



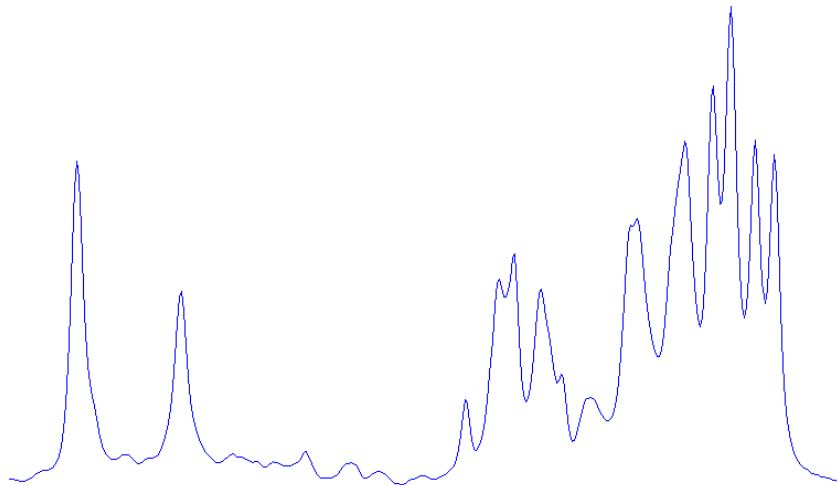
UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



# OPTIMITZACIÓ I AUTOMATITZACIÓ D'UNA ANÀLISI LIPIDÒMICA DE SÈRUM HUMÀ PER $^1\text{H}$ -RMN

Pau Homs Aguadé

TREBALL DE FI DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic: Ricardo Román Cordero Otero, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, ricardo.cordero@urv.cat

En cooperació amb Biosfer Teslab

Supervisor: Enrique Ozcariz García, Biosfer Teslab, enriqueozcariz@gmail.com

Juny 2022, Reus



Jo, Pau Homs Agudé , amb DNI 39940636-D, soc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (apro- vada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formaci-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 4 de Juny de 2022.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.



## Agraïments

*En primer lloc, m'agradaria agrair a tot l'equip de Biosfer Teslab, per donar-me l'oportunitat de realitzar les meves pràctiques i el Treball de Fi de Grau a la seva empresa. En especial a l'Enrique Ozcariz, el meu tutor de pràctiques i supervisor del treball, gràcies per estar sempre al meu costat i respondre totes les meves preguntes i ensenyar-me tot el que saps. A la Núria Amigó, presidenta i co-fundadora de Biosfer Teslab, gràcies per confiar en mi i brindar-me aquesta gran oportunitat. També a la Carla, a la Sara i al Daniel, per ajudar-me sempre que ho he necessitat.*

*Agrair també al meu tutor acadèmic, Ricardo Cordero, per la seva ajuda, així com a tots aquells professors del Grau de Biotecnologia que han posat passió a les seves classes.*

*Als meus companys de carrera, que han acabat sent grans amics i persones molt importants, gràcies per la vostra ajuda sempre que l'he necessitat, per totes les rialles i els mental breakdowns i per totes les festes, viatges i experiències que hem viscut durant aquests 4 anys, i esperem que en siguin més.*

*També als meus amics de sempre, per estar amb mi passi el que passi i sigui on sigui.*

*Finalment, a la meva família, en especial als meus pares, per ensenyar-me totes les coses que no s'aprenen ni a l'escola ni a la universitat. Si soc com soc, és gràcies a vosaltres. I a les meves àvies, que sé que cada dia m'envien la força per seguir cap endavant.*

# Índex

Dades del centre: .....	5
Resum:.....	5
Paraules clau:.....	6
1. Introducció: .....	7
1.1. Lípids:.....	7
1.1.1. Classificació dels lípids:.....	7
1.2. Lípids presents al plasma sanguini humà: .....	9
1.3. Lipidòmica:.....	11
1.3.1. Espectrometria de masses aplicada a lipidòmica: .....	11
1.3.2. Ressonància magnètica nuclear:.....	12
1.3.3. Ressonància magnètica nuclear aplicada a lipidòmica: .....	14
1.4. Mètodes d'extracció lipídica: .....	15
1.4.1. Mètode de Folch:.....	15
1.4.2. Mètode de Bligh i Dyer:.....	16
1.4.3. Mètode MTBE: .....	16
1.4.4. Mètode BUME: .....	16
2. Hipòtesis i objectius: .....	17
3. Metodologia .....	17
3.1. Protocol estàndard d'extracció de mostres lipídiques: .....	17
3.2. Efecte de la liofilització sobre mostres biològiques: .....	18
3.3. Efectes dels solvents orgànics en l'estabilitat de les mostres:.....	19
3.4. Passos a automatitzar:.....	20
3.5. Deconvolució dels espectres lipídics:.....	20
4. Resultats i discussió: .....	21
4.1. Efectes de la liofilització: .....	21
4.2. Congelació amb solvent i sense solvent d'extracció: .....	24
4.3. Automatització del protocol estàndard d'extracció lipídica .....	27
5. Conclusions:.....	29
6. Bibliografia: .....	30
Autoavaluació: .....	32
Annex I: Espècies lipídiques i senyals deconvolucionades dels espectres .....	33
Annex II: Maquinària utilitzada .....	36
Annex III: Instruccions de treball de l'extracció de lípids .....	37

## Dades del centre:

Biosfer Teslab és una empresa spin-off de la Universitat Rovira i Virgili (URV) i l'Institut de Recerca Sanitària Pere Virgili (IISPV), que opera en el sector del diagnòstic *in vitro* de biofluids mitjançant espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de protons ( $^1\text{H}$ -RMN), una tecnologia d'alt rendiment.

El principal producte de Biosfer Teslab és el test Liposcale, en el que es caracteritza el perfil de lipoproteïnes del torrent sanguini determinant de forma directa i ràpida la mida, la composició lipídica i el nombre de les principals classes de lipoproteïnes (VLDL, LDL i HDL), així com la concentració de partícules de nou subclasses diferents, sense haver de fraccionar el sèrum sanguini.

A més del test Liposcale, Biosfer també ofereix altres serveis, com el perfilat de metabòlits de baix pes molecular (*LMWM profiling*), un test de glicoproteïnes, lipidòmica de sèrum, cultius cel·lulars i teixits, i la caracterització de metabòlits aquosos en cultius cel·lulars, femta, orina i teixits tant humans com animals. Aquestes proves analítiques van dirigides a universitats, centres d'investigació, professionals sanitaris, empreses farmacèutiques, empreses alimentàries i laboratoris d'anàlisi clíniques.

Les diferents anàlisis experimentals es realitzen a les instal·lacions del Centre de Ciències Òmiques (COS), un centre dirigit per la URV i gestionat per EURECAT. El COS és un centre d'investigació científica i tècnica equipat amb les tecnologies més avançades de genòmica, transcryptòmica, proteòmica i metabolòmica.



## **Resum:**

La lipidòmica, és la ciència que estudia els lípids a gran escala, generant perfils de les diferents famílies lipídiques biogèniques, l'estudi exhaustiu de les seves vies metabòliques i la interpretació de la seva importància fisiològica, basada en tècniques de química analítica i anàlisis estadístiques.

Gràcies a la seva importància, en aquest treball es busca optimitzar i automatitzar el protocol d'extracció dels lípids a partir de sèrum humà per a una posterior anàlisi lipidòmica emprant espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de protons. Així, es va analitzar el protocol per detectar dos possibles punts crítics: la liofilització de les mostres i la congelació de la fase orgànica amb solvent d'extracció i sense. No es van observar diferències significatives entre les dues condicions en ambdós casos. En el cas de la liofilització es va observar una predominança de l'efecte biològic sobre l'efecte analític, pel que es va decidir liofilitzar les mostres amb el fi de facilitar l'automatització del procés. En el cas de la congelació, és preferible emmagatzemar la fase orgànica sense els solvents d'extracció, però en cas que no sigui possible, qualsevol conjunt de mostres ha de ser tractat amb les mateixes condicions.

Amb la finalitat d'automatitzar el protocol, es va programar el robot dispensador de líquids "Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform" per automatitzar la resuspensió de la mostra després de ser liofilitzada i l'extracció de la fase orgànica. Es van observar coeficients de variació menors quan es realitza el protocol automatitzat, així com una superposició quasi perfecta dels espectres de RMN de les alíquotes tractades automàticament, a diferència de les tractades manualment.

## **Paraules clau:**

Lipidòmica

Ressonància Magnètica Nuclear

Deconvolució



# 1. Introducció:

## 1.1. Lípids:

Els lípids són una classe heterogènia de biomolècules que presenten una gran diversitat d'estructura i funció biològica, actuant com components estructurals de les membranes cel·lulars, fonts d'emmagatzematge d'energia, components de les vies de senyalització, participació en el transport de biomolècules o regulació metabòlica. Tot i la gran diversitat estructural que presenten els lípids, aquest grup de biomolècules exhibeixen una característica global, insolubilitat en aigua però solubilitat en solvents orgànics, com el cloroform, alcohols i altres hidrocarburs, pel que es classifiquen com a molècules hidrofòbiques<sup>1</sup>. Algunes espècies lipídiques que presenten dominis hidrofílics grans, com els sacarolípid, no són solubles en solvents orgànics.

### 1.1.1. Classificació dels lípids:

A diferència dels àcids nucleics i les proteïnes, que estan compostes principalment per una combinació lineal de 4 nucleòtids i 20 aminoàcids respectivament, les estructures lipídiques són generalment molt més complexes degut al gran nombre de transformacions bioquímiques que tenen lloc durant la seva biosíntesi<sup>2</sup>.

Un gran nombre de fonts i recursos, com *The Lipid Library*<sup>3</sup> i *Cyberlipids*<sup>4</sup> classifica els lípids en simples i complexos. Els lípids simples són aquells que donen lloc com a molt a dues entitats després de patir una hidròlisi, com els acilglicerols i les ceres. En canvi, els lípids complexos són aquells que donen lloc a tres o més entitats després d'una hidròlisi, com els fosfolípids, els sacarolípid, els lipoaminoàcids i els nucleolípid<sup>4</sup>. Altres classificacions també afegixen un grup més, els lípids derivats, format per les substàncies derivades de la hidròlisi de lípids simples i complexos, com els àcids grassos, alcohols, esteroides o carotenoids.

El Comitè Internacional de Classificació i Nomenclatura dels Lípids va desenvolupar al 2005 un sistema de classificació de lípids basat en principis químics i bioquímics ben definits, que ha passat per diverses revisions durant els últims anys per representar totalment les estructures lipídiques provinents d'una gran varietat d'organismes. Aquesta classificació lipídica es pot consultar a la base de dades LIPID MAPS<sup>5</sup>. Segons aquesta classificació els lípids es defineixen com a molècules petites amb caràcter hidrofòbic o amfipàtic que s'originen a partir de condensacions basades en carbanions de tioèsters i/o condensacions basades en carbocacions d'unitats

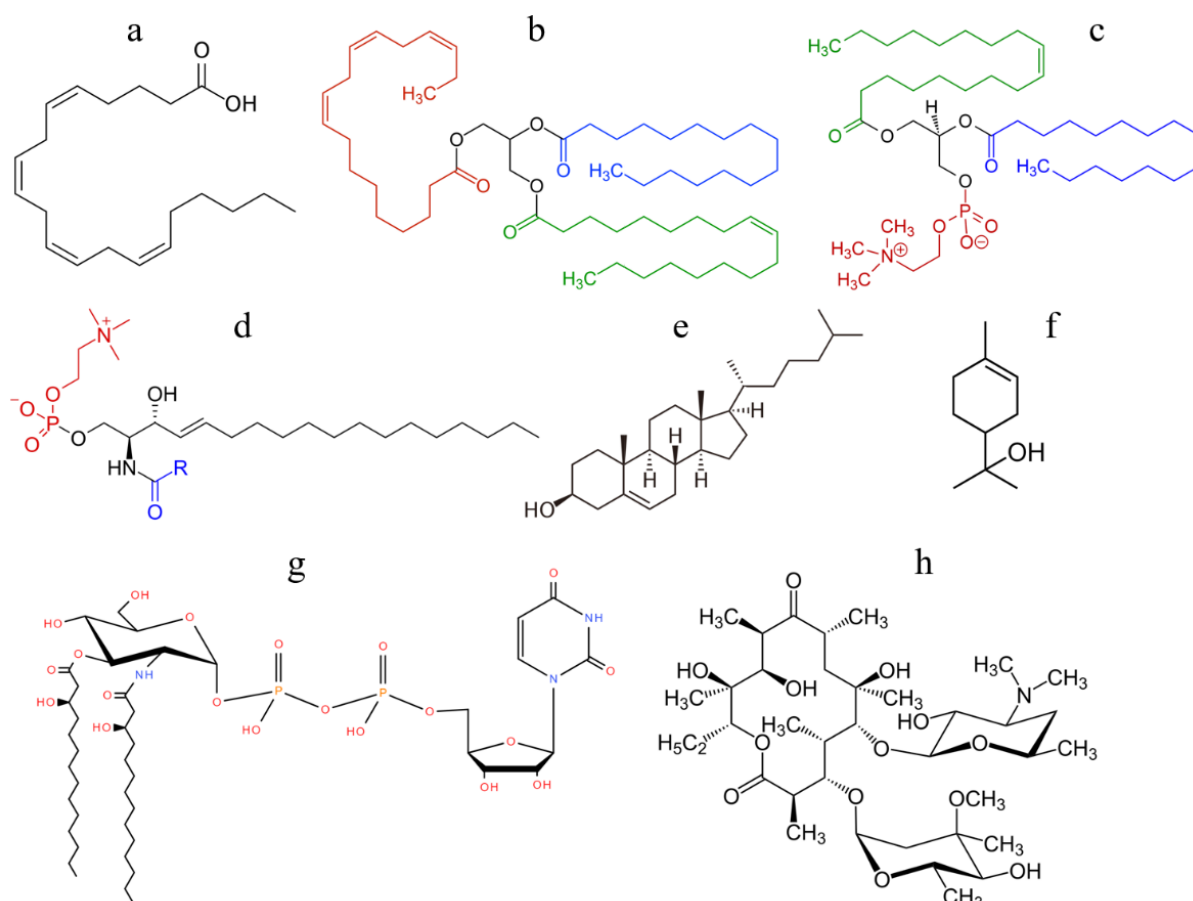
d'isoprè. Aquesta classificació organitza els lípids en vuit categories ben definides que inclouen organismes eucariòtics i procariòtics (Taula 1.1.).

