

OPTIMITZACIÓ I AUTOMATITZACIÓ D'UN MÈTODE D'EXTRACCIÓ DE METABOLITS DE BAIX PES MOLECULAR EN FEMTA HUMANA

Oriol Lacambra Frias

AUTOR

Dr Ricardo Román Cordero Otero

DIRECTOR URV

Míriam Gil Serret

DIRECTORA EXTERNA

Degut a l'emergència sanitària causada pel COVID-19, les pràctiques en les que es basa aquest TFG van quedar incompletes, impedit amb això el desenvolupament de totes les tasques i objectius que es varen plantejar.

Això va causar un lleuger canvi de format, així com una certa rebaixa de les expectatives a obtenir del mateix. Malgrat aquesta incidència, en l'actual treball es detalla els processos que s'haguessin acomplert en un escenari de normalitat, amb l'objectiu de mostrar la planificació inicial del mateix.

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi ha estat un projecte que requeria un to de dedicació, esforç i una gran quantitat d'hores. Com a tal, moltes persones m'han ajudat en el camí, guiant-me, ensenyant-me, o simplement donant-me el seu suport incondicional. Estic orgullós d'això i com a tal, volia destacar i agrair aquest fet en aquestes breus línies.

Primerament, agrair a Biosfer Teslab i tot el seu personal per l'oportunitat de treballar amb ells i pel tracte de respecte i valoració de la feina fet que han tingut cap a mi, així com la seva ràpida resposta en quan a l'acceptació de la meva sol·licitud.

A la Míriam Gil, la meva tutora professional, per haver estat el meu contacte inicial i en tot moment, per la seva atenció sempre personal i afable i per ajudar-me a donar una direcció a aquest projecte dintre un camp del qual jo no tenia prou coneixements.

A l'Enrique Oscariz, amb qui he treballat al laboratori, per haver estat un mentor tant atent i exhaustiu, per ensenyar-me tantes coses sobre la ressonància magnètica, els mètodes d'extracció de LMWM i, en general, per la seva dedicació en tots els aspectes en els que he tingut el plaer de treballar amb ell.

Al meu tutor acadèmic, el Dr. Ricardo Cordero, per la seva atenció i els seus consells respecte la realització del treball en unes circumstàncies tant adverses i estranyes com les que ha configurat el COVID-19.

Molt especialment, vull donar les gràcies a la meva família i amics, aquells que em van ajudar a seguir endavant i no llençar la tovalloleta. Al Raul i el Jordi, que hi han estat des d'abans que ningú. A l'Anabel, per haver estat la meva guia acadèmica i una amiga en aquest breu temps en que ens hem conegut. A la Leire i el Genís, per haver estat al meu costat en aquests anys d'universitat, especialment en els moments més foscs. A l'Alícia, el David, la Paula, la Noelia i la resta de persones que he conegut en aquests anys, i que han contribuït a fer que fos un dels millors períodes de la meva vida. Al Martí i la resta del meu grup de D&D, per haver estat la meva vàlvula d'escapament i un motiu per mirar amb ganes al cap de setmana. Molt especialment, a l'Elisabet, per haver esdevingut el meu pilar i la meva llum, i convèncer-me que podia seguir aguantant sempre una mica més. Per sobre de tot, vull agrair-ho als meus pares per no haver dubtat mai de mi, fins i tot quan jo no creia en mi mateix. I per últim, a totes les persones a qui estimo i respecto amb tot el cor, tot i no haver estat aquí citades, doncs no ho podria haver fet sense vosaltres.

DADES DEL CENTRE

Biosfer Teslab, empresa spin-off de la Universitat Rovira i Virgili (URV) i l'Institut de Recerca Sanitària Pere Virgili (IISPV), opera en el sector del diagnòstic in vitro amb l'objectiu de proporcionar serveis analítics per estudiar i monitoritzar les alteracions del metabolisme amb la finalitat d'avançar en el coneixement i en la millora de la salut de les persones. Els serveis van dirigits tant a universitats com a centres d'investigació, professionals sanitaris, empreses farmacèutiques, empreses alimentàries, i laboratoris d'anàlisis clíniques que desenvolupin la seva activitat en el camp de les malalties metabòliques.

Biosfer Teslab es va crear amb la voluntat de reduir al màxim el temps entre els resultats científics bàsics i la seva aplicació futura als pacients, per convertir-se en una empresa de referència a escala europea en l'anàlisi de bio-fluids, mitjançant la tecnologia d'alt rendiment de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN). Fruit d'aquesta vocació, neix el test Liposcale®, revolucionant la caracterització del perfil de lipoproteïnes (partícules que transporten els lípids pel torrent sanguini) en permetre determinar de manera directa i ràpida la grandària, la composició lipídica i el nombre de partícules 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. Aquest és el producte principal de l'empresa a dia d'avui i el focus central dels treballs allà realitzats.

Alternativament, també estan treballant en altres mètodes d'anàlisis de metabòlits de baix pes molecular en sèrum intacte, el test de glicoproteïnes en sèrum intacte, lipidòmica de sèrum, de cultius cel·lulars i de teixits (tant animals com a humans) i caracterització de metabòlits aquosos per a cultius cel·lulars, medis de cultiu i teixits/biòpsies (tant animals com a humans).



Figura 1: Logotip de Biosfer Teslab

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	3
DADES DEL CENTRE	4
ÍNDEX	5
RESUM	6
INTRODUCCIÓ	7
Metabolòmica: aplicacions i evolució	7
Metabòlits de baix pes molecular (LMWM)	8
LMWM en femta: alteracions i diferències respecte altres matrius	10
Ressonància magnètica de protó (H-RMN)	10
Discussió dels principals mètodes d'extracció	11
Avantatges de l'automatització del procés	12
HIPÒTESI I OBJECTIU	14
MATERIALS I MÈTODES	15
Pre-processament de les mostres	15
Extracció de LMWM de femta	15
Anàlisi per RMN	18
Refinament del mètode PBS. Proves de proporcions	18
Automatització del procés	19
<i>Software</i> utilitzat	19
RESULTATS I DISCUSSIÓ	20
Discussió del mètode òptim	20
Anàlisi dels espectres	24
Detecció de metabòlits	29
Avaluació del procés d'automatització	30
CONCLUSIONS	31
AUTO-AVALUACIÓ	32
BIBLIOGRAFIA	33
ANNEXOS	35
Espectres dels diferents mètodes: TopSpin	35

RESUM

En aquest treball, es busca determinar un mètode per a l'extracció de LMWM de femta humana, optimitzar-lo per obtenir el major rendiment i automatitzar-lo per a un ús industrial. Primerament, es va realitzar una cerca bibliogràfica de diferents mètodes, duent a la pre-selecció de dos d'ells, basats un en metanol:aigua i un altre en PBS. Posteriorment, es van realitzar una sèrie de proves per a determinar quin d'aquests oferia millor resultat, basant-nos en anàlisi amb H-RMN, i es van valorar els resultats obtinguts amb l'ajuda del *software* TopSpin. Es va seleccionar el mètode PBS, per ser més ràpid i oferir millors resultats, i es va optimitzar en proporcions i refinaments fins a seleccionar una quantitat de 0.7 mL de PBS i dos cicles de congelació descongelació.

INTRODUCCIÓ

Metabolòmica: aplicacions i evolució

Les anomenades “ciències òmiques” són, a dia d’avui, la punta de llança de la investigació, i han canviat totalment el paradigma i la forma en la que afrontem les investigacions. Hi ha una gran quantitat de disciplines, o més aviat, vessants d’aquestes que existeixen, tals com la lipidòmica, la proteòmica, la genòmica, la transcriptòmica o la metabolòmica, que s’han desenvolupat especialment des d’inicis del mil·lenni (Lo *et al.*, 2017). Unit amb l’augment de la capacitat d’anàlisis que les noves eines informàtiques, com la seqüenciació de nova generació (NGS) (Lo *et al.*, 2017) permeten, ara és possible analitzar metabòlits en massa per a estudiar el conjunt de les vies de senyalització actives i les reaccions presents en l’organisme, en comptes de veure’s limitat a una única cada vegada, cosa que ha aportat una enorme quantitat de dades (Clish, 2015) i fugir així de l’enfocament dirigit per a poder actuar amb un enfocament holístic.

La metabolòmica (*Metabolomics - an overview | ScienceDirect Topics*, no date; Jang, Chen and Rabinowitz, 2018) és la ciència que estudia el conjunt de metabòlits presents en l’organisme en un moment determinat (Deda *et al.*, 2015), així com les seves interaccions i relacions, permetent així obtenir nous biomarcadors per a generar perfils en diferents estats i així afrontar la investigació de forma no-dirigida (holística). Utilitza tècniques analítiques d’alt rendiment per estudiar alhora una gran quantitat de metabòlits en un gran rang d’espècimens (Karu *et al.* 2018), cosa que la converteix en una eina molt potent i valuosa (Jain *et al.* 2019). Com mostra la Figura 2, l’interès en la Metabolòmica ha anat en augment des dels seus inicis, cap al 1998, disparant-se de forma quasi exponencial en els últims anys, cosa que s’explica pels avenços recent mencionats.

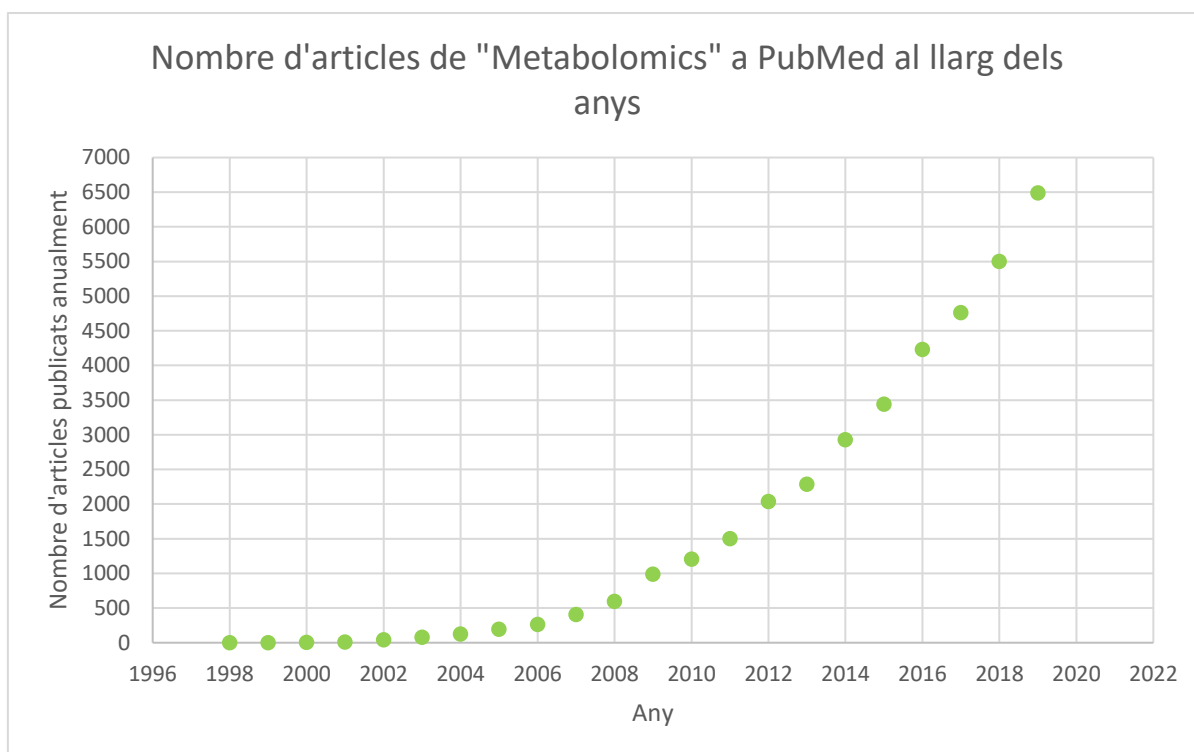


Figura 2: Nombre d'articles de "Metabolomics", evolució al llarg dels anys. Extret de PubMed ('Pubmed @ www.ncbi.nlm.nih.gov', 2003)

Tot i això, és una ciència amb certes limitacions, degut a la gran disparitat en la natura del metabòlits a analitzar, que varien en polaritat, solubilitat, i característiques fisicoquímiques, cosa que es sol solucionar mitjançant separacions en diferents extraccions (Clish, 2015). Això no obstant, engloba un gran ventall de compostos diferents, cosa que ha implicat una evolució més lenta respecte altres òmiques amb un rang més limitat.

Metabòlits de baix pes molecular (LMWM)

El que pretenem estudiar són els *Low Molecular Weight Metabolites* (LMWM), un terme generalista que agrupa una gran quantitat de composts de baix pes molecular que intervenen en el metabolisme de l'organisme. Això inclou metabòlits energètics, com podria ser la glucosa, el lactat, o el succinat; d'altres derivats de la dieta, com la xilosa o la galactosa; així com tot tipus de *Short Chain Fatty Acids* (SCFA) o aminoàcids. Un llistat dels metabòlits que ja avui en dia s'ofereixen com a part de l'anàlisi de LMWM a Biosfer està present en la Taula 1.

