

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIA DE DIGESTÃO *IN VITRO*
E DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO*
DE β -CAROTENO EM TRÊS VARIEDADES DE BATATA
DOCE DE POLPA ALARANJADA

FERNANDA PEIXOTO GIORI

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIA DE DIGESTÃO *IN VITRO* E
DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DE β -CAROTENO
EM TRÊS VARIEDADES DE BATATA DOCE DE POLPA ALARANJADA

FERNANDA PEIXOTO GIORI

Sob Orientação do Professor
D. Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Dissertação submetida como requisito
parcial para a obtenção no grau de
Mestre em Ciências, no Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Área de
Concentração em Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

FERNANDA PEIXOTO GIORI

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção no grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM __/__/__.

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D. Sc.) Embrapa-CTAA
(Orientador)

Mirian Ribeiro Leite Moura (D.Sc.) UFRJ

José Luis Ramírez Ascheri (D.Sc.) UFRRJ

Renata Galhardo Borguini (D.Sc) Embrapa- CTAA
(Suplente)

664.80525

G499a

Giori, Fernanda Peixoto, 1982 -.

T

Adaptação de metodologia de digestão in vitro e determinação da bioacessibilidade in vitro de β -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada / Fernanda Peixoto Giori. – 2010.

67 f.: il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 51-56.

1. Batata-doce – Composição – Teses. 2. Carotenóides – Teses. 3. Absorção (Fisiologia) – Teses. 4. Tecnologia de alimentos – Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai José Antonio pelo exemplo de trabalho, pelo constante incentivo, pelas longas divagações e pelo amor incondicional.

A minha querida mãe Edir, pelo apoio emocional, pela presença, pela amizade e pelo amor incondicional.

Ao meu querido companheiro Marcílio pela amizade, companherismo, entusiasmo e suporte ao longo deste trabalho.

E a minha filhinha Isa pela afetividade, paciência e amor incondicional em todos os momentos, mesmo quando não estávamos juntas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy pela confiança, carinho, amizade, exemplo e enriquecedoras conversas.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos por ceder suas instalações e permitir a realização deste trabalho.

Aos projetos HarvestPlus , AgroSalud e Biofort pelo suporte financeiro.

Ao Pesquisador M.Sc. José Luiz Viana de Carvalho por acreditar e viabilizar a realização deste projeto.

A Pesquisadora M.Sc. Marília Regina Nutti pelo suporte e apoio a deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Embrapa Agroindústria de Alimentos- CTAA, Manuela e Jeane e em especial ao Sidney, pelas valiosas orientações, ao Rafael pela infinita amizade e a Suellen, Sâmara e Pedro, pelo companheirismo.

A grande amiga Ana Cristina pelo exemplo de força e otimismo, pelo carinho, amizade e pela companhia nas longas viagens.

Aos amigos, que compreenderam a ausência em tantos momentos.

RESUMO

GIORI, Fernanda Peixoto. **Adaptação de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da Bioacessibilidade *in vitro* de β - caroteno em três variedades de batata-doce de polpa alaranjada.** 2010. 66p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O Brasil foi classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como área de carência sub-clínica grave de vitamina A. Assim, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) vêm selecionando e melhorando variedades de batata-doce com teores maiores de β -caroteno, composto pró-vitamina A. A quantidade de carotenóides pró-vitamina A presentes nos alimentos não corresponde necessariamente àquela quantidade absorvida e metabolizada pelo organismo. Para uma melhor determinação destes valores e conhecimento dos mecanismos de transporte e absorção deste composto, faz-se necessário, o entendimento dos fatores que levam à sua liberação da matriz do alimento, até a extensão de sua absorção, bem como a influência na promoção e manutenção da saúde humana. A fim de realizar estudos preliminares de sua absorção, este trabalho visa determinar a eficiência de micelização de β -caroteno de batata-doce de polpa alaranjada (*Ipomoea batatas*, Lam.), através da aplicação de digestão *in vitro*, como ferramenta de determinação da bioacessibilidade, etapa preliminar para a determinação da biodisponibilidade. Esta metodologia visa simular as etapas de digestão oral, gástrica e intestinal humana. Foram pesados 10g de amostra *in natura* e adicionados 5% (p/p) de óleo de canola. A extração do alimento foi realizada com acetona e éter de petróleo e a da fração micelar, com éter de petróleo, NaCl 10%(p/v) e NaSO₄ 2%(p/v) . Enzimas como: α -amilase, pepsina, bile, pancreatina, lipase e mucina, bem como compostos inorgânicos, tais como KCl, KSCN, NaH₂PO₄, Na₃PO₄, NaOH, NaCl, CaCl₂, HCl, NaHCO₃. As variações fisiológicas foram reproduzidas pelo banho de aquecimento com giro orbital (37°C) e centrifugação (5000g;45 min). A quantificação e determinação do perfil de carotenóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna YCM[®] Carotenoid C₃₀ S-3 de 4,6 x 250mm. A quantificação de carotenóides totais foi realizada por espectrofotometria UV-VIs. Todo o procedimento foi executado sob temperatura (25°C) e luz controlada. O β -caroteno estava presente majoritariamente, com teores de 86%, 73% e 82%, para as variedades 1, 2 e 3 e após a digestão, o perfil do β -caroteno passou a configurar teores de 96%, 89% e 100%, respectivamente. A eficiência de micelização foi de 23,8%, 28% e 28,9% para as variedades 1,2 e 3, indicando a transferência do β -caroteno da matriz do alimento para as micelas, correspondendo a bioacessibilidade deste composto. Esta metodologia demonstrou-se mais rápida e mais barata, quando comparada aos estudos *in vivo*, que são mais onerosos, complexos e demandam mais tempo.

Palavras-chave: Digestão *in vitro*. CLAE. Carotenóides

ABSTRACT

GIORI, Fernanda Peixoto. **Adaptation of *in vitro* digestion methodology and determination of *in vitro* β - carotene bioaccessibility of three orange sweet potato varieties.** 2010. 66p. Dissertation (Master in Science and Technology of Food, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Brazil was adverted by the World Health Organization (WHO) as a sub-clinical area of serious vitamin A deficiency. Thus, the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) is selecting and improving varieties of sweet potatoes with higher levels of β -carotene, pro-vitamin A. The carotenoids provitamin A amount of in foods does not necessarily correspond the amount that is absorbed and metabolized by the body. For a better determination of these values and knowledge of the mechanisms of its transport and absorption, it is necessary to understand the factors that lead to the food matrix release, until the absorption and the influence on the promotion and maintenance in human health. In order to perform preliminary studies of its absorption, this study aims to determine the efficiency of micellization of β -carotene in orange sweet potato (*Ipomoea batatas*, Lam), by applying a *in vitro* digestion as a tool for determining the bioaccessibility, which is the first step for bioavailability determination. This approach aims to simulate the oral, gastric and intestinal stages of human. The digestion was performed with 10 g of fresh samples, homozeneided with 5% (w/w) of canola oil. The extraction was performed with acetone and petroleum ether and the micellar fraction with petroleum ether, NaCl 10% (w / v) and NaSO₄ 2% (w/v) and involves the use of enzymes as -amylase , pepsin, bile, pancreatin, lipase and mucin, and inorganic compounds such as KCl, KSCN, NaH₂PO₄, Na₃PO₄, NaOH, NaCl, CaCl₂, HCl, NaHCO₃. The physiological variations are reproduced by the heating bath shaker with orbital gyrus (37°C) and centrifugation (5000g, 45 min). Quantification and determination of the profile of carotenoids were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) with YCM ® C30 Carotenoid S-3 4.6 x 250mm column. Quantification of total carotenoids was performed by UV-VIs. The whole procedure was performed under controlled temperature (25 ° C) and light. The β -carotene was present mainly with levels of 86%, 73% and 82% for access 1, 2 and 3 and after digestion, the profile of β -carotene has set levels of 96%, 89% and 100%, respectively. The efficiency of micellization was 23.8%, 28% and 25% for 1.2 and 3 hits, indicating β -carotene transfer of the food matrix to micelles, corresponding to bioaccessibility of the compound. This methodology proved to be faster and cheaper, since the *in vivo* studies are costly, complex and require more time.

Key words: *In vitro* digestion. HPLC. Carotenoids

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estruturas de alguns dos principais carotenóides
- Figura 2 Síntese do fitoeno a partir do isopreno
- Figura 3 Esquema de reações que levam a formação dos diferentes carotenóides
- Figura 4 Esquema de degradação dos carotenóides
- Figura 5 Estrutura química da β -ionona
- Figura 6 Principais vias metabólicas de β – caroteno: central e excêntrica
- Figura 7 Dois possíveis mecanismos enzimáticos de clivagem central de β – caroteno
- Figura 8 Estrutura do carotenóide β -caroteno
- Figura 9 Estrutura química dos derivados retinóides
- Figura 10 Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrointestinal e órgãos anexos
- Figura 11 Esquema das etapas de absorção dos carotenóides
- Figura 12 Esquema da formação das micelas pela ação da bile e lípase pancreática
- Figura 13 Fotos das três variedades de batata doce de polpa alaranjada. Da esquerda para a direita variedade 1, 2 e 3.
- Figura 14 Foto tirada do banho com giro orbital, na etapa de digestão gástrica
- Figura 15 Foto das três amostras após a etapa de digestão intestinal.
- Figura 16 Etapa de centrifugação da fração aquosa (micelar)
- Figura 17 Esquema das etapas da Digestão *in vitro*
- Figura 18 Equação para o cálculo do valor de carotenóides totais
- Figura 19 Representação do pico de β -caroteno nos cromatogramas das variedades 1,2 e 3 de batata-doce de polpa alaranjada antes da digestão *in vitro*
- Figura 20 Representação do pico de β -caroteno nos cromatogramas das variedades 1,2 e 3 de batata-doce de polpa alaranjada após digestão *in vitro*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A Fome e a Deficiência de Vitamina A.....	3
2.2 Carotenóides.....	3
2.2.1 Função e estrutura dos carotenóides.....	3
2.2.2 Fatores de degradação.....	7
2.2.3 Conversão dos carotenóides em vitamina A.....	8
2.2.4 Aplicação como antioxidantes.....	11
2.2.5 β - caroteno (BC).....	12
2.3 Vitamina A.....	12
2.4 Fisiologia do trato digestivo humano.....	13
2.4.1 Características da saliva, pepsina, bile, pancreatina e lípase.....	15
2.4.2 Digestão gástrica.....	15
2.4.3 Digestão intestinal delgado.....	16
2.5 Biodisponibilidade e Bioatividade.....	17
2.6 Métodos para avaliar a biodisponibilidade de carotenóides.....	18
2.7 Principais fatores que interferem na Biodisponibilidade.....	19
2.7.1 Matriz do alimento.....	19
2.7.2 Métodos de Processamento.....	19
2.7.3 Presença de óleo.....	20
2.8 Bioacessibilidade: metodologias de digestão <i>in vitro</i>	21
2.9 Micelização.....	26
2.10 Batata-doce de polpa alaranjada.....	28

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Material.....	29
3.1.1 Amostras.....	29
3.1.2 Solventes da fase micelar.....	29
3.1.3 Solventes – Análise Cromatográfica.....	29
3.1.4 Solventes – digestão <i>in vitro</i>	30
3.1.5 Material de consumo.....	30
3.1.6 Equipamentos.....	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Digestão <i>in vitro</i>	31
3.2.2 Extração antes da digestão <i>in vitro</i>	31
3.2.3 Extração da fração micelar.....	34
3.2.4 Análise de carotenóides totais.....	35
3.2.5 Análise Cromatográfica.....	35
3.2.6 Eficiência de micelização.....	36
3.2.7 Construção da Curva Padrão.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Adaptação da metodologia.....	38
4.1.1 Tratamento das amostras.....	38
4.1.2 Preparo das soluções digestivas.....	38
4.1.3 Ensaios preliminares.....	38
4.1.4 Extração de carotenóides da fração micelar.....	45
4.1.5 Aplicação da metodologia para três variedades de batata- doce.....	45
5 CONCLUSÃO.....	50
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

No mundo mais de 1 bilhão de pessoas não consomem alimentos em quantidades suficientes para suprir suas necessidades diárias básicas de energia. Sabe-se, que uma população estimada em três milhões de pessoas, sofre os efeitos da deficiência de micronutrientes. Dentre os grupos que correm maior risco de contrair doenças, de morte prematura e de deterioração de sua capacidade cognitiva por consumirem dietas pobres em micronutrientes essenciais, particularmente em ferro, vitamina A, iodo e zinco, estão as mulheres e as crianças da África Subsaariana, da Ásia Meridional, do Sudeste Asiático, da América Latina e do Caribe.

Atualmente as estratégias utilizadas para combater a desnutrição nos países em desenvolvimento têm seu enfoque no fornecimento de suplementos de vitaminas e minerais para gestantes e crianças, e na fortificação de alimentos com micronutrientes. A fortificação é capaz de aumentar o consumo destes micronutrientes pela população em regiões com infraestrutura adequada e que dispõem de mercados, entretanto, há locais onde há insuficiente infraestrutura de mercado e esta distribuição fica comprometida. Assim, novos enfoques são necessários para complementar as intervenções já em andamento.

A solução definitiva para a erradicação da desnutrição nos países em desenvolvimento é o aumento do consumo de carne vermelha, frango, peixe, frutas e hortaliças, o que pode levar décadas e custar bilhões de reais. Entretanto, recentemente tem se introduzido na agricultura um novo enfoque que considera um sistema integrado para reduzir a desnutrição: a biofortificação.

A biofortificação tem a proposta de atacar a problemática da desnutrição, ao introduzir cultivares que apresentam maior conteúdo nutricional, tais como ferro, vitamina A, iodo e zinco, dependendo do alimento. Seu alvo é a população mais desfavorecida, ao utilizar mecanismos de distribuição de sementes e de integração com os produtores rurais, a fim de complementar as demais intervenções em andamento.

No Brasil, os projetos HarvestPlus, Agrosalud e Biofort, em parceria com diversas universidades, são coordenados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Assim, todas as linhagens promissoras com altos conteúdos de micronutrientes obtidas pela técnica de biofortificação, exigem que sejam conduzidos estudos de bioacessibilidade *in vitro*, como primeira etapa para a determinação da biodisponibilidade.

Estes estudos, no primeiro momento, têm a função de verificar se a nova linhagem apresentará o mesmo incremento quantitativo na sua absorção, que apresentou em seu conteúdo nutricional. Hoje, já se sabe que a quantidade de carotenóides pró-vitamina A presentes nos alimentos não corresponde necessariamente à quantidade absorvida e metabolizada pelo organismo, portanto, esta é uma forma de evitar desperdícios financeiros e humanos em linhagens que não resultarão em boa biodisponibilidade. Para uma melhor determinação dos valores de bioacessibilidade, faz-se necessário, o entendimento dos fatores que levam à liberação destes compostos da matriz do alimento, até a extensão de sua absorção, bem como a influência na promoção e manutenção da saúde humana.

Este trabalho está sendo financiado pelo *Canadian International Development Agency* (CIDA) e faz parte do projeto Agrosalud, chamado: “Combatendo a Fome Oculta na América Latina: cultivos biofortificados com melhor qualidade protéica e maiores teores de vitamina A e minerais essenciais”, que iniciou em 2005. A presente pesquisa começou em maio de 2007 no Laboratório de Cromatografia Líquida da EMBRAPA -Agroindústria de Alimentos-CTAA. A realização deste estudo deveu-se a necessidade de conhecimento dos níveis de carotenóides que são bioacessíveis, após a ingestão das três novas variedades obtidas de batata doce de polpa alaranjada.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo adaptar do modelo de digestão *in vitro* reportado por Failla e Chitchumroonchokchai (2005) e sua aplicação em três variedades de batata-doce de polpa alaranjada, com maiores teores de β - caroteno, a fim de determinar a bioacessibilidade *in vitro* deste composto no alimento. Esta metodologia poderá ser utilizada como uma ferramenta de avaliação mais rápida, mais barata e que contemple a análise de um maior número de alimentos, já que os estudos “*in vivo*” são mais onerosos, complexos e demandam maior tempo. Para tal, os objetivos específicos visam: simular das etapas de digestão oral, gástrica e intestinal humana; adaptar a metodologia para as condições de trabalho do laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Embrapa -CTAA, que futuramente passará a ser uma análise de rotina; Executar a metodologia de digestão *in vitro*, que posteriormente será complementada com o método *in vitro* de captação e metabolismo dos carotenóides por células intestinais humanas Caco-2, utilizada para a realização de estudos de absorção intestinal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Fome e a Deficiência de Vitamina A

Mais de 1 bilhão de pessoas não consomem alimentos em quantidades suficientes para suprir suas necessidades diárias básicas de energia (FAO, 2010), o que corresponde a aproximadamente 20% da população dos países em desenvolvimento. Uma população estimada em três milhões de pessoas sofre os efeitos da deficiência de vitamina A, como a xeroftalmia. A cada ano, 500 milhões de pessoas ficam cegas devido à deficiência de vitamina A. A deficiência deste micronutriente constitui um problema grave em mais de 60 países (WHO, 1996). Sua prevalência é particularmente alta em regiões como a Ásia, África e América Latina, ainda que os inquéritos nacionais sejam escassos. O Brasil foi classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) como área de carência sub-clínica grave. Estima-se que existe uma subestimação do número de casos de carência sub-clínica de vitamina A, inclusive em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, onde a ingestão inadequada de retinol e carotenóides é o principal fator etiológico da deficiência de vitamina A.

Considera-se atualmente que os casos de xeroftalmia representam apenas a ponta do *iceberg* (RAMALHO, FLORES & SAUNDERS, 2002). Durante muito tempo, o papel da carência de vitamina A em outras funções metabólicas, na reprodução, no sistema imunológico e na manutenção da integridade epitelial, foi quase ignorado, possivelmente devido à falta de indicadores clínicos ou patológicos. Calcula-se que o número de crianças com carência de vitamina A seja de cinco a 10 vezes maior do que o número de crianças com carência clínica (SOUZA et al, 2004). A Vitamina A é essencial ao crescimento e desenvolvimento do ser humano. Atua também na manutenção da visão, no funcionamento adequado do sistema imunológico (defesa do organismo contra doenças, em especial as infecciosas), mantém saudáveis as mucosas (cobertura interna do corpo, que recobre alguns órgãos como nariz, garganta, boca, olhos, estômago) e também atuam como barreiras de proteção contra infecções. A deficiência de Vitamina A (Hipovitaminose A) é a única e a mais comum causa de cegueira previsível entre crianças. Além das alterações oculares que podem levar a cegueira, a deficiência contribui para o aumento das mortes e doenças infecciosas na infância.

2.2 Carotenóides

2.2.1 Função e estrutura dos carotenóides

Os carotenóides são um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, com mais de 600 estruturas caracterizadas, com uma produção pela natureza, estimada em 100 milhões de toneladas por ano (MENDÉLEZ-MARTINEZ et al, 2007) e identificadas em organismos fotossintetizantes, como as plantas superiores e algas e não fotossintetizantes, como: fungos,

bactéria e em alguns animais (FONTANA et al, 1997). São responsáveis pela cores do amarelo ao vermelho de frutas e hortaliças. (MERCADANTE & NUNES, 2004).

Esta é uma denominação genérica para um grupo de carotenos (terpenos) e xantofilas (terpenóides), oxigenados, que apresentam cor. Terpenos e terpenóides são substâncias derivadas do isopreno, que possuem característica lipossolúvel, e sua biossíntese se dá a partir da Via do Acetato. Geralmente os carotenóides apresentam 40 átomos de carbono em sua estrutura, sendo conhecidos como tetraterpenos/ tetraterpenóides, e possuem número variado de duplas-ligações conjugadas, sendo todas em configuração trans (“all trans”). Essas ligações conjugadas são responsáveis tanto pela sua atividade biológica, como antioxidantes, bem como pela presença de coloração (MERCADANTE & NUNES, 2004).

