

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Otimização de separação de Ácidos Biliares por  
HPLC acoplada a MS/MS**

**Maria Beatriz Forja Paz**  
**Pedro Fernandes**

Trabalho de Campo orientado pelo Professor Doutor Humberto E. Ferreira,  
Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2023**



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Otimização de separação de Ácidos Biliares por  
HPLC acoplada a MS/MS**

**Maria Beatriz Forja Paz**  
**Pedro Fernandes**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Trabalho de Campo orientado pelo Professor Doutor Humberto E. Ferreira,  
Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia

**2023**



## Agradecimentos:

Ao professor Humberto, por ter apostado em mim e no meu potencial, numa altura em que o meu rumo na faculdade não estava traçado e por me ter ajudado ao longo dos últimos 4 anos. Graças a si e às inúmeras ocasiões em que trabalhámos em conjunto, pude desenvolver o meu espírito crítico e confiança nas minhas capacidades de trabalho laboratorial, assim como perceber que o espaço dentro de um laboratório é um lugar de aprendizagem constante, sem ter que haver juízos de valor por falta de conhecimento, o que me suscitou uma grande paixão pelo trabalho em laboratório. Agradeço também todo o esforço e dedicação que demonstrou ao longo dos últimos 9 meses e por nunca ter deixado de acreditar em mim.

Aos meus pais, que são os meus maiores *cheerleaders* e que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei e que me incentivaram a descobrir novos horizontes e a explorar a minha curiosidade.

Valorizo eternamente todos os sacrifícios que fizeram por mim, ao longo dos últimos 24 anos e por me terem proporcionado a melhor ferramenta que eu posso ter para a minha vida futura: a minha educação.

Todo o vosso amor e apoio que me deram durante o meu percurso da faculdade foi essencial para conseguir concluir o curso, face a todas as adversidades que enfrentámos os três em família.

Para além disso, não poderia estar aqui sem a vossa força e perseverança. O nosso percurso de vida a 3 repleto de desafios e situações novas ensinou-me a adaptar e a manter em mente que não é como nós caímos, é como nós nos levantamos e seguimos com o nosso caminho.

Ao Manuel, por todo o amor e apoio incondicional que me deste ao longo do meu percurso académico, entre seres o meu *fact cheeker* enquanto estudava anatomia e fisiologia e precisava de decorar os nomes dos ossos, a todo o apoio que me deste quando tive a rutura de ligamentos no pé direito e as boleias infinitas, e por me apoiares nas alturas mais difíceis do curso, sem nunca me deixares cair.

Eu não estaria aqui se não fosse por ti e por isso, fico-te eternamente grata. Contigo e com nosso *puppy Mike*, fazemos a nossa pequena família repleta de amor e risos.

Ao longo dos últimos 7 anos, tenho tido o melhor parceiro para a vida que podia pedir e espero continuar ao teu lado por muitos mais anos.

A todos os meus amigos e família, que me acompanharam ao longo destes 6 anos, quer seja em Portugal, ou na Austrália, ou no México, levo-vos sempre comigo, pois quando a amizade é forte, sobrevive todos os desafios. Sempre ouvi a frase “o curso não se faz sozinho” e felizmente, tive a oportunidade de perceber o significado dessa frase e conhecer pessoas incríveis durante o curso, que vou levar sempre comigo, especialmente a ti, Mafalda, o meu raio de sol.

Adoro-vos com todo o meu coração.  
Obrigada por tudo.

## Resumo:

Os ácidos biliares (AB) são compostos essenciais para vários processos fisiológicos e são produtos derivados do colesterol, após a metabolização hepática, que originam AB livres e AB conjugados, como é o caso dos glicoconjugados e tauroconjugados.

Alguns dos processos biológicos em que os AB estão envolvidos são a homeostasia lipídica, sinalização celular e regulação dos níveis de glicémia.

Adicionalmente, são cada vez mais importantes para o diagnóstico e prognóstico de complicações associadas a transplantes hepáticos.

Usando como referência o trabalho anteriormente realizado pelo Professor Doutor Humberto E. Ferreira no âmbito dos AB, estudou-se a separação dos AB conjugados com taurina e glicina, por HPLC-MS/MS, com a utilização de uma mistura de solventes de fase móvel básicos, com uma fase orgânica (isopropanol e acetonitrilo) e uma fase aquosa (acetato de amónio e água), de forma a potenciar a ionização das moléculas em *electrospray*, o que conseqüentemente aumenta o sinal registado pelo MS/MS. Para além disso, a ordem de eluição dos AB conjugados passa a ser ditada pelo número de grupos hidroxilo que o AB possuir.

Através do software JMP, foi feita a otimização da composição da fase móvel, tendo por base *Response Surface Models (RSM)*, que se baseiam em equações quadráticas a quatro incógnitas (cada uma respetiva a um componente do solvente), de forma a determinar a melhor composição da fase móvel, que garanta uma boa separação e eluição dos AB. O JMP permite ainda realizar *Design Of Experiments (DoE)* com recurso ao *I-optimal design*, de forma a minimizar o número de experiências necessárias à otimização da fase móvel.

Baseando-se no trabalho previamente realizado, foi estudada uma nova composição da fase móvel, aplicadas a uma nova coluna C18 fase reversa, que contém os vários solventes em estudo e que permite otimizar o processo de eluição e separação dos AB, nomeadamente ao avaliar a diferença dos tempos de retenção de compostos di-hidroxilados que contenham o mesmo tipo de molécula conjugada. A otimização da fase móvel permite uma maior tolerância a alterações durante a eluição, sem comprometer a separação dos compostos, o que contribui para a robustez do método.

**Palavras-chave:** Ácidos e Sais Biliares, HPLC-MS/MS, RSM, I-Optimal Design, DoE

## Abstract:

Bile acids (BA) are essential compounds for several physiological functions, and byproduct of cholesterol, after hepatic metabolization. There are at least two types of BA: free BA and conjugated BA, such as the glycoconjugates and the tauroconjugates.

Some of the physiological roles that BA perform are lipid homeostasis, cellular signaling and glycemetic regulation.

In addition to their metabolic role, BA have become a powerful tool regarding diagnosis and prognosis in liver transplanted patients.

Using the work previously done by PhD Professor Humberto E. Ferreira in regards to BA as reference, namely the BA conjugated with taurine and glycine, their separation has been studied using HPLC-MS/MS and a mobile phase using basic solvents, which consists of a mixture of an organic phase (isopropanol, acetonitrile) and an organic phase (ammonium acetate and water), in order to increase the BA ionization, by means of electrospray, which in turn increases the signal captured by MS/MS. In addition, the order in which the BA are eluted is dictated by the number of hydroxyl groups in the molecules.

By using JMP software, we were able to optimize the mobile phase, while using Response Surface Models (RSM), which use quadratic equations with four variables (one variable per solvent), in order to determine the best mobile phase for the separation and elution of the BA. In addition, JMP allows for a Design of Experiments (DoE), using I-optimal design, which decreases the number of experiments necessary to optimize the mobile phase.

Based on previous work, we studied a new mobile phase, by resorting to a new C18 column and using a mixture of the different solvents previously used, not only to determine a new mobile phase that allows a better separation and elution of BA, but also to analyze outcome variables, such as the difference between the retention times of di-hydroxyl BA that have the same conjugated molecule. This new mobile phase allows for a more robust technique, without compromising the separation of the molecules.

**Key words:** Bile Acids and Salts, HPLC-MS/MS, RSM, I-Optimal Design, DoE

## Índice:

<b>Agradecimentos:</b>	<b>5</b>
<b>Resumo:</b>	<b>6</b>
<b>Abstract:</b>	<b>7</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>10</b>
<b>Introdução:</b>	<b>11</b>
<b>Ácidos Biliares</b>	<b>11</b>
Síntese	11
Funções Fisiológicas	12
<b>Método Analítico de Ácidos Biliares</b>	<b>13</b>
Trabalho Prévio	14
<b>Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>17</b>
Estrutura do trabalho experimental	17
Otimização da fase móvel	17
Execução das experiências por HPLC MS/MS	18
<b>Resultados e Discussão:</b>	<b>22</b>
<b>Execução laboratorial das experiências por HPLC-MS/MS</b>	<b>22</b>
Parâmetros laboratoriais a ajustar	22
Obtenção de resultados	24
Otimização da composição da fase móvel, pelo JMP	26
<b>Análise dos gráficos RSM dos ácidos biliares</b>	<b>28</b>
<b>Ácidos Biliares Glicoconjugados</b>	<b>29</b>
Isopropanol e Acetato de Amónia	29
Isopropanol e Acetonitrilo	30
Acetonitrilo e Acetato de amónio	31
Análise Integral para Delta Glico	32
<b>Ácidos Biliares Tauroconjugados</b>	<b>33</b>
Isopropanol e Acetato de Amónia	33
Isopropanol e Acetonitrilo	35
Acetonitrilo e Acetato de amónio	36
Análise Integral para Delta Tauro	37
<b>Conclusões e perspectivas futuras:</b>	<b>38</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>41</b>
<b>Anexos:</b>	<b>43</b>
<b>Anexo 1: Composição da fase móvel ótima utilizada no trabalho previamente realizado</b>	<b>43</b>
<b>Anexo 2: Certificado de Análise da Coluna HPLC</b>	<b>43</b>

## Índice Figuras

FIGURA 1: ÁCIDO QUENODEOXICÓLICO, PUBCHEM.....	11	
FIGURA 2: ÁCIDO TAUROQUENODEOXICÓLICO	FIGURA 3: ÁCIDO GLICOQUENODEOXICÓLICO .....	12
FIGURA 4: COMPOSIÇÃO DAS EXPERIÊNCIAS LABORATORIAIS COM OS RESPECTIVOS RESULTADOS, PELO JMP .....	25	
FIGURA 5: SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS GCDC E GDC .....	26	
FIGURA 6: SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS TCDC E TDC .....	27	
FIGURA 7: GRÁFICO RSM DE ANÁLISE DO ACETATO DE AMÓNIO VS ISOPROPANOL, PARA OS COMPOSTOS GLICOCONJUGADOS....	29	
FIGURA 8: GRÁFICO RSM DE ANÁLISE DO ACETONITRILÓ VS ISOPROPANOL, PARA OS COMPOSTOS GLICOCONJUGADOS.....	30	
FIGURA 9: GRÁFICO RSM DE ANÁLISE DO ACETATO DE AMÓNIO VS ACETONITRILÓ, PARA OS COMPOSTOS GLICOCONJUGADOS....	31	
FIGURA 10: GRÁFICO RSM DE ANÁLISE DO ACETATO DE AMÓNIO VS ISOPROPANOL, PARA OS COMPOSTOS TAUROCONJUGADOS.	33	
FIGURA 11: GRÁFICO RSM DE ANÁLISE DO ACETONITRILÓ VS ISOPROPANOL, PARA OS COMPOSTOS TAUROCONJUGADOS .....	35	
FIGURA 12: GRÁFICO RSM DE ANÁLISE DO ACETATO DE AMÓNIO VS ACETONITRILÓ, PARA OS COMPOSTOS TAUROCONJUGADOS	36	
FIGURA 13: CERTIFICADO DE ANÁLISE DA COLUNA HPLC .....	43	
FIGURA 14: DEFINIÇÃO DOS CANAIS MS/MS PARA ANÁLISE DOS AB .....	44	

