



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Gabriel Deschamps Fernandes

**CARACTERIZAÇÃO DE LECITINAS COMERCIAIS POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS AMBIENTE COM IONIZAÇÃO SONIC-SPRAY**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ALIMENTOS UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Gabriel Deschamps Fernandes aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientado pelo Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

F391c Fernandes, Gabriel Deschamps, 1988-
Caracterização de lecitinas comerciais por
espectrometria de massas ambiente com ionização sonic-
spray / Gabriel Deschamps Fernandes. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2012.

Orientador: Daniel Barrera Arellano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fosfolipídios. 2. Triacilgliceróis. 3.
Espectrometria de massa ambiente. 4. Lecitinas. I.
Barrera Arellano, Daniel. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Characterization of commercial lecithins by easy ambient
sonic-spray ionization mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

Phospholipids

Triacylglycerols

Ambient mass spectrometry

Lecithins

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Daniel Barrera Arellano [Orientador]

Chiu Chih Ming

Rosana Maria Alberici Oliveira

Data da defesa: 13/04/2012

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em 13/04/2012 por Gabriel Deschamps Fernandes e aprovado pela comissão julgadora em 13/04/2012.

Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano (Orientador)
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Dr. Chiu Chih Ming (Membro)
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Dra. Rosana Maria Alberici Oliveira (Membro)
Instituto de Química – UNICAMP

Dra. Ildenize Barbosa Da Silva Cunha (Suplente)
Instituto de Química – UNICAMP

Prof. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves (Suplente)
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

***Dedico este trabalho à minha Família
Meu Pai, Meu Exemplo;
Minha Mãe, Minha Fortaleza;
Meu Irmão, Meu Companheiro e
Minha Vó, Minha Segunda Mãe.***

AGRADECIMENTOS

Neste ponto da minha caminhada me dou conta da impotência do ser humano, de como é impossível realizar as mais variadas façanhas ou traspor quaisquer obstáculos sozinho, e como é gratificante ao final e ter com quem dividir as alegrias e até mesmo as frustrações. Portanto, usarei estas singelas palavras como forma de agradecimento aos que partilharam comigo esta empreitada.

Começaria citando como foi difícil deixar a Santa e bela Catarina para trás, não apenas pelas belezas naturais, mas principalmente por me distanciar cada vez mais do meu porto seguro, minha família, e vir para “SumPaulo” (como diziam os Mamonas). **Pai, Mãe, Leo, Vó** e gostaria de incluir aqui a Dete e o Tio Calo, trouxe cada um de vocês comigo, não fisicamente, mas por meio dos ensinamentos, da educação e do amor que vocês me transmitiram e eu sustentei por toda a caminhada, a vocês jamais cansarei de agradecer.

No sul também foi difícil deixar os amigos, mas como costuma-se dizer, o lado bom da despedida é o reencontro. Foi realmente muito admirável a cada retorno encontrá-los de braços abertos. Muito obrigado por todo incentivo e parceria, Infância e Alírio, Elenira e Chico, Bruna, Cris, Bel, Gi, Zorro, Vino, Cuchi, Tchino, Anelise.

A irmandade escoteira também deixei em SC, mas estive sempre vigiando (lembrem-se liberados porém vigiados) e embora minha dedicação tenha diminuído, lembro diariamente de todos quando olho para meu lenço, que tem um lugar especial em meu quarto. Deixo registrado um aperto de canhoto a todo Grupo Escoteiro Brusque em especial aos membros da Tropa Sênior à Família De Nez (minha família escoteira), lembrem-se que estarei Sempre Alerta Para Servir. Foi graças à amizade escoteira que o primeiro impacto em Sampa foi bastante sutil, obrigado Alexandre por toda contribuição e pelas longas conversas e conselhos que ainda aplicaremos no G.E.B. e na ciência.

Vencer a grande distância só não foi mais difícil por que aqui encontrei amigos, amigos escoteiros e posso dizer q também encontrei uma Família (de grandes amigos) e agradecer esta família é meu próximo passo. Georgia, a irmãzinha mais “alemoa” que já tive, de um agudo inconfundível, muito obrigado por todos os momentos de cumplicidade e todas as cervejas no star, principalmente as que nos faziam dormir matando a ansiedade sempre um dia antes de voltar para casa. Jamais imaginei ter viajado tanto em Sampa, tudo isso graças ao Pixinga e ao Geraldo, opa, a Meg e o Chicão (risos), muito obrigado pelas parcerias nas viagens, que apesar de terem sido regadas a banana seca, sempre foram muito divertidas e deixarão excelentes recordações. Logicamente não passei comendo banana em Campinas, sempre que a situação ficava feia tinha um churrasco um peixe ou ainda a comida da Ritinha, baixinha e muito brava,

mas que faz um carreteiro igual o da vó (risos). Alguns integrantes desta trupe conheço a menos tempo mas considero grandes amigos, obrigado ao Gustavo pela parceria nas baladas e ao longo do trabalho e ao Alemão pela parceria na nossa Humilde Residência. Gostaria de citar também minha irmã italiana Camila, que mesmo em Brasília, no meio de muitos magnatas, nutriu horas de telefone e boas lembranças. Aproveito também para agradecer a Marcella, com quem compartilhei bons momentos.

Durante o período de mestrado o local mais frequentado foi o laboratório, gostaria de citar primeiramente os colegas do LOG, em especial à Professora Lireny e ao Chiu, os funcionários Renato, Rosana, Alaíde, Priscila, Ingrid, Tati, Letícia e os alunos Julio, Oscar, Leilane, Raquel, Kelly, Camilia e Aliciane, a todos agradeço pelo auxílio durante a realização do trabalho e pelos momentos de descontração. Ao laboratório ThoMSON em especial ao Professor Marcos, à Rosana, Rosy, Dena, Elaine, Aninha e Patrícia Carvalho, gostaria de agradecer pela acolhida, ensinamentos, confiança e auxílio nos trabalhos em espectrometria de massas.

Não foi apenas no ambiente de trabalho que fiz bons amigos, aproveito para agradecer também, ao Valter, Monise, Glazi, Rafa, Luizinho, Lucão, Felipe, Leandra, Milene, Miguel, Valéria, Eveline e todos os alunos do DTA pelas inúmeras risadas e cervejas nos bares e churrascos que renderam bons momentos de descontração.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano pela oportunidade e confiança em mim depositada. Também agradeço aos membros da Banca avaliadora deste trabalho pelas correções e sugestões ao trabalho.

Agradeço também ao CNPq pela concessão da bolsa e à UNICAMP pela formação profissional.

Gostaria que todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, sintam-se agradecidos.

Por fim, e não menos importante, gostaria de agradecer a Deus por me acompanhar e guiar em todos os momentos de minha caminhada.

RESUMO GERAL

Os fosfolipídios são definidos como o grupo de moléculas que contém um grupamento fosfato. Por apresentarem características anfipáticas, este grupo de moléculas se organiza naturalmente em bicamadas, originando as membranas dos seres vivos. Industrialmente são capazes de estabelecer interfaces óleo/água, possibilitando a formação e estabilização de emulsões. Este grupo de moléculas é bastante diverso quimicamente, sendo os principais componentes a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico e esfingomiélna. A determinação e quantificação desses compostos é bastante laboriosa tanto nos meios industriais como acadêmicos, envolvendo, entre outras, etapas de digestão ácida e incineração. A espectrometria de massas desponta como uma técnica bastante favorável à análise de lipídios, englobando desde estudos clínicos até de biocombustíveis. Mais recentemente, as técnicas de espectrometria de massas com ionização ambiente facilitaram o acesso a este tipo de tecnologia, diminuindo os custos de implantação e principalmente de operação. A ionização ambiente por sonic-spray (EASI, easy ambient sonic-spray ionization) denota-se como uma técnica adequada à análise de lipídios, uma vez que não aplica alta voltagem e alta temperatura, prevenindo, portanto possíveis degradações destas moléculas. Este trabalho teve como objetivo, estudar a ionização de fosfolipídios (PL) e triacilgliceróis (TAG) frente à técnica EASI-MS, bem como, estudar a viabilidade técnica da caracterização de lecitinas comerciais por meio da técnica EASI-MS. Quanto à ionização dos lipídios, foi possível observar, nas condições de estudo, que dentro de uma mesma classe (PL ou TAG) a intensidade de ionização diminui com o aumento da cadeia dos ácidos graxos e aumenta com o aumento das insaturações. Para o estudo de caracterização foram utilizadas seis amostras de lecitina de soja comercial, obtidas por diferentes processos. As amostras foram diluídas em clorofórmio e submetidas à análise de EASI-MS, nos modos positivo e negativo. Nos espectros de EASI(+)-MS, os íons mais representativos foram os íons correspondentes à fosfatidilcolina e aos triacilgliceróis, enquanto que, nos espectros de EASI(-)-MS os íons mais representativos corresponderam à fosfatidiletanolamina, aos ácidos graxos livres e aos glicofosfolipídios. A técnica EASI-MS mostrou-se eficiente na caracterização das lecitinas comerciais. Sendo uma técnica rápida e que não exige preparo de amostra.

Palavras chaves: Fosfolipídios, triacilgliceróis, espectrometria de massas ambiente, lecitinas.

ABSTRACT

Phospholipids are defined as the group of molecules containing a phosphate grouping. As they have amphipathic characteristics, this group of molecules naturally organizes bilayer, origin the membranes of living organism and are able to establish an industrial oil / water interface, allowing the formation and stabilization of emulsions. This group of molecules is very chemically different; the main components are phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid and sphingomyelin. The determination and quantification of these compounds is very laborious for the academic and industrial circles, involving, among others, several steps, like acid digestion and incineration. Mass spectrometry is emerging as a very favorable tool of lipids analysis, since clinical and biofuel studies. Recently, the techniques of ambient mass spectrometry have facilitated the access to this type of technology, reducing deployment costs and especially the operation. Easy ambient sonic-spray ionization (EASI) denotes as a suitable technique to analyze the lipids, since it does not apply high voltage and high temperature, and thereby prevent possible degradation of these molecules. This work aimed to study the ionization of phospholipids (PL) and triacylglycerols (TAG) in EASI-MS technique, as well as studying the technical feasibility of the characterization of commercial lecithins by EASI-MS. On the lipid ionization, it was observed, under the conditions of the study, that within the same class (TAG or PL) the ionization intensity decreases with increasing of fatty acids chains and increases with increasing of unsaturation. For characterization studies were used six samples of commercial soy lecithin, obtained by different processes. Samples were diluted in chloroform and analyzed for EASI-MS in positive and negative ion modes. In the spectra of EASI (+)-MS, the most representing ions are corresponding to triglycerides and phosphatidylcholine, whereas in the spectra of EASI (-)-MS the most representative ions correspond to the phosphatidylethanolamine, the free fatty acids and glicophospholipidios. The EASI-MS technique was efficient in the characterization of commercial lecithins. As a fast technique and does not require sample preparation.

Keywords: Phospholipids, triacylglycerols, ambient mass spectrometry, lecithins.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Tabela 1 Composição em fosfolípidios (%) de lecitinas de fontes vegetais e animais.	6
Tabela 2 Diagrama das frações comerciais de Lecitinas	9
ARTIGO 2	44
Table 1 Fatty acid (FA) composition, acetone insoluble mater and phosphorus content for the commercial lecithin samples	51
Table 2 Assignment of ions detected by EASI(+)-MS as their sodium and potassium adducts for commercial soy lecithins.....	52
Table 3 Assignment of FFA and PL ions detected by EASI(-)-MS and their desprotonated forms for commercial soy lecithins	57

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Figura 1 Estrutura química dos principais glicerofosfolipídios. Ácido Fosfatídico, 1; Fosfatidilcolina, 2; Fosfatidilinositol, 3; Fosfatidiletanolamina, 4; Fosfatidilserina, 5; Lisofosfatidilcolina, 6; Lisofosfatidiletanolamina, 7. (Adaptado de HORROCKS, 1988). R: Cadeia de ácido graxo.	5
Figura 2 Estrutura química da esfingosina, molécula base dos esfingolipídios (FUCHS et al, 2008).....	5
Figura 3 Diagrama simplificado e geral do processo de degomagem com água e obtenção de lecitina bruta (Fonte: adaptado de AUTINO, 2009).....	8
Figura 4 Fluxograma esquemático de um espectrômetro de massas. Adaptado de MOREAU (2006).	14
Figura 5 Esquema representativo de uma fonte de ionização EASI-MS, (ALBERICI et al., 2010).	17
Figura 6 Espectros de massas de óleo de soja com diferentes combinações de fontes de ionização e analisadores. (SIMAS et al., 2010)	21
Figura 7 Espectros de triacilgliceróis em diferentes óleos comerciais, determinados por EASI(+)-MS. (SIMAS et al., 2010)	22
ARTIGO 1	32
Figure 1 EASI(+)-MS spectrum of an equimolar mixture of triacylglycerols standards.	37
Figure 2 EASI(+)-MS spectrum of an equimolar mixture of phospholipids standards.....	38
Figure 3 EASI(+)-MS spectra of the mixtures of PC18:1/18:1 and T18:1, in different proportion. a) 25/75%; b) 50/50%; c) 75/25%.	39
ARTIGO 2	44
Figure 1 EASI(+)-MS for the commercial lecithin samples.	53
Figure 2 EASI(-)-MS for the commercial lecithins.	56
Figure 3 MALDI-MS for three representative commercial lecithin samples both in the positive and negative ion modes.	59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
FOSFOLIPÍDIOS	4
<i>ESTRUTURA QUÍMICA</i>	4
<i>FONTES E DIVERSIDADE</i>	6
<i>OBTENÇÃO DE LECITINA BRUTA</i>	7
<i>OBTENÇÃO DE LECITINAS COMERCIAIS</i>	8
ANÁLISES DE FOSFOLIPÍDIOS	10
<i>TEOR DE FOSFOLIPÍDIOS TOTAIS</i>	10
<i>COMPOSIÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS</i>	11
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	13
<i>ESPECTROMETRIA DE MASSAS AMBIENTE COM IONIZAÇÃO SONIC-SPRAY</i>	16
<i>APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS A ANÁLISE DE LIPÍDIOS</i>	17
<i>APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS A ANÁLISE DE FOSFOLIPÍDIOS</i>	19
<i>APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS AMBIENTE COM IONIZAÇÃO SONIC-SPRAY (EASI-MS) NA ANÁLISE DE LIPÍDIOS E FOSFOLIPÍDIOS</i>	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ARTIGO 1	32
AMBIENTE SONIC-SPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY (EASI-MS) OF TRIACYLGLYCEROLS AND PHOSPHOLIPIDS : FACTORS AFFECTING INSTRUMENT RESPONSE	33
ABSTRACT	33
INTRODUCTION	34
MATERIAL AND METHODS	36
<i>CHEMICALS</i>	36
<i>IONIZATION ASSAYS</i>	36
<i>EASI-MS ANALYSIS</i>	36
RESULTS AND DISCUSSION	37
CONCLUDING REMARKS	40
ACKNOWLEDGMENT	40
REFERENCES	41
ARTIGO 2	44
INSTANTANEOUS CHARACTERIZATION OF COMMERCIAL LECITHINS BY EASY AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY	45
ABSTRACT	45

INTRODUCTION	46
MATERIALS AND METHODS.....	48
<i>LECITHIN SAMPLES</i>	<i>48</i>
<i>PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION</i>	<i>48</i>
<i>EASI-MS CHARACTERIZATION</i>	<i>48</i>
<i>MALDI-TOF CHARACTERIZATION</i>	<i>49</i>
RESULTS AND DISCUSSION	50
CONCLUSION.....	60
ACKNOWLEDGMENT	60
REFERENCES	61
CONCLUSÃO GERAL.....	65

INTRODUÇÃO GERAL

Os fosfolipídios compõem a fração polar do grupo dos lipídios, sendo os principais componentes estruturais das membranas celulares de organismos vivos. Sua principal característica é conter um grupo fosfato em sua estrutura. São materiais de fácil obtenção e de ampla aplicação nas indústrias química, de alimentos, farmacêutica e cosmética (ERICKSON, 1997; LEHNINGER, NELSON, COX, 2002). Fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), esfingomiéline (EM), glicofosfolipídios (GPL) e ácido fosfatídico (PA) são os principais componentes da classe dos fosfolipídios. A composição em fosfolipídios define-se pela razão dos diferentes compostos em uma mistura (SZUHAI, 2005).

Por serem moléculas anfipáticas, os fosfolipídios têm destinos peculiares quanto às aplicações na indústria de alimentos, destacando sua utilização como emulsificantes e estabilizantes. A composição em fosfolipídios influencia diretamente as características da emulsão formada, sendo assim, modular ou mesmo controlar a composição em fosfolipídios pode resultar em emulsões com características específicas, para diferentes aplicações (DASHIELL, 1988; McCLEMENTS, 1997).

Os estudos e principalmente o controle de qualidade das frações industriais de fosfolipídios são dificultados, devido a laboriosos procedimentos analíticos e alto custo destas análises. A certificação das análises é também complicada devido ao alto custo de padrões específicos para cada componente (RATHJEN, LANGE, STEINHART, 1998; HELMERICH, KOEHLER, 2003).

A espectrometria de massas desponta de maneira promissora dentre as ferramentas analíticas aplicadas à determinação da composição de misturas complexas de compostos orgânicos. Na área de alimentos, os estudos em geral associam a espectrometria de massas à técnicas cromatográficas de separação, concentrando-se na identificação de compostos (KUKSIS; SJOVALL, 2006; ALUYOR et al., 2009).

A utilização de técnicas de espectrometria de massa aplicada a lipídios tem sido alvo de estudos, principalmente, para fins médicos. Estes, indicam a utilização dos fosfolipídios como biomarcadores de doenças (YANG et al., 2009; PAGLIA et al., 2010).

Estudos utilizando espectrometria de massa aplicada à área de óleos e gorduras direcionam-se aos compostos majoritários, como os triacilgliceróis, ou ainda

a produtos, como biodiesel (ABDELNUR et al., 2008; EBERLIN et al., 2009; FUCHS; SCHILLER, 2009).

