



**Universidade de  
Aveiro  
2008**

**Departamento de Química**

**Vanda Sofia de Sousa  
Monteiro Simões**

**Glicoxidação: Estudo da oxidação de  
fosfatidiletanolaminas glicosiladas**



**Universidade de  
Aveiro  
2008**

Departamento de Química

**Vanda Sofia de Sousa  
Monteiro Simões**

**Glicoxidação: Estudo da oxidação de  
fosfatidiletanolaminas glicosiladas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre**

Professor Associado da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Francisco Manuel Pereira Peixoto**

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro

**Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro -  
Orientadora

## **agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Rosário Domingues, pela oportunidade que me deu de realizar este trabalho e por acreditar nas minhas capacidades, por todos os conhecimentos transmitidos e pela sua paciência infinita em explicações de química orgânica.

Quero agradecer de um modo especial à Cláudia Simões. A sua pronta disponibilidade permitiu colmatar a minha escassez de tempo e sem ela a realização deste trabalho, não teria sido possível.

Ao grupo da espectrometria de massa em geral, um muito obrigada. Não vou esquecer a forma como fui muitíssimo bem recebida, permitindo a fácil integração num novo mundo. À Ana Reis, pelo interesse e apoio constantes e pelas palavras reconfortantes em dias menos bons. À Cristina, pela sua boa disposição permanente e disponibilidade para ajudar. Ao Rui, Sofia e São, pelas horas de almoço em constante risada.

Quero agradecer aos meus colegas do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Infante Dom Pedro, pelo entusiasmo que demonstraram e pela ajuda que conseguiram oferecer apesar das grandes limitações existentes. Agradeço em primeiro lugar à Olga por todo o apoio que me deu durante este ano, cheio de peripécias para ambas. Quero agradecer ainda à Manuela, à Filomena, à Elsa e à Fernanda, pelo apoio demonstrado.

Quero agradecer ainda à minha família, especialmente ao Hugo e à Sofia por todo o incentivo. Foram eles os responsáveis pelo começo desta caminhada.

Ao Ricardo pelo apoio em alturas de stress. À Ana pela inspiração constante...

## palavras-chave

Oxidação, fosfatidiletanolaminas, glicosidação, stress oxidativo, espectrometria de massa, *electrospray*.

## resumo

As modificações que ocorrem em fosfolípidos devido ao stress oxidativo têm um papel muito importante na aterogenese, contribuindo para um aumento de predisposição para acidentes vasculares cerebrais (AVC) e trombozes. O stress oxidativo está de igual modo implicado nas complicações crónicas da diabetes *mellitus* (DM), doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e envelhecimento.

A fosfatidiletanolamina (PE) é um aminofosfolípido essencial em várias membranas celulares, como as de eritrócitos e mitocôndrias. As PE estão presentes também em lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As modificações estruturais em PE, particularmente aquelas decorrentes do stress oxidativo, têm sido relacionadas com o aparecimento da aterosclerose, contribuindo de forma indirecta para a ocorrência de eventos trombóticos, como o AVC ou o enfarte agudo do miocárdio (EAM). Vários estudos referem que as PE, na presença de altas concentrações de glicose, reagem com a mesma, sofrendo um processo de glicosilação. Em doentes com DM, o facto de existir uma maior concentração de glicose plasmática, pode favorecer a formação destas etanolaminas glicosiladas. Além disso, pensa-se que as PE ligadas à glicose ficam mais susceptíveis à oxidação do que na sua forma nativa. A forma oxidada das PE, parece favorecer a agregação plaquetar, facto que pode explicar existência de uma taxa mais elevada de aterosclerose registada em doentes diabéticos e conseqüentemente de formação de trombos.

Apesar da importância que estas alterações membranares das PE têm *in vivo*, poucos estudos têm sido realizados, no intuito de aprofundar este tema. Com este trabalho pretende-se criar um modelo de síntese entre glicose e fosfolípido, para obter o produto de reacção PE-Glucose. Este produto depois de obtido será sujeito a stress oxidativo e a sua modificação será avaliada por espectrometria de massa. Serão realizados estudos comparativos com a PE não modificada, utilizando as mesmas condições experimentais. Através desta metodologia pretende-se estabelecer uma comparação entre a taxa de oxidação PE glicosilada e PE não glicosilada e caracterizar os produtos desta oxidação.

O estudo destes produtos de oxidação entre glicose e aminofosfolípidos, poderão contribuir para a melhor compreensão do aparecimento e progressão de algumas patologias, nomeadamente a DM. Os novos compostos e estruturas modificadas que iremos identificar e caracterizar, poderão no futuro, servir como marcadores destes mecanismos.

**keywords**

Oxidation, phosphatidylethanolamines, glycoxidation, oxidative stress, mass spectrometry, electrospray.

**abstract**

The modifications that occur in phospholipids due to oxidative stress have a very important role in atherogenesis, contributing for an increase of predisposition for strokes and thrombosis. Oxidative stress is implied in diabetes mellitus (DM) complications, neurodegenerative disease as Alzheimer and aging.

The phosphatidylethanolamine (PE) is a cellular membranes essential phospholipid, present in red blood cells and mitochondrias. The PE are also present in low density lipoprotein (LDL). The structural modifications in PE, particularly those from oxidative stress, have been related with atherosclerosis, contributing in an indirect way for the occurrence of cerebral vascular accidents or strokes and acute myocardial infarction. Some studies relate that PE, in presence of high glucose concentrations, reacts with those, suffering a process called glycation. In diabetic, the high plasmatic glucose concentration, can lead to phosphatidylethanolamines glycation. Moreover, when PE is linked to glucose, it seems to undergo oxidation process easily, that in the native form.

The oxidized PE, seems to lead to platelet aggregation, fact that can explain high tax of atherosclerosis in diabetic and consequently the thrombus formation.

Although the importance that these alterations have in PE, few studies have been carried through, with an intention to deepen this subject. This work is intended to create a synthesis model between glucose and phospholipid, to get PE-Glucose product. This product will undergo oxidative stress and its modification will be evaluated by mass spectrometry. Comparative studies with the PE not modified will be carried through, using the same experimental conditions.

The study of these oxidation products from glucose and aminophospholipids, will contribute for a better understanding of the beginning and progression of some pathologies, as DM. The new compounds and modified structures that we will identify and characterize can be used in the future as markers of these mechanisms.

# Índice

## Lista de Abreviaturas

## Lista de Tabelas

## Lista de Figuras

## Lista de Esquemas

<b>1 Introdução .....</b>	<b>10</b>
1.1 As fosfatidiletanolaminas e a sua importância .....	11
1.2 Glicosilação de proteínas e lípidos .....	11
1.3 Glicosilação fosfolipídica e Stress Oxidativo.....	14
1.4 Oxidação Radicalar.....	16
1.5 Métodos utilizados na análise de fosfolípidos.....	17
1.5.1. Espectrometria de massa na análise de fosfatidiletanolaminas .....	18
1.5.1.1 Método de ionização por <i>electrospray</i> .....	19
1.5.1.1.1 Analisadores .....	21
1.5.2 Espectrometria de massa tandem.....	22
1.6 Outros métodos utilizados na análise de fosfolípidos .....	22
1.6.1 Cromatografia em camada fina.....	23
1.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	24
1.7 Objectivos do trabalho.....	25
<b>2 Estudo de fosfatidiletanolaminas por espectrometria de massa .....</b>	<b>28</b>
2.1 Introdução.....	28
2.2 Material e Métodos.....	30
2.2.1 Reagentes.....	30
2.2.2 Instrumentação.....	30
2.3 Análise e caracterização de etanolaminas por espectrometria de massa.....	31
2.3.1 ESI-MS da POPE e PLPE .....	31
2.3.2 ESI-MS/MS da PLPE e POPE .....	32
2.4 Conclusões.....	36
<b>3 Síntese e caracterização de fosfatidiletanolaminas glicosiladas .....</b>	<b>38</b>
3.1 Introdução.....	38
3.2 Material e Métodos.....	38
3.2.1 Reagentes.....	38
3.2.2 Síntese de PE glicosilados .....	38
3.2.3 Cromatografia.....	39
3.2.3.1 TLC.....	39

3.2.3.2 HPLC .....	39
3.2.4 Espectrometria de massa por ionização por <i>electrospray</i> .....	39
3.3 Síntese de fosfatidiletanolaminas glicosiladas .....	40
3.4 Purificação e isolamento.....	44
3.4.1 TLC.....	45
3.4.2 HPLC .....	48
3.5 Caracterização de PE – Glucose por ESI-MS e ESI-MS/MS.....	49
3.5.1 ESI-MS de PE-Glucose .....	50
3.5.2 MS/MS da PLPE-Glicose.....	51
3.6 Conclusão .....	56
<b>4 Oxidação de fosfatidiletanolaminas glicosiladas.....</b>	<b>58</b>
4.1 Introdução.....	58
4.2 Material e Métodos .....	59
4.2.1 Reagentes.....	59
4.2.2 Oxidação de PLPE-Glucose .....	59
4.2.3 Instrumentação.....	59
4.3 Oxidação da PLPE-Glucose pelo radical hidroxilo e monitorização por ESI-MS....	60
4.4 Caracterização dos produtos de oxidação [M+H] <sup>+</sup> da PLPE-Glucose por ESI-MS/MS .....	64
4.5 Oxidação de fosfatidiletanolaminas quando em presença de PLPE-Glucose .....	76
4.6 Conclusões.....	78
<b>5 Estudo da oxidação da PLPE-Glucose por LC-MS e LC-MS/MS.....</b>	<b>80</b>
5.1 Introdução.....	80
5.2 Material e Métodos .....	81
5.3 LC-MS .....	82
5.4 LC-MS/MS .....	87
5.6 Conclusões.....	100
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>102</b>
<b>7 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>106</b>

## Lista de Abreviaturas

AGEs – Produtos de glicosilação finais avançados

ESI – Ionização por *electrospray*

ESI-MS – Espectrometria de massa com ionização por *electrospray*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LC – Cromatografia Líquida

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a um espectrómetro de massa

MS/MS – Espectrometria de massa *tandem*

PC – Fosfatidilcolina

PE – Fosfatidiletanolamina

PE-Glicose – Fosfatidiletanolamina ligada a uma molécula de glicose

PLPC – Fosfatidilcolina com ácido linoleico

PLPE – Fosfatidiletanolamina com um ácido linoleico

POPE – Fosfatidiletanolamina com um ácido oleico

RIC – Cromatograma iónico reconstruído

RT – Tempo de retenção

TIC – Cromatograma iónico total

TLC – Cromatografia em camada fina

TOF – Analisador por tempo de voo

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Variações aplicadas nos ensaios da síntese de PE-Glucose.....	41
Tabela 2. Iões visualizados nos espectros de ESI-MS da mistura de síntese de PE-Glucose. .....	42
Tabela 3. Produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose e respectivos valores de $m/z$ dos iões obtidos nos espectros de ESI-MS.....	62
Tabela 4. Produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose e respectivos valores de $m/z$ dos iões obtidos nos espectros de ESI-MS.....	63
Tabela 5. Iões fragmento obtidos por ESI-MS/MS, que resultam de perdas comuns dos produtos de oxidação de cadeia longa com um e dois átomos de oxigénio. ....	66
Tabela 6. Produtos de oxidação $[M+H]^+$ da PLPE-Glucose obtidos por LC-MS e respectivos tempos de eluição em minutos.....	87

## Lista de Figuras

Figura 1. Processo de <i>electrospray</i> (www.rsc.org). .....	21
Figura 2. Espectro de ESI-MS da POPE. ....	31
Figura 3. Espectro de ESI-MS/MS do ião [POPE+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 718.6.....	32
Figura 4. Espectros de ESI-MS/MS do ião [PLPE+Na] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 738.5.....	33
Figura 5. Espectro de ESI-MS da monitorização da reacção de síntese PLPE-Glucose.....	43
Figura 6. Placa de sílica após realização de TLC e revelação com vapores de iodo: 1- ponto de aplicação da mistura; 2- PE-Glucose; 3-PE; 4- BHT. ....	47
Figura 7. Cromatograma obtido por HPLC, para a separação da mistura de PLPE e PLPE-Glucose. ....	49
Figura 8. Espectro de ESI-MS da mistura de POPE e POPE-Glucose.....	50
Figura 9. Espectro de ESI-MS/MS do ião [PLPE-Glucose+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 878.7.....	51
Figura 10. Espectro de ESI-MS/MS do ião [PLPE-Glucose+Na] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 900.6.....	54
Figura 11. Espectros de ESI-MS da mistura PLPE-Glucose em condições não oxidativas (A) e após dois dias de oxidação (B).....	61
Figura 12. Espectro de ESI-MS da PLPE-Glucose após 1 dia de oxidação.....	63
Figura 13. Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose [M+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 892.8.....	67
Figura 14. Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose [M+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 894.7.....	69
Figura 15. Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose [M+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 908.7.....	71
Figura 16. Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose [M+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 910.6.....	73
Figura 17. Comparação da quantidade de produtos de oxidação obtidos na oxidação da PLPE e na PLPE na presença de PLPE-Glucose, após dois dias de reacção. ....	77
Figura 18. Cromatograma iónico total de LC-MS da mistura PLPE+PLPE-Glucose sem oxidação (A) e da mistura PLPE+PLPE-Glucose após oxidação (B). ....	82

Figura 19. Cromatogramas de corrente iónica reconstruída (RIC), dos iões $[M+H]^+$ dos produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose. ....	83
Figura 20. Cromatogramas de corrente iónica reconstruída (RIC) dos produtos de oxidação de cadeia longa $[M+H]^+$ da PLPE-Glucose. ....	86
Figura 21. Espectro de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ de $m/z$ 770.6.....	89
Figura 22. Espectros de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ $m/z$ 892.7,.....	91
Figura 23. Espectros de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ de $m/z$ 894.6.....	94
Figura 24. Espectros de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ de $m/z$ 908.6.....	97

## Lista de Esquemas

Esquema 1. Glicosilação fosfolipídica: reacção entre a D-Glucose e a fosfatidiletanolamina (POPE 16:0 - 18:1). .....	13
Esquema 2. Fragmentação característica das fosfatidiletanolaminas, por ESI-MS/MS.....	29
Esquema 3. Produtos comuns formados a partir da fragmentação da cabeça polar da PLPE e POPE $[M+Na]^+$ .....	34
Esquema 4. Produtos comuns formados a partir da fragmentação das cadeias de ácidos gordos <i>sn-1</i> e <i>sn-2</i> da PLPE e POPE $[M+Na]^+$ .....	35
Esquema 5. Perdas frequentes observadas a partir da molécula de glucose na PLPE-Glucose. ....	53
Esquema 6. Produtos formados a partir da fragmentação do ião $[PLPE-Glucose+Na]^+$ de <i>m/z</i> 900.6.....	55
Esquema 7. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ de.....	68
Esquema 8. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ de.....	70
Esquema 9. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ de.....	72
Esquema 10. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ .....	75
Esquema 11. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ de <i>m/z</i> 770.6. ....	89
Esquema 12. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ de.....	92
Esquema 13. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ de <i>m/z</i> 892.5, a um RT de 28,0 minutos. ....	93
Esquema 14. Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ de <i>m/z</i> 894.6, a um RT de 23,6 minutos. ....	95

Esquema 15. Produtos formados a partir da fragmentação por LC-MS/MS do produto de oxidação [PLPE-Glucose+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 894.6, a um RT de 25,2 minutos. ....	96
Esquema 16. Produtos formados a partir da fragmentação por LC-MS/MS do produto de oxidação [PLPE-Glucose+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 908.6, a um RT de 23,1 minutos. ....	98
Esquema 17. Produtos formados a partir da fragmentação por LC-MS/MS do produto de oxidação [PLPE-Glucose+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 908.6, a um RT de 26,0 minutos. ....	99

# **Capitulo 1**

## **Introdução**

## 1 Introdução

Diversas patologias crónicas, como a aterosclerose, diabetes mellitus (DM) e insuficiência renal crónica (IRC), estão associadas ao stress oxidativo, inflamação e eventualmente às reacções de autoimunidade (Oak *et al.*, 2000; Vlassara and Palace, 2003). Estudos revelam que o stress oxidativo, poderá estar associado à glicosilação proteica e lipídica, ou seja, estruturas biológicas glicosiladas, poderão ficar mais susceptíveis ao processo de stress oxidativo e induzir a oxidação de outras moléculas (Oak *et al.*, 2000; Ravandi *et al.*, 2000). Vários estudos têm sido realizados sobre a glicosilação proteica e mais recentemente sobre a glicosilação lipídica, mais precisamente, entre a glicose e aminofosfolípidos (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001; Ramasamy *et al.*, 2005). Alguns destes estudos estabelecem a ligação entre o aumento de glicose disponível no sangue (como no caso da DM) com conseqüente aumento de compostos lipídicos glicosilados *in vivo* (Oak *et al.*, 2000; Ravandi *et al.*, 2000). No entanto são ainda poucos os estudos realizados sobre a oxidação destes compostos (Ravandi *et al.*, 2000).

O stress oxidativo causa danos em importantes estruturas biológicas, como proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos, e podem levar a uma resposta inflamatória, eventos trombóticos, entre outros (Vlassara and Palace, 2003). Investigação recente sugere que aminofosfolípidos glicosilados são mais susceptíveis à reacção de oxidação, estabelecendo uma ligação com a progressão de algumas doenças crónicas. É neste contexto que se torna relevante estudar a glicosilação de fosfolípidos, mais concretamente as fosfatidiletanolaminas (PE) e avaliar a sua influência no aumento ou diminuição da taxa de oxidação de PE glicosiladas. A identificação dos produtos de oxidação e a sua caracterização por MS/MS poderão contribuir para a melhor compreensão do aparecimento e progressão de algumas patologias crónicas. Nesse âmbito, será estudado o produto PE-Glicose, a sua oxidação e os produtos dessa mesma oxidação. A identificação e caracterização destes produtos de oxidação formados a partir da glicose e aminofosfolípidos poderão servir no futuro, como marcadores destes mecanismos (Kalousova *et al.*, 2005).

### ***1.1 As fosfatidiletanolaminas e a sua importância***

Os glicerofosfolípidos são os constituintes principais das membranas celulares e são constituídos por uma molécula de glicerol, duas cadeias de ácidos gordos e um álcool fosforilado (grupo fosfato). São moléculas anfipáticas, isto é, a cabeça constituída pelo grupo fosfato é polar ou hidrofílica e a cauda constituída pelas cadeias de ácidos gordos é apolar ou hidrofóbica. Estas características fazem dos fosfolípidos estruturas singulares, que permitem estabelecer a estrutura organizada das membranas celulares (Stryer, 1987).

Nas membranas celulares existem diversos tipos de fosfolípidos entre os quais as fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas, esfingomelinas (que têm esfingosina em vez de glicerol) e fosfatidilcolinas (PC). As PE pertencem ao grupo das cefalinas, em que o álcool que esterifica o fosfato é a etanolamina. As PE em conjunto com as PC são os principais constituintes das membranas celulares em geral. As PE são aminofosfolípidos importantes nas membranas biológicas e encontram-se presentes nas membranas citoplasmáticas nomeadamente dos eritrócitos e das mitocôndrias (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001).

Estes fosfolípidos estão também presentes em percentagem significativa nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Lederer and Baumann, 2000). No plasma humano, as PE compõem cerca de 5% a 6% do total de fosfolípidos (Ravandi *et al.*, 2000), daí a importância de serem estudadas, visto que têm grande probabilidade de sofrer glicosilação, na presença de níveis elevados de glicose plasmática. Assim, as PE têm sido objecto de estudo em alguns trabalhos de investigação, entre os quais o seu comportamento na presença de glicose e possível aumento de susceptibilidade à oxidação (Ravandi *et al.*, 1999; Januszewski *et al.*, 2005; Kalousova *et al.*, 2005).

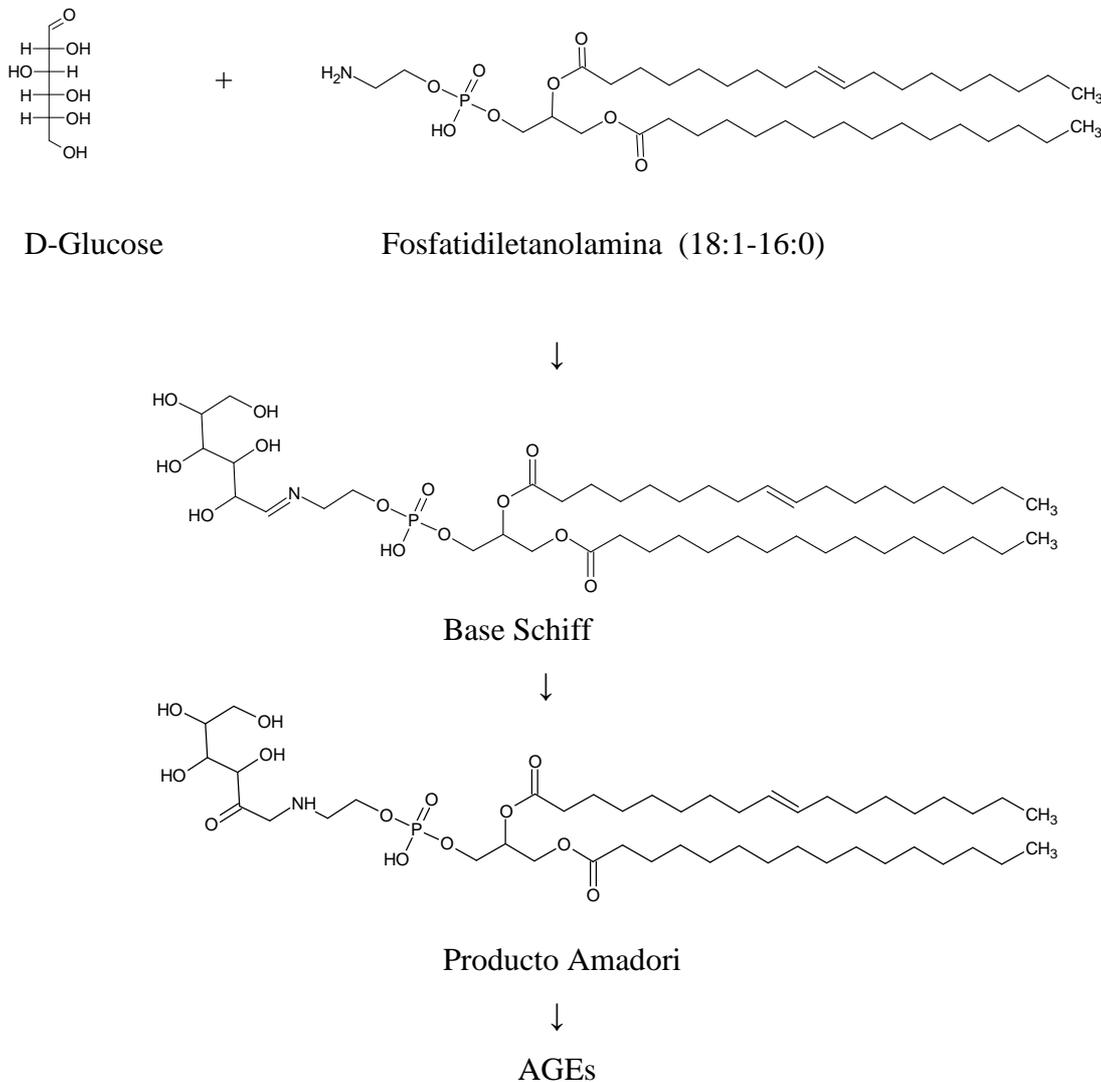
### ***1.2 Glicosilação de proteínas e lípidos***

As reacções entre um grupo carbonilo e amina, encontram-se por toda a natureza. Manifestam-se através de reacções não enzimáticas de ligação entre o grupo aldeído de um hidrato de carbono, como a D-glicose, e um grupo amina livre, geralmente de aminoácidos. A este processo foi dado o nome de reacção de *Maillard*, após ter sido demonstrado

acontecer *in vitro* e *in vivo*. A primeira fase da reacção é iniciada com a ligação da amina, ao grupo carbonilo funcional de um açúcar reduzido, formando as glicosaminas. Este produto intermédio, conhecido como base *Schiff*, sofre um rearranjo, passando de aminoenol para aminocetose, formando o produto *Amadori*. No Esquema 1, está representado resumidamente esta reacção, tomando como exemplo a D-Glucose e a fosfatidiletanolamina (POPE). *In vivo*, estas alterações químicas, são consideradas como causa da deterioração gradual da estrutura e função das proteínas tecidulares, contribuindo para a patofisiologia do processo de envelhecimento. Diversos estudos têm descrito a formação e a acumulação de produtos *Amadori*, como a fracção de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) e a albumina glicosilada, no sangue e em alguns tecidos (Nakagawa *et al.*, 2005; Higuchi *et al.*, 2006). A acumulação de produtos de glicosilação finais avançados (AGEs - do inglês: *Advanced glycation end products*) em diabéticos e o subsequente nível elevado de glicose disponível para várias proteínas, são o elo de ligação entre a hiperglicémia característica desta doença metabólica e as complicações que surgem ao longo do tempo, como a retinopatia e a insuficiência renal crónica (Vlassara and Palace, 2003). A glicosilação das proteínas tem sido relacionada com a progressão das complicações da DM, contribuindo para um agravamento do estado de saúde e aumentando a percentagem de mortalidade em pacientes diabéticos. Apesar da glicosilação proteica ter vindo a ser muito investigada, pouca atenção tem sido dada à glicosilação lipídica.

Estudos recentes indicam que aminofosfolípidos, como a fosfatidiletanolamina, podem ser alvo de reacções de *Maillard*, tal como as proteínas. Devido à presença de um grupo amina livre num aminofosfolípido, torna-se evidente que possam ser modificado por glicosilação, tal como se observa *in vivo* para as proteínas. Bucala *et al.* mostraram que a PE, pode ser glicosilada, através da adição de uma molécula glicose (Esquema 1), podendo dar início à formação de reacções de glicosilação avançada e consequentemente à produção de AGEs (Lederer and Baumann, 2000). Como a PE é parte integrante da lipoproteína de baixa densidade LDL, a sua glicosilação também tem sido objecto de estudo e chegou-se à conclusão que a formação de AGEs a partir da glicosilação da LDL ocorre de forma proporcional à concentração de glicose disponível (Vlassara and Palace, 2003). Foi demonstrado também, que a glicosilação altera a actividade biológica da LDL através da modificação da sua estrutura. Este efeito parece que reduz a percentagem de degradação da

LDL pelos fibroblastos, aumentando a deposição de esteres de colesterol nas células aórticas humanas, o que não acontece comparando com a LDL de conformação normal (Ravandi *et al.*, 2000). Esta acumulação de esteres de colesterol no sistema venoso vai levar ao aumento da taxa de formação de placas de aterosclerose.



**Esquema 1.** Glicosilação fosfolipídica: reação entre a D-Glucose e a fosfatidiletanolamina (POPE 16:0 - 18:1).

*In vivo* a glicosilação lipídica pode induzir alterações na biossíntese e movimento das membranas fosfolipídicas, nas suas propriedades físicas, nas actividades de ligação a enzimas e pensa-se que aumenta a sua susceptibilidade ao stress oxidativo (Ravandi *et al.*,

1996; Ravandi *et al.*, 1999). Todas estas alterações podem contribuir para o envelhecimento e aparecimento de doença crónica, tais como, a DM e a aterosclerose. Diversos estudos mostraram que a formação e acumulação de AGEs é proporcional ao envelhecimento e severidade das complicações na DM e que estas alterações promovem a angiogenese (Oak *et al.*, 2003).

### ***1.3 Glicosilação fosfolipídica e Stress Oxidativo***

Todos os organismos vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, existindo um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de moléculas como o NADH. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam os componentes celulares, incluindo proteínas, lípidos e ADN, alterando a sua função biológica (Stryer, 1987). Em humanos, o stress oxidativo encontra-se associado a diversas doenças, como a aterosclerose, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (Nakagawa *et al.*, 2005; Higuchi *et al.*, 2006).

Higuchi e colaboradores descobriram que plasma com altas concentrações de glicose contém uma maior quantidade de lípidos glicosilados. Estes lípidos foram identificados como sendo produtos *Amadori* da fosfatidiletanolamina, que dão origem a espécies reactivas de oxigénio (ROS – do inglês: *reactive oxygen species*) que por sua vez provocam a peroxidação lipídica (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001). Alguns estudos sugerem que as ROS levam à activação do factor nuclear kB (NF-kB). O NF-kB é um factor que está implicado na transdução de vários sinais celulares, entre os quais o da inflamação e o da pró- e anti-apoptose. A activação destes sinais depende da ligação dos AGEs ao seu receptor (RAGE). Há evidencias que os AGEs estão envolvidos num ciclo vicioso de stress oxidativo, em que há promoção de inflamação, que por sua vez gera ROS, aumentando a produção de AGEs e assim sucessivamente (Ramasamy *et al.*, 2005).

Os níveis de AGEs mostraram uma correlação significativa com o nível de LDL oxidada. Estes resultados suportam a hipótese de que a oxidação iniciada pelos AGEs tem muita importância na oxidação lipídica *in vivo* (Lederer and Baumann, 2000). A acumulação de lípidos e lipoproteínas oxidadas nos vasos sanguíneos pode evoluir para lesões ateroscleróticas e esta é uma das principais preocupações em diabéticos, visto que estes têm um risco aumentado de ocorrência de eventos vasculares oclusivos. É através

desta modificação oxidativa, que o LDL oxidado *in vivo* reduz a sua capacidade de reconhecimento pelo seu receptor normal de LDL, diminuindo a sua remoção, promovendo um aumento dos níveis séricos da LDL e a captação da LDL oxidada pelos receptores dos macrófagos e células do músculo liso vasculares (Pulfer and Murphy, 2003; Vlassara and Palace, 2003). O aumento da endocitose de LDL oxidados, pelos macrófagos e parede vascular, vai transformá-los numa espécie de esponjas celulares carregadas de lípidos (Lederer and Baumann, 2000), dando origem ao estágio inicial da lesão arteriosclerótica (Lederer and Baumann, 2000; Januszewski *et al.*, 2005). Estudos na patogénese da aterosclerose, revelam que a oxidação na lipoproteína de baixa densidade (LDL) é um factor chave na iniciação das lesões ateroscleróticas. Algumas investigações sugerem que a glicosidação não enzimática de apoproteína B e de aminofosfolípidos, pode promover a oxidação de LDL. Usando anticorpos anti-AGE, Bucala *et al.*, mostraram que a molécula de LDL glicosilada está envolvida na susceptibilidade à oxidação (Vlassara and Palace, 2003). Glugliucci *et al.* mostraram que a glicosilação da LDL constitui um evento de predisposição para a sua subsequente modificação oxidativa e que as fracções de LDL e VLDL de pacientes diabéticos são mais susceptíveis à oxidação (Ravandi *et al.*, 2000).

Jain *et al.* investigaram a influência do aumento da glicose plasmática nos eritrócitos no processo de oxidação. Nos eritrócitos de diabéticos existe uma correlação entre o nível de peroxidação e o nível de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001). Os eritrócitos humanos contêm uma quantidade notória de ácidos gordos insaturados de cadeia longa, que são susceptíveis ao processo de oxidação. Estes dados indicam que níveis elevados de glicose promovem a peroxidação lipídica na membrana de eritrócitos. Assim, foi demonstrado também que os níveis de HbA<sub>1c</sub> estão significativamente correlacionados com a ligação a glucosaminas, à fosfatidiletanolamina e consequentemente aos produtos *Amadori in vivo* (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001).

