

NUEVAS ALTERNATIVAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS: MÉTODOS ENZIMÁTICOS Y GENERACIÓN DE NANOMATERIALES

Isabel Sanz-Vicente^{1,2}, Carmen Jarne^{1,2}, Andrés Dominguez¹, Izarbe Barril¹, Javier Camacho¹, Susana de Marcos^{1,2}, Javier Galbán^{1,2}

¹Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, España

²Instituto de Nanomateriales de Aragón (INMA), Universidad de Zaragoza-CSIC, Zaragoza, España.

isasan@unizar.es, www.gba.unizar.es

Abstract

Los fosfolípidos presentan relevancia clínica y analítica. En el grupo de investigación estamos ensayando diferentes alternativas para la determinación de una de las subfamilias más interesantes, las fosfatidilcolinas (PCs):

1) Uso de la fluorescencia de las enzimas. La hidrólisis de PC libera colina determinada por los cambios de fluorescencia de la colina oxidasa (ChOx) durante su posterior reacción de oxidación. Los resultados obtenidos (LoD: $5,7 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹ y aplicación a plasma sanguíneo) permiten avanzar hacia biosensores más simples y eficientes para analizar el contenido global de PC en diagnóstico clínico y control alimentario.

2) La generación in-situ de nanopartículas de oro como método de análisis de PCs. Los resultados son la base de un método de detección cromatográfica alternativo a los cromóforos clásicos.

Mientras el método enzimático se dirige a un análisis global de la concentración de PC, la generación de nanomateriales permite diferenciar PC cuyas cadenas hidrocarbonadas presenten distintas insaturaciones.

1. Introducción

Los fosfolípidos se caracterizan por presentar una estructura anfipática, es decir, poseen una región hidrofílica y otra hidrofóbica.

Se clasifican en fosfoesfingolípidos y glicerofosfolípidos, según deriven de la esfingosina o del glicerol. Estos últimos se dividen en subfamilias siendo la más abundante la de fosfatidilcolinas (PCs). Su fórmula general se representa en Fig. 1

Como se aprecia, todas las PC contienen un grupo fosfato unido a colina y dos cadenas hidrocarbonadas (sn-1 y sn-2) cuya composición da lugar a los diferentes componentes de la subfamilia. Para diferenciarlas, la nomenclatura utilizada para describir cada PC tiene la forma PC(x:y/x:y), donde “x” indica el número de átomos de carbono y “y” el número de dobles enlaces en cada una de las cadenas de ácidos grasos.

Habitualmente, la cadena en posición sn-1 es un ácido graso saturado como el palmítico (16:0) o esteárico (18:0), mientras que en posición sn-2 suele encontrarse un ácido graso insaturado de 18 carbonos, como el oleico (18:1), linoleico (18:2) o linolénico (18:3) [1,2].

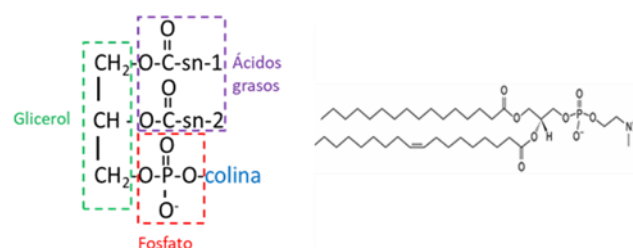


Fig. 1. Estructura de la PC en general y de la PC(16:0/18:1) en particular.

La PC tiene una importancia capital en el organismo. Además de ser un componente estructural de las membranas celulares, juega un rol fundamental en la digestión, pues es uno de los componentes fundamentales de la bilis, lo que le confiere un papel importante en la movilización de lípidos, evitando la acumulación de grasas en el sistema cardiovascular. También es necesaria para el sistema nervioso, al ser el precursor del neurotransmisor acetilcolina; una carencia de PC, se manifiesta en la aparición de problemas hepáticos, en el sistema nervioso y en el sistema cardiovascular [3]; en referencia a esto último, la relación entre los niveles de PC y de esfingomielina (SM) en plasma es un indicador de posibles enfermedades cardiovasculares [4,5].