Trabalhos mais recentes propõem a utilização de técnicas de ionização ambiente como propícias à análise de lipídios, principalmente devido ao baixo custo e alta precisão das análises (DILL et al., 2009; SIMAS et al., 2010). Dentre estas técnicas destaca-se a ionização ambiente por sonic-spray, (EASI), que não utiliza alta temperatura e alta voltagem para promover a ionização. A aplicação de EASI-MS tem demonstrado grande potencial para o estudo de lipídios, principalmente triacilgliceróis, ácidos graxos livres e fosfolípidios (ALBERICI ET AL., 2010; ALBERICI ET AL., 2011)

Assim, devido aos elevados custos e laboriosas técnicas relacionadas à determinação da fração fosfolipídica, bem como, sua importante aplicação industrial, este trabalho tem como objetivo, estudar a viabilidade de aplicação da técnica de EASI-MS à análise de fosfolípidios.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FOSFOLIPÍDIOS

Os fosfolipídios são moléculas pertencentes à fração polar do grupo dos lipídios, caracterizados por conter um grupo fosfato, mono ou diéster em sua estrutura. Em decorrência a presença do grupo fosfato em uma das extremidades, estas moléculas são anfipáticas, agrupando-se em estrutura de miscela ou em bicamadas (SZUHAJ, 2005; LEHNINGER et al., 2002).

ESTRUTURA QUÍMICA

Os fosfolipídios são quimicamente divididos em dois grupos, os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios (LEHNINGER et al., 2002).

Os glicerofosfolipídios são compostos de uma ou duas moléculas de ácido graxo e uma molécula de fosfato, esterificados a uma molécula de glicerol. Ligado ao grupo fosfato pode-se ainda encontrar outras moléculas orgânicas polares, como carboidratos, aminoácidos e alcoóis. As diferentes moléculas polares, que se encontram esterificadas à molécula de fosfato, caracterizam os fosfolipídios, sendo os principais a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA), glicolipídios (GPL) e suas lisoformas (Figura 1) (HORROCKS, 1988; ERICKSON, 1997).

Por sua vez, os esfingolipídios são compostos de uma molécula base, a esfingosina (Figura 2), à qual se encontram ligados uma molécula de ácido graxo e outra molécula polar. Os esfingolipídios compõem o grupo dos fosfolipídios quando esta molécula polar é uma fosfocolina ou uma fosfoetanolamina (LEHNINGER et al., 2002).

Alem das cadeias esterificadas ao radical fosfato, os fosfolipídios diferenciam-se também pelas cadeias anexas de ácidos graxos. Têm-se, portanto, os fosfolipídios saturados e os insaturados. Os ácidos graxos saturados mais comuns são o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0), enquanto que o ácido oléico (C18:1) e o ácido linoléico (C18:2) destacam-se dentre os ácidos graxos insaturados (HORROCKS, 1988; PAGLIA et al., 2010).

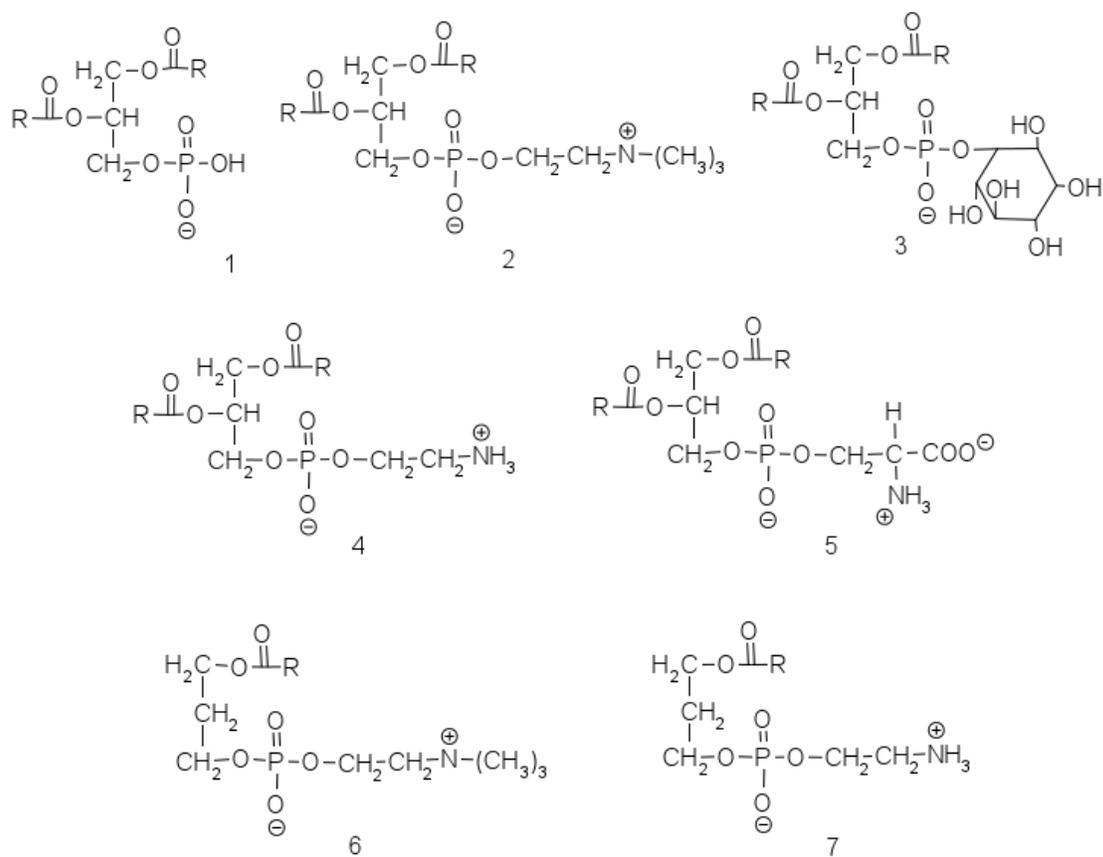


Figura 1 Estrutura química dos principais glicerofosfolipídios. Ácido Fosfatídico, 1; Fosfatidilcolina, 2; Fosfatidilinositol, 3; Fosfatidiletanolamina, 4; Fosfatidilserina, 5; Lisofosfatidilcolina, 6; Lisofosfatidiletanolamina, 7. (Adaptado de HORROCKS, 1988). R: Cadeia de ácido graxo.

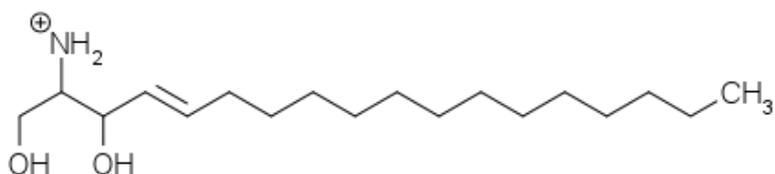


Figura 2 Estrutura química da esfingosina, molécula base dos esfingolipídios (FUCHS et al, 2008).

FONTES E DIVERSIDADE

Sendo os principais componentes das membranas celulares, os fosfolipídios estão comumente presentes nos produtos de origem animal e vegetal. De maneira geral, os fosfolipídios de origem animal caracterizam-se pela presença de esfingomielina. Entretanto, as diferentes fontes de fosfolipídios são caracterizadas por variações entre a composição, ou seja, as fontes de fosfolipídios contem razões diferentes de cada um dos componentes, conforme demonstrado na Tabela 1 (WILSON; RINNE, 1974; FAGAN; WIJESUNDERA, 2004; WANG et al., 2009).

Por sua vez a variação da composição em ácidos graxos, ocorre mais comumente devido a fatores ambientais, pois os fosfolipídios são também responsáveis pela fluidez da membrana celular. Assim, fontes relacionadas à ambientes frios contêm concentrações maiores de fosfolipídios insaturados, enquanto que fontes relacionadas à ambientes quentes tendem a conter fosfolipídios saturados (PARKER; PETERSON, 1965; ZLATANOV, IVANOV, AITZETMULLER, 1999; HATZAKIS et al., 2008).

Tabela 1 Composição em fosfolipídios (%) de lecitinas de fontes vegetais e animais.

<i>Fosfolipídios</i>	<i>Soja</i>	<i>Milho</i>	<i>Girassol</i>	<i>Colza</i>	<i>Ovo</i>	<i>Cérebro Bovino</i>
Fosfatidilcolina	21	31	14	37	68-72	18
Fosfatidiletanolamina	22	3	24	29	12-16	36
Fosfatidilinositol	19	16	13	14	0-2	2
Ácido Fosfatídico	10	9	7	-	-	2
Fosfatidilserina	1	1	-	-		18
Esfingomielina	-	-	-	-	2-4	15
Glicolipídios	12	30	-	20	10	-
Outros	15	10	42	-	8	9

Fonte: Adaptado de SZUHAJ (2005).

As características químicas conferem aos fosfolipídios interessantes e importantes aplicações tecnológicas na indústria de alimentos. Dentre as principais aplicações cita-se a utilização dos fosfolipídios como emulsificantes e estabilizantes. A composição em fosfolipídios da fração utilizada na elaboração de emulsões está diretamente relacionada à estabilidade, bem como as características da emulsão. Os

ácidos graxos ligados aos fosfolipídios também são importantes, uma vez que interferem no estabelecimento da interface óleo/água (WHITTINGHILL, NORTON PROCTOR, 1999; SZUHAJ, 2005).

OBTENÇÃO DE LECITINA BRUTA

Originalmente, o termo químico lecitina referia-se à fosfatidilcolina, entretanto, esse termo tem sido comumente utilizado para denominar misturas comerciais de diferentes fosfolipídios. No passado, as lecitinas provinham de fontes animais, principalmente a gema de ovo. Contudo, o advento do processo de refino e comercialização de óleos vegetais, em especial do óleo de soja, permitiu a produção atual de lecitinas com baixo custo (McCLEMENTS, 1997; SZUHAJ, 2005).

O óleo de soja bruto contém cerca de 2,5% de fosfolipídios, os quais são removidos durante o processo de refino, na etapa de degomagem. A necessidade da remoção inicial dos fosfolipídios deve-se a que na etapa final de desodorização, onde o óleo é aquecido a cerca de 250°C sob vácuo, se o óleo contiver uma quantidade maior de 10mg.kg⁻¹ de fósforo ocorrerá um fenômeno irreversível de escurecimento. Outro agravante é a hidratação espontânea dos fosfolipídios, que resulta na sedimentação e conseqüente entupimento de tubulações e válvulas nas indústrias (SZUHAJ, 2005; AUTINO, 2009).

A degomagem com água é o processo mais simples para obtenção de lecitinas comerciais, consistindo na adição de água ao óleo quente (65-80°C) e posterior centrifugação (Figura 3). Entretanto, devido às diferenças químicas estruturais, os fosfolipídios têm diferentes níveis de hidratação, assim, este processo remove apenas os fosfolipídios facilmente hidratáveis. Em óleos com elevado teor de fosfolipídios como o caso do óleo de soja (1-3%) e do óleo de farelo de arroz (até 5%), faz-se necessário a aplicação de outros processos, como a degomagem ácida. Neste caso, realiza-se primeiro um tratamento ácido (geralmente utiliza-se ácido fosfórico 0,05 a 0,2%) com o objetivo de “quelar” os íons metálicos, principais responsáveis pela não hidratação dos fosfolipídios. Em seguida adiciona-se água para a remoção dos fosfolipídios. (NIEUWENHUYZEN, 1976; PAUCAR-MENACHO et al., 2007; AUTINO, 2009).



Figura 3 Diagrama simplificado e geral do processo de degomagem com água e obtenção de lecitina bruta (Fonte: adaptado de AUTINO, 2009).

*Necessária ou não, dependendo do processo de degomagem adotado.

A especificidade de alguns processos como o refino físico, por exemplo, exige etapas de degomagens mais eficazes. Autino (2009) descreveu alguns processos patenteados como a Degomagem TOP (de Van Moortele), a Unidegomagem (Unilever) e a Degomagem Enzimática Enzymax (de Lurgi). Após a separação (centrifugação) e secagem da fração de fosfolípidios se obtém a lecitina bruta.

OBTENÇÃO DE LECITINAS COMERCIAIS

Uma vez obtida, a lecitina bruta pode ser diretamente comercializada, ou ainda, servir de matéria prima para lecitinas comerciais de maior valor agregado por meio de misturas com aditivos como polisorbatos, monoglicerídeos, entre outros; com o objetivo de modificar as características emulsificantes, explorando a capacidade de sinergismo das diferentes moléculas (NIEUWENHUYZEN, 1976; SCHNEIDER, 1988).

Além disso, as lecitinas modificadas podem ser obtidas por transformações químicas como hidrogenação, onde as insaturações dos ácidos graxos são convertidas em ligações simples por meio da adição de hidrogênio, hidroxilação, transformação baseada na adição de grupos hidroxilas nas insaturações dos ácidos graxos, acetilação, quando um grupo acetil liga-se ao grupo amino da fosfatidiletanolamina; ou ainda transformações enzimáticas como hidrólise, quando os fosfolípidios são submetidos à ação de fosfolipases. De modo geral, as modificações têm por objetivo alterar a capacidade emulsificante dos fosfolípidios. A partir das diferentes lecitinas comerciais pode-se ainda obter fosfolípidios purificados, por meio

de combinações de diferentes técnicas, como fracionamento físico e químico (Tabela 2) (GUO, VIKBJERG, XU, 2005; GHYCZY, 1988).

Tabela 2 Diagrama das frações comerciais de Lecitinas

Lecitina Bruta Comercial
Plástica
Fluida
Misturas Específicas
Lecitinas + Monoacilgliceróis
Lecitinas + Sorbatos
Lecitinas Modificadas
Hidroxiladas
Acetiladas
Hidrolisadas
Refinadas
Desengorduradas
Solúveis em Álcool
Insolúveis em Álcool
Fosfolipídios Purificados

Fonte: Adaptado de Szuhaj (2005).

ANÁLISES DE FOSFOLIPÍDIOS

A lecitina está presente na composição da maioria dos produtos alimentícios, assim, faz-se necessário o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a mesma. Cita-se, dentre os mais usuais, o percentual de componentes insolúveis em acetona (%IA), acidez (mgKOH.g^{-1}), umidade (%U), fração insolúvel em hexano (%HI), cor e composição em fosfolipídios. Outro parâmetro comercial bastante importante é o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB, *Hidrofílic-Lipofílic Balance*), ou seja, a capacidade de formar emulsões óleo/água ou água/óleo. Este parâmetro é determinante à aplicação das diferentes lecitinas comerciais, pois define as características desejadas nas emulsões (McCLEMENTS, 1997; CAMPANELLA et al., 1998; RATHJEN et al., 1998).

Entretanto, por se tratar de um grupo bastante diverso quimicamente, a análise, sobretudo, a composição em fosfolipídios é bastante laboriosa e de custos elevados. Isto ocorre principalmente, pela complexidade das moléculas o que dificulta a obtenção de padrões específicos para os diferentes fosfolipídios. (ERICKSON, 1997; LARSEN, HVATTUM, 2005).

É importante salientar que para análise de óleos, gorduras e suas frações buscam-se seguir os métodos oficiais da AOCS - *American Oil Chemists' Society*, pois estes são tradicionalmente aceitos por toda a comunidade científica e industrial.

TEOR DE FOSFOLIPÍDIOS TOTAIS

Segundo o método oficial AOCS Ca 12-55, a determinação do teor de fosfolipídios é comumente realizada por meio da determinação colorimétrica do fósforo inorgânico, onde a amostra é primeiramente digerida em meio ácido e posteriormente incinerada em forno mufla a 550-600 °C por 2h. O teor de fósforo é determinado na fração inorgânica, através de reação colorimétrica com ácido fosfomolibdico, originando um cromóforo azul, cuja absorvância é obtida a 650 nm. O resultado é expresso em mg de fósforo por quilo de amostra (mg.kg^{-1}). Por meio de uma relação matemática (x30 no caso de soja) é possível, devido a proporção de massa do fósforo na molécula dos principais fosfolipídios, transformar o teor de fósforo inorgânico em mg.kg^{-1} de fosfolipídios na amostra (AOCS, 2004).

A quantificação da matéria insolúvel em acetona, por meio do método oficial da AOCS Ja 4-46 permite determinar indiretamente o teor de fosfolipídios totais, uma vez que os fosfolipídios fazem parte da fração insolúvel em acetona saturada (AOCS, 2004).

A determinação de fosfolipídios totais por meio de metodologias cromatográficas é pouco relatada, pois os diferentes fosfolipídios eluem separadamente, assim, a dificuldade de obtenção de padrões específicos dificulta também a determinação do conteúdo total (ALUYOR et al., 2009).

COMPOSIÇÃO DE FOSFOLIPÍDIOS

A determinação da composição em fosfolipídios, segundo os métodos oficiais da AOCS (2004), é realizada por meio de técnicas cromatográficas. O método Ja 7-86 baseia-se no fracionamento dos fosfolipídios, através de Cromatografia em Camada Delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*) bidimensional. Assim, aplica-se a amostra na placa e realiza-se o desenvolvimento da cromatografia, utilizando como fase-móvel, clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (7N) 13:6:0,8. Em seguida a placa é virada e faz-se o segundo desenvolvimento, utilizando clorofórmio:metanol:ácido acético:água 17:2,5:2,5:0,6; como fase-móvel. As bandas devem ser reveladas em atmosfera saturada de Iodo e removidas da placa por meio de raspagem, para posterior determinação do teor de fósforo total conforme o método da AOCS Ca 12-55, descrito anteriormente.

O método da AOCS Ja 7b-91 consiste na determinação dos fosfolipídios por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). Neste caso, a amostra é separada em coluna de sílica (5 μ m de tamanho de partícula, 200x4,6mm d.i.), por meio de eluição com fase móvel composta de hexano:propanol:tampão acetato (pH4,2) 8:8:1. A detecção é realizada por um detector ultra violeta (UV) a 206 nm. A quantificação é realizada pela curva de calibração previamente estabelecida com os devidos padrões. Esta metodologia é idêntica à metodologia oficial da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (IUPAC, 1992; AOCS, 2004).

As metodologias oficiais citadas são bem definidas, entretanto, são aplicáveis à concentrados de fosfolipídios. Sendo assim, para determinar a composição de

fosfolipídios em óleos é necessário realizar a pré-concentração da amostra. Este fato possibilitou o desenvolvimento de diferentes técnicas para concentração, conforme segue.

Hazel (1985) determinou a composição em fosfolipídios de tecidos animais por TLC/FID (*Fire Ionization Detector*, Detector por Ionização de Chama) (IATROSCAN). Para tanto, aplicou os extratos de lipídios em bastonetes eluindo primeiramente a fração apolar com hexano:éter:ácido fórmico, 80:20:2; concentrando os fosfolipídios na origem. Na sequência, foi realizada a queima do bastonete, preservando os fosfolipídios, que foram então desenvolvidos com clorofórmio:metanol:água, 80:35:3, e posteriormente detectados no FID. Os autores avaliaram o efeito da aclimação de trutas na composição em fosfolipídios, ressaltando diferenças, principalmente, na relação PC/PE. Schrijver e Vermeuien (1991) utilizaram o mesmo princípio de determinação para amostras de plasma sanguíneo, com pequena variação na relação de solventes e impregnação dos bastonetes com ácido oxálico, relatando assim, melhores separações das classes de fosfolipídios, inclusive das lisoformas.