Taula 1: Llista de metabòlits detectats en femta amb el mètode actual de Biosfer

Llista de metabòlits detectats en femta	
Tipus de metabòlits	Metabòlit
Àcids grassos de cadena curta	Format
	Propionat
	Valerat
	Acetat
	Butirat
	Isobutirat
	Isovalerat
Aminoàcids	Lisina
	Alanina
	Glicina
	Glutamat
	Metionina
	Tirosina
	Fenilalanina
	Valina
	Leucina
	Isoleucina
Metabolisme microbià	TMAO
	Dimetilamina
Metabolisme de la glucosa	Glucosa
	Lactat
	Succinat
Metabolisme de la dieta	Xilosa
	Galactosa
Metabolisme pirimidina	Uracil
	Uridina
Metabolisme purines	Oxipurinol
	Hipoxantina
	Inosina
	2-deoxiinosina
Altres	Creatina
	Creatinina
	Malonat
	Colines
	3-fenilpropionat

LMWM en femta: alteracions i diferències respecte altres matrius

La capacitat d'analitzar els metabòlits presents en l'organisme en un moment determinant ens permet valorar-ne l'estat i establir patologies, si en coneixem les alteracions que aquestes causen. La femta és una matriu interessant a estudiar per diversos motius: mostren la interacció de l'organisme amb la microbiota (Jain *et al.* 2019), la qual fa una important funció, que implica la absorció de nutrients, la regulació energètica, o la transformació de xenobiòtics. Malgrat aquests poden ser presents en d'altres matrius, aquesta n'és especialment adequada degut al seu origen. No són mètodes intrusius, pel que són més pràctics pels pacients i tot això, mentre segueixen detectant una gran quantitat de metabòlits.

En el cas de la femta, especialment, aquesta permet també estudiar malalties com la malaltia inflamatòria intestinal, els tipus principals dels quals són la malaltia de Crohn i la colitis ulcerosa (Deda *et al.*, 2015; Lamichhane *et al.*, 2015). També es pot estudiar el càncer colorectal (Le Gall *et al.*, 2018), en el qual, entre d'altres, hi ha nivells elevats de isovalerat, isobutirat i fenilacetat; així com es poden estudiar malalties cardiovasculars, aterosclerosi o diabetis (Jain *et al.* 2019).

Ressonància magnètica de protó (H-RMN)

La espectroscòpia de H-RMN és una eina potent amb capacitat per a l'estudi de l'estructura, la dinàmica, i les interaccions de molècules biològiques (Marion, 2013), així com per a l'anàlisi metabolòmic de diferents matrius biològiques. Aquesta tècnica es basa en la capacitat dels nuclis atòmics per a ser magnèticament actius. Això s'anomena espín, i únicament es manifesta en nuclis amb un nombre senar de protons, neutrons o ambdós. El ^1H i el ^{13}C són les espectroscòpies més comunes. Així doncs, tractant el nostre cas de H-RMN, estarem parlant d'una espectroscòpia basada en H.

En aquesta tècnica, es sotmeten els nuclis magnèticament actius sota la influència d'un camp magnètic, el qual provoca que els espins, abans aleatoris, s'orientin en dues posicions: o bé en espín positiu (seguint la direcció del camp), que és l'estat anomenat de mínima energia, o bé en espín negatiu (oposat al camp), que és l'estat anomenat de màxima energia. Un cop ja s'ha aplicat el camp magnètic, s'irradia la mostra amb un pols de radiació de la zona de radiofreqüència, que duu a un canvi en l'estat energètic,

que causa que els nuclis entrin en ressonància. L'espectròmetre detecta l'energia alliberada pels nuclis al tornar al seu estat energètic original, i l'avalua sobre el temps (a aquesta representació se l'anomena *Free Induction Decay*). Després s'aplica la transformada de Fourier per a passar de domini temps a domini freqüència. La freqüència es divideix per una freqüència de referència per tenir així una unitat independent del camp magnètic de l'espectròmetre (desplaçament químic en ppm), tal com es descriu en la Figura 3. L'espectre resultant contindrà senyals que apareixeran a desplaçaments químics concrets, i la intensitat serà proporcional al nombre de nuclis que contribueixen a ella (Shi *et al.*, 2007).

$$\delta = \frac{\nu_{\text{muestra}} - \nu_{\text{ref.}}}{\nu_{\text{ref.}}} \times 10^6$$

Figura 3: Fórmula que descriu el desplaçament químic d'un protó dintre l'espectre. El desplaçament químic és igual a la freqüència de la mostra menys una freqüència de referència (TSP en el nostre cas), partit entre la freqüència de referència adequada per l'aparell utilitzat.

Aquestes freqüències d'absorció varien entre nuclis, ja que cadascun està en un entorn químic determinat, i poden presentar variacions degut a l'apantallament. Per altra banda, cada metabòlit té associada una senyal a l'espectre de RMN, la intensitat de la qual és proporcional a la concentració del metabòlit i la deconvolució de l'àrea de la senyal permet quantificar la concentració del metabòlit.

Discussió dels principals mètodes d'extracció

La selecció d'un mètode d'extracció és un punt crític per a la realització d'estudis metabolòmics. Els solvents, temps, procediments, i altres punts del mètode tindran un impacte determinant en quins metabòlits s'extrauran, però també en la capacitat de distingir-los o les interferències, pel que en una disciplina amb un rang tant gran de molècules a comparar, generalment es busca un mètode amb capacitat per a molts tipus diferents. Amb aquests objectius, es va dur a terme una recerca exhaustiva de bibliografia, en la qual es van comparar diversos mètodes.

L'extracció de metabòlits amb metanol és un mètode comú en l'estudi de LMWM (Deda *et al.*, 2015). El metanol és un solvent apolar molt adequat pel tipus de finalitat que es busca (Lamichhane *et al.*, 2015). Generalment, es considera més ràpid i menys complex el mètode que usa PBS, però el metanol pot revelar metabòlits que en certs casos no mostren tal presència amb altres mètodes, tals com N-acetils, residus lípids, i certes senyals anomèriques dels carbohidrats (Lamichhane *et al.*, 2015).

El mètode basat en PBS (*buffer* de fosfat sòdic) va ser seleccionat a partir de la bibliografia, on s'observa com el mètode més comú (Deda *et al.*, 2015). El nostre procediment es descriu en l'article de Kostidis (Kostidis *et al.*, 2017), el qual ajusta certes proporcions per a femta. Això és perquè aquest tipus d'extracció s'ha usat també per orina, com fa Shi (Shi *et al.*, 2007), el qual és una modificació de Beckwith-Hall (Beckwith-Hall *et al.*, 1998), el qual fou desenvolupat per plasma. El PBS regula el rang de pH, un punt clau ja que un desequilibri en aquest pot degradar molts dels metabòlits. Posteriorment s'afegeix àcid 3-trimetilsililpropioní-(2,2,3,3-d₄), més conegut com a TSP, que és un estàndard per a la mesura amb RMN que ens permet quantificar, pel que forma part del solvent de reconstitució, format principalment d'aigua deuterada.

Un mètode menys comú és aquell que té dos passos, un primer que incorpora acetonitril:metanol, i un segon de metanol:aigua. Això és degut a que el metanol, per si sol, té bona capacitat per extraure els metabòlits de bio-fluids humans, això no obstant, l'acetonitril ajuda a la precipitació de proteïnes, un factor d'especial importància en la femta; a més, ajuda a eliminar els fosfolípids degut a la baixa solubilitat d'aquests en acetonitril (Jain *et al.* 2019). El segon pas amb metanol:aigua és el que implica l'extracció, ja que degut a la natura no-polar del metanol posseeix un gran rang d'extracció. En aquest pas ja s'han desnaturalitzat les proteïnes, pel que la extracció és de qualitat. Aquest mètode va ser extret d'un article de *Nature Scientifics reports* Jain *et al.* 2019), però protocols similars poden ser trobats en altres publicacions (Dettmer *et al.*, no date; Deda *et al.*, 2015; Filla and Edwards, 2016; Karu *et al.* 2018).

Hi ha molts més mètodes, i tantes variacions com grups d'estudi diferents, però considerarem aquests tres com a alguns dels més rellevants per a l'estudi a realitzar.

Avantatges de l'automatització del procés

Biosfer Teslab, com a empresa, té com a objectiu poder donar sortida i aplicabilitat als coneixements en ressonància magnètica nuclear i bioinformàtica a nivell comercial. Reduir el temps de processat de mostres no només implica poder analitzar-ne un major

nombre, sinó també poder oferir preus més competitius als clients i apropar la recerca en aquest àmbit a més gent (*Nuestro valor añadido - Biosfer Teslab*, no date). Això implica processar un gran nombre de mostres en períodes breus, cosa que pot ser facilitada en gran part gràcies a l'automatització amb robot. Aquests poden processar un nombre elevat de mostres alhora, generalment unes 48-96, cosa que és més del que generalment un usuari pot manipular alhora.

Programar aquest procés requereix d'una certa inversió de temps i refinament, no obstant, aquest es recupera amb facilitat degut al rendiment molt superior que la màquina pot oferir. Així doncs, per una empresa de mida reduïda, aquest pas és essencial, doncs facilita les tasques a realitzar amb menor quantitat de treballadors, i per tant, també incrementar significativament el nombre de mostres que poden acceptar-se alhora.

HIPÒTESI I OBJECTIU

L'espectrometria magnètica nuclear de protó (H-NMR) pot utilitzar-se per a l'extracció de metabòlits de baix pes molecular (LMWM) en femta humana, i aquest mètode pot automatitzar-se per a un ús industrial.

MATERIALS I MÈTODES

Pre-processament de les mostres

Aquest treball busca poder processar mostres de femta humana per a extraure'n LMWM, principalment per estudis i aplicacions mèdiques. L'objectiu és obtenir mostres perfectament dessecades i congelades, evitant al màxim la humitat, que podria intervenir en la mesura, ja que eliminant l'aigua de la mostra, parem l'activitat biològica.

Per a fer això, les mostres arriben en tubs Eppendorf i es congelen amb nitrogen líquid, i posteriorment es processen durant un temps d'entre 24-48 hores liofilitzant-se. En el nostre cas, les mostres es van sotmetre inicialment a 5 hores de liofilització, però al veure que això no era suficient, vam procedir a ampliar aquest temps fins al matí següent, deixant-ho tota la nit treballant. Aquest temps depèn del contingut d'humitat de les mostres, i és indispensable assegurar-se un correcte processat en aquest punt per tal de poder obtenir resultats de qualitat.

Un cop aquest pas ja ha estat realitzat, es separa cada mostra en tubs de 25 mg de mostra en cadascun, per a emmagatzematge i extracció posterior, i s'emmagatzemen a -80°C.

Extracció de LMWM de femta

Havent fet l'avaluació prèvia dels potencials mètodes, es va decidir testar únicament dos mètodes: el mètode metanol:aigua i el mètode PBS. Aquests dos havien demostrat ser habituals en estudis del camp; el mètode amb el primer pas de metanol (descriu a la Figura 4) era, a l'inici de pràctiques, el mètode utilitzat a l'empresa. D'altra banda, el mètode amb acetonitril implicava passos extres i nous reactius, que suposen un sobrecost i un augment de temps de processat respecte els altres dos, pel que degut a la poca diferència de resultats establerta en la bibliografia, decidim descartar aquest mètode.

En quant a materials, la gran majoria és compartit. A banda del material fungible habitual en qualsevol pràctica de laboratori (com puntes, pipetes, Eppendorf i demés), en ambdós protocols es necessita un vòrtex, un sonicador i el *buffer* PBS deuterat. Per

altra banda, cada protocol implica un solvent d'extracció diferent, i a més, el mètode metanol:aigua requereix de *speedvac* per al assecat.

Les proves es van realitzar seguint els procediments de les Figures 4 i 5, i els pesos de les mostres s'inclouen a la Taula 2.

Taula 2: Pesos reals de les proves de mètode

Nom de la prova	Pes teòric	Pes real	Congelació
MeOH 5.1	5 mg	5.4 mg	No
MeOH 5.2	5 mg	5.4 mg	No
MeOH 10.1	10 mg	10.1 mg	No
MeOH 10.2	10 mg	10.2 mg	No
MeOH 20.1	20 mg	20.3 mg	No
MeOH 20.2	20 mg	20.5 mg	No
PBS 1	12.5 mg	12.3 mg	No
PBS 2	12.5 mg	12.7 mg	No
PBS 3	25 mg	24.9 mg	Sí
PBS 4	25 mg	25.3 mg	Sí
PBS 5	25 mg	25.5 mg	Sí

Posteriorment, vam decidir afegir un pas extra al procediment: dos cicles de congelació/descongelació, cadascun d'ells de 30 minuts a -80°C . Aquest procediment es realitza amb el propòsit de disminuir el soroll de fons i és habitual en molts articles (Deda *et al.*, 2015; Kostidis *et al.*, 2017), i nosaltres busquem comprovar si millora el procés d'extracció i si aquests passos varien l'estabilitat.

