



Application Note/Nota de Aplicación

Optimización de una metodología de extracción de hidrocarburos cuticulares (CHCs) en mosca, *Drosophila melanogaster*.

Luis Bartolomé*

*Servicio Central de Analisis de Bizkaia (SCAB). Servicios Generales de Investigación (SGIker), UPV/EHU.

10 ABSTRACT

Insect cuticular hydrocarbons (CHCs) prevent desiccation and serve as chemical signals that mediate social interactions. Drosophila melanogaster CHCs have been studied extensively, but an optimization process for extraction step has not been still developed. Two easy processes were selected for this extraction study: ultrasound sonication and orbital agitator. Time was the parameter optimized. The optimal concentration for IS used and the suitability of a evaporation step were also parameters studied. The best extraction method was the s/l extraction by means agitation during 15 min. Evaporation step could be a good way to improve the identification of more CHCs.

RESUMEN

Los hidrocarburos cuticulares son compuestos que previenen la desecación de los insectos y sirven simultaneamente como señales químicas en sus interacciones sociales. Los CHCs de la mosca Drosophila melanogaster han sido ampliamente estudiados pero aún todavía no ha sido desarrollada una optimización para su proceso de extracción. Fueron elegidos dos procesos sencillos para este paso de la extracción: Sonicación en baño de ultrasonidos y agitación orbital. En ambos fue optimizado el tiempo. La concentración óptima de estandar interno a añadir y la idoneidad de un proceso de evaporación fueron parametros estudiados también. El mejor método de extracción fue la extracción S/L mediante la agitación orbital durante 15 min. El paso de evaporar los extractos fue una buena herramienta para mejorar la identificación de más CHCs.

30 1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos cuticulares (CHC) se ha demostrado que tienen características importantes para diversas funciones en insectos y han sido estudiados extensamente para sus papeles en el reconocimiento de la especie y la ecología [1]. Especialmente interesantes han sido los estudios de este tipo de compuestos, en el papel de la señalización sexual para la *Drosophila*. Para el caso concreto de la *Drosophila melanogaster* se ha descrito bien la biosíntesis, la regulación genética y la especificidad sexual de la expresión de CHC. Se ha llevado a cabo mucho trabajo describiendo el papel de los CHC en el reconocimiento del sexo [2] y la base genética del aislamiento sexual mediado por CHC entre subgrupo de especies estrechamente relacionadas [3] y entre intra-específicos de razas de *D. melanogaster* [4]. Ahora mismo además del conocimiento en si mismo a nivel de evolución de este tipo de especies, el estudio de esta clase de hidrocarburos CHC está teniendo mucha

importancia por su demostrada influencia en la comunicación entre individuos para su procreación, alimentación y desarrollo además de su influencia en procesos de mutación y adaptación al medio [5]. En los últimos años este conocimiento ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de nuevas metodologías para el control de plagas en agricultura y en explotaciones forestales con menor impacto [6]. Hasta el momento, aun habiendo una gran cantidad de estudios en los que se lleva a cabo la determinación de estos CHC en *Drosophila melanogaster* o en otro tipo de insectos [6], no ha habido un proceso de optimización de los parámetros de extracción. El objetivo de este trabajo será realizar un proceso de optimización de distintos parámetros básicos de extracción mediante dos técnicas sencillas y habituales de uso en los laboratorios; extracción S/L bajo agitación y extracción S/L bajo sonicación. Se optimizarán algunos de los parámetros más importantes tales como el volumen de disolvente o el tiempo de extracción.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Muestreo y tratamiento.

Se realizó un muestreo intentando obtener individuos lo más parecidos posibles para obtener un *batch* de muestras relativamente homogéneo, necesario para hacer un proceso de optimización. Se seleccionaron 12 individuos machos de la misma isolinea (1) y se colocaron en 4 viales de cromatografía (3 en cada vial). Por otra parte se tomaron otros 12 individuos machos de otra isolinea (2) y se depositaron en 4 viales de cromatografía diferentes. Además, se muestrearon otros 3 individuos hembra de cada isolinea. Por lo tanto en el muestreo tenemos 5 viales de cada isolinea (4 de machos y uno de hembras) y en cada vial tres individuos de *Drosophila melanogaster*. Todo este proceso de muestreo y selección de individuos se realizó desde el grupo de Ecología, Etología y Evolución del Instituto Cavanilles de la Universidad de Valencia. En la imagen se pueden observar algunos de los viales en los que se almacenaron las moscas.