En el ámbito de la seguridad alimentaria, la PC (al igual que el resto de los fosfolípidos) tienen un papel crucial en la calidad de los alimentos, especialmente los de origen animal. Desde el momento del sacrificio de los animales destinados al consumo, los fosfolípidos (al igual que otros componentes bioquímicos esenciales), comienzan a degradarse con una velocidad y mecanismos [6,7] que dependen de las condiciones de almacenamiento, la temperatura, la presencia de oxígeno, la preparación del envasado y, posteriormente, del modo de cocinado del alimento [8]. El resultado final

puede comprometer la seguridad y valor nutricional de los alimentos.

2. Métodos enzimáticos. Fluorescencia de la Colina Oxidasa.

Con el objeto de detectar de forma rápida la presencia de PC tanto en muestras de alimentos como biológicas, se

han desarrollado métodos enzimáticos, sobre todo electroquímicos [9] y ópticos, para la determinación de PC sin diferenciar entre los distintos isómeros. Estos últimos [10,11] se basan en un esquema en tres etapas (Fig. 2):

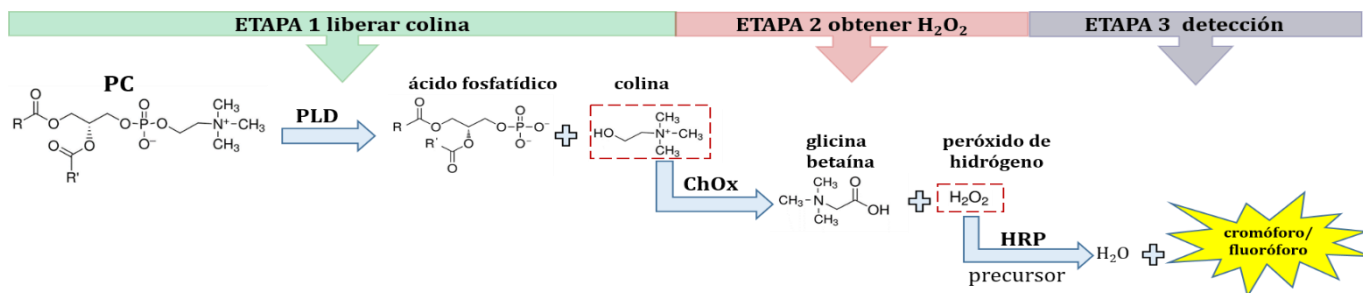


Fig. 2. Esquema simplificado (reacciones sin ajustar) de la determinación enzimática de fosfatidilcolina (PC). (PLD: fosfolipasa D, ChOx: colina oxidasa, HRP: peroxidasa de rábano picante).

- La primera etapa consiste en la liberación de colina mediante, por ejemplo, una fosfolipasa del tipo D (PLD) que cataliza una reacción de hidrólisis.
- En la etapa 2 la enzima colina oxidasa (ChOx) reacciona con la colina generada produciéndose peróxido de hidrógeno y glicina betaina.
- El último paso es un proceso redox que implica al peróxido de hidrógeno generado en la etapa anterior, catalizado por la enzima peroxidasa (HRP), y a otro producto cuya oxidación genera un cromóforo o fluoróforo, responsable de la señal analítica.

Estas metodologías suelen ser la base de métodos discontinuos o sensores monouso. Para que se puedan implementar en sistemas continuos o en sensores reversibles es necesario que la tercera etapa lo sea, lo que en la mayoría de los casos no ocurre. De esta necesidad surgió una de nuestras líneas de trabajo, cuyo objetivo es el desarrollo de métodos basados en el cambio que experimentan las propiedades de fluorescencia (intrínsecas o adquiridas), de alguna de las enzimas que participan en la reacción.

¿Qué propiedades son y por qué cambian?

Para responder a esta pregunta hay que tener en cuenta, por un lado, que la ChOx es una flavoenzima (contiene FAD como factor). Durante la reacción enzimática el FAD se reduce a FAD.H₂ y luego se regenera a su forma oxidada original. La Fig. 3 muestra como varía la concentración de ChOx con el FAD en forma reducida (representado como ChOx.H₂) durante la reacción para

tres concentraciones de colina crecientes ([Colina]_a < [Colina]_b < [Colina]_c); la línea de puntos indica la concentración total de enzima usada en la reacción.

