



DIOGO NOIN DE OLIVEIRA

**“NOVAS ESTRATÉGIAS “ÔMICAS” APLICADAS A PRODUTOS
FARMACÊUTICOS”**

**NOVEL “OMICS” STRATEGIES APPLIED TO PHARMACEUTICAL
PRODUCTS**

**CAMPINAS
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

DIOGO NOIN DE OLIVEIRA

**“NOVAS ESTRATÉGIAS “ÔMICAS” APLICADAS A PRODUTOS
FARMACÊUTICOS”**

**“NOVEL “OMICS” STRATEGIES APPLIED TO PHARMACEUTICAL
PRODUCTS”**

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

Master's dissertation presented to the Medical Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the MSc grade in Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO DIOGO NOIN DE OLIVEIRA E ORIENTADO
PELO PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

OL4n Oliveira, Diogo Noin de, 1986-
Novas estratégias "ômicas" aplicadas a produtos farmacêuticos / Diogo Noin de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rodrigo Ramos Catharino.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Espectrometria de massas. 2. Cosméticos. 3. Análise química. I. Catharino, Rodrigo Ramos, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Novel "omic" strategies applied to pharmaceutical products

Palavras-chave em inglês:

Mass spectrometry

Cosmetics

Chemical analysis

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Rodrigo Ramos Catharino [Orientador]

Fernando Antônio Santos Coelho

Wanda Pereira Almeida

Data de defesa: 27-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DIOGO NOIN DE OLIVEIRA

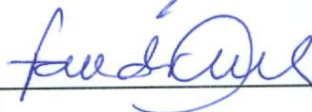
Orientador (a) PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO



2. PROF(A). DR(A). FERNANDO ANTÔNIO SANTOS COELHO



3. PROF(A). DR(A). WANDA PEREIRA ALMEIDA



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 27 de fevereiro de 2014

RESUMO

Com a larga distribuição e o crescimento de mercado da indústria de cosméticos, esta deve sempre seguir processos de produção e controle de qualidade altamente qualificados. Ensaio analítico de controle de qualidade são realizados utilizando-se técnicas de cromatografia, podendo ou não ser acopladas a análises por espectrometria de massas. Entretanto, esses procedimentos requerem fase de preparo de amostra, englobando desde processos de extração até mesmo reações de derivatização. Num cenário industrial, isso se reflete em grande demanda de tempo e, portanto, custos adicionais. Tendo em vista esse escopo, apresentamos uma nova plataforma “ômica” – a Cosmetômica, que propõe o uso de metodologias simplificadas e de grande eficácia em termos de preparo de amostra e facilidade na aquisição de dados. Amostras de diferentes tipos de cosméticos são analisadas através da técnica de espectrometria de massas por imagem (MALDI-MSI), qualitativa e quantitativamente, através da integração de dados tanto analíticos quanto estatísticos. É possível controle total de toda a cadeia produtiva, desde a matéria-prima até o produto acabado, sendo esse último o objeto de estudo do presente trabalho.

ABSTRACT

With the large distribution and the increasingly promising market of cosmetic industry, highly-qualified productive and quality control processes are mandatory for companies to follow. Analytical procedures for QC are commonly carried out using instrumental approaches such as chromatography – coupled or not with mass spectrometry. However, these procedures require sample preparation steps, which may comprise extraction and even sample derivatization. In an industrial scenario it may reflect in great demand of time, with elevated costs as the main consequence. Within this scope, we present a new “omic” platform – Cosmetomics, which proposes the use of simple and effective methods in terms of sample preparation and readiness of data acquisition. Samples from different types of daily use cosmetics are analyzed by mass spectrometry imaging (MALDI-MSI), both qualitative and quantitatively, through the integration of analytical and statistical data. It is possible, therefore, full control of the whole productive chain, from the raw material up to the finished product, which was the elected sample class of our study.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DEDICATÓRIA.....	ix
AGRADECIMENTOS.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	16
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	28
OBJETIVOS.....	29

CAPÍTULO 1 – ANÁLISE DE COSMÉTICOS UTILIZANDO MALDI-MSI.....31

Abstract.....	32
Introdução.....	32
Resultados e Discussão.....	35
Seção Experimental.....	46
Conclusão.....	48
Referências.....	49

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DIRETA DE BATONS ATRAVÉS DE STELDI-MSI.....52

Abstract.....	53
Introdução.....	53
Seção Experimental.....	55
Resultados e Discussão.....	56
Conclusão.....	63
Referências.....	64

CONCLUSÃO GERAL.....	66
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família,
por todo o amor, carinho, atenção e confiança,
por não medirem nenhum esforço para me trazerem até aqui
e por estarem sempre lá por mim, em todos os momentos.
O amor é cada vez maior, independentemente da distância.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a **Deus**, por me guiar nessa caminhada e me iluminar em minhas escolhas. Ao **Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino** pela amizade e parceria, desde os tempos da Farmacognosia “improvisada” nos laboratórios do IB, lá em 2007.

Gilmar, Lucir, Arthur, Magdalena, Léia, Joel e os demais tios e tias...obrigado por tudo, gente. Desde o começo da graduação vocês estiveram sempre do meu lado e me trouxeram até aqui. Eu não tenho palavras e nem como expressar meu amor e gratidão por vocês.

Vivi, meu amor. Obrigado por estar na minha vida e ser um pedaço de mim. Eu simplesmente não sei o que faria se não tivesse você do meu lado em todos esses anos.

Amigos do laboratório INNOVARE: aqui, deixarei apenas vocês marcados em pseudônimos, pois chamar as pessoas pelo nome não faz jus à nossa proximidade. **Brother, Cibelera, Tatimel, Parça, Gus, Lí e ~Georgia~**: obrigado por fazerem parte do meu dia-a-dia e ajudar a termos um ambiente gostoso e familiar. Deixo também registrado que a **Ceci**, apesar de não ser parte oficial do nosso lab e morar lá na p**, é membro honorário da galera e por isso não poderia deixar de figurar aqui.

Demais amigos e colegas que encontro ou não diariamente: valeu por tudo, gente. Vocês são muitos, e eu sou péssimo na hora de ser sentimental, então sintam-se abraçados por mim, seus lindos. Vocês definitivamente sabem quem são ;)

Obrigado, gente!

Diogo Noin de Oliveira

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
CHCA	Ácido alfa-ciano hidróxicinâmico
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>Collision-induced dissociation</i>)
DAG	Diacilgliceróis
DESI	Ionização de dessorção por elétron-spray (<i>Desorption electrospray ionization</i>)
ESI	Ionização por elétron-spray (<i>Electrospray ionization</i>)
FPS	Fator de proteção solar
FT-ICR	Ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>)
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas chromatography</i>)
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LPG	Lisofosfogliceróis (<i>Lysophosphoglycerols</i>)
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)
MSI	Espectrometria de massas por imagem (<i>Mass spectrometry imaging</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal component analysis</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PG	Fosfogliceróis (<i>Phosphoglycerols</i>)
RDC	Resolução de diretoria colegiada
SIMS	Espectrometria de massas por íon secundário (<i>Secondary ion mass spectrometry</i>)

SP	Esfingolipídeos (<i>sphingolipids</i>)
STE	Extração por tira sortiva (<i>Sorptive tape extraction</i>)
STELDI	Ionização por dessorção a laser com extração semelhante a tira sortiva (<i>Sorptive tape-like extraction laser desorption ionization</i>)
TAG	Triacilgliceróis
TLC	Cromatografia por camada delgada (<i>Thin-layer chromatography</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma geral de um experimento de <i>MALDI Imaging</i> em tecido.....	21
Figura 2	Sistemas utilizados na aplicação de matriz em tecidos. a) Manual, b) <i>Portrait</i> , c) <i>Shimadzu ChIP</i> , d) <i>ImagePrep</i> , e) <i>Spraycoating</i> e f) Sublimação.....	24
Figura 3	PCA score plots showing the different clusters of samples. The three classes (new, in use and expired) are stated.....	38
Figura 4	Correlation loadings plot for the principal components on lipstick samples: <i>m/z</i> range of 520-560 (DAGs) for the expired product, <i>m/z</i> range of 890-1000 (higher TAGs) for the “in-use” products and <i>m/z</i> range of 1100-1210 (ceramides) for the new products. The marked ions were the ones chosen as biomarkers of each degradation phase.....	36
Figura 5	Score plots of the eyeliner sample groups. The groups are represented as “exp” for expired samples, “new” for new samples and “in-use” for used samples.....	37
Figura 6	Correlation loadings for the principal components of the eyeliner samples: it is noticed a very close correlation for both the new and “in-use” groups, as they presented ions on the <i>m/z</i> range of 700-800 (lower TAGs). It is possible to observe several ions on the <i>m/z</i> 900 and higher. The marked ions were the ones chosen as biomarkers of each degradation phase.....	39
Figura 7	MSI of the samples analyzed on ImageJ software for the semi-quantification. The intensity on the grayscale indicates more (darker) or less (lighter) concentration of the desired analyte. This figure also illustrates that all samples have been assigned the same area for further quantitative comparison.....	43
Figura 8	Semi-quantification results. The graph presents a comparison between all the nine samples as to the content of Sudan III (<i>m/z</i> 351 – [M-H] ⁻). It is noticeable that sample CCR has the greatest relative quantity when compared to all the others. The values stated on the top refer to the mean found with the calculations of the triplicates. The values are expressed in arbitrary units.....	44
Figura 9	MS/MS spectrum of ion on <i>m/z</i> 351 – [M-H] ⁻ identified as Sudan III.....	45
Figura 10	Lipstick samples stamped onto the TLC plate. The blue rectangle delimits the intersecting area where the analysis was performed.....	57
Figura 11	MS/MS spectrum of the compound at <i>m/z</i> 1055 [M+Na] ⁺ and the structures assigned both to the precursor ion and its CID products (<i>m/z</i> 775 and 495). Note that there is a mass decrease of 280 a.m.u corresponding to the loss of a linoleic acid moiety.....	60

Figura 12 Chemical images of the intersecting area (a) in the positive ion mode and (b) in the negative ion mode. Note that, for each specific lipstick, the corresponding lipid marker distribution is what gives a more detailed contour of the sample limits. Green image: sample L1; red image: sample L2; blue image: sample L3.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Assignment for characteristic ions $[M+Na]^+$ of each sample class. The ^a refers to the proposal of carbon number and double bonds number on each molecule.....	40
Tabela 2	Nail polish samples and their color assignment. The third column refers to the observed aspect of the product.....	42
Tabela 3	Assignments and collision-induced dissociation products of lipstick lipid markers. The data is presented both in the positive and negative ion modes.....	58

INTRODUÇÃO GERAL

Biomarcadores

Os biomarcadores podem ser utilizados clinicamente para compreensão de mecanismos moleculares, diagnóstico, monitoramento da evolução de uma doença e também da resposta terapêutica e/ou toxicológica. Os biomarcadores moleculares apresentam-se em diferentes formas, e como consequência diversas estratégias têm sido adotadas para suas descobertas. (Rifai e cols, 2006).

A busca de biomarcadores é de grande interesse acadêmico, clínico e industrial. Porém, apesar do grande investimento na área, a velocidade de criação de patentes e diagnósticos envolvendo biomarcadores ainda é lenta. As razões deste fenômeno são o longo e difícil caminho a partir da descoberta ao teste clínico. Há seis componentes de processos essenciais para obter um novo biomarcador: descoberta, qualificação, verificação, otimização, validação clínica e comercialização. São três os maiores desafios na busca e descoberta de biomarcadores: i) complexidade dos biofluidos; ii) a baixa abundância relativa de muitos biomarcadores específicos de doenças; iii) variabilidade das manifestações das doenças nos seres humanos. No Brasil existe escassez de dados em pesquisa com biomarcadores utilizando metabólitos celulares de baixo peso molecular empregando estratégias metabolômicas. Portanto, o uso da metabolômica como ferramenta para a identificação de biomarcadores clínicos torna-se indispensável. Assim, aliar a metabolômica com a descoberta, qualificação, verificação, e validação de biomarcadores torna-se uma tarefa de suma importância científica e tecnológica. Por sua vez, os lipídeos, esfingolipídios e ceramidas podem ser bons biomarcadores, tanto para o entendimento de mecanismos moleculares, como na

viabilidade para ser utilizado como futuro foco terapêutico em fisiopatologias. (Kaddurah e cols, 2008).