Os produtos *Amadori* parecem ser capazes de produzir ROS, tal como o anião radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), que por sua vez provoca a peroxidação lipídica (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001). Estes resultados mostraram que os produtos *Amadori* são capazes de produzir peroxidação lipídica mesmo na ausência de iões metálicos. O facto dos produtos *Amadori* promoverem a peroxidação lipídica sem a participação de iões metálicos é muito importante. No plasma sanguíneo, iões de cobre e ferro estão quase completamente ligados a proteínas como a ceruplasmina (Cu<sup>2+</sup>) ou a transferrina (Fe<sup>3+</sup>). Com os resultados

que obtiveram, é perfeitamente justificável que se espere que a peroxidação lipídica seja glicose dependente nas membranas de eritrócitos, através da glicosilação de aminofosfolípidos como a fosfatidiletanolamina (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001). Em condições fisiológicas normais, a totalidade da fosfatidilserina e uma grande parte da fosfatidiletanolamina, estão localizadas na camada interior da bicamada fosfolipídica da membrana dos eritrócitos humanos (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001).

Vários estudos indicam que a peroxidação lipídica da membrana eritrocitária, causada pelo aumento de glicose leva à externalização da fosfatidilserina e da fosfatidiletanolamina e paralelamente a uma elevação da coagulabilidade sanguínea (Zieseniss *et al.*, 2001). Pode assumir-se que as complicações diabéticas como o aumento da coagulabilidade do sangue e o aumento do risco trombótico pode ser atribuído em parte às alterações provocadas pela oxidação induzida pela glicose nas membranas eritrocitárias, através da formação da ligação glicose-fosfatidiletanolaminas e dos compostos *Amadori* (Breitling-Utzmann *et al.*, 2001).

#### **1.4 Oxidação Radicalar**

A oxidação lipídica, conhecida como peroxidação lipídica, é um conjunto de reacções que ocorre em cadeia. O início destas reacções dá-se com a abstracção de um átomo de hidrogénio do grupo metileno reactivo (C-H), deixando um electrão desemparelhado no átomo de carbono desse grupo, produzindo radicais alquilo ( $R^{\bullet}$ ). Esta alteração vai promover a reorganização das ligações duplas adjacentes produzindo outros radicais alquilo. Na presença de oxigénio, os radicais alquilo reagem e formam radicais peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ) que por sua vez ao adquirir um átomo de hidrogénio produzem um hidroperóxido lipídico ( $ROOH$ ), que irá promover várias reacções de oxidação. O peróxido resultante é clivado na presença de iões de ferro, formando mais espécies reactivas como radicais peróxido, alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ ) ou epoxiperóxido ( $OROO^{\bullet}$ ). Estas espécies radicalares conseguem abstrair átomos de hidrogénio de lípidos e propagar a peroxidação lipídica ou terminar esta reacção em cadeia reagindo com proteínas e DNA, causando danos por reacções cruzadas entre biomoléculas (Spiteller, 2006; Cheng and Li, 2007).

A reacção de Fenton é considerada o mecanismo modelo de produção de radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), capaz de abstrair átomos de hidrogénio de cadeias de ácidos gordos polinsaturadas. No entanto este mecanismo de oxidação não prescinde da presença de iões de ferro (II). O ferro funciona como um catalisador nesta reacção, no entanto ainda está em debate a forma como inicia a peroxidação lipídica (Cheng and Li, 2007).

As PE têm na sua constituição duas cadeias de ácidos gordos, que podem ser insaturadas. É nas cadeias de ácidos gordos insaturadas que se dão as alterações provocadas pela oxidação. Tomando como exemplo a fosfatidiletanolamina PLPE (18:2,16:0) em que a cadeia insaturada possui duas ligações duplas, situadas no carbono 9 e 12. Entre estas ligações existe um átomo de hidrogénio, que por estar entre duas ligações duplas é muito instável, designando-se por bisalílico. Na presença de agentes oxidantes, este hidrogénio é abstraído, provocando a deslocação da ligação dupla, para o carbono 10 ou para o carbono 11, ficando um radical livre no carbono 9 ou no carbono 13, respectivamente. (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Spitteller, 2006; Cheng and Li, 2007). Quando se dá a inserção de átomos de oxigénio, o peso molecular aumenta. Os átomos de oxigénio podem ser introduzidos em forma de hidroxilo, hidroxiperoxido/cetonas ou di-hidroxilo, de acordo com o número de átomos de oxigénio incorporados. Quando se dá inserção de átomos de oxigénio e quebra da molécula, o peso molecular diminui. Neste caso, no terminal sn-2 são formados frequentemente grupos aldeído ou ácido carboxílico.

O stress oxidativo em fosfolípidos tem sido estudado por espectrometria de massa (Domingues *et al.*, 2008 (b)), em PC (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b)) e em PE (Domingues *et al.*, 2008 (a)). O estudo da oxidação em PE glicosiladas e a sua caracterização por MS/MS é um assunto ainda pouco desenvolvido. Neste trabalho as alterações provocadas em PE-Glicosiladas decorrentes da peroxidação lipídica, serão estudadas em detalhe por ESI-MS/MS e LC-MS/MS.

### ***1.5 Métodos utilizados na análise de fosfolípidos***

Os fosfolípidos têm muita importância na bioquímica celular. Como já vimos anteriormente, são as principais biomoléculas presentes na constituição das membranas biológicas e são também constituintes de lipoproteínas. Em algumas patologias crónicas

como a aterosclerose, diabetes *mellitus* e Alzheimer, os fosfolípidos têm alterações na sua estrutura. Apesar das modificações estruturais em fosfolípidos associadas a certas patologias ainda não estar completamente compreendida, vários estudos têm sido realizados nesse sentido. Vários estudos dedicados às modificações em fosfolípidos, utilizam como técnica a espectrometria de massa (Kerwin *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Reis *et al.*, 2007; Simoes *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2008 (a)). Esta é frequentemente associada a métodos separativos, como a cromatografia líquida (LC) (Hullin *et al.*, 1989; Kerwin *et al.*, 1994; Ravandi *et al.*, 1996; Domingues *et al.*, 2008 (a)). A cromatografia em camada fina é uma técnica separativa antiga usada na análise de fosfolípidos e tem ressurgido em trabalhos recentes, na separação das diferentes classes de fosfolípidos extraídos de amostras biológicas (Moesgaard *et al.*, 1999; DeLong *et al.*, 2001; Bacot *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2004; Bayir *et al.*, 2007).

### 1.5.1. Espectrometria de massa na análise de fosfatidiletanolaminas

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa, que pode ser utilizada na identificação de compostos desconhecidos. Através desta técnica é possível detectar compostos em concentrações muito baixas em misturas quimicamente complexas, visto que a identificação pode ser feita em quantidades muito pequenas. Os princípios científicos da espectrometria de massa são simples. Assim, esta técnica tem como base a formação de iões que são depois detectados. Os espectrómetros de massa constam de quatro partes básicas: um sistema de manipulação para introduzir a amostra no equipamento; uma fonte de iões, na qual é produzido um feixe de iões proveniente da amostra; um analisador que separa iões de acordo com a razão massa/carga; e um detector, no qual os iões separados são recolhidos e caracterizados. O detector está ligado a um computador que permite integrar a informação recebida e transforma-la num espectro de massa cujos picos correspondem a valores de  $m/z$  (razão massa carga do ião). Ao longo do tempo, têm surgido diferentes métodos de ionização (para gerar esses iões) e diferentes tipos de analisadores. O primeiro método de ionização a surgir, foi o impacto electrónico (EI) e mais tarde a ionização química (CI), que só são aplicáveis a compostos voláteis e termicamente estáveis, por transmitirem grandes quantidades de energia conduzindo à

quebra das moléculas. Para ultrapassar esta limitação surgiu a ionização por bombardeamento com átomos ou iões rápidos (FAB) que permitiu a análise por espectrometria de massa (MS) de amostras não voláteis e termicamente instáveis. Mais recentemente surgiram técnicas de ionização mais suaves como o *electrospray* (ESI) e a ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI), usados hoje em dia para análise de biomoléculas. O método ESI é o mais usado na análise de fosfolípidos (Pulfer and Murphy, 2003) por estes serem moléculas com pesos moleculares relativamente baixos, entre 600 e 1000 Da, e será aqui abordado em detalhe, por ser o método de ionização a ser utilizado no decurso deste trabalho.

Para alguns investigadores, a análises de fosfolípidos era considerada uma área difícil de trabalhar, porque ao contrário das proteínas, os fosfolípidos têm ligações muito específicas, o que faz com certas técnicas que são aplicadas ao ADN e proteínas, não sejam aplicadas aos fosfolípidos (Pulfer and Murphy, 2003). O desenvolvimento da espectrometria de massa por FAB mudou completamente essa situação. A partir daí foi possível analisar directamente estruturas fosfolipídicas intactas e preservar a informação inerente à sua estrutura química (Pulfer and Murphy, 2003). Contudo tinha alguns problemas associados, como as complicações do espectro com iões da matriz e a decomposição dos iões moleculares durante a ionização. Com o aparecimento do ESI, um método de ionização mais suave que o FAB e que prescindiu o uso da matriz, além de estes problemas ficarem resolvidos, o nível de sensibilidade na detecção de fosfolípidos foi aumentado. A sensibilidade foi também uma característica importante obtida com os novos instrumentos detentores de novos analisadores e associação de analisadores, nomeadamente o *Ion Trap* e o *Q-TOF*.

#### **1.5.1.1 Método de ionização por *electrospray***

O método de ionização por *electrospray* (ESI) é uma das técnicas de ionização com mais vasta utilização. Esta técnica passou por duas fases distintas de investigação e desenvolvimento, em que a primeira decorreu antes de 1970. É importante salientar o trabalho de Dole *et al.* que nesta fase se focaram mais nos aspectos fundamentais do processo de produção de carga assim como no modo experimental de o concretizar. Após

1970 deu-se o desenvolvimento da segunda fase principalmente com o trabalho desenvolvido por Yamashita e Fenn em 1989 (Fenn *et al.*, 1989), sendo o último considerado pioneiro da espectrometria de massa de ionização por *electrospray*. A partir daqui esta técnica teve um crescimento muito significativo, através da construção e desenvolvimento das fontes iónicas.

Esta técnica tem três características principais que permitem fazer uma distinção dos outros métodos de ionização. Em primeiro, visto que o *electrospray* é uma técnica de ionização suave, permite que as interacções não covalentes entre moléculas que existam em solução sejam preservadas na fase gasosa. A segunda característica é que tem a capacidade de produzir iões multiplamente carregados, com números de cargas elevado, reduzindo assim a razão  $m/z$ , característica importante para compostos de alto peso molecular, como no caso de proteínas. Desta forma é possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa. Por fim, o facto de que as amostras a analisar devem ser introduzidas em solução, faz com seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação, de que se destaca a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês: *high performance liquid chromatography* (Whitehouse *et al.*, 1985).

Assim, a substância a ser estudada está dissolvida num solvente que normalmente é muito mais volátil do que a amostra em estudo, e de seguida esta solução é injectado através de um capilar, de metal, num fluxo contínuo, por acção de uma bomba de seringa. De seguida é aplicada uma diferença de potencial na agulha metálica, que provoca a formação de um cone de líquido na sua ponta, conhecido como cone de Taylor em que a solução é empurrada para fora do capilar e forma um aerossol em forma de pequenas gotas. Um gás não carregado, como o nitrogénio é frequentemente utilizado para ajudar a formação do spray de pequenas gotas, e também à evaporação do solvente das gotículas. O solvente ao evaporar, torna as gotas mais pequenas e força as moléculas da amostra, a juntar-se, o que vai fazer com que estas se repilam e partam as gotículas. O processo repete-se até que o analito fica sem solvente nenhum, ficando apenas o analito em forma de ião. Os iões carregados são então conduzidos para os analisadores e analisados, por espectrometria de massa (Figura 1).

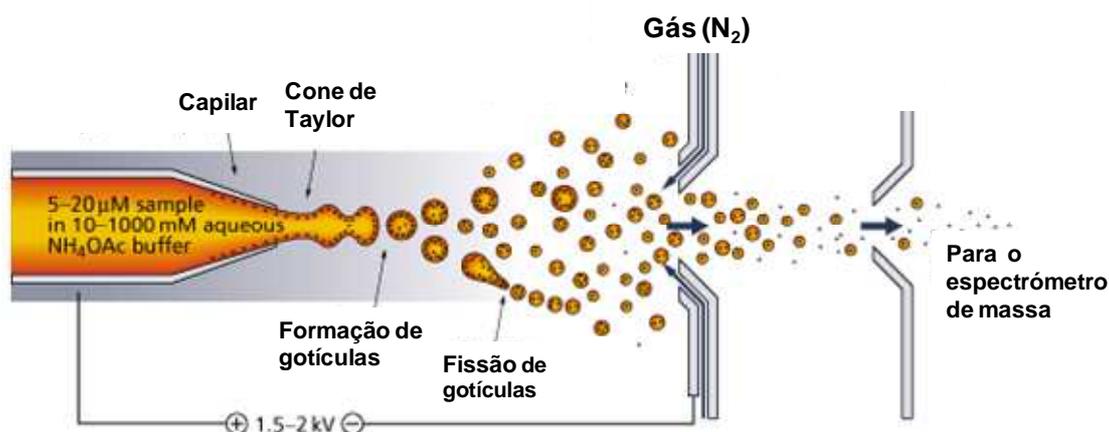


Figura 1. Processo de *electrospray* (www.rsc.org).

Os espectrómetros de massa variam na sua fonte de ionização e no analisador. As fontes dos espectrómetros de massa estão em geral situadas numa região de vácuo. No caso de fonte de ionização por *electrospray* esta encontra-se à pressão atmosférica e a evaporação do solvente é muitas vezes completa por intermédio de um fluxo corrente de um gás, em geral, azoto ou árgon.

#### 1.5.1.1.1 Analisadores

Os analisadores mais usados hoje em dia são o quadrupolo, a trapa e o tempo de voo (TOF – do inglês: *time of flight*). Estes analisadores podem ser usados em diferentes combinações. Um dos instrumentos mais usados é o Q-TOF, que foi usado neste trabalho, e que será descrito brevemente. O Q-TOF combina dois tipos de analisadores, o quadrupolo e o TOF, que o torna significativamente mais sensível. Os quadrupolos são de relativo baixo custo, de fácil utilização e capazes de fornecer resultados rigorosos. No entanto a resolução é limitada e a transmissão diminui linearmente com o valor de  $m/z$ , sendo o limite superior de  $m/z$  cerca de 3000. Um quadrupolo é formado por quatro rolos paralelos aos quais se aplica uma corrente contínua e uma corrente alterna que afecta o percurso dos iões viajando pelo trajecto centralizado entre os 4 rolos. Para as voltagens

dadas, somente os iões de uma determinada relação  $m/z$  podem passar através do filtro do quadrupolo, enquanto os outros são varridos como moléculas descarregadas. Ao variar os sinais eléctricos de um quadrupolo, pode-se variar a faixa da relação  $m/z$  transmitida.

Um analisador por tempo de voo usa as diferenças de tempo que os iões gerados e acelerados levam para chegar ao detector. Os iões são acelerados por um pulso de campo eléctrico e as partículas aceleradas passam através de um tubo de voo vazio. O princípio essencial da espectrometria de massa por tempo de voo baseia-se em que todos os iões são acelerados com a mesma energia. As suas velocidades são inversamente proporcionais às raízes quadradas de suas massas. Assim os iões mais leves e de maior velocidade chegam ao detector antes do que os iões mais pesados e de menor velocidade.

### 1.5.2 Espectrometria de massa tandem

As principais características dos espectros de massa obtidos com o método de ionização suave são a ausência de fragmentação, o que permite a determinação rigorosa de massas moleculares dos constituintes das misturas. No entanto, nestas condições pouca informação é obtida acerca da sua estrutura molecular. Para esse efeito é necessário proceder à fragmentação do ião desejado induzindo a dissociação dos iões formados na fonte, por colisão, normalmente através de um gás. Esta técnica é chamada de espectrometria de massa tandem ou MS/MS. Usando esta tecnologia, podemos retirar várias conclusões sobre a estrutura das moléculas analisadas e os espectros obtidos dão-nos não só as formas de quebra molecular mais frequente, como as mais favoráveis. A espectrometria de massa por MS/MS tem sido utilizada no estudo detalhado e na caracterização de várias moléculas, entre os quais os fosfolípidos (Hsu and Turk, 2000; Pulfer and Murphy, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005).

### 1.6 Outros métodos utilizados na análise de fosfolípidos

Além dos métodos de análise qualitativa e caracterização, que referimos anteriormente, são também de interesse os métodos de separação aplicados em fosfolípidos. Estes métodos são importantes no sentido de simplificar o estudo de misturas

complexas, visto que facilitam a análise de compostos que estão em menor quantidade ou que não ionizam tão facilmente. Alguns compostos sem separação, podem ser mascarados por outros iões presentes nas misturas. Os métodos de separação mais frequentemente utilizados em fosfolípidos são a cromatografia líquido-líquido em camada fina (TLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A TLC é uma técnica mais antiga, mas que nunca deixou de ser utilizada, apesar das vantagens trazidas com o aparecimento do HPLC. Neste trabalho iremos fazer uma breve abordagem destas duas técnicas, uma vez que ambas foram utilizadas neste trabalho.

### 1.6.1 Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina ou TLC (do inglês: *thin layer chromatography*) é uma técnica utilizada para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura. Trata-se de uma técnica de adsorção em que é utilizada uma fase móvel, composta por um líquido (eluente) e uma fase estacionária sólida em que as moléculas do eluente competem com as moléculas do soluto (amostra) por sítios de ligação na fase estacionária. A eluição ocorre quando o eluente desloca a amostra da fase estacionária. A retenção das substâncias ocorre devido a adsorção sofrida na superfície da fase estacionária que geralmente é sílica. Assim, a mistura é aplicada na placa coberta com sílica e posteriormente colocada numa câmara cromatográfica contendo a fase móvel. Esta fase móvel sobe por capilaridade e arrasta a substância menos adsorvida separando-a das substâncias mais adsorvidas. Estas diferenças de retenção da amostra estão associadas à sua polaridade. Assim, existem duas categorias: a TLC de fase normal e a TLC de fase reversa. Na TLC de fase normal a fase estacionária é polar e a fase móvel apolar. Neste caso, em que a fase estacionária é constituída por sílica, a ordem da eluição dos solutos está baseada no princípio dos solutos apolares terem mais afinidade pela fase móvel e serem eluídos primeiramente, enquanto os solutos polares têm mais afinidade pela fase estacionária e são eluídos posteriormente. Na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar e por isso a ordem de eluição dos compostos é inversa à normal, ou seja, os compostos polares eluem à frente dos compostos apolares. A fase estacionária é constituída por sílica com cadeias de 18 carbonos (C18). Quando estiverem presentes várias substâncias, cada uma irá

comportar-se segundo as suas propriedades de solubilidade e adsorção, dependendo dos grupos funcionais presentes na sua estrutura (Ramasamy *et al.*, 2005).

### 1.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica cujos princípios químicos e físicos são semelhantes ao do TLC, ou seja, inclui de igual modo uma fase móvel e outra estacionária em que o objectivo é a separação líquido-líquido de acordo com as suas solubilidades relativas. A grande diferença encontra-se na parte prática, visto ser uma técnica automatizada. O HPLC usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contêm partículas muito finas capazes de proporcionar separações muito eficientes. A sua evolução desde aproximadamente 1969, trouxe muitas vantagens em relação a outros métodos de separação devido a várias características entre as quais: o grande poder de resolução, velocidade de separação e monitorização contínua do eluente da coluna. Além disso permite a medição quantitativa exacta, análises repetidas e reprodutivas com a mesma coluna e a automatização do procedimento analítico e do tratamento dos dados. Muitos dispositivos têm incluído um forno para controlo da temperatura da coluna. Todas estas vantagens fazem do HPLC uma das técnicas de separação mais importantes na actualidade (Harris, 2005).

O HPLC é constituído por 4 componentes principais:

1) Sistema de injeção do solvente. Este sistema inclui a bomba, controles de pressão e de vazão, e um filtro no lado da entrada. A bomba é um dos componentes mais importantes da cromatografia líquida, pois o seu desempenho afecta directamente o tempo de retenção, a reprodutibilidade e a sensibilidade do detector.

2) Sistema de injeção da amostra. O HPLC tem um sistema de injeção composto por várias tubagens, onde passam os eluentes e a amostra. A amostra pode ser injectada quando o sistema de injeção está na posição de carregamento. Quando se gira a válvula 60°, no sentido dos ponteiros do relógio, a amostra contida na tubagem é injectada em alta pressão para dentro da coluna.

3) A coluna. É normalmente de aço inoxidável polido e contém a fase estacionária. A coluna cromatográfica ao ser aquecida vai diminuir a viscosidade do solvente, sendo necessária menor pressão, permitindo o fluxo mais rápido. O aumento da temperatura faz

diminuir os tempos de retenção o que vai melhorar a resolução devido ao aumento da velocidade de difusão dos solutos. No entanto, o aumento da temperatura pode degradar a fase estacionária e diminuir o tempo de vida da coluna. Se a temperatura não for controlada, ela varia de acordo com a temperatura ambiente. Ao usar uma coluna aquecida com temperatura fixada ligeiramente acima da temperatura ambiente, melhora a reprodutibilidade dos tempos de retenção e a precisão da análise quantitativa. A fase estacionária normalmente é constituída por partículas de sílica microporosa, com grande pureza e formato esférico. São permeáveis ao solvente e têm uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama.

4) O detector, cuja função é monitorizar a fase móvel à medida que sai da coluna. Um detector ideal deve ser sensível a pequenas concentrações de todos os compostos, fornecendo uma resposta linear, sem causar alargamento dos picos eluídos. O detector deve ser insensível às variações de temperatura e composição do solvente.

Na utilização do HPLC é necessário utilizar solventes de alto grau de pureza, para evitar a degradação das colunas e para minimizar o sinal de fundo do detector causado por contaminantes. É recomendável a lavagem periódica da coluna analítica, para prolongar a sua vida útil (Harris, 2005).

### ***1.7 Objectivos do trabalho***

Como foi referido anteriormente, vários estudos revelam, que os aminofosfolípidos, em particular as fosfatidiletanolaminas, podem sofrer glicosilação. Pensa-se que após esta modificação, estes lípidos ficam mais susceptíveis à oxidação, levando ao desencadear de mecanismos, que poderão estar relacionados com o desenvolvimento de várias patologias crónicas. Além disso a presença de fosfolípidos oxidados parecem promover ou aumentar a taxa de oxidação de outros fosfolípidos ou outras biomoléculas. Apesar da indiscutível importância destas alterações, poucos estudos têm sido realizados, no intuito de uma melhor compreensão das reacções de glicosilação fosfolipídica e as suas repercussões. Além disso, são raros os estudos desenvolvidos no sentido de identificação dos produtos que advêm destas reacções.

Assim, numa primeira fase iremos otimizar a reacção de síntese da fosfatidiletanolamina com a glicose, de modo a obter uma PE glicosilada. Para monitorizar se houve ou não formação de composto, iremos utilizar a espectrometria de massa com ionização por ESI e o TLC.

Com este trabalho, pretende-se desenvolver um modelo que nos permita conhecer melhor os mecanismos envolvidos na glicosilação de fosfolípidos e na sua oxidação por radicais hidroxilo. Assim, iremos estudar a influência da glicosilação de fosfolípidos na percentagem de fosfolípidos oxidados, ou seja, verificar se de facto existe uma maior susceptibilidade oxidativa pelos fosfolípidos glicosilados. Para isso, pretende-se identificar os produtos glicosilados de fosfolípidos aminados e os produtos da oxidação que eventualmente se possam formar, fazendo a sua caracterização por MS/MS e LC-MS/MS.

**Capitulo 2**  
**Estudo de fosfatidiletanolaminas por**  
**espectrometria de massa**

## 2 Estudo de fosfatidiletanolaminas por espectrometria de massa

Neste capítulo será abordada a forma como a espectrometria de massa tem sido utilizada na análise e caracterização de fosfolípidos, em particular utilizando o método de ionização por *electrospray*.

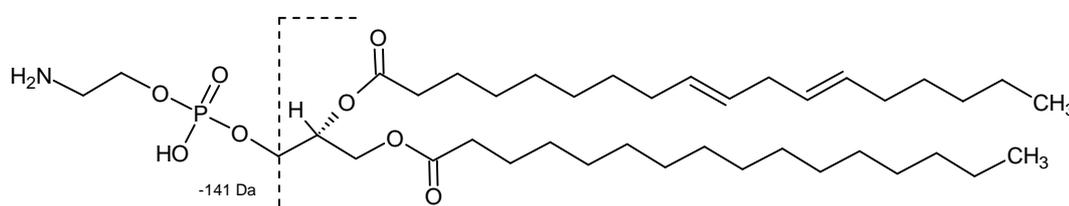
### 2.1 Introdução

Os fosfolípidos têm sido estudados por ESI-MS e ESI-MS/MS (Pulfer and Murphy, 2003), tendo sido identificados iões fragmento característicos que permitem a identificação de cada classe de fosfolípidos. Esta metodologia na análise de fosfolípidos e lípidos em geral, tem vindo a alcançar cada vez mais importância e adquiriu a denominação de lipidómica (Wenk, 2005; Bayir *et al.*, 2007; Wolf and Quinn, 2008 (a); Wolf and Quinn, 2008 (b)).

São diversos os estudos que demonstram que os fosfolípidos têm uma forma característica de fragmentar, quando sujeitos a dissociação induzida por colisão em MS/MS (Han and Gross, 1995; Hsu and Turk, 2000; Pulfer and Murphy, 2003). As PE ionizam em circunstâncias de ESI, e geram tanto iões positivos, nomeadamente  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+Li]^+$ ,  $[M-H+2Li]^+$  e iões negativos  $[M-H]^-$ . Os fragmentos de todos os iões são típicos, dependendo do ião precursor seleccionado para MS/MS. A fragmentação mais abundante e típica do ião  $[M+H]^+$  das PE, observada nos espectros de MS/MS, corresponde ao ião  $[M+H-141]^+$  que corresponde à perda da cabeça polar da fosfatidiletanolamina (Kerwin *et al.*, 1994) (Esquema 2). Esta fragmentação típica foi usada em estudos de lipidómica na identificação dos fosfolípidos que pertencem a esta família. Outros fragmentos têm geralmente uma abundância relativa muito baixa, não permitindo obter mais informação estrutural.

No estudo da fragmentação do ião  $[M+Li]^+$  a perda neutra de 141 Da é considerada também como uma fragmentação típica, assim como a perda de aziridina (- 43 Da, -  $CH_2CH_2NH$ ), pela perda de 147 Da (cabeça polar litiada). A fragmentação gera também iões fragmentos resultantes da perda dos ácidos gordos, como o ião  $[R_nCOOH+Li]^+$  e  $[M+Li-R_nCOOH]^+$  ou o ceteno  $[M+Li-R'_nC=C=O]^+$ . Os iões gerados da perda do ácido

gordo ligado ao *sn1* são mais abundantes do que os iões que surgem da perda do ácido gordo em *sn2*, permitindo a identificação das posições do ácido gordo na estrutura do glicerol. A fragmentação do ião  $[M-H]^-$  das PEs gera o anião carboxilato em *sn-1*  $R_1COO^-$  com abundância mais elevada do que o anião do carboxilato em *sn-2*  $R_2COO^-$ . São observados também iões que correspondem a uma perda neutra da cadeia carbonada ligada ao *sn-1* e ao *sn-2* como dos ácidos gordos na forma de ácido carboxílico e/ou de cetenos (Hsu and Turk, 2000).



**Esquema 2.** Fragmentação característica das fosfatidiletanolaminas, por ESI-MS/MS.

A análise de moléculas por ESI-MS/MS dos aductos de sódio  $[M+Na]^+$  à semelhança dos iões de lítio  $[M+Li]^+$ , fornecem mais informação estrutural em comparação com os aductos de protão  $[M+H]^+$ . A formação de aductos de sódio  $[M+Na]^+$  da PE pode ser conseguida por adição de sais de sódio ao sistema de solventes do ESI. No entanto existia apenas um estudo sobre fragmentação de PE sodiadas (Han and Gross, 1995). Com o objectivo de aprofundar esta informação, neste trabalho analisamos em detalhe os aductos de sódio das PE (Simoes *et al.*, 2008). As etanolaminas estudadas foram a 2-Oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), com um ácido oleico e um ácido palmítico na sua constituição, e a 2-Linoleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PLPE), com um ácido linoleico e um ácido palmítico. A massa molecular da POPE é 717g/mol e a da PLPE é 715g/mol.

Foi utilizado o instrumento Q-TOF 2 e todas as aquisições de espectros foram realizadas no modo positivo, utilizando o método de aquisição *electrospray*.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Reagentes

2-Oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) da Sigma e 2-Linoleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PLPE) da Sigma, foram usados sem purificação. Foi ainda utilizado o solvente metanol, clorofórmio para HPLC e carbonato de sódio.

Após reconstituição com clorofórmio da POPE e PLPE, as amostras foram submetidas a uma diluição com metanol e analisadas por espectrometria de massa.

### 2.2.2 Instrumentação

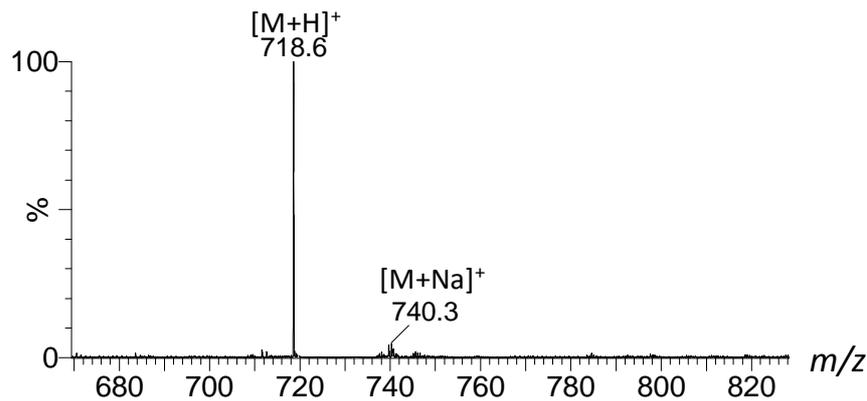
A aquisição de espectros de ESI-MS e MS/MS no instrumento Q-ToF 2 (*Waters, Manchester, UK*) foi realizada utilizando um fluxo de entrada de 10  $\mu$ l/min, a voltagem aplicada na agulha de 3kV com uma voltagem no cone de 30V. A temperatura na fonte de 80°C e a de solvatação 150°C. Os espectros *tandem* foram realizados nos iões de interesse usando árgon como gás de colisão. No tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software MassLynx* (versão 4.0).

O espectrómetro de massa trapa de iões linear LXQ (*ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA*) foi utilizado em modo positivo, com as seguintes condições de *electrospray*: voltagem do *electrospray* de 5.5 kV; temperatura do capilar de 350°C, o fluxo do gás de 25 psi. Foram realizados espectros de MS<sup>2</sup> e MS<sup>3</sup> nos iões de interesse. Para o tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software Xcalibur* (V2.0).