Por otro lado, la ChOx presenta absorción (220 y 280 nm) y fluorescencia (340 nm) en el ultravioleta debido a los aminoácidos que contiene (fundamentalmente al triptófano), así como absorción (370 y 450 nm) y fluorescencia (520 nm) en el visible debidas al FAD. Sin embargo, cuando el FAD se encuentra en forma reducida su absorción es menor y su fluorescencia también. La Fig. 4 muestra el espectro de fluorescencia debido a los aminoácidos (ChOxAA), así como los espectros de absorción de la ChOx con el cofactor en forma oxidada (FAD) y reducida (FADH₂). Como se puede ver el espectro de emisión de los aminoácidos coincide con el espectro de absorción del cofactor por lo que se produce transferencia de energía de los aminoácidos al FAD.

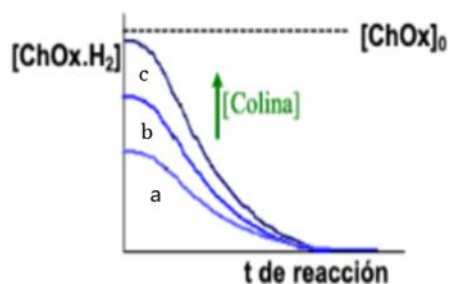


Fig. 3. Variación de la concentración de colina oxidasa en forma reducida (ChOx.H₂) a lo largo de la reacción

para tres concentraciones de colina.
 $[\text{Colina}]_a < [\text{Colina}]_b < [\text{Colina}]_c$.

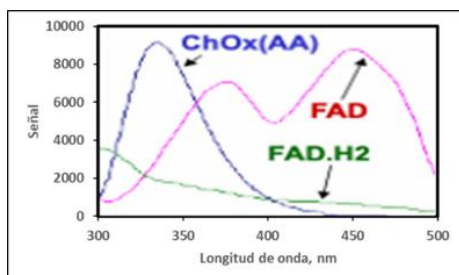


Fig. 4.- Espectro de fluorescencia de la colina oxidasa debido a los aminoácidos (ChOx(AA)) y espectros de absorción de la colina oxidasa cuando el FAD se encuentra en forma oxidada y reducida (FAD.H₂).

Cuando se inicia la reacción, el FAD pasa a su forma reducida, con lo que la transferencia de energía disminuye (al FAD.H₂ absorbe menos a 340 nm) y por tanto la fluorescencia de los aminoácidos aumenta, siguiendo una curva similar a la concentración de ChOx.H₂ existente. Mediante los cambios de fluorescencia de la enzima desarrollamos un método para la determinación de Colina [12]. Para ello, demostramos que la relación entre el área (S) de la curva del registro de fluorescencia obtenido (Fig. 5) se relaciona con la concentración de Colina según:

$$\frac{1}{S} = A + \frac{B}{[\text{Colina}]_0} \quad (1)$$

Donde A y B son constantes que tiene que ver con las propiedades de fluorescencia de la enzima y las constantes cinéticas del proceso enzimático. Cuando esta reacción se acopla con la de hidrólisis de la PC (Fig. 2, Etapa 1) las variaciones de fluorescencia observadas informan sobre la concentración de PC presente en el medio, siguiendo una ecuación similar a la (1) siempre que se trabaje con una concentración de fosfolipasa suficientemente alta. Un ejemplo de las señales obtenidas se muestra en (Fig. 5) en dónde se observa el aumento de fluorescencia observado después de añadir el analito.

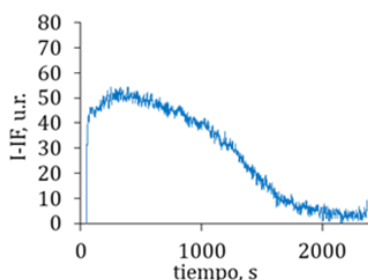


Fig. 5. Variación de fluorescencia. (pH=8, [Ca(II)]=80 mmol·L⁻¹, [PC]=1,3·10⁻⁴ mol·L⁻¹, % EtOH = 5 % (v/v), [ChOx]=1,6 U·mL⁻¹)

El estudio analítico ha supuesto un estudio exhaustivo de PLD de diferentes orígenes (*Arachis Hypogaea* (PLD_{AH}), *Streptomyces Chromofuscus* (PLD_{sc}) y *Streptomyces sp* (PLD_{sp})) con el objetivo de encontrar unas condiciones en las que se pueda determinar PC libre de interferencias, en particular de la esfingomielina (SM), un esfingolípido que también contiene colina. A lo largo del estudio se encontraron algunos resultados interesantes:

- La presencia del ion Ca²⁺ aumenta el rendimiento de la reacción de la fosfolipasa. Su concentración óptima es en torno a 40 mmol·L⁻¹
- Es necesaria la presencia de etanol en el medio para solubilizar la PC (mínimo 5% v/v).
- Los ya citados estudios de selectividad para la determinación de PC en presencia de SM, que se consigue usando la enzima PLD_{sp} (pH=8). Con ella se consigue mayor sensibilidad y rango lineal, lo que la hace la más recomendable para la determinación de PC en presencia de SM.