Nzai e Proctor (1998) concentraram os fosfolipídios de óleos vegetais realizando degomagem com água, aliada a purificação dos fosfolipídios em coluna de sílica, através da lavagem da fração polar com clorofórmio:metanol 90:10. Posteriormente, realizaram comparações entre a determinação dos fosfolipídios por FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) e a determinação via TLC, com revelação em atmosfera de iodo e análise por densitometria de imagem. Em ambos os métodos a quantificação ocorreu através da calibração com padrões. Embora tenham sido notadas melhores reprodutibilidades para o método de FTIR a correlação entre os métodos foi elevada, possibilitando a utilização de ambos, de acordo com as limitações de cada trabalho.

Avalli e Contarini (2005) determinaram a composição de fosfolipídios em produtos lácteos. Neste trabalho a concentração foi realizada por meio de extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*) utilizando coluna de sílica e otimizando a combinação de solventes, separando assim, os compostos apolares, os polares e os fosfolipídios. Posteriormente, os fosfolipídios foram separados em HPLC, utilizando coluna de sílica como fase estacionária e uma solução de clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio:água, 60:34:0,5:5,5; como fase móvel e um detector do tipo ELSD (*Evaporative Light Scattering Deterctor*). Dentre as matrizes testadas, o leite de manteiga foi o que apresentou maiores concentrações de

fosfolipídios. Quanto à composição dos fosfolipídios encontrados, por se tratar de matrizes de origem animal, os autores relataram altos teores de esfingomiéline e fosfatidiletanolamina.

Técnicas mais sofisticadas, como a Ressonância Magnética Nuclear de ^{31}P e de ^1H , foram utilizadas por Hatzakis e colaboradores (2008), com o intuito de determinar a composição de fosfolipídios em azeite de oliva e as características dos ácidos graxos nas cadeias dos fosfolipídios, como o grau de insaturações. A extração dos fosfolipídios do óleo foi realizada por partição líquido/líquido com etanol:água (87:13). Os espectros de RMN foram obtidos a 500.1 e 202.2 MHz.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica comumente utilizada para identificação de moléculas presentes nas mais distintas matrizes, por meio da análise de íons gerados por uma fonte de ionização. A discriminação dos íons analisados é obtida de acordo com a razão massa/carga (m/z). Assim, em íons mono carregados ($M+1$, se protonado; $M+23$, se sodiado; $M+39$, se potassiado; $M-1$, se desprotonado, etc) a razão m/z reflete na massa molecular do íon, em Daltons (Da). Por meio de experimentos de fragmentação (MS/MS), pode-se ainda estabelecer a estrutura molecular do íon. Neste caso analisa-se o padrão de fragmentos gerados, que é intrínseco à cada estrutura molecular (MOREAU, 2006). Estes fatos fornecem às análises de espectrometria de massas características de sensibilidade, seletividade e rapidez (speed), o slogan dos 3 “S” da espectrometria de massas (ALBEERICI, et al. 2010)

Os principais componentes de um espectrômetro de massas (Figura 4) são: área de inserção de amostra, que pode ou não consistir de uma unidade de separação, como um cromatógrafo; a fonte de ionização, onde ocorre a formação dos íons, podendo ou não estar sob vácuo, caracterizando no segundo caso as técnicas de ionização a pressão atmosférica e ambiente; o analisador de massas, que necessariamente encontra-se sob alto vácuo, onde ocorre a distinção dos íons por meio da equalização das cargas com o campo magnético; e o detector de íons, onde estes são identificados e avaliados quanto a abundância. O processamento e

amplificação dos dados é outro componente de suma importância, pois permite trabalhar as informações obtidas (MOREAU, 2006; ALBERICI et al., 2010).

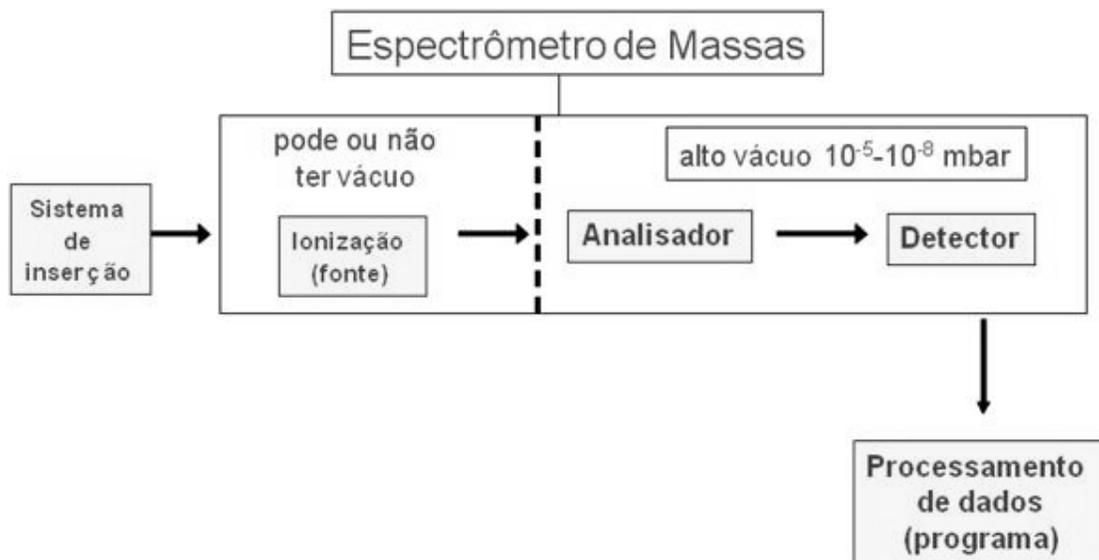


Figura 4 Fluxograma esquemático de um espectrômetro de massas. Adaptado de MOREAU (2006).

A geração de íons, inicialmente, ocorria em fase gasosa sob alto vácuo por meio de uma fonte de ionização por elétrons (EI, *Electron Ionization*). Nesta técnica de ionização, as moléculas na fase gasosa atravessam um campo de elétrons, a colisão das moléculas com os elétrons do campo promove a ionização e fragmentação das moléculas. Assim, a amostra deve ser inserida na fonte de ionização já na fase gasosa. Este fato possibilitou o acoplamento dos espectrômetros de massas a sistemas de separação em fase gasosa, parceria esta amplamente difundida por meio do GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry) para identificação e confirmação estrutural de inúmeros compostos (MOREAU, 2006).

Com o advento das técnicas de ionização sob pressão atmosférica (sem a presença de alto vácuo, mas em ambiente fechado) foi possível realizar o acoplamento da espectrometria de massas a sistemas de separação líquidos (HPLC), ou ainda a inserção direta da amostra por meio de bombas de seringas. A técnica de eletrospray (ESI, *Eletrospray Ionization*), introduzida por Yamashita e Fenn (1984), é uma das técnicas mais difundidas. Esta fonte de ionização produz um fino spray de gotas altamente carregadas, produzidas pela aplicação de voltagem no capilar. Com a evaporação do solvente, as cargas são transferidas para as moléculas transformando-as em íons na fase gasosa (DASS, 2007).

A inserção direta das amostras também é possível em fontes de ionização sob alto vácuo, como no caso da técnica de Dessorção/Ionização a Laser por Matriz Assistida (MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Entretanto, neste caso a amostra é analisada dispersa em uma matriz, normalmente uma molécula orgânica aromática, que absorve energia no comprimento de onda do laser utilizado. Assim o laser transfere energia para a matriz, sublimando-a. Na fase gasosa ocorre a transferência de carga da matriz para as moléculas do analito, promovendo a ionização. Para que os eventos de ionização ocorram corretamente a amostra deve co-cristalizar com a matriz, tornando a interação matriz/amostra um fator importante para a análise (KARAS et al., 1991; COLE, 1997).

Mais recentemente estão sendo difundidas técnicas de ionização ambiente, nas quais a ionização é dada sob pressão atmosférica em ambiente aberto. Nesse sentido a técnica pioneira é a de ionização/dessorção por eletrospray (DESI, *Desorption Electrospray Ionization*), desenvolvida por Takáts e colaboradores (2005). Neste caso a inserção da amostra ocorre por meio da adsorção desta sob uma superfície. A ionização das moléculas ocorre paralelamente à dessorção da amostra, de uma superfície, por meio da ação de um spray de gotas carregadas eletricamente. Após a ionização as moléculas são atraídas, por diferença de potencial, para o analisador, onde os íons serão discriminados segundo sua m/z .

A evolução dos analisadores de íons também foi bastante notável no desenvolvimento das análises de espectrometria de massas, permitindo o alcance de altíssima resolução e exatidão. Dentre os primeiros analisadores pode-se citar o de setor magnético que promove um desvio na trajetória do íon. Este desvio está relacionado à intensidade do campo magnético aplicado e a m/z do íon em questão. Os analisadores mono quadropolo são, também, bastante difundidos, possuem resolução unitária e baseiam-se na estabilização da trajetória do íon por ação do campo eletromagnético, assim, cada m/z estabiliza-se sob determinada intensidade do campo, sendo possível identificar a m/z do íon de acordo com a intensidade de campo aplicada. O tempo de trajetória dos íons sob um campo eletromagnético fixo é diferente de acordo com a m/z , este conceito caracteriza os analisadores do tipo Tempo de Vôo (TOF, *Time of Flight*). Um dos modelos de analisadores de mais alta resolução e exatidão é o de Ressonância Ciclotrônica de Íons (ICR, *Ion Cyclotron Resonance*), que analisa os íons a partir da frequência ciclotrônica que estes adquirem sob um campo magnético uniforme. Os íons adquirem frequências

diferentes, de acordo com uma relação inversamente proporcional à m/z do íon e ao campo eletromagnético aplicado. Este tipo de analisador permite a determinação da massa exata dos íons alcançando resoluções de até 100000 (MILLER; DENTON, 1986; HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

O princípio físico utilizado em cada analisador determina a resolução dos espectros obtidos, entendendo como resolução a capacidade de separar sinais adjacentes, e a exatidão, definida por quão próximo o valor experimental é próximo do valor teórico na determinação da massa do íon, expressa por um valor de erro em ppm. Quanto à natureza dos íons, formam-se normalmente os desprotonados, analisados no modo negativo, ao passo que, os protonados e os coordenados com metais (como adutos de sódio e potássio) são analisados no modo positivo, dependendo da fonte de ionização utilizada e das características da molécula a ser ionizada (WATSON; PARKMAN, 2007).

De maneira geral, a discriminação dos íons pode ser realizada de muitas maneiras, uma vez que é possível combinar diferentes fontes de ionização com diferentes analisadores, modificando assim a quantidade e o tipo de íons gerados, bem como a resolução e exatidão dos espectros.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS AMBIENTE COM IONIZAÇÃO SONIC-SPRAY

Dentre as técnicas de Espectrometria de Massas com Ionização Ambiente, a Espectrometria de Massas Ambiente com Ionização *Sonic-Spray* (EASI-MS - *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry*) é a mais simples, branda e de mais fácil implementação (ALBERICI et al., 2010; IFA et al., 2010).

Segundo Hirabayashi e colaboradores (1994, 1995) na fonte de EASI a ionização baseia-se em *sonic-spray*, que cria microgotas de solvente carregadas devido à distribuição não balanceada de cátions e ânions. O denso fluxo dessas microgotas carregadas promove a dessorção do analito da superfície, sua ionização e transferência dos íons para a fase gasosa (Figura 5).

Uma fonte de EASI pode ser construída empregando-se materiais simples e comuns em laboratórios de espectrometria de massas, sendo instalada em poucos minutos. A técnica EASI-MS permite que as análises sejam executadas em poucos segundos, empregando amostras sem tratamento prévio. Dessa forma elimina-se

uma série de procedimentos dispendiosos de preparação de amostras, como por exemplo, técnicas que envolvam derivatizações prévias e/ou separações cromatográficas (HADDAD, SPARRAPAN, EBERLIN, 2006).

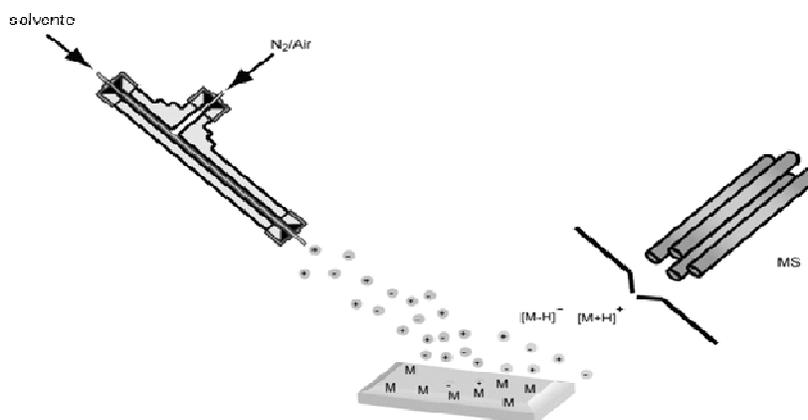


Figura 5 Esquema representativo de uma fonte de ionização EASI-MS, (ALBERICI et al., 2010).

A fonte de EASI não utiliza alta voltagem e alta temperatura para desencadear a ionização, assim, são eliminadas possíveis modificações, como oxidação ou até mesmo fragmentação, das moléculas analisadas. Tornando-se, portanto, uma excelente técnica para aplicação a análise de lipídios. Também pelo fato de não utilizar voltagem, a abundância de cargas no spray é reduzida, reduzindo ao mesmo tempo a relação sinal/ruído no espectro obtido (ALBERICI et al., 2010).

APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS A ANALISE DE LIPÍDIOS

Dentre as técnicas de espectrometria de massas a técnica mais difundida quanto à análise de lipídios é a técnica de MALDI-TOF, sendo relatada a aplicação desta para todos os grupos de lipídios, alterando-se a matriz de ionização (FUCHS, SCHILLER, 2009).

A composição em ácidos graxos foi realizada utilizando meso-tetrakis (pentafluorofenil) porfirina e/ou grafite como matriz de ionização, após a saponificação das amostras de gordura, obtendo-se assim, um perfil qualitativo dos ácidos graxos presentes nas amostras (AYORIND, E et al., 2000; PARK; KIM, 2001). Schiller e colaboradores (2000) determinaram a presença de esteróis (colesterol) em espermatozoides humanos. Relatando a presença do íon de m/z 369,3 correspondente a molécula de colesterol protonada, após a perda de uma molécula

de água, durante a ionização $[M+H^+-H_2O]^+$. Além disso, os autores observaram a presença de outras classes lipídicas nos espectros, principalmente fosfolipídios, como a fosfatidilcolina e a esfingomiéline.

As análises de mono, di e triacilgliceróis são amplamente aplicadas a gorduras de origem animal e vegetal. Dentre as matrizes estudadas o DHB (Ácido 2,5-hidroxi benzóico) é dado como a de melhor sensibilidade e reprodutibilidade (JAKAB et al., 2002; PICARIELLO et al., 2007). Matrizes lipídicas mais complexas, como ceras, também podem ser analisadas por MALDI-TOF. Vrkoslav e colaboradores (2009) utilizaram uma matriz litiada de DHB para a caracterização de ésteres presentes em ceras naturais. Observando e caracterizando estruturalmente ésteres de alcoóis graxos de cadeia longa (C24–C32) com ácidos graxos principalmente palmítico e oléico.

A avaliação do estado oxidativo de lipídios é também de grande importância para a indústria de alimentos. Isso pode ser alcançado pelo acoplamento de técnicas de microextração em fase sólida no espaço de cabeça (HS-SPME - *Head-Sapce Solid-Phase-Microextraction*) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - *Gas-Cromatography Mass Spectrometry*), onde é possível identificar e quantificar produtos voláteis de oxidação, como pentanal e hexanal, de óleos e gorduras (SUN et al., 2011).

A grande diversidade de classes e de fontes de lipídios permite ampla aplicação das técnicas de espectrometria de massas. MacDougall e colaboradores (2011) promoveram a caracterização do perfil lipídico de algas destinadas à produção de biodiesel. Para tal acoplaram um analisador de alta resolução (50000) tipo Orbitrap a um sistema de separação de cromatografia líquida de altíssima pressão (UHPLC – *Ultra High Pressure Liquid Chromatography*), por meio do acoplamento das técnicas, os autores identificaram as diferentes classes de fosfolipídios, bem como, triacilgliceróis, monoacilgliceróis, entre outros.

Os estudos mais atuais utilizam as análises de espectrometria de massas buscando compreender a dinâmica metabólica dos lipídios, Martín-Venegas e colaboradores (2011) desenvolveram uma metodologia de cromatografia líquida acoplada a um sistema sequencial de espectrômetros de massas (LC-MS/MS) para monitorar metabólitos do ácido araquidônico (C20:4) e do ácido linoléico (C18:2) em culturas de células.

APLICAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS A ANÁLISE DE FOSFOLIPÍDIOS

Os fosfolipídios são amplamente estudados por meio de espectrometria de massas, principalmente na análise de tecidos biológicos. Yang e colaboradores (2008) utilizaram a fosfatidilcolina como marcador de hipercolesterolemia em fígados de rato. Para tanto, utilizaram uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e um analisador do tipo tempo de voo (TOF).

Fuchs e colaboradores (2008) acoplaram um sistema de cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC - *High Performance Thin Layer Chromatography*) a uma fonte de MALDI, por sua vez analisada por um sistema TOF. Assim obtiveram espectros nos modos positivos e negativos para diferentes fosfolipídios de membranas celulares de células tronco.

A utilização de analisadores de alta resolução com transformada de Fourier (FT-ICR MS) permitiu He e colaboradores (2011) identificarem a presença de glicoesfingolipídios e fosfolipídios oxidados em culturas de células, determinando assim, a composição elementar dos íons obtidos, associando-a com a estrutura das moléculas estudadas.

A relação de doenças neurodegenerativas com o consumo de determinados ácidos graxos tem sido alvo de constantes estudos. Grimm e colaboradores (2011) avaliaram a relação entre os ácidos graxos da dieta e os ácidos graxos dos fosfolipídios (fosfatidilcolina) em cérebro de humanos portadores da doença de Alzheimer e um grupo controle. As análises dos fosfolipídios foram conduzidas em HPLC combinado a um analisador Quadrupolo Iontrap Linear (QTrap). Os autores perceberam maiores concentrações de ácidos graxos insaturados da família ω -3 nos pacientes que não apresentavam doença.