Metabolômica

A metabolômica hoje é uma importante plataforma bioquímica para o estudo de mecanismos e identificação de biocomponentes existentes nos organismos em diversas condições fisiopatológicas. Revela potenciais biomarcadores e ampliar a compreensão da etiopatogenia dessas doenças, estudando os modelos celulares e in vivo de desordens que envolvem alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo, incluindo a dislipidemia, aterosclerose, e síndrome metabólica. Para tanto, utilizaremos a abordagem da metabolômica como ferramenta básica para solucionar tais desafios, o que aumenta a eficiência de detecção dos componentes moleculares que poderão ser usados para a compreensão molecular de condições como obesidade, do diabetes e da síndrome metabólica. (Kaddurah e cols, 2008)

A metabolômica corresponde à análise das moléculas do metaboloma. O metaboloma é o conjunto dos produtos finais resultante da diversidade das atividades enzimáticas integrando as respostas aos estímulos exteriores (mecânicos ou químicos) num tecido ou conjunto de células específicas, ou seja, o conjunto das moléculas de baixo peso molecular geradas pelo metabolismo primário e intermediário. (Kaddurah e cols, 2008).

Uma vez conhecida a composição dos metabólitos através de diferentes técnicas, pode-se prever, por exemplo, a ativação de determinados genes (nos casos de regulação conhecida), entender os mecanismos moleculares, avaliar o risco imediato para determinadas doenças de forma a poder intervir quando ainda em estágio

subclínico, ou identificar novos biomarcadores de doenças e assim obter um diagnóstico (Sabatine e cols, 2008).

As estratégias metabolômicas para identificação de biomarcadores podem ser sub-divididas em 1) Metabolic profiling: Identificação e quantificação de um número pré-definido de metabólitos, que são geralmente relacionados a uma via metabólica específica; 2) Metabolic fingerprint: análises rápidas cuja função é fornecer a classificação da amostra. Também utilizada como importante ferramenta de screening para diferenciar estados biológicos (caso/ controle, doença/saúde); 3) Metabolic footprint análise dos metabólitos secretados/excretados por um organismo; 4) Metabolite target analysis análise quantitativa e qualitativa de um ou de vários metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica; 5) Metabonomics análise quantitativa de metabólitos em resposta a uma lesão/perturbação (doença ou tratamento terapêutico) ou a modificação genética. Devido às várias estratégias dispostas em análise metabolômica é possível acessar um número enorme de estados fisiopatológicos e as vias bioquímicas para melhor entendê-los, além de auxiliar novas descobertas na área de medicina translacional (Kaddurah e cols, 2008).

Técnicas utilizadas em metabolômica

As estratégias metabolômicas são realizadas utilizando-se técnicas como a cromatografia com alto poder de separação e/ou técnicas de boa resolução como a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas para análise final. Após as análises nos equipamentos específicos, existe a necessidade de etapa de tratamento de dados feita com programas quimiométricos específicos.

A complexidade da composição química de amostras biológicas pode gerar problemas na cromatografia e espectrometria de massas (MS). Isso decorre devido à complexidade da amostra. Contudo, a análise de metabólitos totais de um sistema biológico começa a ser considerada e executada através do uso de cromatografia e espectrometria de massas. A evolução das técnicas de cromatografia e espectrometria para análise do metaboloma são desafios que auxiliarão futuramente no diagnóstico clínico no contexto mundial. A cromatografia é um método que, embora não identifique os componentes separados (necessitando para isso de outras técnicas analíticas acopladas), auxilia na eliminação de interferentes e tem como sua maior vantagem a conservação estrutural dos compostos separado. As técnicas cromatográficas se aplicam muito bem para, por exemplo, a classe dos lipídeos, ácidos orgânicos e metabólitos intermediários, além de outras substâncias que compõem o metaboloma. (Kaddurah e cols, 2008).

Os desafios da detecção e quantificação de substâncias em matrizes complexas (como os fluidos biológicos) serão gradativamente minimizados pela ferramenta espectrometria de massas, que é capaz de analisar simultaneamente grupos de analitos (elementos de interesse numa análise) em poucos minutos e em poucos microlitros de amostra, a qual vem rapidamente avançando em sensibilidade, rapidez e versatilidade. Todo esse aprimoramento possibilita a aplicação da espectrometria de massas, com grande confiabilidade e sensibilidade, em diversos campos científicos e tecnológicos da atualidade, como estudos de compostos nas áreas da química analítica e ambiental, da bioquímica, da biologia e da medicina. (Kaddurah e cols, 2008).

A importância da espectrometria de massas (MS) na elucidação estrutural, bem como no fingerprinting e footprinting é inquestionável em metabolômica. Indubitavelmente, os avanços significativos das técnicas de ionização Electrospray

(ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), recentemente o Desorption Electrospray Ionization (DESI) e o aumento da sensibilidade dos novos equipamentos estão contribuindo muito para a aplicação da MS em metabolômica. As análises de biomoléculas encontradas em amostras complexas foram facilitadas com desenvolvimento da técnica nos últimos anos. Na ionização por electrospray, as substâncias da solução analítica são protonadas ou desprotonadas, formando cátions ou ânions. Esta solução é então nebulizada através de um tubo capilar onde se aplica uma alta voltagem. Devido à ação deste potencial aplicado no capilar e dos gases de solvatação e nebulização, o solvente presente nas gotículas é evaporado restando assim a molécula protonada ou desprotonada na fase gasosa. Entre as características da ionização por electrospray, pode-se citar a baixa energia dos íons formados e a possibilidade da formação de íons multicarregados. Todas estas características fazem com que as técnicas de cromatografia e espectrometria de massas sejam um importante apoio para as estratégias metabolômicas e aumentam seu poder de acesso a biomoléculas para compreensão dos diferentes estados biológicos (Sabatine e cols, 2005).

MALDI-MSI (*Mass Spectrometry Imaging*)

Ao longo da última década, a metabolômica tornou-se um complemento indispensável às análises de quase todos os aspectos das ciências da vida. Estes incluem a elucidação de processos celulares na saúde e doença e a descoberta e avaliação de compostos farmacêuticos. A espectrometria de massas (MS) tornou-se uma ferramenta analítica essencial para a investigação destes processos moleculares. Novos avanços em MS oferecem agora a oportunidade para estudos na investigação de

interações moleculares no tecido intacto. Ao contrário dos estudos realizados por décadas, estudos realizados hoje podem aproveitar a especificidade molecular oferecida pela MS. Em particular, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) *Mass Spectrometry Imaging* (MSI) permite a análise espacial da distribuição de metabólitos diretamente em amostras biológicas (Figura 1).

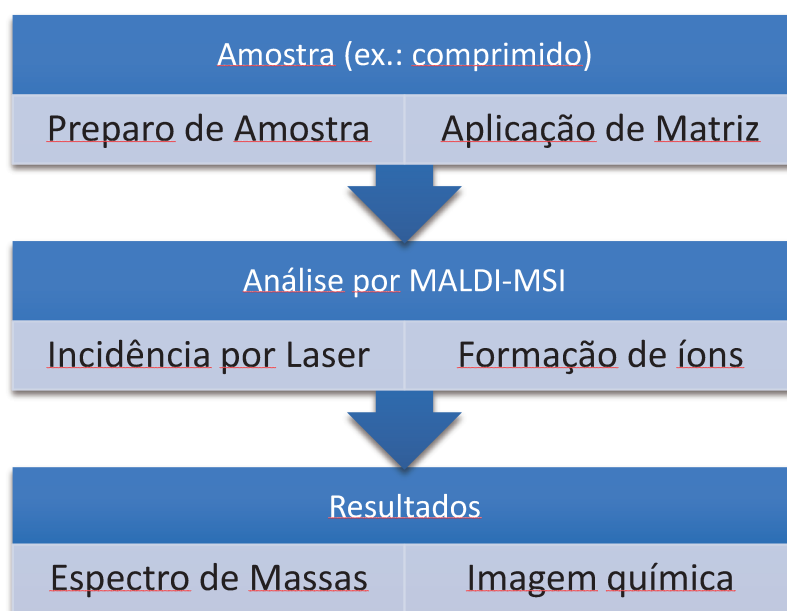


Figura 1: Fluxograma geral de um experimento de *MALDI Imaging* em tecido.

A MSI pode ser usada para localizar moléculas específicas, como drogas, lipídios, peptídeos e proteínas diretamente a partir de secções de tecido fresco congelado, comprimidos e até mesmo células únicas com imagem de boa resolução relativa. A MSI tem resultado em excelentes novas oportunidades em uma ampla variedade de aplicações, incluindo a determinação espacial da expressão de metabólitos diferenciais em tecidos doentes contra sadios, caracterização de tecidos com tumores e não tumores adjacentes, e o mapeamento da localização de drogas e distribuição metabólica em tecidos alvos ou no contexto do corpo todo de animais.

Um dos aspectos mais atraentes da MSI é a capacidade de simultaneamente visualizar o arranjo espacial de centenas de analitos diretamente do tecido, sem qualquer conhecimento prévio ou a necessidade de reagentes específicos.

Aspectos práticos de um experimento de MALDI-MSI

Análises diretas de tecidos com MALDI-MSI permitem detectar compostos endógenos e exógenos presentes em tecidos com especificidade molecular enquanto mantém suas orientações espaciais. Esta combinação única, acoplando excelente sensibilidade e tempo de análise rápida, apresenta vantagens para uma ampla variedade de aplicações nos diversos campos biológicos. O preparo de amostra e fluxograma de trabalho são relativamente simples e não necessitam de homogeneização ou etapas de extração/reconstituição. Basicamente, uma amostra congelada é seccionada, colocada na placa de MALDI, revestida com matriz, e analisada por MALDI-MS. Resumidamente, MALDI é uma técnica de ionização que envolve irradiação da amostra com um *laser*, tipicamente UV (N_2 a 337 nm ou $Nd:Y_3Al_5O_{12}$ a 355 nm), para formar íons-analitos em fase gasosa. Uma matriz é necessária para absorver a energia do *laser*, auxiliando na desorção de moléculas intactas de analitos, e na sua ionização (frequentemente via reações de transferência de prótons). Além disso, a aplicação de matriz em tecidos também serve para extrair analitos (proteínas) fora do tecido. A matriz é um composto orgânico pequeno usualmente com um extenso sistema cromóforo (sistema de conjugação de ligações π), o qual é preparado em solução e aplicado na superfície do tecido. Normalmente, utiliza-se o ácido sinapínico (SA) para análises de amostras com pequenos peptídeos, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) para análises de pequenas moléculas, dentre muitos outros (ácido 2,5-diidroxibenzóico, p-

nitroanilina e 9-aminoacridina). No entanto, há vários outros compostos que podem ser utilizados como matrizes; a escolha de uma matriz ideal para a classe de interesse a ser analisada é crucial para aumentar a sensibilidade e seletividade da análise.

Há diferentes métodos de aplicação de matriz (Figura 2), e alguns são inclusive comercializados. O método empregado está diretamente relacionado com o experimento a ser realizado e no caso de experimentos de imageamento químico, com a qualidade da imagem adquirida. Os experimentos de perfil metabolômico necessitam a aplicação da matriz de modo uniforme, na região de interesse delimitada, portanto, o método mais indicado é o de atomização da solução por meio de um sistema de compressão. Experimentos de imagem com alta resolução necessitam um sistema de aplicação de matriz capaz de aplicá-la por todo o tecido, com uma camada uniforme e em grande quantidade, pois é esta a etapa crucial para a obtenção de alta qualidade de imagem.

O método mais simples para deposição de matriz é a utilização de uma pipeta manual, esta é alternativa mais barata, porém possui baixa reprodutibilidade e resolução, pois as gotas da matriz ficam muito grandes e irregulares. As imagens de alta resolução, no entanto, necessitam de aplicadores de matriz que forneçam a maior cobertura de matriz e mais homogênea possível. Um dos sistemas utilizados para este caso lança um spray fino da solução da matriz sobre toda a superfície do tecido. Há um sistema comercial, o ImagePrep (Bruker Daltonics, Alemanha) e um sistema com o mesmo princípio, mas que pode ser montado no próprio laboratório pelos cientistas, o Spraycoating. Este é um sistema de borrifamento de solvente igual aos utilizados em revelação de placas de TLC (Thin Layer Chromatography). Por último, existe também um sistema de aplicação de matriz para análises de imagens de alta resolução

baseados no princípio de sublimação. É um experimento que pode ser facilmente montado no próprio laboratório, sendo robusto e simples, e é mais utilizado na análise de lipídeos (Mass Spectrometry Research Center - Nashville, TN).

