

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição

Tese de Doutorado

Caracterização química, atividade da lipoxigenase e
biodisponibilidade de carotenóides da rúcula (*Eruca sativa*)

Érika Maria Marcondes Tassi Granja

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, PhD

Orientador

Campinas-SP

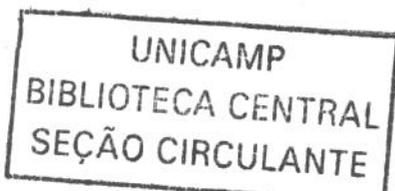
2001

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Érika Maria Marcondes Tassi**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de dezembro de 2001.

Campinas, 19 de dezembro de 2001


Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
Presidente da Banca



200206221

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	G766c
V.	
TORNO	47484
PREC.	837102
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	05-02-02
N.º CPD	

CM00163472-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

G766c
T184e
GRANJA Tassi, Érika Maria Marcondes
Caracterização química, atividade da lipoxigenase e biodisponibilidade de carotenóides da rúcula (*Eruca sativa*). / Érika Maria Marcondes Tassi. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Jaime Amaya-Farfán
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Carotenóides. 2.Biodisponibilidade. 3.Lipoproteínas. 4.Hortaliças. 5.Absorção. I.Amaya Farfán, Jaime. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Érika Maria Marcondes Tassi Granja

Caracterização química, atividade da lipoxigenase e biodisponibilidade de carotenóides da rúcula (*Eruca sativa*)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência da Nutrição

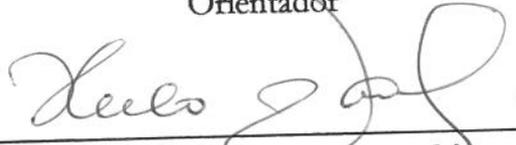
Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, PhD
Orientador

Campinas-SP
2001

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Universidade Estadual de Campinas
Orientador

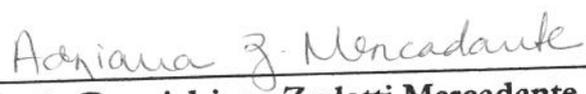


Prof. Dr. Hélio Vannucchi
Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto
Membro

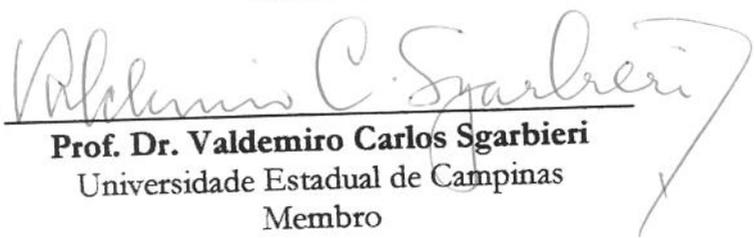


Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Universidade Estadual de Campinas
Membro



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Prof. Dr. Luiz Carlos Trugo
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Membro

*Dedico ao Rodrigo, meu querido
marido, que sem o apoio não seria
possível desenvolver este trabalho.*

*“Se olhei mais longe foi por estar em pé no
ombro de gigantes”*

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jaime que durante todo o tempo não só orientou mais mostrou o que é ser um cientista;

À Profª Délia pela colaboração e orientação dispensadas em várias etapas do trabalho;

Ao CNPq/Pronex pelo auxílio financeiro à pesquisa;

Às voluntárias que sem a colaboração o experimento não teria sido realizado;

À Vera pela coleta do sangue;

À Lucia Delahoz pelo companheirismo e ajuda científica;

Aos meus pais pelo incentivo constante;

À Fátima e Henrique Granja pela revisão gramatical;

À Dona Maria pela grande ajuda no decorrer do tempo;

Aos colegas de laboratório Florência, Flavia, Ivonete, Renata, Roberto, Sônia, Suzana, Luciana e Norka, pelo companheirismo e colaboração na fase de acertos metodológicos;

À Sandra e a Dirce do Departamento de Microbiologia pela ajuda no manuseio da ultracentrifuga;

À Valéria pela colaboração na eletroforese das lipoproteínas;

À Profª Helena Coutinho pela colaboração na metodologia de separação das lipoproteínas;

À Mieko pela orientação nas análises dos carotenóides da rúcula;

À Cristiane, Marcela e Ornella por doarem padrões de carotenóides;

À farmácia Medicamenta e à Patrícia Borges, pela contribuição em manipular em cápsulas o β -caroteno sintético;

Ao Francisco Carraro pela grande colaboração na utilização do HPLC;

À todos que indiretamente colaboraram de alguma forma na realização deste trabalho.

ÍNDICE

Resumo geral.....	x
General Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos	5
3. Capítulo 1	
3.1. Revisão bibliográfica	6
3.1.1. Rúcula.....	6
3.1.2. Deficiência em vitamina A.....	7
3.1.3. Retinóides e carotenóides	9
3.1.4. Absorção e metabolismo	11
3.1.5. Biodisponibilidade dos carotenóides.....	14
3.1.6. Metabolismo das lipoproteínas.....	25
3.2. Referências bibliográficas	29
4. Capítulo 2	
4.1. Resumo	39
4.2. Abstract.....	40
4.3. Introdução.....	41
4.4. Material e métodos.....	42
4.5. Resultados e discussão.....	48
4.6. Conclusão.....	59
4.7. Referências bibliográficas.....	60

5. Capítulo 3	
5.1. Resumo	64
5.2. Abstract	65
5.3. Introdução	66
5.4. Material e métodos	68
5.6. Resultados	74
5.7. Discussão	85
5.8. Conclusão	96
6. Referências bibliográficas	97
6. Conclusão	106
Anexos	107

Resumo Geral

Programas de prevenção à hipovitaminose A preconizam o consumo dos vegetais verdes folhosos, por serem fontes de carotenóides pró-vitamínicos A. Porém, alguns estudos questionam a eficácia desta conduta, alegando que a biodisponibilidade dos carotenóides das folhas é baixa demais para o combate à hipovitaminose. Como a rúcula (*Eruca sativa*) é um vegetal bastante consumido e, são poucas as informações sobre a sua composição, o presente trabalho teve como objetivo estudar o conteúdo de alguns nutrientes-chave da rúcula, e determinar a biodisponibilidade dos carotenóides nessa verdura folhosa, tanto crua como cozida, em relação ao β -caroteno sintético, através da dosagem destes nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT). No estudo sobre a composição determinou-se o teor de cinzas, proteína, lipídeos totais, carboidratos, fibras, ácidos graxos, além do conteúdo de α -tocoferol, carotenóides e atividade da enzima lipoxigenase no vegetal cru e cozido (5, 10 e 15 min a 97°C). Para estudar a biodisponibilidade, foi delineado o seguinte estudo: 10 mulheres adultas saudáveis, com o IMC de 18 a 20kg/m², foram orientadas a consumir durante três dias dietas isentas de fontes de carotenóides. No quarto dia foi feita coleta de sangue em jejum (t=0h) e, logo após, ingeriu-se refeição experimental constituída por rúcula crua (6,0 μ mol de β -caroteno) e 15g de gordura. Coletou-se sangue nos tempos de 2, 4 e 6 horas após a refeição. Após um intervalo de 60 dias repetiu-se o procedimento com o mesmo grupo, porém usando a folha cozida (7,7 μ mol de β -caroteno) por 5 minutos. O grupo controle (n=5) recebeu uma cápsula com 5,6 μ mol de β -caroteno ao invés do vegetal. Depois de isolado, o soro foi ultra-centrifugado para a obtenção das LRT. A biodisponibilidade foi estimada medindo a área sob a curva de concentração-tempo (ASC) de cada indivíduo. A rúcula crua apresentou a seguinte composição centesimal em base úmida: 1,8g de cinzas, 2,4g de proteína, 0,3g de lipídeos totais, 4,1g de carboidratos, 6,2mg de α -tocoferol, 5,3mg de luteína e 3,2mg de β -caroteno e 1,3g de fibra, sendo que o tratamento utilizado não inativou a enzima lipoxigenase. A composição em ácidos

graxos mostra que o ácido linolênico é predominante (48%). Os resultados de biodisponibilidade mostraram que existe considerável variação inter e intra-individual nas concentrações plasmáticas destes compostos (concentrações médias para β -caroteno e luteína de $204 \pm 132 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $91 \pm 44 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente). A absorção determinada pelo método da ASC para β -caroteno e luteína geralmente atinge seu pico em 4 horas, declinando rapidamente para a concentração de 2 horas. A biodisponibilidade média de β -caroteno observada para os grupos 'crua' e 'cozida' foi respectivamente, 61 ± 25 e $42 \pm 24 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$, em relação a $56 \pm 19 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para o β -caroteno em cápsula. Não houve diferenças significativas, entre as três médias, pelo teste de Student ($p > 0,05$). Quando comparada as ASCs observou-se que a absorção do β -caroteno foi maior do que a da luteína, independente do cozimento. Os resultados deste estudo sugerem que, a biodisponibilidade relativa dos carotenóides desta verdura não é baixa, que não houve alteração após 5 minutos de cozimento e que a interação entre o β -caroteno e a luteína resultou numa maior absorção do primeiro.

Palavras-Chave: carotenóides, biodisponibilidade, lipoproteínas, verduras folhosas, quilomícrons.

General Abstract

Hypovitaminosis-A prevention programs have recommended the routine consumption of green leafy vegetables for being good sources of provitamin A. Some studies, however, question the efficacy of this practice based on data indicating that carotenoid bioavailability from these sources is much too low to improve the vitamin A status of individuals in need. The rocket (*Eruca sativa*) is a green leafy vegetable widely consumed in some parts of Brazil, but until now there is little information regarding its nutritional properties, except for its carotenoid composition, particularly rich in lutein and β -carotene. The present work was designed to study the rocket leaf as a source of nutrients of lipid nature, namely α -tocopherol, polyunsaturated fatty acids and carotenoids and estimate the relative bioavailability of β -carotene and lutein to humans, both in the raw and in the cooked state. The experiment consisted of determining the carotenoids in the triacylglycerol-rich lipoproteins (TRL), the first stage after absorption, in 10 adult, healthy women ($18 < \text{BMI} < 20 \text{kg/m}^2$). The volunteers were instructed to consume diets free of carotenoids for three days. Early on the fourth day, a blood sample was drawn (fasted, $t=0\text{h}$). Immediately after, each volunteer ingested an experimental meal that consisting of white bread, 15 g of vegetable oil and the raw leaves ($6.0 \mu\text{mol}$ de β -carotene). Blood samples were drawn again at 2, 4 and 6 hours after the meal. This procedure was repeated 60 days later with the same group, only that the leaf was cooked ($7.7 \mu\text{mol}$ de β -carotene) for 5 minutes. A control group ($n=5$) received a capsule containing $5,6 \mu\text{mol}$ of β -carotene instead of the vegetable. The TRLs were isolated from the sera by ultracentrifugation, the carotenoids extracted from this fraction and quantified by HPLC. Bioavailability was estimated by measuring the area under the time-concentration curve (AUC) of each individual. The composition for the leaf indicated that this vegetable is a rich source of both lutein ($5.3 \text{mg}/100\text{g}$ wet weight) and β -carotene ($3.2 \text{mg}/100\text{g}$). In addition, nearly 48% of the fatty acid content of the leaf corresponds to linolenic acid. Results on the bioavailability study showed considerable inter- and intra-individual

variations in the serum concentrations of these compounds (mean values for β -carotene and lutein were $204 \pm 132 \text{ nmole} \cdot \text{L}^{-1}$ and $91 \pm 44 \text{ nmole} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively). Absorption of the carotenoids, estimated by the method of the area under the time-concentration curve (AUC), showed that β -carotene and lutein generally reached their peak in 4 hours, declining rapidly thereafter. Mean bioavailabilities for β -carotene were 61 ± 24 and $42 \pm 24 \text{ nmole} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, for the raw and cooked leaf, respectively, and $56 \pm 19 \text{ nmole} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for the β -carotene capsule. No significant differences were observed between the three means by the Student test ($p > 0.05$). Comparison of the AUCs revealed that absorption of β -carotene was 3 times greater than that of lutein, regardless of the heat treatment. These results support the notion that the relative bioavailability of these carotenoids from rocket is not low, that there was no alteration upon 5 minutes of cooking and that interaction between β -carotene and lutein results in the greater absorption of β -carotene.

Key-Words: carotenoid, bioavailability, lipoprotein, green leafy vegetables, chylomicrons.

1. Introdução

As verduras folhosas são parte importante da alimentação do homem e dos primatas, sendo uma excelente fonte de fibras, carotenóides, magnésio, potássio, cálcio e de vitaminas C e E, ácido fólico e outros agentes antioxidantes.

As folhas verdes escuras, no conjunto, são consideradas boas fontes de carotenóides que são pigmentos naturais, amplamente distribuídos na natureza, e alguns, com atividade pró-vitáminica A. O β -caroteno é o carotenóide pró-vitáminico A mais importante, devido á sua abundância e também por ser o mais eficiente na produção do retinol (vitamina A pré-formada).

O retinol participa do processo visual e da diferenciação e manutenção dos tecidos epiteliais, ou seja, no crescimento e desenvolvimento humano. A deficiência na dieta dessa substância tem contribuído para que, principalmente em países em desenvolvimento, elevada parcela da população seja acometida de hipovitaminose A (WHO, 1994).

Na tentativa de desenvolver estratégias de prevenção e ou combate a essa deficiência nutricional, muitos estudos vêm sendo realizados.

Dos diferentes trabalhos sobre a eficácia das verduras, realizados por pesquisadores de diversos países, a maioria constatou que o consumo desses vegetais ocasiona uma melhora no estado nutricional de vitamina A de crianças e adultos. Porém alguns estudos mais recentes (Bulux et al., 1994 e De Pee et al., 1995) obtiveram resultados controversos aos até então existentes.

Um importante fato que desencadeou a controvérsia tendo como alvo a divergência sobre a eficácia das fontes naturais, como as verduras folhosas, parece estar relacionado com as metodologias adotadas para a condução do experimento. Por exemplo, em algumas pesquisas os autores utilizaram a

dosagem dos carotenóides séricos para estudos sobre biodisponibilidade, no entanto, de acordo com a literatura, esse indicador não é o mais indicado devido ao fato de existirem indivíduos que não apresentam variações séricas após a ingestão do β -caroteno (Johnson & Russel, 1992). Observa-se também nesses estudos, a falta de uma padronização com relação à quantidade do alimento, tipo e forma (cru ou cozido) como ele é oferecido para os indivíduos. O tempo de cozimento tanto pode ser insuficiente para destruir o complexo caroteno-proteína, como pode ser excessivo e desta forma levar a degradação dos carotenóides.

Há de se enfatizar ainda as considerações tecidas por Rodriguez-Amaya, (1989) e Rodriguez-Amaya & Amaya-Farfán (1992), que destacaram o registro na literatura de dados desprovidos de exatidão, principalmente por superestimar os valores vitamínicos A da maioria dos alimentos.

Nos programas de combate a hipovitaminose A, a intervenção terapêutica é realizada através da administração de uma dose única da vitamina na forma palmitato de retinila. Mas, este tipo de intervenção, além de apresentar um alto custo, é de ação terapêutico-preventiva, não auto-sustentável e de pouco valor educacional para países em desenvolvimento.

A importância deste tema torna-se mais evidente quando observamos que o IVACG (International Vitamin A Consultative Group), órgão técnico em saúde pública sob os auspícios da USAID e da FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), vem investindo há anos em educação e ajuda às populações carentes do terceiro mundo, buscando incentivar a formação de hortas comunitárias e promover o consumo de verduras folhosas, como abordagem auto-sustentável de combate à hipovitaminose A (FAO- The Vitamin A Programme. Fourth Summary Progress Report, 1991-1992).

O presente estudo teve como objetivo estudar o conteúdo de alguns nutrientes-chave da rúcula (*Eruca sativa*), incluindo a composição de carotenóides. Avaliar a estabilidade e biodisponibilidade dos carotenóides nessa verdura folhosa, tanto crua como cozida, em relação ao β -caroteno sintético, através da dosagem dos carotenóides nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT) de mulheres saudáveis.

Referências Bibliográficas

BULUX, J.; DESERRANO, J. Q.; GIULIANO, A.; PEREZ, R.; LOPEZ, C. Y.; RIVERA, C.; SOLOMONS, N. W.; CANFIELD, L. M. Plasma response of children to short-term chronic β -carotene supplementation. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.59, n.6, p.1369-1375, 1994.

De PEE, S.; WEST, C. E.; MUHILAL, KARYADI, D.; HAUTVAST, J. G. A. J. Lack of improvement of vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. **The Lancet**, London, v.346, n.12, p.75-81, 1995.

FAO. The Vitamin A Programme. **Fourth summary progress report, 1991-1992: FAO's contribution to the ten-year UN action to control and prevent vitamin A deficiency, xerophthalmia and nutritional blindness**. Roma: Food Policy and Nutrition Division, FAO. 1992, 98p.

JOHSON, E. J.; RUSSEL, R. M. Distribution of orally administered beta-carotene among lipoproteins in healthy men. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.56, n.3, p.128-135, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrients Analysis**, v.5, p.191-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; AMAYA FARFAN, J. Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A. **Archivos Latinoamericano Nutrition**, v.42, p.180-191, 1992.

WHO – World Health Organization. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva, 1994. 56p

2. Objetivos

Geral

Estudar o conteúdo de alguns nutrientes-chave da rúcula, incluindo a composição de carotenóides. Avaliar a estabilidade e biodisponibilidade dos carotenóides nessa verdura folhosa, tanto crua como cozida, em relação ao β -caroteno sintético, através da dosagem dos carotenóides nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT) de mulheres saudáveis.

Específicos

1. Estudar a composição da rúcula (*Eruca sativa*), como modelo experimental dos vegetais folhosos, particularmente quanto aos níveis de proteína, gordura, fibra, carotenóides, tocoferóis e ácidos graxos.
2. Estudar os níveis de atividade da enzima lipoxigenase do vegetal, visto que a mesma pode agir sobre alguns nutrientes essenciais.
3. Comparar a biodisponibilidade relativa dos carotenóides principais da rúcula crua e cozida, usando a dosagem dos mesmos nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis séricas de mulheres saudáveis.

3. Capítulo 1

3.1. Revisão bibliográfica

3.1.1 Rúcula (*Eruca sativa*)

A rúcula ou pinhão é uma hortaliça da família *Cruciferae* que recebe o nome científico *Eruca sativa*. Ela foi documentada na literatura antiga da Terra Santa e existem vários nomes nas diferentes línguas, como por exemplo; "euzomon" em grego e "gargir" em hebraico. Em francês é "roquete" e "rocket" ou "arugula" em Inglês. Segundo Yaniv et al. (1998), a rúcula foi mencionada na Bíblia como "oroth".

Acredita-se que a rúcula seja uma planta medicinal e que pode ser usada como afrodisíaco, no tratamento de infecções dos olhos e em problemas digestivos e intestinais. O efeito da rúcula como afrodisíaco, está relacionado com o aumento da produção do sêmem após o consumo da semente, fato que está relatado no livro sagrado dos Judeus, o Talude. Nesta mesma literatura encontra-se que a rúcula (oroth, como era chamada) clareia os olhos e deve ser recomendada no seu tratamento (Yaniv et al., 1998).

A folha de rúcula possui gosto pungente, sendo bastante consumida crua como salada e também cozida, como ingrediente de alguns pratos culinários.

No Brasil são comercializados anualmente mais de 1.000.000 de maços no CEAGESP de São Paulo, sendo os municípios da Grande São Paulo, da região de Campinas e Sorocaba os principais produtores da hortaliça, que é uma planta anual, de porte baixo, com folhas relativamente espessas e subdivididas, de cor verde claro e as nervuras verde-arroxeadas claras (Minami & Netto, 1998).

Em um recente estudo (Weckerle et al., 2001), foi observado a presença de flavonóides na folha de rúcula, sendo um deles o quercetina 3. Esses compostos atuam como antioxidantes no organismo, prevenindo o aparecimento de

determinadas doenças que são causadas pelo aumento de produtos da oxidação. Também estão presentes na folha de rúcula alguns carotenóides, sendo os principais a luteína (4,8mg/100g) e o β -caroteno (3,4mg/100g) (Ramos & Rodriguez-Amaya, 1987).

3.1.2. Deficiência de vitamina A

Existem relatos que no antigo Egito por volta de 1500 a.C, pessoas apresentavam sinais de deficiência de vitamina A. Na época, o tratamento consistia na ingestão de fígado.

Durante muito tempo, a deficiência de vitamina A era conhecida como “a doença da deficiência de gordura”. A etiologia da doença só começou a ser descrita no início do século XX. Em 1913, McCollum & Davis observaram que ratos jovens que recebiam dietas sem gordura, adoeciam, paravam de crescer e desenvolviam sinais de inflamação ocular. O quadro era revertido com a adição de manteiga e óleo de fígado na dieta. Por estar relacionado com gordura, o composto foi denominado “gordura solúvel A” e mais tarde vitamina A.

A deficiência de vitamina A pode ocorrer não somente como resultado da ingestão inadequada, mas também devido à má absorção deste nutriente. Os primeiros sinais de deficiência são lesões cutâneas, como hiperqueratose folicular e infecções, no entanto, a manifestação clínica mais importante ocorre à nível ocular. Antes dos sinais oculares aparecerem, ocorre à manifestação subclínica ou marginal (McLaren & Frigg, 1997).

Os sinais oculares provenientes da deficiência de vitamina A variam desde a cegueira noturna (XN), xerose conjuntival (X1A), mancha de Bitot (X1B) até a xerose corneal (X2) e ulceração corneal (X3A e X3B). Esses sinais e sintomas são denominados xeroftalmia e as lesões irreversíveis da córnea, associada com a cegueira noturna de ceratomálacia (McLaren & Frigg, 1997).

As manifestações oculares provenientes da deficiência, de intensidade (leve ou moderada), respondem rapidamente a ingestão da vitamina A, e não deixam seqüelas (Sommer, 1995).