A aplicação de espectrometria de massas ao estudo de fosfolipídios em alimentos foi recentemente realizada com o objetivo de determinar a composição de fosfatidilcolina e os ácidos graxos ligados a estas moléculas em gema de ovo, uma rica fonte de fosfolipídios. A determinação foi conduzida por meio do monitoramento de íons precursores, perdas neutras e múltiplas reações (monitoramento dos fragmentos formados em MS/MS). Os resultados permitiram também, a elucidação dos ácidos graxos ligados aos diferentes fosfolipídios (ZHAO et al., 2011).

Fosfolipídios de linhaça foram caracterizados por Herchi e colaboradores (2011) utilizando um *Iontrap* Linear (QTrap) acoplado a um sistema de cromatografia

líquida (HPLC) para separação dos componentes. Por meio da análise de massas, os autores determinaram os ácidos graxos ligados aos fosfolipídios em três variedades de linhaça. Apesar de a linhaça ser rica em ácido linolênico (C 18:3), nas amostras estudadas os autores encontraram também, elevados teores de ácido palmítico (C 16:0), esteárico (C 18:0) e linoléico (C 18:2) nos fosfolipídios.

As técnicas de ionização ambiente permitem a análise de amostras sem previa preparação. Weiseman e colaboradores (2005) utilizaram uma fonte de ionização por dessorção com eletrospray (DESI, *Desorption eletro-spray ionization*) acoplado a um analisador monoquadrupolo, para avaliar o perfil de fosfolipídios em tecidos musculares intactos, enquanto que Dill e colaboradores (2009) acoplaram a técnica DESI-MS a um sistema de imagem, estabelecendo assim, diferenças entre o perfil de fosfolipídios de tecidos cerebrais de ratos portadores de carcinoma.

A análise de fosfolipídios é bastante difundida para o monitoramento de doenças mediante a espectrometria de massas, pois estes são facilmente ionizados e abundantes nas membranas dos tecidos biológicos. Na área de alimentos, os fosfolipídios são comumente analisados mediante a separação previa devido às misturas complexas que envolvem a formulação de alimentos.

APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS AMBIENTE COM IONIZAÇÃO SONIC-SPRAY (EASI-MS) NA ANALISE DE LIPÍDIOS E FOSFOLIPÍDIOS

A técnica de ionização ambiente por sonic-spray, tem sido bastante aplicada a análise de matrizes complexas, como tintas, bebidas (whisky, vinhos), drogas e medicamentos. Recentemente está sendo aplicada a matrizes biológicas como os lipídios, apresentando vantagens como a flexibilidade no estabelecimento de suportes para a análise, variando desde placas de separação cromatográfica até vidro, plástico e papel, sendo este ultimo o mais utilizado, principalmente por apresentar baixo custo. A possibilidade da análise sem (ou com mínimo) o preparo prévio da amostra é também um dos atrativos da técnica (ALBERICI et al., 2010; HADDAD, SPARRAPAN, EBERLIN, 2006).

Simas e colaboradores (2010) aplicaram a técnica EASI-MS na análise de triacilgliceróis em óleos comerciais, comparando-a a outras fontes de ionização, MALDI e ESI. Desta maneira, evidenciaram que a utilização da técnica de EASI-MS, fornece o mesmo nível de informação, entretanto, de maneira mais rápida, sem o

preparo de amostra e com menores custos (Figura 6). No mesmo trabalho realizaram a caracterização instantânea de triacilgliceróis, no modo positivo, de diferentes óleos vegetais observando grupos de íons correspondentes a TAGs específicos para cada tipo de amostra (Figura 7). Como por exemplo, os íons de m/z 901, 903 e 855, predominantes nos espectros de óleos de soja e correspondentes às formas sodiadas $[M+Na]^+$ dos TAGs LLL/OLLn, OLL/OOLn e PLO respectivamente. Enquanto que para óleo de palma os íons de maior intensidade relativa foram os de m/z 881, 879 e 855, correspondentes aos TAGs POO/PSL, PLO/PSLn e PPL respectivamente (Figura 7). A análise dos óleos no modo negativo permitiu aos autores estabelecer uma relação entre o teor de acidez com a intensidade dos sinais correspondentes aos ácidos graxos livres.

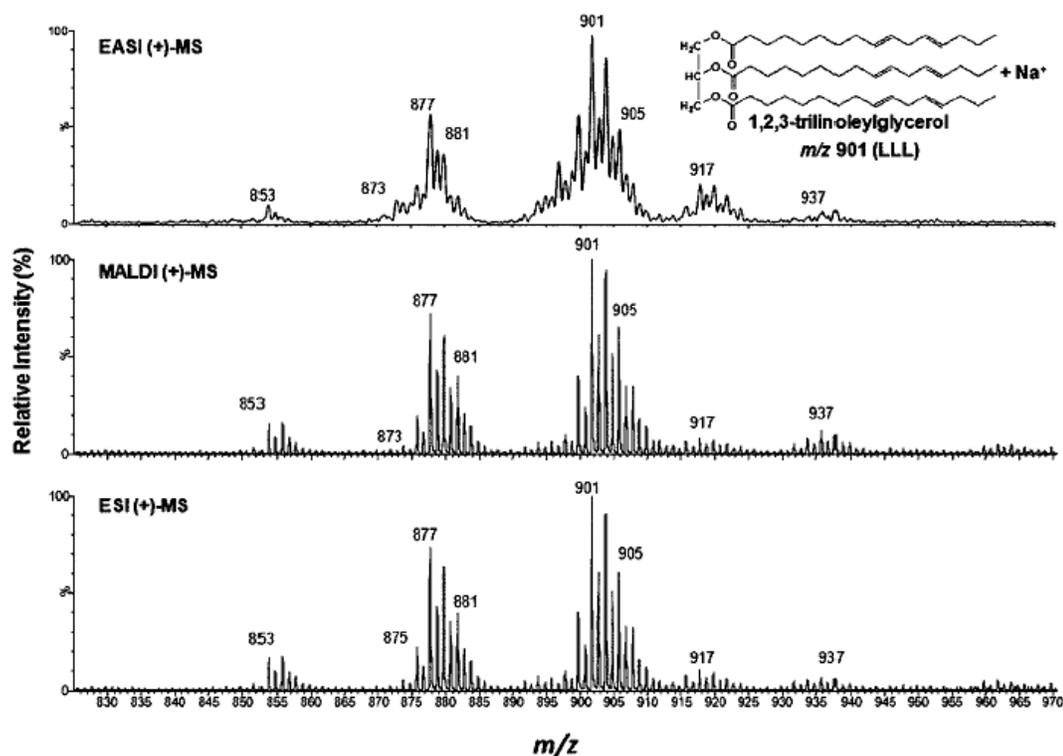


Figura 6 Espectros de massas de óleo de soja com diferentes combinações de fontes de ionização e analisadores. (SIMAS et al., 2010)

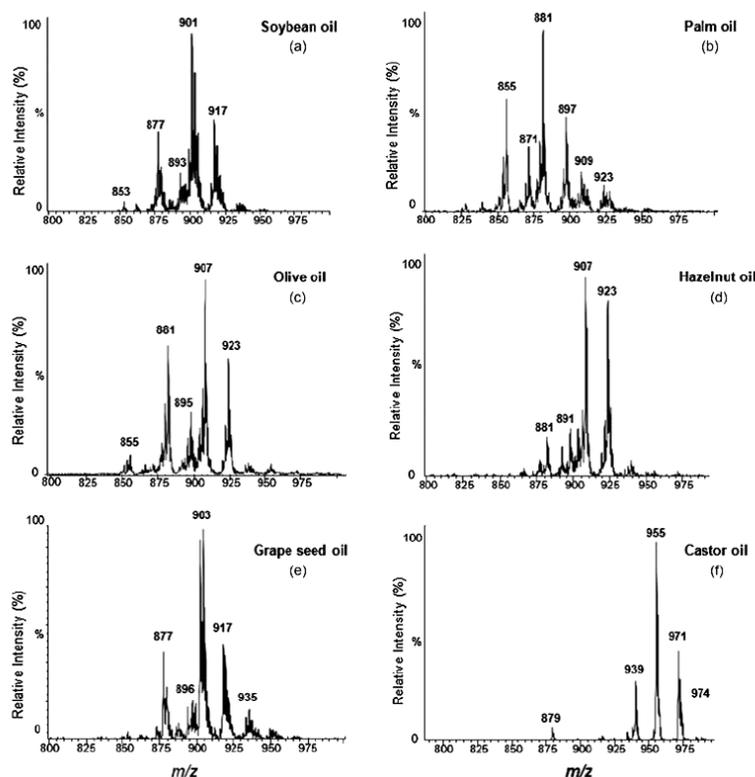


Figura 7 Espectros de triacilgliceróis em diferentes óleos comerciais, determinados por EASI(+)-MS. (SIMAS et al., 2010)

A caracterização dos TAGs também foi realizada em óleo de semente de *Jatropha curcas L.*, planta com potencial para produção de biodiesel, de maneira a acompanhar a maturação das sementes. Relatando assim, a diminuição dos sinais correspondentes aos TAGs mais saturados e de menor cadeia conforme ocorreu a maturação das sementes. Durante o trabalho os autores avaliaram também outra espécie do gênero *Jatropha*, a *Jatropha gossypifolia L.* relatando diferenças no perfil de TAGs, enquanto que na *J. curcas L.* o principal íon observado foi o de m/z 903 (OLL/OOLn), enquanto que para a *J. gossypifolia L.* o principal íon foi o de m/z 901 (LLL/OOLn) (CARDOSO et al., 2011).

Abdelnur e colaboradores (2008) caracterizaram amostras de biodiesel sem preparo prévio, dispondo apenas uma gota de amostra sob uma superfície de papel, observando regiões distintas no espectro, relacionadas aos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs, principais componentes do biodiesel), monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG) (resíduos da reação de transesterificação). Eberlin e colaboradores (2009) submeteram placas de separação cromatográfica (TLC) à análise em EASI-MS, com o intuito de analisar

individualmente as frações das amostras de diesel e biodiesel, FAMES, MAG, DAG e TAG, discriminando os ácidos graxos presentes em cada fração.

Branco de Araújo e colaboradores (2011) realizaram o monitoramento da atividade da lipase de *Rhizomucor miehei* para a produção de lipídios estruturados com ácidos graxos ω -3 (EPA, C 20:5, e DHA, C 22:6). A incorporação dos ácidos graxos aos TAGs do óleo de soja foi observada em EASI-MS pelo aumento dos íons em uma faixa de m/z de 925 a 975.

Trabalhos mais recentes realizaram o monitoramento do estado oxidativo de amostras de óleos, por meio da análise de produtos de oxidação como hidroperóxidos ($m/z > 917$) e redução dos sinais correspondentes aos triacilgliceróis intactos (SIMAS et al., 2011). A quantificação de acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) e glicerina livre foram realizadas em biodiesel por meio da relação de ionização dos íons de interesse com padrões internos (FERNANDES, et al., 2011)

Quanto a análise de fosfolipídios por EASI-MS, foi realizada por Alberici e colaboradores (2011) para a caracterização do perfil de lipídios hepáticos em ratos com hipertrigliceridemia. As análises foram realizadas na fração lipídica do tecido hepático sendo identificados fosfatidilcolinas como addutos de sódio no modo positivo e fosfatidiletanolaminas e fosfatidilinositol desprotonados, no modo negativo.

De acordo com os estudos apresentados a técnica tem se mostrado eficiente, viável e promissora para a análise de lipídios e fosfolipídios em alimentos, uma vez que utiliza quantidades mínimas de amostra sem (ou com mínimo) preparo, além de permitir a obtenção de informações completas quanto a composição lipídica com reduzido tempo de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, L. S.; DE SÁ, G. F.; SOUZA, V.; EBERLIN, M. N. Single-shot biodiesel analysis: nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 20, p. 7882-7886, sep. 2008.
- ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B. S.; EBERLIN, M. N. Ambient Mass Spectrometry: Bringing MS into the Real World. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265-294, sep. 2010.
- ALBERICI, L. C., OLIVEIRA, H. C. F., CATHARINO, R. R., VERCESI, A. E.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. M. Distinct hepatic lipid profile of hypertriglyceridemic mice determined by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 5, p. 1651-1659, jul. 2011.
- ALUYOR, E. O.; OZIGAGU, C. E.; OBOH, O. I.; ALUYOR, P. Chromatographic analysis of vegetable oils: a review. **Scientific Research and Essay**, v. 4, n. 4, p. 191-197, apr. 2009.
- AOCS – American Oil Chemists’ Society. **Official Methods and Recommended Practices**. 4. ed. Champaign: AOCS Press, 2004.
- AUTINO, H. C. Desgomado. In: BLOCK, J. M.; BARRERA-ARELLANO, D. **Temas selectos en Aceites y Grasas**. São Paulo: Ed. Blucher, 2009. v. 1, p. 97-142.
- AVALLI, A.; CONTARINI, G. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, n. 1-2, p. 185-190, apr. 2005.
- AYORINDE, F. O.; GRAVIN, K.; SAEED, K. Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 7, p. 608-615, apr. 2000.
- BRANCO DE ARAÚJO, M. E. M.; CAMPOS, P. R. B.; NOSO, T. M.; ALBERICI, R. M.; CUNHA, I. B. S.; SIMAS, R. C.; EBERLIN, M. N.; CRVALHO, P. O. Response surface modeling of the production of structured lipids from soybean oil using *Rhizomucor miehei* lipase. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 28-33, jul. 2011.

- CAMPANELLA, L.; PACIFICI, F.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETTI, M. A new organic phase bienzymatic electrode for lecithin analysis in food products. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 47, n. 1, p. 25-38, nov. 1998.
- CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; GRIMALDI, R.; STAHL, M.; SIMAS, R. C.; CUNHA, I. B. S.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. M. TAG Profiles of *Jatropha curcas* L. Seed Oil by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Online First, 2011. DOI: 10.1007/s11746-011-1888-7
- COLE, R. B. **Electrospray ionization mass spectrometry**: Fundamentals instrumentation and applications. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1997. 577 p.
- DASHIELL, G. L. Lecithin in food processing applications. In: SZUHAJ, B. F. **Lecithins**: sources, manufacture & uses. Champaign: AOCS, 1988, p. 1-6.
- DASS, C. **Fundamental of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: Ed. John Wiley & Sons, 2007. 608 p.
- DILL, A. L.; IFA, D. R.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 26, p. 2883-2889, sep. 2009.
- EBERLIN, L. S.; ABDELNUR, P. V.; PASSERO, A.; DE SÁ, G. F.; DARODA, R. J.; SOUZA, V.; EBERLIN, M. N. Analysis of biodiesel and biodiesel-petrodiesel blends by high performance thin layer chromatography combined with easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, Local, v. 134, n. 8, p. 1652-1657, aug. 2009.
- ERICKSON, M. C. Chemistry and function of phospholipids. In: AKON, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids**: chemistry, nutrition and biotechnology. New York: Ed. Marcel Dekker, 1997, p. 37-54.
- FAGAN, P.; WIJESUNDERA, C. Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 241-249, oct. 2004.
- FERNANDES, A. M. A. P., SIMAS, R. C., SOUZA, V., DE SÁ, G. F., DARODA, R. J., EBERLIN, M. N., & ALBERICI, R. M. Quantitative analysis of free and bound glycerin in biodiesel by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Energy Fuels** 2011. submitted.

- FUCHS, B.; SCHILLER, J. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 1, p. 83-98, jan. 2009.
- FUCHS, B.; SCHILLER, J.; SÜSS, R.; ZSCHARNACK, M.; BADER, A.; MÜLLER, P.; SCHÜRENBERG, M.; BECKER, M.; SUCKAU, D. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 5, p. 849-860, aug. 2008.
- GHYCZY, M. Synthesis and modification of phospholipids. In: SZUHAJ, B. F. **Lecithins: sources, manufacture & uses**. Champaign: AOCS, 1988, p. 131-144.
- GRIMM, M. O. W.; GRÖSGEN, S.; RIEMENSCHNEIDER, M.; TANILA, H.; GRIMM, H. S.; HARTMANN, T. From brain to food: Analysis of Phosphatidylcholins, lyso-Phosphatidylcholins and Phosphatidycholin-Plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7713-7722, oct. 2011.
- GUO, Z.; VIKBJERG, A. F.; XU, X. Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 3, p. 203-259, may. 2005.
- HADDAD, R., SPARRAPAN, R., & EBERLIN, M. N. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 20:2901–2905 2006.
- HATZAKIS, E.; KOIDIS, A.; BOSKOU, D.; DAIS, P. Determination of phospholipids in olive oil by ³¹P NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6232-6240, aug. 2008.
- HAZEL, J. R. Determination of the phospholipid composition of trout gill by latroscan TLC/FID: effect of the thermal acclimation. **Lipids**, v. 20, n. 8, p. 516-520, aug. 1985.
- HE, H.; EMMETT, M. R.; NILSSON, C. L.; CONRAD, C. A.; MARSHALL, A. G. High mass accuracy and resolution facilitate identification of glycosphingolipids and phospholipids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 305, n. 2-3, p. 116-119, aug. 2011.
- HELMERICH, G.; KOEHLER, P. Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6645-6651, nov. 2003.

- HERCHI, W., SAKOUHI, F., KHALED, S., XIONG, Y., BOUKHCHINA, S., KALLEL, H., & CURTIS, J. M. Characterisation of the glycerophospholipid fraction in flaxseed oil using liquid chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 437-442. nov. 2011.
- HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 24, p. 4557-4559, dec. 1994.
- HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. Sonic spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 2878-2882, sep. 1995.
- HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3. ed. Chichester: Ed. John Wiley & Sons, 2007. 489 p.
- HORROCKS, L. A. Nomenclature and structure of phosphatides. In: SZUHAI, B. F. **Lecithins: sources, manufacture & uses**. Champaign: AOCS, 1988, p. 213-224.
- IFA, D. R.; WU, C.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview. **Analyst**, v. 135, n. 4, p. 669-681, apr. 2010.
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. **Pure & applied chemistry**: Ed. IUPAC, p. 447-454. 1992.
- JAKAB, A.; NAGY, K.; HÉBERGER, K.; VÉKEY, E.; FORGÁCS, E. Differentiation of vegetable oils by mass spectrometry combined with statistical analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 24, p. 2291-2297, dec. 2002.
- KARAS, M.; BAHR, U.; GIEBMANN, U. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 10, n. 5, p. 335-357, sep. 1991.
- KUKSIS, A.; SJOVALL, O. LC/MS and lipid oxidation. In: MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G.; BRENNAN, J. T.; McDONALD, R. E. **Lipid analysis and lipidomics: new techniques and applications**. Champaign: AOCS Press, 2006, p. 109-432.
- LARSEN, A.; HVATTUM, E. Analysis of phospholipids by liquid chromatography coupled with on-line electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. In: BYRDELL, W. C. **Modern methods for lipid analysis by liquid chromatography/mass spectrometry and related techniques**. Champaign: AOCS Press, 2005,.

- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.
- MACDOUGALL, K. M.; MCNICHOL, J.; MCGINN, P. J.; O'LEARY, S. J. B.; MELANSON, J. E. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 8, p. 2609-2616, nov. 2011.
- MARTÍN-VENEGAS, R.; CASILLAS, R.; JÁUREGUI, O.; MORENO, J. J. Rapid simultaneous analysis of cyclooxygenase, lipoxygenase and cytochrome P-450 metabolites of arachidonic and linoleic acids using high performance liquid chromatography/mass spectrometry in tandem mode. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, n. 5, p. 976-982, dec. 2011.
- McCLEMENTS, D. J. Lipid-Based emulsions and emulsifiers. In: AKON, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 55-88.
- MILLER, P. E.; DENTON, M. B. The quadrupole mass filter: basic operating conceptd. **Journal of Chemical Education**, v. 63, n. 7, p. 617-622, jul. 1986.
- MOREAU, R. An overview of modern mass spectrometry methods in the toolbox of lipid chemists and biochemists. In: MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G.; BRENNAN, J. T.; McDONALD, R. E. **Lipid analysis and lipidomics: new techniques and applications**. Champaign: AOCS Press, 2006. p. 29-432.
- NIEUWENHUYZEN, W. V. Lecithin production and properties. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 53, n. 6, p. 425-427, jun. 1976.
- NZAI, J. M.; PROCTOR, A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p.571-576, dec. 1998.
- PAGLIA, G.; IFA, D. R.; WU, C.; CORSO, G.; COOKS, G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry analysis of lipids after two-dimensional high-performance thin-layer chromatography partial separation. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1744-1750, mar. 2010.
- PARK, K. H.; KIM, H. J. Analysis of fatty acids by graphite plate laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 16, p.1494-1499, aug. 2001.

- PARKER, F.; PETERSON, N. F. Quantitative analysis of phospholipids and phospholipid fatty acids from silica gel thin-layer chromatograms. **Journal of Lipid Research**, v. 6, p. 455-460, oct. 1965.
- PAUCAR-MENACHO, L. M.; SILVA, L. H.; SANT'ANA, A. S.; GONÇALVES, L. A. G. Refino de óleo de farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) em condições brandas para preservação do gama-orizanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, suppl. 1, p. 45-53, aug. 2007.
- PICARIELLO, G.; SACCHI, R.; ADDEO, F.; One-step characterization of triacylglycerols from animal fat by MALDI-TOF MS. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 5, p. 511-524, may. 2007.
- RATHJEN, T.; LANGE, R.; STEINHART, H. Analysis of lecithin by near-infrared spectroscopy. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 100, n. 8, p. 358-363, aug. 1998.
- SCHILLER, J.; ARNHOLD, J.; GLANDER, H. J.; ARNOLD, K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. **Chem Phys Lipids**, n.106, p.145–156, 2000.
- SCHNEIDER, M. Fractionation and purification of lecithin. In: SZUHAJ, B. F. **Lecithins: sources, manufacture & uses**. Champaign: AOCS, 1988, p. 109-130.
- SCHRIJVER, R. D.; VERMEUIEN, D. Separation and quantitation of phospholipids in animal tissues by Iatroscan TLC/FID. **Lipids**, v. 26, n. 1, p. 74-76, jan. 1991.
- SIMAS, R. C.; CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B. S.; CABRAL, E. C.; BARRERA-ARELLANO, D.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. M. Instantaneous Characterization of Vegetable Oils via TAG and FFA Profiles by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. **Analyst**, v. 135, n. 4, p. 738-744, jan. 2010.
- SIMAS, R. C.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; BARRERA-ARELLANO D.; SOUZA, V.; ALBERICI, R. M. Triacylglycerols oxidation in oils and fats monitored by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **JAACS**, 2011. Aceito para publicação
- SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Quantitative analysis of volatiles in transesterified coconut oil by headspace-solid-phase microextraction-gas

- chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1882-1888, dec. 2011.
- SZUHAJ, B. F. Lecithins. In: SHAHIDI, F. **Bailey`s industrial oil and fat products**. 6. ed. Champaign: AOCS, 2005, v. 3, p. 361-456.
- TAKÁTS, Z.; WEISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanism and applications in forensics, chemistry and biology. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 10, p. 1261-1275, oct. 2005.
- VRKOSLAV, V.; MÍKOVÁ, R.; CVACĚKA, J: Characterization of natural wax esters by MALDI-TOF mass spectrometry. **J Mass Spectrom**. v. 44, p.101-110, 2009.
- WANG, D. Y.; ZHU, Y. Z.; XU, W. M. Composition of intramuscular phospholipids and free fatty acids in three kinds of traditional Chinese duck meat products. **Poultry Science**, v. 88, n. 1, p. 221-226, jan. 2009.
- WATSON, J. T.; PARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, application and strategies for data interpretation**. 4. ed. Chichester: Ed. John Wiley & Sons, 2007. 862 p.
- WHITTINGHILL, J. M.; NORTON, J.; PROCTOR, A. A fourier transform infrared spectroscopy study of the effect of temperature on soy lecithin-stabilized emulsions. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 12, p. 1393-1398, dec. 1999.
- WILSON, R. F.; RINNE, R. W. Phospholipids in the developing soybean seed. **Plant Physiology**, v. 54, n. 5, p. 744-747, nov. 1974.
- WEISEMAN, J. M.; PUOLITAIVAL, S. M.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G.; CAPRIOLI, R. M. Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 43, p. 7094-7097, nov. 2005.
- YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4451-4459, 1984.
- YANG, L.; BENNET, R.; STRUM, J.; ELLSWORTH, B. B.; HAMILTON, D.; TOMLINSON, M.; WOLF, R. W.; HOUSLEY, M.; ROBERTS, B. A.; WELSH, J.; JACKSON, B. J.; WOOD, S. G.; BANKA, C. L.; THULIN, C. D.; LINFORD, M. R. Screening phosphatidylcholine biomarkers in mouse liver extracts from a

hypercholesterolemia study using ESI-MS and chemometrics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 643-654, jan. 2009.

ZHAO, Y. Y.; XIONG, Y.; CURTIS, J. M. Measurement of phospholipids by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: the determination of choline containing compounds in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 32, p. 5470-5479, aug. 2011.

ZLATANOV, M.; IVANOV, S.; AITZETMÜLLER, K. Phospholipid and fatty acid composition of Bulgarian nut oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 101, n. 11, p. 437-439, nov. 1999.

ARTIGO 1

EASY AMBIENTE SONIC-SPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY (EASI-MS) OF TRIACYLGLYCEROLS AND PHOSPHOLIPIDS: FACTORS AFFECTING INSTRUMENT RESPONSE

(Segundo as Normas da Revista Food Chemistry)

**AMBIENTE SONIC-SPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY (EASI-MS)
OF TRIACYLGLYCEROLS AND PHOSPHOLIPIDS : FACTORS AFFECTING
INSTRUMENT RESPONSE**

Gabriel D. Fernandes; Anna Maria A. P. Fernandes¹, Rosana M. Alberici¹,
Ildenize B. S. Cunha¹; Marcos N. Eberlin¹; Daniel Barrera-Arellano²

¹*ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry,* ²*Fats and Oils
Laboratory, Faculty of Food Engineering, University of Campinas - UNICAMP,
Campinas, SP, BRAZIL.*

ABSTRACT

Triacylglycerols (TAG) and phospholipids (PL) are the most abundant lipid molecules in biological samples. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) has shown to be an inexpensive, fast and accurate technique for analysis of lipids. However, the concentration is not the only determinant on the ionization response, the large variability of molecules structure may influence in this response. This work aimed to determinate the differential ionization of the phospholipid and triacylglycerol molecules in easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Triacylglycerols and phospholipids were detected mainly in their sodiated adducts. Instrument responses were affected by the size of fatty acids chains and number of double bonds.

INTRODUCTION

The lipids are biological molecules defined by their water insolubility. These groups of molecules are one of the energy sources of the heterotrophic organisms. Chemically, the lipids are quite diverse, the triacylglycerols (TAG) and phospholipids (PL) are the most abundant lipids class (Lehninger, Nelson & Cox, 2002).

The TAGs are composed of three fatty acids bounded in a glycerol molecule. While, the phospholipids are the lipids that contain a phosphate group, given an amphipatic characteristic for this molecules. Recently, these lipids have been widely studied, mainly because their relationship with human nutrition and disease (Szuhaj, 2005, Scrimgeour, C. 2005; Yang, Bennet, Strum, Ellsworth, Hamilton, Tomlinson, Wolf, Housley, Roberts, Welsh, Jackson, Wood, Banka, Thulin & Linford, 2009).

Due the large variety of molecules, the analysis of the lipids fraction involves laborious and expensive work, sometimes involves tandem chromatographic techniques, (Rathjen, Lange, Steinhart, 1998; Helmerich & Koehler, 2003).

Mass spectrometry is emerging among so promising analytical tools, with emphasis on determining the composition of complex mixtures of organic compounds. For MS analysis, molecules need to be efficiently ionized to generate diagnostic ions, which are transferred to the mass spectrometer, where they are analyzed and counted. The most widespread ionization technique for the analysis of lipids by mass spectrometry is the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) technique. Studies using MALDI, especially coupled with Time of Flight Analyzer (TOF), have been applied to the characterization of commercial oils and analysis of lipids in whole tissues, cells and embryos, with focus in the membrane phospholipids (Yang, Bennet, Strum, Ellsworth, Hamilton, Tomlinson, Wolf, Housley, Roberts, Welsh, Jackson, Wood, Banka, Thulin & Linford, 2009; Fuchs & Schiller, 2009).

In MS techniques, its knowed that the concentration is not the only determinant on the molecule ionization, and the molecules at the same concentration have differential ionization, since one can suppress the response of the other. This event is also noted in TAGs and PL molecules, using MALDI and Eletrospray (ESI) as ionization source. Studies showed that different PL

ionizes in different modes, phosphatidylcholine and sphingomyelin on the positive mode, while phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine on the negative ion mode. It was also noted that the ionization decrease according to the carbon chain increase (Han & Gross, 2001; Koivusalo, Haimi, Heikinheimo, Kostianen & Somerharju, 2001; Fuchs & Schiller, 2009)

Nowadays, the use of ambient mass spectrometry techniques has emerged as a great option on lipids analysis (Alberici, Simas, Sanvido, Romão, Lalli, Benassi, Cunha & Eberlin 2010; Harris & Galhena, 2011). Studies using ambient mass spectrometry applied on oils and fats are directly linked to the characterization of the majority compounds such as TAG, or derivate products such as biodiesel (Dill, Ifa, Manicke, Ouyang & Cooks. 2009; Ifa, Wu, Ouyang & Cooks. 2010; Paglia, Ifa, Wu, Corso & Cooks, 2010, Simas, Catharino, Cunha, Cabral, Barrera-Arellano, Eberlin & Alberici. 2010). Easy Ambient Sonic-spray Ionization (EASI) is one of the simplest ambient ionization techniques, providing soft ionization without the need of voltage (Haddad, Sparrapan, & Eberlin, 2006; Haddad, Sparrapan, Kotiaho & Eberlin, 2008). EASI ionization is based on sonic-spray ionization (SSI) (Hirabayashi, Sakairi & Koizumi, 1994, 1995) that forms minute droplets with unbalanced charge distribution, which desorb the analytes from surfaces promoting their ionization. EASI-MS allows the direct and fast MS analysis of samples in the open atmosphere with no sample preparation, pre-separation or derivatization procedures. Recently, EASI technique has been reported for analysis of lipids, mainly focused in fats and oils TAG characterization, biodiesel, membrane phospholipids of hepatic tissue and TAG oxidation studies (Abdelnur, Eberlin, De Sá, Souza & Eberlin, 2009, Simas, Catharino, Cunha, Cabral, Barrera-Arellano, Eberlin & Alberici. 2010, Alberici, Oliveira, Catharino, Vercesi, Eberlin & Alberici, 2011, Fernandes, Simas, Fernandes, Cunha, Barrera-Arellano, Eberlin & Alberici, 2011, Fernandes, Simas, Souza, De Sá, Daroda, Eberlin & Alberici, 2011, Simas, Catharino, Eberlin, Barrera-Arellano, Souza & Alberici, 2011).

So, the aim of this study was to determinate the differential ionization of TAGs and PL, in EASI-MS.

MATERIAL AND METHODS

CHEMICALS

Methanol HPLC-grade and chloroform were purchase from Merck SA (Rio de Janeiro, Brazil) and used without further purification.

Dimyristoylphosphatidylcholine (PC 14:0/14:0, M.M. 677), dipalmitoylphosphatidylcholine (PC 16:0/16:0, M.M. 733); dioleoylphosphatidylcholine (PC 18:1/18:1, M.M. 785); dilinoleoylphosphatidylcholine (PC 18:2/18:2, M.M. 783) from Avanti Polar Lipids, were used as phospholipid standards .

Tributanoic (T4:0, M.M. 302), trioctanoic (T8:0, M.M. 470), tridodecanoic (T12:0, M.M. 638), tritetradeacnoic (T14:0, M.M. 722) trihexadecanoic (T16:0, M.M. 806), triheptadecenoic (T17:1, M.M. 842), trioctadecanoic (T18:0, M.M. 890), trioctadecenoic (Δ 9 cis) (T18:1, M.M. 884), trioctadecanodienoico (Δ 9, 12 cis) (T18:2, M.M. 878), trioctadecanotrienoico (Δ 9, 12, 15 cis) (T18:3, M.M. 872) from Nuchec (Elysian, USA) were used as TAG standards.

IONIZATION ASSAYS

Standards were evaluated an equimolar (1mmol/L in chloroform) mixture of both TAGs and PC standards. Therefore, it was also evaluated the ionization influence in three different proportion of PC/TAG, 25/75, 50/50, 75/25, using T18:1 as a TAG model and PC 18:1/18:1 as a PL model.

EASI-MS ANALYSIS

EASI-MS spectra were obtained on the positive ion mode, using a single quadrupole mass spectrometer (LC/MS 2010, Shimadzu) equipped with a home EASI source The analysis conditions were: nebulizer gas N₂ flow rate at 3 L min⁻¹, angle of the surface ~ 30°, methanol at a flow rate of 20 μ L min⁻¹ and 2 μ L of sample were placed directly on the paper surface. Mass spectra were accumulated for 30 s in the mass range of 300-1000 Daltons. The analysis were conducted with 5 repetitions by sample.

RESULTS AND DISCUSSION

On the TAG equimolar mixtures the species were observed main in their $[\text{TAG}+\text{Na}]^+$, however the $[\text{TAG}+\text{K}]^+$ adducts were also observed (Figure 1).

The ion of m/z 325, corresponding to $[\text{T4:0}+\text{Na}]^+$ showed a low signal, probably because the high volatility, since that on EASI source the ionization is ambient. Saturated TAGs, T8:0 of m/z 493, T12:0 of m/z 661, T14:0 of m/z 745, the ionization relative intensity decreases in order increases the carbon fatty acid chain. In the spectra, the ions of m/z 829 (T16:0) showed low ionization response and m/z 913 (T18:0) was not detected (Figure 1). The fact can be explained by the difficulty of desorption, once that this molecules are solids at ambient temperature, and the desorption event is necessary to the ionization in an EASI source.

On the evaluation of the unsaturated TAGs ions, T17:1 of m/z 865, T18:1 of m/z 907, T18:2 of m/z 901, T18:3 of m/z 895, the relative intensity increases as increasing the double bonds (Figure 1). The difference of the carbon fatty acid chains does not influence on the ionization of the unsaturated TAGs, since that the ion of m/z 865 (T17:1) and the ion of m/z 907 (T18:1) has the same relative intensity (Figure 1).

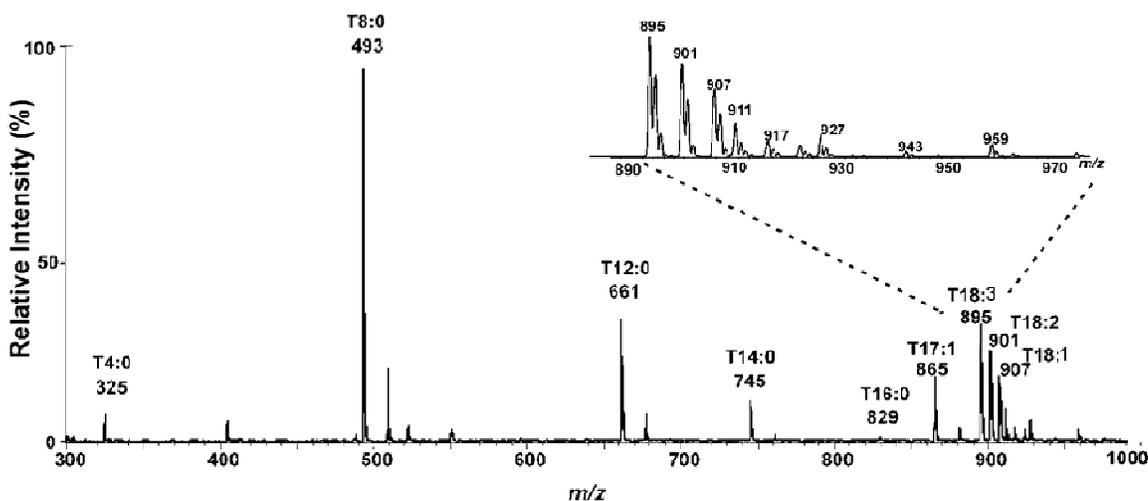


Figure 1 EASI(+)-MS spectrum of an equimolar mixture of triacylglycerol standards.

Han and Gross, (2001) obtained the same results both for saturated and unsaturated TAG, using an ESI ionization source, however at this work the authors doesn't evaluated short chains fatty acids.

On the evaluation of the phospholipids ionization, the ions appeared in their $[PL+Na]^+$ and $[PL+K]^+$ forms. Saturated phospholipids, PC 14:0/14:0 and PC 16:0/16:0 of m/z 700 and 756 respectively, the ionization decreases according to the increasing of the fatty acid chain (Figure 2). By the evaluation of the ions of m/z 808 (PC 18:1/18:1) and m/z 804 (PC 18:2/18:2) was noted that, like in TAG ionization, the ionization increasing with the increase of the double bonds number (Figure 2).

