la fase estacionaria de tipo reversa aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena alquílica de los ácidos grasos y/o lípidos que los contienen. En este tipo de fases estacionarias, los lípidos se separan según el grado de insaturación y largo de la cadena de sus ácidos grasos. El ODS (del inglés *Octadecilsylane*) o C18 resulta ser la fase reversa más utilizada en el análisis de ácidos grasos y constituye una fase estacionaria no polar. Cuando se utilizan columnas con esta fase estacionaria, la presencia de cada doble enlace produce una reducción del tiempo de retención equivalente a tener dos grupos metilenos menos. Esto es particularmente evidente cuando se analizan series del tipo: 14:0, 16:1 y 18:2, los tres ácidos grasos, pese a la diferencia de longitud de su cadena, eluyen próximos en tiempo, de la columna. En la cromatografía líquida de alta performance la fase móvil consiste en una mezcla con distintas proporciones de un solvente orgánico, comúnmente metanol o acetonitrilo, en combinación con uno de mayor polaridad que suele ser agua, o los tres juntos. Resulta interesante, y de gran ventaja metodológica, el hecho de que la proporción de los solventes se puede variar durante la corrida generando un gradiente de la fase móvil que puede ir de menos a más polar o viceversa. En este sentido, la técnica de HPLC presenta más opciones para lograr la adecuada separación de muestras complejas en relación a otras cromatografías. Para la detección de compuestos separados por HPLC es fuertemente sugerido que se realice la derivación de los lípidos. La derivación consiste en la adición de una molécula que mejora sensiblemente las propiedades del derivado para ser detectado. Este método de aumento de la detección debe ser evaluado para cada caso y siempre resulta un compromiso entre la resolución que se desea obtener y la necesidad de aumentar la detección del lípido. Esto se debe a que la introducción de un agente de derivación o cromóforo tiene efecto sobre las propiedades de partición de los lípidos en el sistema cromatográfico. Para el caso de ácidos

grasos, una de las derivaciones comunes consiste en la formación de ésteres metílicos, adicionalmente se utiliza el agregado de cromóforos mediante la formación de ésteres de fenacilo con el 2-bromo 1-feniletanon (Borch, 1975) (Figura 10.6B). En particular, la adición de estos grupos que poseen dobles enlaces conjugados mejoran sensiblemente la detección de los compuestos mediante el monitoreo de los eluyentes con luz ultravioleta a cortas longitudes de onda. Como se desataca más adelante, los detectores UV son de los más utilizados en la HPLC.

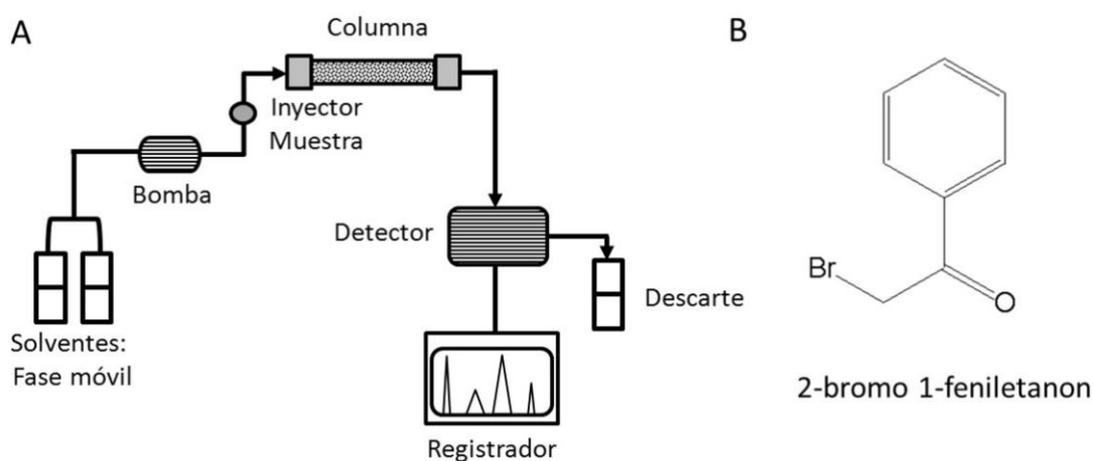


Figura 10.6. *Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). A. Esquema del equipo utilizado en el análisis por HPLC. B. Fórmula química de un compuesto comúnmente utilizado en la derivación de lípidos para el análisis por HPLC.*

