UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES - UNISTRA

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE ET BIOTECHNOLOGIE – UFAL

THÈSE EN COTUTELLE

présentée par:

Cavalcante Ferreira-Junior Genildo

soutenue le : **21 février 2017**

TITRE de la thèse

Análise simultanea de carboximetilisina, pentosidina e pirralina em derivados lácteos por LC-MS/ESI (Q-TOF) após purificação e concentração em fase sólida (SPE) por troca iônica

Analyse simultanée de carboxymethyllysine, pentosidine et pyrraline dans les produits laitiers par LC-MS/ESI (Q-TOF) après purification et concentration en phase solide (SPE) par échange d'ions

THÈSE dirigée par:

M. Eric Marchioni	Professeur, université de Strasbourg
M. João Xavier Araújo-Junior	Professeur, Universidade Federal de Alagoas

RAPPORTEURS:

M. Mario Roberto Meneghetti	Professeur, Universidade Federal de Alagoas
Mme. Simoni M. P. Meneghetti	Professeur, Universidade Federal de Alagoas

Discipline : chimie analytique

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Escola de Doutorado de Ciências Química - UNISTRA

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – UFAL

TESE EM CO-TUTELA

apresentada por:

Cavalcante Ferreira-Junior Genildo

Defendida em: **21 fevereiro de 2017**

TÍTULO da tese

Análise simultânea de carboximetilisina, pentosidina e pirralina em derivados lácteos por LC-MS/ESI (Q-TOF) após purificação e concentração em fase sólida (SPE) por troca iônica

Analyse simultanée de carboxymethyllysine, pentosidine et pyrraline dans les produits laitiers par LC-MS/ESI (Q-TOF) après purification et concentration en phase solide (SPE) par échange d'ions

Orientadores:

M. Eric Marchioni	Professor, université de Strasbourg
M. João Xavier Araújo-Junior	Professor, Universidade Federal de Alagoas

Banca examinadora:

M. Mario Roberto Meneghetti	Professor, Universidade Federal de Alagoas
Mme. Simoni M. P. Meneghetti	Professora, Universidade Federal de Alagoas

Cavalcante Ferreira-Junior Genildo

Analyse simultanée de carboxymethyllysine, pentosidine et pyrraline dans les produits laitiers par LC-MS/ESI (Q-TOF) après purification et concentration en phase solide (SPE) par échange d'ions

Résumé

Les produits de réaction de Maillard apportent des caractéristiques organoleptiques souhaitables aux aliments (couleur, odeur et le goût), contribuant ainsi à leur acceptabilité par le consommateur. Toutefois, plusieurs effets délétères physiopathologiques (vieillissement, diabètes) ont été attribués aux produits de glycation avancés (AGE). Le but de ce travail a concerné la détermination simultanée par LC-MS/ESI (Q-ToF) des carboxyméthyllysine (CML), pentosidine (Pen) et pyrraline (Pyr) dans des échantillons de lait chauffés ou non, après purification et concentration en phase solide (SPE) par échange d'ions. Les échantillons de lait en suite ont été soumis à une hydrolyse acide avec HCl à 37%, une précipitation des protéines avec un mélange méthanol/acétone et une digestion enzymatique des protéines pendant 30 heures à 37°C. Après l'étape d'extraction, les échantillons ont été concentrés/purifiés par SPE avec cartouches échangeuses d'ions puis analysés par LC-MS/ESI (Q-ToF). Les cartouches d'échange d'ions ont permis d'obtenir une excellente récupération des AGEs (89%, 95% et 117% pour la CML, Pen et Pyr, respectivement), valeurs bien plus élevées que celles qui ont pu être obtenues avec des cartouches de type C18. La concentration/purification par SPE est une étape qui mérite une attention particulière pour la détermination et quantification des AGEs. Parmi les AGEs analysés, seule la Pyr a pu être retrouvée dans des échantillons de lait et celà à des valeurs comprises 0,021 ng/mg de protéines (lait écrémé) et 8,367 ng/mg (lait stérilisé).

Mots-clés: Produits avancés de glycation, carboxymethyllisine, pentosidine, pyrralina, colonne SPE échange d'ions, LC-MS.

Résumé en anglais

Maillard reaction products provide desirable organoleptic characteristics to foods (color, odor and taste), thus contributing to their acceptability by the consumer. However, several deleterious pathophysiological effects (aging, diabetes) have been attributed to advanced glycation products (AGEs). The aim of this work was to determine the simultaneous determination by LC-MS/ESI (Q-ToF) of carboxymethyllysine (CML), pentosidine (Pen) and pyrraline (Pyr) in milk samples heated or non-heated after purification and solid phase concentration (SPE) by ion exchange. Subsequent the milk samples were subjected to acid hydrolysis with 37% HCl, protein precipitation with a methanol / acetone mixture and enzymatic protein digestion for 30 hours at 37°C. Après l'étape d'extraction, les échantillons ont été concentrés/purifiés par SPE avec cartouches échangeuses d'ions puis analysés par LC-MS/ESI (Q-ToF). Ion exchange cartridges have resulted in excellent recovery of AGEs (89%, 95% and 117% for the CML, Pen and Pyr, respectively), much higher than those obtained with C18 cartridges. The concentration/purification by SPE is a step that deserves special attention for the determination and quantification of AGEs. Between the AGEs analyzed, only Pyr could be found in milk samples and the values were 0.021 ng/mg protein (skimmed milk) and 8.367 ng/mg (sterilized milk).

Keywords: Advanced glycation endproducts, carboxymethyllysine, pentosidine, pyrraline. ion exchange SPE column, LC-MS.

Résumé en portugais

Os produtos da reação de Maillard fornecem propriedades organolépticas desejáveis para alimentos (cor, cheiro e sabor), contribuindo assim para a sua aceitação pelos consumidores. No entanto, vários efeitos deletérios fisiopatológicos (envelhecimento, diabetes) são atribuídos aos produtos da glicação avançada (AGEs). O objetivo deste trabalho foi à determinação simultânea por LC-MS/ESI (Q-ToF) de carboximetillisine (CML), a pentosidina (PEN) e pirralina (Pyr) em amostras de leite aquecido ou não, após purificação e concentração fase sólida (SPE) por troca iônica. As amostras de leite foram subsequentemente submetidas a uma hidrólise ácida com HCl a 37%, a uma precipitação da proteína com uma mistura de metanol/acetona e uma digestão enzimática durante 30 horas a 37°C. Após a etapa de extração, as amostras foram concentradas/purificado por SPE, com cartuchos de troca iônica e analisadas por LC-MS/ESI (Q-ToF). Os cartuchos de troca iônica permitiram obter uma excelente recuperação dos AGEs (89%, 95% e 117% para CML, Pen e Pyr, respectivamente), sendo valores bem mais elevados do que os que podem ser obtidos com cartuchos de C18. A concentração/purificação por SPE é um etapa que merece uma atenção especial para a determinação e quantificação de AGEs. Entre os AGEs analisados, apenas Pyr foi encontrado nas amostras de leite, sendo observado valores para Pyr entre 0,021 ng/mg de proteína (leite desnatado) e 8367 ng/mg (leite esterilizado).

Palavra-chave*: Produtos de glicação avançada, carboximetilina, pentosidina, pirralina, coluna SPE de troca iônica, LC-MS.*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **GENILDO CAVALCANTE FERREIRA JÚNIOR** intitulada: **"ANÁLISE SIMULTANEA DE CARBOXIMETILISINA, PENTOSIDINA E PIRRALINA EM DERIVADOS LÁCTEOS POR LC-MS/ESI (Q-TOF) APÓS PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) POR TROCA IÔNICA"**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 21 de Fevereiro de 2017, às 09h, na Sala de Aulas da Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA.

Prof. Dr Eric Marchioni
(Université de Strasbourg)

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
(ESENFAR/UFAL)

Êurica A. N. Ribeiro
Profª Drª Êurica Adélia Nogueira Ribeiro
(ESENFAR/UFAL)

Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti
(PPGQB/IQB/UFAL)

Profª Drª Simoni Margareti Plentz Meneghetti
(PPGQB/IQB/UFAL)

Ticiano Gomes do Nascimento
Prof. Dr Ticiano Gomes do Nascimento
(ESENFAR/UFAL)

Remerciemens

Je tiens d'abord à remercier sincèrement le Pr. Eric Marchioni pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à l'université de Strasbourg et m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans la meilleure des ambiances. J'y ai vécu une expérience enrichissante à la fois intellectuelle et personnelle. Mais aussi pour son attention, sa gentillesse et la bien venue témoignée quand je suis arrivé à Strasbourg. Merci pour les longues et nombreuses discussions scientifiques, votre générosité et disponibilité.

Je voudrais exprimer ici ma plus sincère gratitude au Dr. Minjie Zhao pour l'attention, de la patience et son dévouement. Son aide a été essentielle pour le développement de ce travail. J'ai beaucoup appris pendant ces 16 mois. Je vous remercie de m'avoir aidé et encouragé dans l'organisation et la réalisation de mes travaux tout au long de ces mois.

Je remercie sincèrement le Pr. João Xavier pour m'avoir accepté comme doctorant, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse en France, ma plus sincère gratitude.

Un très grand merci à le Pr Ticiano Nascimento Gomes pour ses conseils scientifiques et personnelle.

Je remercie le CAPES et FAPEAL pour avoir financé cette thèse.

Merci à tous les autres membres de l'équipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, pour leur regard, les commentaires scientifiques qu'ils ont portés à mes travaux pendant ces 16 mois et pour ma voir permis de travailler dans une ambiance chaleureuse: Saïd pour sa disponibilité, Martine pour ses conseils scientifiques. Christophe pour sa gentillesse, sa bonne humeur permanente. Diane et Celine, pour leur gentillesse, Myriam, pour sa sympathie, sa gentillesse, sa diligence et tout le travail qu'elle fait pour nous rendre la vie au laboratoire plus facile. Merci aux thésards: Mamadou, Kamar, Randa, Yasmine, Ikram, Justine et Ye. Merci d'avoir fait de votre mieux pour m'aider chaque fois que je vous posais des questions sur ma thèse, et pour vos conseils personnels.

Un merci particuliers à Mamadou, Kamar et Randa ils étaient une famille pour moi pendant cette période. Merci pour nos nombreuses discussions, conseils avisés, enthousiasme, encouragement et pour les trés bons moments passés ensemble, merci de m'avoir poussé quand il le fallait pour que je donne le meilleur de moi et votre soutien dans les moments difficiles.

Merci à Michel et Fanny pour leurs gentillesse et générosité, pour m’avoir accueilli.

Merci à Laura, stagiaire au laboratoire, pour une grande aide et sa sympathie.

Enfin, un grand merci à ma famille pour son soutien continu, ses encouragements et conseils avisés. Et un grand merci à Pr. Maria Cristina Delgado pour ses encouragements.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Eric Marchioni por me receber em seu laboratório e ter me dando a oportunidade de realizar a minha tese no melhor ambiente possível. Eu vivi uma experiência gratificante, tanto intelectual e pessoal. Além disso, também lhe agradeço por sua atenção e recepção quando eu cheguei à Strasbourg. Obrigado pelas longas discussões científicas, sua gentileza, generosidade e disponibilidade.

Eu gostaria de expressar minha sincera gratidão a Dra. Minjie Zhao pela atenção, paciência e dedicação. Sua ajuda foi essencial para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Eu aprendi muito com ela durante esses 16 meses. Obrigado por me ajudar e incentivar na organização e realização do meu trabalho ao longo desse período.

Meus sinceros agradecimentos ao Pr. Dr. João Xavier por me aceitar como estudante de doutorado, e por ter me dado à oportunidade de realizar esta tese conjuntamente na França, a minha sincera gratidão.

Muito obrigado ao Prof. Dr. Ticiano Nascimento Gomes por sua disponibilidade, paciência e seus conselhos tanto científico como pessoal.

Agradeço a CAPES e FAPEAL por proporcionar o financiamento desta tese.

Obrigado a todos os outros membros da equipe de Química Analítica de Moléculas Bioativas, por suas observações e comentários científicos. Agradeço ao M. Saïd, por sua disponibilidade, Mm. Martine por seus conselhos científicos e Christophe por sua gentileza e seu bom humor constante. Agradeço também à Diane, Sônia e Celine, por sua gentileza, Miriam, por sua simpatia, gentileza, diligência e todo o trabalho que ela faz para tornar nossa vida mais fácil no laboratório. Obrigado aos estudantes de doutorado: Mamandou, Kamar, Randa, Yasmine, Ikram, Justine e Ye, obrigado por ter feito o melhor de vocês para me ajudar.

Um obrigado particular à Mamandou, Kamar e Randa, eles foram uma família para mim durante esse período. Obrigado pelas muitas discussões, conselhos

sábios, entusiasmo, incentivo e pelos bons momentos que passamos juntos, obrigado por me encorajar quando necessário e pelo apoio nos momentos difíceis.

Obrigado a Michel e Fanny por sua bondade e generosidade em me receber em sua residência.

Obrigado aos estagiários, em particular, Laura por sua grande ajuda e simpatia.

Finalmente, um agradecimento especial à minha família pelo incentivo, conselhos e apoio permanente. E um grande obrigado a Professora Dra. Maria Cristina Delgado que sempre me incentivou.

RÉSUMÉ

Introduction

Les produits finaux de glycation avancée (AGEs) peuvent être formés dans les aliments lors d'un traitement thermique et/ou lors de leur stockage. Ces produits ont été signalés avec nombreux effets pathologiques. Parmi ces molécules, certaines sont bien caractérisées dans les aliments et ont fait l'objet de plusieurs publications dans la littérature scientifique. Il s'agit essentiellement des N-ε-(carboxymethyl)lysine (CML), pentosidine (Pent) et pyrraline (Pyr) (Zhang et al., 2011; Hegele et al., 2008). Pour quantifier ces AGEs dans les aliments, des techniques chromatographiques, telles que GC/MS, LC/UV ou LC/MS ont été largement utilisées (Hegele et al., 2008).

En préalable à l'analyse chromatographique, les échantillons doivent être purifiés par extraction en phase solide (SPE). La cartouche SPE la plus propsée dans la littérature est constituée d'une phase inverse, le plus souvent de type C18. Cependant, cette phase apolaire n'est pas sélective ni affine pour des composés aussi polaires que le sont les AGEs, et cela même si des agents d'appariement d'ions sont ajoutés dans le solvant d'élution.

Le but de ce travail a concerné la mise au point d'une méthode d'analyse complète (extraction, purification, séparation et détection) des trois AGEs les plus souvent retrouvés dans les aliments soumis à un traitement thermique (CML, Pent et Pyr) et faisant partie des produits finaux de glycation avancée. Nous avons choisi d'étudier une matrice riche en protéine et en sucres, à savoir le lait en poudre, très consommé tant en France qu'au Brésil et représentant de ce fait une importante source d'exposition de la population à ces composés potentiellement toxiques.

Traitement des échantillons de lait

Les AGEs se trouvent soit sous forme libre soit sous une forme conjuguée avec des protéines présentes dans le lait en poudre. Afin de quantifier ces différentes formes des AGEs, les échantillons de lait ont été soumis à différentes méthodes de préparation des échantillons:

- Une hydrolyse acide avec de l'HCl à 37% pendant 24 heures et à 110°C, destinée à quantifier la totalité des AGEs (libres + conjugués).

- Une précipitation des protéines alimentaires avec un mélange méthanol/acétone (v:v) pendant 1 heure à -20°C, afin de quantifier uniquement les AGEs libres.
- Une digestion enzymatique à l'aide d'un mélange de pepsine, de pronase E, de leucine aminopeptidase et de prolidase, pendant 30 heures à 37°C, en vue de quantifier les AGEs totaux (libres + conjugués).

A la fin de chaque traitement, les différents échantillons ont été purifiés et concentrés par SPE.

Les échantillons ont été soumis à une étape de concentration et de purification, en utilisant des cartouches de deux types : C18 (Oasis HLB 6cc, 200 mg, Waters, Milford, MA, USA) et échange d'ions (Polyclean 30HCX, Interchim, Montluçon, Fr).

La cartouche C18 a été préconditionnée avec 4 mL de MeOH, puis 4 mL d'acide nonafluoropentanoique (ANFP, 10 mM) avec un débit de 2 mL/min. Les échantillons ont alors été déposés sur la cartouche à un débit de 0.5 ml/min. Celle-ci a été lavée successivement avec une fraction aliquote de 4 mL d'ANFP (10 mM) et avec 4 mL d'un mélange d'ANFP (10 mm)/MeOH (v/v; 95%:5%). Enfin, les fractions contenant AGEs ont été éluées avec 4 mL d'un mélange MeOH/ANFP 10 mM (v/v; 90%:10%) avec un débit de 0,5 mL/min.

La cartouche 30HCX a été préconditionnée avec 3 mL de MeOH, puis 3 mL d'eau milliQ acidifiée avec de l'acide formique à 0,1%. Un millilitre (1 mL) de l'échantillon a été déposé sur la cartouche à un débit de 0. 5 mL/min. Celle-ci a été lavée avec 3 mL d'eau milliQ acidifiée avec acide formique à 0,1% et 3 mL d'acetronitrile. Enfin, les composés cibles ont été élués avec 3 mL d'un mélange acétronitrile/ammoniaque (v/v; 95%:5%), puis avec 3 mL d'un mélange MeOH/ammoniaque (v/v ; 95%:5%) avec un débit de 0.5 mL/min.

Après l'étape SPE, les échantillons ont été évaporés à sec à l'aide d'un léger flux d'azote et le résidu obtenu a été reconstitué avec une solution aqueuse à 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et filtré avec un filtre (0,45 µm). Les filtrats ainsi obtenus ont été analysés par UPLC-ESI-Qq-TOF.

Analyse des AGEs par UPLC-ESI-Qq-TOF

Le chromatographe utilisé est de marque Waters (Aquity, UPLC). Il a été couplé avec un spectromètre de masse Qq-ToF de marque Bruker (µ-ToF). La séparation chromatographique a été réalisée avec une colonne Waters, ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm x 2,1 mm, 100 Å, 1,8 µm). La phase mobile était constituée de (A) eau MilliQ acidifiée avec 0,1% d'acide formique et de (B) acétonitrile acidifié avec 0,1% d'acide formique. Elle circulait avec un débit de 0,3 mL/min. L'élution a eté réalisée à l'aide d'un gradient décrit comme suit: 1-8% (0-3 min), 8-30% (3-8 min), 30% (8-13 min), 30-1% (13-13,5 min) et 1% (13,5-18 min). Le volume d'injection était de 2 µL. La détection en masse a été réalisée en mode positif (ESI). Les autres conditions de masse ont été comme suit: tension du capillaire, 4,5 kV ; gaz de nébulisation (N_2), 2,8 bar ; gaz séchant (N_2), 9,0 L/min à 200 °C. Les spectres de masse ont été enregistrés entre *m/z* 100-600.

Les Pent et Pyr sont instables dans la source (Zhang et al., 2011, Troise et al., 2014). Les essais d'optimisation des conditions d'introduction et d'ionisation n'ont pas permis d'obtenir les ions moléculaires majoritaires. Par conséquent, le fragment d'intensité la plus importante a été choisi pour chaque composé. Il s'agissait des m/z 135,65 pour Pent et m/z 175,12 pour Pyr. En revanche, CML est stable dans la source et l'ion moléculaire m/z 205,12 a pu être utilisé pour la quantification. Un étalon interne (E.I.), la théophylline, a été utilisé pour minimiser les erreurs produites lors de l'étape de purification et aussi lors de la détection par spectrométrie de masse. En effet, cet étalon interne a été ajouté juste avant l'étape de SPE. L'ion moléculaire *m/z* 181,07 a été suivi (Fig. 1).

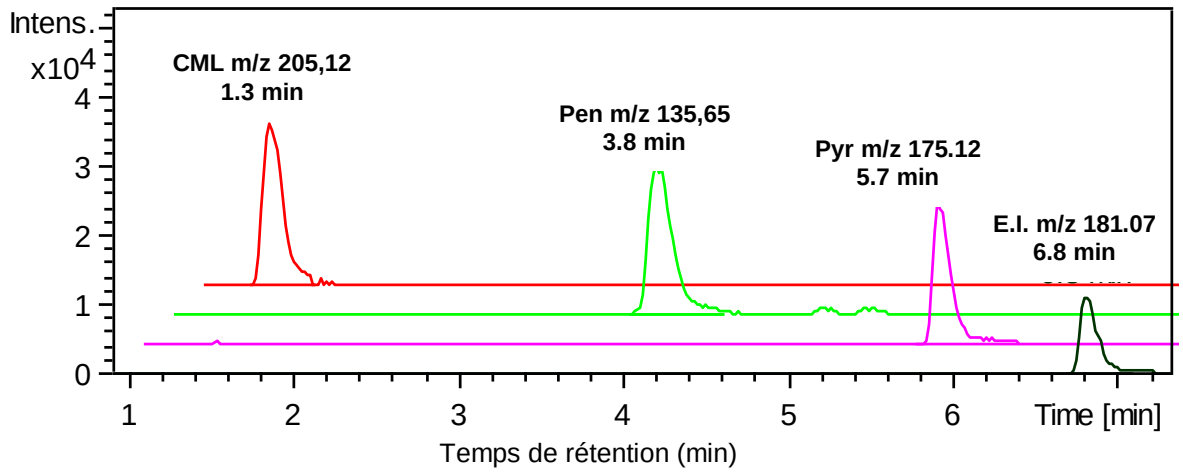


Figure 1. *Chromatogramme reconstruit des ions correspondant à CML m/z 205,12 (1,3 min); Pent m/z 135,65 (3,8 min); Pyr m/z 175,12 (5,7 min) et E.I. m/z 181,07 (6,8 min) d'une solution contenant un mélange des trois composés de référence.*

Selon Assar et al. (2009) et Zhang et al. (2011), en raison de la forte polarité des 3 AGEs, l'utilisation de colonnes de phase inverse telle que C18 nécessite d'un ajout de contre-ions, tel que l'ANFP dans la phase mobile. Cependant, la forte acidité de l'ANFP peut entraîner une détérioration rapide des colonnes de chromatographie (Sun, et al., 2015). De plus, nos expériences au laboratoire ont prouvé que l'utilisation de l'ANFP dans la phase mobile génèrait une très forte contamination du système chromatographique tout entier et entrainait, pendant des durées pouvant atteindre plusieurs mois, un bruit de fond très important lorsque le mode ESI négatif est utilisé. L'élimination complète de l'ANFP est très difficile, couteuse et chronophage. De ce fait, nous avons choisi d'utiliser la colonne ACQUITY UPLC HSS T3 et une phase mobile composée d'un mélange ACN-eau-acide formique. Les résultats chromatographiques obtenus sont très satisfaisants, comme le montre la Fig.1.

Purification et concentration des AGEs par SPE

Deux types de cartouches SPE ont été testés pour la purification et la concentration des trois AGEs cibles à partir des échantillons de lait hydrolysés et digérés comme décrit dans le paragraphe concernant le traitement des échantillons. Il s'agissait des cartouches de type phase inverse C18, et de type échangeur d'ion, polyclean 30HCX.

Les cartouches les plus utilisées dans la littérature pour purifier et concentrer les AGEs sont du type phase inverse C18. En raison de la forte polarité de ces AGEs, l'acide nonafluoropentanoïque (ANFP) est fréquemment ajouté dans la phase d'élution afin de former des sels entre ANFP et AGEs et ainsi augmenter l'affinité vis-à vis de la phase stationnaire (Hegele, Buetler & Delatour, 2008; Assar, et al., 2009; Niquet-Léridon & Tessier, 2011). Nous avons utilisé dans un premier temps ce type de cartouche et d'éluant pour purifier et concentrer les 3 AGEs. Il est en effet envisageable d'utiliser l'ANFP en tant que contre-ion pendant l'étape de purification par SPE puisque ce composé ne sera retrouvé qu'en très faibles quantités dans l'échantillon. S'il était utilisé comme contre-ion en chromatographie, il serait injecté en continu dans la phase mobile et serait alors à même d'induire les importantes contaminations déjà citées précédement. Les résultats obtenus sont présentés dans

le tableau 1. Nous observons que les rendements obtenus pour les 3 AGEs sont d'environ 65%, donc très loin d'être satisfaisants. En effet, malgré utilisation de plusieurs contre-ions (dont l'ANFP), une partie des AGEs a été éluée pendant l'étape de lavage destinée à éliminer les composés interférants.

Nous avons ensuite testé les cartouches du type 30HCX, échangeur d'ions (cations). Ce type de phase stationnaire est spécifique pour retenir des composés cationiques tels que les 3 AGEs en milieu acide (Sun et al. 2015). Pendant le développement de la technique avec ces cartouches 30HCX avec une phase mobile methanolique, nous avons observé que le pic de la Pyr (tr = 5,7 min) a complètement disparu du le chromatogramme de la solution des standards ayant été soumis à l'étape de SPE, et qu'un nouveau pic est apparu (tr = 7,5 min) (Figure 2). L'analyse du spectre de masse de ce nouveau pic et sa comparaison avec le spectre de masse de la Pyr standard, nous a conduit à comprendre que ce nouveau pic correspondait à l'ester méthylique de la Pyr. Le spectre de masse du nouveau pic à tr = 7,5 min présentait d'une part, l'ion moléculaire $[M+H]^+$ m/z 269,15 (formule brute $C_{13}H_{21}N_2O_4$) (correspondant à l'ester méthylique de la Pyr avec 1 adduit d'hydrogène) et un ion pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ m/z 291,13 correspondant au même ester mais avec un adduit de sodium. D'autre part tous les fragments observées dans ce pic restaient identiques à ceux de la Pyr standard, soit m/z 237,12 $[M-2O+H]^+$; m/z 219,11 $[M-2H_2O+H]^+$ et m/z 175,12 $[M-2H_2O-CO_2+H]^+$. En effet, l'ester méthylique de la Pyr est formé par une réaction entre la Pyr et le méthanol utilisé comme solvant d'élution lors de l'étape de SPE. Afin de résoudre ce problème de transformation, nous avons remplacé le méthanol par l'acétonitrile, et gardé les autres conditions SPE inchangées. Les résultats obtenus ont confirmé notre analyse puisque nous avons retrouvé le pic de Pyr à tr = 5,7 min et confirmé que le pic à tr = 7,5 min a complètement disparu lorsque l'éluant méthanol était substitué par l'acetronitrile.

Les rendements d'extraction obtenus pour les 3 AGEs lors de l'étape de SPE avec les cartouches 30HCX sont présentés dans le tableau 1. Nous avons remarqué qu'il n'y a pratiquement pas de perte après purification par SPE et ceci pour les 3 AGEs étudiés, puisque le taux de recouvrement moyen obtenu varie de 95 à 104%.

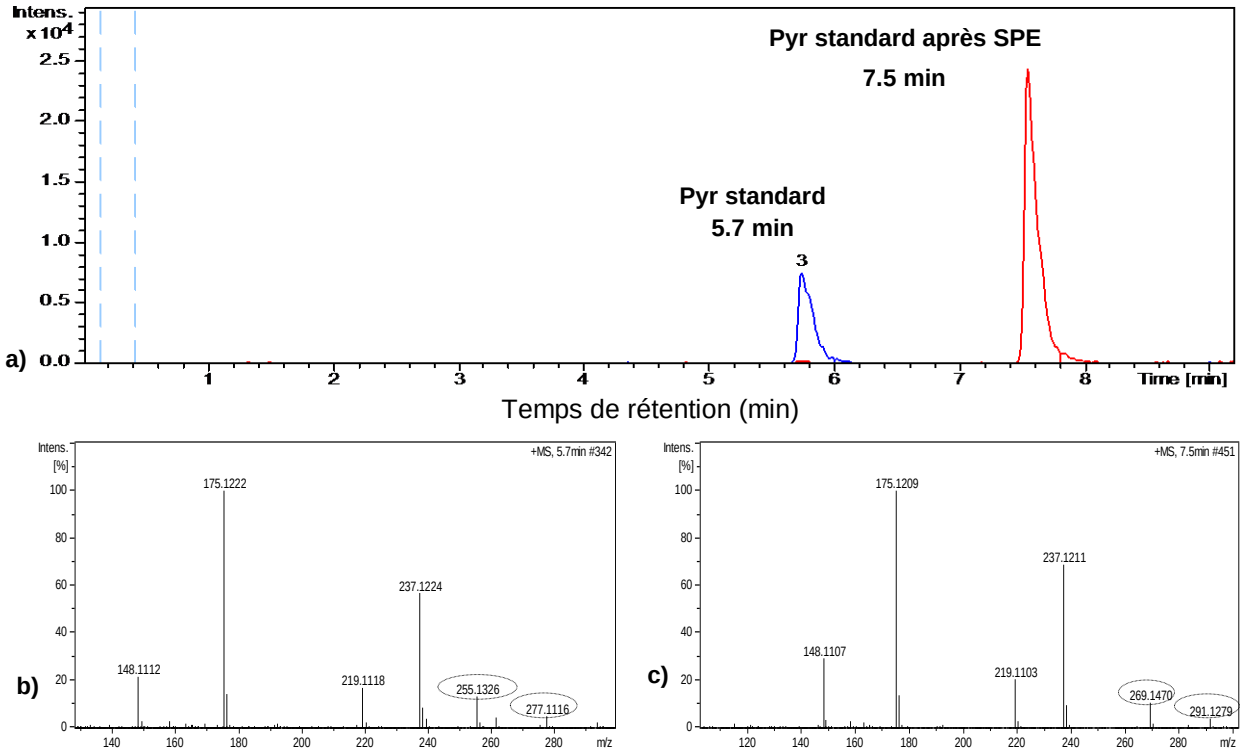


Figure 2. *Chromatogramme reconstitué de l'ion m/z 175,12 qui présente deux pics, respectivement celui de la Pyr (tr 5,7 min) et celui de son ester (tr = 7,5 min) (a), et spectres de masse correspondant à tr = 5,7 min (b) et tr = 7,5 min (C).*

Tableau 1*. Rendements de l'étape SPE obtenus avec les cartouches C18 et 30HCX*

AGEs	Conc. (µg/mL)	Rt (min)	Recouvrement (%)	
			C18	HCX
CML	30	1.3	65,1 ± 14,3	94,8 ± 7,0
Pent	4.5	3.8	63.5 ± 0,6	95,6 ± 25,4
Pyr	6.0	5.7	69,8 ± 6,4	104,3 ± 8,9

Analyse des 3 AGEs dans le lait

Nous avons appliqué les protocoles établis à l'analyse des 3 AGEs dans différents échantillons de lait, et recherché les AGEs totaux, conjugués et libres. Dans un premier temps, les AGEs totaux ont été cherchés dans le lait en poudre. Pour cela, le lait a été soumis à une hydrolyse acide, suivi par une purification par SPE (30HCX) et enfin une analyse par UPLC-ESI-Qq-ToF. Aucun des 3 AGEs a été

observé sur le chromatogramme et cela en dèpit du traitement thermique nécessaire à la production du lait en poudre. Ceci pourrait être expliqué soit par des conditions d'hydrolyse trop drastiques et donc non adaptées à nos molécules d'intérêt, entrainant une dégradation totale des AGEs présents dans le lait, soit par la concentration en AGEs qui serait inférieure au seuil de quantification (LoQ) de notre méthode d'analyse.

Dans une seconde étape, le lait a été soumis à une hydrolyse enzymatique à l'aide d'un cocktail d'enzymes contenant de la pepsine, de la pronase E, de la leucine aminopeptidase et de la prolidase, pendant une durée de 30 heures à une température de 37°C. Cette extraction doit permettre d'avoir un accès à tous les AGEs totaux (libre + conjugués). L'analyse LC-ESI-Qq-ToF, après l'étape de purification SPE, a montré que tous les echantillons de lait, excepté le lait frais, donc non chauffé, contenait de la Pyr (Fig. 3 b).

Dans une troisième étape, les echantillons de lait ont eté soumis à une etape de precipitation des protéines par un mélange MeOH/Acetone (v:v) à – 20°C pendant 1 heure. Ce protocole ne donne accès qu'aux AGEs libres, non liés aux protéines alimentaires. La pyrraline (Pyr) a alors pu être observée (Fig. 3a) sur les chromatogrammes. La comparaison des concentrations de Pyr retrouvées dans le lait soumis soit à une précipitation des protéines (partie libre de Pyr) soit à une digestion enzymatique (Pyr totaux) nous a permis de montrer que cette Pyr se présente sous ses deux formes: libre et conjuguée dans le lait et que la partie libre ne représente qu'environ un tiers de la totalité de Pyr du lait.