*Taula 1.1. Classificació dels lípids segons el sistema de classificació de la base de dades LIPID MAPS. Taula modificada<sup>5</sup>.*

Categoria	Abreviació	Origen
Acils grassos	FA	Condensacions basades en carbanions de tioèsters
Glicerolípid	GL	Condensacions basades en carbanions de tioèsters
Glicerofosfolípid	GP	Condensacions basades en carbanions de tioèsters
Esfingolípid	SP	Condensacions basades en carbanions de tioèsters
Lípids d'esterol	ST	Condensacions basades en carbocacions d'unitats d'isoprè
Lípids de prenol	PR	Condensacions basades en carbocacions d'unitats d'isoprè
Sacarolípid	SL	Condensacions basades en carbanions de tioèsters
Policètid	PK	Condensacions basades en carbanions de tioèsters

Els 8 grups lipídics que recull aquesta classificació es divideixen en diverses classes i subclases. Els acils grassos inclouen principalment els àcids grassos, les ceres i els eicosanoids. Els glicerolípid els formen principalment els acilglicerols (monoglicèrids, diglicèrids i triglicèrids), i els glicerofosfolípid es defineixen per la presència d'un grup fosfat esterificat a un grup hidroxil-glicerol. Els esfingolípid contenen un esquelet d'esfingosina unit a un àcid gras i/o altres molècules. Els lípids d'esterol i de prenol provenen de la mateixa ruta biosintètica, però aquests es separen en dos grups degut a les seves diferències en estructura i funció. Els esterols tenen una estructura basada en l'esterà i l'exemple més representatiu és el colesterol. S'utilitza el terme sacarolípid per descriure aquells compostos que tenen àcids grassos units directament a un esquelet d'un glúcid, formant estructures compatibles amb les bicapes lipídiques que formen les membranes, a diferència dels glicolípid, que poden ser derivats de qualsevol de les vuit categories lipídiques<sup>6</sup>. Els policètid s'obtenen per la condensació modular principalment de monòmers d'acetil-CoA amb unitats allargadores de malonil-CoA.

Degut a que la tecnologia principal d'anàlisi d'espècies lipídiques és l'espectrometria de masses, i aquesta tècnica no cobreix les detalls estructurals pels quals s'agrupen els lípids en la classificació de LIPID MAPS, s'ha desenvolupat una altra classificació lipídica que descriu les estructures derivades de les tècniques d'espectrometria de masses<sup>7</sup>.



**Figura 1.1.** Exemples de cada categoria de lípids segons la classificació LIPID MAPS. **a)** àcid araquidònic, un acil gras (àcid gras), **b)** triglicèrid, un glicerolípid, **c)** fosfatidilcolina, un glicerofosfolípid, **d)** esfingomielina, un esfingolípid, **e)** colesterol lliure, un lípid d'esterol, **f)**  $\alpha$ -terpinol, un lípid de terpè, **g)** UDP-2,3-diacil-glucosamina, un sacarolípid i **h)** eritromicina, un policètid macròlid.

## 1.2. Lípids presents al plasma sanguini humà:

El plasma sanguini humà, o en el seu defecte, el sèrum sanguini, és la font de partida de molts estudis lipidòmics. El plasma sanguini humà presenta un alt contingut lipídic, amb una concentració de lípids al voltant de 8020 nmol/ml i unes 890 espècies lipídiques diferents<sup>8</sup> (Taula 1.2.).

Tot i que els àcids grassos lliures representen una fracció petita dels àcids grassos totals en plasma, aquests representen una classe lipídica altament activa metabòlicament. El teixit adipós n'és la principal font. En condicions normals, l'alliberament d'àcids grassos per aquest teixit té lloc per demanda d'energia, tot i que en diversos desordres metabòlics aquesta homeòstasi es pot veure afectada, alliberant àcids grassos lliures en excés. Dins dels àcids grassos, els principals trobats en plasma són l'àcid oleic, l'àcid palmític i l'àcid esteàric (78% del total). L'àcid

linoleic i l'àcid araquidònic (ARA) són els principals àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) lliures en plasma (8% del total)<sup>8</sup>. L'àcid eicosapentanoic (EPA) i l'àcid docosahexaenoic (DHA) també es troben presents de forma lliure en nivell significants, però amb menor mesura<sup>8</sup>.

*Taula 1.2. Grups de lípids i espècies quantificades amb la seva concentració en plasma sanguini humà. Taula modificada<sup>8</sup>.*

Categoria	Nombre d'espècies	Concentració (nmol/ml)
Acils grassos		
Àcids grassos lliures	31	214
Eicosanoides	76	0.071
Total	107	214
Glicerolípid		
Triglicèrids	18	1058
Altres	55	52
Total	73	1110
Glicerofosfolípid		
Fosfatidilcolina	31	1974
Fosfatidiletanolamina	38	435
Lisofosfatidilcolina	12	103
Altres	79	84
Total	160	2596
Esfingolípid		
Esfingomielina	101	303.5
Altres	103	14,5
Total	204	318
Lípids d'esterol		
Esterols lliures	14	826
Esterols esterificats	22	2954
Total	36	3780
Lípids de prenol	8	4,62
Suma de totals	588	8023

Els glicerolípid representen una proporció elevada dels lípids totals presents en plasma. Dins d'aquests, els triacilglicèrids (TAG) en són els més abundants. La concentració absoluta de TAG és dependent de la ingesta alimentària, ja que la síntesi i l'empaquetament dels TAG en lipoproteïnes és el mecanisme principal pel qual aquests lípids són distribuïts als diferents teixits. També hi ha presència de diacilglicèrids (DAG) al plasma però en nivells inferiors. Es troben 1,2-DAGs i en menor mesura també 1,3-TAGs<sup>8</sup>.

S'han detectat més de 200 espècies diferents de glicerofosfolípid, sent-ne les principals la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) i en menor mesura la lisofosfatidilcolina (LPC).

Aquestes espècies juntament amb alguns esfingolípid amb l'esfingomielina formen la membrana monocapa de les lipoproteïnes<sup>1</sup>.

Es poden trobar esterols tant lliures com esterificats al plasma, sent-ne l'espècie principal el colesterol (3,76 µmol/ml), seguit d'esterols intermediaris en la ruta de biosíntesi del colesterol (2~6 nmol/ml)<sup>8</sup>. Els esterols esterificats representen la classe lipídica més abundant en plasma.

### **1.3. Lipidòmica:**

Degut al rol biològic central que tenen els lípids en múltiples funcions cel·lulars i a l'elevat nombre de d'espècies i la seva influència en processos homeostàtics i en estats relacionats amb diverses malalties, ha sorgit la necessitat d'estudiar els lípids a gran escala, sent la ciència que s'encarrega d'aquest àmbit d'estudi la lipidòmica. El conjunt total de lípids d'una cèl·lula, un teixit, un òrgan o un organisme es coneix com el lipidoma<sup>9</sup>.

La lipidòmica utilitza els principis i les tècniques de la química analítica. Les tècniques basades en cromatografia i espectrometria de masses són la plataforma analítica més emprada actualment<sup>10,11</sup>, ja que proporcionen una caracterització completa de totes les espècies constituents en la mostra en funció de les diferents propietats fisicoquímiques<sup>10</sup>.

La lipidòmica presenta un gran nombre d'aplicacions en la recerca biomèdica, ja que les tècniques analítiques utilitzades ens permeten comparar fàcilment el lipidoma en diferents condicions. Existeix una gran diversitat de patologies en les quals els lípids presenten un paper central, per la qual cosa la lipidòmica ha estat aplicada a: síndrome metabòlic i diabetis, desordres neurològics, càncer i desordres inflamatoris crònics entre altres. De forma similar, el perfilat del lipidoma s'aplica en l'avaluació dels beneficis en la salut de dietes i suplementos nutricionals i per l'estudi dels efectes en teràpies farmacològiques en assajos clínics. A més a més, el perfil lipidòmic s'ha convertit en una eina important en la tecnologia alimentària per determinar les propietats nutricionals i tecnològiques dels aliments<sup>12</sup>.

#### **1.3.1. Espectrometria de masses aplicada a lipidòmica:**

L'espectrometria de masses (MS) és la tècnica analítica més utilitzada en lipidòmica degut a l'alta capacitat qualitativa, amb una elevada sensibilitat i selectivitat. La lipidòmica basada en MS es pot dividir en dos camps: la lipidòmica no dirigida i la lipidòmica dirigida. La lipidòmica no dirigida, també anomenada lipidòmica global, té com objectiu identificar i quantificar tots els lípids d'un sistema, i s'utilitza per obtenir una vista global de les diferents espècies lipídiques

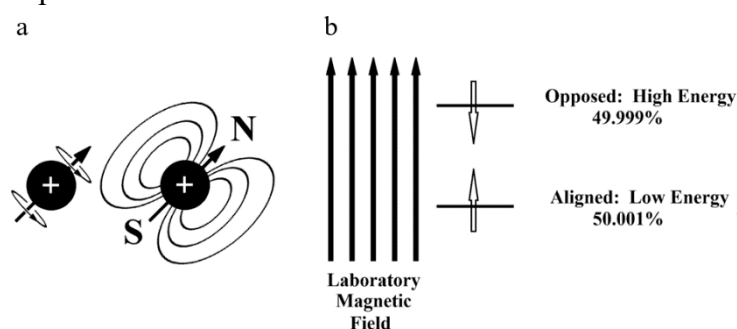
d'una mostra. La lipidòmica dirigida, en canvi, es delimita en la caracterització de lípids específics<sup>13</sup>.

La principal limitació de la lipidòmica basada en l'espectrometria de masses és la quantificació absoluta, ja que el tipus de preparació de les mostres i l'ambient molecular afecten a la intensitat del senyal de MS de cada compost. També es produeix un fenomen anomenat *quenching* d'ions, on el senyal dels lípids poc ionitzables es veu atenuat per espècies més fàcilment ionitzables, el que requereix d'una separació prèvia de les espècies lipídiques per una quantificació precisa<sup>14</sup>. A més a més, l'espectrometria de masses destrueix la mostra durant el procés d'anàlisi, pel que no es pot recuperar la mostra per altres anàlisis complementaries i és una tècnica poc reproducible.<sup>12</sup>

### 1.3.2. Ressonància magnètica nuclear:

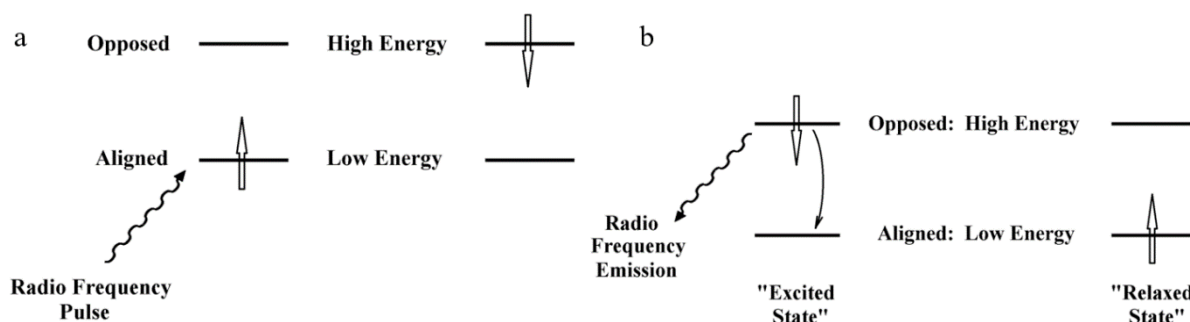
L'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN) és una tècnica versàtil principalment utilitzada per l'elucidació d'estructures de compostos orgànics, la determinació estructural i dinàmica de macromolècules i més recentment per l'elaboració de perfils de metabòlits en el camp de la metabolòmica<sup>15</sup>.

Només són visibles es espectroscòpia RMN els nuclis (isòtops) amb una abundància natural suficientment alta per ser detectats i que presenten un espín nuclear desaparellat. Es descriu l'espín com una propietat estretament lligada al moviment d'una partícula subatòmica sobre un eix i el seu moviment angular. La rotació permanent d'aquesta càrrega en el seu eix genera un camp magnètic, per la qual cosa es pot imaginar el nucli com un petit imant<sup>16</sup> (Figura 1.2. a). En la majoria d'àtoms, com el <sup>12</sup>C, els espins es troben aparellats els uns amb els altres, causant que el nucli de l'àtom no presenti un espín total. Els principals nuclis utilitzats en RMN són <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C i <sup>31</sup>P entre altres, sent l'espectrometria <sup>1</sup>H-RMN la més usada degut a l'alta abundància natural d'aquest isòtop.



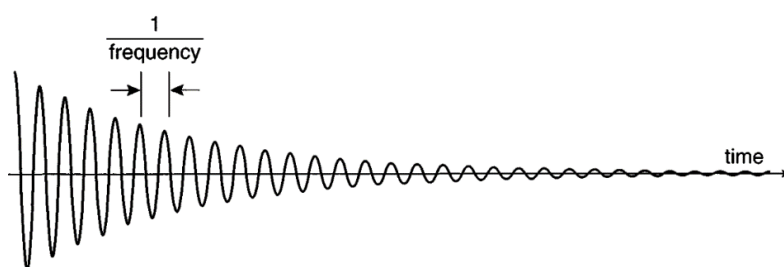
**Figura 1.2.** a) Rotació d'un nucli sobre un eix i formació del seu camp magnètic, b) Alineació dels nuclis amb el camp magnètic al qual s'exposen<sup>16</sup>.

En l'espectrometria RMN la mostra es sotmet a l'efecte d'un camp magnètic fort. Cada nucli es pot alinear amb el camp magnètic o en contra d'aquest si tenen un valor d'espín positiu o negatiu respectivament (Figura 1.2. b). Després d'un temps d'estabilització, s'aplica un puls d'energia de radiofreqüència potent a la mostra causant un canvi de l'estat energètic dels nuclis al seu oposat (Figura 1.3. a). Durant els següents segons, els nuclis retornen a l'estat d'energia original (Figura 1.3. b), i la caiguda de la freqüència es recull per un receptor que les converteix en informació digital a l'espectròmetre<sup>16</sup>.



**Figura 1.3. a)** Excitació dels nuclis (pas de l'estat d'energia baixa a l'estat d'energia alta),  
**b)** Relaxació dels nuclis, amb la conseqüent emissió d'energia de radiofreqüència<sup>16</sup>.

S'obté un *output* observable que resulta en una ona sinusoidal en decadència. Si hi ha nuclis diferents a la mostra capaços de produir senyal, el resultat és la suma de les diferents ones. Els senyals es sostreuen de la freqüència de l'espectròmetre donant com a resultat una ona sinusoidal en decadència de baixa freqüència, que només conté les diferents freqüències entre la freqüència de l'espectròmetre i dels nuclis. Aquest senyal s'anomena *free induction decay* (FID)<sup>17</sup> (Figura 1.4.).



**Figura 1.4.** FID d'un sol tipus de nucli. Aquest senyal conté la mateixa informació que un espectre de RMN convencional. La freqüència del senyal relatiu de l'espectròmetre ve donada per la freqüència de la ona sinusoidal<sup>17</sup>.