En términos de resolución de una muestra, el sistema de separación ideal es aquel que pueda combinar sensibilidad, velocidad y eficiencia en la separación (Gutnikov, 1995). Generalmente sucede que una de estas características va en detrimento de la otra. La velocidad puede aumentarse utilizando columnas cortas que suelen afectar la separación, en tanto que columnas de mayor longitud aumentan los tiempos de corrida pero mejoran sensiblemente la separación de los componentes de la muestra. La sensibilidad aumenta con el agregado de un compuesto para la derivación, pero esto también va en detrimento de la resolución. Esto sucede porque, en la cromatografía de fase reversa, la separación se da en relación a las características estructurales de la cadena carbonada del ácido graso. Un aumento en el volumen del cromóforo incrementa la proporción de la porción no selectiva de la molécula reduciendo

la separación en base a la porción selectiva. En este sentido se debe tener en cuenta al seleccionar el cromóforo que la polaridad del mismo tienda a mejorar la selectividad y separación de los ácidos grasos en la columna. No obstante la regla es que una mayor sensibilidad en general se consigue a expensas de la resolución de la muestra.

La detección de lípidos resueltos por HPLC dependerá ampliamente de las características estructurales de los mismos, específicamente, de la presencia de grupos funcionales susceptibles de ser detectados por uno u otro método. Por otra parte la fase móvil (solventes) utilizada en la HPLC también será determinante, en lo que al uso de uno u otro detector se refiere, ya que no todos los solventes son igualmente compatibles con los distintos detectores. En el caso de la ausencia de grupos funcionales visibles para los detectores, la detección dependerá de las propiedades del cromóforo elegido para la derivación de los lípidos. Existen actualmente numerosos detectores que se acoplan a la HPLC siendo los más utilizados los Detectores por espectrofotometría de luz UV, Índice de refracción (RI del inglés *Refractive Index*) y el de Dispersión de luz por el soluto una vez evaporado el solvente (ELSD del inglés *Evaporative Light Scatter Detector*). También se puede utilizar un detector fluorométrico, en este caso la derivación se realiza con un fluoróforo, comúnmente el antraceno. A los detectores mencionados se suma el espectrómetro de masas; este puede además de permitir monitorear la cromatografía dar información útil sobre aspectos estructurales de los lípidos. En la actualidad se prefieren aquellos detectores que muestran la mayor sensibilidad y que se puedan usar en corridas con gradientes de la fase móvil. Con los detectores UV la sensibilidad resulta baja y estrechamente dependiente de la cantidad de dobles enlaces. Los detectores IR y ELSD son considerados universales y pueden ser muy útiles. La principal desventaja con el IR es que solo puede ser usado en corridas isocráticas y resulta muy sensible a cambios de temperatura. El ELSD es un detector robusto, el principal inconveniente es que no se observa una relación lineal entre la concentración del soluto y los picos generados durante la detección, con lo cual sólo puede utilizarse con fines cualitativos. Sin embargo, la separación y

análisis con este tipo de detectores se usa con fines preparativos. Para fines analíticos es recomendable la derivación de ácidos grasos y lípidos para mejorar la sensibilidad de los detectores y por ende la detección. Para esto es importante utilizar agentes que presenten una alta absorptividad molar. De este modo la señal será proporcional a la cantidad molar del cromóforo o agente de derivación. Esto significa que, para un sistema de cromatografía dado, la sensibilidad será función de la concentración molar del reactivo y su derivado lipídico, lo que implica que su formación debe ser cuantitativa y mantener una cierta estequiometría. Un factor importante en la elección de este tipo de agentes es que no deben modificar significativamente el comportamiento de los lípidos durante el desarrollo de la cromatografía. Posterior a la modificación, el compuesto derivado debe comportarse de manera similar a como lo hace el compuesto parental.

En adición al análisis de ácidos grasos se han realizado numerosos estudios de fosfolípidos extraídos de diversas fuentes naturales. Esta técnica se ha utilizado con éxito para resolver satisfactoriamente la separación de muestras conteniendo distintas clases de fosfolípidos tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico. Cabe mencionar que, si bien es menos común, también se ha utilizado con buenos resultados en el análisis de especies de triacilglicéridos (Nikolova, 1995).