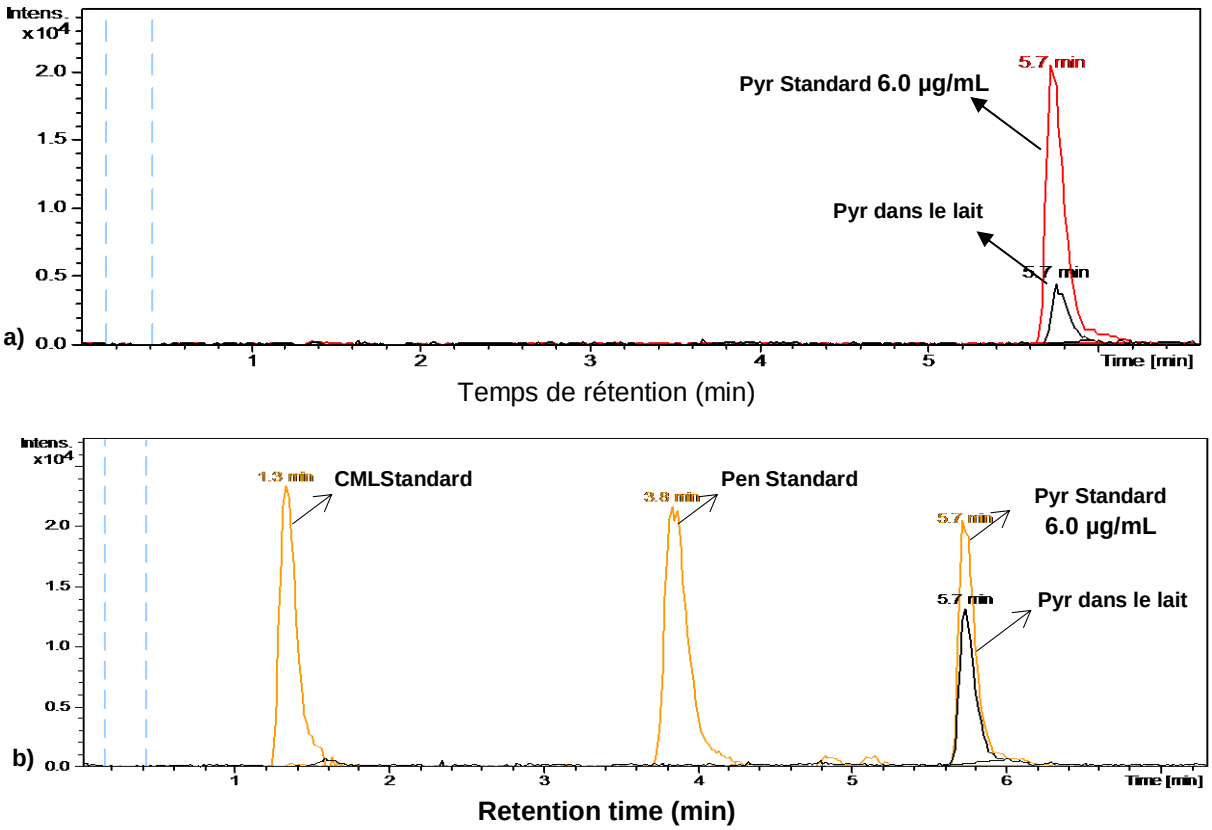


Figure 3. *Chromatogrammes reconstruit de l'ion m/z 175,12 (a) et des ions m/z 205,12 (CML ; 1,3 min); m/z 135,65 (Pent ; 3,8 min); m/z 175,12 (Pyr ; 5,7 min), montrant la présence de Pyr dans le lait frais soumis à précipitation des protéines (a) et à digestion enzymatique (b).*

La teneur en pyralline dans le lait est exprimée en (µg d'AGEs/mg de protéines) :

$$Teneur\ (\mu g/mg) = \frac{\frac{S2}{S4} \times C1 \times 0{,}2}{\frac{S1}{S3}} \Big/ \frac{M}{V1} \times V2$$

S_1 : surface du pic du standard de la pyrraline

S_2 : surface du pic de la pyrraline dans le lait

S_3 : surface du pic du standard de la théophylline

S_4 : surface du pic de la théophylline dans le lait

C_1 : concentration de la solution du standard en µg/mL

M : prise d'essai en mg

V1 : Volume total de la solution obtenue avant l'étape de SPE en mL

V2 : Volume déposé sur cartouche SPE en mL

Les teneurs en protéines du lait (exprimées en mg), ont été obtenues selon les informations contenues sur l'étiquetage des échantillons analysés.

Les concentrations de Pyr mesurées augmentaient lorsque des procédés thermiques étaient appliqués au lait préalablement à leur analyse (Tableau 2).

***Tableau 2**. Quantification de la Pyr libre et totale dans le lait*

Les échantillons	**Pyrraline**	
	Pyr_{libre} ng/mg^{-1} protéines du lait $^{-1}$	**Pyr_{totaux} ng/mg^{-1} protéines du lait $^{-1}$**
Lait cru	0,023 ± 0,00707	nd
Lait entier en poudre	0,035 ± 0,00513	1,467 ± 0,05774
Lait demiécrémé en poudre	0,059 ± 0,00889	0,150 ± 0,21213
Lait écrémé en poudre	0,021 ± 0,00071	0,967 ± 0,11547
Lait stérilisé	0,072 ± 0,00643	8,367 ± 0,70946

Nd. non détecté

Pyr_{libre} : lait soumis a une precipitation des protéines

Pyr_{total} : lait soumis a une digestion enzymatique

Dans les échantillons de lait cru (donc non chauffés), soumis à une digestion enzymatique, aucune trace de Pyr n'a pu être détectée. Les mêmes échantillons, lorsque soumis à une précipitation des protéines, ont révélés la présence de 0,023 ng de Pyr_{libre} par mg de protéine de lait. Cette concentration retrouvée dans le lait cru n'est pas sans poser de questions. Cette valeur est très proche de la LoQ (non déterminée selon les critères de l'ICH dans ce travail), mais reste toutes fois supérieure à 10 fois le bruit de fond retrouvé dans les chromatogrammes afférents à cette analyse des échantillons de lait crus (figure 4).

Le traitement thermique appliqué au lait est certainement la cause la plus probable de l'élévation du niveau Pyr observé dans le lait stérilisé. Cette

augmentation a été observée dans les échantillons soumis à la précipitation et la digestion enzymatique, où les valeurs de Pyr retrouvées étaient de 0,072 et 8,367 ng respectivement. Ces chiffres indiquent clairement le fait que la majorité de la Pyr retrouvée est sous forme liée aux protéines du lait. Nous avons tous regretté l'impossibilité de valider cette méthode d'analyse selon les critères de l'ICH. Une telle validation requiert en effet beaucoup de temps dont nous ne disposions pas. Par contre, elle aurait permis d'assoir nos résultats sur une base sure. Corroborant ces résultats, Hegele et al. (2008) ont également observé la présence de Pyr dans des échantillons de lait cru soumis à la précipitation des protéines. Ils ont observé des valeurs moyennes pour Pyr de 55,0 nmol/µmol^{-1}Lys^{-1}. Zhang et al. (2011) ont également rapporté la présence de Pyr dans les échantillons de amandes grillées, Ils ont observé 1,1 mg/kg pour la Pyr libre et 12,6 mg/kg pour la Pyr totaux. Il importe à le lecture de ces chiffres, de noter que nos résultats sont exprimés en ng d'AGEs par mg de protéine alors que ceux Hegele et al le sont en nmol d'AGEs par µmole de lysine, ce qui est très différent.

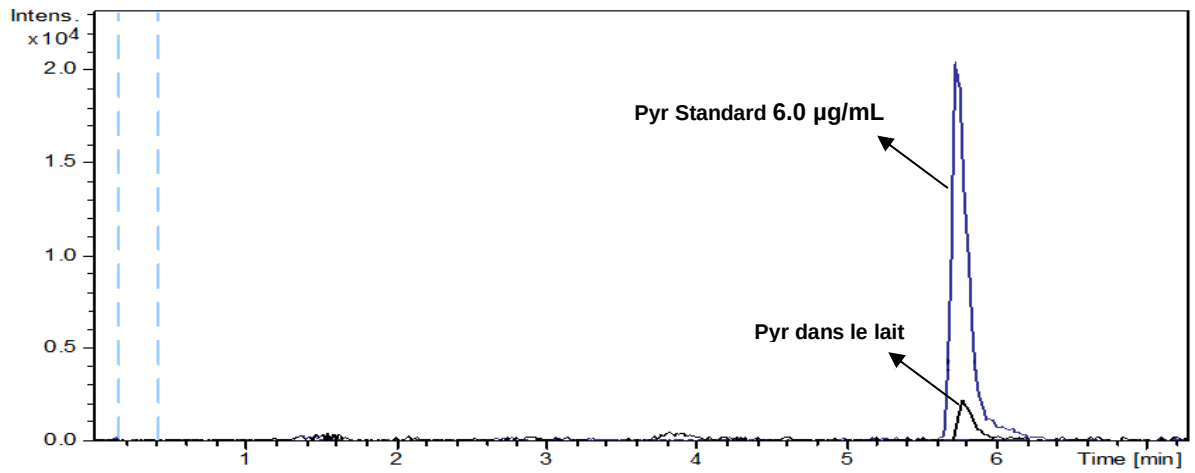


Figure 4. *Chromatogramme reconstruit de l'ion m/z 175,12, montrant la présence de Pyr$_{libre}$ dans le lait frais soumis à une analyse comprenant une précipitation des protéines*

Le protocole proposé repose sur l'utilisation d'une étape de purification/concentration par SPE sur une cartouche échangeuse de cations. Cette étape est fondamentale car elle permet de séparer les AGEs du reste des protéines alimentaires. Nos résultats démontrent bien que ce protocole est sélectif, qu'il

possède une zone de linéarité intéressante et permet d'obtenir des taux de recouvrement très élevés, proches de 100%, pour les trois AGEs recherchés (carboxyméthillysine, pentosidine et pyrraline). Malheuresement, le temps disponible nous a interdit de réaliser la validation de cette méthode selon les critères de l'ICH.

Lors de notre travail, nous avons déjà pu déterminer un certain nombre de paramètres de prévalidation de ce protocole, tels que les pentes des droites de linéarité, leurs coefficients de corrélation, leurs ordonnées à l'origine ainsi que les valeurs des taux de recouvrements. Il s'agit là d'une bonne partie du travail de validation et ces déterminants représentent une valeur ajoutée indéniable à la caractérisation de ce protocole et montre que la validation complète de ce protocole sera facilitée et réalisable avec succès. Par contre, la méthode de digestion enzymatique demande encore à être optimisée en terme de durée. Elle dure en effet 30 heures aujourd'hui, elle est complexe (elle nécessite 4 étapes d'hydrolyse) et présente encore l'inconvénient de dégrader la caboxyméthyllysine dont la surface des pics chromatographiques diminue lors de l'application de cette hydrolyse enzymatique.

Conclusion générale

Il a été possible de développer une méthode d'analyse qui permet d'extraire, de purifier et de concentrer sur une phase solide les trois AGEs d'intérêt (CML, Pen et Pyr). Ces trois composés ont, de plus, pu être séparés et quantifiés de façon indépendante par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (UPLC-ESI-Qq-ToF).

Les cartouches échangeuses de cations nous ont permis d'obtenir des taux de recouvrements très corrects lors de l'analyse des AGEs, puisqu'ils étaient bien supérieurs à ceux qui ont pu être obtenus avec des cartouches de type C18, habituellement utilisées pour la quantification des AGEs dans les aliments. Cependant, il convient de faire preuve de beaucoup de prudence lors de l'élution de ces composés hors des cartouches de purification essentiellement lors de la définition des solvants d'élution. Le méthanol est à proscrire. En effet, cette procédure est déterminante pour la quantification de ces composés. Par manque de temps, la méthode d'analyse proposée n'a pas pu être validée selon les critères de l'ICH. C'est regrettable. La présence de pyrraline a été observée dans tous les

échantillons analysés, lait en poudre entier, demi-écrémé, écrémé, stérilisé et lait frais microfiltré.

Perspectives

Pour achever cette étude, il conviendrait de réaliser la validation complète de la méthode d'analyse développée, avec des échantillons biologiques et alimentaires, en particulier avec les produits laitiers. Il conviendrait également de mettre en place une étude complète d'optimisation de l'étape d'hydrolyse enzymatique. En effet cette hydrolyse nécessite la parfaite maîtrise de très nombreux paramètres tels que les températures, les pH, les forces ioniques, les concentrations en enzymes, les possibilités de réaliser des concktail d'enzymes, l'ordre avec lequel ces hydrolyses doivent se succéder, etc.

Pour bien réaliser une telle étude il semble indispensable de mettre en place une véritable réflexion chimiométrique basée sur des évaluations de design matriciel multidimensionnel, des plans d'expérience et des analyses statistiques des résultats par composantes principales.

Références

Assar, S. H., Moloney, C., Lima, M., Magee, R., & Ames, J. M. (2009). Determination of Ne-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. Amino Acids, 36, 317–326.

Hegele, J., Buetler, T., Delatour, T. (2008). Comparative LC–MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. analytica chimica acta, 617, 85–96.

Niquet-Léridon, C., Tessier, F. J. (2011). Quantification of Ne-carboxymethyl-lysine in selected chocolateflavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. Food Chemistry,126, 655–663.

Sun, X., Tang, J., Wang, J., Rasco, B. A., Lai, K., Huang, Y. (2015). Formation of advanced glycation endproducts in ground beef under pasteurisation conditions. Food Chemistry, 172, 802–807.

Troise, A. D., Fiore, A., Colantuono, A., Kokkinidou, S., Peterson, D. G., Fogliano, V. (2014). Effect of Olive Mill Wastewater Phenol Compounds on Reactive Carbonyl Species and Maillard Reaction End- Products in Ultrahigh- Temperature-Treated Milk. J. Agric. Food Chem, 62, 10092−10100.

Zhang, G., Huang, G., Xiao, L., & Mitchell, A. E. (2011). Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (Prunus dulcis). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(22), 12037–12046.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de Maillard. 15
Figura 2. Geração de aldeídos intermediarios e degeneração de proteína envolvidos na formação de produtos AGEs 17
Figura 3. Estrutura do Hidroximetilfurfural (HMF). 18
Figura 4. Estrutura da Furosina. 18
Figura 5. Via envolvidas na formação de carboximetilisina (CML). 21
Figura 6. Mecanismos de formação da pentosidina, através de pentoses (a) e de gliceraldeído (b). 24
Figura 7. Mecanismo de reação para a formação do AGE pirralina (a), e para a formação de outros cross-links pirralina (b). 26
Figura 8. Interação AGE- RAGE 27
Figura 9. Efeitos biológicos possíveis dos produtos de reação de Maillard (PRM) e produtos finais de glicação avançado (AGEs). 28
Figura 10. Representação do dispositivo com sistema extrator a vácuo utilizado na SPE 34
Figura 11. Ilustração da extração em fase sólida. 36
Figura 12. Ilustração esquemática da espectrômetro de massa em tandem no modo MRM. 39
Figura 13. Esquema geral de análise dos AGEs. 47
Figura 14. Fluxograma da precipitação protéica. 48
Figura 15. Hidrólise ácida, preparação das amostras. 50
Figura 16. Fluxograma da hidrólise ácida. 50
Figura 17. Fluxograma da digestão enzimática. 52
Figura 18. Speedvac (a) e Turbovap (b) utilizados para evaporação de amostras. 55
Figura 19. Cromatograma dos padrões de AGEs, m/z 205,12 (CML), 135,65 (Pen), 175,12 (Pyr) e 181,07 para IS. 58
Figura 20. Modo de operação positvo/negativo do electrospray. 59
Figura 21. Produtos de fragmentação iônica de CML (a) e pirralina (b). 60
Figura 22. Perfil m/z e UV de CML (a), pentosidina (b) e pirralina (c) 61

Figura 23. Fases móveis testadas. Comportamento da pirralina, com as fases móvies: (a) Bicarbonato de amônia 5mM; (b) Formato de amônia; (c) Ácido acético. 63
Figura 24. Método SPE com cartucho C18 65
Figura 25. SPE com o cartucho 30HCX de acordo com as recomendações do fabricante 68
Figura 26. Condição SPE com o cartucho 30HCX, substituindo MeOH por ACN 69
Figura 27. Cromatograma da extração de íons m/z 175,12, correspondendo a um fragmento de Pyr. a) Sobreposição do cromatograma do padrão de Pyr (azul) sobre o mesmo padrão após SPE (vermelho) com MeOH como eluente. Espectro de massa correspondente ao tr = 5.7 min (b) e 7.5 min (c), pós-éster..... 70
Figura 28. Cromatograma da extração de íons m/z 205,12, 135,65, 175,12 e 181,07 (IS), correspondendo aos fragmentos de CML, Pen, Pyr e IS, respectivamente. a) Padrões dos AGES, (b) leite contaminado com os padrões e eluídos com ACN/amônia 5%, e (c) leite contaminado com os padrões e eluídos com MeOH/amônia 5%. 71
Figura 29. (a) Sobreposição dos cromatogramas da extração de íons m/z 175,12 (Pyr) do padrão da Pyr e da amostra de leite integral. (b) Cromatogramas do leite integral submetido a SPE contaminado com AGEs (vermelho), e dos padrões de AGEs (preto). A concentração dos padrões e no leite contaminado, CML 3,0 µg/mL, Pen 0,45 µg/mL, Pyr, 0,6 µg/mL and I.S. 0,3 µg/mL. 73
Figura 30. Coeficientes de correlação (r2) e intersecção obtidos através da regressão linear das curvas analítica de CML (a), Pen (b) e Pyr (c)..... 75
Figura 31. Cromatogramas dos AGEs contaminados no leite submetido a digestão enzimática. (a) Amostras contaminadas antes do procedimento de digestão, (b) sobreposição do cromatograma dos padrões sobre o cromatograma das amostras contaminadas antes da digestão..... 77
Figura 32. Cromatogramas da sobreposição do padrão de Pyr com as picos encontrados nas amostras de leite submetidas à precipitação protéica. (a) Leite integral, (b) leite semidesnatado, (c) leite desnatado e (d) leite esterilizado. 78
Figura 33. Cromatogramas da sobreposição do padrão de Pyr com as picos encontrados nas amostras de leite submetidas à digestão enzimática. (a) Leite integral, (b) leite semidesnatado, (c) leite desnatado e (d) leite esterilizado. 79

Figura 34. Observação de traços de pentosidina. (a) Cromatograma da sobreposição do padrão de Pen com o pico encontrado nas amostras de leite submetidas à digestão enzimática, (b) extração de íons na amostra de leite m/z 135,59 correspondendo a um fragmento de Pen, (c) extração de íons na amostras de leite m/z 167,10 correspondendo ao outro fragmento de Pen. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em alguns alimentos. ... 22
Tabela 2. Conteúdo de proteínas e valores utilizados das amostras de leite utilizadas para análise de AGEs. ... 49
Tabela 3. Extração em Fase Sólida (SPE) ... 54
Tabela 4. Características cromatográficos dos padrões. ... 57
Tabela 5. Eluição de CML na SPE com C18 ... 66
Tabela 6. Taxa de recuperação de CML após SPE com C18 ... 66
Tabela 7. Diferentes condições testadas com o cartucho 30HCX ... 69
Tabela 8. Taxa de recuperação de CML, pentosidina e pirralina, em amostras de leite contaminadas. ... 72
Tabela 9. Taxa de recuperação dos padrões de CML, pentosidina e pirralina. ... 74
Tabela 10. Níveis de concentração dos AGEs para contrução da curva de calibração ... 74
Tabela 11. Quantificação de Pyr em amostras de leite, submetidos à precipitação protéica (Pyr_{livre}) e digestão enzimática ($Pyr_{conjugada}$). ... 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

AGEs - *Advanced Glycation End Products*

ALE - Produtos Finais de Lipoxidação

APCI – Ionização química de pressão atmosférica

CF - Compostos Fluorescentes

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CML - N^{ε}-carboximetilisina/Carboximetilisina

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESI – Ionização por eletro pulverização

fFL - Na-formil-Nε-frutoselisina

GC/MS – Cromatografia Gasosa ligada a Espectrometria de Massa

HCl – Ácido clorídrico

HMF - Hidroximetilfurfural

HbA1c - Hemoglobina glicada A1c

HPLC - High Performance Liquide Chromatography

HTST - High Temperature Short Time

LAL – Lisinoalanina

LDL – Low Density Lipoprotein

LL - Ácido láctico 3-(Nε-lisino)

LTLT - Low Temperature Long Time

MDA – Malondialdeído

MeOH – Metanolo

MRM – Monitoramento de reação múlitpla

m/z - Razão massa/carga (*mass to charge ratio*)

NFPA – Nonafluoropentanoic acid

NO – Monóxido de oxigênio

PRM - Produtos da Reação de Maillard

PEN – Pentosidina

PYR - Pirralina

Q-TOF – Quadruplo time-of-flight

RAGE - Receptor de Produtos da Glicação Avançada

RP- HPLC - Reverse Fase/ High Performance Liquide Chromatography

RI - Resistência à insulina

RPM - Rotação por minutos

SIF – Inspeção sanitária federal

SPE - Solid phase extraction

SRM – Monitoramento de reação selecionada

TFA - Ácido trifluoroacético

UHT - Ultra High Temperature

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography

UV – Radiação utlravioleta

SUMÁRIO

RÉSUMÉ i
LISTA DE FIGURAS 1
LISTA DE TABELAS 4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 5
1. INTRODUÇÃO 9
2. OBJETIVOS 13
2.1. Geral 13
2.2. Específicos 13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 14
3.1. Produtos de glicação 14
3.1.1. Formação de produtos de glicação e reação de Maillard 14
3.1.2. Produtos de glicação avançada e de reação de Maillard 17
3.1.2.1. Hidroximetilfurfural 17
3.1.2.2. Furosina 17
3.1.2.3. N^{ε}-Carboximetilisina 19
3.1.2.4. Pentosidina 22
3.1.2.5. Pirralina 25
3.2. Implicações para a saúde dos AGEs nos alimentos 27
3.2.1. Ação dos AGEs no processo de envelhecimento, catarata e aterosclerose.. 28
3.2.2. Ação dos AGEs em diabéticos 29
3.2.3. Ação benéfica sobre a saúde associada aos AGEs 29
3.3. Análise de produtos de reação de Maillard 30
3.4. Solid Phase Extraction (SPE) 32
3.4.1. Processo de concentração e purificação em fase sólida 35
3.5. Liquid Chromatography Electro Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS-MS) 36
3.6. AGEs em leite e derivados 39
3.7. Tipos de tratamentos térmicos aplicados no processamento do leite 41
3.7.1. Pasteurização 41

3.7.2. Esterilização 42
3.7.3. Desidratação 43
3.8. Efeitos do tratamento térmico sobre o leite 43
4. MATERIAIS E MÉTODOS 46
4.1. Reagentes 46
4.2. Amostras de leite 46
4.3. Preparação das amostras 46
4.4. Extração de CML, pentosidina e pirralina livres 47
4.4.1. Precipitação protéica 47
4.4.2. Hidrólise Ácida 48
4.4.3.Digestão Enzimática 50
4.5. Extração em Fase Sólida (SPE) 52
4.5.1. Cartucho C18 53
4.5.2. Cartucho Polyclean 30HCX 53
4.6. Análise LC-MS 55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5.1. Padrões cromatográficos 57
5.2. Fase móvel 62
5.3. Método SPE 64
5.3.1. Cartuchos C18 64
5.3.2. Cartucho 30HCX 67
5.4. Curva analítica 74
5.5. Quantificação de AGEs 75
6. CONCLUSÃO 84
7. PERSPECTIVAS 85
8. REFERENCIAS 86

1. INTRODUÇÃO

A reação de Maillard se caracteriza por interações amino-carbonilo de natureza não enzimática entre açúcares redutores ou lipídios oxidados a proteínas, aminofosfolipídeos ou a ácidos nucléicos (MONARO, 2012). Na tecnologia de alimentos, os produtos da reação de Maillard (PRM) têm chamado à atenção, uma vez que seus produtos adicionam características desejáveis nos alimentos, como cor, odor e sabor (FRIEDMAN, 1996).

Os produtos da reação de Maillard correspondem a um grupo heterogêneo de compostos químicos, com ampla variação no peso molecular, formados em alimentos e em sistemas biológicos (BARBOSA et al., 2009; NGUYEN, 2006; CHARISSOU et al., 2007). Os compostos representativos dessa reação, que são encontrados em alimentos e em sistemas biológicos são: hidroximetilfurfural, furosina, carboximetilisina, pentosidina, carboxietilisina, pirralina, vesperlisina A, dímero de glioxal-lisina, dímero metilglioxal-lisina, glicosepana (BARBOSA et al., 2009; NGUYEN, 2006; XANTHIS et al., 2007).

Os carbonilos reativos são compostos que contêm dois ou mais grupos carbonilo, sendo os mais comuns os dicarbonilos metilglioxal e o glioxal. Os carbonilos reativos também podem reagir com as proteínas gerando os produtos finais de glicação avançada - AGEs, do inglês *Advanced Glycation end Products* (WANG et al., 2011). Esses carbonilos reativos podem ser formados no corpo humano ou nos alimentos (WANG et al., 2011). A reação de glicação avançada pode ocorrer *in vivo,* pela via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos.

A glicólise e a autoxidação de glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal, os quais interagem com aminoácidos para formar produtos finais dessa reação (BARBOSA et al., 2009; MONNIER, 2007; SHIBAO; BASTOS, 2011). Em pacientes diabéticos, o *pool* de AGEs endógenos podem aumentar significativamente, caso esses pacientes consumam alimentos ricos em AGEs exógenos, ou seja, aqueles que são formados em alimentos processados em temperaturas elevadas, dessa forma, esses pacientes tem um aumento das quantidades de hemoglobinas glicadas, com consequentes aumentos dos danos a sua saúde.

Devidos aos efeitos fisiopatológicos dos AGEs *in vivo*, cresceu o interesse no estudos dos produtos de glicação avançada nos últimos anos (DELGADO-ANDRADE, 2013). O consumo elevado de AGEs pode começar ainda na infância, uma vez que tem se tornado cada vez mais comum a substituição de leite materno das crianças pelo uso de fórmulas infantis, que geralmente são uma importante fonte de produtos da reação de Maillard (PISCHETSRIEDER; HENLE, 2012).

Durante o processamento, os alimentos sofrem tratamentos térmicos o que garante a segurança microbiológica, a inativação de algumas enzimas, a degradação de substâncias tóxicas e o desenvolvimento de substâncias responsáveis pelo aroma, cor e sabor, aumentando assim a sua aceitabilidade (FRIEDMAN, 1996; FINOT, 2005). No entanto, ao mesmo tempo em que esses tratamentos térmicos promovem ações desejáveis nos alimentos, também produzem efeitos negativos como a diminuição do valor nutricional dos alimentos, devido ao comprometimento de aminoácidos essenciais, e possível geração de produtos com potencial tóxico, como os AGEs (MONARO, 2012).

Um dos alimentos que vem contribuído para o aumento do *pool* endógeno de AGEs no organismo, é o leite tipo UHT (*Ultra High Temperature*), que são aquecidos a temperaturas superiores a 100°C. O estabelecimento de novos hábitos alimentares da população, tem contribuído para introdução de grandes quantidades de AGEs na dieta, principalmente produtos derivados de pastelaria e café (MORALES et al., 2012). Delgado-Andrade et al., (2012) apontou em seu estudo "excreção urinária e fecal de N^{ε}-carboximetilisina (CML) em voluntários jovens", uma ingestão diária de 11,28 mg de CML em um grupo de adolescentes do sexo masculino com idade entre 11 - 14 anos.

Apesar das novas terapias e drogas eficazes, a resistência à insulina (RI) no diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e suas complicações, ainda continuam permanecendo como grandes desafios médico. Acredita-se que a resistência à insulina, muitas vezes associada com o excesso de nutrição e obesidade, é resultando da inflamação e estresse oxidativo crônico elevado. Umas das principais causas para essa inflamação é o consumo excessivo de produtos de glicação avançada nas dietas de países do ocidente. Os AGEs, que já foram em grande parte pensado como derivados oxidativos decorrentes da hiperglicemia diabética, são vistos, cada

vez mais, como um risco potencial para a lesão de células-β da ilhota , RI periférica e diabetes (VLASSARA; URIBARRI, 2014).

Um dos grandes problemas no estudo de AGEs é quantificação de sua real quantidade em trânsito no organismo, visto que os sistemas de modelos de produção de AGEs, estão fora das condições fisiopatológicas, como a proporção de carboidratos e proteínas, e o meio da reação (DELGADO-ANDRADE, 2013).

Para a quantificação dos produtos de reação de Maillard e a avaliação da intensidade do tratamento térmico e consequente perda de valor nutricional dos alimentos, têm sido empregados alguns marcadores como a furosina, hidroximetilfurfural, carboximetilisina, pentosidina, pronilisina, pirralina. As técnicas analíticas para análise desses compostos mais comumente utilizadas compreendem a espectrofotometria, a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia gasosa e o método imunológico de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (CHARISSOU et al., 2007; URIBARRI et al., 2010). No caso do leite, em se tratando de uma matriz complexa, etapa de purificação usando extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) é de suma importância para análise de AGEs.

A utilização do leite na dieta alimentar ocorre, principalmente pelo fato deste produto ser fonte de nutrientes essenciais à promoção do crescimento e da manutenção da vida. Devido à essa riqueza de nutrientes, associado ao processo tecnológico de beneficiamento, o leite se torna um excelente substrato para a formação de produtos finais da reação de Maillard. Pacientes portadores de doenças crônicas não transmissíveis como os diabéticos, podem ter seu estado de saúde agravado, uma vez que os AGEs contribuem para o aumento dos danos oxidativos nas células. Portanto, a correta quantificação do conteúdo desses produtos nos alimentos, principalmente no leite e seus derivados, é de suma importância para os indivíduos portadores de doenças crônicas não transmissíveis, umas vez que o *pool* endógeno de AGEs nestes indivíduos, podem ser aumentados por alimentos processados em altas temperaturas.

Ainda que, grande número de estudos tenham sido desenvolvidos com AGEs, e considerando a importância desses produtos para a saúde humana, bem como a dificuldade de quantificação simultâneas de um grande número de AGEs, este trabalho visa contribuir na otimização de métodos de quantificação simultânea de

carboximetilisina, pentosidina e pirralina, com o uso de cartuchos de troca iônica, usando o leite como matriz de estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estabelecer um método de analise completa (extração, purificação, separação e detecção) de três AGEs mais comum encontrados nos alimentos submetidos ao aquecimento (carboximetilisina, pentosidina e pirralina), usando o leite como matriz de estudo.

2.2 Específicos

- ✓ Desenvolver um método concentração e purificação de AGEs, em extração em fase sólida (SPE) por troca iônica;
- ✓ Comparar a influência de cartuchos C18 e 30HCX na taxa de recuperação de CML, Pen e Pyr.
- ✓ Desenvolver uma metodologia para análise de AGEs por LC-MS/ESI/Q-TOF;
- ✓ Identificar e quantificar de forma simultânea carboximetilisina, pentosidina e pirralina de leite em pó (integral, semidesnatado e desnatado), cru e esterelizado;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Produtos de glicação

3.1.1. Formação de produtos de glicação e reação de Maillard

O fenômeno de que os alimentos escurecem a medida que são aquecidos é provavelmente conhecido desde a descoberta do fogo, há mais de 300 mil anos (SHIBAO; BASTOS 2011). Em 1912, o cientista francês *Louis Camille Maillard* relatou pela primeira vez a reação entre os aminoácidos e a glicose, sendo denominada de reação de Maillard. Essa reação tem atraído à atenção devido ao seu papel de modificação pós-tradução, promovendo anormalidade no metabolismo de açúcares e de lipídeos. Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) mudam as propriedades físico-química das proteínas, tais como degeneração das cargas negativas e polimerização (NAGAI et al., 2012). Na ciência de alimentos, a reação de escurecimento não enzimático, reação de Maillard, tem apresentado um impacto importante nas características organolépticas dos alimentos, promovendo alterações sensoriais importantes para a qualidade de alimentos e para o valor nutricional (FINOT, 2005).

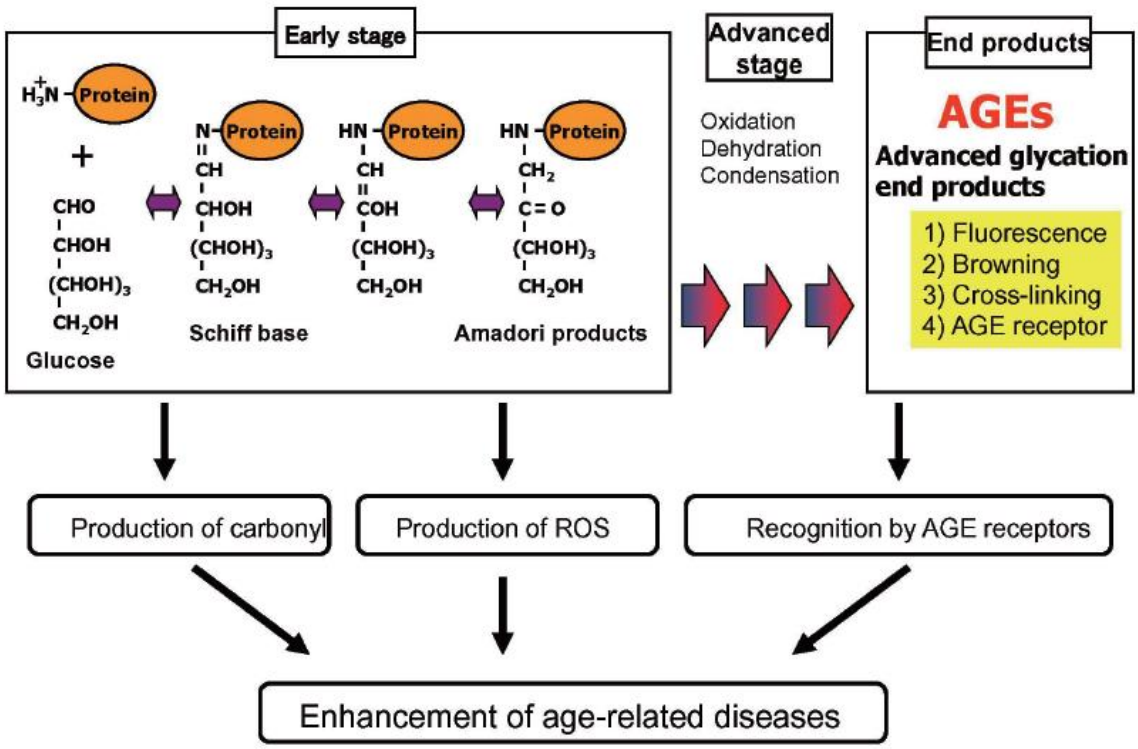
Os compostos originados por essa reação conferem aos alimentos características essenciais para aceitação e consumo dos produtos como sabor, aroma e cor. Podem também apresentar atividades biológicas positivas, atuando como agentes antioxidantes, antimutagênica e quimioprotetora, e negativas como diminuição do valor nutricional de alimentos, devido ao comprometimento de aminoácidos essenciais, e possível produção de produtos com potencial tóxico (MONARO, 2012). Também conhecida como glicação (quando ocorre no organismo vivo), a reação de Maillard progride a partir de reação em que os açúcares redutores e outros compostos α-carbonílicos combina-se com proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos (NAGAI et al., 2012; BASTOS et al., 2012).

Através do ataque nucleofílico do grupo α-carbonílico de um açúcar redutor, por exemplo, ao grupamento amina das proteínas, inicia-se essa reação (FINOT, 2005; NUNES; BAPTISTA, 2001). A reação pode ser dividida em duas partes: a primeira parte ocorre até o rearranjo de Amadori, e a segunda metade envolve a formação de AGEs, por meio de reações de oxidação, desidratação, e condensação

(NAGAI, et al., 2012). Na figura 1, pode ser observado o esquema apresentado das principais etapas da reação de Maillard.

