



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

JÚNIA HELENA PORTO BARBOSA

QUANTIFICAÇÃO DA N^o-CARBOXIMETILISINA EM FÓRMULAS ENTERAIS E
PARENTERAIS ATRAVÉS DE ELISA E LC-MS/MS

MACEIÓ
2014

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

JÚNIA HELENA PORTO BARBOSA

**QUANTIFICAÇÃO DA N^o-CARBOXIMETILISINA EM FORMULAS ENTERAIS E
PARENTERAIS ATRAVÉS DE ELISA E LC-MS/MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências, com área de concentração em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart
Sant'Ana

MACEIÓ-AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

B238q Barbosa, Júnia Helena Porto.
Quantificação da N^o-carboximetilisina em fórmulas enterais e parenterais através de Elisa e LC-MS/MS / Júnia Helena Porto Barbosa. – Maceió, 2014.
82 f. : tabs, graf.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia. f. 73-82

1. Produtos de glicação avançada. 2. Reação de Maillard. 3. Dieta. 4. Carboximetilisina. 5. Elisa. 6. Espectrometria de massa. I. Título.

CDU: 54.06



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

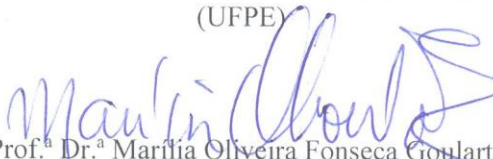
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Júnia Helena Porto Barbosa**, intitulada: “Quantificação da N^o-carboximetilisina em fórmulas enterais e parenterais através de ELISA e LC-MS/MS”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 22 de outubro de 2014, às 13:00 horas, no Auditório do Centro de Interesse Comunitário da UFAL.


COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana – Orientador
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.ª Dr.ª Monika Pischetsrieder
(Universidade Friedrich – Alexander Erlangen –
Nuremberg Alemanha)


Prof.ª Dr.ª Maria Tereza dos Santos Correia
(UFPE)


Prof.ª Dr.ª Marília Oliveira Fonseca Goulart
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.ª Dr.ª Terezinha da Rocha Ataíde
(FANUT/UFAL)

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Adão de Brito e Maria Helena e aos meus avós Francisco Porto e Mercês de Bessa, por me transmitirem com desvelado amor e ao exemplo de atitudes permanentes os ensinamentos mais valiosos da minha formação.

Dedico também à minha estimada e eternamente mestre incentivadora Prof. Lucy Tojal e Seara.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pelo apoio permanente e inestimável confiança depositada, além dos sábios ensinamentos transmitidos, sem os quais nada seria possível.

À estimada Maria Amélia Teles, por ter acreditado na realização deste projeto de Doutorado e, como instrumento Divino, ter atuado como incentivadora desde os estágios anteriores à sua execução.

Às prof.^{as} e amigas Dr.^{as} Suzana Lima de Oliveira, Terezinha da Rocha Ataíde e Marília Oliveira Fonseca Goulart, pelos ensinamentos, apoio, carinho e incentivo generosamente compartilhados, os quais permanecerão indelévels em minha memória.

À Prof.^a Dr.^a Monika Pischetsrieder, chefe do Instituto de Farmácia e Química dos Alimentos da Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg, por me proporcionar um ambiente abundante em recursos, debates científicos respeitosos, acolhimento generoso e produção científica construtiva, os quais me permitiram desenvolver de maneira entusiasmada este projeto, além de evoluir técnica, profissional e pessoalmente ao longo desta experiência.

À Dr.^a Jasmin Meltretter, por dedicar-me orientação e apoio respeitosos desde o processo de candidatura à bolsa de fomento ao estágio sanduíche até o final da minha vivência no Instituto de Farmácia e Química dos Alimentos da Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg, Alemanha.

Às colegas de laboratório Isis Torres (Universidade Federal de Alagoas), Christiane Östereischer (Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg) e Milla Stoll (Microcoat Technologie GmbH), pelas orientações, trocas de experiências e apoio generoso na execução deste projeto.

Aos colegas e técnicos do Instituto de Farmácia e Química dos Alimentos da Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg, pela fantástica e inesquecível experiência vivida conjuntamente e por acrescentarem em minha bagagem de vida valores que vão muito além dos conhecimentos técnicos compartilhados.

Ao estimado Dr. Peter Stahl, por acreditar e empregar inestimáveis esforços pessoais e materiais, com humildade, otimismo e alegria permanentes, para o adequado desenvolvimento dos testes de ELISA deste projeto, em conjunto com a sua equipe da Microcoat Technologie GmbH.

À Prof.^a Dr.^a Yurdagül Zopf, chefe do Instituto de Medicina e Nutrição Clínica da Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg, pelo sempre caloroso acolhimento e debate de ideias, além do generoso fornecimento de amostras de fórmulas enterais para este projeto.

Ao Prof. João Gomes, pelo inestimável apoio com relação às análises estatísticas.

Ao Centro Especializado de Nutrição (Cenutri) pelo gentil preparo e envio das amostras de dietas parenterais para a execução das análises na Alemanha.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB-UFAL), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e DAAD (Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico), pela concessão de bolsas de estudo e outros recursos imprescindíveis ao desenvolvimento deste estudo.

Às amigas Evla Dark, Janayna Lima, Fabiana Accioly e Marcella Moreira, pela torcida e apoio inestimáveis, que nem mesmo a distância e os diferentes caminhos da vida foram capazes de alterar.

À minha valorosa e amada família, em especial à minha mãe Maria Helena, aos meus irmãos Cássia e Riegel e aos meus sobrinhos Melina e Henrique, pelo amor, dedicação e incentivos genuínos e desmedidos em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Fernando e à minha filha Laura, companheiros diários da jornada, pela compreensão, sacrifícios amorosos e incentivo constantes; acima de tudo, por tornarem todas as lutas significativas.

À Deus, por abençoar todos os passos da caminhada.

RESUMO

Os produtos da glicação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*) constituem grande variedade de substâncias formadas a partir de interações amino-carbonilo, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos. A formação de AGEs nos alimentos e em sistemas biológicos constitui tema de crescente interesse, desde que estão associados a efeitos pró-oxidativos e pró-inflamatórios envolvidos na patogênese de diversas doenças crônico-degenerativas como o diabetes, o mal de Alzheimer, a insuficiência renal. A N^ε-carboximetilisina (CML) foi o primeiro AGE a ser identificado em alimentos e tem sido o composto de escolha em estudos em que um único produto é usado como marcador de AGEs de um sistema. Métodos imunoquímicos ou instrumentais estão disponíveis para a determinação da CML, mas ambos apresentam limitações, não havendo ainda um método considerado ideal. Assim, a fim de comparar e otimizar diferentes métodos analíticos, o presente estudo teve como objetivo determinar o conteúdo em CML de fórmulas nutricionais enterais e parenterais através das técnicas de ELISA e de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS). Para tanto, foram investigadas 5 formulações parenterais e 17 enterais comercialmente disponíveis. Todas as amostras investigadas apresentaram níveis detectáveis de CML neste estudo, independentemente do método de análise utilizado. As fórmulas parenterais apresentaram conteúdos mensurados através de ELISA que variaram de $529,9 \pm 33,47$ a $1948,88 \pm 3,68$ ng de CML/mL de amostra e apresentaram correlações lineares positivas quanto aos seus conteúdos em lipídeos (0,9259) e em carboidratos (0,9426), mas não foram submetidas às análises através do LC-MS/MS devido à inviabilidade da aplicação para esse grupo de amostras do protocolo de purificação estabelecido nesta investigação. As formulações enterais apresentaram conteúdos em CML que variaram entre $1076,91 \pm 76,87$ e $55950,71 \pm 1891,29$ ng de CML/ mL de amostra e evidenciaram correlações positivas quanto aos seus conteúdos em carboidratos (0,6057), lipídeos (0,5264) e proteínas (0,6157), quando analisadas através de ELISA, e apresentaram uma variação de 0,09 e 0,503 µg CML/ mg de proteína das dietas quando analisadas através do LC-MS/MS, não havendo correlações entre a CML e as variáveis “lipídeos”, “carboidratos” ou “proteínas” para esse grupo. A investigação conduzida durante o processo de preparo das amostras, anterior à injeção no LC-MS/MS, evidenciou uma expressiva perda da CML durante as diferentes etapas do protocolo, comprometendo a confiabilidade dos resultados obtidos através desse método de análise, enquanto a comparação entre os resultados encontrados através dos diferentes métodos aplicados a amostras semelhantes em composição e preparo demonstrou a confiabilidade do teste de ELISA anti-CML utilizado nas condições deste experimento. Os resultados do presente estudo apontam a necessidade de aperfeiçoamento dos protocolos de análise de AGEs em alimentos e deverão guiar futuras investigações nesta área. Dentre os desafios que permanecem presentes no campo de estudo dos AGEs está a definição de métodos de detecção confiáveis, que possibilitem a mensuração de estruturas nos fluidos ou tecidos corporais e nos alimentos, de maneira sensível, específica, rápida e não muito dispendiosa.

Palavras-chave: Produtos de glicação avançada. Reação de Maillard. Carboximetilisina. ELISA. Espectrometria de massa. Dieta.

ABSTRACT

The advanced glycation endproducts (AGEs) constitute a large variety of compounds formed from nonenzymatic amino-carbonyl interactions between reducing sugars or oxidized lipids and proteins, nucleic acids or aminophospholipids. The AGEs formation in foods and biological systems is a topic of increasing interest for the science, since they are involved in proinflammatory and pro-oxidative effects related to the pathogenesis of chronic degenerative diseases such as diabetes, Alzheimer's disease and renal failure. The N^ε-carboxymethyllysine (CML) was the first AGE identified in foods and, since then, has been the compound of choice in studies on which a single product is used as an AGE marker. Immunochemical or instrumental methods are available for the AGEs determination, but they present limitations and there is not an ideal method yet. Thus, in order to compare and optimize different analytical methods, this study aimed to determine the CML content on enteral and parenteral nutrition formulas by ELISA and LC-MS/MS. So, in order to compare and optimize different analytical methods, this study aimed to determine the content of CML in nutritional enteral and parenteral formulas by ELISA and by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS / MS). Thus, 5 parenteral and 17 enteral commercially available formulations were investigated. All samples studied showed detectable levels of CML, regardless of the method of analysis used. The parenteral formulations presented CML contents measured by ELISA ranging from 529.9 ± 33.47 to 1948.88 ± 3.68 ng CML/mL of sample and showed positive linear correlations to their content in lipids (0.9259) and carbohydrates (0.9426), but they were not submitted to the LC-MS/MS analysis due to the impossibility of applying the established purification protocol for this group of samples. Enteral formulations analyzed by ELISA presented CML contents ranging from 1076.91 ± 76.87 to 55950.71 ± 1891.29 ng CML/mL of sample and showed positive correlations to its contents in carbohydrate (0.6057), lipid (0.5264) and protein (0.6157). They showed a variation from 0.09 to 0.503 μg CML/mg of protein of the diets when analyzed by LC-MS/MS and there was no correlation between CML and the variables "lipid", "carbohydrate" or "protein" calculated for this group. The investigation conducted during the samples preparation prior to injection into the LC-MS/MS showed a significant loss of CML during the different stages of the protocol, compromising the reliability of the results obtained through this method of analysis, while the comparison between the results obtained through different methods applied to similar samples showed the reliability of the anti-CML ELISA test used in this experiments. The results of this study indicate the need for improvement of AGEs analysis protocols in food and should guide future research on this area. The determination of reliable methods of detection, which enable the measurement of AGEs structures in body fluids, tissues and also in food, in a sensitive, specific, fast and not too expensive way is a challenge that remains present on this field.

Key words: Advanced glycation endproducts. Maillard reaction. Carboxymethyllysine. ELISA. Mass spectrometry. Diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reação entre a glicose em um amino grupo e a formação do produto de Amadori.....	17
Figura 2 -	Produtos intermediários da reação de Maillard.....	18
Figura 3 -	Representação de alguns dos produtos de glicação avançada (AGEs).....	19
Figura 4 -	Rotas de formação e produtos finais de glicação avançada (AGEs) relevantes <i>in vivo</i>	26
Figura 5 -	Amostras de dietas enterais comercialmente disponíveis para o uso em terapia nutricional.....	42
Figura 6 -	Preparo das soluções parenterais para o uso em terapia nutricional.....	42
Figura 7 -	Kit de ELISA para a quantificação da CML em matrizes biológicas e alimentares.....	43
Figura 8 -	Visão geral do princípio do teste de ELISA para a determinação da CML nas amostras.....	44
Figura 9 -	Esquema da execução das análises da CML através do teste de ELISA....	44
Figura 10 -	Câmara a vácuo do sistema analisador de massas triplo quadrupolo.....	46
Figura 11 -	Espectros de massas do íon produto da CML e seus fragmentos.....	46
Figura 12 -	Grupo funcional da fase estacionária da coluna ZIC [®] -HILIC.....	47
Figura 13 -	Esquema de análise da CML por LC-ESI-MS/MS.....	48
Figura 14 -	Câmara para a extração por fase sólida aparelhada com cartuchos.....	49
Figura 15 -	Cromatograma de solução padrão (CML/d-CML) obtido através do LC-ESI-MS/MS em modo positivo de monitoramento multi-reações (MRM)	55
Figura 16 -	Cromatograma de amostra de fórmula enteral, evidenciando a presença da CML, obtido através do LC-ESI-MS/MS em modo positivo de monitoramento multi-reações (MRM).....	55
Figura 17 -	Conteúdos em CML de um grupo representativo de amostras ao início e ao final do protocolo de purificação.....	57
Figura 18 -	Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa de extração lipídica do protocolo de purificação.....	57
Figura 19 -	Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa da diálise do protocolo de purificação.....	58

Figura 20 -	Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa da liofilização do protocolo de purificação.....	58
Figura 21 -	Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa da ultrafiltração das amostras, imediatamente anterior à injeção no LC-MS/MS.....	59
Figura 22 -	Ilustração das vias de alimentação oral, enteral e parenteral.....	62
Figura 23 -	Epítomos reconhecidos pelo anticorpo anti-CML-Mab 4G9.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição das etapas básicas do teste de ELISA da Microcoat GmbH para a quantificação da CML.....	43
Quadro 2 -	Parâmetros do espectrômetro de massas (MS) dependentes da vazão do cromatógrafo líquido (LC).....	47
Quadro 3 -	Parâmetros do espectrômetro de massas (MS) dependentes do composto em análise.....	47
Quadro 4 -	Esquema de coleta de alíquotas durante o protocolo de purificação das amostras.....	50
Quadro 5 -	Exemplos de composição nutricional de dieta enteral e parenteral <i>versus</i> leite.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo em macronutrientes e N ^ε -carboximetilisina (CML) das dietas parenterais analisadas por ELISA.....	52
Tabela 2 - Conteúdo em macronutrientes e N ^ε -carboximetilisina (CML) das dietas enterais analisadas por ELISA.....	53
Tabela 3 - Conteúdo em macronutrientes e N ^ε -carboximetilisina (CML) das dietas enterais analisadas por LC-MS/MS.....	54
Tabela 4 - Conteúdo em CML de um grupo representativo de amostras enterais mensurados através de ELISA ao início e ao final do protocolo de purificação.....	59
Tabela 5 - Conteúdo em CML de um grupo representativo de amostras enterais mensurados através de ELISA e LC-MS/MS ao final do protocolo de purificação.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AGEs	Produtos de glicação avançada
ALEs	Produtos de lipoxidação avançada
1-DG	1-Deoxiglicosona
3-DG	3-Deoxiglicosona
AGEs	Produtos de glicação avançada
AP-1	Fator ativador de proteína do tipo 1
bFGF	Fator básico de crescimento fibroblástico
CEL	Carboxietilisina
CML	N ^ε -carboximetilisina
CG	Cromatografia gasosa
d- CML	Epsilon-N-carboxi[2H ₂]metil-L-Lis
DIC	Detector de ionização por chama
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FL	Frutosilisina
GO	Glioxal
GSH	Glutathione
IL-1α	interleucina 1 α
IL-6	Interleucina 6
LC-MS/MS	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa acoplada à espectrometria de massa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX-1	Receptor para lipoproteína de baixa densidade oxidada semelhante à lecitina
MeOH	Metanol
MGO	Metilglioxal
MRM	Modo positivo de monitoramento multi-reações
NAMPT	Nicotinamida fosforibosiltransferase
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κ B
OMA	Ácido oxálico monolisinilamida
OST-48	Proteína 48 do complexo oligosacariltransferase
PIO	Propilinasolona-ornitina
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SIRT1	Proteína desacetilase de sirtuina dependente de NAD-1
SOD2	Superóxido desmutase 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TGI	Trato gastrointestinal
VCAM-1	Moléculas de adesão vascular tipo 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial
W-3	Ácido graxo ômega 3
W-6	Ácido graxo ômega 6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A Reação de Maillard e a Formação dos Produtos de Glicação Avançada (AGEs)	15
1.1.1 Aspectos históricos.....	15
1.1.2 As etapas da reação de Maillard.....	16
1.1.3 Moduladores da formação de AGEs.....	22
1.2 A Formação Endógena e os Mecanismos de Ação dos AGEs	24
1.3 A Alimentação como Fonte de AGEs	31
1.3.1 Absorção e biodisponibilidade de AGEs dietéticos.....	35
1.4 Métodos de mensuração de AGEs	37
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Amostras	41
3.2 Análise da CML Através de ELISA	43
3.3 Análise da CML Através de LC-ESI-MS/MS	45
3.4 Testes de Extração da CML em Fase Sólida (SPE)	49
3.5 Testes de Investigação da CML Durante o Preparo de Amostras para o LC-ESI-MS/MS	50
3.6 Análises Estatísticas	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Conteúdo em CML das Dietas Enterais e Parenterais Analisadas Através de ELISA	--
4.2 Conteúdo em CML das Dietas Enterais Analisadas Através de LC-ESI-MS/MS	54
4.3 Recuperação da CML Através de SPE	56

4.4 Resultados da investigação da CML durante o preparo das amostras para a injeção no LC-MS/MS.....	56
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	70
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Reação de Maillard e a Formação dos Produtos de Glicação Avançada

1.1.1 Aspectos históricos

O fenômeno do escurecimento dos alimentos durante o aquecimento é conhecido desde a descoberta do fogo há mais de 300.000 anos, mas apenas a partir de 1912, quando o bioquímico francês Louis-Camille Maillard reportou seus primeiros experimentos sistemáticos sobre as reações complexas entre aminoácidos e açúcares redutores durante o aquecimento dos alimentos, levando à formação de substâncias “amarronzadas”, o conhecido escurecimento não enzimático começou a ser explicado (MAILLARD, 1912).

Nos anos seguintes à descoberta de Maillard, diversos estudos fizeram avançar os conhecimentos fundamentais relacionados à química da reação, bem como às suas implicações nutricionais. Complementada pelos trabalhos fundamentais de Amadori (1929), Heyns e Meinecke (1953), Hodge (1953), dentre outros, é aceita hoje como “reação de Maillard” uma série de reações paralelas e subsequentes, as quais por razões de clareza e didática podem ser divididas em três estágios, designados “iniciais”, “avançados” e “finais”, que levam à formação de uma grande variedade de compostos que conferem aroma e cor aos alimentos, bem como dos chamados produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*).

No processamento dos alimentos, a reação pode conferir aspectos positivos, como a formação do odor e sabor atrativos, mas acarreta também consequências nutricionais negativas, como a perda de aminoácidos essenciais e a formação de substâncias potencialmente nocivas à saúde humana. Na atual visão da ciência, a formação de AGEs nos alimentos e nos sistemas biológicos constitui um tema de grande interesse entre os pesquisadores, desde que esses compostos tem sido associados a importantes efeitos pró-oxidativos e pró-inflamatórios envolvidos nas alterações metabólicas inerentes ao processo de envelhecimento, mas também à patogênese e à progressão de inúmeras doenças crônicas degenerativas, como o diabetes, o Alzheimer, a insuficiência renal e a aterosclerose (URIBARRI et al., 2007; VLASSARA; URIBARRI, 2014).

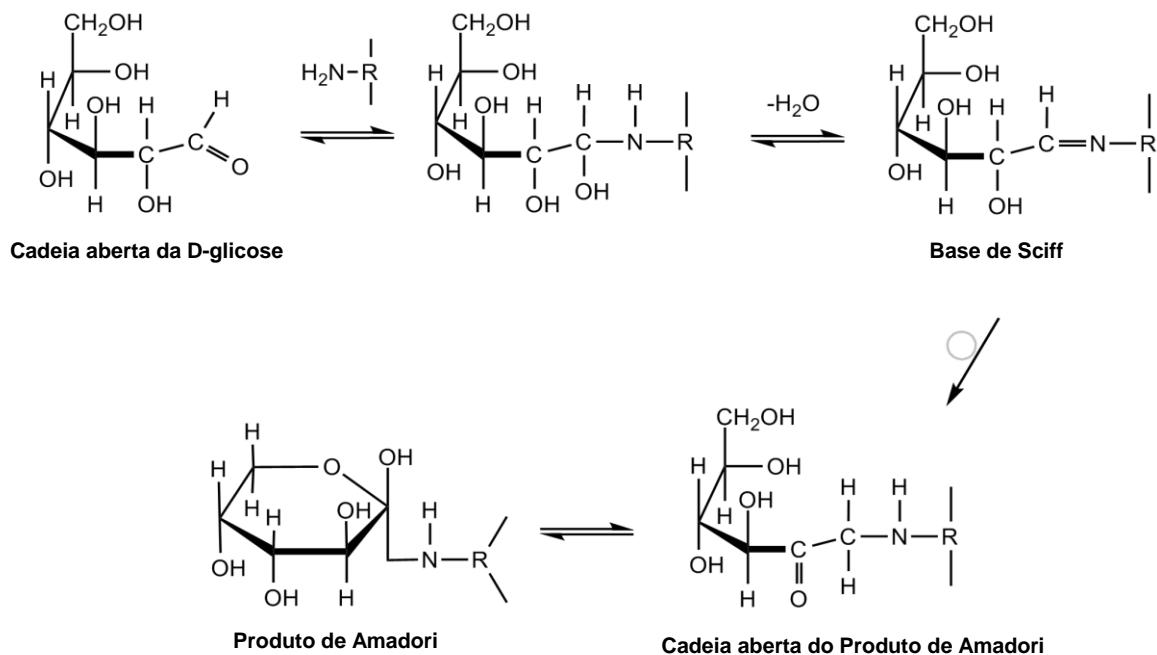
1.1.2 As etapas da reação de Maillard

A primeira e reversível etapa da reação de Maillard envolve a condensação de um grupamento amino proveniente de aminoácidos, peptídeos, aminofosfolipídeos ou proteínas e de um grupamento carbonílico presente em açúcares redutores, lipídeos oxidados, vitamina C ou quinonas, formando uma imina ou também chamada base de Schiff (figura 1) (HIDALGO; ZAMORA, 2005). Aminas primárias são mais reativas que as secundárias, enquanto as terciárias são inativas. O grupamento ϵ -amino presente na cadeia lateral da lisina é o precursor mais reativo em proteínas, sendo o alvo primário de ataque de carboidratos, muito embora os aminoácidos livres presentes em um substrato possam também reagir (LEDL; SCHLEICHER, 1990). Sabe-se que, a depender das condições do processamento de um alimento, até 70% do seu conteúdo em lisina pode ser comprometido nesse tipo de reação (FINOT; DEUTSCH; BUJARD, 1981). A base de Schiff, por sua vez, é altamente susceptível à oxidação e à geração de radicais livres, os quais levam à formação de oxaldeídos, glioxal (GO) e metilglioxal (MGO), na chamada via *Namiki* da reação de Maillard. Essa forma de “glicoxidação” pode também resultar da autooxidação da glicose catalisada por metais, a qual leva à formação de GO e arabinose (NAMIKI; HAYASHI, 1983). A chamada via *Wolff* da reação de Maillard constitui um importante processo *in vitro* observado durante a incubação a longo termo de proteínas e açúcares redutores na presença de tampão fosfato e é atribuída à presença de Cu^{2+} e Fe^{3+} presentes como contaminantes em todos os tampões baseados em fosfato (WELLS-KNECHT et al., 1995). Patologias em que as vias *Namiki* e *Wolff* representam maior importância compreendem as insuficiências renais, nas quais os processos oxidativos são mais intensos, a catarata e a aterosclerose, em que os metais catalíticos foram positivamente correlacionados com o desenvolvimento das patologias (MONNIER, 2003).