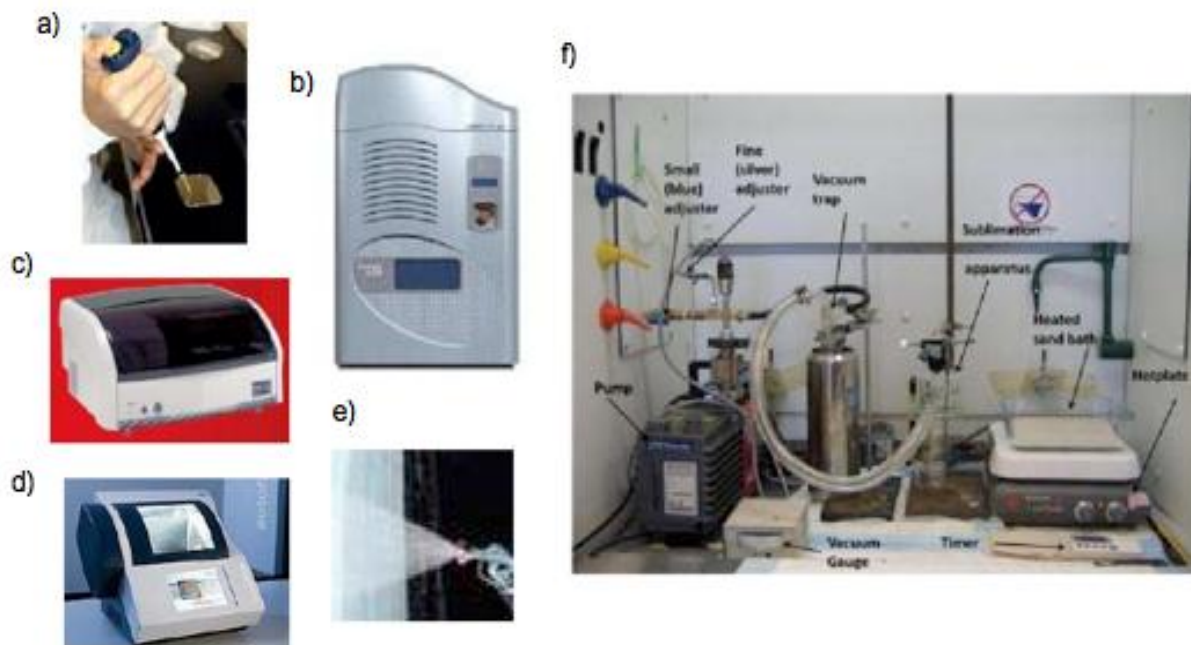


Figura 2: Sistemas utilizados na aplicação de matriz em tecidos. a) Manual, b) *Portrait*, c) *Shimadzu ChIP*, d) *ImagePrep*, e) *Spraycoating* e f) Sublimação.

Aplicações recentes em MALDI-MSI

MALDI-MSI tem evoluído exponencialmente e novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e aplicadas a fim de aprimorar cada vez mais a técnica. Como exemplo pode-se citar o acoplamento de MALDI-MSI e analisadores de massas de ultra-alta resolução, como o Orbitrap e o FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*); este último pode gerar espectros de massas com resolução de aproximadamente 1.000.000 (Comisarow & Marshall, 1974). Outro avanço foi à utilização de MALDI-MSI com *ion mobility MS (Imaging IMMS)*. *Imaging IMMS* foi apresentada com grande

sucesso em um modo totalmente automatizado para a separação estrutural e por m/z de analitos diretamente do tecido de cérebro de rato.

Até o momento as técnicas de MALDI-MSI foram descritas utilizando-se tecidos frescos. Porém, trabalhos recentes mostram a possibilidade de realizar MSI em outras e diversificadas matrizes complexas diferentes.

Dessa forma, torna-se cada vez mais claro à comunidade científica que MALDI-MSI é uma técnica que, apesar de ser bastante nova, está se desenvolvendo rapidamente e vem apresentando vários avanços tecnológicos, fornecendo cada vez mais ferramentas úteis e importantes para o entendimento de sistemas biológicos.

Metabolômica e Cosméticos: o início da Cosmetômica

O mercado de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos é extremamente dinâmico, pois a cada dia novos princípios ativos são descobertos e tendências de estilo de vida fazem surgir e desaparecer linhas inteiras de produtos, sempre movimentando bilhões de dólares anualmente. A chegada de novos concorrentes ao mercado e a constante inovação no setor exige, cada vez mais, investimentos, tecnologia e agilidade no ciclo de desenvolvimento de um novo produto e um processo produtivo alinhado para atender a demanda do mercado e satisfazer o cliente (Alencar *et. al.*, 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulatório do setor no Brasil, define os cosméticos como *“Preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”* (RDC 211/2005 - ANVISA). A agência divide os tipos de cosméticos em duas categorias: produtos de grau 1 e produtos de grau 2. Os produtos de grau 1 são caracterizados por terem propriedades básicas ou elementares, as quais não necessitam ser inicialmente comprovadas e não requerem informações detalhadas em relação ao seu modo de uso e suas restrições de uso (ANVISA). Alguns exemplos: sabonetes, xampus, cremes de beleza, loção de beleza, óleos, maquiagem, batons, lápis e delineadores labiais, produtos para maquiagem dos olhos (sem proteção solar) e perfumes.

Já os produtos caracterizados como grau 2 possuem indicações específicas, cujas características requeiram sua segurança e/ ou eficácia a serem provadas, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (ANVISA). Exemplos de produto de grau 2 são: desodorante íntimo, desodorante antiperspirante axilar, esfoliante para "peeling" químico, protetores labiais com protetor solar, alguns produtos para área dos olhos, filtros UV, clareadores, produtos para ondular cabelo, sendo que todos os produtos infantis e maquiagem com proteção solar (FPS) são de grau 2.

Apesar de haver definições regulatórias, não existe ainda nenhum tipo de controle ou estudos sobre a toxicidade em humanos dos componentes (ex.: corantes) presentes nas formulações. O risco de contaminação em longo prazo deve ser levado em conta, bem como a identificação e caracterização de substâncias que possam apresentar caráter cumulativo no organismo.

As novas técnicas disponíveis, como o MALDI-MSI, permitem não apenas a identificação e caracterização de possíveis contaminantes, como também tem o poder de criar imagens mostrando a localização exata das mesmas, como por exemplo, pontos de oxidação em um batom. A exemplo de outras estratégias "ômicas" já bastante conhecidas e desenvolvidas, lançaremos mão de um segmento ainda completamente inovador: a Cosmetômica, isto é, busca de marcadores relevantes em biociências através da análise direta dos produtos cosméticos acabados (comerciais). O enorme potencial da técnica visa renovar completamente o conceito de análises e controle de qualidade dentro da indústria cosmética, trazendo benefícios como a agilidade e a alta confiabilidade,

associados a uma tecnologia de ponta, que garante um perfil de qualidade de altíssimo nível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- R.R. Catharino, H.T. Godoy, J.A. Lima-Pallone, Quim. Nova, 29 (2006) 972.
- J. A, Q. Huang, G. Wang, W. Zha, B. Yan, H. Ren, S. Gu, Y. Zhang, Q. Zhang, F. Shao, L. Sheng, J. Sun, Analytical Biochemistry, 379 (2008) 20.
- A. Fardet, R. Llorach, J.F. Martin, C. Besson, B. Lyan, E. Pujos-Guillot, A. Scalbert, J. Proteome Res., 7 (2008) 2388.
- Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2006), 20, 2901-2905.
- Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Analytical Chemistry* (2008), 80, 898-903.
- Haddad, R.; Catharino, R. R.; Marques, L. A.; Eberlin, M. N. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2008), 22, 3662-3666.
- Saraiva, S. A.; Abdeinur, P. V.; Catharino, R. R.; Nunes, G.; Eberlin, M. N. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (2009), 23, 357-362.
- Haddad, R.; Milagre, H. M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. *Analytical Chemistry* (2008), 80, 2744-2750.
- M.S. Sabatine, E. Liu, D.A. Morrow, E. Heller, R. McCarroll, R. Wiegand, G.F. Berriz, F.P. Roth, R.E. Gerszten, Circulation, 112 (2005) 3868.
- N. Rifai, M.A. Gillette, S.A. Carr, Nature Biotechnology, 24 (2006) 971.
- R. Kaddurah-Daouk, B.S. Kristal, R.M. Weinshilboum, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 48 (2008) 653.
- Comisarow, M.B.; Marshall, A.G. *Chemical Physics Letters* (1974), 25, 208-209
- Alencar, S. ; Melo D. - Novos Produtos Cosméticos: Planejamento da Qualidade na Fase de Concepção e Desenvolvimento, Enegep, (2008)
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução-RDC 211, de 14 de julho de 2005. Estabelece a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Implementação de estratégias e plataformas analíticas inovadoras, utilizando como ferramenta analítica a Espectrometria de Massas por Imagem na investigação de impurezas e substâncias tóxicas em cosméticos de uso geral feminino. Conforme o andamento do projeto, o potencial de expansão das análises para outros produtos farmacêuticos também será avaliado pela mesma técnica. Além disso, uma nova forma de preparo de amostras simplificada será estudada e desenvolvida.

Objetivos Específicos

- Identificar substâncias e/ou produtos de degradação tóxicos em amostras comerciais de cosméticos, como esmaltes, batons e delineadores de uso comercial no Brasil.
- Acompanhar os biomarcadores através de *metabolic fingerprint* e *target analysis* em relação à presença de contaminantes e substâncias de relevância toxicológica.
- Através do *metabolic fingerprint*, realizar a bioprospecção de contaminantes provenientes de rotas de síntese em comprimidos de medicamentos acabados.

- Desenvolver no Laboratório Innovare de Biomarcadores uma nova metodologia analítica de preparo de amostras que possa auxiliar os futuros estudos metabolômicos e cosmetômicos.

CAPÍTULO I

Análise de Cosméticos Usando MALDI-MSI

Cosmetic Analysis Using MALDI-MSI

*Diogo Noin de Oliveira, Sabrina de Bona Sartor, Mônica Siqueira Ferreira,
Rodrigo Ramos Catharino*

Abstract: A new “omic” platform – Cosmetomics – that proves to be extremely simple and effective in terms of sample preparation and readiness for data acquisition/interpretation is presented. This novel approach employing Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI) for cosmetic analysis has demonstrated to readily identify and quantify compounds of interest. It also allows full control among all the production phases, as well as the final product, by the integration of both analytical and statistical data. This work has focused on daily use products, namely nail polishes, lipsticks and eyeliners of multiple brands sold in the worldwide market.

Keywords: Cosmetics, Cosmetomics, Analysis, Mass Spectrometry.

1. Introduction

The cosmetic industry is one of the most financially promising branches on the pharmaceutical business, as it shows an increasingly effective potential in sales worldwide [1-3]. With such an important position, the quality and safety of its

products must be observed and good manufacturing protocols must be followed at all times [4].

Traditionally, the study and evaluation of chemical compounds in cosmetics is given by the association between a chromatographic technique – such as HPLC or GC – coupled with ESI-Tandem Mass Spectrometry [5]. It is understood that cosmetic products are complex mixtures and thus a previous treatment (e.g.: extraction and derivatization) should be employed before the analysis itself. However, some of these sample preparation steps may generate a great deal of potentially toxic residues, which is not something compatible with the new trends in eco-friendly policies. Moreover, as for the large-scale analysis scenario that industry fits into, these conventional procedures are somewhat difficult to automate; therefore they become extremely time-consuming [6].

Mass Spectrometry Imaging is a relatively simple and multifunctional technique that has been developed in order to identify the spatial distribution (2-dimensional and sometimes 3-dimensional) of compounds in any physical sample, e.g. a tissue section [7] or a drug tablet [8]. This powerful and versatile technique may be adapted with several different types of ionization, such as SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) [9]; [10], DESI (Desorption Electrospray Ionization) [11] and the most common and well-developed variation, MALDI [12]. In every case, despite being a simple task, sample preparation must always be the critical and best-established part of the analysis, for it determines the success or failure of the experiment. On a tissue sample, for instance, every detail, from

thickness to type of preservation and matrix application, must be taken into account, as the results may vary when a different method is employed [13].

The concept of MALDI-MSI is to transform the sample, e.g.: a tissue section, into a two-dimensional picture, providing the compound dispersion information on each particular area. The operating principle is very straightforward: a laser beam is shot throughout the sample extension and every shot produces a mass spectrum of that particular spot, which in terms of result may be understood as a “pixel” that will form the final chemical image [12].

When it comes to cosmetics, no previous work had been found in the literature, as at first glance it may not seem to have a great interest in this technique for this kind of analysis. Most daily-use cosmetics, make-up for instance, are very basic and relatively cheap preparations, and that is the reason why they are so highly disseminated over the world [1]. It is not a rare thing to find some premium brands being imitated by lower-budget companies that promote falsification and use prohibited or health-hazardous compounds [14].

Although much has been investigated on heavy-metals and even lipid profiles in lipsticks [15-17], no previous work has explored the capability of finding biomarkers that differentiate, for example, new and expired/oxidized products. As for nail polishes and eyeliners, no research either has been made in the fields of pigments and lipid profiling, respectively.

We now describe a fast and robust technique to evaluate and quantify compounds of interest in common cosmetic matrixes, such as nail polishes,

lipsticks and eyeliners using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). With virtually no complex sample preparation, this new field, “Cosmetomics”, has been developed as a very interesting and straightforward alternative for both industrial and academic analysis using the principles of MALDI-MSI on product analysis purposes. For lipsticks and eyeliners, it was possible to differentiate: new, in use and expired products based on their lipid profile. For the nail polishes it was possible to quantify the dye, Sudan III (m/z 351, $[M-H]^+$), which is a potential class 3 carcinogen [18].