A reação de Maillard inicia-se com a formação da base de Schiff, composto instável, gerado pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor com um grupamento amina, oriundo, por exemplo, do aminoácido lisina, composto especialmente susceptível à reação. Na seqüência, a base de Schiff sofre rearranjos, resultando nos produtos de Amadori, conhecidos hoje como produtos iniciais da reação de Maillard que apresentam estrutura mais estável. Os produtos de Amadori apresentam grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários acessíveis, dando origem aos produtos avançados da reação de Maillard através de reações como oxidação, desidratação e condensação (HODGE, 1953; BARBOSA et al., 2009).

Figura 1. Reação de Maillard.



Baseado em Nagai et al. (2012).

No organismo vivo a hemoglobina glicada A1c (HbA1c) foi identificada pela primeira vez na década de 1970, e investigações posteriores revelou esta molécula, como sendo um produto de rearranjo de Amadori de glicose combinada com

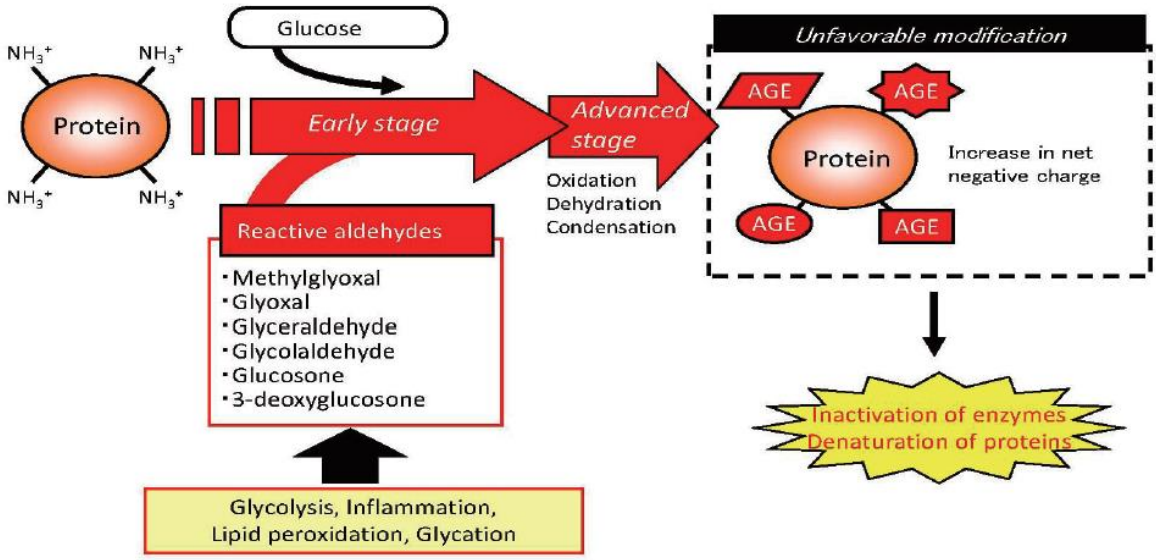
resíduo de aminoácido N-terminal de valina na hemoglobina cadeia β. Enquanto HbA1c é usado globalmente como um marcador para diabéticos no controle glicêmico, a aplicação clínica de produtos AGEs é limitada pelo grande número de estruturas de que esses compostos apresentam, e pelo fato de existirem diferentes métodos para identificação dessas estruturas (NAGAI et al., 2012).

A identificação da hemoglobina glicada em pacientes diabéticos foi o marco para os estudos desse processo de glicação no organismo e suas implicações para a saúde. A reação pode ocorrer *in vivo,* pela via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos (BARBOSA et al., 2009; MONNIER, 2007; SHIBAO; BASTOS, 2011). A glicólise e a autoxidação de glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal, os quais interagem com aminoácidos para formar produtos finais dessa reação. Esses compostos dicarbonílicos chegam a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glicose e estão presentes tanto *in vivo* quanto nos alimentos. A velocidade da glicação é maior em estados de hiperglicemia, em que a glicose se liga a proteínas de tecidos independentes de insulina e de longa vida (NUNES; BAPTISTA, 2001; MONNIER, 2007; SHIBAO; BASTOS, 2011).

A glicação em organismos vivos tem outras vias que estão ligadas ao metabolismo da glicose e da peroxidação lipídica, cujos produtos são denominados produtos finais de lipoxidação avançada (ALE) (GOLDBERG et al., 2004; NASS et al., 2007). As reações de Maillard ocorrem ao longo de toda a vida, visto que os carboidratos são nutrientes indispensáveis para a produção de energia e o organismo usa estes compostos ao longo de sua vida. Resíduos de lisina e arginina podem ser modificados pelos AGEs, aumentando a carga negativa das proteínas e promovendo a formação de ligação cruzada (Fig. 2). Além disso, diversas enzimas podem ser inativadas por conta dos AGEs (NAGAI, et al., 2012).

A formação de AGEs *in vivo* pode, adicionalmente, envolver neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais, após estímulo inflamatório, produzem mieloperoxidase e enzimas NADPH oxidase, que induzem a formação de AGEs por meio da oxidação de aminoácidos (HUEBSCHMANN et al., 2006).

Figura 2. Geração de aldeídos intermédiarios e degeneração de proteína envolvidos na formação de produtos AGEs



Baseado em Nagai et al. (2012).

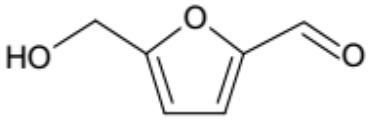
3.1.2. Produtos de glicação avançada e de reação de Maillard

Os produtos da reação de Maillard correspondem a um grupo heterogêneo de compostos químicos, com ampla variação no peso molecular, formados em alimentos e em sistemas biológicos (BARBOSA et al., 2009; NGUYEN, 2006; CHARISSOU et al., 2007). Os compostos representativos dessa reação, tanto nos alimentos como nos sistemas biológicos são: hidroximetilfurfural, furosina, carboximetilisina, carboxietilisina, pentosidina, pirralina, vesperlisina A, dímero de glioxal-lisina, dímero metilglioxal-lisina, glicosepana (BARBOSA et al., 2009; NGUYEN, 2006; XANTHIS, 2007).

3.1.2.1 Hidroximetilfurfural

O Hidroximetilfurfural (HMF) é um composto intermediário formado durante a reação de Maillard e pela degradação de hexoses a temperaturas elevadas em condições ácidas (Fig. 3) (ARRIBAS – LORENZO; MORALES, 2010).

Figura 3. Estrutura do Hidroximetilfurfural (HMF).

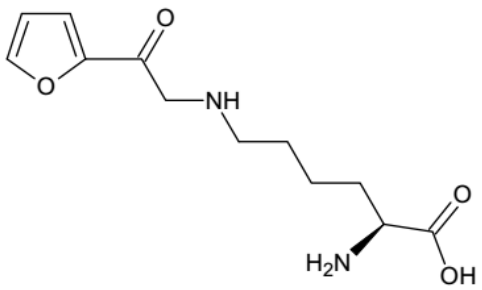


A formação HMF está diretamente relacionada com a intensidade do calor aplicado ao alimento, como normalmente não está presente em alimentos crus e frescos, esse composto é considerado um marcador de dano térmico para produtos que contêm altas concentrações de carboidratos. Além disso, pode ser utilizado para monitorizar o processo térmico aplicado a diferentes produtos alimentares, tais como: cereais contendo frutas secas; caramelo, mel, massas e produtos de panificação (RUFIAN-HENARES; DELGADO-ANDRADE, 2009; RUFIAN-HENARES et al., 2006).

3.1.2.2. Furosina

Os compostos de Amadori são medidos como furosina (ε-N-2-furoylmethyl-L lisina) (Fig. 4). O conteúdo de furosina presente nos alimentos é influenciado pelo tipo de tratamento térmico e/ou o tempo de armazenamento. Níveis de furosina tendem a diminuir após um armazenamento prolongado ou após o superaquecimento para dar origem a outros compostos tais como CML (DELGADO-ANDRADE et al., 2005; FRIEDMAN, 1996; RUFIAN-HENARES; DELGADO-ANDRADE, 2009).

Figura 4. Estrutura da Furosina.



A furosina é o indicador mais importante e específico da fase inicial da reação de Maillard. A pesquisa da furosina é amplamente utilizada na análise de produtos

de cereais, uma vez que a lisina é o aminoácido limitante deste produto e, assim, a presença de furosina é um importante marcador da perda do valor biológico das proteínas. A monitorização da formação de furosina ajuda a adaptar as condições de processamento, a fim de garantir a manutenção do valor nutritivo dos alimentos (RUFIAN-HENARES et al., 2004a, 2006; RESMINI et al., 1990).

A furosina contida no leite depende da intensidade do tratamento térmico aplicado. No leite cru, a quantidade aproximada varia entre 3 a 5 mg/100g de proteína, enquanto que no leite pasteurizada essa quantidade por variar de 4 a 7 mg/100g de proteína, no leite UHT (*ultra high temperature*) 50 a 300 mg/100g de proteína, e no esterilizado esses valores pode chegar a 450 mg/100g de proteína (RESMINI; PELLEGRINO, 1991).

3.1.2.3. N^{ε}-Carboximetilisina

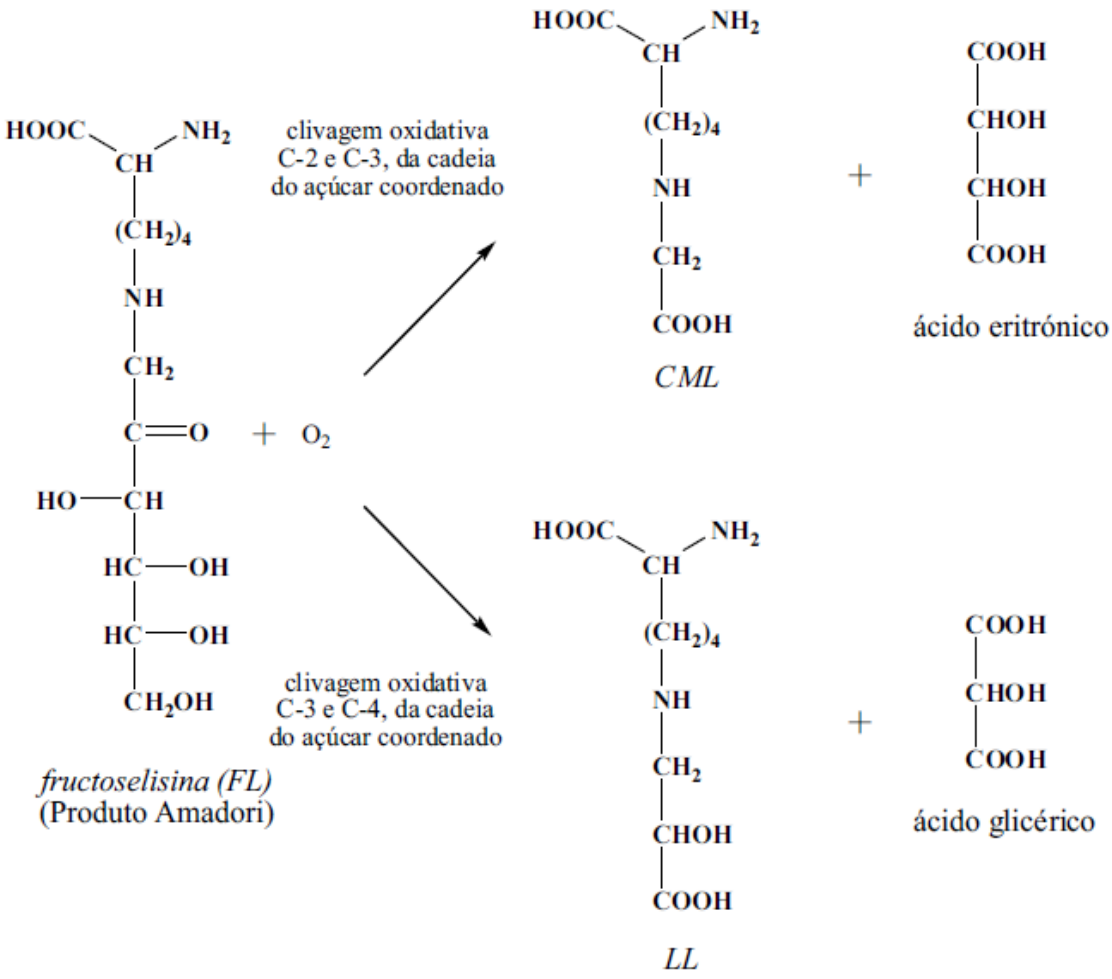
A N^{ε}-carboximetilisina (CML) é o produto de reação de Maillard mais estável, apresentando baixa reatividade, podendo ser produzida por degradação de produtos de Amadori, tal como N^{ε}-(frutosil)lisina, que sofre oxidação para formar N^{ε}-carboximetilisina. Neglia et al. (1985) observaram, por espectroscopia RMN 13C, que as estruturas e as conformações de equilíbrio de aductos Amadori, nas proteínas, eram idênticas às obtidas para o composto Amadori modelo, Nα-formil-N_{ε}-frutoselisina (fFL). Pouco tempo depois, Ahmed et al. (1986) estudaram as reações de fFL e verificaram que o composto, N^{ε}-carboximetillisina (CML), corresponde ao produto maioritário, formado na degradação oxidativa do fFL, sendo também observada a formação de ácido eritronico (EA) (Fig. 5). Esses pesquisadores mostraram que o composto CML é formado ao nível das proteínas, nas condições vulgarmente usadas na glicação *in vitro*, verificando também, que CML é detectado no colágeno e ao nível das proteínas do cristalino humano. Em concordância com a formação do composto CML, resultante da clivagem oxidativa entre as posições C-2 e C-3 da cadeia do açúcar coordenado do produto Amadori fFL (SARAIVA, 2007).

Ahmed et al. (1988) identificaram posteriormente uma nova série de produtos formados na clivagem oxidativa de fFL, entre as posições C-3 e C-4 da cadeia do açúcar do produto Amadori, como sendo, os compostos ácido láctico 3-(N^{ε}-lisina) (LL) e ácido D-glicérico (Fig. 5). Por cromatografia gasosa, os investigadores

verificaram a detecção de LL em proteínas glicadas *in vitro*, e constataram, igualmente, que LL é um produto natural, existente nas proteínas do cristalino humano e na urina (AHMED et al., 1986). Com resultados obtidos da clivagem oxidativa do produto de arranjo de Amadori, fFL, em que a formação dos compostos CML e LL fora observada, conjuntamente com o fato de CML e LL terem sido observados *in vitro* e *in vivo*, é possível concluir que a degradação do produto de Amadori, nas proteínas, constitui uma importante via reacional nos processos de glicação *in vivo* (SARAIVA, 2007).

Glomb e Monnier (1995) estabeleceram a hipótese de que um mecanismo reacional que envolvesse a formação de glioxal e de glicolaldeído poderia contribuir para a formação de CML e para o *cross-linking* de proteínas, em condições fisiológicas. Assim, estes investigadores concluíram que a clivagem em C-2 da cadeia de açúcar de produtos precursores do produto Amadori (base de Schiff), constituía uma via reacional para a reação de Maillard, podendo ter um papel importante na formação de CML e no *cross-linking* de proteínas. A peroxidação lipídica é outra rota para a CML, e o glioxal, tem sido sugerido como um intermediário. A CML é um dos marcadores mais importantes de produtos bioativos da reação de Maillard e seu conteúdo geralmente representa riscos para a saúde, em particular, pela ingestão de alimentos tratados termicamente (CHARISSOU et al., 2007). O composto CML pode ser formado *in vitro* por três vias reacionais distintas: I) clivagem oxidativa de produtos Amadori, como referido anteriormente; II) clivagem oxidativa de precursores de produtos Amadori, bases de Schiff; III) modificação pelo glioxal formado, durante a degradação/autoxidação da glicose (UNNO et al., 2002).

Figura 5. Via envolvidas na formação de carboximetilisina (CML).



Adaptado de Ahmed et al., (1988).

Entre os produtos da reação de Maillard, a CML é o melhor produto de glicação avançada caracterizado, sendo empregado nas pesquisas como marcadores de AGEs e lipoxidação avançada (GOLDBERG, 2004). Vlassara et al., (2003) em seu trabalho sobre glicoxidação como uma ameaça aos diabéticos e sobre o envelhecimento, quantificou a quantidade de carboximetilisina em diversos grupos de alimentos (Tab. 1).

Tabela 1. Teor de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em alguns alimentos.

	Alimento	Carboximetilisina (KU/100g)*	Alimento	Carboximetilisina (KU/100g)*
Grupo de Óleos	Manteiga	26.480	Molho para salada	740
	Margarina	17.520	Semente de abóbora	1.853
	Maionese	9.400	Pistache	380
	Óleo de oliva	11.900	*Cream cheese*	10.883
	Amendoim	6.447	Amêndoa	5.650
Grupo das Proteínas	Carne bovina grelhada	7.479	Ovos fritos	2.749
	Carne bovina cozida	2.687	Bacon	91.577
	Carne de frango grelhada	6.639	Atum enlatado com óleo	5.113
	Carne de frango cozida	1.210	Queijo parmesão	16.900
	Peixe assado	1.212	Queijo *cheddar*	5.523
	Peixe frito	3.083	Lingüiça de porco	5.943
	Ovos cozidos	90	Camarão frito	4.328
Grupo dos Carboidratos	Panquecas	2.263	*Croissant*	1.113
	Pães	133	Granola	427
	Biscoitos	1.647	*Waffle*	2.870
	Flocos de milho	233	Macarrão	242

*Carboximetilisina determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA).
Adaptado de Vlassara et al., (2003).

Além da composição química dos alimentos a formação dos produtos de reação de Maillard depende de alguns outros fatores, como: temperaturas elevadas (acima de 40ºC), atividade de água na faixa de 0,4 a 0,7, pH na faixa de 6 a 8 (preferencialmente alcalino), umidade relativa de 30% a 70%, presença de íons de metais de transição como Cu^{2+} e Fe^{2+}, que podem catalisar a reação (KWAK, et al., 2004; HODGE, 1953).

3.1.2.4. Pentosidina

A pentosidina um composto *cross-link,* foi identificada em 1989 por Sell e Monnier (1989), ao investigar a natureza da fluorescência observada no envelhecimento do colágeno humano, isolando e elucidando os aspectos estruturais desse composto fluorescente que se mostrava resistente à hidrólise ácida. A pentosidina tinha na sua formação a reação de um resíduo de lisina e de um outro de arginina, com uma pentose (Fig. 6a) (SELL; MONNIER, 1989). Ao AGE pentosidina tem sido atribuído um importante significado na investigação gerontológica, pois a sua formação pode contribuir para a degradação dos tecidos

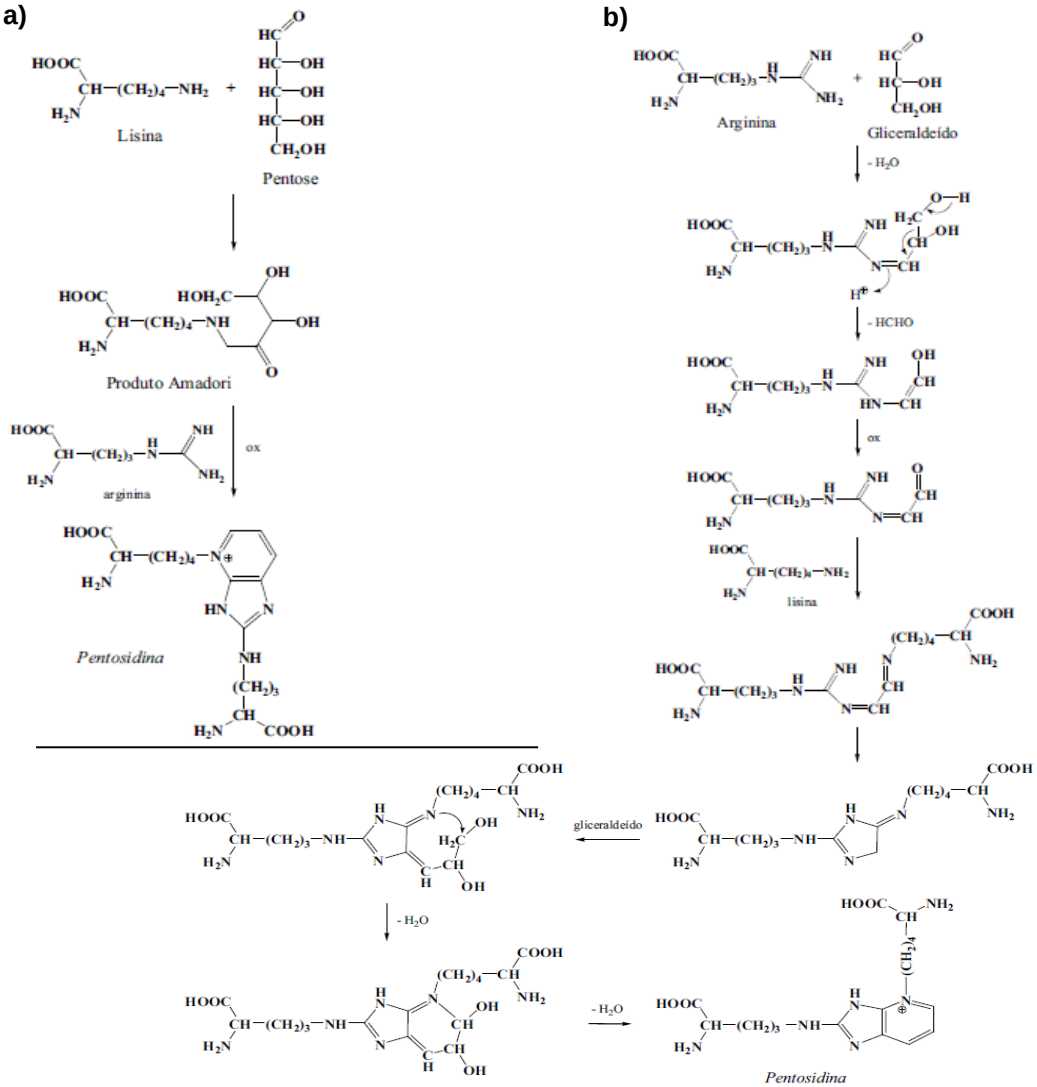
envelhecidos, devido à sua ação *cross-linking* na matriz extracelular. A pentosidina também pode servir como marcador molecular para o processo de envelhecimento, e a sua detecção pode facilitar o estudo da longevidade e dos efeitos nocivos dos sistemas Maillard que envolvem pentoses. Como a pentosidina é *cross-link*, e tendo na sua constituição dois resíduos básicos de aminoácidos, os efeitos na estrutura e na função das proteínas modificadas podem ser bastante acentuados, o que pode proporcionar uma fácil detecção deste composto *in vivo*, sobretudo no que diz respeito aos processos de doença relacionados com a sua formação (SARAIVA, 2007).

Dyer et al. (1991) também identificaram um composto fluorescente, designado por produto fluorescente de Maillard (MFP-1), formado nas reações da glicose com proteínas modelo *in vitro*, o qual fora observado que se acumulava em proteínas do tecido, relacionadas com o envelhecimento e com a progressão das complicações da diabetes mellitus. Os investigadores concluíram que o composto MFP-1 possuía uma estrutura análoga ao composto pentosidina, identificado por Sell e Monnier (1989). Ainda no estudo de Dyer et al. (1991), foi observado que a formação da pentosidina era abundante em sistemas modelo, como as reações de pentoses com lisina e arginina, embora também fosse observada a partir da glicose, frutose, ascorbato, compostos Amadori, 3-deoxiglicosona, e de outros açúcares. Todavia, a pentosidina não se formou a partir do malondialdeído, nem de ácidos graxos poliinsaturados resultantes da peroxidação lipídica (DYER et al., 1991). A formação da pentosidina, por reação de açúcares, fora inibida em condições anaeróbicas, bem como na presença de aminoguanidina, sendo este último composto um conhecido inibidor da glicação avançada e das reações de escurecimento (DYER et al., 1991).

Portanto, a formação de pentosidina envolve a reação de intermediários de açúcares em condições reacionais oxidativas (SARAIVA, 2007). Um novo mecanismo para a formação da pentosidina (Fig. 6b) foi proposto por Chellan e Nagaraj (2001) (Fig. 6b). Os investigadores sugeriram que duas ou três moléculas de carboidratos (gliceraldeído), eventualmente formadas durante a clivagem oxidativa de produtos iniciais da reação de Maillard, estão envolvidas na formação da pentosidina (CHELLAN; NAGARAJ, 2001). Em relação à formação da pentosidina *in vivo*, Odetti et al. (1992) constataram que os níveis de pentosidina nas proteínas do plasma eram elevados em estados de uremia, em comparação com a

diabetes, apesar de não se notar um aumento dos níveis de açúcar no sangue. No entanto, Chatterjee e Banerjee (1979), observou aumento dos níveis de ascorbato em indivíduos urêmicos, o que suporta a evidência de que a formação da pentosidina pode resultar da reação de outros açúcares, e não unicamente de pentoses, como a ribose. Bailey et al. (1995), também constataram que *cross-links* fluorescentes adicionais podem ser observados nas reações da glicose e ribose com o colágeno.

Figura 6. Mecanismos de formação da pentosidina, através de pentoses (a) e de gliceraldeído (b).



Adaptado de Sell & Monnier (1989); Chellan & Nagaraj (2001).

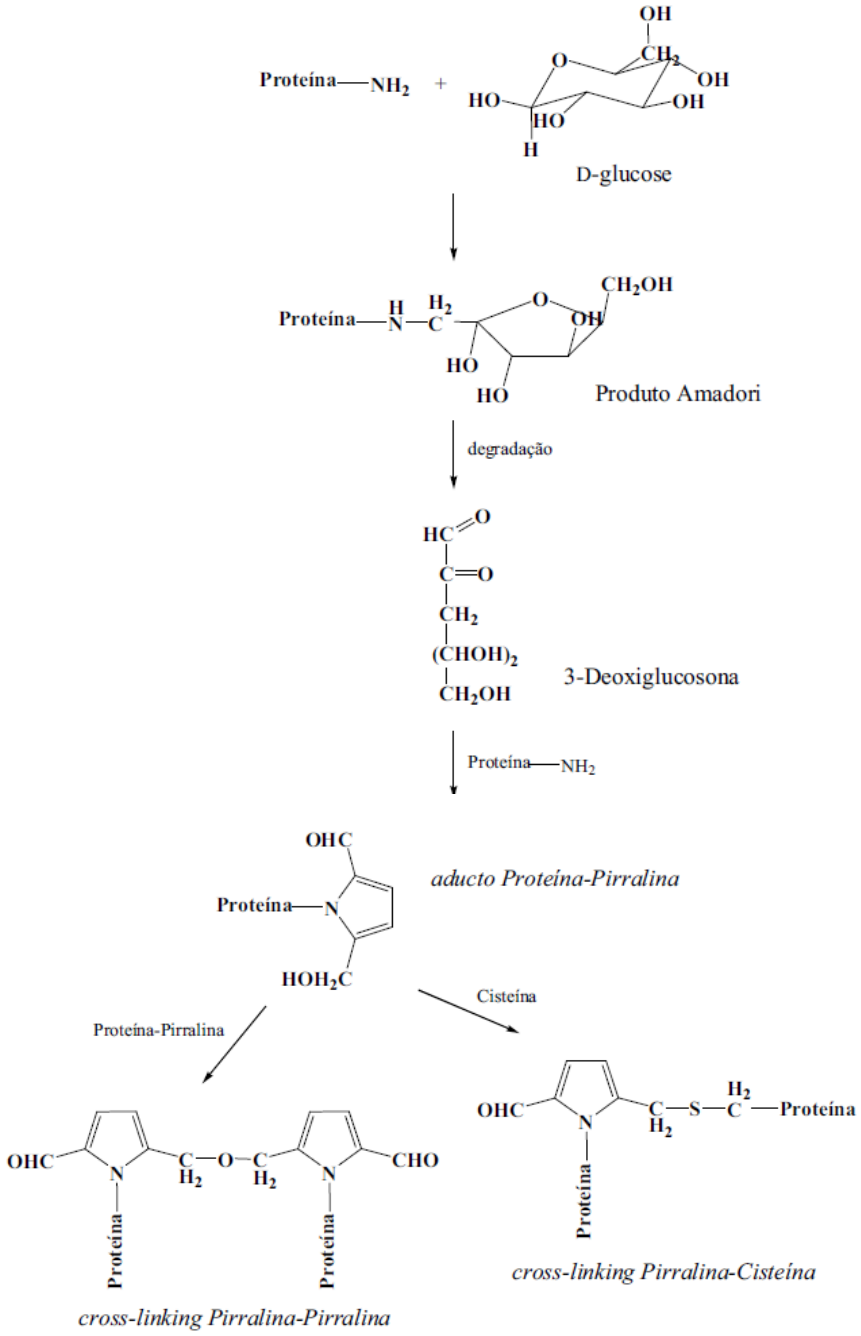
3.1.2.5. Pirralina

A pirralina ((2-amino-6-(2-formyl-5-hydroxymethyl-1-pyrrolyl)-hexanoic acid) é um produto avançado da reação de Maillard, formado entre grupo ε-amino da lisina e 3-deoxiglicosilose que é um produto de degradação de carboidratos reduzidos e aminocetoses (NAKAYAMA et al., 1980; RUFIAN-HENARES et al., 2004). Identificada e caracterizada com um composto formado durante o *browning* não-enzimático, em condições fisiológicas, a pirralina tem na sua origem a reação de grupos amina livres das proteínas com a glicose, e com a formação do intermediário 3-deoxiglicosona, o qual se pensa provir da degradação do produto Amadori (Fig. 7) (NJOROGE et al. 1987), sendo lábil à hidrólise ácida, anteriormente tinha sido observado a formação de um derivado da pirralina em misturas reativas de butilamina e glicose, e de ε-amino lisina e glicose, a 100ºC (KATO, 1966; KATO; FUJIMAKI, 1970; KATO et al., 1977; NAKAYMA et al., 1980; HAYASE; KATO, 1985). Posteriormente, Nissl et al. (1995) identificaram a formação de pirralina na reação da glicose com modelos composto por amina, propilamina, Nα-acetil-L-lisina, e também com a albumina do soro bovino.

Nagaraj et al. (1996) verificaram que, quando da purificação da pirralina, o composto obtido, na reação da lisina com a glicose, sofria degradação quando armazenado sob refrigeração, ou simplesmente quando exposto a temperatura ambiente. Na tentativa de identificação de possíveis produtos de degradação da pirralina, um dos produtos formados fora purificado. Com a elucidação da natureza estrutural deste produto de degradação, Nagaraj et al. (1996) concluíram que se tratava de uma dipirralina, com uma ligação éter entre duas moléculas de pirralina (Fig. 7). Esta descoberta levou os investigadores a estudar a reatividade da pirralina com tio e hidroxi-aminoácidos (NAGARAJ et al., 1996). Deste modo, verificou-se que os hidroxi-aminoácidos, em geral, não eram reativos para com a pirralina. Porém, a reação da cisteína com a pirralina resultou na formação de dois tio-éteres distinto (NAGARAJ et al.,1996). Assim sendo, os resultados obtidos por Nagaraj et al. (1996), seriam fortes indicadores de que a pirralina formada *in vivo* poderia subsequentemente reagir com outros resíduos de aminoácidos, nas proteínas, de modo a originar a formação de produtos *cross-link*. Este fenômeno poderia explicar, em parte, o aumento do *crosslinking*, associado às complicações da diabetes *mellitus* e ao envelhecimento. A detecção da pirralina nas proteínas de tecidos,

plasma, cristalino humano e de membranas tem sido conseguida, por métodos imunoquímicos e cromatográficos (SARAIVA, 2007).

Figura 7. Mecanismo de reação para a formação do AGE pirralina



Adaptado de Nagaraj et al., (1996).

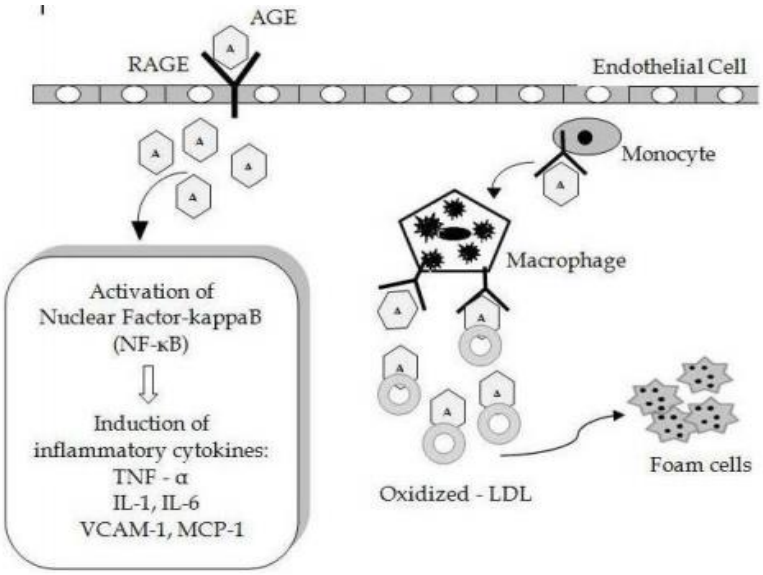
3.2. Implicações para a saúde dos AGEs nos alimentos

Diversas doenças tem sido relacionadas com a presença de AGEs no organismo, o acúmulo destes compostos não se dá apenas pela alimentação ou devido a anormalidades do metabolismo do açúcar, mas também pelo estresse oxidativo elevado.

Em 1949, surgiu o primeiro trabalho indicando que os produtos de reação de Maillard poderiam ser prejudiciais aos processos biológicos. Foram avaliados os efeitos fisiológicos desses compostos na inibição do crescimento celular, redução da digestibilidade, absorção de proteínas, hipertrofia de órgãos, mutações celulares, redução das atividades de enzimas pancreáticas, intestinais, hepáticas e formação de complexos com metais (FINOT, 2005).