### 2.3 Análise e caracterização de etanolaminas por espectrometria de massa

#### 2.3.1 ESI-MS da POPE e PLPE

Os espectros de massa obtidos por ESI-MS da PLPE e POPE revelam a presença de dois íões de maior abundância relativa correspondente ao fosfolípido protonado  $[M+H]^+$  e ao seu aducto de sódio  $[M+Na]^+$  (Figura 2). Assim, o espectro de ESI-MS/MS da POPE mostra a presença de dois íões  $[M+H]^+$  de  $m/z$  718 e  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  740 (Figura 2). Para a PLPE obtemos igualmente dois íões com picos de maior abundância relativa,  $m/z$  716 e  $m/z$  738, correspondendo aos íões  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ , respectivamente.

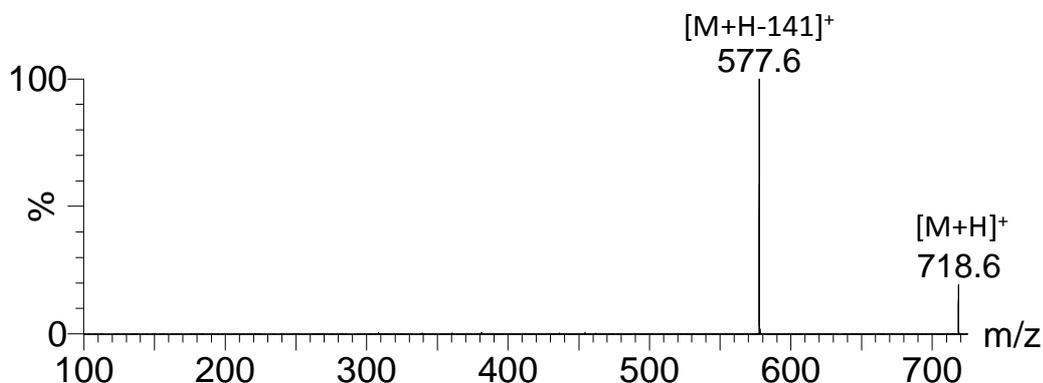


**Figura 2.** Espectro de ESI-MS da POPE.

Foram obtidos os espectros de ESI-MS/MS dos seus aductos de próton e sódio, em dois espectrómetros de massa, com fonte de ionização ESI, mas com analisadores diferentes: um com analisador Q-ToF e outro com Trapa linear. Os espectros obtidos foram estudados em detalhe.

### 2.3.2 ESI-MS/MS da PLPE e POPE

Após aquisição dos espectros de MS dos iões protonados e sodiados, foram realizados espectros de MS/MS desses mesmos iões. Os espectros de MS/MS dos iões  $[\text{POPE}+\text{H}]^+$  e  $[\text{PLPE}+\text{H}]^+$  revelam ambos o ião produto formado pela perda de 141 Da (Figura 3), correspondente à perda da cabeça polar do fosfolípido. Estes resultados estão de acordo com os dados existentes em estudos já publicados anteriormente sobre a fragmentação de fosfatidiletanolaminas (Kerwin *et al.*, 1994; Pulfer and Murphy, 2003). Os espectros de fragmentação de iões protonados geralmente fornecem pouca informação estrutural, indicando-nos apenas a forma mais frequente de quebra destas moléculas. No caso das PE, comprovámos que a fragmentação mais frequente é a perda da cabeça polar pela perda neutra de 141 Da e que não foram observados outros iões com abundância relativa significativa (Figura 3).

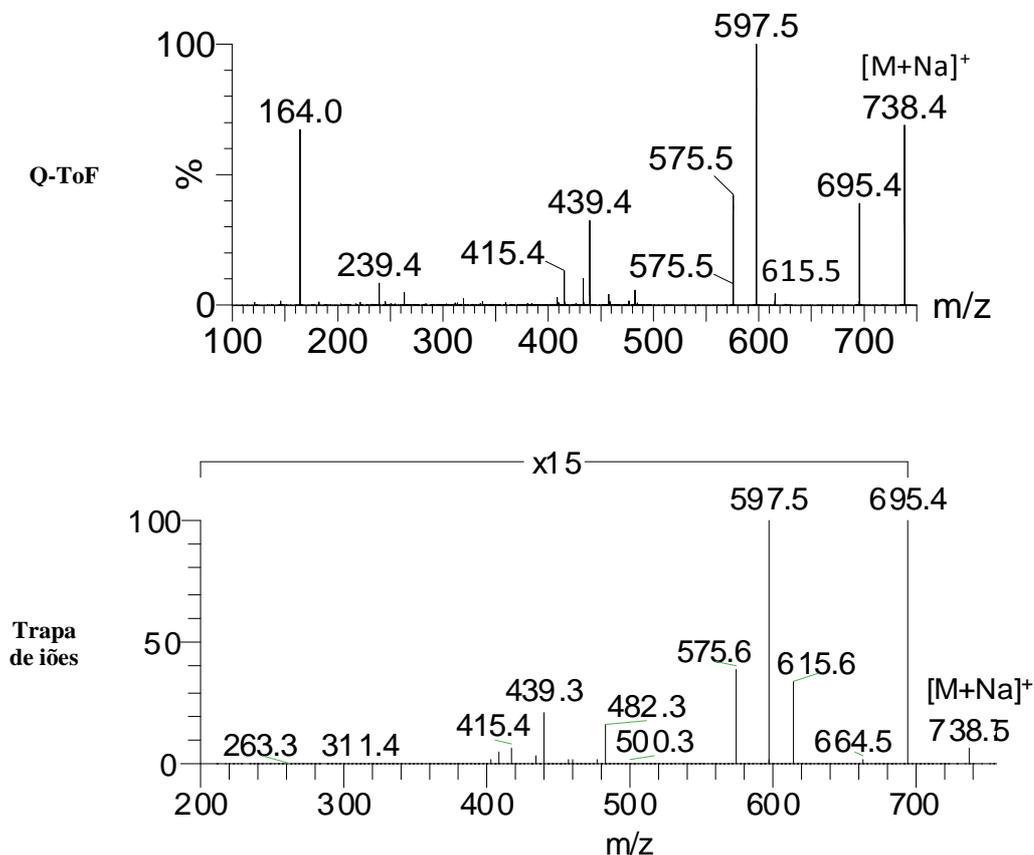


**Figura 3.** Espectro de ESI-MS/MS do ião  $[\text{POPE}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  718.6.

Após adição de sais de sódio ao solvente conseguiu-se obter um espectro de ESI-MS em que se observam apenas os iões  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de cada fosfolípido. De seguida adquiriram-se os respectivos espectros de ESI-MS/MS em dois espectrómetros de massa diferentes, o Q-ToF e a Trapa linear. Curiosamente verificamos que estes espectros

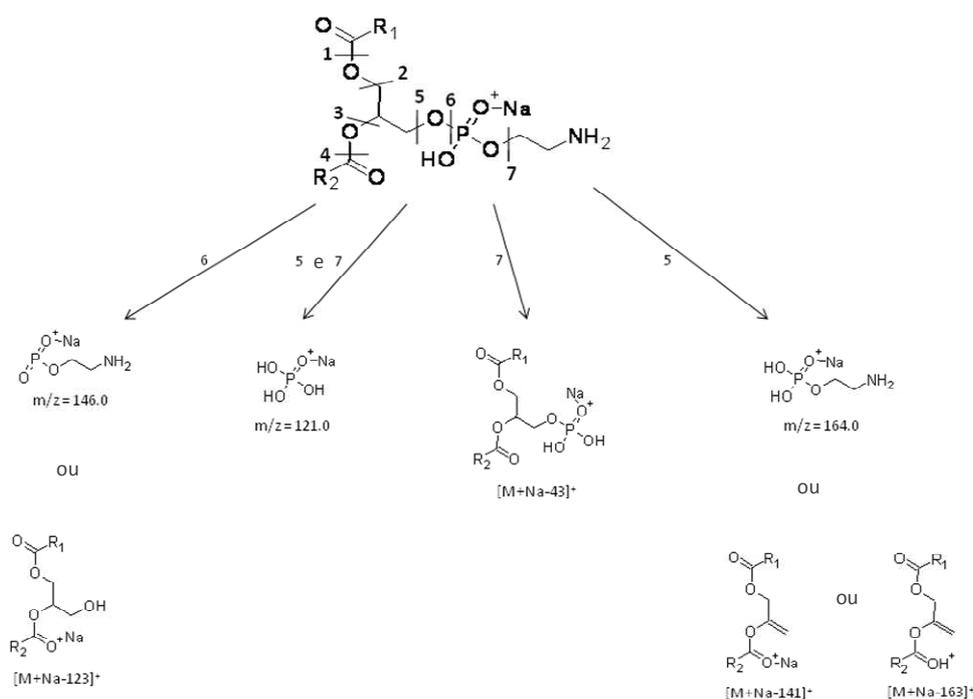
apresentavam número elevado de iões produto, pelo que se procedeu à sua análise no sentido de identificar iões que fornecessem informação estrutural detalhada.

Neste trabalho apresentamos a fragmentação do ião  $[\text{PLPE}+\text{Na}]^+$  em detalhe (Simoes *et al.*, 2008), mas as mesmas vias de fragmentação foram observadas para o ião  $[\text{POPE}+\text{Na}]^+$ . No estudo da fragmentação da PLPE sodiada, verificamos a existência de um ião fragmento  $m/z$  597.5, correspondente à  $[\text{PLPE}-141+\text{Na}]^+$  (Figura 4). Este ião surge após a saída da cabeça polar do fosfolípido. A perda da cabeça polar das PEs, quando sujeitas a condições de ESI-MS/MS, é uma característica desta classe de fosfolípidos e já tínhamos visto a sua ocorrência anteriormente para PE protonadas.



**Figura 4.** Espectros de ESI-MS/MS do ião  $[\text{PLPE}+\text{Na}]^+$  de  $m/z$  738.5.

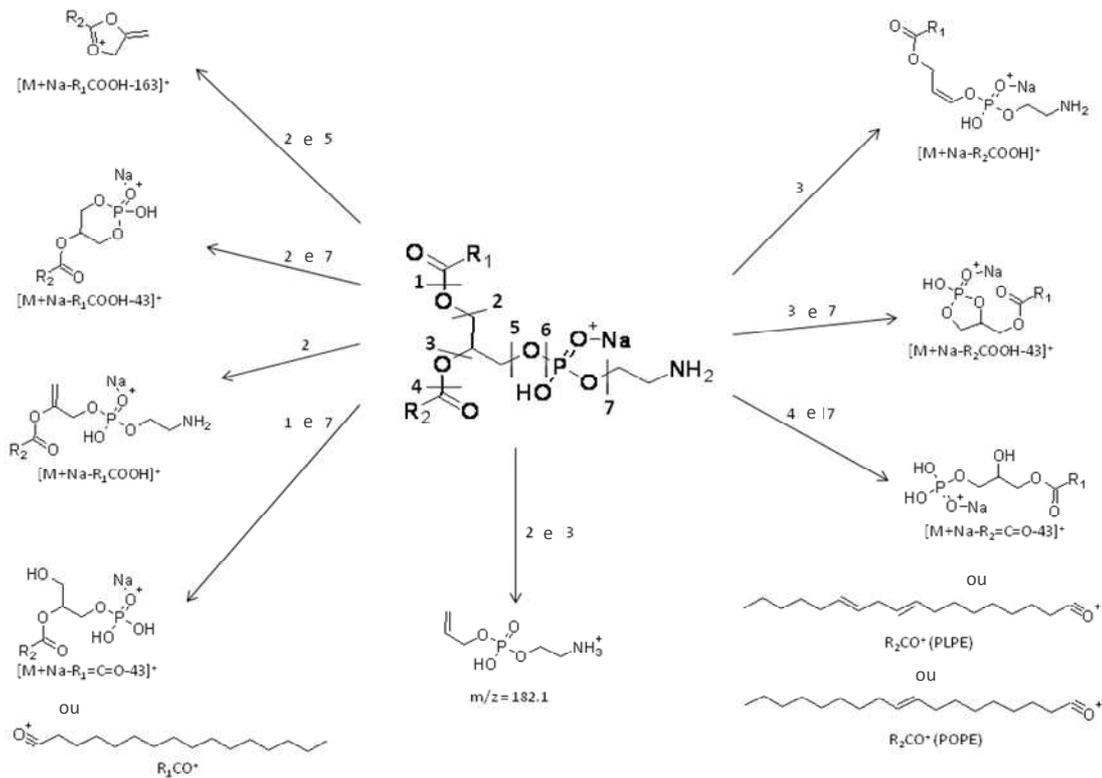
Na fragmentação da PLPE sodiada, os iões obtidos são provenientes ainda da perda da cabeça polar com um átomo de sódio ligado ao fosfatidil (-163 Da), dando origem ao ião  $m/z$  575.5. Verifica-se também a perda de parte da cabeça polar  $\text{PO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  (-123 Da) e a perda da aziridina (-43 Da), dando origem ao iões  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  615.5 e 695.4, respectivamente. Os espectros de ESI-MS/MS obtidos revelam ainda a presença dos iões  $m/z$  164.0 (cabeça polar sodiada), 146.0 e 121.0 (com pouca abundância relativa e não visíveis no espectro), que vão ao encontro dos resultados expostos por Han e Gross, para aductos de sódio (Han and Gross, 1995) e igualmente de acordo com resultados para aductos de lítio obtidos por Hsu and Turk (Hsu and Turk, 2000). O Esquema 3 representa a estrutura dos iões fragmento formados a partir desta via comum de fragmentação.



**Esquema 3.** Produtos comuns formados a partir da fragmentação da cabeça polar da PLPE e POPE  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Estes iões fornecem apenas informação relativa ao tipo de fosfolípido presente. No entanto foi possível identificar ainda iões produtos formados por perda dos ácidos gordos,

quer na forma de ceteno ( $R=C=O$ ) ou como ácido gordo livre ( $RCOOH$ ), combinado com a perda de 43 Da (Esquema 4). Observam-se também os iões  $R_1CO^+$  e  $R_2CO^+$ . Estas vias de fragmentação estão de acordo com a fragmentação obtida para aductos de lítio  $[M+Li]^+$  estudadas por Hsu and Turk (Hsu and Turk, 2000) e dão-nos informação sobre a estrutura dos ácidos gordos ligados ao fosfolípido.



**Esquema 4.** Produtos comuns formados a partir da fragmentação das cadeias de ácidos gordos *sn-1* e *sn-2* da PLPE e POPE  $[M+Na]^+$ .

Verificou-se ainda o ião formado pela perda de  $R_1COOH$  e da aziridina ( $m/z$  439.2 para a PLPE ou 441.2 para a POPE) mostram uma abundância relativa mais elevada, quando comparado com o ião formado pela perda de  $R_2COOH$  e aziridina ( $m/z$  415.2). Além disso, o ião formado pela perda de  $R_1COOH$  de  $m/z$  482.3 para a PLPE e 484.3 para a POPE, tem maior abundância relativa do que o produto formado pela perda de  $R_2COOH$   $m/z$  458.3. Esta diferença na abundância relativa foi observada no dois espectros de ESI-

MS/MS (Figura 4), obtidos em dois instrumentos com analisadores diferentes. Estes dois pares de iões, permitem-nos identificar os dois ácidos gordos das PEs e determinar a sua localização específica no glicerol. Estes iões fragmento podem ser usados na diferenciação de isómeros de PEs na análise de aductos de sódio, por ESI-MS/MS, independentemente do instrumento usado.

Devido às limitações instrumentais da trapa de iões linear, não foi possível adquirir espectros de massa M2, num alcance abaixo de  $m/z$  200 Da. Por isso, com excepção dos iões  $m/z$  164.0, 146.0 e 121.0, os espectros de MS/MS da trapa linear de iões, mostram os mesmos iões fragmento, identificados no Q-TOF2 (Figura 4). Neste espectro podemos observar o ião formado a partir da perda da cabeça, permitindo a identificação das fosfatidiletanolaminas como classe fosfolipídica. Além disso, ambos os espectros diferem no ião mais abundante.

Com estes resultados podemos propor que os iões  $[M+Na-R_1COOH-43]^+ > [M+Na-R_2COOH-43]^+$  gerados por ESI-MS/MS, podem ser usados como iões diagnóstico na identificação das posições dos resíduos de ácidos gordos ligados a *sn-1* e *sn-2* das PEs.

## 2.4 Conclusões

Neste capítulo, através da análise de fosfatidiletanolaminas por espectrometria de massa em modo positivo utilizando o método de ionização por *electrospray*, verificámos que se formam iões  $[PE+H]^+$  e  $[PE+Na]^+$ , com formação preferencial para protonados. Estes iões foram sujeitos a ESI-MS/MS, em que foi possível comprovar tanto em PE protonadas como sodiadas, a formação de iões devido à perda da cabeça polar do fosfolípido pela perda neutra de 141 Da. A perda da cabeça polar do fosfolípido é uma característica desta classe de fosfolípidos. Os espectros de ESI-MS/MS dos aductos de sódio, fornecem mais informações comparativamente aos espectros obtidos dos aductos de protão, em que além da perda da cabeça polar do fosfolípido, obtemos outras perdas, nomeadamente a cadeia carbonada em *sn-1* ou *sn-2*. Através das diferenças encontradas nas abundâncias relativas dos iões formados a partir das perdas dos ácidos gordos  $R_1$  e  $R_2$ , conseguimos identificar a localização das cadeias de ácidos gordos na molécula de glicerol.

**Capitulo 3**  
**Síntese e caracterização de fosfatidiletanolaminas**  
**glicosiladas**

## 3 Síntese e caracterização de fosfatidiletanolaminas glicosiladas

### 3.1 Introdução

Neste capítulo irá ser abordado o procedimento de síntese e caracterização dos produtos glicosilados formados entre glicose e fosfatidiletanolaminas (PE). A síntese de fosfatidiletanolaminas, tem sido realizada por vários investigadores (Ravandi *et al.*, 1995; Oak *et al.*, 2000; Breitling-Utzmann *et al.*, 2001) em estudos que contribuem para uma melhor compreensão destas moléculas modificadas. O nosso estudo incidiu em dois tipos de PE, a 2-Oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), com um ácido oleico e um ácido palmítico na sua constituição, e a 2-Linoleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PLPE), com um ácido linoleico e um ácido palmítico. Assim, estes aminofosfolípidos foram colocados na presença de glicose, sob diferentes condições experimentais variando a temperatura, concentração de glicose e tipo de solvente. A formação de aducto foi monitorizada por ESI-MS e por TLC e estes derivados glicosilados foram posteriormente isolados por HPLC. A caracterização destas etanolaminas glicosiladas foi realizada por espectrometria de massa *tandem*.

### 3.2 Material e Métodos

#### 3.2.1 Reagentes

2-Oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) da Sigma, 2-Linoleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PLPE) da Sigma, D-Glucose da Sigma, hidroxitolueno butilado (BHT) da Sigma e bicarbonato de amónio, foram usados sem purificação. Foram ainda utilizados os solventes metanol para HPLC, ácido fórmico para HPLC, água ultra pura (miliQ), amónia, clorofórmio e acetonitrilo.

#### 3.2.2 Síntese de PE glicosilados

Depois de otimizado o processo de síntese conforme descrito neste capítulo, os derivados de PE-Glucose, foram obtidos por adição de 125 µg de PLPE ou POPE, 5.6 mg

de D-Glucose e 20µl de BHT a 175 µl de Tampão bicarbonato de amónia e 175 µl de metanol. Esta mistura foi levada a um banho de água fervente, durante 30 minutos. As PE glicosiladas foram extraídas utilizando o método de Folch (Folch *et al.*, 1957) que consiste em adicionar á mistura 350 µl de uma solução de clorofórmio/metanol 2:1, centrifugar e recolher a fracção inferior.

### 3.2.3 Cromatografia

#### 3.2.3.1 TLC

A mistura da PLPE glicosilada depois de extraída foi aplicada na placa de sílica com a ajuda de um microcapilar, e colocada na câmara de eluição com o eluente composto por clorofórmio/metanol/30% de amónia (65:35:7 por volume). Como revelador cromatográfico foi utilizada uma câmara de vapores de iodo.

#### 3.2.3.2 HPLC

A mistura da PLPE glicosilada depois de extraída foi diluída (1:20, v/v) em 75 % de metanol e 25% de água (v/v). 10 µl desta amostra foi separada no sistema de HPLC (Waters Alliance 2690) com uma coluna Supelco Bio Wide Pore C4 (15cm x 0.5mm x 5 µm), utilizando como fase móvel água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrilo com a mesma percentagem de ácido fórmico (0,1%, v/v) (eluente B). O programa utilizado tem início com 55% do eluente B durante 5 minutos, com um aumento gradual durante 15 minutos até 70% de B. É atingido 100% de B aos 30 minutos, depois desce gradualmente para os 55% de B em 10 minutos, permanecendo assim durante 5 minutos.

#### 3.2.4 Espectrometria de massa por ionização por *electrospray*

A aquisição de espectros de ESI-MS e MS/MS no instrumento Q-ToF 2 (Waters, Manchester, UK) foi realizada utilizando um fluxo de entrada de 10µl/min, a voltagem aplicada na agulha de 3kV com uma voltagem no cone de 30V. A temperatura na fonte foi de 80°C e a de solvatação de 150°C. Os espectros *tandem* foram realizados nos iões de interesse usando árgon como gás de colisão. No tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software MassLynx* (versão 4.0).

### 3.3 Síntese de fosfatidiletanolaminas glicosiladas

Neste trabalho, testámos a síntese de PE glicosiladas, utilizando duas fosfatidiletanolaminas separadamente: a POPE e PLPE. As PE foram incubadas com a glicose usando diversas variáveis como o tempo e método de incubação, temperatura, solvente e concentração de glicose. Visto que um dos nossos objectivos iniciais é otimizar a reacção de glicosilação destes fosfolípidos, começámos por utilizar tempos de incubação longos (8 dias), concentrações de fosfolípido e glicose baixas e temperaturas de incubação fisiológicas (37°C), em tampão bicarbonato de amónio e numa mistura constituída por tampão bicarbonado de amónio/metanol 70:30 (v/v). Em todos os ensaios foi adicionado BHT (para evitar formação de produtos oxidados indesejáveis). Com o decorrer da optimização de síntese, fomos diminuindo os tempos de incubação, aumentando as concentrações dos reagentes e a temperatura. O resumo das variações dos ensaios realizados pode ser consultado na Tabela 1.

Os aductos foram extraídos da mistura reaccional usando o método de extracção de Folch (Folch *et al.*, 1957). Este método consiste em adicionar à mistura uma solução de clorofórmio/metanol 2:1 e levar à centrifugação. Através da centrifugação conseguimos obter a separação da mistura em duas fases distintas. O sobrenadante é desperdiçado, de modo a obtermos apenas a fracção contendo os compostos lipídicos, que se encontram na fase inferior. Este método permite isolar os compostos lípidicos, nomeadamente os fosfolípidos. Assim, após extracção a mistura foi analisada por ESI-MS de modo a monitorizar a formação de PE-Glicose.

Nesta fase do trabalho, em que se pretende estudar a forma mais eficaz de obtenção do produto PE-Glucose, foram testadas diversas variáveis, que podem ser consultadas na Tabela 1. Nos primeiros ensaios em que foram usados tempos de incubação longos, concentrações de fosfolípido e glicose baixas, temperaturas de incubação fisiológicas, em tampão sem metanol, apenas conseguimos obter dois picos significativos de iões em ESI-MS ( $m/z$  718 e  $m/z$  740), correspondendo à POPE protonada e ao seu aducto de sódio, respectivamente, o que nos indica que não houve síntese de quantidade significativa de PE-Glucose.

Tabela 1. Variações aplicadas nos ensaios da síntese de PE-Glucose.

Ensaio Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
POPE	125 µg	125 µg	125 µg	125 µg	125 µg	125 µg	-	-	125 µg	125 µg	-	-	-	125 µg
PLPE	-	-	-	-	-	-	125 µg	125 µg	-	-	125 µg	125 µg	125 µg	-
D-Glucose	1.4 mg	1.4 mg	1.4 mg	1.4 mg	2.8 mg	5.6 mg	5.6 mg	5.6 mg	5.6 mg	5.6 mg	5.6 mg	5.6 mg	5.6 mg	5.6 mg
BHT	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Tampão Bicarbonato de amônio	500 µl	350 µl	500 µl	350 µl	-	250 µl	250 µl	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl
Metanol	-	150 µl	-	150 µl	-	-	-	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl	175 µl
Metanol/Ácido fórmico1%	-	-	-	-	175 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Água MilliQ	-	-	-	-	75 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estufa	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	-	-	-	-	-
Banho U.S.	-	-	60 minutos	60 minutos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Banho	-	-	-	-	-	-	-	60 minutos em banho fervente +120 minutos a 70°C	60 minutos em banho fervente +120 minutos a 70°C	60 minutos a 80°C	60 minutos a 80°C	30 minutos a 70°C	30 minutos em banho fervente	30 minutos a banho fervente
Tempo incubação	8 dias	8 dias	1 dias	1 dias	2 dias	6 dias	7 dias	2 dias	2 dias	1 hora	1 hora	-	-	-

Nos seguintes ensaios, em que foi utilizado um solvente com 70% de metanol, obtivemos dois novos iões ( $m/z$  880.6 e  $m/z$  902.6) em ESI-MS. O valor de  $m/z$  880.6 é correspondente à POPE-Glucose e o ião  $m/z$  902.6 corresponde ao seu aducto de sódio  $[\text{POPE-Glucose+Na}]^+$ , visto que a molécula de glucose tem massa molecular de 180 g/mol e quando se liga ao fosfolípido, perde uma molécula de água (-18 Da). Assim,  $717.6$  (POPE) +  $180.0$  (Glucose) -  $18.0$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) =  $879.6$ . Se formar um aducto de prótão (+H), o valor  $m/z$  aumenta um valor ( $879.6 + 1 = 880.6$ ) e se formar um aducto de sódio (+Na) o valor  $m/z$  aumenta 23 ( $879.6 + 23.0 = 902.6$ ). Os mesmos cálculos podem ser realizados para a PLPE que tem de massa molecular 715 g/mol. Os iões obtidos nos espectros de ESI-MS para na síntese de POPE-Glucose e PLPE-Glucose, podem ser visualizados na Tabela 2. Estes resultados indicam-nos que houve formação de aducto, ou seja, POPE ligada à glucose. Apesar de estes resultados estarem muito próximos do esperado, o rendimento da reacção ficou abaixo das nossas expectativas. O rendimento foi estimado por comparação das abundâncias relativas do ião  $[\text{PE+H}]^+$  e do ião  $[\text{PE-Glucose+H}]^+$ . A abundância relativa obtida para o ião  $[\text{PE-Glucose+H}]^+$  foi de 5%.

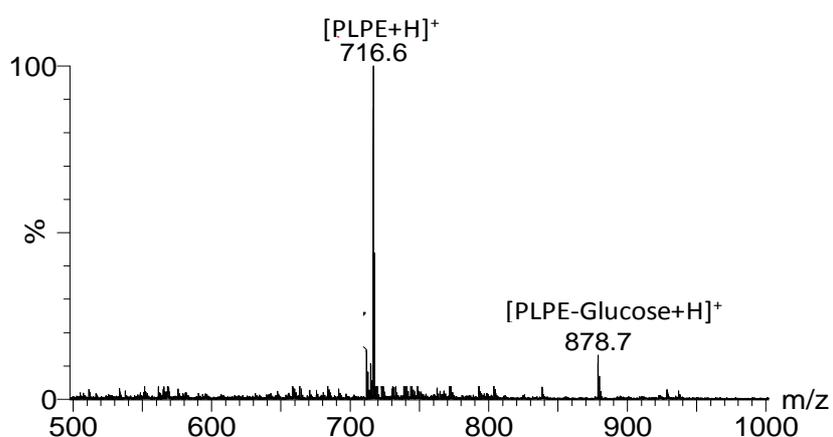
**Tabela 2.** Iões visualizados nos espectros de ESI-MS da mistura de síntese de PE-Glucose.

	$m/z$ $[\text{M+H}]^+$	$m/z$ $[\text{M+Na}]^+$
POPE	718.6	740.6
POPE-Glucose	880.6	902.6
PLPE	716.6	738.6
PLPE-Glucose	878.6	900.6

Nos ensaios seguintes verificámos que obtínhamos melhores resultados na presença de um solvente com 70% de metanol e com o aumento da temperatura. O melhor rendimento de obtenção de aducto foi conseguido com o aumento de concentrações de glucose e fosfolípido e simultaneamente com o aumento de temperatura (meia hora em banho de água fervente), correspondentes aos ensaios nº 13 e 14. Estes resultados podem ser visualizados relativamente à PLPE ( $m/z$  716.6) na Figura 5. A abundância relativa

obtida para o ião  $[\text{PE-Glucose}+\text{H}]^+$  foi de 20%. Assim, podemos observar a presença não só do fosfolípido, mas também do seu produto de glicosilação ( $m/z$  878.6), correspondendo ao fosfolípido ligado à glicose, na sua forma protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Foram realizados novos testes para avaliar se o aumento do tempo de incubação no banho e temperatura levava à degradação do fosfolípido e tal foi comprovado. Nos espectros obtidos dessas soluções, não visualizámos como habitualmente os iões correspondentes aos fosfolípidos ( $m/z$  718.6, para  $[\text{POPE}+\text{H}]^+$  e  $m/z$  716.6 para  $[\text{PLPE}+\text{H}]^+$ ).



**Figura 5.** Espectro de ESI-MS da monitorização da reacção de síntese PLPE-Glucose.

Os resultados de ESI-MS confirmaram que conseguimos com sucesso, sintetizar aminofosfolípidos glicosilados. Ao usar diferentes variáveis podemos estudar o comportamento da reacção, sob diferentes condições e retirar diversas elações. Os resultados demonstram que a reacção não tem melhor rendimento quando é aplicado um tempo de incubação maior. Concentrações mais elevadas de fosfolípido e glicose parecem ter mais influência no rendimento da reacção, havendo maior produção de aducto. O mesmo se aplica à temperatura, visto que os melhores resultados foram conseguidos após a incubação em banho fervente, mas em curto intervalo de tempo. Por outro lado, tempos elevados de incubação, conjugados com temperaturas elevadas, levam ao consumo de todo o fosfolípido, por degradação. Neste caso não conseguimos identificar a presença de fosfolípido nem de aducto. O tipo de solvente, revelou-se ser um factor importante, porque na ausência de metanol não obtivemos formação de aducto.

Nas próximas sínteses de PE-Glucose, iremos utilizar como base os ensaios números 13 e 14 (Tabela1), visto que foi nestas condições que conseguimos o melhor rendimento de aducto. Entre estes dois ensaios, verificamos que o apresenta melhores resultados é aquele em que é usada a PLPE e por esse motivo as sínteses futuras serão de PLPE-Glucose.

Sempre que foi detectada a presença de fosfatidiletanolaminas glicosiladas, foram realizados espectros de MS/MS dos seus iões correspondentes, de forma a conseguir o máximo de informação sobre a sua estrutura.

As etanolaminas glicosiladas serão isoladas por TLC e HPLC e posteriormente serão sujeitas a condições oxidativas, na presença do radical hidroxilo.

### ***3.4 Purificação e isolamento***

A cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais é estacionária, enquanto a outra se movimenta numa direcção definida. A mistura que contem os componentes a serem separados é dissolvida na fase móvel. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, alguns componentes são fortemente retidos pela fase estacionária e por isso se movem lentamente com o fluxo da fase móvel. Enquanto isso, outros componentes interagem fracamente com a fase estacionária, sendo transportados mais facilmente pela fase móvel. Devido a essas diferenças em mobilidade, os componentes da mistura podem ser separados e analisados de forma qualitativa e/ou quantitativa, pela própria técnica de cromatografia ou em conjunto com outras técnicas experimentais, tais como a espectrometria de massa.