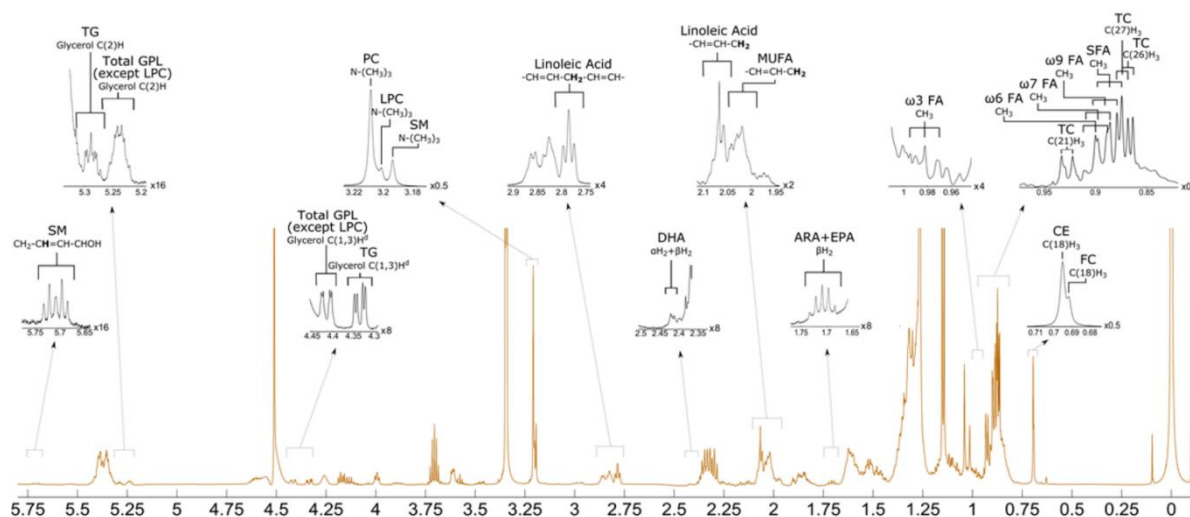
Degut a la complexa forma que adquireix el FID quan hi ha presència de múltiples nuclis, no es poden interpretar dades a partir d'aquest. Es realitza un tractament del senyal anomenat

transformació de Fourier. A partir d'aquest càlcul s'obté l'espectre de RMN, amb freqüència a l'eix horitzontal i intensitat a l'eix vertical.

Degut a que els diferents espectròmetres de RMN operen a camps magnètics diferents, i a major camp magnètic, major resolució. Les freqüències depenen del camp magnètic que s'aplica, per la qual cosa l'eix horitzontal s'estandarditza representant el desplaçament químic en parts per milió (ppm)<sup>16</sup>. El desplaçament químic es descriu com la diferència entre la freqüència de resonància del nucli i un estàndard. Per establir una escala de desplaçament químic és necessari escollir una substància com a estàndard intern i definir el seu desplaçament químic a zero. L'estàndard més utilitzat és el tetrametilsilà (TMS)<sup>17</sup>.

### 1.3.3. Ressonància magnètica nuclear aplicada a lipidòmica:

La caracterització detallada de les espècies lipídiques utilitzant les tècniques d'espectroscòpia de <sup>1</sup>H-RMN és difícil, ja que les estructures moleculars magnèticament equivalents donen resonàncies amplament superposades i no és una tècnica tant sensible com la MS. No obstant, les anàlisis lipidòmiques utilitzant <sup>1</sup>H-RMN proporcionen una visió general ràpida de les principals famílies lipídiques (àcids grassos, glicerolípids i esterols) i algunes espècies individuals com l'àcid araquidònic (Figura 1.5. i Annex I). L'espectroscòpia de RMN també presenta certs avantatges sobre l'ús de MS per lipidòmica, com la no derivatització de les mostres, no es requereix



**Figura 1.5.** Espectre de l'extracció lipídica d'una mostra de plasma amb els senyals lipídics identificats. CE: colesterol esterificat, CF: colesterol lliure, FA: àcid gras, ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentanoic, DHA: àcid docosahexaenoic, MUFA: àcids grassos monoinsaturats, SM: esfingomielina, LPC: lisofosfatidilcolina, PC: fosfatidilcolina, TG: triglicèrids, GPL: glicerofosfolípids<sup>12</sup>.



d'una separació dels components, l'àrea espectral és proporcional a l'abundància molecular (el que la fa quantitativa), la linealitat espectral evita l'ús de múltiples estàndards interns per la calibració i l'espectroscòpia de RMN és una tècnica robusta, altament reproduïble, ràpida i automatitzable. Addicionalment, les tècniques de RMN són no destructives, pel que la mostra queda intacta i pot ser utilitzada per estudis posteriors<sup>12</sup>.

A més, la quantificació de les espècies de glicerofosfolípids no és sempre possible quan s'utilitzen les tècniques de MS, ja que aquestes presenten diferents respostes a la font de la ionització per electrospray (ESI)<sup>14</sup>.

#### **1.4. Mètodes d'extracció lipídica:**

El plasma sanguini i el sèrum són les matrius més comunament utilitzades en estudis lipidòmics. Degut al gran contingut de components presents al plasma sanguini (cèl·lules, proteïnes i pèptids, compostos nitrogenats, nutrients, lipoproteïnes, lípids lliures i lípids units a proteïnes...), s'ha de realitzar una extracció per poder obtenir els lípids, que pot resultar complexa<sup>18</sup>. Degut a l'elevada diversitat estructural de les espècies lipídiques cap mètode és idoni per l'extracció total de les diferents espècies lipídiques. Els mètodes d'extracció principals són el mètode de Folch i el mètode de Bligh i Dyer, publicats ja fa més de cinquanta anys i amb un inconvenient principal, la fase orgànica en la que es troben els lípids és la fase inferior, i per tant hi pot haver una contaminació de la fase orgànica al retirar-la<sup>19</sup>.

##### **1.4.1. Mètode de Folch:**

El mètode de Folch va ser dissenyat al 1951, sent el primer protocol d'extracció de lípids utilitzant el sistema de solvents cloroform/metanol. La mostra biològica es dilueix 1:20 (v/v) en cloroform/metanol 2:1 (v/v) i s'homogeneïtza. El protocol original realitza l'homogeneïtzació de la mostra directament en cloroform i preferiblement a temperatures baixes i en períodes curts. S'addicionen de forma ràpida solvents que desnaturalitzen les proteïnes i bloquegen l'acció de les activitats enzimàtiques per tal de preservar el perfil lipídic del sistema. L'extracte es filtra per separar els residus precipitats. S'addiciona un equivalent de 0,2 d'aigua respecte el volum total de cloroform/metanol addicionat. La mostra es separa en una fase aquosa superior d'aigua/metanol i una fase orgànica inferior de cloroform en un rati 10:60 (v/v), i la mostra es centrifuga per forçar la separació, formant una interfase amb les proteïnes precipitades<sup>20</sup>.

El principal desavantatge d'aquest mètode és la distribució de les fases, situant-se la fase aquosa a la part superior i la fase orgànica amb els lípids a la part inferior, pel que hi pot haver

problemes de contaminació de la fase orgànica amb impureses de la fase aquosa al ser retirada, dificultant el procés i l'automatització. A més, la utilització de cloroform, un compost nociu per la salut<sup>10</sup>.

#### **1.4.2. Mètode de Bligh i Dyer:**

El mètode d'extracció de lípids de Bligh i Dyer va ser dissenyat al 1959 per un procediment eficient per l'estudi de la descomposició de lípids en peixos congelats. El principi bàsic d'aquest mètode està basat en el mètode de Folch però utilitzant menys cloroform i metanol. El teixit homogeneïtzat es mescla amb cloroform/metanol 1:2 (v/v) i posteriorment s'afegeix un volum més de cloroform. Després de mesclar s'afegeix 1 volum d'aigua destil·lada i es deixa incubar. La suspensió resultant consisteix en residus no extraïbles en una solució de cloroform/metanol/aigua 2:2:1,8 (v/v/v). Aquesta suspensió és filtrada i es deixa incubar, obtenint la separació de fases. A la part superior es troba la fase aquosa amb molècules polars i a la part inferior la fase orgànica amb els lípids. Presenta els mateixos desavantatges que el mètode de Folch<sup>20</sup>.

#### **1.4.3. Mètode MTBE:**

El mètode MTBE va ser dissenyat per tal d'evitar els desavantatges dels mètodes d'extracció tradicionals amb la formació de la fase orgànica a la part inferior, per tal de facilitar l'automatització del procés d'extracció. L'extracció es realitza a partir de metil tert-butil èter (MTBE) amb un rati MTBE/metanol/aigua 10:3:2,5 (v/v/v). El principal desavantatge d'aquest mètode és el gran contingut de components aquosos, que pot augmentar la contaminació per compostos solubles en aigua<sup>10</sup>.

#### **1.4.4. Mètode BUME:**

El mètode BUME soluciona els dos problemes dels mètodes d'extracció de lípids substituint el cloroform per butanol i amb la formació de la fase orgànica a la part superior. S'afegeix una solució de butanol-metanol (BUME) a la mostra en un rati BUME/mostra 3:1 (v/v) i es mescla. L'ús de butanol permet una extracció eficient de les espècies lipídiques més polars. S'afegeix un segon dissolvent; el protocol original amb heptà-acetat d'etil en rati 3:1 (v/v) amb la mostra, però l'heptà pot ser substituït amb diisopropil d'èter (DIPE), ambdós solvents no polars. L'addició de DIPE:EtAc promou la formació de les fases de forma espontània, formant la fase orgànica en la qual es troben els lípids i el butanol a la part superior i la fase aquosa a la part inferior amb els components polars i el metanol<sup>19</sup>. També s'afegeix aigua desionitzada en rati

3:1 (v/v) amb la mostra per tal de formar la fase aquosa en la qual s'allotjaran les molècules polars.

Com s'ha comentat anteriorment, aquest mètode permet la formació de la fase orgànica a la part superior, facilitant l'automatització del procés d'extracció lipídica amb la utilització d'un robot dispensador de líquids. A més a més, no requereix de cloroform, un component tòxic, i a diferència del mètode MTBE, que també forma la fase orgànica a la part superior, la fase aquosa formada pel mètode BUME presenta menys quantitat de components aquosos<sup>21</sup>. Tot i això, el principal avantatge d'aquest mètode és el rati de solvents/mostra (inferior a 4:1), facilitant l'automatització<sup>10</sup>.

## **2. Hipòtesis i objectius:**

“L'optimització i l'automatització del protocol d'extracció lipídica utilitzant el robot dispensador de líquids redueix el temps del procés analític sense afectar al rendiment d'aquest”

Les diferents proves realitzades en aquest treball tenen com a objectiu l'automatització d'un procés d'anàlisi lipídica utilitzant un robot dispensador de líquids per reduir el temps i la complexitat del protocol original. Per tal de realitzar aquesta automatització, es van identificar a més a més dos possibles punts crítics en el protocol, i es van definir els següents objectius secundaris.

El primer objectiu secundari és la determinació de l'efecte de la liofilització sobre les mostres, ja que la liofilització d'aquestes facilita l'automatització del procés. El segon objectiu secundari és la determinació de l'efecte de la congelació de les mostres amb els solvents orgànics, per determinar quin és l'ordre òptim en l'automatització del procés.

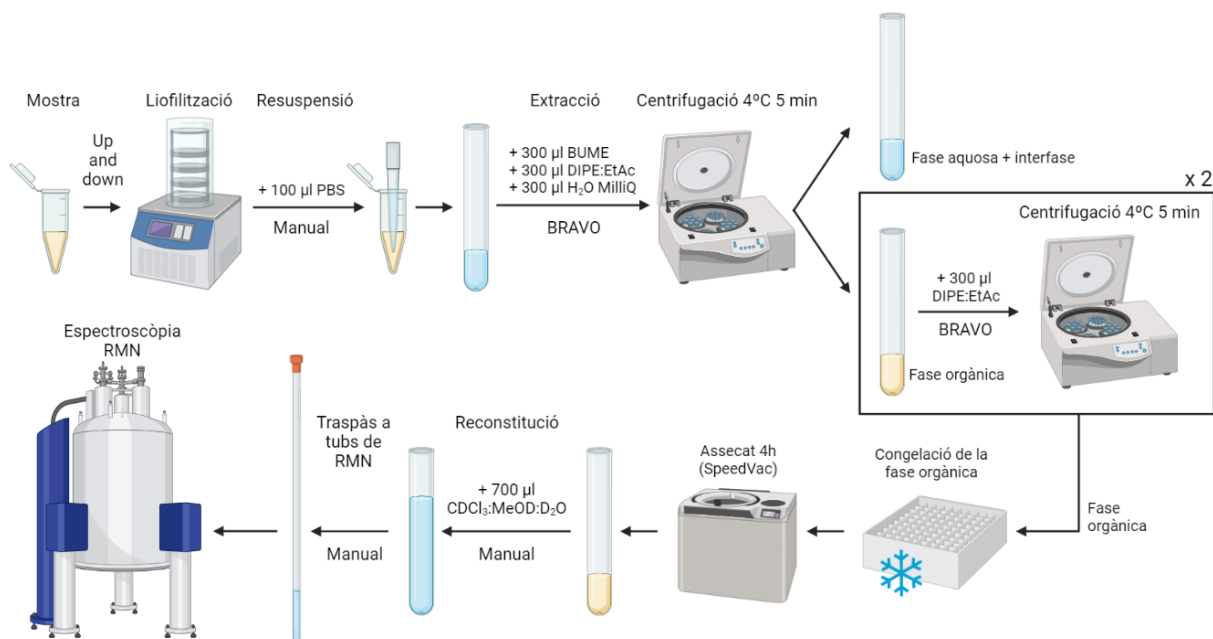
## **3. Metodologia**

### **3.1. Protocol estàndard d'extracció de mostres lipídiques:**

El procés actual d'anàlisi lipídica dut a terme per Biosfer Teslab precisa de mostres congelades de sèrum o plasma humà. De cada mostra es liofilitzen 200 µl durant 24 hores. Les mostres liofilitzades es resuspenen en 100 µl de PBS (50 mM i pH=7.4) manualment i es traspassen a tubs de vidre per evitar la possible corrosió dels tubs de plàstic per part dels solvents orgànics posteriorment utilitzats, fet que contaminaria la mostra obtenint espectres de RMN amb superposició de pics. Posteriorment, amb el robot dispensador de líquids “Agilent Bravo Automated

Liquid Handling Platform” es realitza l’extracció seguint el mètode BUME optimitzat amb diisopropil èter (DIPE)<sup>19</sup>. Primer s’afegeixen a cada tub 300 µl de butanol:metanol 3:1 (v/v) 300 µl de diisopropil èter:acetat d’etil 3:1 (v/v) i 300 µl d’aigua desionitzada. Les mostres es centrifuguen a 4°C durant 5 minuts, forçant la separació de fases i obtenint la fase orgànica a la part superior i la interfase i la fase aquosa a la part inferior. Es repeteix el procés dos cops afegint només 300 µl de DIPE:EtAc i centrifugant a les mateixes condicions. La recuperació de la fase orgànica es realitza de manera automàtica amb el robot dispensador de líquids.