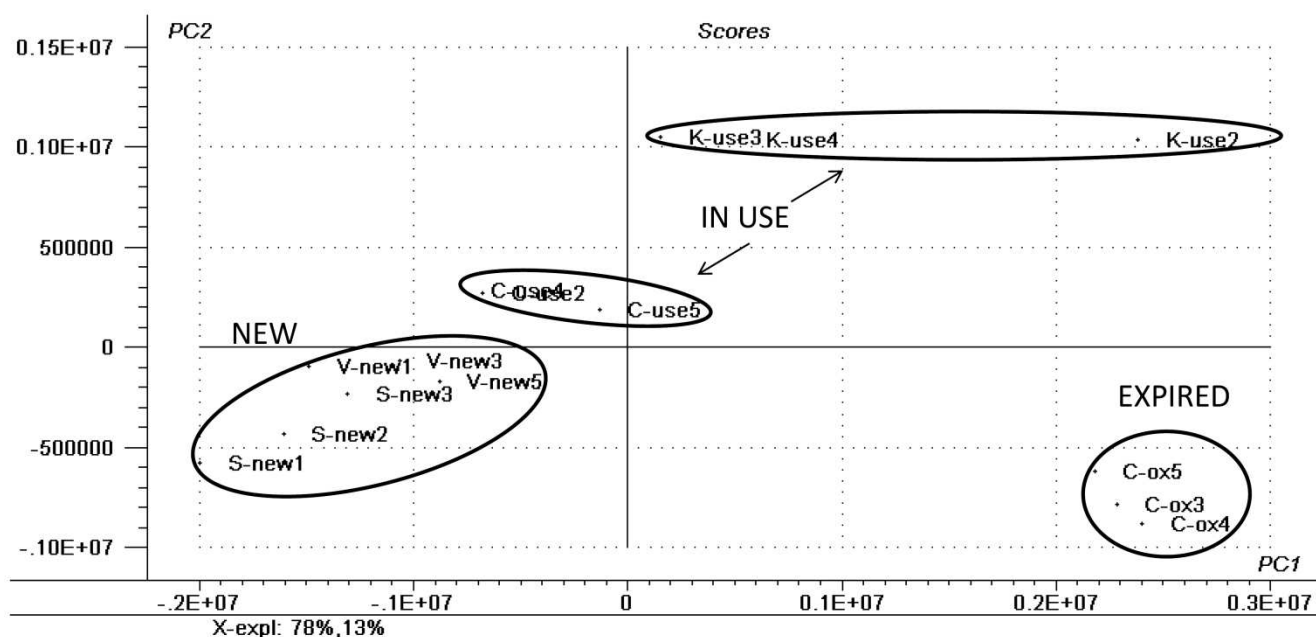
2. Results and Discussion

2.1 Chemometric Analysis

Principal Component Analysis (PCA) was performed based on characteristic signals observed on each specific sample group. Lipsticks often present a formulation that is rich on very complex lipidic matrixes (up to ~90%), such as Ricinus communis seed oil (castor oil), beeswax, Candelilla wax, Carnauba wax, lanolin, etc. These matrixes are comprised of a wide range of lipid classes, generally triacylglycerols (TAG), sphingolipids (SP), free fatty acids and esters, among many others. This great variability in the composition is what gives characteristic smoothness, thickness, creaminess and even the thixotropic effect of the product. When analyzing and comparing different groups of lipsticks (new, in use and expired) we observe that the lipid composition differs especially in terms of the oxidation of TAGs and the presence or absence of higher-complexity lipids,

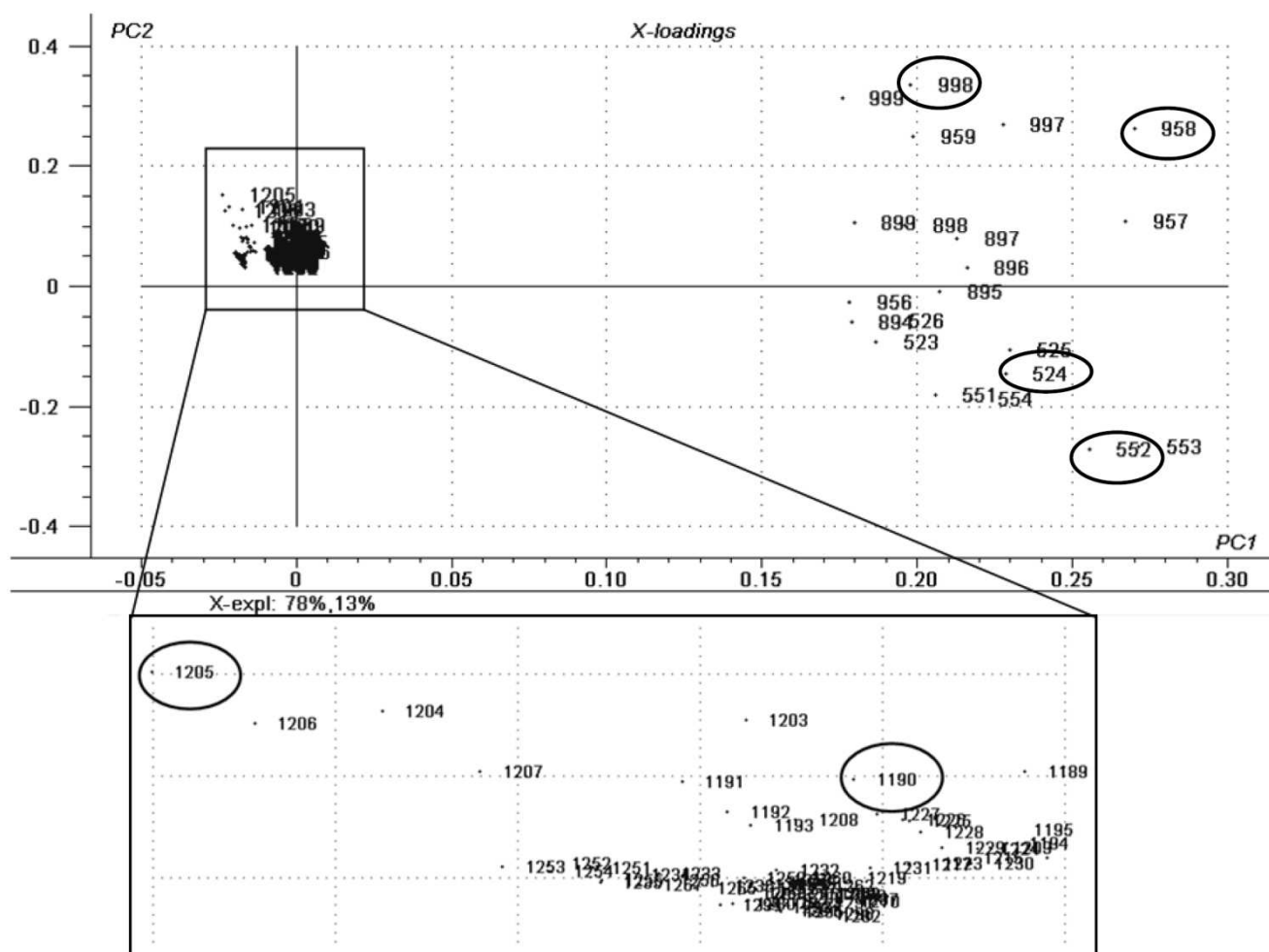
such as ceramides. In Fig. 3 it is possible to observe the differentiation by PCA between the new, in use and expired lipsticks of multiple brands.

Figure 3. PCA score plots showing the different clusters of samples. The three classes (new, in use and expired) are stated.



This difference is given by the presence of cleaved species on the expired as diacylglycerols (DAG) that usually lie on the m/z range of 500 to 600. The “in-use” samples presented several types of TAGs, whereas the new samples presented sphingolipids (ceramides) as the main difference among the others, as it may be seen on Fig. 4.

Figure 4. Correlation loadings plot for the principal components on lipstick samples: m/z range of 520-560 (DAGs) for the expired product, m/z range of 890-1000 (higher TAGs) for the “in-use” products and m/z range of 1100-1210 (ceramides) for the new products. The marked ions were the ones chosen as biomarkers of each degradation phase.



700 to 800 demonstrate the presence of TAGs both in the new and in the “in use” samples. Fig. 5 demonstrates the score plots and Fig. 6 the correlation loadings for the different types of samples analyzed. Table I shows the assignment of the characteristic ions detected on each sample group in the positive mode as $[M+Na]^+$ species.

Figure 5. Score plots of the eyeliner sample groups. The groups are represented as “exp” for expired samples, “new” for new samples and “in-use” for used samples.

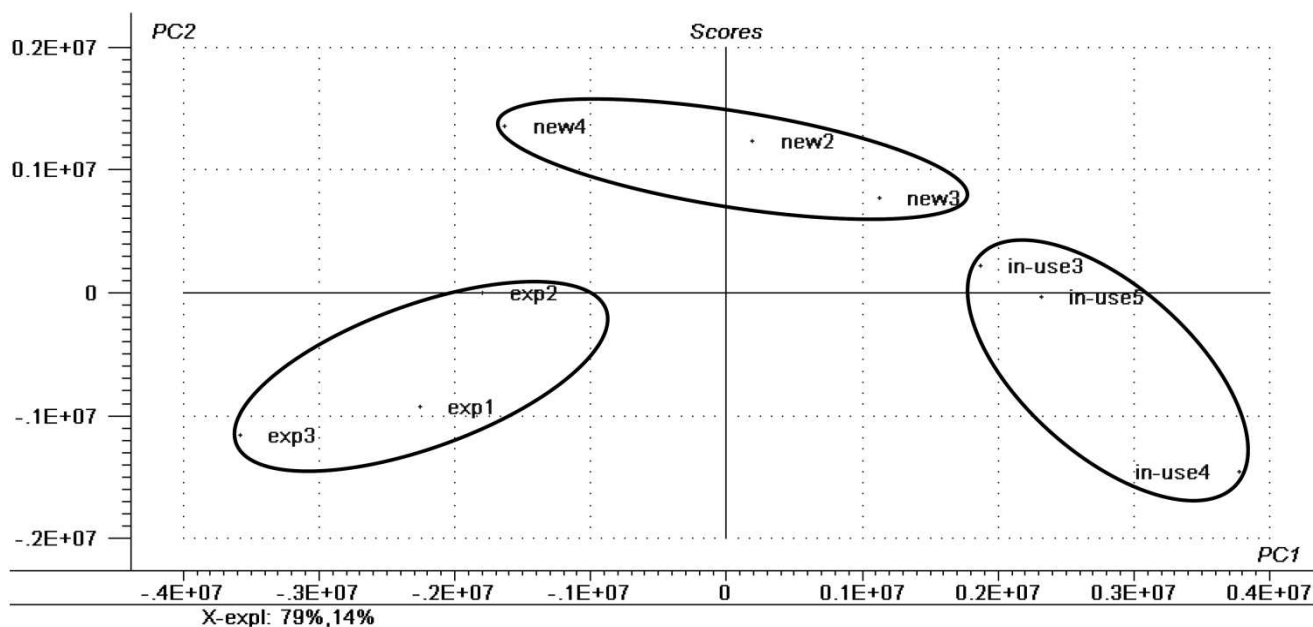
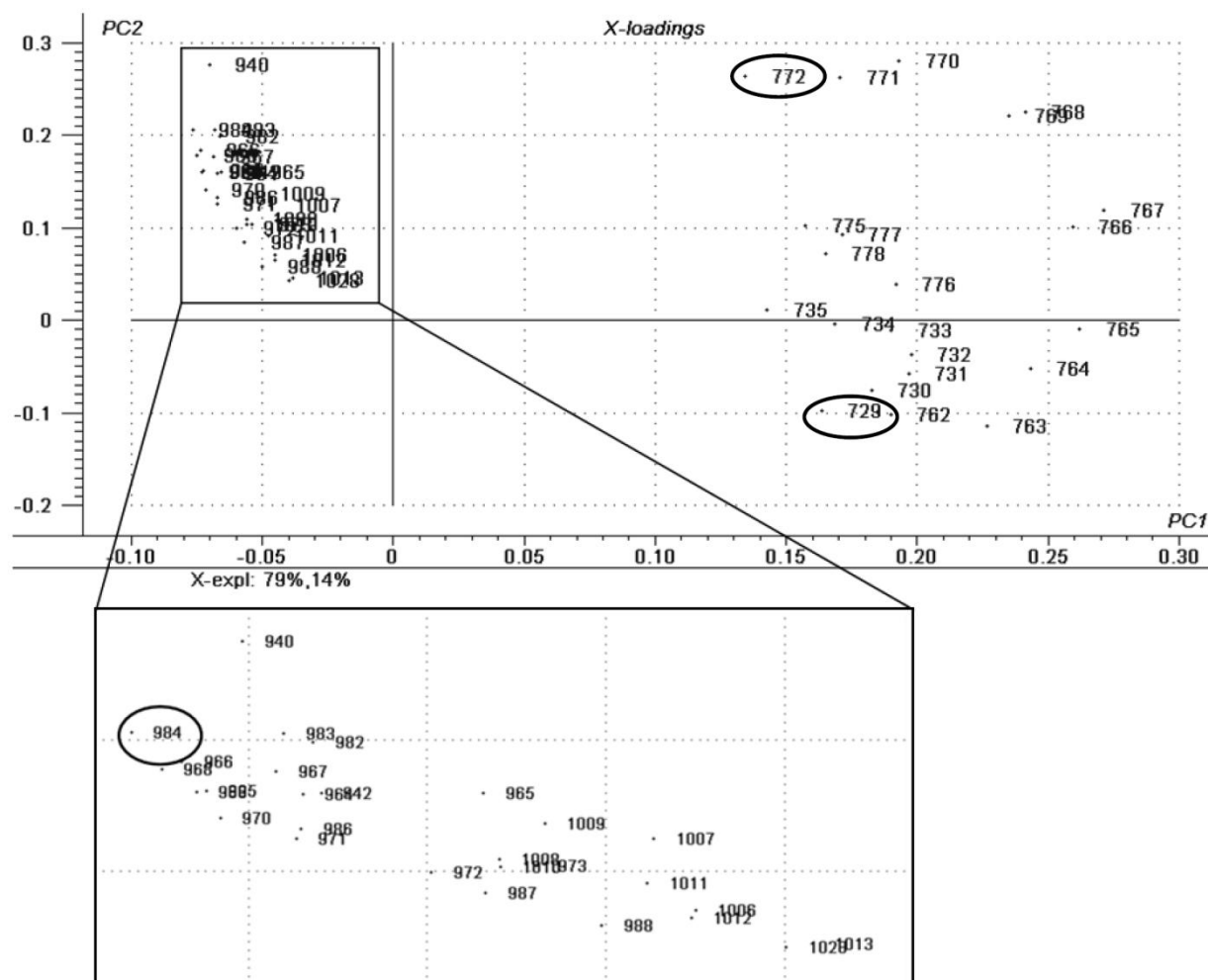