Nos vegetais superiores, estas substâncias possuem funções como: proteger o cloroplasto da ação dos radicais livres gerados durante a fotossíntese, servir como atrativo visual para insetos e animais polinizadores e dispersores de sementes e proteger o vegetal da ação de microorganismos invasores (fitoalexina) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

As xantofilas apresentam geralmente como substituintes oxigenados grupamentos hidroxila (β -criptoxantina), cetona (astaxantina), epóxi (violoxantina), ácido (bixina) e aldeído (β -citrauro) (Figura 1). Os carotenóides também podem ser classificados em acíclicos (licopeno), monocíclicos (γ -caroteno) ou bicíclicos (α -caroteno e β -caroteno) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Alguns carotenóides como a luteína, violaxantina, neoxantina e β -caroteno são largamente distribuídos na natureza, enquanto outros como o licopeno, capsantina, bixina estão presentes em grandes quantidades, mas apenas em algumas fontes, como o urucum, tomate, entre outros (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

Em vegetais, os carotenóides apresentam-se em maior concentração e variedade. Os carotenóides estão presentes em todos os tecidos fotossintéticos, junto com as clorofilas e também em tecidos vegetais não fotossintéticos como componentes dos cromoplastos, que podem ser considerados como cloroplastos degenerados (MENDÉLEZ-MARTINEZ, VICARIO & HEREDIA, 2004). A mudança de cor no amadurecimento dos frutos ou envelhecimento dos vegetais é causada pelo desaparecimento das clorofilas, que enquanto presentes mascaram a cor dos outros pigmentos. Os cloroplastos presentes nas frutas não maduras, durante o amadurecimento geralmente se transformam em cromoplastos, e a síntese de novos carotenóides é estimulada (BOBBIO & BOBBIO, 1995). Os carotenóides sempre acompanham a clorofila em uma relação de três a quatro partes de clorofila para uma de carotenóide (MENDÉLEZ-MARTINEZ, VICARIO & HEREDIA, 2004). A presença de carotenóides nos cloroplastos impede a fotossensibilização das clorofilas impedindo assim a destruição dos cloroplastos (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

Os animais são incapazes de biossintetizá-los; seus carotenóides são obtidos através da dieta, sendo absorvidos e acumulados pelo organismo, provavelmente, são produtos resultantes de mudanças metabólicas, geralmente oxidativas, da ingestão de outros carotenóides (FONTANA et al, 1997).

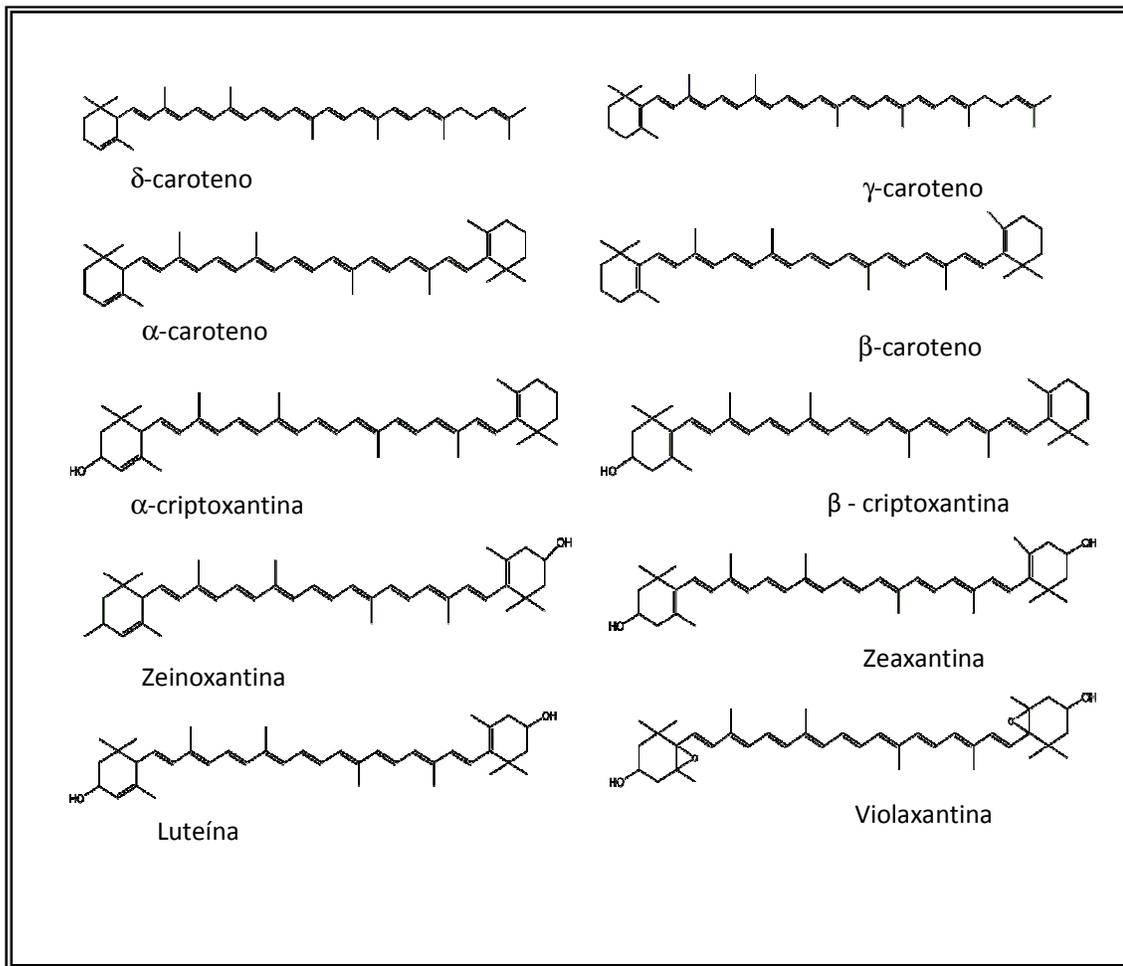


Figura 1: Estruturas de alguns dos principais carotenóides

Os carotenóides fazem parte do grupo dos compostos bioativos, por apresentarem ação biológica sobre determinados alvos biológicos. O interesse sobre eles não está relacionado somente a sua atividade provitamina A, mas também a sua ação antioxidante, a sua participação no sistema de comunicação, nas junções gap célula-célula, bem como no sistema imune (KRINSKY, 2001)

As sucessivas adições de isopreno (5 carbonos) formam um diterpeno (20 carbonos), que sofre uma dimerização formando fitoeno, primeiro carotenóide formado pela via biossintética dos vegetais (Tabela 2). Possui três duplas-ligações conjugadas e absorve radiação na faixa do ultravioleta (100 a 400 nm).

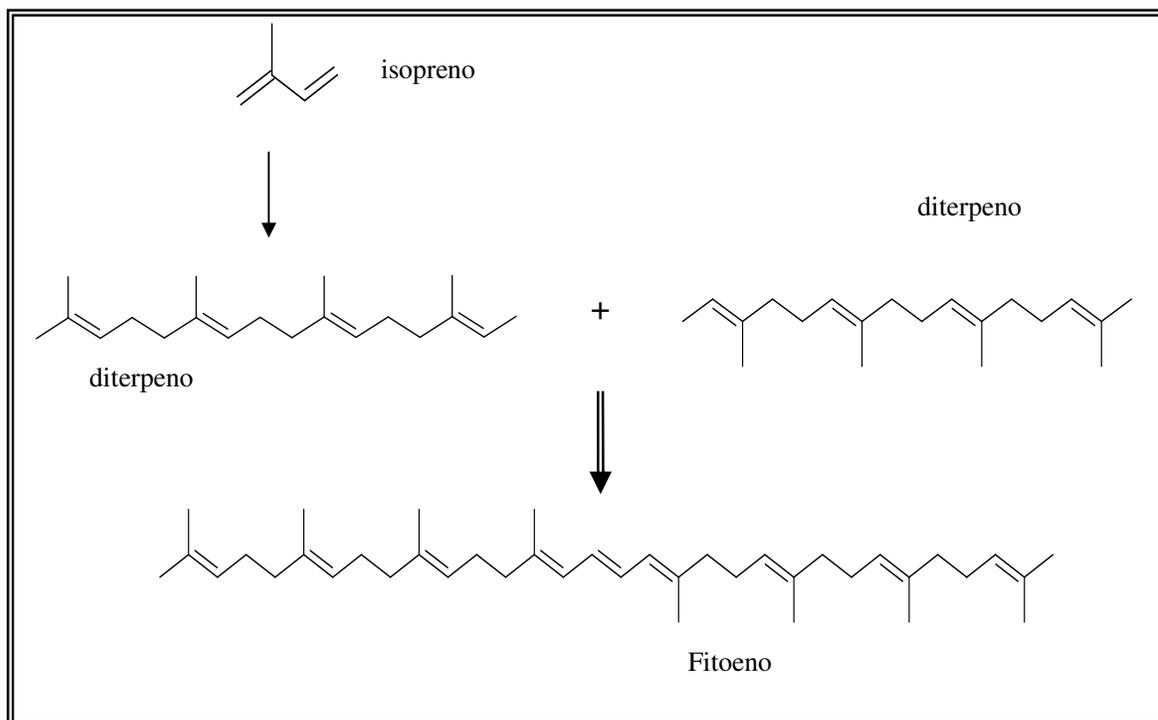


Figura 2 – Síntese do fitoeno a partir do isopreno (Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

O fitoeno constitui o esqueleto de carbono primário para a formação de todos os outros carotenóides a partir de reações de dessaturação, ciclização e oxidação (Tabela 3).

Tanto a atividade antioxidante quanto a sua coloração são decorrentes da presença das duplas-ligações, sendo que quanto maior o número de dupla-ligações conjugadas maior o comprimento de onda absorvido, resultando nas diferentes colorações de carotenóides conhecidas. Uma única dupla-ligação absorve ondas de aproximadamente 160nm, ultravioleta; já o fitoeno, que possui três duplas-ligações conjugadas absorve ondas de aproximadamente 286nm, ainda na faixa do UV; e o licopeno ondas de 470nm de comprimento, faixa de luz visível (OLIVER & PALOU, 2000).

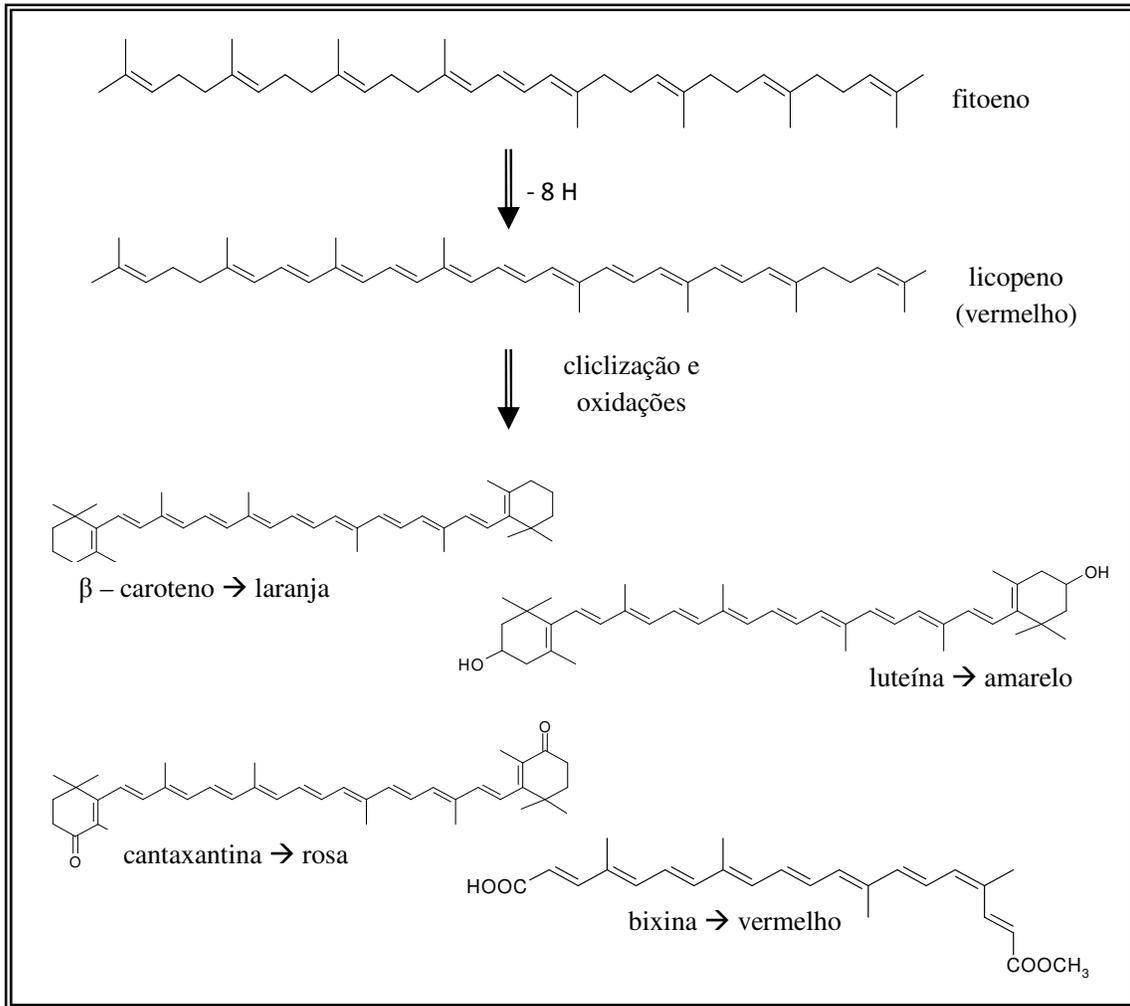


Figura 3 – Esquema de reações que levam a formação dos diferentes carotenóides (Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Estas ligações que conferem as principais características dos carotenóides também são responsáveis pelas suas principais limitações de uso em alimentos processados. As ligações carbono-hidrogênio vizinhas a duplas-ligações (alílico) possuem caráter ácido, o que facilita a abstração do hidrogênio alílico por nucleófilos e radicais. Este é o mecanismo pelo qual os carotenóides exercem atividade antioxidante, pois após a retirada do hidrogênio alílico pelo radical livre, o novo radical gerado será estabilizado pela deslocalização das ligações duplas conjugadas. Contudo, neste processo o carotenóide perde sua coloração e pode gerar outros produtos de degradação de menor peso molecular que podem conferir odor e/ou sabor desagradável ao alimento (SOLOMONS & FRYHLE, 2002).

2.2.2 Fatores de degradação

As duas principais mudanças estruturais sofridas pelos carotenóides são a isomerização das duplas-ligações e a oxidação. Os fatores envolvidos nesses processos são temperatura, luz, presença de oxigênio e pH ácido e presença de antioxidantes, que inibem estas alterações.

A presença de pH ácido é o principal fator responsável pela isomerização das duplas-ligações, ou seja, quando o carotenóide perde sua configuração “all trans” e passa a apresentar duplas de configuração “cis”, ele perde intensidade de cor. Além disso, uma dupla-ligação cis acarreta na perda da atividade de pró-vitamina A, característica do alfa, beta e gama carotenos. A limitação de oxigênio é outro fator determinante na preservação das características dos carotenóides. Mesmo em pequenas quantidades o O₂ dissolvido pode reagir com os carotenóides formando epóxidos, que são os primeiros intermediários de uma reação que os levará a degradação (Figura 4). Essa reação também é acelerada pela luz. Assim, os estágios iniciais de degradação envolvem a epoxidação e clivagem com formação de apocarotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999) e as fragmentações subsequentes resultam em compostos de baixa massa molecular. Estes compostos dão origem a sabores desagradáveis (p.ex.: vinhos e chás) (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008).

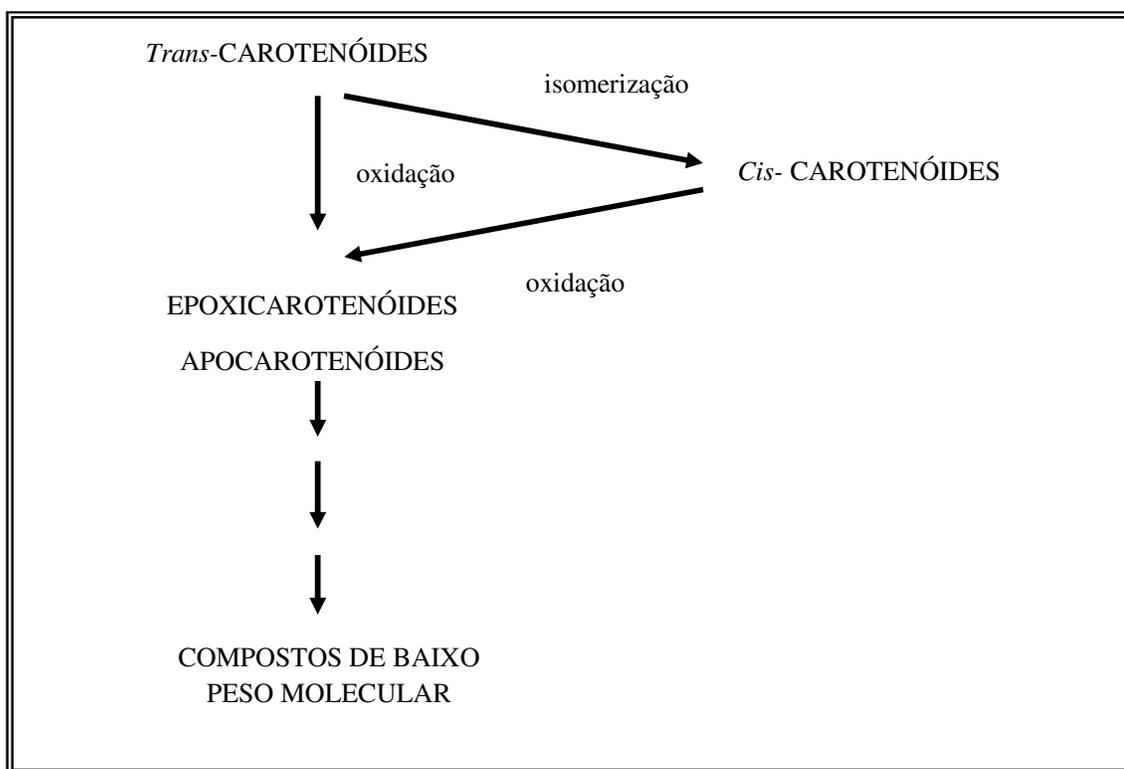


Figura 4 – Esquema de degradação dos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

A maioria dos carotenóides é termolábil, principalmente as xantofilas. Os carotenóides, altamente insaturados, são propensos a sofrer isomerização e oxidação. Calor, luz solar direta ou luz ultravioleta, ácidos e adsorvantes com superfície ativa promovem a isomerização de trans carotenóides, suas conformações usuais, para cis-carotenóides, podendo inclusive, em condições mais enérgicas, causar a destruição desses pigmentos (BOBBIO & BOBBIO, 1995). As degradações oxidativas são as principais causas de grande perda de carotenóides, sendo os estágios iniciais da oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

2.2.3 Conversão dos carotenóides em vitamina A

Cerca de 10% dos 600 carotenóides descritos, são fontes potenciais de vitamina A, destacando-se o β -caroteno, quantitativamente o mais importante, além de α e γ carotenos e criptoxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Estes carotenóides necessitam apresentar pelo menos um anel de β -ionona insubstituível para serem chamados de carotenóides pró-vitamínicos A (Figura 5).

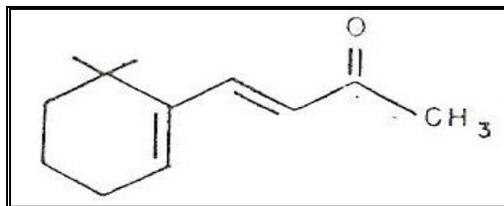


Figura 5- Estrutura química da β -ionona

O β - caroteno (BC) é o carotenóide mais abundante na dieta humana (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008) e o carotenóide mais eficiente como precursor da vitamina A. Para exibir uma atividade pró-vitamina A, a molécula do carotenóide deve apresentar pelo menos um anel não substituído, β -ionona e a posição e número correto dos grupos metil da cadeia poliênica (THURNHAM, 2007). Como resultado, o α - caroteno, a β -criptoxantina, o γ -caroteno apresentam de 30-50% da atividade pró-vitamina A (BAUERNFEIND, 1972) e o 9-cis e o 13-cis isômeros do β -caroteno menos de 10% (NAGAO & OLSON, 1994) em relação ao trans BC. Dois caminhos foram descritos para a clivagem do BC em retinóides (vitamina A): a central e a excêntrica (Figura 6). A principal via é a clivagem central, catalisada por uma enzima citosólica, a β -caroteno 15,15'-oxigenase (BCO), que cliva o BC em sua ligação dupla central (15.-15') para produzir retina, um precursor direto do retinol (vitamina A), e o ácido retinóico (forma ativa da vitamina A). Dois mecanismos para a clivagem enzimática central de BC têm sido propostos (Figura 7). O primeiro é uma reação com a dioxigenase, que requer oxigênio molecular e cujo rendimento é o dioxetano, um intermediário instável, que se converte rapidamente em retina (OLSON, 1964). Mais recentemente, foi elucidado outro mecanismo de reação com a monooxigenase, que necessita de dois átomos de oxigênio de duas diferentes fontes (oxigênio molecular e água) e cujo rendimento é a formação de um epóxido como intermediário (LEUENBERGER, ENGELOCH-JARRET & WOGGON, 2001). Uma série de pontos ainda precisam ser melhor esclarecidos nesta reação, tais como a natureza do complexo metálico envolvido na epoxidação, bem como a extensão das trocas de oxigênio entre as espécies retina ($C_{16}H^{17}O$ e $C_{16}H^{18}O$), oxigênio molecular (^{17}O) e água ($H_2^{18}O$) durante as 7,5 h de reação enzimática a 37°C (LEUENBERGER, ENGELOCH-JARRET & WOGGON, 2001). De fato, tem sido relatado que a maior parte do oxigênio da retina vem da água durante 14 dias. Outros trabalhos ainda precisam ser realizados sobre o mecanismo reacional de clivagem central. Independentemente do mecanismo, o produto final da clivagem central de BC é a retina. Na estequiometria da reação demonstrou-se que 2 mol de retina são formados por 1 mol de BC clivado (DURING & HARRISON, 2004).