## Índice Tabelas

TABELA 1: GAMA DE VALORES PARA OS SOLVENTES DA FASE MÓVEL USADOS NA PRESENTE OPTIMIZAÇÃO. _____	16
TABELA 2: COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DAS FASES MÓVEIS PARA OS DIFERENTES CONJUNTOS EXPERIMENTAIS _____	18
TABELA 3: COMPOSIÇÃO EM MILILITROS DE CADA COMPONENTE DAS FASE MÓVEIS _____	20
TABELA 4: CONCENTRAÇÕES DOS AB PARA PREPARAÇÃO DO ANALITO _____	20
TABELA 5: COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA QUE CONTÉM OS ANALITOS _____	21
TABELA 6: COMPOSIÇÃO EM MILILITROS PARA AS NOVAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS _____	23
TABELA 7: TEMPOS DE RETENÇÃO OBTIDOS PARA OS COMPOSTOS GLICO (ESQUERDA) E TAURO (DIREITA) CONJUGADOS. _____	24
TABELA 8: COMPOSIÇÃO OTIMIZADA DA FASE MÓVEL, ESTIMADA PELO JMP, USANDO O MÉTODO DAS MISTURAS _____	26
TABELA 9: COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL OTIMIZADA, ATRAVÉS DO MODELO ESTATÍSTICO RSM 3D, PELO SOFTWARE JMP _____	28
TABELA 10: COMPOSIÇÕES DA FASE MÓVEL OTIMIZADAS, COM RECURSO A MÉTODOS ESTATÍSTICOS DIFERENTES, PELO JMP _____	38
TABELA 11: COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL ÓTIMA PARA CADA VARIÁVEL RESPOSTA _____	43

## Abreviaturas

3D: Three dimensional  
AB: ácidos biliares  
AC / CA: ácido cólico  
ASH: fígado gordo alcoólico  
BA: bile acids  
C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O: isopropanol  
CDC: ácido quenodeoxicólico  
CH<sub>3</sub>CN: acetonitrilo  
CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>: acetato de amónio:  
DC: ácido desoxicólico  
DoE: Design of Experiments, ou delineamento experimental  
FXR: recetor X Farsenoide  
GCDC: ácido glicoquenodeoxicólico  
GDC: ácido glicodeoxicólico  
Glico: glicoconjugados  
GLP-1: péptido semelhante à glucose  
H<sub>2</sub>O: Água  
HPLC: high performance liquid chromatography  
mM: millimolar  
MS: mass spectroscopy  
MS/MS: mass spectroscopy/ mass spectroscopy  
NASH: fígado gordo não alcoólico  
RSM: Response Surface Models  
Tauro: tauroconjugados  
TCDC: ácido tauroquenodeoxicólico  
TDC: ácido taurodeoxicólico  
UPLC: Ultra pressure liquid chromatography

## Introdução:

### Ácidos Biliares

#### Síntese

Os Ácidos Biliares (AB) são moléculas esteroides complexas que desempenham vários papéis fisiológicos que são essenciais para vários processos endógenos. Os AB são sintetizados a nível hepático e são armazenados sob a forma de bÍlis, um flúido corporal essencial para a homeostasia de vários processos biológicos. (1)

Os AB são sintetizados nos hepatócitos, no CYP27A1 e CYP7B1, a partir do colesterol e possuem uma estrutura em C24. De forma a poder desempenhar um papel importante na homeostasia lipídica, os AB necessitam de formar micelas e por isso são moléculas anfipáticas que possuem 2 faces diferentes: uma face hidrofílica (face alfa) com vários grupos hidroxilo, e uma face lipofílica (face beta), com poucos grupos atratores de elétrões e rica em grupos metilos. (1)

Existem 2 vias para a síntese dos AB: via clássica e via alternativa.

A via clássica constitui 90% do processo de síntese e dá origem ao ácido cólico (CA), com grupos hidroxilo nas posições C3, C7 e C12. (1)

A via alternativa constitui 10% do processo de síntese e dá origem ao ácido quenodeoxicólico (CDCA) (figura 1), com grupos hidroxilo nas posições alfa C3 e C7. A via alternativa é mais utilizada para a eliminação de colesterol em excesso, através das fezes. (1)

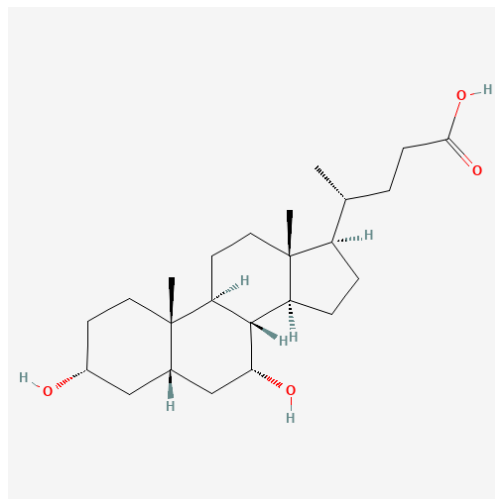


Figura 1: Ácido quenodeoxicólico, PubChem

Após a síntese dos AB, estes podem sofrer processos de conjugação com moléculas endógenas, de forma a aumentar a polaridade e hidrofília e facilitar a absorção pelas microvilosidades intestinais, transporte linfático e entero-porto-hepático, mas também a sua eliminação. (2)

Os processos de conjugação mais comuns são:

- Amidação N-Acil: adição de uma amina glicina/taurina à cadeia lateral do AB, em posição C24;
- Sulfatação: adição de um grupo sulfato, em posição C3 alfa do AB;
- Glucoronidação: adição de uma molécula de ácido glucorónico, em posição C3 alfa do AB.

No caso do trabalho previamente desenvolvido, foram estudados compostos conjugados com moléculas de taurina (figura 2) e glicina (figura 3).

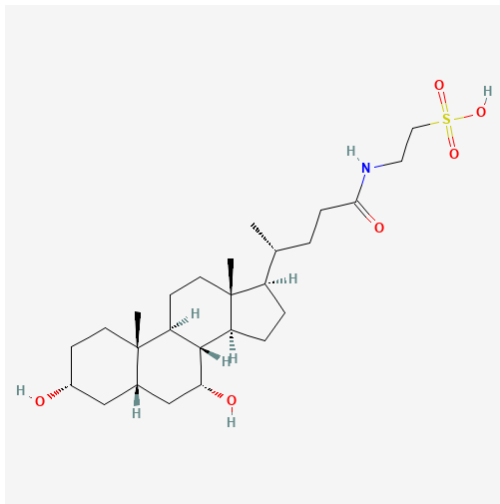


Figura 2: Ácido Tauroquenodeoxicólico, PubChem

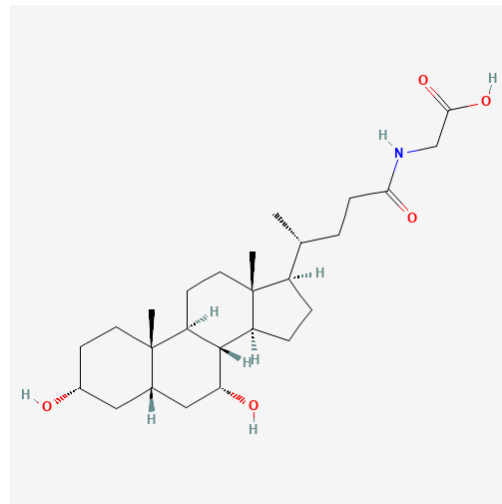


Figura 3: Ácido Glicoquenodeoxicólico, PubChem

### Funções Fisiológicas

Devido ao facto dos AB apresentarem uma estrutura muito semelhante à dos corticosteroides, mineralocorticoides, hormonas sexuais, os AB conseguem variadas funções, sendo as mais relevantes as seguintes (1):

- Formação de micelas, no intestino, para absorção de lípidos da dieta:
  - Tri, di e monoglicéridos;
  - Ácidos gordos após ação de lípases;
  - Moléculas de monoacilgliceróis;
  - Vitaminas lipossolúveis;
  - Colesterol;
- Excreção de compostos endógenos, como o colesterol;
- Excreção de xenobióticos;
- Controlo do crescimento da microbiota intestinal.

Adicionalmente, os AB são mensageiros hormonais e agentes inflamatórios, que regulam o metabolismo energético (glicêmico e lipídico). Os AB exercem funções ao nível de 2 recetores principais: recetor X farsenoide (FXR) e TGR5. (1)

No fígado, os AB ativam o FXR, que inibe a transcrição de genes importantes para a síntese de AB, logo é um recetor envolvido nos mecanismos de feedback negativo na síntese de AB, pelos próprios AB. As funções adjuvantes são (1):

- Aumento das enzimas cujos substratos são AB;
- Aumento da bomba de excreção de AB.

Os recetores TGR5 existem nas células de Kupffer, as células do Sistema Imunitário responsáveis pela proteção imunológica do fígado. Estas células têm uma atividade protetora ativa contra (2):

- Fígado gordo;
- Doenças inflamatórias intestinais;
- Aterosclerose;
- Diabetes.

Estes recetores induzem a síntese do GLP-1 (péptido semelhante à glucose), o que regula o apetite, níveis de glucose, glucagon e insulina, a nível pancreático. (1)

Desta forma, os AB conseguem ser um marcador celular de várias patologias cada vez mais relevantes para a sociedade ocidental, sendo estas (1,3,4):

- Rejeição de transplantes hepáticos;
- Fígado gordo não alcoólico (NASH) e Fígado gordo alcoólico (ASH);
- Intolerância a glucose;
- Doenças da vesícula biliar.

Através do doseamento e análise qualitativa de amostras biológicas que contenham ABs, é possível aumentar as aplicações clínicas, com base nas concentrações e permitir melhores métodos de diagnóstico e prognóstico destas mesmas doenças. (1,4)

## **Método Analítico de Ácidos Biliares**

O método de excelência para o doseamento dos AB é HPLC-MS/MS (tandem), pois permite manter a integridade das moléculas e a especificidade e seletividade são ideais. (5)

A maioria dos métodos de doseamento com HPLC-MS/MS utilizam solventes de base aquosa ácida, contendo ácido acético ou o ácido fórmico, pois estes vão diminuir a polaridade e a ionização das cadeias laterais aquando da entrada dos AB no segmento MS, do equipamento de HPLC-MS/MS. Sabendo-se que formas iónicas positivas têm excelente sinal em MS/MS, a sua protonação por ácidos aumenta o sinal. (2)

Ao utilizar solventes ácidos, a ordem de saída após a análise depende do grupo prostético associado à cadeia lateral, nomeadamente da polaridade deste grupo, sendo a ordem a seguinte: Conjugados com taurina; conjugados com glicina; ácidos biliares livres.