Na seqüência da reação, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, o produto de Amadori. A evidência de que essa reação ocorreria também em sistemas biológicos foi demonstrada a partir da identificação de uma variante da hemoglobina, a HbA_{1C}, na qual o N-terminal do seu resíduo de valina reage com a glicose, formando uma N- α -frutosilvalina (RAHBAR, 2005). Para distinguir os mecanismos dessa reação da fisiológica glicosilação enzimática o termo “glicação” foi introduzido. A hemoglobina glicada é um importante marcador biomolecular e representa um conhecido exemplo de produto de Amadori, sendo a sua determinação considerada, até o presente, o indicador mais confiável de progressão do diabetes (BIERHAUS et al., 1998). Em condições de glicoxidação acelerada por catálise metálica, o produto de Amadori gera superóxido e H_2O_2 . Esse último pode gerar

radicais hidroxil na presença de metais e levar à formação de carboximetilisina (CML) a partir dos produtos de Amadori (NAGAI et al., 1997).

Figura 1 - Reação entre a glicose e um amino grupo e a formação do produto de Amadori



Fonte: autora, 2014.

Nota: Ataque nucleofílico do amino grupo ao aldeído da glicose forma inicialmente uma carbinolamina, a qual se desidrata formando uma base de Schiff. A base de Schiff então sofre rearranjos para formar o produto de Amadori. Embora apenas uma isoforma cíclica seja mostrada, existe uma mistura de diversas isoformas.

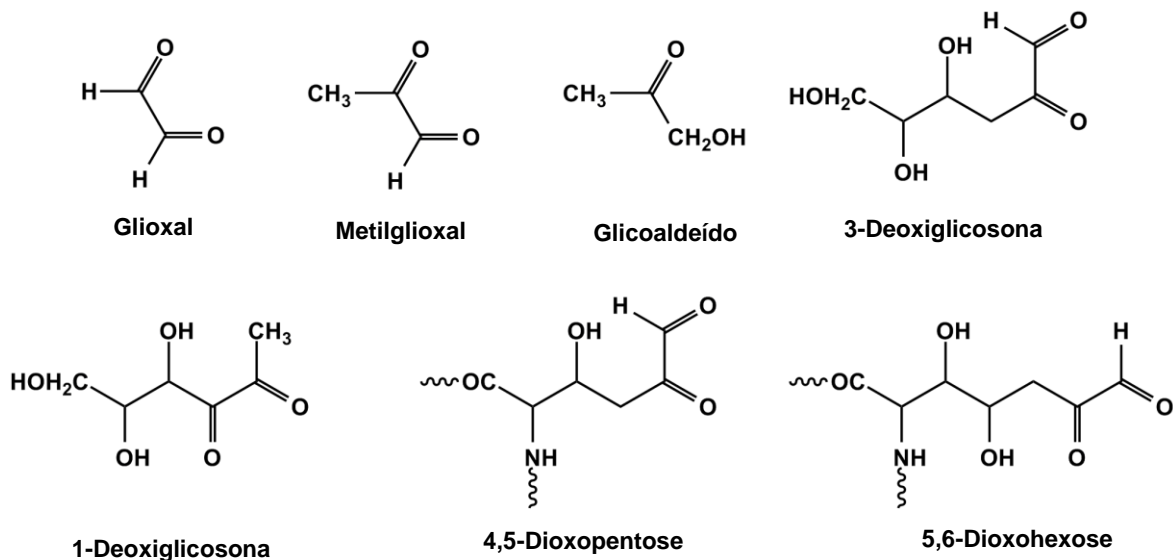
O produto de Amadori é quantitativamente o produto de glicação mais importante nas proteínas extracelulares, lentes do cristalino e glóbulos vermelhos sanguíneos. No entanto, em contraste com os AGEs, que se acumulam exponencialmente com o avançar da idade nas proteínas de meia-vida longa como o colágeno, os produtos de Amadori não se alteram em concentração com o aumento da idade. Deve-se ressaltar que o produto de Amadori representa um estado de equilíbrio entre a formação, reversão ou a degradação dos AGEs e sob condições anaeróbicas, é o precursor da 3-deoxiglicosona (3-DG) e 1-deoxiglicosona (1-DG) (HENLE, 2003).

Enquanto a glicose representa o açúcar comumente associado ao processo de glicação no meio fisiológico, os alimentos podem conter diversos tipos de açúcares redutores, podendo

levar à formação de uma diversidade de produtos de Amadori derivados de mono ou de oligossacarídeos (HENLE, 2003).

O produto de Amadori pode sofrer diversas reações, tais como enolização, ciclização, desidratação, retroaldolização, isomerização ou condensação, levando à formação de compostos dicarbonílicos (figura 2), como o MG e o GO, capazes de se condensarem a grupos aminos primários acessíveis, dando então origem aos produtos avançados da reação, os AGEs (figura 3) (MONNIER, 2003). Deve-se destacar que os compostos dicarbonílicos chegam a ser 20.000 vezes mais reativos do que a glicose e são os principais intermediários durante a formação de AGEs *in vivo* e nos alimentos (MEADE; MILLER; GERRARD, 2003).

Figura 2 - Produtos intermediários da reação de Maillard



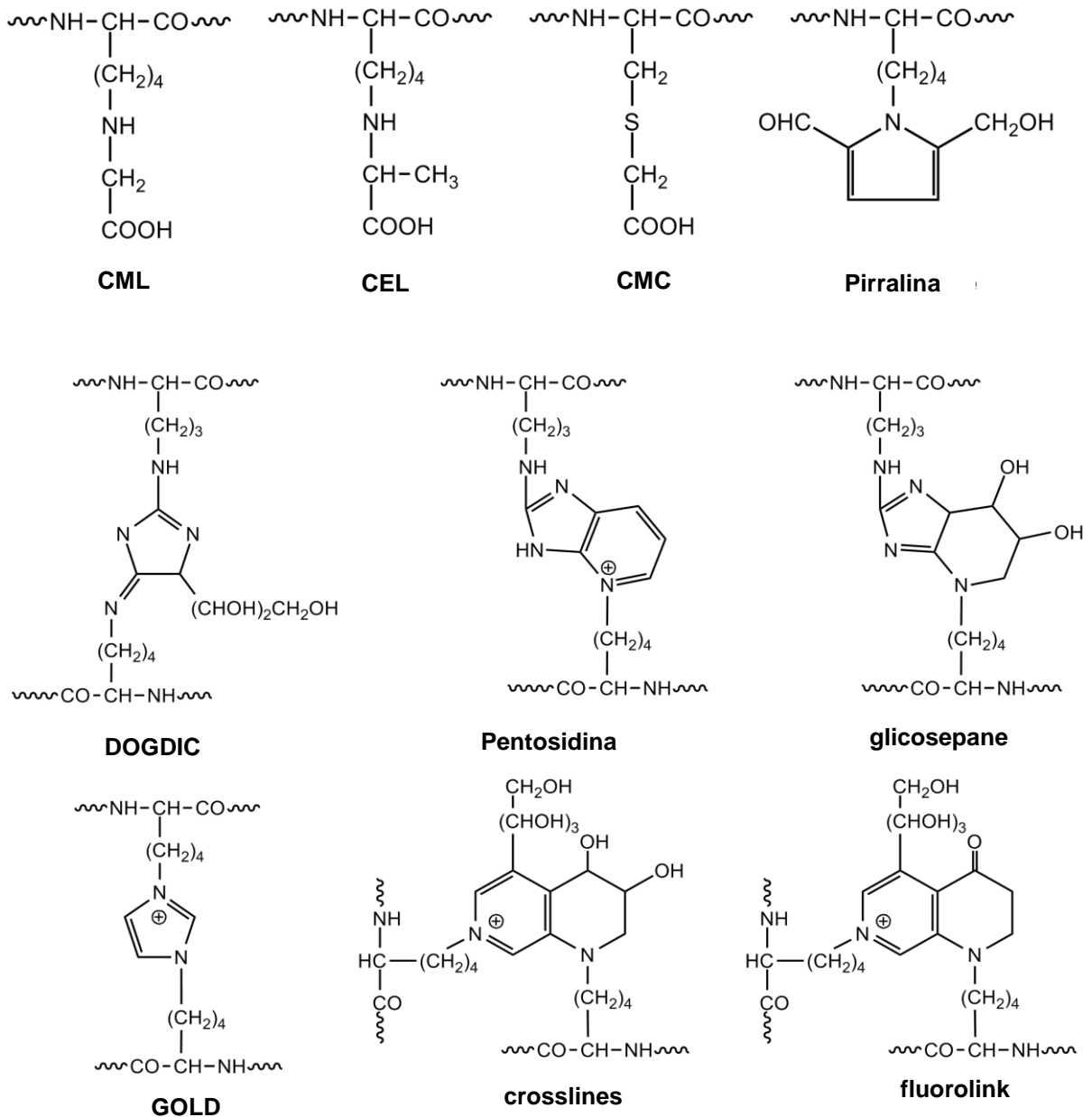
Fonte: adaptado de ZHANG et al., 2009.

Nota: a decomposição oxidativa do produto de Amadori leva à formação de uma variedade de compostos carbonílicos e dicarbonílicos altamente reativos. Esses produtos intermediários da glicação incluem o glioxal (GO), o metilglioxal (MGO), o glicaldeído, a 3-deoxiglicosona (3-DG), a 1-deoxiglicosona 91-DG), a 4,5 dioxipentose e a 5,6-dioxohexose. Estes compostos também podem ser produzidos a partir da autoxidação da glicose ou, no caso do glioxal, através da peroxidação lipídica.

Simultaneamente à formação dos AGEs, ocorre a formação de polímeros nitrogenados de cor marrom, as chamadas melanoidinas, que possuem propriedades sequestradoras de radicais e são associadas a efeitos benéficos à saúde, embora haja ainda carência de informações acerca da exata estrutura molecular desses compostos, bem como de suas funções (NURSTEN, 2005). Os AGEs podem apresentar baixo ou alto peso molecular e,

embora não haja um claro limite entre esses dois grupos, assume-se que os AGEs de baixo peso molecular são derivados de aminas, peptídeos ou aminoácidos livres, enquanto os de alto peso molecular são derivados de proteínas (HENLE, 2003).

Figura 3 - Representação de alguns dos produtos de glicação avançada (AGEs)



Fonte: adaptado de ZHANG et al., 2009.

Nota: a decomposição do produto de Amadori ou a reação entre compostos carbonílicos ou dicarbonílicos com proteínas pode levar à formação dos produtos de glicação avançada (AGEs). Os AGEs incluem a N^ε-carboximetil lisina (CML), N^ε-carboxietil lisina (CEL), S-carboximetilcisteína (CMC), pirralina, ligação cruzada imidazol derivada da 3-deoxiglicose (DOGDIC), pentosidina, glicosepane, dímero de lisina glioxal (GOLD), *crosslines* e fluorolink

Embora inúmeros estudos tenham sido publicados com o objetivo de elucidar e descrever os possíveis produtos da reação gerados durante o processamento de alimentos ou sob condições fisiológicas, o número de compostos claramente identificados e quantificados permanece relativamente pequeno. O primeiro AGE detectado em alimentos foi a N^ε-carboximetilisina (CML). Na sequência, foi isolada a pirralina, a qual é formada a partir da reação entre o ε-amino grupo da lisina e a 3-DG e foi quantificada em alimentos como leite e pães (NAKAYAMA; HAYASE; KATO, 1980; HENLE et al., 1994). Dímeros resultantes da reação entre duas cadeias laterais de lisina e duas moléculas de GO, MGO ou 3-DG, denominados GOLD, MOLD ou DOLD, respectivamente, foram identificados em hidrolisados de pães, em conjunto com produtos de reação cruzada entre a arginina e a lisina denominados GODIC, MODIC, DODIC e glicosepan (BIEMEL et al., 2001). A pentosidina, inicialmente identificada em hidrolisados de colágeno humano, foi também encontrada em pequenas concentrações em diversos alimentos (HENLE; SCHWARSZENBOLZ; KLOSTERMEYER, 1997).

Além da lisina, a cadeia lateral guanidina da arginina é também alvo de modificações pelos compostos dicarbonílicos. A imidazolona, resultante da reação entre a arginina e o MGO foi quantificada em pães e café (HENLE et al., 1994). Em adição à imidazolona, a qual pode representar o principal produto derivado da arginina em alimentos, a agripimidina, produto formado da reação entre duas moléculas de MG e a cadeia lateral da arginina, foi detectada em cerveja (GLOMB; ROSCH; NAGARAJ, 2001).

Diversos outros produtos derivados de aminoácidos resultantes da reação de Maillard foram identificados em alimentos, mas não confiavelmente quantificados, como o ácido oxálico monolisinilamida (OMA) (HASENKOPF et al., 2001) e a aminoredutona (PISCHETSRIEDER; SCHROETER; SEVERIN, 1998). A propilimidazolona-ornitina (PIO) é proveniente especificamente da reação entre a arginina e C5-dicarbonílicos resultantes da degradação de produtos de dissacarídeos com 1,4-ligações glicosídicas (MAVRIC et al., 2004). Adicionalmente, Krause et al. (2004) demonstraram que grupamentos α- amino terminais de peptídeos são modificados por 1,2-dicarbonílicos a pirazinonas, uma classe de AGEs fluorescentes que podem representar uma importância quantitativa em alimentos processados contendo peptídeos, bem como *in vivo*.

Diferentes fatores influenciam a formação e a diversidade de produtos finais da reação, incluindo a disponibilidade de precursores, presença de metais de transição, disponibilidade de pró ou antioxidantes, pH, e no caso do processamento influenciam ainda o tempo, a temperatura e a disponibilidade de água dos alimentos (GOLDBERG et al., 2004). Alguns

produtos podem ser formados com altos rendimentos (acima de 30%) sob condições específicas, enquanto outros são formados em concentrações baixíssimas, na escala de partes por bilhão (ppb), mas podem ser essenciais para conferir propriedades de cor, sabor ou ações biológicas. Verificou-se que mudanças no potencial redox de um sistema modelo de reação de Maillard causadas pela formação de redutonas ou pelas condições oxidativas do meio são capazes de causar alterações na distribuição entre três importantes grupos de moléculas precursoras, as quais podem ser formadas a partir de α -hidroxicarbonílicos: α -dicarbonílicos, 2-(aminoácido)-carbonílicos e 2-aminocarbonílicos. Um outro intermediário da reação de Maillard, o composto acetilformoína, tem sido caracterizado como um indutor químico que direciona a formação de diferentes compostos dependendo da presença de aminas primárias ou secundárias como reagentes (YAYLAYAN et al., 2005). Acredita-se que existam outros indutores químicos envolvidos em diferentes vias, levando à formação de AGEs ou de produtos associados à cor ou aroma, podendo ser essenciais no controle de formação dos AGEs no alimento e preservando sua qualidade organoléptica, todavia esses compostos não foram ainda identificados (POULSEN et al., 2013).

Embora a reação de Maillard venha sendo intensivamente investigada desde sua descoberta, pouco se sabe a respeito da participação de radicais como intermediários, provavelmente devido às dificuldades analíticas inerentes, sendo necessária instrumentalização altamente especializada (RIZZI, 2003; POULSEN et al., 2013). Sabe-se, todavia, que o aumento do pH favorece as condições oxidativas e aumenta a participação de radicais na reação. A estrutura do aminoácido reagente possui, comparativamente, pequeno efeito na razão radical/íons, especialmente em alto pH, indicando que a produção de radicais depende principalmente da estrutura do açúcar redutor (CAMERER; KROH, 1996).

Monossacarídeos são mais susceptíveis à formação de radicais que dissacarídeos devido à limitação da clivagem das ligações glicosídicas desses últimos, podendo ainda se autoxidarem em condições fisiológicas, formando compostos dicarbonílicos reativos e peróxido de hidrogênio via intermediários reativos do oxigênio e de radicais centrados no carbono (WOLFF; CRABBE; THORNALLEY, 1984). Ressonância eletrônica foi utilizada para detectar os radicais formados pela incubação de gliceraldeído a 37 °C e pH 8.6, evidenciando a presença de hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) e radicais intermediários centrados no carbono ($\cdot\text{C}(\text{OH})\text{C}=\text{O}$) (RIZZI, 2003). GO é o produto dicarbonílico exclusivo da autooxidação da glicose e parece ser um intermediário-chave no escurecimento oxidativo e na ligação cruzada entre proteínas. A formação de MG e GO parece ocorrer através da fragmentação dos açúcares por um mecanismo envolvendo radicais, no entanto a contribuição quantitativa de

vias individuais na formação de compostos dicarbonílicos em alimentos é ainda desconhecida (WELLSKNECHT et al., 1995). Mas em um estudo, a degradação da lactose via lactulose a dicarbonílicos, durante o aquecimento do leite, demonstrou ser quantitativamente mais importante que a degradação do produto de Amadori lactosilisina (BERG; VANBOEKEL, 1994). Em contraste, a produção de 1-DG e de 3-DG aparentemente não envolve radicais, pois ocorre mais rapidamente em baixo pH e não é afetada pela presença de íons metálicos (LIEDKE; EICHNER, 2002).

Evidencia-se que a degradação dos compostos de Amadori é aumentada na presença de oxigênio molecular e de íons metálicos e que a fragmentação dos açúcares e as mudanças conformacionais em proteínas são dependentes de radicais hidroxilas produzidos através da autoxidação da glicose ou de processos relacionados. A via *Namiki* envolve a formação de radicais intermediários durante os estágios iniciais da reação de Maillard, anterior à formação dos produtos de Amadori, enquanto fortes sinais foram observados na ressonância de spin eletrônico em misturas contendo caseína-MG, albumina sérica-MG e metilamina-MG. Esses radicais foram identificados como cátions de N,N'-dialquilpirazinas e se originam de bases primárias de Schiff. A formação de radicais estáveis nos estágios iniciais da reação de Maillard tem sido intensivamente estudada, enquanto a possível interação de radicais intermediários de vida curta com produtos de fragmentação do açúcar ou as consequências da formação de H₂O₂ na presença de metais de transição, tais como Fe ou Cu é ainda pouco conhecida (HOFMANN; BORS; STETTMAIER, 1999; PETHIG; SZENTGYORGYI, 1977).

1.1.3 Moduladores da formação de AGEs

A compreensão mais aprofundada do papel dos radicais e de outros intermediários na formação dos AGEs, em alimentos ou em sistemas biológicos, pode indicar a base para a prevenção da formação desses produtos. O envolvimento de reações oxidativas com a participação de radicais na geração dos AGEs pode explicar os mecanismos fundamentais de ação dos inibidores. Os antioxidantes, por exemplo, podem proteger contra os danos estruturais causados pela exposição das proteínas à glicose sob condições oxidativas ao limitar a fragmentação do açúcar e a consequente formação dos intermediários altamente reativos GO e MG (HUNT; DEAN; WOLFF, 1988; OSAWA; KOTO, 2005).

Vários outros compostos naturais ou sintéticos têm sido investigados em relação à inibição ou reversão do processo de glicação. O objetivo principal é controlar a reação de Maillard e favorecer a formação de aroma e cor nos alimentos, enquanto previne a formação

dos AGEs em todos os sistemas. Uma variedade de agentes apresentam propriedades antiglicantes e podem atuar de diversas maneiras, incluindo a diminuição da absorção de AGEs, a inibição da formação de produtos de Amadori, a prevenção da progressão dos produtos de Amadori a AGEs, a diminuição do estresse oxidativo, a ligação e detoxificação de intermediários dicarbonílicos e a interrupção de vias bioquímicas capazes de causar impacto nos níveis de AGEs. Dentre esses agentes estão medicamentos, suplementos e terapias dietéticas (MONNIER, 2003; POULSEN et al., 2013).

Os medicamentos investigados incluem aminoguanidina, aspirina, OBP 9195, ALT-946, ALT-711, metformina e bloqueadores de receptor da angiotensina-II e, embora nenhum deles tenha sido ainda aprovado para indicação específica anti-AGE, alguns já se encontram em fases pré-clínica e clínica de testes (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN et al., 2006). A aminoguanidina possui um grupamento guanidina similar à arginina e atua como um *scavenger* de α -dicarbonílicos nos estágios iniciais da reação de Maillard, inibindo assim a formação de AGEs. Esse protótipo de inibidor demonstrou ser eficaz na melhora da proteinúria, da elasticidade dos vasos e na prevenção da retinopatia diabética, porém, alguns efeitos colaterais associados ao seu uso crônico, que incluem a maior incidência de glomerulonefrite e a deficiência da vitamina B6, têm exigido o esforço dos pesquisadores para estabelecer uma dosagem segura para sua utilização terapêutica em portadores de diabetes (GOLDIN et al., 2006; MCENIERY, 2006).

Em outra linha de investigações, a restrição dietética de AGEs tem emergido como uma estratégia viável por demonstrar efeitos benéficos em relação à arteriosclerose (LIN et al., 2003), uremia (URIBARRI et al., 2003), proliferação da íntima após angioplastia (LIN et al., 2002), sensibilidade à insulina (HOFMANN et al., 2002; SANDU et al., 2005), cicatrização de feridas (PEPPA et al., 2003) e à prevenção do diabetes do tipo 1 (PEPPA et al., 2003b) com a simples modificação dos métodos de preparo dos alimentos. Em um estudo envolvendo seres humanos, a restrição do consumo de alimentos fritos, grelhados ou assados, por períodos que variaram de 2 a 6 semanas, foi responsável pela diminuição significativa dos níveis séricos de AGEs e de mediadores inflamatórios envolvidos na angiopatia diabética (VLASSARA et al., 2002).

Outro aspecto que tem atraído o interesse dos pesquisadores é a presença de compostos que apresentam propriedades de antiglicação e/ou antioxidantes nos alimentos, os quais podem oferecer potencial terapêutico para os portadores de diabetes ou de outras patologias associadas ao acúmulo degenerativo de AGEs. Embora nenhum alimento ou componente alimentar seja ainda especificamente indicado como um redutor de AGEs *in vivo*,

algumas substâncias demonstraram efeitos anti-AGE importantes e merecem investigações adicionais, tais como piridoxamina (MONNIER, 2003; REDDY; BEYAZ, 2006), alilcisteína (um componente do extrato de alho) (AHMAD; AHMED, 2006), compostos fenólicos (BABU; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2006; LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; PARI; VENKATESWARAN, 2003; MUSTATA et al., 2005), vitaminas C e E (OSAWA; KATO, 2005), tiamina (BABAEI-JADIDI et al., 2003; STIRBAN et al., 2006), taurina (MCCARTY, 2005) e carnosina (HOBART et al., 2004).

1.2 A Formação Endógena e os Mecanismos de Ação dos AGEs

A formação endógena de AGEs ocorre em todos os tecidos e fluidos corporais sob condições fisiológicas, afetando predominantemente moléculas de meia-vida longa e exercendo importante função no processo natural do envelhecimento (AHMED, 2005). “Glicação” é o termo generalista da IUPAC para o fenômeno de adução de açúcares a outras biomoléculas e, havendo o envolvimento de proteínas na reação, esse termo é utilizado em oposição à glicosilação, que por sua vez compreende um processo que envolve a participação de enzimas e a formação de ligações glicosídicas. Frequentemente, os termos “glicação não enzimática” e “glicosilação enzimática” são utilizados para garantir maior distinção entre os fenômenos (ZHANG et al., 2009).

Enquanto a frutose e a lactose representam importantes açúcares redutores em alimentos, a glicose é o açúcar mais frequentemente presente e também o mais investigado em sistemas biológicos. Acreditava-se originalmente que os AGEs formavam-se, principalmente, a partir de reações não-enzimáticas entre a glicose e as proteínas extracelulares, porém, devido a maior reatividade dos precursores dicarbonílicos derivados do metabolismo da glicose gerados intracelularmente (GO, MGO e 3-DG), a alta concentração intracelular de glicose é considerada atualmente o evento iniciador primário da formação de AGEs endógenos (BROWNLEE, 2001, 2005).

A extensão de glicação de uma proteína alcança o estado de equilíbrio a depender da taxa de formação do produto de Amadori e da sua taxa de reversão ou conversão a outros produtos. A reação de reversão não enzimática produz glicose e manose, enquanto a reversão enzimática envolve a fosforilação do produto de Amadori, acompanhada de liberação de 3-DG. Em contraste, as reações de conversão são mais complexas e geram uma variada gama de compostos carbonílicos e dicarbonílicos, livres ou ligados à proteínas e envolvendo reações análogas às que ocorrem nos alimentos. Esses produtos de glicação intermediários podem

então reagir com outros grupamentos amino disponíveis para formar adutos e ligações cruzadas estáveis e irreversíveis, gerando assim os chamados produtos avançados da glicação, os AGEs (ZHANG et al., 2009).