Després de l’obtenció de la fase orgànica els tubs són congelats amb el solvent per la seva posterior anàlisi. Els solvents orgànics utilitzats per extreure la fase orgànica són assecats utilitzant el SpeedVac durant 4 hores per evitar que solapin els senyals lipídics a l’espectre de RMN. Les mostres es resuspenen posteriorment a mà amb 700 µl de al solució de cloroform, metanol i aigua deuterats, CDCl<sub>3</sub>:MeOD:D<sub>2</sub>O 16:7:1 (v/v). La solució de solvents deuterats conté tetrametilsilà (TMS), que s’utilitza per referenciar l’espectre. Les mostres són mesurades a 283 K emprant l’espectròmetre “Bruker Avance III-600”, que opera a 600,2 MHz.



**Figura 3.1.** Esquema del procés d’anàlisi lipídica per ressonància magnètica nuclear realitzat per Biosfer Teslab actualment. Figura creada utilitzat BioRender.

### 3.2. Efecte de la liofilització sobre mostres biològiques:

Per avaluar l’efecte de la liofilització es seleccionen 3 mostres de sèrum amb un rang ample de colesterol i triglicèrids prèviament analitzades amb el test Liposcale. El test Liposcale analitza exhaustivament el perfil de lipoproteïnes present en una mostra, obtenint la concentració de

colesterol i triglicèrids de cada tipus de lipoproteïna, la seva mida i la seva concentració total. De cada mostra s'obtenen 200 µl per les alíquotes a liofilitzar i 200 µl per les alíquotes no liofilitzades. Per poden normalitzar i quantificar les concentracions de les diferents espècies lipídiques a partir de les dades de Liposcale es necessiten 200 µl de mostra, ja que és la mateixa quantitat de mostra analitzada per aquest test. El mètode BUME està optimitzat per partir d'un volum de 100 µl, pel que les alíquotes liofilitzades es resuspenen en 100 µl de PBS i les alíquotes no liofilitzades es realitza un duplicat per cada mostra amb 100 µl de mostra intacta. El procés d'extracció lipídica i la reconstitució de les mostres liofilitzades es realitza pel procés prèviament descrit. Els 100+100 µl no liofilitzats es reunifiquen durant la reconstitució per arrossegar els lípids i que la quantitat extreta sigui comparable amb la de les mostres liofilitzades. Les mostres són analitzades tal i com s'ha descrit prèviament.

### 3.3. Efectes dels solvents orgànics en l'estabilitat de les mostres:

Es prepara un *pool* a partir de 4 mostres de sèrum. A partir d'aquest *pool* es preparen 10 alíquotes: dos per les alíquotes basals a temps 0 (B0), dos per les alíquotes que seran congelades sense solvent i dos per les alíquotes que seran congelades amb solvent per un temps de 3 dies (SS3 i AS3 respectivament) i dos mostres que seran congelades sense solvent i dos mostres que seran congelades amb solvent per un temps de 7 dies (SS7 i AS7 respectivament).

**Taula 3.1.** *Nomenclatura i condició de les diferents alíquotes preparades. Per cada condició es realitza un duplicat.*

Alíquotes	Temps	Condició
B0	0	Basal
SS3	3	Congelació sense solvent
AS3	3	Congelació amb solvent
SS7	7	Congelació sense solvent
AS7	7	Congelació amb solvent

Les mostres són liofilitzades i es realitza la resuspensió manual amb 100 µl de PBS. S'extreu la fase orgànica amb el robot dispensador de líquids pel mètode BUME mitjançant el procediment prèviament descrit. La fase orgànica de B0 és assecada, reconstituïda i mesurada el mateix dia de l'extracció. Les alíquotes sense solvent (SS3 i SS7) són assecades utilitzant el SpeedVac i posteriorment congelades amb les alíquotes que no han estat sotmeses a un procés d'assecatge (AS3 i AS7). Cada alíquotes es reconstitueixen i analitzen passat 3 i 7 dies respectivament.

### **3.4. Passos a automatitzar:**

Per tal d'automatitzar el protocol estàndard d'extracció de lípids es programa el *software* del robot dispensador de líquids "Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform", generant un nou protocol capaç de realitzar els dos dels passos manuals del procés de forma automàtica: la resuspensió de les mostres liofilitzades i la reconstitució de la fase orgànica.

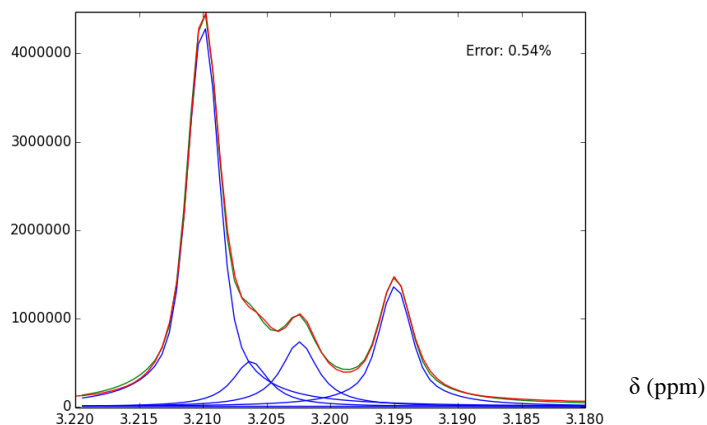
Les mostres liofilitzades es resuspenen en 100 µl de PBS manualment. Es modifica el protocol actual amb el *software* específic del robot dispensador de líquids per tal de realitzar la resuspensió de la mostra i l'extracció lipídica pel mètode BUMÉ en una sola operació. Es decideix resuspendre les mostres amb aigua desionitzada per evitar afegir sals a la mostra, ja que les mostres ja arriben diluïdes en PBS. Si la concentració de sals és superior, la força iònica augmenta i hi ha més probabilitat d'un eixamplament dels senyals als espectres de RMN degut a un *shimming* no òptim.

Per l'automatització de la reconstitució de la fase orgànica es crea un nou protocol utilitzant el robot dispensador de líquids capaç de reconstituir la fase orgànica en 700 µl de la solució de solvents deuterats, que posteriorment es traspassen a tubs de RMN de forma automàtica. Per estudiar una possible diferència entre el procés manual amb PBS i el procés automàtic amb aigua, a partir d'una mostra control s'obtenen quatre alíquotes, dos pel procés manual i les altres dos per l'automàtic. El procediment seguit és el mateix que el del procés inicial en les alíquotes manuals i en les alíquotes automàtiques s'implementen nou protocol.

### **3.5. Deconvolució dels espectres lipídics:**

Utilitzant el *software* TopSpin es processen els espectres per corregir les fases d'ordre zero i primer ordre. La deconvolució dels senyals lipídics d'interès es realitzen mitjançant un *software* propi de Biosfer, Lipidscale, que imita amb funcions matemàtiques els senyals dels espectres per obtenir l'àrea d'aquestes. La deconvolució consisteix a partir d'una regió d'un espectre de RMN, definir una sèrie de funcions matemàtiques, la suma de les quals reproduceix al màxim possible l'espectre original.

Les concentracions es poden quantificar normalitzant amb un factor de correcció per la concentració de colesterol obtinguda si s'ha realitzat prèviament el test Liposcale. Es pot realitzar aquesta quantificació de les àrees ja que l'àrea és proporcional al nombre de protons, i aquest al nombre de molècules.



**Figura 3.2.** Exemple de la deconvolució dels senyals de la fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina i esfingomielina (d'esquerra a dreta). La línia vermella és l'espectre original, les línies blaves són les diferents funcions matemàtiques i la línia verda la suma de les diferents funcions.

$$\text{Concentració de X (mM)} = \text{Àrea de X} \frac{\text{Colesterol total Liposcale (mM)}}{\text{Colesterol Total RMN}}$$

**Fórmula 1.** Càlcul realitzat per l'obtenció de la concentració d'una espècie lipídica, on X és un senyal qualsevol.

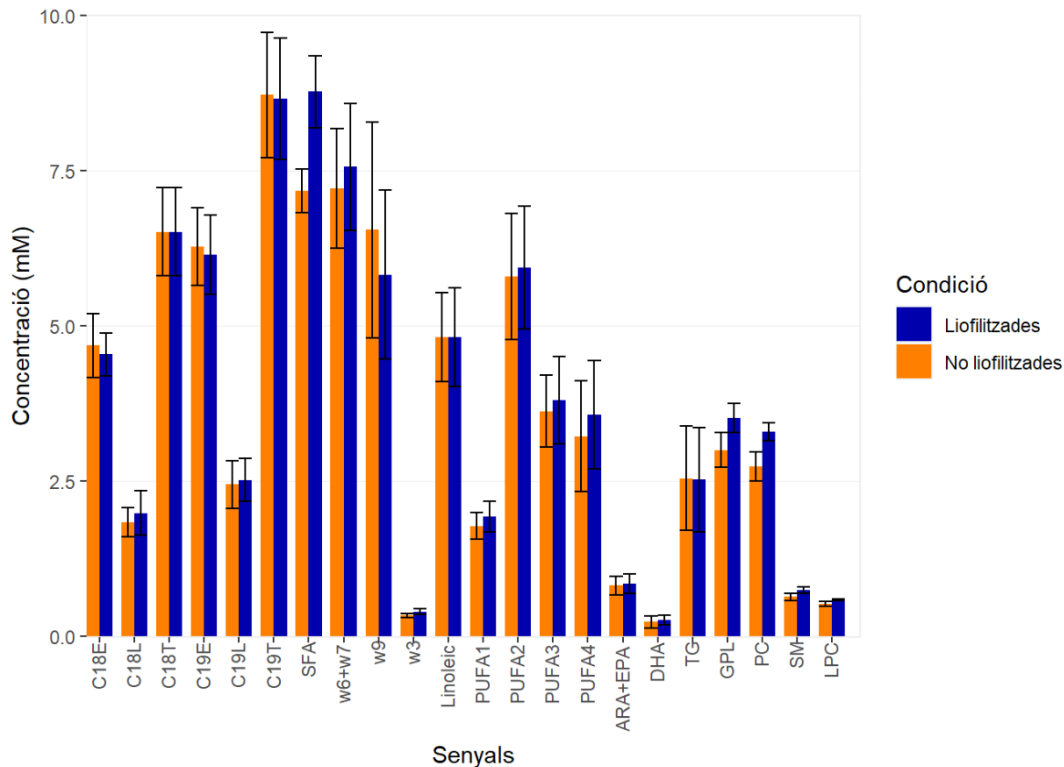
En el cas de l'avaluació dels efectes dels solvents orgànics en l'estabilitat dels lípids, no es disposava de la concentració de colesterol determinada per Liposcale. Es van normalitzar les àrees de cada senyal a partir de l'àrea total dels senyals presents en totes les mostres.

## 4. Resultats i discussió:

### 4.1. Efectes de la liofilització:

Els espectres de RMN obtinguts són processats, i es deconvolucionen els senyals d'interès automàticament mitjançant Lipidscale. A l'annex I es recullen els senyals lipídics observats als espectres i posteriorment quantificats que es repetiran en totes les figures.

Per comparar les mostres es construeix la Figura 4.1., en la que es representen les mitjanes aritmètiques de les alíquotes per cada condició amb els valors del seu error estàndard. Degut al nombre reduït de mostres no és possible veure diferències significatives.



**Figura 4.1.** Representació de les concentracions mitjanes en mM dels diferents senyals lipídics amb els valors dels errors estàndard. Amb la prova de U de Mann-Whitney es troben els valors-p, sent tots superiors a 0,05.

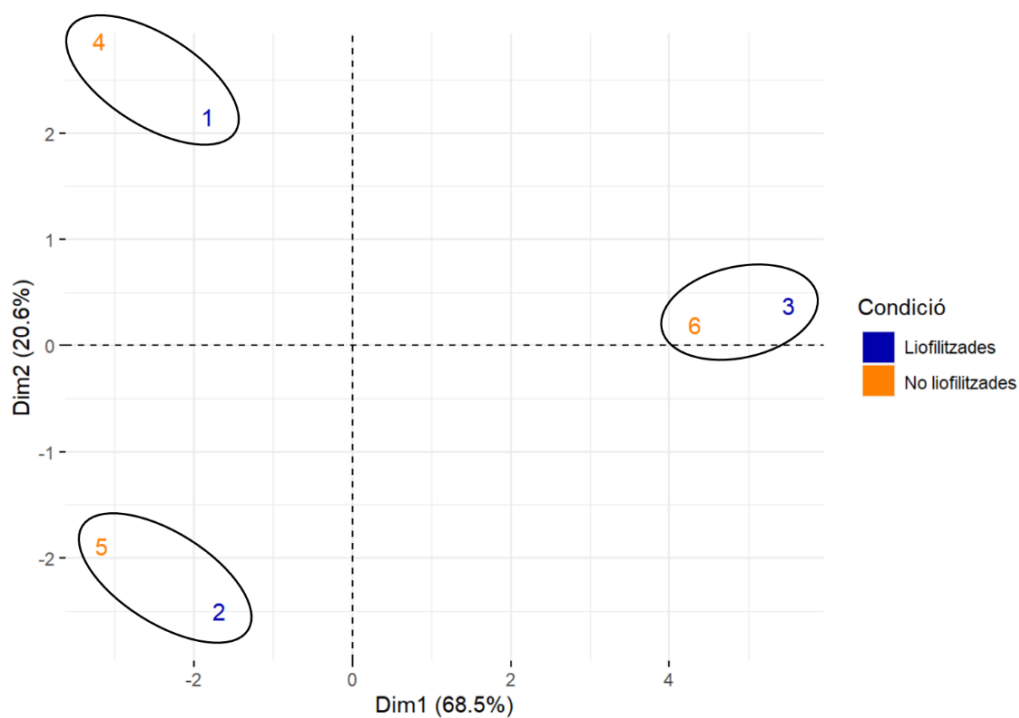
Els senyals de glicerofosfolípids, fosfatidilcolina, esfingomielina i lisofosfatidilcolina, semblen presentar una tendència obtenint concentracions més altes d'aquestes espècies lipídiques en les mostres liofilitzades. Les lipoproteïnes presents al sèrum estan formades per una monocapa lipídica i les apolipoproteïnes. Aquesta monocapa lipídica està constituïda principalment per fosfolípids, sent la fosfatidilcolina el principal, seguit de l'esfingomielina i la lisofosfatidilcolina. També hi ha altres fosfolípids minoritaris, com la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina i el fosfatidilinositol, tots glicerofosfolípids<sup>1</sup>. L'augment de les espècies de fosfolípids en les mostres liofilitzades es podria explicar per la possible ruptura de les membranes de les lipoproteïnes per causa de la liofilització, alliberant aquestes espècies lipídiques i incrementant la seva concentració al sèrum<sup>22</sup>.

També s'observa un augment en la concentració dels àcids grassos saturats en les mostres liofilitzades, augmentant la seva concentració més d'un 20% respecte a les no liofilitzades. Pot ser que s'obtingui aquest resultat ja que les mostres no segueixen una distribució normal, i al tractar-se de tant poques mostres les no es poden treure conclusions robustes partint d'aquesta diferència.



Les concentracions de colesterol total són pràcticament iguals a diferència de l'esperat<sup>23</sup>. Per confirmar aquestes tendències s'hauria de realitzar la prova amb un nombre de mostres més elevat.