Como método inovador realizado em Trabalhos de Campo previamente orientado pelo professor Humberto E. Ferreira, utilizaram-se solventes aquosos básicos, em vez de solventes aquosos ácidos, de forma a potenciar a ionização das moléculas, nomeadamente dos grupos ácido carbonilo, que ficam em déficit de protões. (2)

A face beta do esteroide serve de âncora para com a fase estacionária apolar (C18), os grupos carboxilo terminais e grupos hidroxilo da face alfa interagem com o solvente. Desta forma os AB são eliminados consoante o número de grupos hidroxilo, o que realça o carácter anfipático destas moléculas. (2)

### Trabalho Prévio

Previamente, ao presente trabalho foi realizado um processo de delineamento experimental com vista à otimização da fase móvel, através do software JMP (versão 10), com o objetivo de correlacionar as variáveis de controlo e as variáveis de resultado obtidas após as análises feitas às misturas de AB, de forma a otimizar a composição da fase móvel, para assegurar os 2 objetivos do trabalho (2):

- Melhor separação;
- Maior Cadência de amostras processadas como resultado de uma boa separação.

Definiu-se previamente que as percentagens das fases orgânica e aquosa seriam respetivamente 35/65 % da fase móvel. (2) Tal restrição não existe no presente trabalho.

As variáveis de controlo definidas foram as percentagens dos solventes usados para a separação dos ácidos biliares, com fase móvel de natureza básica (2):

- Isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O, CAS 67-63-0);
- Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN, CAS 75-05-8);
- Acetato de Amónio (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, CAS 631-61-8), em solução aquosa 10 mM;
- Água (H<sub>2</sub>O, CAS 7732-18-5).

As variáveis de resultado definidas foram os intervalos de tempo de eluição dos 2 compostos di-hidroxilados, delta t, ou  $\Delta t$ , em minutos, em cada uma das suas formas: conjugados com a glicina e taurina:

- $\Delta t$  TCDC / TDC: ácido tauroquenodeoxicólico e ácido taurodeoxicólico;
- $\Delta t$  GCDC / GDC: ácido glicoquenodeoxicólico e ácido glicodeoxicólico.

Em cada grupo de conjugados, os di-hidroxilados são sempre os compostos mais difíceis de separar, pelo que são ótimos alvos para um processo de otimização de fases móveis.

Com base na interpretação dos resultados desse mesmo trabalho, concluiu-se que houve um grande aumento de sinal, com a otimização da fase móvel, para além de uma nova ordem de saída dos compostos, tendo por base o número de grupos hidroxilo, e dentro de cada grupo por ordem de conjugação. (2)As percentagens de cada solvente que originaram melhores resultados encontram-se no Anexo 1.

Apesar de ter havido uma otimização da fase móvel, o impacto de pequenas variações na composição da fase móvel tem um impacto significativo nas variáveis resultado, sendo que é necessário aumentar a robustez e a estabilidade da análise, para além da zona estudada, o que significa que é necessário realizar mais trabalho de DoE em que a composição da fase móvel não seja fixa em 35%/65%. (2)

## Objetivos

Os dois grandes objetivos deste trabalho são, para uma coluna nova (recém-introduzida no mercado): 1) otimizar a fase móvel de modo a separar os 2 pares de AB di-hidroxilados, que são as separações de referência para desenvolvimento de novas fases móveis; 2) Ajustes adicionais para reduzir ao mínimo os tempos de retenção, mantendo separações ótimas, ou seja, minimizar o intervalo de tempo de eluição dos compostos, definido com delta t, ou  $\Delta t$ , expresso em minutos.

Com este trabalho, pretende-se explorar vários grupos de condições experimentais que possam aumentar a robustez e estabilidade do método analítico, diminuir o tempo de análise e a quantidade de amostra necessária, aumentando a sensibilidade do método.

Tendo por base o trabalho desempenhado anteriormente pelo professor e pela aluna Ana Catarina Santos, foi decidido como abordagem experimental permitir a variação das percentagens de cada solvente utilizado no trabalho anterior, cujas gamas de valores estão na tabela 1, ou seja, adotar uma abordagem experimental diferente da previamente utilizada.

*Tabela 1: Gama de valores para os solventes da fase móvel usados na presente otimização.*

Solventes	Valor Mínimo (%)	Valor Máximo (%)
<b>Isopropanol</b>	6,0	13,2
<b>Acetonitrilo</b>	18,0	28,8
<b>Acetato de Amónio</b>	54,6	75,3
<b>Água</b>	0,0	3,6

A premissa deste pensamento é conseguir-se determinar se existem percentagens ótimas dentro dos limites previamente mencionados (tabela 1), e averiguar se é possível melhorar:

- Capacidade de separação dos compostos
- Tempo de retenção de cada composto
- Cadência.

Esta otimização vai ser feita mais uma vez com recurso ao software de Design-of-Experiments JMP Pro 16, tendo por base as variáveis-controlo e as variáveis-resultado anteriormente usadas.

## Material e Métodos

### Estrutura do trabalho experimental

Como método inovador adicional ao trabalho a ser realizado, escolheu-se dividir a componente laboratorial em duas partes:

1. Definir as experiências necessárias à otimização laboratorial com o apoio do software JMP, para o DoE;
2. Executar as experiências delineadas pelo JMP e com os ajustes necessários com base nos resultados preliminares do primeiro DoE, a fim de determinarmos quais são as percentagens de cada solvente para otimização do processo de eluição, e o tempo de corrida, de modo que este último seja o mínimo possível e conduza a uma separação eficaz (i.e., sem haver sobreposição de picos de vários compostos presentes na solução a analisar).

### Otimização da fase móvel

A primeira parte do trabalho assenta no delineamento experimental e a otimização das experiências a executar, de forma a minimizar: o número de experiências a realizar, o tempo utilizado para obter resultados relevantes e maximizar a identificação de pontos críticos para o desenvolvimento do nosso trabalho.

A utilização do software JMP (leia-se JUMP) do SAS Institute permite realizar vários modelos de otimização, que dependem somente dos objetivos pretendidos e do tipo de variáveis utilizadas: variáveis-controle, i.e., os pontos críticos do delineamento experimental, e as variáveis-resposta, i.e., o que é mensurável das experiências realizadas. A versão do JMP utilizada foi JMP Pro 16.1.0.

Neste trabalho, definiu-se como variáveis-controle as percentagens de cada solvente que compõe a fase móvel e como variáveis-resposta a diferença dos tempos de retenção dos compostos di-hidroxilados com o mesmo tipo de conjugação (glicoconjugados, tauroconjugados e livres).

Neste caso, o objetivo é realizar a otimização da fase móvel, que é composta por quatro solventes diferentes: isopropanol, acetonitrilo, acetato de amónio 10 mM e água.

O modelo de otimização utilizado foi o I-Optimal design, que minimiza as variâncias (entre resultados observados e esperados) permite obter resultados significativos com um baixo número de experiências.

Adicionalmente, definiu-se o número de corridas a realizar em dezasseis, o que permitiu que o software fizesse o delineamento de dezasseis experiências preliminares, que servem de ponto de partida para rondas de otimização subsequentes.

Após a execução das primeiras dezasseis corridas, caso fosse necessário, proceder-se-ia à realização de um lote adicional de dezasseis corridas mais específicas, tendo por base os resultados obtidos do primeiro lote de experiências e a devida análise realizada pelo software.

O lote das primeiras dezasseis experiências a realizar está tabelado na tabela 2.

**Tabela 2: Composição percentual das fases móveis para os diferentes conjuntos experimentais**

Corrida	C3H8O (%)	CH3CN (%)	CH3COONH4 (%)	H2O (%)	Soma Composição (%)
1	6,00	18,00	72,40	3,60	100,00
2	11,76	24,48	61,42	2,34	100,00
3	8,97	20,16	69,43	1,44	100,00
4	13,20	18,00	65,20	3,60	100,00
5	8,16	28,80	62,32	0,72	100,00
6	7,44	28,80	60,16	3,60	100,00
7	13,20	23,40	61,96	1,44	100,00
8	9,60	18,00	70,24	2,16	100,00
9	13,20	18,00	68,80	0,00	100,00
10	6,72	18,00	75,28	0,00	100,00
11	9,60	22,68	64,12	3,60	100,00
12	6,00	25,56	68,44	0,00	100,00
13	13,20	28,66	54,63	3,51	100,00
14	10,32	23,21	66,47	0,00	100,00
15	13,20	28,80	58,00	0,00	100,00
16	6,00	24,48	67,00	2,52	100,00

## Execução das experiências por HPLC MS/MS

Após a realização do DoE, procedeu-se à preparação laboratorial para a execução das experiências sugeridas pelo software.

Relativamente a utilização de HPLC-MS/MS, a parte cromatográfica é composta por um sistema modular “Alliance 2695” (Waters Portugal), com os seguintes componentes e características:

- Bomba quaternária e válvula de mistura
- Injector automático para 99 amostras, termostaticado
- Forno de coluna.

O sistema de detecção é um espectrómetro de massa “Quattro Micro” (Micromass, UK) com:

- Triplo quadrupolo
- Duas bombas de vácuo, sendo uma externa rotativa Edwards (E2M28B) e uma interna turbo-molecular interna (Micromass, UK)
- Um tanque pulmão de azoto capaz de fornecer até 600L/min de gás, que é alimentado por um gerador de azoto (SysAdvance, Portugal) que filtra o mesmo a partir de uma fonte de ar comprimido
- Um sistema de fornecimento de amostra, externo ao HPLC, que através de uma bomba peristáltica interna e um capilar fornece amostra ao espectrómetro para calibrar as razões m/z do equipamento e estudar fragmentação de compostos a analisar.

Todo o equipamento descrito acima é controlado por software, a partir de um computador, usando o programa MassLynx versão 4.1 SCN 714.

Relativamente à coluna utilizada para as corridas experimentais, foi utilizada a coluna C18HQ, 4.6 x 250 mm, 5 µm, 100 Å, da Uptisphere Strategy - Interchim, cujo número de lote é C18HQ100-5-20343 e cujo certificado de análise se encontra no anexo 2.

Os canais MS/MS (filtros de sinal) utilizados para a identificação de quatro compostos, no espectrómetro de massa, já tinham sido previamente definidos, aquando da realização do trabalho que precedeu o atual, para os compostos: ácido tauroquenoodeoxicólico, ácido taurodeoxicólico, ácido glicoquenoodeoxicólico e ácido glicodeoxicólico. A definição dos canais encontra-se no Anexo 3.

Relativamente aos solventes utilizados já referidos, procedeu-se à utilização de solventes de gama HPLC, mas com uma purificação adicional dos solventes aquosos, por filtração, de forma a garantir que não existiam partículas em suspensão que pudessem contaminar e/ou comprometer o fluxo nos vários canais capilares de solvente e nas válvulas de mistura.

O fluxo de solventes foi inicialmente definido em 0,2 mL/min e a duração das corridas em 120 minutos.

De forma a minimizar o desperdício de solventes e maximizar o trabalho laboratorial, realizaram-se duas etapas adicionais antes de executar as experiências:

- Converter as percentagens de cada solvente obtidas pelo JMP em volumes reais;
- Calcular o volume total de cada solvente que seria gasto para a realização das dezasseis corridas.

Para garantir a estabilização da coluna de HPLC e de cada composição da fase móvel, realizaram-se 2 corridas por *conjunto* de condições experimentais, 1 corrida sem injeção do analito, mas sim de metanol e 1 corrida com injeção do analito em metanol, ambas com a mesma duração e com as mesmas condições experimentais.

Adicionalmente, realizou-se uma corrida de limpeza no final da execução de todas as corridas, com as condições experimentais do último *conjunto sem usar acetato de amónio*. Na realidade, em vez de se realizar 16 corridas, realizaram-se 33 corridas, o que altera os volumes de solventes necessários para o trabalho laboratorial.