Em adição ao processo de glicação de proteínas propriamente dito, outros mecanismos que contribuem para a formação de AGEs já foram identificados em condições fisiológicas, sendo eles a fragmentação da base de Schiff, a degradação da frutosamina, a formação de compostos α,β -dicarbonílicos formados da degradação de intermediários glicolíticos e da peroxidação lipídica (MONNIER, 2003). Deve-se ressaltar ainda, que durante algumas das reações que levam à formação de AGEs, espécies reativas do oxigênio (ROS) são geradas e concorrem paralelamente com o estresse oxidativo e com os danos estruturais e funcionais às macromoléculas (JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006; HIDALGO; ZAMORA, 2005).

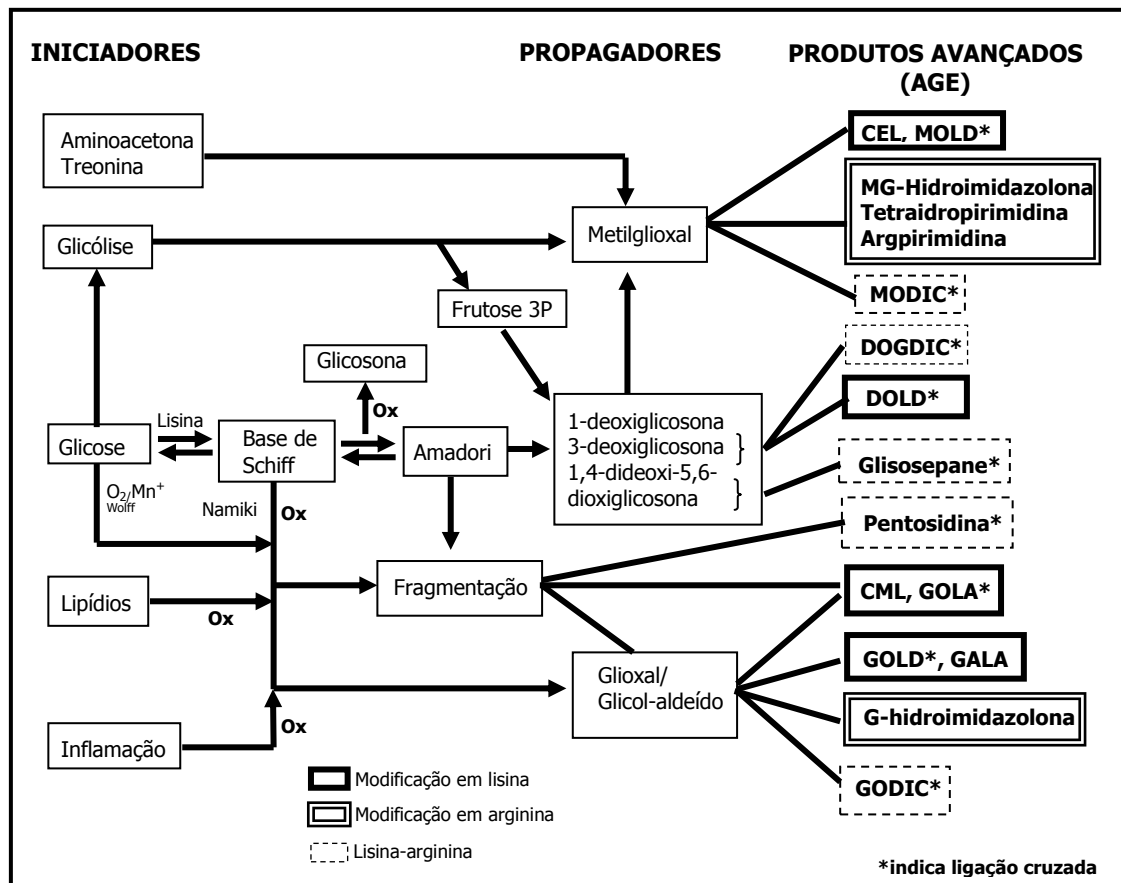
A formação de AGEs *in vivo* pode, adicionalmente, envolver neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais, após estímulo inflamatório, produzem mieloperoxidase e a enzima NADPH oxidase, que induzem a formação de AGEs através da oxidação de aminoácidos (figura 4) (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN et al., 2006).

Muitos dos AGEs encontrados em alimentos foram também identificados *in vivo*, incluindo as hidroimidazonas (derivados de MG, GO e 3-DG), a CML, a carboxietilisina (CEL), pirralina, MOLD, GOLD e DOLD, pentosidina e agripimidina (MONNIER, 2003). A proporção de glicação de resíduos de lisina e de arginina em proteínas nos sistemas biológicos está entre 0,01 a 1%. No entanto, os adutos de base de Schiff, frutosamina e AGEs em albumina sérica humana constituem aproximadamente 1 a 5%, 6 a 15% e 0,01 a 7%, respectivamente, podendo haver um percentual de glicação dos fosfolípidos ainda maior, entre 0,1 a 16%, (BAYNES; THORPE; MURTIASHAW, 1984; DAY; THORPE; BAYNES, 1979; THORNALLEY; LANGBORG; MINHAS, 1999).

O organismo possui mecanismos de defesa contra o acúmulo degenerativo de AGEs. Sistemas enzimáticos capazes de influenciar o *pool* endógeno de AGEs incluem a oxaldeído redutase e a aldose redutase, eficientes na detoxificação de intermediários dicarbonílicos reativos. Os sistemas enzimáticos glioxalase I e II, a frutosamina-3-quinase e a frutosamina oxidase (amadoriase) são também responsáveis por interromper reações de glicação em diferentes estágios (THORNALLEY, 2003). Destaca-se nesse contexto o sistema de defesa enzimático glioxalase, que previne a glicação via MG catalizada pela glutatona reduzida. Em condições fisiológicas, mais de 99% do MG formado é convertido a outros produtos menos prejudiciais, como o lactato, através desse sistema (RABBANI; THORNALLEY, 2012). Polimorfismos genéticos já foram identificados e associados ao comprometimento da ação do

sistema glicoxalase, estando fortemente implicados nas complicações do diabetes (PECULIS et al., 2013; WU et al., 2011a,b). Há também evidências de que, sob condições de excesso de AGEs como no diabetes, hiperlipidemia, insuficiência renal e em indivíduos que consomem uma dieta com alto conteúdo em AGEs, esses sistemas de defesa podem estar comprometidos ou serem superados (VLASSARA; PALACE, 2003).

Figura 4. Rotas relevantes de formação e produtos finais de glicação avançada (AGEs) *in vivo*.



Fonte: adaptado de MONNIER, 2003.

Nota: CML: carboximetil lisina; carboxietil lisina (CEL); DOGDIC: ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicose; DOLD: dímero de lisina e 3-deoxiglicose; GOLA: glioxal lisina amida; GOLD: dímero de glioxal-lisina, GALA: ácido glioxílico lisina amida; GODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de glioxal; MODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de metil glioxal; MOLD: dímero de metilglioxal-lisina.

A remoção dos AGEs formados nos componentes teciduais é realizada através da proteólise extracelular ou por células *scavengers*, como os macrófagos, que endocitam AGEs via receptores e, após a degradação intracelular, liberam na circulação AGE-peptídeos solúveis e de baixo peso molecular, para serem excretados com a urina (BIERHAUS et al., 1998). Dentre esses AGE-peptídeos, também denominados de “segunda geração de AGEs”,

pode haver intermediários altamente reativos, mas seus efeitos são limitados pela excreção renal (GUGLIUCCI; BENDAYAN,1996). Assim, a eficiência dos sistemas de remoção de AGEs depende, em última instância, da eficiência do *clearance* renal. A disfunção renal que ocorre em pacientes portadores de nefropatia, por exemplo, resulta em falha da remoção dos AGEs circulantes e contribui consideravelmente para as altas concentrações de AGEs séricos e teciduais encontradas nesses pacientes (NAKAMURA et al., 2003).

Adicionalmente, a lisozima, uma proteína com reconhecida propriedade antimicrobiana, possui alta afinidade por AGEs e é capaz de auxiliar na remoção desses compostos. Em estudos *in vivo* e *in vitro*, a lisozima demonstrou propriedades protetoras importantes, como a melhora da excreção renal e a diminuição das concentrações séricas de AGEs, além da supressão da ativação celular adversa mediada por AGEs (ZHENG et al., 2001).

Associados aos processos de formação/absorção e degradação/eliminação, fatores genéticos podem influenciar o metabolismo de AGEs nos indivíduos e, conseqüentemente, a predisposição para o desenvolvimento de patologias associadas a estes compostos como o diabetes, a aterosclerose, a artrite, a osteoporose e o mal de Alzheimer (LESLIE et al., 2003, TAKEUCHI; YAMAGISHI, 2004). Como exemplo, um polimorfismo do RAGE, um dos reconhecidos receptores de AGEs, foi associado a um leve efeito protetor quanto ao desenvolvimento de nefropatia em portadores de diabetes do tipo 1, sugerindo um importante impacto da expressão gênica no *pool* endógeno de AGEs (POIRIER et al., 2001).

Os AGEs podem causar efeitos prejudiciais ao metabolismo através de dois mecanismos básicos. O primeiro é a modificação da estrutura nativa de biomoléculas, destacadamente a alteração conformacional de proteínas intra e extracelulares e o segundo através da interação desses produtos com receptores sensíveis a AGEs, presentes em uma grande variedade de células, tais como as endoteliais, os monócitos, macrófagos, adipócitos e podócitos, induzindo o estresse oxidativo, a produção de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento, contribuindo assim para o surgimento e a progressão de diversas patologias (BROWNLEE, 2001; BIERHAUS et al., 1998; BROWNLEE, 2005).

Os AGEs formados intracelularmente podem alterar propriedades celulares importantes para a homeostase vascular. A modificação causada por AGEs ao fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), por exemplo, reduz em 70% a atividade mitogênica do citosol das células endoteliais (GOLDIN et al., 2006). Mais relevantes são as alterações genômicas que podem ocorrer após a interação entre AGEs e

nucleotídeos, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição do DNA celular (BROWNLEE, 2005).

As proteínas de meia-vida longa que constituem a matriz extracelular e as membranas basais vasculares são também susceptíveis à formação e ao acúmulo de AGEs. Além de reduzir a solubilidade e a digestibilidade enzimática, a formação de AGEs compromete a conformação geométrica dessas proteínas, causando anormalidades estruturais e funcionais permanentes. Há evidências de que a formação de ligações cruzadas entre AGEs e o colágeno do tipo I ou elastina conduz ao aumento na área da matriz extracelular, resultando no aumento da rigidez da vasculatura. A formação de AGEs na laminina compromete a reunião de seus polímeros, diminuindo assim sua interação com o colágeno do tipo IV e com o proteoglicano de heparan sulfato (BROWNLEE, 2005, GOLDIN et al., 2006).

Os AGEs não interferem apenas nas interações entre os componentes da matriz extracelular, mas também nas interações entre as células e a matriz. Um bom exemplo dessa interferência consiste na diminuição da adesão das células endoteliais devido às alterações causadas por AGEs nos domínios de ligações celulares do colágeno do tipo IV (BROWNLEE, 2001).

Dentre os mecanismos pelos quais os AGEs podem contribuir para o desenvolvimento e progressão de diversas patologias, a interação desses compostos com receptores presentes na superfície de diversos tipos celulares merece um papel de destaque. Desde as primeiras pesquisas sobre AGEs *in vivo*, especulou-se sobre a possível existência de um sistema de receptores para AGEs, responsável pela remoção desses produtos nos tecidos, limitando seus efeitos deletérios. Demonstrou-se, primeiramente, que as proteínas modificadas por AGEs eram reconhecidas por receptores que foram associados aos sistemas de receptores *scavenger*. Hoje, sabe-se da existência de um complexo sistema de reconhecimento de AGEs, que incluem o RAGE, a proteína 48 do complexo oligosacariltransferase (OST-48), também chamado AGE-R1, a proteína 80 K-H (ou AGE-R2), galectina-3(AGE-R3), em adição a alguns receptores do tipo *scavengers* (VLASSARA; PALACE, 2002; HAN; KIM; MOOK-JUNG, 2011; RAMASAMY et al., 2008).

Dentre a variedade de receptores de AGEs ou proteínas ligantes de AGEs reconhecidos na literatura, o receptor RAGE é provavelmente a molécula mais bem caracterizada (LIN, 2006, YONEKURA et al., 2005). O RAGE pertence à superfamília das imunoglobulinas de superfície celular, estando seu gene localizado no cromossomo 6 no complexo principal de histocompatibilidade entre os genes para as classes II e III. As regiões para o fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) e para a interleucina-6 (IL-6) estão localizadas

no gene promotor do RAGE, controlando a expressão desse receptor e associando o RAGE às respostas inflamatórias. O RAGE é minimamente expresso nos tecidos e na vasculatura sob condições fisiológicas. No entanto, sua expressão está aumentada em macrófagos, monócitos, células musculares lisas, células endoteliais e astrócitos sob condições de excesso de AGEs, um exemplo de feedback positivo (GOLDIN et al., 2006; LIN, 2006).

Estudos evidenciaram que a interação AGE-RAGE nas células endoteliais ativa a transcrição do NF- κ B, do fator ativador de proteína-1 (AP-1, *activator protein-1*) e da proteína 04 da família FOXO (*forkhead box protein 04*), levando ao subsequente aumento da expressão de seus genes alvos, como endotelina-1, moléculas de adesão vascular (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*), selectina E, fator tecidual, trombosmodulina, fator de crescimento endotelial (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) e de citocinas pró-inflamatórias que incluem a interleucina-1 α (IL-1 α), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), além do próprio RAGE. Especula-se também que o RAGE poderia exercer efeitos regulatórios supressores sobre as enzimas do sistema glicoxalase, levando à diminuição da proteção endógena contra a glicação causada pelo estresse carbonílico (GOLDIN et al., 2006; THORNALLEY, 2007; AN et al., 2011).

Há evidências que comprovam o envolvimento do RAGE no desenvolvimento de doenças como o diabetes e o Alzheimer (GOLDIN et al., 2006; WANG et al., 2013). Shoji et al. (2006) demonstraram, por exemplo, que a presença do RAGE é essencial para o comprometimento da resposta angiogênica no diabetes e que o bloqueio funcional desse receptor é capaz de restaurar a resposta angiogênica suprimida. Em um outro estudo, a inativação do gene para o RAGE em um modelo animal de nefropatia diabética resultou em uma supressão significativa das modificações renais características e evidenciou que o grau da injúria renal era proporcional à dosagem de genes para o RAGE (MYINT et al., 2006).

O RAGE apresenta ainda variantes e dentre elas está o RAGE solúvel (sRAGE), que consiste apenas do seu domínio extracelular e que, devido à sua estrutura, não é capaz de propagar eventos sinalizadores, mas sim contribuir para o reconhecimento e o *clearance* de AGEs (YAN; RAMASAMY; SCHMIDT, 2010)

Outros receptores, como os denominados AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3, e os receptores *scavenger* de macrófagos classe A tipos I e II, também são capazes de reconhecer e ligar-se a AGEs, mas não demonstraram qualquer atividade de transdução de sinal após a interação com AGEs. Ao contrário, eles também são associados ao *clearance* e a detoxificação desses compostos. O denominado CD36, um receptor *scavenger* da classe B, similarmente reconhece AGEs e está envolvido no *clearance* desses compostos da circulação,

mas exerce uma importante função na indução do estresse oxidativo na célula. Os AGEs também são reconhecidos pelos receptores *scavengers* classe E, para lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low density lipoprotein*) oxidada semelhante à lecitina-1 (LOX-1, *leptin-like oxidized LDL receptor-1*), fasciclina, domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor-like domain*) e tipo laminina (LE, *laminin-type epidermal growth factor-like domain*), FEEL-1 e FEEL-2 (*link domain-containing scavenger receptors-1,2*) (GOLDIN et al., 2006).

O AGE-R1, uma proteína transmembrana do tipo I, merece destaque por sua evidente função promotora do *turnover* de AGEs endógenos por mediar a captura, a degradação e a remoção desses compostos, além de regular negativamente os sinais induzidos pela interação AGE-RAGE, contribuindo assim para a defesa orgânica contra a toxicidade dos AGEs. Há evidências de que os níveis de expressão do AGE-R1 correlacionam-se positivamente com os níveis de outros mecanismos antioxidantes intracelulares, como a proteína desacetilase de sirtuína dependente de NAD-1 (SIRT1, *NAD dependent protein deacetylase sirtuin-1*), nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT, *nicotinamide phosphoribosyltransferase*), superóxido desmutase (SOD2, *superoxide dismutase 2*) e glutathiona (GSH, glutathion), e negativamente com vias prooxidativas, como RAGE e fosfato-oxidase de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH-oxidase). Assume-se assim, que o AGE-R1 seja um fator-chave para a homeostase orgânica e que uma supressão em seus níveis de expressão, como ocorre no diabetes, representa um sinal de comprometimento das defesas inatas dos indivíduos (VLASSARA; STRIKE, 2011).

Os níveis de AGEs e ROS regulam a expressão de ambos os receptores, RAGE e AGE-R1 e, conseqüentemente, das suas vias associadas, a fim de manter o balanço glicoxidativo nas células. Assim, episódios agudos de elevação dos AGEs podem causar o aumento na expressão de AGE-R1, bem como nos níveis do RAGE. No entanto, no diabetes ou na doença renal crônica, os níveis de RAGE permanecem altos, enquanto os níveis de AGE-R1 são suprimidos, mesmo com a intervenção terapêutica para o controle glicêmico (VLASSARA; URIBARRI, 2014).

O reconhecimento da efetiva interação, bem como a modulação das diferentes atividades exercidas pelos receptores de AGEs, constituem campos de grande interesse e debates entre os investigadores e têm sido associados a diversos fatores, como concentração de glicose, de insulina, de AGEs e de ROS. Nesse contexto, a caracterização molecular de receptores de AGEs, de suas organizações genômicas, bem como de seus polimorfismos genéticos, poderá contribuir para a melhor compreensão do envolvimento desses compostos

na patogênese de diversas doenças e, em última instância, para o desenvolvimento de terapias anti-AGEs (VLASSARA; PALACE, 2002; VLASSARA; URIBARRI, 2014).

1.3 A Alimentação como Fonte de AGEs

A dieta é considerada a principal fonte exógena de AGEs e, embora haja um importante corpo de evidências associando a ingestão desses compostos à promoção de diversas disfunções metabólicas que preocupam as autoridades de saúde em todo o mundo e que incluem a obesidade, as cardiopatias, o mal de Alzheimer, o diabetes e a síndrome metabólica, existem ainda muitas lacunas neste campo de pesquisa que suscitam debates e crescentes investigações envolvendo, especialmente, os mecanismos de absorção e biodisponibilidade dos AGEs dietéticos (CALDER et al., 2011).

Sabe-se claramente que a taxa de formação e a diversidade de AGEs nos alimentos dependem de vários fatores, sendo o tempo e temperatura de processamento, concentração de reagentes, disponibilidade de água e pH particularmente bem reconhecidos como fatores decisivos na taxa de reação do tipo Maillard (HENLE, 2003; GOLDBERG et al., 2004). Considerando-se o escurecimento como fator de avaliação da reação, verificou-se que 4 semanas a 20°C, 3 horas a 100°C e 5 minutos a 150°C conferem o mesmo resultado aos alimentos, evidenciando-se a importância das condições de processamento nesse contexto (LEDL; SCHLEICHER, 1990). O pH inicial e a capacidade tamponante do sistema influenciam a taxa e a direção das vias da reação de Maillard, prevendo-se baixas em pH ácido, as quais tendem a aumentar com o aumento do pH até alcançarem as máximas em torno do pH 10. Em relação à atividade de água, a reação é favorecida entre valores de 0,4 e 0,7, quando os reagentes apresentam boa mobilidade na fase aquosa, e inibida quando há altos níveis de umidade devido à diluição desses reagentes. Como a água é um dos produtos da reação, é provável que a lei de ação das massas também contribua para a diminuição da taxa de reação em condições de altas taxas de umidade (O'BRIEN; MORRISSEY, 1989).

Outra questão amplamente investigada e debatida diz respeito à relação entre as reações de peroxidação lipídica e as vias de formação de AGEs em alimentos. A reação de Maillard e a peroxidação lipídica seguem vias semelhantes e compartilham intermediários comuns, embora a química envolvendo os carboidratos possa ser oxidativa ou não, enquanto a degradação de lipídeos requeira invariavelmente condições oxidativas para formar intermediários reativos. Os produtos da oxidação lipídica são capazes de influenciar a reação de Maillard promovendo ou reagindo com seus intermediários, além de já haver o

reconhecimento de que a formação de produtos avançados da reação possa ser iniciada tanto por carboidratos ou lipídeos, sendo os produtos originados via lipoxidação também denominados de produtos da lipoxidação avançada (ou ALEs, do inglês *advanced lipoxidation endproducts*) (HIDALGO; ZAMORA, 2005).

Os lipídeos podem interagir na reação de Maillard através de seus grupamentos amino da cabeça polar de fosfolipídeos ou através de aldeídos resultantes da oxidação catalisada por metais de seus ácidos graxos insaturados (HIDALGO; ZAMORA, 2005). GO e MG podem ser originados através da oxidação lipídica e produtos como 4-hidroxi-nonenal e CML podem ser derivados tanto de lipoxidação ou de glicoxidação de proteínas. Além disso, produtos de glicoxidação podem acelerar a geração de radicais livres, resultando em estresse oxidativo e carbonílico, sendo esse último compreendido como as reações causadas por compostos dicarbonílicos em um sistema (VLASSARA; URIBARRI, 2004).

Quanto ao conteúdo dos produtos da reação de Maillard em alimentos, poucos AGEs têm sido confiavelmente identificados e quantificados em relação à imensa variedade de compostos que podem se formar, apesar do importante esforço dos pesquisadores da área e do reconhecido avanço tecnológico dos métodos de mensuração disponíveis, causando limitações no desenvolvimento de protocolos experimentais e clínicos, bem como na comparabilidade entre os diferentes estudos já desenvolvidos. À luz do conhecimento atual, afirma-se que o total de AGEs consumidos em uma dieta ocidental convencional seja quantitativamente maior que o total de AGEs presentes no plasma ou nos tecidos. Considerando-se o consumo médio de alimentos termicamente processados, tais como o leite, seus derivados e o café, estimou-se um consumo de 1.500 a 4.000 $\mu\text{mol}/\text{dia}$ de produtos de Amadori, calculado como frutossilina (FL), e de 100-300 $\mu\text{mol}/\text{dia}$ de AGEs, como a pirralina e a CML, baseando-se em métodos cromatográficos (Henle, 2003). Já a média geral de exposição aos AGEs dietéticos baseada em método de ELISA foi estimada em 16.000 kU AGE/dia em adultos norte americanos, alcançando a média de 20.000 kU/dia quando a dieta era rica em alimentos termicamente processados, grelhados e/ou fritos, especialmente os concentrados em açúcares (URIBARRI et al., 2005; URIBARRI et al., 2007). Em outro estudo, a exposição ao MG e à 3-DG foi estimada, respectivamente, entre 5 e 20 mg/dia e entre 20 e 160 mg/dia, através da mensuração por HPLC em fase reversa desses compostos em 173 itens alimentares (DEGEN; HELLWIG; HENLE, 2012). É importante destacar que as estimativas de ingestão de AGEs são normalmente baseadas em um único marcador ou, em raros casos, alguns poucos marcadores por estudo, embora haja uma considerável variação nos conteúdos de diferentes

AGEs dentre os alimentos. Assim sendo, os valores reportados são sempre estimativas do total de AGEs em exposição.

O interesse em identificar e quantificar o conteúdo em AGEs nos alimentos pode ser evidenciado através do vasto número de estudos que têm sido publicados com esse objetivo. Pesquisadores da Escola de Medicina Mount Sinai (EUA), por exemplo, investigaram o conteúdo em MG e CML utilizando método imunológico (ELISA) em 549 itens alimentares comumente consumidos pela população norte americana e, até o presente, este compreende o maior e mais abrangente banco de dados publicado sobre o conteúdo em AGEs em alimentos constituintes de uma dieta típica ocidental (GOLDBERG et al., 2004; URIBARRI et al., 2010). No geral, esses estudos verificaram que os conteúdos em CML reportados correlacionavam-se com níveis correspondentes de MG e que altos conteúdos em AGEs estavam presentes em carnes processadas, bem como em alimentos ricos em gorduras e proteínas. Verificou-se também que os alimentos pertencentes ao grupo dos cereais, como pães, bolos e biscoitos, apresentavam, surpreendentemente, menores conteúdos em AGEs quando comparados aos alimentos fontes de gorduras e de proteínas, como os óleos, manteigas, queijos e carnes, sugerindo uma importante influência das reações de oxidação lipídica sobre o conteúdo final de AGEs encontrados. Esses autores observaram também que fatores relativos ao processamento, como altas temperaturas e baixa umidade foram associados a maiores conteúdos em AGEs, enquanto tempo reduzido, alta umidade, baixas temperaturas e exposição ao meio ácido previamente ao processamento associaram-se com menores conteúdos em AGEs nas amostras analisadas.