De entre os métodos modernos de análise química, a cromatografia é um dos mais utilizados, encontrando aplicações nos mais variados ramos da pesquisa científica e tecnológica, devido á capacidade que possui de separar espécies químicas, de forma selectiva e específica.

Esta técnica tem sido amplamente aplicada na separação de fosfolípidos entre os quais as PE (Ravandi *et al.*, 1996; Ravandi *et al.*, 2000; Tyurina *et al.*, 2004; Bayir *et al.*, 2007). A cromatografia em camada fina (TLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC) são os métodos cromatográficos de eleição na detecção e isolamento destas biomoléculas.

### 3.4.1 TLC

O TLC apesar de não ser uma técnica recente, continua a ser utilizada actualmente por muitos investigadores nomeadamente na detecção e isolamento de fosfolípidos. Ravandi *et al* utilizaram esta técnica para purificar fosfatidiletanolaminas glicosiladas (Ravandi *et al.*, 1996; Ravandi *et al.*, 2000), utilizando placas de sílica gel e eluente composto por clorofórmio, metanol e amónia. As bandas lipídicas foram visualizadas sob luz ultravioleta após a pulverização com metanol e diclorofluorescente. Os lípidos foram retirados da placa após raspagem da mesma e depois foram extraídos com um solvente específico para o efeito desenvolvido por estes investigadores (Ravandi *et al.*, 2000). Moesgaard *et al* utilizaram condições semelhantes na composição do eluente usado na avaliação de lípidos extraídos do cérebro, mas as bandas lipídicas foram visualizadas após pulverização de sulfato de cobre com ácido ortofosfórico e levadas à temperatura de 200°C (Moesgaard *et al.*, 1999). Ishida *et al* (Ishida *et al.*, 2004) utilizaram igualmente o TLC na separação de lípidos oxidados utilizando clorofórmio, metanol e água como eluente e solução de extracção, que permite a análise posterior por MS ou MS/MS.

Mais recentemente, foram introduzidas algumas alterações na técnica do TLC e alguns investigadores utilizaram na análise de fosfolípidos a cromatografia de alta eficiência de duas dimensões em camada fina (HPTLC – do inglês: *two-dimensional high-performance thin-layer chromatography*). Nesta técnica cromatográfica são utilizados dois eluentes diferentes nas duas dimensões, o que permite uma separação mais eficaz das diferentes classes de fosfolípidos (Tyurina *et al.*, 2004; Bayir *et al.*, 2007). Em ambos os trabalhos o eluente utilizado na primeira direcção foi o clorofórmio, metanol e hidróxido de amónia, sendo o eluente da segunda direcção composto por clorofórmio, acetona, metanol, ácido acético glacial e água. Estes fosfolípidos foram visualizados após exposição a vapores de iodo.

No nosso trabalho, utilizamos o TLC para separar a PE da PE-Glucose. Para esse efeito foram utilizadas dois tipos de fase estacionária: cromotafolhas plásticas revestidas

com Silicagel 60 F254 da Merck e cromatoplasmas de vidro revestidas com C18. As placas que contêm sílica são polares, atraindo assim, compostos polares, ao contrário das placas de C18, que contêm sílica modificada com cadeias de 18 carbonos (C18), sendo a esta fase conhecida como reversa. Assim nas placas de C18 é esperado um comportamento contrário, visto serem menos polares.

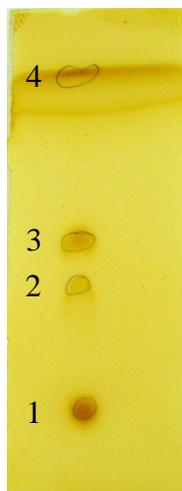
Com a formação do aducto PE-Glucose, vamos obter um composto mais polar do que a PE no seu estado nativo, devido á presença da ligação com a glicose. Assim, quando aplicada a mistura preparada, em que temos em conjunto a PE e a PE-Glucose, é previsto que estas se separem, com base na sua diferença de polaridade. Ao utilizarmos dois tipos de fase estacionária (sílica e C18) podemos verificar também os seus comportamentos de migração inversos. Assim, é esperado que na aplicação em sílica, a PE-Glucose seja menos arrastada pelo eluente do que a PE, visto que tem mais afinidade pela fase estacionária. Utilizando a C18, é esperado precisamente uma migração contrária, ficando a PE-Glucose mais próxima da frente de solvente.

Neste trabalho, o eluente foi preparado para utilização em placas de sílica de acordo com os trabalhos existentes na separação de fosfolípidos (Moesgaard *et al.*, 1999; Ravandi *et al.*, 2000; Bacot *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2004). A composição do eluente consiste em clorofórmio/metanol/30% de amónia (65:35:7 por volume). Após aplicação da mistura com a ajuda de um microcapilar, as placas foram colocadas numa câmara de eluição em contacto com o eluente. Foi realizado o mesmo procedimento para as placas com C18, mas o eluente utilizado foi acetonitrilo com 5% de metanol.

Para podermos visualizar esta separação lipídica é necessária a aplicação de um revelador cromatográfico. De entre vários tipos de reveladores destacam-se os que utilizam uma lâmpada de luz ultravioleta e os vapores de iodo, por serem os de utilização mais fácil e frequente. As placas de sílica utilizadas têm um marcador (F254) que permite a detecção de compostos por fluorescência, quando aplicada uma fonte de luz a um comprimento de onda de 254nm. No entanto não foi possível a visualização da separação dos diferentes compostos presentes na mistura utilizando este método. O facto de utilizarmos concentrações muito reduzidas, poderá está relacionado com a impossibilidade da sua visualização.

Com a utilização de vapores de iodo, haverá ligação deste às ligações duplas existentes nas cadeias carbonadas do fosfolípido, possibilitando a sua visualização a olho

nu. Deste modo as placas depois de eluídas, foram colocadas numa tina contendo vapores de iodo, em que de acordo com o tempo de exposição se pode verificar o aparecimento dos componentes da mistura separados, em pontos diferentes. A ligação do iodo é reversível, ou seja, depois de retirada a placa da tina e após evaporação do iodo ligado, obtemos a placa incolor. Através deste método conseguimos obter uma separação visível da PE e da PE-Glucose com a utilização de placas de sílica (Figura 6). Nas placas de C18 não verificamos qualquer separação.



**Figura 6.** Placa de sílica após realização de TLC e revelação com vapores de iodo: 1- ponto de aplicação da mistura; 2- PE-Glucose; 3-PE; 4- BHT.

Depois de obtido o cromatograma, as placas de TLC foram raspadas nos locais de interesse, de modo a realizar a extracção da PE e PE-Glucose e dissolvidas separadamente numa mistura de clorofórmio-metanol (2:1; por volume) de acordo com as referências (Bacot *et al.*, 2003). Depois de filtrada e centrifugada, a solução obtida para cada fracção foi analisada por ESI-MS.

Após análise de cada fracção por espectrometria de massa, verificámos que a extracção e separação foram realizadas com sucesso, embora não tenha sido conseguido as condições óptimas para a separação de grandes quantidades. Consideramos que este é um

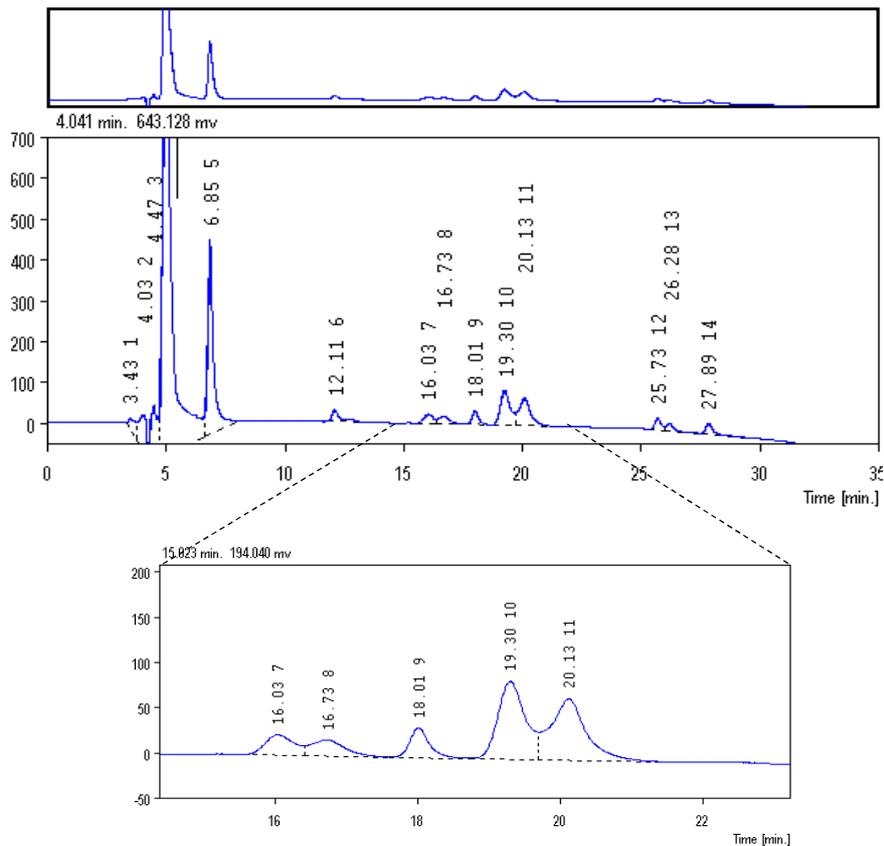
método rápido e prático na detecção de formação de aducto, que permite a monitorização de síntese da reacção de síntese de PE-Glucose.

### 3.4.2 HPLC

Neste trabalho utilizámos o HPLC para separar mais eficazmente os dois compostos presentes na mistura obtida após a síntese de PE-Glucose. Nesta mistura temos presentes a PE e a PE-Glucose.

O HPLC é a par com o TLC uma técnica usada frequentemente na separação de fosfolípidos (Ravandi *et al.*, 1996; Ravandi *et al.*, 2000; Bacot *et al.*, 2003). Esta técnica trás algumas vantagens relativamente ao TLC, visto permitir o acoplamento com outra instrumentação, tais como os espectrómetros de massa. Trata-se de uma técnica automatizada e muito mais sensível, comparativamente com o TLC. Os princípios base desta técnica são os mesmos que no TLC, ou seja, são utilizados de igual modo uma fase estacionária e uma móvel. O HPLC utiliza na fase estacionária uma coluna de tamanho variável, preenchida normalmente com sílica modificada. A separação das biomoléculas dá-se com base nas diferenças de polaridade entre fase móvel e estacionária.

As condições utilizadas no HPLC foram as mesmas usadas em trabalhos anteriores na separação de produtos de oxidação de PE (Domingues *et al.*, 2008 (a)). Como fase estacionária foi utilizada a coluna *Supelco Bio Wide Pore C4* e como fase móvel água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (eluyente A) e acetonitrilo com a mesma percentagem de ácido fórmico (0.1%, v/v) (eluyente B). O programa de eluição utilizado foi diferente do usado por Domingues *et al.* Este programa foi optimizado de modo a obter separação das fracções correspondentes para a PE e PE-Glucose. Após a colecta dos compostos eluidos nos diferentes picos de eluição, verificamos por ESI-MS que a PLPE-Glucose elui dos 16,03 aos 16,73 minutos e a PLPE elui dos 19,30 aos 20,13 minutos (Figura 7).



**Figura 7.** Cromatograma obtido por HPLC, para a separação da mistura de PLPE e PLPE-Glucose.

O HPLC revelou-se um método eficaz na separação de fosfatidiletanolaminas com ou sem glicose.

As frações recolhidas por HPLC foram concentradas e sujeitas ao processo de oxidação por radical hidroxilo, e será abordado no capítulo 4 e 5. A PE-Glucose foi ainda caracterizado por ESI-MS, e a sua fragmentação foi estudada em detalhe.

### 3.5 Caracterização de PE – Glucose por ESI-MS e ESI-MS/MS

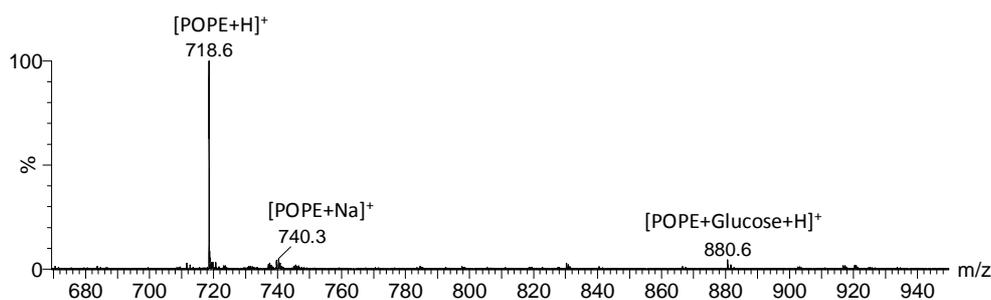
Após realização da síntese de PE-Glucose, a mistura foi analisada por espectrometria de massa, com ionização por *electrospray*, como já vimos anteriormente no

subcapítulo de síntese de fosfatidiletanolaminas. A análise por espectrometria de massa, por um lado permitiu monitorizar a reacção de síntese de PE-Glucose e por outro permite caracterizar os aductos obtidos. A realização de espectrometria de massa *tandem* nos iões de interesse, permite retirar informação estrutural destes compostos. Os espectros de massa obtidos foram analisados em detalhe.

### 3.5.1 ESI-MS de PE-Glucose

As misturas obtidas na síntese da PE-Glucose foram analisadas por ESI-MS. Os espectros obtidos dessa mistura mostra que os aductos PLPE-Glucose e POPE-Glucose ionizam preferencialmente sob a forma de  $[M+H]^+$ . Ao analisar o espectro representado na Figura 8, podemos ver que o ião  $[M+H]^+$  da POPE  $m/z$  718.6 tem maior abundância relativa do que o ião  $[M+Na]^+$  POPE  $m/z$  740.3. O mesmo se verifica para a POPE-Glucose, em que a sua forma protonada de  $m/z$  880.6 é de abundância relativa mais elevada do que na sua forma sodiada de  $m/z$  902.6. Este ião tem uma abundância muito reduzida, e por esse motivo não é visível neste espectro.

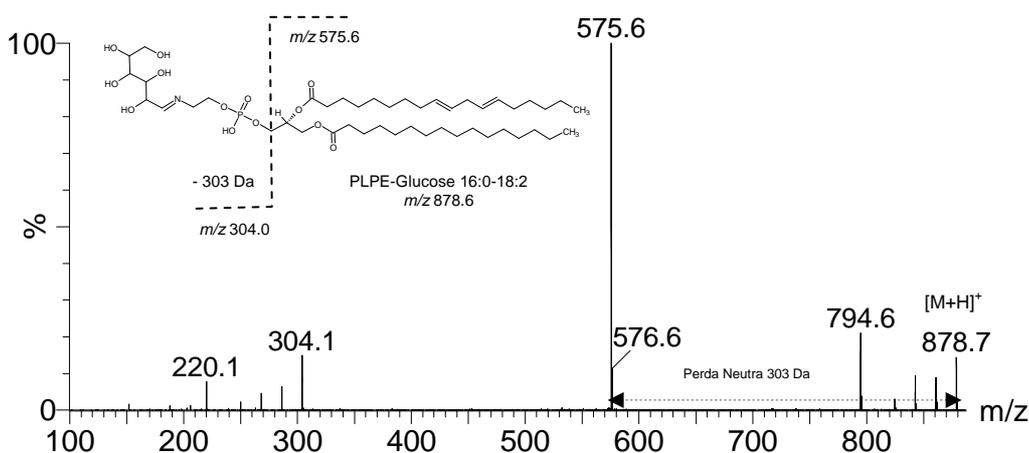
Os iões obtidos para  $[PE-Glucose+H]^+$  e  $[PE-Glucose+Na]^+$  foram analisados por ESI-MS/MS.



**Figura 8.** Espectro de ESI-MS da mistura de POPE e POPE-Glucose.

### 3.5.2 MS/MS da PLPE-Glicose

Sempre que foi detectada a presença de fosfatidiletanolaminas glicosiladas, foram realizados espectros de MS/MS dos seus iões correspondentes, quer na forma protonada  $[M+H]^+$ , quer na forma sodiada  $[M+Na]^+$ . Todos os espectros de MS/MS revelaram a formação de um ião de abundância relativa elevada, por perda de 303 Da. A perda de 303 Da, corresponde à perda da cabeça do fosfolípido glicosilada. Como foi visto anteriormente, a perda da cabeça nas PEs, quando sujeitas a MS/MS é uma das características desta classe de fosfolípidos e é detectada pela perda de 141 Da. A perda de 303 Da corresponde à cabeça do fosfolípido ligada à molécula de glicose (141+162). Na Figura 9 está representado o espectro de ESI-MS/MS da  $[PLPE-Glucose+H]^+$  de  $m/z$  878.7. Neste espectro podemos verificar a presença de um ião de maior abundância relativa de  $m/z$  575.6, que corresponde à saída da cabeça glicosilada do fosfolípido, devido à perda de 303 Da a partir do ião precursor de  $m/z$  878.7. O facto de observarmos no espectro um ião que surge de uma perda de 303 Da vem confirmar que as fosfatidiletanolaminas estão glicosiladas e que essa glicosilação ocorre na cabeça do fosfolípido. O ião correspondente à cabeça glicosilada protonada do fosfolípido, é também visível no espectro, pela presença do ião  $m/z$  304.1. É de salientar a ausência do ião resultante da perda de 141 Da, correspondente à perda da cabeça polar do fosfolípido não glicosilada.

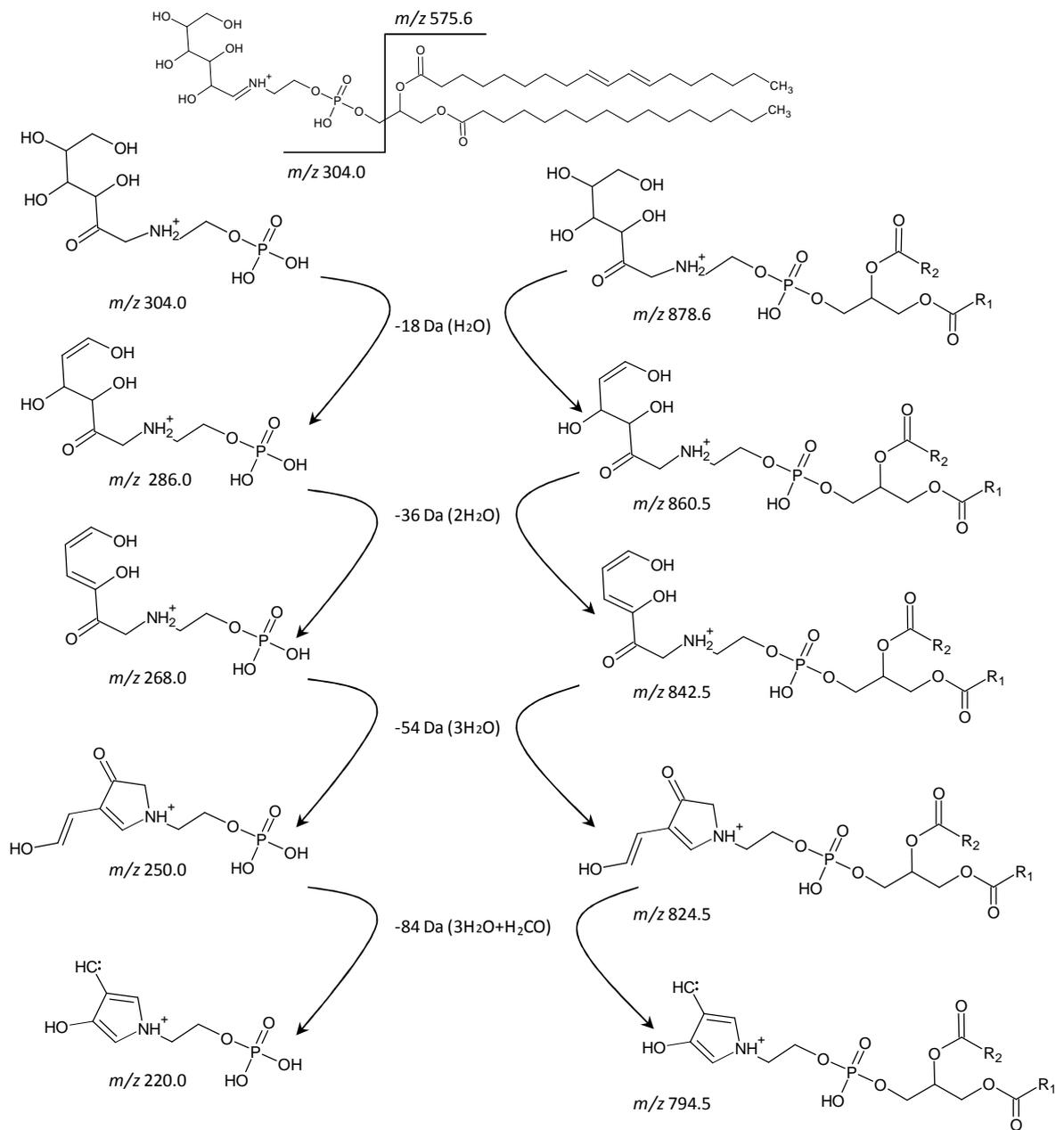


**Figura 9.** Espectro de ESI-MS/MS do ião  $[PLPE-Glucose+H]^+$  de  $m/z$  878.7.

Na fragmentação destes compostos Amadori, além da perda característica da cabeça polar do fosfolípido, verifica-se também a presença de outros íões fragmento característicos destes compostos. Apesar de serem de menor intensidade, a sua presença é constante em todos os espectros de MS/MS, dos íões  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ . Estes íões surgem da perda de 18 Da, 36 Da, 54 Da e 84 Da a partir do íão precursor  $[PE-Glucose]^+$  ou a partir do íão  $m/z$  304.0, correspondente à cabeça polar do fosfolípido glicosilada. Estas perdas já foram descritas anteriormente em estudos com aminoácidos glicosilados (Wang *et al.*, 2008) e aqui está demonstrado ocorrerem igualmente em fosfolípidos glicosilados. De acordo com o estudo realizado por Wang, sabemos que a perda de 18, 36, 54 e 84 Da, correspondem a  $-H_2O$ ,  $-2H_2O$ ,  $-3H_2O$  e  $-3H_2O+H_2CO$ . O facto de o estudo de Wang se debruçar sob as glicosilação de aminoácidos e este incidir sob fosfolípidos, e visto que as mesmas perdas se verificam, vem comprovar que estas perdas características vêm da molécula de glicose. Assim, a presença destas perdas sucessivas, provenientes da molécula de glicose, vêm confirmar mais uma vez que de facto, estamos perante fosfolípidos glicosilados. Estas mesmas perdas são vistas a partir da cabeça glicosilada íão  $m/z$  304  $[M+H]^+$ , o que comprova mais uma vez que a glicose se encontra ligada à cabeça do fosfolípido.

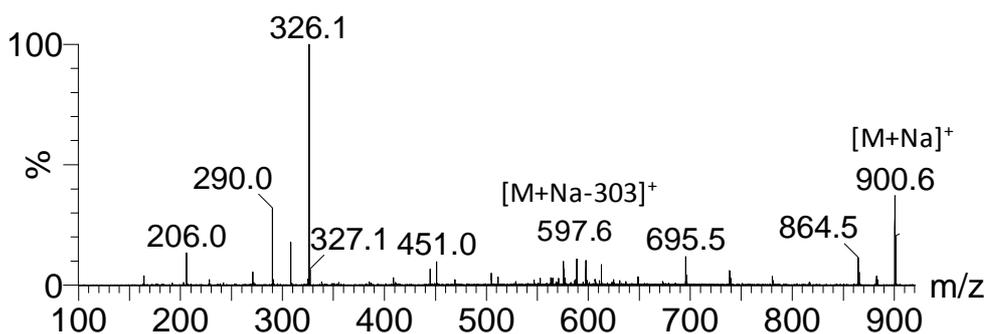
Observando o espectro de ESI-MS/MS da PLPE-Glucose (Figura 9) podemos verificar a presença do íão de  $m/z$  794.6 que corresponde à perda de 84 Da ( $-3H_2O+H_2CO$ ) a partir do íão precursor. Esta mesma perda verifica-se a partir do íão de  $m/z$  304.1 (cabeça glicosilada do fosfolípido protonada), dando origem ao íão de  $m/z$  220.1. No Esquema 5 podemos ver representadas estas perdas da molécula de glicose em mais pormenor, para a PLPE-Glucose.

Ao comparar os espectros de ESI-MS/MS obtidos para a  $[PE+H]^+$  e  $[PLPE+H]^+$ , verificamos que as principais diferenças existentes resultam da inserção da molécula de glicose no fosfolípido. Como a glicose se liga à cabeça do fosfolípido, a saída da cabeça do fosfolípido caracterizada pela perda de 141 Da passa a ser de 303 Da em fosfatidiletanolaminas glicosiladas. Outra diferença que se verifica são as perdas de água e  $H_2CO$  provenientes da molécula de glicose, que nos espectros de ESI-MS/MS da PE não modificada não se observam, visto que temos apenas o fosfolípido não glicosilado.



**Esquema 5.** Perdas frequentes observadas a partir da molécula de glicose na PLPE-Glucose.

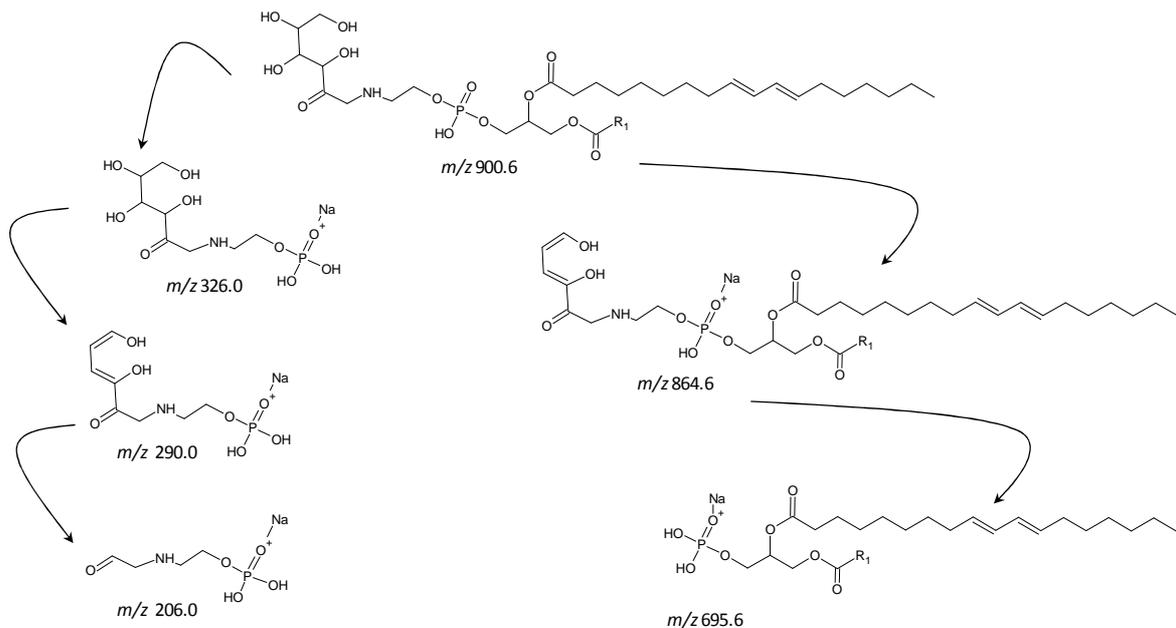
No capítulo 2 foi demonstrado que os iões aductos de sódio, fornecem mais informação estrutural, quando sujeitos a condições de ESI-MS/MS (Simoes *et al.*, 2008). Por esse motivo estudamos também em detalhe o espectro de fragmentação da PLPE-Glucose sodiada (Figura 10).



**Figura 10.** Espectro de ESI-MS/MS do ião  $[PLPE-Glucose+Na]^+$  de  $m/z$  900.6.

Ao analisar o espectro de ESI-MS/MS da PLPE-Glucose sodiada (Figura 10) verificamos que se observa a presença de alguns iões comuns ao espectro de fragmentação do ião  $[M+H]^+$  de  $m/z$  878.7. Podemos então observar a perda de 303 Da a partir do ião precursor, correspondente à perda da cabeça glicosilada do fosfolípido, neste caso dando origem ao ião de  $m/z$  597.6. Neste espectro podemos visualizar também a presença de outros iões que surgem de perdas conhecidas da molécula de glucose, pela saída de duas moléculas de água (-36 Da), representada pelo ião  $m/z$  864.5 e 290.0. Outra perda menos frequente, mas associada igualmente à molécula de água, dá origem ao ião  $m/z$  206.0 (Esquema 6). Estas perdas relacionadas com a molécula de glucose já foram observadas anteriormente nos espectros de ESI-MS/MS da PE-Glucose protonada e a sua observação neste espectro vem comprovar mais uma vez, que estamos perante uma fosfatidiletanolamina glicosilada. Neste espectro, curiosamente verificamos a presença de um ião de maior abundância relativa, de  $m/z$  326.1. Este ião contrariamente ao que é observado mais frequentemente, corresponde à cabeça glicosilada do fosfolípido sodiada.

Na análise de fosfatidiletanolaminas por ESI-MS/MS, como já podemos comprovar, os íons de maior abundância relativa que surgem nos espectros, normalmente surgem da perda da cabeça do fosfolípido.



**Esquema 6.** Produtos formados a partir da fragmentação do íon  $[\text{PLPE-Glucose}+\text{Na}]^+$  de  $m/z$  900.6.

Outras características desta fragmentação são dadas pela presença do íon  $m/z$  695.5, que surge após a perda combinada da glicose com a aziridina. A perda da aziridina (-43 Da) é uma perda frequente em PE sodiadas (Han and Gross, 1995; Simoes *et al.*, 2008). No Esquema 6, estão representadas as estruturas propostas para os íons fragmento da PLPE-Glucose sodiada.

### **3.6 Conclusão**

Neste trabalho, conseguimos sintetizar fosfatidiletanolaminas glicosiladas e esta reacção foi otimizada, de modo a obter o melhor rendimento possível. Na monitorização da síntese foi utilizado o TLC e o ESI-MS/MS. O TLC foi utilizado também na separação e isolamento da PE da PE-Glucose, embora não tenha sido conseguido as condições óptimas para a separação de grandes quantidades de aducto. Ao utilizar o HPLC essa separação foi conseguida mais eficazmente. A caracterização dos aductos obtidos, foi realizada para a POPE-Glucose e PLPE-Glucose, na sua forma protonada e sodiada. A maioria dos espectros de ESI-MS/MS mostraram como ião mais abundante, aquele que surge da perda da cabeça glicosilada do fosfolípido (-303 Da). Esta saída da cabeça glicosilada do fosfolípido, juntamente com a observação das perdas frequentes da molécula da glucose, permitem-nos confirmar que a glucose está de facto ligada ao fosfolípido e que essa ligação é na sua cabeça polar. Ao analisar o espectro da PLPE-Glucose sodiada, podemos ver ainda a presença de outros iões não presentes em espectros de PLPE-Glucose protonada. Uma das diferenças mais importante está na perda da aziridina, combinada com a perda de glucose.

Visto que obtivemos maior rendimento na síntese de PLPE-Glucose, este aducto será sujeito a condições oxidativas e os seus produtos de oxidação serão estudados em detalhe.