Un buen ejemplo de lo útil que puede resultar esta técnica en el análisis de fosfolípidos se observa en el estudio publicado por Patton (Patton, 1982). En dicho trabajo los autores obtienen una muy buena separación de las clases de fosfolípidos presentes en un extracto de lípidos de hígado obtenido por el método de Folch. Los lípidos disueltos en hexano: 2-propanol: agua se separan por HPLC en el modo de fase directa mediante la utilización de una columna de sílica gel (250 x 4,6 mm). La corrida se desarrolla en condiciones isocráticas utilizando una mezcla de solventes hexano: isopropanol: *buffer* fosfato 25 mM: etanol: ácido acético (367:490:62:100:0.6 v/v).

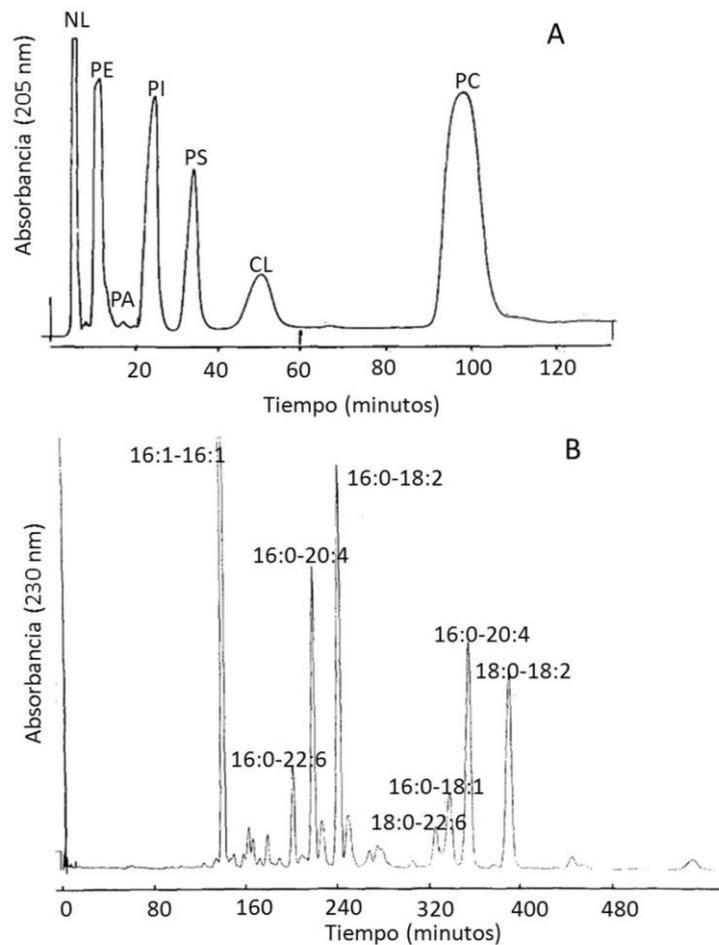


Figura 10.7. A. Cromatograma del análisis de clases de lípidos por HPLC de fase directa. NL: lípidos neutros; PE: fosfatidiletanolamina; PA: ácido fosfatídico; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; CL: cardiolipina; PC: Fosfatidilcolina (Reproducido y adaptado de J. Lipid Res. 23:190-196, 1982. y con permiso de Sander J. Robins). B. Separación de especies de fosfatidilcolina por HPLC de fase reversa la anotación asociada a cada pico indica la composición en ácidos grasos (Reproducido y adaptado de J. Nutr. Biochem., 1:549-556, 1990. y con permiso de Sander J. Robins).

En este mismo estudio se precedió a la separación de distintas especies de los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. La separación de las especies de fosfolípidos se realizó por HPLC en columna de fase reversa C18 (ODS) utilizando distintos sistemas de solventes. Las fracciones detectadas fueron colectadas para la posterior determinación de las especies de fosfolípidos por análisis de la composición de ácidos grasos por CG. Las figuras 10.7.A y B muestran cromatogramas obtenidos en fase directa y reversa, respectivamente, utilizando este tipo de análisis.

Espectrometría de masa en el análisis de lípidos: lipidoma.

La técnica de espectrometría de masa se basa en la generación de iones a partir de compuestos, inorgánicos u orgánicos por alguno de los métodos adecuados, para luego separar estos iones en base a su relación de masa a carga, m/z . El método permite la detección, análisis cualitativo, así como la determinación de la abundancia de los iones, análisis cuantitativo. Los compuestos pueden ser ionizados térmicamente, por acción de un campo eléctrico, por el impacto de electrones, otros iones o incluso fotones. Los iones generados pueden consistir en simples átomos, moléculas o fragmentos de estas, así como asociaciones de estos elementos. En cualquier caso, la separación de los iones se efectúa por exposición de los mismos a la acción de un campo magnético que los separa (Gross, 2004).