El primer mètode que descriurem, doncs, és el de metanol, tal qual es pot observar a la Figura 4.

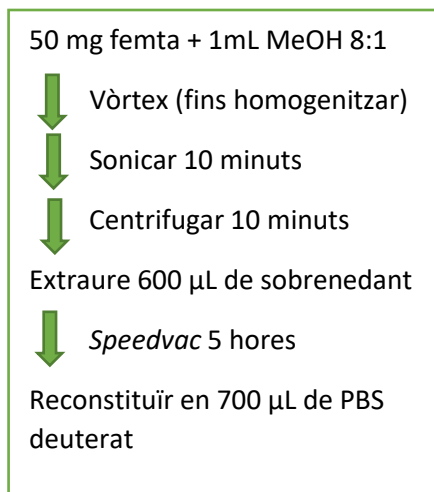


Figura 4: Procediment inicial per a l'extracció de LMWM en fema amb metanol:aigua

En aquest, es va voler ajustar la concentració mínima de fema necessària per a obtenir resultats significatius i de qualitat, doncs es va poder observar durant la preparació de mostres que en molts casos les quantitats de mostres proporcionades eren insuficients pel plantejament inicial. Amb això en ment, es van plantejar proves amb quantitats inferiors als 50 mg pensats originalment: 5, 10 i 20 mg de fema per a 1 mL de MeOH 8:1, amb dues al·lquotes per cada quantitat.

Per altra banda, el mètode en el que s'utilitza PBS com a substrat d'extracció (descriu a la Figura 5) no havia estat provat prèviament a l'empresa, però els resultats positius de la bibliografia ens van impulsar a testar-lo.

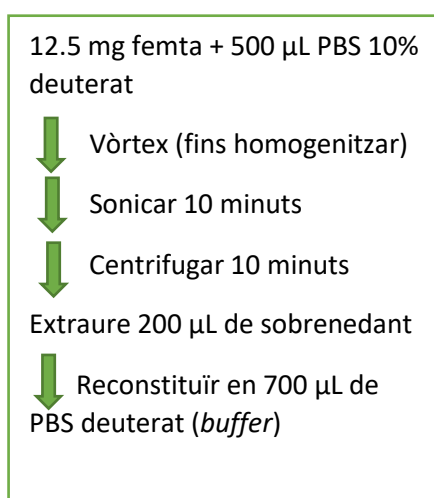


Figura 5: Procediment inicial per a l'extracció de LMWM en fema amb PBS 10%

Inicialment, es va plantejar una única prova amb 12'5 mg de femta, un pes en el mateix rang analitzat en la prova del mètode MeOH, per tal d'assolir certa comparabilitat. En cas d'èxit, es procedirien a realitzar més proves per a refinar aquest.

Anàlisi per RMN

Un cop les mostres ja han estat extretes, passem aquestes a tubs per H-RMN, destinades a Bruker 600, i s'analitzen. L'anàlisi dels espectres es realitza a la secció de Resultats. Degut a la millor definició dels pics (que permet millor deconvolució) en el mètode PBS, aquest mètode és preferible de cara al *software* de deconvolució dels espectres. A més, com s'ha comentat anteriorment, aquest procediment és més simple, més ràpid i utilitza reactius compatibles amb altres tests de l'empresa, aquest mètode resulta preferible també de cara a manipulació. En conjunt, és un procediment que ofereix molts avantatges i pocs inconvenients, pel que decidim seleccionar aquest com a punt de partida per al refinament posterior.

Refinament del mètode PBS. Proves de proporcions

En aquest punt es discuteixen quins aspectes afrontar per tal de poder obtenir els millors resultats possibles amb el mètode PBS. El primer que es va plantejar va ser incloure cicles de congelació, que en la bibliografia atorguen beneficis considerables (Kostidis *et al.*, 2017) i són ubiqües en diferents metodologies. Les proves que es proposen són 2 anàlisis amb 25 mg de femta, un amb 2 cicles de congelació/descongelació i un sense. Per minimitzar les enormes diferències interindividuals, utilitzem una mostra en la qual hi ha prou material per a fer-se servir per tots els anàlisis, pel que podem assegurar que en tots els anàlisis hi ha el mateix substrat, és a dir, són replicats amb diferents mètodes.

La dues primeres proves es van realitzar, doncs, amb 25 mg de femta i seguint el protocol habitual ja descrit a la Figura 5. Un cop es van obtenir els resultats, es van analitzar, tal com es descriu a l'apartat de Resultats.

Per aquest motiu, es va decidir fer dues proves més: una amb 700 µL de PBS, i una altra amb 1 mL de PBS, ambdues amb 2 cicles de congelació/descongelació. Això és degut a que, al llarg dels estudis, el paràmetre que més varia (i que es considera menys optimitzat) és el rati femta:PBS (Deda *et al.*, 2015). Aquestes foren les últimes proves que es varen realitzar, i el resultat d'aquestes serà el mètode seleccionat per l'empresa per al anàlisi de LMWM.

Automatització del procés

Es discuteix sobre el millor suport a utilitzar per a l'automatització del procés. Les opcions a debatre són el *Gilson PIPETMAX* i el *Aligent Velocity 11 Bravo*. Aquests tenen capacitats de processat diferents, de 48 i 96 mostres, respectivament.

No obstant, aquesta part de les pràctiques, que estava programada i havia de realitzar-se la setmana següent, no va poder dur-se a terme degut al confinament causat per la pandèmia del COVID-19.

Software utilitzat

Els programes utilitzats en el desenvolupament d'aquest treball són dos: TopSpin 4.08 (Bruker, 2019) i Chenomx (Chenomx, 2020). TopSpin és un programa utilitzat per a visualitzar i processar els espectres de H-NMR, i ha estat fet servir per a obtenir resultats sobre rendiment, capacitat d'extracció, optimització dels diferents components i realització de les diferents proves (Howe, 2016).

Chenomx és un programa que permet la identificació dels diferents metabòlits presents en un espectre, per bé que és un programa que requereix d'una feina més exhaustiva i manual, pel que es va utilitzar un cop el mètode definitiu ja va estar establert, per tal d'identificar els metabòlits capaços de ser extrets amb aquest mètode, havent discernit ja el millor d'entre els proposats. En certs casos, per tal de fer la verificació de certs metabòlits dubtosos, es va consultar la *Human Metabolome Database* (HMDB) (HMDB, 2020), una de les principals bases de dades metabolòmiques. En aquesta, es comparava la situació de certs suposats metabòlits i la forma de la seva senyal. Aquesta part no es pogué realitzar degut a les circumstàncies del COVID.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Discussió del mètode òptim

Els tres mètodes proposats es mostraren, doncs, com tres protocols comuns i amb resultats àmpliament satisfactoris, susceptibles per a un estudi posterior com a candidat a mètode d'extracció de LMWM en femta per Biosfer. És important que tingui una bona rendibilitat i que es redueixi al mínim el temps d'operari i el preu dels reactius, pel que es va decidir descartar l'acetonitril degut a que el seu cost és considerablement més elevat en comparació amb el metanol o el PBS, ja utilitzats en altres procediments de l'empresa; addicionalment, la diferència descrita a la bibliografia en quant a rendiment i a metabòlits detectats era mínima. És per això que es va decidir dur a terme proves amb els mètodes metanol:aigua i PBS. Aquest tipus de consideració són importants de cara a l'aplicació comercial del mateix en un futur. Per a totes les proves que es discuteixen a continuació, la mostra prové d'una única mostra de femta de la qual hi havia quantitat suficient per al conjunt de proves, per tal de poder garantir l'objectivitat i reproductibilitat de les valoracions.

Tal qual s'ha comentat a l'apartat anterior, el mètode PBS, al no contar amb el pas de *speedvac*, un pas d'assecat de 5 hores, és considerablement més ràpid. Addicionalment, a simple vista s'observa una major nitidesa en la mostra reconstituïda en el mètode PBS que en el mètode metanol, en el qual es pot observar terbolesa. Aquesta es manifesta també en la formació de "vels" que poden interferir en l'anàlisi per RMN ja generant contaminació en l'espectre, pel que l'operari ha de ser curós d'evitar-ho. Aquests grumolls no desapareixen malgrat es centrifugui la mostra, pel que probablement siguin degut a compostos no solubles en PBS deuterat, que implicaria una limitació pròpia del mètode que no pot ser solucionat analíticament. Aquest pas, que en el cas de manipular-se manualment no implica més que una precaució addicional, resulta una limitació important a l'hora d'automatitzar-ho, ja que un robot no pot realitzar els subtils moviments i la observació necessària per aquest. El mètode PBS, doncs, que ja inicialment és més breu, presenta la possibilitat d'automatitzar també el pas de dispensar la fase aquosa dels Eppendorf a tubs de H-RMN. Això representa un punt a favor del mètode PBS fins i tot abans de l'anàlisi del mateix en espectres.

Aquestes proves seran analitzades a l'apartat d'anàlisi d'espectres. Un cop vam haver obtingut aquestes dades, es va analitzar el valor de cada mètode. Independentment dels aspectes qualitius (que seran analitzats posteriorment), un factor important per aquest

projecte és poder aplicar-ho a nivell d'indústria i obtenir-ne el màxim rendiment possible. Per això, un anàlisi dels materials, reactius, aparells i temps implicats per cada procediment era de vital importància.

En les Figures 6 i 7, situades sota, podem observar els diversos passos implicats en els mètodes d'extracció, des del processat de mostres (assumint que aquestes han estat ja liofilitzades i congelades) fins a l'anàlisi mitjançant H-RMN. Podem observar que el pas més llarg, amb diferència, és l'assecat amb *speedvac*, que de mitjana tarda unes 5 hores, però aquest temps a més és variable en funció de la mostra i pot allargar-se.

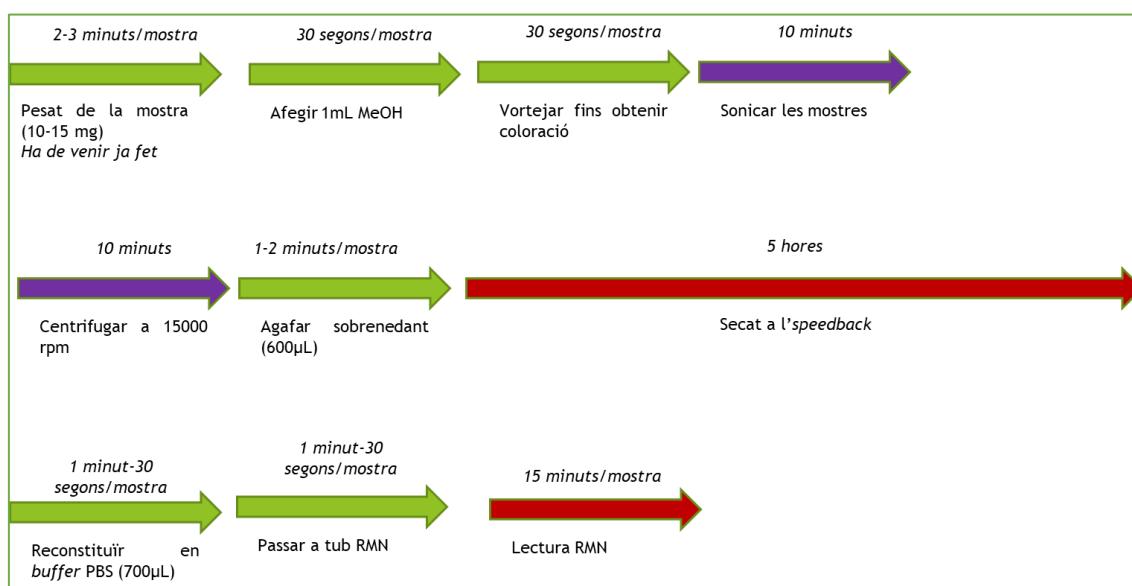


Figura 6: Cronograma del mètode Metanol:aigua, a partir de les primeres proves

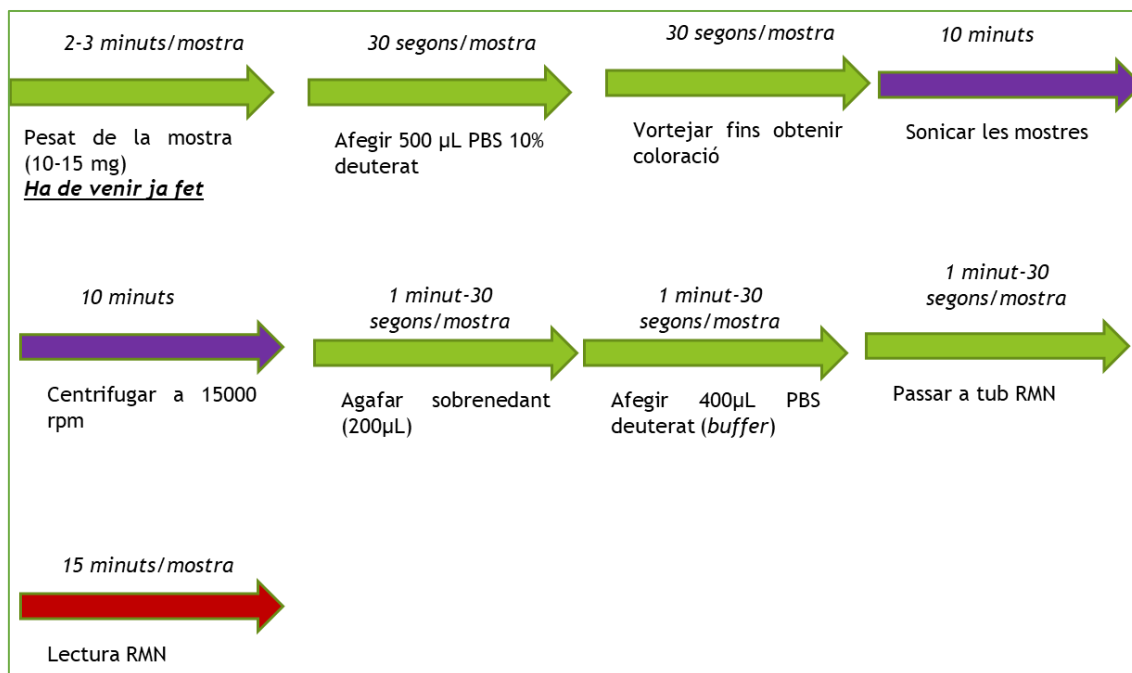


Figura 7: Cronograma del mètode PBS, a partir de les primeres proves

Així doncs, el procediment de metanol dura unes 5 hores i 45 minuts, mentre que el protocol amb PBS, uns 40 minuts aproximadament. Evidentment, això fa preferir aquest darrer mètode vers l'anteriorment utilitzat a Biosfer.