A deficiência de vitamina A afeta pessoas em cerca de 118 países, sendo considerada um grave problema nutricional mundial (Goodman et al., 2000), e em países em desenvolvimento como grave problema de saúde pública. Segundo Bloem et al. (1998), três milhões de crianças no mundo apresentam sinais clínicos da deficiência e, apesar de obscura, a magnitude da deficiência subclínica (níveis séricos de retinol < 20 µg/dl) deve ser em torno de 140 a 250 milhões de crianças.

No Brasil estudos isolados restritos a populações de baixa renda, mostraram que apesar de não ser freqüente a ocorrência de sinais clínicos da deficiência, como a xeroftalmia e a cegueira noturna, existem crianças com sinais subclínicos (níveis séricos de retinol inadequados). Sendo considerado um problema endêmico em algumas áreas das regiões do norte e nordeste do Brasil (Gonçalves-Carvalho, 1995; Ramalho, 1998; Gonçalves, 2001).

Desde 1983 começou a ser executada no Brasil uma ação (patrocinada pelo governo federal) no combate à hipovitaminose A, onde pré-escolares, das regiões do semi-árido nordestino, da periferia de Belo Horizonte e do vale do Jequitinhonha, começaram a receber doses maciças da vitamina (Araújo, 1989).

Programas de distribuição de doses maciças de vitamina A são eficientes como solução a curto prazo, pois a administração do palmitato de retinila é cara e de difícil implementação e continuidade em países em desenvolvimento (Zeitlin et al., 1992).

Underwood (1992) acredita que é essencial acoplar aos programas de distribuição de vitamina A, programas que incentivem práticas de horticultura e educação alimentar, no intuito de aumentar o consumo de vegetais verdes

folhosos. Como ocorreu na Tanzânia, onde um programa de controle da deficiência alimentar em vitamina A foi eficiente pois levou em consideração estratégias como educação alimentar e promoção do cultivo de hortas, para aumentar o consumo de alimentos ricos em pró-vitamina A (Kavishe, 1992).

Apesar de existirem diversos trabalhos que mostram o efeito positivo do consumo de vegetais verdes folhosos no combate à hipovitaminose A, esta estratégia está sendo questionada considerando os resultados de alguns estudos (Bulux, 1994; De Pee, 1995) que mostraram que a biodisponibilidade dos carotenóides das verduras folhosa é baixa, não sendo eficiente no controle da hipovitaminose.

3.1.3. Retinóides e Carotenóides

Vitamina A é um termo genérico usado para descrever todos retinóides que têm atividade biológica do *todo-trans* retinol. O nome retinol deriva-se de uma função específica da vitamina nos olhos (retina).

A forma aldeídica do retinol (retinal) pode derivar-se dos carotenóides pró-vitamínicos A; sendo o β -caroteno (composto de dois anéis β -ionona) o carotenóide com maior atividade de vitamina A e o mais amplamente distribuído na natureza. A percentagem importante dos carotenóides pró-vitamínicos é oxidada enzimaticamente (15,15'-dioxigenase) na mucosa intestinal, gerando retinal.

A vitamina A na sua forma álcool (retinol) é encontrada somente no reino animal, principalmente, como ésteres com ácidos graxos de cadeia longa, no fígado, rins, pulmões e depósitos de gorduras. Nos alimentos de origem vegetal, encontramos os carotenóides, que são responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelha de frutas, raízes, flores, peixes e pássaros. Eles se localizam nos cloroplastos de plantas superiores, embora neste tecido sua cor seja ocultada pela

clorofila. Também são encontrados em algas, bactérias e leveduras (Britton, 1995).

Recentemente, Scott & Rodriguez-Amaya (2000) propuseram que, face a insuficiência de estudos de conversão de carotenóides pró-vitamínicos A em retinol, não sejam adotados novos fatores de conversão. Na opinião desses autores, todos os dados de composição de alimentos em carotenóides pró-vitamínicos A devem ser publicados sem aplicar qualquer conversão, ou seja, que a prática de relatar esses dados em tabelas de composição na forma de equivalente retinol seja abandonada.

Os retinóides apresentam propriedades anti-carcinogênicas, prevenindo câncer de muitos órgãos incluindo as glândulas mamárias, sistema gênito-urinário, pâncreas, esôfago, fígado, pele e intestino. Estudos experimentais mostraram que existe uma relação inversa entre os níveis de vitamina A no organismo animal e o câncer induzido (Wald, 1987).

Os carotenóides apresentam algumas funções como a de promover a melhora do sistema imunológico e diminuir o risco de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e cataratas. Este papel dos carotenóides é atribuído à sua propriedade antioxidante de ligação com radicais livres e oxigênio singlete (DiMascio, 1998).

Estudo realizado por Seddon et al. (1994) sobre carotenóides e a degeneração macular, concluiu que o aumento do consumo de alimentos ricos em certos carotenóides, em particular os verdes escuros, pode diminuir o risco do desenvolvimento de degeneração macular em indivíduos idosos.

A toxicidade do retinol depende da idade do paciente, da dose e da duração da administração. Os primeiros sintomas de uma intoxicação aguda incluem irritabilidade, ou desejo irresistível de dormir, cefaléia intensa resultantes da

elevação da pressão intracraniana, tonturas, hepatomegalia, vômitos, papiledema e, depois de 24 horas, descamação generalizada da pele. A alta ingestão de vitamina A por crianças é resultado da administração exagerada da vitamina por parte dos pais. Nos adultos têm ocorrido toxicidade em consequência de prolongada auto-medicação, modismos alimentares ou uso de retinóides no tratamento da acne ou de outras lesões cutâneas.

3.1.4. Absorção e metabolismo

Absorção é definida como a passagem dos carotenóides da dieta, ou seus metabólitos, para a circulação linfática ou portal. Eles são absorvidos por difusão passiva pelas células do intestino delgado. Este processo deve ocorrer de acordo com o gradiente de concentração entre a micela e a membrana do enterócito (Van Vliet, 1996).

São vários os processos necessários para ocorrer uma absorção adequada: 1) digestão eficiente da matriz alimentar, onde encontram-se os carotenóides, 2) formação de micelas no intestino delgado, 3) entrada do carotenóide para a célula intestinal, e 4) transporte dos carotenóides e seus metabólitos para a circulação linfática ou portal (Erdman et al., 1996). A espécie humana absorve os carotenóides e os armazenam no fígado, sangue, tecido adiposo e leite.

Nos alimentos *in natura* os carotenóides encontram-se em um complexo caroteno-proteína e compostos celulares, dificultando assim a ação de enzimas, e ocasionando uma baixa digestão e absorção destes compostos. Um estudo mostrou que a absorção do β -caroteno em alimentos *in natura* é relativamente baixa, comparada com alimentos cozidos (300%) (Rock et al., 1998).

Vitamina A (ésteres de retinila) e os carotenóides ingeridos na alimentação são liberados no estômago de suas combinações protéicas, através da ação de enzimas proteolíticas. Em seguida, os sais biliares emulsificam os lipídeos e

formam as micelas que possuem grupos lipofílicos no centro e hidrofílicos por fora. Os ésteres de retinila são clivados à retinol no lúmen intestinal, pela ação de hidrolases pancreáticas. A absorção do retinol é mais eficiente (70 a 90%) que a dos carotenóides (20 a 50%), porém ambas dependem da quantidade de gordura da dieta (Blonhoff, 1994).

Uma porcentagem importante dos carotenóides pró-vitâmicos é oxidada enzimaticamente (15,15'-dioxigenase) na mucosa intestinal, gerando retinal (uma molécula de β -caroteno clivada no meio, origina duas de retinal), que é reduzido a retinol, através da ação da retinal redutase. Podem ocorrer também clivagens assimétricas nas posições 8', 10' e 12' formando os apocarotenais e compostos-*apo* menores. Os apocarotenais podem ser enzimaticamente convertidos a retinal ou oxidados formando o ácido β -apocarotenóico, os quais são posteriormente convertidos a ácido retinóico (McLaren & Frigg, 1997).

A conversão de carotenóides em retinol depende da presença do anel β -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica de no mínimo 11 carbonos. O β -caroteno (composto de dois anéis β -ionona) é o carotenóide com maior atividade de vitamina A e o mais amplamente distribuído na natureza. Outros carotenóides com menor atividade são os α - e γ - caroteno e a β - criptoxantina. O licopeno em função de sua estrutura, é um carotenóide sem atividade de vitamina A. Porém é um antioxidante importante, com maior capacidade de seqüestro de oxigênio singlete (DiMascio, 1998).

Todo o retinol formado, originário de fonte animal ou vegetal, será esterificado, através da enzima lecitina:retinol aciltransferase (LRAT) ou da atividade enzimática da acil:CoA retinol aciltransferase (ARAT), com ácido graxo de cadeia longa, principalmente na forma de palmitato, antes de ser incorporado aos quilomícrons. Os carotenóides que não foram clivados também são incorporados nos quilomícrons, que são transferidos por exocitose ao sistema linfático (Blonhoff, 1994).

A carga dos quilomícrons é composta por triacilgliceróis, fosfolípidos e vitaminas lipossolúveis (ésteres de retinila e carotenóides). Na corrente sanguínea eles são submetidos a lipólise (ação de lipases), e resultam na formação dos remanescentes, que são removidos do plasma para o fígado (Havel et al., 1988).

No fígado, os hepatócitos captam os quilomícrons remanescentes, através de seus receptores específicos, sendo os ésteres de retinila hidrolisados pelas hidrolases ácidas e neutras. Após o processo no endossomo, o retinol é transferido para o retículo endoplasmático, se liga a uma proteína que é sintetizada no próprio local (proteína ligadora de retinol - RBP), passa para o complexo de Golgi e é secretado da célula (Blonhoff, 1994).

A vitamina A é armazenada na forma de ésteres de retinila no fígado, nas células perisinusoidais estreladas. Cerca de 50 a 80% da vitamina A corpórea está no fígado. Os carotenóides encontram-se principalmente no tecido adiposo (80 a 85%) seguido do fígado (8 a 12%), músculos (2 a 3%) e em menor proporção em outros tecidos (Batres & Olson, 1987).

Após liberação pelas células, o complexo retinol-RBP plasmático se liga com a proteína transtiretina (TTR). A formação deste complexo reduz a perda de retinol na filtração glomerular (McLaren & Frigg, 1997).

Em adultos bem-nutridos, a concentração plasmática de RBP é de 1,9 a 2,4 $\mu\text{mol/L}$ (40 a 50 $\mu\text{g/mL}$), e o valor encontrado nas crianças fica em torno de 60% dos adultos. Desnutrição protéico-energética, infecções e parasitoses podem diminuir a concentração da RBP.

Em relação a bioconversão dos carotenóides no intestino, tem sido relatado que há um controle bidirecional, não de entrada, mas de conversão para vitamina A ativa. O que é bem demonstrado pela baixa taxa de conversão com alta ingestão; pois não ocorre hipervitaminose A com a ingestão de carotenóides. Estudos em

animais demonstraram que a bioconversão é maior quando há uma deficiência em vitamina A. Em humanos, quando o estado de vitamina A é adequado, o excesso de carotenóides causa carotenodermia, devido ao bloqueio da bioconversão, que é controlada por um efeito de "feedback". Isto sugere que ocorre um aumento na bioconversão em casos de deficiência em vitamina A (Solomons & Bulux, 1993).

3.1.5. Biodisponibilidade dos carotenóides

Conceito de biodisponibilidade

Usado inicialmente pela farmacologia, o termo biodisponibilidade foi proposto para estabelecer a proporção em que determinada droga intacta alcança a circulação e a razão na qual isso ocorre. Tratando-se de nutrientes, a biodisponibilidade absoluta pode ser definida como a proporção de um nutriente ingerido que se torna disponível para os processos metabólicos do organismo (Jackson, 1997). É importante distinguir a biodisponibilidade absoluta da relativa. A absoluta se refere à quantidade de um nutriente ingerido que se torna disponível para o organismo, enquanto que a relativa, é a comparação da eficiência de um determinado nutriente, contido numa fonte, em relação a outra fonte usada como referência.

Estes conceitos podem ser aplicados para os carotenóides pró-vitâmicos A. O estudo da biodisponibilidade dos carotenóides é complexo, pois, durante o processo absorptivo, o próprio intestino, através da ação da enzima 15,15'-dioxigenase, é capaz de efetuar a conversão destes compostos para vitamina A (Van Vliet, 1996). Desta forma, biodisponibilidade absoluta é a massa de vitamina A (mg de éster de retinila) encontrada na corrente sangüínea proveniente da ingestão de uma dose conhecida de carotenóides pró-vitâmicos A. Tendo em vista que as necessidades do organismo determinam a quantidade de pró-vitamina a ser convertida, e que o fígado regula o nível de vitamina circulante, segue-se que as quantidades de carotenóide e vitamina circulantes podem ou não

refletir a quantidade de pró-vitamina biodisponível. Portanto, nos estudos que têm como objetivo medir a biodisponibilidade absoluta é necessário o uso de isótopos.

A vitamina A recém-absorvida, através dos quilomícrons e seus remanescentes, é transportada para o fígado na forma de ésteres de retinila, já a endógena encontra-se no fígado, ligada à proteína retinol-ligante (RBP). A concentração plasmática de retinol não aumenta necessariamente em resposta à ingestão dos carotenóides pró-vitamínicos A. Apenas quando o indivíduo apresenta estoques orgânicos de vitamina A baixos, entra em ação o controle homeostático para aumentar os níveis plasmáticos de retinol. Desta forma, a dosagem do retinol plasmático é de pouco valor para se estimar a biodisponibilidade dos carotenóides pró-vitamínicos A. Entende-se que o melhor indicador da biodisponibilidades dos carotenóides, após a ingestão desses compostos, é o cálculo da área da concentração x tempo que os carotenóides aparecem nas lipoproteínas (quilomícrons $d < 0,9$ mg/dl) (Blonhoff, 1994).

Um estudo realizado por Johnson & Russel (1992), onde foi medida a concentração do β -caroteno no plasma e nas lipoproteínas, após a ingestão de 120mg de β -caroteno, mostrou que há variação na resposta plasmática entre os sujeitos, sendo que apenas 4 dos 11 indivíduos estudados apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de β -caroteno. Considerando isto, os pesquisadores vêm avaliando os estudos em biodisponibilidade, através da dosagem dos carotenóides nas lipoproteínas.

Fatores que interferem na biodisponibilidade

Segundo Castenmiller & West (1997), em estudos de biodisponibilidade de carotenóides devem ser considerados os seguintes fatores: 1- estrutura química do composto, 2- ligação molecular, 3- quantidade na dieta, 4- matriz onde está localizado o composto, 5- atenuadores da absorção e bioconversão, 6-estado

nutricional do indivíduo, 7- fatores genéticos, 8- outros fatores relacionados ao indivíduo e 9- interações com outros nutrientes.

1-Estrutura química

Na natureza a maioria dos carotenóides é encontrada principalmente na forma *todo-trans*. Acredita-se que a presença de isômeros *cis* em plantas não processadas seja, pelo menos em parte, proveniente da metodologia de extração (Quackenbush, 1987). Com o tratamento térmico pode ocorrer a isomerização de parte das formas *todo-trans* para *cis*, formando principalmente os isômeros 9, 13 e às vezes 15-*cis*. Vários estudos indicam, entretanto, que as formas *cis* possuem menor atividade vitamínica que a forma *trans* (Castenmiller & West, 1997).

No soro humano, a forma *todo-trans* do β -caroteno é a predominante (Stahl et al., 1993), existindo, porém, pequenas quantidades do 9-*cis* β -caroteno. Estes mesmo autores investigaram em 1995 o aparecimento de isômeros *cis* e *todo-trans* nos quilomícrons e VLDL, após a ingestão de uma mistura de isômeros de β -caroteno (*todo trans/cis*=1,5). Foi concluído que há um mecanismo de seleção dos isômeros, pois a concentração do *todo-trans* β -caroteno nos quilomícrons foi predominante. Foi observado também, por Gaziano et al. (1995), que a ingestão de 100mg/dia, durante 6 dias, do *todo-trans* β -caroteno ou da mistura 50:50 de *todo-trans* e *cis*- β -caroteno por humanos, leva a um maior aumento na concentração plasmática do *todo-trans* β -caroteno, em relação à forma *cis*.

Estudando a isomerização do licopeno, o qual não é convertido em vitamina A, Stahl & Sies (1992) observaram um aumento na razão dos isômeros *cis* para *trans* licopeno, no plasma de humanos, com relação à dose de licopeno que foi ingerida. Sugerindo desta forma a ocorrência de uma rápida isomerização do licopeno após a absorção.

Tang et al. (1995), utilizando o furão (*Mustela putorius furo*) como modelo animal, observaram que após a ingestão crônica de cantaxantina (78% *trans* e 22% *cis*), estes animais apresentavam um acúmulo de isômeros *cis* e *trans* no tecido adiposo, na mesma proporção ao que foi ingerido. Porém no fígado, o acúmulo da forma *cis* foi maior (70% *cis* e 30% *trans*). Exatamente o que ocorreu não se sabe, mas acredita-se que, ou os isômeros *cis* são estocados preferencialmente no fígado, ou o *todo-trans* é liberado para outros tecidos.

2-Ligação molecular

Alguns hidroxicarotenóides são encontrados nos alimentos esterificados com ácidos graxos (ex. β -criptoxantina no mamão papaia). No soro humano somente a forma livre deste carotenóide é detectada, sugerindo que a hidrólise dos ésteres ocorre antes desses compostos chegarem à circulação linfática.

Khachick et al. (1996) relataram que a maioria das xantofilas (hidroxicarotenóides) presentes na papaia e outras frutas estão na forma esterificada. Pouca quantidade foi detectada na forma livre.

Em 1995, Wingerath et al. realizaram um estudo para averiguar se o consumo de um concentrado de tangerina, rico em ésteres de β -criptoxantina (hidroxicarotenóide), aumentaria a concentração deste composto nos quilomícrons e no soro. Eles observaram que ocorria um aumento na concentração da β -criptoxantina na sua forma livre, sugerindo que antes desta ser liberada para a circulação linfática, ocorre a hidrólise dos ésteres.

3-Quantidade na dieta

Dependendo da quantidade de β -caroteno na dieta, ocorrem variações nos níveis plasmáticos deste composto. Isto pode ser observado tanto nos estudos em

que se administra dose única, como nos que são feitas suplementações a longo prazo.

Prince & Frizoli (1993) observaram aumento (três vezes maior) na concentração de β -caroteno no soro quando este foi ingerido em três refeições distintas, em comparação à ingestão de uma dose única. Considerando que pode ocorrer a bioconversão, também é necessário medir a quantidade de retinol plasmático, o que não foi feito no referido trabalho.

4-Matriz onde está localizado

Acredita-se que a biodisponibilidade do β -caroteno dissolvido em óleo, é muito maior do que o contido nos alimentos. Por exemplo, nos vegetais verdes folhosos, os carotenóides não estão completamente biodisponíveis por estarem complexados com proteínas cloroplásticas e outras estruturas celulares.

Bulux et al. (1994) relataram um acréscimo na concentração da pró-*vitamina* no sangue de crianças normais em *vitamina A* quando sua alimentação foi suplementada com β -caroteno sintético, mas não quando foi fornecida a cenoura como fonte de β -caroteno. Neste estudo, não se deu suficiente importância ao fato de os indivíduos apresentarem níveis de retinol sérico normais.

Em 1995, foi realizado um estudo por De Pee et al., onde observou-se que 62 mães da Indonésia, lactantes, não deficientes, suplementadas com β -caroteno sintético apresentaram aumentos consideráveis e significativos dos níveis de retinol sérico, retinol no leite e β -caroteno sérico, em contraposição a um grupo de 56 mães suplementadas apenas com verduras folhosas. Neste estudo, como no citado acima, os indivíduos apresentavam níveis de retinol sérico normais.

No estudo realizado por Rock et al. (1998) sobre a biodisponibilidade do β -caroteno em mulheres que ingeriram cenoura e espinafre, crus e processados, foi observado que as mulheres recebendo os alimentos termicamente tratados apresentaram um aumento de três vezes na concentração plasmática de β -caroteno, em relação às que receberam os alimentos na sua forma crua. Segundo os autores, o tratamento a quente, não influenciou o conteúdo do β -caroteno no alimento.

Em outro estudo realizado por Takyi (1999), em que pré-escolares, consumiram, durante três meses, sete dias por semana, vegetais verdes folhosos com determinada quantidade de gordura, foi observada uma melhora na concentração de retinol no soro. A porcentagem de crianças com níveis adequados de retinol aumentou de 28,2 para 48,2% após o consumo dos vegetais. Estes dados são de extrema importância para a discussão sobre a eficiência dos vegetais verdes folhosos como fonte de provitamina A.

Castenmiller & West (1997) realizaram um estudo, de 3 semanas, com 72 indivíduos, para averiguar o efeito do processamento na biodisponibilidade dos carotenóides do espinafre. Eles concluíram que a destruição enzimática da estrutura celular aumentava a biodisponibilidade do β -caroteno.

Com relação a outro carotenóide, o licopeno, que é encontrado principalmente no tomate na forma cristalina, Gärtner et al. (1997) realizaram um estudo sobre o efeito do tratamento, na biodisponibilidade deste carotenóide e, observaram que, indivíduos que consumiram pasta de tomate, apresentaram maior concentração de licopeno, em relação aos que ingeriram o tomate fresco. Confirmando portanto que, o processamento pode melhorar a biodisponibilidade dos carotenóides.

5-Atenuadores da absorção e bioconversão

Vários nutrientes, quando consumidos juntos com os carotenóides, podem afetar sua absorção e a bioconversão. A presença de proteínas e da bile no intestino ajuda na estabilização das emulsões lipídicas e leva à formação de micelas, as quais servem como veículo no transporte dos carotenóides.

Tang et al. (1995) observaram que o pH do estômago, também interfere na biodisponibilidade dos carotenóides. Eles relataram que após a ingestão de 120mg de β -caroteno (dose-única), os níveis plasmáticos deste carotenóide duplicaram nos indivíduos com pH normal em relação aos que apresentavam pH 6,4.