La espectrometría de masa es una de las técnicas de química analítica más ampliamente utilizada en la actualidad para distintos compuestos y tiene un amplio campo de aplicación en la bioquímica de lípidos, constituyendo uno de los tipos de detectores que puede acoplarse a la cromatografía líquida o gaseosa líquida. En este sentido representa una valiosa herramienta para el análisis estructural de lípidos. Sus primeras aplicaciones, sobre lo que se encuentra abundante bibliografía, se realizaron en el campo del estudio de ácidos grasos (Kuksis, 1995). Posteriormente fueron surgiendo otras aplicaciones en el análisis de fracciones o mezclas de lípidos simples y complejos mediante la técnica de cromatografía líquida y espectrometría de masa (LC-MS del inglés *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*). A esto se sumaron los estudios de *Shotgun lipids*, en los cuales la muestra compleja de lípidos es inyectada directamente en el espectrómetro de masa.

Existe actualmente una gran diversidad en cuanto a equipos de espectrometría de masas. Sin embargo, todos comparten una serie de rasgos y partes comunes, a saber: una fuente de iones, punto de entrada al equipo, un analizador de masas que puede ser de una o varias cámaras y el detector (Gross, 2004).

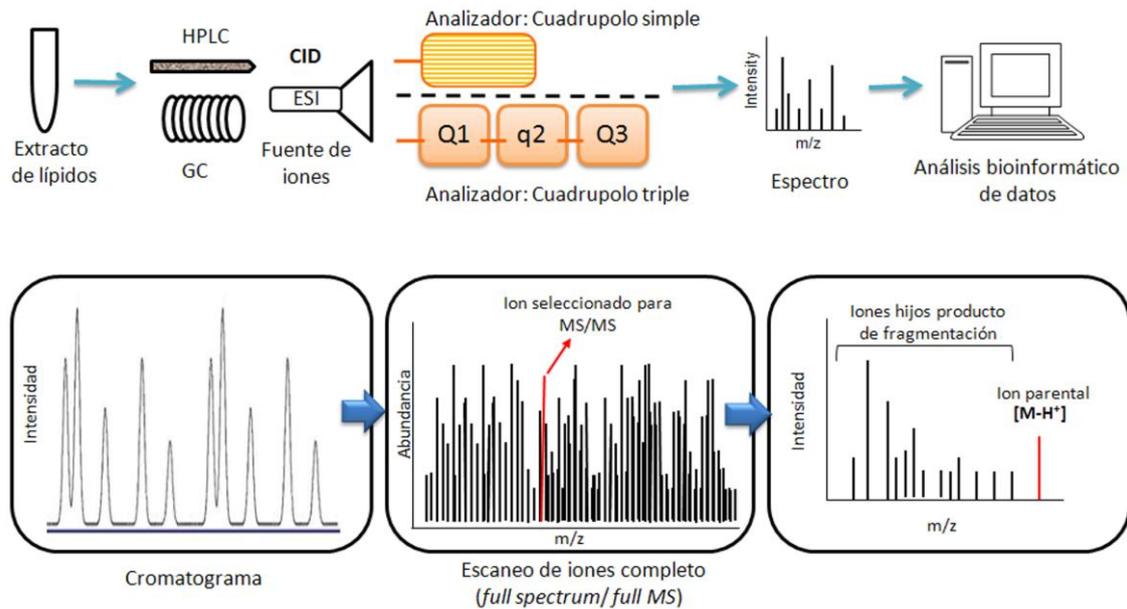


Figura 10.8. Análisis de lípidos por espectrometría de masa

Las muestras lipídicas entran a través de la fuente de iones desde donde son conducidas al analizador de masa. Este consiste en un fuerte campo electromagnético a lo largo del cual los iones migran a diferentes velocidades según su relación de m/z , lo que determina que los iones sean registrados por el detector a distintos tiempos. La Figura 10.8 muestra de manera esquemática el procedimiento. En la figura (panel inferior) se muestra el resultado del análisis en el espectrómetro, un espectro de masa. A medida que los iones van alcanzando el detector se va generando un gráfico de barras, histograma, donde se muestra la abundancia de los iones, en la ordenada, versus la relación de m/z en abscisas. La intensidad de cada pico indica la abundancia relativa para esa determinada relación de masa/carga (m/z). El conjunto de picos representa lo que se denomina espectro completo (*full ms*). El pasaje de compuestos por el analizador genera un espectro de iones que han sido detectados a distintos tiempos y en base al cual el equipo construye un cromatograma que se correlaciona de manera directa con dicho espectro. De esta manera se puede, a partir de un pico del cromatograma, mapear o identificar en el espectro a qué ion/iones corresponde dicho pico y viceversa, desde el espectro se puede seleccionar un pico correspondiente a un ion y ver en el cromatograma en que momento dejó la columna. El pico de mayor intensidad en el espectro se denomina pico de base y los espectros suelen