En las mejores condiciones encontradas (pH=8, [PLD_{sp}]= 80 U·mL⁻¹, [ChOx]= 3.2 U·mL⁻¹, [Ca²⁺]=40 mmol·L⁻¹, 5% etanol (v/v) el rango lineal llega hasta una concentración 2,4·10⁻⁴ mol·L⁻¹, con un límite de cuantificación (10_{Sblanco} dividida entre la pendiente de la recta de calibrado) de 1,9·10⁻⁵ mol·L⁻¹.

Después de todo este estudio, el método se aplicó a muestras de plasma sanguíneo (contienen PC y SM) siendo necesario realizar una extracción en diclorometano/metanol y calibración por adición estándar obteniendo concentraciones de PC de 2,6·10⁻³ ± 1,3·10⁻⁴ mol·L⁻¹ (Data-Trol NTM) similares a las encontradas en otros trabajos [13].

3. Generación de Nanomateriales.

Hace unos años, nuestro grupo de investigación inició una línea cuyo objetivo era estudiar las posibilidades que ofrece la generación in situ de nanopartículas (NP) durante la reacción enzimática [14-16].

Se han obtenido muy buenos resultados con nanopartículas de oro (AuNP) a partir de Au(III) en reacciones con enzimas oxidasas (tiramina oxidasa, glucosa oxidasa, etc.). Dichas AuNP presentan una banda de absorción observable en el visible con un máximo sobre 550 nm (aunque se desplaza y se ensancha dependiendo del tamaño de la nanopartícula).

Una opción que nos planteamos para determinar los fosfolípidos sería utilizar esta alternativa, realizar la reacción enzimática anterior en presencia de Au(III) y

mezclas con Pt(II) y Pd (II) (que mejoran sus propiedades de absorción).

Los primeros estudios llevados a cabo se han centrado en la interacción de la PC con Au (III) ya que los fosfolípidos también pueden actuar como reductores de Au(III). Además, el grupo polar de la cabeza del fosfolípido (compuesto por el grupo colina y el grupo fosfato) contribuiría a estabilizar las nanopartículas formadas.

Se trabajó con tres PCs, todas con cadenas de 18 átomos de carbono, pero con diferente grado de insaturación: PC (18:0/18:0), (18:0/18:1) y PC (18:1/18:1) observando que las AuNP se formaban y que cuanto mayor era el grado de insaturación de las fosfatidilcolinas, más rápida era la reducción del Au (III) y la formación de las AuNPs que daban lugar a disoluciones coloreadas. En la Fig. 6 se muestra un ejemplo del espectro de las nanopartículas formadas.

En las condiciones óptimas encontradas ($[Au(III)] = 1$ mM, tampón fosfato a pH 7 y fuerza iónica de 0,1 M, 45 °C) se obtuvieron curvas de calibración con buena linealidad en el intervalo 0,011–0,10 mM.

Uno de los inconvenientes de esta aplicación en concreto es que se necesita mucho tiempo para completarla (alrededor de 6 horas) por lo que se está trabajando en alternativas para acelerarlas. Por ahora hemos probado técnicas como ultrasonidos, baños a alta temperatura o microondas, obteniéndose tiempos de reacción más cortos (90 minutos) y mayores señales de absorbancia. No obstante, estos métodos deben seguir evaluándose para mejorar el control experimental.

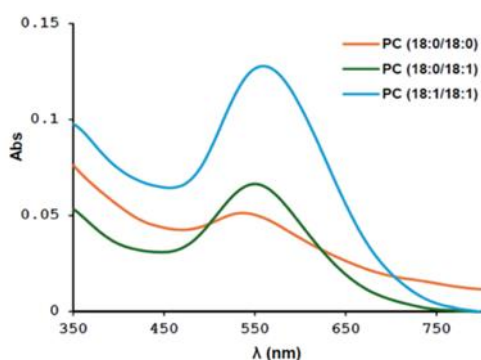


Fig. 6. Señales de absorbancia obtenidas con una concentración de Au (III) 1mM, tampón fosfatos 0,1M y pH 7 (6 horas de reacción).