Figure 6. Correlation loadings for the principal components of the eyeliner samples: it is noticed a very close correlation for both the new and “in-use” groups, as they presented ions on the m/z range of 700-800 (lower TAGs). It is possible to observe several ions on the m/z 900 and higher. The marked ions were the ones chosen as biomarkers of each degradation phase.



chemical transformations are more bound to occur than oxidation alone, as it is in the case of eyeliners.

Table 1 reports the probable assignment for some of the characteristic ions of each sample class. This is based on the MS/MS spectra obtained and its comparison to lipid databases and characteristic fragmentations predicted on the Mass Frontier software. No structural proposal was placed, since these m/z ratios cannot be assigned to a single structure, as some of them show position isomers within the same lipid class.

Table 1. Assignment for characteristic ions $[M+Na]^+$ of each sample class. The ^a refers to the proposal of carbon number and double bonds number on each molecule.

SAMPLE	LIPID CLASS	CN:DB^a	$[M+Na]^+$ m/z	CID Fragments m/z
LIPSTICK - NEW	Ceramides	38:1	1190	1146, 1045, 1001
	Ceramides	36:1	1205	1161, 1060, 907
LIPSTICK - USED	Triacylglycerols	58:6	958	914, 844, 660
	Triacylglycerols	60:0	998	700, 419, 363
LIPSTICK - EXPIRED	Diacylglycerols	28:6	524	480, 299, 270
	Diacylglycerols	30:6	552	508, 299, 407
EYELINER- NEW	Triacylglycerols	44:1	772	728, 627
EYELINER - USED	Triacylglycerols	41:2	729	685, 611, 567
EYELINER - EXPIRED	Triacylglycerols	59:0	984	966, 940, 839

2.2 Quantification by Imaging

The described technique for quantification by image is based on a recent approach utilizing ImageJ [19]. This software was already commonly used as a tool for western blot quantification [20]. The results obtained in this experiment have demonstrated that this approach proves to be a useful, rapid and facile tool for semi-quantitative analysis.

Sudan III was chosen because of its potential carcinogenic risk and because it is also a common dye for cosmetics [21]; in this case, it was stated as an ingredient on all the labels as CI 21600 (color index) and/or Solvent Red 23 (commercial name). The health risks associated with a possible carcinogen in a nail polish formulation is the accidental ingestion by nail biting or even when cooking or baking.

The obtained results are rather interesting and coherent, as the quantity of Sudan III (m/z 351, $[M-H]^-$) on each sample is directly influenced by the color of the nail polish. As seen on Table 2, the analyzed products were from different colors, but all of them listed “CI 21600” on their labels. Sample CCR, which has presented the highest relative concentration, is light blue. It is known that Sudan III is a red-to-brown dye under normal conditions, but when submitted to acidic conditions, turns to blue. This particular dye also helps to give a thick and glossy aspect, which was expected from CCR. The other two highest content samples (RCR and ICR) are red-to-brown in color.

Table 2. Nail polish samples and their color assignment. The third column refers to the observed aspect of the product.

Sample	Color	Aspect
AHC	Dark Blue	Creamy
CCR	Light Blue	Creamy- Glossy
HTT	Brown	Plain
ICM	Red	Metallic
ICR	Orange-Golden	Creamy
IPC	Orange	Plain
RCR	Red	Creamy
RMT	Pink	Metallic
SLB	Golden	Plain

Fig. 7 presents the comparison of the different samples (numbered from 1 to 9) in the data table in a graph of intensity in grayscale.

Figure 7. MSI of the samples analyzed on ImageJ software for the semi-quantification. The intensity on the grayscale indicates more (darker) or less (lighter) concentration of the desired analyte. This figure also illustrates that all samples have been assigned the same area for further quantitative comparison.

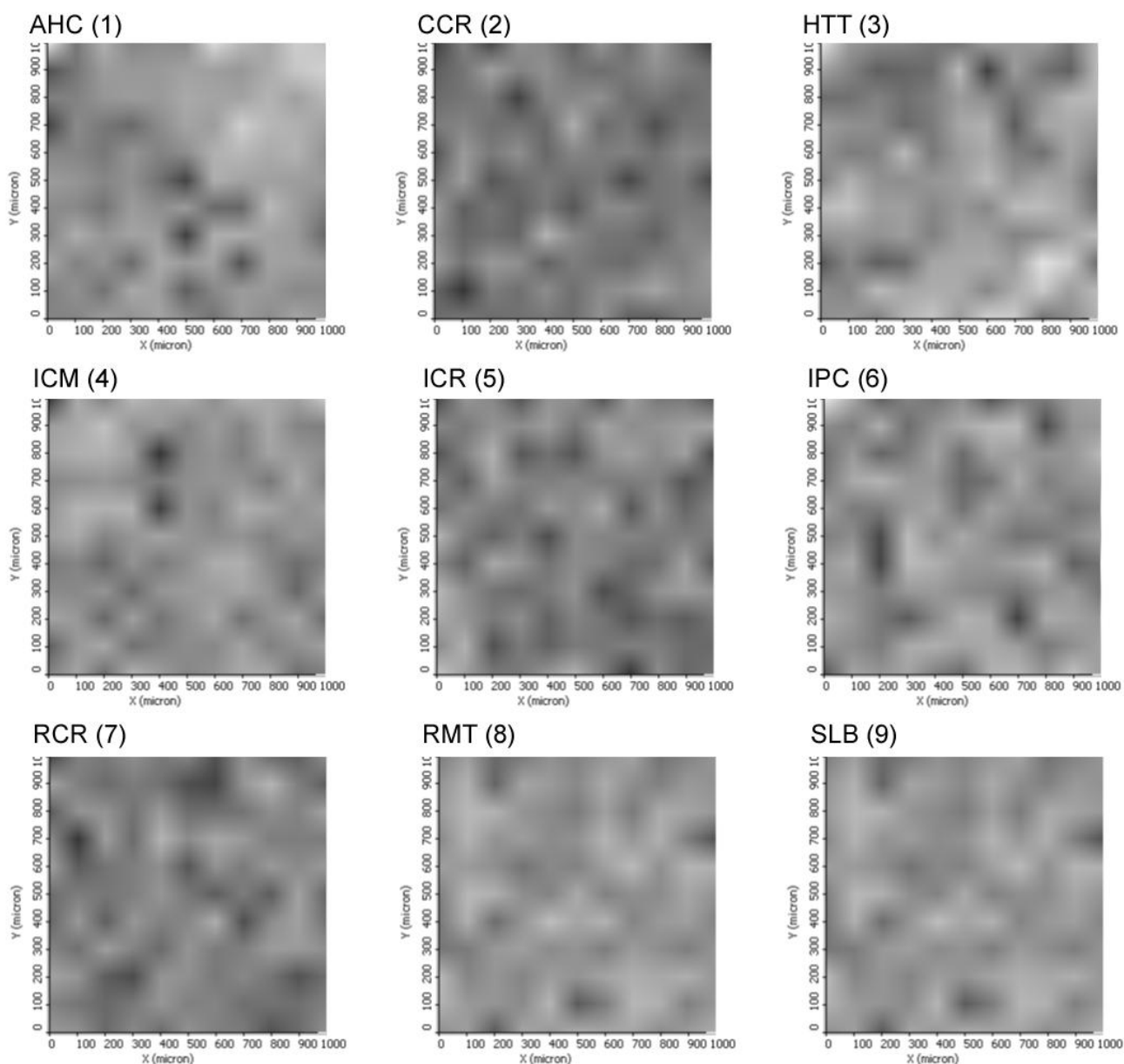
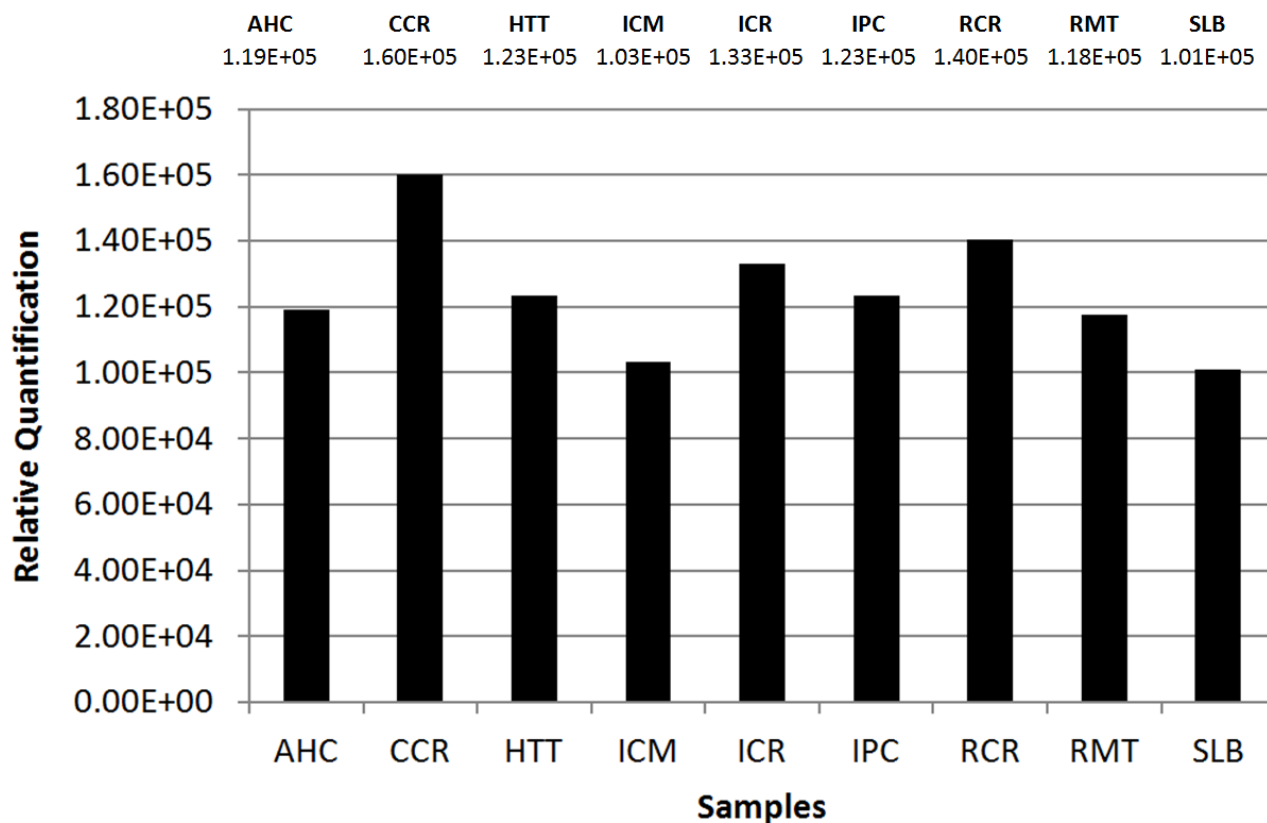