mostrarse con intensidades relativas respecto de este al cual se asigna una intensidad del 100%. La identificación de los distintos lípidos en el espectrómetro se realiza, de manera general, al igual que para los otros compuestos orgánicos analizados por esta técnica. Las moléculas lipídicas se cargan positiva o negativamente en la fuente de generación de iones y entran al analizador donde se produce un filtrado de los mismos para, individualmente, promover su fragmentación y analizar los resultados. La fragmentación que es un proceso conocido como disociación inducida por colisión (CID del inglés *Collision Induced Dissociation*) se produce por el impacto de los iones con un gas inerte y resulta ser característica y reproducible en condiciones determinadas para cada compuesto. El producto de la colisión, los iones, es analizado por el equipo generando un segundo espectro que se conoce como espectro de masa en tándem o simplemente MS/MS. En este se puede observar un pico con la relación de m/z mayor, resultado de la detección del ion original sin fragmentar, denominado ion parental, el cual suele estar acompañado de una serie de picos que son el producto de la fragmentación del ion parental o molecular. Mediante el análisis y reconocimiento del patrón de fraccionamiento comparado con el obtenido y estudiado utilizando compuestos puros (estándares) se obtiene la identificación de los compuestos de la muestra. El proceso de fraccionamiento depende de la estructura química del lípido y, en la medida que se mantengan las condiciones de operación del equipo, es altamente reproducible. Esto permite que cada compuesto pueda ser analizado en base a un ion parental/molecular de relación m/z (z en general es igual 1) y una colección de fragmentos característicos que se observan en un mismo espectro (tándem MS/MS). De esta manera se obtiene un patrón de iones que caracteriza a una molécula dada y que puede ser enfrentada a una base de datos formada por espectros generados en base a estándares y de este modo realizar su identificación. Adicionalmente, conociendo la masa de los iones generados y la del ion parental se puede proceder de manera manual a la elucidación de la fórmula molecular del ion y la predicción de su estructura. Es importante mencionar que, si bien el espectrómetro de masas puede utilizarse en el análisis directo de los lípidos, lo más común es que se lo utilice

como detector asociado a distintos tipos de cromatografía. La cromatografía, además de reducir la complejidad de la muestra y mejorar sensiblemente la capacidad analítica del espectro, brinda importante información en términos de tiempos de retención que contribuye a la identificación de los lípidos. En relación al análisis por espectrometría de masa de lípidos se debe mencionar que, dependiendo del proceso de ionización que se utilice, también se puede obtener el fraccionamiento de la molécula lipídica durante la generación de iones. En este caso el escaneado de cada tipo de lípido se obtiene como un ion parental, correspondiente a la molécula original intacta y los fragmentos asociados a este, el análisis del conjunto nos permite elucidar la estructura química del lípido en cuestión y su identificación.

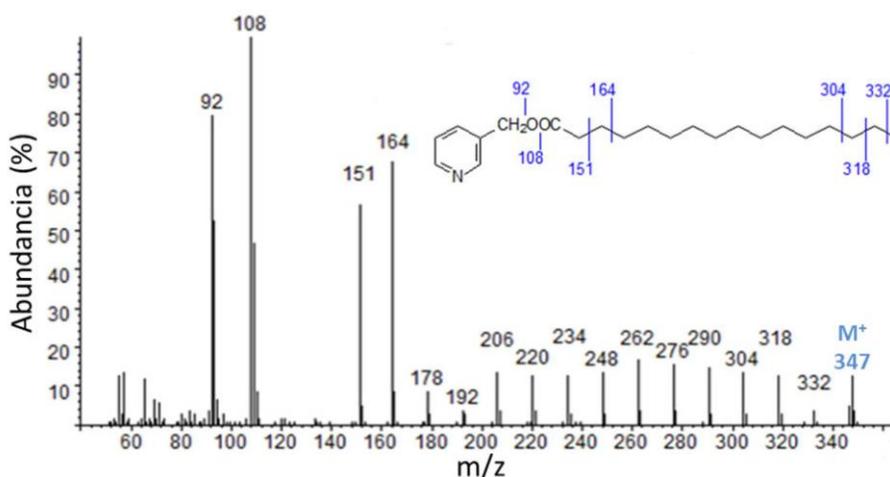


Figura 10.9. Análisis de ácidos grasos por espectrometría de masa. Espectro correspondiente al tándem MS/MS del derivado de ácido palmítico (Reproducido y adaptado de Lipid Library, Saturated and branched-chain fatty acids en lipidlibrary.aocs.org y con permiso de William W. Christie).