A tabela 3 resume os volumes utilizados de cada solvente, para cada experiência, assim como os volumes totais de cada solvente:

**Tabela 3: Composição em mililitros de cada componente das fase móveis**

Corrida	C3H8O (mL)	CH3CN (mL)	CH3COONH4 (mL)	H2O (mL)
1	5,40	16,20	65,16	3,24
2	10,58	22,03	55,28	2,11
3	8,07	18,14	62,49	1,30
4	11,88	16,20	58,68	3,24
5	7,34	25,92	56,09	0,65
6	6,70	25,92	54,14	3,24
7	11,88	21,06	55,76	1,30
8	8,64	16,20	63,22	1,94
9	11,88	16,20	61,92	0,00
10	6,05	16,20	67,75	0,00
11	8,64	20,41	57,71	3,24
12	5,40	23,00	61,60	0,00
13	11,88	25,80	49,17	3,16
14	9,29	20,89	59,82	0,00
15	11,88	25,92	52,20	0,00
16	5,40	22,03	60,30	2,27
<b>Limpeza</b>	5,40	22,03	60,30	2,27
<b>Volume total (2 corridas por conjunto)</b>	287,22	686,29	1942,87	53,62

Relativamente à preparação da amostra, procedeu-se à mistura dos quatro ácidos biliares di-hidroxilados, cujas concentrações iniciais estão apresentadas na tabela 4:

**Tabela 4: Concentrações dos AB para preparação do analito**

Ácidos Biliares	Concentrações (mg/mL)
<b>TCDC</b>	0,1050
<b>TDC</b>	0,1010
<b>GCDC</b>	0,0976
<b>GDC</b>	0,1009

No entanto, devido a uma análise prévia de cada um dos compostos no mesmo equipamento, determinou-se que seria necessário fazer um ajuste de intensidade de sinal dos compostos, ao adicionarmos volumes diferentes de cada uma das soluções, a fim de garantir que não iria haver um composto com uma intensidade de sinal muito superior, comparativamente aos outros.

Desta forma, a tabela 5 apresenta os seguintes volumes de cada uma das soluções dos compostos utilizados, para se obter um volume final de 326 microlitros:

*Tabela 5: Composição da amostra que contém os analitos*

Ácidos Biliares	Concentrações (mg/mL)	Volume utilizado (µL)
<b>TCDC</b>	0,1050	65,00
<b>TDC</b>	0,1010	10,00
<b>GCDC</b>	0,0976	262,00
<b>GDC</b>	0,1009	14,76

Relativamente à duração das corridas e o tempo total de execução das trinta e três corridas, definiu-se como duração de cada corrida 120 minutos, o que perfaz 3960 minutos, ou seja, 66 horas para executar o lote de corridas com a solução de metanol (branco) e a solução a analisar.

## Resultados e Discussão:

### **Execução laboratorial das experiências por HPLC-MS/MS**

#### *Parâmetros laboratoriais a ajustar*

O primeiro lote de 16 experiências foi realizado nas condições delineadas pelo JMP e após a imputação dos resultados para o software de análise das corridas de HPLC-MS/MS (Clarity), realizou-se a análise dos cromatogramas obtidos, e registaram-se os tempos de retenção de cada composto e foi possível concluir dois aspectos fundamentais para a otimização do lote seguinte de experiências.

Primeiramente, a intensidade do sinal dos quatro compostos da solução a analisar não era idêntico, pois existiam compostos com intensidades de sinal a rondar  $10^3$  e o ácido glicodeoxicólico com intensidades de sinal a rondar as centenas, o que permitiu aferir que a concentração inicial deste composto não estava correta.

Isto constitui um problema, pois é necessário que a intensidade de cada composto seja idêntica, mas também porque é necessário para uma análise por MS/MS correta que a intensidade dos picos de cada composto seja inferior a  $10^7$ .

Apesar de se terem feito ajustes iniciais de concentração para assegurar que este problema não se iria colocar, o ajuste não foi bem-sucedido.

Será, pois, necessário só refazer certas “soluções mãe” (nomeadamente do ácido glicodeoxicólico), bem como concentrar a solução a analisar, para se obter intensidades de sinal consideradas normais para os AB, que sejam inferiores  $10^7$  em área.

Para tal, fez-se um novo vial e recorreu-se ao método de evaporação por azoto, de forma a se conseguir concentrar mais as soluções de AB. Colocou-se 1 mL de cada solução (0,10 mg/mL), levando à secura 3 das soluções de ABs e a quarta solução não foi levada à secura, pois serviu para ressolubilizar os ABs cujos solventes tinham sido evaporados previamente.

A segunda conclusão foi referente à duração de cada corrida e a capacidade de eluição dos compostos.

Com base nos tempos de retenção obtidos e os picos de cada composto, foi possível determinar que certos compostos glico, como é o caso do ácido glicodeoxicólico, não estavam a ser analisados e eluídos durante os 90 minutos de cada corrida, mas sim ao início da corrida seguinte, aproximadamente nos primeiros 15 minutos de análise.

Isto demonstra ser um problema não só pela eluição insuficiente dos compostos em análise, mas também porque as condições experimentais são diferentes entre corridas, pois são experiências diferentes.

Desta forma, decidiu-se alterar as condições experimentais em 2 parâmetros:

- Aumentar a duração das corridas de 120 minutos para 180 minutos;
- Aumentar o fluxo de 0,2 mL/min para 0,5 mL/min.

O objetivo destas alterações é assegurar que ao aumentar a duração da corrida, os compostos são eluídos durante o uso da mesma fase móvel, que corresponde às condições experimentais previamente definidas no conjunto DoE, e confirmar se um fluxo mais elevado facilita a eluição dos compostos ou não.

Após a execução de algumas corridas nestas condições experimentais, concluiu-se que mesmo com o aumento da duração das corridas, algumas das experiências delineadas não permitiam que a eluição dos compostos fosse realizada durante os 180 minutos de análise nas condições experimentais específicas, logo decidiu-se aumentar o número de corridas com as mesmas condições experimentais.

Desta forma, para cada *conjunto* de condições experimentais, realizou-se:

- 1 corrida de estabilização da fase móvel, sem analito;
- 1 corrida de injeção do analito, com 180 minutos de análise;
- 2 corridas em branco nas mesmas condições experimentais, mas sem injeção de analito, mas com o solvente usado, cada uma com 180 minutos de análise.

O que perfaz 720 minutos, ou 12 horas, de análise por cada *conjunto* de condições experimentais, o que na realidade significa que em vez de se realizar 2 corridas por *conjunto*, realizaram-se 4 corridas por *conjunto* e resulta em 372 horas, ou 15,5 dias. Logo o volume de solventes a consumir está tabelado na tabela 6:

**Tabela 6: Composição em mililitros para as novas condições experimentais**

Corrida	C3H8O (mL)	CH3CN (mL)	CH3COONH4 (mL)	H2O (mL)
1	5,40	16,20	65,16	3,24
2	10,58	22,03	55,28	2,11
3	8,07	18,14	62,49	1,30
4	11,88	16,20	58,68	3,24
5	7,34	25,92	56,09	0,65
6	6,70	25,92	54,14	3,24
7	11,88	21,06	55,76	1,30
8	8,64	16,20	63,22	1,94
9	11,88	16,20	61,92	0,00
10	6,05	16,20	67,75	0,00
11	8,64	20,41	57,71	3,24
12	5,40	23,00	61,60	0,00
13	11,88	25,80	49,17	3,16
14	9,29	20,89	59,82	0,00
15	11,88	25,92	52,20	0,00
16	5,40	22,03	60,30	2,27
<b>Volume total (4 corridas por conjunto)</b>	569,05 mL	1350,55 mL	3825,44 mL	104,97 mL

### Obtenção de resultados

Após a execução laboratorial dos 16 conjuntos de experiências, com as condições experimentais alteradas, obteve-se os seguintes tempos de retenção, apresentados na tabela 7:

**Tabela 7: Tempos de retenção obtidos para os compostos Glico (esquerda) e Tauro (direita) conjugados.**

Corrida	GCDC (min)	GDC (min)	Corrida	TCDC (min)	TDC (min)
1	393,00	468,00	1	432,00	688,00
2	31,78	39,00	2	36,66	45,69
3	325,50	328,97	3	164,62	178,71
4	75,20	93,84	4	86,30	109,20
5	21,08	26,14	5	25,39	31,32
6	26,72	32,57	6	31,60	39,34
7	82,98	100,92	7	82,88	104,00
8	128,81	518,00	8	162,09	528,88
9	433,25	528,76	9	234,87	302,06
10	540,00	540,00	10	540,00	540,00
11	540,00	540,00	11	540,00	540,00
12	139,43	152,15	12	110,57	232,85
13	60,75	64,95	13	62,98	77,28
14	540,00	540,00	14	264,64	525,70
15	42,64	51,37	15	48,02	57,27
16	357,51	357,51	16	256,18	256,18

Ao importar os dados para o software JMP, representado na figura 4, obteve-se os intervalos de tempo de eluição dos compostos em minutos, neste caso,  $\Delta t$  TCDC / TDC e  $\Delta t$  GCDC / GDC que são as variáveis-resultado neste estudo.

	<b>isop_mix</b>	<b>CH3CN_mix</b>	<b>acetato_mix</b>	<b>agua_mix</b>	<b>Delta_Glc</b>	<b>Delta_Tar</b>	<b>Run Order</b>
1	0,06	0,18	0,724	0,036	75	256	1
2	0,1176	0,2448	0,61419424	0,02340576	7,22	9,03	2
3	0,0896831914	0,2016	0,6943168086	0,0144	3,47	14,09	3
4	0,132	0,18	0,652	0,036	18,64	22,9	4
5	0,0816	0,288	0,6232	0,0072	5,06	5,93	5
6	0,0744	0,288	0,6016	0,036	5,85	7,74	6
7	0,132	0,234	0,6196	0,0144	17,94	21,12	7
8	0,096	0,18	0,7024	0,0216	389,19	366,79	8
9	0,132	0,18	0,688	0	95,51	67,19	9
10	0,0672	0,18	0,7528	0	0	0	10
11	0,096	0,2268	0,6412	0,036	0	0	11
12	0,06	0,2556	0,6844	0	12,72	122,28	12
13	0,132	0,2866138576	0,5463102373	0,0350759051	4,2	14,3	13
14	0,1032	0,23211	0,66469	0	0	261,06	14
15	0,132	0,288	0,58	0	8,73	9,25	15
16	0,06	0,2448	0,67	0,0252	0	0	16

Figura 4: Composição das experiências laboratoriais com os respectivos resultados, pelo JMP

Tendo por base os resultados do primeiro lote de experiências, foi possível importar os dados obtidos para o JMP e definir as gamas dos  $\Delta t$  para a eluição dos compostos em análise que forneciam resultados mais otimizados, considerando os nossos objetivos experimentais:

- Melhor cadência do sinal;
- Boa eluição dos compostos;
- $\Delta t$  de tempos de retenção razoável.

Definiu-se que  $\Delta t$  podia admitir valores entre 3 minutos e 14 minutos, sendo o valor expectável ótimo de 8 minutos.