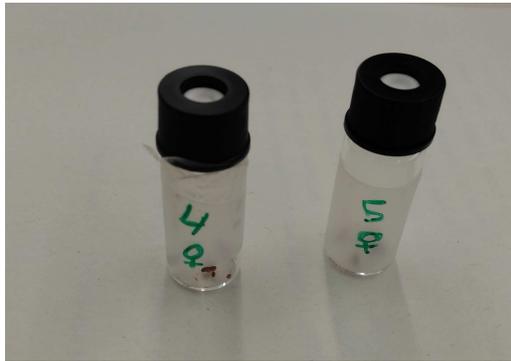


Figura 1. Viales de almacenamiento de las diferentes muestras de *Drosophila melanogaster*.

Para todos los procesos de extracción estudiados se utilizó n-hexano (Scharlab, Barcelona). La extracción bajo sonicación se realizó en un baño ultrasónicos (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) mientras que para la agitación se usó un agitador orbital (Reax 2, Heidolph, Germany).

2.2. Procedimiento Experimental

2.2.1. Proceso de extracción.

Se optimizó el proceso de extracción de los hidrocarburos cuticulares en las moscas. Para ello se llevaron a cabo dos procesos de extracción diferentes: sonicación (muestras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4) y agitación (5.1, 5.2, 5.3, 5.4). El parámetro que se varió para cada uno de ellos fue el tiempo de extracción (t_1 : 5 min para las muestras 1 y 2 de cada lote y t_2 : 15 min para las muestras 3 y 4 de cada lote). La velocidad de agitación fue constante (nivel 4 rpm).

Las extracciones se realizaron en todos los casos con 100 microlitros de n-hexano al que previamente se le había añadido el estándar interno (n-docosane D66) en una concentración aproximada de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se midieron también dos muestras blanco, una por cada modo de extracción (blanco 4-sonicación, blanco 5-agitación). Por último también se midió una muestra en la que sólo se incorporó el extractante con el IS para poder calcular el % de recuperación de las dos metodologías.

2.2.2. Análisis mediante GC/MS.

Una vez realizada la extracción, los extractos fueron separados de las moscas mediante una pipeta Pasteur y trasladadas a un vial de inyección con inserto. En la siguiente tabla se pueden observar los parámetros seleccionados para el análisis GC/MS.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos de los análisis realizados

Cromatógrafo de gases (GC)
Inyección: Líquida
Modo de inyección: splitless
Temperatura de inyección: 270° C
Temperatura de línea de transferencia: 325° C
Columna cromatográfica: HP 5 (30 mx25 mmx0.25 μm)
Gas portador: Helio 1.4 mL min^{-1}
Rampa de temperaturas:
T inicial: 50° C
de 50° C a 150° C a 20° C min^{-1}
de 150° C a 330° C a 320° C min^{-1}
T final: 330° C. durante 10 min
Detector de masas (MS)
Modo SCAN (40-400 m/z)

2.2.3. Tratamiento de datos.

Tras la medida de las muestras, los compuestos encontrados fueron contrastados e identificados con la librería de espectros NIST 11. Para ello, se sustrajo la línea base de los cromatogramas. Para comparar la concentración de compuestos extraídos se tuvo en cuenta el análisis semicuantitativo de las áreas integradas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Proceso de extracción: Agitación vs Sonicación

Uno de los primeros objetivos era saber cuál de las dos formas de extracción seleccionadas obtenía un mayor número de compuestos CHCs. Como se puede observar en la figura 2 el número de compuestos obtenidos mediante las dos formas de extracción fue la misma (14). Comparando con publicaciones anteriores, son bastantes menos de los habituales.

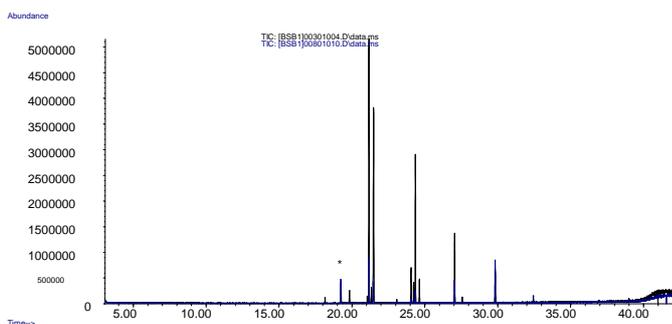


Figura 2. Cromatogramas en modo SCAN superpuestos de una de las muestras correspondiente a la extracción por agitación (5.1) en negro y otra muestra extraída mediante sonicación (4.1) en azul. * Estándar interno (IS).

En esta misma figura se puede observar como la intensidad de los compuestos detectados es mayor en el proceso de extracción mediante agitación orbital (5.1-5.4) que mediante sonicación (4.1- 4.4).