Cal mencionar que en la Figura 7, es representa el procediment sense incloure passos de congelació. Posteriorment, es va provar el mètode PBS (pel fet de ser més ràpid) incloent dos passos de congelació-descongelació, per tal de comprovar si aquesta addició podia resultar d'utilitat en el mètode, tal com s'observa en la Figura 8. Això incrementa en aproximadament 1 hora i 20 minuts el procediment, però aquest temps no requereix l'atenció de l'operari, que pot aprofitar-lo per a realitzar altres tasques, pel que no és un període crític en quant a les decisions.

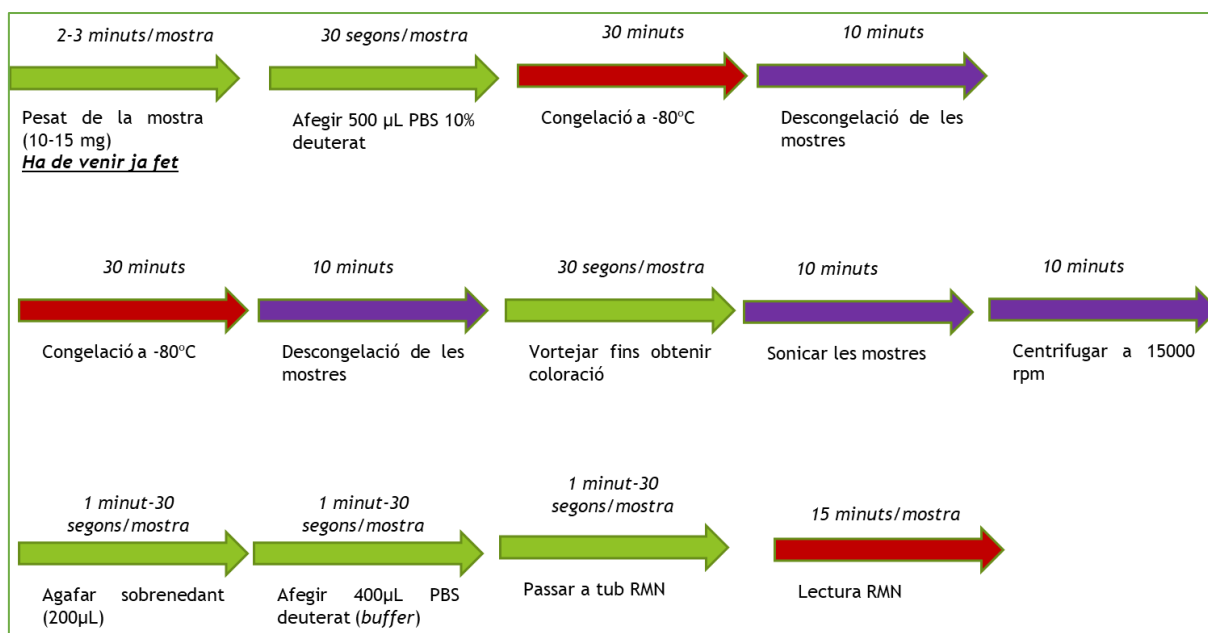


Figura 8: Cronograma del mètode PBS incloent passos de congelació-descongelació

En resum, cada mètode ens atorga uns avantatges i uns inconvenients, que cal tenir en compte a l'hora de decidir quin escollir. El mètode metanol té l'avantatge d'una efectivitat provada, i un ús aplicat a l'empresa. A més, a partir de l'apàrs en la bibliografia, considerem que hi ha potencial de millora si s'optimitzen les concentracions i s'afegeixen modificacions, com un pas de congelació-descongelació, que segons es descriu en la bibliografia (Kostidis *et al.*, 2017), millora la definició en certs pics associats a certs compostos, ampliant la capacitat del mètode. El mètode PBS, per altra banda, té com a avantatges el fet de ser molt més ràpid, per més quasi 5 hores, la no necessitat d'un pas d'assecat amb *speedvac*, que és el causant de la disminució de temps i que a més, ens simplifica les necessitats d'equipament. A més, els reactius són comuns a la preparació de mostres de sèrum a *Liposcale*, cosa que ens atorga compatibilitat i major rendibilitat en aquests.

Pel que fa als inconvenients, el mètode metanol és notablement més llarg, degut al pas d'assecat, que a més crea dependència de l'*speedvac*. El MeOH pot causar una contaminació de l'espectre si no s'asseca correctament, distorsionant els resultats, per bé que aquest problema no es va donar en el nostre cas, indicant un bon procedir. Un problema més de cara a l'automatització és la terbolesa i grumolls que s'observen. Per altra banda, el mètode PBS té com a principal problema una potencial supressió d'aigua (Price, 1999), un problema que seria observable als resultats. En tots els anàlisis que hem realitzat, es realitza una presaturació de la senyal d'aigua, que implica irradiar la

zona durant un període perllongat per tal de saturar-la i així evitar que en el moment de l'adquisició hi hagi senyal, malgrat només aconsegueix atenuar-la. En el metanol, el pas d'assecat elimina la major part de l'aigua, pel que aquesta banda amb prou feines apareix. Això no obstant, com aquesta es dona a una regió de l'espectre (4,5-5,5 ppm) on no hi ha metabòlits d'interès, en general considerem que no perdem informació.

Anàlisi dels espectres

Els diferents espectres obtinguts amb anterioritat van ser tots processats amb TopSpin per tal d'ajustar la fase i obtenir imatges analitzables (*Bruker Topspin NMR Training Manual*, no date). Primerament, cada una de les repeticions va ser estudiada individualment per observar la qualitat de l'extracció. Posteriorment, es van comparar per tal de comprovar la reproductibilitat i per seleccionar la millor d'entre les dues rèpliques presents en cada experiment, doncs com s'ha mencionat amb anterioritat, la femta és una matriu que presenta una gran variabilitat fins i tot dintre la mateixa mostra, i a més, homogeneïtzacions molt agressives duen a la degradació de metabòlits. Els espectres estan presents als Annexos, aquí es mostraran alguns dels més representatius i necessaris per a la obtenció de resultats. Allà s'inclouen totes les proves, les tries entre repeticions com a model per a altres comparacions i ampliacions justificant aquestes tries. Amb tria ens referim a escollir l'espectre que ha resultat més clar i més informatiu d'entre les dues repeticions, que teòricament són iguals, però degut a imperfeccions, a vegades poden ser lleugerament diferents, malgrat l'alta reproductibilitat del mètode, i que poden ser causades per petits errors de manipulació. Cada un d'aquests experiments es va comparar amb d'altres.

Val la pena mencionar que malgrat hem fet anàlisis comparant les dues repeticions de cada quantitat, en conjunt el mètode H-RMN ha demostrat una sensibilitat menor que altres, però sobretot una gran reproductibilitat, amb prou feines detectant diferències, que són més aviat justificades degut a la pròpia natura de la matriu, doncs la femta és en general molt heterogènia, tal qual pot ser observat en la Figura 9. Aquesta gran reproductibilitat, a més, ens permet utilitzar només dues repeticions, doncs observem com no hi ha quasi diferències.

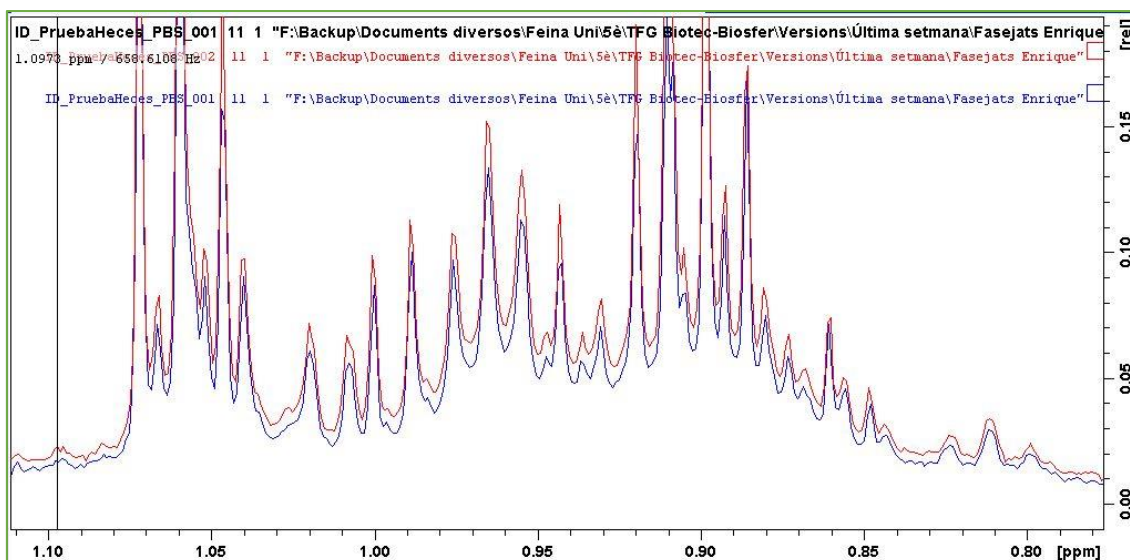


Figura 9: Espectres 1H-RMN de dos rèpliques de femta humana utilitzant el mètode d'extracció PBS. Es mostra amplificada la regió de 0.80 a 1.1 ppm, mostrant la enorme reproductibilitat del mètode.

Així doncs, tal qual s'ha descrit anteriorment, es va comparar inicialment el mètode MeOH amb el mètode PBS per tal de decidir quin ofereix millor rendiment. Primerament vam avaluar la quantitat òptima de mostra necessària per a una correcta extracció de metabòlits, i aquest es feu amb el mètode MeOH. La Figura 10 mostra aquesta comparació, i es pot apreciar com 20 mg sembla ser la quantitat més apta per als nostres propòsits, malgrat que a partir de 10 mg ja es mostren resultats satisfactoris. Pel contrari, la prova amb 5 mg no ofereix prou intensitat ni definició de senyal. Seleccionem 20 mg, doncs, com a quantitat de mostra a utilitzar.