É importante denotar que, apesar da preparação da solução com os analitos pelo método de secura por azoto, com o objetivo de aumentar a concentração e consequentemente a intensidade dos sinais associados a cada AB, não foi possível aumentar a intensidade de sinal dos ABs, o que dificultou a análise dos cromatogramas. Tal deve ser devido a um efeito de formação de dímeros de ABs, em que duas faces polares se encontram face-a-face, estabilizando pontes de hidrogénio e como consequência, evadindo a vigilância dos filtros MS/MS impostos para os vários grupos de compostos.

### Otimização da composição da fase móvel, pelo JMP

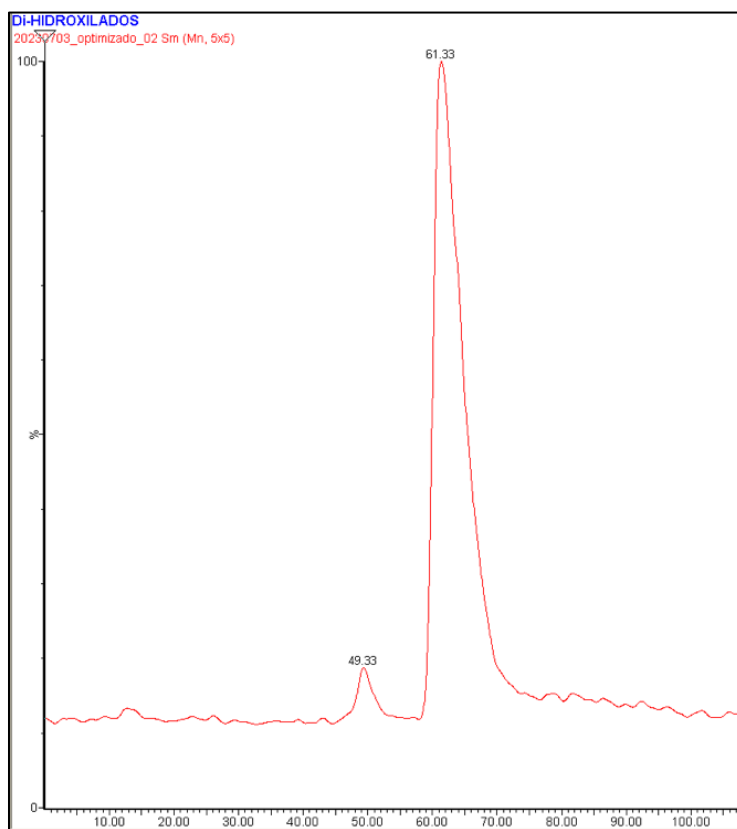
O software analisou os parâmetros na globalidade e definiu como composição ótima para a fase móvel a seguinte composição, como está na tabela 8:

*Tabela 8: Composição otimizada da fase móvel, estimada pelo JMP, usando o método das misturas*

Solventes	Composição (%)
<b>Isopropanol</b>	9,79
<b>Acetonitrilo</b>	23,06
<b>Acetato de amônio</b>	65,36
<b>Água</b>	1,78

De seguida, realizou-se um *conjunto* experimental, cuja fase móvel tivesse a composição ótima, para os compostos glicoconjugados e tauroconjugados.

A figura 5 representa o cromatograma obtido para a separação dos compostos glicoconjugados, com a separação do GCDC aos 49,33 min e o GDC aos 61,33 minutos e com um intervalo de tempo de eluição dos compostos a rondar os 12 minutos.



*Figura 5: Separação dos compostos GCDC (49,33 min) e GDC (61,33 min)*

Nesta figura, é possível ver que a separação foi bem sucedida, devido aos picos bem separados e com uma linha de base próxima do nível zero de sinal. Adicionalmente, os tempos de separação dos compostos em estudo cumprem os objetivos previamente definidos, o que demonstra que a otimização foi conseguida.

A figura 6 representa o cromatograma obtido para a separação dos compostos tauroconjugados, com a separação do TCDC aos 57,98 minutos e do TDC aos 73,08 minutos e com um intervalo de tempo de eluição dos compostos a rondar os 15,1 minutos.

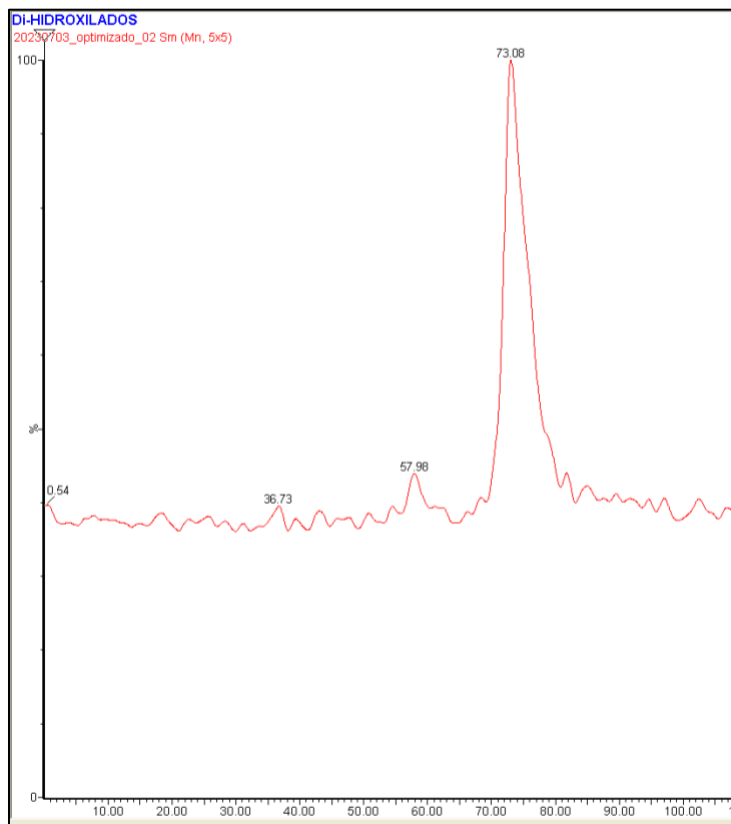


Figura 6: Separação dos compostos TCDC (57,98 min) e TDC (73,08 min)

Tal como no caso dos glicoconjugados, é possível ver que houve uma separação dos compostos tauroconjugados, com resolução na linha de base. Esta não se encontra ao mesmo nível que a linha de base dos glicoconjugados, pois o filtro de deteção MS/MS para os tauroconjugados é diferente do dos glicoconjugados. Adicionalmente, os tempos de separação dos compostos em estudo cumprem os objetivos previamente definidos, o que demonstra que a otimização foi bem conseguida.

É importante denotar que os compostos glicoconjugados têm tempos de retenção intercalados com os tempos de retenção dos tauroconjugados, mas nunca há sobreposição de picos, pois utilizam-se canais de deteção MS/MS diferentes para cada par de compostos.

Ao analisar-se de forma crítica os cromatogramas obtidos, é possível aferir que a composição otimizada pelo JMP é específica para este tipo de analitos, pois em termos de boas características da eluição e cromatogramas temos:

- $\Delta t$  curtos e dentro da gama de intervalos definida após a integração dos dados experimentais do primeiro lote;
- Largura dos picos relevante para os ABs;
- Linhas de base bem definidas após conveniente *smooth*;
- Mais tarde, verificou-se que esta fase móvel otimizada também promove a resolução completa dos AB não conjugados ou di-hidroxilados livres (CDC e o DC).

### Análise dos gráficos RSM dos ácidos biliares

Os gráficos RSM (Response Surface Models) permitem interpretar os resultados experimentais (resolução dos compostos di-hidroxilados) em função das variáveis previamente definidas (variáveis de controlo), que neste caso é a composição da fase móvel. No entanto, como um dos aspetos fulcrais deste trabalho é determinar quais é que são os solventes que têm um impacto maior na variação dos resultados experimentais, o que fez com que se dividisse a variável da composição da fase móvel em 3 variáveis diferentes: isopropanol (Isop), acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) e acetato de amónio + água ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-NH}_4$ ), pois para a solubilização do acetato de amónio a 10 mM é necessária água.

No início do trabalho, definiu-se como modelo experimental o modelo de Mistura (a soma de 4 variáveis é 100%), no entanto, este não permite obter os Response Surface Models (como a soma de 4 variáveis é de 100%, basta assumir que a soma de 3 delas é  $\leq 100\%$  e que a quarta variável é o que faltar para 100%). Os RSM são essenciais para podermos avaliar o impacto que cada solvente tem na separação dos compostos e determinar as gamas de valores relevantes para cada solvente, que oferecem a melhor eluição dos compostos.

Desta forma, alterou-se o modelo para um modelo de análise 3D e inseriu-se os mesmos dados que tinham sido previamente obtidos (3 variáveis-controlo e 2 variáveis-resultado) e o software determinou uma nova composição ótima para a fase móvel, apresentada na tabela 9:

**Tabela 9: Composição da fase móvel otimizada, através do Modelo estatístico RSM 3D, pelo software JMP**

Solventes	Composição (%)
<b>Isopropanol</b>	9,60
<b>Acetonitrilo</b>	23,40
<b>Acetato de amónio</b>	64,96
<b>Água</b>	2,05

## Ácidos Biliares Glicoconjugados

Graças ao software JMP, foi possível obter gráficos RSM (3D), em que estão representados os dados retirados dos cromatogramas. Os gráficos representam o intervalo de tempo das eluições dos 2 compostos AB di-hidroxilados em função da composição da fase móvel, mais especificamente cada solvente em estudo.

Os gráficos RSM permitem aferir quais é que são as zonas ótimas de trabalho para cada solvente, ao utilizarmos as linhas de contorno sobre a superfície dos gráficos e o impacto que cada mistura de solventes tem ao nível da eluição dos compostos.

Obteve-se 3 gráficos diferentes:

- Isopropanol (X) e acetato de amónio (Y);
- Isopropanol (X) e acetonitrilo (Y);
- Acetonitrilo (X) e acetato de amónio (Y).

### Isopropanol e Acetato de Amónia

O gráfico da figura 7 em forma de sela apresenta uma amplitude considerável, com uma secção cónica estável no topo da sela, o que confere robustez a variações de cada solvente. É até possível definir uma reta que percorre a parte estável da sela e define claramente a dependência da % de acetato de amónio versus % isopropanol.