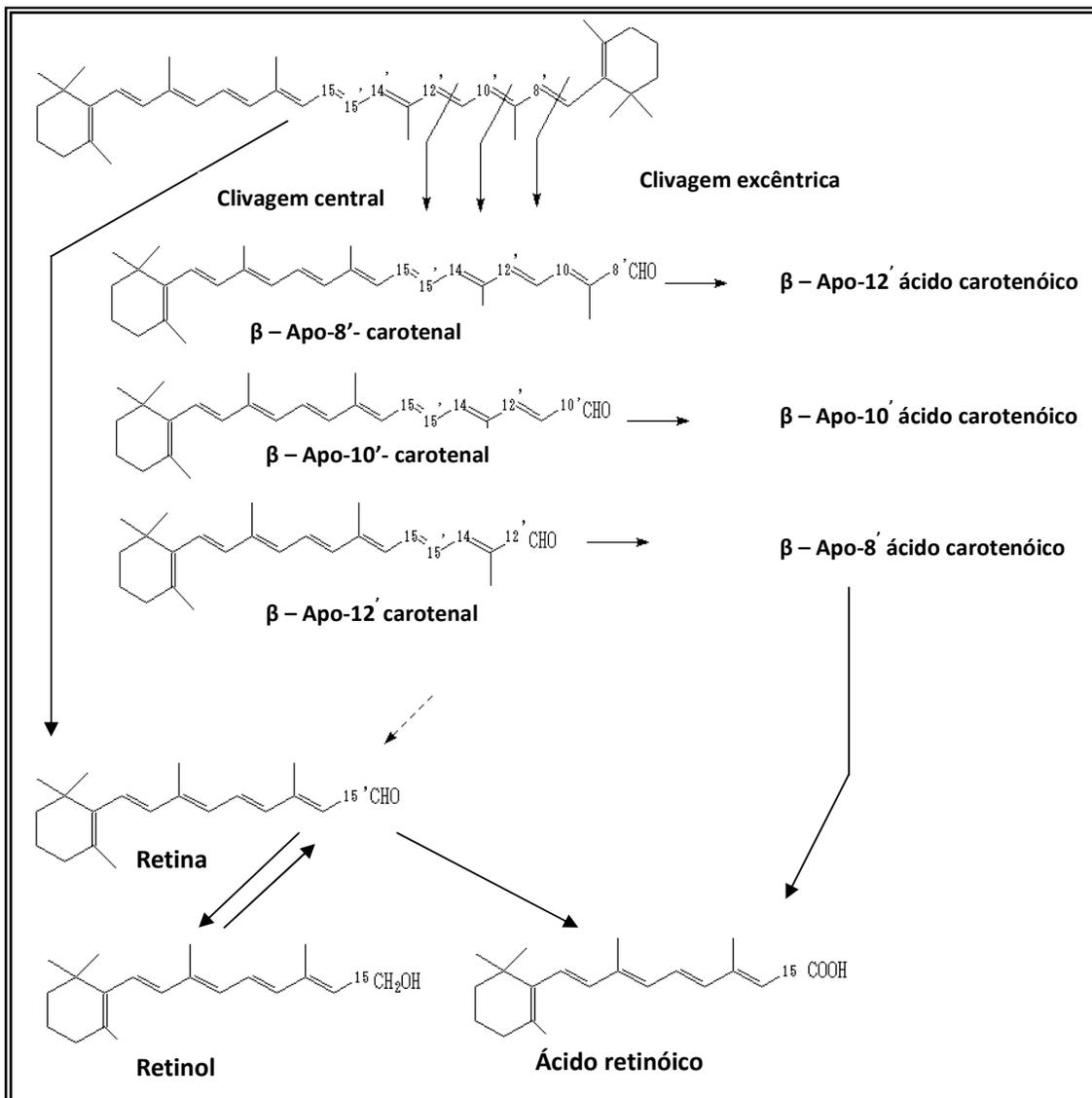


Figura 6- Principais vias metabólicas de β -caroteno: central e excêntrica

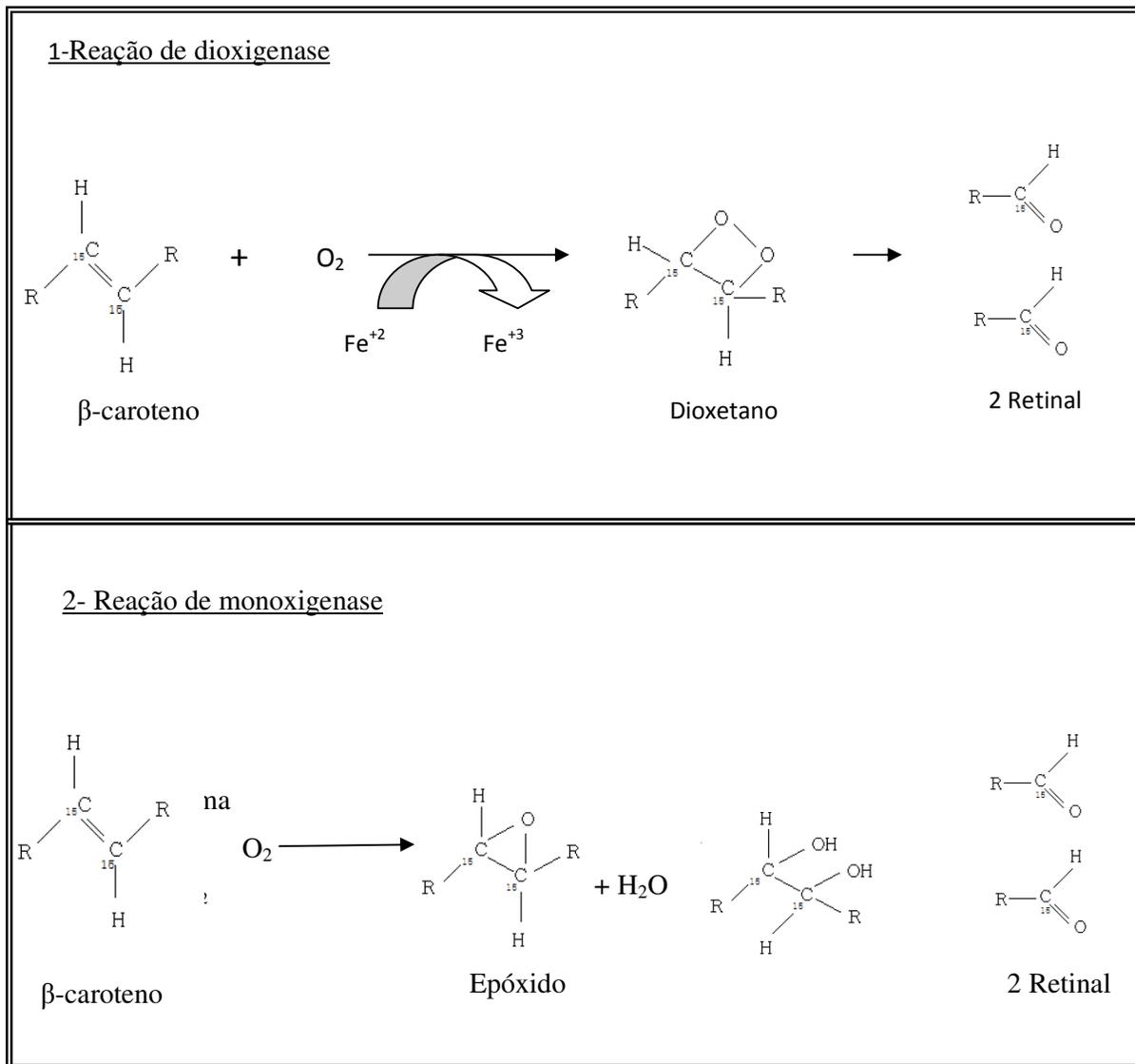


Figura 7- Dois possíveis mecanismos enzimáticos para a clivagem central de β -caroteno

2.2.4 Aplicação como antioxidantes

Na última década, têm sido atribuídos aos carotenóides, efeitos promotores da saúde, decorrentes da sua atividade antioxidante nos sistemas biológicos. Dentre esta funções biológicas destacam-se: imuno-modulação e redução do risco de contrair doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular relacionada a idade (SOUZA et al, 2004).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de provar que a suplementação diária de carotenóides como luteína e zeaxantina podem prevenir doenças crônicas e degenerativas, carcinogênese, inflamações, e outras reações induzidas por radiação ultravioleta (ZANATTA, 2004).

Esta atividade tem inúmeras aplicações e está intimamente ligada com a estrutura dos carotenóides. Isso porque, a capacidade de seqüestrar oxigênio singlete está relacionada com o sistema de duplas ligações conjugadas, e a máxima proteção contra oxidação é dada por carotenóides com nove ou mais ligações conjugadas (AZEVEDO-MELEIRO, 2003), pois os mesmos interagem com os radicais livres. Foi constatado que o licopeno, sendo acíclico, é mais eficiente do que o dicíclico BC, embora os dois tenham 11 duplas ligações conjugadas (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008). Atualmente, o licopeno vem sendo estudado, devido à forte evidência científica em relação à redução do risco dos cânceres de pulmão, esôfago e próstata (WERTZ, SILVER & GORALCZYK, 2004).

2.2.5 β -caroteno (BC)

É um carotenóide bicíclico, do tipo caroteno, que apresenta 11 ligações duplas conjugadas sendo duas dessas localizadas nos anéis. Está presente em diversos alimentos como: cenoura, abóbora, carambola, espinafre, manga, goiaba, mamão, entre outros (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). É o carotenóide mais estudado e nas últimas décadas adquiriu um papel importante no contexto da nutrição e da medicina, pois pode ser converter em vitamina A no corpo humano. Outros carotenóides também podem desempenhar esta função, mas dão origem a uma única molécula de vitamina A, o BC, entretanto, dá origem a duas moléculas de vitamina A, sendo por esse motivo o carotenóide com maior atividade de provitamina A. Além de atuar como provitamina A, o BC também apresenta atividade antioxidante (HENRIQUE et al, 1998).

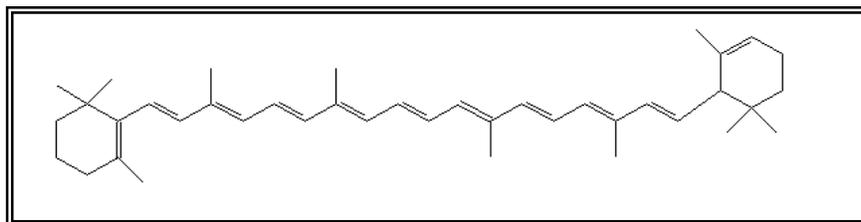


Figura 8- Estrutura do carotenóide β -caroteno

2.3 Vitamina A

A vitamina A é um termo genérico que se aplica apenas para os retinóides (Figura 9) que têm estrutura cíclica da β -ionona: retinol, retinal, éster de retinila e o ácido retinóico (DOLINSKY & RAMALHO, 2003). O retinol é encontrado somente em alimentos de origem animal e em um pequeno número de bactérias. É quimicamente instável e não se encontram em grande quantidade em alimentos e tecidos; entretanto está presente na forma de ésteres, por exemplo no palmitato de retinila.

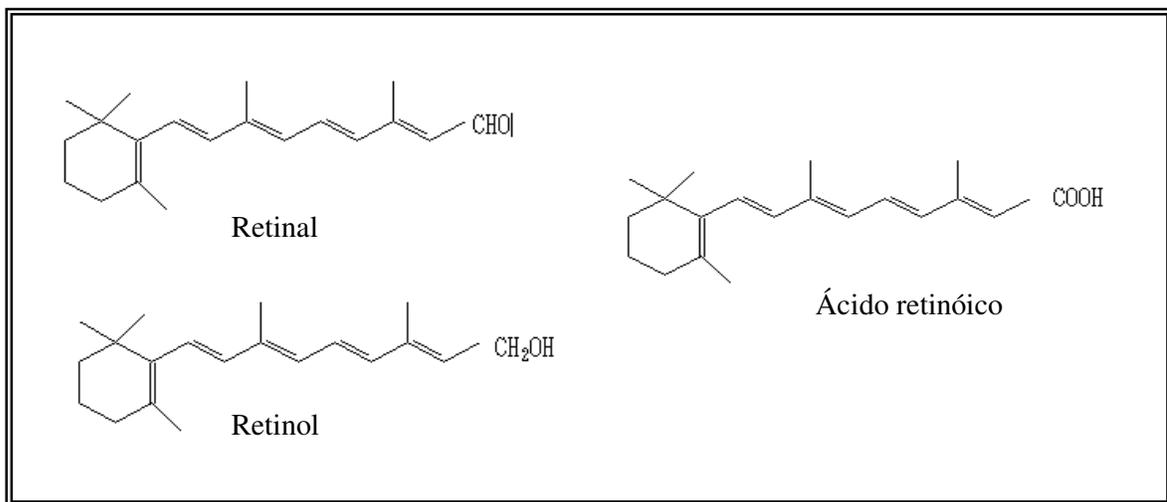


Figura 9 - Estrutura química dos derivados retinóides.

A vitamina A é essencial para o processo da visão, para a diferenciação celular, para o crescimento ósseo, para a reprodução, para a integração do sistema imunológico e para a prevenção de anemia (SOUZA et al, 2004). Em nível mundial, cerca de 60% da vitamina A alimentar vêm das pró-vitaminas A; esta porcentagem aumenta para 80% nos países em desenvolvimento. Esses precursores têm a vantagem adicional de não serem convertidos em vitamina A quando o corpo humano não necessita, evitando assim, potencial toxicidade causada por vitamina A em excesso (SILVA, 2004).

A biodisponibilidade de vitamina A em alimentos e formulações alimentícias varia de acordo com diversos fatores. Com relação, especificamente, aos carotenóides, ressaltam-se as espécies presentes, o tipo de ligação molecular, a quantidade de carotenóides consumida na refeição, a matriz na qual o carotenóide está incorporado, e fatores de absorção e bioconversão. Os trabalhos relacionados à biodisponibilidade de vitamina A pré-formada e provitamina A indicam uma eficiência de absorção de cerca de 70% a 90% para a primeira (ERDMAN, POOR & DIETZ, 1988) comparada com 20% a 50% das provitaminas (ERDMAN, POOR & DIETZ 1988) após a ingestão de alimentos ricos nesses compostos. Uma possível explicação para a baixa biodisponibilidade dos carotenóides em relação à vitamina A seria, provavelmente, o fato de esses sofrerem uma absorção passiva, além de sua lenta taxa de conversão em vitamina A, no intestino. Outra explicação deve-se ao tipo de ligação desses compostos à matriz do alimento (CASTENMILLER et al, 1999).

2.4 Fisiologia do trato digestivo humano

Para o desenvolvimento de um método *in vitro* de simulação gastrointestinal é necessária a compreensão da fisiologia humana. O trato digestivo é composto pelo tubo digestivo e por glândulas secretoras anexas. Ele tem a função de digestão e de barreira seletiva de proteção entre o meio externo e o meio interno. As glândulas secretoras são os anexos e produzem enzimas digestivas por quase toda a sua extensão, desde a boca até o íleo terminal. Essas enzimas têm a função de degradar as macromoléculas presentes nos alimentos ingeridos, transformando-as em moléculas mais simples, em tamanho e complexidade, portanto mais solúveis no meio intestinal e facilmente absorvidas pela mucosa intestinal. Resumidamente, o processo de digestão consiste na entrada do alimento pela boca e saída através do ânus, no entanto todas as etapas do movimento do alimento, de composição dos fluídos biológicos e de condições fisiológicas em que isso ocorre, devem ser cuidadosamente

estudadas. O alimento é ingerido pela boca, causando degradação inicial na presença de saliva, com pH de 6,5. Ele é mastigado, permitindo que os componentes maiores sejam divididos em fragmentos menores. Isso aumenta a área de superfície do material para a digestão no estômago. Todo esse processo é relativamente curto, com duração de poucos segundos a alguns minutos. O material é então engolido e transportado, através do esôfago, para o estômago em poucos segundos. O esôfago tem aproximadamente 25 cm de comprimento. Pela ação das contrações musculares (peristaltismo), o alimento ingerido é transferido da boca até o estômago. No estômago inicia a digestão de proteínas. As células da parede do estômago secretam pepsinogênio inativo e ácido clorídrico (pH < 2). A presença de ácido clorídrico tem duas funções: (1) desnaturar proteínas, (2) transformar pepsinogênio em pepsina. A ação da pepsina no estômago pode digerir proteínas parcialmente (mas não carboidratos e gorduras). O intestino delgado mede aproximadamente 3 m de comprimento no corpo humano. É composto por três partes: duodeno (20-30 cm de comprimento), o jejuno (aproximadamente 110 cm de comprimento) e íleo (aproximadamente 165 cm de comprimento). O intestino delgado é o principal local onde os nutrientes são absorvidos, incluindo gorduras, carboidratos, proteínas, cálcio, ferro, vitaminas, água e eletrólitos. O fígado produz e secreta a bile, que é inicialmente armazenada na vesícula biliar antes de sua liberação para o duodeno. A bile é composta de sais biliares (principalmente o ácido cólico e ácido desoxicólico), pigmentos biliares (bilirrubina), fosfolípidos (lecitina), colesterol e íons inorgânicos (sódio, potássio, cloreto e bicarbonato). O pâncreas secreta suco pancreático para o duodeno. O suco pancreático contém água, bicarbonato, bem como uma série de enzimas digestivas, incluindo amilase, que digere o amido; tripsina, que digere as proteína e lipase. A água e eletrólitos são absorvidos do alimento no intestino grosso ou cólon. Após a absorção de água e eletrólitos, o material residual passa para o reto. O acúmulo deste material residual gera uma pressão retal, levando à necessidade de defecar (DEAN & MA, 2007).

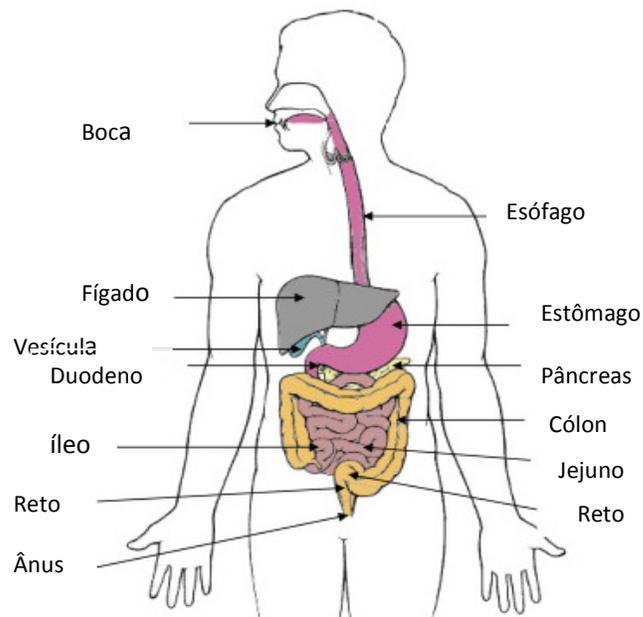


Figura 10 – Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrintestinal e órgãos anexos (DEAN & MA, 2007)

2.4.1 Características da saliva, pepsina, bile, pancreatina e lipase

A secreção salivar é produzida por três principais pares de glândulas: parótidas, submandibulares e sublinguais e elas contribuem, respectivamente, com 25, 70 e 5% da saliva total produzida diariamente. A atividade destas glândulas gera diariamente uma produção em torno de 800 a 1.500 mL. Os principais componentes são proteínas de ação enzimática e sais minerais. Seu pH varia entre 6,0 e 7,4. As proteínas presentes são a alfa amilase (secreção serosa) e mucina (secreção mucosa). A alfa amilase tem a função de iniciar a digestão dos polissacarídeos e a mucina tem a função de proteção e lubrificação das mucosas do trato digestivo. Entre os íons presentes destacam-se o sódio, cloro, potássio, bicarbonato e em menores proporções fosfato, brometo, fluoreto, tiocianato e cálcio. A pepsina é a principal enzima proteolítica do organismo e a única do suco gástrico. O pH ótimo para a sua ação catalítica é ao redor de 2,0. Sua ação se faz sentir em pH entre 1,8 e 2,5, porém sua atividade diminui com a elevação do pH, tornando-se completamente inativa a pH acima de 5,0. Salienta-se, que a produção de ácido clorídrico é tão necessária quanto a produção da pepsina (AIRES, 1999).