Estudiando la reproducibilidad de las metodologías también se observó cómo, en el caso de la agitación, los resultados eran más homogéneos que para el caso de la extracción mediante ultrasonidos. En la siguiente figura se pueden observar los cromatogramas superpuestos de las dos muestras analizadas mediante ultrasonidos a 5 minutos (4.1 y 4.2). Como se puede observar, las diferencias entre los dos cromatogramas son muy evidentes con una alta desviación asociada (RSD alto).

Comparando las dos figuras resalta de nuevo lo anteriormente comentado sobre la intensidad de las señales detectadas. En el caso de la extracción mediante agitación el área de los compuestos mayoritarios llega a 5000000 de cuentas mientras que en el caso de la sonicación está alrededor de 1500000 de cuentas.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se recomienda hacer la extracción mediante agitación frente a la extracción con ultrasonidos.

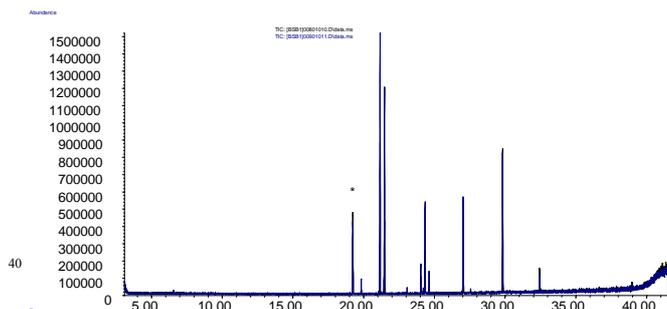


Figura 3. Cromatogramas en modo SCAN superpuestos de dos de las muestras correspondientes a la extracción por ultrasonidos (4.1 y 4.2). *Estándar interno (IS).

3.2. Tiempo de extracción

Para el caso del tiempo de extracción se compararon los resultados obtenidos a 5 min y a 15 min. En el siguiente gráfico se pueden observar las áreas bajo cada una de las señales detectadas e identificadas como hidrocarburos. Todas las señales están normalizadas frente al área del IS (estándar interno). Se puede observar que en la mayoría de los compuestos no existen diferencias significativas entre las áreas excepto para el caso de los compuestos mayoritarios. Por esa razón, y no influyendo de forma grave en la rapidez del proceso, se opta por 15 minutos de extracción.

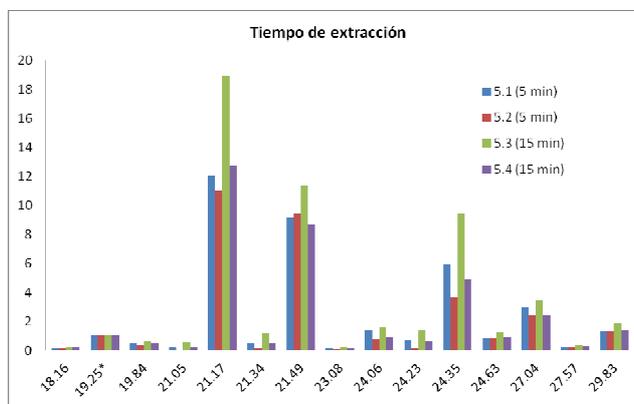


Figura 4. Áreas corregidas (A_i/A_{IS}) para los compuestos detectados e identificados como hidrocarburos. Muestras extraídas mediante agitación a dos tiempos diferentes (5 min y 15 min).

Para el caso de la extracción de ultrasonidos se observaron diferencias significativas entre cada una de las muestras extraídas en el mismo tiempo y entre las muestras extraídas en distintos tiempos, por lo que no se consideró una buena técnica para extraer los CHCs.

3.3. Especificidad y Recuperación

Por último, fue chequeada la selectividad y la especificidad de la metodología. Para ello, se chequearon los blancos analizados observándose que no había ningún problema de solapamiento con ninguno de los compuestos extraídos. Como se puede comprobar en la siguiente figura, en los cromatogramas de las muestras blanco sólo se observó una única señal perteneciente al estándar interno (IS).

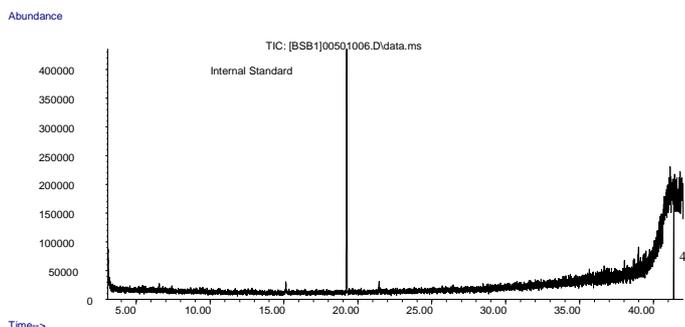


Figura 5. Cromatograma en modo SCAN de uno de los blancos (blanco 5 agitación).