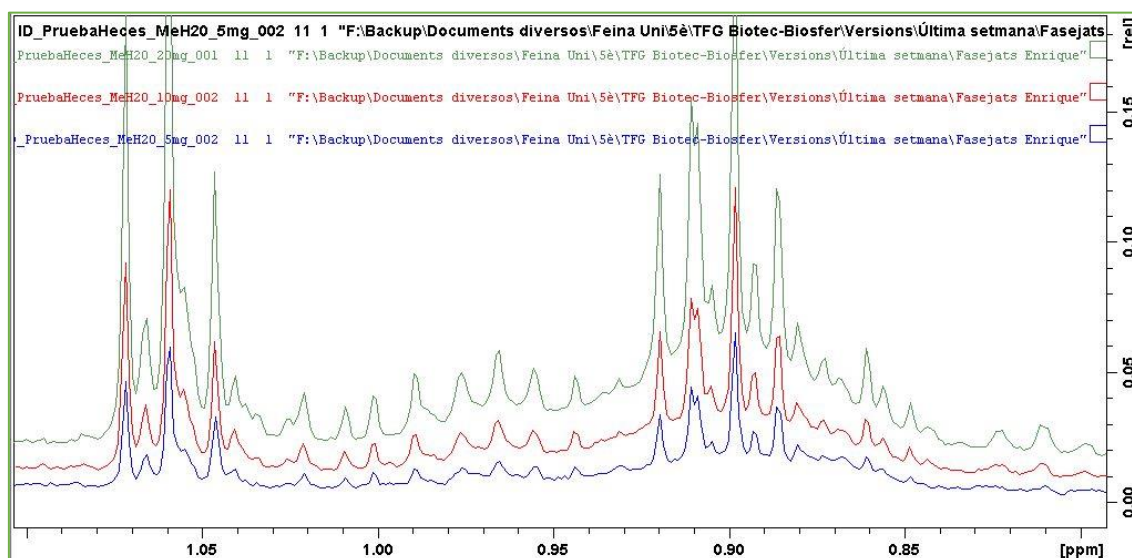


Figura 10: Espectres ^1H -RMN de femta humana utilitzant el mètode d'extracció MeOH partint de diferents concentracions de femta (5, 10 i 20 mg). Es mostra ampliada la regió entre 0.80 i 1.10 ppm per tal de valorar les diferències causades per la concentració.

Un cop ajustada la quantitat de mostra necessària per al mètode PBS, vam passar a comparar-lo amb el mètode PBS. Tal qual s'observa a la Figura 11, el mètode PBS presenta una enorme senyal entre 6 i 5 ppm, molt major que no pas en el mètode MeOH. Aquesta senyal és la senyal de supressió d'aigua, i és degut a que en el mètode MeOH hi ha el pas de speedvac, el qual és un assecat que elimina la major part d'aigua de la mostra, i al no donar-se aquest pas en l'altre mètode, aquesta posseeix aquesta senyal; a més, en MeOH es reconstitueix únicament en solvents deuterats, al contrari que en PBS (Water suppression MRA - Questions and Answers in MRI, no date). Els deuteris s'intercanvien espontàniament amb protons, pel que sempre acabarà havent-hi cert contingut d'aigua. No obstant, aquesta no ens interfereix en la determinació de cap dels composts que ens interessen, així que podem negligir aquest fet. Cal mencionar que els pesos de mostra no són iguals, ja que comparem 20 mg de femta en el mètode MeOH respecte 12.5 mg en el mètode PBS, que és el que vam trobar per la bibliografia. No obstant això, si que considerem que malgrat no pugui estudiar-se quantitativament, sí que ens serveix per estudis qualitius, doncs certs pics són inexistents en el mètode MeOH, com es pot apreciar en la Figura 12, on es veu la regió al voltant de 1.35 ppm. S'ha inclòs una ampliació d'aquesta regió, això no obstant és observable en altres punts de l'espectre, on es detecten metabòlits que abans no eren presents.

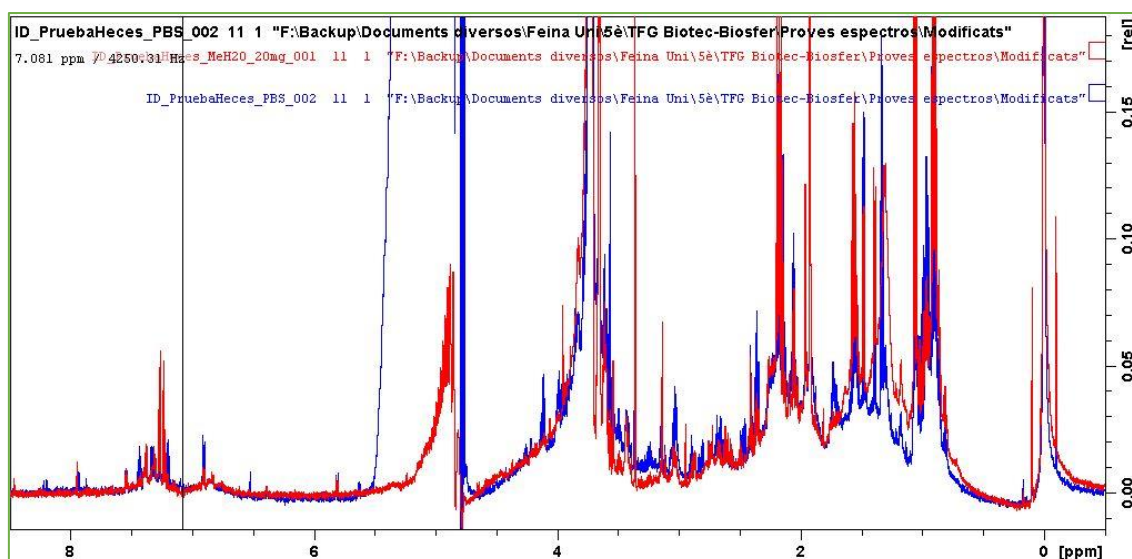


Figura 11: Espectres 1H-RMN de femta humana comparant el mètode d'extracció PBS i el mètode MeOH (20 mg).

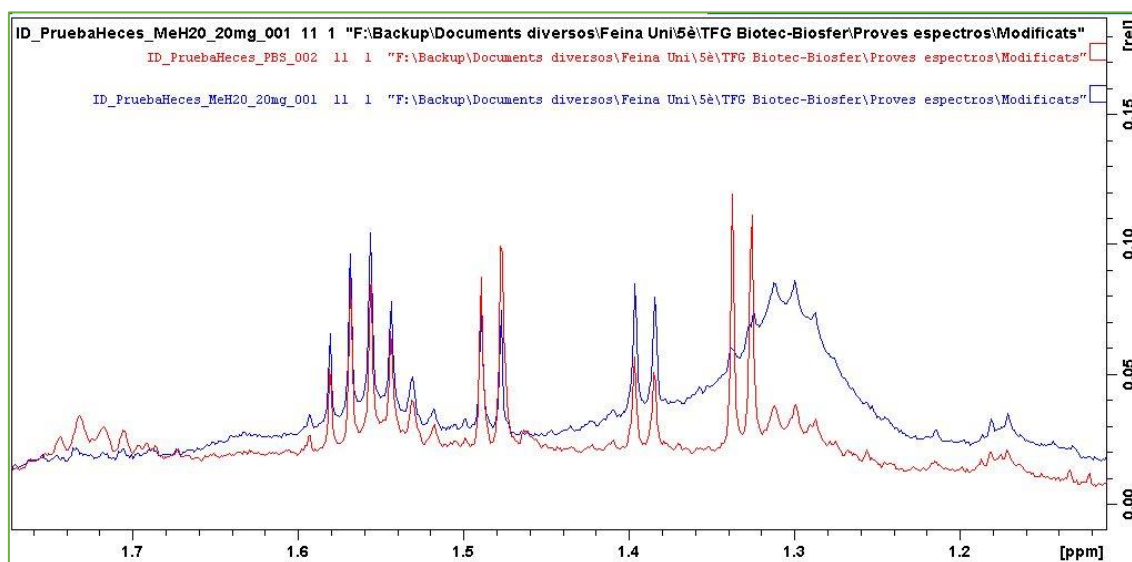


Figura 12: Comparació entre els mètodes PBS i MeOH (20 mg femta), ampliació de la regió 1.8 ppm a 1.1 ppm. Podem observar com el mètode PBS permet la identificació de nous metabòlits.

Altrament, el mètode PBS presenta major intensitat en moltes de les senyals, així com major definició, tal qual es pot observar amb major claredat en la Figura 13. Aquest factor, unit a la major practicitat tècnica que s'ha descrit amb anterioritat i el menor temps, ens duu a seleccionar aquest com a mètode per a seguir el nostre estudi.

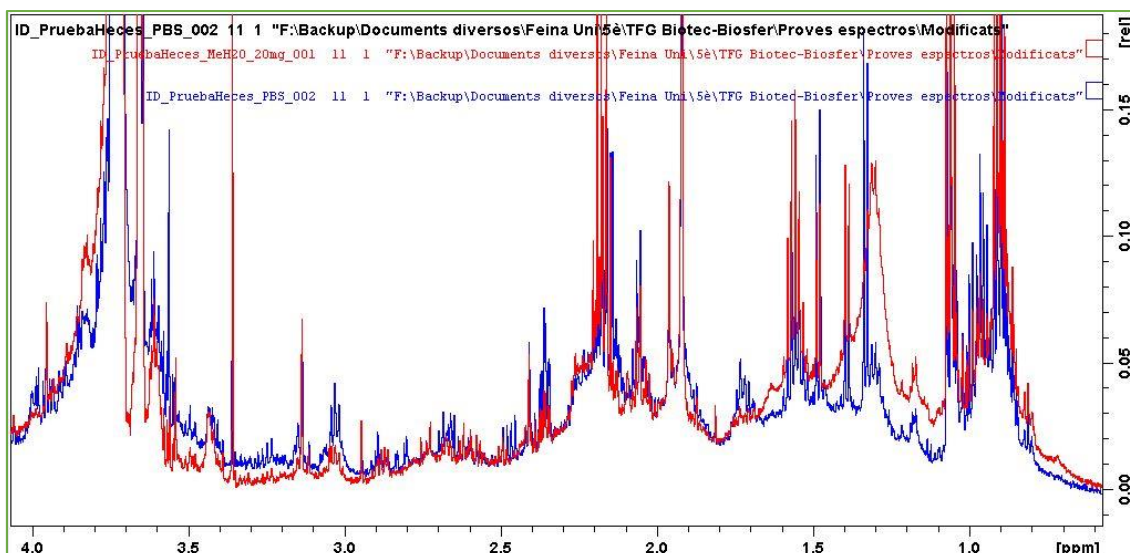


Figura 13: Secció ampliada de la comparativa dels dos mètodes, on es pot observar la major definició i major quantitat de metabòlits detectats del mètode PBS. Ampliació de la regió entre 0.6 i 4.1 ppm.

Amb l'objectiu de poder refinar aquest mètode, es va valorar la possibilitat d'incloure passos de congelació-descongelació, que segons la bibliografia són un pas comú en una molts protocols i comunament utilitzats en mètodes amb PBS. Vam decidir (tal com es descriu als Annexos) utilitzar 0.7 mL de PBS degut al menor solapament entre pics, que implica major definició, que provoca respecte l'extracció amb 1 mL, com es pot apreciar a la Figura 14.

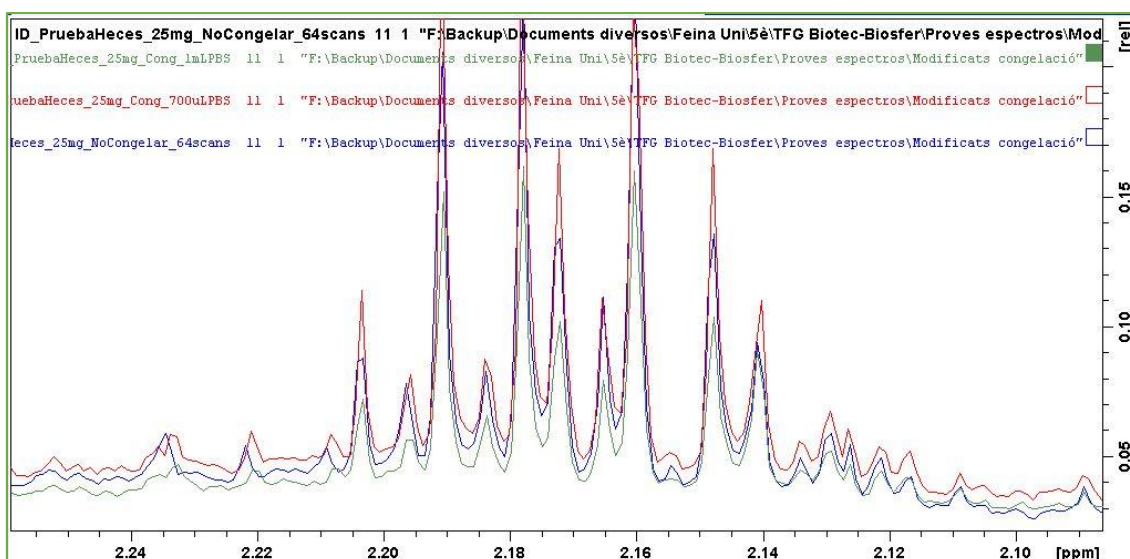


Figura 14: Comparativa de les proves amb congelació de 1 i 0.7 mL de PBS i sense congelar (amb 0.7 mL). S'observa com la prova amb 1 mL de PBS ofereix un pitjor rendiment vers les altres. Ampliació de 2.05 a 2.36 ppm.

En la Figura 15 es poden valorar els resultats d'ambdós mètodes, els quals ens van dur a la conclusió que el pas de congelació representava una millora en la definició dels pics respecte l'altre. Val la pena mencionar que la diferència, relativament baixa, entre els dos espectres pot ser causada degut a que les nostres mostres ja havien estat prèviament conservades a -80°C i havien estat un cert temps sent manipulades abans de tornar-hi, el que ja implica una sèrie de cicles de congelació-descongelació. Per tant, el que valorem és l'efecte de dos cicles seguits i estrictes, malgrat les mostres no estaven en les condicions ideals per a aquesta avaluació.