Outro estudo conduzido por Assar et al. (2009), que utilizou um método cromatográfico acoplado à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) para investigar o conteúdo de CML em uma variedade de alimentos, como pães, carnes, queijos, leite, manteiga e óleos, encontrou, por sua vez, maiores níveis de CML nos itens que apresentavam maior conteúdo em carboidratos, em prejuízo àqueles fontes de proteínas e/ou gorduras, conforme as expectativas associadas à via clássica da reação de Maillard, lançando novos campos de debate e investigações sobre a mensuração confiável de AGEs em alimentos.

Diversos outros AGEs, além da CML, têm sido detectados em alimentos. As taxas de modificação da lisina encontradas variam entre 10 e 20% em média, mas podem alcançar até 70% durante o processamento do leite. Deve-se destacar, porém, que essas modificações compreendem, majoritariamente, a formação de produtos iniciais e intermediários da reação de Maillard, enquanto produtos avançados, como a CML, representam cerca de 3 a 10% das modificações encontradas em leite e outros alimentos. Outro fato importante compreende

a escassez de informações acerca de AGEs derivados da arginina em alimentos. Sabe-se, por exemplo, que o composto ornitinaimidazolinona, derivado da arginina, é encontrado em pequenas proporções em produtos lácteos, mas em maiores concentrações no café, já que até 30% da arginina é modificada à imidazolinona durante a sua torragem, podendo representar um marcador de AGEs mais útil nesse alimento do que a CML. Já outro derivado da arginina, a pentosidina, foi encontrada em baixa concentração no café torrado (5-10 mg/kg de proteína), mas em importante concentração (35 mg/kg de proteína) em cereais (HENLE et al., 1994; HENLE et al., 1997; POULSEN et al., 2013).

A pirralina, um pirrol ácido lábil derivado da lisina, tem sido quantificada em diversos alimentos, como leite e cereais, em concentrações que vão de 150 mg/kg de proteína em leite esterelizado a 3700 mg/kg de proteína em crosta de pão, indicando que a pirralina deve representar quantitativamente um dos principais AGEs em alimentos (HENLE, 2003).

Dados sobre o conteúdo em AGEs formadores de ligações cruzadas em alimentos são limitados devido aos desafios inerentes à hidrólise das proteínas modificadas e à preservação desses compostos para a mensuração. De qualquer forma, dímeros de lisina resultantes da reação entre duas lisinas em cadeias laterais e duas moléculas de GO, MG ou 3-DG, os denominados GOLD, MOLD ou DOLD, respectivamente, foram encontrados em hidrolisados de cereais, juntamente com produtos da interação das mesmas moléculas envolvendo arginina e lisina (GODIC, MODIC, DODIC). MODIC foi encontrado em concentrações de cerca de 150 mg/kg de proteína, enquanto GODIC e DODIC representaram concentrações entre 10 e 50 mg/kg de proteína em produtos derivados de cereais, como pães e bolos. As concentrações de MODIC e GODIC foram geralmente de 5 a 10 vezes maiores que os compostos MOLD e GOLD, sugerindo que os primeiros representam os principais compostos formadores de ligações cruzadas derivados de MG e GO, respectivamente, em proteínas alimentares (HENLE, 2003; BIEMEL et al., 2001). O composto 1,4-bis (5-amino-5-carboxi-1-pentil)pirazínio, denominado CROSSPY, foi encontrado em pães, cacau em pó e grãos de café, mas a sua estimativa de ingestão alimentar não foi ainda sugerida (LIEDKE; EICHNER, 2002).

Informações acerca de compostos dicarbonílicos reativos em alimentos são ainda mais desafiadoras e, portanto, mais escassas. Pequenas quantidades de MG e GO já foram encontradas em produtos fermentados, como iogurte, vinho e cerveja, enquanto mais altas concentrações de GO, MG E 3-DG foram descritas para bebidas carbonatadas adoçadas com xarope de frutose, sugerindo que o uso rotineiro desse aditivo alimentar na alimentação poderia contribuir importantemente com a ingestão de compostos dicarbonílicos precursores

de AGEs (MARCEAU; YAYLAYAN, 2009; WEIGEL; OPITZ; HENLE, 2004; LO et al., 2008). Adicionalmente, foram descritos recentemente os conteúdos de MG e 3-DG mensurados através de cromatografia líquida de fase reversa em uma variedade de alimentos (DEGEN; HELLWIG; HENLE, 2012).

1.3.1 Absorção e biodisponibilidade de AGEs dietéticos

Os estudos pioneiros no campo da reação de Maillard envolvendo animais já relatavam que seus produtos poderiam ser, ao menos em parte, absorvidos e que os produtos com menor peso molecular deveriam transpor a barreira intestinal mais facilmente que os de maior peso molecular (FINOT; MAGNENAT, 1981). Desde então, a absorção e a biodisponibilidade de produtos iniciais e intermediários da glicação, como a FL (FOERSTER; KUHE; HENLE, 2005; HULTSCH et al., 2006), frutose-leucina, frutosetriptofano (SGARBIERI et al., 1973) e lactulosilisina (SCHWENGER et al., 2006) têm sido mais intensamente investigadas. Estudos envolvendo os AGEs propriamente ditos são, no entanto, mais escassos. As primeiras investigações envolvendo os AGEs levaram à identificação da CML como um composto de origem exógena excretado na urina de ratos e, desde então, pesquisas com o objetivo de reconhecer e descrever a biodisponibilidade, o metabolismo e a excreção de CML e de outros AGEs têm sido desenvolvidas utilizando-se diferentes modelos animais e em humanos (LIARDON et al., 1987; POULSEN et al., 2013).

Sabe-se que os produtos de alto peso molecular apresentam taxas de absorção mais lentas e menos eficientes e que necessitam ser degradados por proteases intestinais, estando a biodisponibilidade desses produtos dependente dos seus peptídeos associados, do tipo da dieta ingerida, do ambiente intestinal e do tempo de permanência desses produtos no intestino. As alterações causadas pelo aquecimento às proteínas podem diminuir a susceptibilidade dessas à digestão enzimática gastrointestinal, podendo também afetar a liberação dos AGEs das proteínas termicamente desnaturadas (DELGADO-ANDRADE et al., 2011).

Um estudo que utilizou um método de ELISA para investigar a absorção de AGEs dietéticos em humanos estimou que cerca de 10% dos AGEs ingeridos com a dieta são absorvidos e que, da fração absorvida, cerca de 2/3 ficam retidos no organismo e apenas 1/3 é excretado pela urina, dentro de 48 horas, por indivíduos com função renal normal (KOSCHINSKY et al, 1997). Já a absorção de AGEs em ratos foi também verificada em taxa aproximada de 10% em 72 h, sendo o pico de absorção entre 6 e 12 h após a ingestão pelos animais de AGEs marcados com ^{14}C . Esses autores também observaram, curiosamente, que

grande parte dos AGEs absorvidos estavam ainda ligados a peptídeos (HE et al., 1999). Recente estudo que utilizou métodos cromatográficos para mensurar o conteúdo em CML como marcador de AGEs em refeições consumidas, sangue, urina e fezes de adolescentes confirmou que a absorção e a excreção fecal da CML são altamente influenciadas pela dieta, mas apontou a necessidade de investigações adicionais a fim de esclarecer mais detalhadamente os mecanismos de absorção, órgãos ou tecidos-alvo de acúmulo da CML, bem como o real impacto à saúde dessas glicotoxinas dietéticas (DELGADO-ANDRADE et al., 2012).

Sugere-se que a CML seja absorvida no epitélio intestinal através de difusão simples, mas verificou-se que CML, CEL e MG-H1 em dipeptídeos são carregados por transportadores de peptídeos, em especial pelo PEPT1 (GRUNWALD et al., 2006; HELLWIG et al., 2011), sendo esse também o sistema de absorção da pirralina (GEISSLER et al., 2010).

Em havendo a absorção intestinal, a distribuição e o destino metabólico dos AGEs é também amplamente desconhecida. Devido às propriedades anfotéricas e de solubilidade em água, infere-se que os AGEs de baixo peso molecular possam ser mais prontamente distribuídos aos compartimentos extra e intracelulares do que aqueles que apresentam alto peso molecular. A distribuição *in vivo* de CML e CEL após a injeção intravenosa em ratos demonstrou um acúmulo temporário no fígado dos animais, indicando a existência de uma provável afinidade desses produtos a algumas proteínas hepáticas específicas (BERGMANN et al., 2001). O estudo que empregou carbono marcado (^{14}C) e envolveu ratos verificou que 60% dos AGEs absorvidos encontravam-se no fígado e nos rins após 72h, embora radioatividade tenha sido detectada nos pulmões, coração e baço, indicando uma distribuição generalizada dos AGEs dietéticos em alguma extensão. A interação dos AGEs com os tecidos pareceu afetar mais importantemente as proteínas, desde que o soro dos animais tratados com AGEs foi capaz de interagir com peptídeos e proteínas testadas, levando à formação de agregados de alto peso molecular, indicando que apenas uma fração minoritária dos AGEs absorvidos estariam disponíveis para excreção, enquanto a maior fração desses produtos deveriam interagir não especificamente à proteínas orgânicas, em especial no fígado e rins. Porém, a natureza da provável afinidade dos AGEs a certas proteínas, bem como o *turnover* desses adutos não foram reportados (HE et al., 1999). De qualquer forma, pode-se concluir que as informações disponíveis atualmente à respeito da absorção, distribuição, metabolismo e excreção de AGEs dietéticos são ainda escassas, exigindo o especial esforço dos investigadores no sentido de desenvolver estudos com adequado protocolo experimental para a elucidação das inúmeras questões em aberto.

1.4 Métodos de mensuração de AGEs

Devido às evidências da implicação do acúmulo de AGEs, seja por vias de formação endógena ou por absorção de fontes exógenas, no desenvolvimento de complicações vasculares, renais e neurais, bem como no desencadeamento de doenças de base inflamatória e neurodegenerativas, a disponibilidade de técnicas analíticas confiáveis de detecção, quantificação e, em alguns casos, de avaliação da extensão da glicação das biomoléculas em diferentes matrizes representa um fator de primordial interesse para o avanço da ciência, embora ainda hoje compreenda um dos principais desafios para os pesquisadores desta área.

Em alimentos, uma característica primária da reação de Maillard compreende a formação de cor associada a alguns dos produtos finais. Assim, uma das formas mais simples ainda utilizada para avaliar o progresso da reação é através da mensuração da absorvância, transmissão ou reflectância da luz na região visível. In vivo, a formação da cor não representa uma característica ou sintoma importante, sendo uma alternativa a mensuração da fluorescência, que se desenvolve em estágio anterior ao desenvolvimento da cor. Diversos AGEs formadores de ligações cruzadas, como a pentosidina, os *crosslines* e a versperlisina são fluorescentes (ZHANG et al., 2009).

Todavia, embora a espectrofotometria de absorção e de fluorescência possam ser utilizadas para avaliar o curso da reação de Maillard, elas não especificam quais os produtos estão sendo formados. O acoplamento de métodos cromatográficos (cromatografia líquida – LC - ou gasosa – GC) a detectores relativamente não-específicos (fluorescência, no caso do LC e ionização por chama – DIC, no caso do GC) auxiliam na quantificação mais acurada de alguns compostos, como a FL, quando padrões autênticos são empregados. Já o acoplamento das técnicas cromatográficas à espectrometria de massas (MS), somada à utilização de padrões isótopos, permite que os compostos sejam quantificados com um alto grau de especificidade e sensibilidade (ZHANG et al., 2009).

A grande variedade de polaridades e de propriedades físicas dos AGEs torna os processos de purificação anterior às análises das amostras, bem como a retenção e a separação através da cromatografia, especialmente desafiadores. O ideal seria quantificar diversos, senão todos, os AGEs em corrida única, mas a maioria dos métodos já desenvolvidos focam em um único marcador. Há cerca de 20 anos os pesquisadores se empenham na identificação de compostos desta classe e já se pode afirmar que alguns deles

são claramente produtos da glicação, como a pirralina, a pentosidina e a glicosepana - possuem 5 ou 6 carbonos derivados exclusivamente de açúcares – enquanto outros, como a CML e a CEL são produzidos por múltiplas vias. A CML, por exemplo, pode ser formada através da clivagem de produtos de Amadori ou por reação do GO com resíduos de lisina das proteínas. A CML e a CEL também são formadas durante as reações de peroxidação lipídica e durante a autoxidação do ascorbato, justificando serem frequentemente descritos na literatura como AGEs/ALEs (POULSEN et al., 2013).

A CML foi o primeiro AGE a ser identificado em alimentos e, desde então, sua formação através de diversas vias químicas, sua presença também identificada em matrizes biológicas (tecidos ou fluidos), além de sua estabilidade em meio ácido necessário a protocolos que utilizam HCL para a hidrólise proteica fizeram da CML o composto de escolha em estudos em que um único produto é usado como marcador do total de AGEs de um sistema. Assim, a CML representa atualmente o produto majoritariamente investigado em protocolos que envolvam AGEs (AMES, 2008; ZHANG et al., 2009).

Os métodos de quantificação de AGEs podem ser basicamente caracterizados em instrumentais ou imunoquímicos. Os métodos instrumentais incluem a cromatografia líquida acoplada a diferentes detectores e os imunoquímicos compreendem primordialmente os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), não havendo ainda um único método confiável, que possibilite a mensuração de estruturas nos fluidos ou tecidos corporais e nos alimentos, de maneira sensível, específica, rápida e não muito dispendiosa. No geral, os métodos imunoquímicos são mais práticos e baratos, porém menos específicos e mais susceptíveis à interferência da matriz quando comparados aos métodos instrumentais, que por sua vez exigem uma maior soma de recursos materiais, além de recursos humanos altamente especializados (AMES, 2008).

Os resultados reportados na literatura são principalmente provenientes de estudos que utilizaram ELISA ou LC-MS/MS para a mensuração de AGEs, mas esses são dificilmente comparáveis por serem expressos em diferentes unidades de medida. Além disso, quando comparáveis, esses resultados têm sido conflitantes entre si, fato que sugere uma interferência dos métodos utilizados sobre os resultados observados, gerando questionamentos e debates entre os pesquisadores e comprometendo, inclusive, a confiabilidade dos achados (ASSAR et al, 2009; URIBARRI et al., 2010). Desta forma, faz-se necessário comparar os dados obtidos de amostras semelhantes analisadas por métodos analíticos diferentes, a fim de que essas diferenças sejam melhor esclarecidas e que os

métodos sejam aperfeiçoados, favorecendo assim o progresso da pesquisa na área.

Adicionalmente, a carência de informações na literatura sobre o conteúdo de AGEs em fórmulas nutricionais enterais e parenterais utilizadas no tratamento de pacientes em diversas condições patológicas e a possibilidade dessas fórmulas constituírem fontes desses compostos apoiam a implementação do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o conteúdo em N^ε-carboximetilisina, como um marcador de glicação avançada, em fórmulas nutricionais enterais e parenterais, através dos métodos de ELISA e LC-MS/MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar os métodos de análise da CML previamente validados para a aplicação às amostras objeto do presente estudo;
- Montar um banco de dados com o conteúdo em CML de fórmulas nutricionais especializadas utilizadas no tratamento de indivíduos em situações clínicas diversas;
- Realizar análise comparativa entre o conteúdo em CML das diferentes fórmulas nutricionais analisadas por método imunológico (ELISA) e instrumental (LC-MS/MS);
- Investigar possíveis influências dos métodos de análise sobre os conteúdos em CML encontrados;
- Verificar a possível influência da composição em nutrientes das formulações sobre seus conteúdos apresentados em CML;
- Comparar o conteúdo em CML de amostras semelhantes analisadas por métodos analíticos diferentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram utilizadas fórmulas dietéticas prontas para o uso e apresentando composição nutricional conhecida, gentilmente fornecidas pelo Centro Especializado de Nutrição (Cenutri) e pelo Centro de Nutrição Clínica e Experimental da Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg. As formulações parenterais foram preparadas em ambiente estéril e refrigerado (16 °C), conforme diretrizes nacionais e internacionais estabelecidas para a manipulação desses produtos, e mantidas sob congelamento (-20 °C) até o momento das análises. As formulações enterais industrializadas foram obtidas dentro dos seus prazos de validade e mantidas em suas embalagens originais de comercialização, sob condições recomendadas de estocagem (temperatura ambiente entre 20-24 °C, ao abrigo de luz direta e sem violação das embalagens), até o momento das análises. As formulações nutricionais em conjunto foram representativas dos principais produtos disponíveis no mercado para terapia nutricional e continham proporção em macronutrientes que variaram de 55 a 70% em carboidratos, representados por glicose (exclusiva nas soluções parenterais), maltodextrina, sacarose e/ou lactose, de 20 a 40% de lipídeos e de 15 a 20% de proteínas, representadas por aminoácidos (exclusivos nas soluções parenterais), caseínas e/ou proteínas do soro do leite, adicionadas de vitaminas e minerais.

Figura 5 - Amostras de dietas enterais comercialmente disponíveis para o uso em terapia nutricional



Fonte: domínio público; disponível em: <https://www.flickr.com/photos/nutricaoaoju das/5093464894/>. Acesso em: 26 de setembro. 2014.

Figura 6 - Preparo das soluções parenterais para o uso em terapia nutricional



Fonte: domínio público; disponível em: <http://www.hu.ufsc.br/setores/farmacia/nutricao-parenteral/>. Acesso em: 26 de setembro de 2014.

3.2 Análise da CML Através de ELISA

A CML foi analisada em 5 amostras de dietas parenterais e em 12 amostras de dietas enterais através de ensaio imunoenzimático competitivo baseado em anticorpos monoclonais anti-CML (*mouse monoclonal 4G9; Alteon Inc., Ramsey, NJ, USA*), desenvolvido e validado pela Microcoat Biotechnologie GmbH, para quantificar a CML em diferentes matrizes, tais como plasma, soro ou alimentos (figuras 7, 8, 9 e 10). As amostras foram homogeneizadas e diluídas em tampão do ensaio e os sobrenadantes foram testados para a CML utilizando anticorpo monoclonal anti-CML. O conteúdo de CML de cada formulação foi a média dos valores das duas mensurações por amostra expressa como unidades de CML por mililitro da dieta, calculada através de programa específico desenvolvido pela fabricante do kit.

Fig 7 - Kit de ELISA para a quantificação da CML em matrizes biológicas e alimentares



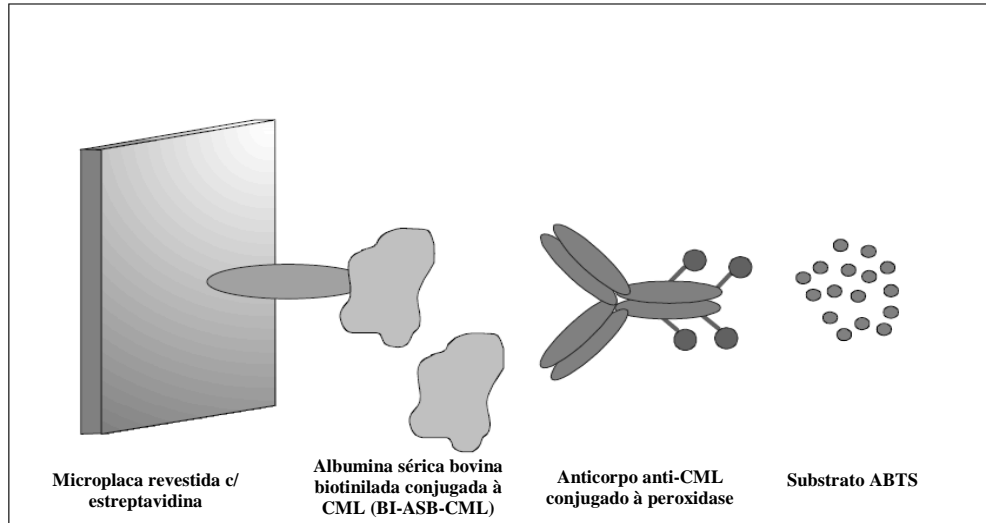
Fonte: imagem gentilmente cedida por Microcoat Biotechnologie GmbH

Quadro 1 - Descrição das etapas básicas do teste de ELISA da Microcoat GmbH para a quantificação da CML

Etapa	Descrição
1	Albumina sérica bovina biotinizada conjugada à CML (Bi-ASB-CML) interage com a superfície revestida com estreptavidina das microplacas. Bi-ASB-CML não ligadas são lavadas.
2	As amostras ou padrões são adicionados. O anticorpo anti-CML conjugado à peroxidase é adicionado. A CML ligada à placa e a CML presente na amostra ou na solução padrão competem pelo anticorpo. Os anticorpos não ligados são então lavados.
3	A peroxidase ligada é desenvolvida pelo substrato ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS)/perborato e determinado fotometricamente (referência de comprimento de onda a 492 nm).

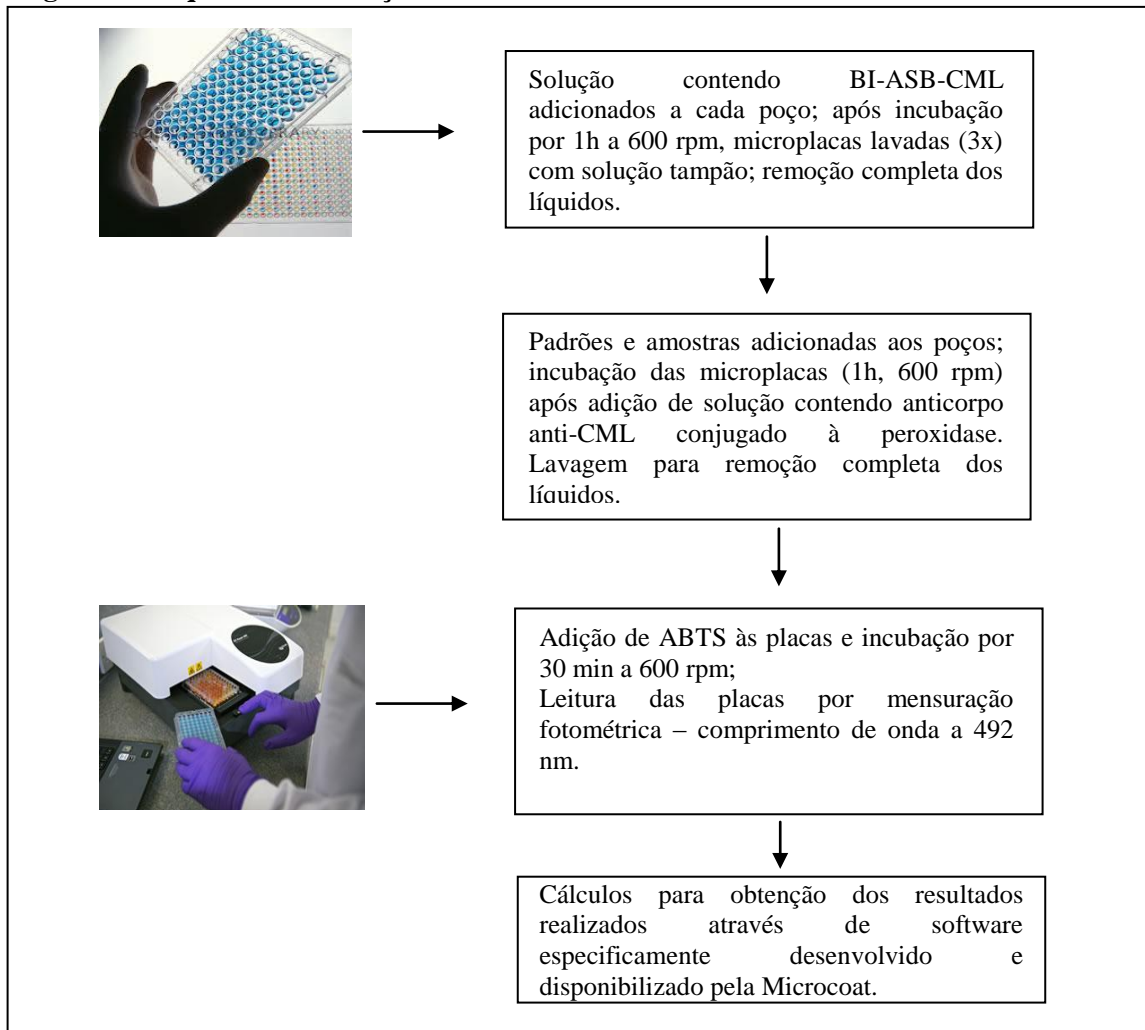
Fonte: autora, 2014.