Os AGEs podem causar danos aos tecidos por: modificação da função da proteína devido a alterações em sua estrutura/configuração, modificação do tecido, devido às ligações cruzadas (*cross-links*) inter e intramolecular, formação de radicais livres, e indução de respostas inflamatória após ligar-se a receptores específicos RAGE (Receptor de Produtos da Glicação Avançada), receptores de membrana celular, cuja atividade aumenta proporcionalmente à concentração de AGEs presentes (Fig. 8). A interação AGE-RAGE modula vias pró-inflamatória com ativação transcricional e expressão alterada de vários mediadores inflamatórios, como as citocinas, desencadeando reações inflamatórias (TAN et al., 2002; SASAKI et al., 1998).

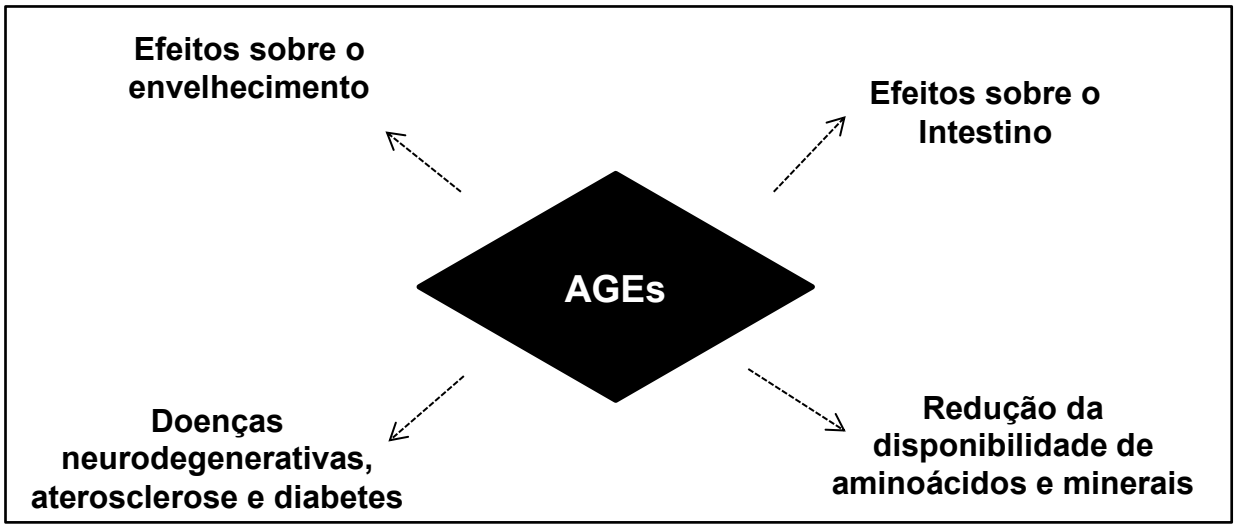
Figura 8. Interação AGE- RAGE.



Baseado em Hartog et al., (2007); Bastos et al., (2012).

A ligação de AGE a tecidos como a retina, endotélio, mesênquima e células renais, favorece a disfunção endotelial, prejudicando a vasodilatação devido à diminuição da produção de monóxido de nitrogênio - NO, a ativação acelerada de macrófagos para as células espumosas, a diminuição da flexibilidade das células musculares lisas, comprometendo a complacência arterial, e torna a fração LDL-colesterol (*Low Density Lipoprotein*) mais susceptível à oxidação (TAN et al., 2002; SASAKI et al., 1998). Os AGE estão associados a complicações renais, disfunções endoteliais e patologias neurodegenerativas, processo em que se observa elevada concentração desses compostos, o que possivelmente se relaciona à disfunção neuronal e, ainda, a fatores de risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Fig. 9), (KIM et al., 2005; ROJAS; MORALES, 2004; URIBARRI et al., 2005).

Figura 9. Efeitos biológicos dos produtos de reação de Maillard (PRM) e produtos finais de glicação avançado (AGEs).



Adaptado de Somoza (2005).

3.2.1. Ação dos AGEs no processo de envelhecimento, catarata e aterosclerose

Os produtos de glicação avançada (AGE), por sua vez, são implicados no envelhecimento e na perda de funcionalidade de tecidos que não são dependentes de insulina e, por isso, encontram-se expostos a concentrações elevadas de glicose (como o cristalino, a membrana basal das arteríolas, as células nervosas e os

tecidos intersticiais da pele). A catarata e aterosclerose, em alguma extensão, são patologias resultantes da glicação entre a glicose sanguínea com proteínas de longa duração presentes nesses tecidos (URIBARRI et al., 2010; GLENN; STITT, 2009).

Como a formação de AGEs ocorre vagarosamente sob condições fisiológicas, as moléculas de meia-vida longa, como o colágeno, são diretamente afetadas por esses compostos, contribuindo dessa forma no processo de envelhecimento (FORBES et al., 2005).

3.2.2. Ação dos AGEs em diabéticos

Indivíduos diabéticos, em especial, apresentam diversas complicações devido aos processos de glicação. Atualmente, recomenda-se que a dieta desses pacientes seja controlada quanto aos teores de PRM. Apesar de não haver consenso sobre os limites de ingestão segura, a redução de 50% na ingestão de PRM na dieta de indivíduos diabéticos resulta em um decréscimo de 30% dos teores plasmáticos desse composto, em apenas um mês de intervenção. Observou-se também redução do peso corporal e melhora do prognóstico da doença, embora o nível de hemoglobina glicada (HbA1c) não tenha sido modificado (URIBARRI et al., 2005; TEIXIDÓ et al., 2008). Estima-se que os indivíduos que consomem maiores proporções de PRM estejam expostos a maior risco de desenvolver complicações do diabetes, como disfunções vasculares e renais (URIBARRI et al., 2010; TEIXIDÓ et al., 2008; SANDU et al., 2005), e que o consumo seguro de PRM para esses pacientes, seja de no máximo 16 mil unidades por dia (medida relativa à carboximetilisina) (KIM et al., 2005; KOSCHINSKY et al., 1997).

Estudos com ratos mostraram que os animais que receberam dietas com altos teores de PRM por seis meses desenvolveram diabetes mellitus tipo 2, enquanto os animais do grupo-controle (dieta equivalente em composição e valor energético, mas com teores de PRM reduzidos) não desenvolveram a doença e apresentaram menores níveis de glicemia (CHUN-LIANG et al., 2003).

3.2.3. Ação benéfica sobre a saúde associada aos AGEs

Apesar de grande parte dos estudos se concentrarem nos potenciais efeitos nocivos dos PRM, existem evidências de efeitos benéficos destes compostos sobre

o organismo. Esses efeitos positivos têm despertado interesse na investigação dos mecanismos de ação e dos produtos específicos responsáveis por esses efeitos. De todos os PRM formados durante o processamento de alimentos, os compostos finais, melanoidina, foram mais fortemente associados com efeitos biológicos positivos (DELGADO-ANDRADE, 2013).

Atenção especial tem sido dada ao estudo de melanoidina em café e na crosta de pães. Assim, pronil-lisina, um aminácido glicado de baixo peso molecular, tem demonstrado exercer atividade antioxidante e indução enzimática quimio-preventiva em modelo de cultura de celular, sobre células intestinais humanas (LINDENMEIE et al., 2002). Além disso, Borrelli e Fogliano (2005) revelaram o potencial de melanoidina da crosta de pães como ingredientes prebióticos, aumentando o crescimento das bifidobactérias de forma seletiva. Del Castillo et al. (2007), relataram que a fração de baixo peso molecular derivado da hidrólise enzimática de glúten glicado é rica em peptídeos anti-hipertensivos, enquanto que a fração de peso molecular elevado contém catadores de radicais peroxil e inibidores de crescimento bacteriana.

3.3. Análise de produtos de reação de Maillard

Muitos autores têm destacado os benefícios e riscos para a saúde dos produtos da reação de Maillard presente nas dietas. Por esse motivo, é de grande importância caracterizar e quantificar esses produtos nos alimentos, como forma de se obter um melhor equilíbrio entre os benefícios e riscos potenciais, e em seguida, no estabelecendo de diretrizes para a saúde alimentar (DELGADO-ANDRADE et al., 2009).

A partir do desenvolvimento de técnicas sofisticadas de análise, foi possível isolar, caracterizar, e quantificar vários compostos da reação de Maillard e de glicação avançada formadas *in vitro* e *in vivo*, tanto no estágio inicial como avançado, como os compostos de Amadori (indiretamente analisados como furosina), carboximetilisina (CML), e alguns derivados intermediários da reação, tais como hidroximetilfurfural (BASTOS et al., 2012). A medição de compostos fluorescentes (CF) formados durante a reação é também uma ferramenta confiável para avaliar a extensão e proporção de perda nutricional devido ao processamento térmico dos alimentos (DELGADO-ANDRADE et al., 2009; FRIEDMAN, 1996).

Tradicionalmente, a monitorização da reação de Maillard no processamento de alimentos foi baseada na avaliação espectrofotométrica de desenvolvimento de cor a 420 nm. Mais recentemente, a avaliação de compostos fluorescentes gerados pelo rearranjo dos produtos de Amadori se tornou habitual. Além do seu uso em alimentos, a medição de fluorescência também é empregada para avaliar a reação de Maillard em condições fisiológicas, correlacionando a geração de AGEs com o desenvolvimento de patologias (DELGADO-ANDRADE et al., 2006).

Os compostos fluorescentes são precursores de pigmentos castanhos formados na reação de Maillard, que apresentam diferentes estruturas químicas. A avaliação das alterações na intensidade da fluorescência ajuda a avaliar, a extensão da reação de Maillard em produtos alimentícios e sistemas biológicos (MORALES; VAN BOEKEL, 1998; RUFIAN-HENARES; DELGADO-ANDRADE, 2009). A fluorescência foi primeiro utilizado para avaliar a formação de produtos de reação de Maillard em leite, e agora é também utilizada para monitorar a transformação de cereais, biscoitos, soja, fórmula infantil, salmão cozido e produtos de panificação (BASTOS et al., 2012).

Dependendo do produto de reação de Maillard a ser analisado, diferentes metodologias podem ser adotadas. Entre essas metodologias se destaca os métodos espectrofotométricos, geralmente utilizados para determinar hidroximetilfurfural em alimentos e os métodos cromatográficos (cromatografia líquida ou gasosa de alta resolução) que são mais precisos e sensíveis para este propósito (ERBERSDOBLER; SOMOZA, 2007; MORALES et al., 1997; RUFIAN - HENARES et al., 2001, BASTOS et al., 2012).

Em 1992, uma metodologia baseada em pareamento de íons por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) foi proposto e aplicado com sucesso numa série de estudos na análise de furosina. Em 1996 a HPLC de fase reversa tornou-se o método de escolha para análise de furosina, quando seu padrão se tornou disponível comercialmente. Devido à possibilidade de transformação de CML em furosina durante o aquecimento é necessária uma hidrólise ácida em uma atmosfera inerte (ERBERSDOBLER; SOMOZA, 2007; BASTOS, 2012).

Para análise de CML em alimentos, Charissou et al. (2007), propõem três metodologias principais: 1) RP- HPLC (*Reverse Fase/ High Performance Liquid Chromatography*), 2) GC/MS (Cromatografia gasosa ligada a espectrometria de

massa) seguida pela metilação do grupo carboxílico e acilação do grupo amina, 3) ensaio de imunoabsorção (ELISA) ligado a enzima com base numa anticorpo monoclonal anti-CML. De acordo com Goldberg (2004), este ensaio é adequado para a análise quantitativa CML, tanto em amostras biológicas como de alimentos.

3.4. Solid Phase Extraction (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) na sua forma moderna tem mais de 25 anos, e representa um método rápido de preparação de amostras, em que uma fase estacionária sólida, é tipicamente acondicionada em um interior de um cartucho, usado seletivamente para extrair, concentrar, e purificar analitos alvos, antes de serem analisados por HPLC ou GC.

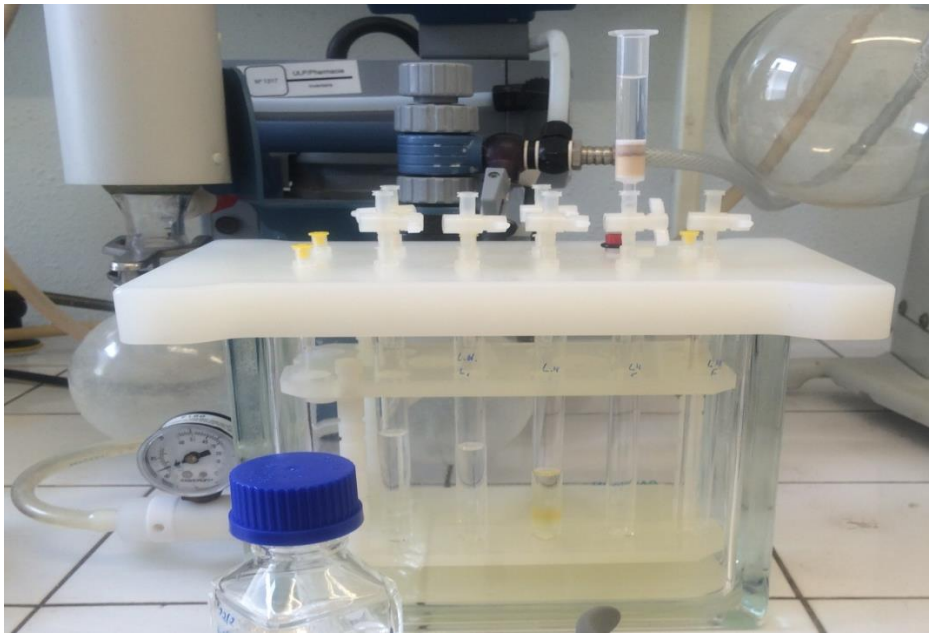
A SPE tem se tornado uma das mais comuns técnicas de concentração e cleanup de amostra usada pelos químicos analíticos. Ao longo do tempo, o uso da SPE tem crescido devido ao fato de que essa técnica atende as necessidades dos analistas em relação aos procedimentos de preparo da amostra, apresentando-se simples, relativamente barata, com boa recuperação dos analitos e adequada seletividade, reduzido uso de solventes orgânicos e capacidade de automação (MAJORS, 2001). Esta técnica tem sido muito utilizada para remover ou concentrar substâncias de matrizes líquidas presentes em pequenas quantidades. Pode ser considerado como um meio de purificação de amostras antes da análise por cromatografia líquida, a fim de eliminar outras substâncias que compõem a matriz, a SPE depende de alguns fatores para o sucesso do processo de purificação. Esses fatores incluem: o tipo de resina utilizada, a concentração do analito, o volume da amostra e o fluxo com que a amostra atravessa o sorvente.

A SPE é um processo onde normalmente recupera-se quase todo o analito da matriz em uma única extração. Esta é uma técnica bastante aplicada em matrizes complexas e utiliza os mesmos materiais adsorventes usados na cromatografia líquida, dentre os quais se destacam os derivados de sílica C8, C18 e CN (SILVA, 2012). Uma grande variedade de adsorventes pode ser utilizada, desde fases de sílica modificadas de C8 a C18 (fases reversas), resinas poliméricas, alumina, carvão, sílica e ciano e outras (QUEIROZ et al., 2001). Os mecanismos de retenção na SPE assemelham-se aqueles envolvidos na cromatografia líquida em coluna (POOLE et al., 2000), e dependendo do adsorvente e do modo como é utilizada, a SPE é dividida em modo reverso, modo normal e troca iónica. Nos casos das fases

reversas (C8, C18 e CN), a retenção do analito acontece devido, primeiramente, às interações de van der Waals não polares, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica. Já no modo normal, as principais interações são entre grupos polares do analito e da fase extratora através de ligações de hidrogênio, interações $\pi - \pi$ e dipolo-dipolo (SILVA, 2012).

No modo troca iónica, interações eletrostáticas são as responsáveis pela extração seletiva do analito (SNYDER et al., 1997). A SPE conta com uma grande variedade de adsorventes disponíveis, que podem ser utilizados com os mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos (QUEIROZ et al., 2001). A extração com resinas poliméricas ocorre devido à adsorção dos analitos por meio de forças de van der Waals, que permitem uma dessorção fácil. As resinas poliméricas mais comumente utilizadas são as do copolímero poliestireno-divinilbenzeno (JUNKER-BUCHHEIT e WITZENBACHER, 1996). Atualmente, a SPE tem ganhado aplicações específicas com o desenvolvimento de fases mais seletivas. Vários são os dispositivos utilizados para SPE dentre eles os mais utilizados são os cartuchos e os discos de extração. Em ambos dispositivos, a amostra é forçada a passar pelo material extrator pela aplicação de pressão em uma das extremidades do cartucho ou disco. Para realizar a análise simultânea de várias amostras e extrações mais rápidas, geralmente são utilizados sistemas extratores com vácuo (Fig. 10) (HAGEN et al., 1990).

Figura 10. Representação do dispositivo com sistema extrator a vácuo utilizado na SPE.



Fonte: autor

Os cartuchos são os dispositivos mais utilizados para a SPE devido a sua facilidade de utilizar, grande disponibilidade comercial e baixo custo (SNYDER et al., 1997). Assemelham-se a seringas hospitalares sem o êmbolo, dentro das quais se encontra o material extrator acondicionado entre dois filtros. Os primeiros cartuchos foram utilizados em 1978, cartuchos com formato de seringa em 1979 e como pré-coluna para acoplamento ―on-line‖ com cromatografia líquida em 1980 (HENNION, 1999). Durante os últimos cinco ou seis anos tem crescido o desenvolvimento com melhoria do formato, automação e com a introdução de novos sorventes com capacidade de melhorar a extração de analitos polares (PICHON, 2000).

Os cartuchos disponíveis comercialmente em geral, possuem reservatórios (região destinada ao acondicionamento das amostras, acima do sorvente e dos filtros) de 0,5 a 10 mL e recheios que variam de 35 mg a 2 g (SNYDER et al., 1997). A resina poliamida é usada para adsorver os compostos polares (grupos-OH, os compostos fenólicos) de soluções aquosas ou metanólicas no âmbito do mecanismo de fase reversa através de ligações fortes de hidrogénio entre o composto de grupos hidroxilo e grupos de amida da resina, sendo útil para extração de taninos, clorofila, ácidos húmicos, terpenóides farmacologicamente ativos, flavonóides, ácido gálico, ácido protocatecuico A-catecol e floroglucinol (SILVA, 2012). Também é útil para a

extracção de ácidos carboxílicos aromáticos, compostos nitroaromáticos e irreversivelmente retém quinonas.

As vantagens de extração por SPE estão na capacidade de suportar amostras em condições fortemente ácidas ou básicas e no seu baixo custo. Um problema associado à SPE é o fato da fase ser uniforme, de modo, a evitar baixa eficiência. Neste método o efeito de matriz pode se antever devido à competição que possa ocorrer entre o analito desejado e os demais componentes da matriz. Em geral, as principais desvantagens da SPE são o maior tempo de execução e complexidade operacional quando realizada de forma manual. Além disso, destaca-se o custo adicional dos cartuchos e discos que são utilizados geralmente uma única vez (LORD; PAWLISZYN, 2000; SILVA, 2012).

3.4.1. Processo de purificação e concentração em fase sólida

O processo da extração em fase sólida (SPE) pode ser descrita como sendo um processo cromatográfico simplificado, com o sorvente atuando como fase estacionária. A fase móvel é a água da amostra aquosa durante a etapa de extração ou o solvente orgânico durante a etapa de dessorção (eluição). Altos valores de recuperação são obtidos quando os analitos são fortemente retidos pelo sorvente na presença de água e quando eles têm baixa retenção com o solvente orgânico usado para dessorção. Para a realização da SPE, utilizando-se, por exemplo, C18 ou cartucho de troca iônica, são necessárias quatro etapas, as quais estão demonstradas na figura 11. Elas devem ser otimizadas de forma a obter-se uma recuperação máxima (SIMPSON; WELLS, 2000; WELLS, 2000).

A fase líquida é eluída sob pressão ou vácuo e o processo consiste em:

I) Condicionamento do sorvente através da passagem de um solvente que condicione a superfície do sólido, removendo quaisquer substâncias que estejam presas;

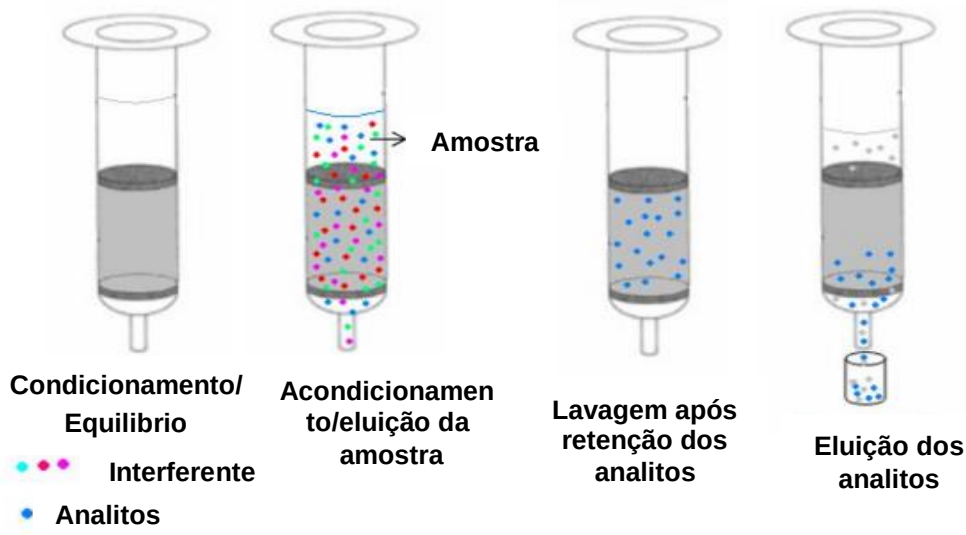
II) Equilíbrio com a remoção do solvente responsável pela ativação;

III) Acondicionamento da amostra no cartucho: a) O analito de interesse e os interferentes ficam retidos na fase sólida; b) O analito de interesse fica retido e parte dos interferentes passa pela fase sólida; c) O analito de interesse passa pelo sólido e os interferentes ficam retidos na fase sólida, neste caso a fração de interesse é imediatamente coletada;

IV) Lavagem: a fase sólida é lavada com um solvente apropriado, retirando os interferentes da matriz ou parte delas, sem eliminar os analitos de interesse (no caso 3a), no caso 3b a fase sólida não precisa ser lavada com um solvente apropriado para a remoção dos interferentes;

V) Eluição do analito de interesse do sorvente com um solvente apropriado.

Figura 11. Ilustração da extração em fase sólida



Adaptado de Silva (2012).

O procedimento geral é transportar a solução que contém o analito por uma resina ou sorvente pré-condicionado que possui afinidade com o analito que se quer analisar. Os analitos são retidos na resina e de seguida por meio de uma solução extrai-se os analitos praticamente sob a forma concentrada.

3.5. Liquid Chromatography Electro Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS-MS)

A cromatografia líquida é um método de separação física baseado na distribuição dos analitos entre duas fases. A primeira é a fase estacionária e a segunda, é uma fase líquida que se move através da fase estacionária em uma direção precisa. Muitos detectores são usados juntamente com a cromatografia líquida, tais como UV, fluorescência, condutividade, e espectrometria de massa. A espectrometria de massa permite a diferenciação de compostos que têm um tempo

de retenção similar independentemente da sua resolução cromatográfica (ARDREY, 2003), sendo uma excelente ferramenta qualitativa do peso molecular do composto. Além disso, a espectrometria de massa em tandem (MS/MS) induz fragmentos característicos do analito que permitem a elucidação dos suas estruturas. A MS/MS é considerada um detector muito seletivo e sensível para a quantificação de analitos, mesmo em matrizes complexas, como sangue, plasma e leite. A maior seletividade de MS/MS em comparação com MS simples é a massa dupla seleção, primeiro pela seleção de íons precursores de íons diferentes nas matrizes, e segundo pela seleção de íons de produtos, que surgiram a partir do íon precursor pré-selecionado.

Muitas técnicas são utilizadas para induzir a ionização dos analitos na fonte de íons sob pressão atmosférica tal como ionização química de pressão atmosférica (APCI) e ionização por eletro-pulverização (ESI). Para ESI, o eluído da HPLC, é dirigido para dentro do espectrômetro de massa através de um capilar mantido a alta tensão e pressão atmosférica. A aplicação de alta tensão na agulha de eletropulverização dispersa a corrente líquida formando uma névoa de gotículas altamente carregadas que são dessolvatadas durante a sua passagem através da região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por uma corrente de gás de secagem, normalmente nitrogênio. A ionização em ESI ocorre diretamente na solução durante a pulverização. A temperatura mais baixa que é aplicada em comparação com APCI torna ESI uma técnica de ionização mais suave, uma vez que não, ou quase nenhuma decomposição térmica das moléculas é formada durante a ionização.

Os compostos iónicos, ionizáveis e polares são facilmente ionizados por ESI, enquanto as moléculas não polares têm uma resposta muito pobre em ESI. A ionização é seguida pela evaporação do solvente assistido por calor a elevadas taxas de fluxo (ZIMMER, 2003). Na espectrometria de massa íons positivo, os íons são formados pela adição de espécies, principalmente prótons, à molécula do analito. No modo de íons negativos, as moléculas são normalmente desprotonadas para formar íons. O número de cargas no íon está relacionado com o número de espécies adicionadas. Assim, a relação massa/proporção da carga (m/z) de um íon depende do peso molecular do próprio analito, bem como sobre o número de espécies adicionadas, como mostrado pela seguinte equação:

$$m/z = (M+nA)/n$$

M: peso molecular do analito.

A: peso molecular da adicionada (1 para hidrogênio H^+, 18 para íon amônia NH^+_4 e 23 para sódio Na^+).

n: número de cargas que são transportadas pelo íon.

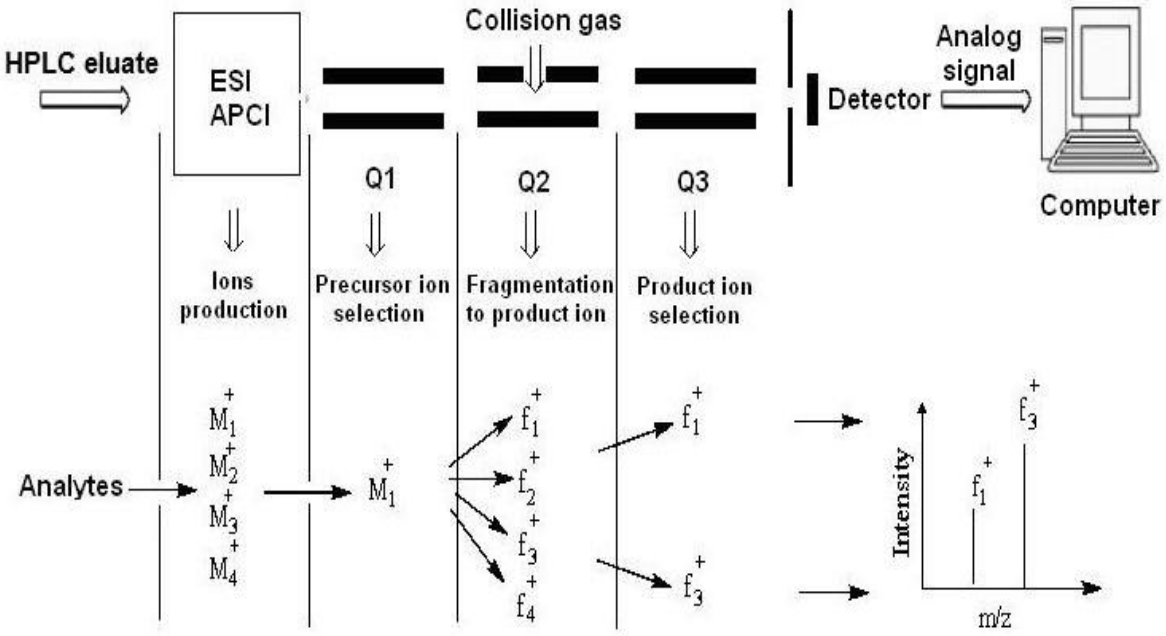
Os íons são gerados fora do analisador de massa e são então direcionados para sua entrada. O triplo quadrupolo é o analisador de massa mais utilizado em MS/MS. Ele consiste em três conjuntos de barras quadrupolares: dois analisadores de massa, MS1 e MS3 (Q1 e Q3), e a célula de colisão (Q2) (ARDREY, 2003). O Q-TOF (*Quadrupole Time-of-Flight*) é um espectrômetro de massas com alta resolução e exatidão de massa, possuindo um quadrupolo como “filtro de massa” e uma célula de colisão para experimentos de MS/MS. A figura 12 ilustra a montagem de um triplo espectrômetro de massa em tandem quadrupolar.

O íon molecular [M+H] + (íon precursor) é selecionado no primeiro analisador de massa (Q1), sendo então transmitida para a célula de colisão (Q2), onde a fragmentação é realizada. Na célula de colisão, os íons colidem com uma parede de moléculas de gás, geralmente nitrogênio, que é chamado gás de colisão. Os íons fragmentos gerados f+1, f+2, f+3, f+4 (produtos dos íons) são focados no segundo analisador de massa (Q3), onde normalmente apenas os produtos dos íons de mais altas intensidade são escolhidos e monitorados (f+1,f+3). Esta técnica é chamada de monitoração de reação selecionada (SRM), porque monitora a fragmentação de um íon precursor selecionado para um íon produto selecionado. É considerado como uma das experiências MS/MS mais amplamente utilizadas.

O termo reações múltiplas monitoramento (MRM) refere-se à monitoração simultânea de vários pares de produtos íons e íons precursores derivados de diferentes analitos (ZIMMER, 2003). Outras experiências MS-MS amplamente utilizadas são o produto íon-scan, o íon-scan precursor e a varredura de perda neutra constante. Um único íon produto é normalmente inadequado para identificar o analito de interesse. Se a cromatografia estiver envolvendo a combinação do tempo de retenção e de um único íon produto, pode ser considerado adequado, especialmente se esse íon é gerado por técnica de ionização suave. No entanto, a fim de assegurar a identidade do analito, recomenda-se para monitorizar pelo menos

dois íons de produto da substância a analisar (ARDREY, 2003). Nesses casos, o produto que dá um pico cromatográfico com a maior intensidade é chamado o fragmento quantificador (f+3), porque é usado para quantificação. Os outros fragmentos são usados para confirmar a identidade do analito e é chamado o qualificador fragmentos (f+1). A espectrometria de massa é comumente utilizada para a quantificação de moléculas de peso molecular abaixo de 1000-2000 Da (ZIMMER, 2003).

Figura 12. Ilustração esquemática da espectrometria de massa em tandem no modo MRM.



Adaptado de Zimmer, 2003.

3.6. AGEs em leite e derivados

A utilização do leite na dieta alimentar ocorre, principalmente pelo fato deste produto ser fonte de nutrientes essenciais à promoção do crescimento e da manutenção da vida. A composição média do leite em termos percentuais é de 87,5% de água, 4,9% lactose, 3,9% gordura, 3,5% proteínas e 0,9% de sais minerais. Assim, infere-se que 1L de leite fornece 35 g de proteína, 39 g de gorduras, 49 g de lactose e 9 g de sais minerais. Cada um destes componentes apresenta fundamental importância em termos de necessidades diárias do organismo (MAGALHÃES, 2006; AGUILAR et al., 2012).

De acordo com Martins et al. (2005), nos últimos anos a população brasileira, vem se preocupando mais, com a qualidade dos alimentos que chegam à sua mesa. No caso do leite, além das preocupações com as características organolépticas (sabor, odor, cor) as questões sanitárias e o tempo de vida de prateleira do produto também são observados.

Diante dos riscos sanitários, inerentes à ingestão de leite obtido e processado em condições insatisfatórias, se faz necessário à aplicação de um tratamento térmico eficiente para a destruição dos microrganismos. O processo de conservação de alimento é baseado na eliminação total ou parcial dos agentes que podem alterar os produtos, tais como: microrganismos, enzimas, oxigênio, água, luz e calor (AGUILAR et al., 2012). Os métodos de conservação que utilizam calor visam principalmente a eliminação de microrganismos indesejáveis, que se encontram no alimento e que podem causar transtornos à saúde humana. Existem vários métodos e técnicas de conservação de alimento pelo calor que incluem a pasteurização, tindalização, branqueamento, esterilização, entre outros métodos (SILVA, 2000).

O tratamento térmico empregado na produção de leite e derivados tem a finalidade de garantir a segurança do leite e de seus derivados, aumentando a vida útil e conferindo qualidades sensoriais desejáveis. Entretanto, esse mesmo tratamento pode afetar a segurança e valor nutricional do produto, devido aos danos oxidativos gerados pela temperatura nas moléculas de proteínas e de lipídeos.

Devido às modificações que ocorrem no leite durante o tratamento térmico, vários marcadores químicos são comumente utilizados para avaliar essas modificações, como a avaliação da oxidação de lipídeos, que são umas das principais causas de deterioração da qualidade durante o processamento e armazenamento de produtos à base de leite. Neste monitoramento é analisada a presença de produtos de oxidação de lipídeos, tais como o malondialdeído (MDA) ou aldeídos saturados voláteis, como o hexanal (CESA, 2004; FENAILLE et al., 2001; GIAMMARIOLI et al.,1997; FENAILLE et al., 2003; ROMEU-NADAL et al., 2004; ULBERTH; ROUBICEK, 1995; FENAILLE et al., 2006).

Ao analisar a presença de carboximetilisina (CML) em 36 amostras de leite e derivados coletados na França e na Suíça, Fenaille et al. (2006) observaram valores de CML que variaram de 16,3 ng/mg^{-1} (leite pasteurizado) a 212,4 ng/mg^{-1} (leite hipoalergênicos). O estudo realizado por esses pesquisados, apesar de importante,

não retrata a realidade da indústria do leite no Brasil, pois além da legislação que regulamenta a produção e processamento do leite no Brasil ser diferente, o volume de leite processado no país é bem maior que nos países que Fenaille et al. (2006) fizeram a pesquisa. Além disso, deve-se levar em consideração as variações que o processamento do leite sofre nas diferentes regiões do Brasil.

3.7. Tipos de tratamentos térmicos aplicados no processamento do leite

Devido à composição físico-química e microbiológica, o leite é um alimento altamente perecível e por isso deve ser submetido, logo após sua obtenção, a um processo com a finalidade de evitar a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes. A escolha do tratamento vai depender do produto que se deseja obter, do prazo de validade requerido, do tipo de alteração que pode causar e do grau bacteriano que se deseja destruir (TRONCO, 2008). Entre os métodos de conservação utilizados pelas indústrias de beneficiamento de leite, destaca-se a pasteurização (lenta e rápida), a esterilização e a desidratação.