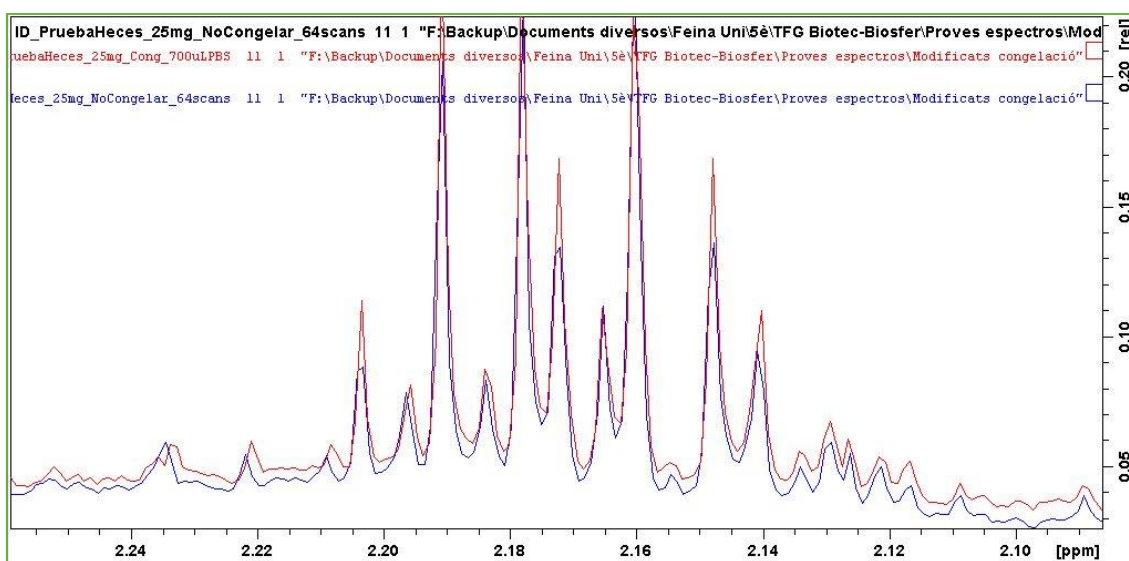


Figura 15: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode PBS utilitzant 12.5 mg de femta, un amb 0.7 mL sense congelar i un congelant, en una secció ampliada on s'observa per què seleccionem el mètode amb congelació. Ampliació de 2.05 a 2.36 ppm.

Detecció de metabòlits

Inicialment, l'objectiu era analitzar el mètode definitiu amb Chenomx per tal d'identificar cadascun dels metabòlits presents a la mostra, no obstant, això no es va realitzar degut a les circumstàncies del COVID, que dificultaren l'obtenció dels espectres fins a un període molt posterior a l'esperat.

Això no obstant, és d'esperar que, majorment, tots els metabòlits detectats amb el mètode metanol, com els citats a la Taula 1, es detectessin amb major facilitat (degut a la major definició, ja descrita, del mètode PBS respecte l'anterior), i probablement fos possible detectar-ne algun d'altre. Aquest seria un punt a ampliar en futures etapes del projecte.

Avaluació del procés d'automatització

Es volgué automatitzar, doncs, el mètode PBS amb pas de congelació, no obstant, degut a les circumstàncies del COVID-19, això no fou possible.

CONCLUSIONS

En aquest treball, es va pretendre cercar, optimitzar i automatitzar un mètode per a l'extracció de LMWM en femta humana per a un ús industrial i de recerca. Aquest objectiu ha estat parcialment assolit, per bé que la darrera part no ha estat possible degut a la crisi del COVID-19.

En l'àmbit de la selecció de mètode, la recerca bibliogràfica, malgrat trobar certa varietat de tècniques, va acabar reduint els candidats principals a dos: el mètode d'extracció amb PBS i el mètode d'extracció amb metanol. Aquests foren posteriorment assajats i estudiats per tal de comparar el mètode òptim i refinar-lo, que resultà ser el mètode PBS. Aquest fou seleccionat i optimitzat per l'ús intencionat, que era ser compatible amb una automatització del mateix per tal de permetre un processat de moltes mostres alhora.

Aquest darrer objectiu no va ser possible degut al tancament del COS, i al fet de ser una feina que requereix treball in situ. Això no obstant, tot el procediment està llest per ser aplicat.

Considerem, doncs, aquests resultats com a satisfactoris i a l'assoliment dels objectius proposats.

AUTO-AVALUACIÓ

Aquest treball deriva de la meva experiència de pràctiques curriculars, realitzada amb Biosfer Teslab. El motiu pel que vaig seleccionar aquestes pràctiques fou, principalment, per a intentar ampliar la meva perspectiva respecte al que l'àmbit de la Bioquímica/Biotecnologia té per aportar a nivell laboral. Ja havia realitzat amb anterioritat pràctiques extracurriculars, en el grup TecnEnol de la Universitat Rovira i Virgili, en el transcurs dels tres estius anteriors a aquest curs, cosa que em va servir per a refinar les meves habilitats de manipulació de mostres i treball en laboratori, i em va aportar una visió de la vessant d'investigació en una entitat pública. És per això que vaig voler col·laborar amb una empresa, per veure l'aplicació del nostre camp a la indústria.

Les pràctiques es van realitzar, majorment, al Centre de Ciències Òmiques (COS. Les tasques de laboratori realitzades allà van ser relativament similars a les que havia realitzat amb anterioritat en les altres pràctiques, doncs es van basar en l'extracció de metabòlits de femta humana, així com una feina extensiva de preparació de mostres. En aquest sentit, l'experiència prèvia en extracció de DNA va resultar molt útil. El punt més novedós per mi fou treballar amb ressonància magnètica nuclear de protó (^1H -RMN), un aparell que, degut al seu volum i complexitat, no és habitual en les pràctiques que es realitzen en la carrera, i que pel contrari és la tecnologia central de l'empresa. Aquesta pràctica fou complexa i enriquidora per mi, doncs malgrat la preparació és prou simple, la interpretació dels espectres obtinguts i l'aprenentatge del software relacionat han estat reptes. Va faltar poder completar l'automatització del procediment per robot, cosa que m'hagués agradat aprendre, però ja hem parlat amb Biosfer per poder completar aquesta part del projecte un cop es pugui tornar a accedir als laboratoris, independentment de que acabi al TFG o no.

El major aprenentatge, però, vingué de les reunions d'empresa, en les que es planifiquen les tasques, s'avaluen els resultats obtinguts, i es plantegen els passos a seguir. Des del primer dia, se'm permeté intervenir en aquestes amb total llibertat i se'm va demanar l'opinió sobre diferents temes, cosa que em va forçar a considerar tots els punts de la meva formació i a aprendre a marxar forçades sobre un tema (RMN) que no dominava en absolut. Aquesta integració en l'equip ha estat sens dubte el punt més valuós d'aquestes pràctiques, aconseguint que em sentís valorat no només per les capacitats tècniques d'operar amb certs procediments, sinó per les idees i coneixements a aportar al projecte comú, un punt que sovint he trobat que manca en altres enfocaments de pràctiques.

BIBLIOGRAFIA

Beckwith-Hall, B. M. *et al.* (1998) *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic and Principal Components Analysis Investigations into Biochemical Effects of Three Model Hepatotoxins*. Available at: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (Accessed: 14 June 2020).

Bruker (2019) 'Software for NMR Data Analysis and NMR Spectra Data Procession | Bruker'. Available at: <https://www.bruker.com/products/mr/nmr/software/topspin.html> (Accessed: 25 June 2020).

Bruker Topspin NMR Training Manual (no date).

Chenomx (2020) 'Chenomx Inc | Metabolite Discovery and Measurement'. Available at: <https://www.chenomx.com/> (Accessed: 25 June 2020).

Clish, C. B. (2015) 'Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine', *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, 1. doi: 10.1101/mcs.a000588.

Deda, O. *et al.* (2015) 'An overview of fecal sample preparation for global metabolic profiling', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V., 113, pp. 137–150. doi: 10.1016/j.jpba.2015.02.006.

Dettmer, K., Aronov, P. A. and Hammock, B. D. (no date) *MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLOMICS*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904337/pdf/nihms21280.pdf> (Accessed: 12 May 2020).

Filla, L. A. and Edwards, J. L. (2016) 'Metabolomics in diabetic complications.', *Molecular bioSystems*. Royal Society of Chemistry, 12(4), pp. 1090–105. doi: 10.1039/c6mb00014b.

Le Gall, G. *et al.* (2018) *Metabolite quantification of faecal extracts from colorectal cancer patients and healthy controls*, *Oncotarget*. Available at: www.oncotarget.com (Accessed: 28 January 2020).

HMDB (2020) *Human Metabolome Database: About the Human Metabolome Database*. Available at: <https://hmdb.ca/about> (Accessed: 25 June 2020).

Howe, D. (2016) *Processing With Topspin*.

Jain, A., Li, X. H. and Chen, W. N. (2019) 'An untargeted fecal and urine metabolomics analysis of the interplay between the gut microbiome, diet and human metabolism in Indian and Chinese adults', *Scientific reports*, 9. doi: 10.1038/s41598-019-45640-y.

Jang, C., Chen, L. and Rabinowitz, J. D. (2018) 'Metabolome_review_Cell2018', *Cell*. Elsevier Inc., 173(4), pp. 822–837. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.055.

Karu, N., Deng, L., Slae, M., Guo, A. C., Sajed, T., Huynh, H., Wine, E. and Wishart, David S. (2018) *A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal*

metabolome database, *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.aca.2018.05.031.

Karu, N., Deng, L., Slæ, M., Guo, A. C., Sajed, T., Huynh, H., Wine, E. and Wishart, David S (2018) 'A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database'. doi: 10.1016/j.aca.2018.05.031.

Kostidis, S. *et al.* (2017) '1H-NMR analysis of feces: New possibilities in the helminthes infections research', *BMC Infectious Diseases*. BMC Infectious Diseases, 17(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12879-017-2351-7.

Lamichhane, S. *et al.* (2015) 'Strategy for Nuclear-Magnetic-Resonance-Based Metabolomics of Human Feces'. doi: 10.1021/acs.analchem.5b00977.

Lo, A. W. *et al.* (2017) "Omic" Approaches to Study Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence'. doi: 10.1016/j.tim.2017.04.006.

Marion, D. (2013) 'An Introduction to Biological NMR Spectroscopy*'. doi: 10.1074/mcp.O113.030239.

Metabolomics - an overview | ScienceDirect Topics (no date). Available at: [https://www-sciencedirect-com.sabidi.urv.cat/topics/medicine-and-dentistry/metabolomics](https://www.sciencedirect-com.sabidi.urv.cat/topics/medicine-and-dentistry/metabolomics) (Accessed: 12 May 2020).

Nuestro valor añadido - Biosfer Teslab (no date). Available at: <https://biosferteslab.com/quienes-somos/nuestro-valor-anadido/> (Accessed: 16 June 2020).

Price, W. S. (1999) 'Water Signal Suppression in NMR Spectroscopy', *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Academic Press, 38(C), pp. 289–354. doi: 10.1016/S0066-4103(08)60040-X.

'Pubmed @ Wwww.Ncbi.Nlm.Nih.Gov' (2003), p. 290. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=8023347>.

Shi, C. *et al.* (2007) 'NMR-spectroscopy-based metabonomic approach to the analysis of Bay41-4109, a novel anti-HBV compound, induced hepatotoxicity in rats', *Toxicology Letters*, 173, pp. 161–167. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.07.010.

Water suppression MRA - Questions and Answers in MRI (no date). Available at: <http://mri-q.com/water-suppression.html> (Accessed: 8 July 2020).

ANNEXOS

Espectres dels diferents mètodes: TopSpin

Incloem aquí els espectres individuals de cadascuna de les proves que es van realitzar. Tots ells han estat processats utilitzant el mateix mètode, analitzats a partir d'una única mostra i amb el mateix espectròmetre de H-RMN. A més, la visualització aquí adjunta s'amplia a tots per igual mesura, amb l'ànim de poder ser valorat amb la màxima objectivitat possible en un estudi d'aquest tipus. Podem apreciar que entre les dues repeticions de cada procediment, els resultats són quasi idèntics, mostrant clarament la altíssima reproductibilitat de la H-RMN, que no és present en altres mètodes d'estudi. Els resultats aquí presentats s'ordenen de la següent forma: primerament, s'inclouen els espectres individuals de cada repetició, posteriorment, s'inclou un gràfic solapant els dos espectres, i posteriorment es mostra una ampliació d'aquest en algun punt on la diferència sigui notòria per tal de seleccionar una de les repeticions.