**Capitulo 4**  
**Oxidação de fosfatidiletanolaminas glicosiladas**

## 4 Oxidação de fosfatidiletanolaminas glicosiladas

### 4.1 Introdução

A peroxidação lipídica está associada a várias patologias, entre as quais a inflamação, aterosclerose (Oranje and Wolffenbuttel, 1999) e cancro. Já foi demonstrado que as fosfatidiletanolaminas que se encontram no plasma, são 5% a 6% dos fosfolípidos totais e estas podem sofrer glicosilação, levando ao aumento da sua susceptibilidade oxidativa e de outras moléculas, nomeadamente as LDL (Ravandi *et al.*, 2000). Estas modificações oxidativas em lípidos têm um papel central na aterogenese, contribuindo para as diversas sequelas provocadas pela diabetes e envelhecimento (Oak *et al.*, 2000). Os ácidos gordos insaturados são os constituintes celulares mais sensíveis à oxidação e estes são os principais motivos pelos quais o estudo da oxidação lipídica tem sido alvo de grande interesse. Apesar da indiscutível importância e da influência que os produtos de oxidação têm nos seres vivos, o trabalho desenvolvido nesta área ainda é muito reduzido. Têm sido realizados vários estudos em que são descritos com detalhe os produtos de oxidação de fosfatidilcolinas, utilizando a espectrometria de massa (Marathe *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Spickett and Dever, 2005; Reis *et al.*, 2007) mas as alterações oxidativas nas PE, têm sido alvo de pouca atenção (Morand *et al.*, 1988; Ramanadham *et al.*, 1993; Engelmann *et al.*, 1994; Bacot *et al.*, 2003; Maeba and Ueta, 2003; Tsuji *et al.*, 2003; Bernoud-Hubac *et al.*, 2004; Bacot *et al.*, 2007). Destes trabalhos, uns focaram-se mais no estudo dos aductos que resultam da interacção entre PE e aldeídos, resultantes da oxidação lipídica (Bacot *et al.*, 2003; Tsuji *et al.*, 2003; Bernoud-Hubac *et al.*, 2004; Bacot *et al.*, 2007), enquanto outros estudaram as potenciais propriedades antioxidantes de etanolaminas plasmalogenos (Morand *et al.*, 1988; Ramanadham *et al.*, 1993; Engelmann *et al.*, 1994; Maeba and Ueta, 2003). Actualmente existem apenas dois trabalhos com a identificação e estudo dos produtos de oxidação da PE através da utilização de LC-MS/MS (Gugiu *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2008 (a)).

Curiosamente, até à data não existe informação detalhada sobre os produtos de oxidação resultantes de fosfatidiletanolaminas glicosiladas.

No capítulo anterior, onde foi estudada a síntese e a caracterização de fosfatidiletanolaminas glicosiladas, obtivemos melhor rendimento para a PLPE-Glucose do que para a POPE-Glucose. Por esse motivo, neste trabalho utilizamos a PLPE-Glucose para oxidação por radical hidroxilo e estudo dos seus produtos de oxidação. Os produtos de oxidação da PLPE-Glucose serão caracterizados em pormenor, utilizando a espectrometria de massa e a espectrometria de massa *tandem*, com ionização por *electrospray*.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Reagentes**

Para a reacção de oxidação foi utilizada PLPE previamente glicosilada.  $\text{FeCl}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) usados na reacção de peroxidação foram adquiridos na Merck. Todos os solventes utilizados são de alto grau de pureza, indicados para HPLC.

### **4.2.2 Oxidação de PLPE-Glucose**

Após síntese de PLPE-Glucose, esta foi extraída pelo método de Folch e posteriormente concentrada através de uma corrente de nitrogénio. A mistura PLPE-Glucose foi submetida a stress oxidativo, induzido pelo radical hidroxilo, produzido pela reacção de Fenton. Esta metodologia já foi utilizada anteriormente noutros estudos de oxidação, utilizando fosfatidiletanolaminas (Domingues *et al.*, 2008 (a)) e fosfatidilcolinas (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b)). À mistura PLPE-Glucose foi adicionado 223  $\mu\text{l}$  de tampão bicarbonato de amónia, 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_2$  e 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A mistura foi incubada a 37°C e ocasionalmente agitada. A reacção foi monitorizada por ESI-MS, após extracção pelo método de Folch.

### **4.2.3 Instrumentação**

A aquisição de espectros de ESI-MS e MS/MS no instrumento Q-ToF 2 (Waters, Manchester, UK) foi realizada utilizando um fluxo de entrada de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , a voltagem

aplicada na agulha de 3kV com uma voltagem no cone de 30V. A temperatura na fonte de 80°C e a de solvatação 150°C. Os espectros *tandem* foram realizados nos iões de interesse usando árgon como gás de colisão. No tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software MassLynx* (versão 4.0).

### **4.3 Oxidação da PLPE-Glucose pelo radical hidroxilo e monitorização por ESI-MS**

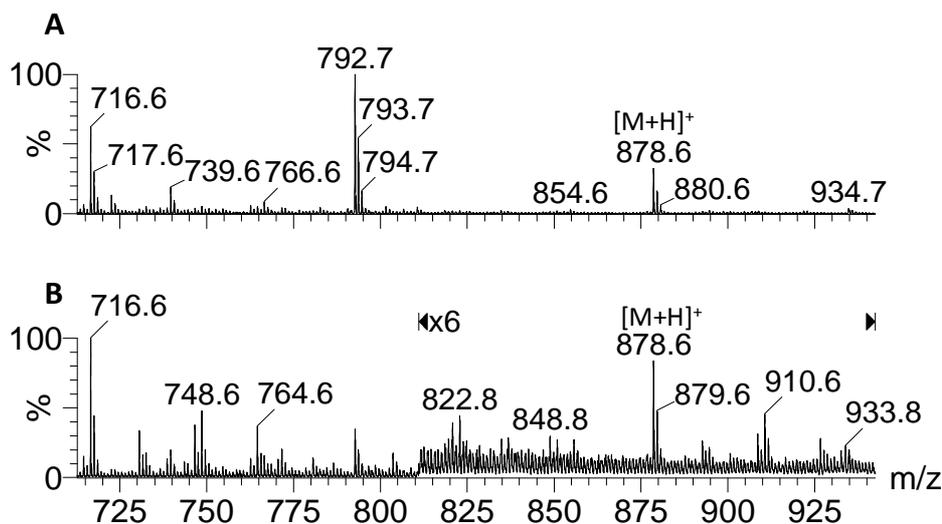
A mistura PLPE-Glucose foi sujeita a condições oxidativas pelo radical hidroxilo, formado através da reacção de Fenton. Uma mistura de PLPE-Glucose, sem introdução de agentes oxidantes serviu como controlo. A monitorização desta reacção foi realizada por espectrometria de massa, por ionização suave (*electrospray*) ao longo de três dias consecutivos.

É sabido que a PLPE contém na posição *sn-1*, ácido palmítico (cadeia de ácido gordo saturada) e na posição *sn-2* um ácido linoleico (cadeia de ácido gordo insaturada). Visto que o ácido palmítico é resistente à oxidação radicalar (Sergent *et al.*, 1999) é no ácido linoleico que se espera verificar as alterações, por ser mais susceptível à oxidação, devido à presença de ligações duplas (Marathe *et al.*, 2000; Niki *et al.*, 2005; Fruhwirth *et al.*, 2007).

Os produtos de oxidação foram identificados como iões  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ , por ESI-MS e as suas características estruturais serão confirmadas por ESI-MS/MS. Quando comparamos os espectros de ESI-MS da PLPE-Glucose controlo na ausência de condições oxidativas, com a PLPE-Glucose sob condições oxidativas, deparamo-nos com o aparecimento de novos iões  $[M+H]^+$  (Figura 11). Estes iões aparecem com valor  $m/z$  mais elevados e mais baixos do que a PLPE-Glucose ( $m/z$  878.6). De acordo com trabalhos realizados anteriormente na oxidação da PLPE (Domingues *et al.*, 2008 (a)), verificamos que os iões de  $m/z$  superior correspondem a produtos de oxidação com inserção de átomos de oxigénio, na cadeia de ácido gordo insaturada e são conhecidos como produtos de oxidação de cadeia longa. Os iões com valor  $m/z$  mais baixo do que a PLPE-Glucose, correspondem a iões que após a inserção de átomos de oxigénio na cadeia insaturada do fosfolípido, quebram por acção de uma  $\beta$ -clivagem na cadeia transformada (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b)), dando origem aos chamados produtos de oxidação de

cadeia curta. A formação de produtos de oxidação de cadeia longa e curta, após oxidação radicalar, está de acordo com trabalhos realizados anteriormente em oxidação da PC (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Reis *et al.*, 2007)

Os produtos de oxidação da PLPE-Glucose de cadeia curta e longa obtidos serão descritos separadamente.



**Figura 11.** Espectros de ESI-MS da mistura PLPE-Glucose em condições não oxidativas (A) e após dois dias de oxidação (B).

### Produtos de oxidação de cadeia curta $[M+H]^+$ da PLPE-Glucose

Os produtos de oxidação de cadeia curta formam-se quando após a inserção de átomos de oxigénio, a se dá a quebra da cadeia modificada, como foi referido anteriormente. A quebra do ácido linoleico (cadeia insaturada em *sn*-2) leva à formação de dois tipos de compostos, uns com a formação de um grupo terminal aldeído e outros com ácido carboxílico, e com comprimentos de cadeia diferentes. A formação destes produtos de oxidação começou a ser observada após um dia de oxidação e foram identificados como iões  $[M+H]^+$  de  $m/z$  742.5, 756.5, 770.5, com formação de um grupo aldeído e os iões  $[M+H]^+$  de  $m/z$  758.5, 772.5, 786.5, com formação de um grupo funcional carboxílico. Além destes iões, também visualiza-mos alguns iões  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  764.6, 778.6 e 792.6,

com formação de um grupo terminal aldeído e 780.6, 794.6, 808.6, com terminal ácido carboxílico. Estes dados encontram-se organizados de forma resumida na Tabela 3, com as respectivas localizações da posição do grupo terminal, que dão informação do tamanho da cadeia carbonada *sn-2*.

**Tabela 3.** Produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose e respectivos valores de *m/z* dos iões obtidos nos espectros de ESI-MS.

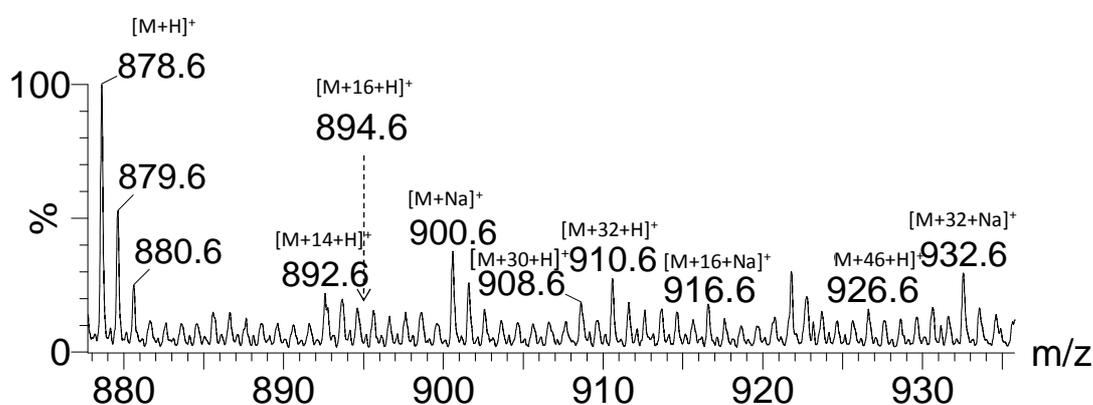
Produtos de oxidação de cadeia curta (local da quebra)	Formação de um grupo aldeído ( <i>m/z</i> )		Formação de um grupo carboxílico ( <i>m/z</i> )	
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
C7	742.6	764.6	758.6	780.6
C8	756.6	778.6	772.6	794.6
C9	770.6	792.6	786.6	808.6

Estes resultados estão de acordo com dados obtidos anteriormente na oxidação da PLPE (Domingues *et al.*, 2008 (a)) em que foram observados produtos de oxidação com tamanho de cadeia C7, C8 e C9. Na oxidação da PLPE foram ainda encontrados produtos de oxidação de cadeia curta com terminal aldeído ou ácido carboxílico em C11. Comparativamente com estudos realizados na oxidação de PLPC (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Domingues *et al.*, 2008 (a)), verificamos que produtos de cadeia curta com terminação em C7 só foram observados na oxidação da PLPE (Domingues *et al.*, 2008 (a)) e PLPE-Glucose e que produtos de oxidação de cadeia curta com terminação em C13, foram observados apenas em PC.

### Produtos de oxidação de cadeia longa [M+H]<sup>+</sup> da PLPE-Glucose

Nas primeiras horas de reacção, podemos observar a formação de produtos de oxidação que surgem da inserção de átomos de oxigénios no fosfolípido. Estes produtos são designados de cadeia longa e têm maior valor *m/z* do que a PLPE-Glucose. Este valor *m/z* varia de acordo com o número de átomos de oxigénio que são inseridos na cadeia

insaturada e grupo funcional formado. Neste trabalho foram observados produtos de oxidação de cadeia longa com a inserção de 1, 2, 3 e 4 átomos de oxigénio com formação de grupos hidroxilo e/ou peróxido, dando origem a iões  $[M+H]^+$  de  $m/z$  894.6, 910.6, 926.6 e 942.6. A formação de produtos de cadeia longa também se fez notar, pela presença dos iões  $[M+H]^+$   $m/z$  892.6, 908.6, 924.6 e 940.6 que correspondem à inserção de 1 a 4 átomos de oxigénio e podem formar um grupo cetona, cetohidroxilo e cetodi-hidroxilo ou cetoperoxilo. Foram observados ainda os aductos de sódio dos mesmos produtos de oxidação de cadeia longa. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos na oxidação da PLPE (Domingues *et al.*, 2008 (a)) e estão organizados de forma resumida na Tabela 4. A presença de alguns destes iões pode ser visualizada na Figura 12.



**Figura 12.** Espectro de ESI-MS da PLPE-Glucose após 1 dia de oxidação.

**Tabela 4.** Produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose e respectivos valores de  $m/z$  dos iões obtidos nos espectros de ESI-MS.

Produtos de oxidação de cadeia longa (nº de oxigénios)	Formação de grupo Hidroxilo / Hidroperóxido ( $m/z$ )		Formação de grupo Cetona ( $m/z$ )	
	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$
+1 0	894.6	916.6	892.6	914.6
+2 0	910.6	932.6	908.6	930.6
+3 0	926.6	948.6	924.6	946.6
+4 0	942.6	964.6	940.6	962.6

No estudo da oxidação da PLPE-Glucose, verificamos a presença de alguns aductos de sódio, mesmo sem a adição de sal. O estudo da fragmentação realizado anteriormente em PLPE sodiadas revela-nos o interesse da análise destes iões. Apesar do estudo dos aductos de sódio não ter sido aprofundado neste trabalho, reconhecemos que se considera importante o seu estudo no futuro. Neste trabalho foi estudada a fragmentação dos iões  $[M+H]^+$  por ESI-MS/MS em detalhe. Visto que nos dados de LC-MS se observam predominantemente os iões  $[M+H]^+$ , apenas estudámos as fragmentações desses iões.

#### ***4.4 Caracterização dos produtos de oxidação $[M+H]^+$ da PLPE-Glucose por ESI-MS/MS***

Neste subcapítulo serão analisados os espectros de ESI-MS/MS dos produtos de oxidação obtidos e serão propostas estruturas de todos os iões de interesse formados a partir dos produtos de oxidação. Ao estudar os produtos de oxidação da PLPE-Glucose por ESI-MS/MS, conseguimos retirar informação estrutural, a partir da perda das cadeias de ácidos gordos (Pulfer and Murphy, 2003). Serão ainda propostas as principais vias de fragmentação de cada produto de oxidação.

#### **ESI-MS/MS de produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose**

---

Os produtos de oxidação de cadeia curta apesar de identificados nos espectros de ESI-MS aparecem com pouca abundância relativa. Este facto faz com que os iões fragmento obtidos em espectros adquiridos em ESI-MS/MS desses mesmos iões surjam com pouca abundância relativa. Deste modo estes foram analisados por LC-MS e LC-MS/MS.

## ESI-MS/MS de produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose

---

Dentro dos produtos de cadeia longa, serão apenas analisados os produtos com inserção de um e dois átomos de oxigénio, dado que foram os que apresentaram maior abundância relativa. Ao analisar os espectros de ESI-MS/MS destes produtos, verificamos de existem iões fragmento que correspondem a perdas comuns. A perda comum de 303 Da a partir do ião  $[M+H]^+$ , está presente em todos os espectros de ESI-MS/MS e dá origem aos iões de abundância relativa elevada. Os iões  $[M+H-303]^+$ , surgem após a perda da cabeça polar do fosfolípido glicosilada e ao seus valores  $m/z$  estão organizados na Tabela 5. Para alguns produtos, verificamos que a perda da cabeça glicosilada, não dá origem aos iões de maior abundância relativas, mas esse facto será esclarecido separadamente para cada ião. A perda da cabeça polar do fosfolípido é uma característica da classe das fosfatidiletanolaminas, e já foi visualizada em trabalhos realizados anteriormente como perda de 141 Da para fosfatidiletanolaminas não modificadas na cabeça, na análise destes fosfolípidos por ESI-MS/MS (Pulfer and Murphy, 2003; Wenk, 2005; Simoes *et al.*, 2008) e no estudo da oxidação de fosfatidiletanolaminas (Domingues *et al.*, 2008 (a)). Estes resultados vêm confirmar que de facto estes produtos de oxidação são fosfolípidos com a cabeça glicosilada. Além desta perda característica da cabeça polar glicosilada, verificam-se ainda outras perdas características que surgem da molécula da glicose, nomeadamente pela perda de 18 Da, 36 Da, 54 Da e 84 Da, a partir do ião  $[M+H]^+$  de cada produto de oxidação, e correspondem respectivamente à perda de  $H_2O$ ,  $2H_2O$ ,  $3H_2O$  e  $3H_2-H_2CO$ . Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente em aminoácidos glicosilados (Wang *et al.*, 2008), em que se observam, por ESI-MS/MS estas mesmas perdas. Neste trabalho, conseguimos ver essas mesmas perdas em fosfolípidos glicosilados. A formação de iões que resultam destas perdas de glicose, também podem surgir a partir do ião  $[M+H]^+$  de  $m/z$  304.0, correspondente à cabeça do fosfolípido glicosilada protonada. Estas vias de fragmentação foram também observadas no espectro de MS/MS da PE-Glucose não oxidada, como foi descrito no capítulo anterior aquando do estudo da fragmentação da PLPE-Glucose.

Os valores de  $m/z$  dos iões fragmento resultantes destas perdas comuns encontram-se organizados de forma resumida na Tabela 5.

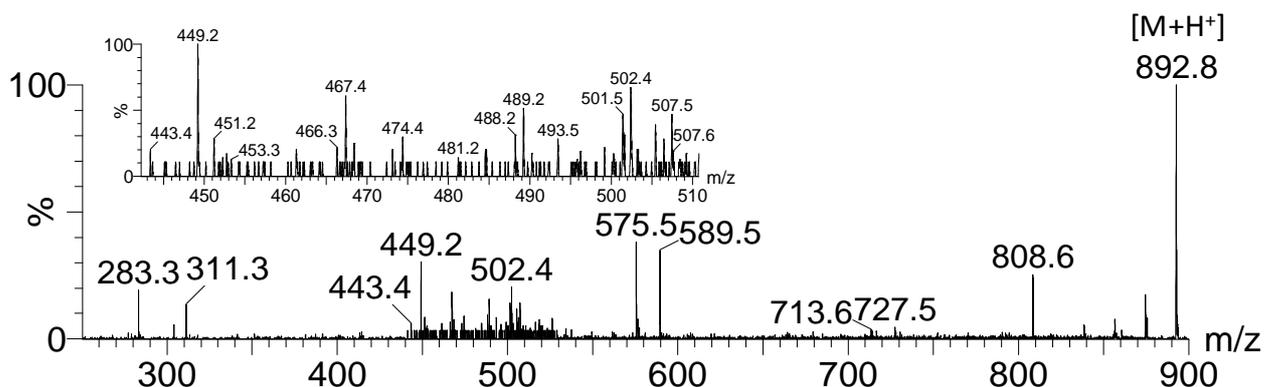
**Tabela 5.** Iões fragmento obtidos por ESI-MS/MS, que resultam de perdas comuns dos produtos de oxidação de cadeia longa com um e dois átomos de oxigénio.

	$[M-H_2O+H]^+$	$[M-2H_2O+H]^+$	$[M-3H_2O+H]^+$	$[M-3H_2O+H_2CO]^+$	$[M-303+H]^+$
892.6	874.6	856.6	838.6	808.5	589.5
894.6	876.6	858.6	840.6	810.6	591.5
908.6	890.6	872.6	854.6	824.6	605.5
910.6	892.6	874.6	856.6	826.6	607.5

Outros iões fragmento de abundância relativa menor e que não são reprodutíveis em todos os espectros, serão analisados e discutidos separadamente de acordo com o número de oxigénios inseridos e grupo funcional formado, por valor crescente de  $m/z$ .

**Ião  $[M+H]^+$   $m/z$  de 892.6** – produto de oxidação de cadeia longa, com inserção de um átomo de oxigénio e formação de uma ligação dupla

O ião  $[M+H]^+$  de  $m/z$  892.6, corresponde a um produto de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose com inserção de um átomo de oxigénio sob a forma de grupo cetona. O espectro resultante da sua análise por ESI-MS/MS está representado na Figura 13. Ao observar o espectro, podemos verificar a presença de dois iões fragmento de maior abundância relativa de  $m/z$  589.5 e 575.5. O ião de  $m/z$  589.5, surge da perda de 303 Da a partir do ião precursor. Esta perda surge com a saída da cabeça glicosilada do fosfolípido, já descrita anteriormente e que confirma estarmos perante uma fosfatidiletanolamina glicosilada. O ião de  $m/z$  575.5, surge após a perda de 317 Da a partir do ião precursor. A perda de 317 Da sugere a eliminação da cabeça glicosilada oxidada, ou seja a perda de um neutro de 303 + 14 Da (Esquema 7).



**Figura 13.** Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$  de  $m/z$  892.8.

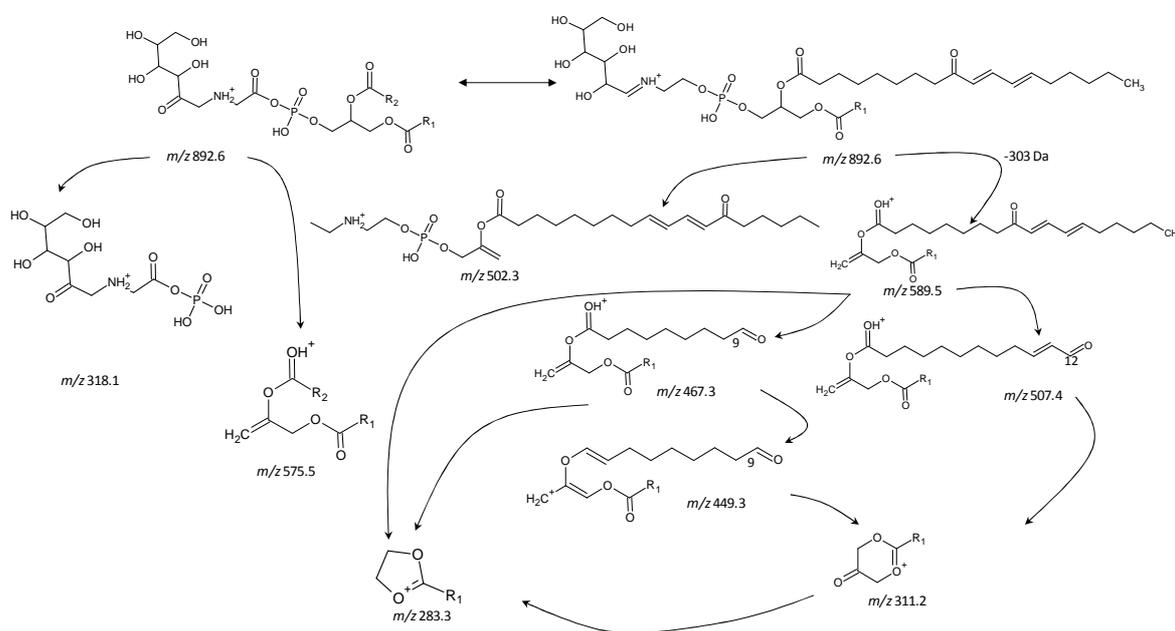
Esta fragmentação indica que a cabeça glicosilada sofreu oxidação com formação de um grupo cetona e muito provavelmente esta oxidação ocorrerá no grupo etanolamina da cabeça do fosfolípido. A glicosilação poderá favorecer esta oxidação. A oxidação na cabeça não se observou na oxidação da PLPE (Domingues *et al.*, 2008 (a)). Como já vimos anteriormente é a cadeia de ácido gordo insaturada em *sn-2*, que é mais susceptível à oxidação, devido à presença de ligações duplas. No entanto, há evidências de que estas modificações oxidativas também possam ocorrer a nível da cabeça polar do fosfolípido, factos revelado em estudos de oxidação em PC (Reis *et al.*, 2004 (b)). Desta forma, podemos afirmar que o ião  $[M+H-317]^+$  de  $m/z$  575.5 corresponde a uma estrutura com os ácidos gordos não modificado e com o grupo cetona na etanolamina. A observação destes iões diz-nos que temos pelo menos dois produtos de oxidação diferentes, um com oxidação na cabeça glicosilada do fosfolípido e o outro com oxidação na cadeia de ácido gordo.

Neste espectro foi ampliada a zona entre os valores  $m/z$  440.0 e 510.0, por ser a zona onde se encontram vários iões fragmento de interesse.

Na zona do espectro ampliada, podemos observar outros iões de menor abundância relativa que se revelam importantes. Os iões de  $m/z$  311.2 e 283.3 surgem após a perda da cadeia insaturada do fosfolípido e da cabeça, ficando apenas a cadeia em *sn-1* não modificado com o glicerol. A sua presença indica-nos que as alterações oxidativas não

ocorrem em *sn-1* (Esquema 7). O ião de  $m/z$  502.3 vem confirmar a ocorrência da oxidação na cadeia de ácido gordo insaturada em *sn-2*. A estrutura proposta indica-nos a saída de parte da molécula de glicose e da cadeia em *sn-1* não modificado.

Os iões de  $m/z$  467.4, 449.2 e 507.5 dão-nos informação sobre a possível posição do grupo cetona em *sn-2*, como podemos ver no esquema de fragmentação apresentado em baixo (Esquema 7). O ião  $[M+H]^+$  de valor  $m/z$  467.4 forma-se após saída da cabeça glicosilada do fosfolípido e a partir da quebra da ligação C-C entre o carbono 9 e 10 em *sn-2*, o que nos indica que o grupo cetona se encontra localizado no carbono 9. A partir deste ião forma-se um outro de  $m/z$  449.2 por perda de uma molécula de  $H_2O$ , que confirma a presença do ião 467.4 e da posição do átomo de oxigénio em C9. O ião de  $m/z$  507.5 surge da quebra em *sn-2* entre C12-13 e após a perda da cabeça, sugerindo a presença do grupo cetona em C12 (Esquema 7). Estas quebras na ligação adjacente ao grupo funcional foram já observadas em estudos da oxidação em PE e PC (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Domingues *et al.*, 2008 (a)), e são indicativos da localização do grupo funcional na cadeia carbonada.



**Esquema 7.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação  $[PLPE-Glucose+H]^+$  de  $m/z$  892.6.

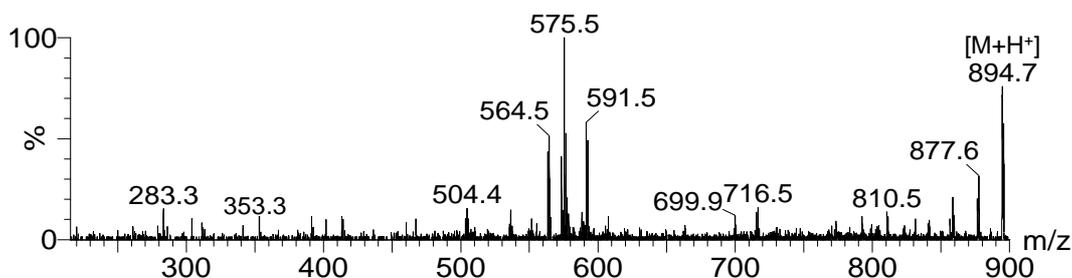
O facto destes iões fragmento indicarem que o grupo cetona está posicionado preferencialmente em C9, C12 e C13 está de acordo com os estudos realizados anteriormente na oxidação da PLPE (Domingues *et al.*, 2008 (a)). Neste estudo, os iões fragmento com maior abundância relativa, eram aqueles que indicavam a presença do grupo cetona em C9 e em C12, contrariando os resultados obtidos no estudo da oxidação da PC (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Domingues *et al.*, 2008 (a)), em que os grupos cetona parecem ter preferência pela localização em C9 e C13. Estas diferenças foram atribuídas ao facto destes dois tipos de fosfolípidos, terem cabeças polares diferentes.

Em resumo, o ião  $[M+H]^+$  892.6, corresponde a vários produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose, em que a oxidação pode ocorrer a nível da cabeça polar do fosfolípido, ou a nível das cadeias de ácidos gordos, confirmada pela presença dos iões 502.3 e 589.5. A presença de iões como 311.2 e 283.3, comprovam que a oxidação não ocorre em sn-1. Os iões de  $m/z$  467.3 e 507.4 confirmam que a oxidação ocorre em sn-2 levando à formação de produtos com formação do grupo cetona em C9 e C12, respectivamente.

**Ião  $[M+H]^+$  de  $m/z$  894.6** – produto de oxidação de cadeia longa, com inserção de um átomo de oxigénio e formação de um grupo hidroxilo

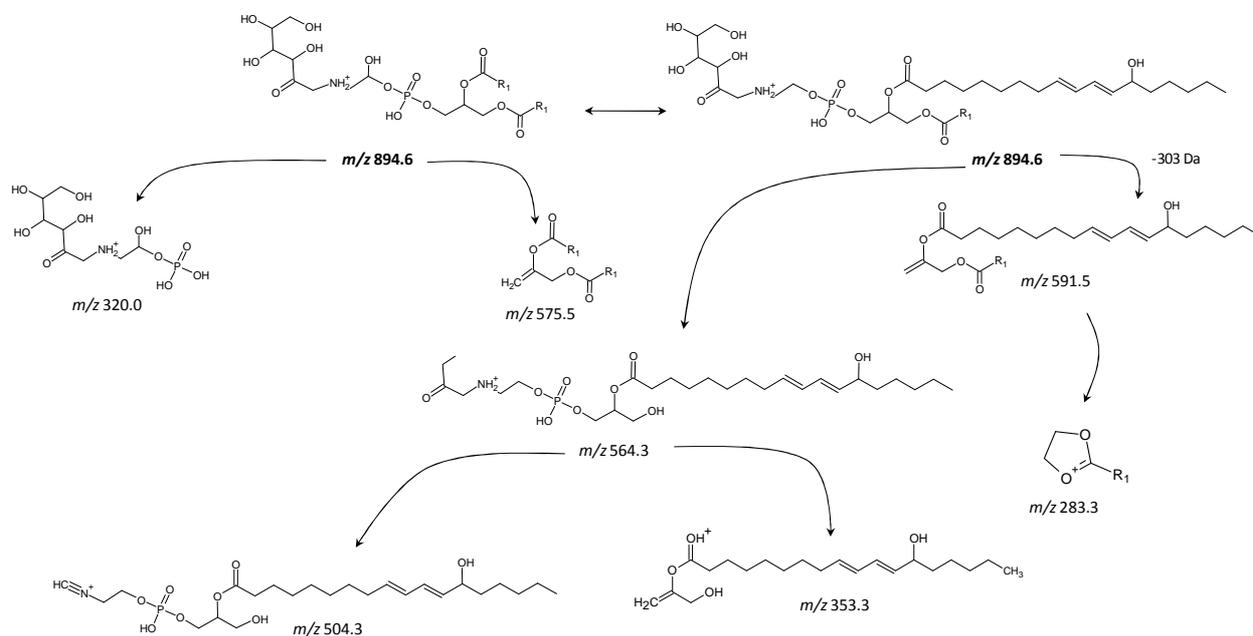
---

O ião 894.6 correspondente à PLPE glicosilada com inserção de um átomo de oxigénio sob a forma de grupo hidroxilo e o seu espectro de fragmentação obtido por ESI-MS/MS está representado na Figura 14.