A pancreatina é uma mistura de proteínas enzimáticas presentes na secreção exócrina do pâncreas. Ela apresenta as seguintes enzimas e proenzimas digestivas: tripsinogênio, quimiotripsinogênio, procarboxipeptidases A e B, ribonuclease, desoxirribonuclease, prolipase e amilase. Estas proteínas representam 95% do conteúdo protéico do suco pancreático e têm ação específica sobre os três componentes básicos da dieta alimentar: proteínas, carboidratos e gorduras. Para a sua ação sobre esses alimentos, a secreção pancreática deve estar num pH que varie de 6 a 9, com valor ótimo de 7,8. A lipase pancreática funciona como uma esterase, hidrolisando as ligações éster das gorduras neutras. Sua ação catalítica é estimulada principalmente pelos sais biliares e por aminoácidos e cálcio (AIRES, 1999).

A bile hepática humana apresenta cor amarelo-ouro, densidade 1.010 e pH 7,5 a 8,0. Quando coletada em jejum, é uma solução aquosa contendo eletrólitos como sódio, potássio, magnésio, cálcio, cloreto e bicarbonato; e componentes orgânicos como: sais biliares, bilirrubina, colesterol, fosfolipídeos (lecitina, o principal fosfolipídeo da bile, cefalina, esfingomielina, lisolecitina), ácidos graxos, mucina, aminoácidos (tirosina) e proteínas. Os sais biliares são compostos anfipáticos, isto é, possuem na molécula regiões polares ou hidrófilas, que interagem com a fase aquosa, regiões apolares ou hidrófobas, que interagem com a fase orgânica. O caráter anfifílico dos sais biliares permite que eles se situem na interface gordura/água, causando diminuição local da tensão superficial e assim, facilitando e promovendo a dispersão das moléculas das gorduras sob a forma micelar (AIRES, 1999).

2.4.2 Digestão gástrica

Nesta etapa, os carotenóides são processados da mesma forma como os ésteres de retinol (vitamina A) e outros compostos lipossolúveis. Eles necessitam ser liberados da matriz alimentar, emulsionados na fase lipídica do quimo e solubilizados nas micelas para de ser tornarem acessíveis para absorção pelos enterócitos (células epiteliais do intestino). A digestão se inicia na cavidade oral, onde o alimento é mecanicamente triturado e lubrificado com a secreção salivar, antes entrar no estômago. Já neste órgão, o ácido clorídrico e a pepsina são secretados no lúmen gástrico e misturados com o alimento ingerido, resultando na

transferência parcial dos carotenóides da matriz dos alimentos para as gotículas de óleo emulsionadas. Os carotenóides apolares, tais como β -caroteno reside no núcleo de gotículas lipídicas, enquanto carotenóides polares ficam preferencialmente distribuídos na superfície.

2.4.3 Digestão no intestino delgado

A chegada do quimo no intestino delgado está associada com o estímulo de liberação das secreções pancreática e da bile no lúmen. A acidez do quimo é neutralizada pelos íons bicarbonato e as enzimas hidrolíticas se encarregam de degradar os outros componentes da matriz do alimento. Os compostos solúveis em gordura sofrem partição para as gotículas lipídicas. As lipases do lúmen hidrolisam triacilgliceróis, fosfolípídeos e ésteres, emulsionando-os totalmente, nas gotículas de óleo. A colesterol esterase pancreática e triglicérido lipase hidrolisam os carotenóides polares e ésteres de carotenóides livres (JACOBS et al, 1982).

Os sais biliares são fundamentais para a partição dos produtos lipofílicos em micelas (EI-GURAB, UNDERWOOD & LOERCH, 1975; OLSON, 1964). Elas possuem uma estrutura na forma de disco com um diâmetro aproximado de 4 a 60 nm, consistindo de lipídeos hidrofóbicos, cercados por uma camada externa de sais biliares (OLSON, 1994). Não são ainda totalmente compreendidos os processos envolvidos na transferência dos carotenóides para os enterócitos, no entanto, acredita-se que as micelas, uma vez formadas, difundam-se para a camada de água da membrana em borda escova e os carotenóides migrem da estrutura micelar e por transporte passivo, atravessam a membrana plasmática e se alojam no citoplasma (PARKER, 1996; FURR & CLARK, 1997; OLSON, 1999). Estudos anteriores demonstraram que a absorção intestinal de β -caroteno micelizado é influenciada por uma série de fatores intra-luminal, incluindo a composição dos sais biliares, pH, concentração de sódio, e comprimento e grau de saturação dos ácidos graxos (HOLLANDER E RUBLE, 1978; EL-GURAB et al. 1975; OLSON, 1964). Tyssandier e colaboradores (2001), investigaram quais os principais envolvidos na transferência dos carotenóides da emulsão lipídica para as micelas e concluíram que fatores como concentração de sais biliares, tipo de carotenóide e pH são essenciais na compreensão destes eventos.

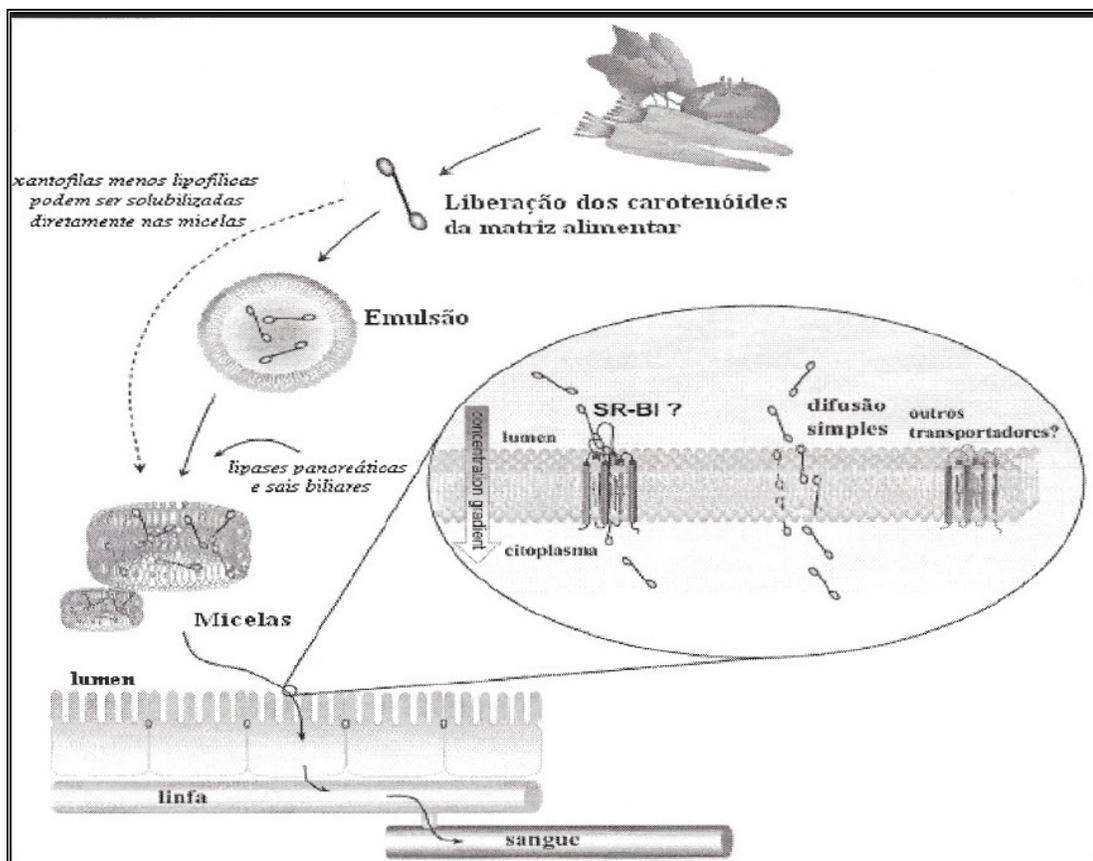


Figura 11- Esquema das etapas de absorção dos carotenóides (YONEKURA & NAGAO, 2007).

2.5 Biodisponibilidade e Bioatividade

O termo biodisponibilidade é utilizado para indicar a proporção da substância que passa para a circulação sistêmica após a administração oral, e atinge o local de ação biológico (RANG et al, 2003), levando em consideração tanto a absorção, quanto a degradação metabólica local. A biodisponibilidade é dita absoluta quando a dose da substância é administrada pela via intravenosa, evitando que a gama de enzimas da parede intestinal e do fígado (efeito de primeira passagem) a inativem. Quando isto ocorre, na situação em que a substância é administrada oralmente, ou por outra via, a biodisponibilidade é dita relativa. A definição de biodisponibilidade inclui o conceito de bioatividade. Este, por sua vez, tratar-se de eventos ligados à forma como os compostos bioativos são transportados e atingem os tecidos alvos, ou seja, como eles interagem com as biomoléculas, o metabolismo ou biotransformação, que podem sofrer, e a geração de um marcador biológico e a resposta fisiológica que provocam (FERNANDEZ-GARCIA, CARVAJAL-LÉRIDA & PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

Muitas vezes os termos biodisponibilidade e bioacessibilidade são utilizados indistintamente, mas é importante salientar que a biodisponibilidade inclui os conceitos de bioatividade, bem como de bioacessibilidade. Ela tem sido definida como a fração de um composto que é liberado de sua matriz no trato gastrointestinal e que, portanto, torna-se disponível para absorção intestinal. Ela inclui toda a seqüência de eventos que ocorrem

durante a transformação digestiva dos alimentos, em material que pode ser assimilado pelo corpo, pelas células do epitélio intestinal.

O termo “biodisponibilidade” é conveniente para fazer generalizações, porém o conceito falha quando se tenta utilizá-lo com precisão quantitativa ou, até mesmo, defini-lo. Para passar do lúmen do intestino delgado para a circulação sistêmica, a substância não deve apenas penetrar na mucosa intestinal, como também deve passar pela parede intestinal. Um dos problemas é o fato de que a biodisponibilidade não constitui uma característica exclusiva do alimento: ela é afetada por variações na atividade enzimática da parede intestinal ou do fígado, no pH gástrico ou na motilidade intestinal. Devido a isso, podemos somente falar sobre a biodisponibilidade de determinada substância, em um determinado indivíduo, numa determinada ocasião (RANG et al, 2003). Raramente, observamos um valor numérico atribuído à biodisponibilidade, e é conveniente tomar cuidado com quantidades ostensivamente mensuráveis, que são utilizadas para impressionar, sem, na realidade, receberem valores (RANG et al, 2003).

Para a avaliação da biodisponibilidade dos compostos bioativos, alguns processos fisiológicos normais devem ser avaliados: a liberação, ou bioacessibilidade que permite que o composto seja liberado da matriz do alimento e incorporado nas micelas, disponibilizando-o para absorção; a absorção, que compreende o movimento do composto do lúmen digestivo para a circulação sanguínea; a distribuição, processo no qual os compostos são difundidos ou transferidos do espaço intravascular para o extravascular; o metabolismo, que é a conversão ou transformação química de um composto às suas respectivas formas mais eletrofílicas e, portanto, mais suscetíveis à última etapa, que é a excreção dos compostos não modificados ou de seus metabólitos conjugados, pelas vias renal, biliar ou pulmonar e a bioatividade. Este conjunto de processos é designado por suas iniciais: LADME.

2.6 Métodos para avaliar a biodisponibilidade de carotenóides

Atualmente, não há métodos validados para avaliação da biodisponibilidade de carotenóides de dietas ou suplementos dietéticos. Alguns métodos de análise utilizados incluem: a resposta plasmática, ou seja, do soro humano após a ingestão de carotenóides; o doseamento em frações de triacilgliceróis ricos em lipoproteínas, misturas de quilomícrons e VLDLs (*very low density lipoprotein*)- lipoproteínas de muito baixa densidade; balanço de massas e isótopos estáveis. O primeiro é um procedimento simples, no entanto apresenta algumas limitações tal como: a resposta sérica para a dose oral ser variável; a concentração de carotenóides no soro representar o balanço entre a absorção intestinal e a liberação do estoque corporal; o soro humano conter uma concentração endógena de carotenóides, o que pode interferir nos valores obtidos; os carotenóides pró-vitamina a serem metabolizados a ésteres de retinila durante a absorção intestinal. O balanço de massas inclui a comparação do consumo de carotenóides e excreção fecal, para estimar a absorção dos carotenóides. A limitação deste método está relacionada a degradação, bem como a secreção endógena de carotenóides. Já o emprego de métodos com isótopos estáveis tem permitido distinguir entre carotenóides de fonte alimentar e os secretados por via endógena. Este método tem permitido avaliar a extensão da conversão intestinal dos carotenóides para a vitamina A, estimar a absorção absoluta, o metabolismo pós-absortivo e o uso de baixas doses, suficientes para evitar influências de pool endógeno (COZZOLINO, 2007).

2.7 Principais fatores que Interferem na Biodisponibilidade

O estudo da biodisponibilidade é bastante complexo, por existirem uma série de fatores capazes de influenciar nos resultados das análises. Estes fatores incluem o tipo de carotenóide, as ligações moleculares existentes nos carotenóides, a matriz do alimento, a quantidade ingerida de carotenóide, efeitos da absorção e bioconversão, estado nutricional, fatores genéticos, fatores relacionados a característica de cada indivíduo e interações com outras substâncias. No entanto, para o objetivo deste trabalho, somente os fatores abaixo mereceram destaque.

2.7.1 Matriz do alimento

Na natureza, os carotenóides de folhas verdes são localizados intracelularmente, dentro dos cloroplastos, por isso não são facilmente digeridos, bem como podem estar complexados com proteínas, diferente do que ocorre nos frutos, onde eles estão presentes nos cromoplastos (CASTENMILLER et al, 1999). Desta forma, isto parece ser um indicativo de que os cromoplastos são mais eficientemente absorvidos (COZZOLINO, 2007). A liberação do carotenóide a partir da matriz alimentar é um importante um passo inicial no processo de absorção. Tem sido sugerido que os caroteno-proteínas têm um efeito inibitório sobre a digestão e absorção de carotenóides (ERDMAN, POOR & DIETZ, 1988). Os estudos sobre o efeito da matriz alimentar sobre a biodisponibilidade de carotenóides em geral são realizados comparando-se as respostas do carotenóide puro formulado, natural ou sintético, com a dose equivalente de carotenóide encontrado em uma fonte de alimento. A trituração e a cocção e do alimento também favorecem o aumento da biodisponibilidade, já a ruptura do tecido celular vegetal facilita a liberação dos carotenóides da matriz, bem como a descomplexação da proteína (ERDMAN, POOR & DIETZ, 1988), no entanto, a liberação de ácidos orgânicos provocados pelo corte, fatiamento, ralagem ou trituração, pode ser suficiente para provocar a isomerização trans-cis, embora esta transformação ocorre mais intensamente no tratamento térmico (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA & AMAYA-FARFAN, 2008)

2.7.2 Métodos de Processamento

O processamento de alimentos tem demonstrado aumentar a biodisponibilidade de licopeno, devido a liberação da matriz do alimento. Com isso, molho de tomate e purê de tomate são tidos como melhores fontes biodisponíveis de licopeno do que as demais fontes de alimentos não cozidos, tais como o tomate cru (GARTNER, STAHL & SIES, 1997). Rodriguez- Amaya (1999) investigou diversas condições de processamento, dentre elas: cocção, como escaldado em água e a vapor, cozimento em tampa e sem tampa, ebulição e salteado. Os resultados indicaram que em preparações domésticas, as perdas de carotenóides aumentam segundo a sequência de cocção: microondas < ao vapor < fervura < refogado. Fritura por imersão, fervura prolongada, assados e marinados, todos provocam perdas consideráveis (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008). A liofilização é um processo onde ocorre a degradação (PARK, 1987; CRAFT, WISE & SOARES, 1993), pois o mesmo aumenta a superfície de contato do carotenóide ao oxigênio, o que gera a sua degradação.

2.7.3 Presença de óleo

A absorção dos carotenóides pelas células da mucosa intestinal é auxiliada pela formação de micelas de ácidos biliares. A produção de bile é estimulada pela ingestão de gordura dietética. O consumo de BC em óleo gera uma resposta plasmática, em torno de cinco vezes maior do que uma resposta de quantidade similar de BC em cenouras (CASTENMILLER et al, 1999). Van Het Hof e colaboradores (2000) descrevem que a quantidade de gordura necessária para a absorção dos carotenóides varia de 3 a 5g por refeição. Vários investigadores concluíram que o carotenóide puro dissolvido em óleo ou dispersões aquosas é bem absorvido (> 50%), enquanto que os carotenóides como BC, em vegetais cozidos como cenoura e o licopeno em suco de tomate, sem óleo, são mal absorvidos. O tipo de gordura presente na dieta pode também influenciar na biodisponibilidade dos carotenóides, já que refeições ricas em triglicérides de cadeia média (TCM) diminuem sua biodisponibilidade, devido ao fato de TCM serem absorvidos via veia porta, diminuindo, assim, a formação de quilomícrons após a refeição (MORTIZ & TRAMONTE, 2006).

O comprimento da cadeia acila do triglicérideo foi positivamente associada a uma maior eficiência de micelização do BC e licopeno. Estudos anteriores demonstraram que o aumento do comprimento da cadeia acil do ácido graxo (oleato > octanoato > butirato), aumenta a captação BC em intestinos delgados perfundidos, de ratos (HOLLANDER & RUBLE, 1978). O maior comprimento da cadeia acil aumenta a hidrofobicidade de produtos da digestão lipídica, possivelmente facilitando a transferência do BC da matriz alimentar. Pesquisadores relatam que o grau de insaturação do grupo acila graxos em óleos alimentares afetam a absorção de carotenóides (CLARK et al, 2000). Os mesmos autores observaram que a absorção do licopeno e da astaxantina, em ratos, foi maior quando oralmente administrado como uma emulsão com azeite de oliva em comparação ao óleo de milho (CLARK et al, 2000). Outros autores observaram uma maior absorção de BC e palmitato de retinol após uma refeição rica em gordura com sebo bovino (46,9% e 50,5% de cadeias acil saturados e mono-insaturados, respectivamente), em vez de óleo de girassol (68,9% grupos acila graxos poliinsaturados) (HU, JANDAEEK & WHITE, 2000). No entanto, outros estudos revelam que a micelização dos carotenóides não foi afetada pelo grau de insaturação dos ácidos graxos C18 ou a posição das duplas ligações (HUO et al, 2007). Existem indicativos de que o grau de insaturação de grupos acil, influenciam nos processos pós-micelização, necessários para a absorção, tais como a entrega dos carotenóides micelizados para enterócitos (CLARK et al, 2000) ou a incorporação e secreção de carotenóides em triacilgliceróis e lipoproteínas ricas (HUO et al, 2007). Huo e colaboradores (2007) verificaram que as quantidades de trioleína e óleo de canola necessárias para o máximo de micelização de carotenos eram baixas (cerca de 0,5-1,0% v / p), quando comparadas com as quantidades de trioctanoína e óleo de coco (cerca de 2,5% v / p). Nestes últimos, as cadeias dos ácidos graxos saturados são de comprimento médio, enquanto que nos primeiros são de comprimento longo.

2.8 Bioacessibilidade: metodologias de digestão *in vitro*

Tradicionalmente, durante décadas, o estudo da biodisponibilidade dos carotenóides em humanos tem sido realizado através do doseamento dos mesmos no plasma. Estes dados são essenciais, uma vez que através deles pudemos conhecer os cinco principais carotenóides circulantes: β - caroteno, α - caroteno, luteína, licopeno e o β -criptoxantina. No entanto, não é capaz de indicar as quantidades reais, dos compostos, que estão acessíveis, absorvidas e metabolizadas no organismo.

Assim, na última década, diversos modelos de digestão *in vitro*, principalmente nas áreas farmacêutica, toxicológica e de meio ambiente, têm sido desenvolvidos, com o intuito de melhor elucidar as etapas que envolvem a bioacessibilidade dos compostos.

