

## **Identificación de Ácidos Grasos de Cadena Corta, Neonicotinoides y Metabolitos Biomarcadores En Muestras Coprológicas, Calostro y Meconio por Cromatografía de Alta Presión (HPLC) y Espectrometría de Masas de Resonancia Magnética (MRMS).**

### Contenido

1. Antecedentes .....	2
1.1 La relación del microbiota intestinal y los ácidos grasos de cadena corta .....	2
1.2 Metodologías analíticas normalmente utilizadas en la cuantificación de AGCC ...	2
1.3 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia en el análisis de muestras biológicas	3
1.4 Metodologías de análisis de LC-MS para muestras de Copro .....	4
2. Confirmación por firma isotópica de neonicotinoides .....	5
2.1 Lista de neonicotinoides .....	5
2.2 Neonicotinoides identificados .....	6
3. Análisis PCA de las ionizaciones .....	8
4. Lista de metabolitos identificados .....	11
5. Diagrama metodológico de muestras y datos .....	20
5.1 Protocolo para la extracción de los AGCC por SPE .....	20
5.2 Protocolo para inyección directa al equipo SOLARIX .....	20
5.3 Diagrama de flujo .....	21
5.4 Análisis de datos .....	22
6. Resultados de AGCC .....	23
Bibliografía: .....	40

## 1. Antecedentes

### 1.1 La relación del microbiota intestinal y los ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son productos finales que se generan de la fermentación de carbohidratos no digeribles disponibles para el microbiota intestinal. Estos se producen principalmente de una fermentación sacarolítica de carbohidratos que escapan a la digestión y absorción en el intestino delgado. (J. Morrison & Preston, 2016)

Los principales productos son formiatos, acetatos, propionatos y butiratos. El lactato también se produce a partir de carbohidratos no digeribles seleccionados. También se producen en menor cantidad ácidos grasos de cadena ramificada fermentando aminoácidos de cadena ramificada derivados de proteínas.

Los AGCC, el butirato en particular es importante para mantener el epitelio colonico, es utilizado por los coloncitos como combustible sin embargo parece que desempeña un doble papel proliferando coloncitos sanos denominado paradoja de butirato. Los AGCC desempeñan un papel importante en la regulación de la integridad de la barrera epitelial regulando coordinadamente proteínas de unión estrecha regulando así la carretera molecular intracelular entre el sistema de portal de luz y hepático.

La mayor permeabilidad que se le asocia a los AGCC es la translocación de bacterias y componentes de pared celular que desencadenan una cascada inflamatoria que a su vez se asocia con la obesidad y la resistencia a la insulina.

Gracias a experimentos con ratas se ha demostrado que de los AGCC producidos en el colon, el butirato es el regulador más importante de proteínas de unión estrecha y mejora la barrera intestinal, disminuye la translocación de lipopolisacáridos bacterianos lo que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y reduce el riesgo de lesión hepática.

Se necesita más trabajo en humanos para determinar que los AGCC son importantes para el mantenimiento e integridad de la mucosa intestinal.

### 1.2 Metodologías analíticas normalmente utilizadas en la cuantificación de AGCC

Para la determinación de AGCC normalmente se utilizan las técnicas de HPLC y cromatografía de gases sin embargo el tratamiento que se les da a las muestras suele ser diferente. Por ejemplo:

Derivatización química marcado con isótopos, en el que, para desarrollar un nuevo método LC-MS/MS en muestras fecales humanas se emplea 3-nitrofenilhidrazina (3NPH) para la derivatización preanalítica para convertir diez  $C_2$ –  $C_6$  SCFA a sus 3-nitrofenilhidrazonas bajo un solo conjunto de condiciones de reacción optimizadas y sin la necesidad de enfriamiento de reacción, cuyos respectivos derivados muestran una gran estabilidad química teniéndolos en solución y separándolos en una fase inversa  $C_{18}$  en columna y se cuantifican por ionización de electrospray de iones negativos. (Han et al., 2015)

Cuantificación simultánea de ácidos grasos de cadena corta de cadena lineal y ramificada por cromatografía de gases espectrometría de masas, donde se usa bromuro de pentafluorobencil (PFBBR) como reactivo de derivatización y se optimizan las condiciones para la derivatización usando una mezcla con 8 estándares, 5 AGCC de cadena recta y 3 con cadena ramificada, realizando la derivatización en 90 min a  $60^{\circ}C$  y pH 7. Comparando el rendimiento de diferentes Columnas de  $GC_3)_2CO$ :  $H_2O$  relación 2: 1 Las configuraciones, un DB-225ms de 30 m con guiones con una columna DB-5ms de 30 m en conjunto mostraron la mejor separación de los AGCC y estas condiciones sirvieron para detectar simultáneamente los AGCC con un límite de detección de 0.244-0.977  $\mu M$ . (He et al., 2018)

Además de estos también se tienen métodos como la cromatografía en capa fina el cual se recomienda como un método complementario a la cromatografía gas-líquido sobre todo si se sabe que la mezcla a analizar pueda contener ácidos de cadena ramificada o ácidos hidroxilados así como cuando se desea examinar por separado los ácidos grasos saturados e insaturados. (R & H. K, 1961)

### 1.3 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia en el análisis de muestras biológicas

Esta técnica nos permite analizar un mayor número de muestras en menor tiempo sin comprometer la resolución ni la eficiencia de la separación, tratándose de muestras no volátiles o termolábiles. (BARTOLOMÉ JIMENO, 2015)

Para este tipo de muestras normalmente se trabaja con métodos en fase reversa, siendo la fase estacionaria de carácter apolar ( $C_8$ ,  $C_{18}$ , etc.) y la fase móvil de carácter polar (agua, acetonitrilo, metanol, isopropanol, etc.).

Hay tres enfoques principales de métodos para HPLC que permiten obtener un análisis más rápido:

- Cromatografía líquida a altas temperaturas: Acorta la separación y el tiempo de análisis, mejorando la eficiencia de la columna, minimizando el uso de

disolventes orgánicos, genera una compatibilidad de las columnas más largas con tamaño de partícula más pequeñas.

- Columnas monolíticas: Aceptan caudales elevados ocupando longitudes de columnas tradicionales si generar altas presiones, además de que requieren poco tiempo para que la columna se equilibre si se utiliza un método gradiente.
- Cromatografía líquida a ultra alta presión: Se pueden ocupar columnas cortas y tamaño de partícula muy reducido en la fase estacionaria.

#### 1.4 Metodologías de análisis de LC-MS para muestras de Copro

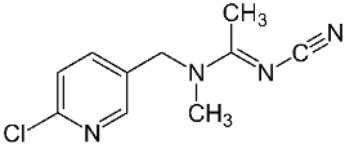
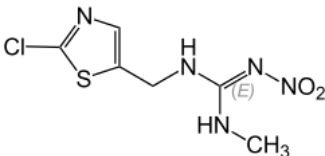
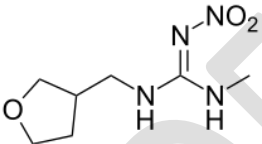

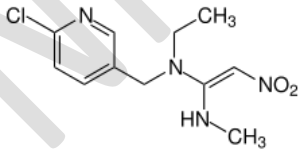
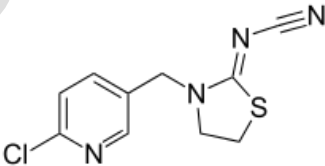
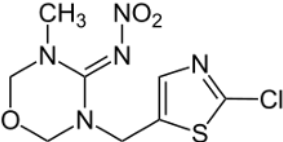
Las heces húmedas de bebés prematuros se homogenizaron utilizando una espátula, después se pesaron 40 mg aproximadamente de cada muestra en microtubos de reacción de 2 mL. Posteriormente se dejan secar durante 24 horas en un concentrador de vacío. Posteriormente se les añade 40 µL de agua desionizada y se somete a agitación en vórtex durante 1 minuto. Al finalizar la agitación se les agregan 160 µL del disolvente de extracción (ACN/MeOH/HAc 49.5/49.5/1, v/v/v), seguido de sonicación en un baño de hielo durante 15 minutos.

Las muestras se almacenan durante una noche en un congelador a una temperatura de -20°C para precipitar las proteínas. Al día siguiente las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 18,000 rpm. El sobrenadante obtenido se diluye 1:10 con una mezcla de agua y HAc al 0.1%. Finalmente, las muestras diluidas se filtran mediante una membrana PTFE de 0.20 µm.

El factor de dilución total es de 1:100. Las muestras filtradas se transfieren a viales ámbar con micro insertos para inyectar un volumen de 5 µL al sistema LC-MS/MS. (Krausová et al., 2022)

## 2. Confirmación por firma isotópica de neonicotinoides

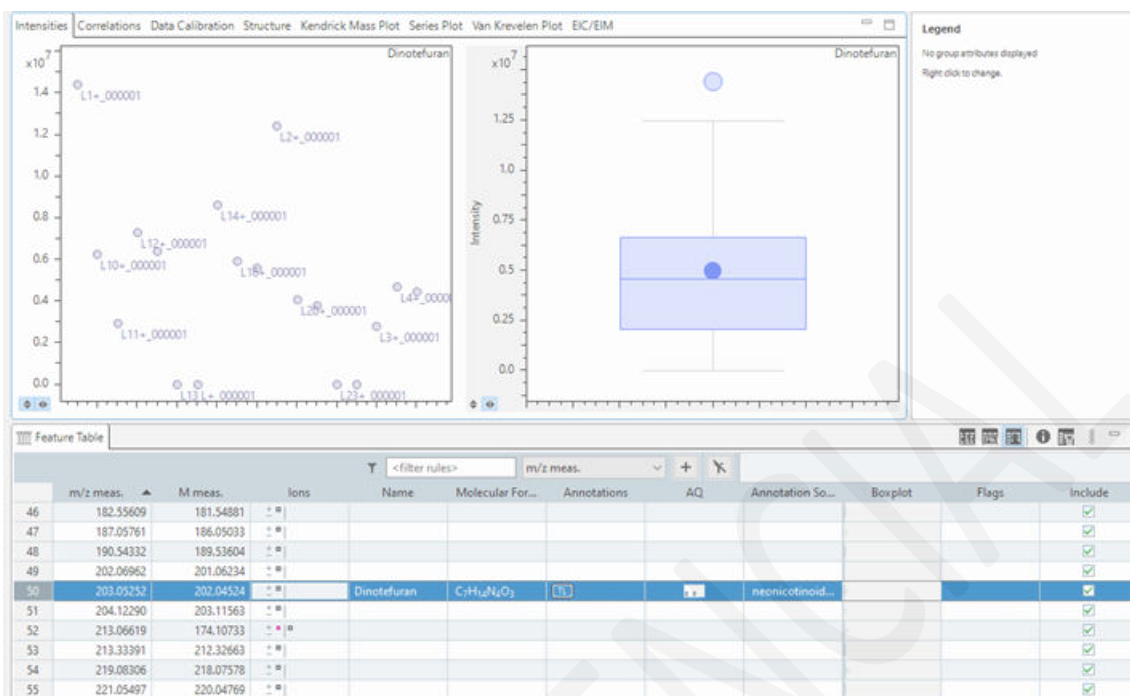
### 2.1 Lista de neonicotinoides

Nombre	Estructura	Fórmula	Masa molecular (g/mol)
Acetamiprid		$C_{10}H_{11}ClN_4$	222.67
Clotianidina		$C_6H_8ClN_5O_2S$	249.68
Dinotefuran		$C_7H_{14}N_4O_3$	202.21
Imidacloprid		$C_9H_{10}ClN_5O_2$	255.66
Nitenpiram		$C_{11}H_{15}ClN_4O_2$	270.72
Tiacloprid		$C_{10}H_9ClN_4S$	252.72
Tiametoxam		$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	291.72

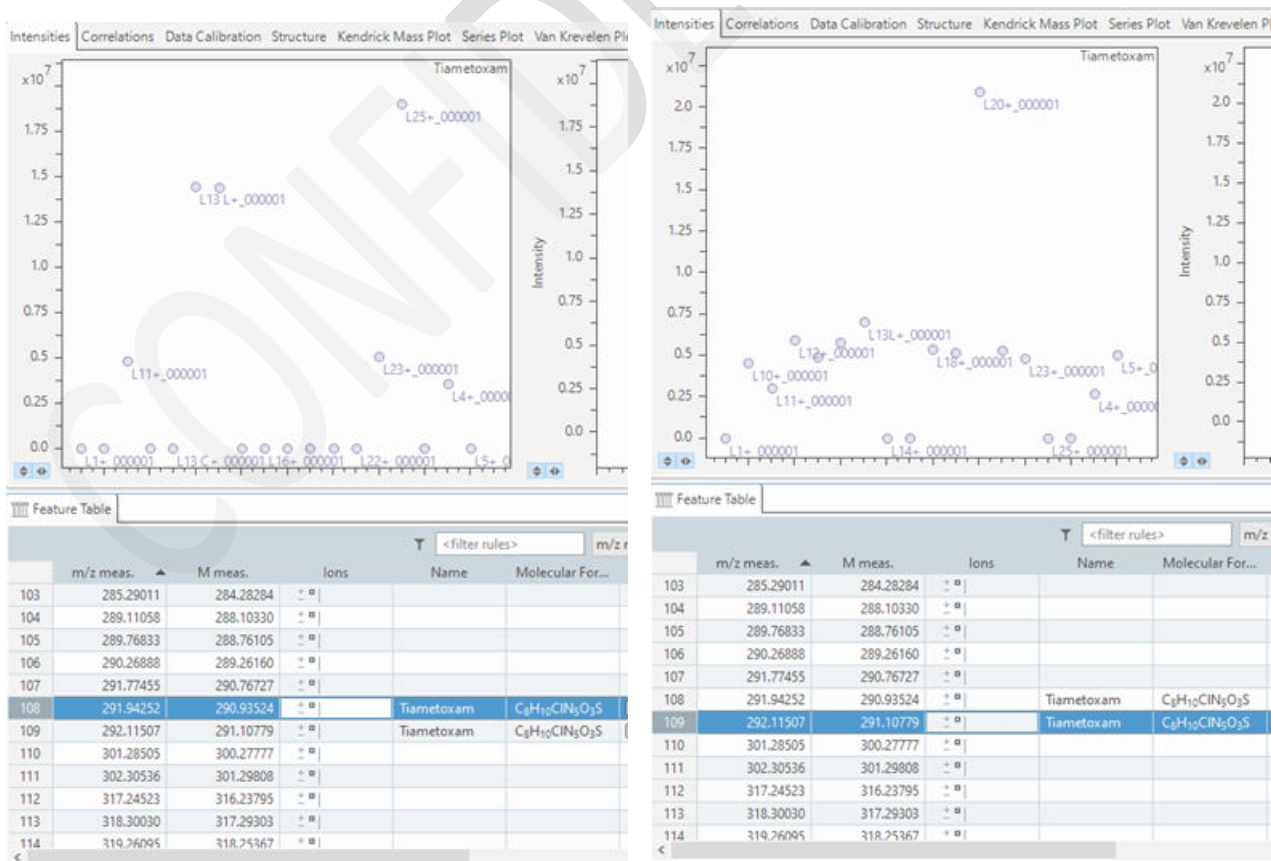
## 2.2 Neonicotinoides identificados

Muestra	Sustancia encontrada
L1+_000001.d	Dinotefuran
L2+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L3+_000001.d	Dinotefuran
L4+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L5+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L10+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L11+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L12+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L13 C+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L13 L+_000001.d	Tiametoxam
L13L+_000001.d	Tiametoxam
L14+_000001.d	Dinotefuran
L16+_000001.d	Dinotefuran
L18+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L20+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L22+_000001.d	Dinotefuran Tiametoxam
L23+_000001.d	Tiametoxam
L25+_000001.d	Tiametoxam