**Figura 14.** Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$  de  $m/z$  894.7.

Neste espectro podemos ver que há três iões que se destacam pela sua abundância relativa elevada, os iões de  $m/z$  591.5, 575.5 e o 564.5. Como já vimos anteriormente, o ião de  $m/z$  591.5 é um ião que corresponde a uma perda comum (Tabela 5), que surge da perda da cabeça glicosilada do fosfolípido  $[M+H-303]^+$ , confirmando que este espectro é relativo a de um produto de oxidação de PLPE glicosilada. A presença do ião de  $m/z$  810.5 confirma também essa glicosilação, visto que surge de uma das perdas conhecidas da molécula de glicose, aqui representada pela perda de 84 Da ( $3H_2O-H_2CO$ ) (Tabela 5). A presença do ião de  $m/z$  575.5 sugere a saída da cabeça do fosfolípido juntamente com o grupo hidroxilo, o que indica que a oxidação tenha ocorrido a nível da cabeça polar do fosfolípido. O ião de  $m/z$  564.4 é um ião que surge com elevada abundância relativa e que aparece após saída da cadeia em *sn-1* juntamente com parte da molécula de glicose. Este ião indica-nos que a oxidação ocorreu a nível da cadeia insaturada do fosfolípido (Esquema 8).



**Esquema 8.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação  $[PLPE-Glucose+H]^+$  de  $m/z$  894.6.

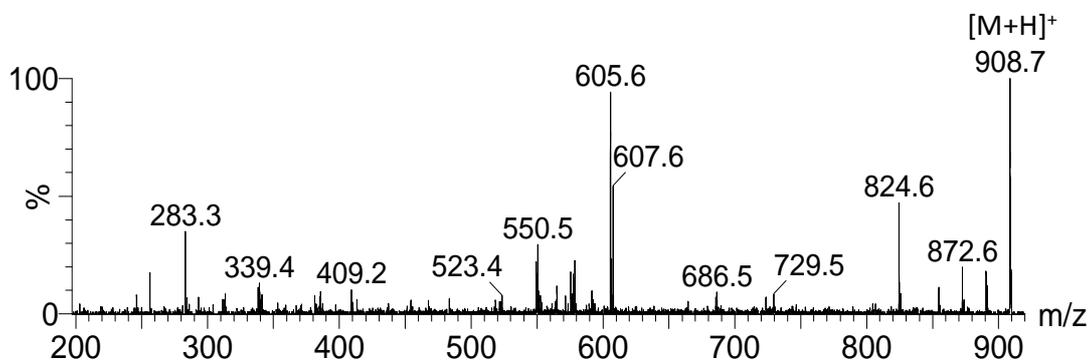
A par com ião 564.3, temos a presença de outros iões como o ião de  $m/z$  504.4 e o 353.3. O ião de  $m/z$  504.4 surge após saída de parte da molécula de glucose e saída completa da cadeia carbonada situada em *sn-1*. O ião de  $m/z$  353.3 surge após a perda da cabeça glicosilada do fosfolípido combinada com a saída da cadeia carbonada em *sn-1*. Estes iões são indicativos da presença do grupo hidroxilo na cadeia *sn-2*, o que vem comprovar mais uma vez que a oxidação ocorre em *sn-2* e não em *sn-1*.

A presença de outros iões de menor abundância relativa, como o ião de  $m/z$  283.3, revela-se importante, visto que é um ião indicativo da presença de *sn-1* não modificada.

Em resumo, o ião  $[M+H]^+$  894.6, corresponde a um produto de oxidação hidroxilado da PLPE-Glucose, em que a oxidação pode ocorrer a nível da cabeça polar do fosfolípido, ou a nível das cadeias de ácidos gordos, confirmada pela presença dos iões 591.5, 564.5, 504.3 e 353.3. A presença de iões como 283.3, vem comprovar mais uma vez que a oxidação não ocorre em *sn-1*.

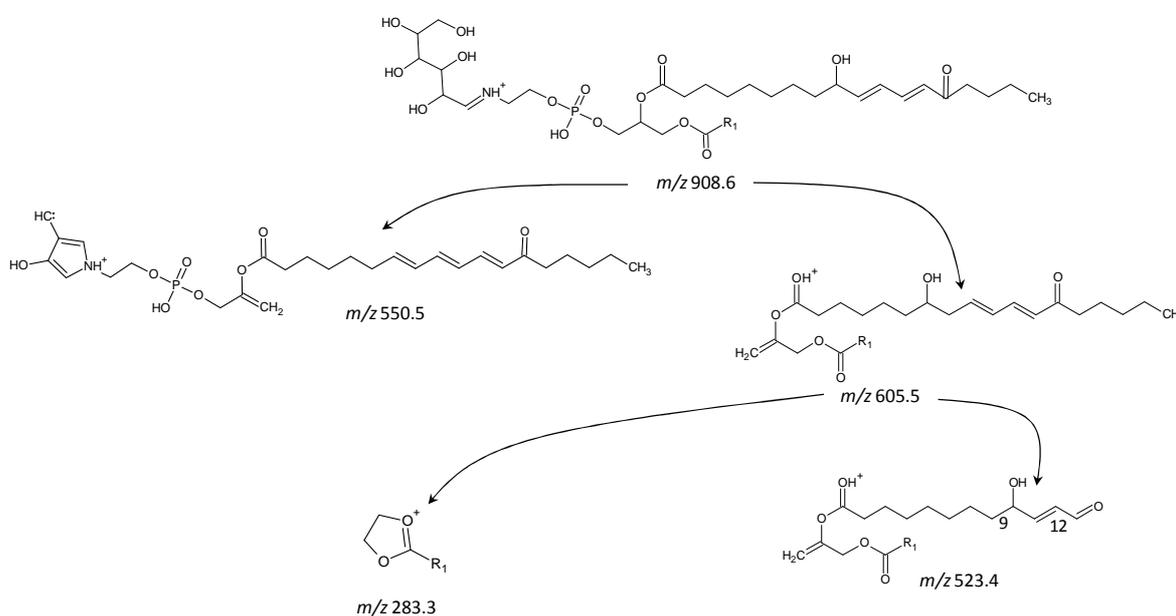
**Ião  $[M+H]^+$   $m/z$  de 908.6** – produto de oxidação de cadeia longa, com inserção de dois átomos de oxigénio

O ião  $[M+H]^+$   $m/z$  908.6 corresponde à PLPE glicosilada com inserção de dois átomos de oxigénio com formação de um grupo cetona e um grupo hidroxilo, designando-se por ceto-hidroxilo, e o seu espectro de fragmentação obtido por ESI-MS/MS está representado na Figura 15.



**Figura 15.** Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$  de  $m/z$  908.7.

Neste espectro verificamos a presença de um ião fragmento de abundância relativa elevada de  $m/z$  605.6. Este ião surge a partir da perda da cabeça glicosilada do fosfolípido e corresponde a  $[M+H-303]^+$  confirmando que este espectro é relativo a de um produto de oxidação de PLPE glicosilada. Além deste ião de maior abundância relativa, podemos verificar a presença dos iões correspondentes às perdas conhecidas da molécula de glicose, aqui representadas pelos iões de  $m/z$  872.6, que surge da perda de 36 Da ( $2H_2O$ ) e de  $m/z$  824.6, que surge da perda de 84 Da ( $3H_2O-H_2CO$ ) (Tabela 5). Podemos ver ainda a presença de outros iões como o ião de  $m/z$  550.5. Este ião surge após a perda de 84 Da ( $3H_2O-H_2CO$ ), combinada com a perda do *sn-1* e do grupo hidroxilo (Esquema 9) o que nos indica mais uma vez, que a modificação oxidativa se dá a nível da cadeia em *sn-2*. Com a saída do grupo hidroxilo, forma-se uma ligação dupla na cadeia insaturada, uma vez que este grupo sai com formação de uma molécula de água. À semelhança dos espectros anteriores, podemos verificar a presença do ião  $m/z$  de 283.3 que indicativo da cadeia em *sn-1* não modificada, comprovando que a oxidação ocorre em *sn-2*, como referido para os iões anteriores.



**Esquema 9.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação  $[PLPE-Glucose+H]^+$  de  $m/z$  908.6.

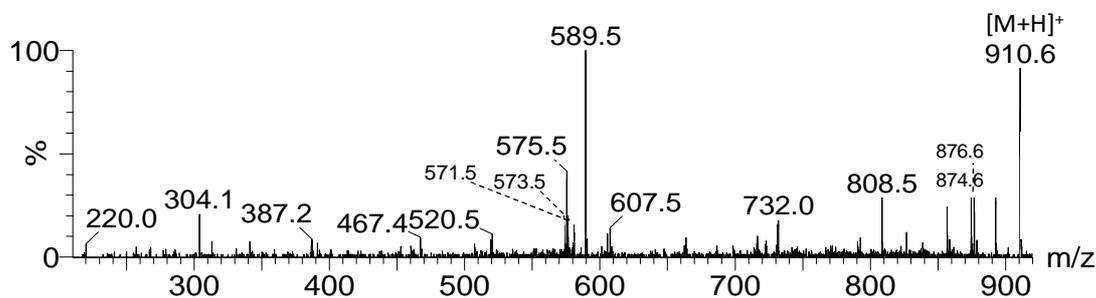
Ao analisar este espectro, verificamos a presença de outros iões com abundância relativa mais baixa, como o ião de  $m/z$  523.4. Este ião informa-nos da possível localização do grupo hidroxilo a C9 e o grupo cetona a C12 (Esquema 9). A quebra na ligação C-C ocorre na posição adjacente à localização da inserção do oxigénio. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente na oxidação da PLPE (Domingues *et al.*, 2008 (a)), em que um dos iões resultantes do produto de oxidação de cadeia longa com inserção de dois oxigénios e formação de um ceto-hidroxilo, é exactamente o ião  $m/z$  523.4.

Resumindo, o ião  $[M+H]^+$  908.6, corresponde a vários produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose, em que a oxidação ocorrer a nível das cadeias de ácidos gordos, confirmada pela presença dos iões 605.5 e 550.5. A presença do ião  $m/z$  283.3, comprovam que a oxidação não ocorre em *sn-1*. O ião  $m/z$  523.4 confirma que a oxidação ocorre em *sn-2* e que este ião é resultante da quebra em C12, têm maior abundância relativa.

#### Ião $[M+H]^+$ $m/z$ de 910.6 – produto de oxidação de cadeia longa, com inserção de dois átomos de oxigénio

---

O ião  $[M+H]^+$   $m/z$  910.6 corresponde à PLPE glicosilada com inserção de dois átomos de oxigénio com formação de grupos hidroxilo ou de um grupo peróxido, e o seu espectro de fragmentação obtido por ESI-MS/MS está representado na (Figura 16).

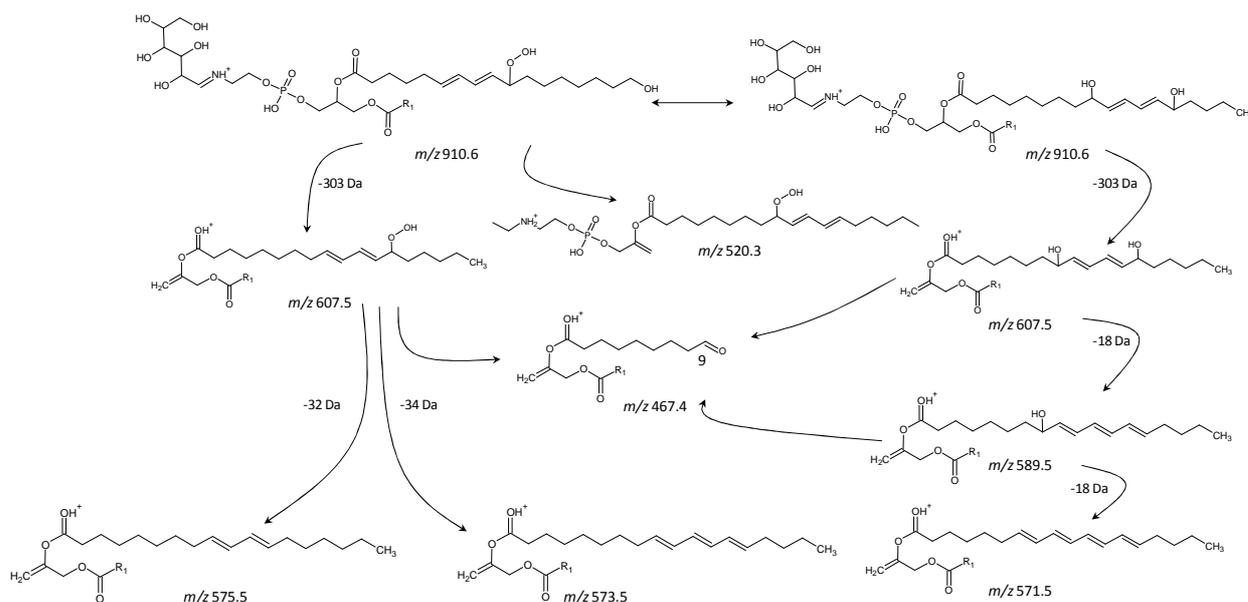


**Figura 16.** Espectro de ESI-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$  de  $m/z$  910.6.

Neste espectro, o ião de maior abundância relativa obtido, não é o que corresponde à perda da cabeça glicosilada do fosfolípido ( $m/z$  607.5), mas sim o que corresponde a essa perda combinada com a perda de  $H_2O$ , dando origem ao ião de  $m/z$  589.5. Esta perda de 18 Da, combinada com a perda da cabeça glicosilada (-303 Da) a partir do ião precursor, faz-nos suspeitar que estamos perante um composto di-hidroxiado, e a presença do ião  $[M+H]^+$   $m/z$  571.5 vem comprovar essa suspeita, visto ser um ião que surge após saída de duas moléculas de água a partir do ião  $[M+H-303]^+$  de  $m/z$  607.5. (Esquema 10). Estes resultados estão concordantes com trabalhos realizados anteriormente na oxidação de PLPC (Adachi *et al.*, 2004; Adachi *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2007), em que a presença de compostos hidroxiados foi detectada através da perda de moléculas de água.

No entanto, além da perda de -36 Da, verificamos também uma perda de -34 Da a partir do ião precursor e combinada com a perda da cabeça glicosilada do fosfolípido, dando origem aos iões de  $m/z$  876.6 e 573.5, respectivamente (Esquema 10). Esta perda indica que estamos perante um composto com um grupo peróxido, visto que a perda de 34 Da foi encontrada na fragmentação de hidroperóxidos de PC oxidada (Spickett *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2004; Adachi *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2007) e em peróxidos de PE oxidada (Domingues *et al.*, 2008 (a)).

Outro ião de abundância relativa elevada é o de  $m/z$  575.5 (-303+32Da). Como já vimos em espectros de fragmentação da PLPE glicosilada não oxidada, este ião surge após saída da cabeça glicosilada do fosfolípido e corresponde às cadeias de ácidos gordos do fosfolípido e glicerol. A presença deste ião sugere que as cadeias de ácidos gordos não tenham sofrido modificações oxidativas. Isto significa, que a oxidação ocorreu a nível da cabeça glicosilada do fosfolípido. O ião de  $m/z$  520.3, surge após saída do *sn-1* e parte da molécula de glucose e indica-nos mais uma vez que a oxidação ocorreu a nível da cabeça glicosilada do fosfolípido.



**Esquema 10.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação [PLPE-Glucose+H]<sup>+</sup>  $m/z$  910.6.

O espectro obtido mostra-nos outro íon de importância relevante de  $m/z$  467.4 indicativo da possível ligação de um dos grupos hidroxilo ou do grupo peróxido em C9 (Esquema 10). Este íon fragmento comprova que a inserção de átomos de oxigénio ocorre a nível do *sn*-2 e está de acordo com os resultados obtidos por Domingues e colaboradores (Domingues *et al.*, 2008 (a)), visto que a presença do íon de  $m/z$  467.4 também se verifica em compostos com um grupo peróxido/peroxilo ou com um di-hidroxilo.

Resumindo, a presença de íões resultantes das perdas de 32, 34 e 36 Da, combinadas com a perda da cabeça polar do fosfolípido, significa que o íon de  $m/z$  910.6 com inserção de dois átomos de oxigénio pode ser um composto com um grupo peróxido/peroxilo ou di-hidroxilo. A presença do íon  $m/z$  520.3 indica-nos que a modificação oxidativa se dá em *sn*-2. O íon de  $m/z$  467.4 confirma-nos que a oxidação se dá a nível do *sn*-2 e que um dos grupos hidroxilo ou o grupo peróxido/peroxilo se situa em C9. Assim, este íon corresponde a vários produtos de oxidação da PLPE-Glucose. Deste

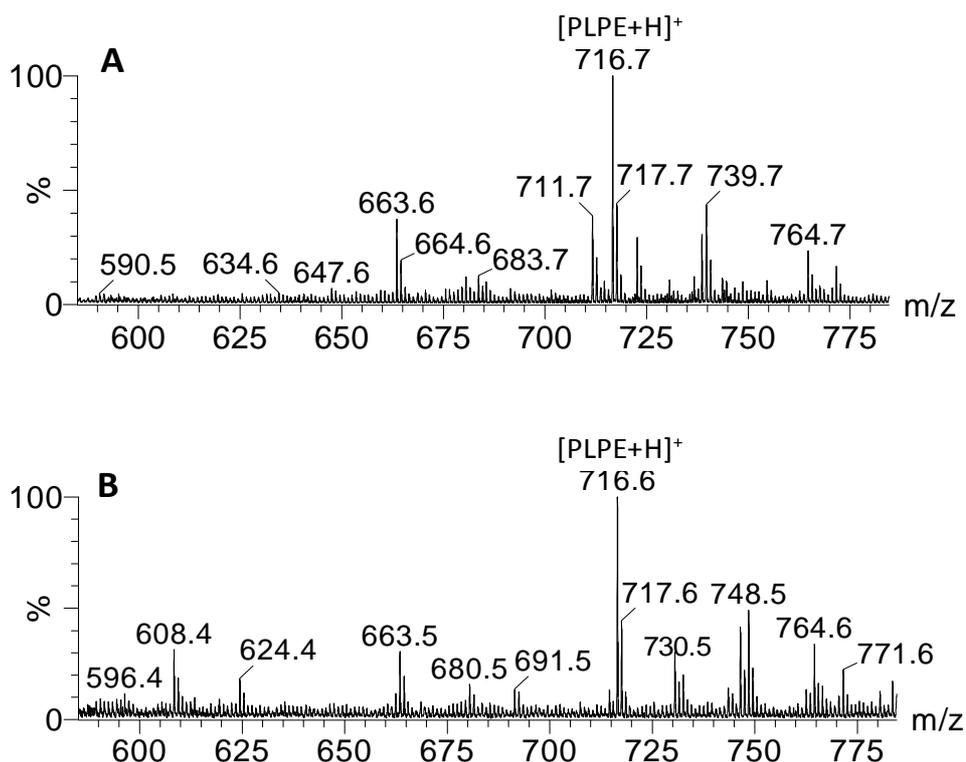
modo, podemos verificar que o íão de  $m/z$  910.6 corresponde a produtos de oxidação da PLPE-Glucose com estruturas diferentes.

#### ***4.5 Oxidação de fosfatidiletanolaminas quando em presença de PLPE-Glucose***

Vários estudos fazem referência ao facto das fosfatidiletanolaminas glicosiladas serem capazes de promover a peroxidação lipídica, mesmo na ausência de agentes oxidantes (Oak *et al.*, 2000; Breitling-Utzmann *et al.*, 2001). Parece que as fosfatidiletanolaminas glicosiladas promovem a produção de espécies reactivas de oxigénio, levando à peroxidação lipídica (Oak *et al.*, 2000). Assim, fomos avaliar qual a influência da glicosilação na peroxidação de fosfatidiletanolaminas. Neste trabalho avaliamos a oxidação de fosfatidiletanolaminas na presença de fosfatidiletanolaminas glicosiladas. A monitorização foi realizada através do uso de espectrometria de massa, utilizando o *electrospray* como método de ionização.

Os espectros apresentados abaixo (Figura 17) correspondem à reacção de oxidação da PLPE na ausência de PLPE-Glucose (Figura 17-A) e da oxidação da PLPE em presença de PLPE-Glucose (Figura 17-B). Os espectros foram adquiridos nas mesmas circunstâncias, após dois dias de oxidação.

A presença destes produtos de oxidação estão concordantes com resultados obtidos num outro estudo utilizando reacção química como geradora de radicais livres na oxidação de fosfatidiletanolaminas (Gugiu *et al.*, 2006). Curiosamente estes mesmos autores que utilizaram também oxidação enzimática e UV, verificaram que os produtos de cadeia curta com 9 carbonos eram os mais abundantes, tendo ainda constatado que em amostras biológicas de retina de rato os produtos de oxidação de cadeia curta com terminal ácido carboxílico em C9, eram os mais abundantes (Gugiu *et al.*, 2006). Neste trabalho, ao observar a (Figura 17), verificamos esses mesmos resultados, em que o produto de cadeia curta C9 com terminal aldeído ( $m/z$  608.4) tem maior abundância relativa, que o de cadeia curta C9 com terminal ácido carboxílico ( $m/z$  624.4).



**Figura 17.** Comparação da quantidade de produtos de oxidação obtidos entre: A – espectro de ESI-MS relativo à reacção de oxidação da PLPE, após dois dias de reacção; B – espectro de ESI-MS relativo à reacção de oxidação da PLPE, na presença de PLPE-Glucose, após dois dias de reacção.

Os produtos de oxidação de cadeia longa obtidos têm  $m/z$  730.5, 732.5, 746.5 e 748.5 e surgem após a introdução de 1 e 2 átomos de oxigénio. O ião de  $m/z$  730.5 e 732.5 surgem da inserção de 1 átomo de oxigénio, com formação de um grupo cetona e de um grupo hidroxilo, respectivamente. O ião de  $m/z$  746.5 e 748.5 surgem da inserção de dois átomos de oxigénio e podem formar derivados hidroxilados e/ou peróxidos. Os produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE foram anteriormente identificados por Domingues e colaboradores (Domingues *et al.*, 2008 (a)), por LC-MS e LC-MS/MS.

#### 4.6 Conclusões

Os produtos de oxidação formados a partir da oxidação da PLPE-Glucose, através da reacção de Fenton, foram analisados por ESI-MS e ESI-MS/MS e descritos em detalhe neste capítulo. Assim, foi possível identificar os produtos de oxidação de cadeia curta com formação de um grupo aldeído e de um ácido carboxílico com comprimentos de cadeia de 7 a 9 carbonos. Além destes produtos de cadeia curta, conseguimos identificar também produtos de oxidação de cadeia longa com inserção de um, dois, três e quatro átomos de oxigénio. Através do uso do ESI-MS/MS, foi possível também obter informação estrutural dos produtos de oxidação com inserção de um e dois átomos de oxigénio, revelando o seu posicionamento na cadeia em *sn-2*, mas também na cabeça glicosilada do fosfolípido. Como foram obtidos vários produtos de oxidação, para os mesmos valores *m/z*, a caracterização destes produtos será realizada por LC-MS e LC-MS/MS de modo a obter informação mais detalhada, sobre as suas diferenças estruturais.

Ao comparar os espectros obtidos para as reacções de oxidação da PLPE na ausência e em presença PLPE-Glucose, conseguimos comprovar que de facto, os fosfolípidos oxidam mais rápido na presença de outros fosfolípidos glicosilados, provavelmente por haver um aumento de produção de ROS.

**Capitulo 5**  
**Estudo da oxidação da PLPE-Glucose por LC-MS**  
**e LC-MS/MS**

## 5 Estudo da oxidação da PLPE-Glucose por LC-MS e LC-MS/MS

### 5.1 Introdução

Na oxidação da PLPE e PLPE-Glucose há formação de uma grande variedade de produtos e as possibilidades estruturais são diversas para cada produto de oxidação. Esta variedade de produtos inclui a presença de isómeros posicionais e funcionais. A presença de isómeros já foi observada anteriormente em estudos com fosfatidilcolinas (Reis *et al.*, 2004 (b)) e em fosfatidiletanolaminas (Domingues *et al.*, 2008 (a)). Para poder identificar e caracterizar estruturalmente os produtos isoméricos formados, a mistura de PLPE e PLPE-Glucose oxidada foi analisada por LC-MS, de modo a podermos separar esses compostos e diferenciar os isómeros que possam existir. As modificações oxidativas em PE, não têm sido alvo de muitos estudos e apenas dois estudos identificam os produtos de oxidação de PE, por LC-MS/MS (Gugiu *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2008 (a)). Gugiu *et al.* identificaram produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE contendo grupo terminal ácido carboxílico e aldeído, por MRM (multi reaction monitoring). Utilizando a técnica de LC-MS/MS, Domingues e colaboradores identificaram produtos de oxidação de cadeia curta e cadeia longa e diferenciaram isómeros posicionais da PLPE oxidada. Até à data não existe nenhum trabalho sobre a identificação e o estudo detalhado das modificações ocorridas em PE glicosiladas por LC-MS/MS. A espectrometria de massa e mais especificamente a espectrometria de massa *tandem*, é uma técnica poderosa que é muito útil na identificação de produtos de peroxidação fosfolípida, particularmente quando é usada no uso de misturas complexas, como aquelas obtidas *in vivo*.

Neste capítulo, descrevemos as alterações oxidativas sofridas pela PLPE-Glucose, através do uso do radical hidroxilo, formado através da reacção de Fenton. Os produtos de oxidação foram identificados com o uso da cromatografia líquida de fase reversa, acoplada a um espectrómetro de massa.

## 5.2 Material e Métodos

Nesta parte do trabalho foi realizada nova síntese de PLPE-Glucose de acordo com a metodologia utilizada no capítulo 3. Foram realizadas duas misturas com PLPE e PLPE-Glucose e uma delas foi submetida ao processo de oxidação seguindo a metodologia utilizada no capítulo 4.

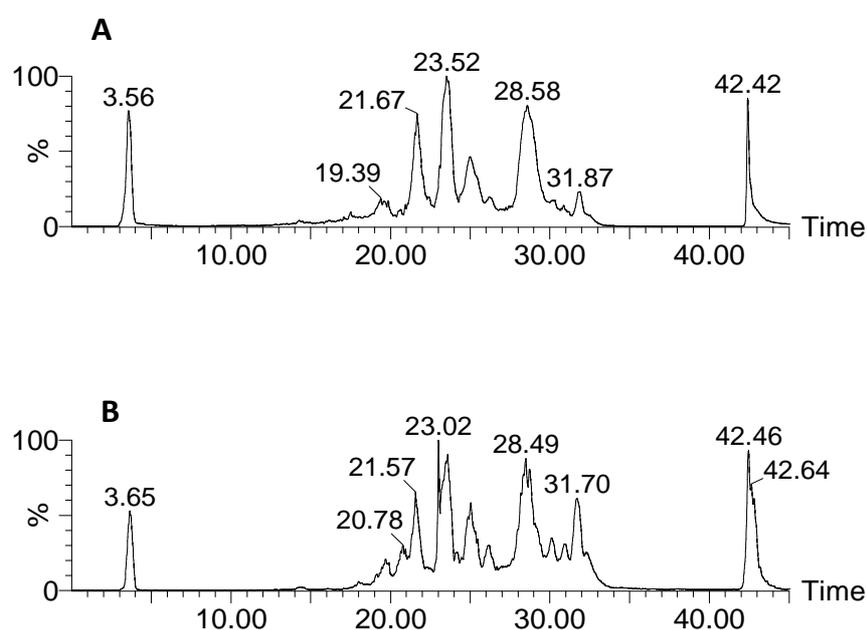
### **Instrumentação:**

Os produtos de oxidação foram separados através da utilização de LC-MS, utilizando o HPLC (Waters Alliance 2690) acoplado ao espectrómetro de massa Q-ToF 2 (Micromass, Manchester, UK). A mistura foi diluída (1:20, v/v) em 75% de metanol e 25% de água (v/v). Foram introduzidos 10 µl de amostra na coluna Supelco Bio Wide Pore C5 (15 cm x 0.5 mm, 5 µm) que funciona como fase estacionária. Para fase móvel, foi utilizada água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrilo com a mesma percentagem de ácido fórmico (0.1%, v/v) (eluente B). O programa foi otimizado de modo a obter separação das fracções correspondentes para a PE e PE-Glucose. O programa utilizado tem início com 20% do eluente B, com um aumento gradual durante 15 minutos até 70% de B. É atingido 100% de B aos 25 minutos onde permanece durante 10 minutos, descendo até aos 20% de B em 5 minutos. O programa tem na totalidade 40 minutos.

A aquisição de espectros de ESI-MS e MS/MS foi realizada no modo positivo, utilizando a agulha com 3kV de voltagem aplicada e com uma voltagem no cone de 35V. A temperatura na fonte de 80°C e a de solvatação 150°C. Os espectros *tandem* foram realizados nos iões de interesse usando árgon como gás de colisão e a energia de colisão variou entre os 20 e os 30 eV. No tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software MassLynx* (versão 4.0).

### 5.3 LC-MS

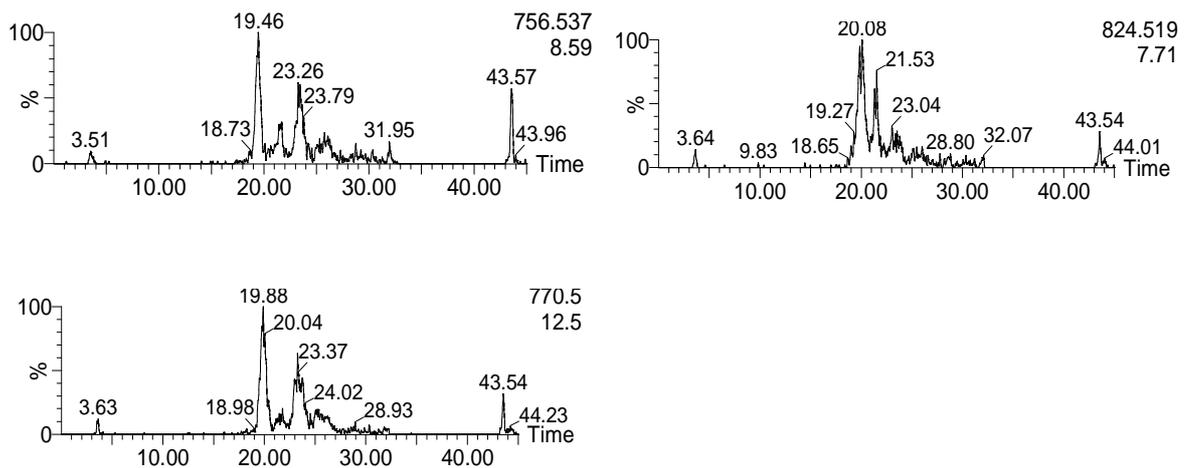
Neste trabalho foram analisadas por LC-MS duas misturas oxidativas distintas: uma com PLPE+PLPE-Glucose sem oxidação (amostra A) e outra com PLPE+PLPE-Glucose com oxidação (amostra B). A reacção de oxidação (amostra B) foi monitorizada por ESI-MS durante três dias e analisada por LC-MS durante o mesmo tempo. Na Figura 18 estão representados os cromatogramas obtidos para as misturas analisadas A e B, onde se pode visualizar as diferenças entre dois perfis cromatográficos, quando comparados.