Roels et al. (1958) estudaram um grupo de garotos de uma vila africana, onde as pessoas em geral apresentavam um alto índice de hipovitaminose A. Os autores mostraram que só a ingestão de alimentos ricos em carotenóides não solucionava o problema de hipovitaminose. Neste estudo, um grupo de garotos recebeu cenoura, um segundo cenoura com óleo de oliva e um terceiro β -caroteno no óleo. Para as dietas com cenoura, cenoura com óleo de oliva e β -caroteno no óleo, as eficiências da absorção de β -caroteno foram de 5, 25 e 45%, respectivamente. Os autores constataram que a baixa ingestão de gorduras na região foi a principal causa da hipovitaminose A e, que para combater este problema, além de suplementar com alimentos ricos em carotenóides, seria necessário aumentar a quantidade de gordura da dieta.

A quantidade e o tipo de gordura da dieta é muito importante na absorção e bioconversão do β -caroteno. Borel et al. (1998) realizaram um estudo com o objetivo de averiguar o efeito da ingestão do β -caroteno, com triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e longa (TCL), sobre a biodisponibilidade e a atividade provitamínica A do β -caroteno em humanos. Foi observado que a resposta do β -caroteno nos quilomícrons é menor quando a ingestão é feita junto com TCM.

Com relação à atividade provitamínica A, o TCM não afetou os níveis de conversão do β -caroteno para vitamina A no intestino. Entretanto, a dose de 120mg ingerida é muito maior do que a encontrada nos alimentos.

As fibras também interferem na absorção de carotenóides. Erdman et al. (1988) mostraram que dietas com alto teor de fibras, especialmente a pectina, podem reduzir a utilização dos carotenóides. Em outro estudo, realizado por Rock & Swendseid (1992), observou-se uma redução do conteúdo plasmático de β -caroteno, quando a dieta ingerida continha um alto teor de pectina. Acredita-se que as fibras dietéticas interagem com os ácidos biliares, aumentando a excreção destes nas fezes e, com isto, diminuindo a absorção dos lipídeos e nutrientes lipossolúveis, como os carotenóides.

6-Estado nutricional do indivíduo

O organismo humano tenta manter um equilíbrio homeostático, absorvendo mais quando suas reservas estão depletadas, e menos, quando há uma condição adequada. Como a ingestão elevada do β -caroteno não causa toxicidade, como ocorre com a vitamina A, acredita-se que não só os níveis de β -caroteno ingerido, mas também o circulante, inibem a bioconversão deste para vitamina A.

Van Vliet et al. (1996) estudaram a atividade da dioxigenase, enzima responsável pela conversão do β -caroteno em vitamina A, em ratos que consumiram dietas com diferentes quantidades de vitamina A e β -caroteno. Eles concluíram que a conversão é maior nos animais que receberam dietas pobres em vitamina A, e que isto ocorreu devido ao aumento da atividade da enzima. Villard & Bates (1986) mediram a atividade de dioxigenase em ratos alimentados com dietas com diferentes teores de vitamina A (81-1551 RE/kg) por dez semanas. Também neste estudo, a atividade da enzima foi maior para os animais que receberam dietas pobres em vitamina A, sugerindo a existência de um mecanismo de ajuste metabólico para conservar ou suprir as necessidades de vitamina A.

Outro nutriente que pode afetar a utilização da vitamina A é a vitamina E. Arnrich & Arthur (1980) relataram que animais com deficiência em vitamina E apresentaram uma baixa utilização de vitamina A alimentar. Quando os níveis de vitamina E voltaram ao normal, ocorreu uma melhora na utilização da vitamina A da dieta.

7-Fatores genéticos

Sabe-se que algumas doenças genéticas podem interferir na absorção dos carotenóides, principalmente aquelas que envolvem a absorção de gorduras, pelo fato de que estas servem como veículo para a absorção dos carotenóides.

8-Fatores relacionados ao indivíduo

Fatores como a idade, peso corpóreo, fumo, consumo de álcool, estados patológicos, e outros, interferem na absorção dos carotenóides. Com relação à idade, Furr & Clark (1997), relatam que a quantidade de gordura na dieta é muito mais importante para a absorção dos carotenóides em jovens do que nos idosos, porém há evidência da necessidade de mais estudos sobre este tema. Acredita-se que, devido ao envelhecimento, ocorrem algumas mudanças na permeabilidade e nas propriedades da camada estacionária do intestino. Estas mudanças podem alterar a absorção dos nutrientes lipossolúveis.

Existem indivíduos que são resistentes à ingestão dos carotenóides, ou seja, não apresentam aumento na concentração plasmática após a ingestão. Não está claro se isto ocorre devido à má absorção dos carotenóides, ou a eficiente conversão para vitamina A. No trabalho realizado por Johnson & Russel (1992), apenas 4 dos 11 indivíduos estudados apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de β -caroteno, após a ingestão deste composto.

9-Interações com outros nutrientes

Aparentemente, interações entre os diferentes carotenóides também ocorrem durante o processo absorptivo e têm sido bastante questionadas ultimamente. Estudos sobre a absorção de carotenóides em humanos e furões têm mostrado que ocorre uma competição entre o β -caroteno e os outros carotenóides. Moore et al. (1997) realizaram um estudo sobre a absorção de carotenóides utilizando vesículas de membrana da bordadura em escova (VMBE). Observaram que ocorre uma competição entre o β -caroteno e o licopeno. Também foi observada competição entre o β -caroteno e a cantaxantina. Os autores acreditam que a competição entre o β -caroteno e a luteína ocorre após a passagem pela VMBE.

Um trabalho realizado por Khachik et al. (1996) sobre a biodisponibilidade e metabolismo da luteína, licopeno e β -caroteno em homens e mulheres saudáveis, recebendo dietas com alimentos ricos nestes carotenóides (couve, batata doce e suco de tomate), mostrou que, após três semanas, ocorre aumento de 2,3 vezes na concentração do β -caroteno plasmático (17 para 39 μ g/dl). Para o licopeno, o aumento foi de apenas 1,4 vezes. Estes dados sugerem que o licopeno do suco de tomate estava menos biodisponível que o β -caroteno da batata e da couve. A biodisponibilidade da luteína da couve apresentou amplas variações individuais, porém foram registrados aumentos de até 200% na concentração plasmática deste carotenóide.

Gärtner et al. (1996) investigaram a competição entre xantofilas (luteína, zeaxantina) e o β -caroteno na absorção intestinal. Após a ingestão do Betateno (extrato da alga *Dunaliella salina*) que contém 0,5% de luteína, 0,8% de zeaxantina, 3,6% α -caroteno, 70,3% de todo-*trans*- β -caroteno, 22,7% de *cis*-isômeros de β -caroteno e 2,1% de outros carotenóides, estes compostos foram dosados nos quilomícrons. Quando foi comparado o conteúdo de carotenóides presentes no Betateno com o aparecimento dos carotenóides nos quilomícrons

em 6, 9, 12 horas após a ingestão de Betateno, observou-se que existe uma preferência pela absorção de xantofilas (luteína e zeaxantina) em relação ao β -caroteno.

Na tentativa de elucidar a interferência de outros carotenóides na biodisponibilidade do β -caroteno em humanos, Van Denberg et al. (1996) mediram a concentração plasmática de β -caroteno e ésteres de retinila após a ingestão oral de β -caroteno, β -caroteno com luteína (concentrado de xantofila a 10%) e β -caroteno com licopeno (concentrado de tomate a 5%). A análise dos resultados mostrou que ocorre uma interação entre a luteína e o β -caroteno, porém não foi observado efeito significativo entre o β -caroteno e licopeno.

Paetau et al. (1997) estudando a interação do β -caroteno e cantaxantina nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis de mulheres que ingeriram estes carotenóides separadamente ou juntos, observaram que existem mecanismos distintos de incorporação dos carotenóides nas lipoproteínas, e que ocorreram interações entre o β -caroteno e cantaxantina durante a absorção.

Em estudo sobre as interações dos diferentes carotenóides, O'Neill & Thurnham (1998) estudaram a concentração da luteína e licopeno, em comparação com o β -caroteno, nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT), após a ingestão oral destes carotenóides por 12 indivíduos saudáveis. Concluíram que existe uma grande variação inter-individual, e que a absorção do β -caroteno é um processo "saturado", pois de 40mg ingeridos, apenas uma pequena quantidade foi encontrada nas LRT.

3.1.6. Metabolismo das lipoproteínas

As lipoproteínas (LP) plasmáticas são complexos macromoleculares, compostos por lipídeos e proteínas. Elas transportam e distribuem os lipídeos provenientes da dieta e os endógenos por todo o organismo e são constituídas por componentes apolares (triacilgliceróis e ésteres de colesterol) e polares (fosfolipídios, colesterol livre e proteínas). Os polares lhes conferem estabilidade em meio aquoso e, apesar da estrutura ser a mesma para todas as lipoproteínas, ocorre uma variação em sua composição e conseqüentemente em tamanho, densidade e carga elétrica (Lee et al., 1970).

Considerando estas diferenças, as lipoproteínas poderão ser classificadas com base em critérios eletroforéticos e de ultracentrifugação. De acordo com suas densidades (Brewer et al., 1988), podemos classificá-las em:

- a- Quilomícrons (partículas com densidades menor que 0,95g/mL e de tamanho entre 75-12000 Å);
- b- Lipoproteínas de densidade muito baixa ("Very Low Density Lipoprotein-VLDL, partículas com densidade menor que 1,006g/mL, com tamanho entre 300-800 Å);
- c- Lipoproteínas de densidade intermediária ("Intermediate Density Lipoprotein-IDL, partículas com densidade entre 1,006 – 1,019g/mL, com tamanho entre 250-350 Å);
- d- Lipoproteínas de densidade baixa ("Low Density Lipoprotein-LDL, partículas com densidade entre 1,019 – 1,063g/mL, com tamanho entre 180-250 Å);
- e- Lipoproteínas de alta densidade ("High Density Lipoprotein-HDL, partículas com subfrações HDL2, com densidade entre 1,063–1,125g/mL, e com tamanho entre 90-120 Å, e HDL3 com densidade entre 1,125-1,210g/mL e tamanho entre 50-90 Å).

Uma diferença marcante entre todas estas partículas é a porcentagem decrescente de lipídeos na sua composição.

Os lipídeos de origem alimentar (ácidos graxos livres, monoglicerídeos e colesterol), quando no intestino, são incorporados nos quilomícrons (Q) na forma de triacilgliceróis (TG-85%), colesterol livre (CL) e fosfolipídios (PL) (Glickman & Bisgaier, 1983). Os quilomícrons são sintetizados no retículo endoplasmático das células intestinais, passam para o complexo de Golgi e em seguida são liberados por pinocitose reversa para a linfa. A glicoproteína apoB-48 que tem alto peso molecular, é o componente estrutural dos quilomícrons.

Nos quilomícrons também está presente a apo C-II que é um co-fator para a ação da lipoproteína-lipase (LLP) (Fielding & Fielding, 1976). Esta enzima, localizada na superfície endotelial dos capilares, é responsável pela hidrólise dos TG contidos no núcleo hidrofóbico dos quilomícrons. Após a hidrólise, os monoglicerídeos e os ácidos graxos livres (AGL) são liberados e estes últimos transportados pela albumina para os tecidos muscular, hepático e adiposo.

Após a hidrólise dos triacilgliceróis, a partícula resultante é denominada de remanescentes de quilomícrons. Estes remanescentes, além de possuírem uma maior quantidade de ésteres de colesterol com relação à partícula anterior, apresentam na sua composição a apo E transferida da HDL.

Através de receptores específicos, o fígado reconhece a apo E, e capta os remanescentes por endocitose (Havel et al., 1988). A ligação entre a partícula remanescente e o sítio de remoção no hepatócito depende da interação entre a apo E e o receptor de partículas remanescente ou LRP (receptor related protein) localizado na membrana celular. Esse receptor tem alta afinidade por aminoácidos básicos presentes na apo E.

No fígado, a enzima lipoproteína-lipase (LLH), localizada na superfície das células sinusóides, hidrolisa parte dos triacilgliceróis liberados pela lipoproteína lipase periférica a qual atua unicamente na hidrólise dos triacilgliceróis. A LLH hidrolisa os fosfolipídios.

O pico da concentração plasmática de quilomícrons ocorre entre 3 e 6 horas após a ingestão de uma alimentação rica em lipídeos, sendo rápida a sua remoção plasmática. Os quilomícrons apresentam uma meia-vida de alguns minutos, e com isto, indivíduos normais em jejum de 12 horas, não apresentam quilomícrons séricos.

Os remanescentes são captados pelo fígado seguidamente, estes são metabolizados, ocorrendo a liberação de ácidos graxos, glicerol, aminoácidos e colesterol. O colesterol livre poderá ser reesterificado para ser armazenado, metabolizado em ácidos biliares ou utilizado na regulação da síntese do colesterol no hepatócito.

No fígado são formadas as VLDL, que são compostas pelas apo B100, CI, CII, CIII e E. Na circulação, as VLDL são hidrolisadas pela lipase lipoprotéica formando as IDL, que não são detectadas no plasma de indivíduos normais, por serem removidas rapidamente pelo fígado (Havel et al., 1988).

As LDL são as principais lipoproteínas transportadoras de colesterol, vitamina E e carotenóides para os tecidos extra-hepáticos. Nestes tecidos é importante a presença de receptores específicos que reconheçam a apo B100 presente na LDL. Quando ocorrem modificações químicas acidentais nas apo B, os receptores específicos da LDL não poderão reconhecê-las, induzindo esteatose hepática (Amaya-Farfán, 1999).

As HDL são sintetizadas no fígado e compostas por proteínas, fosfolipídeos, colesterol e traços de triglicerídeos. As apoA1, C1 e CII estão presente nas HDL. A A1 também está presente nos quilomícrons, nas VLDL e nos remanescentes de quilomícrons, mas não é encontrada nas LDL. Ela serve como co-fator para a enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCT), que é responsável pela esterificação do colesterol no plasma (Eisenberg, 1984).

3.2. Referências Bibliográficas

AMAYA-FARFÁN, J. Aflatoxin B-1 induced hepatic steatosis: role of carbonyl compounds and active diols on steatogenesis. **The Lancet**, London, v.27, n.9154, p.747-748, 1999.

ARAÚJO, R. L. Problemas nutricionais do Brasil. In: **Situação alimentar e nutricional do Brasil**. Brasília, Gráfica tipogresso, 1989. cap.3, p.15-38.

ARNRICH, L.; ARTHUR, V. A. Interaction of fat-soluble vitamins in hypervitaminosis. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v.355, p.109-112, 1980.

BAILEY, K. Control of vitamin A deficiency in Africa. **NU Nytt U-Landshalsovard. Vitamin A**, v.3, n.6, p.17-21, 1992. Special issue.

BATRES, R. O.; OLSON, J. A. A marginal vitamin A status alters the distribution of vitamin A among parenchymal and stellate cells in rat liver. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 117, n.5, p.874-879, 1987.

BLOMHOFF, R.; GREEN, J. B.; BERG, T.; NORUN, K. R. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport and storage. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.71, n.6, p.951-900, 1991.

BLOMHOFF, R. Transport and metabolism of vitamin A. **Nutrition Reviews**, Lawrence, v.52, n.2, p.13-24, 1994.

BLOEM, M. W.; DE PEE, S.; DARNTON-HILL, I. New issues developing effective approaches for the prevention and control of vitamin A deficiency. **Food Nutrition Bulletin**, Bethesda, v.19, p.137-148, 1998.

BOREL, P.; GROLIER, P.; ARMAND, M.; PARTIER, A. LANFONT, H.; LAIRON, D.; AZAIS-BRAESCO, V. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.37, n.2, p.250-261, 1996.

BOREL, P.; TYSSANDIER V.; MEKKI, N.; GROLIER, P.; ROCHETTE, Y.; ALEXANDRE-GOUABAU M. C.; LAIRON D.; AZAIS-BRASCO, V. Chylomicrons beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.8, p.1361-1367, 1998.

BREWER, H. B. Jr.; GREGG, R. E.; HOEG, J. M.; FOJO, S. S. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: overview. **Clinical Chemistry**, Washington, v.4, n.3, p.28-32, 1988.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, Bethesda, v.9, n.15, p.1551-1558, 1995.

BULUX, J.; DESERRANO, J. Q.; GIULIANO, A.; PEREZ, R.; LOPEZ, C. Y.; RIVERA, C.; SOLOMONS, N. W.; CANFIELD, L. M. Plasma response of children to short-term chronic β -carotene supplementation. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.59, n.6, p.1369-1375, 1994.

CASTENMILLER, J. J. M.; WEST, C. E. Bioavailability of Carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.69, n.10, p.2145-2150, 1997.

CASTENMILLER, J. J. M.; WEST, C. E.; LINSSEN, J. P. H.; VANHETHOF, K. H.; VORAGEN, A. G. J. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-carotene and to a lesser extent of lutein in human. **Journal of Nutrition**. Bethesda, v.129, n.2, p.349-355, 1999.

De PEE, S.; WEST, C. E.; MUHILAL, KARYADI, D.; HAUTVAST, J. G. A. J. Lack of improvement of vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. **The Lancet**, London, v.346, n.12, p.75-81, 1995.

DiMASCIO, P. Lycopene and other carotenoids as singlet molecular oxygen quenchers. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CAROTENÓIDES EM ALIMENTOS. **Resumos**. 1998. Campinas, SP, Brasil.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **Journal Lipids Research**, Bethesda, v.25, n.10, p.1017, 1984.

ERDMAN, J. W.; FAHEY, G. C.; WHITE, C. B. Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.116, n.12, p.2415-2423, 1996.

ERDMAN, J. W.; POOR, C. L.; DIETZ, J. M. Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenoids, and vitamin E. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.10, p.214-221, 1988.

FAO/WHO. **Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B₁₂**: report of a joint FAO/WHO expert consultation. FAO food Nutrition. Rome: FAO, 1988.

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Chylomicron protein content and the rate of lipoprotein lipase activity. **Journal Lipids Research**, Bethesda, v.17, p.419, 1976.

FURR, H. C.; CLARK, R. M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.8, n.7, p.364-377, 1997.

GÄRTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.66, n.1, p.116-122, 1997.

GÄRTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to beta-carotene in the human. **International Journal For Vitamin And Nutrition Research**, Bern, v.66, n.2, p.119-125, 1996.

GAZIANO, J. M.; JOHSON, E. J.; RUSSEL, R. M.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; REDKER, P. M.; FREI, B.; HENNEKENS, C. H.; KRINSKY, N. I. Discrimination in absorption or transport of beta-carotene isomers after oral supplementation with either all-trans or 9-cis beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.61, n.6, p.1248-1252, 1995.

GLICKMAN, R. M.; BISGAIER, C. L. Intestinal synthesis, secretion, and transport of lipoproteins. **Physiology**, v.45, p.425, 1983.

GONÇALVES, A. L. F. N. **Níveis séricos de vitamina A em crianças de 6-71 meses de idade matriculadas em uma unidade básica de saúde no município de Botucatu-SP**. Botucatu, 2001. 159p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

GONÇALVES-CARVALHO, M. C. R.; AMAYA-FARFAN, J.; WILKE, B. C. Prevalência de hipovitaminose-A em crianças da periferia do município de Campinas, SP, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Campinas, v.11, p.85-96, 1995.

GOODMAN, T.; DALMIYA, N.; BENOIST, B. SCHULTINK, W. Polio as a platform: using national immunization days to deliver vitamin A supplements. **Bulletin World Health Organization**, v.78, p.305-314, 2000.

GREINER T. Combining short- and long-term vitamin A deficiency control programs. **NU Nytt U-Landshalsovard. Vitamin A.** v.3, n.6, p.27-29, 1992. Special issue.

HAVEL, R. J. The formation of LDL: mechanism and regulation. **Journal Lipids Research**, Bethesda, v.25, p.1570, 1984.

HAVEL, R. J.; HAMILTON, R. L. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. **Hepatology**, Philadelphia, v.8, n.6, p.1689, 1988.

JACKSON, M. J. The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction. **European Journal of Clinical Nutrition**, Oxford, v.51, n.1, p.1-2, 1997.

JOHNSON, E. J.; RUSSEL, R. M. Distribution of orally administered beta-carotene among lipoproteins in healthy men. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.56, p.128-135, 1992.

KAVISHE, F. P. Development of vitamin A control programs: an example from Tanzania. **NU Nytt U-Landshalsovard**, v.3, n.6, p.21-26, 1992. Special issue.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; WILEY, E. R.; KRAMER, T. R.; BROWN, E.; SMITH, J. C.; CLEVIDENCE, B. A. Bioavailability and metabolism of carotenoids in healthy humans with high intake of foods rich in lutein, lycopene, and beta Carotene. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAROTENOIDS**, 11th.1996. **Abstracts Poster**. Leiden. Netherlands: IUPAC, 1996.

LEE, D. M.; ALAUPOVIC, P. Studies of the composition and structure of plasma lipoproteins. Isolation, composition, and immunochemical characterization of low density lipoprotein subfraction of human plasma. **Biochemistry**, New York, v.9, p.2244, 1970.

McCOLLUM, E. V.; DAVIS, M. The necessity of certain lipids in diet during growth. **Journal of Biologic Chemistry**, v.15, p.167-175, 1913.

McLAREN, D. S.; FRIGG, M. Sight and life: manual on vitamin A deficiency disorders. 1997.

MARCUS, R.; COULSTON, A. M. Bases farmacológicas da terapêutica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1991. Cap 64, p.1033-1039,

MINAMI, K.; NETTO, J. T. A cultura da rúcula. **Anais da Esalq.**, Piracicaba, 1998. 19p.

MOORE, A. C.; GUGGER, E. T.; ERDMAN, J. W. Competition between Beta carotene and selected carotenoids for uptake by rat and human brush border membrane vesicles. **FASEB Journal**, Bethesda, v.11, n.3, p.2262-2262, 1997.