Figura 8 - Visão geral do princípio do teste de ELISA para a determinação da CML nas amostras.



Fonte: imagem gentilmente cedida por Microcoat Biotechnologie GmbH.

Figura 9 - Esquema da execução das análises da CML através do teste de ELISA



Fonte: autora, 2014.

Nota: todos os equipamentos, materiais e reagentes necessários para a execução dos testes foram gentilmente cedidos pela Microcoat.

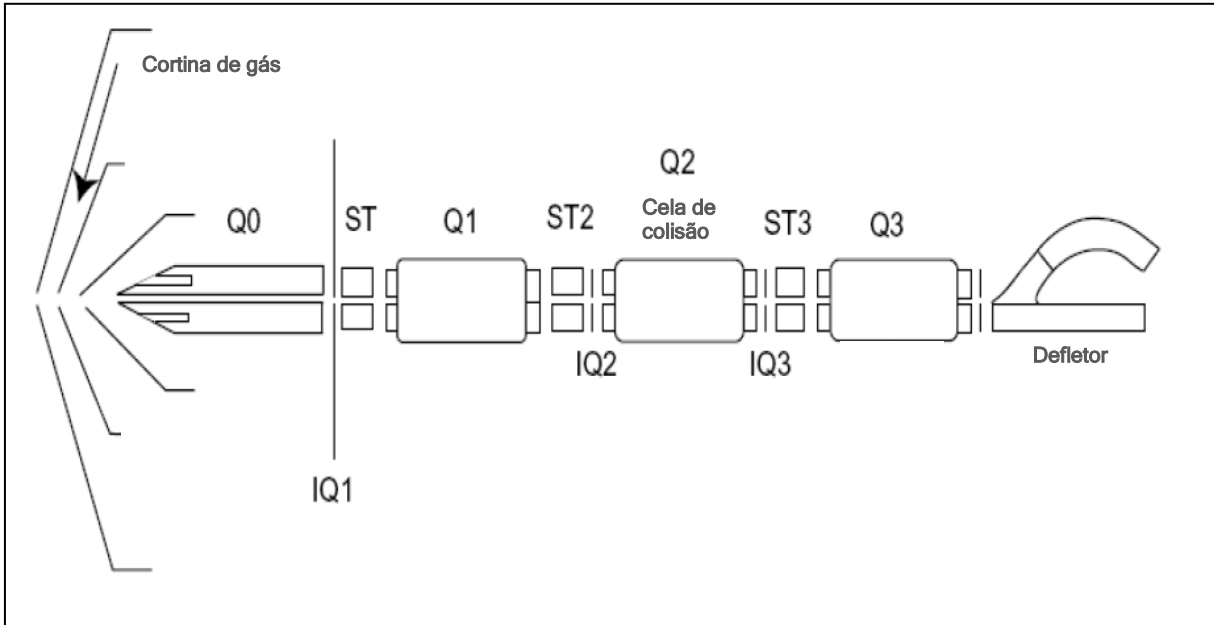
3.3 Análise da CML Através de LC-ESI-MS/MS

Ao todo, 17 fórmulas nutricionais enterais foram submetidas à análise da CML através de LC-ESI-MS/MS e todas as amostras foram preparadas em duplicatas completamente independentes, conforme o esquema apresentado na figura 13. A quantificação da CML foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido por Aldiab et al. (2011), no Laboratório de Farmácia e Química dos Alimentos da Universidade Friedrich-Alexander Erlangen-Nuremberg. As fórmulas líquidas (prontas ou reconstituídas conforme orientações do fabricante) foram desengorduradas através de do método desenvolvido por Bligh e Dyer (1959) e os açúcares e minerais removidos através de diálise contra água duplamente destilada por 24 horas a + 4 °C (membranas para diálise Carl Roth GmbH, limite de peso molecular - *cutoff* - de 3,5 kDa). A diálise foi seguida de liofilização e o resíduo da liofilização dissolvido em HCl (0,02 M). Uma alíquota de solução de pepsina (Sigma-Aldrich, Inc; 2 mg em HCl 0,02 M) foi adicionada à solução de proteínas, seguida por incubação a 37 °C em um termomisturador. Após 24 horas de incubação, a solução proteica foi tamponada utilizando-se solução a 2 M de acetato de amônio (NH₄Ac, pH 8.2) e hidrolisada por adição de solução de protease (Sigma-Aldrich, Inc; 2 mg/mL no tampão de NH₄Ac). O pH foi ajustado em 7.5 por solução de amônia (NH₃) a 5% e a amostra foi novamente incubada (24 h a 37 °C). A solução proteica foi então suplementada com aminopeptidase (Sigma-Aldrich, Inc; 4,1 µL) e novamente incubada (24 h a 37 °C). Após hidrólise enzimática, as enzimas foram separadas do hidrolisado proteico através de ultrafiltração (dispositivos para centrífuga Amicon ultra - 0,5, *cutoff* de 10kDa, por 10 min a 4 °C e 14400 RPM) seguida de liofilização. O resíduo seco foi então reconstituído em mistura água/acetona (50:50 v/v), filtrado e finalmente injetado (5 µl) para a mensuração da CML.

Os hidrolizados proteicos foram analisadas quanto ao conteúdo de CML em um equipamento AB Sciex QTrap 4000 equipado com uma fonte ionização eletroscópica (ESI, *electrospray ionization*, figura 11) em modo positivo de monitoramento multi-reações (MRM), acoplado a um cromatógrafo líquido de ultra performance Dionex Ultimate 3000. A CML foi cromatograficamente separada em uma coluna de cromatografia líquida de interação hidrofílica zwitteriônica (ZIC-HILIC – Merck, figura 12) e quantificada através da adição do padrão interno isotopicamente marcado (CML-d₂ Epsilon-N-carboxi[2H₂]metil-L-Lis; Polypeptide Group) e seu conteúdo expresso em µg de CML por mg de proteína. Para a determinação da CML nas amostras, seu escaneamento iônico foi executado e os três fragmentos mais intensos escolhidos para a quantificação, sendo o de maior intensidade

considerado o fragmento quantificador, associado a um dos fragmentos qualificadores (m/z 205.1 \rightarrow 84.1 ou 205.1 \rightarrow 130.1, figura 12). Os parâmetros do MS dependentes da CML e do fluxo do LC (figuras 13 e 14) foram previamente otimizados para a aquisição da melhor resolução para a CML. A aquisição dos dados foi executada em um tempo de escaneamento de 200 ms.

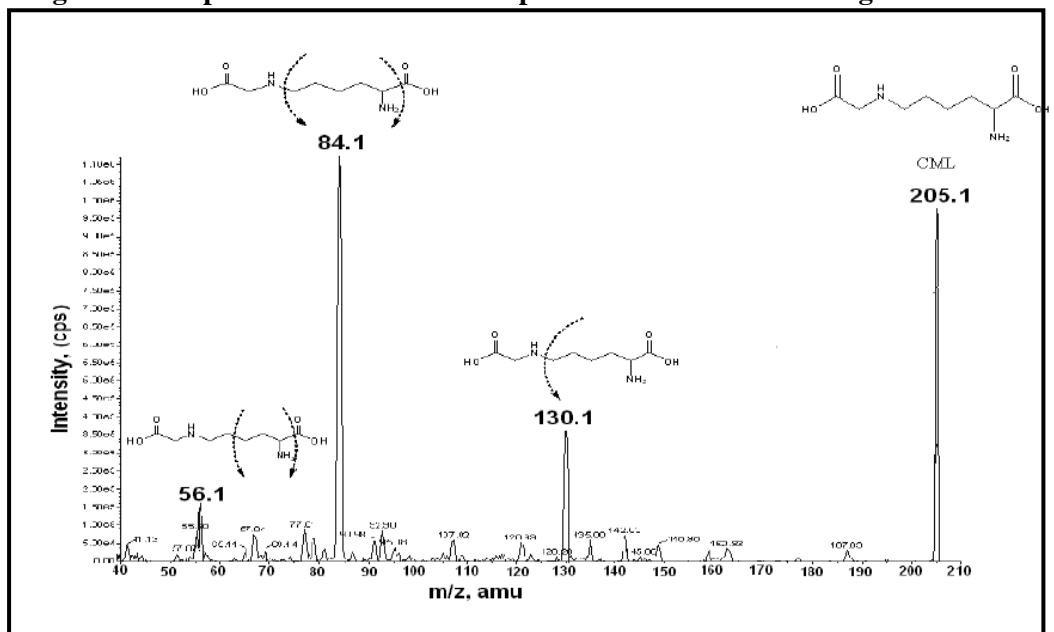
Figura 10 - Câmara a vácuo do sistema analisador de massas triplo quadrupolo



Fonte: manual API 400 QTRAP.

Nota: Q1 1º quadrupolo, Q2 cela de colisão, Q3 3º quadrupolo, ST, ST2 e ST3 lentes.

Figura 11 - Espectros de massas do íon produto da CML e seus fragmentos



Fonte: Aldiab et al., 2008.

Quadro 2 - Parâmetros do espectrômetro de massas (MS) dependentes da vazão do cromatógrafo líquido (LC)

Parâmetro	Descrição
GS1 (gás 1)	Controla o nebulizador de gás que ajuda a gerar pequenos <i>droplets</i> provenientes do mesmo fluxo.
GS2 (gás 2)	Controla o turbo gás que auxilia a evaporação dos <i>droplets</i> do spray e previne a entrada de solvente no instrumento.
Temperatura	Controla a temperatura do turbo gás, auxiliando a evaporar o solvente e produzir íons na fase gasosa.
Cur (cortina do fluxo de gás)	Controla a interface da cortina de gás, prevenindo a entrada de <i>doplets</i> e a contaminação do sistema.
IS (voltagem do spray iônico)	Controla a voltagem aplicada à agulha para ionizar a amostra.
CAD (gás de dissociação ativado por colisão)	Controla a pressão do gás na cela de colisão.
Ihe (aquecedor de interface)	Funciona como um interruptor (on/off) do aquecedor de interface, promovendo a maximização do sinal iônico.

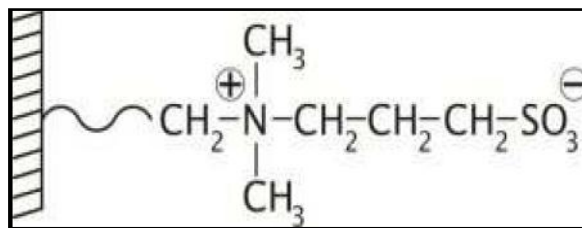
Fonte: autora, 2014.

Quadro 3 - Parâmetros do espectrômetro de massas (MS) dependentes do composto em análise

Parâmetro	Descrição
DP (potencial de desaglomeração)	Controla a diferença de potencial entre o orifício e a entrada; minimiza a aglomeração de íons na amostra.
EP (potencial de entrada)	Controla o potencial de entrada, o qual guia e foca os íons através da região Q0.
CE (energia de colisão)	Controla a energia de colisão recebida pelo íon precursor durante a aceleração para a cela de colisão.
CXP (potencial de saída da cela de colisão)	Controla o potencial de saída da cela de colisão e é usado para focar e acelerar os íons do Q2 ao Q3.

Fonte: autora, 2014.

Figura 12 - Grupo funcional da fase estacionária da coluna ZIC[®]-HILIC



Fonte: manual do fabricante ZIC[®]-HILIC (Merck)

A seguinte equação foi usada para determinar a concentração da CML nas amostras:

$Y = m \cdot x + b$, onde:

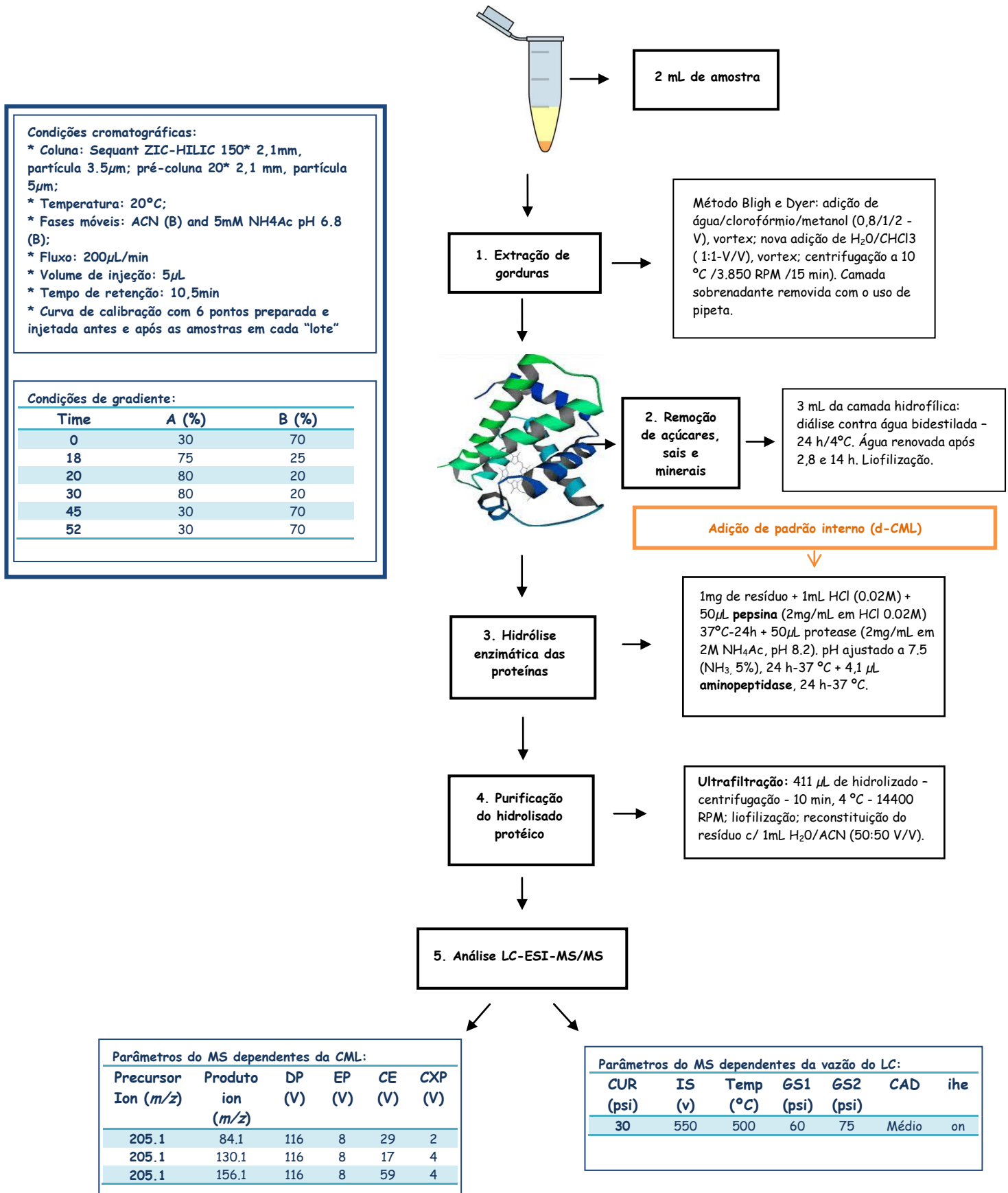
Y: sinal do analito (razão entre as áreas sob os picos dos fragmentos quantificadores para a CML/d-CML);

m = inclinação da curva de calibração

x = concentração do analito

b = ponto em que y intercepta a curva

Figura 13 - Esquema de análise da CML por LC-ESI-MS/MS

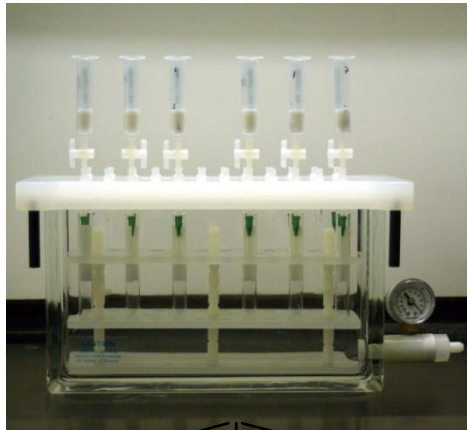


Fonte: autora, 2014.

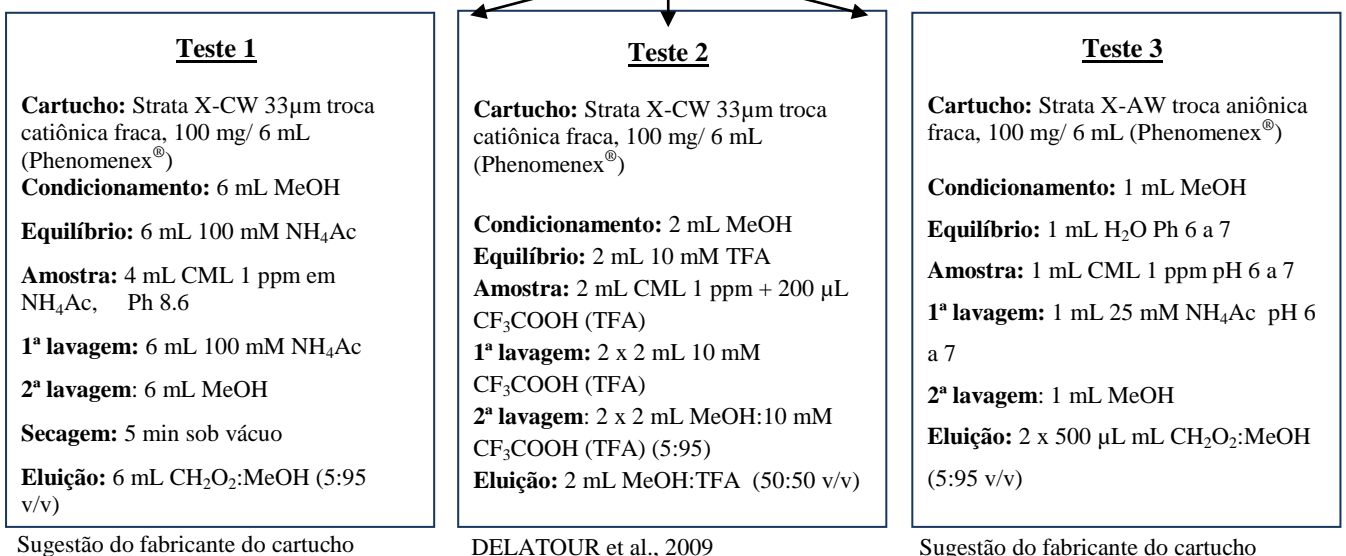
3.4 Testes de Extração da CML em Fase Sólida (SPE)

Com o objetivo de estabelecer um método alternativo de purificação das amostras para a injeção no LC-ESI-MS/MS, testes de extração da CML em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) foram executados, utilizando-se de diferentes princípios de retenção e de soluções contendo o padrão CML (Epsilon-N-carboxymethyl-L-lysine, Polypeptide Group). Basicamente, os cartuchos foram inseridos na câmara e tubos posicionados sob os cartuchos para a coleta dos eluatos (figura 14). Uma porta de vácuo contendo um medidor foi usado para controlar o vácuo aplicado ao compartimento. Os cartuchos foram então condicionados, equilibrados, carregados com solução contendo o padrão CML, lavados para a remoção de possíveis substâncias interferentes e, enfim, deu-se a eluição da possível CML retida. Em seguida, as soluções de lavagem e eluição foram analisadas quanto ao conteúdo em CML através do LC-ESI-MS/MS.

Figura 14 - Câmara para a extração por fase sólida aparelhada com cartuchos



Fonte: autora, 2014.



3.5 Testes de Investigação da CML durante o Preparo de Amostras para o LC-ESI-MS/MS

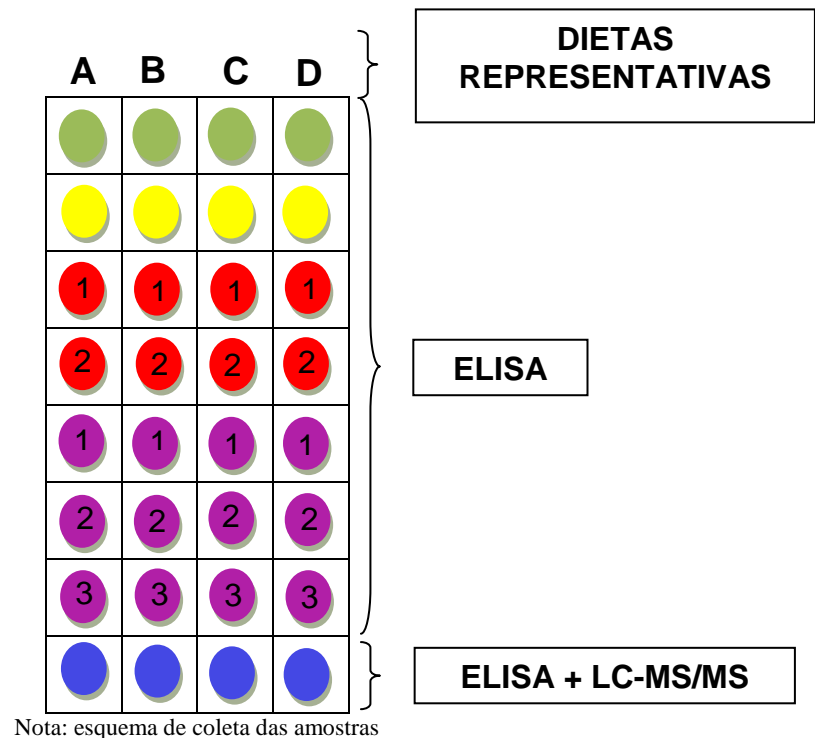
Com o objetivo de investigar o comportamento da CML durante seu processo de extração das amostras para a injeção no LC-MS/MS, foram coletadas alíquotas de um grupo representativo de amostras de fórmulas enterais (n = 4) ao final de cada etapa do protocolo estabelecido e analisadas em duplicatas quanto ao conteúdo em CML através do teste de ELISA supracitado (anti-CML, Microcoat GmbH), obedecendo ao esquema apresentado no quadro 4. Esta investigação foi replicada em três diferentes momentos, sendo os resultados do último conjunto de amostras assumidos como definitivos.

Quadro 4 - Esquema de coleta de alíquotas durante o protocolo de purificação das amostras

Etapa do protocolo	Descrição	Alíquota coletada ^a
Amostras originais^b	Dieta sem tratamento/diluição	1 mL
Etapa 1^c	Amostras após a extração lipídica	1 mL
Etapa 2 (1)^d	Amostras após diálise	1 mL
Etapa 2 (2)	Amostras após diálise + liofilização	1 mg
Etapa 3 (1)	Amostras após digestão por pepsina	100 µL
Etapa 3 (2)	Amostras após digestão por protease	100 µL
Etapa 3 (3)	Amostras após digestão por aminopeptidase	100 µL
Etapa 4^e	Amostras após ultrafiltração	100 µL

Fonte: autora, 2014.

Nota: **a.** As alíquotas coletadas foram submetidas ao teste de ELISA para a determinação da CML; **b.** Dietas líquidas enterais; **c.** Nesta etapa, as amostras ainda continham os componentes hidrofílicos, como os açúcares; **d.** A partir desta etapa, as amostras continham apenas a fração proteica; **e.** Ao final do protocolo, as amostras foram submetidas ao teste de ELISA e à análise através do LC-MS/MS.



3.6 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para verificar se existe associação entre as variáveis foi realizada análise de correlação de Pearson. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Genes (Cruz, 2013).

4 RESULTADOS

4.1 Conteúdo em CML das Dietas Enterais e Parenterais Analisadas Através de ELISA

A tabela 1 apresenta as características em macronutrientes das dietas parenterais, bem como seus conteúdos em CML, expressos em ng/mL de dieta, analisados através da técnica de ELISA. Verifica-se que todas as parenterais investigadas neste estudo apresentaram conteúdos detectáveis de CML, que variaram de $529,9 \pm 33,47$ a $1948,88 \pm 3,68$ ng de CML/mL de amostra. Adicionalmente, a análise dos coeficientes de Pearson realizada para este grupo apresentou correlações lineares positivas muito fortes entre as variáveis CML e lipídeos (0,9259) e entre CML e carboidratos (0,9426), indicando uma significativa influência da composição em nutrientes das dietas sobre os conteúdos em CML encontrados através dessa técnica analítica. Verifica-se ainda que as formulações parenterais suplementadas com taurina apresentaram concentrações significativamente menores de CML quando comparadas às demais, enquanto as amostras suplementadas com glutamina, ácidos graxos ômega 3 (w-3) e ômega 6 (w-6) apresentaram os maiores conteúdos em CML encontrados ($p < 0,05$). Destaca-se a significativa diferença observada no conteúdo em CML das amostras suplementadas com taurina quando comparadas às amostras não suplementadas, mas de conteúdo em macronutrientes estatisticamente semelhantes.