En la Figura 10.9 se muestra un espectro representativo obtenido en el análisis del ácido graso palmítico (16:0) para graficar el modo en que el espectrómetro nos permite la elucidación de la estructura de una molécula y eventualmente su identificación. La figura muestra el espectro correspondiente al derivado del ácido palmítico, el 3-picolinil éster. Los ácidos grasos pueden ser analizados en el modo de iones positivos o negativos del espectrómetro según el tipo de iones que se generen. Esto dependerá de si se analizan los ácidos grasos naturales o sus derivados, metil-ésteres, sulfo o nitroderivados (Harvey, 1982).

En el caso de los nitroderivados, la presencia del átomo de nitrógeno hace que los compuestos que se forman con el ácido graso presenten la tendencia a formar iones positivos y por esto el análisis se realiza operando el espectrómetro de masa en el modo positivo. En este ejemplo el análisis muestra un ion parental o molecular positivo M^+ ($m/z= 347$) que se distingue fácilmente. Debido a que la carga del ion (z) es de 1 el valor de 347 nos indica la masa del ion molecular. Adicionalmente se observan una serie iones producto de la fragmentación del ion molecular que, como se mencionó, ocurre de manera característica y es función de la estructura y energía interna del ácido graso analizado y de las condiciones en que se opera el equipo. La aparición sistemática de estos iones da cuenta de la estructura e identidad del ácido graso. En el espectro que se muestra se puede ver que, además del ion 347, aparecen con distintas intensidades una colección de iones que van desde el 332 hasta el 151 y que se generan por la pérdida y/o remoción de un grupo metileno cada vez (CH_2). Además se observan dos iones muy prominentes y característicos, 108 y 92, producto de la fragmentación en distintos puntos del éster. La detección del ion de relación $m/z= 347$ sumado a los iones que se mencionan indican la presencia del éster del 3-picolinil del ácido palmítico. Como se desprende del análisis de este caso resulta fundamental para una rápida y adecuada interpretación de los resultados contar con una buena caracterización, basada en el análisis de estándares de lípidos puros, del comportamiento de los distintos ácidos grasos y/o derivados al pasar por el espectrómetro. Cabe destacar que este tipo de análisis y caracterizaciones es resultado del trabajo de varios grupos que investigan en el área de la bioquímica e identificación de lípidos (Navas Iglesias, 2009). A la identificación por espectrometría de masa se suma la información y simplificación que otorga el análisis por cromatografía. El hecho de poder acoplar y trabajar en línea (*on line*) con HPLC o CG y MS ha transformado ambas técnicas en uno y otro sentido, aumentando la selectividad y sensibilidad de las mismas. Las cromatografías aportan su selectividad y poder resolutivo para muestras complejas entregando al analizador, de manera continua, clases y especies de

lípidos reduciendo el trabajo del espectrómetro lo que se traduce en una mejor detección e identificación.

La técnica y equipamiento utilizado en el análisis por espectrometría suele variar en función de la complejidad de las muestras y del tipo de lípido que se quiera analizar. Generalmente se utiliza la ionización por *electrospray* o ESI, del inglés *Electrospray Ionization*, que permite obtener los lípidos cargados (iones) en nano-gotas del solvente listos para pasar a la fase gaseosa y entrar al analizador del espectrómetro. Esta es considerada una técnica suave de ionización que, dependiendo de la estructura química de los lípidos y de la presencia de iones inorgánicos en la solución generarán iones positivos o negativos. De esta manera los iones se conducen mediante un capilar al analizador de tipo “atrapa iones” o *ion trap*. Este puede ser simple, una sola cámara, conocido como cuadrupolo simple, o estar compuesto por tres cámaras conocido como cuadrupolo triple. En este hay tres cuadrupolos o regiones para el análisis de iones, QqQ (Q1, q2, Q3). La mayoría de los analizadores de masa poseen un detector donde los iones impactan y generan un impulso eléctrico que es magnificado y traducido en una señal que es registrada. Como se mencionó anteriormente, resulta fundamental la fragmentación y análisis de los iones generados para la identificación del compuesto. Esto se realiza por el proceso de Disociación Inducida por Colisión, (CID). Dependiendo del equipo que se utilice el proceso de disociación puede realizarse durante la generación de iones, como suele ser en el caso en que se utiliza *electrospray* (ESI), o en una cámara de disociación (q2) entre los cuadrupolos (Q1 y Q3). En el primero de los casos esto se logra incrementando y ajustando la corriente (voltaje) que se aplica. En el análisis de lípidos se observó que aumentando el voltaje (energía) en el proceso del ESI se obtiene una buena colección del ion original y sus fragmentos (Kuksis, 1995). Los iones así generados son luego analizados por el analizador de una cámara, el *ion trap*. En el caso del cuadrupolo triple los iones que ingresan al espectrómetro son seleccionados en Q1 y dirigidos a q2 donde se bombardean con un gas para producir la fragmentación. Finalmente los iones así generados son analizados en Q3. Si bien ambas estrategias de análisis se usan en la