A causa de l'elevat nombre d'espècies lipídiques que es quantifiquen en es realitza una anàlisi de components principals (PCA) (Figura 4.2.), per tal de reduir el nombre de variables a dues noves dimensions que expliquen la variabilitat de les dades. Cada dimensió és una combinació lineal de les diferents variables originals. A partir del PCA generat es pot observar que les alíquotes estan agrupades segons la mostra de la qual provenen i no segons la seva condició (liofilitzades o no liofilitzades). A més a més, també es separa clarament una de les mostres de les altres dos (alíquotes 3 i 6 respecte a 1 i 4, i 5 i 2) amb respecte al primer component principal. Aquesta mostra més separada conté una concentració de lípids més elevada respecte de les altres. Per tant, les tendències observades prèviament són molt menys rellevants que el fet que siguin la mateixa mostra. Es pot dir l'efecte biològic predomina sobre l'efecte analític.



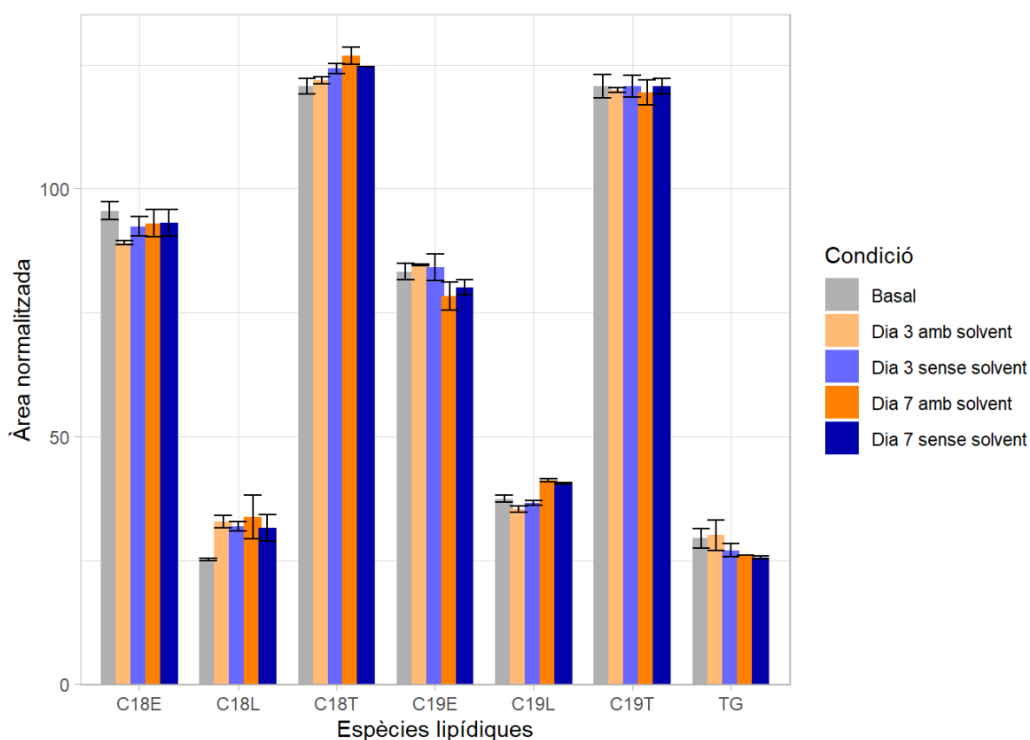
**Figura 4.2.** Anàlisi de components principals de les diferents alíquotes. Les alíquotes 1 i 4, 5 i 2 i 3 i 6 representen les 3 mostres respectivament. S'observa la separació de les alíquotes per mostra i no segons si han estat liofilitzades o no.

## 4.2. Congelació amb solvent i sense solvent d'extracció:

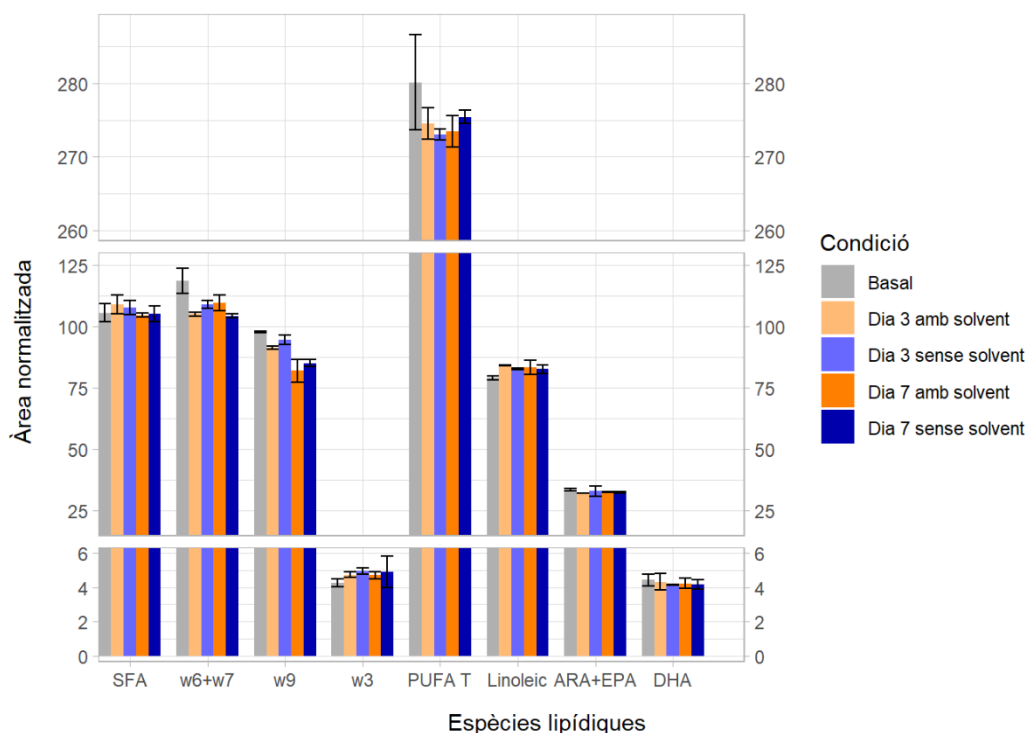
Es representa la mitjana aritmètica de les àrees normalitzades obtingudes per cada senyal lipídic amb el seu error estàndard per cada condició (figures 4.3. a 4.5.). En la majoria de senyals s'observen valors més semblants entre ells en les alíquotes congelades sense solvent respecte a les congelades amb solvent.

S'observa una disminució de la concentració en algunes dels senyals referents als àcids grassos insaturats (Figura 4.4.), principalment els senyals de  $\omega 6+\omega 7$ ,  $\omega 9$  i els àcids grassos poliinsaturats (PUFA) entre les alíquotes basals i la resta. Aquests àcids grassos són els més probables a ser oxidats de forma espontània, per la presència d'enllaços dobles<sup>24</sup>.

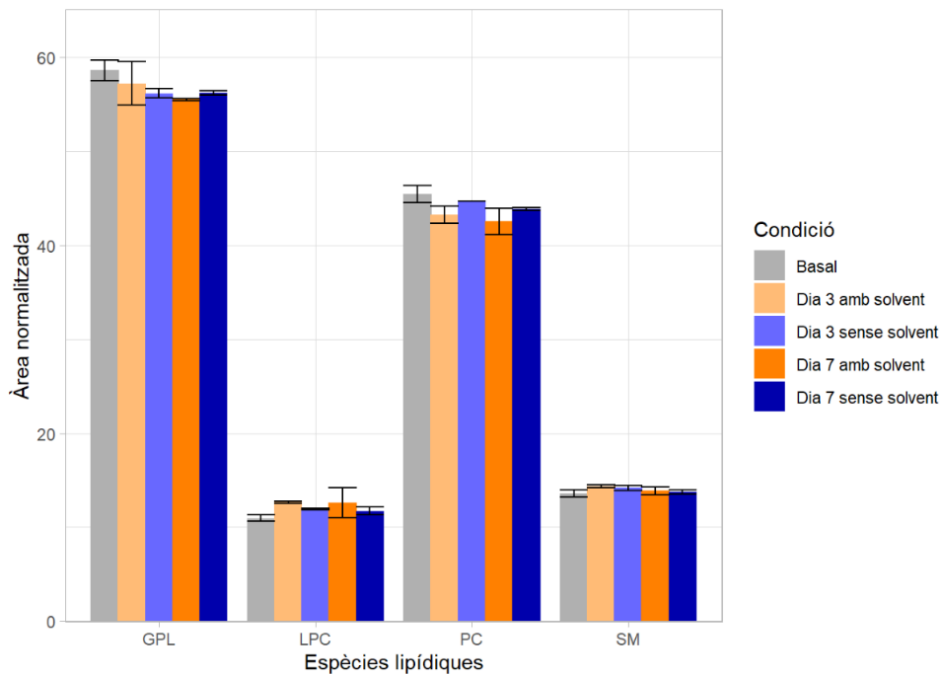
S'observa un augment de la quantitat de lisofosfatidilcolina i una disminució de la fosfatidilcolina present en les mostres congelades amb solvent respecte a les congelades sense solvent (Figura 4.5.). Aquest efecte es podria explicar pel trencament d'un dels enllaços èster de la fosfatidilcolina, alliberant un àcid gras i formant la lisofosfatidilcolina en presència de solvent orgànic en la mostra.



**Figura 4.3.** Representació de les àrees normalitzades mitjanes amb l'error estàndard dels diferents senyals del colesterol i triacilglicèrids. S'observen valors més semblants entre ells en les alíquotes congelades sense solvent respecte a les congelades amb solvent.



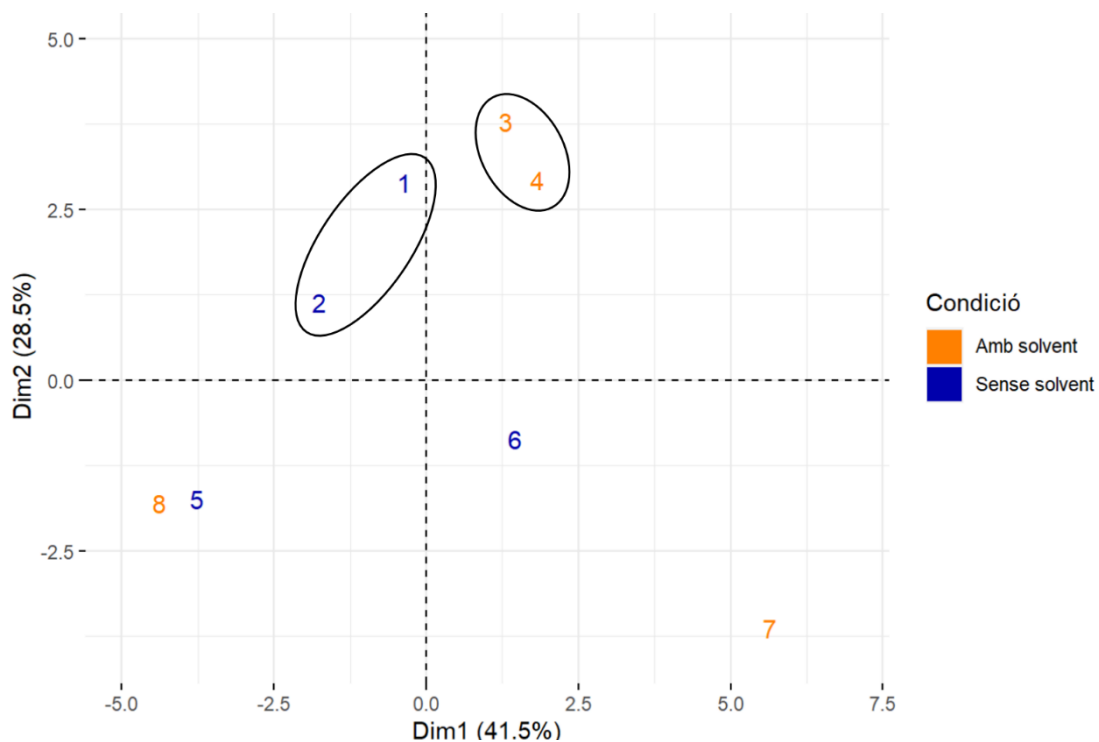
**Figura 4.4.** Representació de les àrees normalitzades mitjanes amb l'error estàndard dels diferents senyals d'àcids grassos saturats i insaturats. S'observa la diferència entre les alíquotes basals respecte a les restants probablement degut a reaccions d'oxidació dels dobles enllaços.



**Figura 4.5.** Representació de les àrees normalitzades mitjanes amb l'error estàndard dels diferents senyals de fosfolípids. S'observa la diferència entre inversament proporcional entre la fosfatidilcolina i la lisofosfatidilcolina segons la condició.

Pel fet que és difícil que tingui lloc l'oxidació espontània d'aquestes espècies lipídiques a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , es creu que aquestes oxidacions tenen lloc durant el procés d'assecatge utilitzant el SpeedVac, realitzat a temperatura ambient, però on les mostres poden assolir temperatures majors. Com que no s'observen diferències prou significatives entre les alíquotes congelades amb solvent i les congelades sense solvent es conclou que és millor emmagatzemar les mostres sense solvent per evitar possibles oxidacions causades per aquests, però no hi ha inconvenients en congelar les mostres amb solvent en casos puntuals, sempre que totes les mostres d'un mateix conjunt es tractin de la mateixa manera.

Per tal de reduir la dimensionalitat de les dades aquestes es representen en una anàlisi de components principals (Figura 4.6.). S'observa que les alíquotes a dia 3 s'agrupen per condició, en canvi, les alíquotes a dia 7 no, per la qual cosa es pot pensar que hi ha una tendència a una pèrdua de l'homogeneïtat de les mostres com més temps estiguin les mostres congelades.



**Figura 4.6.** Anàlisi de components principals de les diferents alíquotes. Les alíquotes 1 i 2 fan referència a les alíquotes congelades sense solvent durant 3 dies, les alíquotes 3 i 4 les congelades amb solvent durant 3 dies, les 5 i 6 les congelades sense solvent durant 7 dies i les alíquotes 7 i 8 les congelades amb solvent durant 7 dies. S'observa una agrupació de les alíquotes congelades durant 3 dies segons la mostra a la que pertanyen, però aquesta agrupació es perd en les alíquotes congelades durant 7 dies.

### 4.3. Automatització del protocol estàndard d'extracció lipídica

Per tal de determinar si el protocol manual o automàtic és més precís es calcula el coeficient de variació (CV). Com es mostra a la Taula 4.1., els valors obtinguts dels coeficients de variació del procediment automàtic són en la majoria de casos inferiors als coeficients de variació del procediment manual, reduint-se en més d'un 90% en senyals com els SFA, el linoleic,  $\omega 3$  o ARA+EPA, entre altres. De totes formes s'obtenen CV baixos pels dos procediments. S'obté 1 valor aberrant, el coeficient de variació del DHA. Aquest valor aberrant pot no provenir del procés analític, sinó que l'increment de la variabilitat pot tindre el seu origen en el procés de la deconvolució, ja que es tracta d'un senyal poc abundant, el que es tradueix en una baixa intensitat i per tant en una baixa relació senyal/soroll de fons, el que dificulta la seva quantificació.