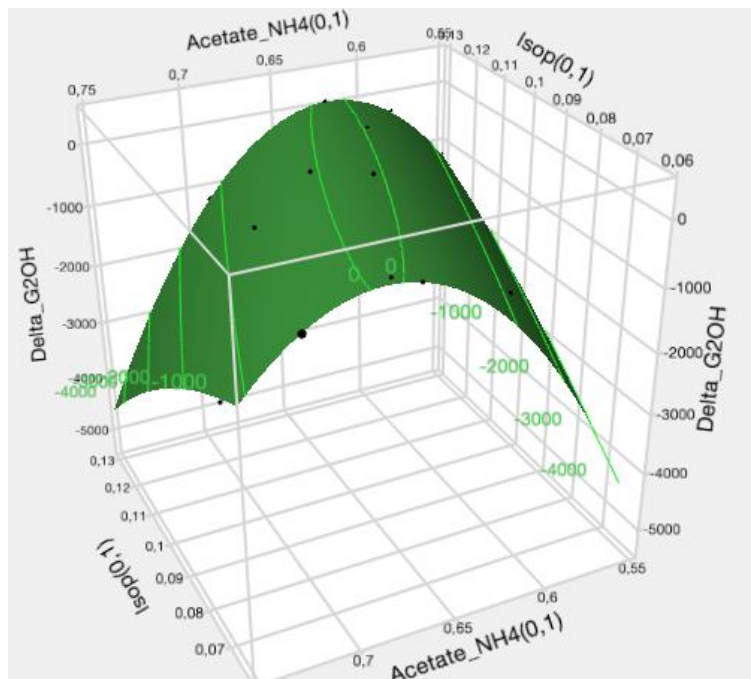


Figura 7: Gráfico RSM de análise do acetato de amónio vs isopropanol, para os compostos glicoconjugados

No gráfico, é possível ver que existe uma zona central (topo da sela) que permite uma separação otimizada do GCDC e GDC, considerada composição ótima de análise. Os valores estimados de cada solvente que a delimitam são os seguintes:

- Isopropanol: 9 – 11%;
- Acetato de amónio: 60 – 66%.

Adicionalmente, conseguiu-se identificar composições de pouco interesse experimental. Estas zonas estão delimitadas pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Isopropanol: 6 – 8,5% e 11,5 – 13,2%;
- Acetato de amónio: 54,6 – 59,5% e 66,5 – 75,3%.

Numa análise global, 7 dos 16 pontos encontram-se no topo da sela e perto, ou dentro, da zona central ótima, o que significa que 7 das condições experimentais permitem obter boas separações dos compostos glicoconjugados.

### Isopropanol e Acetonitrilo

O gráfico da figura 8 apresenta uma grande amplitude no topo da sela, o que lhe confere quase um aspeto de papagaio (plano), o que significa que a mistura de isopropanol e acetonitrilo apresenta uma grande robustez a variações.

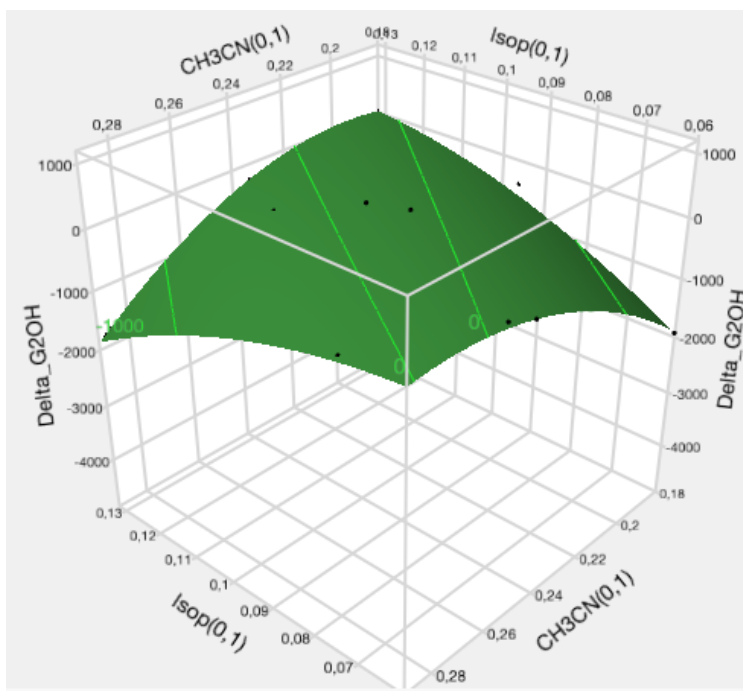


Figura 8: Gráfico RSM de análise do acetonitrilo vs isopropanol, para os compostos glicoconjugados

Neste gráfico, existe uma zona central da sela que representa a composição ótima de análise. Esta zona está delimitada pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Isopropanol: 9,5 – 13%;
- Acetonitrilo: 18 – 24%.

Adicionalmente, identificou-se como zonas com composições prejudiciais de análise experimental. Esta zona está delimitada pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Isopropanol: 6 – 9 %;
- Acetonitrilo: 25 – 28,8%.

Numa análise global, 6 dos 16 pontos encontram-se no topo da sela, e perto ou dentro, da zona central ótima, o que significa que 6 das condições experimentais permitem obter boas separações dos compostos glicoconjugados.

### **Acetonitrilo e Acetato de amónio**

O gráfico da figura 9 apresenta uma sela com uma amplitude semelhante à amplitude no topo do gráfico de Isopropanol e Acetato de amónio, o que demonstra que o acetato de amónio é mais determinante para a amplitude de variação de delta e consequentemente para a robustez da composição.

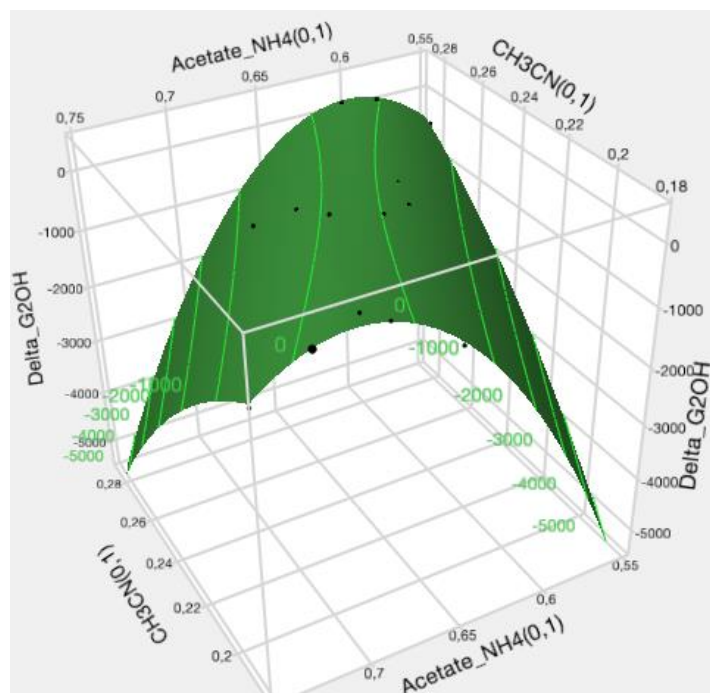


Figura 9: Gráfico RSM de análise do acetato de amónio vs acetonitrilo, para os compostos glicoconjugados

Neste gráfico, existe uma zona central, *quá*si planar, que representa a composição ótima de análise. Esta zona está delimitada pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Acetato de amónio: 60 – 68%;
- Acetonitrilo: 23 – 28%.

Adicionalmente, identificou-se como zonas com composições prejudiciais de análise experimental. Estas zonas estão delimitadas pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Acetato de amónio: 54,6 – 59% e 69 – 75,3%;
- Acetonitrilo: 18 – 22%.

Numa análise global, 7 dos 16 pontos encontram-se dentro da zona ótima e 3 dos 16 apresentam-se adjacentes à mesma, o que corresponde a 10 composições experimentais que permitem obter boas separações.

### **Análise Integral para Delta Glico**

Ao realizar uma análise conjunta dos 3 gráficos, concluiu-se que as amplitudes de variação para cada solvente são as seguintes:

- Isopropanol: 0,01, o que representa 1% da composição total da fase móvel;
- Acetonitrilo: 0,02, o que representa 2% da composição total da fase móvel;
- Acetato de amónio: 0,05, o que representa 5% da composição total da fase móvel.

Desta forma, é possível conjecturar que as variações de isopropanol na fase móvel são as mais impactantes para alterações no intervalo de tempos de eluição dos compostos, pois a amplitude de variação é a menor. As variações no acetato de amónio na composição são mais toleradas, pois a amplitude de variação é a maior.

No entanto, ao analisar os 3 gráficos de forma global, pode-se identificar que a amplitude dos gráficos é determinada pelo acetato de amónio e não pelo isopropanol, pois no gráfico de Isopropanol e Acetonitrilo, figura 8, a amplitude é muito grande e quando se analisa o gráfico de Acetonitrilo e Acetato de Amónia, figura 9, a amplitude é semelhante à do gráfico de Isopropanol e Acetato de Amónia, figura 7.

O isopropanol, apesar de permitir apenas amplitudes até 1% da composição da fase móvel, quando ele é utilizado, ele origina uma zona ótima quase plana. Não obstante, o acetato de amónio permitir variações até 5% da composição, contudo a área de zona ótima é mais pequena, o que prejudica o intervalo de tempo de eluição dos compostos.

## Ácidos Biliares Tauroconjugados

A abordagem de análise dos gráficos para os compostos tauroconjugados, TCDC e TDC é semelhante à dos glicoconjugados, GCDC e GDC, pois as condições experimentais foram iguais para todos os ácidos biliares em análise.

É importante realçar que os pontos representados apresentam uma dispersão em torno da superfície maior do que os pontos dos glicoconjugados e que a curvatura dos gráficos é a oposta da dos glicoconjugados.

Tal como nos glicoconjugados, obtivemos 3 gráficos diferentes:

- Isopropanol (X) e acetato de amónio (Y);
- Isopropanol (X) e acetonitrilo (Y);
- Acetonitrilo (X) e acetato de amónio (Y).

### Isopropanol e Acetato de Amónia

O gráfico da figura 10 apresenta uma sela invertida de grande amplitude, no entanto, com a concavidade oposta à concavidade apresentada nos compostos glicoconjugados, uma característica transversal a todos os gráficos dos tauroconjugados.

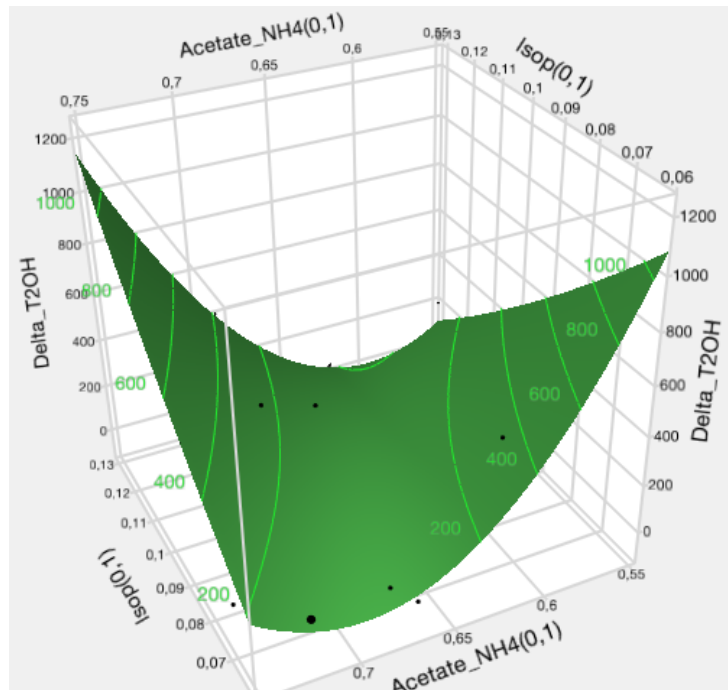


Figura 10: Gráfico RSM de análise do acetato de amónio vs isopropanol, para os compostos tauroconjugados

A concavidade representa o impacto que a composição da fase móvel tem no intervalo de tempo dos compostos.