Os primeiros ensaios de bioacessibilidade foram relatados por Miller e colaboradores (1981), Ruby e colaboradores (1993, 1996), Oomen e colaboradores (2002) e tantos outros autores na área de contaminantes de solo. Estes autores visavam avaliar o grau de contaminação dos solos, das águas, dos vegetais, por metais com o chumbo e mercúrio, agrotóxicos e pesticidas, e o seu potencial risco a saúde humana, uma vez em contato com estes contaminantes. Diversos modelos de bioacessibilidade (Tabela 1) vêm sendo desenvolvidos e aprimorados, dentre eles: o SBET (Teste simples de bioacessibilidade por extração), PBET(Teste de extração baseado na fisiologia), IVG (modelo gastrointestinal *in vitro*), USP- U.S. Modelo gástrico farmacêutico, MB & SR- Balanço de Massa e recaptção de solo, DIN- modelo estático gastrointestinal, SHIME- Simulador do ecossistema microbiano Intestinal humano de infantes, RIVM- modelo de *digestão in vitro*, TIM- modelo gastrointestinal dinâmico (BOSSO & ENZWEILLER, 2008); e são utilizados como referência para o estudo dos modelos da área de alimentos.

Tabela 1 - Principais métodos de bioacessibilidade, tipo de experimento, constituintes das soluções simuladoras, pH e tempo de contato de cada solução. Todos os testes foram executados em temperatura controlada, na proporção sólido: líquido (S/L) indicada. O último (TIM) foi realizado em fluxo (BOSSO & ENZWEILLER, 2008).

Método	Solução simulada	pH	S/L	Tempo (h)
SBET	Gástrica – Glicina	1,5	1/100	1
PBET	Gástrica – Pepsina, ac. málico, ac. acético, ac. láctico e ac. cítrico	2,5	1/100	1
	Intestinal – Pancreatina, sais de bile e NaHCO ₃	7,0		3
IVG	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,8	1/150	1
	Intestinal – Pancreatina, extrato de bile e NaHCO ₃	5,5		1
U.S.P	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,2	1/100	2
MB & SR	Saliva – Mucina, uréia, Na ₂ HPO ₄ , CaCl ₂ , KCl, NaCl	5,5	1/160	5 s
	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,5	1/2160	2
	Intestinal – NaHCO ₃	7,0	1/4770	4
DIN	Gástrica – Pepsina, mucina	2,0	1/15	2
	Intestinal – Tripsina, pancreatina e extrato de bile	7,5	1/50	6
			1/100	
SHIME	Gástrica – Pectina, Nutrilon plus, mucina, amido, cellobiose, glucose, proteose peptona e leite	5,2	1/2,5	3
	Intestinal – Pancreatina, blie bovina e NaHCO ₃	6,5	1/4	5
RIVM	Saliva – Mucina, amilase, uréia, ac. úrico, NaOH, NaCl, KCl, Na ₂ SO ₄ , NaSCN	6,5	1/15	5 min
	Gástrica – Pepsina, glucose, ac. glucorônico, glucoseamina, BSA, mucina	1,1	1,40	2
	Intestinal – Lipase, pancreatina, uréia, BSA e extratos de bile	5,5	1/100	2
TIM	Saliva – Não especificado	5,0	1/5	5 min
	Gástrica – Lipase, pepsina	2,0	1/30	1,5
	Intestinal – Pancreatina, extrato de bile, NaHCO ₃	7,2	1/50	6

SBET- Simple Extraction Bioaccessibility Test; PBET- Physiologically Based Extraction Test; IVG- *In vitro* Gastrointestinal model; U.S.P- U.S. Pharmacopoeia gastric model; MB & SR- Mass Balance and Soil Recapture; DIN- Static gastrointestinal model; SHIME- Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystems of Infants; RIVM- *In Vitro* Digestion model; TIM- Dynamic Gastrointestinal model.

A maioria dos ensaios *in vitro* baseiam-se na fisiologia do trato gastro-intestinal e simulam as condições da digestão humana. No lugar da saliva e dos sucos gástrico e duodenal naturais, são utilizadas soluções artificiais que simulam o meio de cada um dos compartimentos digestivos. As soluções simuladoras do trato gastro-intestinal, contêm enzimas, aminoácidos, sais orgânicos, inorgânicos e ácido clorídrico (Tabela 2). É possível identificar três áreas distintas e interligadas do sistema digestivo humano, que são importantes na concepção da metodologia de digestão. Essas três áreas são a boca, o estômago e o intestino delgado. A boca é um compartimento essencial de todo o processo da digestão humana, no entanto, pelo fato do alimento permanecer neste local durante um período curto de tempo, muitas vezes não é incluída nos métodos *in vitro*. No estômago, o alimento está sujeito a pepsina em pH 2 por alguns minutos (normalmente 8 minutos) a várias horas (3 h), e no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), fica sujeito a ação do suco intestinal composto por enzimas como tripsina, pancreatina e amilase, sais biliares e bicarbonato. Quando os processos físicos, que ocorrem *in vivo* não são reproduzidos (corte, mistura, hidratação, mudanças nas condições de tempo, o peristaltismo), o modelo *in vitro* é definido como um estático ou bioquímico. Os modelos dinâmicos imitam os processos físicos *in vivo*, de modo que consideram novas variáveis, tais como alterações na viscosidade do digerido, redução do tamanho das partículas, difusão e partilha de nutrientes (FERNANDEZ-GARCIA, CARVAJAL-LÉRIDA & PÉREZ-GÁLVEZ, 2009). Assim, é fundamental o entendimento de que os estudos *in vivo* em seres humanos são a abordagem padrão para determinar a bioacessibilidade dos nutrientes e compostos bioativos, ou seja, para que o modelo de bioacessibilidade seja confiável e eficaz, é necessário que sejam realizados ensaios *in vivo* e *in*

vitro, e que os resultados obtidos sejam correlacionados. Na prática, para o estudo destas metodologias, alguns fatores merecem atenção, dentre eles:

- **Temperatura:** As análises devem ser realizadas na mesma temperatura corporal, ou seja, 37 ° C.
- **Agitação das amostras:** Visa imitar os movimentos peristálticos do esôfago.
- **Compartimento oral:** Devido ao curto período de tempo que o alimento permanece na boca, esta etapa pode ser opcional. No entanto, se for incluída, o alimento deve ser submetido a saliva com pH 6,5, por cerca de 2 minutos.
- **Compartimento estomacal:** A amostra deve ser submetida a pepsina e ácido clorídrico em um pH de 1-4 para cerca de 3 h.
- **Compartimento intestinal (delgado):** A amostra deve ser submetida a sucos intestinais com pH de 4 -7,5, por cerca de 7 h.

Tabela 2 – Composição típica (constituintes orgânicos e inorgânicos) e concentrações dos sucos artificiais (saliva, suco gástrico, duodenal e bile) dos modelos de digestão (WITTSIEPE et al, 2001)

Suco	Constituintes orgânicos	Concentração (mg/L)	Componentes inorgânicos	Concentração (mg/L)
Saliva	α -amilase	145	KCl	895
	Mucina	5	KSCN	200
	Uréia	200	Na ₂ SO ₄	570
Gástrico			NaCl	290
			NaH ₂ PO ₄	885
			CaCl ₂	200
	Glicose	650	HCl	1380
	Ácido glucurônico	20	KCl	820
	Mucina	1500	NaCl	2750
	Nácido acetilneuramínico	50	NaH ₂ PO ₄	270
	Pepsina suína	1000	NH ₄ Cl	305
Soro albumina bovina	1000			
Uréia	85			
Duodenal	Lipase	500	CaCl ₂	200
	Pancreatina	3000	KCl	560
	Soro albumina bovina	1000	KH ₂ PO ₄	80
	Ácido esteárico	5	MgCl ₂	50
	Uréia	100	NaCl	7010
			NaHCO ₃	1800
Bile	Bile	3000	CaCl ₂	220
	Soro albumina bovina	1800	KCl	370
	Uréia	250	NaCl	5250
			NaHCO ₃	4200

O estudo da bioacessibilidade *in vitro* de carotenóides é realizado como nas demais áreas, utilizando também modelos de digestão *in vitro*. Para os carotenóides, os métodos buscam quantificar os carotenóides que são liberados da matriz do alimento durante a digestão e transferidos para as micelas, ou seja, sua eficiência de micelização, que na prática representa a quantidade de carotenóide transferido da fração digerida (alimento digerido) para a fração micelar (aquosa). Na área de alimentos, os modelos em uso são adaptações e modificações dos diversos modelos existentes nas demais áreas.

Os principais autores de metodologias de bioacessibilidade de carotenóides são: Garret, Failla, Sarama (1999), Granado-Lorencio e colaboradores (2007), Failla & Chitchumroonchokchai (2005), Thakkar & Failla (2007, 2008). Muitos deles aplicaram o modelo de digestão “*in vitro*” de carotenóides, associado a captação celular, com a cultura de células Caco-2, a fim de avaliar sua absorção. Oomen e colaboradores (2002) são autores

muito citados, pois compararam cinco metodologias de digestão ‘in vitro’ de metais pesados para avaliação dos níveis de contaminantes do solo e fizeram uma comparação minuciosa com relação a composição salina, enzimática e pH das etapas de digestão. Concluíram também que a maioria utiliza o método de digestão estático, que simula o trânsito seqüencial dos compostos no trato gastrointestinal, ou seja, desde a boca até o intestino delgado, seqüencialmente, assim como o método utilizado neste trabalho. Muitas outras metodologias foram desenvolvidas a fim de prever a bioacessibilidade dos carotenóides, outras a fim de avaliar a influência do processamento (MENDEZ & MOSQUERA, 2007; THAKKAR et al, 2009), e outra que visaram estudar a estabilidade, isomerização, hidrólise e transferência dos carotenóides para a fração micelar (GRANADO- LORENCIO et al, 2007). O modelo desenvolvido por Granado-Lorencio e colaboradores (2007) é uma otimização do método validado de Oomen e colaboradores (2002), que incluiu o processo completo de digestão *in vitro* (simulação de mastigação e solução de saliva, sucos gástricos e intestinais fases), mas com adição de lipase pancreática humana e outras enzimas específicas como a colesterol esterase, fosfolipase A2, para alcançar condições mais fisiológicas. O método aplicado por Hedren e colaboradores (2002) visa estimar a quantidade máxima de carotenóides liberados da matriz alimentar, sem o posterior isolamento da fração micelar e determinação da captação celular.

Tabela 3- Condições experimentais, compostos analisados, matriz utilizada e técnica de análise dos principais modelos de digestão *in vitro*

Composto	Modelo de Digestão <i>in vitro</i>	Alimento	Técnica de análise	Referência
Carotenoides (em geral)	Amostra é ajustada para pH 2, adição de 2 mL de pepsina suína (40 mg / ml em 0,1 M HCl é transferida e incubada a 37 ° C em banho-maria a 95 rpm por 1 h. Em seguida, o pH é aumentado para 5,3 e adicionado extrato de bile e pancreatina (9 ml contendo 2 mg / mL pancreatina e 12 mg / mL de extrato de bile em 100 mmol / L de sódio solução de bicarbonato).O pH de cada amostra é aumentado para 7,5 e 10 ml da amostra é levado para banho de água agitação (rpm 95) a 37 ° C por 2 h.	Purê infantil	CLAE	GARETT et al, 1999
α - caroteno e isômeros	Descrito por Garrett et al. 1999, com pequenas alterações, como adição de pâncreas lipase (10 mg em 0,1 mol / L de bicarbonato de sódio), ajuste do pH para 7,0 (0,1 a 1 mol / L de NaOH. Conclusão das fases gástrica e intestinal, 2 mL foram cobertos com nitrogênio. Amostras (6 mL) foram centrifugadas 16700g a 4 ° C por 30 min. A fração micelar é obtida por filtragem 0,22 poros	Applesauce	CLAE	FERUZZI et al, 2006
β - caroteno	Descrito por Garrett et al, 1999, com 1,5 g de mangas com 1 g de carne de frango processada contendo 5,6% de gordura, 8,5% de proteína e 0% de fibra. A fase gástrica com pepsina suína em pH 3 por 1 h em 37 ° C, sob agitação recíproca (RPM 95). A fase intestinal ação pancreatina suína e de extrato de bile no pH 7 por 2 h. Centrifugação com 16700g a 4 ° C por 20 min e filtro Millex seringa com poros 0,22	Manga	CLAE	ORNELAS-PAZ ET al, 2008

	μm			
β - caroteno/ xantofilas	Descrito por Garrett et al. 3 g de amostra com 3000 unidades de a-amilase /g de amostra. Uma solução de sal basal contendo NaCl, KCl e CaCl ₂ (final concentrações de 120, 5 e 6 mmol / L, respectivamente) é substituída por 150 mmol / L como a solução. KCl é adicionado como outro sal além de NaCl e CaCl ₂ . O pH da digestão gástrica é ajustado para 2,5 +/- 0,1, em vez de 2,0 +/- 0,1 e que na digestão intestinal é ajustado para 6,5 +/- 0,1, em vez de 7,0 +/- 0,1. Lipase pancreática porcina (concentração final 0,2 g / L em 100 mmol / L NaHCO ₃), além de pancreatina e extrato de bile. Isolado da digestão é centrifugado a 5000 g, 45 min a 4°C/ carboxil-lipase em fase intestinal.	mandioca/milho	CLAE	THAKKAR ET al, 2007.; 2008.
Carotenóides- carotenos e xantofilas	Metodologia aplicada neste trabalho/ carboxil-éster lipase	Mandioca, milho, batata, perê infantil	CLAE	FAILLA & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005

Failla & Chitchumroonchokchai (2005) realizaram um vasto estudo sobre as ferramentas existentes para o “screening” de carotenóides e compararam os resultados obtidos em ensaios realizados *in vivo* (humanos e cobaias) e *in vitro* (modelos de digestão), buscando chegar a respostas mais conclusivas, sobre sua a eficiência destes modelos (tabela 4).

Tabela 4- Condições experimentais, compostos analisados, matriz utilizada e técnica de análise dos principais modelos de digestão *in vitro*

Estudos em humanos e modelos animais	Modelos <i>in vitro</i>
<i>Digestão, fonte e processamento</i>	
Carotenóides são estáveis durante as fases oral, gástrica e intestinal	Alta recuperação e limitada isomerização durante a digestão
Micelização da luteína > carotenos apolares	Micelização da luteína > BC > licopeno
Baixa absorção se pancreatina e bile são insuficientes	Baixa micelização quando pancreatina e bile estão insuficientes ou ausentes
Alta absorção com alimento cozido	Alta micelização com alimento cozido
Alta absorção com alimento e óleo	Alta micelização com alimento e óleo
Alta absorção do isômero <i>trans</i> x <i>cis</i> de BC	Alta micelização do isômero <i>trans</i> x <i>cis</i> de BC

2.9 Micelização

No meio aquoso e desde que atinjam certa concentração, os sais biliares são capazes de formar agregados moleculares, chamados de micelas. Nestas estruturas, as regiões polares se dirigem para fora em direção à fase aquosa, enquanto as regiões hidrófobas se colocam no interior das micelas e se mantêm unidas por interações hidrofóbicas. A estabilidade da

dispersão micelar é mantida, pois cada uma delas apresenta a mesma carga, e se repelem mutuamente.

A absorção dos carotenóides da dieta dá-se pela transferência dos carotenóides da matriz do alimento para dentro das micelas. Esta é uma etapa crucial no processo digestivo e, portanto, merece bastante atenção. Ryan e colaboradores (2008) demonstraram que os teores de BC em courgettes, pimenta vermelha e tomate reduziram significativamente após a digestão, quando os mesmos foram grelhados, cozidos, cozidos em microondas ou cozidos sob vapor, no entanto todos os métodos aumentaram a transferência de BC para as micelas. Segundo estes autores, o cozimento em microondas e grelhado foram os métodos mais prejudiciais a incorporação das xantofilas, como por exemplo a β -criptoxantina, nas micelas. Failla e Chitchumroonchokchai (2008), ao investigarem a micelização do licopeno e do BC em *Momordica cochinchinensis*, um fruto originário da Ásia, concluíram que a micelização do isômero cis-licopeno era maior do que do trans, mas era menor do que de BC.

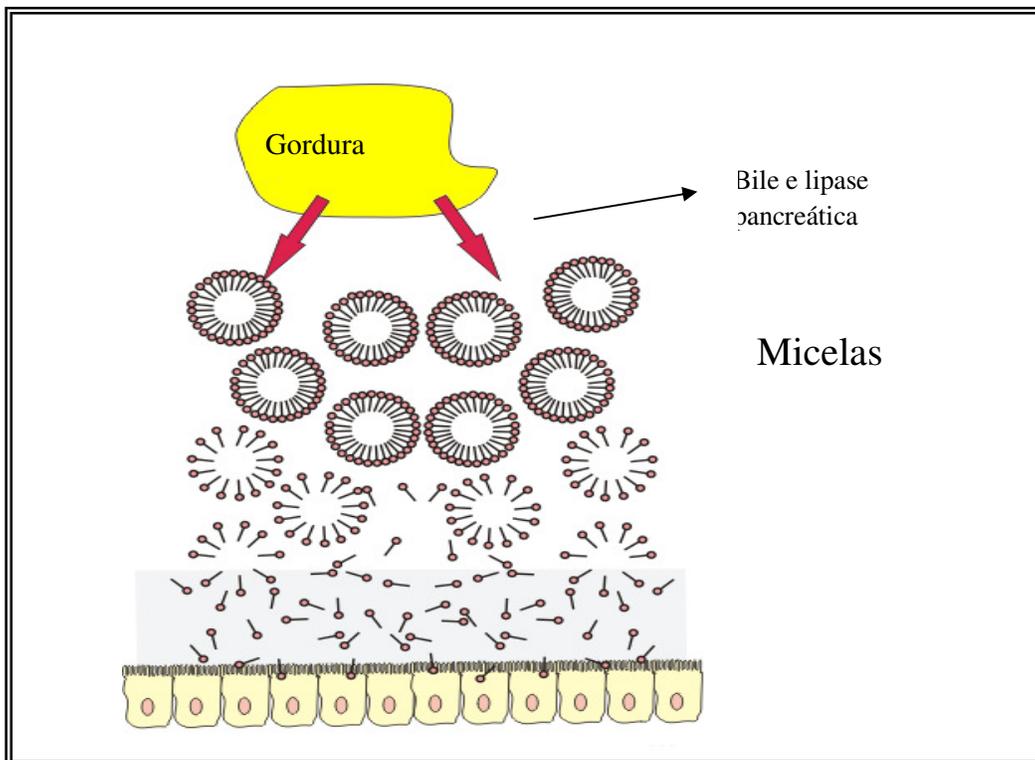


Figura 12- Esquema da formação das micelas pela ação da bile e lípase pancreática (Fonte: www.en.witibooks.org/digestion_&_Absorption)

Em outro estudo realizado com adição de vários tipos de óleos, incluindo o óleo de canola e de côco em saladas, verificou-se que a eficiência de micelização dos carotenóides foi influenciada pela estrutura de carotenóides, ou seja, a eficiência de micelização é inversamente proporcional à hidrofobicidade, com luteína (+ zeaxantina) > α - caroteno, BC > icopeno (GARETT, FAILLA & SARAMA, 1999; HUO et al, 2007).

2.10 Batata-doce de polpa alaranjada

A batata-doce é cultivada em 111 países, sendo que aproximadamente 90% da produção é obtida na Ásia, apenas 5% na África e 5% no restante do mundo. Apenas 2% da produção estão em países industrializados como os Estados Unidos e Japão. A China é o país que mais produz, com 100 milhões de toneladas (FAO, 2000).

A batata-doce é cultivada em locais de climas diversos como o das Cordilheiras dos Andes; em regiões de clima tropical, como o da Amazônia; temperado, como no do Rio Grande do Sul e até desértico, como o da costa do Pacífico. No Brasil, a batata-doce é cultivada em todas as regiões. Embora bem disseminada no país, está mais presente nas regiões Sul e Nordeste, notadamente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco e Paraíba.

A cultura da batata-doce tem sido cultivada de forma empírica pelas famílias rurais, em conjunto com diversas outras culturas, visando a alimentação da família, principalmente na primeira refeição diária, utilizada na forma de raízes cozidas, assadas ou fritas. Com o crescente êxodo rural, grande parte do consumo de batata-doce foi substituído pelo pão e por hortaliças de mais fácil preparo e de maior atratividade, como batata, cenoura e tomate, que eram anteriormente pouco consumidas pela família rural, por serem de difícil cultivo em hortas domésticas. (BOSCO, 2009)

Como na região Norte e Nordeste (Maranhão e Sergipe), esta cultura assume maior importância social, por se constituir em uma fonte de alimento energético, contendo também importante teor de vitaminas e de proteína, levando-se em conta a grande limitação na disponibilidade de outros alimentos em períodos críticos de estiagem prolongada. Está sendo realizado o melhoramento do conteúdo nutricional de cultivos que são importantes em regiões em desenvolvimento, tais como: o arroz, feijão, milho, mandioca e batata doce. Os cultivos biofortificados são aqueles desenvolvidos através de técnicas de fitomelhoramento que apresentam maiores conteúdos de nutrientes e melhores características agrônomicas, diferentemente das variedades atualmente plantadas e consumidas. Esta técnica está em fase de desenvolvimento, portanto, já existem algumas variedades com alto teor destes micronutrientes, mas ainda não foram atingidas as metas finais, por isso, faz-se referência a estes cultivos, como alimentos de polpa alaranjada (alusão a cor do β -caroteno). As técnicas de biofortificação envolvem a realização de cruzamento de linhagens com características nutricionais melhores, livre polinização (hibridização), utilização de solo com alto conteúdo mineral e a engenharia genética, através da transgenia.