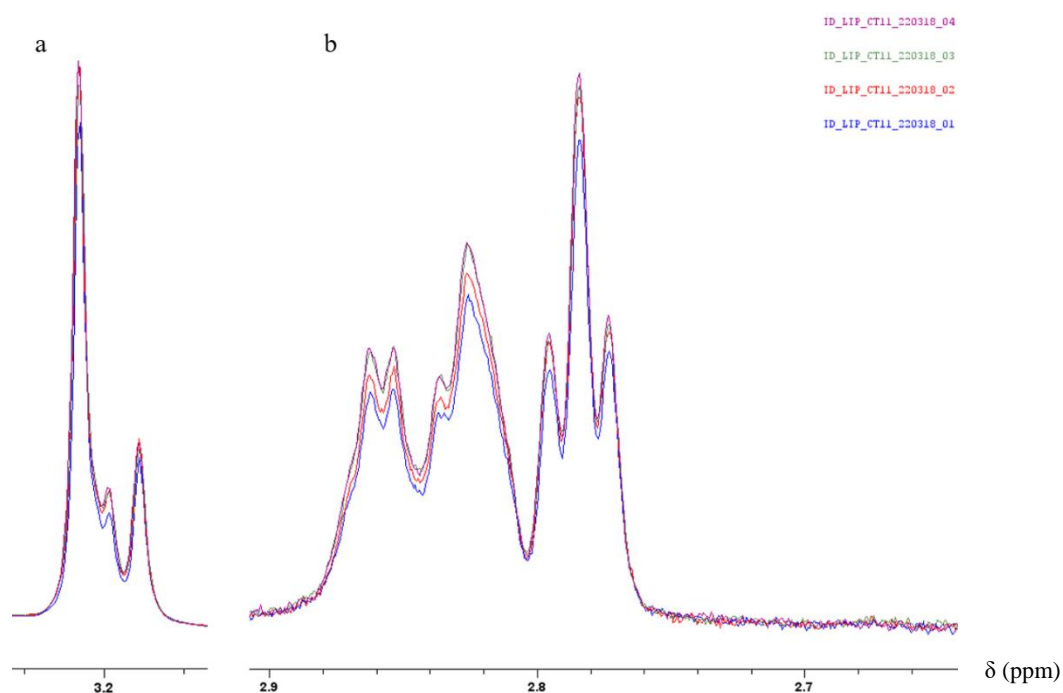
*Taula 4.1. Mitjana aritmètica en mM, desviació estàndard i coeficient de variació (CV) de les dades obtingudes pels controls processats manual i automàticament. S'observen coeficients de variació menors en la majoria de senyals.*

	Manual			Automàtic		
	Mitja (mM)	Desviació estàndard	CV	Mitja (mM)	Desviació estàndard	CV
C18E	3.48	0.09	2.66	3.91	0.06	1.65
C18L	2.13	0.30	14.23	1.96	0.02	1.03
C18T	5.61	0.40	7.06	5.87	0.04	0.76
C19E	3.41	0.17	4.97	3.26	0.04	1.26
C19L	2.05	0.05	2.57	2.21	0.14	6.44
C19T	5.46	0.22	4.07	5.47	0.18	3.35
SFA	6.60	0.51	7.81	6.53	0.01	0.11
$\omega 6 + \omega 7$	4.95	0.32	6.51	5.44	0.07	1.28
$\omega 9$	2.78	0.14	4.96	2.97	0.07	2.34
$\omega 3$	0.49	0.04	8.52	0.53	$2.6 \cdot 10^{-3}$	0.49
Linoleic	3.87	0.33	8.41	3.99	0.03	0.68
PUFAT	11.93	1.11	9.29	13.09	0.30	2.29
ARA+EPA	1.30	0.21	16.26	1.46	0.01	0.59
DHA	0.16	$6 \cdot 10^{-4}$	0.40	0.18	0.04	20.95
TG	0.82	0.10	11.76	0.89	0.07	7.97
GPL	3.08	0.25	8.28	3.32	0.16	4.86
PC	2.20	0.10	4.78	2.50	0.05	1.94
SM	0.81	0.07	8.63	0.87	$3.9 \cdot 10^{-3}$	0.45
LPC	0.77	0.06	7.87	0.76	$1.4 \cdot 10^{-3}$	0.18

El solapament dels espectres de les quatre rèpliques junts mostra una superposició quasi perfecta de les rèpliques 3 i 4, els automàtics. En canvi, les rèpliques 1 i 2 presenten espectres més variables entre ells mateixos i els preparats pel protocol automàtic (Figura 4.8.). Aquest fet

juntament amb els valors dels coeficients de variació calculats prèviament indica que l'automatització del procés no introdueix variabilitat, i de fet la redueix.

A més a més, en l'automatització de la resuspensió de la mostra liofilitzada s'hi afegeix un canvi, es resuspen la mostra en aigua desionitzada en comptes de PBS. La liofilització no elimina les sals presents al PBS, per la qual cosa, una resuspensió en PBS augmenta la concentració salina de la mostra i, per tant, la força iònica. La força iònica afecta al *shimming*, un paràmetre de RMN relacionat amb l'homogeneïtzació del camp magnètic. Si la mostra presenta més contingut salí, el *shimming* no és òptim i s'obtenen pics més amples<sup>25</sup>.



**Figura 4.8.** Solapament dels espectres de RMN dels quatre controls. Rèplica 1 (blau) i rèplica 2 (vermell) analitzades manualment. Rèplica 3 (verd) i rèplica 4 (lila) analitzades automàticament. **a)** Regió de l'espectre amb els senyals de la fosfatidilcolina, la lisofosfatidilcolina i l'esfingomielina. S'observa poca superposició de la rèplica 1 amb la resta de rèpliques. **b)** Regió de l'espectre amb els senyals dels PUFAs i l'àcid linoleic. S'observa poca superposició de les rèpliques 1 i 2 respecte elles mateixes i les rèpliques analitzades automàticament.

## 5. Conclusions:

L'objectiu principal d'aquest treball és l'automatització del protocol, per tal de reduir el temps de treball, ja que la lipidòmica, com totes les ciències òmiques, treballa a gran escala amb un nombre elevat de mostres, pel que el temps de preparació i tractament de les mostres és elevat quan es treballa amb grans conjunts de mostres. Tal com s'ha determinat, l'automatització del procés no només redueix el temps de treball gràcies a l'ús del robot dispensador de líquids per realitzar la resuspensió de les mostres i la reconstitució de la fase orgànica, sinó que també redueix la variabilitat introduïda per l'error humà a l'hora de tractar les mostres manualment, com es pot veure gràcies a la reducció del coeficient de variació de les mostres analitzades automàticament i al solapament dels espectres d'aquestes.

Amb la finalitat d'automatitzar el protocol, també s'han analitzat dos possibles punts crítics del procés. S'ha determinat gràcies a la reducció de les variables mitjançant el PCA que les diferents alíquotes s'agrupen segons la mostra de la qual provenen i no segons si han estat liofilitzades o no, predominant l'efecte biològic sobre l'analític. D'aquesta manera, es prefereix la liofilització de les mostres per facilitar l'automatització del protocol, evitant el duplicat necessari en les mostres no liofilitzades ja que el mètode BUME utilitzant el robot dispensador de líquids està optimitzat per 100 µl, reduint el temps d'anàlisi i la utilització de més solvent del necessari.

També s'ha determinat que la congelació de la fase orgànica amb solvent o sense solvent no presenta diferències significatives, i tot i que es prefereix un emmagatzematge de les mostres sense solvents per tal d'evitar possibles oxidacions de certes espècies lipídiques, el més important és tractar totes les mostres d'un mateix conjunt amb les mateixes condicions.

Amb la maquinària i el mètode d'extracció utilitzat actualment en aquesta anàlisi lipidòmica, el protocol no pot ser més automatitzat. La principal limitació de l'estudi és el nombre de mostres, degut a l'entorn de l'empresa, tot i això, la RMN és una tècnica robusta i molt reproduïble, sent aquest estudi una primera aproximació en l'anàlisi de l'efecte de la liofilització i la congelació amb solvent d'extracció.

## 6. Bibliografia:

1. Vance JE, Vance DE. *Biochemistry Of Lipids, Lipoproteins And Membranes.*; 2008. doi:10.1016/B978-0-444-53219-0.X5001-6
2. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011;1811(11):637-647. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009
3. Lipidlibrary.aocs.org. n.d. Chemistry/Physics. [online] Available at: <<https://lipidlibrary.aocs.org/>> [Accessed 11 May 2022].
4. Cyberlipid.gerli.com. n.d. Your Web site for FATS and OILS. [online] Available at: <<http://cyberlipid.gerli.com/>> [Accessed 11 May 2022].
5. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 2009;50(SUPPL.):S9-S14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200
6. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 2005;46(5):839-861. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200
7. Liebisch G, Vizcaíno JA, Köfeler H, et al. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*. 2013;54(6):1523-1530. doi:10.1194/jlr.M033506
8. Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma<sup>1</sup>. *Journal of Lipid Research*. 2010;51(11):3299-3305. doi:10.1194/jlr.M009449
9. Han X. Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016;12(11):668-679. doi:10.1038/nrendo.2016.98
10. Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends in Biochemical Sciences*. 2016;41(11):954-969. doi:10.1016/j.tibs.2016.08.010
11. Sun T, Wang X, Cong P, Xu J, Xue C. Mass spectrometry-based lipidomics in food science and nutritional health: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020;19(5):2530-2558. doi:10.1111/1541-4337.12603
12. Barrilero R, Gil M, Amigó N, et al. LipSpin: A New Bioinformatics Tool for Quantitative <sup>1</sup>H NMR Lipid Profiling. *Analytical Chemistry*. 2018;90(3):2031-2040. doi:10.1021/acs.analchem.7b04148
13. Hu T, Zhang JL. Mass-spectrometry-based lipidomics. *Journal of Separation Science*. 2018;41(1):351-372. doi:10.1002/jssc.201700709
14. Li J, Vosegaard T, Guo Z. Applications of nuclear magnetic resonance in lipid analyses: An emerging powerful tool for lipidomics studies. *Progress in Lipid Research*. 2017;68(September):37-56. doi:10.1016/j.plipres.2017.09.003
15. Fan TWM, Lane AN. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2016;92-93:18-53. doi:10.1016/j.pnmrs.2016.01.005



16. Jacobsen NE. *NMR Data Interpretation Explained: Understanding 1D and 2D NMR Spectra of Organic Compounds and Natural Products*. Wiley; 2017.
17. J. W. A, E. B. M. *NMR and Chemistry: An Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. Fourth. Taylor & Francis; 2000.
18. Hyötyläinen T, Orešič M. Optimizing the lipidomics workflow for clinical studies - practical considerations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(17):4973-4993. doi:10.1007/s00216-015-8633-2
19. Löfgren L, Forsberg GB, Ståhlman M. The BUME method: A new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Scientific Reports*. 2016;6(February):1-11. doi:10.1038/srep27688
20. Wenk R. M. *Encyclopedia of Lipidomics*.; 2016. doi:10.1007/978-94-007-7864-1
21. Cruz M, Wang M, Frisch-Daiello J, Han X. Improved Butanol–Methanol (BUME) Method by Replacing Acetic Acid for Lipid Extraction of Biological Samples. *Lipids*. 2016;51(7):887-896. doi:10.1007/s11745-016-4164-7
22. Alexandri E, Ahmed R, Siddiqui H, Choudhary MI, Tsiafoulis CG, Gerathanassis IP. High resolution NMR spectroscopy as a structural and analytical tool for unsaturated lipids in solution. *Molecules*. 2017;22(10). doi:10.3390/molecules22101663
23. Marcovina SM, Adolphson JL, Parlavecchia M, Albers JJ. Effects of lyophilization of serum on the measurement of apolipoproteins A-I and B. *Clinical Chemistry*. 1990;36(2):366-369. doi:10.1093/clinchem/36.2.366
24. Fereidoon S, Ying Z. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*. 2010;39(11):4067-4079. doi:10.1039/b922183m
25. Naqi HA, Husbands SM, Blagbrough IS. <sup>1</sup>H quantitative NMR and UHPLC-MS analysis of seized MDMA/NPS mixtures and tablets from night-club venues. *Analytical Methods*. 2019;11(37):4795-4807. doi:10.1039/c9ay01403a
26. Vinaixa M, Ángel Rodríguez M, Rull A, et al. Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(5):2527-2538. doi:10.1021/pr901203w

## **Autoavaluació:**

Durant la meua estada a Biosfer Teslab amb la finalitat de desenvolupar el meu Treball de Fi de Grau, he pogut portar a la pràctica diferents coneixements teòrics adquirits en diferents assignatures de la carrera, com l'estructura dels lípids i la seva síntesi a Bioquímica i Productes Naturals d'Interès Industrial, les bases teòriques de la ressonància magnètica nuclear a Química Orgànica i el tractament de dades òmiques a Biologia de Sistemes. A més a més, aquesta estada de pràctiques m'ha permès entrar en contacte amb maquinària de laboratori d'última generació no utilitzats durant els laboratoris de les diferents assignatures, com el liofilitzador, localitzat al Servei de Recursos Científics, el robot dispensador de líquids i l'espectròmetre de RMN, localitzats ambdós al COS.

A més a més, les dades han estat tractades mitjançant l'ús de softwares específics del camp de RMN, com TopSpin per corregir els espectres i el software propi de Biosfer, Lipidscale, per tal de deconvolucionar les senyals i obtenir les àrees. Les dades han estat analitzades mitjançant el software de programació R, per tal de generar les taules i les diferents figures.