Además, fue chequeada también la recuperación de las metodologías propuestas mediante comparación de las áreas del estándar interno. Ambas metodologías mostraron una recuperación mayor del 99%.

3.4. Proceso de evaporación. Sensibilidad.

Una vez inyectados los extractos se evaporaron y se reconstituyeron en 20 μ L de n-hexano dopado con la misma cantidad de IS. Comparando los resultados obtenidos teniendo en cuenta la cantidad de CHCs, se pudo observar como el número de hidrocarburos encontrados en las mismas muestras (5.1 y 5.3) fue multiplicado por tres pasando de los 14 iniciales a 57. De la misma manera la abundancia de las señales para cada uno de los 14 hidrocarburos detectados previamente aumentaron considerablemente. En el material suplementario del Excel adjunto (CHC2.xls) se pueden ver los compuestos identificados. En la siguiente figura (Figura 6), se puede observar el cromatograma perteneciente a la muestra (5.1) después del proceso de evaporación. Si se compara con el cromatograma de la figura 2 (Muestra 5.1 sin evaporar), se puede observar perfectamente cómo se aprecia un mayor número de señales cromatográficas y que, estas tienen un área mucho mayor que en la muestra sin evaporar. Destacar también, que el aumento de la mayor parte de las señales

cromatográficas se corresponden a CHCs de menor número de carbonos ($<C:20$). A su vez las señales de los compuestos determinados antes también aumentaron.

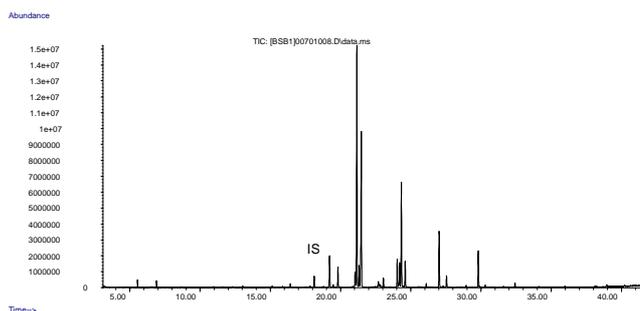


Figura 6. Cromatograma en modo SCAN de la muestra 5.1 después del proceso de evaporación.

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una metodología de extracción para los CHCs en mosca *Drosophila melanogaster*. Se ha concluido que el método de agitación es más reproducible que el de sonicación. Además, se ha visto que aunque no hay diferencias importantes en la capacidad de extracción entre 5 y 15 minutos, sí que se observaron algunas diferencias significativas en algunos hidrocarburos mayoritarios. Por esta razón, y viendo que el aumento de tiempo no hipotecaba mucho la viabilidad de la metodología, se eligió 15 minutos como tiempo óptimo de extracción. Se observó como la elección del IS (n-docosane d66) fue correcta y las recuperaciones completas ($>99\%$). No se observaron interferencias importantes en los blancos de método estudiados. Para finalizar se constató como la sensibilidad de la metodología aumentó considerablemente si se añadía el paso de evaporación de extractos. Será conveniente sopesar los beneficios/inconvenientes de incorporar un paso más en el método global.

Finalmente el método optimizado se aplicará a 150 muestras reales observando diferencias evidentes en el perfil cromatográfico. La identificación de los CHCs requiere de mejoras importantes en trabajos futuros.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Tillman, J. A., S. J. Seybold, R.A. Jurenka and G. J. Blomquist, (1999) Insect pheromones: an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 481–514.
- [2] Savarit, F., and J. F. Ferveur, (2002) Temperature affects the togeny of sexually dimorphic cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 205, 3241–3249.
- [3] Coyne, J. A., (1996) Genetics of differences in pheromonal hydrocarbons between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics* 143, 353–364.

-
- [4] Fang, S., A. Takahashi and C.-I Wu, (2002) A mutation in the promoter of desaturase 2 is correlated with sexual isolation between *Drosophila* behavioral races. *Genetics* 162, 781–784.
- [5] Fumey, J., Wicker-Thomas., C., (2017) Mutations at the Darkener of Apricot locus modulate pheromone production and sex behavior in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 98, 182–187.
- [6] Sutton, P.A., Wilde, M.J., Martin, S.J., Cvacka. J., Vrkoslav, V., Rowland, S.J., (2013) Studies of long chain lipids in insects by high temperature gas chromatography and high temperature gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1297, 236–240.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la revisión por parte de la investigadora B. Uribe. El autor agradece el apoyo tecnologico de los SGIker de la UPV/EHU y la financiación europea (FEDER y FSE) y especialmente al Dr. R. García-Roa y a los investigadores involucrados en el muestreo y selección de las muestras del Instituto Cavanilles de la Universidad de Valencia.