Assim, o projeto de Biofortificação tem buscado realizar o melhoramento convencional de espécies de batata-doce regionais, a fim de obter uma variedade com alto teor de β -caroteno. Resultados significativos já foram observados na Índia, onde a redução da cegueira vem sendo obtida, através do fornecimento de 100g/dia de batata-doce de polpa alaranjada para crianças de até 5 anos (BOSCO, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostras

As três amostras de batata doce de polpa alaranjada foram fornecidas pelo Campo Experimental da Embrapa no estado do Maranhão. Elas foram cortadas manualmente, sofreram quarteamento (CECCHI, 2003) e depois homogeneizadas em moinho. As amostras foram preparadas em duplicata e foram acrescidas 5% de óleo de canola as amostras. Assim, para o estudo de matrizes alimentícias pobres em lipídeos, faz-se necessário a adição intencional nos mesmos para viabilizar a análise.



Figura 13 - Fotos das três variedades de batata doce de polpa alaranjada. Da esquerda para a direita variedade 1, 2 e 3.

3.1.2 Solventes da fase micelar

- Água Milli- Q[®]
- Cloreto de sódio grau P.A
- Éter de petróleo grau HPLC Tedia[®]
- Sulfato de sódio grau pesticida Tedia[®]
- Sulfato de sódio anidro Tedia[®]
- Acetona grau HPLC – Tedia[®]
- Éter de petróleo grau HPLC - Tedia[®]

3.1.3 Solventes – Análise Cromatográfica

- Acetona grau HPLC – Tedia[®]
- Acetonitrila grau HPLC - Tedia[®]
- Éter de petróleo grau HPLC - Tedia[®]

- Metanol grau HPLC – Tedia[®]
- Éter metil-*terc*-butílico grau HPLC – Tedia[®]

3.1.4 Solventes - digestão *in vitro*

- KCl sigmaultra Sigma-Aldrich[®]
- NaPO₄ sigmaultra Sigma-Aldrich[®]
- NaOH sigmaultra Sigma-Aldrich[®]
- Ureia sigmaultra Sigma-Aldrich[®]
- NaCl sigmaultra Sigma-Aldrich[®]
- CaCl₂ anidro Sigma-Aldrich[®]
- KSCN sigmaultra Sigma-Aldrich[®]
- NaH₂PO₄ sigmaultra Sigma-Aldrich[®]
- HCl suprapur Merk[®]
- Pepsina 1:10.000 Sigma-Aldrich[®]
- NaHCO₃ Sigma-Aldrich[®]
- α-amilase tipo VI-B Sigma-Aldrich[®]
- Mucina tipo II Sigma-Aldrich[®]
- Extrato de Bile Porcina Sigma-Aldrich[®]
- Pancreatina- Porcina Sigma-Aldrich[®]
- Lipase tipo II de pâncreas de suino Sigma-Aldrich[®]
- Óleo de canola salada[®]

3.1.5 Material de consumo

- Tubos de polipropileno com rosca 50mL
- Tubos de centrífuga 50 mL Sorval[®]
- Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 10 a 100µL – Brand[®]
- Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 100 a 1000µL – Brand[®]
- Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 0,5 a 5mL – Brand[®]
- Balões volumétricos âmbar com capacidade para 25, 50, 100 e 200mL
- Gral e pistilo de porcelana
- Filtro com placa de vidro sinterizado de porosidade 4 e capacidade de 150mL
- Kitassatos com capacidade para 125, 250 e 500mL
- Funis de separação com capacidade para 150, 250, 500 e 1000mL
- Funis raiados de vidro com 10 cm de diâmetro
- Funil de vidro para sólidos com 15cm de diâmetro
- Bastão de vidro com 30cm de comprimento
- Espátula de aço inox com 40cm de comprimento
- Béqueres com capacidade para 50, 100, 250 e 500mL
- Erlenmeyer âmbar de 125mL com tampa
- Balão âmbar de fundo redondo de 125, 250 e 500mL

- Vials âmbar para injetor automático com capacidade para 1,8 e 4mL – Waters®
- Redutor de volume para vial com volume de 200µL
- Celite 545 – Tedia®
- Hidróxido de magnésio PA - Merck®
- Sulfato de sódio anidro - Quimex®
- Cloreto de sódio PA - Quimex®
- Lã de vidro fibra média - Proquimios®
- Água ultrapura (18,2MΩ) – Milli-Q®
- Nitrogênio grau 4.6 – White Martins®
- Ar comprimido

3.1.6 Equipamentos

- Balança analítica BEL®
- Banho-maria com agitador orbital gyromax TM
- Ultra-centrífuga sorval® stratos
- Moinho simples IKA® A11
- Pipetas automáticas Transferpette® 100-1000µL, 0,5-5 ml
- Sistema de purificação de água Milli-Q® A10 e Ellix®
- Sistema de N₂
- Pipetador automático com capacidade para 100 a 1000µL – Brand®
- Pipetador automático com capacidade para 0,5 a 5mL – Brand®
- Balança analítica (0,1mg) modelo 2104 – Bel Engineering®
- Homogeneizador ultra Turrax T18 Basic – Ika®
- Agitador tipo vórtex modelo Genie 2 – Scientific Industries®
- Sistema de purificação de água modelo Ellix/Rios 5 e Milli-Q A10 – Millipore®
- Cromatógrafo líquido modular modelo W600 – Waters®
- Injetor automático modelo 717 plus - Waters®
- Cromatógrafo líquido modelo Alliance® 2695 – Waters®
- Detetor de arranjo de fotodiodos modelo W26996 – Waters®
- Coluna cromatográfica YMC® C₃₀ Carotenoid (250x4,6xmm; 3µm) - Waters®
- Espectrofotômetro Modelo UV-1800 – Shimadzu®
- Software de controle e aquisição de dados Empower® – Waters®
- Geladeira modelo DF45 - Eletrolux®

3.2 Métodos

3.2.1 Digestão *in vitro*

Fase oral - Foram pesados 10g de cada amostra em tubo 50 ml com rosca de polipropileno. Adicionou-se 7 mL de solução contendo α-amilase, mucina e demais sais, como descrito por Oomen et al. (2003), em cada tubo. As amostras foram colocadas sob atmosfera de nitrogênio, seladas, homogeneizadas e transferidas para o banho orbital por 37°C a 60 rpm por 10

minutos. Após passado o tempo, cada amostra foi transferida para uma cuba com gelo (Figura 17) (FAILLA & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

Fase gástrica - Adicionou-se solução A (120 mM NaCl, 6 mM CaCl₂ e 5 mM KCl) em cada tubo com amostra vindo da fase oral, até atingir o volume de 30 mL, em seguida foram homogeneizadas em vórtex. Ajustou-se o pH para 2.5 +/- 0.1 utilizando HCl 1 M. Após, foi adicionado 2 mL de solução estoque de pepsina (40 mg/mL 100mM HCl) em cada tubo. Ajustou-se o volume para 40 mL com solução A (concentração final de pepsina foi de 2mg/mL). Os tubos foram colocados sob atmosfera de nitrogênio e selou-se o tubo e incubados no banho orbital por 1 h a 37°C a 60 rpm (Figura 17)(FAILLA & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).



Figura 14 - Foto tirada do banho-maria com agitador orbital gyromax TM, durante a digestão gástrica.

Fase intestinal- Removeu-se os tubos do banho e colocou-se em gelo. Adicionou-se 1 M de NaHCO₃ a todos os tubos vindos da fase gástrica, para o ajuste do pH para 6.0 +/- 0.2. Adicionou-se 3 mL de solução estoque de extrato de bile (40 mg extrato de bile/ mL 100 mM NaHCO₃) a cada tubo. Adicionou-se 2 mL de solução estoque de pancreatina-lipase (10 mg de pancreatina + 5 mg lípase/ mL 100 mM NaHCO₃). Ajustou-se o pH para 6.5 +/- 0.1 com 1 M NaOH. Aumentou-se o volume final para 50 mL com a solução A. Colocou-se a amostra sob atmosfera de nitrogênio e selou-se o tubo. Incubou-se a amostra no banho orbital por 2 h a 37°C a 60 rpm. As concentrações finais de bile, pancreatina e lipase foram de 2.4, 0.4 e 0.2 mg/mL, respectivamente (Figura 17) (FAILLA & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).



Figura 15- Aspecto alaranjado da fração aquosa nas três amostras, após a etapa intestinal.

Preparação da fração micelar- Os tubos contendo as amostras foram removidos do banho e colocados em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e colocadas sob atmosfera de nitrogênio e transferiu-se 10 mL para os tubos de centrifuga. As mesmas foram colocadas sob atmosfera de nitrogênio e os tubos foram selados e centrifugados por 45 minutos a 4°C a 5.000 g. A fração aquosa de cada tubo foi coletada para um novo tubo, nomeado-a como fração micelar (Figura 17)(FAILLA & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).



Figura 16 - Etapa de centrifugação da fração aquosa (micelar)

3.2.2 Extração antes da digestão *in vitro*

O procedimento utilizado baseou-se na metodologia descrita por Rodriguez-Amaya e colaboradores (2001). As análises foram realizadas em duplicata e os procedimentos de extração foram realizados em câmara escura e com a maior rapidez possível, a fim de evitar a degradação dos carotenóides. Durante as análises, as transferências de material entre as vidrarias foram realizadas quantitativamente para evitar perda de material.

3.2.3 Extração da fração micelar

Uma alíquota de 10 mL da fração micelar foi colocada em um funil de separação, foram adicionados de 30 ml de éter de petróleo e 200 mL de solução de NaCl (10%). Após agitação, as frações foram separadas e a fase aquosa descartada. A fase orgânica foi lavada duas vezes com 200 mL de solução de Na₂SO₄ (2%) (FERNANDEZ-GARCIA, MOSQUERA & PÉREZ-GÁLVEZ, 2007). Posteriormente, a solução foi passada através de Na₂SO₄ anidro para balão volumétrico âmbar e levado para evaporador a vácuo até redução do volume para 10mL e levada para leitura no espectrofotômetro UV-VIS a 450 nm.

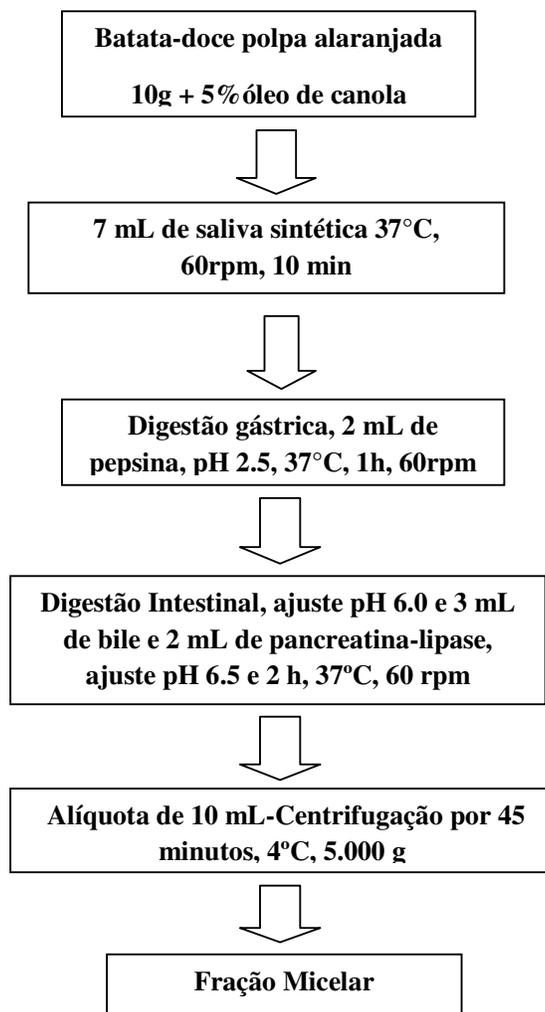


Figura 17 - Esquema das etapas da Digestão *in vitro*

3.2.4 Análise de carotenóides totais

A extração dos carotenóides das amostras antes e após a digestão teve o objetivo de confirmar os valores de concentração obtidos através da análise cromatográfica. Na extração antes da digestão, o extrato foi transferido para balão de fundo redondo, após a execução da extração. Em seguida foi transferido para balão volumétrico âmbar de 50mL conforme a concentração aparente dos carotenóides na solução. O volume do balão foi então aferido com éter de petróleo e conduzido para determinação espectrofotométrica UV-VIS. Em seguida foi realizada a leitura da absorvância da solução etérea em espectrofotômetro, utilizando éter de petróleo como “branco”. O comprimento de onda utilizado foi 450nm. Já a extração após a digestão, foi realizada, transferindo-se o extrato para o rota evaporador a vácuo e reduzindo-se o volume para 2 ou 3mL e transferindo-o para balão volumétrico 10 mL, avolumando-o com éter de petróleo e realizando-se a leitura.

O valor da leitura de absorvância deveria sempre estar contido na faixa de linearidade do espectrofotômetro que é de 0,2 a 0,8. Quando a mesma apresentava valor superior a 0,8, a solução era diluída com éter de petróleo até que o valor estivesse dentro desta faixa. No caso de valor inferior a 0,2, a extração era repetida usando-se massa maior de amostra ou balão volumétrico de menor capacidade.

A concentração de carotenóides totais (em microgramas por 100 gramas de amostra, foi calculada conforme a equação da Figura 18.

$$\text{Concentração } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{\text{Abs.} \times \text{Dil.} \times \text{Vol.} \times 10000}{2592 \times \text{ma.}}$$

Onde:

- Abs.** = valor da leitura de absorvância
- Vol.** = volume do balão volumétrico utilizado (mL)
- ma.** = massa da amostra (g)

Figura 18 – Equação para o cálculo do valor de carotenóides totais (PACHECO, 2009)

Como a determinação de carotenóides totais após a digestão foi realizada com uma alíquota de 10 mL, conforme metodologia, esta concentração deve ser multiplicada por 5, já que o volume final da análise foi de 50 mL e a massa da amostra utilizada para o cálculo deve ser 1/5 da massa inicial.

3.2.5 Análise cromatográfica

A quantificação e determinação do perfil de carotenóides foram realizadas no Cromatógrafo líquido de alta eficiência, com forno para colunas e detector de rede de diodos UV-Vis Waters®, com coluna YCM® Carotenoid C30 S-3 de 4,6 x 250mm. A separação foi obtida utilizando eluição por gradiente, com fase móvel binária de metanol/éter metil *terc*-butílico, fluxo de 0,8ml/min, volume de injeção de 15µl e tempo de corrida de 28 minutos. A quantificação de carotenóides totais foi realizada por espectrofotometria de UV-VIS a 450nm.

Para a construção das curvas de calibração, uma ampola contendo sete padrões foi aberta e a mistura de carotenóides ressuspensa com um mL de acetona para injeção(PACHECO, 2009).

Na determinação cromatográfica dos carotenóides, uma alíquota de 2mL do extrato etéreo foi transferida para vial âmbar de 3mL. O valor da alíquota foi escolhido de acordo com o valor da concentração dos carotenóides totais, de tal modo que a resposta cromatográfica ficasse dentro da faixa de trabalho usada na curva de calibração.

O solvente foi removido sob fluxo de nitrogênio até à secura. Foram adicionados 100µL de acetona ao resíduo e o vial foi então agitado em vórtex durante 10 segundos. Com auxílio de pipetador automático, a solução obtida foi transferida para vial com redutor de volume e realizada a análise cromatográfica.

3.2.6 Eficiência de micelização

Nos estudos preliminares, os ensaios foram divididos em quatro etapas: quantificação dos carotenóides totais da amostra antes de ser submetida ao processo de digestão; quantificação dos carotenóides totais após a digestão oral; quantificação após a digestão gástrica e quantificação dos carotenóides totais após a digestão intestinal e micelização, ou seja, quantificação da fração aquosa. Após a adaptação do método, os resultados de bioacessibilidade foram obtidos após a determinação da eficiência de micelização, obtida pela fórmula abaixo (OOMEN et al, 2003).

$$\text{Eficiência de micelização} = \frac{[\beta\text{-caroteno Fração Micelar}]}{[\beta\text{-caroteno na matriz}]} \times 100$$

3.2.7 Construção da Curva de calibração

Para a construção das curvas de calibração, o Laboratório dispunha de uma ampola contendo sete padrões primários, tais como: violaxantina, luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, α-caroteno, β-caroteno e licopeno. A mesma foi aberta e a mistura de carotenóides foi ressuspensa com 1 mililitro de acetona.

Após agitação em vórtex para completa solubilização, alíquotas da solução foram quantitativamente retiradas com pipetador automático, conforme Tabela 5, e transferidas para vials de 1,8mL. Cada alíquota representou um ponto da curva de calibração e apresenta uma quantidade conhecida de todos os sete carotenóides.

O solvente dos vials foi então evaporado, sob fluxo de nitrogênio e o sólido de cada vial ressuspensa com 100µL de acetona. Após agitação em vórtex, os 100µL de cada um dos sete vials foram cuidadosamente transferidos para redutor de volume. Por fim, os vials contendo os redutores de volume foram levados para análise cromatográfica.

Cada ponto da curva de calibração foi injetado em triplicata, de modo a obter a construção da curva de calibração externa dos sete carotenóides com uma faixa de trabalho de sete pontos em triplicata.

Tabela 5 – Volumes das alíquotas retiradas da ampola com sete padrões e concentração final dos pontos da curva de calibração (PACHECO, 2009).

Ponto da Curva de calibração	Volume da alíquota μL	Concentração final μg/mL
1	10	0,5
2	30	1,5
3	50	2,5
4	70	3,5
5	100	5,0
6	130	6,5
7	160	8,0

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adaptação da metodologia

4.1.1 Tratamento das amostras

Foram testadas três formas de tratamento das amostras: 1^a- homogeneização da amostra *in natura*, no momento da análise; 2^a – pesagem da amostra em recipientes individualizados, antes da análise; 3^a- homogeneização da amostra antes da análise e congelamento em frasco único, no momento da análise, descongelou-se e pesou-se. A melhor forma de tratamento para este tipo de estudo foi a primeira, já que o congelamento da matriz causou o rompimento celular da matriz, o que aumentou artificialmente a biodisponibilidade dos carotenóides e o uso de recipientes individualizados acarretou a excessiva perda de amostra, uma vez que esta permaneceu fixada a mesma. Esta etapa representou uma etapa crítica, já que corresponde a etapa de mastigação, cujo objetivo era expor ao máximo a matriz alimentícia à ação das enzimas digestivas, e para tal, optou-se pela utilização do moinho IKA[®] simples de bancada.

4.1.2 Preparo das soluções digestivas

O preparo correto das soluções salinas e enzimáticas de cada uma das fases representou um desafio, já que exigiu muitos detalhes na sua execução. A saliva, o suco gástrico, o suco pancreatina-lipase e a solução de bile foram preparados e utilizados no tempo máximo de um dia (OOMEN et al, 2002). Na saliva, as soluções salinas foram misturadas, segundo os volumes descritos no mesmo artigo e avolumadas para 50 mL com água milli-Q. As devidas reduções foram realizadas, obedecendo a proporcionalidade, já que o volume total da solução descrita é de 500 mL.

4.1.3 Ensaios preliminares

As matrizes testadas foram: mamão, batata doce de polpa alaranjada, mandioca de polpa alaranjada e cenoura. Os ensaios iniciaram-se através da execução da metodologia e quantificação após cada etapa de digestão, com amostras de mamão, sem óleo. O objetivo era verificar a transferência dos carotenóides da matriz para a fase aquosa, após cada etapa. Em suma, seis duplicatas foram submetidas a digestão, onde duas foram quantificadas após fase oral, duas após a fase gástrica e duas após a intestinal. Os resultados, no entanto, demonstraram não haver a presença de carotenóides nos extratos de cada etapa, o que foi indicativo da ausência de algum outro componente na metodologia, para que fosse possível quantificar os carotenóides na fase aquosa (tabela 6). A razão desta inviabilidade deveu-se a ausência do óleo juntamente com a matriz, já que o mamão não é um alimento rico em lipídios. Outra dificuldade, comumente encontrada na análise de frutos, deveu-se a necessidade de uma etapa posterior de saponificação, antes e após a digestão, já que estas matrizes apresentam carotenóides oxigenados, na forma de ésteres e que necessitavam ser hidrolisados e liberados, para sua quantificação por CLAE. Além disso, para a digestão os frutos, seria necessária a adição da enzima colesterol esterase, na etapa intestinal, que

objetivaria a hidrólise e digestão destes compostos na matriz, para sua posterior liberação. Este fato tornaria a análise mais complexa, por aumentar o número de etapas críticas. Como a matriz foco deste trabalho era a batata-doce, cujo carotenóide majoritário é o BC, composto não oxigenado e o mais eficiente conversor dos carotenóides em vitamina A, optou-se por descartar o estudo do mamão.