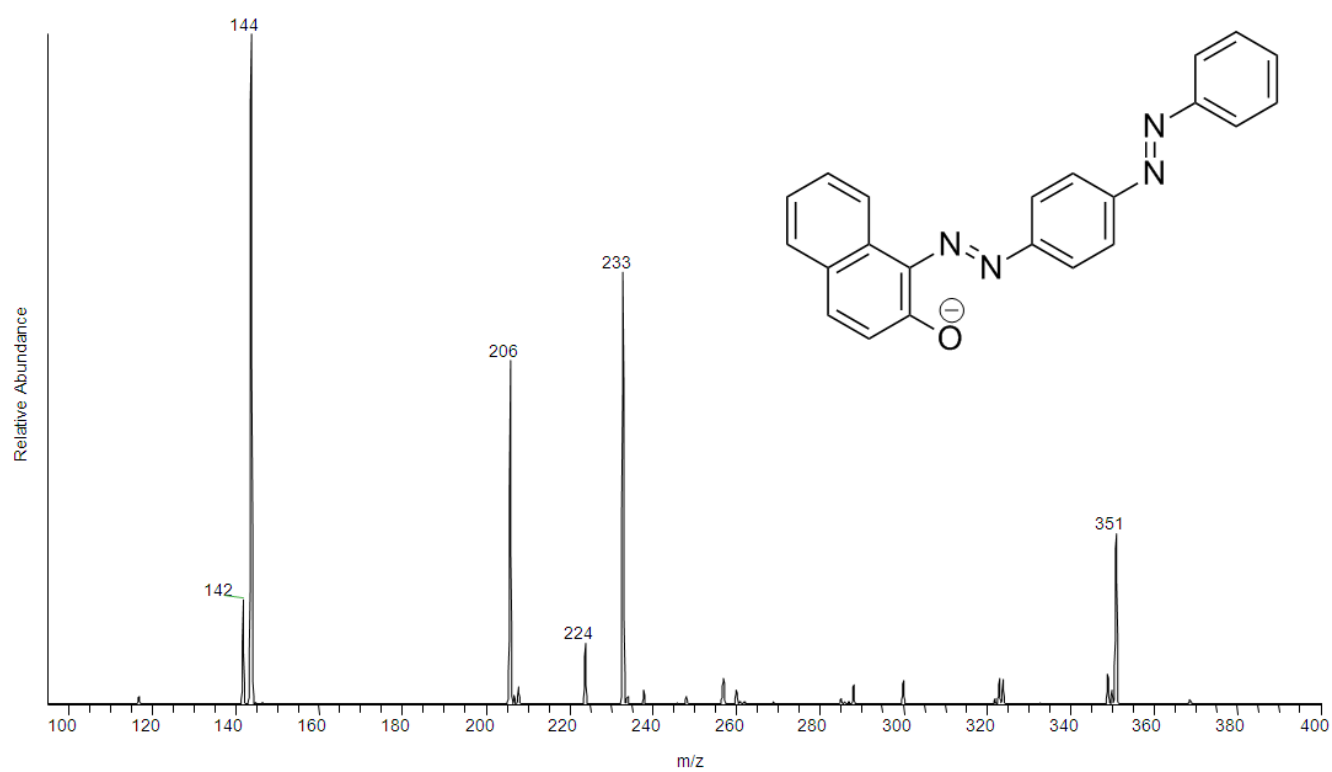
Fig. 8 presents the obtained values of the semi-quantification and their comparison on a graphic of bars. The numbers have no unit scale and represent the relationship between the grayscale intensity and the analyzed area.

Figure 8. Semi-quantification results. The graph presents a comparison between all the nine samples as to the content of Sudan III (m/z 351 – $[M-H]^+$). It is noticeable that sample CCR has the greatest relative quantity when compared to all the others. The values stated on the top refer to the mean found with the calculations of the triplicates. The values are expressed in arbitrary units.



As seen on Fig. 9, the MS/MS spectrum of the ion on m/z 351 identified as Sudan III.

Figure 9. MS/MS spectrum of ion on m/z 351 – $[M-H]^-$ identified as Sudan III.



3. Experimental Section

3.1 Sample preparation

All cosmetics samples were available and purchased from regular market stores. Nine different samples of nail polishes from six different manufacturers were purchased, all of them indicating Sudan III on the composition (label); for the eyeliners, three different samples (new, used and expired), all from different manufacturers, were purchased; for the lipsticks, five different samples (2 new, 2 used and 1 expired), all from different manufacturers, were purchased. For lipstick application, a soft rod covered in nitrilic polymer was coated with the samples and then “stamped” into MALDI-appropriate stainless steel plates (GMS-Thermo, California, USA). The eyeliners and nail polishes were directly applied onto the plate surface. A 10 mg/mL solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix (Sigma Aldrich, Pennsylvania, USA) was prepared (50% acetonitrile:methanol) and the samples were coated using a commercially available airbrush.

3.2 MALDI Mass Spectrometry Imaging

A MALDI-LTQ-XL with Imaging feature (Thermo Fisher, California, USA) was used to acquire mass spectrometric data. Typical operation conditions were 4 μ J Nitrogen laser power, 100 μ m raster step size, sample size of 1000x1000 μ m (100 pixels), 3 shots per step and 30-50 eV of collision-induced dissociation (CID)

for MS/MS. Full scan analysis were performed in a m/z range of 50 to 2000. All samples were acquired in the positive ion mode for eyeliners and lipsticks and negative ion mode for the nail polish. The compound classes were proposed both by MS/MS spectra and software calculations with Mass Frontier (v. 6.0, Thermo Scientific, California, USA).

3.3 Quantification by MSI

Imaging data were analyzed in triplicates using ImageQuest software (Thermo Scientific, California, USA). The quantification was performed using ImageJ (National Institutes of Health, USA – Open Source) on grayscale images. The area was standardized in number of pixels for all the replicates and the ImageJ software assigned a value for the selection based on the intensity of each pixel.

3.4 Statistical analysis of data

Principal component analysis (PCA) was performed using Statistica v. 7 (Statsoft Inc., Oklahoma, USA). The mass spectra were expressed as the intensities of individual $[M+Na]^+$ ions (i.e. variables). Ions with relative intensities of less than ~10% were excluded. The data was preprocessed using auto scale and the PCA method was run.

4. Conclusions

The development of a new “omic” strategy to employ on the analysis of cosmetics has been successful to the extent of this work. The scope of this new analytical platform is based on manufactured products, contemplating from raw material to the final product. Stability studies, degradation byproducts analysis and efficiency of processes are also very feasible to be measured and understood by the cosmetomics platform. Viewing the processes and integrating them as a whole – from chemical composition to quantification and statistical analysis simultaneously – is, beyond question, the strongest feature related to cosmetomics

This novel approach on product analysis will surely help to improve the speed to a level that the cosmetic industry desires. The possibility of establishing a quick and assertive procedure that can be implemented on a cosmetic industry to perform “right-on-time” analysis (up to 60 seconds per sample) is very much appealing, as some usual analytical procedures are very time-consuming and demand highly-qualified personnel regarding sample preparation, for instance. Requiring little or no sample preparation, not to mention the usage of very small quantities of solvents and toxic products for analysis, is what reveals a real contrast to these other strategies.

Finally, when it comes to effectiveness and reliability, this new “omic” platform enables the industry to launch products with higher quality and safety for the public. For this reason, several other works will definitely come following this trend and new applications will start being developed.

Acknowledgments

INNOVARE Biomarkers Lab would like to acknowledge CAPES, FAPESP and INCT for the financial support that allowed this work to be developed.

References and Notes

1. Brandt, F. S.; Cazzaniga, A.; Hann, M., Cosmeceuticals: Current Trends and Market Analysis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 2011, 30, (3), 141-143.
2. Kumar, S., Exploratory analysis of global cosmetic industry: major players, technology and market trends. *Technovation* 2005, 25, (11), 1263-1272.
3. Oh, C. H.; Rugman, A. M., Regional Sales of Multinationals in the World Cosmetics Industry. *European Management Journal* 2006, 24, (2–3), 163-173.
4. Draelos, Z. D., Cosmeceuticals: undefined, unclassified, and unregulated. *Clinics in Dermatology* 2009, 27, (5), 431-434.
5. Doi, T.; Takeda, A.; Asada, A.; Kajimura, K., Characterization of the decomposition of compounds derived from imidazolidinyl urea in cosmetics and patch test materials. *Contact Dermatitis* 2012, 67, (5), 284-292.
6. Salvador A., M. C. P.-M., A. Chisvert and M. D. de la Ossa, News & Views Green analytical strategies for sunscreen controlA. Salvador, M. C. Pascual-Marti, A. Chisvert and M. D. de la Ossa of the Departamento de Quimica Analitica, in Valencia, Spain, explain how green chemical technologies can be used for environmentally benign analysis of cosmetics including sunscreens. *Green Chemistry* 2002, 4, (6), G55-G62.
7. Solon, E. G., "Autoradiography: high-resolution molecular imaging in pharmaceutical discovery and development". *Expert Opinion on Drug Discovery* 2007, 2, (4), 503-14.
8. Earnshaw, C. J.; Carolan, V. A.; Richards, D. S.; Clench, M. R., Direct analysis of pharmaceutical tablet formulations using matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2010, 24, (11), 1665-1672.

9. Hoshi, T.; Kudo, M., High resolution static SIMS imaging by time of flight SIMS. *Applied Surface Science* 2003, 203-204, (0), 818-824.
10. Strick, R.; Strissel, P. L.; Gavrillov, K.; Levi-Setti, R., Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 2001, 155, (6), 899-910.
11. Ifa, D. R.; Wiseman, J. M.; Song, Q.; Cooks, R. G., Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *International Journal of Mass Spectrometry* 2007, 259, (1-3), 8-15.
12. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular Imaging of Biological Samples - Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* 1997, 69, (23), 4751-4760.
13. Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M., Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* 2003, 38, (10), 1081-92.
14. Haddad, R.; Catharino, R. R.; Marques, L. A.; Eberlin, M. N., Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008, 22, (22), 3662-3666.
15. Basheer, C.; Tan, S. H.; Lee, H. K., Extraction of lead ions by electromembrane isolation. *Journal of Chromatography A* 2008, 1213, (1), 14-18.
16. Gunduz, S.; Akman, S., Investigation of lead contents in lipsticks by solid sampling high resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2012, (in press).
17. Challinor, J. M., A rapid simple pyrolysis derivatisation gas chromatography-mass spectrometry method for profiling of fatty acids in trace quantities of lipids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 1996, 37, (2), 185-197.
18. Ahmed Refat, N. A. G.; Ibrahim, Z. S.; Moustafa, G. G.; Sakamoto, K. Q.; Ishizuka, M.; Fujita, S., The induction of cytochrome P450 1A1 by Sudan Dyes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2008, 22, (2), 77-84.
19. Grey, A. C.; Crouch, R. K.; Koutalos, Y.; Schey, K. L.; Ablonczy, Z., Spatial Localization of A2E in the Retinal Pigment Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011, 52, (7), 3926-3933.
20. Gassmann, M.; Grenacher, B.; Rohde, B.; Vogel, J., Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *ELECTROPHORESIS* 2009, 30, (11), 1845-1855.

21. Okada, J.; Kanbe, R.; Kuzukawa, M.; Ikeda, Y.; Yoshimura, K.; Hayakawa, R.; Matsunaga, K., Identification of contact allergens in C.I. Solvent Red 23 (commercial Sudan III) by chemical analysis and animal testing. *Contact Dermatitis* 1991, 25, (5), 313-8

CAPÍTULO II

Análise Direta de Batons por STELDI-MSI

Direct Analysis of Lipsticks by Sorptive Tape-like Extraction Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging

Diogo de Oliveira, Mônica Siqueira, Sabrina Sartor and Rodrigo Catharino

Abstract: A novel and rapid technique for lipid evaluation in lipsticks is presented. This approach uses STE-LDI-MSI for fast fingerprinting of complex lipids, such as triacylglycerols, phosphoglycerols and simpler structures as free fatty acids. With no sample preparation, it has demonstrated to readily identify compounds of interest by integrating both full scan and MS/MS data. This work has focused on lipsticks of several brands globally marketed.

Keywords: Colour Cosmetics, Chemical Analysis, Formulation/Stability and Mass Spectrometry Imaging.

Objective: Create and establish a simple and rapid method for lipid evaluation in daily-use female products, namely lipsticks.