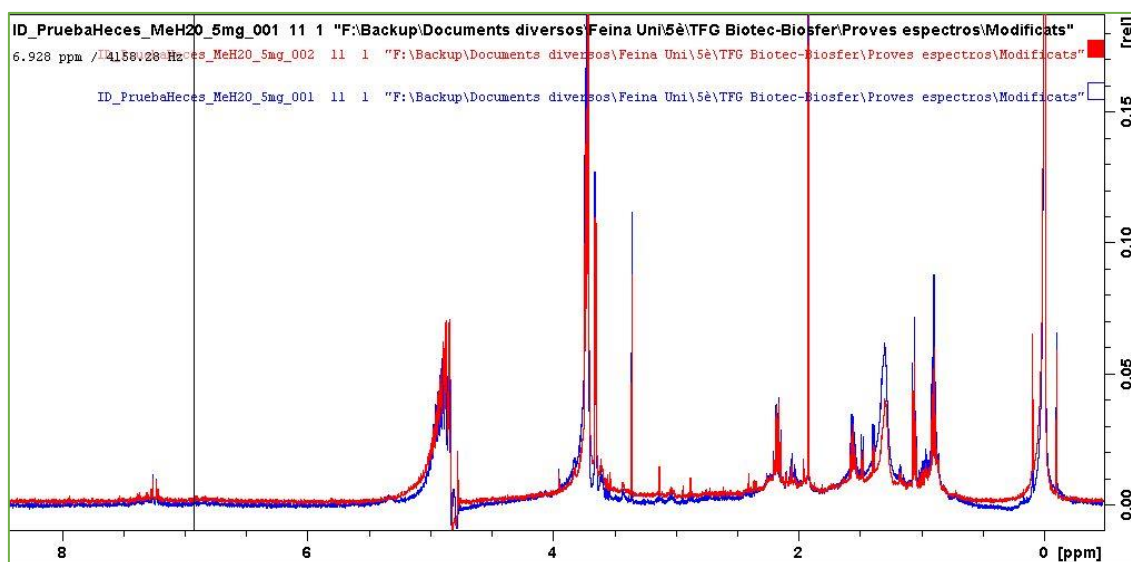


Figura 16: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode MeOH utilitzant 5 mg de femta.

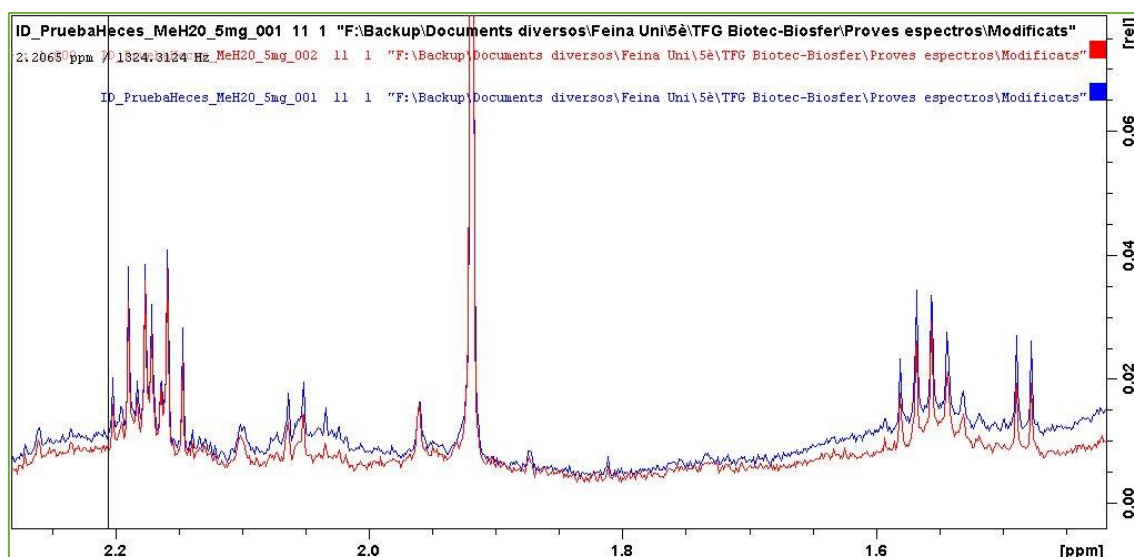


Figura 17: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode MeOH utilitzant 5 mg de femta, en una secció ampliada on s'observa per què seleccionem el mètode 2

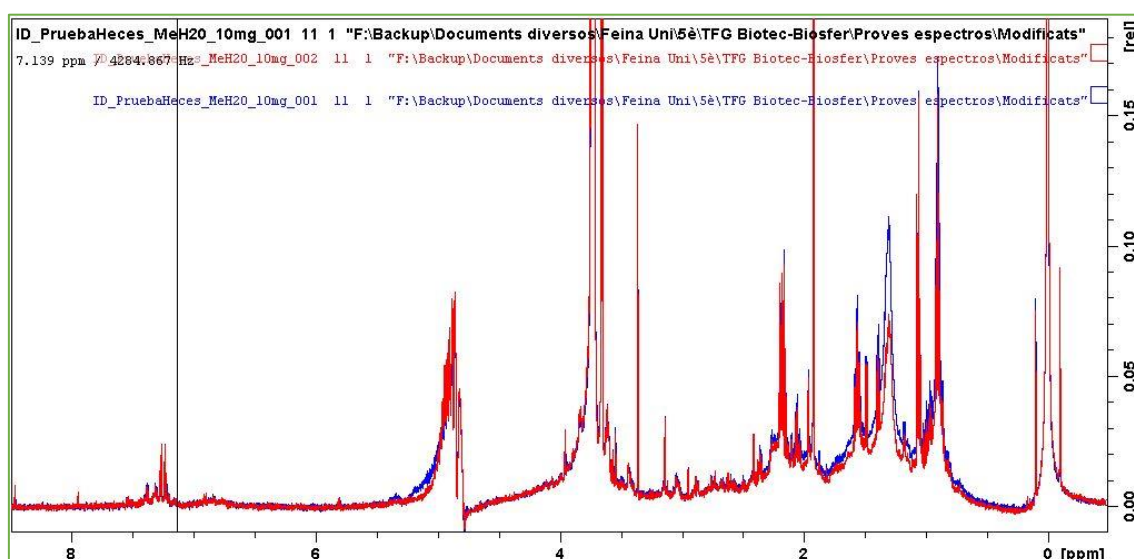


Figura 18: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode MeOH utilitzant 10 mg de femta

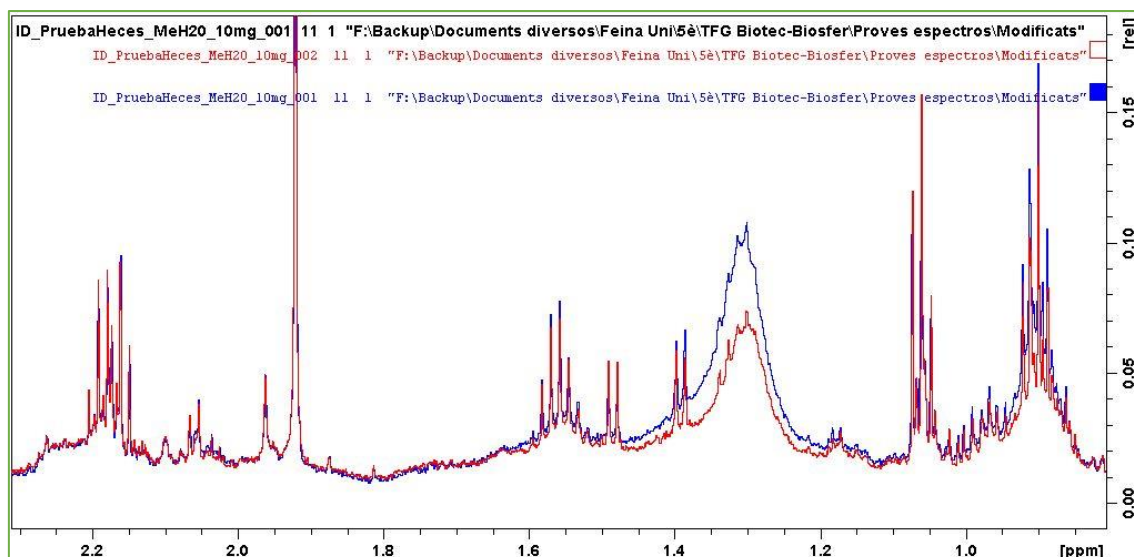


Figura 19: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode MeOH utilitzant 10 mg de femta, en una secció ampliada on s'observa per què seleccionem el mètode 2

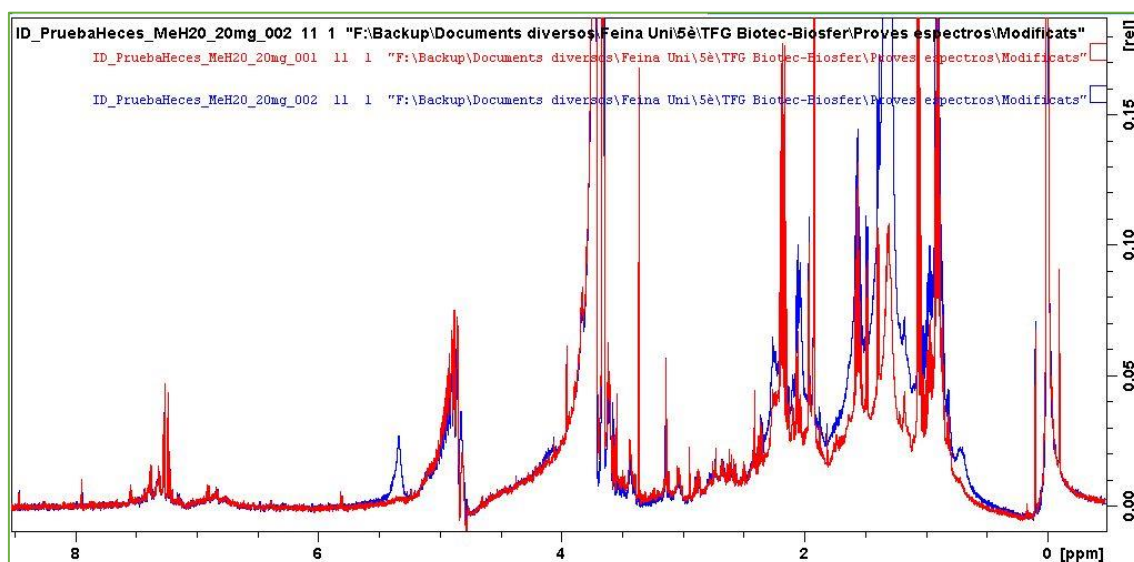


Figura 20: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode MeOH utilitzant 20 mg de femta

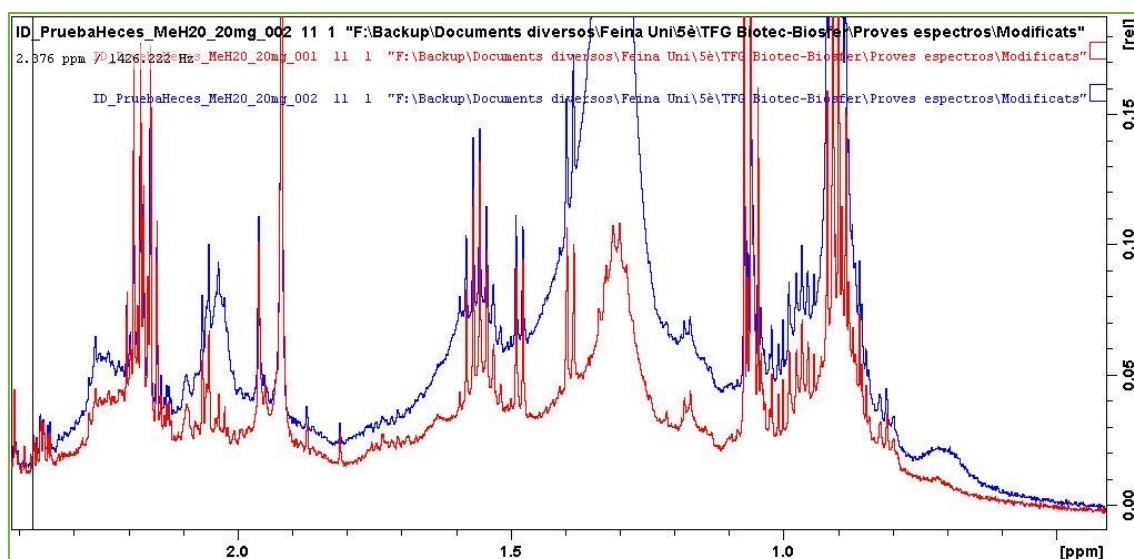


Figura 21: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode MeOH utilitzant 20 mg de femta, en una secció ampliada on s'observa per què seleccionem el mètode 1

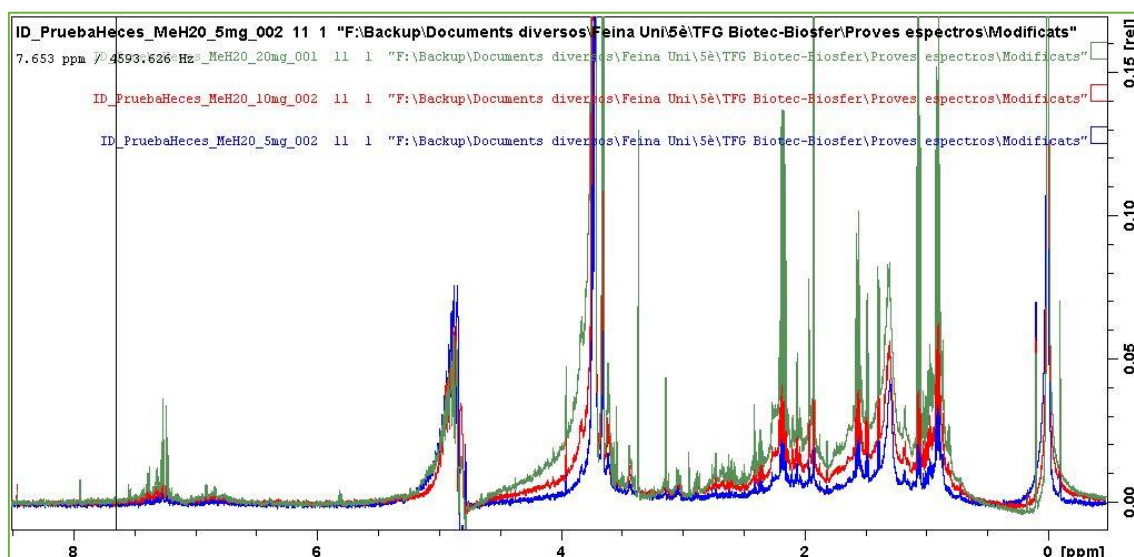


Figura 22: Imatge comparativa dels espectres del mètode MeOH amb diferents quantitats de femta. Aquesta es realitza amb les proves òptimes a partir de les versions seleccionades.