4. Conclusiones y estudios futuros

De los resultados mostrados con el trabajo realizado con ChOx se desprende que el uso de la fluorescencia de la enzima proporciona una herramienta interesante para la determinación de PC que, además, puede ampliarse a

otros glicerofosfolípidos modificando la reacción enzimática de la segunda etapa. Se abren, desde aquí, diversas líneas de investigación que podrían contribuir a optimizar y ampliar las aplicaciones del método desarrollado. Una de las principales propuestas consiste en marcar covalentemente la colina oxidasa con fluoróforos específicos que emitan en el rango visible, lo que permitiría mejorar la sensibilidad y facilitar la detección óptica, especialmente en sistemas portátiles o de bajo coste. Asimismo, la inmovilización de las enzimas en soportes sólidos es una estrategia prometedora para la construcción de sensores reutilizables, robustos y compatibles con dispositivos miniaturizados para análisis in situ. Para ello se seguirán protocolos ya propuestas por el grupo para el análisis de otros compuestos como glucosa [17], que se indica en la Fig. 7. La enzima se incorpora en poliacrilamida (A) y se introduce en un sistema de inyección en flujo diseñado para ello (B); con él se obtienen señales transitorias proporcionales a la concentración de analito (C).

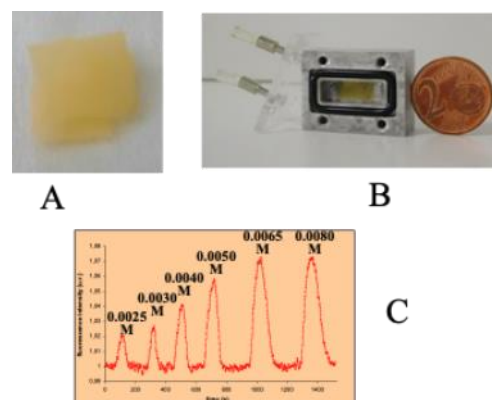


Fig. 7. Ejemplo de un sensor para glucosa previamente desarrollado: A) Lámina sensora de poliacrilamida con glucosa oxidasa. B) Dispositivo de inyección en flujo. C) Señales transitorias de glucosa obtenidas.

En cuanto a la capacidad de los PC para generar AuNPs, una de las aplicaciones que se están desarrollando es como agente revelador en cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Se han desarrollado muchos métodos cromatográficos para la determinación de fosfolípidos como TLC [18], HPLC [19], MALDI-TOF-MS [20] o LC- MS/MS [21], y aunque esta metodología no podría competir con algunas de las presentadas en los métodos citados, sí que permitiría diferenciar PCs con distintos grados de insaturación, aportando un valor añadido a las determinaciones por TLC y HPTLC. En este sentido, es interesante profundizar en el estudio del mecanismo de reducción de Au(III) por los distintos fosfolípidos, así como optimizar las condiciones experimentales para acelerar la formación de las AuNPs.

Agradecimientos

Esta publicación es parte del proyecto PID2022-139235OB-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER (Una manera de hacer Europa).