**Figura 18.** Cromatograma iónico total de LC-MS da mistura PLPE+PLPE-Glucose sem oxidação (A) e da mistura PLPE+PLPE-Glucose após oxidação (B).

As diferenças entre os dois perfis cromatográficos surgem devido à presença de produtos de oxidação presentes na mistura de PLPE+PLPE-Glucose que foi submetida ao processo de oxidação. Os produtos de oxidação da PLPE-Glucose foram identificados como produtos de oxidação de cadeia curta e longa.

Os produtos de oxidação de cadeia curta separados por LC-MS foram os de  $m/z$  756.4, 770.4 e 824.4, já identificados anteriormente por ESI-MS. Na Figura 19 estão representados os cromatogramas de corrente iónica reconstruída (RIC) obtidos para os valores  $m/z$  correspondentes aos produtos de oxidação de cadeia curta. Observando os RICs obtidos, verificamos que existem vários picos de eluição para o mesmo valor de  $m/z$ . A presença de vários picos de eluição pode dever-se à formação de produtos de oxidação de cadeia curta isoméricos. No entanto, como o sinal obtido foi baixo, não foi possível a realização de LC-MS/MS para todos os picos de eluição apresentados. Os picos de eluição de maior intensidade para cada valor  $m/z$  correspondem a produtos de oxidação de PLPE-Glucose, identificados por LC-MS/MS.



**Figura 19.** Cromatogramas de corrente iónica reconstruída (RIC), dos iões  $[M+H]^+$  dos produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose.

Assim, os produtos de oxidação de cadeia curta com formação de um grupo aldeído  $m/z$  756.5 e 770.4, eluam a 19,46 e a 19,88 minutos, respectivamente (Figura 19) e o

produto de oxidação de cadeia curta com formação de um grupo ácido carboxílico, elui a 20,8 minutos (Figura 19).

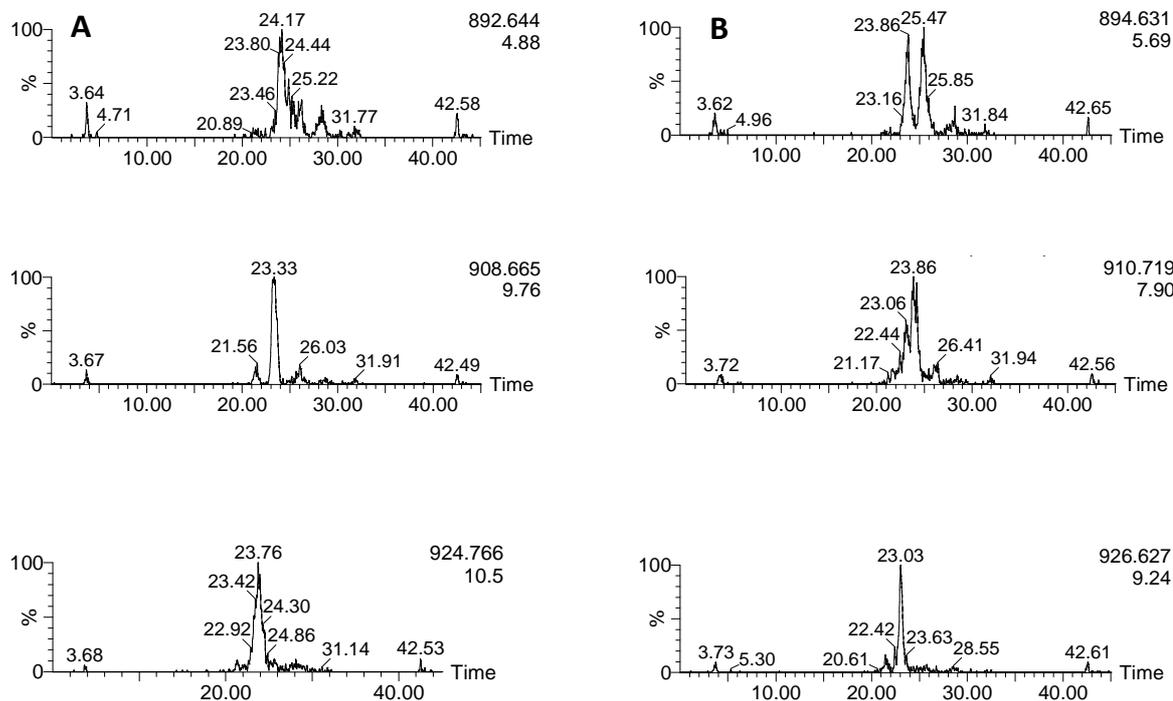
De acordo com dados publicados anteriormente (Gugiu *et al.*, 2006), sabemos que as modificações que ocorrem em *sn-2* decorrentes do processo de peroxidação levam ao encurtamento do ácido gordo, levando à formação de dois tipos de compostos, com um grupo aldeído ou um ácido carboxílico terminal. Estes produtos de oxidação têm a cadeia em *sn-2* com comprimentos diferentes, dependendo da localização da sua quebra. Neste trabalho foram identificados dois produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose, com terminal aldeído de  $m/z$  756.4 (com quebra da cadeia em *sn-2* no carbono 8) e 770.4 (com quebra do *sn-2* no carbono 9). Além destes produtos de oxidação curta com terminal aldeído, foi ainda identificado um produto de cadeia curta com terminal ácido carboxílico, de  $m/z$  824.4, com quebra entre C12-13.

Dos produtos de oxidação de cadeia curta, aquele que apresenta maior intensidade de sinal é o ião  $m/z$  770.4 correspondente ao ião  $[M+H]^+$  do produto de oxidação de cadeia curta com quebra entre C9-10. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em estudos relativos à oxidação de fosfolípidos contendo cadeias de linoleoil se verifica que os produtos de cadeia curta com quebra em C9-10 são os que apresentam maior abundância relativa (Gugiu *et al.*, 2006) (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b)). Este facto pode estar associado a vários motivos, entre os quais a uma maior estabilidade da molécula, à sua resistência à oxidação posterior ou da possibilidade de se formar a partir de outros produtos de oxidação de cadeia curta com mais carbonos (Reis *et al.*, 2004 (a); Reis *et al.*, 2004 (b); Gugiu *et al.*, 2006).

Com base nos dados de LC-MS, foi possível separar produtos de oxidação de cadeia curta com terminal aldeído e ácido carboxílico, com diferentes tamanhos de cadeia carbonada em *sn-2*. Visto estar descrito na literatura, a identificação de produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE com terminal em C7, C8, C9, C11 e C12, supomos que os mesmos produtos possam ser observados para a oxidação da PLPE-Glucose. Contudo, neste estudo a baixa intensidade dos iões observada para todos os iões limitou a aquisição dos espectros com boa razão S/N.

Através da separação por LC-MS da mistura PLPE-Glucose oxidada, foi possível separar também produtos de oxidação de cadeia longa.

Os produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose separados foram os de  $m/z$  894.5, 910.5 e 926.5 correspondendo a moléculas protonadas com inserção de um, dois e três átomos de oxigénio na cadeia em *sn*-2, respectivamente, e formação de um grupo hidroxilo ou hidropéroxidos. Também foram separados os produtos de cadeia longa de  $m/z$  892.5, 908.5 e 924.5 com inserção em *sn*-2 de um, dois e três átomos de oxigénio, respectivamente, com formação de um grupo cetona, cetona-hidroxilo e cetona-dihidroxilo ou cetopéroxido. Estes produtos foram identificados anteriormente por ESI-MS e caracterizados por ESI-MS/MS (Capítulo 4). Observando os RIC de cada ião (Figura 20) podemos confirmar que alguns produtos de cadeia longa  $[M+H]^+$  apresentam dois picos de eluição com maior evidencia. Os respectivos RT obtidos para cada ião estão organizados de forma resumida na Tabela 6. Estes dados estão de acordo com estudos realizados anteriormente (Domingues *et al.*, 2008 (a)) para a oxidação de PLPE, em que existe a possibilidade de os produtos de oxidação de cadeia longa obtidos, apresentarem mais do que um pico de eluição e por esse motivo deveremos estar na presença de compostos diferentes, como isómeros funcionais e posicionais. No trabalho de Domingues e colaboradores (Domingues *et al.*, 2008 (a)), foram obtidos dois picos de eluição para a PLPE com inserção de dois átomos de oxigénio, sugerindo que essas diferenças de eluição surgem da diferença da posição de oxigénios, tratando-se de isómeros com grupos funcionais diferentes. Neste trabalho, obtivemos também picos de eluição diferentes para compostos com inserção de apenas um átomo de oxigénio ao contrário do trabalho de Domingues *et al.*, em que para produtos de oxidação da PLPE com inserção de um átomo de oxigénio, apenas obtiveram um pico de eluição. A diferença entre esses compostos será esclarecida por LC-MS/MS.



**Figura 20.** Cromatogramas de corrente iónica reconstruída (RIC) dos produtos de oxidação de cadeia longa  $[M+H]^+$  da PLPE-Glucose. A -  $m/z$  892.6, 908.6 e 924.6, com formação de grupos hidroxilo/hidroperóxido. B -  $m/z$  894.6, 910.6 e 926.6, com formação de grupo cetona.

Os produtos de oxidação de cadeia longa e curta separados por LC-MS, estão organizados de forma resumida na Tabela 6, com os respectivos tempos de eluição.

**Tabela 6.** Produtos de oxidação  $[M+H]^+$  da PLPE-Glucose obtidos por LC-MS e respectivos tempos de eluição em minutos.

Local da quebra	Valores $m/z$ dos produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ com formação de um grupo aldeído	Tempos de Retenção em minutos obtidos para cada produto de oxidação $[PLPE-Glucose+H]^+$ , por LC-MS
C8	756.4	19,46
C9	770.4	19,88
	Valores $m/z$ dos produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ com formação de um ácido carboxílico	
C12	824.4	20,08
	Valores $m/z$ dos produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ com formação de um grupo cetona	
+1 O	892.5	24,17; 28,01
+2 O	908.5	23,33; 26,41
+3 O	924.5	23,76
	Valores $m/z$ dos produtos de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose $[M+H]^+$ com formação de um grupo hidroxilo/hidroperóxido	
+1 O	894.5	23,86; 25,47
+2 O	910.5	23,86
+3 O	926.5	23,03

Para alguns produtos de oxidação da PLPE-Glucose não foi possível a sua separação por LC-MS, devido à baixa intensidade do sinal obtido para esses íões, pelo que esses íões não foram considerados. Os produtos de oxidação  $[M+H]^+$  da PLPE-Glucose foram, na sua maioria, separados com sucesso, permitindo o seu estudo mais detalhado, através de LC-MS/MS.

#### 5.4 LC-MS/MS

No capítulo 4 foram estudadas as vias de fragmentação, por ESI-MS/MS, dos vários produtos de oxidação obtidos a partir da oxidação da PLPE-Glucose. Com a utilização do LC-MS/MS, conseguimos retirar ainda mais informação a partir dos espectros de MS/MS dos íões de interesse, visto ser uma técnica mais sensível. Assim, os produtos de oxidação de cadeia curta e longa  $[M+H]^+$  da PLPE-Glucose obtidos por LC-MS, foram analisados por LC-MS/MS. As suas fragmentações serão estudadas separadamente para produtos de cadeia curta e longa.

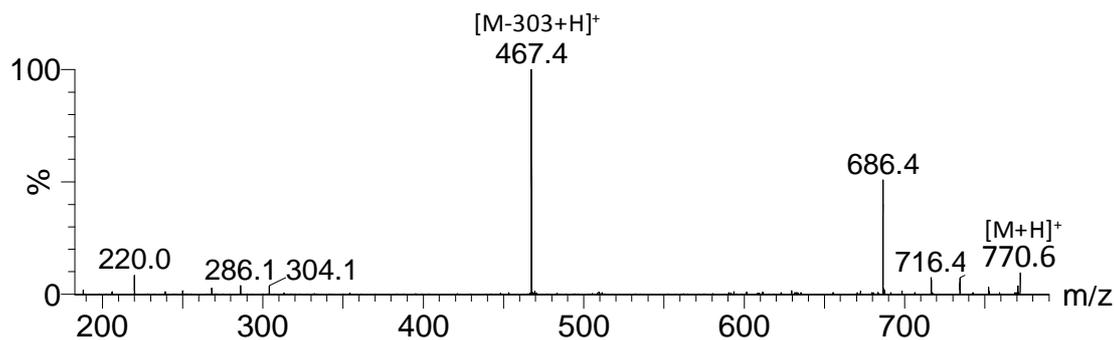
### LC-MS/MS de produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose

---

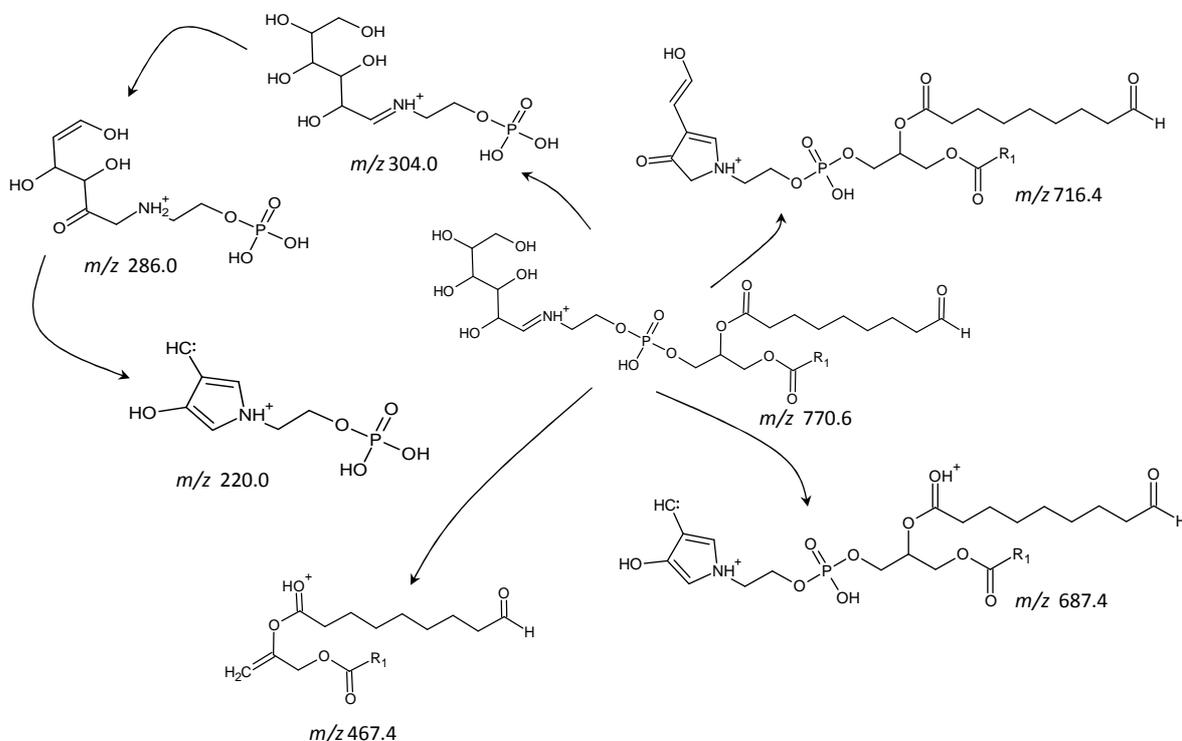
Ao analisar os espectros de LC-MS/MS dos iões  $[M+H]^+$  identificados como produtos de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose, verificamos que todos os espectro evidenciam um ião de abundância relativa elevada, que surge de uma perda neutra de 303 Da. Esta perda de 303 Da que surge a partir do ião precursor corresponde à perda da cabeça do fosfolípido glicosilada e já foi descrita como uma das principais vias de fragmentação das PEs, identificada por ESI-MS/MS em iões  $[M+H]^+$  de PLPE-Glucose e em iões  $[M+H]^+$  de produtos de oxidação de PLPE-Glucose. Estes dados indicam-nos que de facto o fosfolípido glicosila através da ligação da glicose à cabeça polar do fosfolípido.

Outros iões fragmento comuns dos produtos de oxidação mas de abundância relativa menor são aqueles que surgem das perdas características da glicose, através da perda de 18 Da ( $H_2O$ ), 36 Da ( $2H_2O$ ), 54 Da ( $3H_2O$ ) e 84 Da ( $3H_2O+H_2CO$ ), a partir do ião precursor ou da cabeça glicosilada do fosfolípido. Estas perdas de água e de  $H_2CO$  são frequentes na fragmentação de iões  $[M+H]^+$  de aminoácidos glicosilados (Wang *et al.*, 2008) e neste trabalho foram identificadas em fosfolípidos glicosilados. O facto de visualizarmos estas perdas a partir dos produtos de oxidação da PLPE-Glucose vem reconfirmar-nos que estes iões têm de facto uma molécula de glicose na sua constituição.

Visto que os produtos de cadeia curta mais abundantes são os que apresentam quebra em C9, vamos estudar em detalhe a fragmentação do ião  $[M+H]^+$   $m/z$  770.4. O espectro de LC-MS/MS representado na Figura 21, mostra-nos os iões fragmento resultante da sua fragmentação. Assim, podemos verificar a presença de um ião de abundância relativa elevada de  $m/z$  467.9, que surge da perda da cabeça glicosilada do fosfolípido (-303 Da). Podemos verificar ainda a presença de outros iões de abundância relativa menor resultantes das perdas características da glicose, como o ião de  $m/z$  716.4 e 686.4 que surgem respectivamente da perda de  $3H_2O$  (-54 Da) e de  $3H_2O+H_2CO$  (-84Da), a partir do ião  $m/z$  770.6. Os iões de  $m/z$  286.1 e 220.0, surgem a partir da perda de  $H_2O$  (-18 Da) e  $3H_2O+H_2CO$  (30 Da) respectivamente, a partir do ião de  $m/z$  304.1, que corresponde à cabeça glicosilada do fosfolípido protonada. Estas vias fragmentação e as estruturas de cada fragmento, estão descritas no Esquema 11.



**Figura 21.** Espectro de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$  de  $m/z$  770.6.



**Esquema 11.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação  $[PLPE-Glucose+H]^+$  de  $m/z$  770.6.

Através da interpretação deste espectro, obtivemos a confirmação de que estamos perante um produto de oxidação de cadeia curta da PLPE-Glucose, em que a perda da cabeça glicosilada do fosfolípido (303 Da) leva à formação do íon fragmento com maior abundância relativa.

Tal como demonstrado para o ião de  $m/z$  770.6, os outros iões de produtos de oxidação de cadeia curta mostram as mesmas fragmentações. No entanto essas fragmentações não nos fornecem mais informação estrutural.

### **LC-MS/MS de produtos de oxidação de cadeia longa PLPE-Glucose**

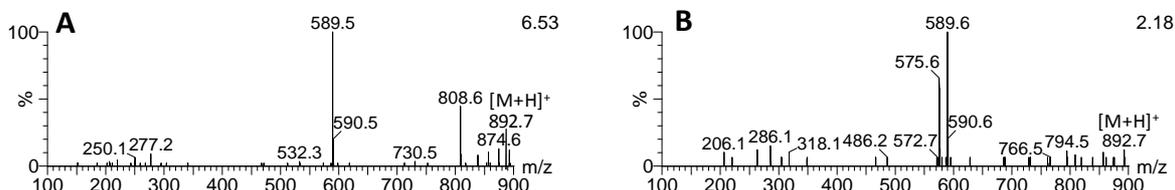
---

Ao analisar os RIC dos produtos de oxidação de cadeia longa, podemos verificar que os iões eluíram em RT diferentes (Tabela 6). Os iões de  $m/z$  892.6, 894.6 e 908.6 foram analisados por LC-MS/MS, com o objectivo de esclarecer a origem desses RT diferentes.

**Ião  $[M+H]^+$  de  $m/z$  892.6** - Produto de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose, com inserção de um átomo de oxigénio e formação de uma ligação dupla.

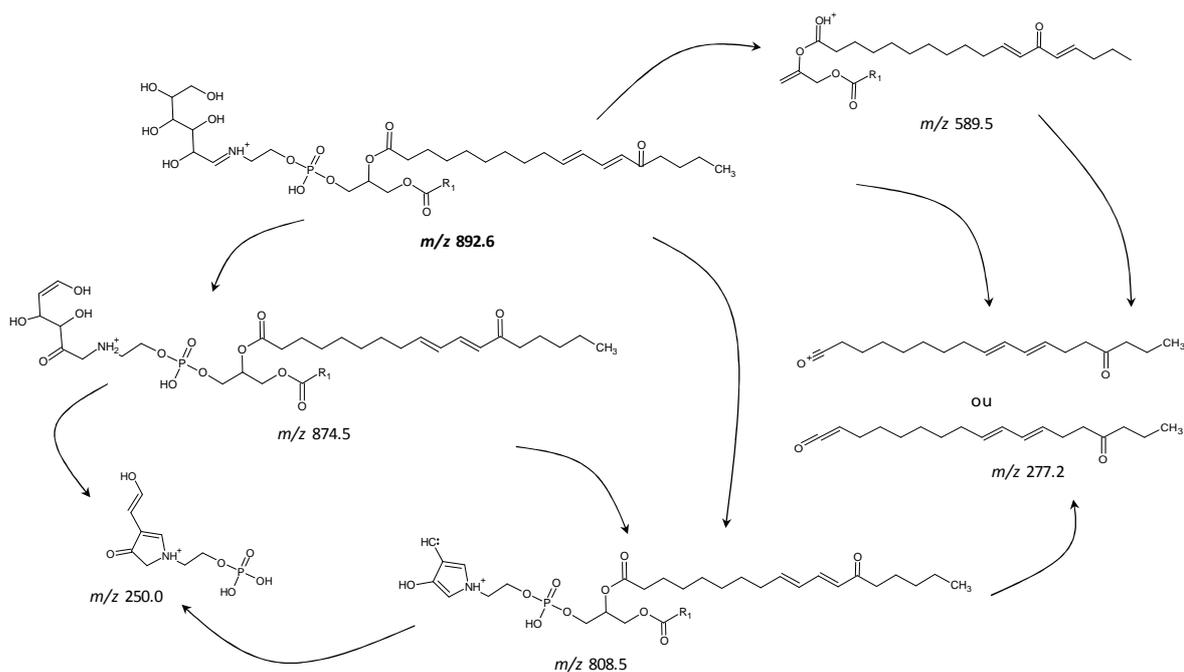
---

O ião  $[M+H]^+$   $m/z$  892.6 que foi identificado como produto de oxidação da PLPE-Glucose com a formação de um grupo cetona apresenta dois picos distintos de eluição, a 24,1 e a 28,0 minutos. Os espectros de LC-MS/MS deste ião, obtidos para os diferentes tempos de retenção estão representados na Figura 22. O espectro obtido para o tempo de retenção de 24,1 minutos (Figura 22–A), mostra a presença de um ião com maior abundância relativa de  $m/z$  589.5. Este ião surge de uma perda neutra de 303 Da, a partir do ião precursor e corresponde à perda da cabeça do fosfolípido glicosilada. A perda da cabeça da PLPE-Glucose não oxidada, dá origem a um ião fragmento de  $m/z$  575.6 e por isso, o facto de neste caso se formar um ião de  $m/z$  mais elevado (589.5) indica-nos que a oxidação da PLPE-Glucose ocorreu na cadeia do fosfolípido. O ião fragmento de  $m/z$  589.5 deve-se à presença do oxigénio nas cadeias carbonadas (ião de  $m/z$  575.6 + 14 Da).



**Figura 22.** Espectros de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$   $m/z$  892.7, obtido em dois tempos de eluição: **A** – Tempo de retenção (RT) 24,1 minutos; **B** – Tempo de Retenção (RT) 28,0 minutos.

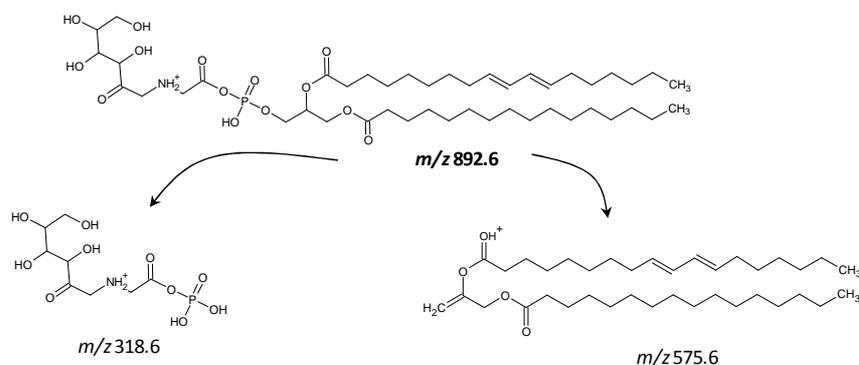
No espectro A, verificamos ainda a presença de outros íões fragmento com menor abundância relativa como os íões de  $m/z$  874.6 e 808.6. Estes íões resultam da perda de uma molécula de água (18 Da) e de  $3H_2O-H_2CO$  (84 Da), respectivamente, a partir das moléculas de glicose. Estas perdas já foram visualizadas anteriormente em aminoácidos glicosilados (Wang *et al.*, 2008) e neste trabalho, foi possível visualizá-las em fosfolípidos glicosilados, como já tivemos oportunidade de analisar anteriormente por ESI-MS/MS e agora por LC-MS/MS. O íão de  $m/z$  250.1 que observamos, também no espectro A, surge de igual modo da molécula de glicose, mas por perda de 54 Da ( $3H_2O$ ) a partir do íão  $m/z$  304.0 (não visível no espectro), que corresponde à cabeça glicosilada do fosfolípido protonada. O íão de  $m/z$  277.2 corresponde à cadeia carbonada em *sn*-2 com inserção de um oxigénio, e que saiu do fosfolípido como ceteno. Este íão vem confirmar que a PLPE-Glucose oxida em *sn*-2. Todos os esquemas dos íões descritos anteriormente e as suas vias de fragmentação estão representados no Esquema 12. O íão fragmento de  $m/z$  730.5 surge da perda da molécula de glicose (162 Da).



**Esquema 12.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação  $[\text{PLPE-Glucose}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  892.5, a um RT de 24,1 minutos.

Ao analisar o espectro de LC-MS/MS obtido para o íon de  $m/z$  892.5 com tempo de retenção de 28,0 minutos (Figura 22-B), podemos verificar a presença de dois íões fragmento de abundância relativa mais elevada, o íon de  $m/z$  589.5 e o íon de  $m/z$  575.5. A presença do íon de  $m/z$  575.5 surge após perda da cabeça glicosilada e oxidada do fosfolípido, ou seja  $303+14$ . Este íon fragmento ( $m/z$  575.5) corresponde às cadeias carbonadas do fosfolípido não modificadas. Este íon indica-nos que a oxidação da PLPE-Glucose, não ocorreu nas cadeias carbonadas do fosfolípido, sugerindo então que a oxidação ocorra na cabeça do fosfolípido. Este facto é comprovado pela presença do íon fragmento de  $m/z$  318.1, que corresponde à cabeça glicosilada do fosfolípido ( $m/z$  304.0) com a adição de um átomo de oxigénio e formação de um grupo cetona (+14 Da), como podemos ver representado no Esquema 13. Estes resultados estão de acordo com resultados

obtidos anteriormente na oxidação de fosfatidilcolinas, em que se verificou igualmente a presença de oxidação na cabeça do fosfolípido (Reis *et al.*, 2004 (b)).



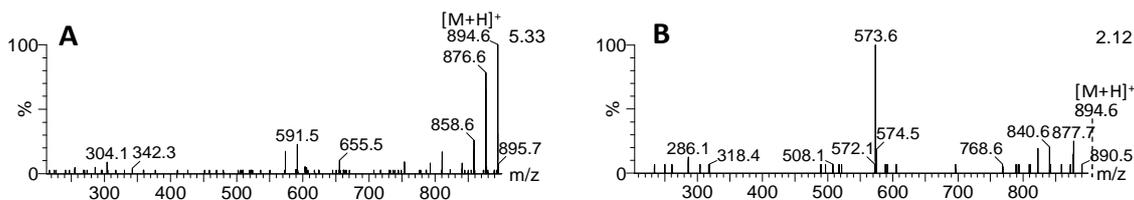
**Esquema 13.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação  $[\text{PLPE-Glucose}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  892.5, a um RT de 28,0 minutos.

Os dados obtidos nos espectros para cada tempo de retenção para o ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  892.7, sugerem que as diferenças de eluição deste ião se devem à presença de isómeros posicionais do átomo de oxigénio. O ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  892.7 que elui a 24,1 minutos terá o átomo de oxigénio inserido na cadeia carbonada do fosfolípido e o ião de massa igual que elui a 28,0 minutos tem o átomo de oxigénio inserido na cabeça do fosfolípido.

**Ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  894.6** - Produto de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose, com inserção de um átomo de oxigénio.

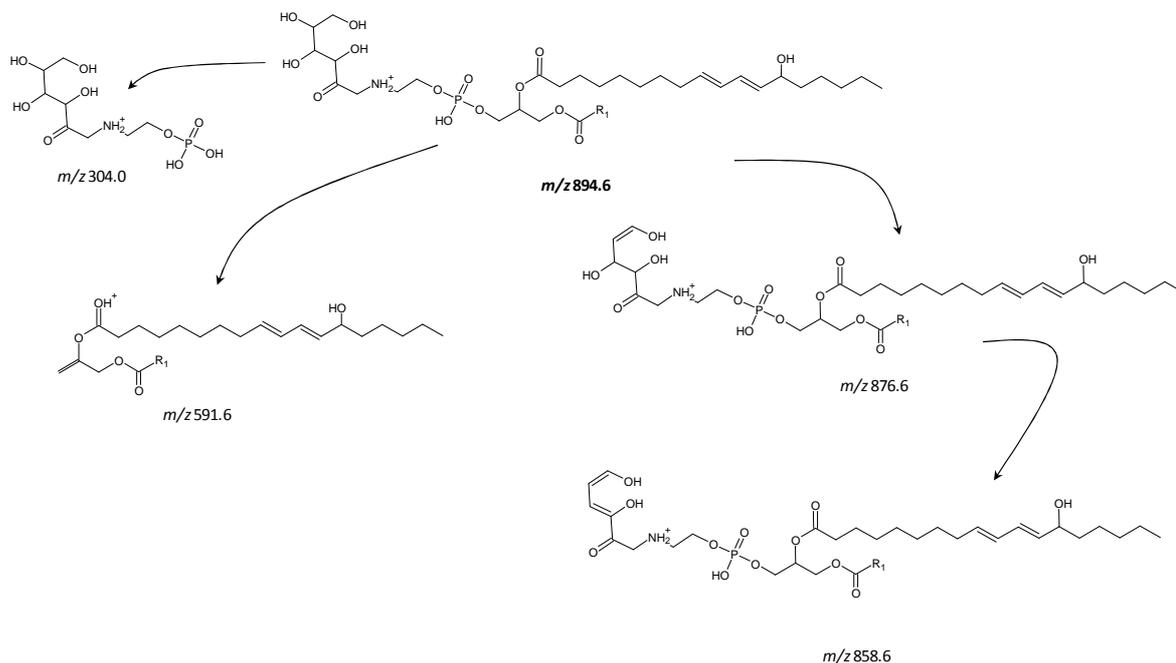
O ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  894.6, corresponde à PLPE-Glucose oxidada com formação de um grupo hidroxilo e eluiu em dois tempos de retenção diferentes, RT 23,6 e 25,2 minutos. Ao analisar o espectro de LC-MS/MS deste ião, com tempo de retenção 23,6 minutos (Figura

23 - A), podemos verificar a presença de um ião fragmento de  $m/z$  591.5, correspondente à perda da cabeça do fosfolípido glicosilada, pela perda de 303 Da a partir do ião precursor.