## Identificación de dinotefuran

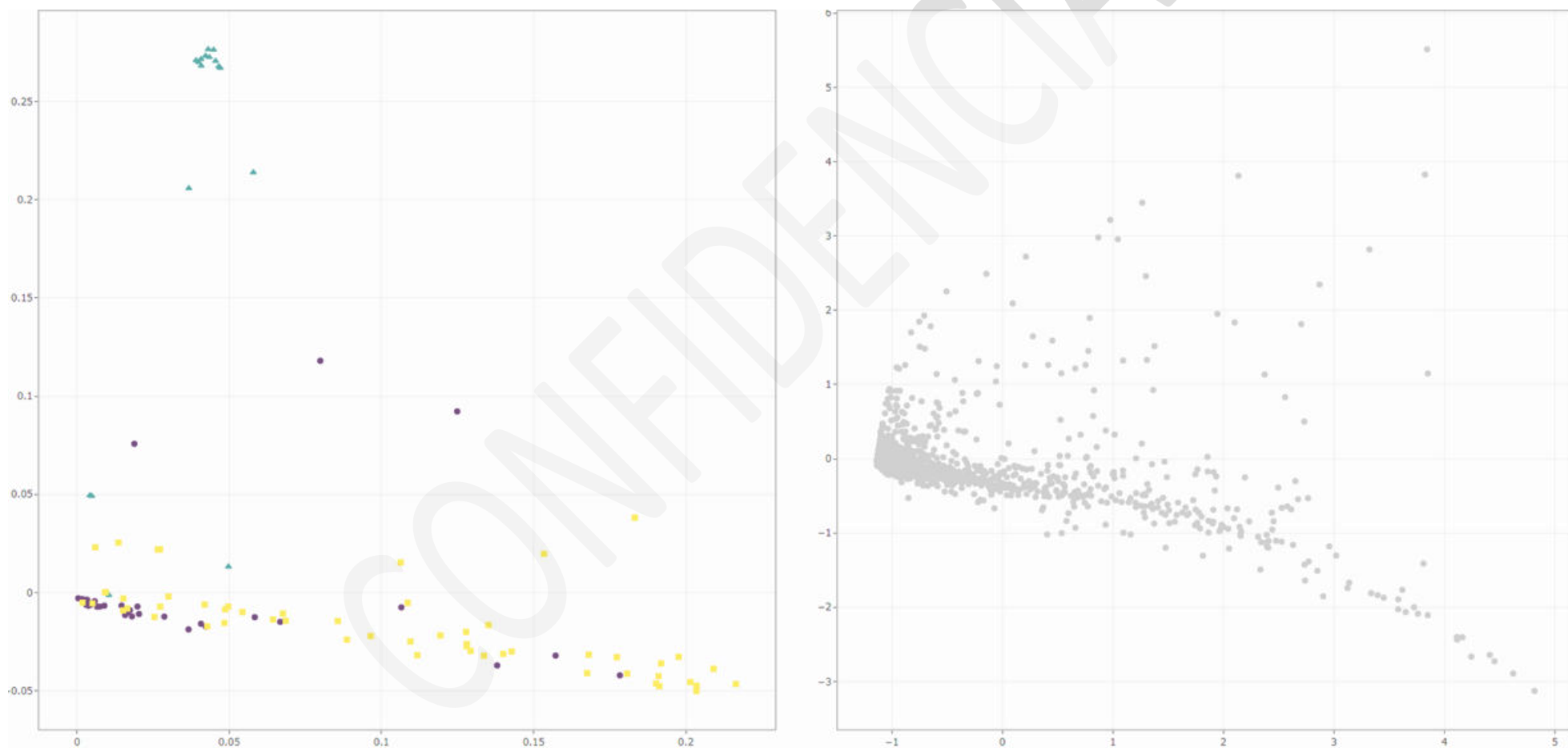


## Identificación de diametoxam



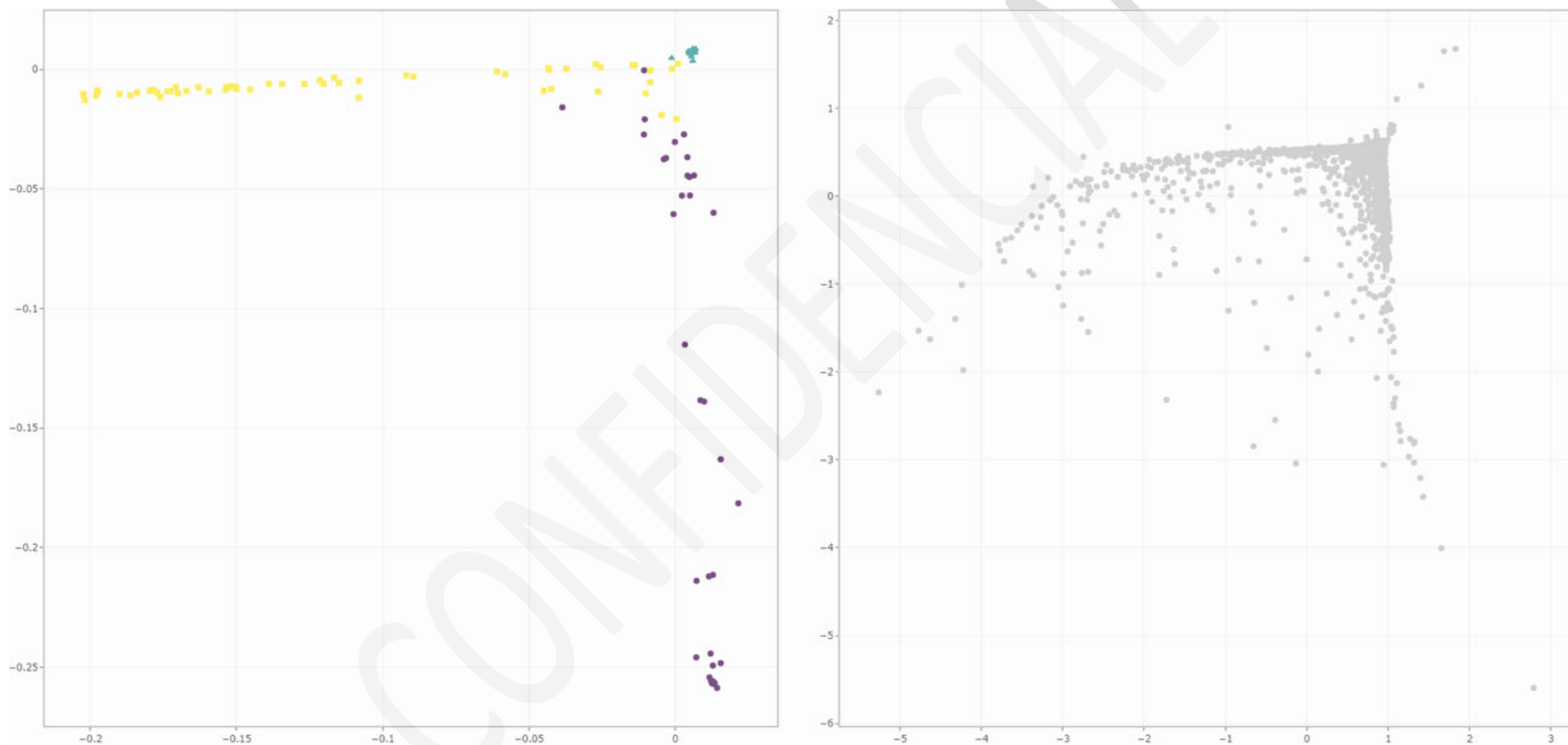
### 3. Análisis PCA de las ionizaciones

PCA en ionización positiva

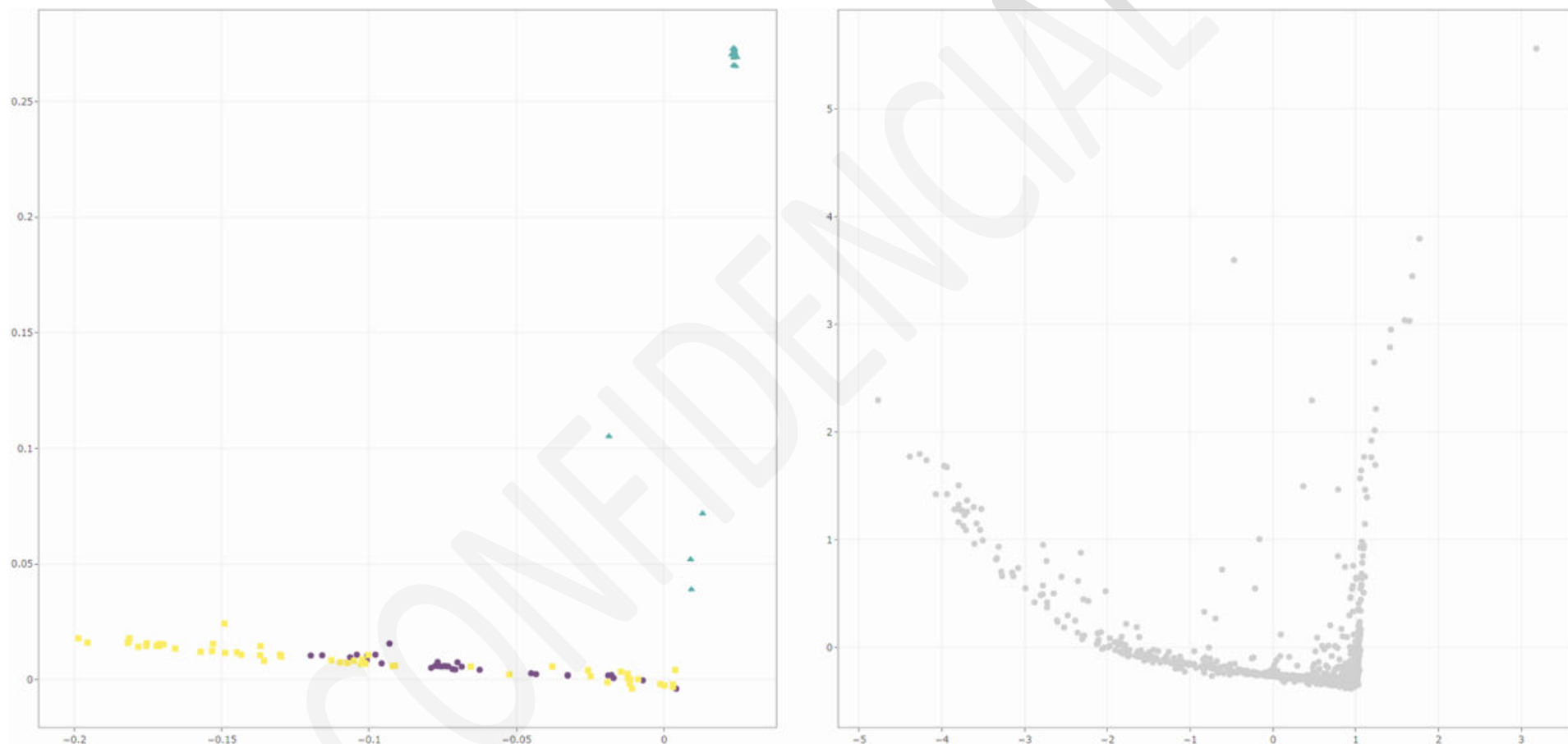




PCA en ionización negativa



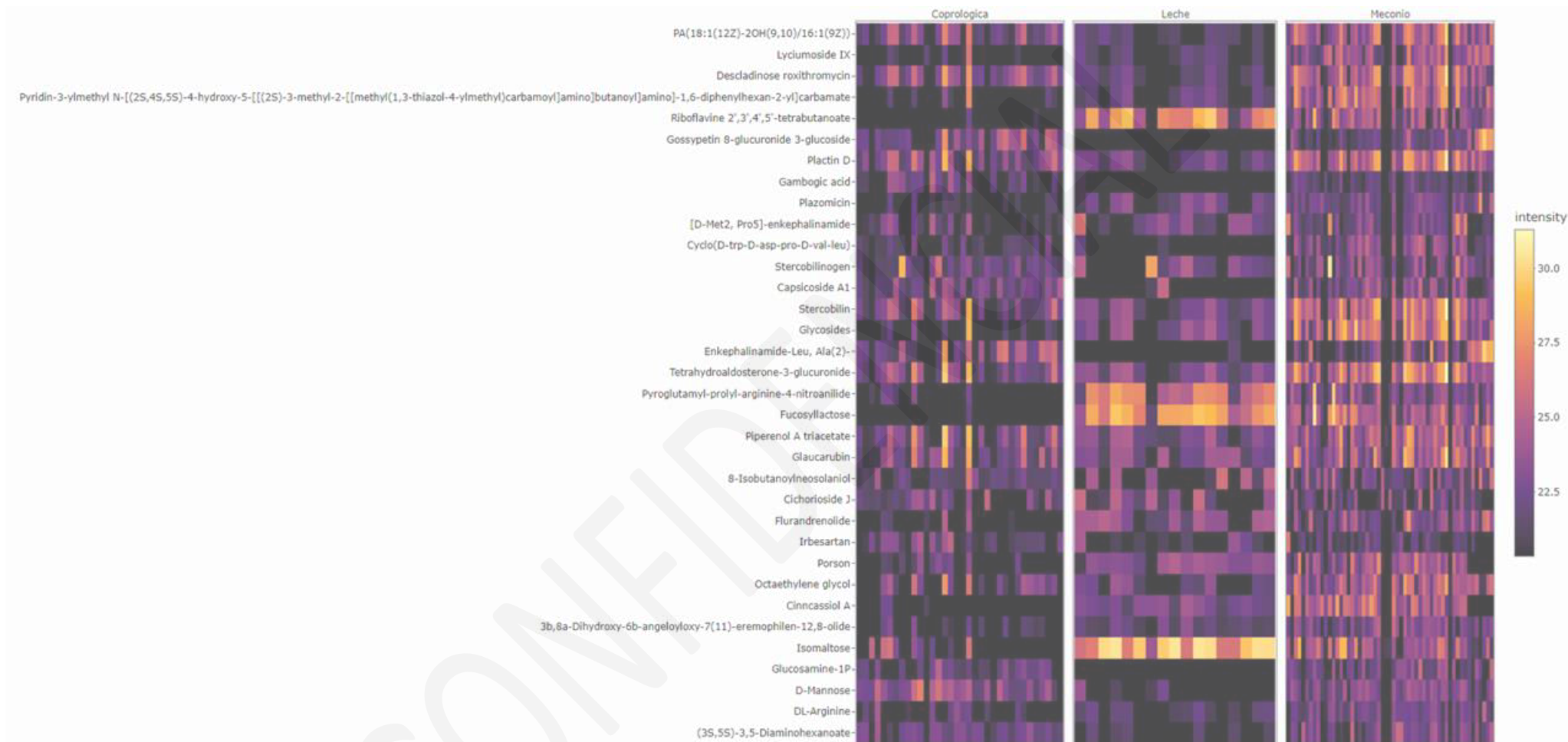
PCA en ionización positiva después de agregar solución de ácido fórmico al 1%