actualidad se ha observado que combinando la técnica de HPLC con *ESI-CID-Ion Trap* se obtienen resultados similares a los generados utilizando MS-CID-MS en un cuadrupolo triple. Debido a que el primero de los métodos resulta menos costoso se ha transformado en la técnica de elección.

Alternativamente al análisis de fracciones puras constituidas por una clase de lípido y sus especies ha surgido también en este campo de la bioquímica una metodología de análisis global conocida como lipidoma. El lipidoma es una especialidad dentro del campo del metaboloma dedicada al análisis exhaustivo de compuestos hidrofóbicos de alto peso molecular, de baja polaridad y bajo recambio. Uno de los principales desafíos ha sido trabajar con la gran diversidad y heterogeneidad que los lípidos reportan, lo cual ha obligado a desarrollar estrategias de análisis para cubrir el amplio espectro de las muestras (Layre, 2013; Navas-Iglesias, 2009). El objetivo de esta área dentro de la bioquímica de lípidos consiste en poder realizar un análisis que permita conocer de manera exhaustiva el conjunto de lípidos que se encuentran en un sistema dado en simultáneo. Metodológicamente esto implica combinar una o más cromatografías, idealmente en línea, con un espectrómetro de masas de modo tal de determinar la gran variedad de lípidos presentes. Adicionalmente se requiere de un sistema automatizado de análisis de datos para realizar la identificación de los compuestos detectados por el equipo. Para el desarrollo de esta área ha sido necesaria la caracterización del comportamiento de los distintos lípidos conocidos en condiciones controladas, y reproducibles, de trabajo del espectrómetro. Producto de este trabajo se han obtenido bases de datos que resultan en la actualidad fundamental para la etapa de identificación de los compuestos y análisis de datos, tal es el caso de LIPIDMAP (<http://www.lipidmaps.org>). El procedimiento implica la extracción de lípidos totales de la matriz biológica y su separación por cromatografía líquida (HPLC) en un sistema de trabajo en línea. Conforme los lípidos se van separando pasan por la zona donde se generan los iones, la fuente de iones, y entran al analizador. Los resultados así obtenidos se analizan aplicando estrategias bioinformáticas que permiten la identificación y cuantificación de los lípidos en la muestra, así como la comparación de resultados provenientes de analizar

muestras distintas. En la última década se han publicado de manera creciente varios estudios donde se aplica esta metodología al análisis y caracterización de muestra de gran relevancia. Inclusive se han desarrollado protocolos de “*high throughput*” por *Shotgun* o análisis directo por inyección de la muestra en el espectrómetro que permiten el análisis de varias muestras (cientos) en tiempo de horas (Stahlmana, 2009). Uno de los trabajos pioneros en el análisis global de lípidos por inyección directa en el espectrómetro fue el publicado a mediados de la década del 90 por Han y Gross (Han,1994) sobre la caracterización de fosfolípidos del eritrocito provenientes de la extracción de lípidos con cloroformo. En este estudio se utilizó el ESI como fuente de iones y los lípidos fueron analizados directamente, sin previa cromatografía, en los modos negativo y positivo en un *Ion Trap*. Más de 50 fosfolípidos de la membrana del eritrocito fueron identificados por infusión directa en un sistema de tipo ESI-CID-MS a partir de extractos de sangre.