1. Introduction

Lipids are a major component of daily-use makeup cosmetics, and the large number of different vegetable or animal sources of this material is what distinguishes a formulation from another [1, 2]. The sought properties related to this class of compounds are often related to skin softness, elasticity and moisture [3]. To reach these highly desired characteristics, several lipid subclasses are utilized in a formulation, such as phosphoglycerols (PGs), ceramides and,

principally, triacylglycerols (TAGs). The latter are the major components of skin sebum in the stratum corneum [4]. Moreover, free unsaturated fatty acids are known for their augmented performance in skin penetration [5], a feature that may improve both hydration and potentially drug delivery in formulations [6].

Techniques for compound assessment in complex formulations have always been based on chromatographic techniques, often coupled with mass spectrometry [7]. In cosmetics, liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) are usually associated with Electrospray Ionization (ESI) Tandem Mass Spectrometry [8]. The use of these techniques is directly related to high compound complexity in cosmetic formulations. Depending on the class of molecules desired for analysis, several steps of sample preparation must be observed [9-13]. Sometimes, these particular procedures may lead either to long-lasting processes or to the employment of costly equipment just to do so [10, 13]. Furthermore, extractions both in solid-phase and liquid-phase generate large amounts of solvent residues, a practice increasingly out of line with new trends in chemistry [14].

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) has been widely used in the past few years for lipid evaluation in complex matrices, both in animal and vegetable [15-17]. However, commercial analyses refer mainly to the raw material (crude/refined/bleached oil) rather than focusing on the finished product or even in productive phases [18]. Deriving from this approach, Mass Spectrometry Imaging (MSI) is a feasible tool for direct analysis of lipids in cosmetics, as its readiness of data acquisition proves to be highly desirable from an analytical point of view.

Following this trend, extraction techniques with sorptive characteristics have also been developed to study of many chemical compounds in complex matrices. Sorptive Tape Extraction (STE), for instance, has been employed on the study of skin sebum composition using *in vivo* samples [19]. This particular approach has described sample collection directly from the skin surface by contact of a flexible polydimethylsiloxane (PDMS)-coated tape. Based on this procedure, this work has coupled a sorptive tape-like substrate – a silica gel plate for thin-layer chromatography (TLC) – to direct analysis in a MALDI-MSI instrument.

Herein is described an easy and rapid technique to evaluate lipids and find compounds of interest that differentiate the samples in lipsticks using Sorptive Tape-like Extraction coupled with Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging (STE-LDI-MSI). No sample preparation and no matrix are required in this novel cosmetic assessment tool that uses the same idea of MALDI-MSI.

2. Experimental Section

2.1 Sample preparation

Three commercially available lipsticks of different brands were purchased from beauty shops in the Campinas area (São Paulo, Brazil). All samples were applied in a nitrilic polymer-covered rod and then directly stamped onto a silica gel (60 Å) plate for TLC (Merck, Darmstadt). The lipstick samples were stamped in

such a way that an intersecting area between the three of them was formed, as seen in figure 10. No further actions were taken neither any matrix was applied.

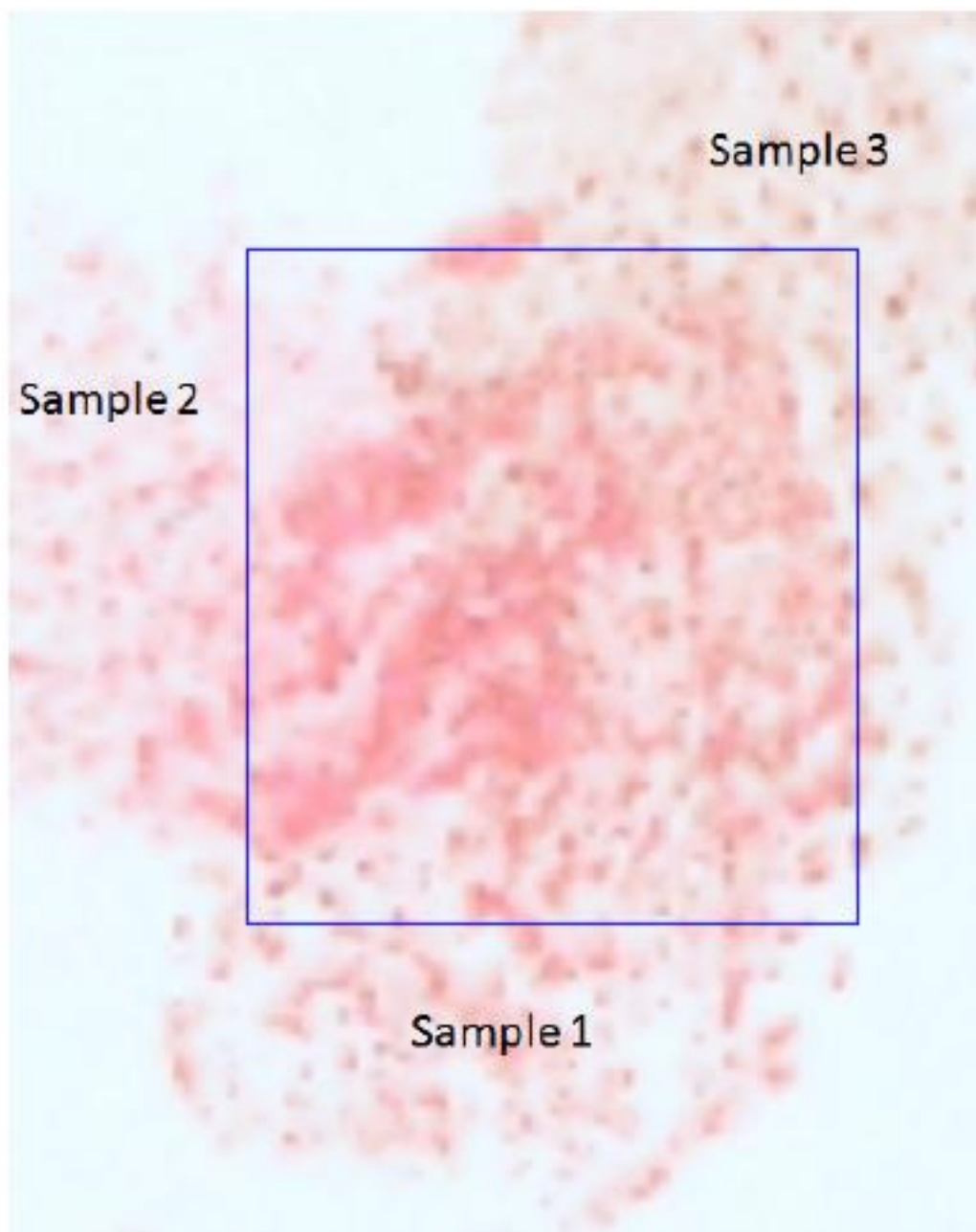
2.2 Mass Spectrometry Imaging

A MALDI-LTQ-XL instrument with Tissue Imaging feature (Thermo Fisher, California, USA) was used on mass spectrometric data acquisition. Operating conditions were established at 20 μ J Nitrogen laser power, 50 μ m raster step size, sample size of 700x700 μ m, 3 laser shots per step and 30-50 eV of collision-induced dissociation (CID) for MS/MS experiments, when required. Survey scan was performed in m/z range of 50 to 500 in negative mode and 500 to 1500 in positive mode. Lipid structures were proposed both supported by MS/MS fragmentation and software calculations with Mass Frontier (v. 6.0, Thermo Scientific, California, USA).

3. Results and Discussion

Figure 10 shows the spatial distribution of lipsticks stamped on the TLC plate. The samples (L1, L2 and L3) are indicated, as well as the intersection where all three of them are mixed. The main idea motivating this approach is both to assess composition and find specific lipid markers when one or more samples are mixed.

Figure 10. Lipstick samples stamped onto the TLC plate. The blue rectangle delimits the intersecting area where the analysis was performed.



In the negative ion mode it is possible to assign a specific lipid marker for every lipstick; in other words, it is possible to differentiate the three samples, even when they are mixed together. Survey scan for each sample has presented $[M-H]^-$ ions that were later confirmed by MS/MS experiments – isolation of the ion following fragmentation for structure elucidation. The species found at m/z 283, 367 and 427 are assigned as the free fatty acids stearic acid and lignoceric acid and the lipophosphoglycerol LPG (12:0/0:0), for samples L1, L2 and L3, respectively. This result is supported by the information shown in table 3, showing characteristic lipids and their CID products for both ion modes. This data leads to a plausible conclusion, since each sample, when analyzed individually, presents a unique lipid marker that is not present in any of the others. When combined, these markers appear both in the survey scan and in the isolation by MS/MS, presenting the same fragmentation pattern.

Table 3. Assignments and collision-induced dissociation products of lipstick lipid markers. The data is presented both in the positive and negative ion modes.

Sample	m/z	Elemental composition	CN:DB*	CID
Negative mode				
L1	283	$C_{18}H_{36}O_2$	18:0	265, 255
L2	367	$C_{24}H_{48}O_2$	24:0	349, 339
L3	427	$C_{18}H_{39}OP$	12:0/0:0	271
Positive mode				
L1	897	$C_{57}H_{94}O_6$	54:7	879
L2	955	$C_{57}H_{104}O_9$	54:3	937, 657
L3	1055	$C_{60}H_{105}O_{11}P$	60:6	775, 495

*Carbon number: double bond.

The positive ion mode presents acylphosphoglycerols (PGs) and a great number of triacylglycerols (TAGs), which are the major constituents of vegetable oil and animal fat, two of the main sources of lipids in cosmetic production [3]. Depending on the type of formulation, several combinations of these sources are possible, which essentially varies the TAG profile in the lipstick composition. Table 3 shows the possible assignments for these markers. All ions are stated as $[M+Na]^+$ species, as they are the most abundant form naturally found. The TAGs were found at m/z 897 (L1), derived from linolenic and linoleic acid (LnLnL) and 955 (L2), derived from ricinoleic acid (RoRoRo). This was an expected profile, since L2 was the only sample that presented *Ricinus communis* seed oil (castor oil), the natural source of ricinoleic acid and its derivatives. The signal at m/z 1055 (L3) on the other hand was found to be a PG (54:6) with three acyl groups (linoleic acid). Figure 11 shows the MS/MS spectrum of the compound and the CID products generated.

Figure 11. MS/MS spectrum of the compound at m/z 1055 $[M+Na]^+$ and the structures assigned both to the precursor ion and its CID products (m/z 775 and 495). Note that there is a mass decrease of 280 a.m.u corresponding to the loss of a linoleic acid moiety.