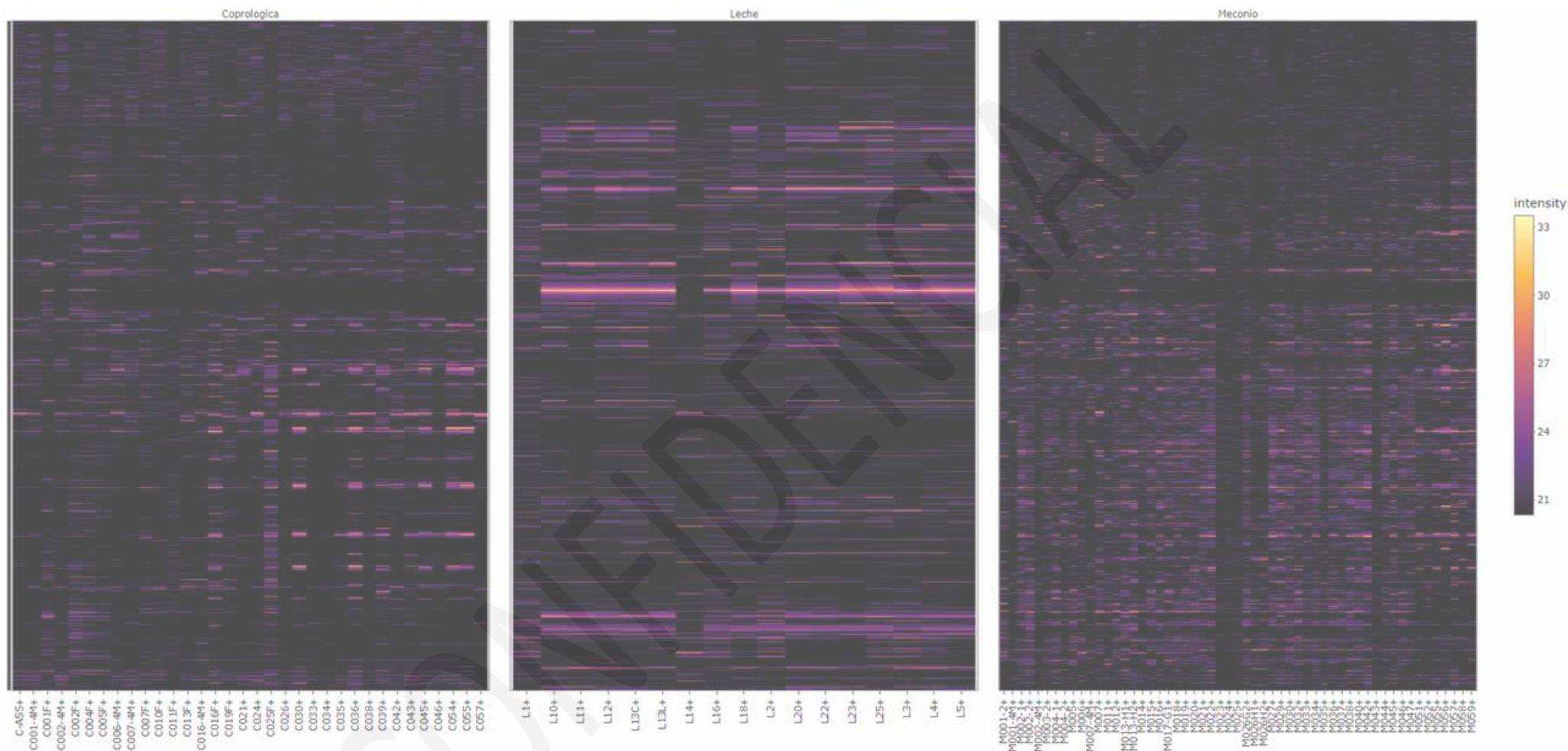


## 4. Lista de metabolitos identificados

Metabolitos encontrados en ionización positiva



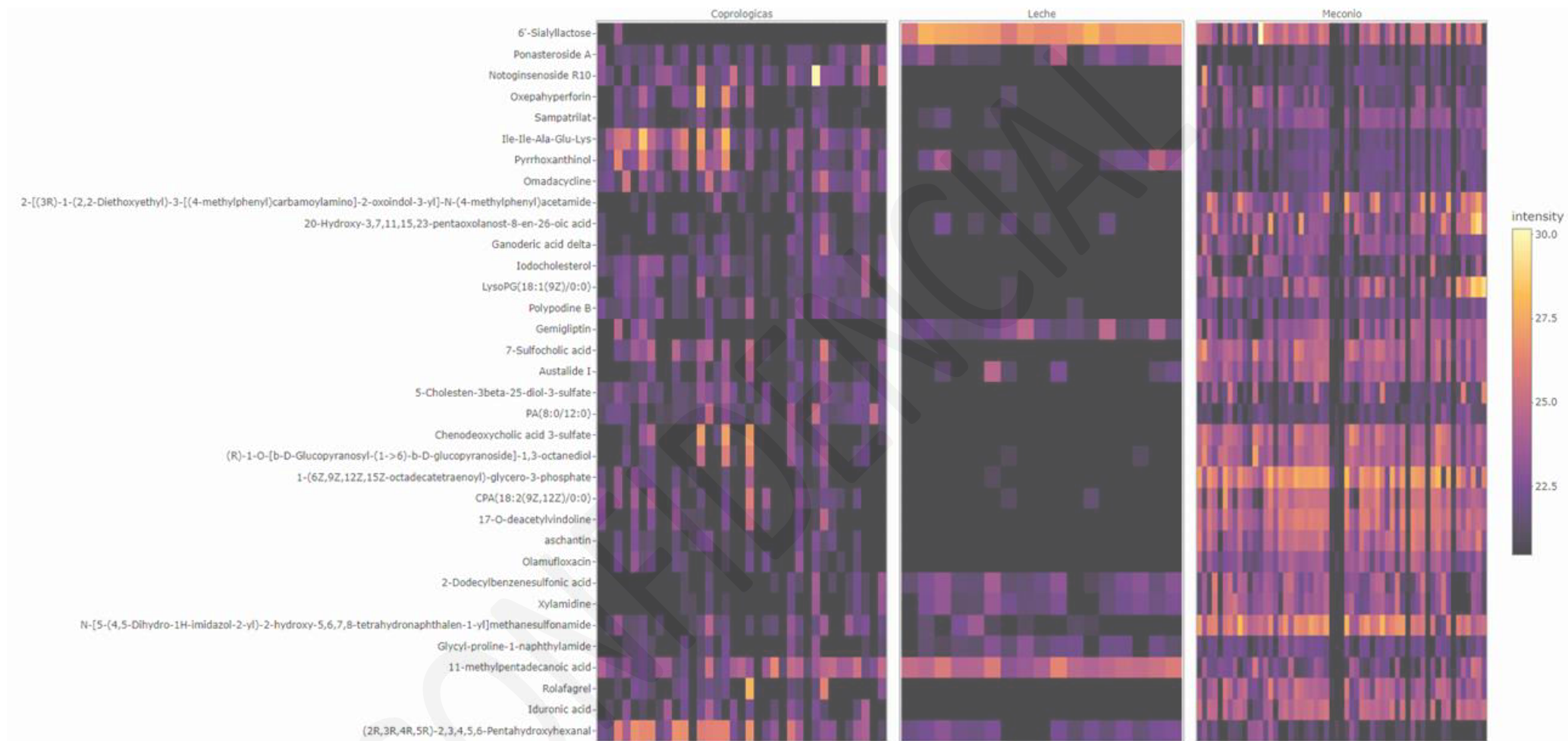


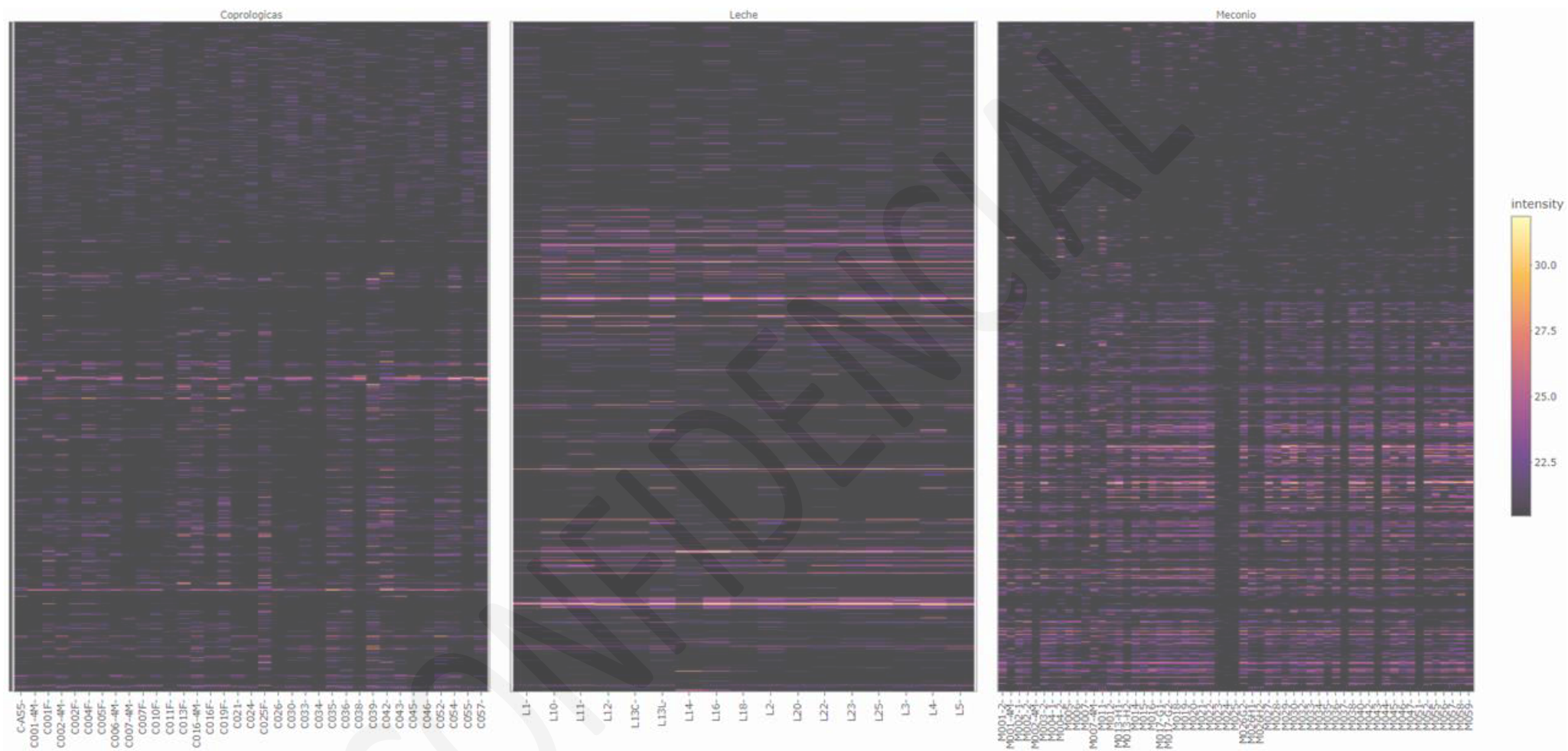


## Metabolitos encontrados en ionización negativa



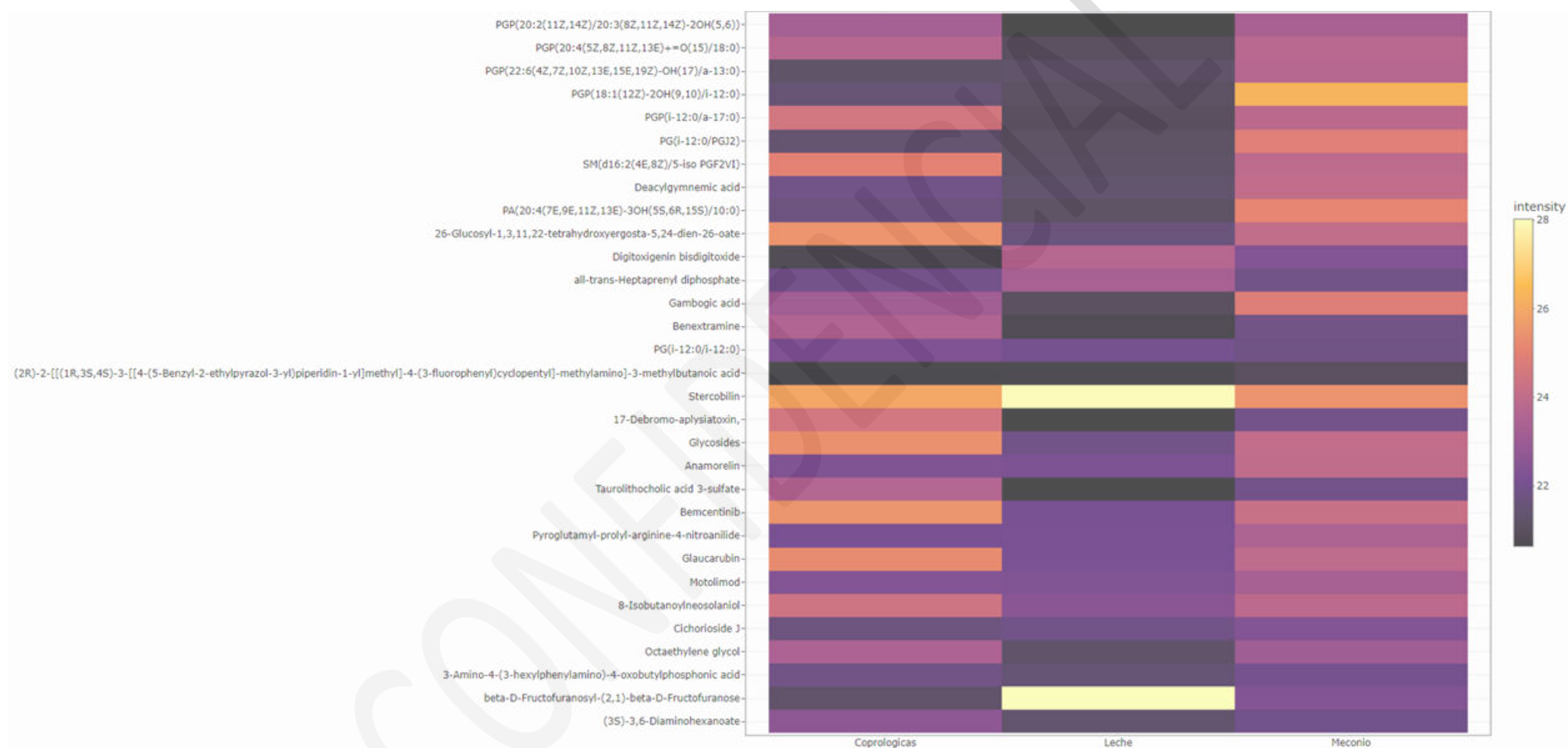




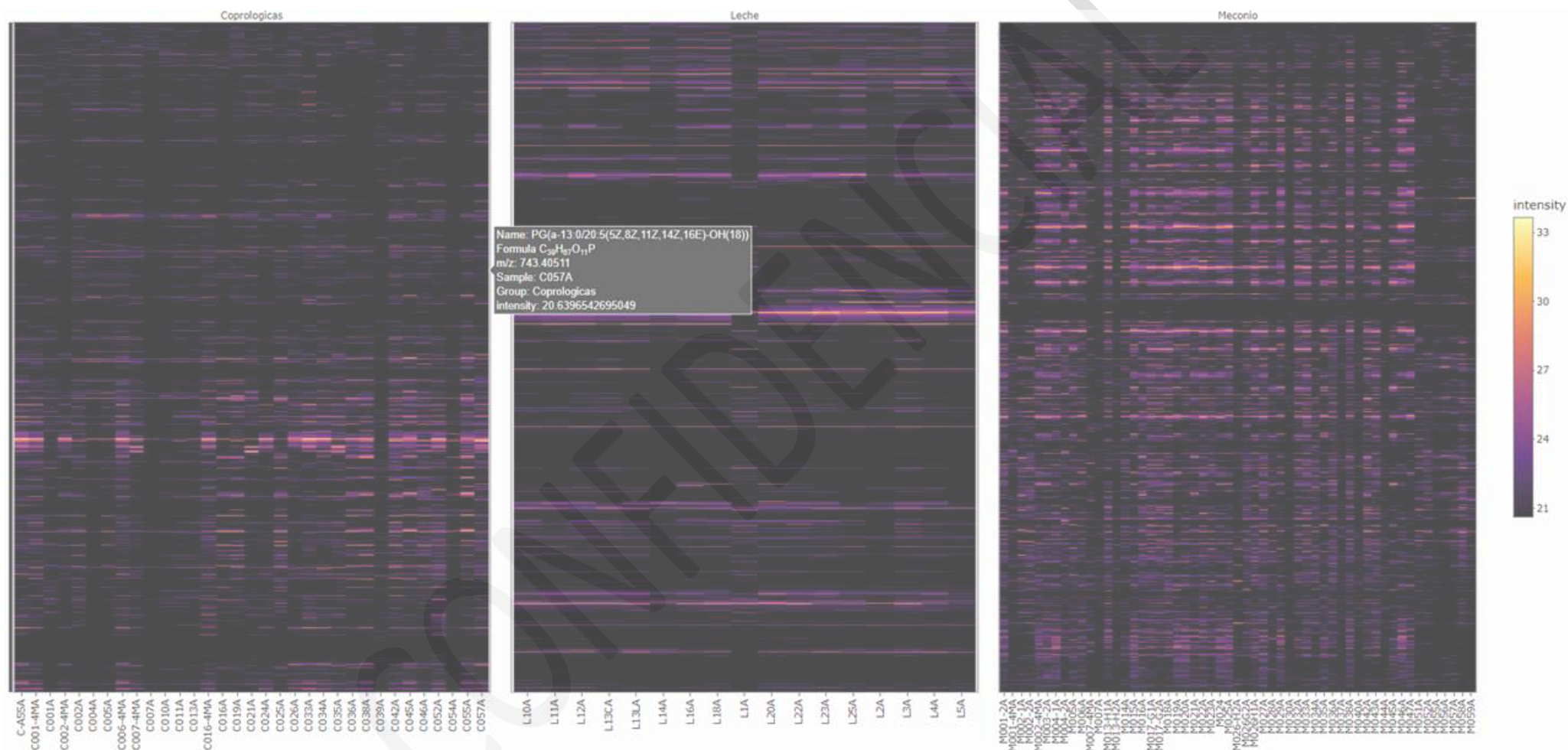




Metabolitos encontrados en ionización positiva después de agregar solución de ácido fórmico al 1%







## 5. Diagrama metodológico de muestras y datos

### 5.1 Protocolo para la extracción de los AGCC por SPE

- a. Pesar 100mg de materia fecal
- b. Añadir 1mL de agua miliQ y vortexear
- c. Separar 100  $\mu$ L de mezcla y colocar en otro tubo para su tratamiento para la inyección al equipo SOLARIX
- d. A la mezcla restante, añadir 100  $\mu$ L de ácido clorhídrico 0.1 M
- e. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min

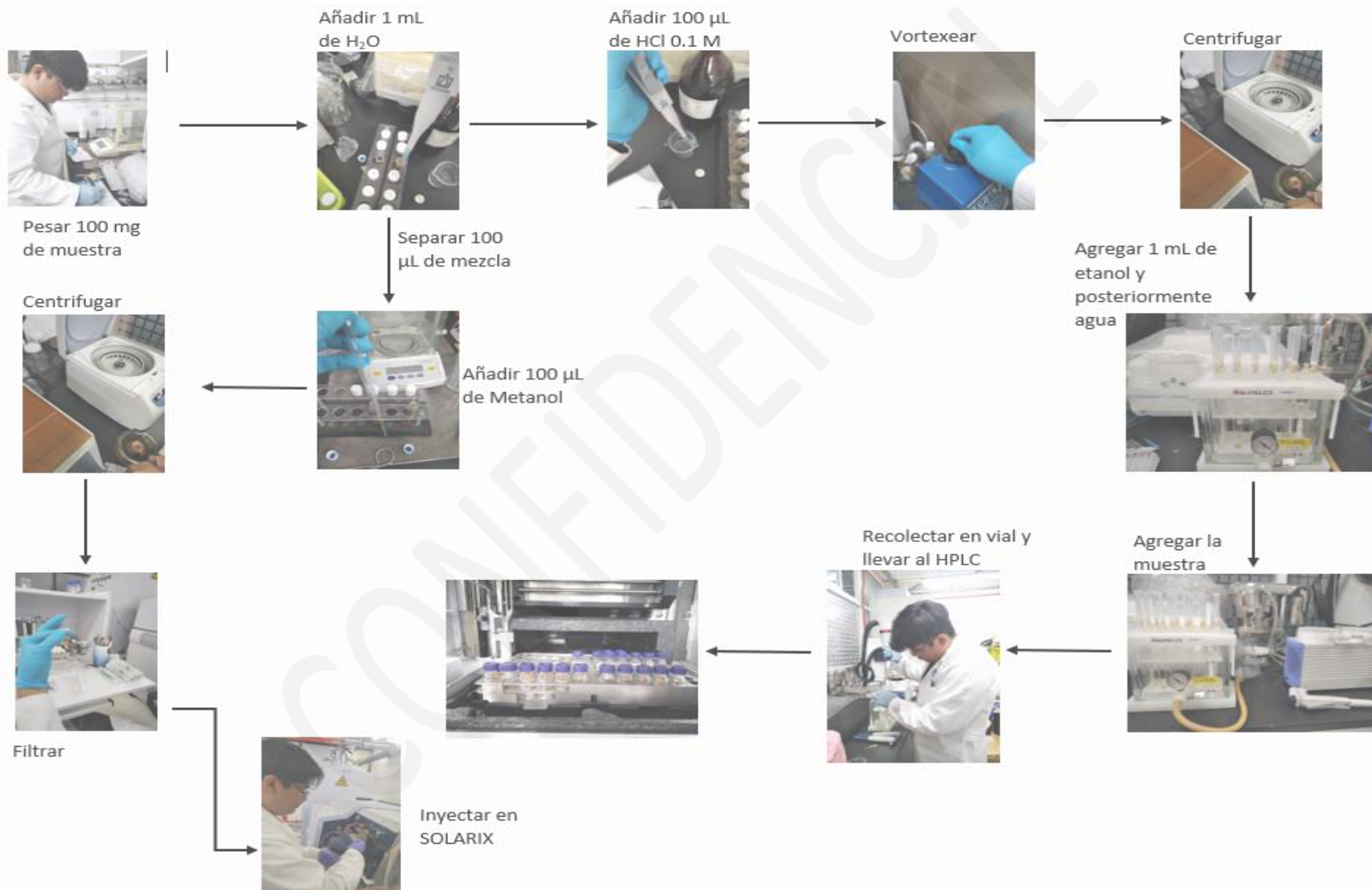
Para la preparación del cartucho

- A. Pasar 1mL de etanol por el cartucho SPE C<sub>18</sub>
- B. Pasar 1mL de agua miliQ por el mismo cartucho
- C. Añadir el sobrenadante que se obtiene del paso “e” al cartucho
- D. Eluir con 300  $\mu$ L de etanol y recolectar en un vial HPLC

### 5.2 Protocolo para inyección directa al equipo SOLARIX

- a. Del paso “c” en el punto 5.1, a la mezcla separada, agregar 100  $\mu$ L de metanol puro grado HPLC
- b. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min