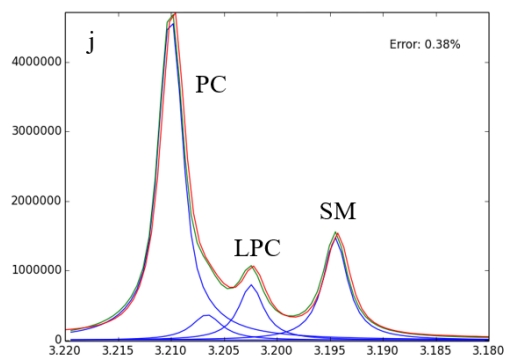
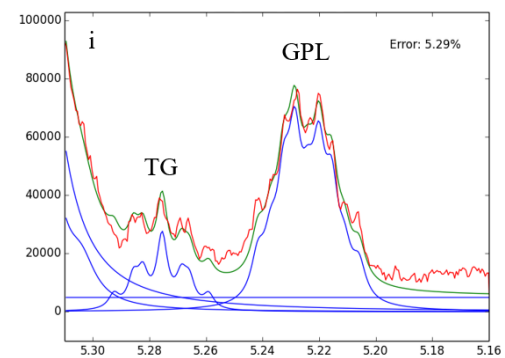
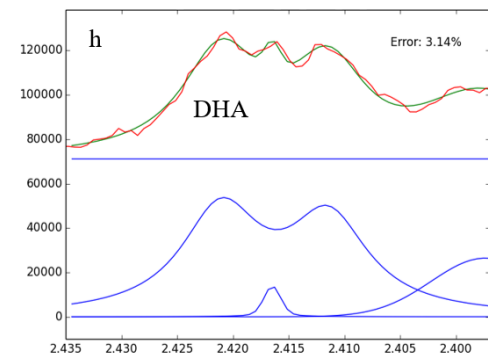
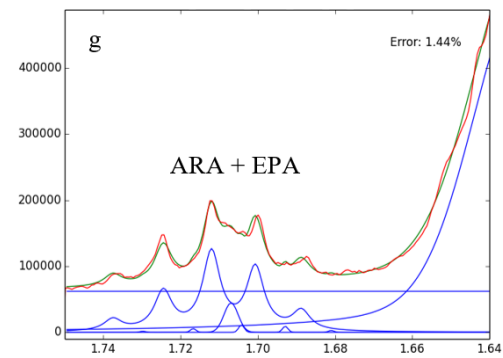
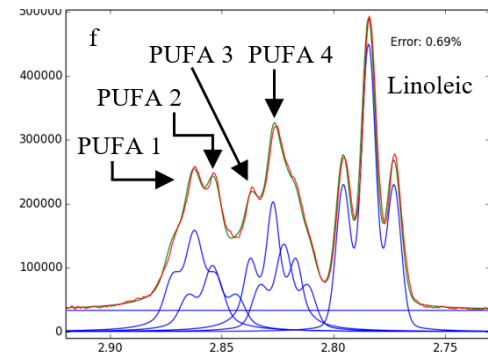
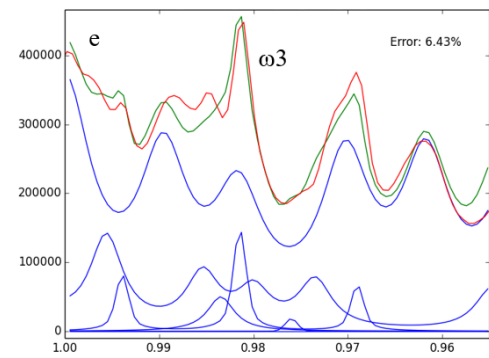
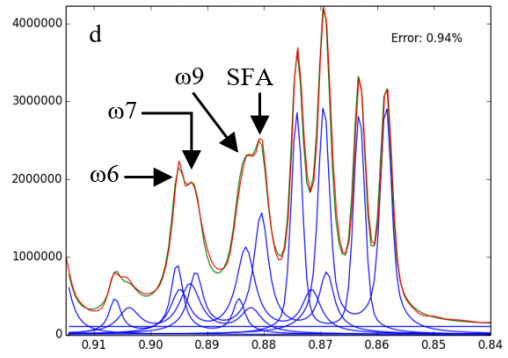
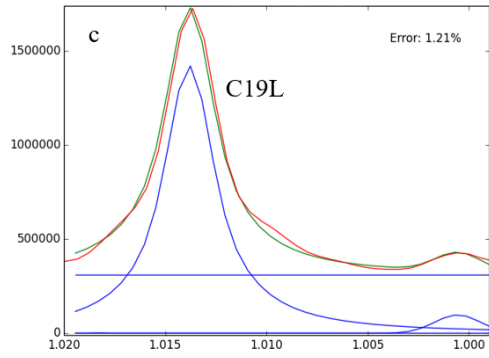
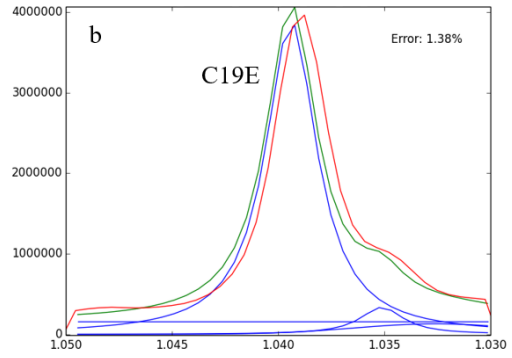
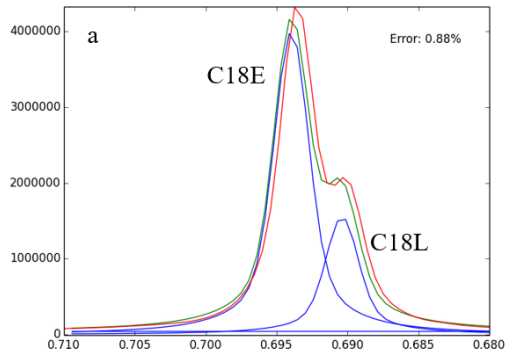
Els coneixements adquirits, tant de treball de laboratori com de tractament de dades han estat de molta ajuda per la meua formació acadèmica i professional. A més a més, la meua estada a Biosfer Teslab ha estat el meu primer contacte amb el treball en una empresa de l'àmbit científic, i per tant m'han ajudat a créixer professional i personalment.

## Annex I: Espècies lipídiques i senyals deconvolucionades dels espectres

*Taula suplementària 1. Senyals lipídics deconvolucionats obtingudes dels espectres de RMN, amb la seva multiplicitat, el nombre de protons, l'estructura química i el desplaçament químic en les que apareixen. (Linoleic:  $n=1$ , PUFAs:  $n \geq 2$ ).*

*C18E: colesterol 18 esterificat, C18L: colesterol 18 lliure, C19E: colesterol 19 esterificat, C19L: colesterol 19 lliure, SFA: àcids grassos saturats,  $\omega 6$ : omega 6,  $\omega 7$ : omega 7,  $\omega 9$ : omega 9,  $\omega 3$ : omega 3, Linoleic: àcid linoleic, PUFAs: àcids grassos poliinsaturats, ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, DHA: àcid docosahexaenoic, TG: triglicèrids, GPL: glicerofosfolípids, PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomielina i LPC: lisofosfatidilcolina. Taula modificada<sup>12,26</sup>.*

Senyal	Multiplicitat	Nombre de protons	Estructura	Desplaçament químic (ppm)
C18E	singlet	3	C18- <b>H</b> <sub>3</sub>	0,691
C18L	singlet	3	C18- <b>H</b> <sub>3</sub>	0,694
C19E	singlet	3	C19- <b>H</b> <sub>3</sub>	1,040
C19L	singlet	3	C19- <b>H</b> <sub>3</sub>	1,013
SFA	triplet	3	<b>CH</b> <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <i>n</i>	0,886
$\omega 6$	triplet	3	<b>CH</b> <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <i>n</i>	0,900
$\omega 7$	triplet	3	<b>CH</b> <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <i>n</i>	0,898
$\omega 9$	triplet	3	<b>CH</b> <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <i>n</i>	0,888
$\omega 3$	triplet	3	<b>CH</b> <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -C=C	0,982
Linoleic	triplet	2	-CH=CH- <b>CH</b> <sub>2</sub> -(CH=CH-CH <sub>2</sub> -) <i>n</i>	2,783
PUFA1	triplet	2	-CH=CH- <b>CH</b> <sub>2</sub> -(CH=CH-CH <sub>2</sub> -) <i>n</i>	2,862
PUFA2	triplet	2	-CH=CH- <b>CH</b> <sub>2</sub> -(CH=CH-CH <sub>2</sub> -) <i>n</i>	2,854
PUFA3	triplet	2	-CH=CH- <b>CH</b> <sub>2</sub> -(CH=CH-CH <sub>2</sub> -) <i>n</i>	2,827
PUFA4	triplet	2	-CH=CH- <b>CH</b> <sub>2</sub> -(CH=CH-CH <sub>2</sub> -) <i>n</i>	2,817
ARA	multiplet	2	-CH=CH-CH <sub>2</sub> - <b>CH</b> <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CO-OR	1,699
EPA	multiplet	2	-CH=CH-CH <sub>2</sub> - <b>CH</b> <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CO-OR	1,697
DHA	multiplet	4	-CH=CH- <b>CH</b> <sub>2</sub> - <b>CH</b> <sub>2</sub> -CO-OR	2,420
TG	multiplet	1	Esquelet de glicerol (C2- <b>H</b> )	5,237
GPL	multiplet	1	Esquelet de glicerol (C2- <b>H</b> )	5,288
PC	singlet	9	-CH <sub>2</sub> -N-( <b>CH</b> <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3,208
SM	singlet	9	-CH <sub>2</sub> -N-( <b>CH</b> <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3,192
LPC	singlet	9	-CH <sub>2</sub> -N-( <b>CH</b> <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	3,201



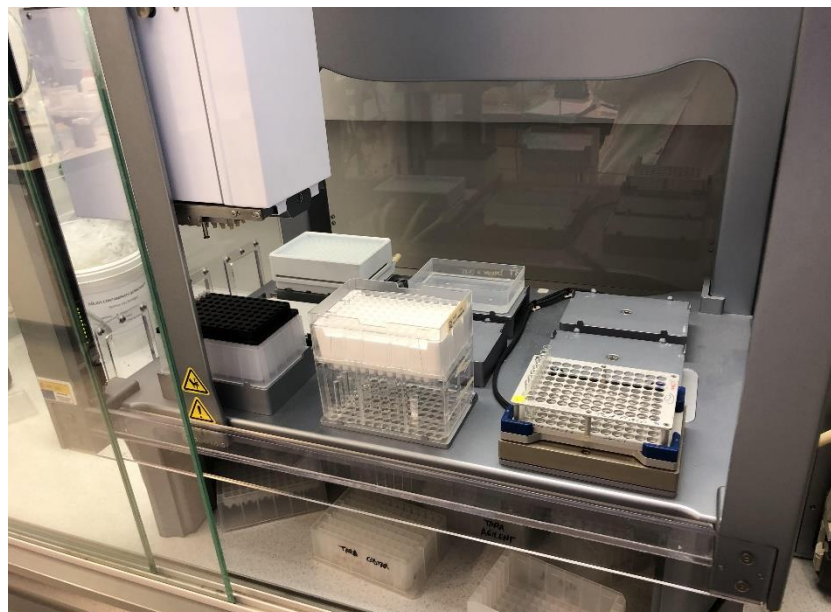
**Figura suplementària 1.** Regions dels espectres de RMN dels senyals lipídics deconvolucionats en les diferents proves realitzades. **a)** C18E: colesterol 18 esterificat, C18L: colesterol 18 lliure, **b)** C19E: colesterol 19 esterificat, **c)** C19L: colesterol 19 lliure, **d)** SFA: àcids grassos saturats,  $\omega 6$ : omega 6,  $\omega 7$ : omega 7,  $\omega 9$ : omega 9, **e)**  $\omega 3$ : omega 3, **f)** Linoleic: àcid linoleic, PUFAs: àcids grassos poliinsaturats, **g)** ARA: àcid araquidònic, EPA: àcid eicosapentaenoic, **h)** DHA: àcid docosahexaenoic, **i)** TG: triglicèrids, GPL: glicerofosfolípids, **j)** PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomielina i LPC: lisofosfatidilcolina.

L'eix de les x mostra el desplaçament químic en ppm.

## Annex II: Maquinària utilitzada



*Figura suplementària 2. Eespectròmetre “Bruker Avance III-600”. Opera a 600,2 MHz. Utilitzat en totes les mesures.*



*Figura suplementària 3. Robot dispensador de líquids “Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform”.*

## Annex III: Instruccions de treball de l'extracció de lípids

	<b>INSTRUCCIÓN DE TRABAJO</b>	Edición: 3ª Fecha: 25/05/22 Código: IT-0906
	<b>Extracción de lípidos BRAVO</b>	

### ÍNDICE

1. Objeto
2. Alcance
3. Responsabilidades
4. Desarrollo
  - 4.1 Preparación del material
  - 4.2 Preparación del BRAVO
  - 4.3 Extracción lipídica
  - 4.4 Secado de los extractos
  - 4.5 Adquisición de los espectros
5. Registros
6. Anexos
7. Registro de modificaciones

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO POR:</b>	<b>APROBADO POR:</b>
<b>Cargo:</b> LabTech	<b>Cargo:</b> QM	<b>Cargo:</b> CEO
<b>Nombre:</b> Enrique Ozcariz	<b>Nombre:</b> Sara Samino	<b>Nombre:</b> Nuria Amigó
<b>Firma:</b> 	<b>Firma:</b> 	<b>Firma:</b> 
<b>Fecha:</b> 04/11/19	<b>Fecha:</b> 04/11/19	<b>Fecha:</b> 04/11/19

**1. OBJETO**

Este procedimiento tiene por objeto describir el sistema utilizado por **Biosferteslab** para garantizar que el proceso de preparación de muestras se lleva a cabo de forma controlada de modo que permita cumplir con los requisitos establecidos para el análisis de las muestras de extractos lipídicos.

**2. ALCANCE**

El ámbito del presente procedimiento alcanza a los controles y las acciones que se realizan en la preparación de las muestras según el protocolo COS-BRAVO a través del uso del manipulador de muestras (a partir de ahora BRAVO) antes de ser analizadas y adquisición de muestras mediante RMN.

**3. RESPONSABILIDADES**

Actividades	COO	CSO	CEO	LabTech
Preparación de muestras de RMN				
Adquisición de muestras				



#### 4. DESARROLLO

Consideraciones previas para llevar a cabo el proceso de extracción lipídica con robot.

Consideración 1: Desde el inicio es importante saber en todo momento el número de muestras a extraer (de aquí en adelante, N).

Consideración 2: Para colocar el material en la base del BRAVO es importante conocer la orientación de todas las placas.

##### 4.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL

Para llevar a cabo una extracción lipídica con el manipulador de muestras BRAVO es necesario disponer de:

1. Tubos de cristal por duplicado (N x 2): (1) suero y (2) fase orgánica. Previamente rotulados y cubiertos con cinta adhesiva transparente.
2. Bases con puntas estériles: (1) suero- no reciclables (N) y (2) solventes – reciclables en sucesivas extracciones (N). El orden de las puntas se indica en la figura.
3. Solventes: H<sub>2</sub>O MilliQ, BUME (3:1), DIPE:EtAc (3:1).
4. Cubetas transparentes. Una para cada solvente.
5. Soportes para los tubos de cristal. Uno para el plasma y otro para la fase orgánica. El orden de los tubos se indica en la figura.
6. Dos bases de centrifuga.