NOMURA, A.; M. Y.; KOLONEL, L. N.; HANKIN, J. H.; YOSHIZAWA, C. N. Dietary factors in cancer of the lower urinary tract. **International of Cancer**, New York, v.48, n.2 p.199-205, 1991.

OLSON, J. A. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in human. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.45, n.4, p.704-716, 1987.

O'NEILL, M. E.; THURNHAM, D. I. Intestinal absorption of beta-carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal response curves in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.79, n.2, p.149-159, 1998.

PAETAU, I.; CHEN, H.; GOH, N.M-Y.; WHITE, W. S.; Interactions in the post prandial appearance of beta-carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol-rich lipoproteins in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.66, p.1133-1143, 1997.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 10°.ed. São Paulo: Nobel, 1982. 430p.

POLLACK, J.; CAMPBELL, J. M.; POTTHE, S. M.; ERDMAN, J. W. J. R. Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) absorb beta-carotene intact from a test meal. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124, p.869-873, 1994.

PRINCE, M.R.; FRISOLI, J. K. Beta-caroteno accumulation in serum and skin. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.57, p.175-181, 1993.

RALTE, A. L. First step for child survival: Preventing vitamin A deficiency among women at risk. **NU Nytt U-Landshalsovard. Vitamin A**, v.3, n.6, p.14-16, 1992. Special issue.

RAMALHO, R. A. N. S. **Deficiência marginal de vitamina A em recém-nascidos, puéperas e pré-escolares atendidos em três serviços de saúde do município do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 1998. 75p. Tese (Doutorado)-Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.

RAMOS, D. M. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. **Journal of Micronutrients Analysis**, San Diego, v.3, p.147-55, 1987.

REDDY, V.; UNDERWOOD, B. A.; DE PEE, S.; WEST, E. C.; KARYADI, D.; HAUTVAST, J. G. A. J. Vitamin A status and dark green leafy vegetables. **The Lancet**, London, v.346, p.1634-1636, 1995.

ROCK, C. L.; LOVALVO, J. L.; EMENHESER, E.; RULFIN, M. T.; FLATL, W. S.; SCHWART, S. J. Biavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.5, p.913-916, 1998.

ROCK, C. L.; SWENDSEID, M. E. Plasma beta-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.55, n.23, p.96-99, 1992.

ROELS, O. A.; TROUT, M.; DUPACQUIER, R. Carotene balances on boys in Ruanda where vitamin deficiency is prevalent. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.65, p.115, 1958.

SALOMONS, N. W.; BULUX, J. Effects of nutritional status on carotene uptake and bioconversion. In: Carotenoids in human health. **The New York Academy of Science**, New York, v.691, 1993.

SCOTT, J. K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents - fact or fiction? **Food Chemistry**, v.69, p.125-127, 2000.

SOMMER, Vitamin A deficiency and its consequences: a field guide to detection and control. 3ed. Geneva: **World Health Organization**, 1995. 69p.

STAHL, W.; SCHWARZ, W.; SIES, H. Human serum concentration of all-trans beta and alpha-carotene but not 9-cis beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatane). **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.5, p.847-851, 1993.

STAHL, W.; SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.122, n.11, p.2161-2166, 1992.

TAKYI, E. E. K. Children's consumption of dark green leafy vegetables with added fat enhances serum retinol. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, n.8, p.1549-1554, 1999.

TANG, G.; SERFATY, C.; RUSSEL, R. M. Effects of gastric acidity on intestinal absorption of beta-carotene in human. **FASEB**, Bethesda, v.9, A.442, 1995. Abstract.

THATCHER, A. J.; LEE, C. M.; ERDMAN, J. W. Tissue stores of beta-carotene are not conserved for later use as a source of vitamin A during compromised vitamin a status in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Nutrition**, v.128, v.7, p.1179-1185, 1998.

UNDERWOOD, B. A. Hipovitaminosis A: Hidden Hunger? **NU Nytt Ulandshalsovard. Vitamin A**, v.3, n.6, p.4-9, 1992. Special issue.

VAN DENBERG, H.; VAN SCHARK, F.; VAN VLIET, T. Beta-carotene absorption and Cleavage in men, interaction with lycopene and lutein. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM, ON CAROTENOIDS**. 1996, 11th 1996. Luden. Abstracts poster. IUPAC.

VAN VLIET, T.; VANVLISSINGEN, M. F.; VANSCHAIK, F.; VANDENBERG, H. beta-carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.126, n.2, p.499-508, 1996.

VAN VLIET, T.; VANSCHAIK, F.; VANSCHOONHOVEN, J.; SCHRIJVER, J. Determination of several retinoids, carotenoids and E vitamers by high-performance liquid chromatography. Application to plasma and tissue of rats fed a diet rich in either beta-carotene or canthaxanthin. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.553, n.1-2, p.179-186, 1991.

VILLARD, L.; BATES, C. J. Carotene dioxygenase (EC 1.13.11.21) activity in rat intestine. Effects of vitamin A deficiency and of pregnancy. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.56, p.115-22, 1986.

ZEITLIN, M. F.; MEGAWANGI, R.; KRAMER, E. M.; ARMSTRONG, H. C. Mother's and child's intakes of vitamin A in rural Bangladesh. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.56, n.1, p.136-147, 1992.

WALD, N. Retinol, B-carotene and cancer. **Cancer Surveys**, v.6, n.4, p.635-653, 1987.

WECKERLE, B.; MICHEL, K.; BALGS, B.; SCHREIER, P.; TOTH, G. Quercetin 3,3',4'-tri-O-beta-D-glucopyranosides from leaves of *Eruca sativa* (Mill.). **Phytochemistry**, v.57, n.4, p.547-551, 2001.

WINGERATH T.; STHAL W.; SIES H. beta-cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in beta-cryptoxanthin esters. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.324, n.2, p.385-390, 1995.

YANIV, Z.; SCHAFFERMAN, D.; AMAR, Z. Tradition, uses and biodiversity of Rocket (*Eruca sativa*, Brassicaceae) in Israel. **Economic Botany**, New York, v.4, n.52, p.394-400, 1998.

4. Capítulo 2

Caracterização Química da Rúcula (*Eruca sativa*) e o Efeito do Tratamento Térmico na Atividade da Lipoxigenase

Tassi, EMM & Amaya-Farfán, J

Resumo

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma verdura bastante consumida no Brasil, principalmente nas regiões sul e sudeste. Apesar de seu alto consumo, poucas são as informações existentes sobre a sua composição em nutrientes e propriedades relacionadas à saúde. Decorrente disto foi de interesse neste trabalho estudar a composição centesimal da rúcula, quantificando alguns de seus nutrientes específicos. Determinou-se o teor de cinzas, proteína, lipídeos totais, carboidratos, fibras, composição de ácidos graxos, além do conteúdo de α -tocoferol e carotenóides. A atividade da enzima lipoxigenase no vegetal cru e cozido (5, 10 e 15 min a 97°C) também foi medida devido ao fato desta enzima estar envolvida na degradação de alguns nutrientes de natureza lipídica. A rúcula apresentou a seguinte composição centesimal em base úmida: 1,8g de cinzas, 2,5g de proteína, 0,3g de lipídeos totais, 4,1g de carboidratos, 1,3g de fibra, 6,2mg de α -tocoferol, 5,3mg de luteína e 3,2mg de β -caroteno. A composição em ácidos graxos na rúcula mostra que o ácido linolênico é predominante neste vegetal (48%). Observou-se que o tratamento utilizado para inativar a enzima lipoxigenase não foi suficiente.

Palavras-chave: composição, *Eruca sativa*, vegetais folhosos, Vitamina E, β -caroteno, lipoxigenase

Chemical characterization of the leafy vegetable rocket (*Eruca sativa*) and the effect of thermal treatment on the lipoxygenase activity

Abstract

The rocket (*Eruca sativa*) is a green-leafy vegetable widely consumed mainly in South and Southeast Brazil. In spite of that, little chemical composition and nutritional information is available in the literature. One of the objectives of the present work was to study the macronutrient composition and some of its lipid micro-nutrients. The leaf content of total proteins, lipids, carbohydrates, fibers, ash, fatty acids, and the levels of α -tocopherol and carotenoids. Due to its importance in lipid nutrient degradation, the lipoxygenase activity was also measured in the raw and cooked (5, 10 e 15 min, at 97°C) rocket leaves. The per-cent (wet weight) composition found was: 2.5g of protein, 0.3g of lipids, 4.1g of carbohydrates, 1.3g de fiber, 1.8g of ash, 6.2mg of α -tocopherol, 5.3mg of lutein and 3.2mg of β -carotene. The rocket was found to be rich in linolenic acid (48%). It was also observed that the thermal treatment used on the vegetable was not sufficient to inactivate the lipoxygenase enzyme.

Key-words: composition, *Eruca sativa*, green leaves vegetables, lipoxygenase

Introdução

Vários estudos epidemiológicos relatam que o consumo de frutas e vegetais está associado com a diminuição do risco de alguns tipos graves de câncer, o qual é considerado por Miller et al. (1994) como um dos maiores problemas de saúde pública. Acredita-se que o poder de proteção contra o câncer se deva à ação antioxidante de alguns nutrientes presentes nos alimentos.

Entre os compostos que podem atuar na proteção contra o câncer estão, entre outros, os carotenóides. Estes são pigmentos naturais responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha de frutas, raízes, flores, peixes, pássaros e invertebrados. Os carotenóides são hidrocarbonetos, algumas vezes contendo oxigênio, geralmente com 40 carbonos, de estrutura poliênica com duplas ligações alternadas responsáveis pela capacidade de absorverem luz na região visível. Esta estrutura também proporciona aos carotenóides propriedades antioxidantes de inativação de radicais livres e seqüestro da forma mais reativa do oxigênio que é o oxigênio singlete (DiMascio, 1998).

As verduras folhosas são consideradas boas fontes de carotenóides. Nelas encontramos a luteína, que além de outras funções age contra a degeneração do tecido macular (Seddon et al., 1994) e o β -caroteno, que é o principal carotenóide com função pró-vitáminica A. A quantidade destes compostos presentes na folha, de potencial benefício à saúde, entretanto, pode ser diminuída com a presença e ação da enzima lipoxigenase, que está envolvida na degradação dos mesmos.

No Brasil, a rúcula (*Eruca sativa*) é um vegetal bastante consumido especialmente nas regiões Sul e Sudeste. Ela é uma hortaliça herbácea da família *Cruciferae*, de periodicidade anual, porte baixo, originária do sul da Europa e da parte ocidental da Ásia. A rúcula é consumida principalmente na forma crua, como salada e ultimamente vem crescendo o seu uso em alguns pratos específicos (como por exemplo, pizzas e molhos para macarrão). Suas folhas são tenras e

possuem um sabor pungente suave bem característico, facilmente destruído pelo calor.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a composição da rúcula (*Eruca sativa*), como representante dos vegetais folhosos, particularmente quanto aos níveis de proteína, fibras, carotenóides, tocoferóis e ácidos graxos. Estudou-se também a atividade da enzima lipoxigenase na folha crua e cozida, visto que a mesma pode agir no processo de degradação de alguns nutrientes, inclusive dos carotenóides.

Material e Métodos

Amostragem

A rúcula foi adquirida em dois fornecedores locais (Campinas, SP), sendo que o tempo de pós-colheita foi de 24 horas. Foram utilizados 10 maços (limpos e secos), dos quais retirou-se 4cm do cabo. As análises foram feitas em triplicatas e os valores foram tratados como amostras individuais para obtenção da média.

Composição

Fibras: foram determinadas por método enzimático, baseado na técnica de ASP (1983) e modificada, segundo as recomendações da AOAC (Lee et al., 1992).

Proteínas: foram determinadas pelos métodos semi-microkjeldahl e biureto (AOAC, 1990).

Lipídeos totais: foi usado o método Bligh & Dyer (1959).

Carboidrato: o teor foi calculado por diferença.

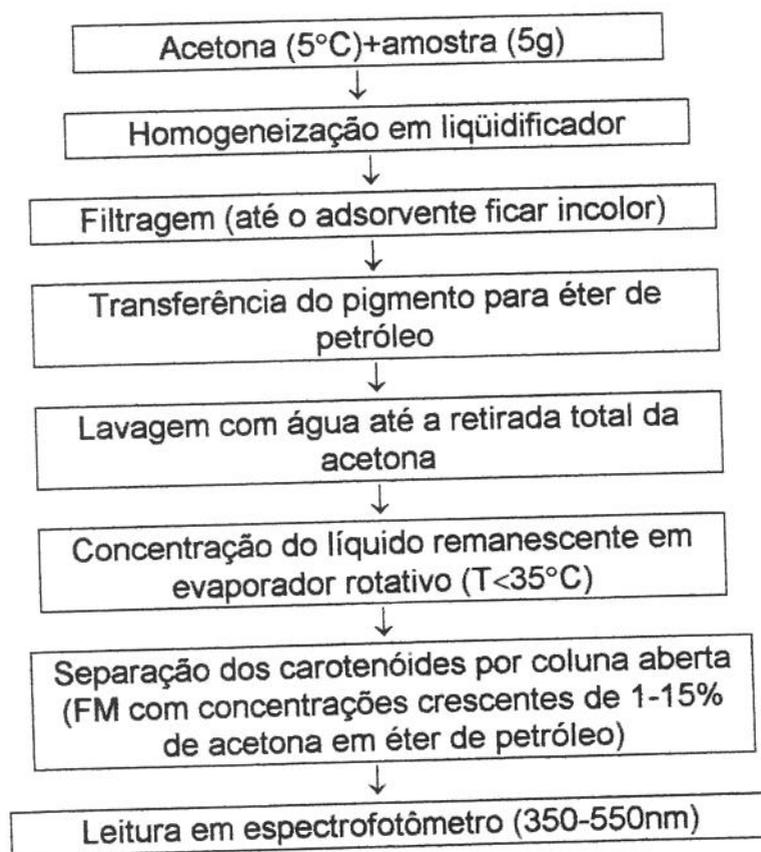
Cinzas: foi usada a técnica por incineração a 550°C (AOAC, 1980).

Umidade: foi usada a técnica de pesagem após secagem em estufa à 105°C (AOAC, 1980).

Tocoferóis: As folhas selecionadas da forma anteriormente descrita e depois pesadas na forma fresca e, em seguida liofilizadas, forçadas à passagem em peneiras (60 mesh) e homogeneizadas. A extração da fração lipídica (Bligh & Dyer, 1959) foi feita colocando 3g da amostra liofilizada em tubos de 80mL, com 20mL de clorofórmio e mais 8mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em homogeneizador rotativo por 30 min. Adicionou-se mais 10mL de clorofórmio e 10mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e agitou-se vigorosamente por 2 min. Centrifugou-se para separar as camadas. A camada orgânica com o clorofórmio foi separada, filtrada e evaporada sob o fluxo de N₂. O resíduo foi suspenso em 100µL de metanol (grau cromatográfico) e filtrado para ser injetado em cromatógrafo (Varian 9012), com coluna C-18 (LiChospher 100RP-18, Merck, 5µM, 125X4mm), utilizando metanol 100% (modo isocrático) como fase móvel e fluxo de 1mL/min. A fase móvel foi previamente desgaseificada por ultra-sonificação. O sistema foi monitorado com detector de fluorescência (Varian 9075) com excitação a 290nm e emissão a 330nm. O software utilizado foi Star Chromatography Workstation. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão externo o α -tocoferol (T-3001, Sigma, St. Louis, EUA). A técnica é baseada no método de Sharma & Kumar (1990).

Carotenóides: Utilizou-se tanto cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como cromatografia de coluna aberta (CCA), sendo o segundo feito de acordo com Rodriguez-Amaya et al. (1976). A amostra (5g) foi homogeneizada exaustivamente em liqüidificador com acetona (5°C) e celite, seguido de filtração (papel Whatman N°3). O meio filtrante foi resuspenso em éter de petróleo (Synth p.a.) e feita partição com água para remoção da acetona. Em seguida, concentrou-se o extrato em evaporador rotativo (T<35°C). A separação foi realizada em coluna aberta de MgO:Hyflosupercel (Merk, Darmstadt, 1:1, mistura previamente ativada a 110°C por 2 horas). A polaridade da fase móvel foi ajustada gradativamente de acordo com a polaridade do carotenóide em eluição (Figura 1). Após a lavagem com água para retirada da acetona, reduziu-se o volume em evaporador rotativo (T<35°C). A leitura foi feita em espectrofotômetro, na faixa de

350-550 nm (Fluxograma 1). A concentração dos carotenóides foi calculada usando-se a lei de Beer: $A=a.b.c$, onde A =absorbância, a =valor da absortividade em éter de petróleo (Davies, 1976), b = largura da cubeta e c = concentração do composto.



Fluxograma 1-Esquema de extração, separação e quantificação dos carotenóides por coluna aberta.

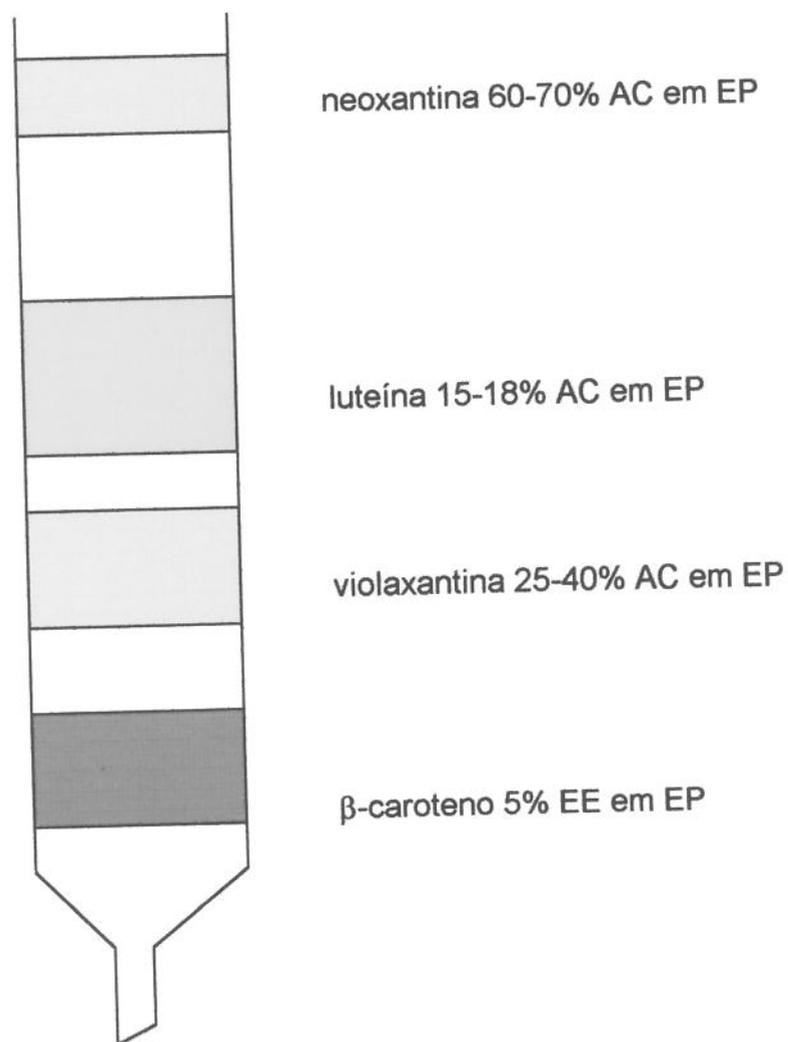
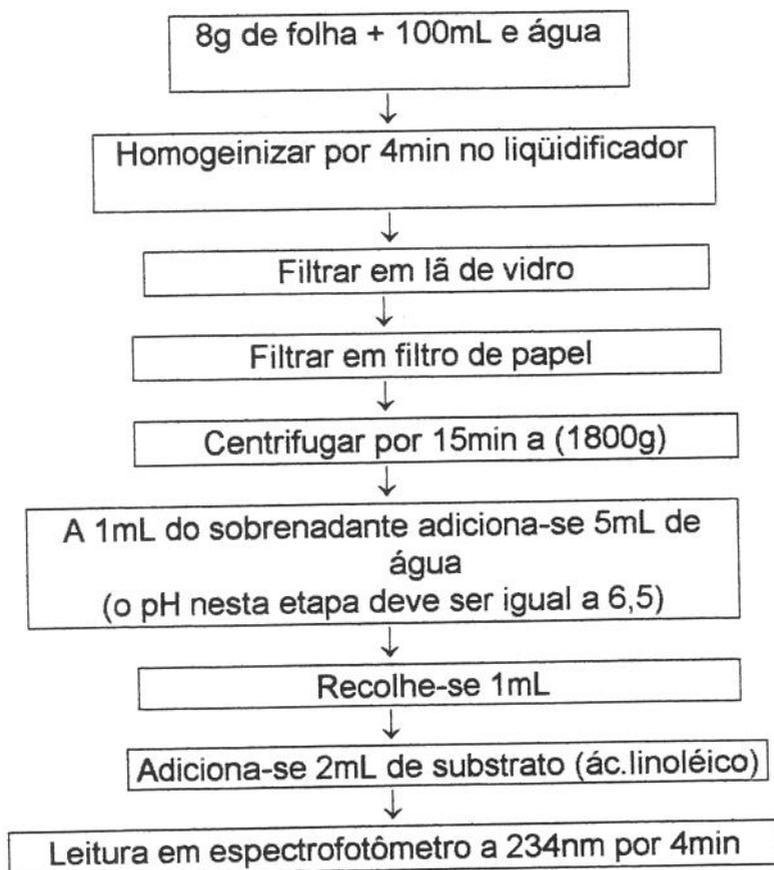


Figura 1-Separação dos carotenóides por coluna aberta (AC-acetona, EP-éter de petróleo e EE-éter etílico)

Para confirmar os resultados da análise dos carotenóides, utilizou-se também CLAE. A cromatografia foi realizada utilizando o cromatógrafo líquido Waters (modelo 2690) com um injetor automático controlado pelo Millennium workstation (versão 2010), e uma coluna de fase reversa polimérica C₁₈ (Spherisorb S3 ODS2, 3µm, 4,6 x 150mm). Utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetonitrila:metanol:acetato de etila, com fluxo de 0,5mL/min e eluição por gradiente de 95:5:0 para 60:20:20 durante 20 min, sendo este mantido até o final da corrida. O reequilíbrio das condições iniciais foi feito em 15 min. Foi utilizado um detector de arranjo de fotodiodos (Waters model 996).