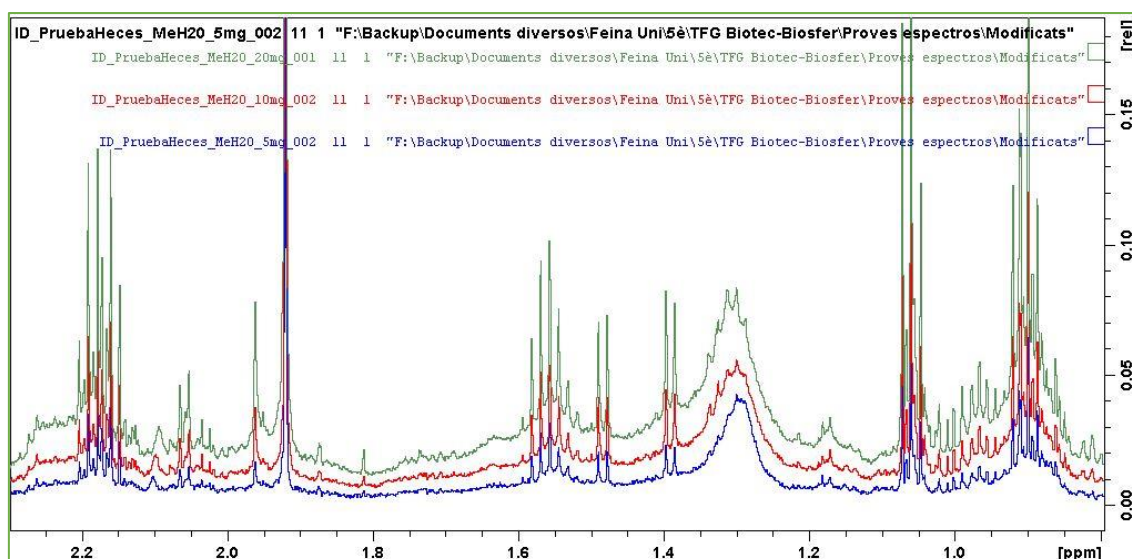


Figura 23: Imatge comparativa dels espectres del mètode MeOH utilitzant diverses quantitats de femta, en una secció ampliada on s'observa per què considerem la quantitat òptima entre 10 i 20 mg de femta, on es mostra major definició però també major apantallament a més quantitat.

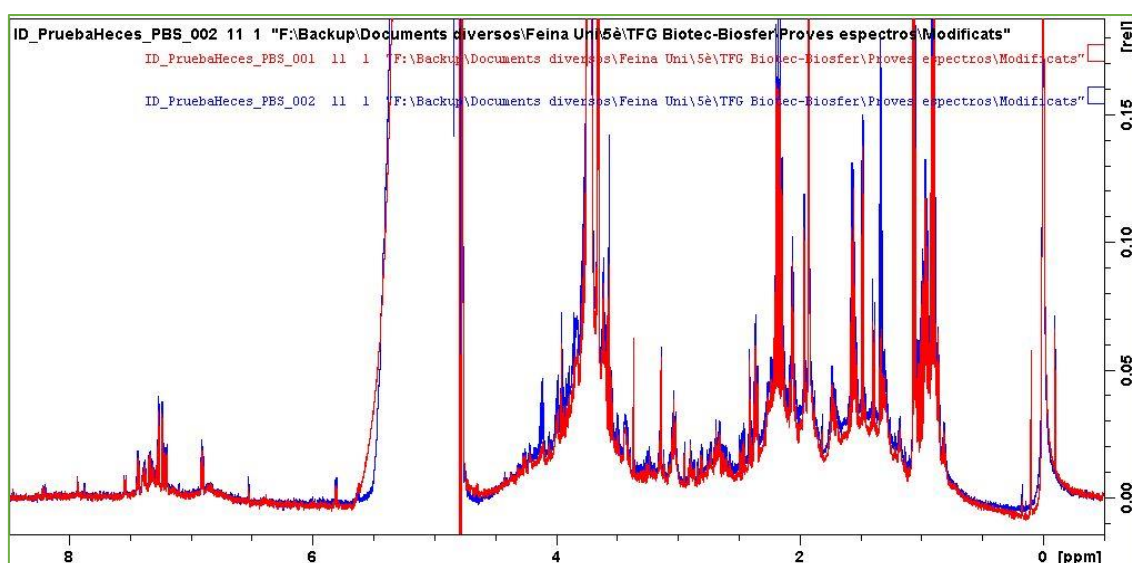


Figura 24: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode PBS utilitzant 12.5 mg de femta

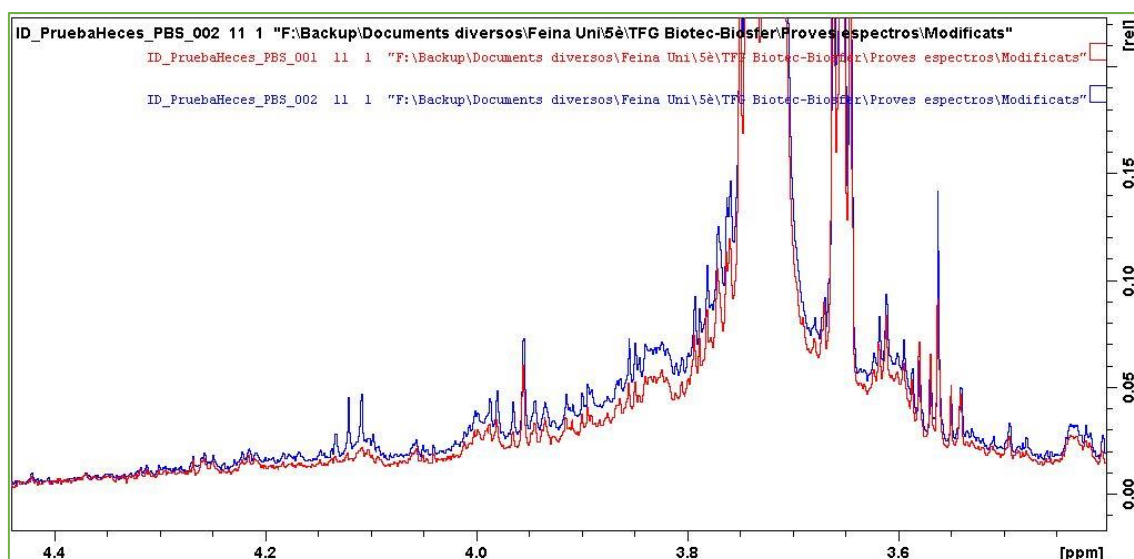


Figura 25: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode PBS utilitzant 12.5 mg de femta, en una secció ampliada on s'observa per què seleccionem el mètode 2

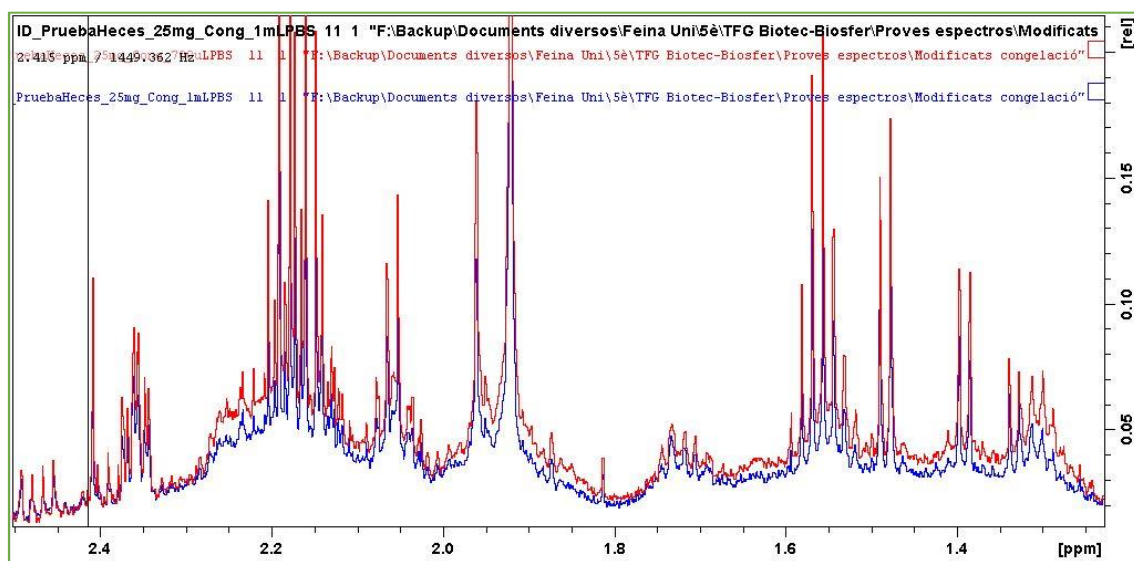


Figura 26: Imatge comparativa dels dos espectres del mètode PBS utilitzant 12.5 mg de femta, ambdós amb pas de congelació, en una secció ampliada on s'observa per què seleccionem usar 0.7 mL.

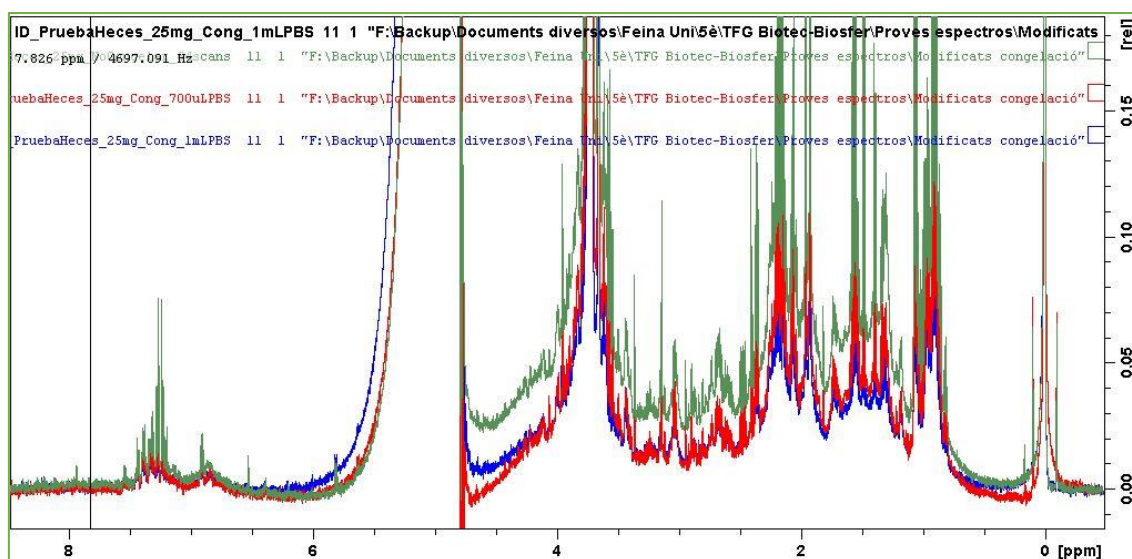


Figura 27: Imatge comparativa dels espectres del mètode PBS, amb i sense pas de congelació