##### 4.2 PREPARACIÓN DEL BRAVO

###### 4.2.1 INICIALIZACIÓN DEL BRAVO

Acción		Documento
1	Encender el BRAVO accionando el interruptor trasero. La luz azul indica que está encendido.	
2	Encender el control de temperatura accionando el interruptor que se encuentra en la parte trasera de la esquina superior izquierda del controlador de temperatura.	
3	Abrir el software <i>VWorks</i> desde el pc.	
4	Clicar sobre <i>log in</i> para introducir el nombre de usuario y la contraseña.	User: mgil Contraseña: mgilserret

Acción		Documento
5	Clicar sobre <i>File - Open - Protocol File.</i>	<i>Lipid extraction Miriam v2.pro</i>
6	Seleccionar <b>SÍ</b> en la ventana emergente que pregunta si se desea iniciar el dispositivo ( <i>device</i> ).	
7	Aparecerá un primer mensaje de error indicando que el sensor detecta la presencia de una placa. En caso de no haber colocado ninguna todavía se selecciona la opción: "ignorar y que se continúe moviendo al eje G." El brazo del robot se desplazará al eje G.	
8	Aparecerá un segundo mensaje que preguntará si es seguro que el brazo se mueva hacia el eje W. Se selecciona la opción: <i>retry</i> . El brazo del robot se desplazará al eje W.	
9	Aparecerá un tercer error que indicará que no se puede inicializar el <i>Autofill Station</i> . Click en ignorar y continuar.	
10	Reducir la temperatura del <i>Heating/Shaking station</i> (posición 4): Seleccionar <i>Diagnostics</i> → <i>BRAVO</i> → <i>Device Diagnostics</i> → <i>Configuration</i> → <i>Heating/Shaking station</i> (aparecerá en la posición 4) → <i>Diagnose Accesory</i> → Target = 4 → START → OK → OK Confirmar que la temperatura disminuye en la pantalla del controlador de temperatura.	

	<b>INSTRUCCIÓN DE TRABAJO</b>	Edición: 3ª Fecha: 25/05/22 Código: IT-0906
	<b>EXTRACCION DE LIPIDOS -BRAVO</b>	

Acción		Documento
11	Ir a la pestaña <i>lipid extraction Miriam V2.pro</i> . Abrir en ella los 4 subprocesos.	
12	Indicar el número de muestras a extraer en cada subproceso (N):  <i>Set head mode</i> - Clicar sobre los 3 puntos que están al lado de la pestaña que indica el número de columnas del brazo del BRAVO (si están todas seleccionadas pondrá all barrels) - Indicar el número de columnas en <i>Subset Mode</i> (ponerlo en el menú, no solo con la flecha sobre el brazo del bravo).	Se deben modificar la tarea <i>Set head mode</i> en los 4 subprocesos
13	Guardar los cambios efectuados.	

#### 4.2.2 DISPOSICIÓN DEL MATERIAL EN EL BRAVO

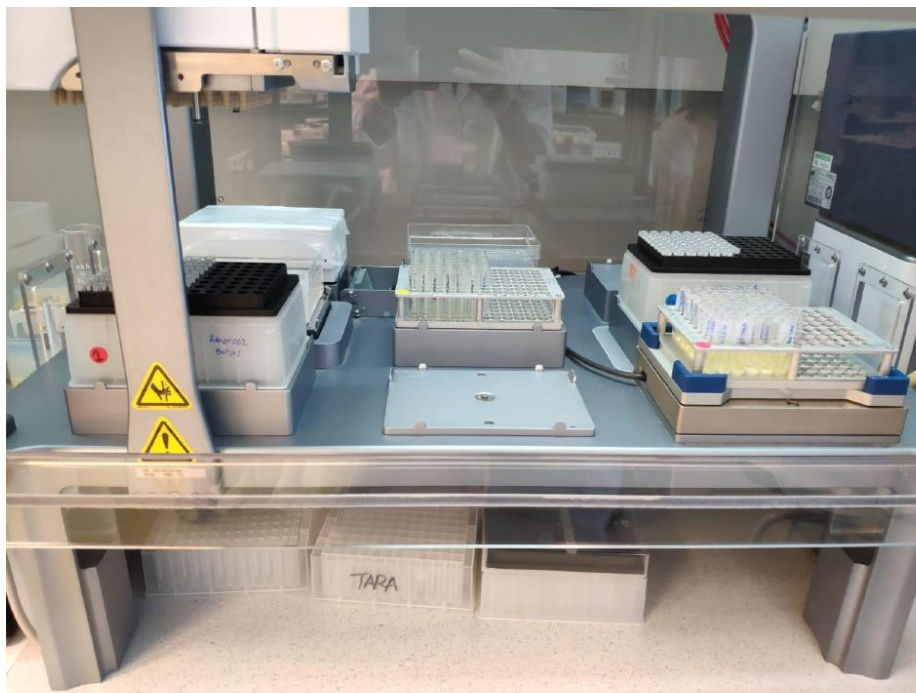
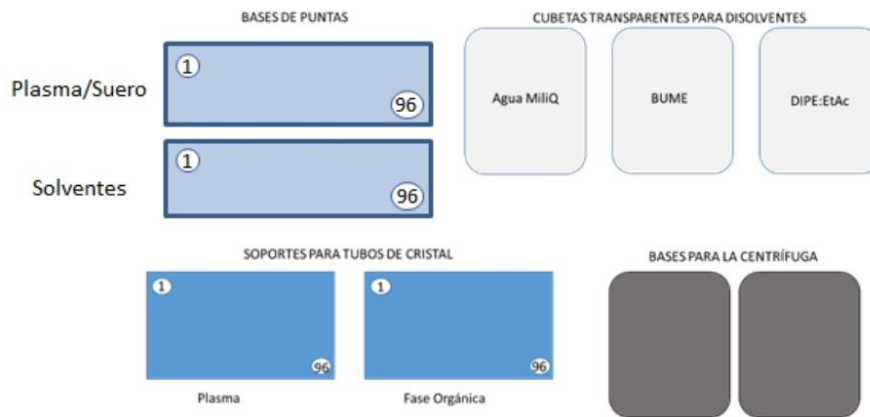
Es necesario transferir los 100 µl de suero o plasma a los tubos de cristal correspondientes, antes de comenzar con la disposición del material en el BRAVO.

Cada elemento ocupará una **posición y orientación** concreta en él:

1. Esta posición queda libre.
2. Agua MiliQ. Se coloca en el centro.
3. BUME.
4. DIPE:EtAc. Se coloca en el centro y en último lugar (por ser el más volátil).
5. Base con tubos de cristal para recoger la fase orgánica. Se orientan hacia el fondo-izquierda.
6. Puntas para el disolvente. Se orientan hacia el fondo-izquierda.
7. Puntas para el plasma.
8. Esta posición queda libre.

4

9. Base con tubos de cristal que contienen el plasma.



#### 4.3 EXTRACCIÓN LIPÍDICA

La extracción se compone de tres ciclos:

1. Se añaden 300 ul de BUME, X ml de DIPE:EtAc y X ml de H<sub>2</sub>O MiliQ.
2. Se añaden 300 ul de DIPE:EtAc.
3. Se añaden 250 ml de DIPE:EtAc.

Es necesario centrifugar entre ciclo y ciclo para favorecer la separación entre las fases orgánica y acuosa.

##### 4.3.1 PRIMER CICLO DE EXTRACCIÓN

Consideraciones: apagar la campana de flujo laminar y trabajar con la campana cerrada para evitar la evaporación de los solventes volátiles.

Acción		Documento
1	Simular el proceso seleccionando <i>Simulation is ON</i> .	
2	Iniciar la simulación pulsando START	
3	Aparecerán una serie de mensajes: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hay 4 tareas deshabilitadas - Seleccionar yes.</li> <li>2. Cuántas veces se desea realizar el protocolo? 1 vez - Seleccionar <i>Finish</i></li> </ol>	
3	Al final de la simulación aparecerá un mensaje indicando el tiempo estimado de la extracción y los errores encontrados. En caso de que no los haya pulsar OK.	
4	Desactivar la simulación seleccionando <i>Simulation is OFF</i> .	



	<b>INSTRUCCIÓN DE TRABAJO</b>	Edición: 3ª Fecha: 25/05/22 Código: IT-0906
	<b>EXTRACCION DE LIPIDOS -BRAVO</b>	

Acción		Documento
5	Iniciar el proceso de extracción pulsando START.	
6	Seleccionar <i>Continue</i> y posteriormente <i>Finish</i> en la ventana emergente.	
7	Pulsar OK sobre la ventana emergente que indica un error que provocará el cierre del programa.	
8	Abrir de nuevo el software <i>VWorks</i> .	
9	Debido al guardado previo solo es necesario abrir el protocolo <i>Lipid extraction Miriam v2,pro</i> de nuevo, sin realizar ninguna modificación adicional.	
10	Iniciar el proceso con <i>Simulation is OFF</i> à START.	Volverán a aparecer los errores indicados en los pasos 7 y 8 del apartado: 1.1 Inicialización del BRAVO
11	Seleccionar <i>GO</i> en la ventana emergente que insta a una comprobación de cada posición.	
12	PAUSA 1: Retirar el solvente BUME una vez que se haya dispensado y seleccionar <i>GO</i> en la ventana emergente.	

Acción		Documento
13	PAUSA 2: Centrifugación. Retirar la placa con los tubos contenedores del suero o plasma situados en la posición 9.	Aparecerá un segundo mensaje preguntando si se ha introducido la placa retirada en el paso anterior. NO se seleccionará <i>GO</i> hasta después de haber realizado la centrifugación.

#### 4.3.2 CENTRIFUGACIÓN

Este proceso se repetirá tras cada ciclo de extracción.

Acción		Documento
1	Colocar de manera compensada los tubos con el suero o plasma en las dos bases de centrifuga	
2	Tapar las dos bases de centrifuga con parafilm.	
3	Abrir la centrifuga y colocar el rotor de placas.	
4	Introducir las bases con las muestras.	

Acción		Documento
5	Seleccionar las condiciones de centrifugación (apretar pulse para cambiar de una a otra): <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Speed: 4700</i></li> <li>○ <i>Time: 0,01</i></li> <li>○ <i>Temp: 4</i></li> <li>○ <i>ACC: 9</i></li> <li>○ <i>DEC: 9</i></li> <li>○ <i>BUCKET: 3617</i></li> </ul>	
6	Cerrar la centrifuga y pulsar START	Este proceso dura 1 min
7	Comprobar de manera visual que la separación entre ambas fases se ha producido correctamente.	
8	<b>En caso de que no se haya producido una separación suficiente entre ambas fases</b> repetir el proceso de centrifugación.	



	<b>INSTRUCCIÓN DE TRABAJO</b>	Edición: 3ª Fecha: 25/05/22 Código: IT-0906
	<b>EXTRACCION DE LIPIDOS -BRAVO</b>	

#### 4.3.3 SEGUNDO Y TERCER CICLO DE EXTRACCIÓN

Las acciones detalladas a continuación se realizan dos veces consecutivas, coincidiendo con los dos ciclos de extracción.

Acción		Documento
1	Destapar las bases de la centrifuga y traspasar todos los tubos de vidrio (ya centrifugados) a la placa de extracción	
2	Introducir la placa en la posición 9.	
3	Seleccionar GO en la ventana emergente que instaba a comprobar que se ha introducido la placa.	
4	Comprobar que no se produce una aspiración de interfase.	

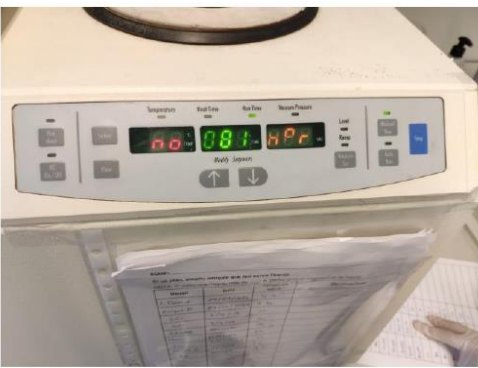
#### 4.3.4 RETIRAR MATERIAL Y APAGAR BRAVO

Acción		Documento
1	Retirar los tubos que contienen la fase orgánica situados en la posición 5.	
2	Colocar de manera compensada los en las dos bases de centrifuga	

Acción		Documento
3	Retirar el material de la base del bravo.	<p><u>Desechar</u> el material que ha estado en contacto con material biológico: puntas de suero y tubos de la posición 9.</p> <p><u>Reciclar</u>: disolventes, puntas de disolventes</p>
4	Cerrar la ventana del protocolo.	
5	En el pc. Cerrar sesión en VWorks mediante <i>log off</i> y cerrar la aplicación.	
6	Apuntar las horas de uso del robot en el Excel situado en el escritorio	
7	Apagar el robot Bravo y el controlador de temperatura mediante el interruptor.	

**4.4 SECADO DE LOS EXTRACTOS LIPÍDICOS**

El secado de las muestras se realizará en el SpeedBack.

Acción		Documento
1	Abrir el SpeedBack y retirar la cubierta.	
2	Introducir el rotor de placas y comprobar que las placas estén bien colocadas (no debe escucharse ruido al hacer girar el rotor).	
3	Introducir ambas placas con las muestras colocadas de manera compensada.	
4	El secado (4 horas) se realizará sin temperatura y se iniciará pulsando <i>manual run</i> .	
5	Transcurridas las 4 horas pulsar <i>stop</i> .	

	<b>INSTRUCCIÓN DE TRABAJO</b>	Edición: 3ª Fecha: 25/05/22 Código: IT-0906
	<b>EXTRACCION DE LIPIDOS -BRAVO</b>	

Acción		Documento
6	Una vez parado el equipo se abrirá el SpeedBack y se extraerán las muestras. Comprobar el estado de secado de las muestras.	
7	Se apagará el equipo pulsando el interruptor que se encuentra	

#### 4.5 ADQUISICIÓN DE LOS ESPECTROS

Acción		Documento
1	Ejecutar el comando edte y establecer una temperatura de 286 K en <i>Sample Target Temperature</i> .	
2	Esperar a que se alcance la temperatura establecida.	
3	Importar el archivo csv que contenga las muestras a medir desde: File → Import Spreadsheet(.xls(x)/.csv) file.	
4	Seleccionar el solvente LIPID BT	

	<b>INSTRUCCIÓN DE TRABAJO</b>	Edición: 3ª Fecha: 25/05/22 Código: IT-0906
	<b>EXTRACCION DE LIPIDOS -BRAVO</b>	

Acción		Documento
5	Seleccionar el experimento PBBO_zgpr_CD3Cl_CD3O D_GlobalMet	
6	Seleccionar la posición en la que se encuentre la primera muestra	
7	Seleccionar la fila del archivo csv que haga referencia a la primera muestra a medir y la que haga referencia a la última.	
8	Hacer click sobre <i>load into setup window</i>	

## 5 REGISTROS

Código	Nombre	Archivo	Localización	Responsable	Conservación
RC-0007	Seguimiento Proyecto Extracción de lípidos	ISO9001/Manual de Calidad	Servidor Biosfer Teslab	COO	Permanente

## 6 ANEXOS

No aplica.

## 7 REGISTRO DE MODIFICACIONES

**1ª edición.** Se crea la instrucción de trabajo.

**2ª edición.** Se añade el apartado 4.5 Adquisición de espectros.

**3ª edición.** Se arregla el formato en el apartado 4.2.1. En el apartado de centrifugación 4.3.2 se añade el paso de tapar las bases de centrifuga, se incluyen fotos de las placas de centrifugado en la centrifuga y se corrige la temperatura de centrifugación. Se incluye el proceso de destapar las bases de centrifuga en el apartado 4.3.3.