Tabela 1 - Conteúdo em macronutrientes (aminoácidos, carboidratos e lipídeos)* e N^e-carboximetilisina (CML) das dietas parenterais analisadas por ELISA

Dietas parenterais	Características			
	Aminoácidos (g/100 mL)	Carboidratos (g/100 mL)	Lipídeos (g/100 mL)	CML (ng/mL de amostra)
parenteral + taurina	2,21	1,85	7,16	$614,13 \pm 12,4^c$
parenteral + c/ w-3,w-6 e glutamina	24,13	2,57	9,54	$1921,25 \pm 33,75^a$
parenteral + taurina	2,03	1,23	5,87	$529,9 \pm 33,47^c$
parenteral + w-3,w-6 e glutamina	24,25	2,76	8,74	$1948,88 \pm 3,68^a$
parenteral s/ suplementação	4,19	2,42	9,68	$1760,37 \pm 57,78^b$

Fonte: autora, 2014.

Nota: Os valores representam a média \pm desvio padrão de cada amostra ($n = 2$). Letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey, $p < 0,05$). * Composição nutricional fornecida pelos fabricantes.

A tabela 2 apresenta o conteúdo em CML das fórmulas enterais analisadas através da técnica de ELISA. Observam-se, similarmente às parenterais, níveis detectáveis de CML em

todas as amostras investigadas e em uma variação de $1076,91 \pm 76,87$ a $55950,71 \pm 1891,29$ ng CML/mL nas diferentes fórmulas. A análise da correlação de Pearson para este grupo também encontrou coeficientes lineares significativamente positivos entre CML e carboidratos (0,6057) e entre CML e lipídeos (0,5264), mas também entre CML e proteínas (0,6157).

Tabela 2 - Conteúdo em macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídeos)* e N^ε-carboximetilisina (CML) das dietas enterais analisadas por ELISA

Dietas enterais	Características			
	Proteínas (g/100 mL)	Carboidratos (g/100 mL)	Lipídeos (g/100 mL)	CML (ng/mL de amostra)
Dieta 1	2,5	12	4,4	$13253,32 \pm 253,64^c$
Dieta 2	4,9	12	3,8	$13388,52 \pm 1042,95^c$
Dieta 3	9,6	30	9,3	$55950,71 \pm 1891,29^a$
Dieta 4	6	18	6	$20876,87 \pm 421,85^c$
Dieta 5	6	18	6	$28401,45 \pm 34,03^b$
Dieta 6	10	14	3,5	$12210,16 \pm 46,13^e$
Dieta 7	7,5	22,5	3,3	$17755,64 \pm 294,4^d$
Dieta 8	2,6	10	5,4	$8495,05 \pm 116,46^f$
Dieta 9	8,8	19,2	5,6	$13182,39 \pm 268,48^e$
Dieta 10	4	26	8,9	$1458,32 \pm 80,26^g$
Dieta 11	2	8,1	3,5	$1440,46 \pm 45,04^g$
Dieta 12	2,5	14,6	3,5	$1076,91 \pm 76,87^g$

Fonte: autora, 2014.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de cada amostra (n = 2). Letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05). * Composição nutricional fornecida pelos fabricantes das fórmulas.

A análise da tabela 3 permite verificar que todas as formulações enterais submetidas ao protocolo de purificação e análise através do LC-ESI-MS/MS apresentaram conteúdos detectáveis de CML, embora algumas delas (O, P, e Q) tenham apresentado níveis extremamente baixos, praticamente negligenciáveis, de CML (0,053; 0,07 e 0,009 μ g CML/mg de proteína, respectivamente), evidenciando, concomitantemente, a alta sensibilidade dessa técnica analítica. Observa-se também uma variação quanto às médias dos conteúdos em CML apresentados (entre 0,09 e 0,503 μ g de CML/mg de proteína), havendo diversas diferenças significativas entre as amostras, porém a análise de coeficientes de Pearson realizada para este grupo não tenha evidenciado qualquer correlação significativa entre a CML e as variáveis “proteínas”, “lipídeos” ou “carboidratos” das formulações investigadas.

4.2 Conteúdo em CML das Dietas Enterais Analisadas Através de LC-ESI-MS/MS

Tabela 3 - Conteúdo em macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídeos)* e N^ε-carboximetilisina (CML) das dietas enterais analisadas por LC-ESI-MS/MS.

Dietas enterais	Características			
	Proteínas (g/100 mL)	Carboidratos (g/100 mL)	Lipídeos (g/100 mL)	CML (µg/mg PTN)
Dieta A	3,8	13,8	3,4	0,195 ± 0,007 ^b
Dieta B	4	12	3,9	0,154 ± 0,001 ^{b,c,d,e}
Dieta C	4	12	3,9	0,118 ± 0,005 ^{e,f}
Dieta D	3,3	13	4	0,164 ± 0,00 ^{b,c,d}
Dieta E	7,5	17	5,8	0,503 ± 0,011 ^a
Dieta F	3,3	13	4	0,464 ± 0,013 ^a
Dieta G	3,5	13,8	3,8	0,099 ± 0,006 ^{f,g}
Dieta H	2,6	10	5,4	0,186 ± 0,0 ^{b,c}
Dieta I	2,5	12	4,4	0,148 ± 0,007 ^{c,d,e}
Dieta J	2,5	18	6,7	0,125 ± 0,017 ^{d,e,f}
Dieta K	6	18	5,8	0,164 ± 0,022 ^{b,c,d}
Dieta L	5,5	12	3,3	0,178 ± 0,0 ^{b,c}
Dieta M	7,5	16	3,8	0,150 ± 0,0 ^{c,d,e}
Dieta N	6,3	14	4,9	0,093 ± 0,015 ^{f,g,h}
Dieta O	5,2	12	3,2	0,053 ± 0,013 ^h
Dieta P	4,3	11	4,2	0,07 ± 0,0 ^{g,h}
Dieta Q	3,6	14	3,4	0,009 ± 0,002 ⁱ

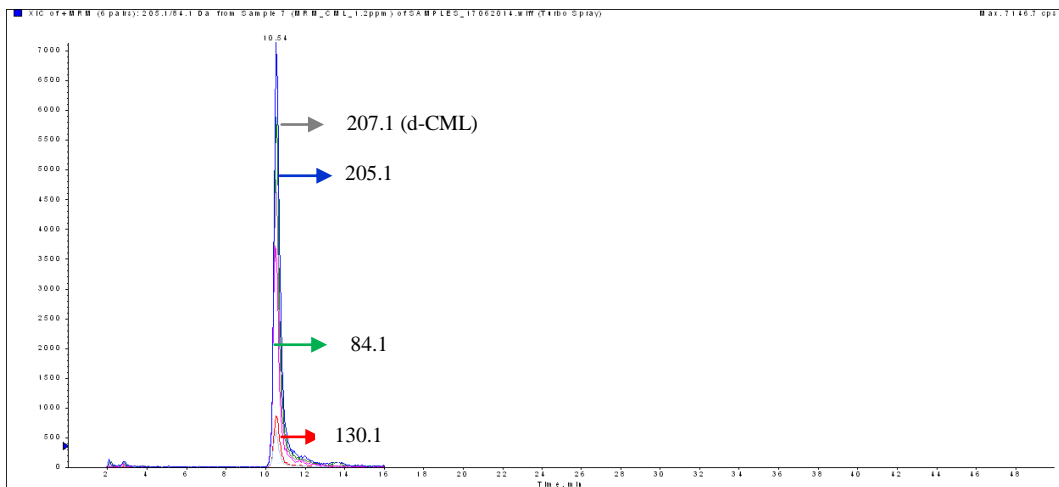
Fonte: autora.

Nota: os valores representam a média ± desvio padrão de cada amostra (n = 2). Letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05); * Composição nutricional fornecida pelos fabricantes das fórmulas; equação da curva de calibração: $y = 0,9758x + 0,0742$; $R^2 = 0,9998$.

A figura 15 apresenta o aspecto de um cromatograma obtido através da análise por LC-ESI-MS/MS em modo positivo de múltiplas reações (MRM) de uma solução contendo os padrões CML e d-CML, na concentração de 1.2 ppm, utilizada para a construção de uma das curvas de calibração dos experimentos e a figura 16 apresenta o aspecto de um cromatograma obtido, sob as mesmas condições analíticas, de uma das amostras em corrida subsequente. Verificam-se os parâmetros que identificam a CML e a d-CML (fragmentos CML m/z 205.1 → 84.1; m/z 205.1 → 130.1 e d-CML m/z 207.1 → 84.1; m/z 207.1 → 130.1), bem como o tempo de retenção de 10,5 min para a CML e a d-CML em ambos os cromatogramas, evidenciando também a presença da CML na amostra. No cromatograma da figura 16 é possível observar a presença de dois picos apresentando áreas menores e tempos de retenção anteriores aos padrões CML e d-CML, mas que apresentam os fragmentos qualificadores e quantificadores característicos da CML. Tais sinais não foram observados nos cromatogramas das soluções contendo os padrões, mas foram observados em todos os cromatogramas das

demais amostras e similarmente nos estudos de validação interna conduzidos por Aldiab et al. (2011). Investigações realizadas através do aumento da concentração da CML e/ou d-CML nas amostras (dados não apresentados) descartaram haver uma relação entre a ocorrência desses sinais e a presença da CML nas amostras, embora o significado desse achado não tenha sido esclarecido.

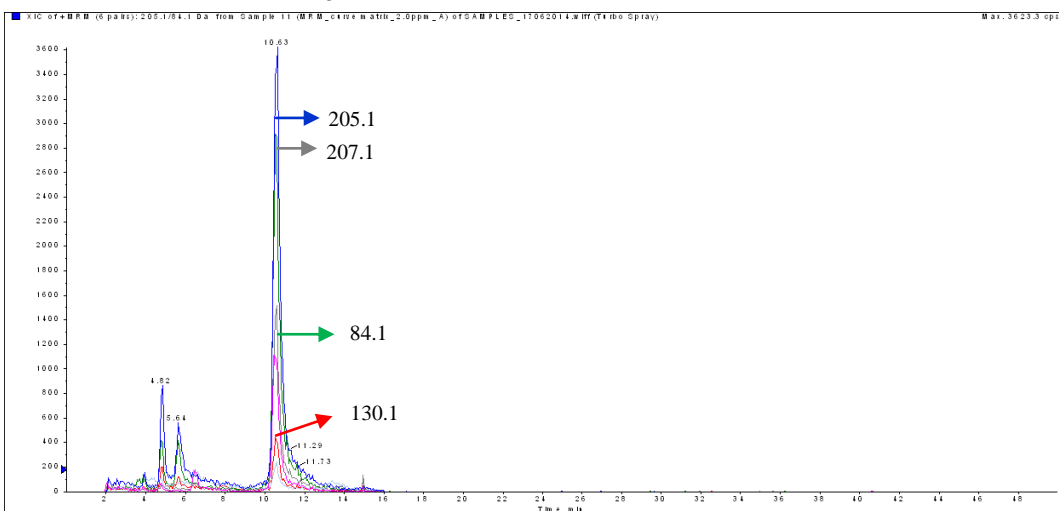
Figura 15 - Cromatograma de solução padrão (CML/d-CML)* obtido através do LC-ESI-MS/MS em modo positivo de monitoramento multi-reações (MRM)



Fonte: autora, 2014.

Nota: solução CML/d-CML 1.2 ppm (partes por milhão) em H₂O:ACN (50:50 v/v).

Figura 16 - Cromatograma de amostra de fórmula enteral*, evidenciando a presença da CML, obtido através do LC-ESI-MS/MS em modo positivo de monitoramento multi-reações (MRM)



Fonte: autora.

Nota: amostra após purificação e hidrólise proteica; resíduo seco final reconstituído em H₂O:ACN (50:50 v/v).

4.3 Recuperação da CML Através de SPE

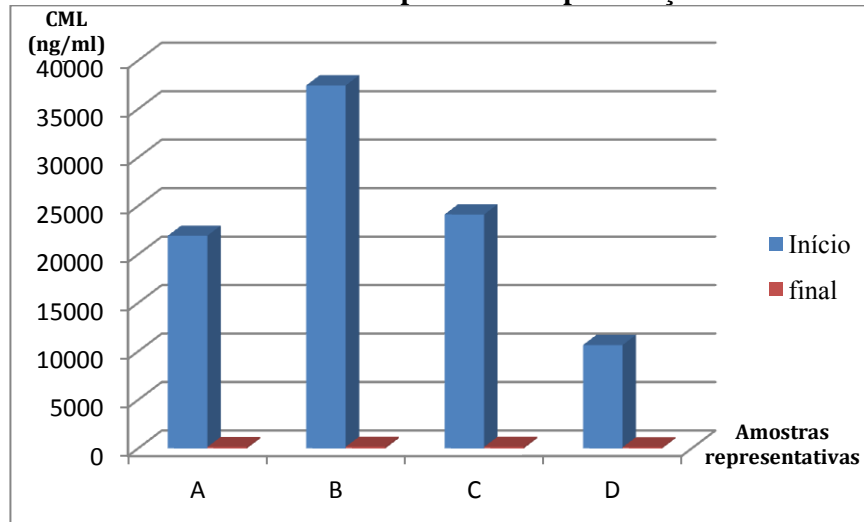
Os testes realizados para a adsorção da CML à fase estacionária dos cartuchos de SPE e a sua posterior eluição falharam em alcançar o objetivo de uma média de recuperação pretendida entre 70 a 80% da CML depositada. A taxa de recuperação alcançada variou entre os valores de 0 a 25%, havendo a completa perda da CML depositada na maioria dos testes realizados. As análises através do LC-MS/MS das soluções de lavagem e eluição utilizadas demonstrou que a CML não apresentou apropriada adsorção aos cartuchos em nenhum dos diferentes protocolos testados, tendo sido majoritariamente perdida ainda durante a etapa de lavagem dos cartuchos, anteriormente à eluição.

4.4 Resultados da investigação da CML durante o preparo das amostras para a injeção no LC-MS/MS

O gráfico da figura 17 representa as diferenças nos conteúdos em CML ao início e ao final do protocolo de purificação de um grupo representativo de amostras, mensurados através do teste de ELISA. Em percentuais, as perdas totais de CML representaram 99,63% para a amostra A (início: $21932,5 \pm 579,1$; final: 137 ± 12 ng CML/mL de amostra), 99,57% para a amostra B (início: $37433 \pm 1337,8$; final: $161,5 \pm 21$ ng CML/mL de amostra), 99,31% para C (início: 24126 ± 280 ; final: 148 ± 10 ng CML/mL de amostra) e 98,56% para D (início: $10656 \pm 46,7$; final: 153 ± 9 ng CML/mL de amostra). Os gráficos das figuras 18, 19 e 20 representam o desmembramento desses resultados, apresentando o impacto no conteúdo em CML das amostras após cada etapa do protocolo de limpeza. Observa-se que a extração lipídica foi a etapa responsável pelas maiores perdas proporcionais de CML quando comparada às demais etapas do preparo, embora todas as demais etapas de purificação investigadas tenham apresentado perdas variáveis da CML originalmente presente nas amostras. Os resultados referentes às etapas de hidrólise enzimática não estão representados devido às inconsistências numéricas observadas, possivelmente causadas pela presença das enzimas digestivas sobre a eficiência do teste de ELISA. Após a remoção das enzimas proteolíticas, os resultados apresentaram-se novamente viáveis e são assim apresentados no gráfico da figura 21. Nesse gráfico, é possível verificar que as amostras C e D apresentaram conteúdos em CML maiores após a etapa de ultrafiltração, ou seja, após a hidrólise enzimática e a remoção das enzimas proteolíticas, achado esse esperado para todas as amostras, desde que durante a etapa de digestão enzimática ocorre a proteólise e a consequente “liberação”

dos adutos de CML das proteínas. Sugere-se que a não observância de achado semelhante para as amostras A e B seja devido à perda mais importante da CML durante essa etapa do protocolo de purificação que a sua preservação nessas amostras.

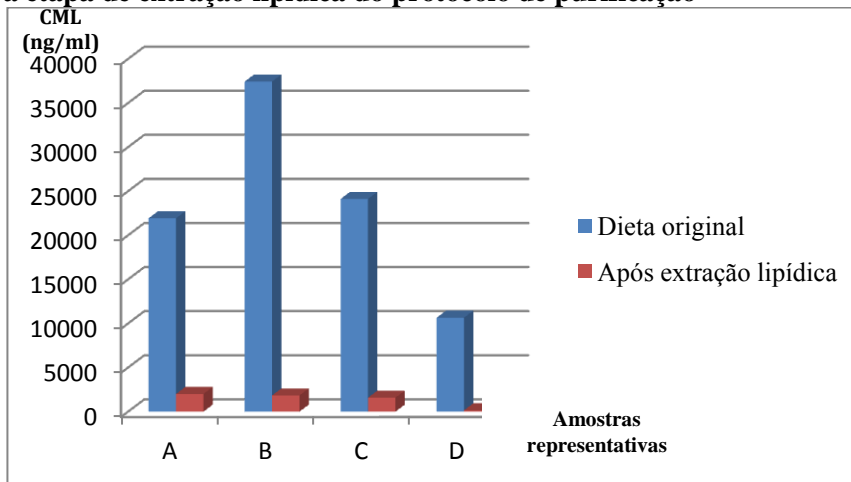
Figura 17 - Conteúdos em CML de um grupo representativo de amostras ao início e ao final do protocolo de purificação



Fonte: autora, 2014.

Resultados obtidos através do teste de ELISA anti-CML Início: fórmulas enteras originais; final: hidrolisados prontos para a injeção no LC-MSMS.

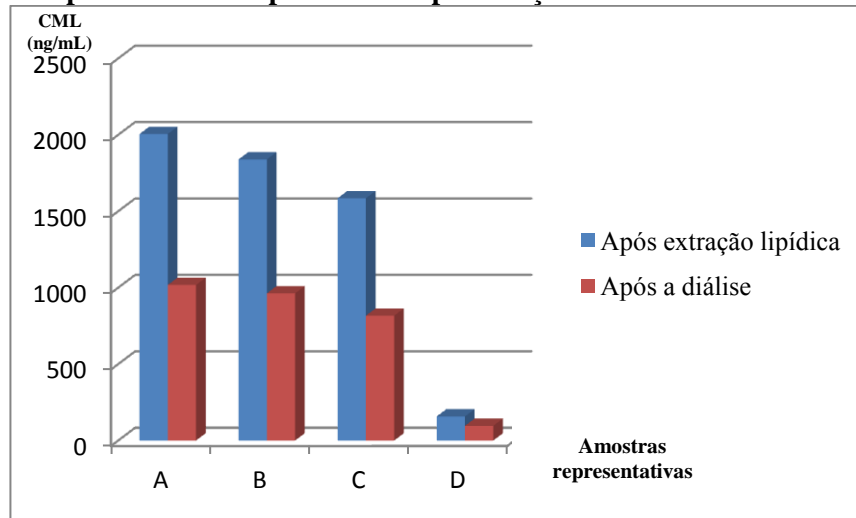
Figura 18 - Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa de extração lipídica do protocolo de purificação



Fonte: autora, 2014.

Resultados obtidos através do teste de ELISA anti-CML.

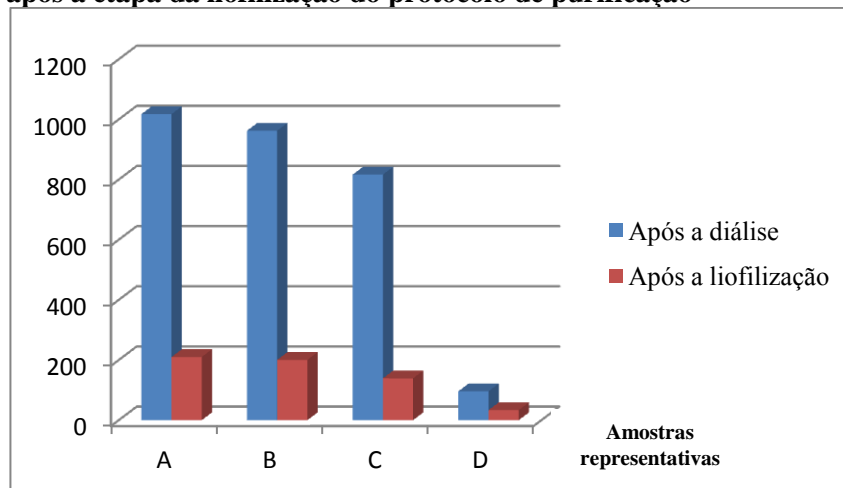
Figura 19 - Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa da diálise do protocolo de purificação



Fonte: autora, 2014.

Resultados obtidos através do teste de ELISA anti-CML.

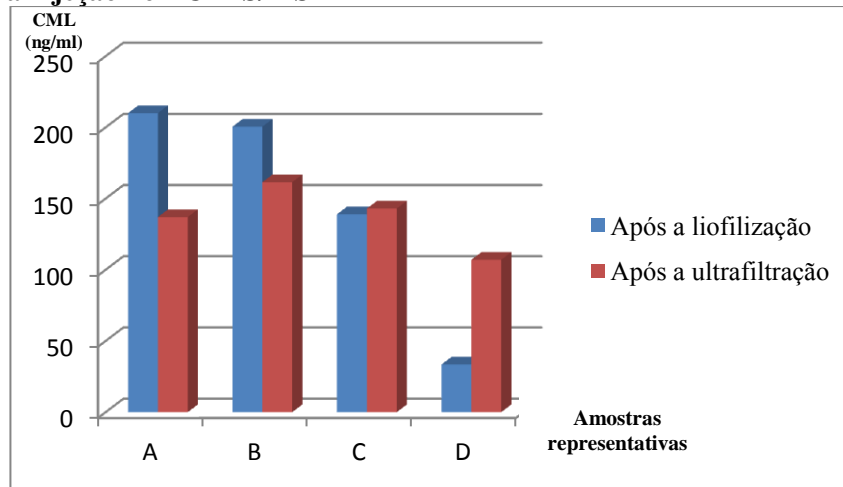
Figura 20 - Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa da liofilização do protocolo de purificação



Fonte: autora, 2014.

Resultados obtidos através do teste de ELISA anti-CML.

Figura 21 - Conteúdos em CML do grupo de amostras testadas após a etapa da ultrafiltração das amostras, imediatamente anterior à injeção no LC-MS/MS



Fonte: autora, 2014.

Resultados obtidos através do teste de ELISA anti-CML.

A tabela 4 apresenta os conteúdos em CML nas amostras de fórmulas enterais, mensurados através de ELISA, ao início e ao final do protocolo de extração e purificação da CML, enquanto a tabela 5 apresenta os resultados obtidos através das diferentes técnicas (ELISA e LC-ESI-MS/MS) para as mesmas amostras apenas ao final do referido protocolo.

Tabela 4 - Conteúdos em CML de um grupo representativo de amostras enterais, mensurados através de ELISA, ao início e ao final do protocolo de purificação

Amostras	ELISA Inicial (ng cml/mL amostra)	ELISA Final (ng cml/mL amostra)
A	21932,5 ± 579,12 ^c	137 ± 12,3 ^a
B	37433 ± 1337 ^f	161,5 ± 21,2 ^b
C	24126 ± 280 ^e	144 ± 10,0 ^a
D	10656 ± 46,7 ^d	153 ± 9,5 ^c

Fonte: autora, 2014.

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 2). Letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey, p < 0,05).

Tabela 5 - Conteúdos em CML de um grupo representativo de amostras enterais mensurados através de ELISA e LC-MS/MS ao final do protocolo de purificação

Amostras	ELISA Final¹ ($\mu\text{g CML/mg PTN}$)	LC-MS/MS ($\mu\text{g CML/mg PTN}$)
A	0,196 \pm 0,01 ^a	0,174 \pm 0,00 ^a
B	0,230 \pm 0,02 ^c	0,173 \pm 0,00 ^a
C	0,201 \pm 0,00 ^a	0,176 \pm 0,00 ^a
D	0,153 \pm 0,00 ^f	0,094 \pm 0,00 ^e

Fonte: autora, 2014.

Valores expressos em média \pm desvio padrão (n = 2). Letras diferentes representam diferenças significativas (Tukey, p < 0,05).