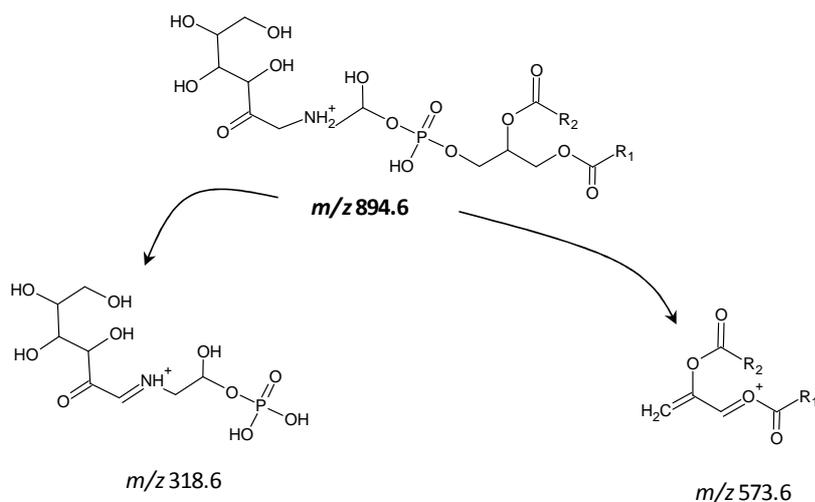
**Figura 23.** Espectros de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$  de  $m/z$  894.6, obtido em dois tempos de eluição: A – Tempo de retenção (RT) 23,6 minutos; B – Tempo de Retenção (RT) 25,2 minutos.

Já vimos anteriormente que este comportamento é característico desta classe de fosfolípidos e através destes valores de  $m/z$ , podemos verificar que a oxidação se dá a nível das cadeias do fosfolípido, tal como vimos anteriormente para o ião  $[M+H]^+$   $m/z$  892.7. Podemos ainda visualizar a presença de outros iões fragmento de abundância relativa elevada, como os iões de  $m/z$  876.6 e 858.6. Estes iões fragmento, surgem das perdas características da molécula de glucose a partir do ião precursor pelas perdas de -18 Da e -36 Da, respectivamente. Estas vias de fragmentação e respectivos iões observados estão representados no Esquema 14.



**Esquema 14.** Produtos formados a partir da fragmentação do produto de oxidação  $[\text{PLPE-Glucose}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  894.6, a um RT de 23,6 minutos.

Observando o espectro da Figura 23 – B, podemos verificar que apresenta iões  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  diferentes daqueles observados na Figura 23 – A, confirmando a suspeita de que estamos perante dois compostos diferentes e daí o facto de eluírem em RT diferentes. Neste espectro observa-mos que o ião com maior abundância relativa é o ião fragmento de  $m/z$  573.6. Sugerimos que este ião surja após a perda da cabeça glicosilada oxidada (-319 Da), com formação de duas ligações duplas, como podemos visualizar no Esquema 15. Este facto pode ocorrer devido à presença do oxigénio na cabeça, o que poderá provocar uma alteração na quebra da ligação, formando mais uma ligação dupla. A presença do ião de  $m/z$  318.0, confirma-nos que a cabeça do fosfolípido glicosilada está oxidada com formação de uma ligação dupla.



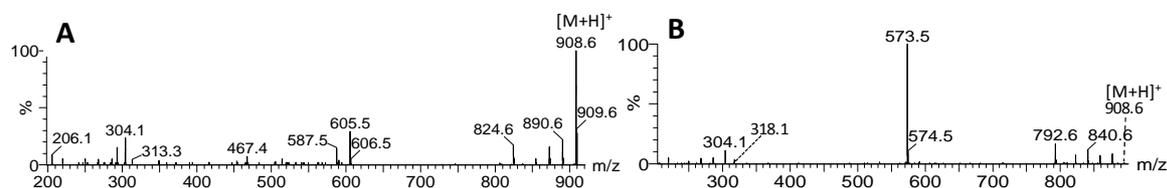
**Esquema 15.** Produtos formados a partir da fragmentação por LC-MS/MS do produto de oxidação [PLPE-Glucose+H]<sup>+</sup> de  $m/z$  894.6, a um RT de 25,2 minutos.

Os dados obtidos nos espectros para cada tempo de retenção para o ião [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  894.6, sugerem que as diferenças de eluição deste ião se devem à presença de isómeros posicionais do átomo de oxigénio. O ião [M+H]<sup>+</sup> de  $m/z$  894.6 que elui a 23,6 minutos terá o átomo de oxigénio inserido na cadeia carbonada do fosfolípido e o ião de massa igual que elui a 25,2 minutos tem o átomo de oxigénio inserido na cabeça polar glicosilada do fosfolípido.

**Ião [M+H]<sup>+</sup> de  $m/z$  908.6** - Produto de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose, com inserção de dois átomos de oxigénio.

O ião [M+H]<sup>+</sup> de  $m/z$  908.6, corresponde ao produto de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose, com inserção de dois átomos de oxigénio, com formação de um grupo hidroxilo e de um grupo cetona, elui em dois tempos de retenção diferentes, RT 23,1 e 26,0 minutos.

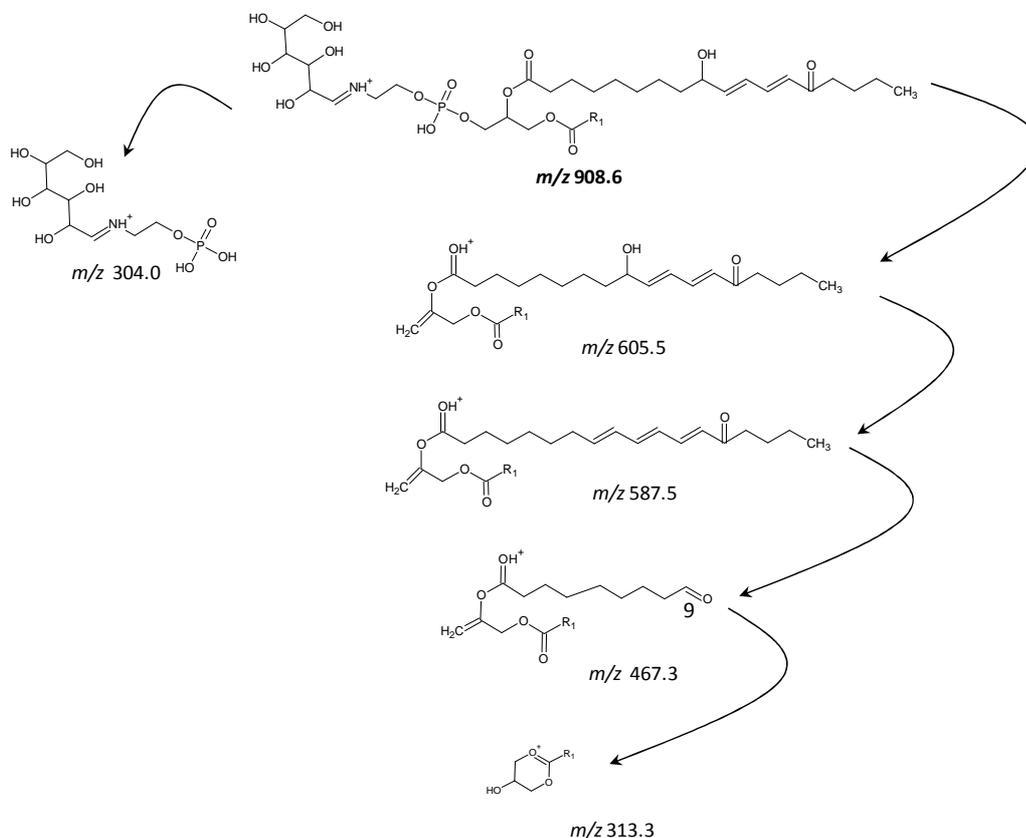
No espectro de LC-MS/MS do ião de  $m/z$  908.6 (Figura 24-A) para um RT de 23,1 minutos, podemos verificar a presença de um ião fragmento de abundância relativa mais elevada de  $m/z$  605.5. Este ião fragmento, surge da perda da cabeça do fosfolípido glicosilada (-303 Da), a partir do ião precursor, dando origem ao ião  $[M+H-303]^+$  de  $m/z$  605.5 (Esquema 16). Além desse ião, observamos outro ião de  $m/z$  587.5, correspondente à perda de 18 Da a partir do ião  $m/z$  605.5, sugerindo a saída do grupo hidroxilo sob a forma de uma molécula de água. Estes iões comprovam que o produto de oxidação de  $m/z$  908.6 com tempo de retenção 23,1 sofre oxidação na cadeia do fosfolípido.



**Figura 24.** Espectros de LC-MS/MS do produto de oxidação da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$  de  $m/z$  908.6, obtido em dois tempos de eluição: A – Tempo de retenção (RT) 23,1 minutos; B – Tempo de Retenção (RT) 26,0 minutos.

Outro ião fragmento de menor abundância relativa com  $m/z$  313.3, correspondente à perda da cabeça do fosfolípido glicosilada e da cadeia em *sn*-2. Este ião é visto nos espectros de LC-MS/MS da oxidação de PLPE e confirma a presença da cadeia *sn*-1 não transformada, sugerindo então, que a oxidação ocorra em *sn*-2 (Domingues *et al.*, 2008 (a)). A presença do ião  $m/z$  467.4, indica-nos a possível localização de um dos oxigénios inseridos. Este ião surge após a saída da cabeça glicosilada do fosfolípido e após quebra da ligação C-C entre a posição 9 e 10, o que sugere que um dos átomos de oxigénio se terá ligado em C9, provocando o encurtamento da cadeia (Esquema 16). Sugerimos que o outro átomo de oxigénio estivesse localizado numa posição na cadeia em *sn*-2 superior a C9. Estes resultados estão concordantes com estudos realizados anteriormente na oxidação de PE (Domingues *et al.*, 2008 (a)) que referem que dentro dos iões identificados nos

produtos de oxidação de cadeia longa, os mais abundantes eram os que apresentam oxidação em C9.

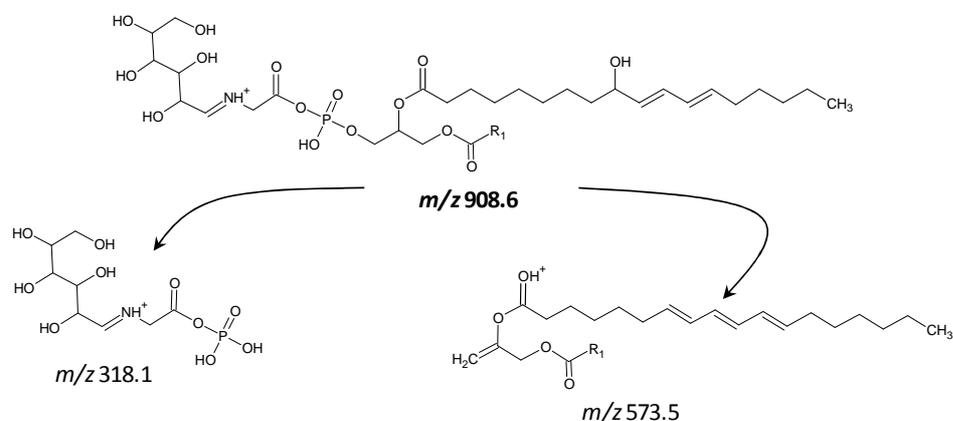


**Esquema 16.** Produtos formados a partir da fragmentação por LC-MS/MS do produto de oxidação [PLPE-Glucose+H]<sup>+</sup> de  $m/z$  908.6, a um RT de 23,1 minutos.

A Figura 24-B referente à análise por LC-MS/MS do ião  $m/z$  908.6 com tempo de eluição de 26.0 minutos, revela-nos a presença de um ião fragmento de abundância relativa elevada  $m/z$  573.5. Este ião já foi visualizado no espectro de LC-MS/MS relativo ao ião 894.5 com tempo de retenção de 25,2 minutos. Sugerimos que este ião surja após a saída da cabeça oxidada do fosfolípido combinada com a saída do grupo hidroxilo presente na cadeia em *sn*-2, sob a forma de uma molécula de água, formando uma ligação dupla

(Esquema 17). A presença do ião fragmento  $m/z$  318.1 no espectro, confirma-nos que a cabeça glicosilada do fosfolípido está oxidada, com formação de um grupo cetona.

Com base nestes dados, verificamos que o produto de oxidação de cadeia longa da PLPE-Glucose  $[M+H]^+$   $m/z$  908.6 com inserção de dois átomos de oxigénio elui a dois RT distintos e que essa diversidade se deve a diferenças posicionais dos átomos de oxigénio inseridos. Assim, no RT de 23,1 minutos, os dois oxigénios estão inseridos na cadeia *sn*-2 do fosfolípido e a um RT de 26,0 minutos, um átomo de oxigénio está inserido na cadeia *sn*-2 e o outro está na cabeça do fosfolípido, sob a forma de cetona.



**Esquema 17.** Produtos formados a partir da fragmentação por LC-MS/MS do produto de oxidação  $[PLPE-Glucose+H]^+$  de  $m/z$  908.6, a um RT de 26,0 minutos.

Todos os iões que obtivemos com dois tempos de retenção, mostraram diferenças posicionais dos átomos de oxigénio inseridos. Nos iões com inserção de um átomo de oxigénio ( $m/z$  892.6 e 894.6), podemos verificar que nos RT mais baixos (24,1 e 23,6 minutos), o oxigénio estava situado na cadeia do fosfolípido e que no tempo de retenção mais elevado (28,0 e 25,2 minutos) o oxigénio se encontra inserido na cabeça glicosilada do fosfolípido. No ião estudado com inserção de dois átomos de oxigénio ( $m/z$  908.6) verificamos que no tempo de retenção mais curto (23,1 minutos) os oxigénios se encontram ambos na cadeia do fosfolípido e que no tempo de retenção mais longo (26,0

minutos) um dos oxigénios se encontra situados na cadeia do fosfolípido e o outro na sua cabeça glicosilada. Desta forma, propomos que os iões que apresentam oxidação na cabeça apresentam tempos de retenção mais elevados. Este facto está associado às diferenças de polaridade que o fosfolípido adquire com a inserção do átomo de oxigénio na cabeça. Quando o oxigénio se liga à cabeça da PLPE-Glucose, esta adquire propriedades menos polares, aumentando a afinidade pelo revestimento da coluna utilizada na separação e por este motivo, apresentam um RT mais longo.

## 5.6 Conclusões

Os produtos de oxidação formados a partir da oxidação da PLPE-Glucose, através da reacção de Fenton, foram analisados por LC-MS e LC-MS/MS e descritos neste capítulo. Através do uso desta tecnologia, conseguimos identificar os produtos de oxidação de cadeia curta com formação de um grupo aldeído e de um ácido carboxílico, já estudados anteriormente por ESI-MS. Além destes produtos de cadeia curta, conseguimos identificar também produtos de oxidação de cadeia longa com inserção de um, dois e três átomos de oxigénio. Através do uso do LC-MS/MS, conseguimos também obter informação estrutural de isómeros posicionais com inserção de um e dois átomos de oxigénio, revelando o seu posicionamento na cadeia em *sn-2*, mas também na cabeça glicosilada do fosfolípido, com apresentação de um RT mais elevado.

No futuro, com o uso de condições de eluição diferentes, esperamos obter a separação de ainda mais produtos de oxidação da PLPE-Glucose e mais informação estrutural desses produtos.

Apesar de estes resultados apresentarem sustentabilidade, com base em estudos realizados anteriormente na oxidação de PE e PC, consideramos que devem ser sujeitos a novos estudos por espectrometria de massa, de modo a obtermos mais informação sobre estes fragmentos de produtos de oxidação.

## **Capítulo 6**

### **Conclusões**

## 6 Conclusões

Com a realização deste trabalho foi possível criar um modelo de síntese entre fosfatidiletanolaminas e glicose. A monitorização desta reacção por ESI-MS e por TLC, permitiu confirmar a presença de fosfatidiletanolaminas glicosiladas na mistura reaccional. O estudo destes aductos por espectrometria de massa e espectrometria de massa *tandem*, possibilitou a sua caracterização e a identificação das principais vias de fragmentação destes compostos. De entre as diferentes vias, destaca-se a perda da cabeça glicosilada do fosfolípido, caracterizada pela perda de 303 Da. A identificação desta perda nos espectros de MS/MS, fazem o diagnóstico da presença de fosfatidiletanolaminas glicosiladas numa mistura.

Ao colocar as fosfatidiletanolaminas em condições oxidativas, nomeadamente por radicais hidroxilo, permitiu estudar e avaliar o seu comportamento nessas circunstâncias. Assim, foi possível verificar que as fosfatidiletanolaminas são mais susceptíveis à oxidação, quando se encontram na sua forma glicosilada. A glicosilação de fosfolípidos leva à oxidação destas moléculas mais rapidamente, do que quando se encontram na sua forma nativa.

A oxidação de PE glicosiladas levou à formação de produtos de oxidação. Os produtos de oxidação formados foram identificados por ESI-MS e LC-MS como produtos de cadeia longa e curta. Os produtos de oxidação de cadeia curta foram identificados como produtos de cadeia curta com terminal aldeído e terminal ácido carboxílico. Os produtos de oxidação de cadeia longa foram identificados como derivados hidroxilados, ceto-hidroxilados e peroxilados ou di-hidroxilados.

Os produtos de oxidação identificados foram estudados por ESI-MS/MS e LC-MS/MS, o que permitiu a sua caracterização e identificação das principais vias de fragmentação. Este estudo permitiu localizar em que zona da fosfatidiletanolamina glicosilada é que ocorreu a oxidação. Assim, verificou-se que a oxidação ocorreu na cadeia carbonada insaturada em *sn-2* e curiosamente em grande extensão na cabeça glicosilada do fosfolípido.

As alterações que ocorrem em fosfolípidos na presença de elevadas concentrações de glicose, levando à sua glicosilação e aumento de susceptibilidade oxidativa, foram aqui demonstradas e estudadas. A peroxidação em fosfolípidos glicosilados pode ocorrer *in vivo* e

está associada a vários mecanismos envolvidos no início e progressão de diversas doenças crónicas, tais como a DM, aterosclerose e Alzheimer.



**Capitulo 7**  
**Referências Bibliográficas**

## 7 Referências Bibliográficas

- Adachi, J., N. Yoshioka, R. Funae, H. Nushida, M. Asano and Y. Ueno (2004). "Determination of phosphatidylcholine monohydroperoxides using quadrupole time-of-flight mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **806**(1): 41-6.
- Adachi, J., N. Yoshioka, M. Sato, K. Nakagawa, Y. Yamamoto and Y. Ueno (2005). "Detection of phosphatidylcholine oxidation products in rat heart using quadrupole time-of-flight mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **823**(1): 37-43.
- Bacot, S., N. Bernoud-Hubac, N. Baddas, B. Chantegrel, C. Deshayes, A. Doutheau, *et al.* (2003). "Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses." J Lipid Res **44**(5): 917-26.
- Bacot, S., N. Bernoud-Hubac, B. Chantegrel, C. Deshayes, A. Doutheau, G. Ponsin, *et al.* (2007). "Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals." J Lipid Res **48**(4): 816-25.
- Bayir, H., V. A. Tyurin, Y. Y. Tyurina, R. Viner, V. Ritov, A. A. Amoscato, *et al.* (2007). "Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: an oxidative lipidomics analysis." Ann Neurol **62**(2): 154-69.
- Bernoud-Hubac, N., L. B. Fay, V. Armarnath, M. Guichardant, S. Bacot, S. S. Davies, *et al.* (2004). "Covalent binding of isoketals to ethanolamine phospholipids." Free Radic Biol Med **37**(10): 1604-11.
- Breitling-Utzmann, C. M., A. Unger, D. A. Friedl and M. O. Lederer (2001). "Identification and quantification of phosphatidylethanolamine-derived glucosylamines and aminoketoses from human erythrocytes--influence of glycation products on lipid peroxidation." Arch Biochem Biophys **391**(2): 245-54.
- Cheng, Z. and Y. Li (2007). "What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: an update." Chem Rev **107**(3): 748-66.
- DeLong, C. J., P. R. Baker, M. Samuel, Z. Cui and M. J. Thomas (2001). "Molecular species composition of rat liver phospholipids by ESI-MS/MS: the effect of chromatography." J Lipid Res **42**(12): 1959-68.
- Domingues, M. R., A. Reis and P. Domingues (2008 (b)). "Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids." Chem Phys Lipids **156**(1-2): 1-12.
- Domingues, M. R., C. Simoes, J. P. Costa, A. Reis and P. Domingues (2008 (a)). "Identification of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylethanolamine modifications under oxidative stress conditions by LC-MS/MS." Biomedical Chromatography **22**: under revision.
- Engelmann, B., C. Brautigam and J. Thiery (1994). "Plasmalogen phospholipids as potential protectors against lipid peroxidation of low density lipoproteins." Biochem Biophys Res Commun **204**(3): 1235-42.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." Science **246**(4926): 64-71.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

- Fruhwrith, G. O., A. Loidl and A. Hermetter (2007). "Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease." Biochim Biophys Acta **1772**(7): 718-36.
- Gugiu, B. G., C. A. Mesaros, M. Sun, X. Gu, J. W. Crabb and R. G. Salomon (2006). "Identification of oxidatively truncated ethanolamine phospholipids in retina and their generation from polyunsaturated phosphatidylethanolamines." Chem Res Toxicol **19**(2): 262-71.
- Han, X. and R. W. Gross (1995). "Structural Determination of Picomole Amounts of Phospholipids Via Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **6**(12): 1202-1210.
- Harris, D. C. (2005). Análise química quantitativa. Rio de Janeiro, LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.
- Higuchi, O., K. Nakagawa, T. Tsuzuki, T. Suzuki, S. Oikawa and T. Miyazawa (2006). "Aminophospholipid glycation and its inhibitor screening system: a new role of pyridoxal 5'-phosphate as the inhibitor." J Lipid Res **47**(5): 964-74.
- Hsu, F. F. and J. Turk (2000). "Characterization of phosphatidylethanolamine as a lithiated adduct by triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization." J Mass Spectrom **35**(5): 595-606.
- Hullin, F., H. Y. Kim and N. Salem, Jr. (1989). "Analysis of aminophospholipid molecular species by high performance liquid chromatography." J Lipid Res **30**(12): 1963-75.
- Ishida, M., T. Yamazaki, T. Houjou, M. Imagawa, A. Harada, K. Inoue, *et al.* (2004). "High-resolution analysis by nano-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the identification of molecular species of phospholipids and their oxidized metabolites." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(20): 2486-94.
- Januszewski, A. S., N. L. Alderson, A. J. Jenkins, S. R. Thorpe and J. W. Baynes (2005). "Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids." J Lipid Res **46**(7): 1440-9.
- Kalousova, M., T. Zima, V. Tesar, S. Dusilova-Sulkova and J. Skrha (2005). "Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background." Mutat Res **579**(1-2): 37-46.
- Kerwin, J. L., A. R. Tuininga and L. H. Ericsson (1994). "Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry." J Lipid Res **35**(6): 1102-14.
- Lederer, M. O. and M. Baumann (2000). "Formation of a phospholipid-linked pyrrolecarbaldehyde from model reactions of D-glucose and 3-deoxyglucosone with phosphatidyl ethanolamine." Bioorg Med Chem **8**(1): 115-21.
- Maeba, R. and N. Ueta (2003). "Ethanolamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers." J Lipid Res **44**(1): 164-71.
- Marathe, G. K., K. A. Harrison, R. C. Murphy, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman and T. M. McIntyre (2000). "Bioactive phospholipid oxidation products." Free Radic Biol Med **28**(12): 1762-70.
- Moesgaard, B., J. W. Jaroszewski and H. S. Hansen (1999). "Accumulation of N-acyl-ethanolamine phospholipids in rat brains during post-decapitative ischemia: a 31p NMR study." J Lipid Res **40**(3): 515-21.
- Morand, O. H., R. A. Zoeller and C. R. Raetz (1988). "Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation." J Biol Chem **263**(23): 11597-606.

- Nakagawa, K., J.-H. Oak, O. Higuchi, T. Tsuzuki, S. Oikawa, H. Otani, *et al.* (2005). "Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma with or without diabetes." J Lipid Res **46**: 2514-2524.
- Niki, E., Y. Yoshida, Y. Saito and N. Noguchi (2005). "Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 668-76.
- Oak, J., K. Nakagawa and T. Miyazawa (2000). "Synthetically prepared Amadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid peroxidation via free radical reactions." FEBS Lett **481**(1): 26-30.
- Oak, J. H., K. Nakagawa, S. Oikawa and T. Miyazawa (2003). "Amadori-glycated phosphatidylethanolamine induces angiogenic differentiations in cultured human umbilical vein endothelial cells." FEBS Lett **555**(2): 419-23.
- Oranje, W. A. and B. H. Wolffenbuttel (1999). "Lipid peroxidation and atherosclerosis in type II diabetes." J Lab Clin Med **134**(1): 19-32.
- Pulfer, M. and R. C. Murphy (2003). "Electrospray mass spectrometry of phospholipids." Mass Spectrom Rev **22**(5): 332-64.
- Ramanadham, S., A. Bohrer, R. W. Gross and J. Turk (1993). "Mass spectrometric characterization of arachidonate-containing plasmalogens in human pancreatic islets and in rat islet beta-cells and subcellular membranes." Biochemistry **32**(49): 13499-509.
- Ramasamy, R., S. J. Vannucci, S. S. Yan, K. Herold, S. F. Yan and A. M. Schmidt (2005). "Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation." Glycobiology **15**(7): 16R-28R.
- Ravandi, A., A. Kuksis, L. Marai and J. J. Myher (1995). "Preparation and characterization of glucosylated aminoglycerophospholipids." Lipids **30**(10): 885-91.
- Ravandi, A., A. Kuksis, L. Marai, J. J. Myher, G. Steiner, G. Lewisa, *et al.* (1996). "Isolation and identification of glycated aminophospholipids from red cells and plasma of diabetic blood." FEBS Lett **381**(1-2): 77-81.
- Ravandi, A., A. Kuksis and N. A. Shaikh (1999). "Glycated phosphatidylethanolamine promotes macrophage uptake of low density lipoprotein and accumulation of cholesteryl esters and triacylglycerols." J Biol Chem **274**(23): 16494-500.
- Ravandi, A., A. Kuksis and N. A. Shaikh (2000). "Glucosylated glycerophosphoethanolamines are the major LDL glycation products and increase LDL susceptibility to oxidation: evidence of their presence in atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(2): 467-77.
- Reis, A., M. R. Domingues, F. M. Amado, A. J. Ferrer-Correia and P. Domingues (2007). "Radical peroxidation of palmitoyl-linoleoyl-glycerophosphocholine liposomes: Identification of long-chain oxidised products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **855**(2): 186-99.
- Reis, A., P. Domingues, A. J. Ferrer-Correia and M. R. Domingues (2004 (a)). "Fragmentation study of short-chain products derived from oxidation of diacylphosphatidylcholines by electrospray tandem mass spectrometry: identification of novel short-chain products." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(23): 2849-58.
- Reis, A., P. Domingues, A. J. Ferrer-Correia and M. R. Domingues (2004 (b)). "Tandem mass spectrometry of intact oxidation products of diacylphosphatidylcholines:

- evidence for the occurrence of the oxidation of the phosphocholine head and differentiation of isomers." *J Mass Spectrom* **39**(12): 1513-22.
- Sergent, O., I. Morel and J. Cillard (1999). "Involvement of metal ions in lipid peroxidation: biological implications." *Met Ions Biol Syst* **36**: 251-87.
- Simoës, C., V. Simoës, A. Reis, P. Domingues and M. R. Domingues (2008). "Determination of the fatty acyl profiles of phosphatidylethanolamines by tandem mass spectrometry of sodium adducts." *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**(20): 3238-44.
- Spickett, C. M. and G. Dever (2005). "Studies of phospholipid oxidation by electrospray mass spectrometry: from analysis in cells to biological effects." *Biofactors* **24**(1-4): 17-31.
- Spickett, C. M., N. Rennie, H. Winter, L. Zambonin, L. Landi, A. Jerlich, *et al.* (2001). "Detection of phospholipid oxidation in oxidatively stressed cells by reversed-phase HPLC coupled with positive-ionization electrospray [correction of electroscopy] MS." *Biochem J* **355**(Pt 2): 449-57.
- Spiteller, G. (2006). "Peroxy radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products." *Free Radic Biol Med* **41**(3): 362-87.
- Stryer, L. (1987). *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Tsuji, K., Y. Kawai, Y. Kato and T. Osawa (2003). "Formation of N-(hexanoyl)ethanolamine, a novel phosphatidylethanolamine adduct, during the oxidation of erythrocyte membrane and low-density lipoprotein." *Biochem Biophys Res Commun* **306**(3): 706-11.
- Tyurina, Y. Y., V. A. Tyurin, Q. Zhao, M. Djukic, P. J. Quinn, B. R. Pitt, *et al.* (2004). "Oxidation of phosphatidylserine: a mechanism for plasma membrane phospholipid scrambling during apoptosis?" *Biochem Biophys Res Commun* **324**(3): 1059-64.
- Vlassara, H. and M. R. Palace (2003). "Glycooxidation: the menace of diabetes and aging." *Mt Sinai J Med* **70**(4): 232-41.
- Wang, J., Y. M. Lu, B. Z. Liu and H. Y. He (2008). "Electrospray positive ionization tandem mass spectrometry of Amadori compounds." *J Mass Spectrom* **43**(2): 262-4.
- Wenk, M. R. (2005). "The emerging field of lipidomics." *Nat Rev Drug Discov* **4**(7): 594-610.
- Whitehouse, C. M., R. N. Dreyer, M. Yamashita and J. B. Fenn (1985). "Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers." *Anal Chem* **57**(3): 675-9.
- Wolf, C. and P. J. Quinn (2008 (a)). "Lipidomics: practical aspects and applications." *Prog Lipid Res* **47**(1): 15-36.
- Wolf, C. and P. J. Quinn (2008 (b)). "Lipidomics in diagnosis of lipidoses." *Subcell Biochem* **49**: 567-88.
- Zieseniss, S., S. Zahler, I. Muller, A. Hermetter and B. Engelmann (2001). "Modified phosphatidylethanolamine as the active component of oxidized low density lipoprotein promoting platelet prothrombinase activity." *J Biol Chem* **276**(23): 19828-35.