Ácidos graxos: A esterificação da amostra foi realizada segundo o método de Hartman e Lago (1973). A composição dos ácidos graxos foi determinada utilizando-se o cromatógrafo gasoso Varian (modelo 3600) com coluna capilar DB-WAX (fase líquida Polietilenoglicol), 0,25µm, 30m x 0,252mm, com programação de temperatura (170°C-1 mim e 210°C-15mim), e injetor (split 1:30) com temperatura isotérmica de 250°C. O gás de arraste usado foi o H₂, com fluxo de 1,2mL/min. O detector utilizado foi o de ionização em chama (FID), com temperatura isotérmica (T=250°C). Para a integração da amostra utilizou-se o programa de integração Star Chromatography Workstation (versão 2010). A identificação e quantificação foram realizadas utilizando padrões externos dos ácidos graxos (Sigma, St. Louis, EUA).

Atividade lipoxigenase: A atividade da lipoxigenase (E.C.1.13.11.12) foi determinada na folha crua e cozida (por 5, 10 e 15 min a 97°C), segundo o método de Holman (1955), que utiliza o ácido linoléico como substrato (Fluxograma 2).



Fluxograma 2-Extração e quantificação da lipoxigenase presente na rúcula.

Resultados e Discussão

Composição Centesimal:

Na Tabela 1 encontram-se os valores obtidos para proteína, lipídeos, carboidratos, cinzas, fibras e umidade. Os valores médios encontrados não apresentaram diferenças marcantes quando comparados com os de outras folhas de composição já relatada. Apenas os teores de fibra alimentar total da rúcula são um pouco superiores aos valores já relatados para outras folhas, que são em média de 0,7g/100g de vegetal fresco (IBGE, 1977).

Tabela 1- Composição centesimal média da rúcula

Composto	Composição (%)*
Proteína	2,5±0,08
Lipídeos	0,3±0,04
Carboidratos	4,1±0,09
Fibra**	1,3±0,05
Cinzas	1,8±0,10
Umidade	92,0±0,20

*Valores representam médias de três determinações ± desvio-padrão (Base úmida)

**Fibra Alimentar Total

α-Tocoferol:

Devido a sua alta especificidade analítica, a CLAE é bem aceita na quantificação de tocoferóis em alimentos. A utilização do metanol 100% como fase móvel já é comum em alguns trabalhos (Tan & Brzuskiwicz, 1989; Sharma & Kumar, 1990). Em alimentos onde, além do α -tocoferol são encontrados outros isômeros, recomenda-se usar a mistura acetonitrila:metanol (60:40 v/v) (Tan & Brzuskiwicz, 1989). Como nos vegetais o principal composto encontrado da família dos tocoferóis é o α -tocoferol, utilizou-se a fase móvel de metanol a 100%.

Com relação ao α -tocoferol, Konings et al. (1996), utilizando sistema de CLAE, relataram teor de 6,3mg/100g de vegetal no brócolis. Na rúcula o valor médio de α -tocoferol encontrado foi de 6,2mg/100g de folha (Tabela 2), não diferindo, portanto, dos valores encontrados no brócolis.

Tabela 2- Conteúdo de α -tocoferol e dos carotenóides da rúcula, estes últimos obtidos por CLAE e CCA

Composto	mg/100g de folha úmida*
α -tocoferol	6,2±0,8
Carotenóides	
β -caroteno	3,5±0,9
Luteína	5,3±1,1
Neoxantina	0,9±0,2
Violaxantina	1,8±0,3

*Média \pm DP de triplicatas

Na Figura 2 pode ser observado o cromatograma do α -tocoferol presente na rúcula. O tempo de retenção do α -tocoferol presente na rúcula foi de 4 minutos.

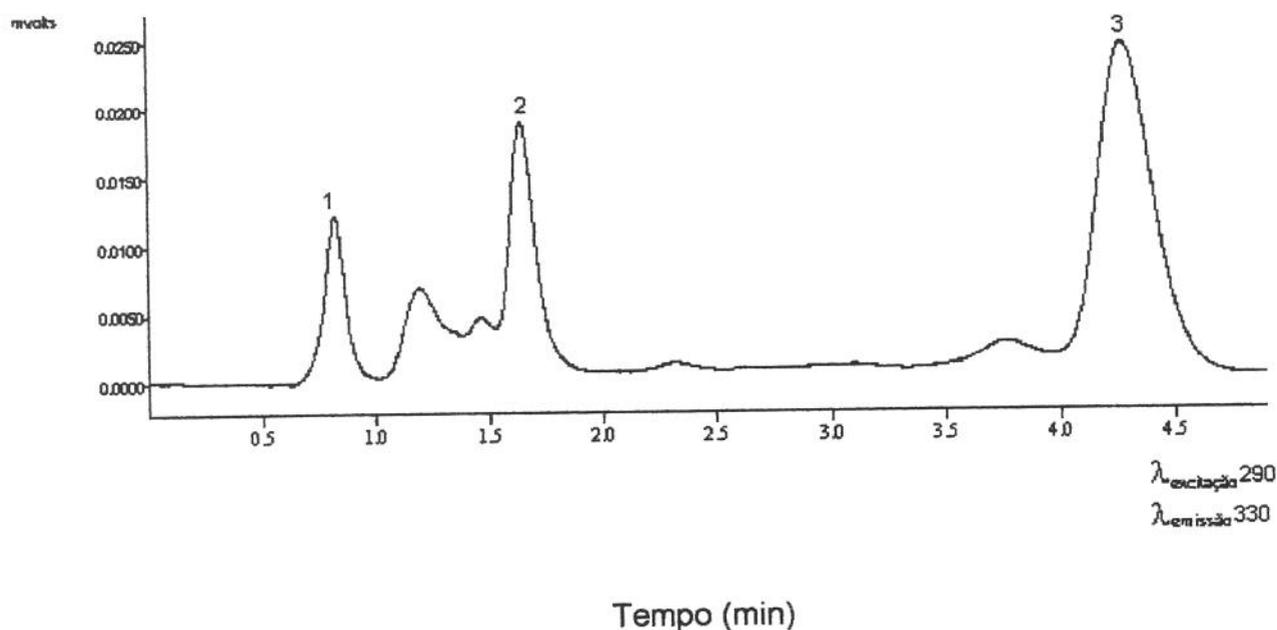


Figura 2- Cromatograma típico do extrato lipídico da rúcula. Os picos 1 e 2 não foram identificados. O pico 3 é o α -tocoferol. As condições cromatográficas estão descritas no texto.

Carotenóides:

Os teores de carotenóides encontrados no presente trabalho foram quantificados tanto por CCA, como por CLAE (Figura 3). Após a separação dos compostos por CLAE, foram feitos os espectros dos picos para a confirmação (Figuras 4 e 5). Hoje a metodologia por CLAE é mais comumente utilizada na análise de carotenóides, embora exista a dificuldade destes compostos absorverem luz em diferentes comprimentos de onda e, apresentarem diferentes coeficientes de absorção. Apesar da rapidez de análise por CLAE, esta técnica depende ainda da cromatografia por coluna aberta para o isolamento constante padrões de fontes naturais, devido ao fato de que eles se degradam facilmente e os sintéticos são caros.

O método por coluna aberta para análise dos carotenóides descrito em 1976 (Rodriguez-Amaya et al., 1976) foi tido como o melhor procedimento da época, e ainda hoje, é usado em vários laboratórios do Brasil e bem conceituado em termos de reprodutibilidade para os carotenóides pró-vitâmicos A em diferentes alimentos. Seus resultados analíticos são tão confiáveis quanto os obtidos por CLAE. Além disso, e devido à falta de padrões comerciais, é conveniente para todo laboratório analítico de carotenóides manter em funcionamento um sistema de coluna aberta.

Os teores de β -caroteno, luteína, neoxantina e violaxantina (Tabela 2) obtidos tanto por CLAE ou CCA, foram quase idênticos, sendo, portanto utilizados conjuntamente para a obtenção das médias. Segundo a classificação de Begum e Pereira (citado por Rodriguez-Amaya, 1997), que dividiram os vegetais folhosos da Índia em três grupos, a rúcula é um vegetal com nível médio de β -caroteno, 3,2 mg/100g. Considerando que o β -caroteno é o carotenóide com maior atividade pró-vitáminica A, e que o custo da rúcula no Brasil não é alto, no longo prazo, o consumo deste vegetal poderia ser encorajado como mais uma alternativa na prevenção da hipovitaminose A.

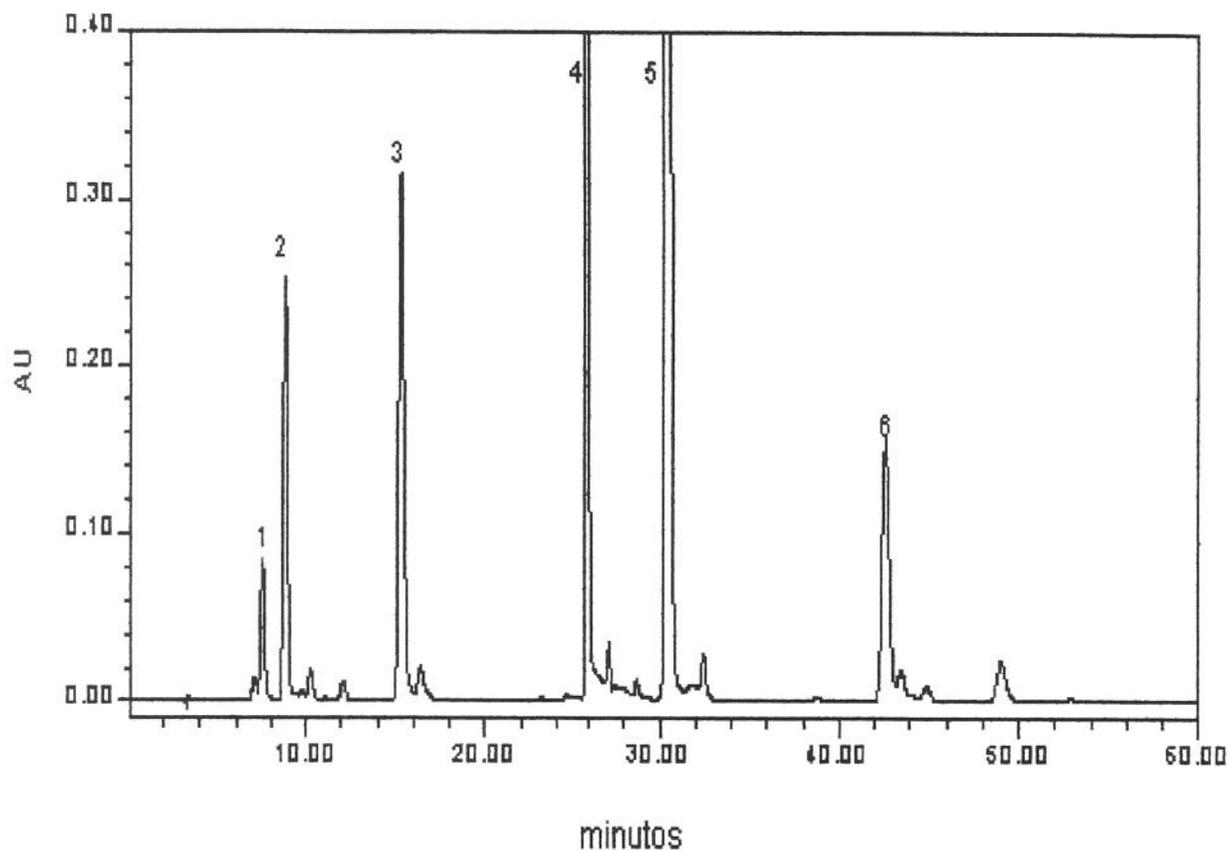
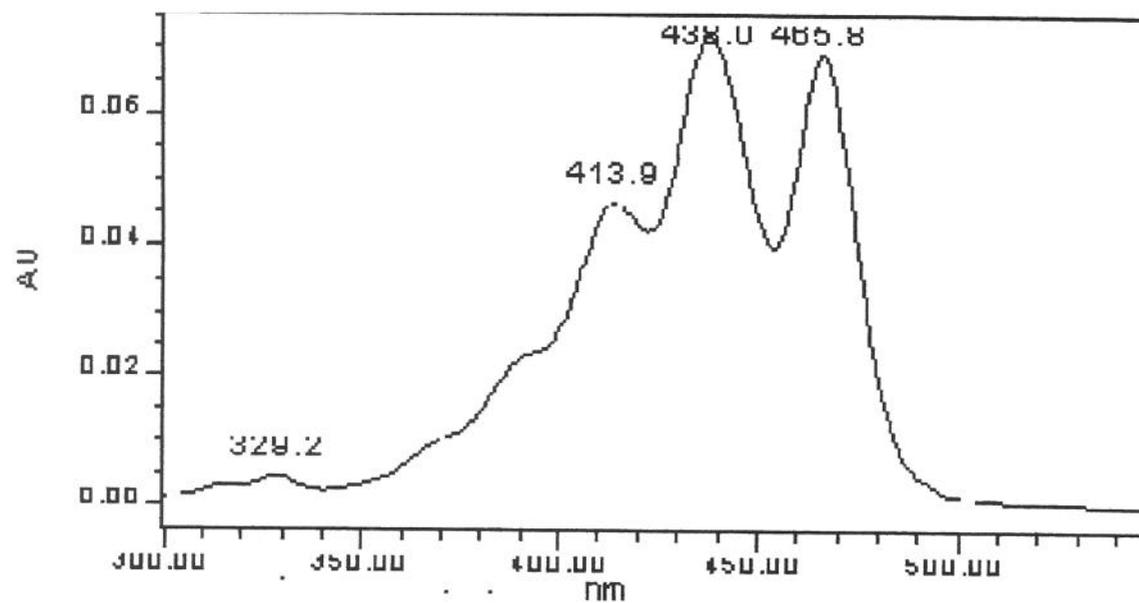
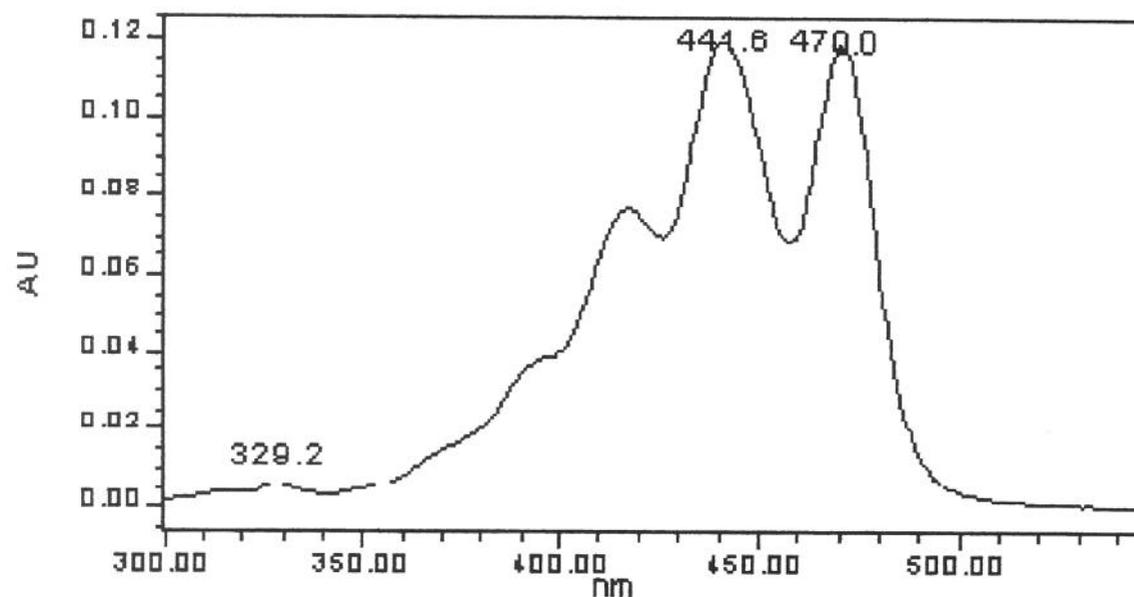


Figura 3-Cromatograma de extrato de rúcula crua obtida por CLAE. 1-neoxantina, 2-violaxantina, 3-luteína, 4,5-clorofilas e 6- β -caroteno. As condições cromatográficas estão descritas no texto.



A



B

Figura 4- Espectros de absorção dos picos neoxantina (A) e violaxantina (B) da Figura 3, obtidos pelo detector de conjunto de diodos.

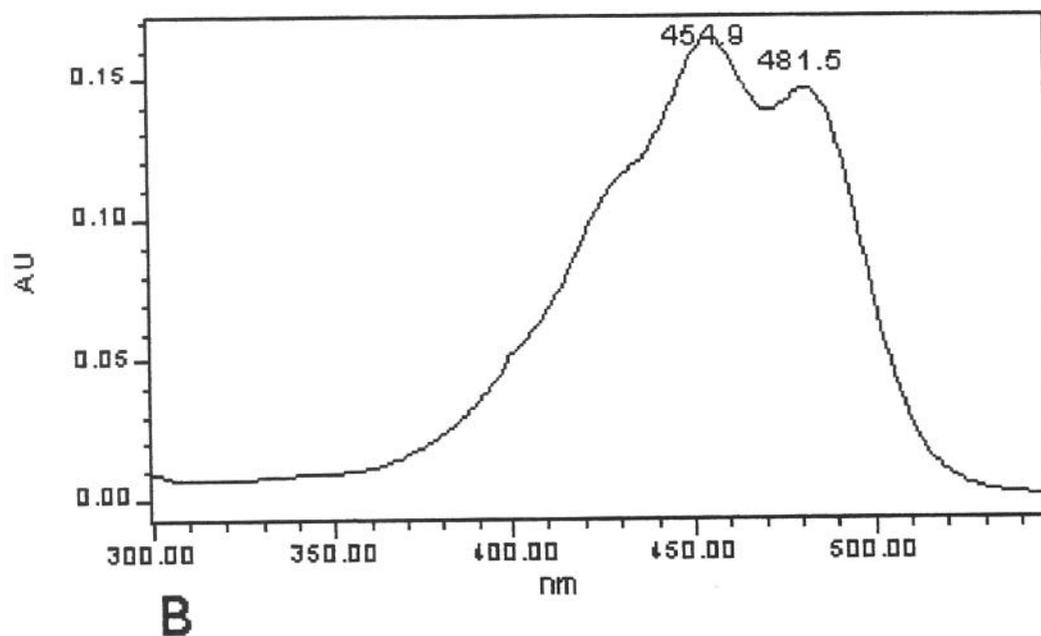
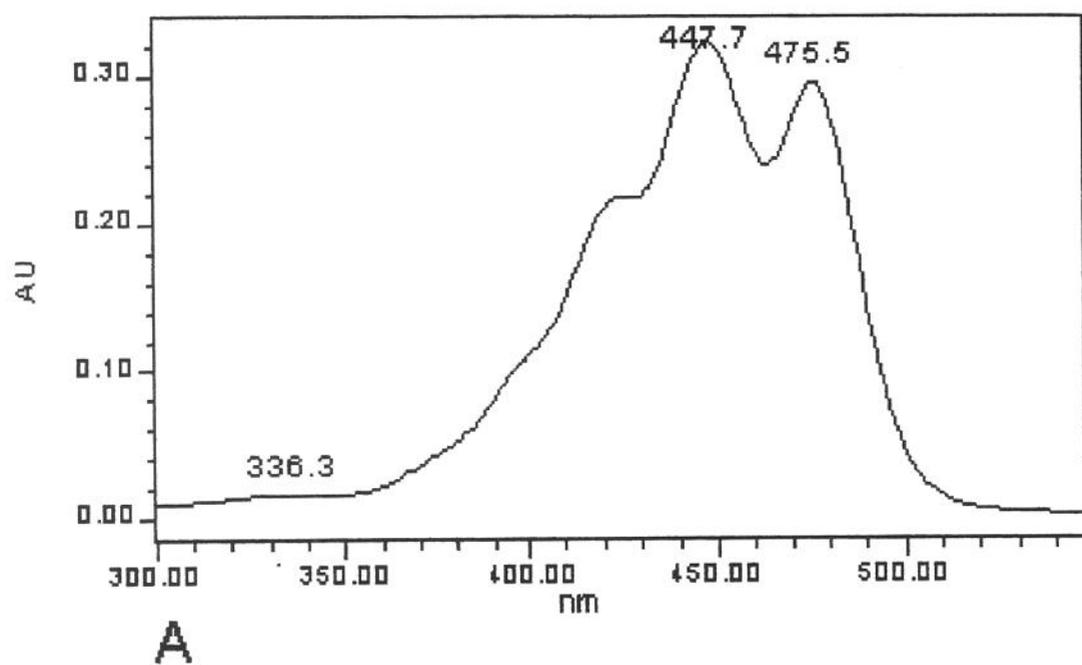


Figura 5- Espectros de absorção dos picos luteína (A) e β -caroteno (B) da Figura 3, obtidos pelo detector de conjunto de diodos.

Estudos sobre o valor biológico do β -caroteno de fontes folhosas mostram que a biodisponibilidade do β -caroteno é baixa nos vegetais folhosos e muito inferior a biodisponibilidade do β -caroteno sintético (De Pee, 1995), o que lança dúvidas quanto à eficácia das verduras folhosas como fonte de vitamina A para o homem. Contudo, estudo recente sobre a biodisponibilidade dos carotenóides contidos na rúcula em humanos (Tassi & Amaya-Farfán, 2001) mostra que, em mulheres saudáveis, a absorção do β -caroteno presente neste vegetal cru é equivalente à do β -caroteno sintético.