A análise desses resultados permite verificar a expressiva perda (p < 0,01) da CML durante o protocolo de limpeza das amostras anterior à análise através do LC-MS/MS. Observa-se ainda que, apesar dessa importante perda, o grupo representativo das amostras enterais preserva sua proporcionalidade quanto ao conteúdo em CML quando mensurada através da técnica de ELISA, ou seja, as amostras A e B permanecem no grupo intermediário quanto ao conteúdo em CML em relação à B (maior) e D (menor). Os resultados obtidos através do LC-MS/MS não apresentam essa mesma proporcionalidade (A, B e C estatisticamente similares), embora a amostra D permaneça apresentando o menor conteúdo em CML entre elas.

Adicionalmente, a análise dos coeficientes de Pearson desenvolvida para esses grupos apresentou uma correlação linear positiva apenas entre a CML obtida ao início do protocolo e a variável lipídeos das fórmulas originais (0,6258), evidenciando novamente a influência desse nutriente sobre os resultados para a CML observados através do teste de ELISA.

5 DISCUSSÃO

A mensuração de AGEs em diferentes matrizes, especialmente em matrizes complexas como as alimentares, constitui ainda hoje um importante desafio para a evolução do conhecimento no campo da reação de Maillard, o qual, por sua vez, cresceu exponencialmente em interesse nas últimas décadas, abrangendo diversas áreas, como as Ciências Biomédicas e as Farmacêuticas, além das originalmente associadas Nutrição e Engenharia de Alimentos.

O uso de técnicas mais confiáveis de análises, como a espectrometria de massa, para a identificação, quantificação e, em alguns casos, para a avaliação da extensão dos danos glicativos ou glicosidativos ocorridos em um sistema, poderá permitir, por exemplo, a prevenção ou tratamento de patologias associadas futuramente.

Na Engenharia de Alimentos, o maior conhecimento da complexa química da reação *do tipo* Maillard e das vias de formação dos seus produtos poderá favorecer o controle benéfico da formação de compostos responsáveis por conferir cor, sabor e aromas desejáveis, prevenindo em contrapartida a formação dos compostos potencialmente tóxicos à saúde humana.

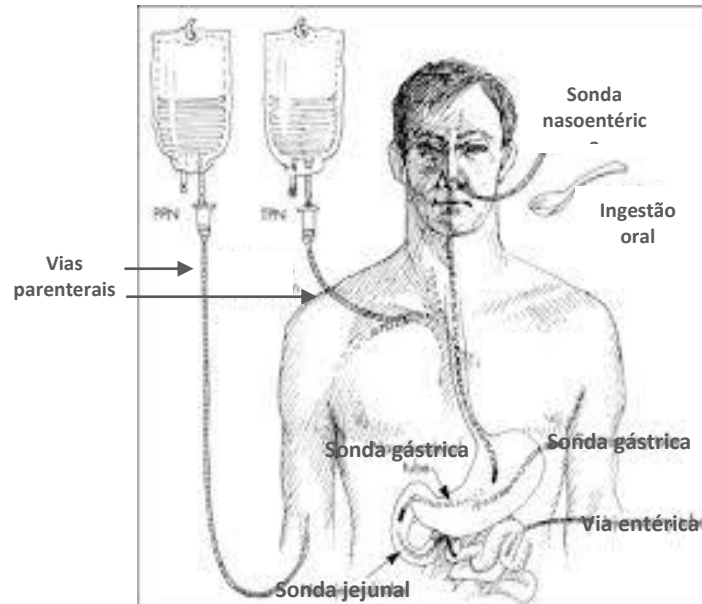
No presente estudo, foram aplicadas duas das técnicas analíticas mais comumente utilizadas para a determinação do conteúdo em AGEs de amostras alimentares, a fim de investigar possíveis influências das diferentes metodologias sobre os resultados observados, além de identificar prováveis vantagens e desvantagens de cada uma delas, podendo contribuir assim para o maior esclarecimento de algumas questões atualmente debatidas entre os pesquisadores da área e favorecer o futuro aprimoramento dessas técnicas.

Nesse sentido, os primeiros desafios identificados para a execução do estudo foram a adequação e a otimização dos protocolos previamente validados para a aplicação nas amostras alvos da presente investigação.

As chamadas fórmulas especializadas para o suporte nutricional são utilizadas em situações clínicas em que os indivíduos, por diversas razões, são incapazes de atender às suas necessidades nutricionais através da fisiológica ingestão oral. Assim, através da utilização de critérios clínicos, a equipe de saúde atesta a necessidade do uso e realiza a indicação da via de administração das referidas fórmulas, sendo a via parenteral utilizada nos casos de não funcionalidade ou contra-indicação do uso do trato gastrointestinal (TGI), enquanto as fórmulas enterais são indicadas para a administração através de sondas nasoentéricas ou gastrostomias (DEBUSK, 2010). Devido às peculiaridades dos diferentes processos nutritivos, as fórmulas enterais e parenterais são distintas em algumas de suas características de

composição (figura 22 e quadro 5).

Figura 22 - Ilustração das vias de alimentação oral, enteral e parenteral.



Fonte: domínio público; disponível em <http://www.ibecs.com.br/bases-para-a-prescricao-enteral-e-parenteral>. Acesso em 22 de setembro, 2014.

As dietas enterais podem apresentar seus nutrientes em estruturas mais complexas, como proteínas integrais (por ex. caseína, proteínas do soro do leite, proteína isolada da soja), açúcares como a lactose e a maltodextrina, além da possível presença de componentes como as fibras alimentares. Já as soluções parenterais, administradas através de cateteres venosos centrais ou periféricos, são necessariamente compostas por nutrientes em suas formas mais elementares, como aminoácidos e glicose (fonte exclusiva de carboidratos dessas formulações). O quadro 5 apresenta alguns exemplos de diferenças em composição entre as fórmulas enterais e parenterais em comparação com o leite.

Assim, o primeiro desafio deste estudo foi identificar o método ideal de tratamento das amostras, considerando suas características peculiares de composição, a fim de preservar ao máximo a CML possivelmente presente em suas formulações, removendo concomitantemente seus componentes potencialmente interferentes no sistema sensível de análise do LC-MS/MS (íons, açúcares, fibras, lipídeos, etc.). Desde que o protocolo de purificação das amostras estabelecido por Aldiab et al. (2011) prevê uma etapa de diálise para a remoção de moléculas inferiores a 3kDa, sua aplicação às amostras parenterais implicaria na perda dos seus

aminoácidos constituintes e, conseqüentemente, de toda a possível CML formada. Assim, a aplicação do protocolo de preparo das amostras descrito no tópico 3.3 deste trabalho foi prontamente descartada para o grupo de amostras parenterais, lançando o desafio da aplicação de uma técnica alternativa para a purificação dessas amostras.

Quadro 5 - Exemplos de composição nutricional de dieta enteral e parenteral *versus* leite

Dietas	Ingredientes	Proteínas (g/L)	Lipídeos (g/L)	Carboidratos (g/L)
Enteral x	Água, maltodextrina, óleos de peixe e de vegetais, proteínas de soja e leite, celulose, mix de vitaminas e minerais.	38	34	138
Enteral y	Água, maltodextrina, óleos de peixe e de vegetais, leite, vitaminas e minerais.	75	58	170
Enteral z	Água, caseínas, mix de óleos vegetais, maltodextrina, mix de fibras.	63	49	140
Parenteral 1	Aminoácidos, TCMs, TCLs, glicose e vitaminas.	42	50	150
Leite integral	Água, lactose, gordura, caseínas e proteínas do soro, vitaminas e minerais.	32	33	53

Fonte: autora, 2014.

Nota: informações fornecidas pelos fabricantes dos produtos.

Deve-se destacar que a CML encontra-se nos alimentos sob duas formas: livre ou ligada às proteínas (AMES, 2008). Assim, para a análise da CML através de técnicas cromatográficas é necessária a sua extração das proteínas. No protocolo aplicado neste estudo, utilizado também por diversos outros laboratórios com algumas adaptações metodológicas, toda a provável CML livre presente nas amostras é perdida. Nesse contexto, a técnica de extração em fase sólida (SPE), na qual se utilizam cartuchos com propriedades de adsorção do analito de interesse e sua subsequente eluição após remoção das substâncias interferentes, surgiu como uma estratégia interessante, prática e teoricamente viável, prevenindo, inclusive, a excessiva manipulação da amostra inerente ao protocolo estabelecido. A SPE é descrita em diversos estudos como método de purificação anterior à análise da CML, envolvendo inclusive amostras alimentares complexas, sendo executada rotineiramente após a etapa de hidrólise e “liberação” da CML das proteínas (HEGELE; BUETLER; DELATOUR, 2008; DELATOUR et al., 2009; TAREKE et al, 2013). No entanto, na presente investigação e em experiências anteriores descritas por Aldiab et al. (2011), todos os testes realizados com a

SPE falharam em seu objetivo de recuperar um percentual importante da CML depositada (>70%), inviabilizando assim o uso desta técnica para a necessária purificação das amostras anterior à injeção no LC-ESI-MS/MS e colocando em questionamento a reprodutibilidade e a comparabilidade de resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa.

Dessa forma e devido a não identificação de uma outra técnica metodologicamente viável para a análise das fórmulas parenterais através do LC-MS/MS neste estudo, estabeleceu-se a aplicação do protocolo desenvolvido por Aldiab et al. (2011) exclusivamente para as amostras enterais e a aplicação do teste de ELISA para as amostras parenterais e enterais.

Em protocolos convencionais de análise de AGEs em alimentos através de métodos instrumentais, a proteína é extraída da amostra utilizando-se diversos métodos, sendo os mais citados a precipitação da proteína em ácido tricloracético (TCA) a 20°C, a extração através do método de Folch ou a ultrafiltração. No entanto, durante a fase de otimização do protocolo de preparo das amostras neste estudo, nenhuma dessas técnicas mostrou-se satisfatória (dados não apresentados), estabelecendo-se finalmente a aplicação do método de extração lipídica desenvolvido por Bligh e Dyer (1959) e a subsequente remoção dos micronutrientes e açúcares através da diálise como o método de isolamento da proteína.

Outra questão debatida entre os pesquisadores da área diz respeito à técnica necessária para a hidrólise das proteínas após seu isolamento (AMES, 2008; DELATOUR, 2009; ASSAR, 2009). Uma solução a 6 M de HCl (24 h, 110°C) é uma técnica clássica, eficiente, prática e barata, descrita em diversos experimentos, no entanto tem sido relatada como desvantajosa devido a possibilidade de superestimar os resultados para a CML, desde que os produtos de Amadori intermediários da reação, como a frutossilisina, podem ser oxidados e convertidos a CML nas amostras submetidas a essa técnica. Alguns autores sugerem a adição de boroidreto de sódio (NaBH_4) às amostras, anterior à etapa da hidrólise, a fim de prevenir esse fenômeno, todavia esses procedimentos devem ser avaliados com cautela (POULSEN et al., 2013).

Uma alternativa à hidrólise ácida compreende a hidrólise enzimática empregada neste estudo. O coquetel enzimático, sugerido por Schmitz et al. (1976), utiliza uma combinação de endo e exopeptidases em condições menos drásticas e foi previamente otimizado por Aldiab et al. (2011) com o objetivo de alcançar a maior extensão de clivagem das ligações peptídicas, e, portanto, a máxima liberação da CML, prevenindo concomitantemente a formação de artefatos de CML durante a manipulação das amostras.

A investigação sobre o comportamento da CML durante o protocolo de manipulação

da amostra desenvolvida no presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto de cada tratamento dado às amostras sobre seus conteúdos em CML, além de permitir a comparação entre as diferentes técnicas de mensuração aplicadas às amostras semelhantes em composição e tratamento. Considerando que o protocolo desenvolvido por Aldiab et al. (2011) e otimizado para a aplicação às atuais amostras obedece às regras gerais convencionadas para esta categoria de análise, infere-se que os resultados encontrados neste estudo podem implicar em resultados semelhantes aos diferentes grupos que desenvolvem investigações com a mesma finalidade.

A expressiva perda da CML verificada durante o preparo das amostras anterior às análises no LC-MS/MS compromete a confiabilidade dos resultados obtidos através dessa técnica e impõe um questionamento adicional ao já complexo cenário metodológico envolvendo os AGEs e exigirá maiores esforços para o esclarecimento dos possíveis fatores associados.

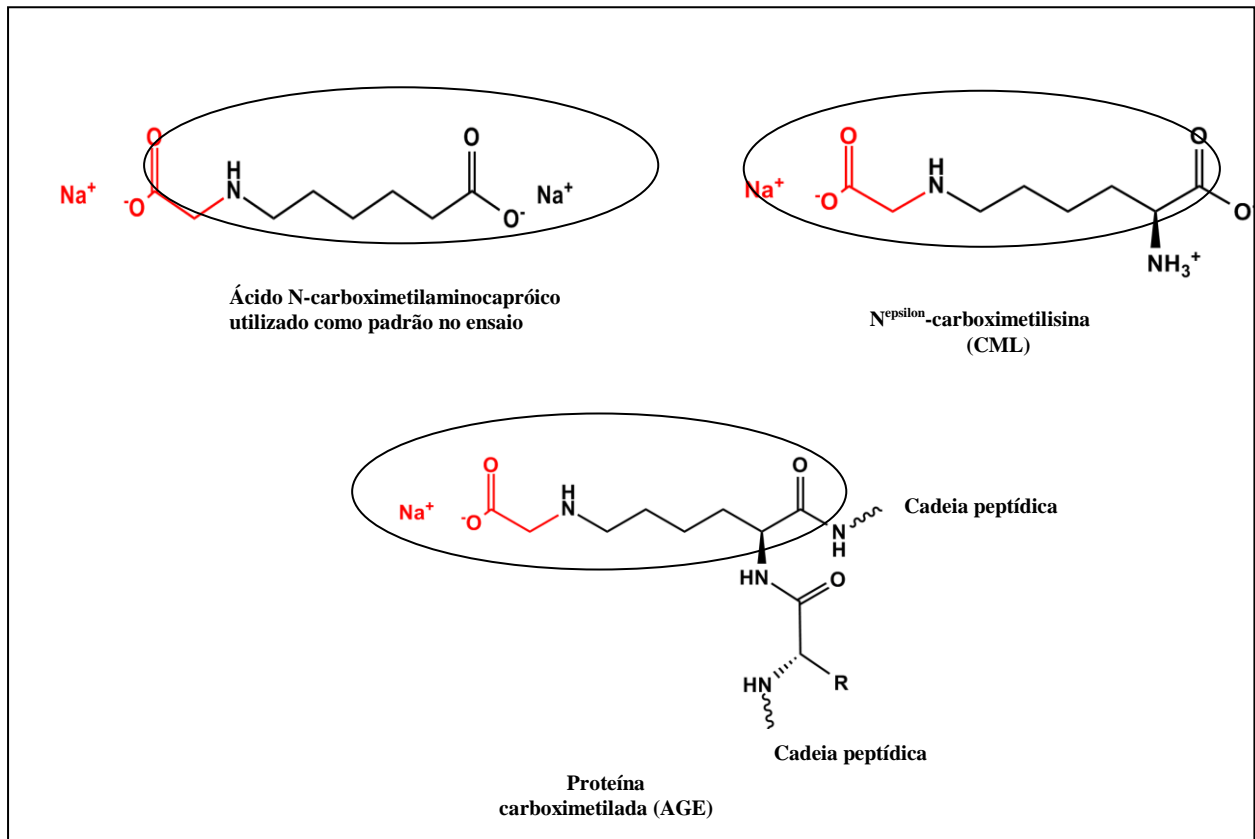
Nos últimos anos, um acirrado debate envolvendo as metodologias de análise empregadas por diferentes grupos tem se intensificado, havendo a atual tendência em assumir como aceitáveis e confiáveis apenas os resultados obtidos através de técnicas instrumentais, sendo as técnicas espectrométricas com a adição de padrão interno marcado consideradas o padrão-ouro para a quantificação de AGEs em alimentos. As principais críticas associadas ao método de ELISA envolvem especialmente o uso de anticorpos apresentando baixa especificidade e a possibilidade de reações cruzadas com outras estruturas, principalmente quando utilizado em matrizes alimentares complexas. Nesse cenário, questões outras, como diferenças nas unidades de medida utilizadas para a expressão dos resultados entre as diferentes técnicas comprometem a comparabilidade dos achados e adicionam críticas ao uso dos testes de ELISA para a análise de AGEs em alimentos. Afirma-se assim que o uso do ELISA para a quantificação de AGEs exige a avaliação de reatividade cruzada do anticorpo utilizado, além da otimização do teste para cada matriz em que for aplicado, cuidados esses que foram considerados no presente estudo (POULSEN, et al.; 2013; TESSIER; JACOLOT; NIQUET-LÉRIDON, 2014; AMES, 2008).

Cabe salientar que o anticorpo monoclonal (anti-CML-Mab 4G9), componente do kit de ELISA utilizado para a obtenção dos atuais resultados, é específico anti-CML e não apresenta reações cruzadas entre outras estruturas, segundo o fabricante, e que essa técnica foi otimizada para a sua utilização nas amostras objeto deste estudo. A figura 23 apresenta os epítomos reconhecidos pelo anticorpo 4G9 (com a licença da Microcoat GmbH).

Um dos achados do atual estudo que pode indicar a confiabilidade do teste de ELISA

utilizado diz respeito às similaridades encontradas entre os resultados das amostras analisadas por ELISA e LC-MS/MS ao final do protocolo de purificação das amostras (amostras A e C, tabela 5).

Figura 23 - Epítomos reconhecidos pelo anticorpo anti-CML-Mab 4G9



Fonte: imagem gentilmente cedida por Microcoat GmbH Technologie.

Algumas desvantagens claramente associadas ao uso de técnicas cromatográficas, em especial quando acopladas a sistemas detectores de massa, diz respeito à necessidade de mão de obra altamente especializada para sua execução, vastos recursos em equipamentos e reagentes laboratoriais, além da cuidadosa e muitas vezes extensa manipulação das amostras, a fim de eliminar possíveis contaminantes e/ou interferentes do sistema analisador. Esse último fator justificaria a importante perda da CML observada neste estudo, embora a maior proporção de perda observada na etapa específica da extração lipídica possa estar associada a outra polêmica da área metodológica presente na literatura.

A análise do conjunto de resultados publicados descrevendo o conteúdo em AGEs de alimentos tem demonstrado que aqueles obtidos através de métodos imunológicos associam-se positivamente ao conteúdo em lipídeos das dietas, sugerindo que os alimentos que apresentam uma maior concentração desse nutriente em suas composições seriam também as

principais fontes de AGEs da alimentação, o que por sua vez é contraposto pelos resultados obtidos através de técnicas instrumentais, os quais estão mais associados ao conteúdo em carboidratos dos alimentos (BUETLER, 2008).

Os autores que utilizam os imunoenaios justificam este fenômeno argumentando que as reações de oxidação lipídica catalisariam as reações de formação de AGEs nos alimentos ricos em lipídeos, especialmente durante o processamento térmico, além do que os AGEs seriam também originados a partir da interação entre amino grupos de aminofosfolipídeos de membrana e grupos carbonílicos provenientes de lipídeos oxidados, justificando a presença de altos níveis de AGEs (ou ALEs) descritos mesmo em alimentos pobres em carboidratos, como os óleos e as gorduras (GOLDBERG, et al., 2004; URIBARRI et al., 2010). Esses argumentos, porém, são questionados por aqueles que defendem a utilização dos métodos instrumentais para a análise de AGEs, os quais defendem a rota clássica da reação de Maillard, através da interação entre proteínas e carboidratos, como sendo a principal contribuinte para a formação de AGEs em alimentos (TESSIER, F.J.; JACOLOT, P.; NIQUET-LÉRIDON, 2014). No presente estudo, em consonância com a literatura, verificou-se uma correlação positiva entre o conteúdo em CML das dietas originais mensurados por ELISA e seus conteúdos em lipídeos, mas também com seus conteúdos em carboidratos, provavelmente justificados pela maior concentração de ambos os nutrientes neste tipo de produto nutricional. Porém, quanto aos resultados obtidos através do LC-MS/MS e também do ELISA ao final do protocolo de limpeza, não foram encontradas correlações significativas entre seus conteúdos em CML e os macronutrientes das amostras originais. Pode-se ainda considerar que a significativa diminuição do conteúdo em CML observada após a remoção da fração lipídica das amostras anterior às análises por LC-MS/MS acrescenta uma intrigante evidência a este contexto, apontando a necessidade de investigações adicionais e mais aprofundadas envolvendo, inclusive, a cinética das reações de formação de AGEs em sistemas-modelo.

Outro resultado interessante deste estudo diz respeito ao conteúdo significativamente menor em CML verificado através do teste de ELISA na amostra de dieta parenteral suplementada com o aminoácido taurina. Esse achado sugere um efeito inibidor quanto à formação da CML causado por esse nutriente, o qual possui reconhecidas propriedades antioxidantes, merecendo investigações adicionais que visem confirmar esse efeito e esclarecer os mecanismos envolvidos nessa inibição. A modulação da composição em nutrientes das dietas poderá constituir uma estratégia viável e eficaz para a prevenção da ingestão de um grande aporte de AGEs potencialmente nocivos à saúde e a elucidação de

mecanismos protetores associados representa uma promissora área de pesquisa.

A comparação dos resultados entre os diferentes estudos publicados nem sempre constitui tarefa simples devido à diversidade de métodos utilizados, que frequentemente expressam seus resultados em diferentes unidades de medida. No entanto, há trabalhos que investigaram o conteúdo em CML em diferentes alimentos através da técnica de LC-MS/MS e que podem ser comparados aos achados desta investigação. Para leites esterilizados, Delatour, et al. (2009) encontrou valores próximos a 9 ng CML/mg PTN, Fenaille et al. (2006) valores entre 29,2 - 46,4 ng CML/mg PTN e Aldiab, et al. (2008), utilizando o mesmo protocolo, valores entre 40 e 60 ng CML/mg PTN e valores entre 533 – 899 ng CML/mg PTN em leite condensado, comparáveis aos valores obtidos neste estudo, que variaram entre 9 e 503 ng CML/mg PTN através do LC-MS/MS.

A ausência de informações acerca do conteúdo em AGEs em formulações enterais e parenterais na literatura compromete uma análise comparativa mais ampla à respeito da presença desses compostos potencialmente tóxicos nesta categoria especial de dieta, mas a comparação entre os conteúdos em CML observados para o grupo das soluções parenterais e para o grupo das formulações enterais no presente estudo permite realizar algumas observações importantes. Primeiramente, o menor conteúdo em CML verificado para o grupo das soluções parenterais evidencia a importância das condições do preparo e estocagem desses produtos na prevenção da formação de AGEs, mesmo em se tratando de sistemas que apresentam os substratos para as reações em suas formas mais simples e concentradas (aminoácidos e glicose, por ex.), além da presença abundante de metais catalisadores, como Fe e Cu, desde que essas formulações visam atender as necessidades nutricionais dos indivíduos em relativos pequenos volumes diários. As soluções parenterais são produzidas e mantidas sob condições permanentes de refrigeração (0 a 16°C) e seus ingredientes reunidos em período de até 24 h, em média, anterior à administração, em contraste com as fórmulas enterais, que embora apresente seus nutrientes em estrutura mais complexa, são processadas sob condições mais severas (esterilização a 150°C) e podem ser mantidas em estocagem por um período médio de 6 meses.

Porém, o fato das formulações parenterais apresentarem um menor conteúdo em CML não representa fator de menor atenção ou preocupação, desde que estas soluções são infundidas diretamente na corrente sanguínea dos indivíduos, não havendo assim uma barreira protetora contra os possíveis efeitos tóxicos dos AGEs ali presentes, como é o caso da barreira intestinal para as fórmulas enterais. Embora ainda não estejam descritas na literatura investigações envolvendo a análise desses compostos em fórmulas parenterais nutricionais, a

hipótese de que a presença de AGEs em formulações parenterais utilizadas para o controle osmótico em pacientes sépticos esteja associada a uma maior taxa de mortalidade nesses indivíduos apontaram para a necessidade de investigações sobre o real impacto dessa “contaminação” sobre a evolução clínica dos pacientes, sugerindo a abertura de um novo campo investigativo nesse cenário (HUMPERT, et al., 2009).

Nos últimos anos, inúmeros estudos envolvendo indivíduos saudáveis, bem como portadores de diabetes e/ou doenças cardiovasculares tem indicado uma associação entre os níveis de ingestão de AGEs, os níveis de AGEs endógenos e os marcadores de inflamação e de estresse oxidativo (POULSEN et al., 2013; SCHULMAN et al., 2014). Há um importante corpo de evidências demonstrando que grandes quantidades de AGEs, parte desses provenientes da dieta, podem ser acumulados nos tecidos e células ao longo do tempo, contribuindo para o desencadeamento e a progressão de processos inflamatórios e oxidativos implicados na fisiopatogenia das mais diversas doenças (VLASSARA; STRIKER, 2011).