Tabela 6- Valores das massas das amostras, média de absorvâncias de três repetições e carotenóides totais, após as fases oral, gástrica e intestinal

Amostra	Massa	Abs	Carotenóides Totais
MAMÃO	(g)	Média	(ug/100g)
		(nm)	
Extração antes	5,0501	1,3770	10520
Fase Oral	5,0932	ND	ND
	5,0742	ND	ND
Fase Gástrica	5,2053	ND	ND
	5,0844	ND	ND
Fase Intestinal	5,0765	ND	ND

ND : não detectado

Uma vez concluída a necessidade da adição de fonte lipídica, optou-se por testar três tipos de óleos vegetais disponíveis no mercado: de soja, de girassol e de canola (HUO et al, 2007), a fim de determinar qual dos óleos proporcionaria uma maior eficiência de micelarização, já que cada um apresenta uma composição de ácidos graxos de tamanho e insaturações variados. A matriz utilizada foi a cenoura *in natura*, com adição de 10% (p/p) dos três tipos de óleo. A quantificação foi realizada na fração micelar. Os resultados obtidos demonstraram que dentre os óleos, o de canola foi mais capaz de emulsificar os carotenóides, pois os valores de carotenóides totais estavam na ordem de 3500 ug/100g, enquanto os outros dois apresentaram valores próximos a 2100 ug/100g (Tabela 7). O óleo de canola utilizado, teoricamente, apresenta em sua composição ácidos graxos de cadeia longa, tais como: ácido oléico (C18:1- 53-70%), ácido linoléico (C18:2- 15-30%) e ácido linolênico (C18:3- 5- 13%), o que corrobora com os dados da literatura (HUO et al, 2007), pois quanto maior for o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo, maior será a interação do carotenóide com o lipídio, portanto maior será sua bioaccessibilidade.

Tabela 7- Valores das massas das amostras, média de absorvâncias de três repetições e carotenóides totais, da fração micelar, utilizando 10% (p/p) de óleo de soja, girassol e canola.

Amostra	Massa	Abs Média	Carotenóides
CENOURA	(g)	(nm)	Totais
			(ug/100g)
Extração antes	2,0391	0,7770	7351
	2,0997	0,8580	7883
Óleo de soja	5,0291	0,306	2351
Óleo de girassol	5,0226	0,279	2147
	5,0159	0,281	2165
Óleo de canola	5,0127	0,974	3748
	5,0167	1,063	4089

A partir daí, buscou-se investigar qual seria a concentração de óleo mais indicada, capaz de proporcionar uma melhor emulsificação dos carotenóides. Segundo Huo e colaboradores (2007) não seria necessário mais do que 2,5% de óleo, para que o BC fosse emulsionado e transferido para a fração micelar. Optou-se então por testar as concentrações 2, 5 e 10% (p/p) e os valores obtidos não demonstraram haver alterações na emulsificação e micelização dos carotenóides, quando as concentrações variavam (Tabela 8). Desta forma, optou-se por reduzir a concentração de 10% para 5% (p/p) de óleo de canola, por razões econômicas e práticas, pois o manuseio de fontes oleosas é mais difícil

O efeito da presença do óleo vegetal causa diferentes formas de incorporação, em função da classe dos carotenóides presentes. As xantofilas se alojam nas regiões mais externas das micelas, enquanto o BC se localiza mais internamente (YONEKURA & NAGAO, 2007). Além disso, a produção de bile é estimulada pela ingestão de gordura dietética. O consumo de gordura com uma refeição contendo carotenóides aumenta a eficiência da absorção, sendo sugerida a ingestão de, no mínimo, 3 a 5 gramas de gordura por refeição (VAN HET HOF et al, 2000). A formação das micelas é dependente, dentre outros fatores, da presença de óleo no intestino, e conseqüentemente da sua co-ingestão com os carotenóides. Pode-se afirmar que esta etapa é crucial e o mais importante fator dietético para a sua disponibilidade de absorção.

Tabela 8- Valores das massas das amostras, média de absorvâncias de três repetições e carotenóides totais, da fração micelar, utilizando 2, 5 e 10% (p/p) de óleo de canola.

Amostra	Massa (g)	Abs Média (nm)	Carotenóides (ug/100g)
Extração antes	2,1140	1,1720	10694
	2,0314	1,1700	11110
Óleo 2%	2,1865	0,286	2523
	2,0337	0,281	2670
Óleo 5%	2,0070	0,203	1951
	2,0506	0,217	2040
Óleo 10%	2,1721	0,209	1856
	2,1996	0,210	1841

Foi necessária a realização de ensaios preliminares para cada matriz, a fim de determinar a melhor quantidade de amostra para os ensaios, quantidade esta, que capaz de fornecer concentrações de β -caroteno, que pudessem ser extraídas e detectadas ao final do método. Após a avaliação das quantidades utilizadas em diversos ensaios, onde as quantidades testadas foram 2, 5 e 10 g, concluiu-se que a última foi a quantidade que melhor atendeu a esta necessidade, em todas as matrizes estudadas.

Como a colheita da batata-doce é realizada a cada três (3) meses, seria necessário utilizar um método de conservação para o aumento da vida útil das amostras, e por isso optou-se por liofilizar as amostras *in natura*. Observou-se, no entanto, que as amostras liofilizadas em, aproximadamente duas semanas perdiam a coloração alaranjada, o que era um indicativo da degradação dos carotenóides, embora as amostras tivessem sido armazenadas em embalagem laminada (sob proteção da luz) e em freezer a - 8°C. A inviabilidade da utilização deste método de processamento deveu-se também a dificuldade de relacionar os valores de concentração de carotenóides totais obtidos pela análise em base seca, com as amostras *in natura*. Os valores calculados de carotenóides, descontando-se a umidade para as amostras liofilizadas 1007, 1205, 1194, respectivamente, foram 25, 22,5 e 25% inferiores, aos resultados obtidos nas amostras *in natura* (Tabela 10). Os valores de umidade estão relacionados na tabela 9.

Tabela 9 - Valores de umidade das amostras de batata-doce *in natura*.

Amostras	Peso (g)	Umidade (%)	Umidade Média (%)
1007-1	10,0497	74,86	75,0
1007-2	10,0723	75,17	
1205-1	10,5061	77,63	77,5
1205-2	10,2503	76,99	
1194-1	10,1122	75,47	75,0
1194-2	10,0981	74,95	

Tabela 10 - Comparação entre os valores de carotenóides totais calculados a partir das amostras liofilizadas e os valores das amostras *in natura*.

Amostras	Carot. Totais liofilizadas (ug/100g)	Carot. Totais <i>in natura</i> (ug/100g)	Carot. Totais calculados (ug/100g)
1007	27081	17974	6770
1205	28045	18884	6311
1194	29377	21362	7344

Tabela 11 - Valores de massa, absorvância média e média de carotenóides totais das amostras *in natura* e liofilizadas

Amostra Liofilizada	Massa (g)	Abs Média (nm)	Carotenóides Totais (ug/100g)	Média Carotenóides Totais (ug/100g)
1007-1L	0,5069	0,717	27285	27081
1007-2L	0,5024	0,700	26877	
1205-1L	0,5010	0,746	28723	28045
1205-2L	0,5075	0,720	27367	
1194-1L	0,5064	0,771	29369	29377

Amostra In natura	Massa (g)	Abs Média(nm)	Carotenóides Totais (ug/100g)	Média Carotenóides Totais(ug/100g)
1194-2L	0,5045	0,767	29385	
1007-1N	1,7426	0,816	18066	17974
1007-2N	1,7260	0,800	17882	
1205-1N	1,7340	0,864	19222	18884
1205-2N	1,7543	0,842	18548	
1194-1N	1,7209	0,942	21118	21362
1194-2N	1,7605	0,986	21608	

Tabela 12 - Valores de massa, Absorvância média e média de carotenóides totais da fração micelar após a digestão

Fração micelar	Massa (g)	Abs Média (nm)	Carotenóides Totais (ug/100g)
1007	1,0061	0,0140	268(x5)
1205	2,0191	0,161	1465(x2,5)
1194	1,0095	0,0740	1414 (x5)

Determinou-se também a eficiência de micelização de carotenóides totais dos mesmos cultivares e os resultados encontrados demonstraram que a amostra 1194 apresentou o melhor valor, indicando que a transferência dos carotenóides da matriz para a micela, é mais facilitada nesta a variedade (Tabela 13). Além disso, a variedade 1007, apesar de apresentar altos valores de carotenóides totais, após o processo de digestão *in vitro*, demonstrou ter o menor valor de bioacessibilidade. Outra observação importante é de que variedade 1205 apresentou concentração inicial 12% menor do que a variedade 1194, no entanto apresentou Eficiência de Micelização 59% menor (Tabela 13). Desta forma, estes dados são indicativos de que a ingestão de quantidade equivalentes das três variedades, possivelmente geraria maior biodisponibilidade com a variedade 1194.

Tabela 13 - Valores de carotenóides totais antes e após a digestão, e a eficiência de micelização.

Batata doce de polpa alaranjada	Carotenóides totais ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Carotenóides totais fração micelar ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Eficiência de Micelização (%)
1007	17944,0	1340,0	7,5
1205	18884,0	3662,5	19,4
1194	21362,0	7070,0	33,1

Avaliou-se também as quantidades de HCl 1M, Na_2HCO_3 1M e NaOH 1 M necessárias para o ajuste de pH de cada etapa, já que cada matriz responde de forma diferente as condições de análise (Tabela 14). Os diferentes volumes utilizados nos ensaio de digestão demonstram não ser possível padronizar quantidades exatas a serem utilizadas, a menos que sejam feitos testes preliminar para cada matriz.

Sabe-se, que maioria dos carotenóides é termolábil, principalmente as xantofilas. Os carotenóides por serem insaturados, são propensos a sofrer isomerização e oxidação. Como o calor, a luz solar direta ou luz ultravioleta, ácidos e adsorventes com superfície ativa promovem a isomerização dos carotenóides trans, sua conformação usual, para carotenóides cis, podendo inclusive, em condições mais enérgicas, causar a destruição desses compostos e as degradações oxidativas são as principais causas de grande perda de carotenóides, o tempo de verificação e ajuste do pH foi o menor possível, a fim de evitar o contato do ar atmosférico com a mistura em digestão, reduzindo assim a degradação dos carotenóides. Também pela mesma razão, todo o procedimento analítico foi executado sob temperatura (25°C) e luz controlada.

Tabela 14 - Volumes das soluções de HCl, Na_2HCO_3 e NaOH a 1 M, gastos para o ajuste de pH de cada etapa em quatro diferentes matrizes

Amostra	Volume de HCl 1 M (pH 2,5)(μL)	Volume de Na_2HCO_3 1M (pH 6,0) (μL)	Volume de NaOH 1 M (pH 6,5) (μL)
Mamão	110	NR	NR
Cenoura	1800	800	NP
Mandioca	1200	1600	30
Batata-doce	1000	1400	1000

NR- Não realizado; NP- não foi preciso

A verificação e o ajuste do pH durante a digestão foi realizado em medidor de pH Tecnopon, e representa uma etapa crítica do processo, já que cada tipo de enzima apresenta seu pH ótimo de atividade. A pepsina é a principal enzima proteolítica do organismo e a única do suco gástrico. O pH ótimo para a sua ação catalítica está ao redor de 2,0, mas sua ação se faz sentir em pH entre 1,8 e 2,5, porém sua atividade diminui com a elevação do pH, tornando-a completamente inativa a pH acima de 5,0. Refere-se, que a solução de ácido clorídrico é tão necessária quanto a produção da pepsina.

4.1.4 Extração de carotenóides da fração micelar

A extração de BC da fração micelar exigiu investigação minuciosa, já que as metodologias de extração descritas são aplicadas as amostras sólidas e semi-sólidas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). A dificuldade encontrada deveu-se a não liberação dos carotenóides da fração micelar para o éter de petróleo, solvente este, utilizado para a leitura de absorvância espectrofotométrica. Quando a melhor metodologia de extração foi atingida, a transferência dos carotenóides pôde ser visualmente percebida, já que quando as micelas foram rompidas, percebeu-se a formação de cor alaranjada, característica de BC, no éter de petróleo.

Assim, testou-se submeter a fração micelar ao banho de ultrassom por 10 minutos, no entanto não resultou na transferência de BC. Outra tentativa foi realizada, mas desta vez usou-se uma alíquota de 10 mL de solução de ácido acético glacial a 10%, pois supôs-se que o mesmo romperia as micelas, não obtendo resultado satisfatório. Por fim, Fernández-Garcia e colaboradores (2007) descreveram que a extração da fração micelar poderia ser realizada através da introdução de alíquota de 5 mL do extrato, em funil de separação, adição de 50 mL de éter dietílico e 200 mL de solução de NaCl 10%(p/v), e agitação. A fase aquosa seria dispensada e a fase orgânica lavada duas vezes com 200 mL de solução de Na₂SO₄ a 2% (p/v). Assim, optou-se por utilizar esta metodologia, mas realizando alguns ajustes como mudança do solvente orgânico utilizado, passando de éter dietílico para éter de petróleo, que tem caráter apolar maior, já que o BC tem mais afinidade pelo segundo; redução da quantidade de solvente orgânico (éter de petróleo) de 50 mL, para 30 mL, já que a quantidade era excessiva, deixando assim a análise mais limpa e evitando desperdícios. Realizou-se também a passagem da fase orgânica pelo sulfato de sódio anidro, a fim de retirar todo o vestígio de água ainda presente e levou-se a mesma para o evaporador a vácuo, para concentração e redução do volume final.

4.1.5 Aplicação completa da metodologia para três variedades de batata-doce

A análise espectrofotométrica VIS dos carotenóides das amostras antes e após a digestão teve o objetivo de confirmar os valores de concentração obtidos pela análise cromatográfica. As médias de resultados estão apresentadas na tabela 15. Os valores finais de carotenóides totais da fração micelar foram calculados multiplicando os valores presentes na tabela por um fator, que para as três variedades, foi 5. Este fator deve-se a alíquota utilizada na etapa de preparação da fração micelar (centrifugação e extração), onde foram retirados 10 mL de um total de 50 ml do volume final da análise.

Tabela 15 – Resultados de carotenóides totais da fração micelar e alíquota utilizada para centrifugação e extração.

Amostra	Carotenóides	
Antes da digestão	Totais Média (ug/100g)	
Var1	9580	NA
Var1		
Var2	12068	NA
Var2		
Var3	8049	NA
Var3		

Amostra	Carotenóides	Alíquota ao final da
Fração micelar	Totais Média (ug/100g)	digestão
		(mL)
Var1FM	405	10
Var1FM		
Var2FM	557	10
Var2FM		
Var3FM	382	10
Var3FM		

NA: não se aplica

Antes do processo de digestão *in vitro*, as amostra de batata- doce de polpa alaranjada apresentaram concentração totais de carotenóides de 9500 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 12068 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 8049 $\mu\text{g}/100\text{g}$, para as variedades 1, 2 e 3, respectivamente. Após a execução do processo, foi possível determinar a concentração dos carotenóides totais presentes na fração aquosa ou fração micelar, que foi de 2025 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 2790 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e 1910 $\mu\text{g}/100\text{g}$, para as variedades 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 16). Além disso, observou-se que houve uma mudança no perfil cromatográfico das três amostras de batata doce de polpa alaranjada *in natura*, antes da digestão *in vitro*, e após a digestão. O tempo de retenção de 17 minutos do todo-trans BC foi característico para as três variedades, além do aumento da razão BC trans: BC cis após digestão. Inicialmente, o β -caroteno estava presente majoritariamente, com teores de 86%, 73% e 82%, para as variedades 1, 2 e 3, respectivamente (tabela 16) e após a execução da digestão, o perfil do β -caroteno passou a configurar teores médios de 96%, 89% e 100% (Figura 19), respectivamente, o que pode ser um indicativo de que o método de digestão se apresenta mais seletivo para o BC, já que se conhece o efeito inibitório de outros carotenóides, tal como o licopeno, sobre a incorporação micelar do BC, já é conhecido. Para a variedade 1,. Ocorreu também a redução do teor de isômero 9-cis- BC após a digestão. Já para as variedades 2 e 3 ocorreu uma redução do isômero 9-cis e de α – caroteno após a digestão. Para a três variedades, o pH 2,5 não causou maior isomerização, em oposição ao esperado.

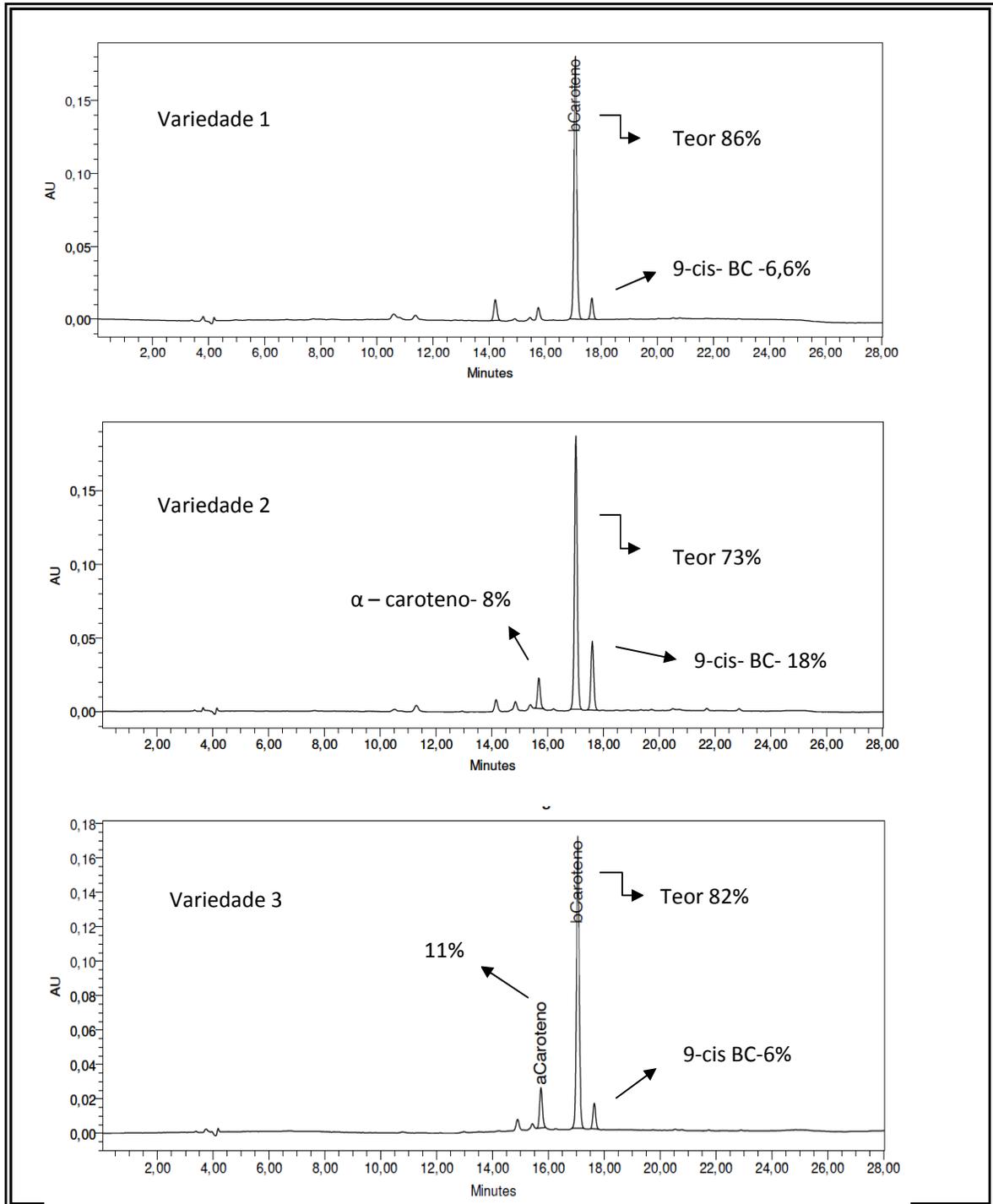


Figura 19: Representação do pico de β -caroteno nos cromatogramas das variedades 1,2 e 3 de batata-doce de polpa alaranjada antes da digestão *in vitro*