3.7.1. Pasteurização

A pasteurização é um tratamento térmico que tem como objetivo a obtenção de um leite saudável e com a vida útil prolongada. O processo de pasteurização consiste na aplicação de um tratamento térmico no leite, com a finalidade de destruir os microrganismos patogênicos e parte da flora banal do leite, evitando a disseminação de doenças, preservando as características físico-químicas pela destruição quase total de sua microbiota normal ou saprófita conjuntamente com a inativação de algumas enzimas. Com relação ao tempo e a temperatura a ser utilizado, o processo pode ser realizado de duas formas: a baixas temperaturas (pasteurização lenta) denominado LTLT (*Low Temperature Long Time*), realizado em temperaturas próximas de 63°C por 30 minutos e a altas temperaturas (pasteurização rápida), esse processo é denominado HTST (*High Temperature Short Time*) realizado a 72°C por 15 segundos (SILVA, 2000).

Segundo o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado, da Instrução Normativa nº51 de 2002 (BRASIL, 2002), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o leite pasteurizado é o fluído elaborado a

partir do leite cru refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima contidas em regulamento técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador, submetido ao tratamento térmico de 72-75ºC durante 15-20 segundos, em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4ºC e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações, garantindo que a pasteurização seja eficiente.

A pasteurização lenta, não é permitida em estabelecimentos sob Inspeção Sanitária Federal, (SIF) de acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado. A vantagem da pasteurização lenta se dá pelo fato desse tratamento térmico conservar as propriedades do leite o mais próximo do seu estado *in natura*, principalmente a cor e o sabor (TRONCO 2008).

Os cuidados no tempo e temperatura utilizados na pasteurização rápida são imprescindíveis para manutenção da qualidade do leite, visto que erros no processo pode resultar em vários problemas, como redução da funcionalidade, mudança na viscosidade, aumento da desnaturação das proteínas e vitaminas, implicações higiênico-sanitárias, coloração indesejável, odor e sabor indesejável, além da produção excessiva de AGEs.

3.7.2. Esterilização

De acordo a Portaria nº370, de 04 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), leite esterilizado ou UHT é o leite homogeneizado submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130ºC a 150ºC, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32ºC e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

A esterilização comercial tem por objetivo aumentar significativamente a vida de prateleira do produto, por destruição dos microrganismos (tanto patogênicos como deteriorantes) na forma vegetativa. Com esse processo térmico, a vida de prateleira do leite aumenta em até 180 dias. Além disso, o processo evita a oxidação

das gorduras, pois o ar é retirado no processo de envase, assim, o produto é comumente chamado de leite longa vida (TRONCO, 2008).

No sistema convencional de esterilização, o leite é devidamente embalado em um recipiente hermeticamente fechado, impermeável aos líquidos e aos microrganismos e esterilizado depois de envasado por meio do calor, que deve destruir as enzimas e os microrganismos patógenos. A esterilização se realiza a uma temperatura de 109°C a 120°C por um período de 15 a 40 minutos. Este método, apesar de ser pouco utilizado, ainda é usado por algumas indústrias. Entre os tratamentos térmicos, esse é o que mais contribui para a formação de AGEs no leite.

3.7.3. Desidratação

No processamento do leite em pó, após a pasteurização é realiza a concentração do leite, sempre em equipamentos a vácuo, com o objetivo de baixar a temperatura de ebulição e evitar modificações profundas na estrutura do leite. A desidratação é realizada mediante ação do calor sobre cilindros ou pulverização em uma câmara (sistema spray). No sistema de cilindros, o leite é uniformemente distribuído em forma de uma fina camada sobre a superfície de dois cilindros que giram em sentido contrário em torno de 14 a 19rpm (rotação por minutos) e aquecidos por vapor internamente, a temperatura de 130ºC a 160ºC. Nas partes superiores dos cilindros, são adaptados raspadores especiais para remover a película seca do leite, caindo esta em uma rosca sem fim, sendo transportada para moinhos especiais para dar textura desejada no leite em pó (ORDONEZ, 2005).

No sistema spray, o leite concentrado é pulverizado no interior de uma câmara, em formas de diminutas gotas, cujo tamanho deve ser o mais uniforme possível, entrando em contato com uma corrente de ar filtrado e quente a temperatura de 160ºC a 200ºC (ORDONEZ, 2005).

3.8. Efeitos do tratamento térmico sobre o leite

Durante o tratamento térmico do leite, muitas reações podem envolver apenas proteína ou proteína com os outros macronutrientes. Estas reações incluem:

- ✓ Reações de proteínas: A lisinoalanina (LAL) é formada pela reação de lisina com dehidroalanina. Este último é produzido pela β-eliminação de cisteína e serina (MAURON, 1990). O conteúdo de LAL em leite esterilizado e condensado é 13 e 18 vezes maior do que o teor em leite fresco (HAAGSMA; SLUMP, 1978).
- ✓ Interações lipídeos-oxidados proteínas: Durante essas reações, lipídios insaturados são oxidados resultando em produtos diferentes. Estes produtos podem ser classificados em produtos primários (hidroperóxido), produtos secundários (aldeído, cetona, carbonilos) e produtos estáveis como ácidos carboxílicos. A metionina é rapidamente oxidada por hidroperóxidos em sulfóxido de metionina, enquanto a lisina reage com os produtos secundários como aldeído e cetona numa reação de tipo Maillard (NIELSEN et al., 1985).
- ✓ Interações proteína-polifenol: Esses processos incluem a reação de lisina ou metionina com quinonas para formar adutos de lisina-quinonas e metionina sulfoxido, respectivamente (MAURON, 1990). Tal reação pode ser produtos de tipo chocoleite.
- ✓ Reações de proteína-lactose: Esta reação é chamada de reação de Maillard ou glicação protéica e é considerada como a reação mais frequente no leite durante o processamento.
- ✓ Oxidação de proteínas: Em paralelo à glicação, as proteínas do leite são submetidas a várias reações de oxidação sob condições de processamento (MAURON, 1990). Nos produtos lácteos, triptofano, metionina e cisteína são particularmente sensíveis à modificação oxidativa. Por exemplo, a oxidação do triptofano pode levar a um número importante de derivados gerados pela abertura do anel indol. A oxidação converte metionina em sulfóxido de metionina (GUY; FENAILLE, 2006). A cisteína pode ser oxidada em ácido cisteína sulfênico (MELTRETTER; SEEBER et al., 2007). Outros resíduos, tais como lisina, prolina, arginina, histidina e tirosina também podem ser sujeita a oxidação. A oxidação desses últimos aminoácidos é frequentemente caracterizada pela formação de grupos carbonilo dentro de suas estruturas (GUY; FENAILLE, 2006). A formação de carbonilo é também um resultado da reação entre o grupo amino e os compostos de dicarbonilo reativos gerados a partir da reação de Maillard e/ou oxidação de lipídeos. Além disso, o radical

livre produzido pela oxidação catalisada por metal em fórmulas para lactentes pode produzir grupos carbonilo. Portanto, o teor de proteína carbonila é usado como indicador para a oxidação de proteínas (FENAILLE; PARISOD et al., 2005). A lisina aldeído é um exemplo para de um produto carbonilo formado em proteínas de leite durante o tratamento térmico (MELTRETTER; SEEBER et al., 2007).

- ✓ Desnaturação: O tratamento térmico pode alterar estruturas secundárias e terciárias de proteínas do leite, principalmente proteínas de soro de leite que causam desnaturação (MAURON, 1990). A ordem de estabilidade ao calor da proteína de soro de leite é: α-LA> β-LG> BSA> IgG (MORTIER et al., 2000). Durante a desnaturação, os grupos sulfidrilo são clivados, especialmente em β-LG, levando à formação de compostos de enxofre, como sulfureto de metilo, que contribuem para o sabor característico do leite (CALVO, 1992).

Todas essas interações promovem à degradação de aminoácidos essenciais, bem como a uma diminuição da digestibilidade das proteínas do leite.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Metanol para uso em HPLC (MeOH), clorofórmio, ácido fórmico, n-hexano, acetona, ácido clorídrico HCl 37%, borato de sódio, borohidreto de sódio, tampão Tris, solução de hidróxido de amônia (NH_4OH) e acetronitrila (ACN), ácido nonafluorpentanoíco (NFPA) 97%, ácido trifluoracético (TFA), pepsina, pronase E, leucina aminopeptidase e prolidase foram adquiridas da Sigma–Aldrich (St Louis, MO). CML, pentosidina (Pen), pyrralina (Pyr) e teofilina, usada como padrão interno (IS) foram adquiridas da Polypeptide Groupe (Strasbourg, Fr).

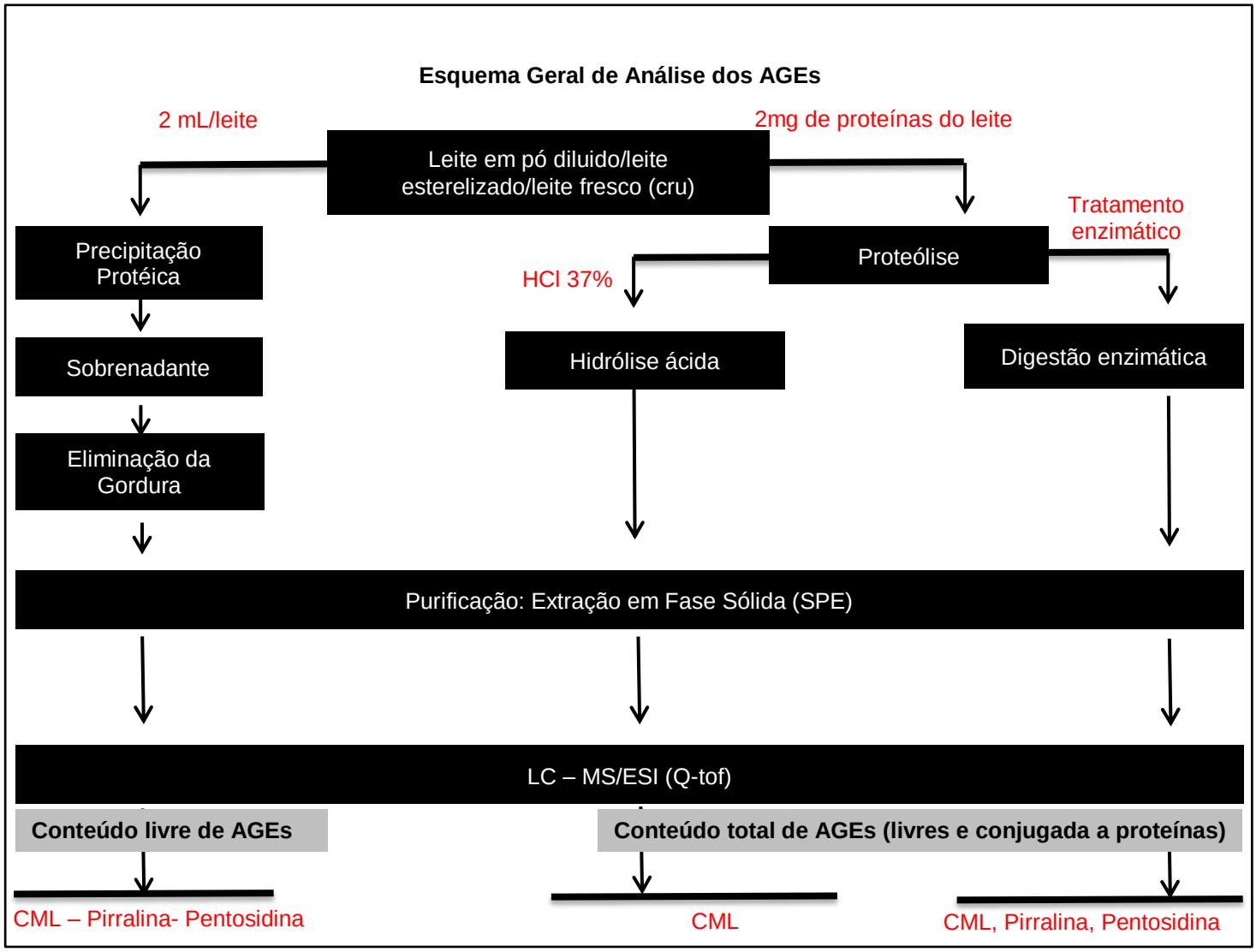
4.2. Amostras de leite

Foram utilizadas amostras de leite em pó integral, semidesnatado e desnatado, além de amostras de leite cru e esterilizado. Todas as amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Estrasburgo, França. As amostras em pó foram diluídas conforme as recomendações dos fabricantes, a de leite cru também foi adquirida em supermercados locais, visto que a legislação francesa permite a comercialização do leite cru ultrafiltrado. O leite esterilizado foi preparado a partir do leite em pó integral, aquecido em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.3. Preparação das amostras

Para extração dos AGEs, as amostras passaram pelo processo de precipitação proteica, digestão enzimática e hidrólise ácida com ácido clorídrico 37%. Após a extração, as amostras foram submetidas a um processo de purificação por extração em fase sólida (SPE). Todos os métodos utilizados para extração dos compostos alvos, estão simplificados na figura 13.

Figura 13. Esquema geral de análise dos AGEs.



Adaptado de Hegele et al., 2008

4.4. Extração de CML, pentosidina e pirralina livres

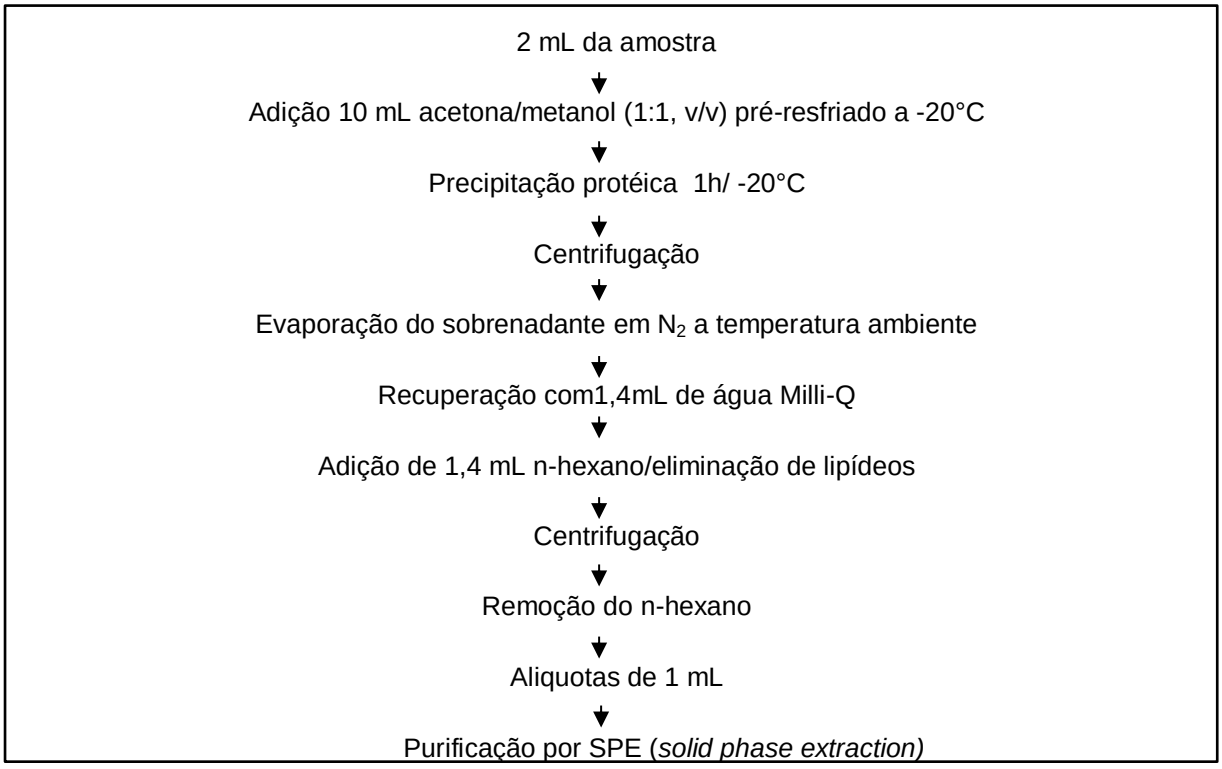
4.4.1. Precipitação protéica

O método descrito por Hegele et al. (2008), com alguma modificações, foi utilizado para a extração dos AGEs por precipitação protéica (Fig. 14). Dois microlitros (2 mL) da amostra de leite, foram misturados com 10 mL de metanol/acetona (v/v, 1:1) pré-resfriado a -20°C em tubos de polipropileno de 15 mL, sendo homogeneizadas e armazenadas por 1 h a -20°C. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de ensaio e a solução foi evaporada até a secura com N_2 a

temperatura ambiente. O remanescente foi resuspendido em 1,4 mL de água Milli-Q. Igual volume de n-hexano (1,4 mL) também foi adicionado e agitado vigorosamente, com o objetivo de eliminação dos resíduos de lipídeos. Após, a mistura foi novamente centrifugada a 5000 rpm por 5 min. A fase com n-hexano fui cuidadosamente removida com um auxílio de uma pipeta Pasteur. Um microlitro (1 mL) da fase aquosa restante, foi purificada por extração em fase sólida (SPE). Antes da etapa SPE, a fase aquosa foi suplementada com 200 µL de uma mistura dos padrões, contendo as seguintes concentrações: CML (3 µg/mL, 30 ppm), Pen (0.45 µg/mL, 4,5ppm) e Pyr (0.6 µg/mL, 6ppm) e teofilina (0,3 µg/mL, 3 ppm), usada como padrão interno (IS). Amostras de leite não contaminada, também foram purificadas para a determinação de AGEs.

O método de extração por precipitação protéica, limita-se a extrair apenas os AGEs que estão livres na amostra, ou seja, não ligados às proteínas.

Figura 14. Fluxograma da precipitação protéica.



4.4.2. Hidrólise Ácida

Alíquotas de 100 mg de proteínas das amostras de leite foram diluídas em água (volume final de 10 mL). De acordo com o tipo de leite, as alíquotas com 100mg de proteínas variaram de volume. Os valores de proteínas indicados pelos

fabricantes, bem como o volume das amostras de leite contendo 100 mg de proteínas, são apresentados na tabela 2. Porções com 2 mg de proteínas (200 µL do volume final) foram adicionadas à tubos de vidro com roscas, resistentes a altas temperaturas (Fig. 15), contendo 1,5 mL de borato de sódio 0,2M (pH 9,5) e 1,0 mL de borohidreto de sódio 1,0 M em NaOH 0,1 M, sendo incubadas em seguida por 4 horas a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado aos tubos 2,6 mL de HCl 37% e as amostras foram hidrolisadas a 110°C por 24 h. O hidrolisado foi evaporado até à secura com N_2 e reconstituídos em 1380 µL de um tampão constituído por: 37,6 mL de HCl 0,02 N, 11,7 mL de tampão Tris 2 M (pH 8,2) e 725 µL de água (Hegele et al., 2008). Utilizou-se uma alíquota de 1 mL contaminada com 200 µL da mesma mistura dos padrões utilizada na precipitação protéica, para a purificação em SPE (Fig. 16). Amostras de leite não contaminada, também foram purificadas para a determinação de AGEs.

O método de extração por hidrólise ácida limita-se a extrair somente a CML, tanto as que estão livres, como as que se apresentam ligadas às proteínas.

Tabela 2. Conteúdo de proteínas e valores utilizados das amostras de leite utilizadas para análise de AGEs.

Tipo de leite	Conteúdo de proteína indicado no rótulo/100 mL	Diluição do leite contendo 100 mg de proteínas
Leite em pó integral	26 g	2,47 mL
Leite em pó semidesnatado	31 g	2,63 mL
Leite em pó desnatado	36 g	2,49 mL
Leite esterilizado integral	26 g	2,47 mL
Leite cru ultrafiltrado	32 g	3,12 mL

Figura 15. Hidrólise ácida, preparação das amostras.

Fonte: autor

Figura 16. Fluxograma da hidrólise ácida.

100 mg de proteínas

↓

Diluição: água (volume final de 10 mL)

↓

Alíquotas com 2000 µg/2 mg de proteínas

↓

Mistura: 1,5 mL de borato de sódio 0,2 M (pH 9,5) + 1,0 mL de borohidreto de sódio 1,0 M/em NaOH 0,1 M

↓

1ª Incubação: 4h em temperatura ambiente

↓

Adição de 2,6 mL de HCl 37%

↓

2ª Incubação: hidrólise por 24h a 110°C

↓

Evaporação: evaporação até a secura com N_2

↓

Reconstituição: em 1380 µL de uma solução tampão (37,6 mL de 0,02 N HCl, 11,7 mL de tampão Tris 2,0 M (pH 8,2) e 725 µL de água Milli-Q

↓

Aliquotas de 1 mL

↓

Purificação por SPE (*solid phase extraction)*

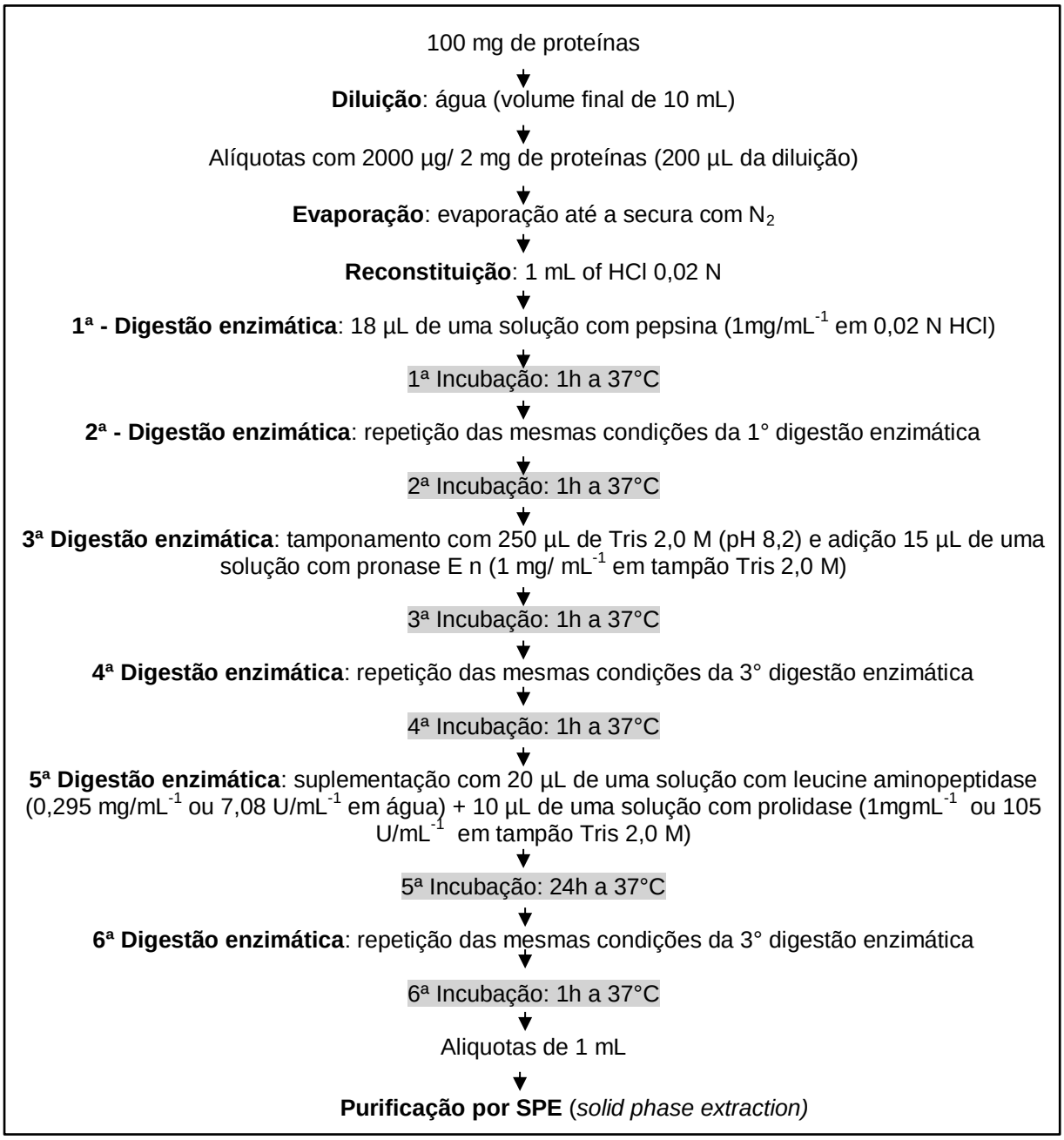
4.4.3. Digestão Enzimática

Para extração do conteúdo global de AGEs (AGEs livre e ligados as proteínas), adotou-se o protocolo descrito por Delatour et al. (2007), com alguma

modificações. Uma alíquota de 100 mg de proteínas fui diluída em água, até um volume final de 10mL. Porções contendo 2 mg de proteínas foram evaporadas até a secura sob fluxo de N_2. Os resíduos secos foram reconstituídos em 1 mL de HCl 0.02 N. Em alíquotas correspondendo a 2 mg de proteínas do reconstituído (200 µL), foram adicionados 18 µL de uma solução de pepsina (1 $mgmL^{-1}$ em HCl 0,02N) seguido de uma incubação por 1h a 37°C. Esse tratamento foi repetido por uma segunda vez, e em seguida, as amostras foram tamponadas com 250 µL de Tris 2 M (pH 8,2) e subsequentemente digeridas com pronase E. O tratamento com pronase E, foi repetido duas vezes, sendo adicionado a cada tratamento 15 µL de uma solução de pronase E (1 mg/mL^{-1} em tampão Tris 2 M) e incubada por 1h a 37°C, em cada repetição. Por fim, foi adicionado nas amostras 20 µL de uma solução de leucina aminopeptidase (0,295 mg/mL^{-1} ou 7,08 U/mL^{-1} em água) e 10 µL de uma solução de prolidase (1$mgmL^{-1}$ ou 105UmL^{-1} em tampão Tris 2M) e incubadas por 24h a 37°C. Finalmente, realizou-se um terceiro tratamento com pronase E, aplicando as mesmas condições descritas acima (15 µL de pronase E, incubação por 1h a 37°C). Uma alíquota de 1 mL da solução resultante foi contaminada com 200 µL da mesma mistura dos padrões utilizada na precipitação protéica para purificação e concentração em SPE (Fig. 17).

Amostras de leite não contaminada, também foram purificadas para a determinação de AGEs.

Figura 17. Fluxograma da digestão enzimática.



4.5. Purificação e concentração por SPE

O método de purificação é imprescindível para a eliminação de interferentes da amostra, de tal modo que os analitos alvos sejam determinados com precisão e exatidão pelo LC-MS. O desenvolvimento do método de purificação incluíram dois cartuchos, um usualmente utilizado C18, e outro ainda pouco relatado na literatura para análise de AGES, cartuchos de troca iônica. Nos dois tipos de cartuchos foram testado apenas a mistura dos padrões (200 µL), nas mesmas concentrações

utilizadas no processo de contaminação das amostras (CML 3 µg/mL, Pen 0,45 µg/mL, Pyr 0,6 µg/mL e IS 0,3 µg/mL), bem como as amostras de leite contaminadas e não contaminadas.

As amostras provenientes da precipitação protéica foram purificadas utilizando cartuchos C18 Oasis HLB 6cc, 200 mg (Waters, Milford, MA, USA) e com troca iônica (Polyclean 30HCX, Interchim, Montluçon, Fr). As amostras provenientes da digestão enzimática foram submetidas à etapa de purificação, utilizando apenas cartuchos 30HCX, enquanto que as amostras submetidas à hidrólise ácida foram submetidas apenas a purificação com os cartuchos C18. Após a otimização dos métodos de purificação, todas as amostras foram analisadas em triplicada.

4.5.1. Cartucho C18

Antes de serem testadas com o cartucho C18, todas as amostras foram contaminadas 100 µL de NFPA. O cartucho C18 foi pré-condicionado com 4 mL de MeOH, seguido por 4 mL de NFPA (10mM) com uma taxa de fluxo de 2 mL/min. Em seguida, as amostras foram acondicionadas no cartucho C18 com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min, em sequencia o cartucho foi lavado com uma alíquota de 4 mL de NFPA (10mM) e outra com 4 mL de NFPA (10mM)/MeOH (v/v, 95%:5%). Finalmente, as frações contendo AGEs, foram eluídas com 4 mL de MeOH/NFPA 10 mM (v/v; 90%:10%), com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. As frações foram evaporadas até a secura em uma corrente de gás de nitrogênio a 40°C, sendo resuspendidas em 200 µL de ácido trifluoroacético 0,1%, e filtradas através de um filtro de 0,22 µm antes da análise cromatográfica. Dois microlitros (2 µL) foram injetados em um sistema UPLC/ESI/Q-TOF.

4.5.2. Cartucho Polyclean 30HCX

O principio de condicionamento, equilíbrio, acondicionamento das amostras, lavagem e eluição, são os mesmos nos dois tipos de cartuchos, sendo modificados os solventes utilizados nessas etapas. O pré-condicionamento do cartucho 30HCX, foi realizado com 3 mL de MeOH, seguido por 3 mL de água MilliQ/ácido fórmico 0.1%. Um microlitro (1 mL) da amostra foi acondicionada no cartucho pré-condicionado com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. Em sequencia, os cartuchos

foram lavados com 3 mL de água MilliQ/ácido fórmico 0.1% e 3 mL de ACN. Finalmente, os compostos alvos foram eluídos com 3 mL de acetronitrila/amônia (v/v; 95%:5%), e depois 3 mL de MeOH/amônia (v/v; 95%:5%) com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. As frações foram evaporadas em uma corrente de gás de nitrogênio a 30°C até a secura, sendo resuspendidas em 200 µL de ácido trifluoroacético 0,1%, e filtradas através de um filtro de 0,22 µm antes da análise cromatográfica. Dois microlitros (2 µL) foram injetados em um sistema UPLC/ESI/Q-TOF.

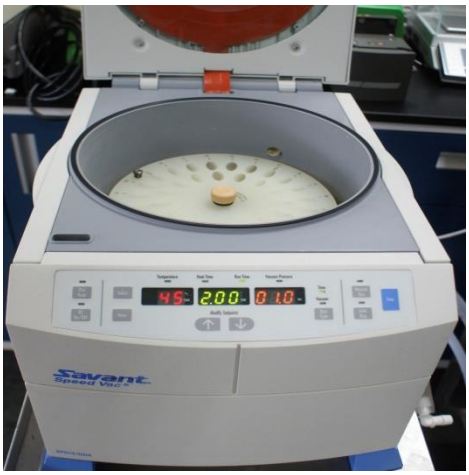
Os métodos de extração em fase sólidas (SPE) supracitados forram a versão final de um processo de otimização realizado ao longo da pesquisa. Na tabela 3, é simplificado todos os métodos SPE testados.

Tabela 3. Extração em Fase Sólida (SPE)

Etapas	**Cartucho C18**	**Cartucho polyclean 30HCX**			
		Método 1	**Método 2**	**Método 3**	**Método 4**
Condicionamento	4 mL de MeOH	3 mL de MeOH	3 mL de MeOH	3 mL de MeOH	3 mL de MeOH
Equilíbrio	4 mL NFPA (10mM)	3 mL H_2O	3 mL H_2O/ácido fórmico 2%	3 mL H_2O/ ácido fórmico 0,1%	3 mL H_2O/ ácido fórmico 0,1%
1ª - Lavagem	4 mL NFPA (10mM)	3 mL H_2O	3 mL H_2O/ácido fórmico 2%	3 mL H_2O/ ácido fórmico 0,1%	3 mL H_2O/ ácido fórmico 0,1%
2ª – Lavagem	4 mL NFPA (10mM)/MeOH 5%	3 mL MeOH	3 mL MeOH	3 mL MeOH	3 mL ACN
Eluição	4 mL MeOH/ NFPA (10mM) 10%	4 mL MeOH/ amônia 5%	4 mL MeOH/ amônia 5%	4 mL MeOH/ amônia 5%	3 mL ACN/amônia 5% + 3mL MeOH/ amônia 5%

Ao longo do processo de otimização das etapas SPE foram avaliados concomitantemente a influência da temperatura de evaporação em gás de nitrogênio, bem como a influência do equipamento usado para a evaporação. Os equipamentos utilizados e testados para a evaporação das amostras foram do tipo Turbovap, na qual o nitrogênio é injetado individualmente nos tubos e a temperatura é controlada através do banho-maria associado, e o outro sistema foi do tipo SpeedVac (Fig. 18), associado com a centrifugação e uma bomba de vácuo, apresentando também controle de temperatura.

Figura 18. Speedvac (a) e Turbovap (b) utilizados para evaporação de amostras.

a)  b)

Fonte: Labcare, UK.