Em conjunto, esses resultados endossam a necessidade de investigações adicionais a fim de elucidar os níveis reais de ingestão de AGEs dietéticos, a biodisponibilidade desses compostos e suas efetivas ações sobre a saúde humana, bem como as estratégias de inibição da formação dos AGEs em alimentos e nos sistemas biológicos.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Todas as amostras investigadas neste estudo apresentaram níveis detectáveis de CML, independentemente dos métodos de análise utilizados;
- ✓ Os conteúdos em CML das fórmulas parenterais mensurados através de ELISA variaram de $529,9 \pm 33,47$ a $1948,88 \pm 3,68$ ng de CML/mL de amostra e apresentaram correlações lineares positivas quanto aos seus conteúdos em lipídeos (0,9259) e em carboidratos (0,9426), evidenciando uma importante influência da composição em nutrientes das dietas sobre seus conteúdos em CML analisados por essa técnica;
- ✓ As formulações parenterais suplementadas com taurina apresentaram concentrações significativamente menores em CML quando comparadas às demais, incluindo aquelas contendo composição semelhante em macronutrientes (lipídeos, carboidratos e proteínas), sugerindo um efeito inibidor da taurina sobre a formação da CML nessas amostras;
- ✓ Os conteúdos em CML das fórmulas enterais mensurados através de ELISA variaram de $1076,91 \pm 76,87$ a $55950,71 \pm 1891,29$ ng de CML/ mL de amostra e apresentaram correlações positivas quanto aos seus conteúdos em carboidratos (0,6057), lipídeos (0,5264) e proteínas (0,6157);
- ✓ A análise do conteúdo em CML das formulações parenterais através do LC-MS/MS não foi possível neste estudo, devido à inviabilidade da aplicação para esse grupo de amostras do protocolo de purificação estabelecido, bem como à ineficácia da aplicação de métodos alternativos de extração da CML dessas formulações, necessária às análises através dessa técnica;
- ✓ A técnica de extração em fase sólida (SPE), descrita em diversos estudos como eficaz para a extração da CML de matrizes complexas, se apresentou ineficaz em todos os diferentes protocolos testados neste trabalho, lançando questionamentos sobre a reprodutibilidade, comparabilidade e confiabilidade entre os achados da literatura;
- ✓ Os conteúdos em CML das fórmulas enterais analisadas através do LC-MS/MS variaram de 0,09 a 0,503 μg de CML/mg de proteína das amostras, não havendo correlações entre a CML e as variáveis “lipídeos”, “carboidratos” ou “proteínas” para esse grupo;
- ✓ A investigação conduzida durante o processo de preparo das amostras anterior à injeção no LC-MS/MS evidenciou uma expressiva perda da CML durante as

diferentes etapas do protocolo estabelecido, comprometendo a confiabilidade dos resultados obtidos através desse método de análise;

- ✓ A comparação entre os resultados encontrados através dos métodos de ELISA e de LC-MS/MS para amostras semelhantes evidenciou similaridades significativas entre elas, demonstrando a confiabilidade do teste de ELISA anti-CML utilizado para as amostras nas condições deste experimento;
- ✓ As formulações enterais e parenterais utilizadas para suporte nutricional especializado e alvos de estudo do presente trabalho podem representar fontes de AGEs potencialmente nocivos à saúde humana, achado que suscita novos campos de investigação, tanto em áreas biotecnológicas quanto em áreas da saúde.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento sobre a presença dos AGEs em alimentos, bem como sua relação com a saúde humana progrediu consideravelmente nas últimas duas décadas, mas ainda enfrenta obstáculos que necessitam ser superados para que a ciência continue evoluindo. Pode-se afirmar que os desafios que se apresentam nesta área atualmente se subdividem em três sub-áreas: o estabelecimento de uma definição mais clara para este grupo de compostos, a avaliação do real impacto dos AGEs sobre a saúde humana e, para que os desafios anteriores sejam esclarecidos, o aperfeiçoamento de técnicas de mensuração confiáveis desses compostos que possam ser aplicadas em maior escala, preferencialmente de maneira mais prática e segura.

À luz da ciência atual, pode-se afirmar que os processos que levam à formação dos AGEs são complexos e ainda não conhecidos totalmente. Essa complexidade e diversidade das reações implica, similarmente, na formação de uma grande e diversa gama de produtos que apresentam propriedades variadas. Os intermediários dicarbonílicos formados no curso das reações também constituem alvo de debate, desde que são frequentemente considerados AGEs, sendo o uso dessa nomenclatura geradora de conflitos, especialmente quando se trata de estudos que envolvam quantificação *versus* impacto fisiológico dos AGEs.

O uso da CML como um marcador confiável do conteúdo em AGEs nos diferentes sistemas tem motivado o desenvolvimento de um banco de dados sobre o conteúdo em CML em alimentos, no entanto os resultados conflitantes gerados pelos diferentes grupos de investigação aponta claramente a necessidade de um maior investimento no aperfeiçoamento na área de metodologia analítica relativa a esta área, exigindo dos pesquisadores cautela e esforço para que os avanços nos conhecimentos nesta área sejam alcançados de maneira mais confiável.

Espera-se que o alcance de um nível de conhecimento mais aprofundado e confiável nesse campo de pesquisa possa proporcionar benefícios relativos à prevenção e ao tratamento de inúmeras patologias associadas a essa classe de compostos e, em última instância, levar a uma melhora na qualidade de vida dos indivíduos acometidos ou predispostos a elas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.S.; AHMED, N. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. **J Nutr**, v. 136, supl. 3, p. S796-799, 2006.
- AHMED, N. Advanced glycation endproducts–role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, p. 3–21, 2005.
- ALDIAB, D. LC-ESI-MS-MS of non-enzymatic posttranslational protein modifications. **Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg**, 178 pág., 2011.
- AMADORI, M. The condensation product of glucose and p-anisidine. **Atti della Accademia Nazionale dei Lincei**, v. 9, p. 226–230, 1929.
- AMES, J.M. Determination of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in foods and related systems. **Ann N Y Acad Sci**, n. 1126, p. 20-24, 2008.
- AN, X.F.; et al. Advanced glycation end-products induce heparanase expression in endothelial cells by the receptor for advanced glycation end products and through activation of the FOXO 4 transcription factor. **Mol Cell Biochem**, v. 354, p. 47–55, 2011.
- ASSAR, S.H.; et al. Determination of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Amino Acids**, v. 36, n. 2, p. 317-326, 2009.
- BABAEI-JADIDI, R. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. **Diabetes**, v. 52, n. 8, p. 2110-2120, 2003.
- BABU, P.V.A.; SABITHA, K.E.; SHYAMALADEVI, C.S. Green tea impedes dyslipidemia, lipid peroxidation, protein glycation and ameliorates Ca²⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the heart of streptozotocin-diabetic rats. **Chem Biol Interact**; v. 162, n. 2, p. 157-164, 2006.
- BAYNES, J.W.; THORPE, S.R.; MURTIASHAW, M.H. Nonenzymatic glycosylation of lysine residues in albumin. **Methods Enzymol**, v. 106, p. 88–98, 1984.
- BERG, H.E.; VANBOEKEL, M.A.J.S. Degradation of lactose during heating of milk. Reaction pathways. **Neth Milk Dairy J**, v. 48, p. 157–175, 1994.
- BERGMANN, R.; et al. Radio fluorination and positron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N-epsilon-carboxymethyllysine (CML) and N-epsilon-carboxyethyllysine (CEL). **Nahrung**, v. 45, p. 182–188, 2001.
- BIEMEL, K.M.; et al. Identification and quantitative evaluation of the lysine-arginine crosslinks GODIC, MODIC, DODIC and glucosepan in foods. **Nahrung Food**, v. 45, p. 210–214, 2001.

BIERHAUS, A.; et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res**, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

BUETLER T. CML content in food stuffs, AGEs or ALEs? **IMARS Highlights**, v. 3, n. 4, p. 8-9, 2008.

BUETTNER, G.R. Use of ascorbate as test for catalytic metals in simple buffers. **Method Enzym**, v. 186, p. 125-127, 1990.

CALDER, P.C.; et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106, 3071-3109, 2011.

CAMMERER, B.; KROH, L.W. Investigation of the contribution of radicals to the mechanism of the early stage of the Maillard reaction. **Food Chem**, v. 57, p. 217-221, 1996.

DAMIÃO, C.C. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics - doi: 10.4025/actasciagr.v35i3.21251. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, p. 271-276, 2013.

DAY, J.F.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. Non-enzymatically glucosylated albumin in vitro preparation and isolation from normal human-serum. **J Biol Chem**, v. 254, p. 595-597, 1979.

DEBUSK, R. The role of nutritional genomics in developing an optimal diet for Humans. **Nut Clin Pract**, v. 25, n. 6, p. 627-633, 2010.

DEGEN, J.; HELLWIG, M.; HENLE, T. 1,2-Dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. **J Agric Food Chem**, v. 60, p. 7071-7079, 2012.

DELATOUR, T.; et al. Analysis of advanced glycation endproducts in dairy products by isotope dilution liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. The particular case of carboxymethyllysine. *Journal of Chromatography A*, n. 1216, p. 2371-2381, 2009.

DELGADO-ANDRADE, C.; et al. Increased Maillard reaction products intake reduces phosphorus digestibility in male adolescents. **Nutrition**, v. 27, p. 86-91, 2011.

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

- FENAILLE, F. Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. **Int Dair Journ**, v. 16, p. 728–739, 2006.
- FINOT, P.A.; DEUTSCH, R.; BUJARD, E. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. **Prog Food Nutr Sci**, v. 5, p. 345–355, 1981.
- FINOT, P.A.; MAGNENAT, E. Metabolic transit of early and advanced Maillard products. **Prog Food Nutr Sci**, v. 5, p. 193–207, 1981.
- FOERSTER, A.; KUHNE, Y.; HENLE, T. Studies on absorption and elimination of dietary maillard reaction products. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1043, p. 474–481, 2005.
- GEISLER, S.; et al. Transport of the advanced glycation end products alanylpyrraline and pyrrolylalanine by the human proton-coupled peptide transporter hPEPT1. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 2543–2547, 2010.
- GLOMB, M.A.; ROSCH, D.; NAGARAJ, R.H. N(delta)-(5-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-l-ornithine, a novel methylglyoxal-arginine modification in beer. **J Agric Food Chem**, v. 49, p. 366–372, 2001.
- GOLDBERG, T.; et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **J Am Diet Assoc**, v. 104, n. 8, p. 1287-1291, 2004.
- GOLDIN, A.; et al. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006.
- GRUNWALD, S.; et al. Transepithelial flux of early and advanced glycation compounds across Caco-2 cell monolayers and their interaction with intestinal amino acid and peptide transport systems. **Br J Nutr**, v. 95, p. 1221–1228, 2006.
- GUGLIUCCI, A.; BENDAYAN, M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia*, v. 39, n. 2, p.149-160, 1996.
- HAN, S.H.; KIM, Y.H.; MOOK-JUNG, I. RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions. **Mol Cells**, v. 31, p. 91–97, 2011.
- HASENKOPF, K.; UBEL, B.; BORDIEHN, T.; PISCHETSRIEDER, M. Determination of the Maillard product oxalic acid monolysinyamide (OMA) in heated milk products by ELISA. **Nahrung Food**, v. 45, p. 206–209, 2001.
- HE, C.; et al. Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. **Diabetes**, v. 48, p. 1308–1315, 1999.
- 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. **Anal Chim Act**, v. 617, p. 85–96, 2008.

HELLWIG, M.; et al. Transport of free and peptide-bound glycated amino acids: synthesis, transepithelial flux at Caco-2 cell monolayers, and interaction with apical membrane transport proteins. **Chem Bio Chem**, v. 12, p. 1270–1279, 2011.

HENLE, T. AGEs in food: do they play a role in uremia? **Kidney International**, v. 63, p. 145-147, 2003.

HENLE, T.; SCHWARZENBOLZ, U.; KLOSTERMEYER, H. Detection and quantification of pentosidine in foods. **Z Lebensm Unters Forsch**, n. 204, p. 95–98, 1997.

HENLE, T; et al. Isolation and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. **Z Lebensm Unters Forsch**, n. 199, p. 55–58, 1994.

HEYNS, K.; MEINECKE, K.H. The formation and preparation of D-glucosamine from fructose and ammonia. **Chem Ber**, v. 86, p. 1453–1562, 1953.

HIDALGO, F.J.; ZAMORA, R. Interplay between the Maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. **Ann N Y Acad Sci**, n. 1043, p. 319–326, 2005.

HOBART, L.J. Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. **Life Sci**, v. 75, n. 11, p. 1379-1389, 2004.

HODGE, J.E. Browning reactions in model systems. **J Agric Food Chem**, v. 1, p. 928–943, 1953.

HOFMANN, S.; et al. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in db/db mouse. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2082-2089, 2002.

HOFMANN, T.; BORS, W.; STETTMAIER, K. Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. **J Agric Food Chem**, v. 47, p. 379–390, 1999.

HUEBSCHMANN, A.G; et al. Diabetes and glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n.6, p. 1420-1432, 2006.

HULTSCH, C.; et al. Biodistribution and catabolism of 18F-labeled N-epsilon-fructoselysine as a model of Amadori products. **Nucl Med Biol**, v. 33, p. 865–873, 2006.

HUMPERT, M; et al. AGE-modified albumin containing infusion solutions boosts septicaemia and inflammation in experimental peritonitis. **Journ Leuk Bio**, v. 86, p. 589-597, 2009.

HUNT, J.V.; DEAN, R.T.; WOLFF, S.P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation – glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes-mellitus and aging. **Biochem J**, v. 256, p. 205–212, 1988.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENDLING, K.K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 2, p. 183-192, 2006.

- KOSCHINSKY, T.; et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, n. 12, p. 6476-6479, 1997.
- KRAUSE, R. N-terminal pyrazinones: a new class of peptide-bound advanced glycation end-products. **Amino Acids**, v. 27, p. 9–18, 2004.
- LEDL, F.; SCHLEICHER, E. New aspects of the Maillard reaction in food and in the human body. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 29, p. 565–594, 1990.
- LESLIE, R.D; et al. Level of an advanced glycated end product is genetically determined. A study of normal twins. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2441-2444, 2003.
- LIARDON, R.; et al. Identification of N(epsilon)-carboxymethyllysine: a new Maillard reaction product, in rat urine. **J Agric Food Chem**, v. 35, p. 427–431, 1987.
- LIEDKE, R.; EICHNER, K. Radical induced formation of D-glucosone from Amadori compounds. In: MORELLO, M.J.; et al. Free Radicals in Food Chemistry. **Nutrition and Health**, American Chemical Society, p. 69–83, 2002.
- LIN L. RAGE on the toll road? **Cell Mol Immunol**, v. 3, n. 5, p. 351-358, 2006.
- LIN, R.; et al. Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 168, n. 2, p. 213-220, 2003.
- LIN, R.; et al. Lowering of dietary advanced glycation endproducts (AGE) reduces neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. **Atherosclerosis**, v. 163, n. 2, p. 303-311, 2002.
- LO, C.Y.; et al. Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup. **Food Chem**, v. 107, p. 1099–1105, 2008.
- LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.
- MAILLARD, L.C. Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. **Compt Rend**, v. 154, p. 66–68, 1912.
- MARCEAU, E.; YAYLAYAN, V.A., Profiling of alpha-dicarbonyl content of commercial honeys from different botanical origins: identification of 3,4-dideoxyglucoson-3-ene (3,4-DGE) and related compounds. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 10837–10844, 2009.
- MAVRIC, E.; et al. A new imidazolinone resulting from the reaction of peptide bound arginine and oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. **Eur Food Res Technol**, n. 218, p. 213–218, 2004.
- MCCARTY, M.F. The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. **Med Hypotheses**, v. 64, n. 2, p. 394-398, 2005.

MCENIERY, C.M. Novel therapeutic strategies for reducing arterial stiffness. **Br J Pharmacol**, v. 148, n. 7, p. 881–883, 2006.

MEADE, S.J.; MILLER, A.G.; GERRARD, J.A. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 853-862, 2003.

MONNIER VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 419, p. 1-15, 2003.

MUSTATA, G.T.; et al. Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 517-526, 2005.

MYINT, K.M.; et al. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model. Effects of RAGE gene disruption and administration of low molecular weight heparin. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2510-2522, 2006.

NAGAI, R.; et al. Hydroxyl radical mediates N-epsilon-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 234, p. 167–172, 1997.

NAKAMURA, S.; et al. Immunohistochemical detection of an AGE, a ligand of macrophage receptor, in peritoneum of CAPD patients. **Kidney Int Suppl**, v. 84, p. S152-157, 2003.

NAKAYAMA, T.; HAYASE, F.; KATO, H. Formation of epsilon-(2-formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-L-norleucine in the Maillard reaction between D-glucose and L-lysine. **Agric Biol Chem**, v. 44, p. 1201–1202, 1980.

NAMIKI, M.; HAYASHI, T. A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation, in: **The Maillard Reaction in Foods and Nutrition**, in: WALLER, G.R.; FEATHER, M.S. **ACS Symposium Series, American Chemical Society**, p. 215, 1983.

NURSTEN, H. Recent advances. **The Maillard Reaction Chemistry, Biochemistry and implications**. The Royal Society of Chemistry, p. 31–51, 2005.

O'BRIEN, J.; MORRISSEY, P.A. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 28, p. 211–248, 1989.

OSAWA, T.; KATO, Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. **Ann N Y Acad Sci**, v.1043, p. 440-451, 2005.

PARI, L.; VENKATESWARAN, S. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 7, p.861-870, 2003.

PECULIS, R.; et al. Identification of glyoxalase 1 polymorphisms associated with enzyme activity. **Gene**, v. 515, p. 140–143, 2013.

PEPPA M.; et al. Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p.1441-1448, 2003.

PEPPA, M.; et al. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2805-2813, 2003.

PETHIG, R.; SZENTGYORGYI, A. Electronic properties of casein-methylglyoxal complex. **Proc Natl Acad Sci**, v. 74, p. 226-228, 1977.

PISCHETSRIEDER, A.M.; SCHROETER, C.; SEVERIN, T. Formation of an aminoreductone during the Maillard reaction of lactose with N- α -acetyllysine or proteins. **J Agric Food Chem**, n. 46, p. 928-931, 1998.

POIRIER, O.; et al. Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors: association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 1214-1218, 2001.

POULSEN, M.W; et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food Chem Toxicol**, v. 60, p.10-37, 2013.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P.J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. **Amino Acids**, v. 42, p. 1133-1142, 2012.

RAHBAR, S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. **Ann N Y Acad Sci**, n. 1043, p. 9-19, 2005.

RAMASAMY, R.; et al. Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1126, p. 7-13, 2008.

REDDY, V.P.; BEYAZ, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. **Drug Discov Today**, v. 11, n.13-14, p. 646-654, 2006.

RIZZI, G.P. Free radicals in the Maillard reaction. **Food Rev Int**, v. 19, p. 375-395, 2003.

SANDU, O.; et al. Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in High-Fat-Fed Mice Are Linked to High Glycotxin Intake. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2314-2319, 2005.

SCHWENGER, V.; et al. An oral load of the early glycation compound lactuloselysine fails to accumulate in the serum of uraemic patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, p. 383-388, 2006.

SCHMITZ, I.; et al. Zum Vorkommen von Isopeptidbindungen in erhitztem Milcheiweiss. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 160, p. 377-381, 1976. In: POULSEN, M.W; et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food Chem Toxicol**, v. 60, p.10-37, 2013.

SCHULMAN, C.; et al. Increased circulating advanced glycation endproducts (AGEs) in acute trauma patients. **Clin Chem Lab Med**, v. 52, n. 1, p. 1-12, 2014.

SGARBIERI, V.C.; et al. Nutritional consequences of the Maillard reaction. Amino acid availability from fructoseleucine and fructose-tryptophan in the rat. **J Nutr**, v. 103, p. 657-663, 1973.

- SHOJI T.; et al. Receptor for advanced glycation end products is involved in impaired angiogenic response in diabetes. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2245-2255, 2006.
- STIRBAN, A.; et al. Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 9, p. 2064-2071, 2006.
- TAKEUCHI, M.; YAMAGISHI, S. TAGE (toxics AGEs) hypothesis in various chronic diseases. **Med Hypotheses**, v. 63, n. 3, p. 449-452, 2004.
- TAREKE, E.; et al. Isotope dilution ESI-LC-MS/MS for quantification of free and total Ne-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine and free Ne-(1-Carboxyethyl)-L-Lysine: Comparison of total Ne-(1-Carboxymethyl)-L-Lysine levels measured with new method to ELISA assay in gruel samples. **Food Chemist**, v. 141, p. 4253–4259, 2013.
- TESSIER, F.J.; JACOLOT, P.; NIQUET-LÉRIDON, C. Open questions around the Carboxymethyllysine. **IMARS Highlights**, v. 9, n. 3, 2014.
- THORNALLEY, P.J. Dietary AGEs and ALEs and risk to human health by their interaction with the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) – an introduction. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, p. 1107–1110, 2007.
- THORNALLEY, P.J. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. **Biochem Soc Trans**, v. 6, p. 1341-1342, 2003.
- THORNALLEY, P.J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochem J**, v. 344, p. 109–116, 1999.
- URIBARRI, J.; et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **J Am Diet Assoc**, v. 110, p. 911-916, 2010.
- URIBARRI, J.; et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.62, n.4, p. 427-433, 2007.
- 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. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1043, p. 461–466, 2005.
- URIBARRI, J.; et al. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 3, p.728-731, 2003.
- VLISSARA, H.; et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, n. 24, p 15596-15601, 2002.
- VLISSARA, H.; PALACE, M.R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J Intern Med**, v. 251, n. 2, p. 87-101, 2002.

VLASSARA, H.; PALACE, M.R. Glycooxidation: the menace of diabetes and aging. **Mt Sinai J Med**, v. 70, n. 4, p. 232-241, 2003.

VLASSARA, H.; STRIKER, G.E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, p. 526–539, 2011.

VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? **Curr Diab Rep**, p. 14:453, 2014.

VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Glycooxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning? **Rev Endocr Metab Dis**, v. 5, p. 181–188, 2004.

WANG, C.Y.; et al. Trientine reduces BACE1 activity and mitigates amyloidosis via the AGE/RAGE/NF- κ B pathway in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Antioxid Redox Signal**, v.19, n. 17, p. 2024-2039, 2013.

WEIGEL, K.U.; OPITZ, T.; HENLE, T. Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. **Eur Food Res Technol**, v. 218, p. 147–151, 2004.

WELLS-KNECHT, K.J.; et al. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. **Biochemistry**, v. 34, p. 3702–3709, 1995.

WELLSKNECHT, K.J.; et al. Mechanism of autoxidative glycosylation identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. **Biochemistry**, v. 34, p. 3702–3709, 1995.

WOLFF, S.P.; CRABBE, M.J.C.; THORNALLEY, P.J. The autoxidation of glyceraldehydes and other simple monosaccharides. **Experientia**, v. 40, p. 244–246, 1984.

WU, J.C.; et al. Association of two glyoxalase I gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in type 2 diabetes. **J Endocrinol Invest**, v. 34, p. e343–e348, 2011a.

Wu, J.C.; et al. Glyoxalase I and aldose reductase gene polymorphisms and susceptibility to carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 15, p. 273–279, 2011b.

YAN, S.F., RAMASAMY, R., SCHMIDT, A.M. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. **Biochem pharmacol**, v. 79, p. 1379–1386, 2010.

YAYLAYAN, V.A.; et al. Oxidative pyrolysis and postpyrolytic derivatization techniques for the total analysis of Maillard model systems – investigation of control parameters of Maillard reaction pathways. **Ann N Y Acad Sci**. n. 1043, p. 41–54, 2005.

YONEKURA, H.; et al. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. **J Pharmacol Sci**, v. 97, n. 3, p. 305-311, 2005.

ZHANG, Q.; et al. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. **J Proteome Res**, v. 8, n. 2, p. 754–769, 2009.

ZHANG, Q.; et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. **J Proteome Res**, v. 8, n. 2, p. 754–769, 2009.

ZHENG, F.; et al. Lysozyme enhances renal excretion of advanced glycation endproducts in vivo and suppresses adverse age-mediated cellular effects in vitro: a potential AGE sequestration therapy for diabetic nephropathy? **Mol Med**, v. 7, n. 11, p. 737-747, 2001.