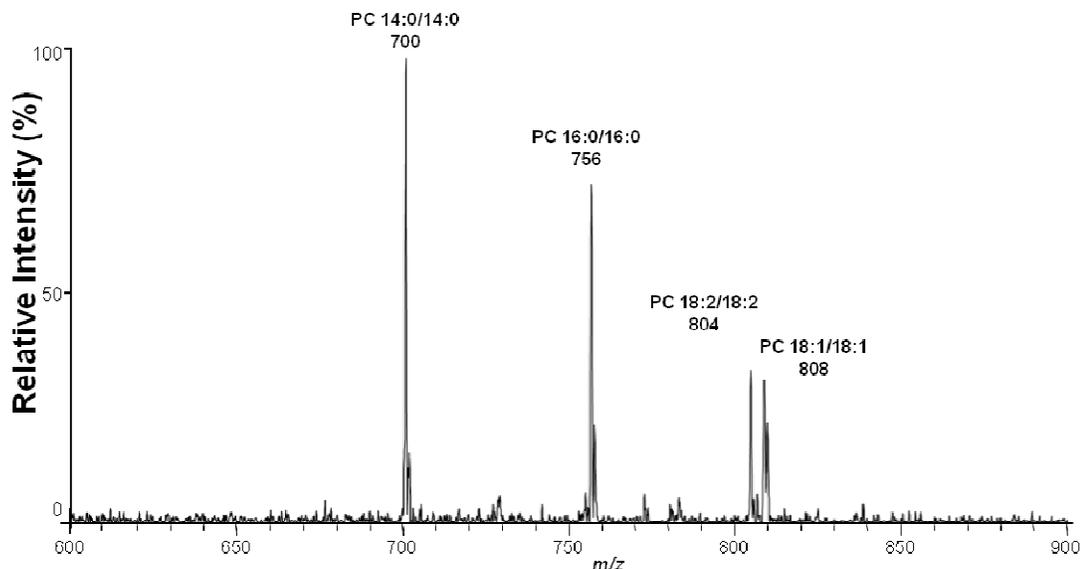


Figure 2 EASI(+)-MS spectrum of an equimolar mixture of phospholipid standards.

Koivusalo, Haimi, Heikinheimo, Kostainen & Somerharju, (2001) performed a similar study with an ESI ion source and a triple quadrupole instrument. The authors found the same relation on the ionization instrument response and still defined the linearity of the response,

In the experiment which evaluated the interaction between TAGs and PL, on the mixture of 75:25 (TAG: PL), the ionization responses followed the concentration range. The same answer was obtained on the mixture 50:50, where the TAG ion has the same intensity than the PL ion. However, in the mixture of 25:75 the TAGs ionization were great than the proportion of the mixture (Figure 3).

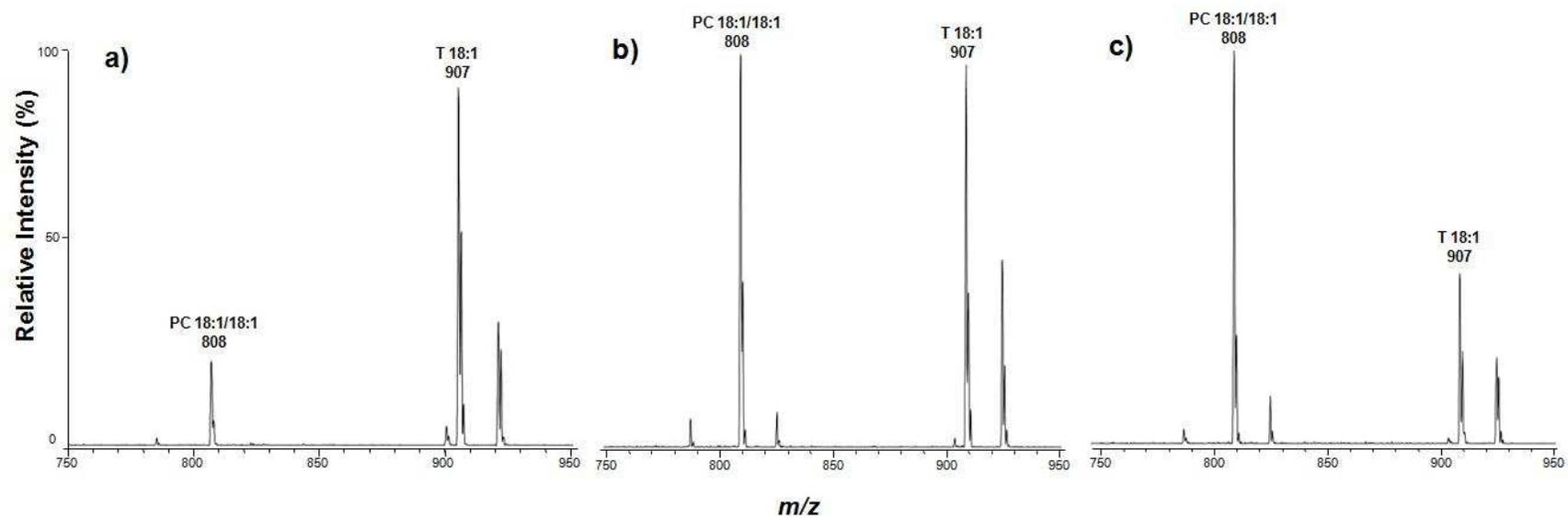


Figure 3 EASI(+)-MS spectra of the mixtures of PC18:1/18:1 and T18:1, in different proportion. a) 25/75%; b) 50/50%; c) 75/25%.

CONCLUDING REMARKS

TAG and PL ionizations, in a standard mixture, decrease with the increase on the size of fatty acids chains, in EASI-MS. The increasing on the number of double bonds increases the ionization responses.

It's necessary more studies to define the concentration influence, on EASI-MS instrument response.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Financing Agency of Studies and Projects (FINEP) for financial assistance and Professor PhD. Patricia de Oliveira Carvalho for providing the PL standards.

REFERENCES

- Abdelnur, P. V.; Eberlin, L. S.; De Sá, G. F.; Souza, V.; Eberlin, M. N. (2008). Single-shot biodiesel analysis: nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. ***Anal. Chem.***, *80*: 7882-7886
- Alberici, L. C., Oliveira, H. C. F., Catharino, R. R., Vercesi, A. E., Eberlin, M. N., Alberici, R. M. (2011) Distinct hepatic lipid profile of hypertriglyceridemic mice determined by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. ***Analytical and bioanalytical chemistry***, *401*(5), 1651-9.
- Alberici, R. M., Simas, R. C., Sanvido, G. B., Romão, W., Lalli, P. M., Benassi, M., Cunha, I. B. S., Eberlin, M. N. (2010). Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. ***Analytical and bioanalytical chemistry***, *398*(1), 265-94.
- Dill, A.L.; Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. (2009). Mass spectrometric imaging of lipids using desorption electrospray ionization. ***J. of Chromatography B***. v.877, p. 2883-2889.
- Fernandes, A. M. A. P., Simas, R. C., Fernandes, G. D., Cunha, I. B. S., Barrera-Arellano, D., Eberlin, M. N., Alberici, R.M. (2011) Qualitative and semi-quantitative analysis of triacylglycerides in vegetable oils by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. ***Analyst***: submitted
- Fernandes, A. M. A. P., Simas, R. C., Souza, V., de Sá, G. F., Daroda, R. J., Eberlin, M. N., Alberici, R. M. (2011) Quantitative analysis of free and bound glycerin in biodiesel by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. ***Energy Fuels***: submitted.
- Fuchs, B. Schiller, J. (2009) Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. ***Eur. J. Lipid Sci. Technol.*** v.111, p 83-98.
- Han, X., & Gross, R. W. (2001). Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. ***Analytical biochemistry***, *295*(1), 88-100.
- Harris, G. a, Galhena, A. S., & Fernández, F. M. (2011). Ambient sampling/ionization mass spectrometry: applications and current trends. ***Analytical chemistry***, *83*(12), 4508-38.

- Haddad, R., Sparrapan, R., Kotiaho, T. & Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization-membrane interface mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. *Analytical Chemistry*, 80: 898–903.
- Haddad, R., Milagres, H. M. S., Catharino, R. R. & Eberlin, M. N. (2008) Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Analytical Chemistry*, 80: 2744–2750.
- Helmerich, G.; Koehler, P. (2003) Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers. **J. Agric. Food Chemistry**, n.51, p.6645-6651.
- Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. (1994). Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry, **Anal. Chem.**, 66: 4557-4559
- Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. (1995). Sonic spray mass spectrometry, **Anal.Chem.**, 67: 2878-2882.
- Ifa, D.R.; Wu, C.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. (2010). Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview, **Analyst**. 135: 669-681.
- Koivusalo, M. Haimi, P. Heikinheimo, L. Kostianen, R. Somerharju, P. (2001) Quantitative determination of phospholipids composition by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. **Journal of Lipid Research**. v.42, p. 663-672.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. (2002). **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 975 p.
- Paglia, G.; Ifa, D. R.; Wu, C.; Corso, G.; Cooks, G. (2010) Desorption electrospray ionization mass spectrometry analysis of lipids after two-dimensional high-performance thin-layer chromatography partial separation. **Anal. Chem.** v.82, p. 1744-1750
- Rathjen, T.; Lange, R.; Steinhart, H. (1998) Analysis of lecithin by near-infrared spectroscopy. **Fett/Lipid**. v.100, n.8, p.358-363.
- Scrimgeour, C. (2005) Chemistry of fatty acids. In. Shahidi, F. **Bailey's industrial oil and fat products**. Ed. AOCS, 6ed. v.1, cap.1, p. 361-456.
- Simas, R. C., Catharino, R. R., Eberlin, M. N., Barrera-Arellano, D., Souza, V., Alberici, R. M. (2011) Triacylglycerides oxidation in oils and fats monitored

- by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom**: accepted to publication.
- Simas, R.C.; Catharino, R. R.; Cunha, I. B. S.; Cabral, E. C.; Barrera-Arellano, D.; Eberlin, M. N.; Alberici, R. M. (2010). Instantaneous Characterization of Vegetable Oils via TAG and FFA Profiles by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry, **Analyst** 135, 738-744.
- Szuhaj, B. F. (2005) Lecithins. In. Shahidi, F. **Bailey`s industrial oil and fat products**. Ed. AOCS, 6ed. v.3, cap.13, p. 361-456.
- Yang, L.; Bennet, R.; Strum, J.; Ellsworth, B. B.; Hamilton, D.; Tomlinson, M.; Wolf, R. W.; Housley, M.; Roberts, B. A.; Welsh, J.; Jackson, B. J.; Wood, S. G.; Banka, C. L.; Thulin, C. D.; Linford, M. R. (2009) Screening phosphatidylcholine biomarkers in mouse liver extracts from a hypercholesterolemia study using ESI-MS and chemometrics. **Anal. Bioanal. Chem.** v.393, p.643-654,

ARTIGO 2

**INSTANTANEOUS
CHARACTERIZATION OF
COMMERCIAL LECITHINS BY EASY
AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION
MASS SPECTROMETRY**

(Segundo as Normas da Revista Food Chemistry)

INSTANTANEOUS CHARACTERIZATION OF COMMERCIAL LECITHINS BY EASY AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY

Gabriel D. Fernandes^{1*&}, Rosana M. Alberici^{2&}, Gustavo G. Pereira¹, Elaine C. Cabral², Marcos N. Eberlin², Daniel Barrera-Arellano¹

¹Fats and Oils Laboratory, Faculty of Food Engineering, ²ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas - UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, BRAZIL.

& Both authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Commercial lecithins are composed mainly of phospholipids and triacylglycerols. The analysis of the commercial lecithins as well as their fraction of phospholipids normally involves laborious and expensive protocols. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) has shown to be an efficient technique for the analysis of lipids. Samples of commercial lecithin as well as standards, refined, deoiled and modified soy lecithin were tested. Characteristic profiles of phosphatidylcholines and triacylglycerols are detected by EASI(+)-MS, whereas EASI(-)-MS provided phosphatidylethanolamines, glycolphospholipids and free fatty acids profiles. Acetylated lecithins also displayed characteristic acetylated derivatives. EASI-MS data was also compared to MALDI-MS, and found to display richer compositional information. The industrial process applied to lecithin fabrication was also characterized via typical EASI-MS profiles. EASI-MS both in its positive and negative ion modes offers a direct, fast and efficient technique able to characterize commercial lecithin.

Keywords: lecithins, phospholipids, ambient mass spectrometry

INTRODUCTION

Lecithin is a term used originally to describe specifically phosphatidylcholines but, nowadays, it is commonly used to refer to commercial mixtures of different phospholipids (PL). Initially, the major source of lecithin was from animals, mainly the egg yolk. The advent of the process of refining and marketing of vegetable oils, especially soybean oil, made possible large scale lecithin production from vegetable sources at low costs. Phosphatidylcholines (PC), phosphatidylethanolamines (PE), phosphatidylserines (PS), phosphatidylinositols (PI), phosphatidylglycerols (PG), phosphatidic acid (PA), glycolphospholipids (GPL) and their lysoforms are the major phospholipids found in lecithin from vegetable sources (McClements, 1997; Szuhaj, 2005).

Phospholipids are amphipathic molecules and as such they have found numerous applications in the food industry, mainly as emulsifiers and stabilizers. The phospholipid composition and their relative abundances directly influence the characteristics of the emulsion; hence, various emulsions with specific characteristics for different applications can be formed by changing the phospholipid composition of lechitins (Dashiell, 1988; McClements, 1997). Due to complex composition, the analysis of the commercial lecithins as well as their fraction of phospholipids involves laborious and expensive work (Rathjen, Lange & Steinhart, 1998; Helmerich & Koehler, 2003).

Mass spectrometry is the major analytical tool applicable to the structural characterization of complex mixtures of organic compounds (Sawaya, Abdelnur, Eberlin, Kumazawa, Ahn, Bang, Nagaraja, Bankova & Afrouzan, 2010; Fuchs & Schiller, 2009). In food science, most efforts to analyze lipids have associated chromatographic separation techniques to mass spectrometry (Kuks & Soovall, 2006; Aluyor, Ozigagu, Oboh & Aluyor, 2009). The most widespread ionization technique for the MS analysis of lipids is matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). MALDI-MS have been widely applied to characterize commercial oils (Saraiva, Cabral, Eberlin & Catharino, 2009) and lipids in whole tissues, cells and embryos, with focus in the membrane phospholipids (Yang, Bennet, Strum, Elsworth, Hamilton, Tomlinson, Wolf, Housley, Roberts, Welsh, Jackson, Wood, Banka, Thulin & Linford, 2008; Fuchs & Schiller, 2009; Ferreira, Saraiva, Catharino, Garcia, Gozzo, Sanvido, Santos, Lo Turco, Pontes, Basso, Bertolla, Sartori, Guardieiro, Perecin, Meirelles, Sangalli & Eberlin, 2010).

Recently, ambient desorption/ionization mass spectrometry (Alberici, Simas, Sanvido, Romão, Lalli, Benassi, Cunha & Eberlin, 2010; Harris, Galhena & Fernandez, 2011) has emerged as a much simplified powerful alternative for the direct analysis of lipids. For oils and fats, ambient mass spectrometry has been shown to provide characterization via typical profiles of triacylglycerols (TAG) (Simas, Catharino, Cunha, Cabral, Barrera-Arellano, Eberlin & Alberici, 2010; Cardoso, Da Silva, Grimaldi, Stahl, Simas, Cunha, Eberlin, & Alberici, 2011; Dill, Ifa, Manicke, Ouyang, & Cooks, 2009; Ifa, D. R.; Wu, C.; Ouyang, Z. & Cooks, R. G, 2010; Paglia, Ifa, Wu, Corso & Cooks, 2010). Easy ambient sonic-spray ionization (EASI) is one of the simplest ambient ionization techniques, providing soft voltage-free ionization (Haddad, Sparrapan, & Eberlin, 2006; Haddad, Sparrapan, Kotiaho & Eberlin, 2008). EASI is based on sonic-spray ionization (SSI) (Hirabayashi, Sakairi & Koizumi, 1994; Hirabayashi, Sakairi & Koizumi, 1995) that forms minute droplets with unbalanced charge distribution. These droplets desorb the analytes from surfaces promoting their ionization and transfer to mass spectrometers. EASI-MS allows therefore direct and fast MS analysis of samples in the open atmosphere with no sample preparation, pre-separation or derivatization procedures (Abdelnur, Eberlin, De Sá, Souza & Eberlin, 2008; Fernandes, Simas, Fernandes, Cunha, Barrera-Arellano, Eberlin & Alberici 2011; Fernandes, Simas, Souza, de Sá, Daroda, Eberlin & Alberici, 2011; Simas, Catharino, Eberlin, Barrera-Arellano, Souza & Alberici, 2011). Recently, the application of EASI for the characterization of membrane phospholipids in hepatic tissues was demonstrated (Alberici, Oliveira, Catharino, Vercesi, Eberlin, & Alberici, 2011). We therefore envisage that EASI-MS could provide an effective, nearly instantaneous technique able to characterize different commercial lecithin samples via typical lipid profiles.

MATERIALS AND METHODS

LECITHIN SAMPLES

Six different commercial lecithin samples, of which, a Standard Soy Lecithin Fluid (SOLEC™ SG TN, HLB 4), two Refined Soy Lecithin (SOLEC™ L TN, HLB 2-3 and SOLEC™ CH TN, HLB 4-5), an Enzyme-Modified Soy Lecithin (SOLEC™ AE IP, HLB 7-8), an Acetylated Soy Lecithin (SOLEC™ AA, HLB 6) and a Deoiled Soy Lecithin (SOLEC™ F, HLB 7), provided from SOLAE.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION

The lecithin samples were characterized as the acetone-insoluble matter, AOCS standard method Ja 4-46 (AOCS, 2006), phosphorus content, AOCS standard method Ca 12-55 (AOCS, 2006).

Analysis of the fatty acid compositions were performed in a capillary gas chromatograph (CGC Agilent 6850 Series GC System – Santa Clara, CA) after esterification using the method of Hartman and Lago (1973). The fatty acid methyl esters (FAME) were separated according to AOCS standard method 2–66 in a DB – 23 Agilent capillary column (50% cyanopropyl-methylpolysiloxane), dimensions 60 m, f int: 0.25 mm, 0.25 mm film. Oven temperature was 110 °C-5 min, 110–215 °C (5 °C/min), 215 °C -24 min; detector temperature: 280 °C; injector temperature 250 °C; carrier gas: helium; split ratio 1:50; injection volume: 1.0 mL. The fatty acids identification was determined by comparing peak retention times with the respective standards.