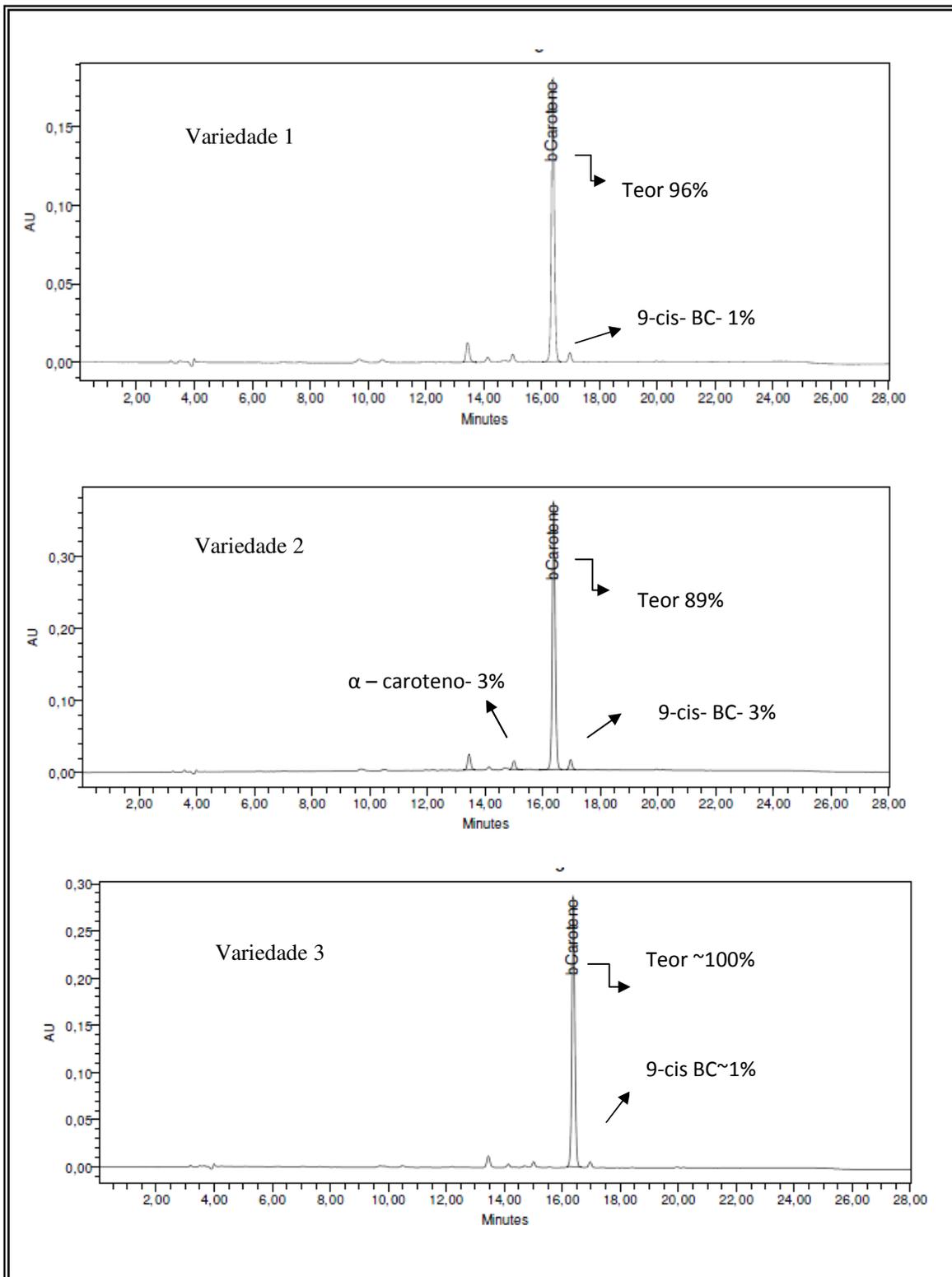


Figura 20: Representação do pico de β -caroteno nos cromatogramas das variedades 1,2 e 3 de batata-doce de polpa alaranjada após digestão *in vitro*

Os valores apresentados indicam a formação das estruturas micelares, já que os carotenóides foram encontrados nesta fração, o que representa a bioacessibilidade relativa de β -caroteno. Os valores de eficiência de micelização são de 23,8% para a variedade 1, 28,0%

para a variedade 2 e 28.9% para a variedade 3, indicando que as três variedades apresentaram equivalência na transferência de BC da matriz para as micelas (Tabela 15).

Tabela 16 - Valores de β -caroteno, antes e após a digestão, e a eficiência de micelização

Variedades com maior teor de β -caroteno	Concentração ($\mu\text{g}/100\text{g}$) e teor de β -caroteno antes da digestão	Concentração ($\mu\text{g}/100\text{g}$) e teor de β -caroteno após a digestão	Eficiência de Micelização de BC (%)*
Variedade 1	8143 /86%	1944/96%	23.8%
Variedade 2	8810 /73%	2483 / 89%	28.0%
Variedade 3	6600 /82%	1910 / 100%	28.9%

(*) A eficiência de micelização é calculada segundo o item 3.2.6

O tempo de verificação e ajuste do pH foi o menor possível, a fim de evitar o contato do ar atmosférico com a mistura em digestão, reduzindo assim a degradação dos carotenóides. Também, pela mesma razão, todo o procedimento analítico foi executado sob temperatura (25°C) e luz controlada.

A lipase, a pancreatina e o extrato de bile foram de origem suína, já que as características fisiológicas e anatômicas dos porcos são semelhantes às dos humanos, o que torna a resposta quase idêntica à observada no ser humano. Os sais biliares por serem compostos anfipáticos, isto é, possuem na molécula regiões polares ou hidrófilas, que interagem com a fase aquosa e regiões apolares ou hidrófobas, que interagem com a fase orgânica, são essenciais. O caráter anfifílico dos sais biliares permitiu que eles se situassem na interface gordura/água, causando diminuição local da tensão superficial e assim, facilitando e promovendo a dispersão das moléculas das gorduras sob a forma micelar.

A determinação da eficiência de micelização permitiu a verificação da proporção de β -caroteno que foi transferido da matriz da batata-doce para as micelas formadas, após a digestão *in vitro* e que, portanto, seria passível de ser absorvida, se estivesse no corpo humano. Como o BC estava majoritariamente presente no alimento, não foi possível comparar o grau de micelização deste composto com os demais carotenóides.

Ainda não há relatos na literatura de bioacessibilidade *in vitro*, a cerca das três variedades estudadas, no entanto, outras variedades de batata-doce foram estudadas e encontrou-se valores de eficiência de micelização de β -caroteno entre 0,6 e 6%, necessitando-se de mais estudos com esta matriz (FAILLA et al, 2009). Já para o tomate, foram encontrados valores na faixa de 6,1 a 47,2%, para a pimenta vermelha entre 13,3 e 76,7% para a abóbora de 18,0 a 79.4%, e para a mandioca 12 a 15% (RYAN et al, 2008). Estas variações confirmam as hipóteses de que a matriz, o tipo de óleo presente, o tipo de carotenóide, são grandes fatores de variabilidade.

5 CONCLUSÃO

Os resultados de eficiência de micelização de BC, uma vez que viabilizou a quantificação de β -caroteno na fração micelar após a digestão das três variedades de batata-doce de polpa alaranjada, demonstraram que a adaptação da metodologia foi realizada com sucesso e que o método utilizado está adequado à determinação da bioacessibilidade deste composto, por se apresentar seletivo. No entanto, alguns aspectos, tal como a ausência dos microorganismos da biota do trato digestivo, mudanças na concentração de algumas soluções e enzimas na fase intestinal, devem ser otimizados. É necessária a realização de ensaios *in vivo*, para a comparação de resultados e posterior validação da metodologia.

Além disso, a determinação da bioacessibilidade fornece informações valiosas para selecionar a quantidade apropriada e as matrizes de alimentos mais capazes de assegurar a qualidade nutricional dos produtos alimentares. Além disso, pode ser utilizada como ferramenta de apoio na estimativa de medições de bioatividade de compostos potencialmente bioativos, na investigação de seus possíveis benefícios a saúde.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. Fisiologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1999. p. 652- 657.
- BAUERNFEIND, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs In foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 456-473, 1972.
- BENCHI, A. From 1989 to 2001: What have we learned about the “biological actions of β – carotene”?. **Journal of Nutrition**, v. 134, p.225S-230S, 2004.
- BOBBIO. F. O; BOBBIO. P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995. p 197-204.
- BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaio para determinar a biodisponibilidade de chumbo em solos contaminados revisão. **Química Nova**, v. 31, n.2, p. 394-400, 2008.
- CASTENMILLER, J. J.; WEST, C. E. **Bioavailability and bioconversion of carotenoids**. *Annu Rev Nutr.* v.18, p.19-38, 1998.
- CASTENMILLER, J. J. M.; WEST, C.E.; LINSSEN, J. P. H.; VAN HET HOF, K. H.; VORAGEN, A. G. J. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. **Journal of Nutrition**, v.129(2), p.349-55. 1999.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2a. ed. Campinas: UNICAMP; 2003.
- CLARK, R. M.; YAO, L.; SHE, L.; FURR, H. C. A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions. **Lipids**, v. 35, p. 803-806, 2000.
- CRAFT, N. E.; WISE, A. S.; SOARES, J. H. JR. Individual carotenoid content of SRM 1548 total diet and influence of storage temperature, lyophilization, and irradiation on dietary carotenoids. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v.41, p.208-213, 1993.
- COZZOLINO, S. M. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2 edição atual. e ampl, São Paulo: Manole, 2007.
- DEAN, J. R.; MA, R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: a critical review. **Chemosphere**, v. 68, f.8, p. 1399-1407, 2007.
- DURING, A.; HARRISON, E. H. Intestinal absorption metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.430, p.77-88, 2004.
- DOLINSKY, M.; RAMALHO, A. Deficiência de vitamina A: uma visão atualizada. **Compacta nutrição**, v. 4, f.2 , 2003.

EL-GORAB, M.I., UNDERWOOD, B. A.; LOERCH, J.D. The roles of bile salts in the uptake of β - carotene and retinol by rat everted sacs. **Biochem Biophy Acta**, v.401, p.265–277, 1975.

BOSCO, JOÃO CARVALHO. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/maio/3a-semana/embrapa-hortalicas-participa-de-programa-com-produtores-de-batata-doce-no-rs/>>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2010

ERDMAN, J. W.; POOR, C. L.; DIETZ, J. M. Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenóids, and vitamin E. **Food Technology**, v.41(10), p.214-216, 1988.

FAO . Food and Agriculture Organization. The sixth food survey, _____ . The state of food insecurity in the world (SOFI), 2000.

FAILLA, M. L. CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. In vitro Models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. **Harvest Plus Technical monograph series 3**. International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for tropical Agriculture (CIAT). Washington, DC. 2005.

FAILLA, M. L. CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; ISHIDA, B. K. In vitro micellarization and intestinal cell uptake of cis isomeros of lycopene exceed those of All-trans lycopene. **The Journal of Nutrition**, p. 482-486, 2007.

FAILLA, M. L.; THAKKAR, S. K.; KIM, J. Y. In Vitro Bioaccessibility of β -Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). **J. Agric. Food Chemistry**, v.57, p.10922–10927, 2009.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; MOSQUERA, M. I. M.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Changes in composition of the lipid matrix produce a differential incorporation of carotenoids in micelles. Interaction effect of cholesterol and oil. **Innovative food science and Emerging Technologies**, v.8, p.3379-384, 2007.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751–760, 2009.

FERRUZZI, M. G.; LUMPKIN, J. L.; SCHWARTZ, S.J.; FAILLA, M. L. Digestive Stability, Micellarization, and Uptake of \hat{a} -Carotene Isomers by Caco-2 Human Intestinal Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 2780-2785, 2006.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F; PASSOS, M. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, p 40-45, 1997.

FURR, H. C.; CLARK, R. M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **Journal of Nutr Biochem.**, v.8, p.364–377, 1997.

GARRET, D.A.; FAILLA, M. L.; SARAMA, R.J. Development of a in vitro digestion model for estimating the bioavailability of carotenoids from meals. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, 47: 4301-4309. 1999.

GARTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 116-122, 1997.

GRANADO-LORENCIO, F.; ALONSO, B.O.; BARBUDO, C. H.; NAVARRO, I. B.; SACRISTAN, B. P.; GARCIA, S. B. In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.102, p. 641-648. 2007.

HARVESTPLUS.2004. Desenvolvendo produtos agrícolas mais nutritivos. Disponível em:<<http://www.harvestplus.org>>. Acesso em 01 de dezembro de 2009.

HARVESTPLUS.2006a.Mandioca biofortificada. Disponível em:<<http://www.harvestplus.org>>. Acesso em 01 de dezembro de 2009.

HARVESTPLUS.2006b.Batata-doce biofortificada. Disponível em:<<http://www.harvestplus.org>>. Acesso em 01 de dezembro de 2009.

HEDRÉN, E.; DIAZ, V.; SVANBERG, U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. **Eur J Clin Nutr**, v.56, p.56:425-30, 2002.

HENRIQUE, N. M; NAVALHO, J. C; VARELA, J. C; CANCELA, M. L. Dunaliela: uma fonte natural de β -caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de biotecnologia**, v.61, p 12-18, 1998.

HOLLANDER D, RUBLE PE. β -carotene absorption:bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. **American Journal Physiology**, v.235, p.E686–E691, 1978.

HU, X.; JANDAEK, R. J.; WHITE, W. S. intestinal absorption of beta-carotene ingested with a meal rich in sunflower oil or beef tallow: postprandial appearance in triacylglycerol-rich lipoproteins in women. **Am. J. Clin. Nutrition**, v. 71, p. 1170-1180, 2000.

HUO, T.; FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S.J.; FAILLA, M. L.Impact of Fatty Acyl Composition and Quantity of Triglycerides on Bioaccessibility of Dietary Carotenoid. **Agric. Food Chem**, v.55, p. 8950–8957, 2007.

JACOBS PB, LEBOEUF RD, MCCOMMAS SA, TAUBER JD. The cleavage of carotenoid esters by cholesterol esterase. **Comp. Biochem Physiol**, v. 72 p.157–160, 1982.

KRINSKY N. I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v. 17, f.10, p. 815-817, 2001.

LEUENBERGER, M. G.; ENGELOCH-JARRET, C.; WOGGON, W. D. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. **Angew Chem-Int**, v. 40, p.2614-2617, 2001.

LIU, C. S.; GLAHN, R. P.; LIU, R. H. Assesement of carotenoids bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 52, p.4330-4337, 2004.

- MÉNDEZ-HORNERO, D.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.407-412, 2007.
- MENDÉLEZ- MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. **Importância nutricional de los pigmentos carotenóides**. Caracas. ALAN, v.54, n.2, 2004.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1145-1150, 2007.
- MERCADANTE, A.Z.; PFANDER, H. Carotenoids from annatto: a review. **Recent Res. Devel. Agric. Food Chem.**, v. 2, p. 79-91, 1998.
- MERCADANTE, A. Z.; NUNES, I. L. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v. 24, n. 3, 2004. Disponível em:<www.scielo.br/scielo.php?pid=S010120612004000300024&script=sci_arttext&tlng=pt.> Acesso em 30 de setembro de 2009.
- MILLER, D. D.; SCHRICKER, B.R.; RASMUSSEN, R. R.; CAMPEN, D. V. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 34 , p. 2248–2256, 1981.
- MORTIZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade do licopeno. **Revista de Nutrição**, v.19, p.265-273, 2006.
- NAGAO, A.; OLSON, J. A. Enzymatic formation of 9-cis, 13-cis, and all-trans retinals from isomers of β -carotene. **FASEB**, v.8, p.968-973, 1994.
- OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatografic determination of carotenoids in foods. **Journal of chromatography A** , v.881, p.543-555, 2000.
- OLSON JA. The effect of bile and bile salts on the uptake and cleavage of β -carotene into retinol ester (vitamin A ester) by intestinal slices. **Journal of Lipid Reseach.**, v.5, p.402–408, 1964.
- OLSON, J. A. Absorption, transport and metabolism of carotenoids in humans. **Pure and appl. Chem.**, v. 66(5), p.1011-1016, 1994.
- OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; BRUEIL, M. A.; DOBBE, C. J. G.; PEREBOOM, D. P. K. H.; SIPS, A.J.A.M. Development of na in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and toxicology**, v. 44, p.281-287, 2003.
- OOMEN, A. G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJDNER, E.; CORNELIS, C.; SCHOETERS, G.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. V.; WRAGG, J.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. M.; WIJNEN, J. H. V. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. **Environment Science and technology**, v. 35, n.36, p. 3326-3334, 2002.

ORNELAS-PAZ, J. J.; FAILLA, M. L.; YAHIA, M. E.; GARDEA-BEJAR, A. Impact of the Stage of Ripening and Dietary Fat on *in Vitro* Bioaccessibility of β -Carotene in 'Ataulfo' Mango. **J. Agric. Food Chemistry**, v.56, p.1511–1516, 2008.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 2009.

PARK, Y. W. Effect of freezing, thawing, drying, and cooking on carotene retention in carrots, broccoli, and spinach. **Journal of Food Science**, v.52, p.1022-1025, 1987.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J**, v.10, p.542–551, 1996.

RAMALHO, R. A.; FLORES, H.; SAUNDERS, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. **Pan. Am. J. Public Health**, v. 12, p.117-123, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5a. ed. Elsevier; 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Latin american food of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, v.49, nº 1, p. 38S-47S,1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington DC: International Life Sciences Institute (ILSI) Press, 1999, 64p.

RODRIGUEZ-AMAYA. D; KIMURA. **Training course for harvestplus..** Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de carotenóides: Tabela Brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2008.

RYAN, L.; O'CONNELL, O.; O'SULLIVAN, L.; AHERNE, S. A. Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. **Plat. Foods Hum Nutr.**, v. 63, p.127-133, 2008.

RUBY, A.; DAVIS, T.E.; LINK, R.; SCHOOF, R.L.; CHANEY, G.B.; FREEMAN, B. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. **Environ. Sci. Technol.**, v.27, p. 2870–2877, 1993.

RUBY, A.; DAVIS, R.; SCHOOF, S.; SELLSTONE, C. M. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. **Environ. Sci. Technol**, v.30, p. 422–430, 1996.

SANDMANN, G. Carotenoid Biosynthesis and biotechnological application. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.385, n .1, p. 4-12, 2001.

SHARGEL, L.; YU, A.B. **Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics** 4 ed. New York: McGraw-Hill, 1999.

SILVA, MAYBI CRISTINA DA. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos**. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP: [s.n.], 2004.

SOUZA, S. L.; MOREIRA, A. P. B.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; ALENCAR, E. R. Conteúdo de carotenos e provitamina A em frutas comercializadas em Viçosa, estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomv.**, v. 26. n. 4, p. 453-459, 2004.

THAKKAR, S.K.; DIXON, B. M.; DIXON, A.G.O.; FAILLA, M. L. β -carotene micellarization during in Vitro Digestion and Uptake by Caco-2 Cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. **The Journal of Nutrition**, v.137, p. 2229-2233, 2007.

THAKKAR, S. K.;FAILLA, M. L. Bioaccessibility of Pro-Vitamin A Carotenoids Is Minimally Affected by Non Pro-Vitamin A Xanthophylls in Maize (*Zea mays* sp.). **J. Agric. Food Chem.**,v .56, p. 11441–11446, 2008.

THAKKAR, S. K.; HUO, T.; DIXON, B. M.; FAILLA, M. L. Impact of style of processing on retention and bioaccessibility of β -Carotene in Cassava (*Manihot esculanta*, Crantz). **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 57, p.1344-1348, 2009.

THURNHAM D.I. Bioequivalence of β -carotene and retinol. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 8, p.13-39, 2007.

TYSSANDIER, V.; LYAN, B. BOREL, P. Main factos governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. **Biochimica biophysica Acta**, v.1533, p.285-292, 2001.

VAN HET HOF, K. H.; WEST, C.E; WESTSTRATE, J.A.; HAUTVAST, J.G. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.503-506, 2000.

WERTZ, K., SILER, U.; GORALCZYK, R. Lycopene: modes of action to promote prostate health. **Arch. Biochem. Biophys**, v.430, p. 127–134, 2004.

WITTSIEPE, J.; SCHEY, P.; HACK, A.; SELENA, F.; WILHELM, M. Comparison of different digestive tract models for estimating bioaccessibility of polychlorinated dibenzo-p-dioxans and dibenzofurans (PCPP/F) from red slag “ Kiesselrot”. **Int. Journal Hyg. Environment**, v. 203, p. 263-273, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Indicators of assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Genova, 1996. Acesso em: 05 de setembro de 2009. Disponível em: <http://www.who.int>

YONEKURA, L.; NAGAO, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 51, p.107-115, 2007.

ZANATTA, CINTHIA FERNANDA. **Determinação da composição de carotenóides e antocianinas de camu-camu**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de alimentos. Campinas, São Paulo, 2004.