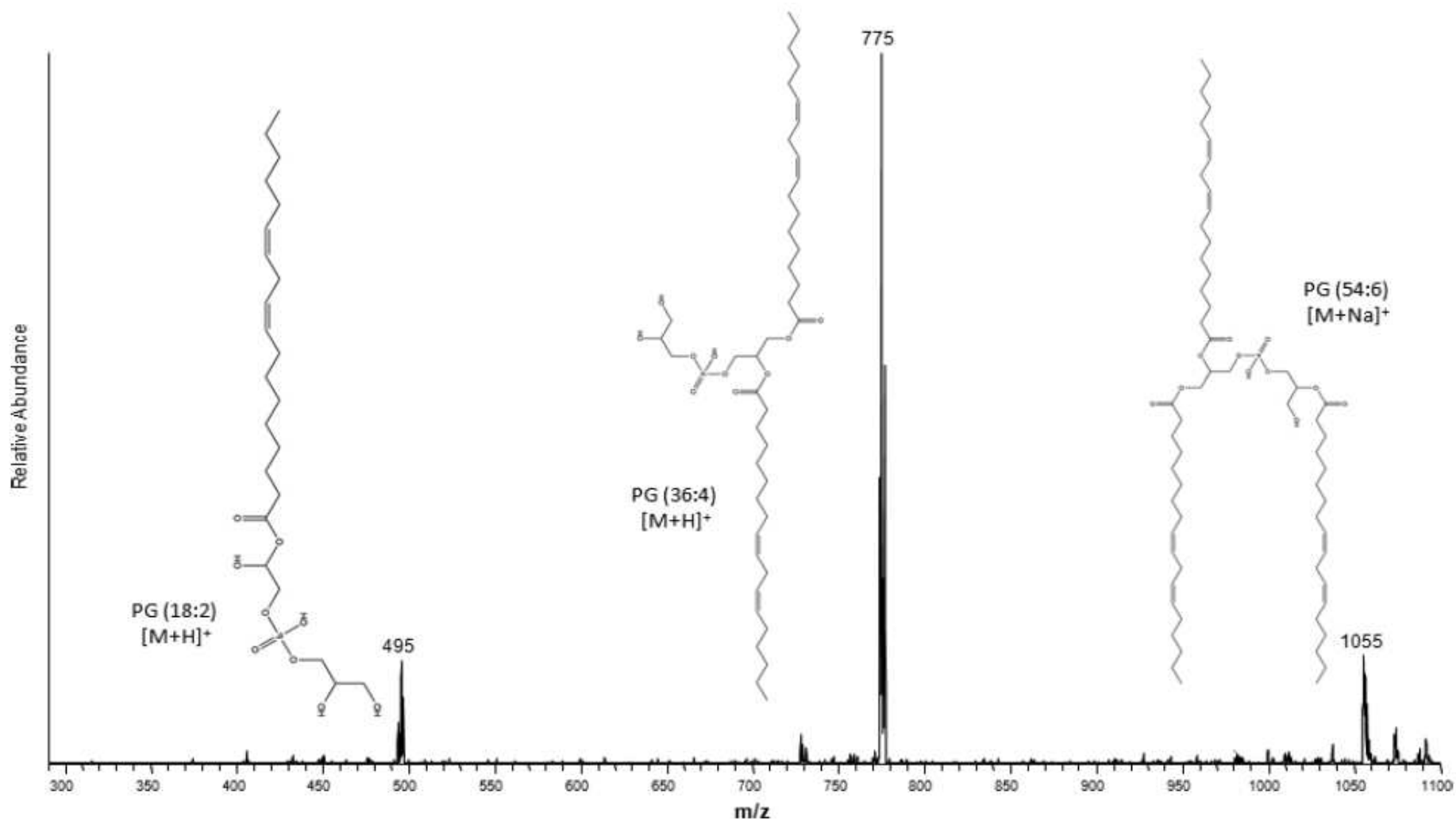
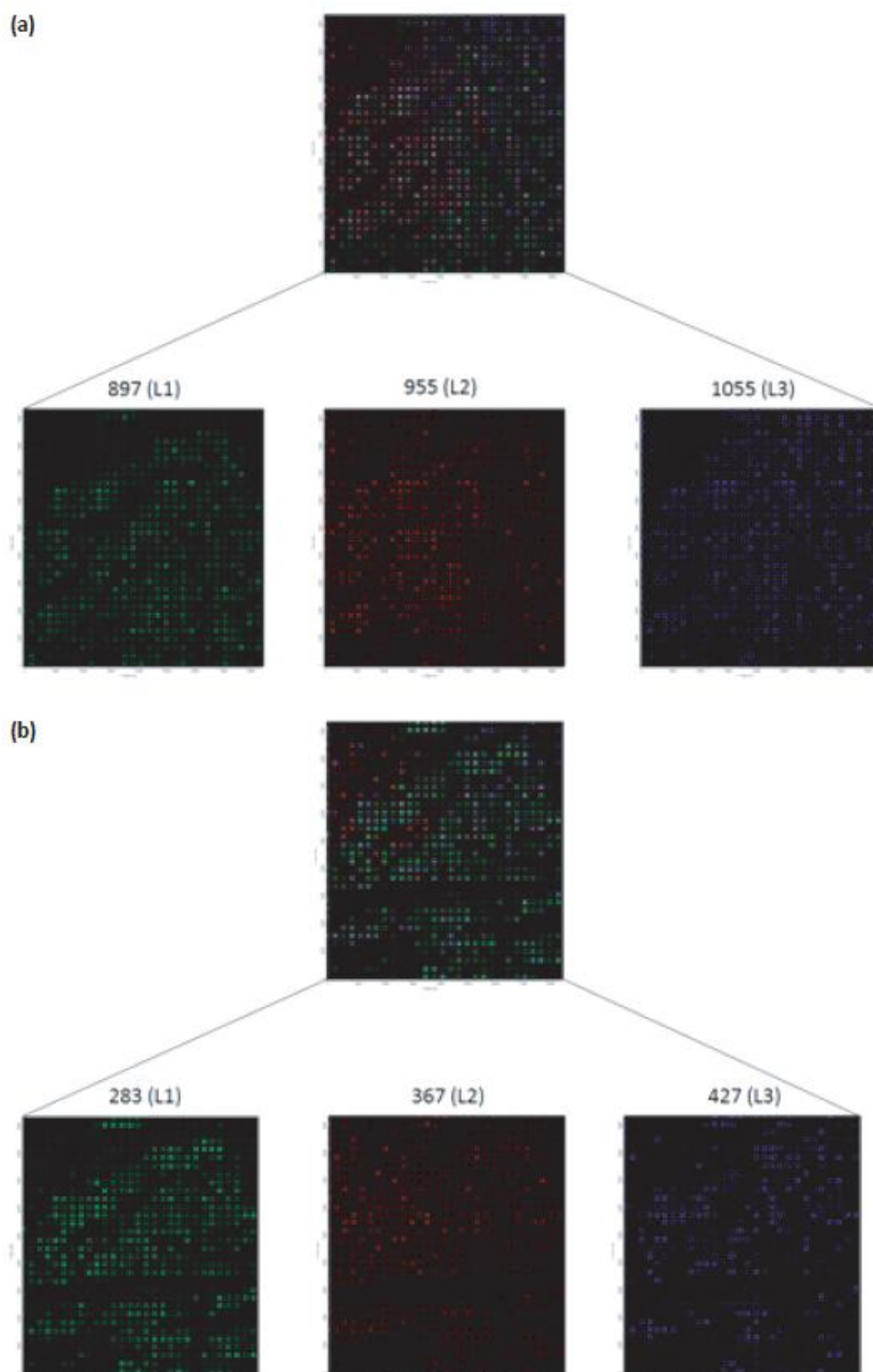


Figure 3 (**a** and **b**) present a combo of the chemical image of the superimposed lipstick samples, in the negative and positive ion modes respectively. An interesting view on the scope of the technique may be established when comparing with figure 10. Simply by analyzing the physical image of the TLC plate, there are no visible boundaries delimiting the samples in the intersecting area. On the other hand, figure 12 show the spatial distribution of the monitored ions. The species at m/z 283, 367 and 427 ($[M-H]^-$) and 897, 955 and 1055 ($[M+Na]^+$) are individually visualized and, even further, for their specificity as markers, allow the sample limits to be determined in the intersection between lipsticks. These results infer great potential on this approach as a novel methodology, for example, in assessing unknown samples for either forensic or toxicological analysis among others.

Figure 12. Chemical images of the intersecting area (a) in the positive ion mode and (b) in the negative ion mode. Note that, for each specific lipstick, the corresponding lipid marker distribution is what gives a more detailed contour of the sample limits. Green image: sample L1; red image: sample L2; blue image: sample L3.



4. Conclusion

This rapid and simple approach on lipid evaluation for cosmetics may be applied for virtually any product that contains this class of compounds in its composition. It also may be implemented in a routine for industrial purposes for quick product assessment, especially on targeted analyzes. Furthermore, toxicological and forensic analysis can take advantage of this principle to obtain accurate and reliable results in a rather quick and straightforward way.

Another important aspect brought by this procedure is the absence of matrix in the whole analytical chain, which ensures greater signal cleanliness the mass spectrum, simplifies the process and lowers the toxic potential for the analyst.

Acknowledgements

INNOVARE Biomarkers Laboratory would like to thank CAPES, CNPq and FAPESP for financial support that allowed this work to be performed.

References and Notes

1. Hernandez, E. Pharmaceutical and Cosmetic Use of Lipids. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6th Edition, John Wiley and Sons (2005).
2. Rabasco-Alvarez, A. M.; Rodríguez, M. L. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites* (2000), 51 (1-2), 74-96.
3. Shanni, D. Cosmetic preparations for moisturizing human skin containing specific lipids. US patent 5 361 012. New Jersey (1997).
4. Norlén, L. Skin barrier structure, function and formation – learning from cryo-electron microscopy of vitreous, fully hydrated native human epidermis. *Journal of International Cosmetic Science* (2003), 25 (5), 209-226.
5. Ben-Shabat, S.; Baruch, N.; Sintov, A. C. Conjugates of unsaturated fatty acids with propylene glycol as potentially less-irritant skin penetration enhancers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2007), 33 (11), 1169-1175.
6. Pearson, M.; Barr, T. L. EMU Oil-based formulations for use as an analgesic, anesthetic and antipruritic. US patent 6 528 040. Texas (2003).
7. Rainville, P. D; Stumpf, C. L.; Shockcor, J. P; Plumb, R. S.; Nicholson, J. K. Novel Application of Reversed-Phase UPLC-oeTOF-MS for Lipid Analysis in Complex Biological Mixtures: A New Tool for Lipidomics. *Journal of Proteome Research* (2007), 6 (2), 552-558.
8. Doi, T.; Takeda, A.; Asada, A.; Kajimura, K., Characterization of the decomposition of compounds derived from imidazolidinyl urea in cosmetics and patch test materials. *Contact Dermatitis* (2012), 67, (5), 284-292.
9. Becart, J.; Chevalier, C.; Biesse, J. P. Quantitative Analysis of Phospholipids by HPLC with a Light Scattering Evaporating Detector - Application to Raw Materials for Cosmetic Use. *Journal of High Resolution Chromatography* (1990), 13 (2), 126-129.
10. Lee, M. R.; Lin, C. Y.; Li, Z. G.; Tsai, T. F. Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2006), 1120 (1–2), 244-251.
11. Mikami, E.; Goto, T.; Ohno, T.; Matsumoto, H.; Nishida, M. Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2002), 28 (2), 261-267.

12. Han F.; He, Y. Z.; Yu, C. Z. On-line pretreatment and determination of parabens in cosmetic products by combination of flow injection analysis, solid-phase extraction and micellar electrokinetic chromatography. *Talanta* (2008), 74 (5), 1371-1377.
13. García-Jiménez, J. F.; Valencia, M. C.; Capitán-Vallvey, L. F. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column. *Analytica Chimica Acta* (2007), 594 (2), 226-233.
14. Salvador A., M. C. P.-M., A. Chisvert and M. D. de la Ossa, News & Views Green analytical strategies for sunscreen control. *Green Chemistry* (2002), 4 (6), G55-G62.
15. Saraiva, S. A.; Cabral, E. C.; Eberlin, M. N.; Catharino, R. R. Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009), 57 (10), 4030-4034.
16. Picariello, G.; Sacchi, R.; Addeo, F. One-step characterization of triacylglycerols from animal fat by MALDI-TOF MS. *European Journal of Lipid Science* (2007), 109 (5), 511-524.
17. Kubo, A.; Satoh, T.; Itoh, Y.; Hashimoto, M.; Tamura, J.; Cody, R. B. Structural analysis of triacylglycerols by using a MALDI TOF/TOF system with monoisotopic precursor selection. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* (2012), *In Press*.
18. O'Brien, R. *Fats and Oils: Formulating and Processing Applications*. Technomic Publishing (1998).
19. P. Sandra, S. Sisalli, A. Adao, M. Lebel, I. Le Fur, LC-GC Europe 19 (2006) 33.

CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia proposta por este trabalho, denominada Cosmetômica, apresenta-se como uma alternativa extremamente viável para implementação em análises de cosméticos, seja ela em rotinas de alta performance industrial ou mesmo para pesquisas em meio acadêmico. O escopo, inicialmente considerado como tendo o controle de qualidade como foco inicial, expandiu-se para englobar análises de processo produtivo, estudos de estabilidade e processos de engenharia reversa, o que coloca a Cosmetômica como uma plataforma analítica extremamente versátil e com alto poder de assertividade nos resultados oferecidos. O conjunto de dados obtidos através dessa plataforma permite não apenas a inferência de resultados qualitativos, caracterizando classes de moléculas de interesse e seus derivados, como também permite resultados de quantificação relativa interamostral de componentes-alvo ou também a quantificação absoluta dos mesmos, quando do uso de padrões e da observância de parâmetros de validação analítica.

Dentro desse escopo, considera-se que o trabalho desenvolvido até o momento da apresentação dessa dissertação cumpriu seus objetivos primários de criação de uma nova plataforma analítica voltada para cosméticos e de uma nova metodologia simplificada para a ionização de compostos por dessorção a laser sem a necessidade de matriz.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento da Cosmetômica teve boa repercussão tanto em meios acadêmicos, quanto entre empresas da área de cosméticos. Nosso Laboratório foi procurado por uma grande empresa do setor para que houvesse a colaboração no desenvolvimento de análises de processo e controle de qualidade de alguns de seus produtos, num projeto-piloto para a realização de validação de metodologia. Para este projeto estará envolvido também um aluno de Mestrado e uma aluna de Iniciação Científica.

Uma patente está em vias de depósito junto à Agência de Inovação da Unicamp (INOVA, processo 767) para assegurar que todo o processo analítico do escopo da Cosmetômica seja amparado pelas leis de proteção à inteligência.

Além disso, também já estão em vias de produção pelo menos mais 2 (dois) trabalhos ligados diretamente à Cosmetômica dentro do escopo de estudos de estabilidade. Nesse projeto estão também envolvidas uma aluna de Doutorado e duas alunas de Iniciação Científica. Como até o momento da apresentação desta dissertação não haviam resultados significativos, os mesmos não foram incluídos.