EASI-MS CHARACTERIZATION

The lecithin samples were dissolved in chloroform (1:10) and 2 µL of sample were placed directly on the paper surface which was submitted to EASI-MS analysis. The spectra were obtained in either the positive and negative ion modes, using a single-quadrupole mass spectrometer (LC/MS 2010, Shimadzu) equipped with a homemade EASI source (Haddad, Sparrapan & Eberlin, 2006; Haddad, Milagres, Catharino & Eberlin, 2008). The analysis conditions were: nebulizer gas N₂ flow rate 3 L min⁻¹, angle of the surface ~ 30°, methanol at a flow rate of 20 µL min⁻¹. Mass spectra were accumulated for 30 s in the *m/z* range of 500-1000 for the positive ion mode. For the negative ion mode, the solvent was doped with 0.1% of ammonium hydroxide, and the spectra was collected in the *m/z* range of 100-1000. Analysis was made in quadruplicate.

MALDI-TOF CHARACTERIZATION

Lecithin samples were diluted (1:100) in chloroform and 1 μL of solution was placed onto a MALDI steel target plate (MSP 384 polished-steel target; Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and allowed to air dry. The dried supernatant, overlaid with 1 μL of matrix solution, consisted of 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) at 15 mg/mL in methanol, to the positive mode analysis; and with 1 μL of 9-aminocridine matrix solution consisted of 10mg/mL in 60:40 (v/v) of acetonitrile/isopropyl alcohol, to the negative mode. MALDI-MS was performed in a Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer operated in the reflectron mode and equipped with a 337-nm nitrogen laser using FlexControl 3.3 software (Bruker Daltonik). The mass spectra were collected within the m/z range of 650 to 1500. Five hundred laser shots were accumulated to generate each spectrum. The MALDI-MS/MS spectra were acquired in the LIFT (Bruker technology) mode.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the FA composition of commercial lecithin samples determined by GC. The FA profiles are characteristic from soybean oil with palmitic (C16:0), oleic (C18:1) and linoleic (C18:2) as the main components. The GC result confirms the origin of the samples. The acetone insoluble mater (IA) and the phosphorus content (P) are related with the proportion of PL on the lecithin samples (Table 1). The SOLEC™ F sample contains high levels of acetone insoluble mater and phosphorus content, indicating therefore that the deoiled process was used.

Figure 1 shows representative EASI(+)-MS lipid profiles for the different commercial lecithins. Note that both TAG and PL were detected, mainly in $[M + K]^+$ forms. minor $[M + Na]^+$ ions were also detected (Table 2). The main $[TAG + K]^+$ ions were detected in the 850 to 1000 m/z range, and were of m/z 893 (PLL), m/z 895 (PLO), m/z 917 (LLL and/or OLLn), m/z 919 (OLL and/or OOLn), m/z 921 (OOL and/or SLL) and m/z 923 (OOO and/or OLS) . TAG composition as measured by EASI-MS therefore corresponds closely to the FA composition of these lecithins determined by GC (Table 1). These results also confirm the origin of the lecithin, since these TAG profiles correspond to soybean oil (Simas, Catharino, Cunha, Cabral, Barrera-Arellano, Eberlin & Alberici, 2010). TAG ions were not observed for SOLEC™ F lecithin, since this sample is a deoiled lecithin, as can be confirmed by the contents of acetone insoluble mater and phosphorus (Table 1). EASI(+)-MS profiles, which are attained in simpler and cheaper ways than IA and P determinations, seems therefore applicable for lechithin quality control indicating the use of the deoiled process.

Table 1 Fatty acid (FA) composition, acetone insoluble mater and phosphorus content for the commercial lecithin samples

Sample	SOLEC™ SG TN	SOLEC™ L TN	SOLEC™ CH TN	SOLEC™ AA %	SOLEC™ AE IP	SOLEC™ F %
Fatty Acid- CN:DB ^a	%	%	%	%	%	%
C 14:0	0.09 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.02
C 15:0	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01
C 16:0	16.46 ± 0.06	16.25 ± 0.02	17.16 ± 0.11	16.45 ± 0.02	17.18 ± 0.03	18.42 ± 0.04
C 16:1	0.1 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.11 ± 0.00
C 17:0	0.12 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.16 ± 0.00
C 17:1	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.01
C 18:0	3.85 ± 0.01	3.46 ± 0.01	3.92 ± 0.15	3.76 ± 0.02	3.64 ± 0.01	4.32 ± 0.01
C 18:1	21.34 ± 0.01	22.51 ± 0.02	20.36 ± 0.21	20.22 ± 0.04	19.76 ± 0.02	7.42 ± 0.01
C 18:2	51.31 ± 0.08	51.59 ± 0.04	51.5 ± 0.36	52.38 ± 0.06	52.74 ± 0.03	60.78 ± 0.02
C 18:3	5.47 ± 0.01	4.61 ± 0.01	5.47 ± 0.10	5.65 ± 0.02	5.08 ± 0.01	7.52 ± 0.01
C 20:0	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.00	0.15 ± 0.02
C 20:1	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.18 ± 0.02	0.06 ± 0.01
C 22:0	0.47 ± 0.01	0.45 ± 0.00	0.45 ± 0.03	0.47 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.52 ± 0.00
C 24:0	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.31 ± 0.01
Acetone Insoluble Mater (%)	58.03 ± 0.09	51.33 ± 0.41	66.8 ± 0.59	59.31 ± 0.19	57.51 ± 0.51	95.73 ± 0.45
Phosphorus Content (%)	1.92 ± 0.12	1.68 ± 0.06	2.07 ± 0.11	2.07 ± 0.12	2.06 ± 0.06	3.09 ± 0.08

^aCarbon number : Double bonds

Table 2 Assignment of ions detected by EASI(+)-MS as their sodium and potassium adducts for commercial soy lecithins

[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	CN:DB ^a	Assignment	Relative Intensity of [M-K] ⁺ Ions*					
				SOLEC TM SG TN	SOLEC TM L TN	SOLEC TM CH TN	SOLEC TM AA	SOLEC TM AE IP	SOLEC TM F
544	558	18:2	LPC ^d 18:2	3.49 ± 1.47	2.52 ± 0.11	0.00 -	3.07 ± 0.37	79.91 ± 6.77	0.00 -
546	560	18:1	LPC ^d 18:1	0.00 -	0.00 -	0.00 -	0.00 -	15.88 ± 3.37	0.00 -
780	796	34:2	PC ^e 16:0/18:2	30.05 ± 1.38	36.25 ± 0.80	38.48 ± 2.15	39.41 ± 5.34	33.97 ± 5.30	42.58 ± 3.69
782	798	34:1	PC ^e 16:0/18:1	7.21 ± 0.63	10.88 ± 2.17	10.20 ± 0.39	7.98 ± 1.87	9.86 ± 0.87	2.90 ± 2.90
802	818	36:5	PC ^e 18:2/18:3	2.2 ± 0.14	1.23 ± 1.23	3.13 ± 0.01	2.50 ± 0.29	0.00 ± 0.00	8.54 ± 0.70
804	820	36:4	PC ^e 18:2/18:2 or 18:1/18:3	47.90 ± 2.83	54.68 ± 0.55	63.60 ± 15.64	69.94 ± 13.57	56.97 ± 4.43	100.00 -
806	822	36:3	PC ^e 18:1/18:2 or 18:0/18:3	31.51 ± 1.69	32.01 ± 2.93	37.62 ± 0.52	39.19 ± 6.85	42.63 ± 3.19	34.73 ± 0.15
808	824	36:2	PC ^e 18:0/18:2 or 18:1/18:1	10.49 ± 3.23	12.93 ± 1.30	14.30 ± 0.38	10.24 ± 1.68	9.76 ± 0.38	10.24 ± 2.02
875	891	52:5	PLLn	4.385 ± 1.53	4.39 ± 0.51	6.00 ± 0.60	5.37 ± 1.97	0.00 -	0.00 -
877	893	52:4	PLL	46.65 ± 4.8	47.54 ± 0.05	52.39 ± 2.03	48.67 ± 11.10	34.55 ± 6.88	0.00 -
879	895	52:3	PLO	39.19 ± 11.51	35.96 ± 1.92	39.05 ± 4.98	35.22 ± 11.64	29.02 ± 5.19	0.00 -
881	897	52:2	POO	13.3 ± 2.7	13.16 ± 0.71	14.62 ± 2.21	13.15 ± 3.00	9.31 ± 0.06	0.00 -
899	915	54:7	OLnLn	19.9 ± 1.35	14.92 ± 0.39	15.47 ± 0.98	17.48 ± 1.81	14.49 ± 2.46	0.00 -
901	917	54:6	LLL/OLLn	82.81 ± 17.18	98.59 ± 1.42	95.17 ± 4.83	91.15 ± 8.85	97.47 ± 2.53	0.00 -
903	919	54:5	OLL/OOLn	99.24 ± 0.75	96.37 ± 3.63	93.90 ± 6.10	87.65 ± 12.35	92.86 ± 7.14	0.00 -
905	921	54:4	OOL/SLL	61.07 ± 2.23	51.40 ± 3.34	61.50 ± 5.56	47.46 ± 20.32	47.25 ± 9.75	0.00 -
907	923	54:3	OOO/SOL	23.91 ± 2.13	19.33 ± 1.52	28.26 ± 0.40	25.00 ± 3.51	14.24 ± 0.60	0.00 -
905	925	54:2	SOO/SSL	3.87 ± 0.02	2.33 ± 0.25	3.20 ± 0.07	3.08 ± 0.68	0.00 -	0.00 -

*Relative intensity = intensity of the ion to the mainly signal of the spectra (100%)

^aCarbon Number : Double Bond of fatty acid chain, ^bPhospholipid, ^cTriacylglycerol, ^dLysophosphatidylcholine; ^ePhosphatidylcholine

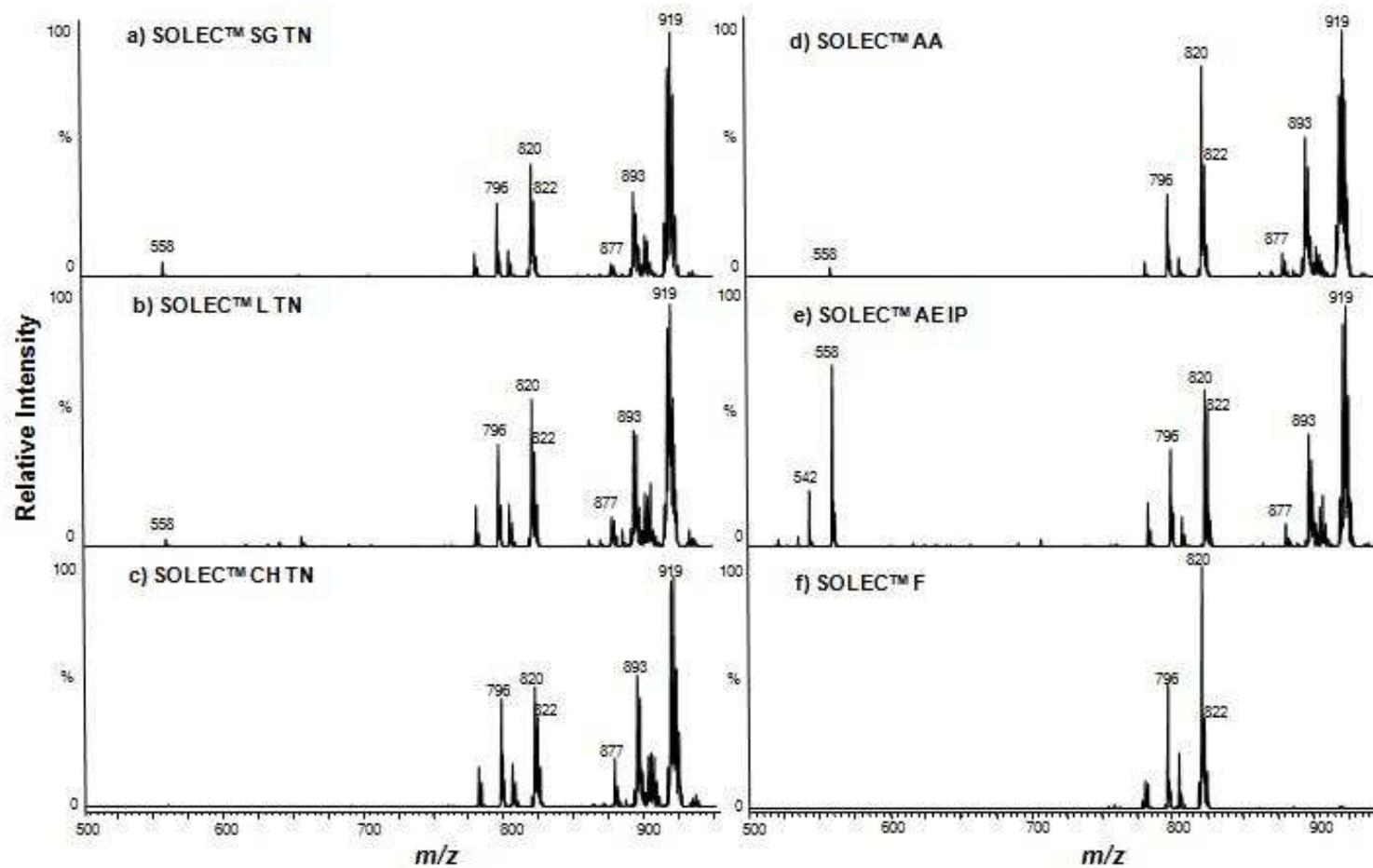


Figure 1 EASI(+)-MS for the commercial lecithin samples.

Note that the EASI(+)-MS data, interestingly, shows three well defined regions in which different classes of lipids are detected. This feature is convenient as it facilitates classification and quality control. TAGs are detected mainly in the m/z 850-1000 range, as already discussed. Phospholipids, mainly PC, are detected in the m/z 750 to 850 range whereas lysophosphatidylcholine (LPC) with only one fatty acid chain are observed in the m/z 500 to 580 range (Figure 1). The predominant $[PC + K]^+$ ions are those of m/z 820 (PC36:4), m/z 822 (PC36:3), m/z 824 (PC36:2), m/z 796 (PC34:2) and m/z 798 (PC34:1), whereas LPC is mainly detected as the ion of m/z 558 (LPC18:2) (Table 2). Comparing the FA composition obtained by GC (Table 1) to that revealed by EASI(+)-MS, the major PL are PC 18:2/18:2 and/or 18:1/18:3 (m/z 820), PC 18:1/18:2 and/or 18:0/18:3 (m/z 822), PC 18:0/18:2 and/or 18:1/18:1 (m/z 824), PC 16:0/18:2 (m/z 796), PC 16:0/18:1 (m/z 798) and the LPC 18:2 (m/z 558). The ion of m/z 558 (LPC18:2) was observed mainly in the enzymatic hydrolyzed SOLECTM AE IP sample, and this was expected since the enzymatic treatment hydrolyzes one of the two fatty acids bonded with the glycerol, transforming PC into LPC. This result shows that EASI(+)-MS promptly reveals lecithin hydrolysis.

The samples were also analyzed via EASI-MS in the negative ion mode, focusing now on deprotonated molecules $[M - H]^-$ (Table 3). Figure 2 shows representative EASI(-)-MS profiles from different commercial lecithins. Note that several FFA, PE, lysophosphatidylethanolamine (LPE), acetylated phosphatidylethanolamine (PEAcet) and GPL are now detected. The main ions were those of m/z 279 (FFA18:2), m/z 714 (PE34:2), m/z 738 (PE36:4) and m/z 833 (PG38:2). A characteristic feature of the enzyme-modified soy lecithin (fig 2 e) and deoiled soy lecithin (fig 2f) samples was the relatively high abundance of the ions of m/z 714 (PE34:2) and 738 (PE36:4). The ion of m/z 476 (LPE18:2) was detected only for in the enzyme-modified soy lecithin sample (fig 2e) and again due to the enzymatic treatment which transform PE into LPE.

Another unique feature was observed for the acetylated soy lecithin SOLECTM AA sample (fig 2d) via the exclusive detection of the ions of m/z 756 (PEAcet34:2), m/z 758 (PEAcet34:1), m/z 780 (PEAcet36:4), m/z 782 (PEAcet36:3) and m/z 518 (LPEAcet18:2) (Table 3) that corresponds to FA composition (Table 1), assigned to PEAcet 18:2/18:2 and/or 18:1/18:3 (m/z

780), PEAcet 18:1/18:2 and/or 18:0/18:3 (*m/z* 782), PEAcet 16:0/18:2 (*m/z* 756), PEAcet 16:0/18:1 (*m/z* 758) and LPEAcet 18:2 (*m/z* 518). As the acetylating process modifies solely the ethanolamine chain, EASI(-)-MS seems to offer also a proper technique to monitor this transformation process for lethichin.

EASI-MS analysis permitted therefore the evaluation of the different phospholipids groups and the FA content of such molecules in each group, with no sample preparation and short time analysis. In contrast, it has been shown that such detailed structural characterization of lecithins is very demanding by other protocols. For instance, to evaluate the ω -3 fatty acid incorporation on PC and PE from egg yolk, was necessary to extract the phospholipids of the lipid egg yolk fraction, and then to isolate PC and PE by HPLC. In addition, to determinate the fatty acid composition of each fraction, FAME derivatives were prepared and analysis was performed by gas chromatography (Gładkowski, W., Kielbowicz, G., Chojnacka, A., Gil, M., Trziszka, T., Wawrzen, C., & Dobrzań, Z. 2011).