- c. Filtrar el sobrenadante
- d. Inyectar al equipo SOLARIX

### 5.3 Diagrama de flujo



## 5.4 Análisis de datos

Para el análisis de datos que se obtengan se realizara lo siguiente

Para los AGCC

- Con la curva de calibración realizada y la identificación de los picos se determinarán las ecuaciones que relacionen el área de cada pico identificado y se determinarán los límites inferiores de detección de cada AGCC encontrado
- Posteriormente se tomarán los datos del área de cada pico identificado anteriormente y se realizarán los cálculos correspondientes para la determinación de la concentración de los AGCC
- El porcentaje obtenido se transformará a la concentración de mMol/100mg de Copro

Para los datos que se obtengan en SOLARIX

- Los datos se tratarán con el Software “MetaboScape” para si tratamiento estadístico.
- Se realizarán un PCA por cada ionización realizada en el equipo
- Las masas obtenidas de los análisis PCA se buscarán en el mismo software para determinar si se trata de algún compuesto de interés.

## 6. Resultados de AGCC

A continuación, se muestra los resultados de concentración de AGCC encontrados en muestras coprológicas, leche y meconio analizadas en un periodo de 2 meses (noviembre-diciembre).

Tabla. 1 límite inferior de detección de AGCC

AGCC	Limite en mMol/100mg de Copro
Ac. Fórmico	0.8500
Ac. Acético	0.8000
Ac. Propiónico	1.0000
Ac. Butírico	0.0800
Ac. Valérico	2.0000
Ac. Hexanoico	0.0600