Referencias

- [1] R.E. Wuthier, Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 409 (1975) 128-143. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(75\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(75)90087-9).
- [2] T.M. Devlin, *Bioquímica*, libro de texto con aplicaciones clínicas, Editorial Reverté S.A., 2004.
- [3] D. Magaquian, S. Delgado Ocaña, C. Perez, C. Banchio, Phosphatidylcholine restores neuronal plasticity of neural stem cells under inflammatory stress, *Sci. Rep.* 11 (2021) 22891. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02361-5>.
- [4] M.R. Hojjati, Z. Li, H. Zhou, S. Tang, C. Huan, Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10284–10289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412348200>.
- [5] T.S. Park, R.L. Panek, S.B. Mueller, J.C. Hanselman, W.S. Rosebury, A.W. Robertson, E.K. Kindt, Inhibition of sphingomyelin synthesis reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice, *Circulation* 110 (2004) 3465-3471. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148370.60535.2>
- [6] R. Domínguez, M. Pateiro, M. Gagaoua, F. J. Barba, W. Zhang, J. M. A Lorenzo, Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products, *Antioxidants* 8 (2019) 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>.
- [7] Y. Tan, X. Sum, H. Hou, A. A. Debrah, M. Woy, F. Zhang, Z. Du, Investigation of and Multivariate Data Analysis, *Food Chem.* 364 (2021) 130414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130414>.
- [8] W. Jia, R. Liu, X. M. Wang, L. Li, S. Liu, L. Sun, Molecular Mechanism of Lipid Transformation in Cold Chain Storage of Tan Sheep, *Food Chem.* 347 (2021) 129007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129007>.
- [9] J.Y. Qu, P. Wang, Y.W. Wang, Z.Y. Li, F.M. Yang, C.P. Han, L.Q. Wang, D.Y. Yu, Determination of phospholipids in soybean oil using a phospholipase-choline oxidase biosensor based on g-C₃N₄-TiO₂ nanocomposite material. *J. Food Compos. Anal.* 124 (2023) 10517. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105717>.
- [10] H. Hidaka, K. Yamauchi, H. Ohta, T. Akamatsu, T. Honda, T. Katsuyama, Specific, rapid, and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in serum and lipid extracts, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 1211-1217. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.06.010>.
- [11] M.R. Hojjati, X.C. Jiang, Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 673-676. <https://doi.org/10.1194/jlr.D500040-JLR200>.
- [12] J. Galbán, O. Sánchez-Monreal, Y. Andreu, S. de Marcos, J.R. Castillo. Choline determination based on the intrinsic and the extrinsic (chemically modified) fluorescence of choline oxidase, *Anal Biochem.* 334 (2004) 207. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.015>.
- [13] O. Quehenberger, A.M. Armando, A.H. Brown, S.B. Milne, D.S. Myers, A.H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K.N. Jones, and S. Kelly, Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3299-3305. <https://doi.org/10.1194/jlr.M009449>.
- [14] J. Camacho-Aguayo, S. de Marcos, V. Mora-Sanz, J. Galbán, Selective generation of gold nanostructures mediated by flavo-enzymes to develop optical biosensors, *Biosens Bioelectron* 215 (2022) 114579. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114579>.
- [15] J. Camacho-Aguayo, S. de Marcos, C. Felices, J. Galbán, In situ enzymatic generation of Au/Pt nanoparticles as an analytical photometric system: proof of concept determination of tyramine, *Microchim. Acta* 190(4) (2023) 114. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05698-y>.
- [16] S. de Marcos, I. Sanz-Vicente, A. López-Molinero, J. Camacho-Aguayo, M. Domínguez, P. Cebrián, J. Navarro, A. Martín-Barreiro, J. Galbán, Biosensores enzimáticos basados en la generación in-situ de nanomateriales de oro: una alternativa a los métodos enzimáticos ópticos clásicos. *Actualidad Analítica* 75 (2021) 35-38. <https://seqa.es/actualidad-analitica-2021/actuanali-septiembre2021/>.
- [17] J. Galbán, I. Sanz-Vicente, E. Ortega, M. del Barrio, S. de Marcos, Reagentless fluorescent biosensors based on porphyrins for continuous monitoring systems, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3039-3054. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5715-2>.
- [18] G. Tan, Y. Tian, M. Addy, Y. Cheng, Q. Xie, B. Zhang, Y. Liu, P. Chen, R. Ruan, Structural analysis of phosphatidylcholine using a thin layer chromatography-

based method, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 119 (2017) 1600282. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600282>.

[19] O. Berdeaux, P. Juaneda, L. Martine, S. Cabaret, L. Bretilon, N. Acar, Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 7738–7748.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.039>.

[20] A. Rees, Z. Edwards-I-Coll, O. Richards, M.E. Raikes, R. Angelini, C.A. Thornton, The dynamic inflammatory profile of pregnancy can be monitored using a novel lipid-based mass spectrometry technique. Mol. Omics, 19 (2023) 340-350. <https://doi.org/10.1039/D2MO00294A>.

[21] K.M. Rund, L. Carpanedo, R. Lauterbach, et al. LC-ESI-HRMS - lipidomics of phospholipids. Anal. Bioanal. Chem. 416 (2024) 925–944. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-05080-0>.