4.6. Análise LC-MS/ESI (Q-ToF)

As análises em cromatografia líquida foram realizadas em UPLC-ESI/Q-TOF (Waters, França) acoplado a um Bruker Q-TOF detector de massa (Bruker, Germany). A separação cromatográfica dos AGEs, foi realizada com o uso de uma coluna Acquity HSS C18 SB column (150 mm x 2,1 mm, 1,8 µm; Waters Inc.) e com fase móvel composta por água/ácido fórmico 0.1% (fase móvel A) e ACN/ácido fórmico 0.1% (fase móvel B), com taxa de fluxo de 0,3 mL/min, com gradiente de concentração modificando conforme a seguir: 0-3 min, 1-8% B; 3-8 min, 8-30% B; 8-13 min, 30% B; 13-13.5 min, 30-1% B; 13.3-18 min, 1% B, sendo injetado um volume de 2 µL das amostras. Os AGEs foram determinados de acordo com a sua área de pico dos íons selecionados nos cromatogramas, obtidos de um total de íons

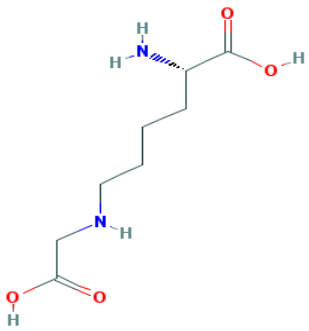
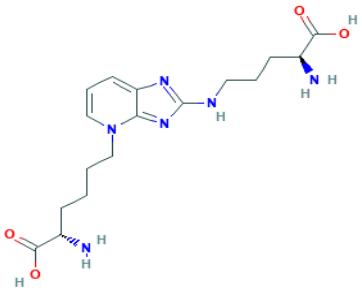
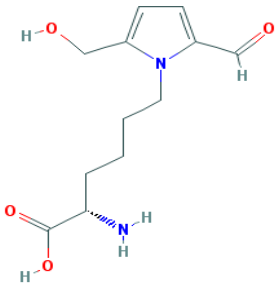
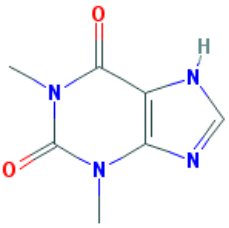
registrados nos cromatogramas (*m*/z 100-600) em comparação com os obtidos com os padrões de AGEs. O *m*/z usado para cada AGEs e IS foram de 205,12, 135,65, 175,12 e 181,07 para CML, Pent, Pyr e IS, respectivamente. O sistema UPLC empregado, foi otimizado usando um interface “electrospray” ESI/Q-TOF usando um tensão capilar de 4.5 kV, em modo positivo ESI, e com uma temperatura de dessolvatação do gás a 200°C com um fluxo de 9 L/min, com monitoramento de reação múltipla (MRM).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Padrões cromatográficos

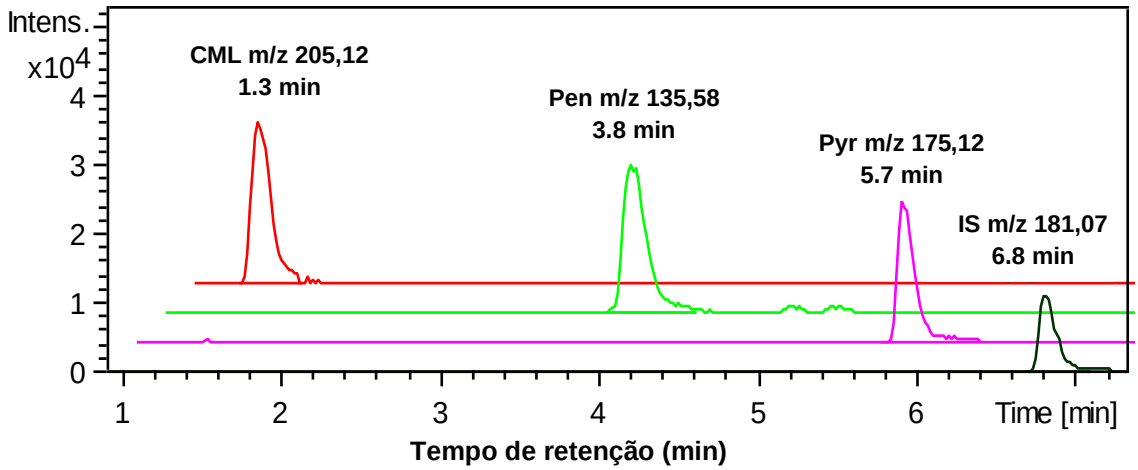
Inicialmente foram estabelecidas as condições cromatográficas dos padrões de CML, pentosidina e pirralina, além da escolha do padrão interno (IS) a ser utilizado (teofilina) durante o desenvolvimento do trabalho. As características principais desses compostos são apresentadas na tabela 4:

Tabela 4. Características cromatográficos dos padrões.

Características	**Compostos**	
AGEs/Marca	CML - PolyPeptide	Pentosidina - PolyPeptide
Fórmula Química	$C_8H_{16}N_2O_4$	$C_{17}H_{26}N_6O_4$
Fórmula Estrutural		
Peso Molecular m/z $(M+H)^+$	205,1188	379,2093
Íons fragmentos (íons filhos)	130,08	135,65 167,15
Grau de Pureza	-	99,5%
pKa	1,61 10,6	1,51 9,83
Características	**Compostos**	
Marca	Pirralina - PolyPeptide	Teofilina
Fórmula Química	$C_{12}H_{18}N_2O_4$	$C_7H_8N_4O_2$
Fórmula Estrutural		
Peso Molecular m/z $(M+H)^+$	255.13	181,07
Íons fragmentos (íons filhos)	237,12 175,12	-
Grau de Pureza	99,7%	-
pKa	2,03 9,33	8,81

As soluções estoques de AGEs, foram preparadas com TFA 0,1%, conforme as recomendações do fabricante e armazenadas a -20°C. A partir dessas soluções foi preparado uma mistura de AGEs, nas concentrações de 30 ppm (3 µg/mL), 4,5 ppm (0,45 µg/mL), 6 ppm (0,6 µg/mL) e 3 ppm (0,3 µg/mL), de CML, Pen, Pyr e IS, respectivamente. Essa diluição foi utilizada como base para a otimização das condições de análise no UPLC/ESI/Q-TOF e da etapa de concentração e purificação por SPE. O equipamento foi operado em modo positivo, com fase móvel de água/ácido fórmico 0,1% (fase móvel A) e ACN/ácido fórmico 0,1% (fase móvel B) -. O tempo de retenção obtido para os AGEs foi de 1.3 min, 3.8 min, 5.7 min, e 6.8 min para CML, Pen, Pyr e IS, respectivamente (Fig. 19).

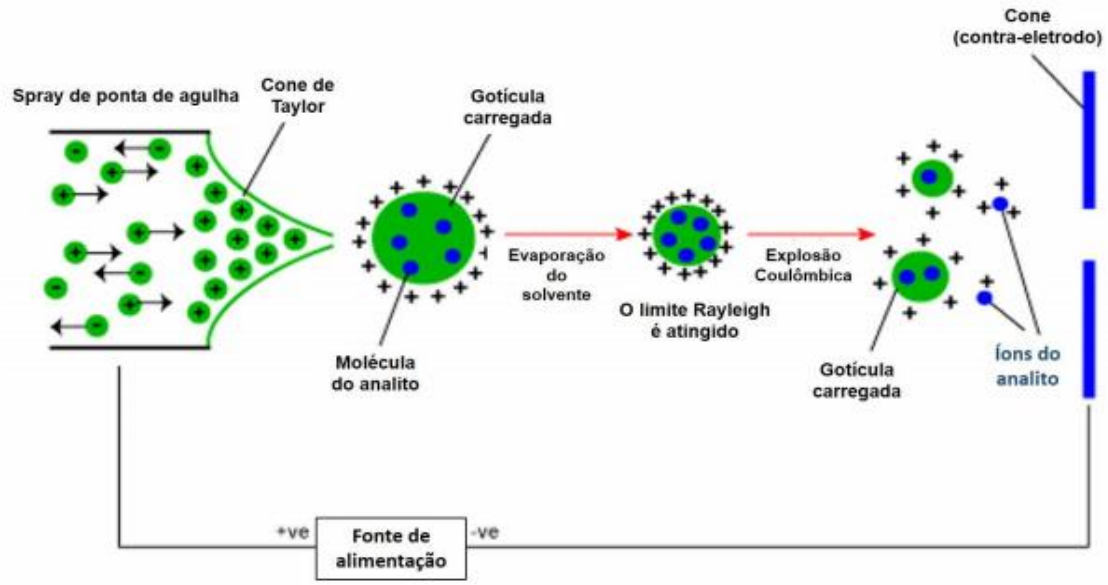
Figura 19. Cromatograma com os 205,12 (CML), 135,65 (Pen), 175,12 (Pyr) e 181,07 para IS.



Devido a forte resposta induzida pelos grupos aminas dos AGEs (-NH2, -NH-, -N=) em fase móvel acidificada, o equipamento foi operado em modo ESI positivo. O modo positivo ou negativo do electrospray (Fig. 20) depende do sinal da tensão aplicada (LANÇAS, 2009). A solução de analito passa através da agulha de eletro pulverização que tem uma diferença de potencial elevado. As gotículas carregadas são então pulverizadas com uma carga de superfície de mesma polaridade que a carga sobre a agulha. As gotículas são repelidas da agulha em direção ao cone Taylor. À medida que as gotículas atravessam, ocorre a evaporação do solvente até que a tensão de superfície não possa sustentar a carga (Limite de Rayleigh). Neste momento ocorre a explosão de Coulomb e são produzidas gotículas carregadas

menores que podem repetir o processo. No modo positivo, as gotículas que saem do “spray” terão carga positiva.

Figura 20. Modo de operação positvo/negativo do electrospray**.**



Adaptado de Lanças (2009) e http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html

A decomposição induzida por colisão de cada AGEs, gerou fragmentação dos íons (descrita na tabela 4). De cada composto, os fragmentos dos íons mais proeminentes na intensidade iônica foram escolhidos para quantificação e confirmação dos AGEs (Fig. 21 e 22). Para pentosidina e pirralina os fragmentos iônicos que apresentaram maior intensidade iônica foram m/z 135,58 e 175,12, respectivamente. Para a CML, foi utilizado a m/z da molécula, 205,12, visto que ela apresentou maior intensidade iônica que o seu fragmento 130,08. A colisão que induziu a dissociação desses AGEs, foi devido à perda de fragmentos de -$NHCH_2COOH$ e/ou –COOH (TEERLINK et al., 2004; ZHANG et al., 2011). A quantificação dos AGEs das amostras, foi comparado com o padrão interno em termos de tempo relativo de retenção e abundância relativa dos três analitos alvos.

Figura 21. Produtos de fragmentação iônica de CML (a) Pen (b) e Pyr (c).

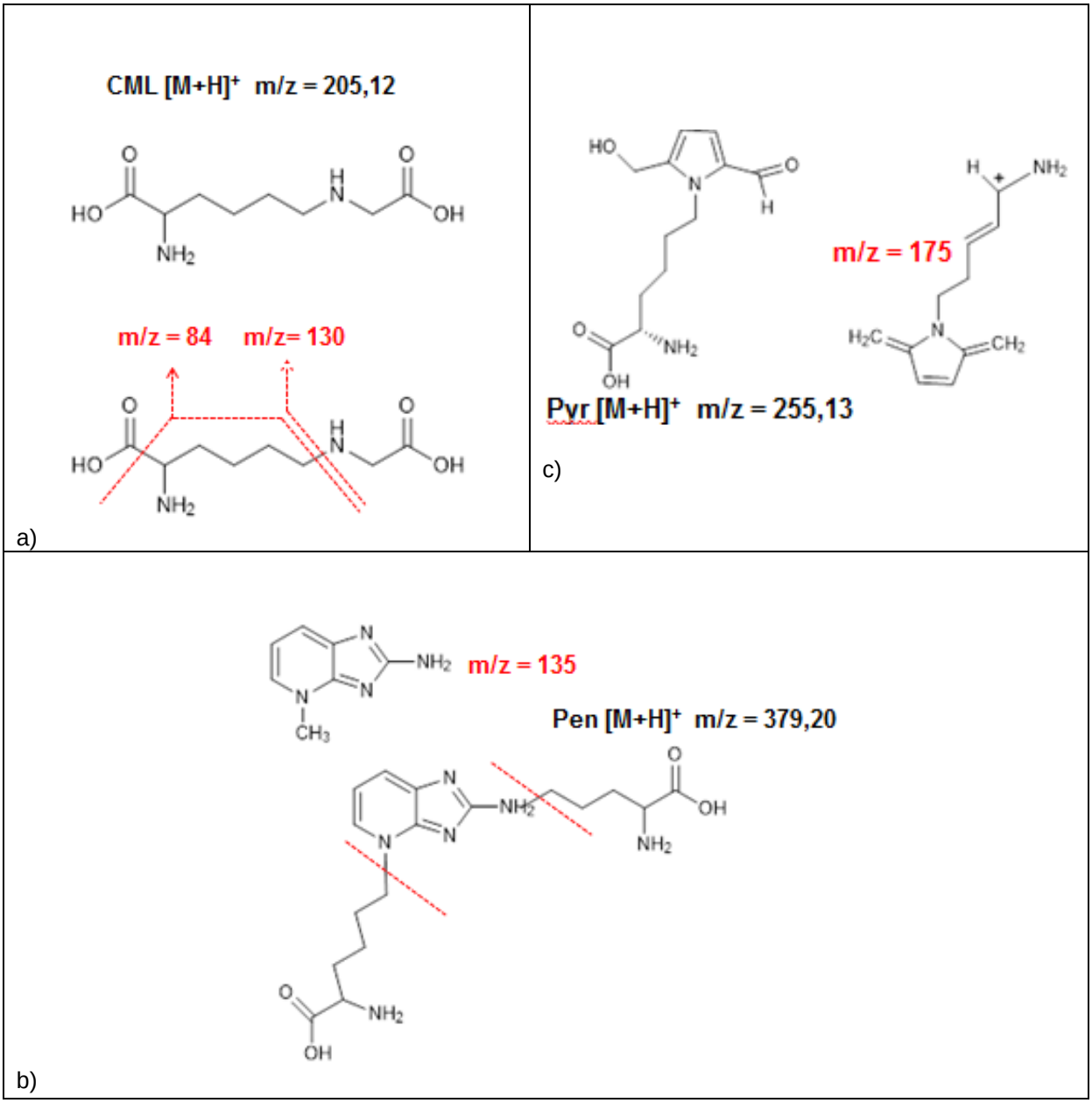
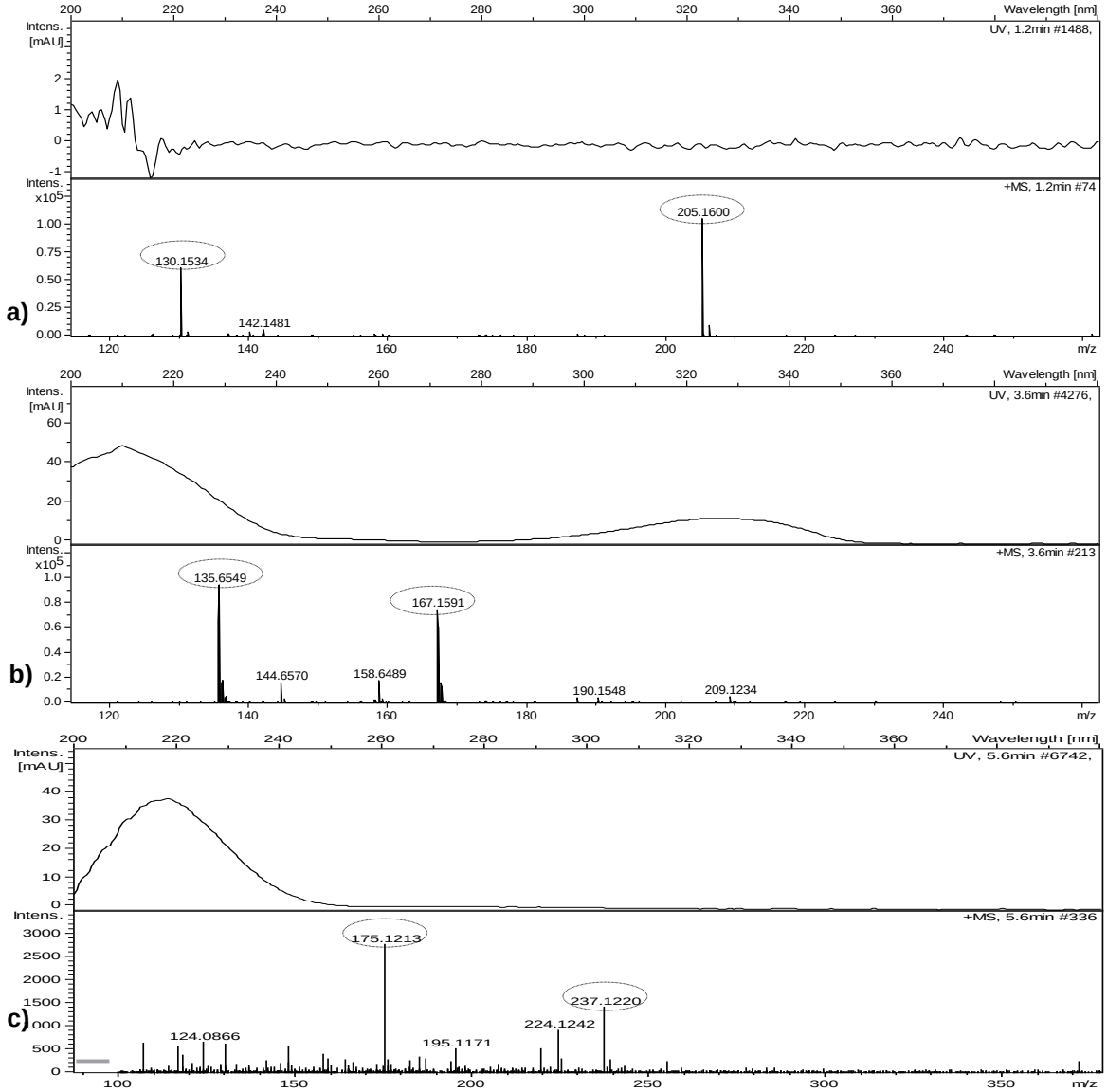


Figura 22. Perfil m/z e UV de CML (a), pentosidina (b) e pirralina (c)



O funcionamento dos detectores espectrofotométricos baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra, que ocorre normalmente do ultravioleta próximo a um dado comprimento de onda. A resposta do detector será seletiva, porque só detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda no qual ele opera. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta; o de comprimento de onda variável, que é de aplicação mais variada e sensível, cobrindo a faixa de 190 a 800nm, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos, operando em comprimento de onda de 254 e de 280 nm na região do UV-próximo ao UV-visível. Alguns compostos que absorvem na região visível do

espectro, podem ser analisados por um detector que funciona nesta região do espectro, sendo chamado de detector de absorção no visível (PATONAY, 1992).

Como a carboximetilisina, não absorve energia pelos detectores UV (Fig. 22), somente a pentosidina e pirralina apresentaram absorção de energia nos comprimentos de onda 325 nm e 298 nm, respectivamente. Desta forma, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi uma técnica bastante útil para determinar os 3 AGEs de forma simultânea num mesmo método cromatográfico.

5.2. Fase móvel

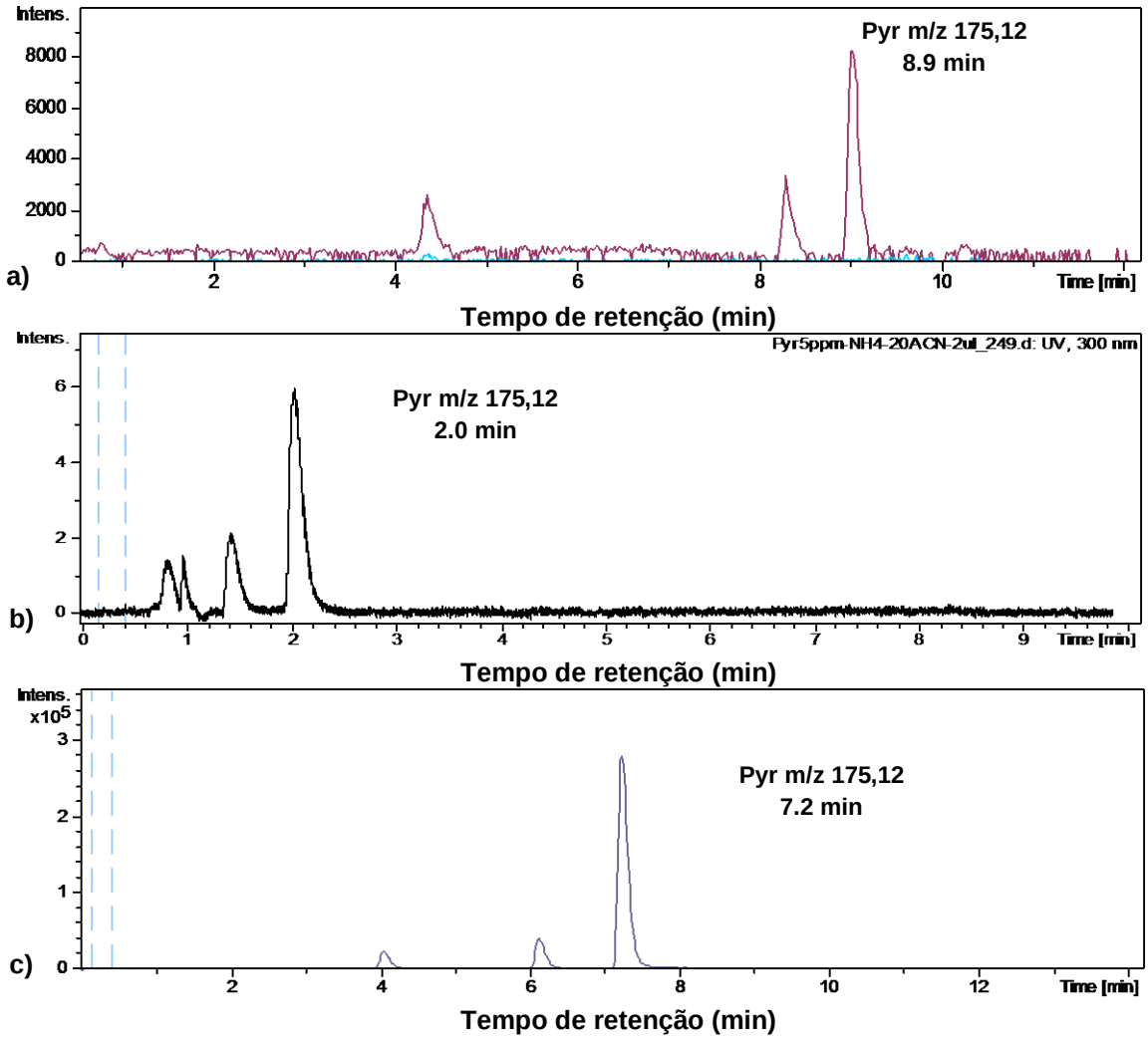
Conforme Schettegen et al. (2007) e Zhang et al. (2011), a análise de CML por HPLC de fase reversa sem derivatização (derivado fluorescente, por exemplo) é difícil, devido à sua elevada polaridade, sendo pouco recuperado em colunas de fase reversa, além dos efeitos de supressão de íons da coeluição de componentes da matriz polar, que afeta significativamente a sensibilidade da análise. Além de resultar numa rápida deterioração da coluna (SUN et al., 2015). O uso de ácido nonafluorpentanoíco na acidificação da fase móvel para análise de AGEs é observada em vários trabalhos (ZHANG et al., 2011; TROISE et al., 2014, ASSAR et al., 2009), mas seus efeitos para o equipamento não são relatados.

A entrada de uma fase móvel com elevada acidez pode contaminar a fonte de íons do espectrômetro de massa. A utilização do NFPA na fase móvel gera um nível muito elevado de contaminação em todo o sistema cromatográfico, permanecendo durante vários meses no equipamento e gerando grandes ruídos de fundo quando utilizado em modo ESI negativo. A eliminação completa do NFPA é muito difícil, dispendioso, e demorado. No entanto, apesar do NFPA não ser um reagente de emparelhamento iónico ideal devido à sua forte acidez (pH 2,0), a resolução e sensibilidade do equipamento pode ser melhorada significativamente quando utilizado na fase móvel (ZHANG et al., 2011).

Depois de estabelecida as condições UPLC/ESI/Q-TOF, foi observado que mesmo sem o uso de NFPA na fase móvel, foram obtidos resultados satisfatórios, (mostrado na figura 19) utilizando a fase móvel água/ácido fórmico 0,1% e ACN/ácido fórmico 0,1% (pH 2,7), com picos e tempo de retenção bem definidos. Dessa forma, eliminou-se o problema de contaminação da fonte. Outras fases

móveis foram testadas (bicarbonato de amônia 5 mM, formato de amônia e ácido acético), mas não apresentaram bons resultados, sendo, portanto descartadas (Fig. 23). Fenaille et al. (2006) também observou resultados satisfatórios para determinação de CML com a fase móvel água/ácido fórmico 0,1% e ACN/ácido fórmico 0,1%.

Figura 23. Comportamento da Pyr mediante diferentes fases móveis. (a) Bicarbonato de amônia 5mM; (b) Formato de amônia; (c) Ácido acético.



Observando os picos de Pyr, verifica-se que ocorre comportamento diferente nas três fases móveis testadas. Comparando-se com o comportamento da Pyr, na fase ACN/ácido fórmico 0,1%, em que a Pyr saiu com o tempo de retenção de 5.7 min (Fig. 19), observa-se nos cromatogramas acima, que esse tempo de retenção é deslocado para 8.9 min, quando utilizado a fase móvel bicarbonato de amônia 5mM (pH 7.9), com formato de amônia (pH 3.9) o tempo de retenção é reduzido para 2.0

min, e com ácido acético (pH 3.4) esse tempo aumenta para 7.2 min. No entanto, cabe ressaltar que além da mudança do tempo de retenção, verificou-se o surgimento de picos secundários quando se testaram esses solventes como fase móvel (Fig. 23).

Apesar do uso de NFPA na fase móvel para determinação de AGEs, ser quase um consenso, outras fases móveis também foram utilizadas por outros pesquisadores, como o uso de MeOH/ acetato de amônia 2 mM/ ácido fórmico 0,1% (fase móvel A) e água/acetato de amônia 2 mM/ ácido fórmico 0,1% (fase móvel B), utilizada por Sun et al. (2015) e ACN (fase móvel A) e água (fase móvel B), utilizada por Kuang et al. (2014).

5.3. Método SPE

Um método adequado de concentração e purificação por SPE, é essencial para a determinação de AGEs. Protocolos de extração que incluem precipitação protéica, digestão enzimática e hidrólise ácida, são bem definidos e fundamentados na literatura (HEGELE et al., 2008; FENAILLE et al. 2006; SUN et al., 2015), mas o processo de concentração e purificação por SPE são quase sempre realizados com cartuchos C18 (HEGELE et al., 2008). Porém, os resultados obtidos neste trabalho com os cartuchos C18 não foram satisfatórios, sendo testado alternativamente o cartucho de troca iônica (30HCX), que apresentou boas taxas de recuperação. O uso desse tipo de cartucho para determinação de AGEs, já é relatado na literatura (SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2011). No entanto, seu uso para determinação de AGEs em derivados lácteos, é restrito, e em particular para concentração e purificação de pirralina.

Sorbentes SPE são mais comumente classificados pela natureza de sua interação primária ou mecanismo de retenção com o analito de interesse. Os mecanismos de extração mais utilizados na SPE são a fase reversa, fase normal e troca iônica.

5.3.1. Cartuchos C18

As extrações de fase reversa são comumente utilizadas para extrair hidrofóbicos ou mesmo os analitos orgânicos polares de uma amostra/matriz

aquosa. As cadeias hidrocarbonadas tanto no analito como no sorvente são atraídas umas às outras por forças de dispersão de van der Waals de baixa energia. Os sorbentes de fase inversa comuns contêm cadeias de hidrocarbonetos saturados tais como C18 e C8, ou anéis aromáticos tais como fenil. Como as extrações em fase reversa são relativamente inespecíficas, uma gama de compostos é tipicamente retida. Como resultado, é importante optimizar as condições de extração, particularmente a composição do solvente de lavagem. Os analitos são tipicamente eluídos com solventes orgânicos tais como metanol ou acetonitrilo, em combinação com água, ácidos, bases ou outros solventes e modificadores orgânicos.

No caso do uso de cartuchos C18 para extração de AGEs, o eluente e o solvente de lavagem foram suplementados com NFPA. Neste trabalho, foi utilizado o método de concentração e purificação por SPE descrito por Hegele et al., (2008), com algumas modificações (Fig. 24).

Figura 24. Método SPE com cartucho C18

Condicionamento: 4 mL de MeOH

↓

Equilíbrio: 4 mL de NFPA (10 mM)

↓

Acondicionamento da amostra: 1 mL

↓

1ª Lavagem: 4 mL de NFPA (10 mM)

↓

2ª Lavagem: 4 mL NFPA (10 mM)/MeOH (v/v; 95%:5%)

↓

Eluição: 4 mL MeOH/NFPA 10 mM (v/v; 90%:10%) – Fração 1

1 mL MeOH/NFPA 10 mM (v/v; 90%:10%) – Fração 2

1 mL MeOH/NFPA 10 mM (v/v; 90%:10%) – Fração 3

1 mL MeOH/NFPA 10 mM (v/v; 90%:10%) – Fração 4

1 mL MeOH – Fração 5

Após a eluição inicial com 4 mL (fração 1), foi realizado mais 3 eluições fracionadas, com 1 mL de MeOH/NFPA 10Mm 10%, com o objetivo de verificar se algum resíduo do analito alvo restou no cartucho. Ao final das eluições, mais 1 mL de MeOH 100%, foi colocado no cartucho a fim de garantir total remoção dos analitos alvos. Devido à alta polaridade de CML, Pen e Pyr, o ácido nonafluoropentanoico (NFPA) é frequentemente adicionados à fase de eluição para

que seja formado sais entre ele e os AGEs e aumentar a afinidade ao solvente de eluição.

A etapa de lavagem deve ser realizada, a fim de remover sujeiras presentes nas amostras, que possam prejudicar o funcionamento do sistema UPLC/ESI/Q-TOF, sendo imprescindível para remoção de sais e açúcares de amostras complexas, como o leite, por exemplo. Nessa etapa os analitos alvos devem permanecer no cartucho, não podendo ser eluídos juntamente com o solvente de lavagem. Os AGEs são compostos altamente polares e não são bem retidos nas fases C18. Foi observado entre os AGEs analisados, que a CML apresentou maior problema de retenção no cartucho C18. A CML começava a ser eluida durante o processo de lavagem do cartucho (Tab. 5), especificamente durante a 2ª lavagem. Essa eluição precoce, afetou bruscamente na taxa recuperação desse AGE, de modo que o desempenho da CML na etapa SPE com os cartuchos C18, não foi satisfatória, atingindo baixa taxa de recuperação, como observado na tabela 6.

Tabela 5. Eluição de CML na SPE com C18

Frações	**CML concentração 3,3 µg/mL**			
	Teste 1		**Teste 2**	
	Rt (min)	**Área**	**Rt (min)**	**Área**
1ª Lavagem	-	-	-	-
2ª Lavagem	1.3	67.138	1.3	83.523
Eluição Fração 1	1.3	66.858	1.3	158.347
Eluição Fração 2	1.3	9.379	1.3	-
Eluição Fração 3	-	-	-	-
Eluição Fração 4	-	-	-	-
Eluição Fração 5	-	-	-	-

Tabela 6. Taxa de recuperação de CML após SPE com C18

Amostra	**Rt (min)**	**Conc. (µg/mL)**	**Recuperação (%) de CML após SPE com cartucho C18**
Padrão de CML	1.3	6 µg/mL	65,1
Leite contaminado com CML	1.3	12 µg/mL	12.34

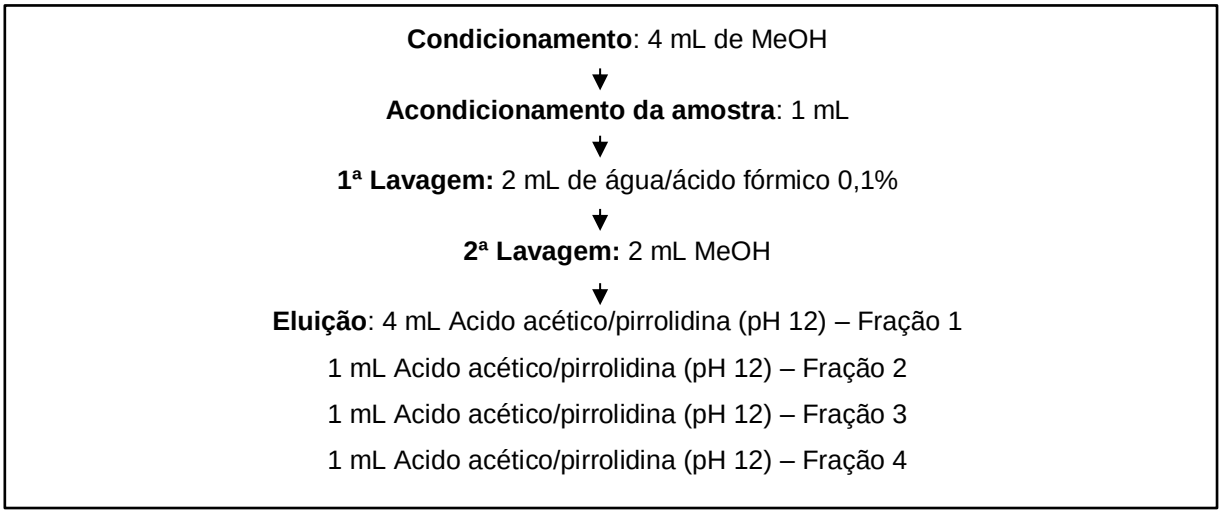
A matriz complexa do leite pode ter influenciado na taxa de recuperação da CML, pois quando se realizou a concentração e purificação por SPE do padrão de CML, observou que a taxa de recuperação foi superior a 65%, enquanto que a CML das amostras contaminadas antes da SPE, apresentou uma taxa de recuperação inferior a 13%.

5.3.2. Cartucho 30HCX

Os cartuchos 30HCX utilizam mecanismos de troca iônica para extrair analitos carregados a partir de amostras aquosas ou orgânicas de baixa resistência iônica. Nos cartuchos de troca iônica, os sorbentes carregados são usados para reter analitos de carga iônica oposta. Por exemplo, os analitos carregados positivamente contendo aminas são retidos em "permutadores de catiônicos" carregados negativos, tais como ácidos sulfônicos ou carboxílicos. Em contraste, os analitos carregados negativamente contendo ácido sulfônico ou grupo ácido carboxílico são retidos em "permutadores aniônicos" carregados positivamente contendo qualquer um de uma variedade de diferentes grupos amino. Os mecanismos de troca iônica dependem de interações específicas de alta energia entre o sorbente e o analito. Apenas as espécies da carga adequada são retidas pela coluna, de modo que a maioria dos contaminantes da matriz são simplesmente enxaguados para o lixo durante o carregamento e os passos de lavagem. Por esta razão, a SPE de troca catiônica é comumente utilizada para a extração de compostos básicos (fármacos e outras aminas) a partir de amostras biológicas complexas. Os analitos são tipicamente eluídos com sais e tampões de elevada resistência iônica, ácidos ou bases fortes.