Quando a concavidade está virada para baixo, como é o caso dos glicoconjugados, significa que pequenas variações na composição produzem um intervalo de tempo de eluição dos compostos menor, pois facilmente atinge o valor zero no eixo vertical (uma transformada de Delta-glico ou Delta-tauro).

Nos gráficos dos glicoconjugados, são apresentados valores temporais delta inferiores a zero, por extrapolação abstrata do software, o que não corresponde às observações realizadas, porque o eixo vertical ao contrário do que indica o software, é uma transformada do valor delta e não o próprio delta.

Quando a concavidade está virada para cima, como é o caso dos tauroconjugados, significa que pequenas variações na composição produzem um intervalo de tempo de eluição dos compostos maior.

No gráfico, é possível ver que existe uma zona central, que oferece uma separação otimizada do TCDC e TDC. Os valores estimados para a composição ótima que a delimitam são os seguintes:

- Isopropanol: 8,5 – 10%;
- Acetato de amónio: 61 – 67%.

Adicionalmente, conseguiu-se identificar composições de pouco interesse experimental. Estas zonas estão delimitadas pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Isopropanol: 6 – 8 % e 10,5 – 13,2%;
- Acetato de amónio: 54,6 – 62% e 68 – 75,3%.

Numa análise global, 5 dos pontos 16 pontos encontram-se no topo da sela invertida e perto, ou dentro, da zona central ótima, o que significa que 5 das condições experimentais permitem obter boas separações dos compostos tauroconjugados.

## Isopropanol e Acetonitrilo

O gráfico da figura 11 apresenta uma grande amplitude da curvatura, tal como o gráfico homónimo dos glicoconjugados, o que significa que a mistura de isopropanol e acetonitrilo apresenta uma grande robustez a variações para os glicoconjugados e tauroconjugados.

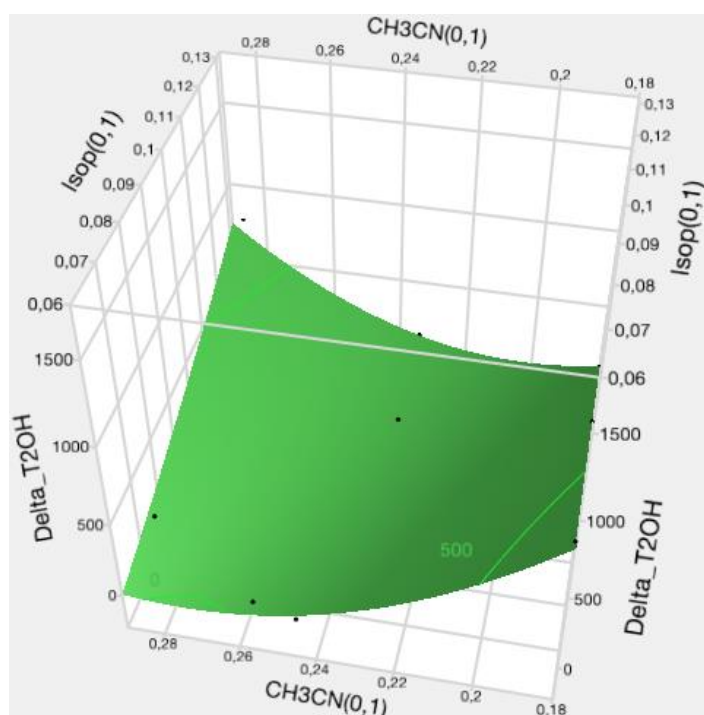


Figura 11: Gráfico RSM de análise do acetonitrilo vs isopropanol, para os compostos tauroconjugados

Neste gráfico, existe uma zona central que representa a composição óptima de análise. Esta zona está delimitada pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Isopropanol: 8,5 – 11 %;
- Acetonitrilo: 21 – 24,5 %.

Adicionalmente, identificou-se como zonas com composições prejudiciais de análise experimental. Esta zona está delimitada pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Isopropanol: 6 – 8 %;
- Acetonitrilo: 18 – 20,5% e 25 – 28,8%.

Numa análise global, 5 dos 16 pontos encontram-se no topo da sela invertida e perto, ou dentro, da zona central ótima, o que significa que 5 das condições experimentais permitem obter boas separações dos compostos tauroconjugados.

### Acetonitrilo e Acetato de amónio

O gráfico da figura 12 apresenta uma sela invertida com uma amplitude semelhante à amplitude do gráfico de Isopropanol e Acetato de amónio, tal como no gráfico homónimo dos glicoconjugados, o que demonstra que o acetato de amónio é mais impactante para a amplitude de variação do delta e consequentemente a boa robustez da composição.

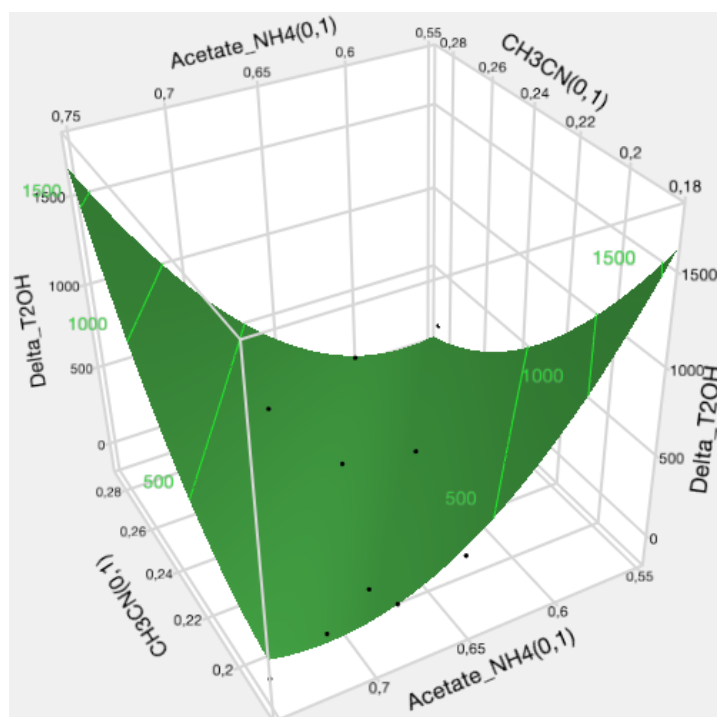


Figura 12: Gráfico RSM de análise do acetato de amónio vs acetonitrilo, para os compostos tauroconjugados

Neste gráfico, existe uma zona central que representa a composição ótima de análise. Esta zona está delimitada pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Acetato de amónio: 61 – 65 %
- Acetonitrilo: 23 – 27 %

Adicionalmente, identificou-se como zonas com composições prejudiciais de análise experimental. Esta zona está delimitada pelos seguintes valores estimados para cada solvente:

- Acetato de amónio: 54,6 – 60% e 66% - 75,3%
- Acetonitrilo: 18 – 22%

Numa análise global, 7 dos 16 pontos encontram-se dentro da zona ótima e 3 dos 16 apresentam-se adjacentes à mesma, o que significa que 10 das composições experimentais permitem obter boas separações.

### **Análise Integral para Delta Tauro**

Ao realizar uma análise dos dados referentes aos gráficos e ao comparar com os dados dos glicoconjugados, concluiu-se que existem muitas semelhanças entre os glicoconjugados e os tauroconjugados.

As amplitudes de variação de delta-tauro para cada solvente são semelhantes às dos glicoconjugados e as zonas de análise ótimas, assim como as zonas prejudiciais para análise, apresentam valores semelhantes.

Como maior diferença entre os tauroconjugados e os glicoconjugados é a concavidade das parábolas, sendo que nos glicoconjugados apresenta uma concavidade para baixo e os tauroconjugados apresenta uma concavidade para cima.

A concavidade representa de que forma é que pequenas variações aumentam ou encurtam o intervalo de tempo de eluição dos compostos, e desta forma, é possível determinar que a composição da fase móvel favorece a eluição mais rápida dos compostos glicoconjugados, do que a do tauroconjugados, pelo facto de que o intervalo de tempo para os tauroconjugados é maior e a concavidade dos tauroconjugados é para cima e não para baixo.

## Conclusões e perspectivas futuras:

Relativamente à composição da fase móvel, foi possível aferir que a gama de intervalos que permite uma melhor eluição dos compostos, com uma boa separação dos mesmos, apresenta boa robustez. Tal conclusão deve-se ao facto de que utilizámos dois modelos estatísticos multivariados diferentes, um de mistura e outro 3D, e ambos apresentaram valores concordantes. As composições da fase móvel estão apresentadas na tabela 10:

*Tabela 10: Composições da fase móvel otimizadas, com recurso a métodos estatísticos diferentes, pelo JMP*

Modelo de análise	Isopropanol		Acetonitrilo		Acetato de amónio		Água	
	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)
<b>Mistura</b>	9,79		23,06		65,36		1,78	
<b>3D-RSM</b>	9,60		23,40		64,96		2,04	
<b>3D-RSM (gamas)</b>	9,00	10,00	23,00	25,00	61,00	65,00	0,00	7,00

Com recurso à análise dos gráficos RSM, pelo software JMP, foi possível determinar as zonas ótimas de análise (que fornecem separações ótimas), assim como as zonas prejudiciais para a análise dos ácidos biliare, que não cumprem os objetivos experimentais definidos no início do trabalho experimental.

A análise global destas gamas de valores é semelhante para os tauroconjugados e os glicoconjugados e está representada na tabela 10.

Ao comparar as gamas de valores que permitem uma separação ótima dos compostos e com um intervalo de tempo o mais curto possível, com o delineamento experimental inicial realizado pelo JMP, as conclusões obtidas são concordantes.

As condições experimentais aleatorizadas no delineamento experimental, que apresentam semelhanças às condições ótimas de separação, apresentam intervalos de eluição curtos e que cumprem os objetivos delineados.

As condições experimentais, cujas composições incluam uma percentagem de solvente que esteja numa zona prejudicial de análise, originam intervalos de eluição de compostos muito longos ou sem separação sequer, o que valoriza a importância da definição das zonas ótimas de separação.

Ao analisar mais atentamente as gamas e o delineamento experimental, os solventes com maior impacto nos resultados são o isopropanol e o acetato de amónio, o que corrobora a conjectura de que o isopropanol, apesar de permitir apenas amplitudes até 1% da composição da fase móvel, quando é utilizado, origina uma zona ótima quase plana para as variáveis isopropanol-acetonitrilo. Não obstante, o acetato de amónio permite variações até 5% da composição, contudo a área de zona ótima é mais estreita, o que prejudica o intervalo de tempo de eluição dos compostos.

Relativamente ainda aos RSM, é possível visualizar que a dispersão dos pontos em torno da superfície de otimização é maior para os tauroconjugados do que para os glicoconjugados, o que permite concluir que a otimização da fase móvel e separação dos compostos é mais eficiente para os glicoconjugados, em comparação com os tauroconjugados.

Tal análise é verificada pela interpretação das curvaturas das parábolas nos gráficos e do impacto que as curvaturas apresentam no intervalo de eluição dos compostos.