Figura 1. Ácido fórmico presente en muestras coprológicas

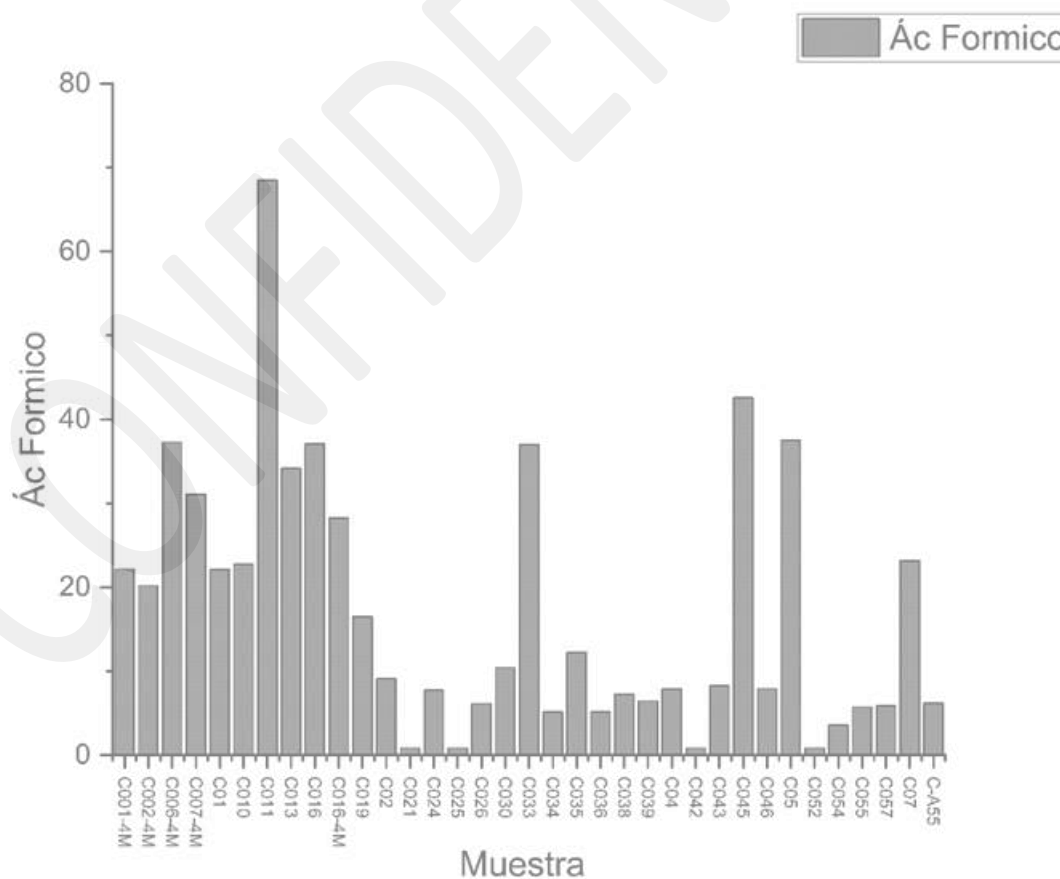




Figura 2. Ácido fórmico presente en muestras de leche

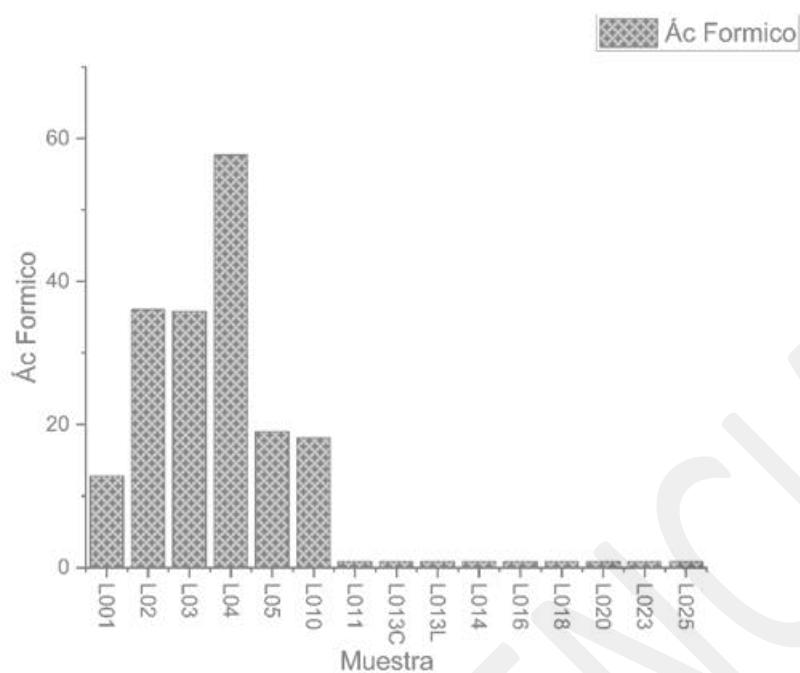


Figura 3. Ácido fórmico presente en muestras de meconio

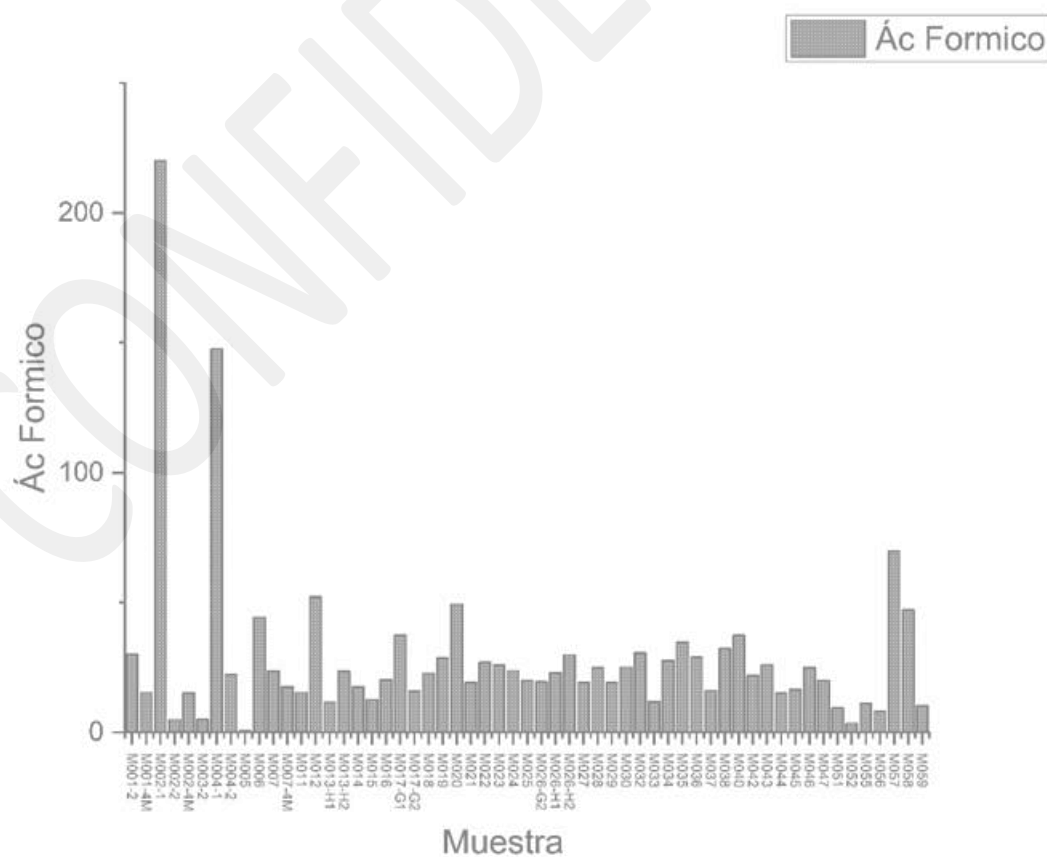




Figura 4. Ácido acético presente en muestras coprológicas

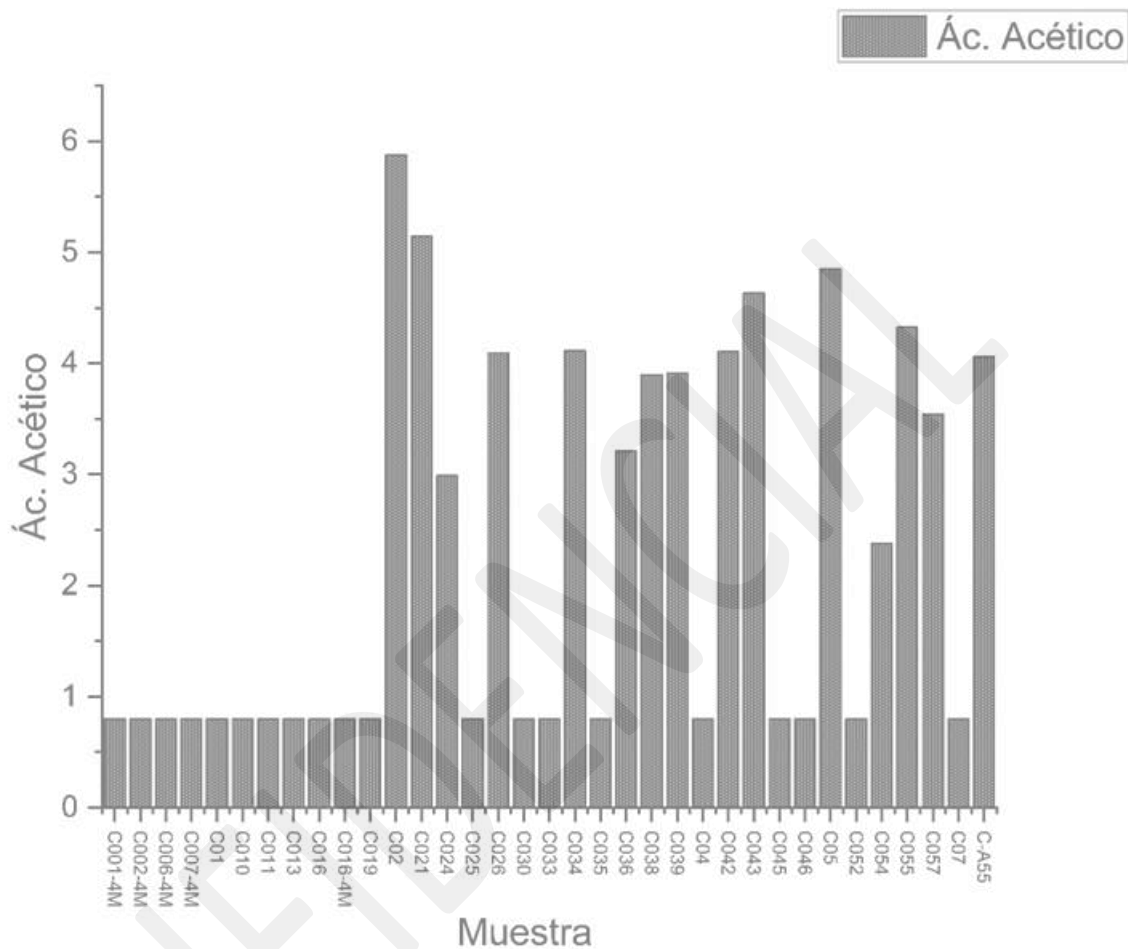


Figura 5. Ácido acético presente en muestras de leche

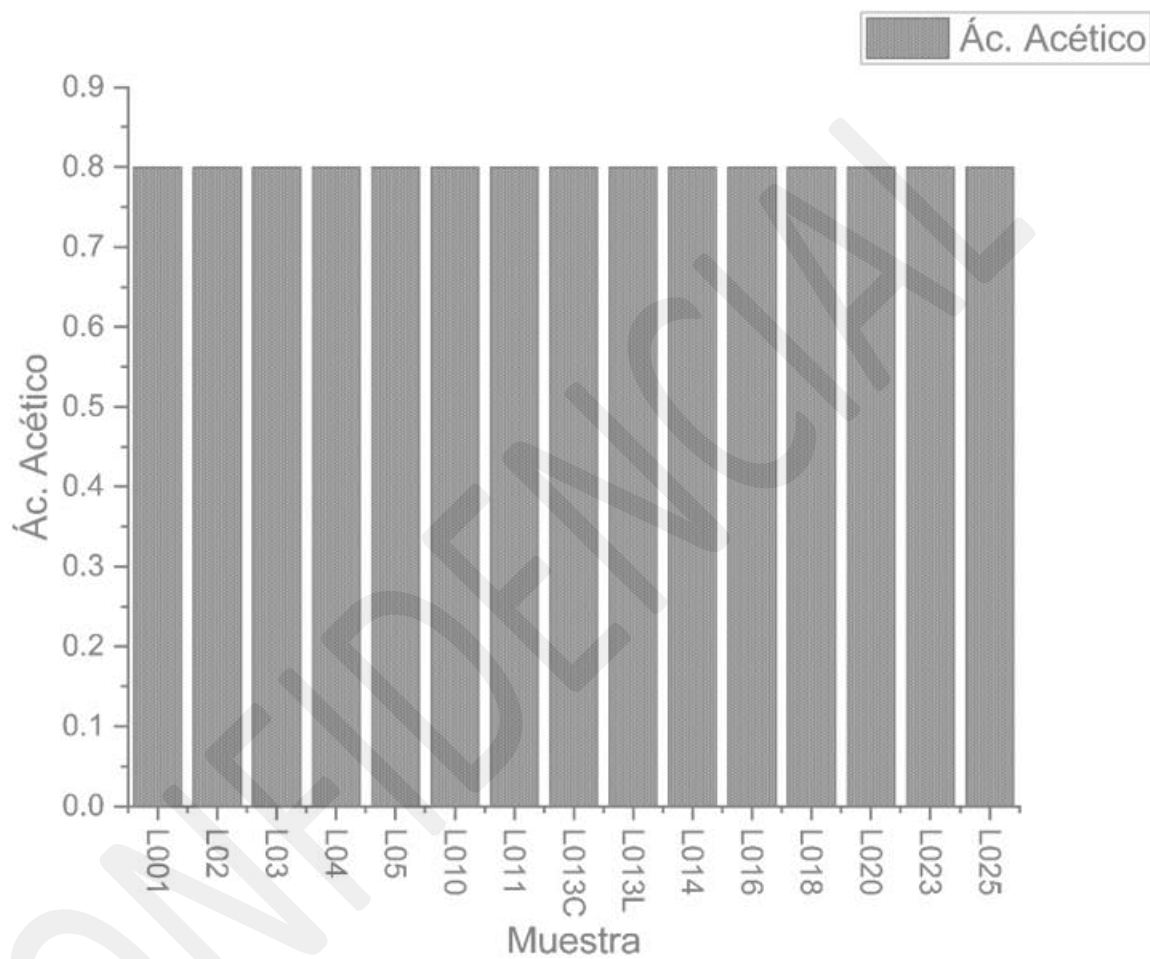


Figura 6. Ácido acético presente en muestras de meconio

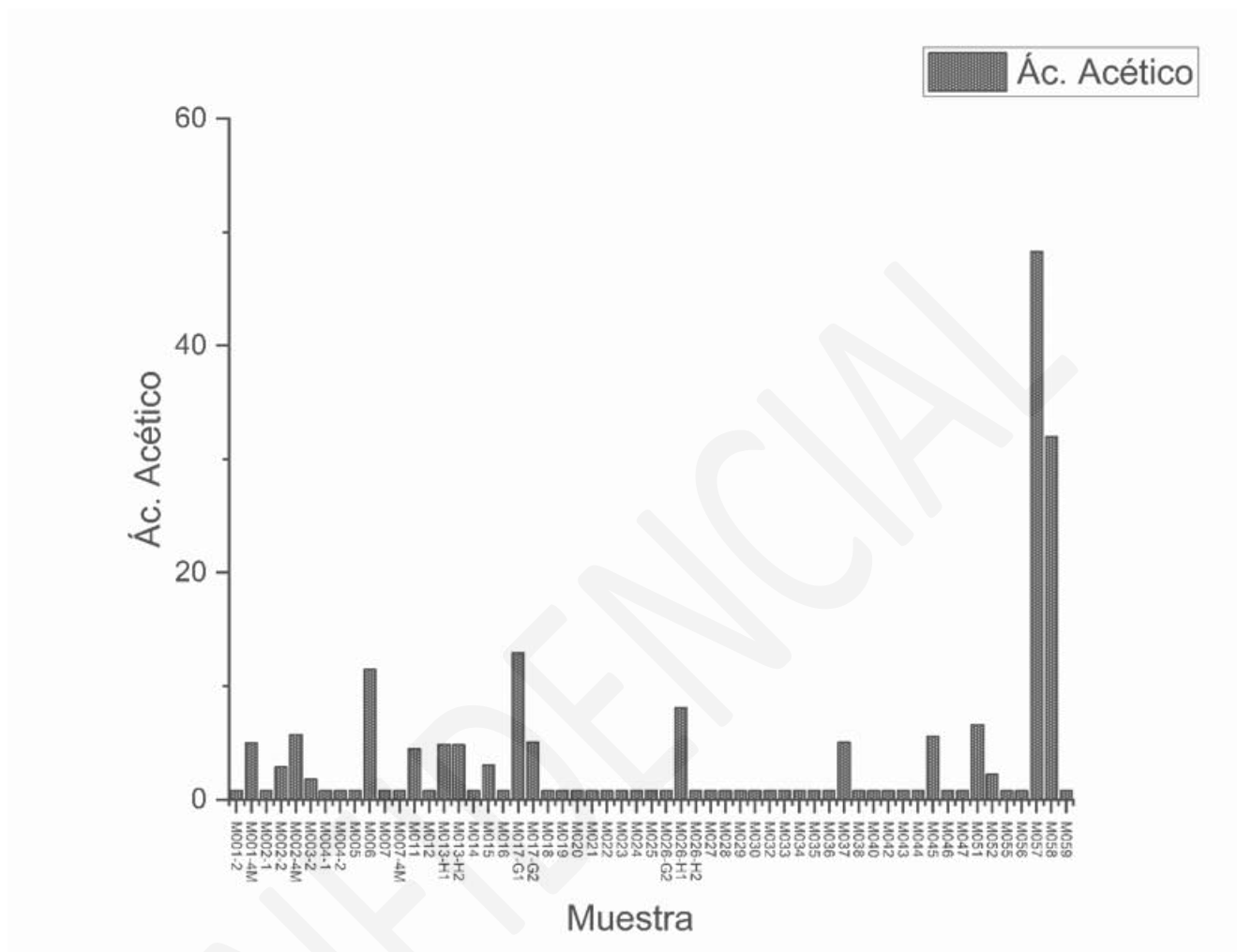


Figura 7. Ácido propiónico presente en muestras coprológicas

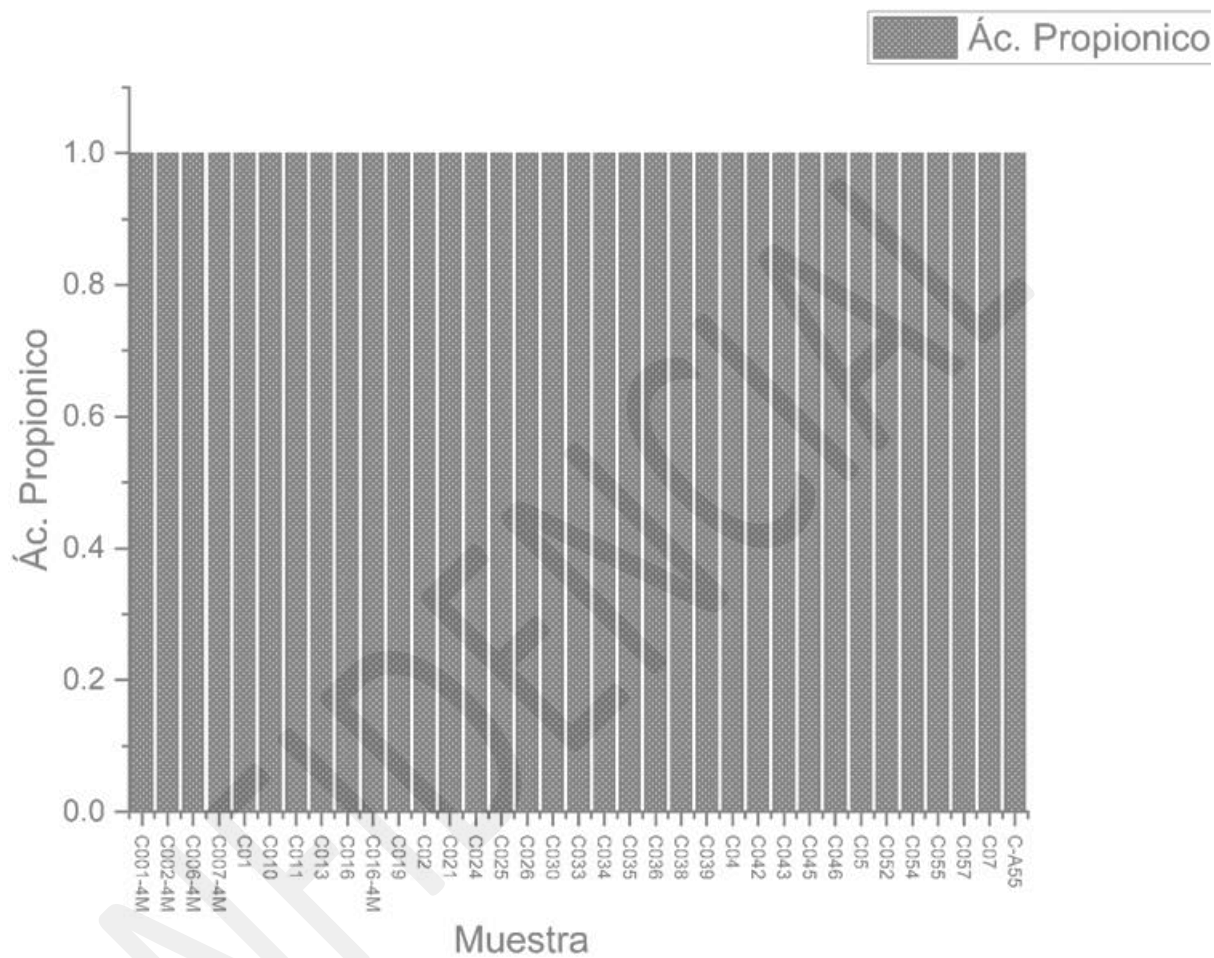


Figura 8. Ácido propiónico presente en muestras de leche

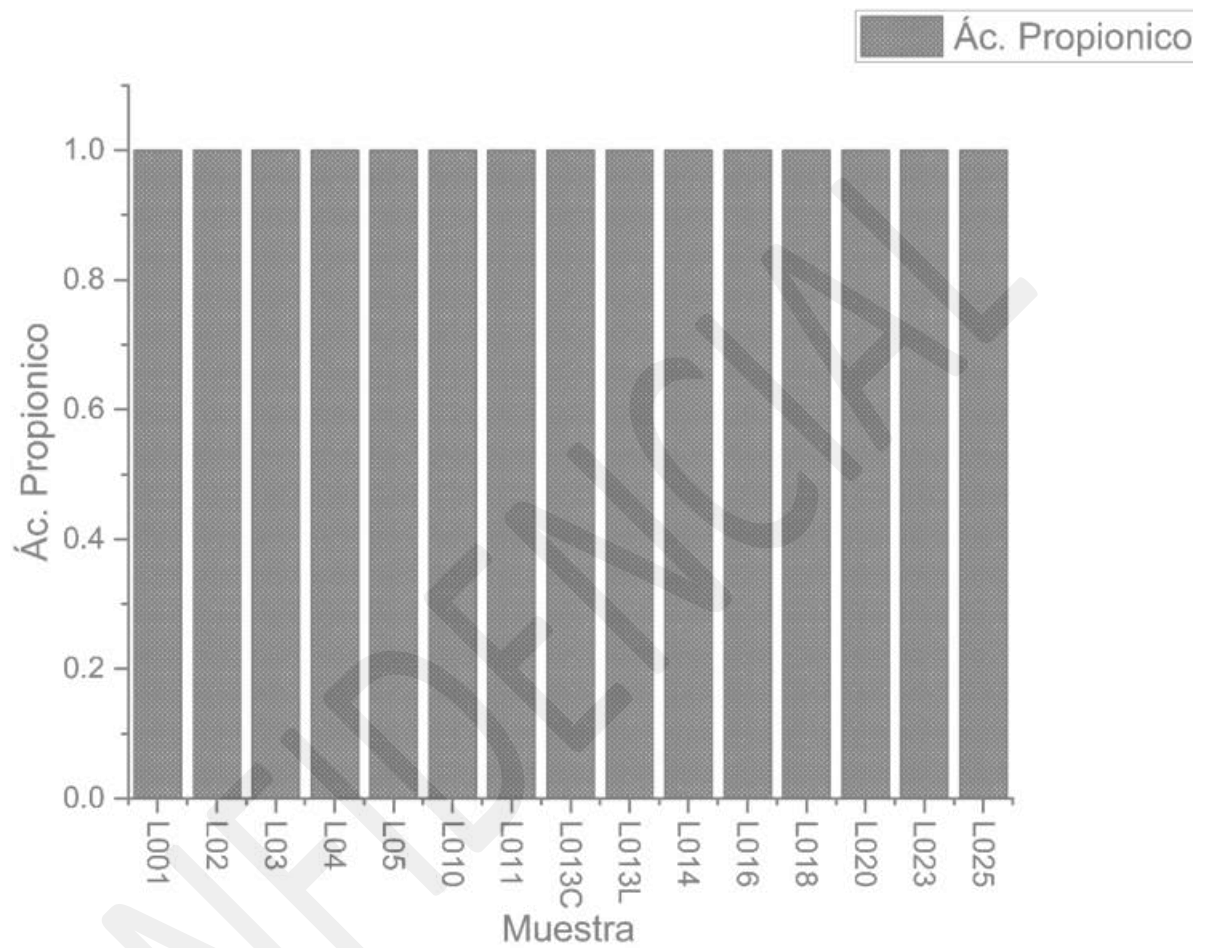