O fabricante dos cartuchos 30HCX recomendou a utilização de pirrolidina para a eluição dos analitos. Seguindo essas recomendações, os cartuchos 30HCX, foram testados com o protocolo (Fig. 25):

Figura 25. SPE com o cartucho 30HCX de acordo com as recomendações do fabricante



Paralelamente, foram desenvolvidos outros métodos com o cartucho 30HCX, a fim de se aumentar a taxa de recuperação, utilizando diferentes eluentes, soluções de lavagem e de equilíbrio (Tab. 7). Os resultados preliminares com o cartucho de troca iônica, demonstrava que o pico de pirralina sempre se deslocava, partindo do tempo de retenção de 5.7 min para 7.5 min. De alguma forma estava ocorrendo formação de algum tipo de aduto, que provocava o deslocamento da pirralina. Testou-se a influência do MeOH na formação desse aduto, reconstituindo os padrões de AGEs com solução de MeOH/amônia 5%. Mesmo após esse procedimento, o deslocamento do pico de pirralina para o tr = 7.5 min, continuou sendo observado. Ao substituir o MeOH por ACN, observou-se que o ACN não provocava o deslocamento do pico de Pyr, permanecendo com o tr = 5.7 min. Logo, concluiu-se que havia alguma transformação da Pyr na presença de MeOH/amônia 5%.

A fim de resolver o problema de transformação da Pyr na presença de metanol, o método SPE, foi otimizado pela substituição do metanol por ACN, nas etapas da 2ª lavagem e de eluição (Fig. 26). Estratégia similar foi utilizada por Zhang et al. (2011), quando eles utilizaram para eluição a solução ACN/amônia 50% (v/v), embora eles não tenham relatado problemas de transformação da pirralina.

Tabela 7. Diferentes condições testadas com o cartucho 30HCX

Etapas	Cartucho polyclean 30HCX		
	Método 1	**Método 2**	**Método 3**
Condicionamento	3 mL de MeOH	3 mL de MeOH	3 mL de MeOH
Equilíbrio	3 mL H_2O	3 mL H_2O/ácido fórmico 2%	3 mL H_2O/ ácido fórmico 0,1%
1ª - Lavagem	3 mL H_2O	3 mL H_2O/ácido fórmico 2%	3 mL H_2O/ ácido fórmico 0,1%
2ª – Lavagem	3 mL MeOH	3 mL MeOH	3 mL MeOH
Eluição	4 mL MeOH/amônia5%	4 mL MeOH/ amônia 5%	4 mL MeOH/ amônia 5%

Figura 26. Condição SPE com o cartucho 30HCX, substituindo MeOH por ACN

Condicionamento: 3 mL de MeOH

Equilíbrio: 3 mL H_2O/ ácido fórmico 0,1%

↓

Acondicionamento da amostra: 1 mL

↓

1ª Lavagem: 3 mL de água/ácido fórmico 0,1%

↓

2ª Lavagem: 3 mL ACN

↓

Eluição: 3 mL ACN/amônia 5% (pH 10,5) + 3 mL MeOH/amônia 5% (pH 10,5)

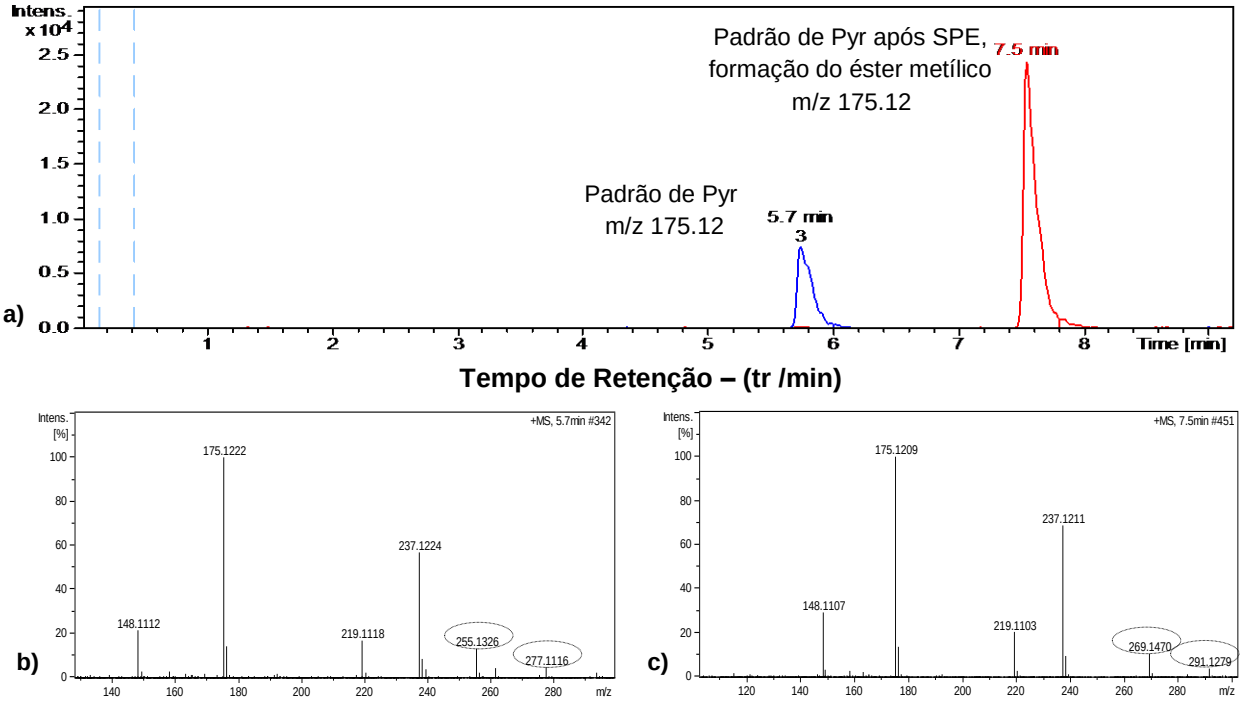
Apesar do problema de transformação da pirralina, observou-se que o uso do metanol é necessário para a completa eluição dos AGEs, sendo adotada uma estratégia diferenciada para eluição dos AGEs. Inicialmente as amostras foram eluídas com 3 mL de ACN/amônia 5%, seguida por 3 mL de MeOH/amônia 5%. Verificou-se que a transformação da Pyr, ocorria apenas se o contato com o MeOH fosse antes do ACN. O uso de 6 mL de solvente de eluição (3 mL ACN/amônia + 3 mL de MeOH/amônia 5%), foram suficientes para eluir todos os AGEs retidos no cartucho.

A análise do espectro de massa do novo pico e a sua comparação com o espectro de massa do padrão da Pyr (Fig. 27), levou a entender que este novo pico na realidade corresponde a um éster metílico da Pyr. O espectro de massa do novo

pico em tr = 7.5 min, em primeiro lugar apresentou uma parte o íon molecular $[M+H]^+$ 269,1470 (formula bruta $C_{13}H_{21}N_2O_4$), correspondendo ao éster metílico de Pyr, com um aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 291,1279, e a outra parte, todos os fragmentos idênticos ao do padrão da Pyr, m/z 237,12 $[M-H_2O+H]^+$; m/z 219,11 $[M-2H_2O+H]^+$; m/z 175,12 $[M-2H_2O-CO2+H]^+$ e m/z 148,11 $[M-2H_2O+H]^+$. Em efeito, o éster metílico de Pyr é formado por uma reação entre a Pyr e o metanol, utilizado como solvente de eluição da SPE. A fim de resolver esse problema de transformação, o metanol foi substituído pelo ACN, sendo as demais condições mantidas. Os resultados obtidos depois dessa substituição confirmam o desaparecimento do éster metílico no tr =7.5 min permanecendo apenas o pico da Pyr, no tr = 5.7 min.

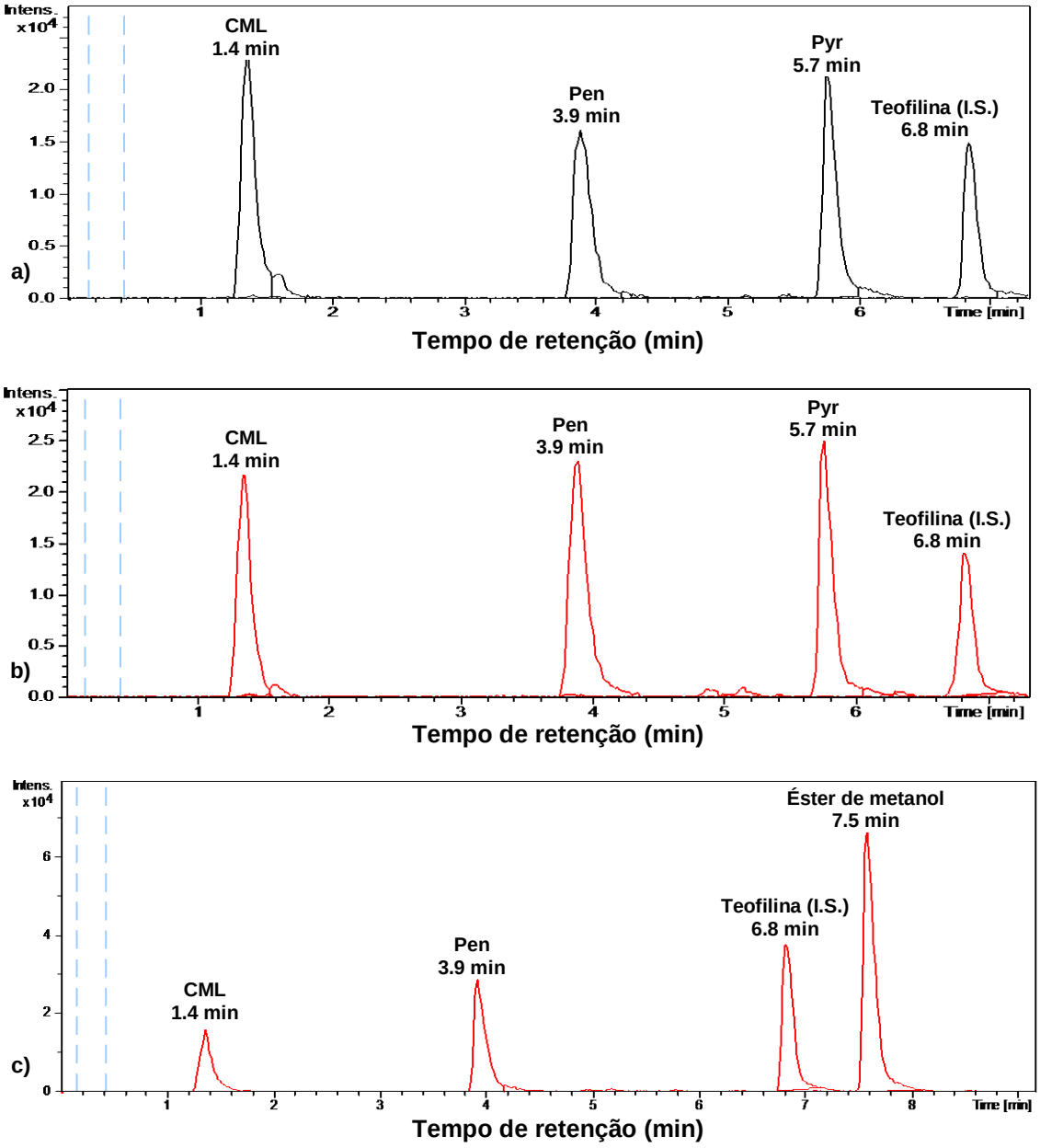
O uso de ácido fórmico 0,1% nas etapas de equilíbrio e 1ª lavagem, também ajudaram na retenção dos AGEs no cartucho. Quando o ácido fórmico 0,1% foi substituído por água e/ou ácido fórmico 2% como soluções de equilíbrio e lavagem, a taxa de recuperação foi bem menor que aquelas observadas com ácido fórmico 0,1%.

Figura 27. Cromatograma da extração de íons m/z 175,12, correspondendo a um fragmento de Pyr. a) Sobreposição do cromatograma do padrão de Pyr (azul) sobre o mesmo padrão após SPE (vermelho) utilizando MeOH como eluente. (b) Espectro de massa correspondente ao tr = 5.7 min e 7.5 min (c), pós-éster.



Analisando o efeito da matriz sobre os AGEs, observou-se o mesmo comportamento para pirralina, nas amostras de leite contaminadas. Nessas amostras a eluição com metanol, também promoveu a formação de éster de metanol. Quando o metanol foi substituído por ACN, o pico de pirralina permaneceu com o tempo de retenção em 5.7 min (Fig. 28).

Figura 28. Cromatograma da extração de íons m/z 205,12, 135,65, 175,12 e 181,07 (IS), correspondendo aos fragmentos de CML, Pen, Pyr e IS, respectivamente. a) Padrões dos AGES, (b) leite contaminado com os padrões e eluídos com ACN/amônia 5%, e (c) leite contaminado com os padrões e eluídos com MeOH/amônia 5%.



Comparando a taxa de recuperação nas amostras de leite integral contaminadas com AGEs (Tab. 8), observou-se que a melhor taxa recuperaçã, foi obtida com o método ACN/amônia 5%, apresentando recuperação de quase 90% para CML, 95,7% e 117% para pentosidina e pirralina, respectivamente. Esses valores apresentam-se em conformidade com a faixa de recuperação média recomendada pela Comunidade Europeia (Commission Decision, 2002/657/EC) que recomenda faixas de recuperações entre 50 e 120%. Uma baixa taxa de recuperação foi observada mesmo com o cartucho 30HCX, quando a pirrolidina foi utilizado como solvente de eluição, conforme recomendação pelo fabricante. Em relação às taxas de recuperação com o cartucho C18, observou-se que a maior taxa foi obtida para pentosidina (17,91%), enquanto que a pirralina não foi recuperada.

Tabela 8. Taxa de recuperação de CML, pentosidina e pirralina, em amostras de leite contaminadas.

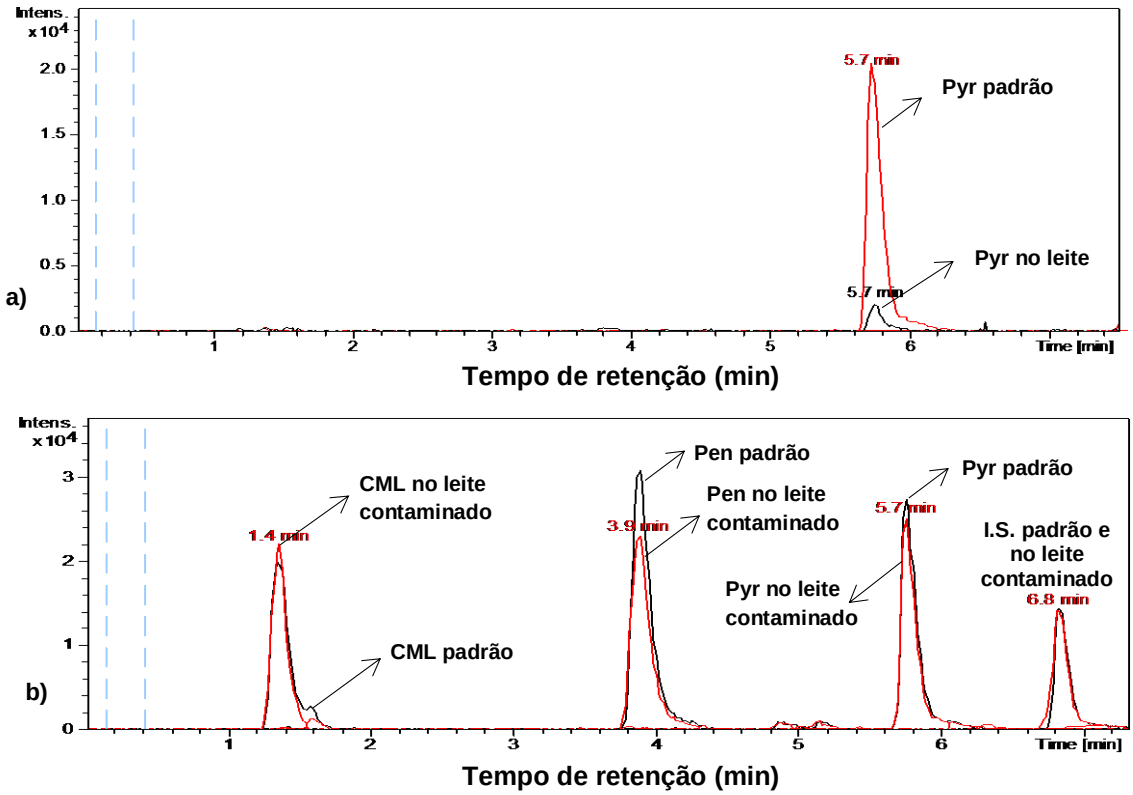
AGEs	**Rt (min)**	**Conc. (µg/mL)**	**Recuperação (%)**		
			Cartucho C18 com NFPA 10 mM	**Cartucho 30HCX com pirrolidina**	**Cartucho 30HCX com ACN/NH_4OH 5%**
CML	1.3	12 µg/mL	12.34	1,68 ± 1,68	89,8 ± 0,8
Pentosidina	3.8	2 µg/mL	17.91	64.63 ± 0,92	95,7 ± 2,3
Pirralina	5.7	2 µg/mL	0	29.35 ± 4,58	117,0 ± 2,9

Sun et al. (2015), ao analisares AGEs de carnes, também observaram que os cartuchos de troca iônica, apresentavam melhores taxas de recuperação, quando comparado com os cartuchos C18, comumente utilizados para determinação de AGEs. Zhang et al. (2011), ao determinarem AGEs de amêndoas, também observaram alta taxa de recuperação com cartuchos de troca iônica, embora eles não tenham comparado essas taxas utilizando cartuchos C18.

Cabe ressaltar que o leite já pode conter AGEs em sua constituição, portanto, resultados de recuperação acima de 100% pode sugerir a presença desse composto no leite contaminado. Como observado na tabela 8, a taxa de recuperação da pirralina foi de 117%, supondo que no leite utilizado já havia a presença de Pyr mesmo antes da contaminação dessas amostras. Corroborando com esse resultado,

observou-se a presença de pirralina nas amostras de leite integral submetida tanto ao procedimento de precipitação protéica e de digestão enzimática (Fig. 29).

Figura 29. (a) Sobreposição dos cromatogramas da extração de íons m/z 175,12 (Pyr) do padrão da Pyr e da amostra de leite integral. (b) Sobreposição dos cromatogramas do leite integral contaminados com AGEs, submetido a SPE (vermelho) e dos padrões de AGEs (preto). A concentração dos padrão e no leite contaminado CML 3,0 µg/mL, Pen 0,45 µg/mL, Pyr, 0,6 µg/mL and I.S. 0,3 µg/mL.



Os padrões foram submetidos à concentração e purificação em SPE, com cartuchos C18 e 30HCX, para calculo da taxa de recuperação. Observando os resultados, verificou-se a mesma tendência que aquelas observadas nas amostras de leite contaminadas. Todos os AGEs apresentaram alta taxa de recuperação com os cartuchos 30HCX (Tab. 9).

Tabela 9. Taxa de recuperação dos padrões de CML, pentosidina e pirralina.

AGEs	Rt (min)	Conc. (µg/mL)	Recuperação (%)	
			Cartucho C18	Cartucho 30HX
CML	1.3	6 µg/mL	65,1 ± 14,3	94,8 ± 7,0
Pentosidina	3.8	1 µg/mL	63.5 ± 0,6	95,6 ± 25,4
Pirralina	5.7	1 µg/mL	69,8 ± 6,4	104,3 ± 8,9

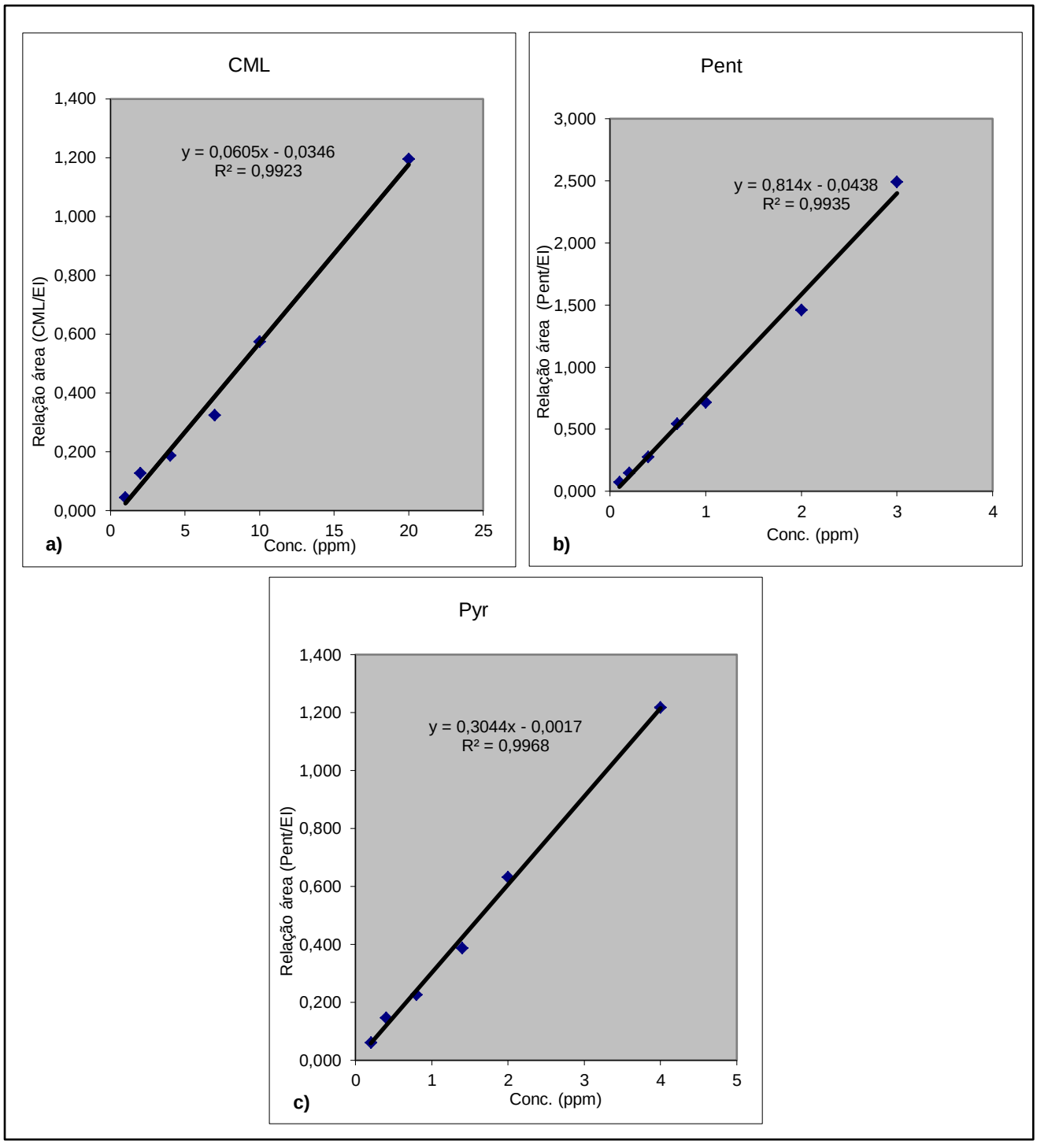
5.4. Curva analítica

Após a otimização das condições UPLC-ESI/Q-TOF e de concentração e purificação por SPE, para quantificação dos AGEs das amostras comerciais, foi construída uma curva analítica com sete níveis de concentração para cada composto (Tab. 10). Na figura 30, observam-se os coeficientes de correlação (r2) e intersecção obtidos através da regressão linear das curvas analítica para cada transição monitorada. A técnica apresentou alta sensibilidade e seletividade medida para a transição de m/z 205,12 (CML), 135,65 (Pen), 175,12 (Pyr) e 181,07 (IS).

Tabela 10. Níveis de concentração dos AGEs para contrução da curva de calibração

	CML (µg/mL)		Pen (µg/mL)		Pyr (µg/mL)		I.S.	
Diluição	Conc. (ppm)	Área	Conc (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área	Conc. (ppm)	Área
G_1	0,1 (1)	5886,9	0,01 (0,1)	8555	0,02 (0,2)	7900	0,3 (3)	129503
G_2	0,2 (2)	14542	0,02 (0,2)	22186	0,04 (0,4)	16556	0,3 (3)	113588
G_3	0,4 (4)	25900	0,04 (0,4)	41196	0,08 (0,8)	31297	0,3 (3)	138549
G_4	0,7 (7)	44868	0,07 (0,7)	76647	0,14 (1,4)	53350	0,3 (3)	137970
G_5	1,0 (10)	74206	0,1 (1)	124775	0,2 (2)	81569	0,3 (3)	129141
G_6	2,0 (20)	157938	0,2 (2)	245453	0,4 (4)	160816	0,3 (3)	132117
G_7	3,0 (30)	277077	0,3 (3)	182156	0,6(6)	205921	0,3 (3)	125780

Figura 30. Coeficientes de correlação (r2) e intersecção obtidos através da regressão linear das curvas analítica de CML (a), Pen (b) e Pyr (c).



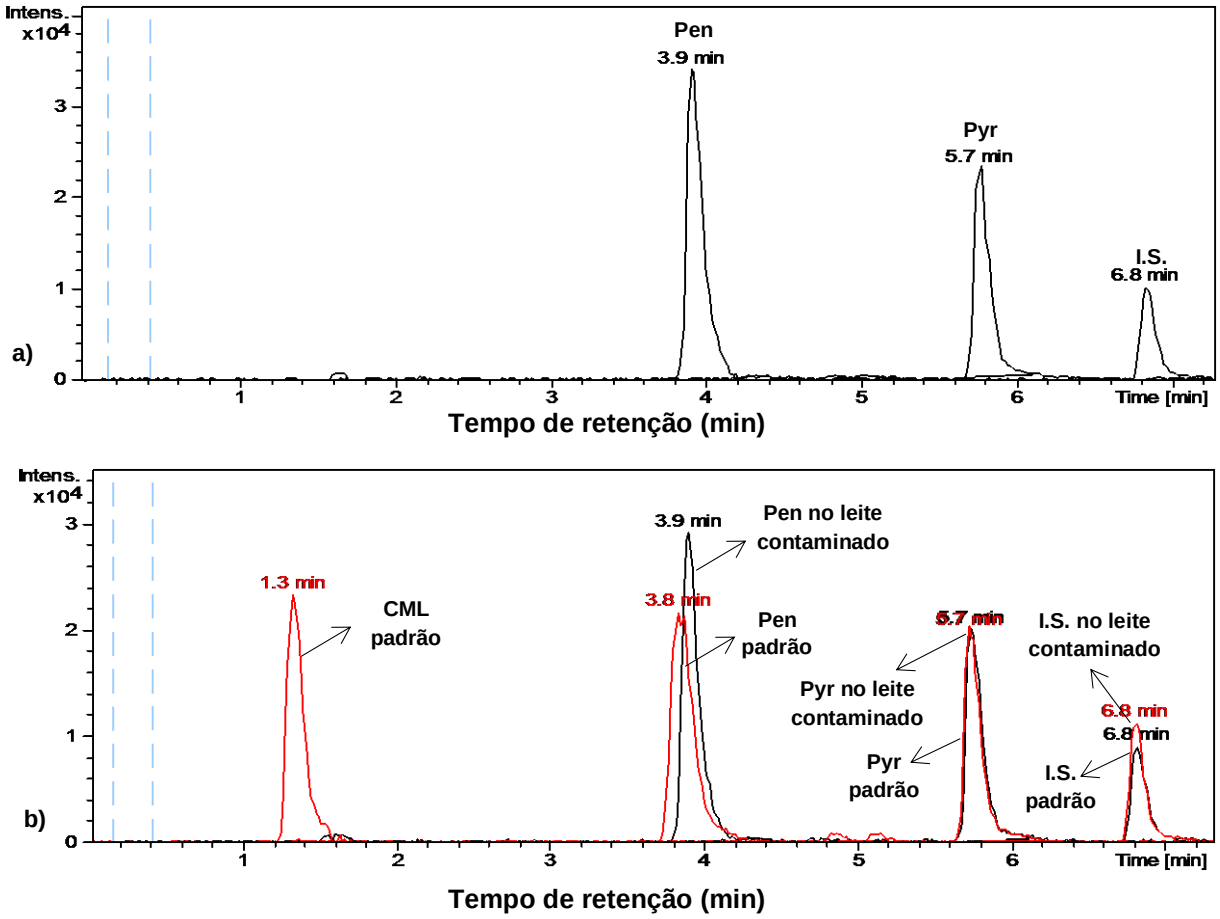
5.5. Quantificação de AGEs

A quantificação de AGEs, foi realizada com as amostras submetidas a digestão enzimática e precipitação protéica. As amostras submetidas à hidrólise

ácida não foram incluídas nos cálculos de quantificação, pois esse método é específico para extração de CML, livres e ligados a proteínas, e nas amostras submetidas a esse procedimento, não foi observada a presença de CML.

Ao analisar o procedimento de digestão enzimática, observou-se que a CML era degradação durante as etapas de digestão. Para avaliar a influência desse processo na estabilidade dos AGEs, amostras de leite contaminadas com AGEs, foram submetidas a digestão enzimática. As análises do UPLC/ESI/Q-TOF revelaram a ausência de CML nessas amostras (Fig. 31). Embora esse método tenha sido relatado por Hegele et al. (2008), não houve tempo suficiente neste trabalho, para pesquisar em qual momento das etapas de digestão enzimática estaria ocorrendo a degradação da CML, visto que esse procedimento é longo, aproximadamente 30 horas, e envolve a utilização de quatro enzimas. Portanto, faz-se necessário que seja realizado estudos de otimização desse procedimento, de modo a evitar a degradação da CML, e diminuição do tempo e etapas de digestões enzimáticas.

Figura 31. Cromatogramas dos AGEs contaminados no leite submetido a digestão enzimática. (a) Amostras contaminadas antes do procedimento de digestão, (b) sobreposição do cromatograma dos padrões (vermelho) sobre o cromatograma das amostras contaminadas antes da digestão (preto).



Entre os AGEs analisados, apenas a pirralina se mostrou proeminente nas amostras de leite analisadas, sendo observada e quantificada nas amostras submetidas a digestão enzimática e precipitação protéica (Fig. 32 e 33). Traços de pentosidina, também foram observados nas amostras que sofreram digestão enzimática. A CML não foi observada em nenhuma das amostras analisadas (Fig. 34).

Figura 32. Cromatogramas da sobreposição do padrão de Pyr com os picos encontrados nas amostras de leite submetidas à precipitação protéica. (a) Leite integral, (b) leite semidesnatado, (c) leite desnatado e (d) leite esterilizado.

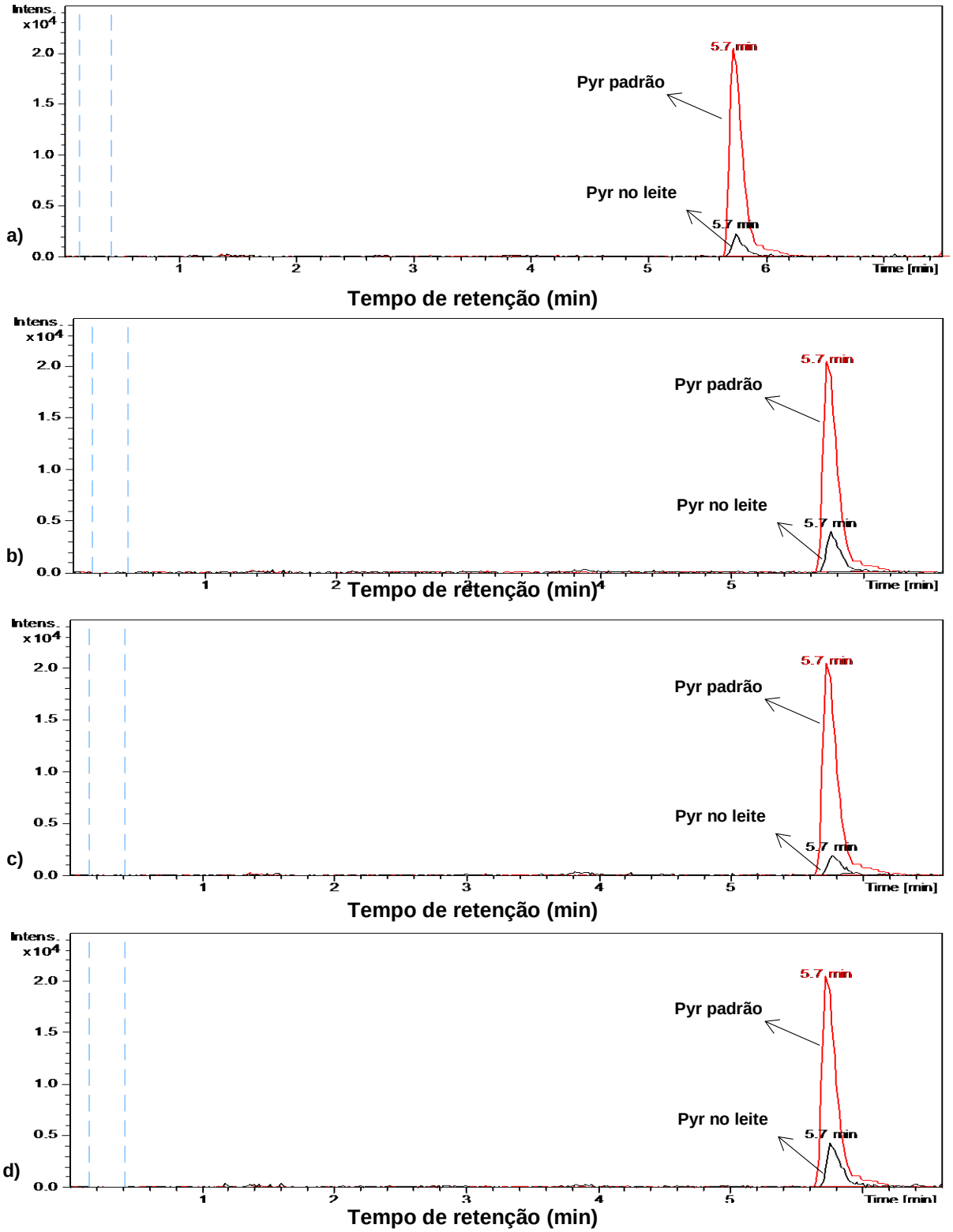


Figura 33. Cromatogramas da sobreposição do padrão de Pyr com os picos encontrados nas amostras de leite submetidas à digestão enzimática. (a) Leite integral, (b) leite semidesnatado, (c) leite desnatado e (d) leite esterilizado.