A rúcula, como os outros vegetais folhosos, também contém uma grande quantidade de luteína (5,3 mg/100g). A luteína é um oxicarotenóide (xantofila) que está presente nos tecidos animais, principalmente no pigmento macular da retina e no soro de humanos. Estudos têm mostrado que este pigmento, junto com a zeaxantina, fornece proteção às células sensíveis da retina provavelmente prevenindo contra a degeneração macular (Seddon et al., 1994).

Ácidos graxos:

Como pode ser observado na Tabela 3, 48% da composição dos ácidos graxos presentes na folha da rúcula é representada pelo ácido linolênico (C 18:3), o qual é um ácido graxo essencial de importância funcional e, estudos têm mostrado que a ingestão deste composto apresenta efeitos positivos para a saúde, incluindo atividade hipocolesterolêmica, antitrombótica e antiinflamatória (Katan et al., 1995).

Apesar da presença de ácidos graxos polinsaturados na rúcula ser conveniente devido aos efeitos citados, por outro lado, esses ácidos graxos apresentam como efeito indesejável a rápida deterioração do vegetal, devido a ação direta da lipoxigenase nos ácidos quer sejam livres ou ligados, para formar radicais intermediários (Whitaker, 1994).

Já na semente da rúcula, o óleo extraído é composto predominantemente pelo ácido graxo erucico (C22:1) sendo que a composição dos ácidos graxos presentes na semente pode variar de acordo com a origem geográfica. Em sementes de origem alemã esse ácido corresponde a 47%, enquanto que em sementes nativas de Israel, essa porcentagem cai para 33% (Yaniv et al., 1998). Provavelmente essa variação deve ocorrer também na composição da folha, porém não foi possível fazer este tipo de comparação.

Tabela 3 Composição interna dos ácidos graxos na folha da rúcula (*Eruca sativa*)

Ácido Graxo	%
C 12:0	0,83
C 13:0*	1,11
C 14:0	0,68
C 15:0	0,44
C 16:0	10,94
C 16:1	11,23
C 17:0*	0,57
C 18:0	1,28
C 18:1	2,09
C 18:2	7,39
C 18:3	48,01
C 18:4(n-3)	0,16
C 20:4(n-3)	0,17
C 20:5(n-3)	0,72
C 22:5(n-3)	5,35
C 22:6(n-3)	0,17

*Provável (sem padrão interno)

Atividade da lipoxigenase:

Há relativamente poucos dados disponíveis com respeito ao efeito das enzimas sobre a qualidade nutricional das folhas. Sabe-se que a lipoxigenase está envolvida na oxidação dos ácidos graxos essenciais, que são todos insaturados, desta forma diminuindo sua qualidade nutricional. Com a oxidação dos ácidos graxos através da ação direta da lipoxigenase, ocorre a formação de radicais livres e hidroperóxidos, os que por um lado são responsáveis pela perda da cor do vegetal e por outro, podem trazer prejuízos à saúde do consumidor.

Considerando que os carotenóides são nutrientes importantes na alimentação humana e o fato de serem susceptíveis ao ataque da lipoxigenase (Whitaker, 1994), fica evidente a necessidade de se obter maiores informações sobre a ação desta enzima.

Após o cozimento da folha por 5, 10 e 15 min, a 97°C foi medida a atividade da lipoxigenase presente na rúcula e o possível efeito do cozimento. Como pode ser observado na Figura 5, houve uma inativação aproximada de 50% a partir dos primeiros 5 min e que posteriores aumentos do tempo não foram suficientes para produzir inativação completa da atividade da lipoxigenase. Na literatura consultada, não existem resultados que possam ser comparados com os encontrados neste trabalho. Entretanto, estudando a lipoxigenase presente na soja, Paulo et al. (1995) afirmaram existir isoenzimas da lipoxigenase (isoenzima 4) que são altamente resistentes ao calor. Apesar de tratar-se de alimentos diferentes, provavelmente na rúcula exista isoenzima semelhante que também não seja inativada pelo calor.

A atividade de uma enzima pode variar muito nos alimentos de acordo com: o cultivar, o grau de maturidade e com as condições ambientais de crescimento (temperatura, solo e fertilização). Whitaker (1994) coloca que o tempo necessário

para inativar uma enzima depende da concentração desta no alimento e que, é difícil inativar uma enzima que apresente alta concentração inicial.

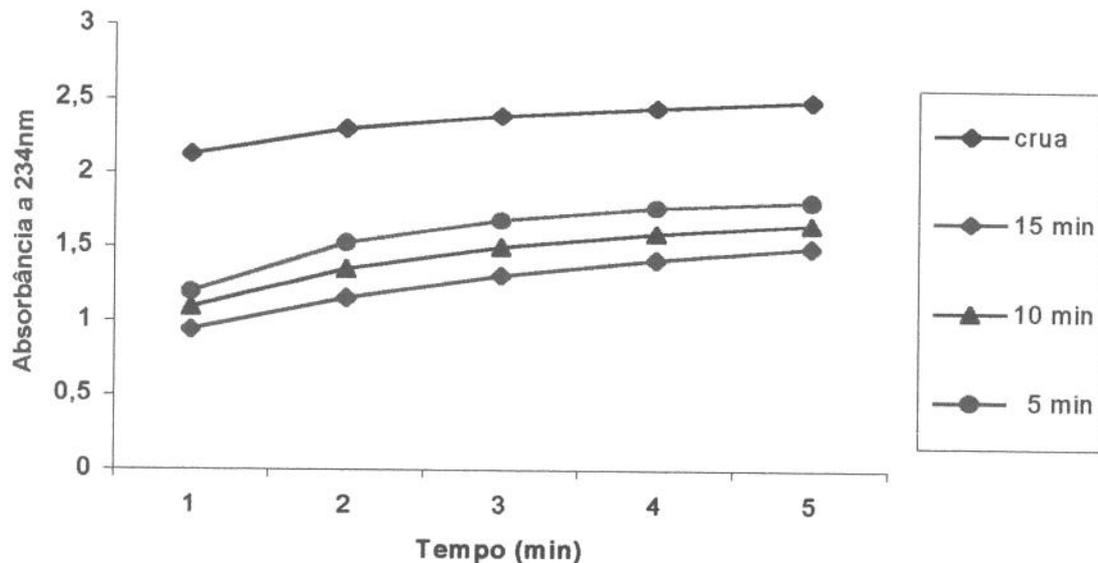


Figura 5- Atividade da lipoxigenase da rúcula crua e cozida por diferentes tempos. Absorbância do substrato ácido linoléico versus tempo de reação. Os resultados representam médias de 4 determinações.

Conclusão

Com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- 1- A rúcula possui composição em macronutrientes semelhante às de outras verduras folhosas;
- 2- A composição em ácidos graxos na rúcula mostra que o ácido linolênico é predominante neste vegetal (48%);
- 3- - A atividade da enzima lipoxigenase foi reduzida em 50% após 15 min de cozimento;
- 4- A composição dos carotenóides da folha de rúcula está de acordo com outras pesquisas recentemente divulgadas sendo a luteína e o β -caroteno os principais componentes;
- 5- A metodologia utilizada para quantificar o α -tocoferol foi eficiente e poderá ser utilizada para estudos em outras folhas;

Referências Bibliográficas

AOAC. **Official methods of analysis**. Washington, 13th ed. DC: Association of Official Analytical Chemists, 1980.

AOAC. **Official methods of analysis**. 15th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

ASP, N. G.; JOHANSSON, C. G.; HALLMER, H.; SILJESTROM, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.476-82, 1983.

BLIGH, EG; DYER, WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. (ed.). **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. London: v.2, Academic Press, 1976.

De PEE, S.; WEST, C. E., MUHIAL, K. D.; HAUTVAST, J. G. A. J. Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. **The Lancet**, London, v.346, p.75-81, 1995.

DiMASCIO, P. Lycopene and other carotenoids as singlet molecular oxygen quenchers. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CAROTENÓIDES EM ALIMENTOS. **Resumos**. 1998. Campinas, SP, Brasil.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.4, p.475-46, 1973.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. **The Lancet**, London, v. 342, n.23, p.1007-1011, 1993.

HOLMAN, R. T. Measurement of lipoxidase activity. **Methods Biochemistry Anal**, v.2, p.113, 1955.

IBGE. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Tabelas de composição de alimentos**. 3ed. Rio de Janeiro, 1977. 216p.

KATAN, M. B.; ZOCK, P. L.; MENSINK, R. P. Dietary oils, serum lipoproteins and coronary heart disease. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v.61, n.6, p.1368-1373, 1995.

KIMURA, M. **Aprimoramento da metodologia para determinação de carotenóides em alimentos**. Campinas, 1999. 96p. Tese (Doutorado). – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KONINGS, E. J. M.; ROOMANS, H. H. S.; BELJAARS, P. R. Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in margarine, infant foods, and vegetables. Food composition and additives. **Journal of AOAC International**, Garthersburg, v.79, n.4, 1996.

LEE, S.; PROSKY, L.; DEVRIES, J. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods: collaborative study. **Journal Association of Analytical Chemistry**, Garthersburg, v.3, n.2, p.234-238, 1992.

MILLER, A. B.; BERRINO F.; HILL M. P.; PIETINEN P.; RIBOLI E.; WAHRENDORF J. Diet in the aetiology of cancer: a review. **European Journal of Cancer**, Oxford, v.30, n.2, p.207-220, 1994.

PAULO, A. C. O. C. J.; CABRAL, L. C.; VIEIRA, C. R.; BASTOS, A. M. M. Estudo cinético da inativação térmica protéica na soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.15, n.3, p.262-267, 1995.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A. **Boletim do SBCTA**, Campinas, n.19, v.4, p.227-242, 1985.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation**: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: John Snow, OMNI, 1997. 88p.

RODRIGUEZ, D. B.; RAYMUNDO, L. C.; LEE, T. C.; SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C.O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, London, v.40, n.167, p.615-624, 1976.

SEDDON, J. M.; AJANI, U. A.; SPERDUTO, R. D.; HILLER, R.; BLAIR, N.; BURTON T. C.; FARBER, M. D.; GRAGOUDAS, E. S.; HALLERR, J.; MILLER D. T.; YANNUZZI, L. A.; WILLETT, W. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. **JAMA**, v.272, n.9, p1413-1420, 1994.

SHARMA, A.; KUMAR, A. Concurrent analysis of plasma retinol and α -Tocopherol by isocratic HPLC. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi. v.28, n.8, p.780-782, 1990.

TAN, B.; BRZUSKIEWICZ, L. Separation of tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase. **Liquid Chromatography. Analytical Biochemistry**, San Diego, v.180, n.2, p.368-373, 1989.

TASSI, E. M. M. T.; AMAYA-FARFÁN, J. Absorção dos carotenóides da rúcula (*Eruca sativa*) e incorporação nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT). In: **Caracterização química, atividade da lipoxigenase e biodisponibilidade de carotenóides da rúcula (*Eruca sativa*)**. Campinas, 2001. 105p. Tese (Doutorado). –Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

THANE, C.; REDDY, S. Processing of fruit and vegetable: effect on carotenoids. **Nutrition & Food Science**, v.2, p.58-65, 1997.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food science**, 2nded., Marcel Dekker: New York, 1994. 301p.

YANIV, Z.; SCHAFFERMAN, D.; AMAR, Z. Tradition, uses and biodiversity of Rocket (*Eruca sativa*, Brassicaceae) in Israel. **Economic Botany**, New York, v.4, n.52, p.394-400, 1998.

AGRADECIMENTOS: CNPq e PRONEX (FINEP/MCT) pelo apoio financeiro

5. Capítulo 3

Absorção dos carotenóides da rúcula (*Eruca sativa*) e incorporação nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT)

Tassi, EMM & Amaya-Farfán, J

Resumo

Programas de prevenção à hipovitaminose A preconizam o consumo dos vegetais verdes folhosos, por serem fontes de carotenóides pró-vitâmicos A. Porém, alguns estudos questionam a eficácia desta conduta, alegando que a biodisponibilidade dos carotenóides das folhas é baixa demais para o combate à hipovitaminose. O presente trabalho teve como objetivo determinar a biodisponibilidade relativa de β -caroteno e luteína da rúcula (*Eruca sativa*) crua e cozida, mediante a determinação cromatográfica dos carotenóides, imediatamente depois de transferidos para as lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT), que é o primeiro estágio da assimilação. O estudo foi delineado da seguinte maneira: 10 mulheres adultas saudáveis com o IMC de 18 a 20kg/m², foram orientadas a consumir durante três dias dietas isentas de fontes de carotenóides. No quarto dia foi feita coleta de sangue em jejum (t=0h) e, logo após, ingeriu-se refeição experimental constituída por rúcula crua (6,0 μ mol de β -caroteno) e 15g de gordura. Coletou-se sangue nos tempos de 2, 4 e 6 horas após a refeição. Após um intervalo de 60 dias repetiu-se o procedimento com o mesmo grupo, porém usando a folha cozida (7,7 μ mol de β -caroteno) por 5 minutos. O grupo controle (n=5) recebeu uma cápsula com 5,6 μ mol de β -caroteno ao invés do vegetal. Depois de isolado, o soro foi ultracentrifugado para a obtenção das LRT. A biodisponibilidade foi estimada medindo a área sob a curva de tempo (ASC) de cada indivíduo. Os resultados mostraram que existe considerável variação inter e intra-individual nas concentrações plasmática destes compostos (concentrações médias para β -caroteno e luteína de 204 \pm 132nmol·L⁻¹ e 91 \pm 44nmol·L⁻¹, respectivamente). A absorção determinada pelo método da ASC para β -caroteno e luteína geralmente atinge seu pico em 4 horas, declinando rapidamente para a concentração de 2 horas. A biodisponibilidade média de β -caroteno observada para os grupos 'crua' e 'cozida' foi respectivamente, 61 \pm 25 e 42 \pm 24nmol·L⁻¹h⁻¹, e 56 \pm 19nmol·L⁻¹h⁻¹ para o β -caroteno em cápsula. Não houve diferenças significativas entre as três médias pelo teste de Student (p>0,05). Quando comparada as ASCs observou-se que a absorção do β -caroteno foi maior do que a da luteína, independente do cozimento. Os resultados deste estudo sugerem que a biodisponibilidade relativa dos carotenóides desta verdura não é baixa, que não houve alteração após 5 minutos de tratamento térmico e que a interação entre o β -caroteno e a luteína resultou numa maior absorção do primeiro.

Palavras-Chave: carotenóides, biodisponibilidade, lipoproteínas, verduras folhosas

Abstract

Programs for the prevention of hypovitaminosis A have recommended the consumption of green leafy vegetables as good sources of provitamin A. Some studies, however, question the efficacy of this practice based on data indicating that carotenoid bioavailability from these sources is too low to improve the vitamin A status of individuals. The objective of this work was to estimate the relative bioavailability of β -carotene and lutein from rocket (*Eruca sativa*) leaves, both raw and cooked, by chromatographic determination of the provitamin-A carotenoids, immediately after being transferred to the triacylglycerol-rich lipoproteins (TRL), which is the first stage towards utilization. The experiment included 10 adult, healthy women (Body Mass Index between 18 and 20). The volunteers were instructed to consume diets free of carotenoids for three days. Early on the fourth day a blood sample was drawn (fasted, $t=0h$). Immediately after, each volunteer ingested an experimental meal of bread, 15g of vegetable oil and the raw leaves ($6,0\mu\text{mol}$ de β -carotene). Blood samples were again collected at 2, 4 and 6 hours after the meal. After an interval of 60 days the procedure was repeated with the same group, only that the leaf was cooked ($7,7\mu\text{mol}$ de β -carotene) for 5 minutes. A control group ($n=5$) received a capsule containing $5,6\mu\text{mol}$ of β -carotene instead of the vegetable. The TRLs were isolated from the sera by ultracentrifugation, the carotenoids extracted from this fraction and quantified by HPLC. Bioavailability was estimated by measuring the area under the time-concentration curve (AUC) of each individual. The results showed considerable inter- and intra-individual variations in the serum concentrations of these compounds (mean values for β -carotene and lutein were $204\pm 132\text{nmole}\cdot\text{L}^{-1}$ and $91\pm 44\text{nmole}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively). Absorption of the carotenoids, estimated by the method of the area under the time-concentration curve (AUC), showed that β -carotene and lutein generally reached their peak in 4 hours, declining rapidly thereafter. Mean bioavailabilities for β -carotene were 61 ± 24 and $42\pm 24\text{nmole}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$, for the raw and cooked leaf, respectively, and $56\pm 19\text{nmole}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ for the β -carotene capsule. No significant differences were observed between the three means by the Student test ($p>0.05$). Comparison of the AUCs revealed that absorption of β -carotene was 3 times greater than that of lutein, regardless of the heat treatment. These results support the notion that the relative bioavailability of these carotenoids from rocket is not low, that there was no alteration upon 5 minutes of cooking and that interaction between β -carotene and lutein results in the greater absorption of β -carotene.

Key-Words: carotenoid, bioavailability, lipoproteins; green leafy vegetables, chylomicrons.

Introdução

A deficiência em vitamina A representa ainda um ponto crítico dentro dos esforços despendidos pelos governos para solucionar os problemas de má nutrição e saúde pública nos países em desenvolvimento. Programas de incentivo ao cultivo de hortas vêm sendo realizados nas comunidades mais carentes, na tentativa de educar e aumentar o consumo de vegetais, diminuindo assim o impacto negativo da hipovitaminose A na saúde.

As verduras folhosas são consideradas boas fontes de carotenóides. Estas são fonte de luteína, que além de outras funções age diminuindo o risco da degeneração macular relacionada com a idade, e de β -caroteno que é o principal carotenóide com função pró-vitáminica A. A filosofia dos programas de incentivo à horta, porém, está sendo reavaliada em virtude de estudos que questionam a eficácia das folhas no combate à hipovitaminose A (De Pee et al., 1995).

Pelo fato dos carotenóides estarem complexados com proteínas do cloroplasto e outros componentes da célula vegetal, acredita-se que a ingestão da folha crua comprometa a digestão e absorção destes compostos (Poor et al., 1993; Thane & Reddy, 1997). Supõe-se ainda que o cozimento possa, por um lado melhorar a biodisponibilidade relativa destes compostos, enquanto que do outro, a temperatura elevada venha promover a formação de isômeros *cis* e produtos da oxidação, diminuindo a quantidade do composto nativo que é todo-*trans*.

Os carotenóides são compostos lipossolúveis absorvidos no intestino delgado junto com os lipídeos majoritários da dieta e, em seguida, transportados pelas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT) para o fígado. Estudos recentes mostraram que a melhor maneira de se investigar a biodisponibilidade relativa dos carotenóides e da vitamina A é através da dosagem destes nutrientes nas LRT

(Wingerath et al., 1995; O'Neill & Thurnham, 1998), já que eles se encontram associados às LRT e não às outras lipoproteínas do sangue. Quando se efetua a dosagem sérica do carotenóide, a concentração total observada inclui, além da quantidade recentemente absorvida, também o "pool" do nutriente pré-existente nos tecidos (inclusive fígado e sangue).

O objetivo deste estudo foi comparar a biodisponibilidade relativa dos carotenóides da rúcula (*Eruca sativa*) crua e cozida, através da quantificação destes por CLAE nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT) de mulheres adultas saudáveis.

Material e Métodos

Protocolo experimental

Este projeto de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Anexo I). As voluntárias foram convidadas e informadas sobre os objetivos e métodos do estudo. Todas as participantes assinaram termo de concordância antes do início do trabalho.

Análise de carotenóides na rúcula

O método utilizado para determinar os carotenóides presentes na rúcula crua e cozida foi o de Rodriguez-Amaya et al., (1976). A rúcula foi adquirida em dois fornecedores locais (Campinas, SP), sendo que o tempo de pós-colheita foi de 24 horas. Foram utilizados 10 maços (limpos e secos), dos quais retirou-se 4cm do cabo. As análises foram feitas em triplicatas e os valores foram tratados como amostras individuais para obtenção da média. A amostra (5g) foi homogeneizada em liquidificador com acetona (5°C), seguido de filtração (com filtro de papel Whatman N°3). O meio filtrante foi dissolvido em éter de petróleo (Synth, p.a.) e feita partição com água para remoção da acetona. Em seguida, concentrou-se o volume em evaporador rotativo (T<35°C). A separação foi realizada em coluna aberta de MgO:Hyflosupercel (1:1, mistura previamente ativada a 110°C por 2 horas). A polaridade da fase móvel foi ajustada gradativamente de acordo com a polaridade do carotenóide em eluição. Após a lavagem com água para retirada da acetona, reduziu-se o volume de cada fração em evaporador rotativo (T<35°C). A leitura foi feita em espectrofotômetro, na faixa de 350-550 nm. A concentração dos carotenóides foi calculada usando-se a lei de Beer: $A=a.b.c$, onde A=absorbância, a=valor da absorvidade molar em éter de petróleo (Davies, 1976), b= largura da cubeta e c = concentração do cromóforo.

Amostragem

Quinze voluntárias não-fumantes foram selecionadas, idades entre 20 e 35 anos, sem antecedentes clínicos de má digestão e absorção intestinal, IMC entre 18,0 e 24,0 kg/m² e não ingerindo qualquer medicamento.

Dieta experimental

As dietas para o ensaio foram elaboradas (Tabela 1) pensando principalmente no aspecto sensorial da refeição. A rúcula foi fornecida na forma de um sanduíche de pão francês com a folha crua ou cozida, uma fatia de presunto e quantidade de óleo de soja suficiente para facilitar a mastigação e deglutição. Embora as quantidades de folha aparecem díspares, testes preliminares indicaram que maiores quantidades de rúcula crua trouxeram baixa aceitação por razão sensorial, enquanto que menores quantidades de rúcula cozida davam a impressão de se estar consumindo somente o pão. Por outro lado, testes preliminares com menores quantidades de rúcula cozida resultaram em alta variabilidade na quantificação do carotenóide.