Figura 9. Ácido propiónico presente en muestras de meconio

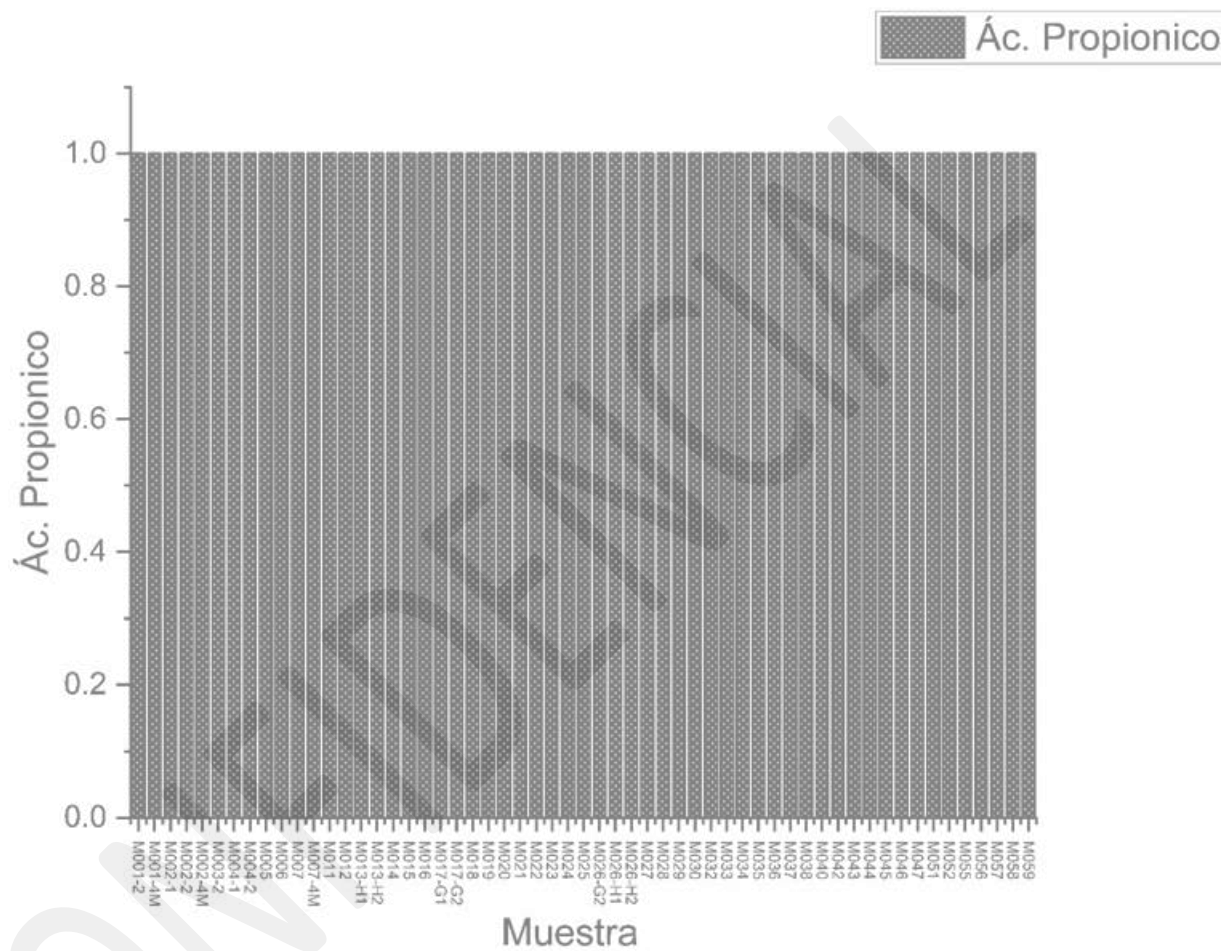


Figura 10. Ácido butírico presente en muestras coprológicas

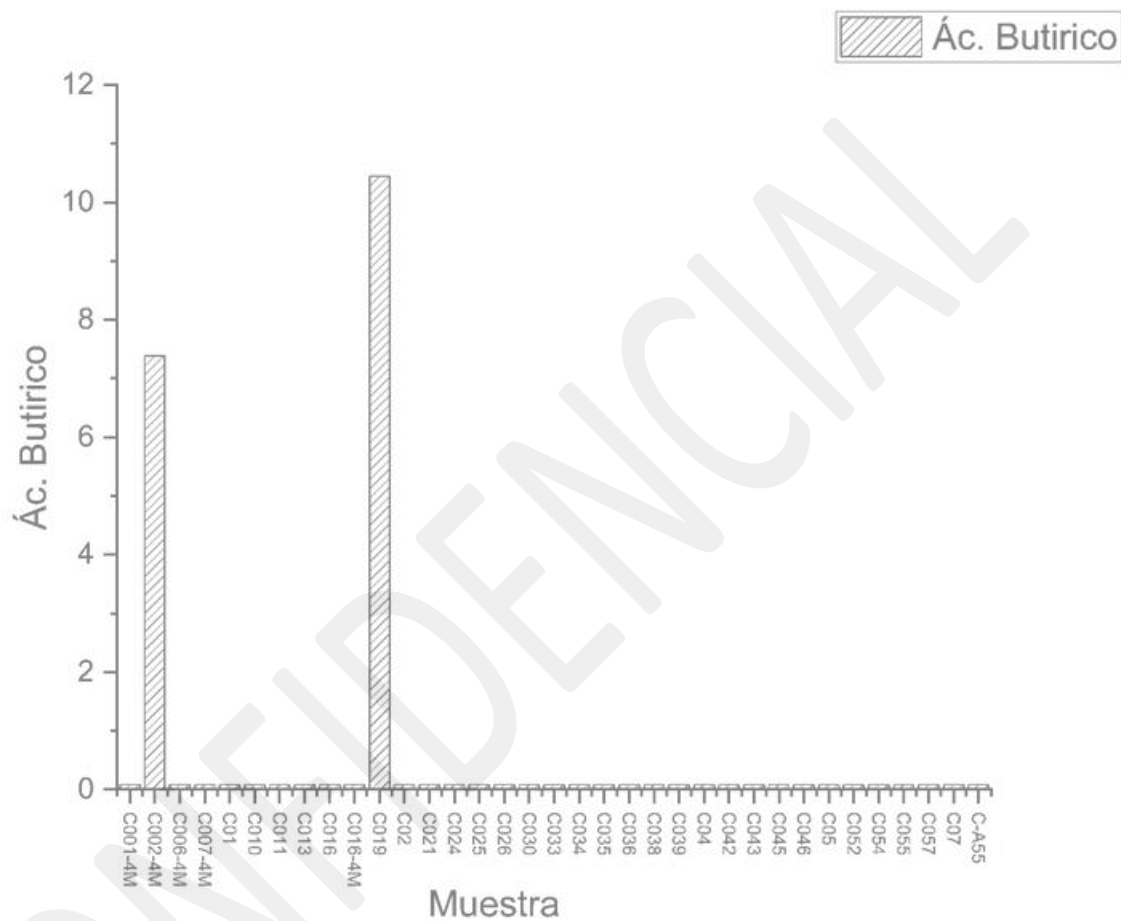


Figura 11. Ácido butírico presente en muestras de leche

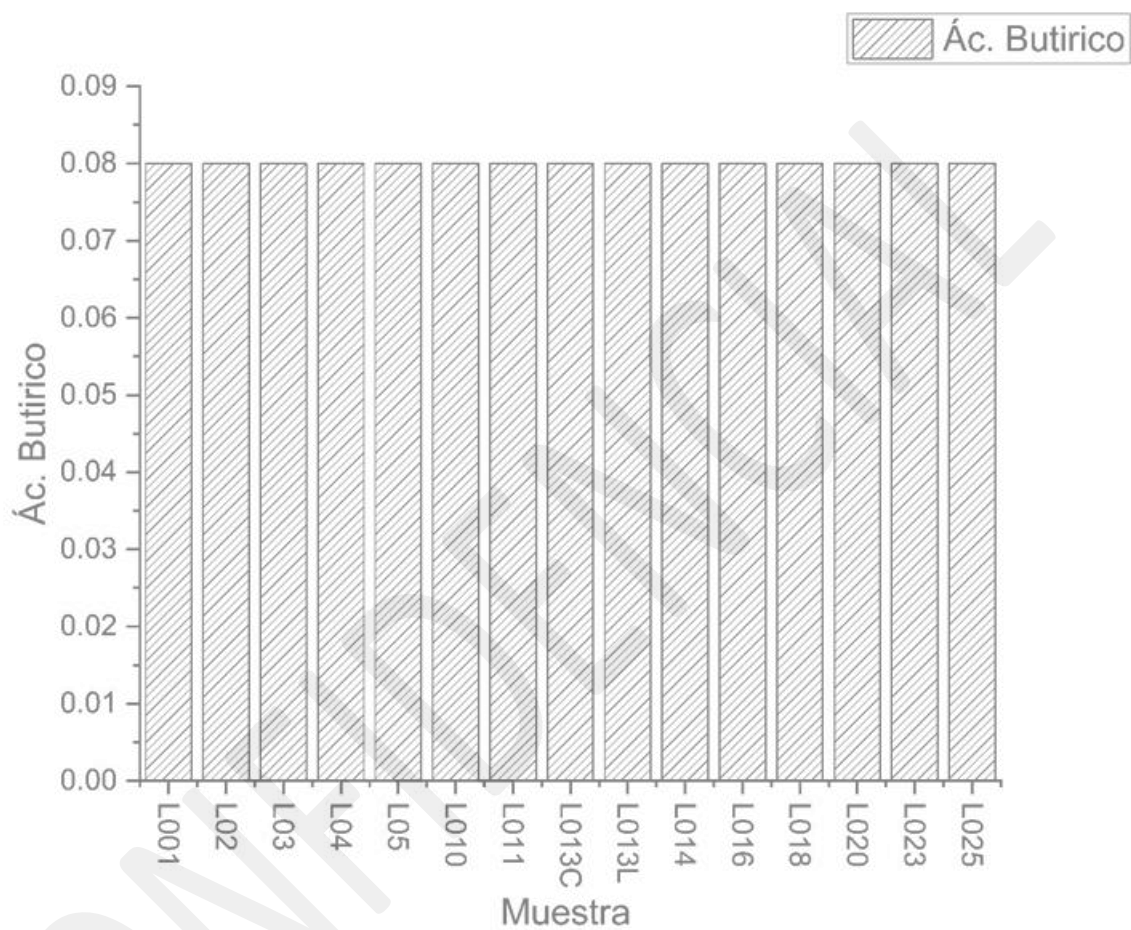




Figura 12. Ácido butírico presente en muestras de meconio

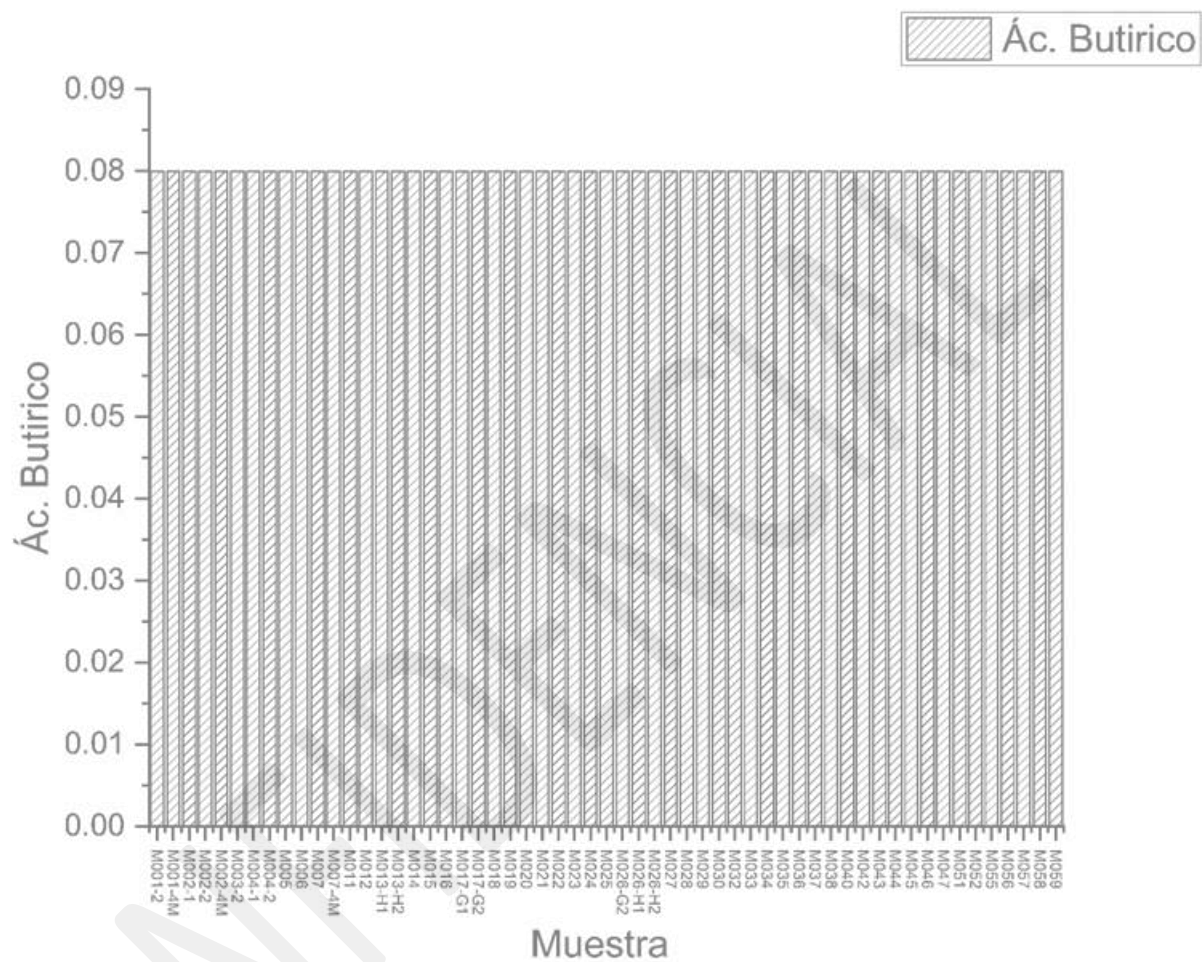


Figura 13. Ácido valérico presente en muestras coprológicas

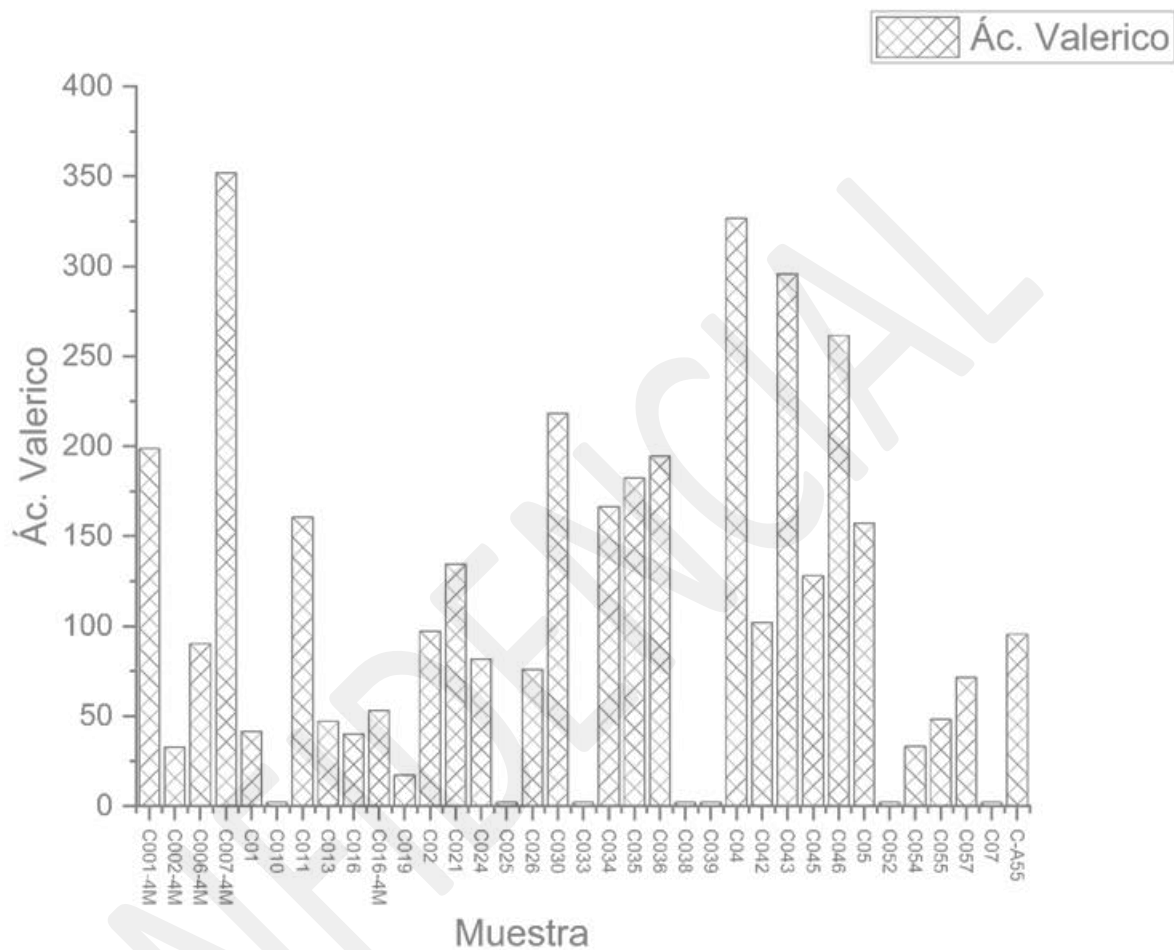


Figura 14. Ácido valérico presente en muestras de leche

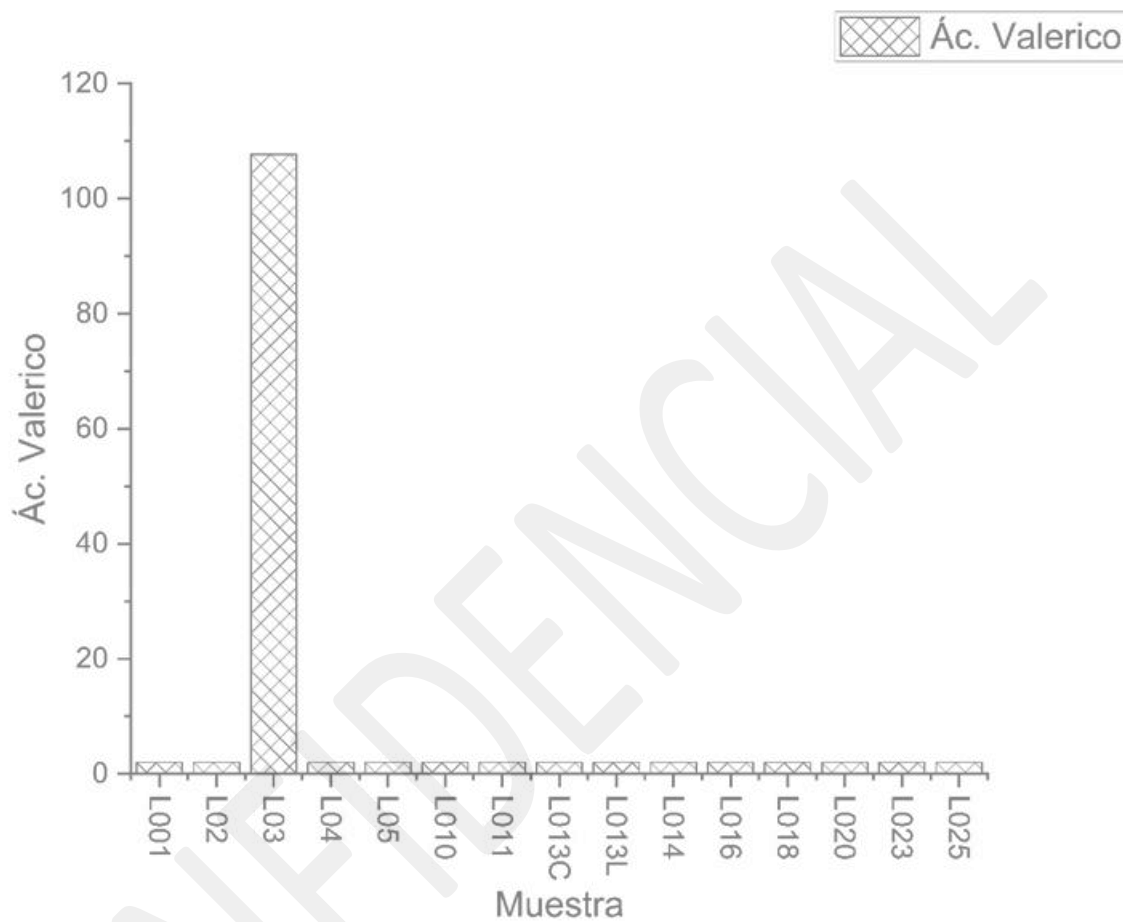


Figura 15. Ácido valérico presente en muestras de meconio

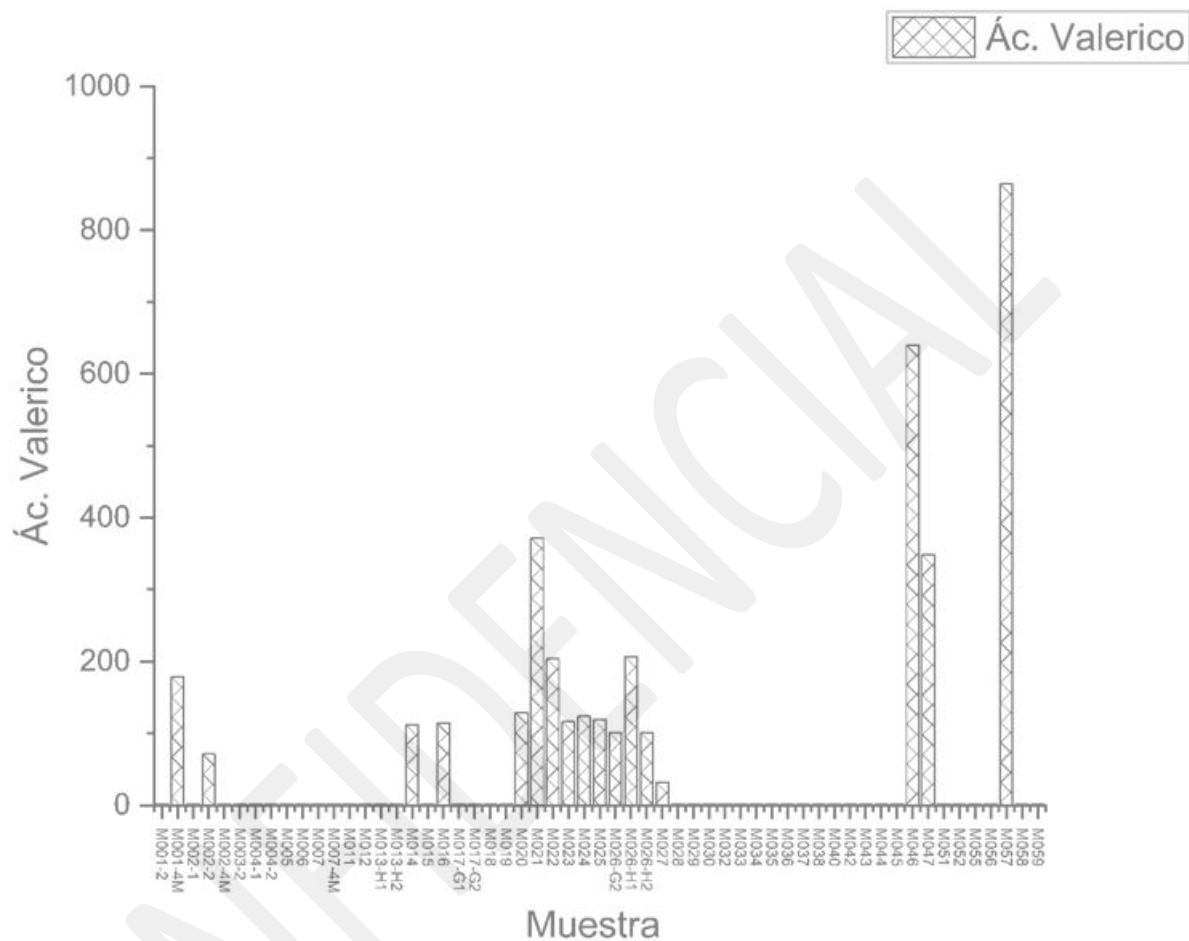


Figura 16. Ácido Hexanoico presente en muestras coprológicas