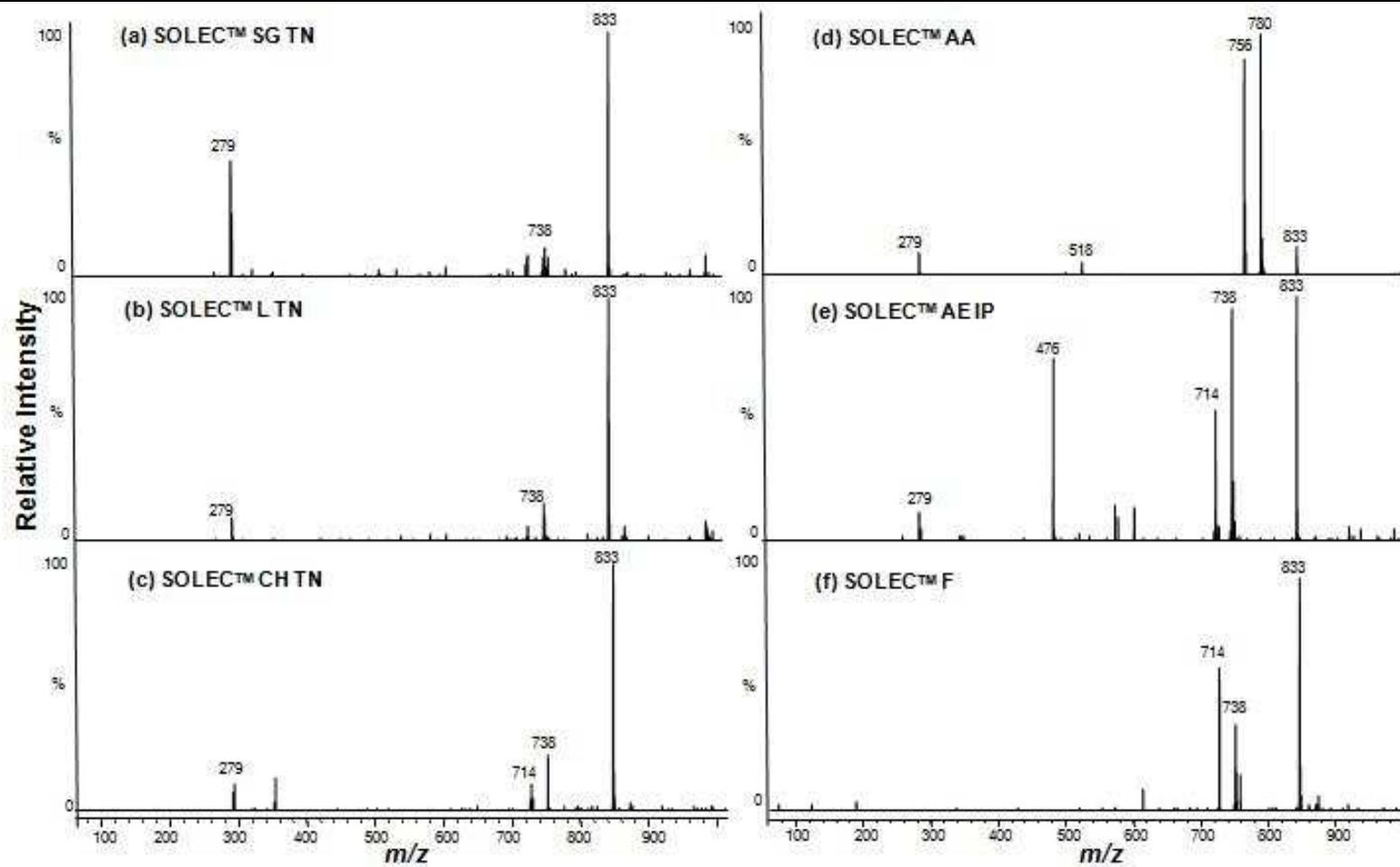


Figure 2 EASI(-)-MS for the commercial lecithins.

Table 3 Assignment of FFA and PL ions detected by EASI(-)-MS and their desprotonated forms for commercial soy lecithins

[M-H] ⁻	CN:DB ^a	Assignment	Relative Intensity of [M-H] ⁻ Ions					
			SOLEC TM SG TN	SOLEC TM L TN	SOLEC TM CH TN	SOLEC TM AA	SOLEC TM AE IP	SOLEC TM F
279	18:2	Linoleic Acid	13.39 ± 1.46	11.17 ± 5.58	8.22 ± 1.68	9.18 ± 2.32	13.59 ± 4.35	2.81 ± 4.87
281	18:1	Oleic Acid	5.30 ± 1.42	7.47 ± 2.38	0.00 -	0.00 -	0.00 -	0.00 -
476	18:2	LPE ^b 18:2	0.00 -	0.00 -	0.00 -	0.00 -	74.17 ± 28.55	0.00 -
518	18:2	LPEAcet ^c 18:2	0.00 -	0.00 -	0.00 -	7.96 ± 2.72	0.00 -	0.00 -
714	34:2	PE ^d 16:0/18:2	9.50 ± 2.67	16.41 ± 0.99	7.91 ± 3.17	0.00 -	54.13 ± 9.36	21.40 ± 5.02
738	36:4	PE ^d 18:2/18:2 or 18:1/18:3	5.53 ± 2.48	15.66 ± 1.85	12.35 ± 5.12	0.00 -	93.61 ± 6.34	23.86 ± 3.33
740	36:3	PE ^d 18:1/18:2 or 18:0/18:3	4.51 ± 1.54	0.00 -	0.00 -	0.00 -	15.08 ± 0.26	0.00 -
756	34:2	PEAcet ^e 16:0/18:2	0.00 -	0.00 -	0.00 -	89.40 ± 10.05	0.00 -	0.00 -
758	34:1	PEAcet ^e 16:0/18:1	0.00 -	0.00 -	0.00 -	12.96 ± 5.78	0.00 -	0.00 -
780	36:4	18:2/18:2 or 18:1/18:3 PEAcet ^e	0.00 -	0.00 -	0.00 -	96.67 ± 5.77	0.00 -	0.00 -
782	36:3	18:1/18:2 or 18:0/18:3	0.00 -	0.00 -	0.00 -	20.96 ± 11.06	0.00 -	0.00 -
833	34:2	GPL ^f 16:0/18:2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	7.30 ± 2.97	98.33 ± 2.89	100.00 ± 0.00

^aCarbon number : Double bonds of fatty acid chain; ^bLysophosphatidylethanolamine; ^cLysophosphatidylethanolamine acetylated;

^dPhosphatidylethanolamine; ^ePhosphatidylethanolamine acetylated; ^fGlycophospholipid.

As already pointed out, MALDI-MS is the technique most widely used for lipid analysis; hence, the lecithin samples were also analyzed by this technique to compare the results with those obtained by the direct EASI-MS protocol. The mass spectrometer used to collect the MALDI-MS data is capable of performing MS/MS analysis, hence the phospholipid structures was also investigated.

Figure 3 shows MALDI-MS profiles for three representative lecithin samples both in the positive and negative ion modes. In the MALDI(+)-MS PL ions were detected in both $[\text{PL} + \text{K}]^+$ and $[\text{PL} + \text{H}]^+$ forms. These profiles reveal similar composition with those obtained by EASI-MS. In the MALDI(+)-MS profiles the main PL ions were observed in their $[\text{PL} + \text{K}]^+$ forms, assigned to PC 36:4 (m/z 820), PC 36:3 (m/z 822), PC 34:2 (m/z 796). . In the MALDI(-)-MS the major ion observed in its $[\text{M} - \text{H}]^-$ form was of m/z 833 assigned to GLP (confirmed by MS/MS fatty acid neutral loss in the fragmentation spectra). A limitation of MALDI(+)-MS is that due to noise from the DHB matrix, species of m/z lower than 600 such as LPL cannot be detected. Also note that PE ions are nearly absent in the MALDI(-)-MS spectra possibly due the ionic suppression caused by ion of m/z 833. When the MALDI-MS spectra for the three representative lecithin samples (Figure 3) are compared to the corresponding EASI-MS spectra (Figures 1 and 2), the superior compositional information revealed by EASI-MS is evident. Note that EASI(+)-MS reveals rich details of the TAG, PC and LPC composition while EASI(-)-MS shows the PE composition

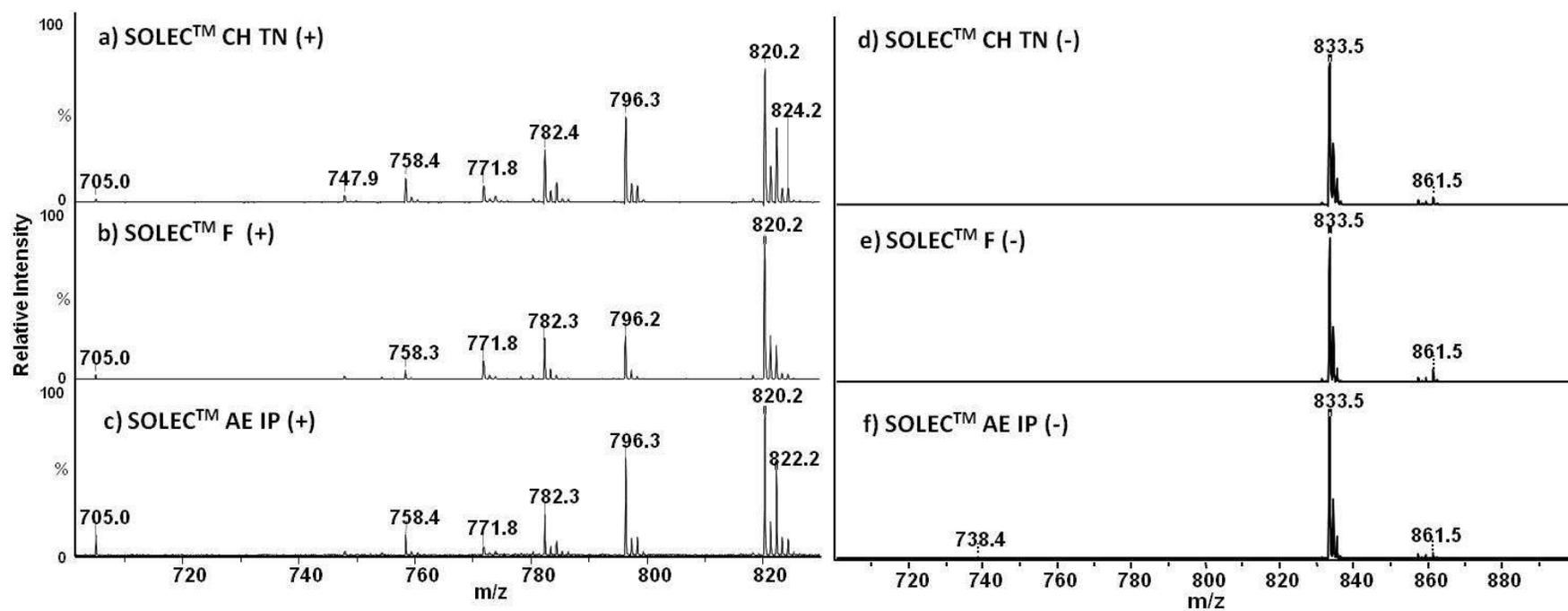


Figure 3 MALDI-MS for three representative commercial lecithin samples both in the positive and negative ion modes.

CONCLUSION

The usefulness of EASI-MS for lecithin analysis has been evaluated. The technique is performed directly on the intact sample requiring therefore no sample preparation, derivatization or pre-separation protocols. When compared to MALDI-MS analysis that requires co-crystallization with a matrix, EASI-MS showed superior results displaying much detailed structural information on TAG, PC, LPC, FFA, PE (Acet), LPE (Acet) and GPL composition. EASI(+)-MS and EASI(-)-MS has shown therefore to offer a rapid, simple and efficient technique to characterize and monitor the quality of commercial lecithin samples. It seems also capable of monitoring abnormal composition changes due for instance the addition of additives and to reveal the application of phospholipid transformation processes.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Financing Agency of Studies and Projects (FINEP) for financial assistance.

REFERENCES

- Abdelnur, P. V., Eberlin, L. S., De Sá, G. F., Souza, V., & Eberlin, M. N. (2008) Single-shot biodiesel analysis: nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *80*: 7882-7886.
- Alberici, L. C., Oliveira, H. C. F., Catharino, R. R., Vercesi, A. E., Eberlin, Marcos N., & Alberici, R. M. (2011) Distinct hepatic lipid profile of hypertriglyceridemic mice determined by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*: 1651-9.
- Alberici, R. M., Simas, R. C., Sanvido, G. B., Romão, W., Lalli, P. M., Benassi, M., Cunha, I. B. S., & Eberlin, M. N. (2010) Ambient mass spectrometry: bringing MS into the real world. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *398*: 265–294.
- Aluyor, E. O., Ozigagu, C. E., Oboh, O. I., & Aluyor, P. (2009) Chromatographic analysis of vegetable oils: a review. *Scientific Research and Essay*, *4*: 191-197.
- AOCS – American Oil Chemists’ Society. (2006) Official Methods and Recommend Practices. 4. ed.: AOCS Press. Champaign, Illinois.
- Cardoso, K. C., Da Silva, M. J., Grimaldi, R., Stahl, M., Simas, R. C., Cunha, I. B. S., Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2011). TAG profiles of *Jatropha curcas* L. seed oil by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, *89*: 67–71.
- Dashiell, G. L. (1988) Lecithin in food processing applications. In. Szuhaj, B. F. Lecithins: sources, manufacture & uses. Ed. AOCS. Cap. 1, p. 1-6.
- Dill, A. L., Ifa, D. R., Manicke, N. E., Ouyang, Z., & Cooks, R. G. (2009) Mass spectrometric imagin of lipids using desorption electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*, *877*, 2883-2889.
- Fernandes, A. M. A. P., Simas, R. C., Fernandes, G. D., Cunha, I. B. S., Barrera-Arellano, D., Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2011) Semi-quantitative analysis of triacylglycerides in vegetable oils by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analyst*: submitted
- Fernandes, A. M. A. P., Simas, R. C., Souza, V., de Sá, G. F., Daroda, R. J., Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2011) A new method for quantitation of

- free and total glycerin in biodiesel by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Energy Fuels*: submitted.
- Ferreira, C. R., Saraiva, S. A., Catharino, R. R., Garcia, J. S., Gozzo, F. C., Sanvido, G. B., Santos, L. F., Lo Turco, E. G., Pontes, J. H., Basso, A. C., Bertolla, R. P., Sartori, R., Guardieiro, M. M., Perecin, F., Meirelles, F. V., Sangalli, J. R. & Eberlin, M. N. (2010) Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *Journal Lipid Research*, 51: 1218-27.
- Fuchs, B., & Schiller, J. (2009) Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 83-98.
- Gładkowski, W., Kielbowicz, G., Chojnacka, A., Gil, M., Trziszka, T., Wawrzen, C., & Dobrzański, Z. (2011). Fatty acid composition of egg yolk phospholipid fractions following feed supplementation of Lohmann Brown hens with humic-fat preparations. *Food chemistry*, 126, 1013-1018.
- Haddad, R., Sparrapan, R., & Eberlin, M. N. (2006) Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 20: 2901–2905.
- Haddad, R., Sparrapan, R., Kotiaho, T. & Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization-membrane interface mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. *Analytical Chemistry*, 80: 898–903.
- Haddad, R., Milagres, H. M. S., Catharino, R. R. & Eberlin, M. N. (2008) Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Analytical Chemistry*, 80: 2744–2750.
- Harris, G. A., Galhena, A. S. & Fernandez, F. M. (2011) Ambient sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and Current Trends. *Analytical Chemistry*, 83, 4508–4538.
- Hartman, L., & Lago, R. (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22, 475-476.
- Helmerich, G., & Koehler, P. (2003) Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51, 6645-6651.
- Hirabayashi, A., Sakairi, M., & Koizumi, H. (1994) Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 66: 4557-4559.

- Hirabayashi, A., Sakairi, M., & Koizumi, H. (1995) Sonic spray mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 67: 2878-2882.
- Ifa, D. R.; Wu, C.; Ouyang, Z.; Cooks, R. G. (2010) Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview. *Analyst*, v. 135,. 669-681.
- Kuksis, A., & Sjovall, O. (2006) LC/MS and lipid oxidation. In. MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G.; BRENNAN, J. T.; McDonald, R. E. Lipid analysis and lipidomics: new techniques and applications. AOCs Press, cap. 5: p109-156, 399-432.
- Mcclements, D. J. (1997) Lipid-Based emulsions and emulsifiers. In. Akon, C. C., Min, D. B. (org). Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. Ed. Marcel Dekker, cap. 3, p.55-88.
- Paglia, G., Ifa, D. R., Wu, C., Corso, G., & Cooks, G. (2010) Desorption electrospray ionization mass spectrometry analysis of lipids after two-dimensional high-performance thin-layer chromatography partial separation. *Analytical Chemistry*, 82, 1744-1750.
- Rathjen, T., Lange, R., & Steinhart, H. (1998) Analysis of lecithin by near-infrared spectroscopy. *Fett/Lipid*, 100, 358-363.
- Sawaya, A. C. H. F., Abdelnur, P. V., Eberlin, M. N., Kumazawa, S., Ahn, M-R., Bang, K-S., Nagaraja, N., Bankova, V. S., & Afrouzan H. (2010) Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta* 81, 100-108.
- Saraiva, S. A., Cabral, E. C., Eberlin, M. N. & Catharino, R. R. (2009) Amazonian vegetable oils and fats: fast typification and quality control via triacylglycerols (TAG) profiles from dry matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 57: 4030–4034.
- Simas, R. C., Catharino, R. R., Eberlin, M. N., Barrera-Arellano, D., Souza, V., & Alberici, R. M. (2012) Triacylglycerides oxidation in oils and fats monitored by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Journal American Society Mass Spectrometry*, DOI 10.1007/s11746-012-2010-5.
- Simas, R.C., Catharino, R. R., Cunha, I. B. S., Cabral, E. C., Barrera-Arellano, D., Eberlin, M. N., & Alberici, R. M. (2010) Instantaneous characterization of

- vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry, *Analyst* 135, 738-744.
- Szuhaj, B. F. (2005) Lecithins. In. Shahidi, F. Bailey's industrial oil and fat products. Ed. AOCS, 6ed. v.3, cap.13, p. 361-456.
- Yang, L., Bennet, R., Strum, J., Ellsworth, B. B., Hamilton, D., Tomlinson, M., Wolf, R. W., Housley, M., Roberts, B. A., Welsh, J., Jackson, B. J., Wood, S. G., Banka, C. L., Thulin, C. D., Linford, M. R. (2009) Screening phosphatidylcholine biomarkers in mouse liver extracts from a hypercholesterolemia study using ESI-MS and chemometrics. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 393, 643-654.

CONCLUSÃO GERAL

A ionização dos fosfolipídios diminuiu com o aumento das cadeias de ácidos graxos ligados ao glicerol, e aumentou com o incremento de duplas ligações nestas cadeias. Entretanto, são necessários mais estudos para estabelecer o efeito da concentração nas análises de EASI-MS para fosfolipídios e triacilgliceróis.

A técnica de espectrometria de massas com ionização ambiente por sonic-spray demonstrou-se eficiente na caracterização direta de lecitinas comerciais, ou seja, sem preparo de amostra. Quando comparado com MALDI-MS, EASI-MS apresentou resultados superiores, uma vez que foi possível caracterizar os principais componentes (fosfolipídios e fosfolipídios acetilados, triacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicolipídios) das diferentes amostras. Além da identificação das classes de lipídios foi possível identificar os ácidos graxos ligados a cada molécula. Sendo passível de aplicação para controle de qualidade de lecitinas, bem como, o monitoramento dos processos de modificação.