Tabela 1- Composição das dietas para o ensaio biológico

Composição	Grupos		
	Cápsula*	Rúcula crua	Rúcula cozida**
Pão francês	50g	50g	50g
Presunto gordo	20g	20g	20g
Óleo de soja	8g	8g	8g
Rúcula crua	—	100g	—
Rúcula cozida	—	—	130g
Calorias totais	264	298	307
Fibras (g)	0,25	1,7	2,2
β -caroteno (mg)	3,0	3,2	4,1
Luteína (mg)	—	5,3	6,9
Neoxantina (mg)	—	0,7	1,1
Violaxantina (mg)	—	1,7	2,2

*cápsula com 3mg de β -caroteno purificado (Hoffman La Roche Ltd-Basel, Suíça)

**5 minutos em água a 97°C

O cozimento diminui o volume da verdura e quantidade foi aumentada para compensar a perda de palatabilidade.

Ensaio biológico

Durante 3 dias, as 15 mulheres consumiram dietas pobres em carotenóides e isentas de β -caroteno. Para facilitar o controle da dieta das participantes, foram distribuídas listas de alimentos que deveriam ser evitados e os que poderiam ser consumidos. Cada participante recebeu um anel colorido para lembrança constante do experimento em andamento. Foi feito o registro do consumo alimentar durante os três dias de depleção. Os cálculos das dietas foram realizados utilizando o programa de apoio à nutrição da Escola Paulista de Medicina (CIS-EPM, versão 2.0, São Paulo, Brasil).

No início do quarto dia, as participantes compareceram em jejum ao laboratório, onde foi feita a coleta de 10mL de sangue (seringa de 10mL, com agulha 40X12 mm). Em seguida, a refeição experimental (Tabela 1) foi consumida. Todas as voluntárias foram orientadas a mastigarem bem o alimento antes de degluti-lo. Foi estruturado um grupo controle de 5 participantes que recebeu uma cápsula de β -caroteno sintético com a refeição sem rúcula.

Depois de 2, 4 e 6 horas da ingestão do alimento, foram feitas coletas de sangue, as quais foram colocadas em tubos sem anticoagulante, para a obtenção do soro. Durante o experimento só foi permitido o consumo de água, café e bolacha de água e sal.

Depois de dois meses, foi repetido o mesmo procedimento, revezando os grupos, de tal forma que as voluntárias que na primeira etapa consumiram a verdura crua, desta vez consumiram a cozida. O grupo controle após a verificação da homogeneidade dos resultados analíticos desse grupo, foi dispensado a repetição da dosagem com a cápsula de β -caroteno.

O soro foi separado por precipitação em centrífuga refrigerada marca Sigma (Melsungen, Germany), a 7°C por 30 minutos (1041×g), imediatamente congelado e estocado em nitrogênio líquido. Foram tomados cuidados para evitar perdas dos carotenóides (ex. proteção com invólucro de papel alumínio e luzes atenuadas).

Utilizando-se o processo de ultracentrifugação foi feita a separação das diferentes lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT) (Havel et al., 1955). Uma alíquota do soro (4 mL) foi colocada em tubos de celulose (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA), acertou-se a densidade da solução com KBr ($\rho=1,025\text{kg/L}$; 0,288g para 4,0mL de soro) e completou-se o tubo com 5mL de água destilada. As amostras foram centrifugadas a 40.000 rpm (127000×g) a 4°C em centrífuga Beckman mod. L-8

(Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) equipada com rotor SW 41. Após uma hora de centrifugação o sobrenadante contendo as LRT ($d < 1,0$ g/mL) foi removido com o auxílio de pipeta de pasteur.

Eletroforese em gel de agarose da fração recolhida foi realizada através do Sistema Paragon, com kit Beckman 655910 (Fullerton, CA, EUA), para conferir a eficiência da metodologia de fracionamento.

As LRT coletadas foram armazenadas em nitrogênio líquido até o início das análises, as quais foram realizadas antes de três semanas após a coleta. Além do curto tempo de estocagem, os cuidados já mencionados para evitar perdas, foram mantidos.

Análise de triacilgliceróis, colesterol e glicose séricos

As análises sorológicas de triacilgliceróis, colesterol e glicose foram realizadas através de métodos enzimáticos.

Kits individuais da LaborLab (Guarulhos, SP, Brasil) foram usados para as determinações de triacilgliceróis (Nº de catálogo 04400), colesterol (Nº de catálogo 01400) e glicose (Nº de catálogo 02200), seguindo os procedimentos detalhados pelo fabricante.

Análise dos carotenóides nas LRT

As análises dos carotenóides presentes nas LRT foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A extração dos carotenóides foi feita de acordo com Wingerath et al. (1995) da seguinte maneira: a 400 μ L de amostra foram

adicionados 800 μ L de tampão (2mmol/L KH_2PO_4 , 0,7mmol/L EDTA, 1,4mmol/L ascorbato, pH 7,2), 1mL de isopropanol e 6mL da mistura hexano:diclorometano (5:1), contendo ainda 1,1mmol/L BHT. Em seguida, misturou-se a solução em agitador vortex por 1 minuto e sonificou-se por mais 5 minutos, seguido de nova agitação no vortex por 30 segundos e centrifugação a 1041 \times g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e seco sob jato de nitrogênio gasoso e, depois, dissolvido na fase móvel (50 μ L) do sistema cromatográfico.

A cromatografia foi realizada utilizando o cromatógrafo líquido (Varian, modelo 3600, com bomba 9012, forno para coluna tipo Mistral, software gerenciador Star Chromatography Workstation 4.5) com injetor manual com loop de 20 μ L. Foi utilizada a coluna de fase reversa polimérica C-18, 5 μ m (Vydac 218 TP54, Hesperia, CA, EUA), com 4,6mm de diâmetro interno e 250mm de comprimento e uma pré-coluna do mesmo material. A fase móvel usada foi uma mistura de metanol:acetonitrila:isopropanol na proporção de 54:44:2, com fluxo de 1mL/min. A detecção foi realizada a 460nm no detector UV (Varian UV 9050). Como padrão interno foi utilizado o Sudan I (1-(fenilazo)-2-naftol; Sigma, St. Louis, EUA) (Quackenbush, 1987).

Análises Estatísticas

Utilizou-se o cálculo da área sob a curva (ASC) para quantificar os carotenóides em função do tempo. Para estimar a quantidade absorvida de carotenóides com relação ao ingerido, dividiu-se a ASC encontrada pela quantidade ingerida do composto. A quantidade ingerida foi obtida baseando-se na quantidade de folhas consumida e o teor de carotenóides apurado das análises preliminares das folhas. Os resultados foram expressos em nanomol/L de soro por hora. Para analisar os resultados obtidos utilizou-se o teste *t* de *Student* (Pimentel-Gomes, 1982). As análises foram realizadas através do programa STATISTICA para Windows, versão 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

Resultados

A composição centesimal da rúcula pode ser observada na Tabela 2. Com relação aos teores dos carotenóides presentes na rúcula, observa-se que como as outras verduras folhosas, a rúcula contém uma elevada quantidade de β -caroteno e luteína, mas sendo este último o composto predominante.

Cabe destacar que os teores de carboidratos e fibras na folha de rúcula, embora pareçam elevados, se encontram numa faixa intermediária com relação a outras verduras folhosas, como alface, espinafre, alface, couve.

Tabela 2- Composição centesimal média da rúcula¹

Componente	Teor
Proteínas (g/100g)	2,4±0,08
Lipídeos (g/100g)	0,3±0,04
Carboidratos (diferença) (g/100g)	4,1±0,09
Tocoferóis	
α -tocoferol (mg/100g)	6,2±0,8
Carotenóides	
β -caroteno (mg/100g)	3,2±0,9
Luteína (mg/100g)	5,3±1,1
Neoxantina (mg/100g)	0,9±0,2
Violaxantina (mg/100g)	1,8±0,3
Fibras totais (g/100g)	1,3±0,05
Cinzas (g/100g)	1,8±0,10
Umidade (g/100g)	93±0,20

¹Valores representam médias de 3 determinações (Base úmida).

Após a ultracentrifugação do soro, a fração menos densa (LRT, $\rho < 1,0$ kg/L) foi coletada e analisada por eletroforese em gel confirmando-se que a fração era somente constituída pela lipoproteína característica das LRT (Figura 1). Isto é, o perfil eletroforético não indicava contaminação das LRT com outras lipoproteínas de baixa densidade também encontradas no soro, como as VLDL e LDL. É importante ressaltar aqui que, no estado de jejum, a fração LRT não foi encontrada no soro, confirmando que a fração coletada após a ingestão de gordura de fato contém os quilomícrons, como apurado pela eletroforese.

Na Figura 2 observa-se o perfil dos carotenóides encontrados no soro de uma das participantes, representativo do estado de jejum e de depleção geral em carotenóides. Mediante a utilização de detector com arranjo de diodos, obteve-se o espectro de cada pico, constatando-se a presença de β -caroteno, luteína e β -criptoxantina. Na tabela 3, observamos os valores médios das características nutricionais das participantes. Os valores encontrados para colesterol, triacilgliceróis, glicose, β -caroteno e luteína séricos representam as condições basais do grupo de voluntárias. Enquanto que os índices de colesterol, triacilglicerol e glicose estavam dentro da normalidade para todas as participantes, os níveis de β -caroteno e luteína foram considerados representativos do estado de depleção induzido pelo consumo de alimentos pobres em carotenóides durante os três dias que precederam o ensaio.

Tabela 3- Idade média e características nutricionais das participantes

Idade (anos)	28 \pm 4
IMC (kg/m ²)	22 \pm 03
Colesterol (mg/dL)	175 \pm 30
Glicose (mg/dL)	73 \pm 08
Triacilgliceróis (mg/dL)	55 \pm 30
β -caroteno (nmol/L)	204 \pm 132
Luteína (nmol/L)	91 \pm 44

*Valores médios \pm DP (n=15)

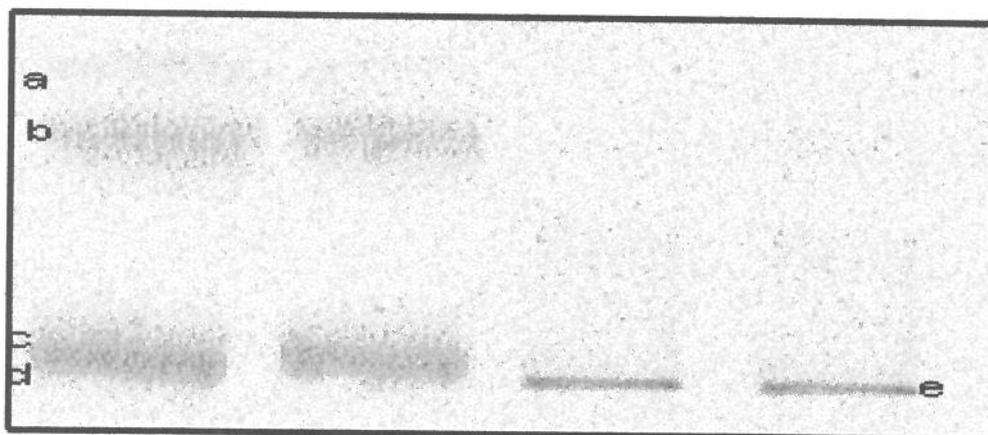


Figura 1- Eletroferograma das lipoproteínas do soro mostrando a ausência de contaminação da fração LRT (a=proteínas totais, b=fração α -HDL, c= fração pré- β -VLDL, d= fração β -LDL, e= quilomícrons)

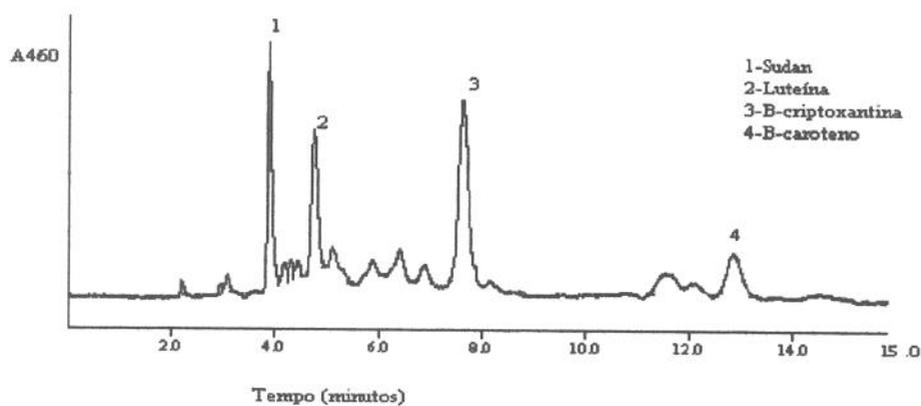
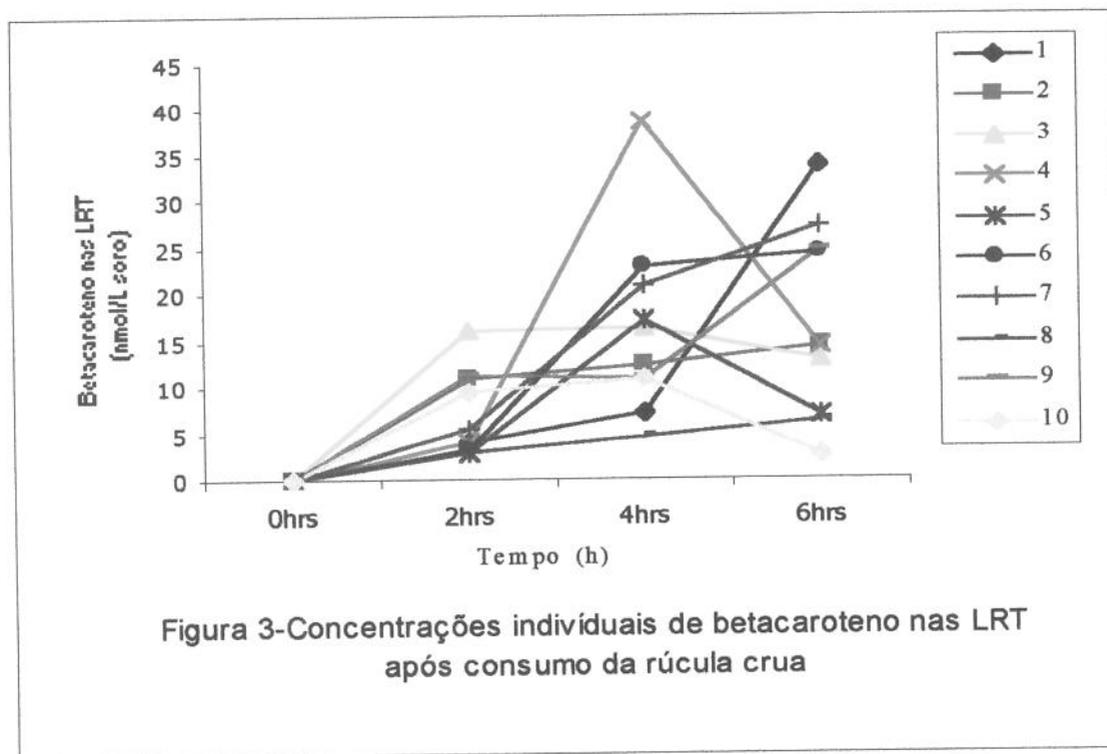
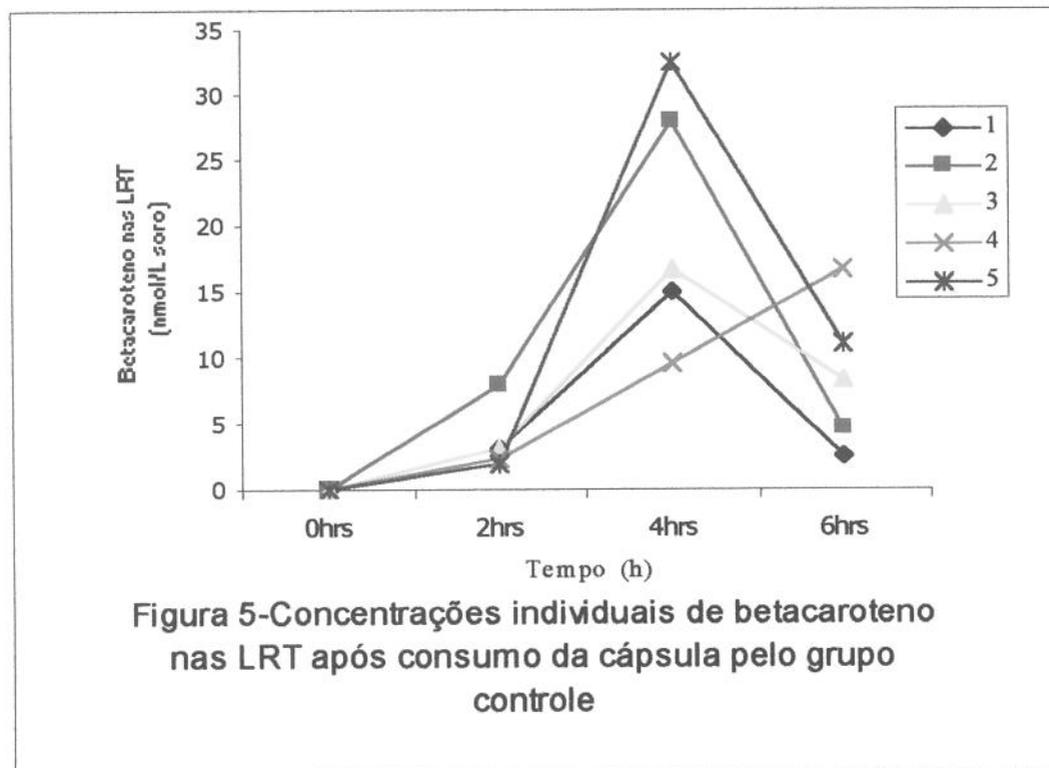
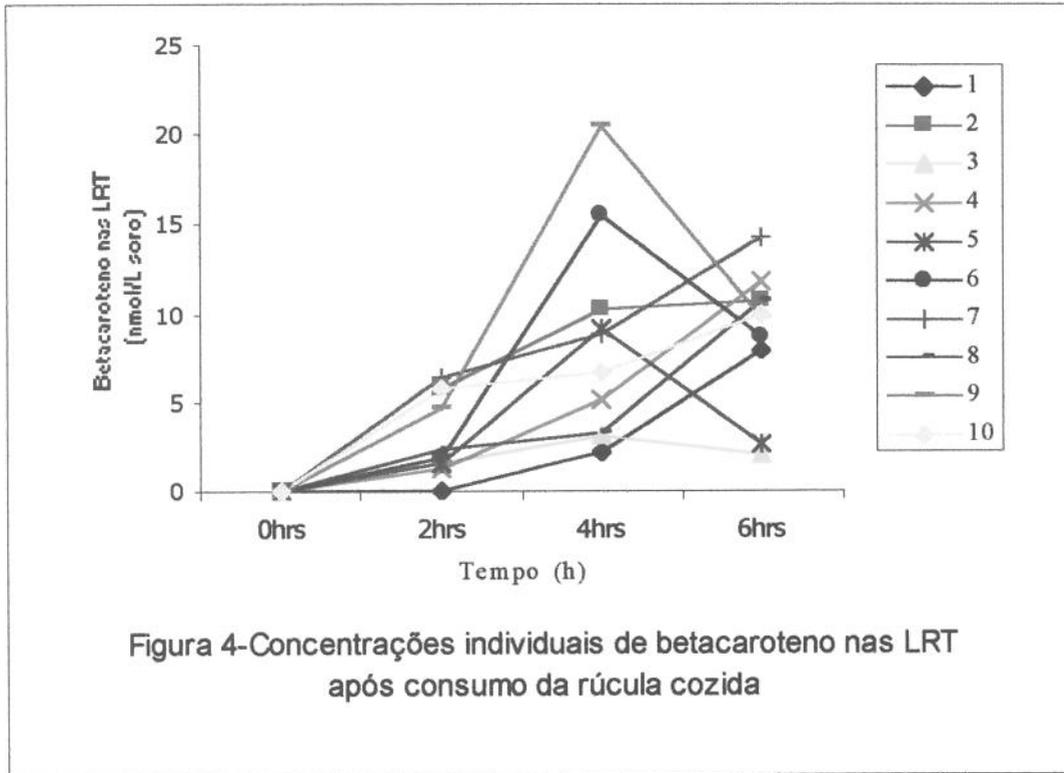


Figura 2. Cromatograma do perfil típico de carotenóides do soro das participantes, antes do experimento

Concentração dos carotenóides nas LRT em função do tempo

As Figuras 3, 4 e 5 mostram as curvas de evolução da concentração de β -caroteno (nmol/L de soro) nas LRT das participantes, em função do tempo (h) transcorrido após a ingestão da refeição experimental. Tendo em conta que as quantidades de rúcula não foram idênticas para todos os grupos, os valores encontrados nas LRT foram normalizados de acordo com a dose ingerida do nutriente. As Figuras 3 e 4 mostram a resposta dos mesmos 10 indivíduos para a verdura crua (Figura 3) ou cozida (Figura 4). No caso da folha crua, os valores encontrados em 4h e 6h para os indivíduos R1 e R4 se destacaram do resto do grupo por atingirem valores máximos quase duas vezes mais elevados do que a média e, inclusive pelo fato de que a voluntária 1 teve resposta máxima no final do período de seis horas.





A resposta de um grupo independente que consumiu o β -caroteno em cápsula está apresentada na Figura 5. Pode ser visto nesta figura que, em quatro das cinco participantes, o pico de concentração do β -caroteno foi atingido em 4 horas, enquanto que a quinta participante alcançou máxima concentração no tempo próximo das seis horas. Observa-se também que, para este grupo, a resposta coletiva dos indivíduos foi sensivelmente mais homogênea, do que nos casos em que se forneceu as folhas.