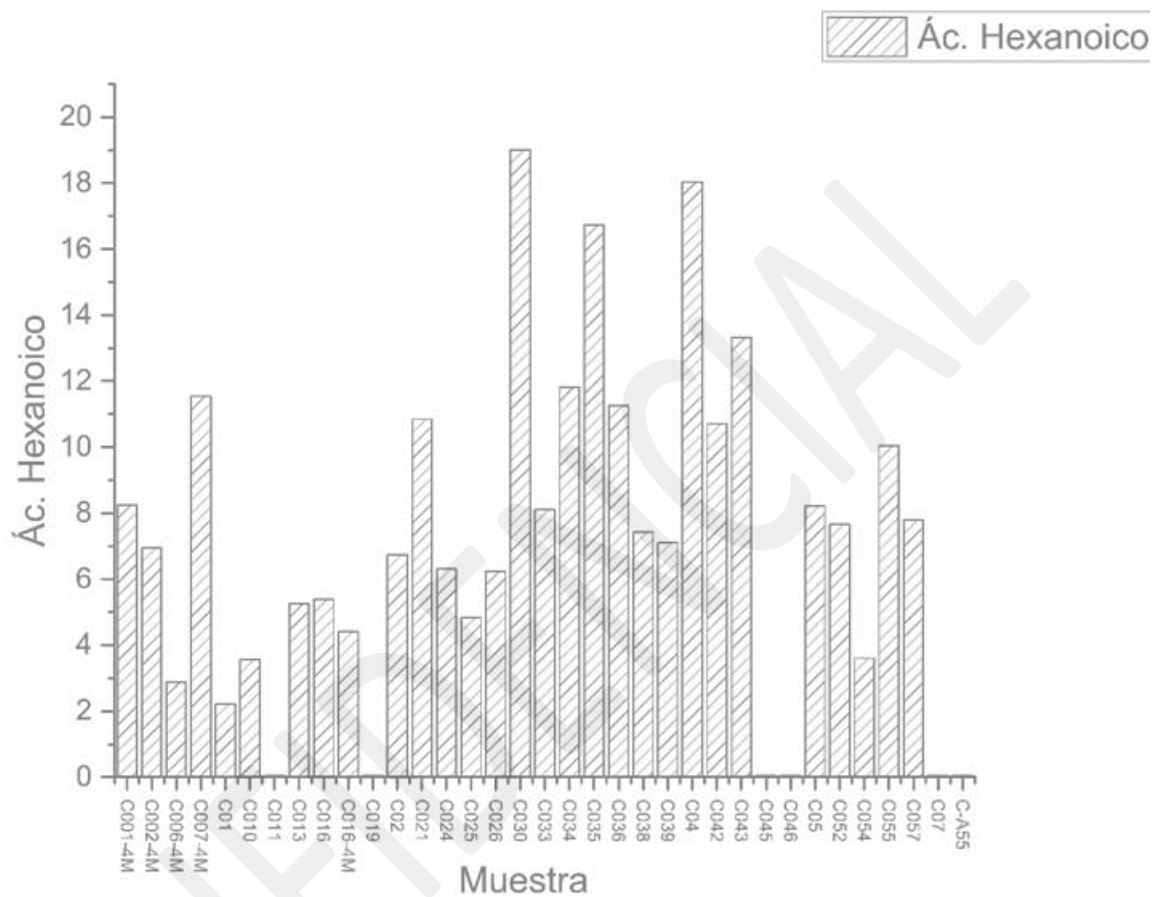


Figura 17. Ácido Hexanoico presente en muestras de leche

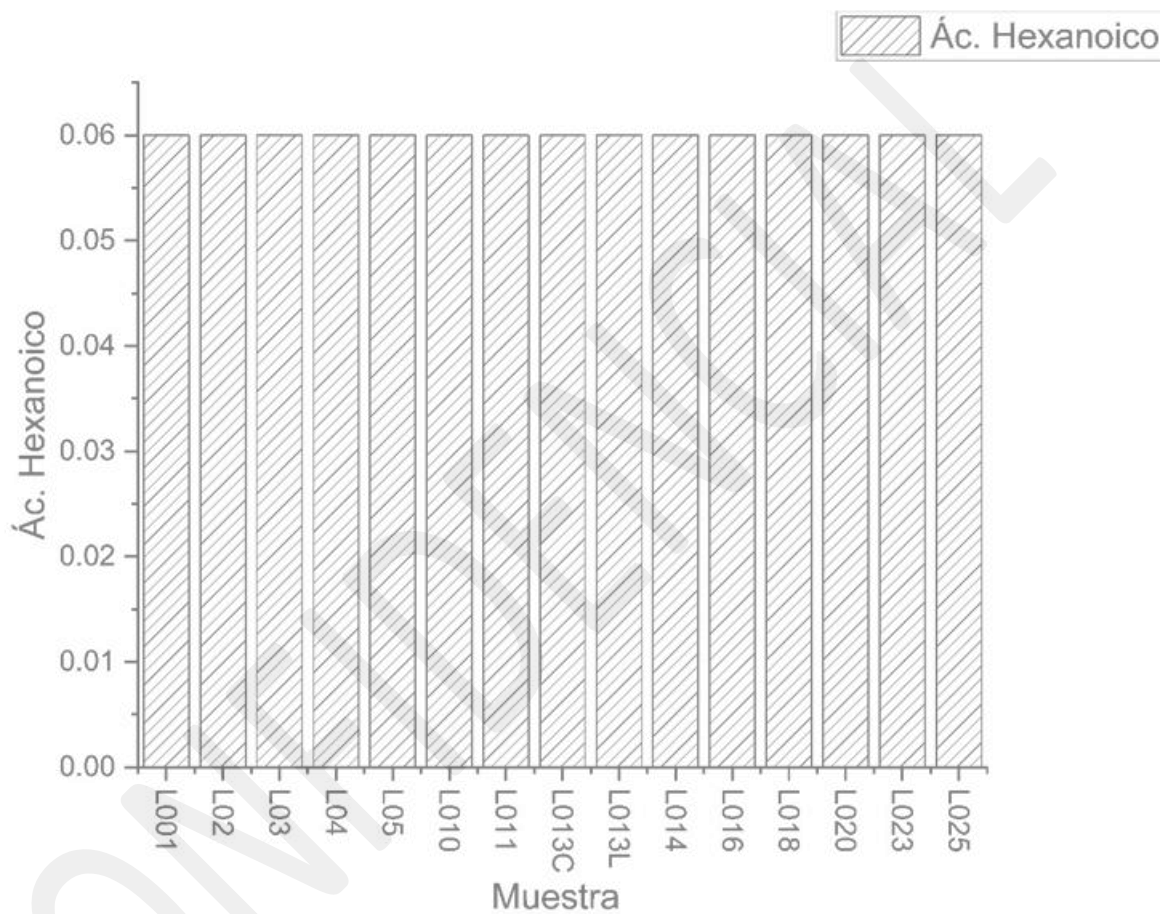
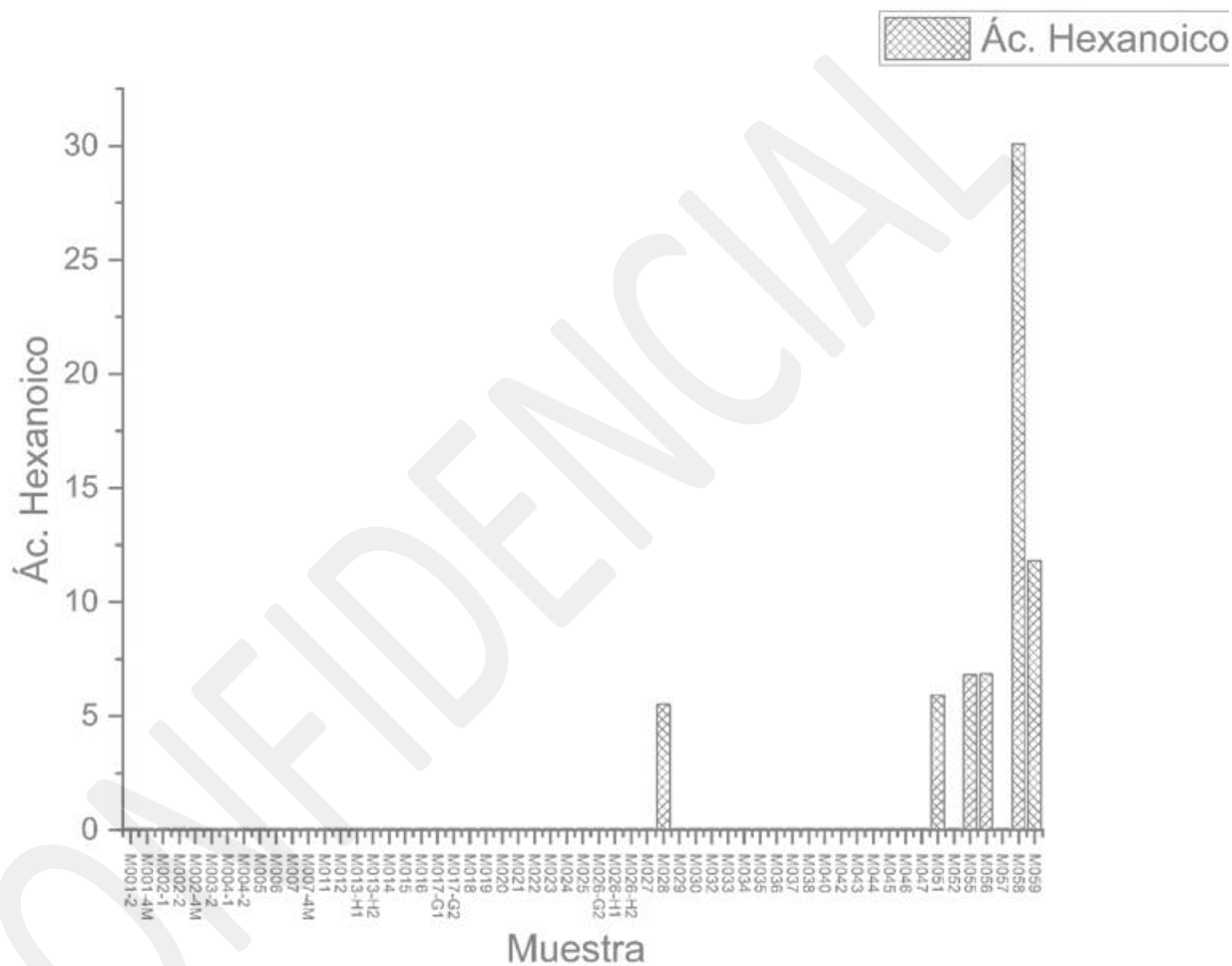


Figura 18. Ácido Hexanoico presente en muestras de meconio



## Bibliografía:

- 1.- BARTOLOMÉ JIMENO, M. (2015). *ANÁLISIS DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS CON TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA FACULTAD DE CIENCIAS.
- 2.- Han, J., Lin, K., Sequeira, C., & H. Borchers, C. (2015). *An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry* | Elsevier Enhanced Reader. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.015>
- 3.- He, L., Yuan, F., Islam Prodhon, M. A., Yin, X., K. Lorkiewicz, P., Wei, X., Feng, W., McClain, C., & Zhang, X. (2018). *Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short chain fatty acids by gas chromatography mass spectrometry* | Elsevier Enhanced Reader. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.028>
- 4.- J. Morrison, D., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *GUT MICROBES*, 7(3), 12. <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- 5.- Krausová, M., Ayeni, K. I., Wisgrill, L., Ezekiel, C. N., Braun, D., & Warth, B. (2022). Trace analysis of emerging and regulated mycotoxins in infant stool by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(25), 7503-7516. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03803-9>
- 6.- R, K., & H. K, M. (1961). *Separación, identificación y análisis cuantitativo de ácidos grasos por cromatografía en capa fina y cromatografía gas-líquido*. 27.