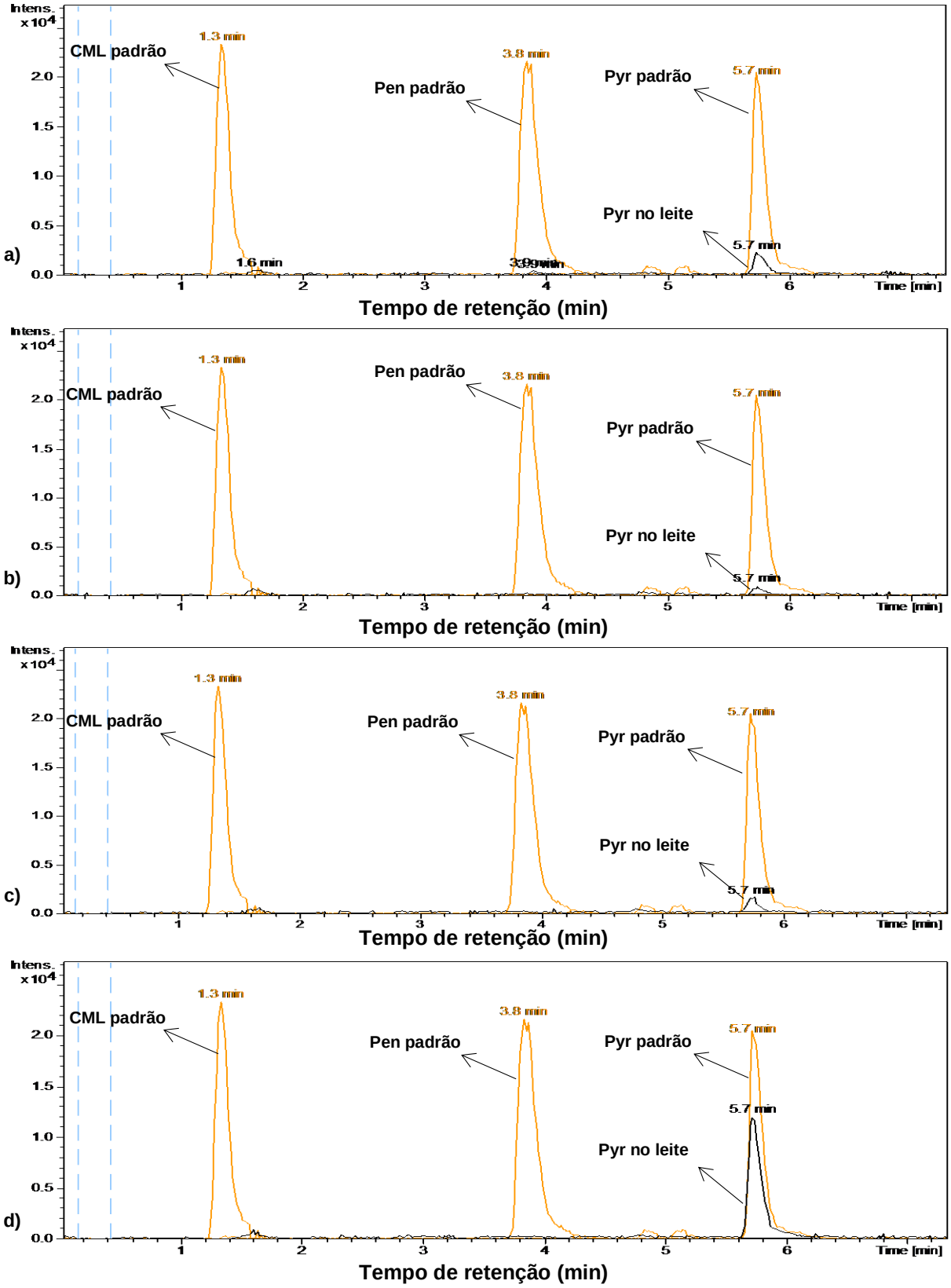
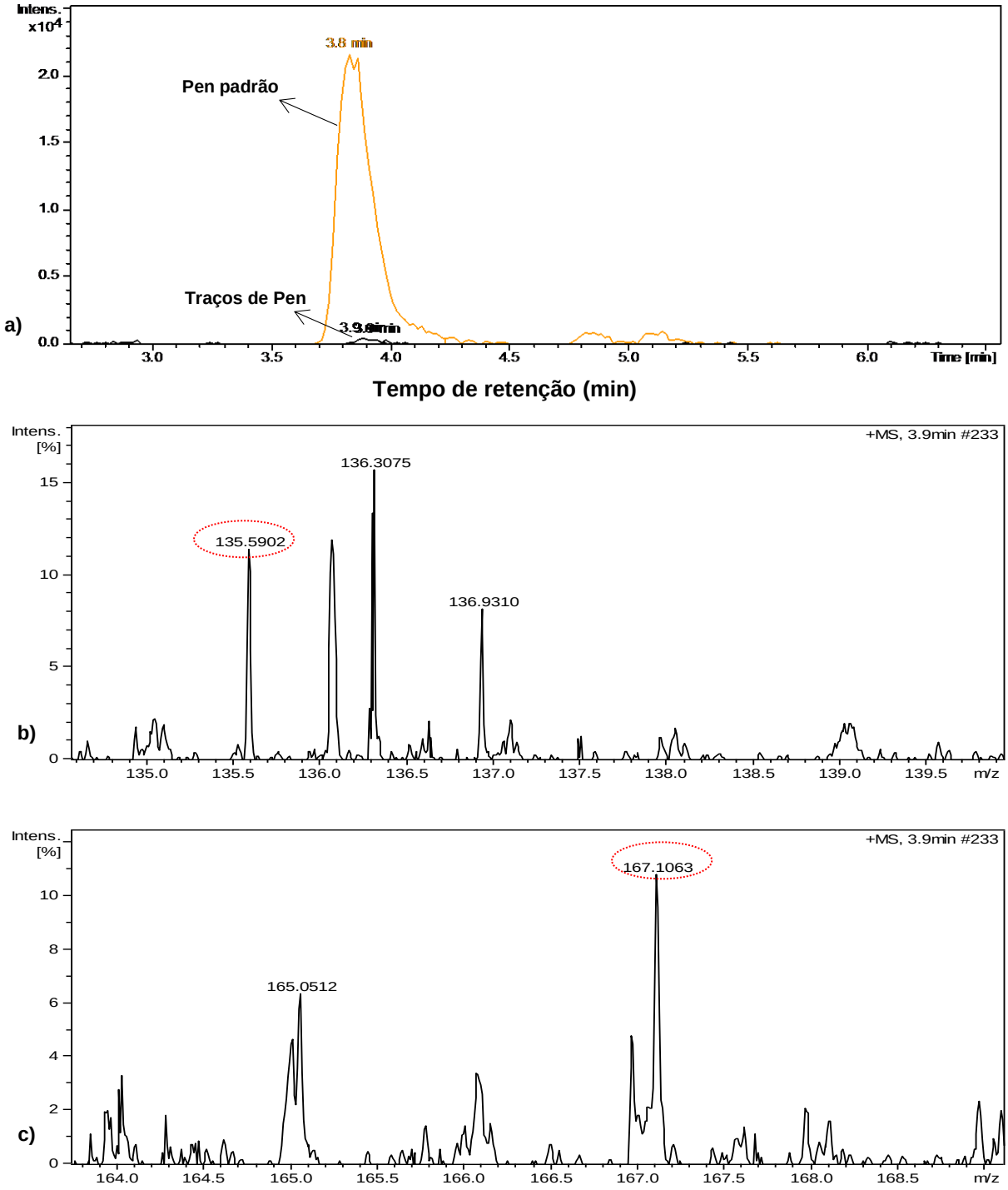


Figura 34. Observação de traços de pentosidina no leite integral em pó. (a) Cromatograma da sobreposição do padrão de Pen com o pico encontrado nas amostras de leite submetidas à digestão enzimática, (b) extração de íons nas amostras de leite m/z 135,59 correspondendo a um fragmento de Pen, (c) extração de íons nas amostras de leite m/z 167,10 correspondendo ao outro fragmento de Pen.



A pirralina encontrada nas amostras de leite foi confirmada pelo espectro de massa m/z 175,12 e comparado com o tempo de retenção do padrão. Mesmo no leite cru foi observada a presença de Pyr, indicando que o leite *in natura*, já apresenta esse AGEs, sendo sua concentração aumentada mediante aos processos térmicos aplicado ao leite durante seu beneficiamento (Tab. 11). Corroborando com esses resultados, Hegele et al. (2008), também observaram a presença de Pyr em amostras de leite cru, submetidos a precipitação protéica. Eles relataram valores médios desse AGE, de 55,0 nmol/µmol^{-1}Lys^{-1}. Zhang et al. (2011) também relataram Pyr em amostras de amêndoas torradas, que variaram de 1,1 mg/kg de Pyr_{livre} a 12,6 mg/kg de $Pyr_{conjugada}$. Para a leitura destes valores, é importante notar que os nossos resultados são expressos em ng de AGE por mg de proteína, enquanto aqueles de Hegele et al. (2008), estão em nmol por AGEs µmol lisina, o que é muito diferente.

Tabela 11. Quantificação de Pyr em amostras de leite, submetidos à precipitação protéica (Pyr_{livre}) e digestão enzimática ($Pyr_{conjugada}$).

Amostras	**PIRRALINA**	
	Pyr_{livre} ng/mg^{-1}proteínas do leite^{-1}	**$Pyr_{conjugada}$ ng/mg^{-1}proteínas do leite^{-1}**
Leite Cru	0,023 ± 0,00707	nd
Leite integral em pó	0,035 ± 0,00513	1,467 ± 0,05774
Leite semidesnatado em pó	0,059 ± 0,00889	0,150 ± 0,21213
Leite desnatado em pó	0,021 ± 0,00071	0,967 ± 0,11547
Leite esterilizado	0,072 ± 0,00643	8,367 ± 0,70946

nd.: não detectado

Nas amostras de leite cru (isto é, sem aquecimento), sujeito a digestão enzimática, nenhum vestígio de Pyr foi detectado. As mesmas amostras, quando submetido à precipitação das proteínas, revelaram a presença de 0,023 ng/mg^{-1}proteínas do leite^{-1} de Pyr_{livre}. Esta concentração encontrada no leite cru com certeza é da Pyr, pois este valor foi muito próximo do LoQ (não determinado pelos critérios da ICH neste trabalho), mas permaneceu em todas as amostras, superior a

10 vezes ao ruído de fundo encontrado nos cromatogramas relacionados com a análise das amostras de leite cru.

O tratamento térmico aplicado ao leite certamente é a causa do aumento dos níveis de Pyr, observado no leite esterilizado, pois essas amostras foram provenientes do leite em pó integral, diferindo apenas pela aplicação da temperatura. Esse aumento foi observado tanto nas amostras de leite esterilizado submetidas à precipitação como a digestão enzimática, onde os valores para Pyr encontrados variaram de 0,072 a 8,367 ng/mg^{-1}proteínas do leite^{-1} de Pyr_{livre} e $Pyr_{conjugada}$, respectivamente.

Para os cálculos de quantificação, usou-se a seguinte fórmula:

$$Quantidade\ (\mu g/mg) = \frac{\frac{S2}{S4} \text{ x } C1 \text{ x } 0{,}2}{\frac{S1}{S3}} \Big/ \frac{M}{V1} \text{x } V2$$

S_1: área do pico da pyr com o padrão.

S_2 : área do pico da pyr no leite contaminado.

S_3 : área do pico da teofilina (I.S.) com o padrão.

S_4 : área do pico da teofilina (I.S.) no leite contaminado.

C_1 : concentração da solução padrão da pyr em µg/mL.

M : massa de proteina de leite utilizada para a precipitação e/ou digestão em mg.

V1 : Volume total da solução obtida antes da etapa SPE em mL.

V2 : Volume depositado no cartucho SPE em mL.

Entre os AGEs utilizados neste trabalho, a pirralina foi o composto que apresentou maior instabilidade. Aproximadamente 30 dias após a sua diluição e armazenamento a -20°C foi observado uma mudança de coloração, após o descongelamento. Problemas de degradação de Pyr, também foram relatados por Najaraj et al. (1996), que observaram coloração de cor rosa no padrão de Pyr diluído, com diminuição de sua forma nativa.

O desenvolvimento desse protocolo com a utilização de cartuchos de troca iônica para concentração e purificação na etapa SPE, exigiu muito tempo, portanto, não sendo possível concluir as etapas de validação. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o protocolo desenvolvido, mostrou-se seletivo, linear e com boa recuperação para a determinação de CML, pentosidina e

principalmente, pirralina. A obtenção dos coeficientes de correlação (r2) e intersecção obtidos através da regressão linear das curvas analíticas, bem como as taxas de recuperação, são parâmetros de pré-validação, que auxiliará em uma posterior etapa de validação.

Cabe salientar que há necessidade de realizar uma otimização do método de digestão enzimático proposto na literatura e utilizado nesse trabalho. Além de ser um método longo (aproximadamente 30 horas) e com várias etapas de tratamento enzimático, observou-se que a CML é degradada ao longo da digestão. Portanto, há necessidade de realizar outros experimentos para comprovar em qual etapa específica dos tratamentos enzimáticos ocorre essa perda.

6. CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver um método completo (extração, purificação e concentração em fase sólida) de quantificação simultâneas dos três AGEs em estudo neste trabalho. Os cartuchos de troca iônica permitiram obter uma correta recuperação na análise dos AGEs, com taxas de recuperação bem mais elevada que aquelas obtidas com cartuchos do tipo C18, normalmente utilizado para quantificação de AGEs em alimentos. No entanto, deve-se ter um cuidado especial durante a eluição desses compostos. O correto procedimento de eluição é fundamental para a quantificação de AGEs com os cartuchos de troca iônica.

A presença de pirralina foi observada em todas as amostras analisadas, leite em pó integral, semidesnatado, desnatado, leite cru microfiltrado e esterilizado, sendo mais proeminente nas amostras de leite esterilizado, comprovando dessa forma, que o tratamento térmico contribui significativamente para o aumento de Pyr no leite. Os valores quantificados nas amostras submetidas à precipitação protéica, variaram entre 0,021 (leite desnatado) a 0,072 Pyr_{livre}ng/mg^{-1}proteínas do leite^{-1} (leite esterilizado). E nas amostras submetidas à digestão enzimática esses valores foram de 0,150 (leite semidesnatado) a 8,367 $Pyr_{conjugada}$ng/mg^{-1}proteínas do leite^{-1} (leite esterilizado). Pôde-se observar que a CML foi degradada durante as etapas de digestão, sugerindo que estudos de melhoria desse procedimento sejam realizados, a fim de reduzir o tempo de digestão, evitando assim a degradação de CML.

Por falta de tempo, o método de análise proposto não pôde ser validado pelos critérios do ICH (Harmonised Tripartite Guideline).

7. PERSPECTIVAS

Para concluir este estudo, devemos atingir a completa validação do método analítico desenvolvido com amostras biológicas e de alimentos, em particular, para os produtos lácteos. Também deve ser colocado em prática um estudo abrangente para aperfeiçoar a etapa de hidrólise enzimática. Na verdade, esta hidrólise requer o domínio de numerosos parâmetros, tais como temperatura, pH, força iônica, concentração de enzimas, coquetéis enzimáticos, e a ordem na qual elas devem estar para obtenção do sucesso do método.

Para realizar esse estudo é necessário estabelecer uma verdadeira reflexão com base na avaliação quimiométrica do design da matriz multidimensional, design experimental e análise estatística dos resultados dos componentes principais.

8. REFERENCIAS

AGUILAR, P. B. et al. Perfil dos consumidores de leites pasteurizado tipo C e esterilizado (UHT) de Janaúba–MG. **Semina: Ciências Agrárias**, 33 (4), p. 1581-1588, 2012.

AHMED, M. U.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. **J. Biol. Chem**. 261: 4889. 1986.

AHMED, M. U.; DUNN, J. A.; WALLA, M. D.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. **J. Biol. Chem**. 263: 8816. 1988.

ARDREY, B. Liquid chromatography mass spectrometry: An Introduction. 2003.

ARRIBAS-LORENZO, G.; MORALES, F. J. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. **Food and chemical toxicology**, 48 (2), p. 644-649, 2010.

ASSAR, S. H.; MOLONEY, C.; LIMA, M.; MAGEE, R.; AMES, J. M. Determination of Ne-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Amino Acids**. 36, 317–326. 2009.

BAILEY, A. J.; SIMS, T. J.; AVERY, N. C.; HALLIGAN, E. P. **Biochem. J**. 305: 385. 1995.

BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S. L; SEARA, L. T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**. 22 (1), 113-124, 2009.

BASTOS, D. H. M. et al. Maillard Reaction Products in Processed Foods: Pros and Cons. In: Benjamin Valdez (Org.). Food Industrial Processes Methods and Equipment. 1ed. **Rijeka: In Tech**, v. 1, p. 281-300, 2012.

BORRELLI, R. C.; FOGLIANO, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. **Molecular nutrition & food research**, 49 (7), p. 673-678, 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº370, de 04 de Setembro de 1997. **Norma para a Inclusão do Citrato de Sódio no**

Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT. Diário Oficial da União, 08 de Setembro de 1997, seção 1, pág.19700.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51, de 18 de Setembro de 2002. **Normas para Produção, Identidade e Qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado.** Diário Oficial da União, 20 de Setembro de 2002, seção 1, pág.13.

CALVO, L. D. L. H. Flavour of heated milk. A review. **Intenational dairy journal**. 2: 69-81. 1992.

CESA, S. Malondialdehyde contents in infant milk formulas. **Journal of agricultural and food chemistry**, 52 (7), p. 2119-2122, 2004.

CHATTERJEE, I. B.; BANNERJEE, A. **Anal. Biochem**. 98: 368. 1979.

CHARISSOU, A.; AIT-AMEUR, L.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. **Journal of Chromatography A**, 1140 (1), p. 189-194, 2007.

CHELLAN, P.; NAGARAJ, R. H. **J. Biol. Chem**. 276: 3895. 2001.

CHUN-LIANG, L. et al. Reduction of advanced glycation end product levels by on-line hemodiafiltration in long-term hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis**., 42(3):524-31, 2003.

Commission Decision 2002/657/EC de 12 de Agosto de 2002; Off. J. **Eur.Commun**. L221, 8. 2002.

DELATOUR, T.; FENAILLE, F.; PARISOD, V.; RICHOZ, J.; VUICHOUD, J.; MOTTIER, P.; BUETLER, T.; **J. Chromatogr**. B 851, 268. 2007.

DEL CASTILLO, M. D. et al. In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxyl-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. **Journal of Cereal Science**, 45 (3), p. 327-334, 2007.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIÁN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis. **European Food Research and Technology**, 221 (5), p. 707-711, 2005.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIÀN-HENARES, J.; MORALES F.J. Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals. **Molecular Nutrition & Food Research**, 50 (9), p. 799-804, 2006.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIÁN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Colour and fluorescence measurement as unspecific markers for the Maillard reaction. In: Delgado-Andrade, C.; Rufian-Henares, J. A. **Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods**. 1º ed., Granada: Atrio, p. 98, 2009.

DELGADO-ANDRADE, C. et al. Study of the urinary and faecal excretion of Nε-carboxymethyllysine in young human volunteers. **Amino Acids**, 43 (2), p. 595-602, 2012.

DELGADO-ANDRADE, C. Maillard reaction products: some considerations on their health effects. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 52 (1), p. 53-60, 2013.

DYER, D. G.; BLACKLEDGE, J. A.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. **J. Biol. Chem**. 266: 11654. 1991.

ERBERSDOBLER, H. F.; SOMOZA, V. Forty years of furosine–Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. **Molecular nutrition & food research**, 51 (4), p. 423-430, 2007.

FENAILLE, F. et al. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. **Journal of Chromatography A**, 921 (2), p. 237-245, 2001.

FENAILLE, F. et al. Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase MicroExtraction gas chromatography mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51 (9), p. 2790-2796, 2003.

FENAILLE, F.; PARISOD, V. et al. Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions. **Proteomics**. 5(12): 3097-3104. 2005.

FENAILLE, F. et al. Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. **International Dairy Journal**, 16 (7), p. 728-739, 2006.

FINOT, P. A. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1043, p. 1–8, 2005.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Below the Radar: Advanced Glycation end Products that Detour “around the side”: Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes?.**Clinical Biochemist Review**, 26 (4), p.123-134, 2005.

FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: an overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, p. 631-653, 1996.

GIAMMARIOLI, S. et al. Preliminary study on lipid oxidation in infant formulas during storage. **La Rivista di scienza dell'alimentazione**, 26 (2), p. 80-88, 1997.

GLENN, J. V.; STITT, A. W. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1790 (10), p. 1109-1116, 2009.

GLOMB, M. A.; MONNIER, V. M. **J. Biol. Chem***.* 270: 10017. 1995.

GOLDBERG, T. et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **Journal of the American Dietetic Association**, 104 (8), p. 1287-1291, 2004.

GUY, P. A.; FENAILLE, F. Contribution of mass spectrometry to assess quality of milk-based products. **Mass Spectrometry Reviews** 25(2): 290-326. 2006.

HAAGSMA, N.; SLUMP, P. Evaluation of lysinoalanine determinations in food proteins. **Z Lebensm Unters Forsch.** 167(4): 238-240. 1978.

HAGEN, D. F.; MARKELL, C. G.; SCHMITT, G. A.; BLENVINS, D. D. Membrane approach to solid-phase extractions. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 236, p. 157-164. 1990.

HARTOG, J. W. L. et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. **European journal of heart failure**, 9 (12), p. 1146-1155, 2007.

HAYASE, F.; KATO, H. **Agric. Biol. Chem***.* 49: 467. 1985.

HEGELE, J.; BUETLER, T.; DELATOUR, T. Comparative LC–MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products**. Analytica chimica acta**. 617, 85–96. 2008.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**. v. 856, p.5. 1999.

HODGE, J. E. **J. Agric. Food Chem.** 1: 928. 1953.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and glicoxidation end products. **Diabetes Care**, 29 (6):1420-32. 2006;

JUNKER-BUCHHEIT, A.; WITZENBACHER, M. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 737, p. 67-74, 1996.

KATO, H. **Agric. Biol. Chem***.* 30: 822. 1966.

KATO, H.; FUJIMAKI, M. **Agric. Biol. Chem**. 34: 1071. 1970.

KATO, H.; SONOBE, H.; FUJIMAKI, M. **Agric. Biol. Chem***.* 41: 711. 1977.

KIM, W. et al. Receptor for advanced glycation end products and its ligands: a journey from the complications of diabetes to its pathogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1043 (1), p. 553-561, 2005.

KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 94 (12), p. 6474-6479, 1997.

KWAK, E. J.; LIM, S. I. The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. **Amino Acids**, 27 (1), p. 85-90, 2004.

KUANG, L.; JING, Z.; WANG, J.; MA, L.; LIU, X.; YANG, J. Quantitative determination of ε-N-carboxymethyl-L-lysine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 90, 1 – 6. 2014.

LANÇAS, F. M**.** A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis? **Scientia Chromatographica**. v. 1, n. 2, 2009.

LINDENMEIER, M.; FAIST, V.; HOFMANN, T. Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, 50 (24), p. 6997-7006, 2002.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **J. Chromatogr. A**. Amsterdam, v. 902, p. 17-63. 2000.

MAJORS, R. E. New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. In: LCGC. Europa. Disponível em: http://www.lcgceurope.com. Acessado em 12-01-17. 2001.

MAGALHÃES, L. R. **Leite e qualidade de vida**. 2006. Disponível em: <http://www.dta.uvf.br/minasiac/artigos/qual leite>. Acesso em: 20 nov. 2014.

MARTINS, A. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento lógico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25 (4), p. 698-704, 2005.

MAURON, J. Influence of processing on protein quality." **J Nutr Sci Vitaminol**. (Tokyo) 36 Suppl 1: S57-69. 1990.

MELTRETTER, J. ; SEEBER, S. et al. Site-specific formation of Maillard, oxidation, and condensation products from whey proteins during reaction with lactose." **J Agric Food Chem**. 55(15): 6096-6103. 2007.

MONARO, E, L. F. **Inibição da formação de produtos da reação de Maillard por extrato de erva-mate (Ilex paraguariensis) em sistemas modelo alimento**. 2012. Dissertação (Nutrição em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MONNIER, V. M. Dietary advanced lipoxidation products as risk factors for human health: a call for data. **Molecular nutrition & food research**, 51 (9), p. 1091-1093, 2007.

MORALES, F; ROMERO, C.; JIMENEZ-PEREZ, S. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycasylation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45 (5), p. 1570-1573, 1997.

MORALES, F.; VAN BOEKEL, M. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. **International Dairy Journal**, 8 (10), p.907-915, 1998.

MORALES, F.; SOMOZA, V.; FOGLIANO, V. Physiological relevance of dietary melanoidins. **Amino Acids**, 42 (4), p. 1097-1109, 2012.

MORTIER B. A. ; CARTUYVELS, D. ; VAN RENTERGHEM, R. ; DE BLOCK J. Intrinsic indicators for monitoring heat damage of consumption milk. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**. 4(4): 221-225. 2000.

NAGAI, R. et al. Advanced Glycation End Products and Their Receptors as Risk Factors for Aging. **Anti-Aging Medicine,** 9 (4), p. 108-113, 2012.

NAGARAJ, R. H. ; PORTERO-OTIN, M. ; MONNIER, V. M. Pyrraline Ether Crosslinks as a Basis for Protein Crosslinking by the Advanced Maillard Reaction in Aging and Diabetes **Arch. Biochem. Biophys.** 325:152-158. 1996.

NAKAYAMA, T.; HAYASE, F.; KATO, H. Formation of e-(2-formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-L-norleucine in the Maillard reaction between D-glucose and lysine. **Agricultural and Biologycal Chemistry**. 44, 1201–1202. 1980.

NAKAYMA, T.; HAYASE, F.; KATO, H. **Agric. Biol. Chem**. 44: 1201. 1980.

NASS, N. et al. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. **Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie**, 40 (5), p. 349-356, 2007.

NEGLIA, C. I.; COHEN, H. J.; GARBER, A. R.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. **J. Biol. Chem**. 260: 5406. 1985.

NGUYEN, C. V. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. **Molecular nutrition & food research**, 50 (12), p. 1140-1149, 2006.

NIELSEN, H. K. ; LOLIGER, J. et al. Reactions of Proteins with Oxidizing Lipids Analytical Measurements of Lipid Oxidation and of Amino-Acid Losses in a Whey-Protein Methyl Linolenate Model System. **British Journal of Nutrition** 53(1): 61-73. 1985.

NISSL, J.; PISCHETSRIEDER, M.; KLEIN, E.; SEVERIN, T. **Carbohydr. Res**. 270: C1. 1995.

NJOROGE, F. G.; SAYRE, L. M. ; MONNIER, V. M. **Carbohydr. Res**. 167: 211. 1987.

NUNES, C. S.; BAPTISTA, A. O. Implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 96 (538), p. 53-59, 2001

ODETTI, P.; FOGARTY, J.; SELL, D. R.; MONNIER, V. M. **Diabetes**. 41: 153. 1992.

ORDONEZ, Juan. Tecnologia de alimentos. Volume 2. Alimentos de origem animal – 1ª. Ed., Ed. Artmed – SP, 2005.

PATONAY, G. HPLC Detection: Newer methods. New York: VCH, 236p. 1992.

PINCHON, V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. **J. Chromatogr. A**. 885, 195–215. 2000.

PISCHETSRIEDER, M.; HENLE, T. Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and physiological aspects. **Amino Acids**, 42 (4), p. 1111-1118, 2012.

POOLE, C. F.; GUNATILEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction**. J. Chromatogr. A**., v. 885, p. 17-39. 2000.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 68-76. 2001.

RESMINI, P.; PELLEGRINO, L. **Int Chromatogr Lab**.6:7–11. 1991.

RESMINI, P.; PELLEGRINO, L.; BATTELLI, G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. **Italian Journal of Food Science**, 2 (3), p. 173-183, 1990.

ROMEU-NADAL, M.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas. **Journal of Chromatography A**, 1046 (1), p. 235-239, 2004.

ROJAS, A.; MORALES, M. A. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. **Life sciences**, 76 (7), p. 715-730, 2004.

RUFIÁN-HERNARES, J. A.; GARCIA-VILLANOVA, B.; GUERRA-HERNANDEZ, E. Determination of furosine in enteral formula*.* **J. Liq. Chromatogr**., 24 (19), p. 3049-3061, 2001.

RUFIÁN-HENARES, J. A.; GARCÍA-VILLANOVA, B.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, 52 (17), p. 5354-5358, 2004a.

RUFIAN-HENARES, J. Á.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Pyrraline content in enteral formula processing and storage and model systems. **Eur Food Res Technol**. 219:42–47. 2004b.

RUFIN-HENARES, J. A.; DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F. J. Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. **Journal of AOAC International**, 89 (1), p. 161-165, 2006.

RUFIÁN-HENARES, J. A.; DELGADO-ANDRADE, C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. **Food Research International**, 42 (3), p. 394-400, 2009.

SANDU, O. et al. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat–fed mice are linked to high glycotoxin intake. **Diabetes**, 54 (8), p. 2314-2319, 2005.

SARAIVA, M. A. G. **Espectrometria de massa aplicada ao estudo da reacção de Maillard.** 2007. 34-35 f. Tese de doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências - Química analítica. Departamento de Química e Bioquímica. Lisboa, 2007.

SASAKI, N. et al. Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **The American journal of pathology**, 153 (4), p. 1149-1155, 1998.

SCHETTGEN, T.; TINGS, A.; BRODOWSKY, C.; MÜLLER-LUX, A.; MUSIOL, A.; KRAUS, T. Simultaneous determination of the advanced glycation end product Nε-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution–hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. 387:2783–2791. 2007.

SELL, D. R.; MONNIER, V. M. **J. Biol. Chem.** 264: 21597. 1989

SILVA, P. D. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. 2012. 33-38f. Dissertação (Mestrado em Química Industrial). Universidade da Beira Interior. Covilhã, 2012.

SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000.

SIMPSON, N. J. K.; WELLS, M. J. M. Introduction to solid-phase extraction. In: Solidphase extraction: principles, techniques and applications. **New York: Marcel Dekker**, Inc., p. 1-17. 2000.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. LPratical HPLC method development. 2.ed., **New York: John Wiley Professio**. 1997.

SOMOZA, V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. **Molecular nutrition & food research**, 49 (7), p. 663-672, 2005.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de nutrição**, 24 (6), p. 895-904, 2011.

SUN, X.; TANG, J.; WANG, J.; RASCO, B. A.; LAI, K.; HUANG, Y. Formation of advanced glycation endproducts in ground beef under pasteurisation conditions. **Food Chemistry**. 172, 802–807. 2015.

TAN, K. C. B. et al. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. **Diabetes care**, 25 (6), p. 1055-1059, 2002.

TEERLINK, T.; BARTO, R.; BRINK, H. J. T.; SCHALKWIJK, C. G. Measurement of Ne-(carboxymethyl)lysine and Ne-(carboxyethyl)lysine in human plasma protein by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry**. 50, 1222–1228. 2004.

TEIXIDO, E. et al. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. **Journal of Chromatography A**, 1185 (1), p. 102-108, 2008.

TRONCO, M. Manual para Inspeção da Qualidade do Leite. 3ª ed. Santa Maria:

UFSM, 2008.

TROISE, A. D.; FIORE, A.; COLANTUONO, A.; KOKKINIDOU, S.; PETERSON, D. G.; FOGLIANO, V. Effect of Olive Mill Wastewater Phenol Compounds on Reactive Carbonyl Species and Maillard Reaction End-Products in Ultrahigh- Temperature-Treated Milk. **J. Agric. Food Chem**. 62, 10092−10100. 2014.

ULBERTH, F.; ROUBICEK, D. Monitoring of oxidative deterioration of milk powder by headspace gas chromatography. **International Dairy Journal**, 5 (6), p. 523-531, 1995.

UNNO, Y.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S.; KINAE, N. **Int. Congr. Ser***.* 1245: 73. 2002.

URIBARRI, J. et al. Diet-Derived Advanced Glycation End Products Are Major Contributors to the Body's AGE Pool and Induce Inflammation in Healthy Subjects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1043 (1), p. 461-466, 2005.

URIBARRI, J. et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the American Dietetic Association**, 110 (6), p. 911-916, 2010.

VALÉCIO, M.; LOPES, R. B.; LIMA, L. C. **Alagoas: Estratégias de Desenvolvimento**. 2005. Disponível em: <www.investimentosalagoas.al.gov.br/ed/estratégias/pdf>. Acesso em: 10 jan. 2014.

VLASSARA, H.; PALACE, M. R. Glycoxidation: the menace of diabetes and aging. **The Mount Sinai journal of medicine**, 70 (4), p. 232-241, 2003.

VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both?. **Current diabetes reports**, 14 (1), p. 1-10, 2014.

WELLS, M. J. M. Handling large volume samples: applications of SPE to environmental matrices. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.) Solid-phase extraction: principles, techniques and applications. **New York: Marcel Dekker,** Inc. p. 97-123. 2000.

XANTHIS, A. et al. Advanced glycosylation end products and nutrition: a possible relation with diabetic atherosclerosis and how to prevent it. **Journal of food science**, 72 (8), p. 125-129, 2007.

WANG, W. et al. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end products by scavenging reactive carbonyls. **Food Research International**, 44, p. 2666–2673, 2011.

ZHANG, G.; HUANG, G.; XIAO, L.; MITCHELL, A. E. Determination of advanced glycation endproducts by LC–MS/MS in raw and roasted almonds (Prunus dulcis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59, 12037–12046. 2011.

ZIMMER, D. Introduction to quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Chromatographia** 57: S325-S332. 2003.