Tal seria de esperar, pelo facto de a coluna ser apolar (C18) e a principal interação com a molécula ser nas zonas carbonadas apolares (núcleo esteroide e cadeia lateral) que são bastante semelhantes. Estes glico e tauroconjugados diferem apenas nas partes polares representadas pelo número de hidroxilos na face alfa do núcleo esteroide e pelos ácidos no extremo da cadeia lateral. Entre os 2 grupos a diferença na zona carbonada é que os Tauro apresentam 2 grupos CH<sub>2</sub> na parte terminal da cadeia lateral (taurina, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>), os glicoconjugados só 1 grupo CH<sub>2</sub>. Logo, frente a uma coluna de fase carbonada, a ordem de saída será glicoconjugados e só no final os tauroconjugados, se a fase móvel apresenta pH>7, para cada grupo definidor do núcleo esteroide (cada AB livre).

Numa análise futura, será importante desenvolver uma técnica isolada que permita uma maior robustez na separação dos compostos tauroconjugados, em vez de analisarmos os 2 grupos de compostos nas mesmas condições experimentais. No entanto, não são de esperar grandes variações na otimização em relação ao que fica definido neste trabalho.

Idealiza-se que futuramente, a composição ótima definida neste trabalho, deverá ser estudada para fluxos de fase móvel a variar acima de 0,5 mL/min, potencialmente até 15 mL/min em UPLC (Ultra-High Pressure Liquid Chromatography), inclusive variando a granulometria do enchimento (5 para 1,5 micras).

Após a execução de vários *conjuntos* de experiências em condições laboratoriais diferentes, é possível concluir alguns aspetos importantes relativos às condições experimentais de análise dos ABs: Primeiramente, é possível deduzir que para que a eluição dos ABs seja eficaz, é necessário um fluxo mais alto do que 0,2 mL/min. No delineamento inicial, foi definido um fluxo de 0,2 mL/min, no entanto, os resultados obtidos desse lote experimental revelaram que o tempo de eluição dos ABs era mais longo que o esperado. Com o aumento do fluxo para 0,5 mL/min, foi possível reduzir o tempo de eluição dos compostos, especialmente nos *conjuntos* experimentais cujas composições eram mais semelhantes à composição ótima, gerada pelo software JMP.

O fluxo é especialmente importante, pois a minimização dos tempos de eluição dos ABs, sem comprometer a qualidade da eluição, é um dos objetivos deste trabalho.

É importante denotar que o fluxo e a composição da fase móvel estão interligados, pois em *conjuntos* cuja composição da fase móvel não apresentava semelhanças à composição otimizada, o tempo de eluição dos compostos permanecia muito longo, apesar do fluxo mais elevado.

A segunda conclusão a retirar desta análise refere-se à intensidade do sinal nos cromatogramas. Os ABs são moléculas anfipáticas, que possuem a capacidade de interagir com a água. Os ABs possuem ainda grupos hidroxilo que interagem com os íões em solução, podendo criar sais e complexar (com a possível formação de dímeros) com precipitação para o fundo dos *vials* de análise HPLC.

Caso haja complexação, a concentração de ABs em solução é menor, e o equipamento injeta uma solução não homogénea.

Como possível solução, pode-se estudar a possibilidade de redissolver os AB em etanol 100%. O etanol é conhecido como um solvente que “quebra” dímeros, por se introduzir entre os dois componentes de um dímero, para que não haja complexação dos ABs no fundo dos *vials*. No entanto, as amostras devem estar num compartimento a baixa temperatura para evitar a evaporação do etanol, logo que o vial é injetado a primeira vez.

Como pontos a melhorar para a análise de ácidos biliares por HPLC-MS/MS no futuro, é importante considerar a redução do tempo de análise de cada composto, de forma a maximizar a rentabilidade do tempo de análise e diminuir o gasto de solvente.

Para além disso, numa análise futura de ABs, é importante ter em consideração a conjugação dos ABs e a necessidade de usar na dissolução da amostra a mesma composição de solventes que vai fluir dentro da coluna durante a análise.

Embora, não seja reportado neste trabalho, foram produzidos filamentos MIP (Molecularly Imprinted Polymers) contra o ácido desoxicólico, usando impressão 3D, que capturaram da solução cerca de 10% da quantidade inicial de AB colocada à disposição. A verificação da quantidade capturada da solução foi feita com a técnica otimizada neste Trabalho de Campo. Futuramente, serão medidas as afinidades de 15 AB contra estes filamentos finos, o que demonstra que este trabalho vai ser de extrema utilidade no curto prazo.

A análise de ácidos biliares tem um grande potencial prognóstico na medicina moderna, pois permite um diagnóstico precoce de rejeições de transplantes hepáticos, assim como o diagnóstico de doenças metabólicas cada vez mais relevantes para a nossa sociedade. Com o aperfeiçoamento a longo prazo das técnicas de análise de ácidos biliares, será possível progredir nas técnicas de diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas.

## Referências Bibliográficas

1. Shulpekova Y, Shirokova E, Zharkova M, Tkachenko P, Tikhonov I, Stepanov A, et al. A Recent Ten-Year Perspective: Bile Acid Metabolism and Signaling. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
2. Catarina A, Santos L. Nova separação cromatográfica de ácidos biliares otimizada para HPLC-MS/MS, em regime de alta cadência. 2021.
3. Gertzen CGW, Gohlke H, Häussinger D, Herebian D, Keitel V, Kubitz R, et al. The many facets of bile acids in the physiology and pathophysiology of the human liver. Vol. 402, *Biological Chemistry*. De Gruyter Open Ltd; 2021. p. 1047–62.
4. Azer SA, Hasanato R, Sephehrimanesh M. Use of bile acids as potential markers of liver dysfunction in humans: A systematic review. Vol. 100, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2021. p. E27464.
5. Hu T, An Z, Shi C, Li P, Liu L. A sensitive and efficient method for simultaneous profiling of bile acids and fatty acids by UPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2020 Jan 30;178.
6. Kiriya Y, Nochi H. The Biosynthesis, Signaling, and Neurological Functions of Bile Acids. *Biomolecules*. 2019 Jun 15;9(6):232.
7. Sarafian MH, Lewis MR, Pechlivanis A, Ralphs S, McPhail MJW, Patel VC, et al. Bile Acid Profiling and Quantification in Biofluids Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2015 Oct 6;87(19):9662–70.
8. Fiorucci S, Distrutti E. The Pharmacology of Bile Acids and Their Receptors. In 2019. p. 3–18.
9. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):241–59.
10. Hofmann AF, Hagey LR. Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *J Lipid Res*. 2014 Aug;55(8):1553–95.
11. Hylemon PB, Bohdan PM, Sirica AE, Heuman DM, Vlahcevic ZR. Cholesterol and bile acid metabolism in cultures of primary rat bile ductular epithelial cells. *Hepatology*. 1990 Jun;11(6):982–8.
12. Chiang JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley; 2013. p. 1191–212.
13. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(7):804.
14. McCann S. The good, the bad and the ugly. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Sep 1;53(9):1087–8.
15. Li T, Chiang JYL. Bile Acid Signaling in Metabolic Disease and Drug Therapy. *Pharmacol Rev*. 2014 Oct 29;66(4):948–83.

16. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al. A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis. *Mol Cell*. 2000 Sep;6(3):517–26.
17. Mazidi M, de Caravatto PPP, Speakman JR, Cohen R V. Mechanisms of Action of Surgical Interventions on Weight-Related Diseases: the Potential Role of Bile Acids. *Obes Surg*. 2017 Mar 14;27(3):826–36.

Anexos:

## Anexo 1: Composição da fase móvel ótima utilizada no trabalho previamente realizado

Tabela 11: Composição da fase móvel ótima para cada variável resposta

	Delta GCDC/GDC	Delta TCDC/TDC	Área Total
Isopropanol (%)	11	8	8
Acetonitrilo (%)	24	23	27
Acetato de Amônio (%)	62	69	65
Água (%)	3	0	0

## Anexo 2: Certificado de Análise da Coluna HPLC



### Certificate of Analysis

Date: December/09/2020

Product: Uptisphere Strategy 100A 5µm C18HQ

Part Number: US100-5C18HQ

Batch: C18HQ100-5-20343

#### Physical Properties Tests

<b>Pore size (Å)</b> Specifications: 90-110 103	<b>Surface area (m<sup>2</sup>/g)</b> Specifications: 395-451 405	<b>Size (µm)</b> Specifications: 4.7-5.3 4.8	<b>Nature</b> silica
<b>Metal trace</b> Specifications: <20 ppm yes	<b>Bonding</b> C18	<b>% Carbon</b> Specifications: 19 19.9	<b>Shape</b> spherical

The batch n° C18HQ100-5-20343

is conforming to the evaluation tests.

This product is certified compliant.

Production Chief

### Certificate of Analysis

Part Number: US5C18HQ-250/046  
 mfg # 2107623  
 batch C18HQ100-5-20343

#### Column Information

Material: Uptisphere Strategy 100A  
 Bonding: C18HQ  
 Particle Size (µm): 5  
 Length (mm): 250  
 I.D. (mm): 4.6

#### Test Conditions

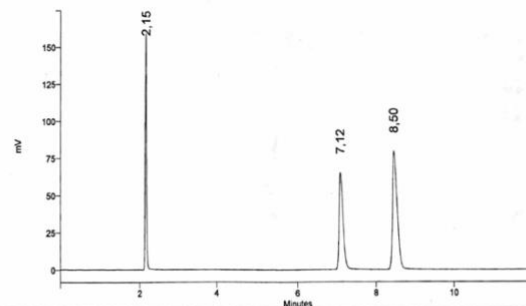
Mobile Phase: Acetonitrile/Water-(70/30)  
 Flow Rate (mL/min): 1.0  
 Pressure (bars): 69  
 Temperature (°C): 22  
 UV (nm): 254  
 Sample Volume (µL): 5

SHIPPING / STORAGE SOLVENT: Acetonitrile / Water (70/30)

#### Integration results

#	Peak Name	Rt	Tailling	Plates (USP)	Resolution (USP)
1	Uracil	2.15	1,17	26225,52	0,00
2	Toluene	7,12	1,21	25144,42	42,71
3	Naphthalene	8,50	1,16	24947,07	6,98

SUM



Accepted by:

Figura 13: Certificado de análise da coluna HPLC

**Anexo 3: Canais definidos para a análise de ácidos biliares por HPLC-MS/MS no trabalho previamente realizado.**

Conjugação	Ácido biliar	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Tauroconjugados	LCA	482,83	80,15	60	55
		482,83	124,22	60	55
		482,83	482,83	60	55
	UDCA, CDCA, DCA	498,44	80,13	60	55
		498,44	124,22	60	55
		498,44	498,44	60	55
	CA	514,25	80,08	60	55
		514,25	124,22	60	55
		514,25	498,44	60	55
Gliconjugados	LCA	432,4	74,22	50	40
		432,4	432,4	50	40
	UDCA, CDCA, DCA	448,53	74,2	50	40
		448,53	448,53	50	40
	CA	464,4	74,15	50	40
		464,4	464,4	50	40
Livres	LCA	375,5	375,5	50	50
		751,9	375,5	50	20
	UDCA, CDCA, DCA	391,5	391,5	50	40
		783,9	391,4	50	25
	CA	407,5	407,5	50	40
		799,8	407,5	50	20

Figura 14: Definição dos canais MS/MS para análise dos AB, de Catarina A, Santos L. Nova separação cromatográfica de ácidos biliares otimizada para HPLC-MS/MS, em regime de alta cadência. 2021