Resumiendo podemos decir que el análisis de lípidos por espectrometría de masa comprende un conjunto de técnicas y/o posibilidades que va desde el análisis de fracciones puras provenientes de sistemas *off line* de cromatografía, pasando por el análisis de fracciones con clases de lípidos ricas en especies que se resuelven y analizan mediante sistemas de cromatografía *on line* con el espectrómetro, hasta los denominados sistemas de análisis de tipo *Shotgun* donde muestras con distinta complejidad son analizadas directamente en el espectrómetro.

Bibliografía

Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Med Sci, 37(8):911-917, 1959.

Borch RF. Separation of Long Chain Fatty Acids as Phenacyl Esters by High Pressure Liquid Chromatography Analytical Chemistry, 47:2437-2439, 1975.

Brondz I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques Analytica Chimica Acta 465:1–37, 2002.

Christie WW. Gas Chromatography and Lipids published in by P.J. Barnes & Associates, The Oily Press Ltd, 1989.

Christie WW. Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids. *Advances in Lipid Methodology – One*, Ed. WW. Christie, Oily Press, Ayr pp. 1-17, 1992.

Christie WW. Lipid analysis: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. 2nd ed. Pergamon international library of science, technology, engineering, and social studies. Oxford, Oxfordshire, England; New York: Pergamon Press. xvi, 207, 1982.

Cruz-Hernandez C, Goeuriot S, Giuffrida F, Thakkar SK, Destailats F. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1284 :174–179, 2013.

Dijkstra AJ, Christie WW and Knothe G. Handbook of Lipids, 3^{era} edición , Capítulo 6: Analisis. Editado por Frank D. Gunstone, John L. Harwood, Albert J. Dijkstra. CRC Press, Taylor and Francis Boca Raton London, New York, 2007.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226(1):497-509,1957.

Fuchs B, Süß R, Teuber K, Eibisch M, Schiller J. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state *Journal of Chromatography A*, 1218:2754–2774, 2011.

Gross JH. Mass Spectrometry a Textbook. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.

Gutnikov G. Fatty acid profiles of lipid samples, *Journal of Chromatography B*, 671:71-89, 1995.

Halim R, Gladman B, Danquah MK, Webley PA. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102(1):178–85, 2011.

Halim R., Michael K. Danquah, Paul A. Webley Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review *Biotechnology Advances* 30:709–732, 2012.

Harvey DJ. Picolinyl Esters as Derivatives for the Structural Determination of Long Chain Branched and Unsaturated Fatty Acids *BIOMEDICAL MASS SPECTROMETRY* 9:33-38, 1982.

Iverson SJ, Lang SL, and Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids* 36:1283–1287, 2001.

James AT and Martin AJP. Gas-liquid Partition Chromatography: the Separation and Micro-estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid 50:679-690, 1952.

King JW. Analytical Supercritical Fluid Techniques and Methodology: Conceptualization and Reduction to Practice. *Journal of AOAC International*. 81:9-17, 1998.

King JW. Supercritical Fluid Extraction: Present Status and Prospects. *Grasas y Aceites*. 53:8-21, 2002.

Kuksis A, Myher JJ Application of tandem mass spectrometry for the analysis of long-chain carboxylic acids *Journal of Chromatography B*, 671:35-70, 1995.

Layre E, Moody DB Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens. *Biochimie* 95:109-115, 2013.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York : W.H. Freeman, 2013.

McDaniel LH, Taylor LT. Esterification of decanoic acid during supercritical fluid extraction employing either methanol-modified carbon dioxide or a methanol trap. *Journal of Chromatography A*, 858:201–207, 1999.

Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *Trends in Analytical Chemistry* 28(4), 2009

Nikolova-Damyanova Boryana, Christie WW, Bengt G. Herslöf. Retention properties of triacylglycerols on silver ion high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 694:375-380, 1995.

Olsson NU, Salem N. Molecular species analysis of phospholipids. *Journal of Chromatography B*, 692:245-256, 1997.

Patton GM, Fasulo JM, Sander JR. Analysis of lipids by high performance liquid chromatography. Part II: Phospholipids. *J. Nutr. Biochem.* 1:549-556, 1990.

Patton GM, Fasulo JM, Sander JR. Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 23:190-196, 1982.

Ståhlman M, Ejsing CS, Tarasov K, Perman J, Borén J, Ekroos K. High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry *Journal of Chromatography B*, 877:2664–2672, 2009.

Touchstone JC. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation *Journal of Chromatography B*, 671:169-195, 1995.

Williams MA, McCluer RH. The Use of Sep-Pap C, Cartridges During the Isolation of Gangliosides. *Journal of Neurochemistry* 35(l):266-269, 1980.