Nas Figuras 6 e 7 podemos observar as curvas de variação da concentração de luteína (nmol/L de soro) nas LRT das participantes em, função do tempo (h) pós-prandial. Como no caso do β -caroteno, os valores encontrados para a luteína também foram corrigidos de acordo com a quantidade ingerida do nutriente e cada indivíduo agiu como seu próprio controle. No consumo da folha crua (Figura 6), os indivíduos R3 e R5 responderam com concentrações bem mais elevadas, no tempo de 4 horas, do que os restantes. Na Figura 7, também encontramos dois indivíduos (R6 e R7) que apresentaram valores maiores em 4 horas. Uma participante (R10) atingiu a concentração mais elevada no final das 6 horas.

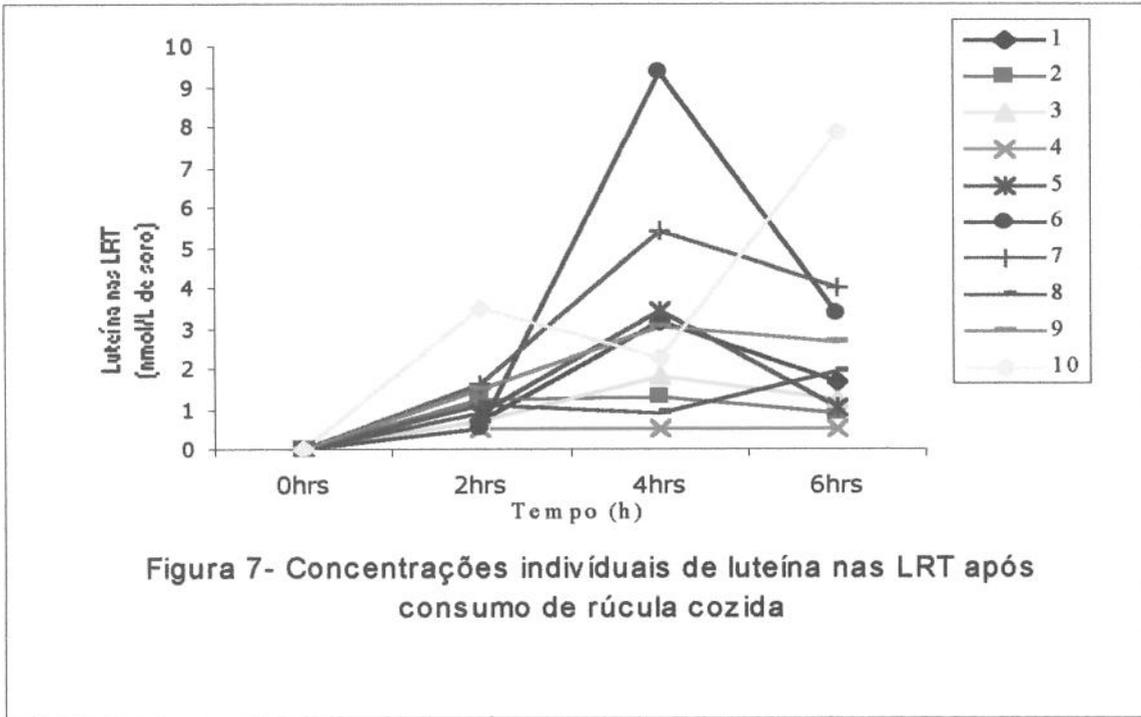
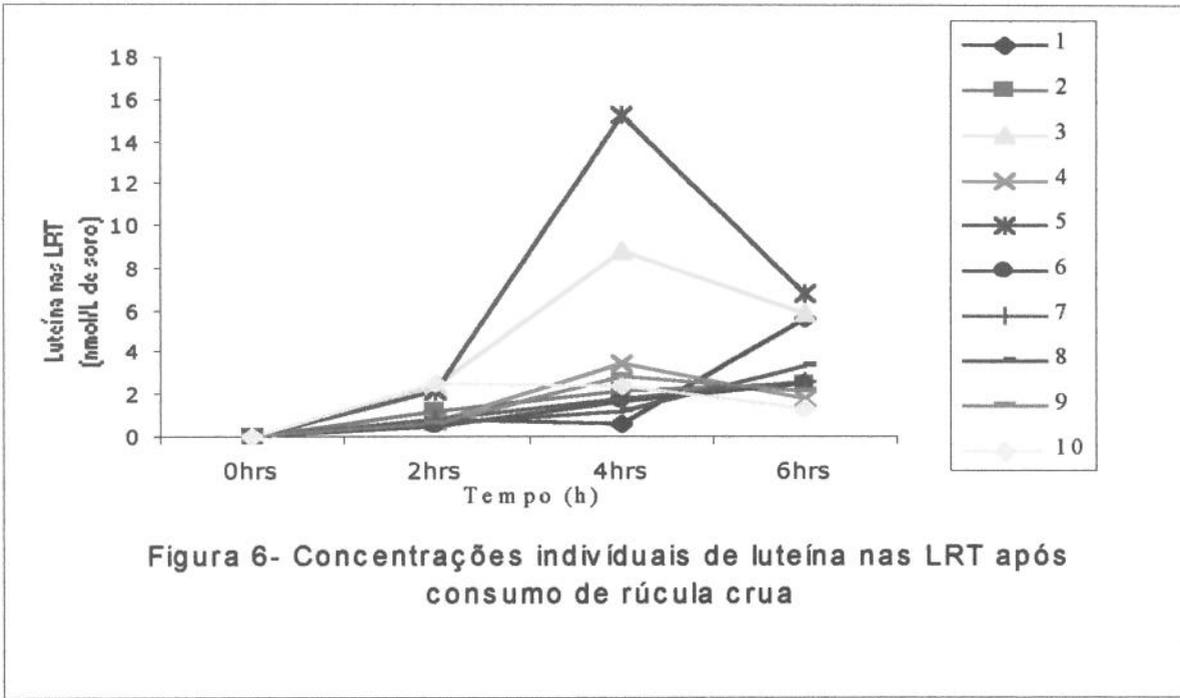


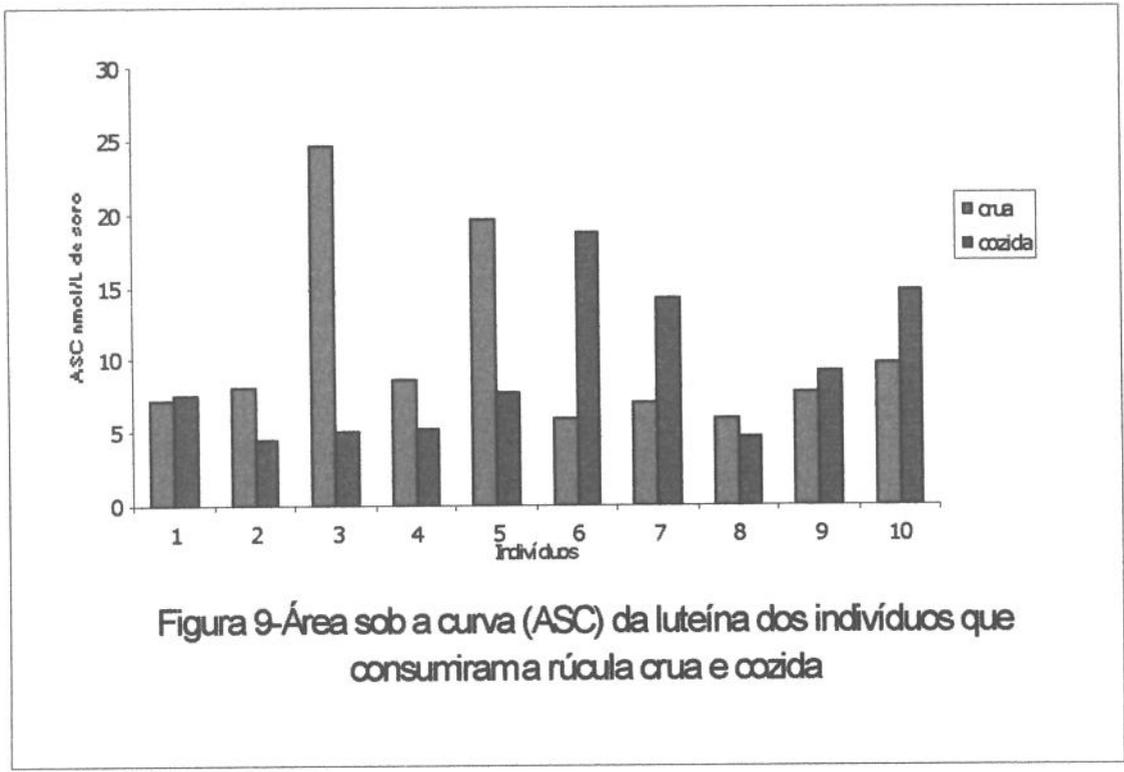
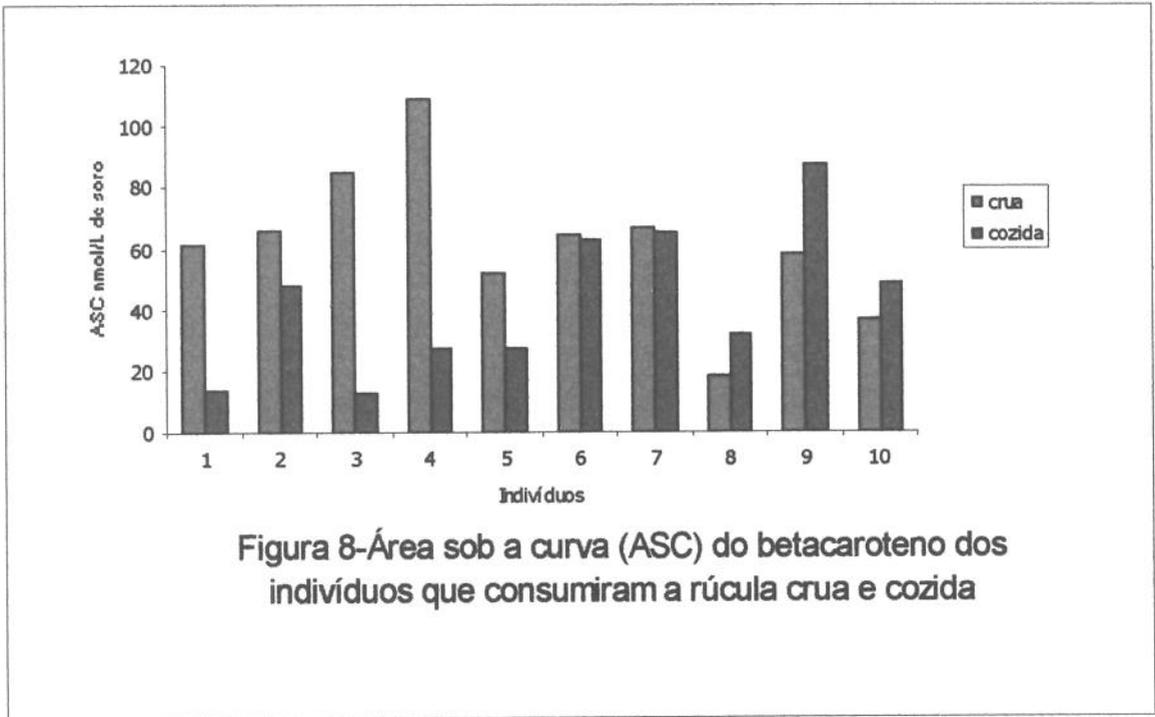
Tabela 4- Área média sob a curva (ASC) mostrando que a concentração de β -caroteno e luteína, versus o tempo transcorrido após a ingestão da rúcula não variou significativamente com o cozimento.

Carotenóide	ASC ¹		
	Crua	Cozida	Cápsula
β -caroteno	61,72 \pm (24,77)	42,37 \pm (24,22)	56,61 \pm (19,60)
Luteína	10,44 \pm (6,40)	9,13 \pm (21,80)	-----

¹Valores médios \pm (DP) em nmole \cdot L⁻¹ \cdot h⁻¹, já normalizados pela ingestão.

Níveis de ingestão: Rúcula crua (6,0 μ mol de β -caroteno e 9,3 μ mol de luteína), cozida (7,7 μ mol de β -caroteno e 12,1 μ mol de luteína) e a cápsula (5,6 μ mol de β -caroteno). (Rúcula crua: n=10; cozida: n=10; cápsula: n=5)

De forma geral, observa-se que a área sob a curva (ASC) de concentração do β -caroteno nas LRT em função do tempo, variou consideravelmente, tanto inter- como intra-individualmente, em resposta à ingestão da rúcula (Tabela 4). A variação intra-indivíduo foi mais evidente nos primeiros cinco voluntários da Figura 8. Pela análise das curvas observou-se que a absorção normalizada do β -caroteno da rúcula crua foi semelhante ($p > 0,05$) à da cozida, embora para os indivíduos R8, R9 e R10 a absorção de β -caroteno tenha sido ligeiramente maior quando o vegetal foi consumido cozido. Nota-se que para certos indivíduos (R1 a R5) a absorção do β -caroteno, chega a ser consideravelmente maior (de duas até cinco vezes) quando o vegetal é ingerido na sua forma crua. Os casos "outliers" não foram eliminados devido à falta de critérios que justificassem a sua exclusão. De igual forma, foi observado que os grupos que consumiram a rúcula crua e cozida, não diferiram com relação ao grupo que recebeu a cápsula.



A absorção da luteína, da rúcula tanto crua como cozida, calculada através da ASC nos mesmos indivíduos seguiu um perfil semelhante ao do β -caroteno, como pode ser vista na Figura 9. Analogamente ao observado para o β -caroteno, houve aqui também bastante variação inter e intra-individual. A análise dos dados mostrou que a ASC da luteína também não diferiu em função do tratamento térmico ($p>0,05$). Observou-se novamente que a absorção mostrada pelas participantes R2 a R5 ao consumirem a folha crua foi bem mais elevada do que nas outras cinco ou seis.

Nas Figuras 10 e 11, observam-se as respostas de absorção do β -caroteno e da luteína, para a rúcula crua e cozida, respectivamente. Independente do estado em que o vegetal foi consumido, a ASC do β -caroteno foi significativamente maior ($p<0,05$) do que a ASC da luteína, mostrando que estes carotenóides são absorvidos em taxas diferentes.

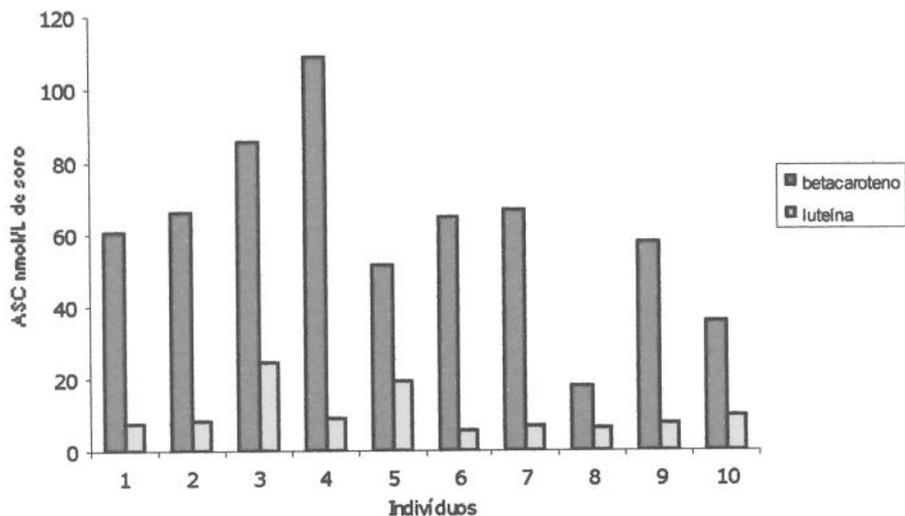


Figura 10-Absorção do betacaroteno e da luteína pelos indivíduos que consumiram a rúcula crua

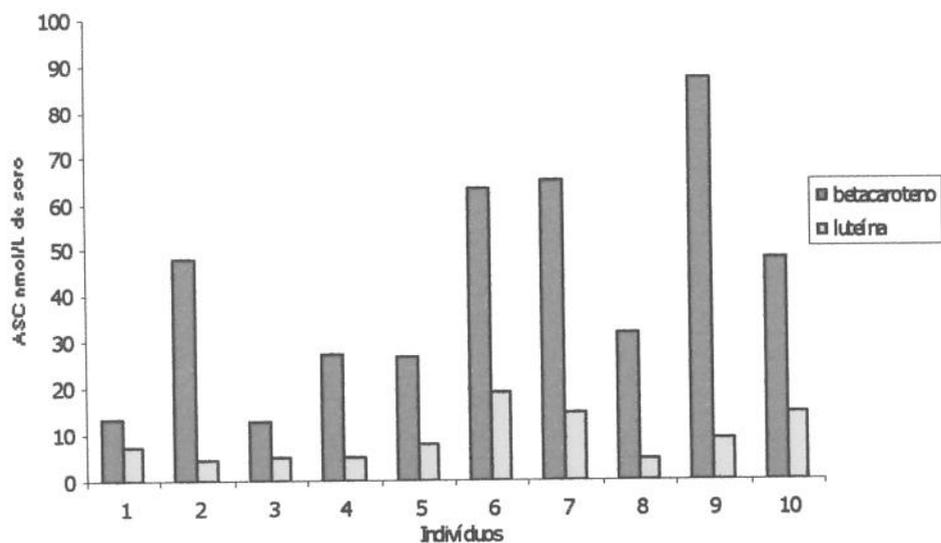


Figura 11-Absorção do betacaroteno e da luteína pelos indivíduos que consumiram a rúcula cozida

Biodisponibilidade do β -caroteno e da luteína

As ASCs, determinadas acima para o β -caroteno e a luteína, poderiam ser consideradas diretamente como sendo as biodisponibilidades aparentes desses dois carotenóides, fazendo apenas a ressalva de que uma certa quantidade de cada carotenóide não foi computada por ter sido retida no intestino ou por ter sido absorvida depois das seis horas.

Discussão

A rúcula (*Eruca sativa*) é uma hortaliça herbácea da família *Cruciferae*, de periodicidade anual, porte baixo, originária do sul da Europa e da parte ocidental da Ásia. No Brasil é consumida crua como salada e ultimamente vem crescendo o seu uso em alguns pratos específicos (como por exemplo, pizzas e molhos para macarrão). Suas folhas são tenras e com um sabor pungente suave, bem característico. Esta verdura foi escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho, por ser um vegetal folhoso consumido tanto cru como cozido, pela sua fácil obtenção na região Sudeste do país e por ser classificado como vegetal com teor ao menos razoável de β -caroteno, segundo Begum e Pereira (citado por Rodriguez-Amaya, 1997).

Com respeito à composição centesimal da folha, entretanto, pode se dizer que o teor de carboidratos totais da rúcula é intermediário, pois em 100g a alface (*Lactuca sativa* L.) possui 3,3g, agrião (*Rorippa nasturtium-aquaticum* L. HAYEK) 3,6g, espinafre (*Tetragonia tetragonioides* PALLAS) 3,8g, almeirão (*Cichorium intybus* L.) e chicória (*Cichorium endivia* L.) 4,1g, acelga (*Beta vulgaris* L.) e a zedinha (*Rumex acetosa* L.) 5,6g, cebolinha (*Allium fistulosum* L.) 7,1g. Já a folha de mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ) ou macaxeira possui 18,3 g/100g (IBGE, 1977).

A polêmica levantada por De Pee et al. (1995) de que os carotenóides contidos em verduras folhosas não são boa fonte de vitamina A em humanos implica na baixa biodisponibilidade destes nutrientes em alimentos de uso tanto ou mais antigo do que os próprios animais que os consomem. Na tentativa de reunir dados experimentais sobre a utilização dos carotenóides por seres humanos, este trabalho apresenta dados de biodisponibilidade de β -caroteno e luteína, dois dos principais carotenóides da rúcula.

Na presente pesquisa foi realizada a análise dos carotenóides contidos na rúcula crua e cozida em água (5 min, 97°C), observando-se que não houve diferença significativa em conteúdo entre os estados cru e cozido. Para a realização dos cálculos necessários, considerou-se que a rúcula contém em média 36 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno e 48 $\mu\text{g/g}$ de luteína (base úmida), assim como os valores encontrados para zeaxantina e neoxantina, foram de 9 e 18 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Estes valores estão de acordo com os encontrados por outro pesquisador do nosso grupo (Kimura, 1999), que estudou e quantificou os carotenóides da rúcula através de CLAE.

As concentrações plasmáticas médias (perfil em jejum) de β -caroteno e luteína encontradas nesta pesquisa estão no limite inferior, ou ainda abaixo, das faixas de valores compilados na revisão de Furr & Clark (1997, Tabela 3), especialmente para a luteína. De um modo geral e previsível, o baixo nível plasmático de alguns voluntários pode ser atribuído ao consumo de dietas pobres em carotenóides durante a fase de depleção. Quanto à variação individual natural observada nos conteúdos plasmáticos de carotenóides, pode se afirmar que está associada à diversidade de fatores que modulam a absorção, metabolismo, estocagem e principalmente a dieta. Ainda não há estudos sobre o perfil plasmático de carotenóides no Brasil, onde existe grande variedade de alimentos ricos em carotenóides. Até a presente data, só existe uma pesquisa que caracteriza os colostros e leites de dez mães de crianças pré-termo (Passos,

1993), além de numerosos estudos que quantificam os carotenóides em diferentes alimentos de origem vegetal (Rodriguez-Amaya, 1996).

Foi observada em alguns indivíduos, a curiosa presença de um pico cujo tempo de retenção e espectro coincidiam com o da β -criptoxantina, carotenóide não presente na rúcula. A origem e a razão para este carotenóide estar presente nos cromatogramas ainda são desconhecidas, pois as possibilidades de contaminação com carotenóides do plasma e a ingestão de fontes do carotenóide foram descartadas. Caso tivesse ocorrido consumo de alimentos fonte, haveria alteração substancial dos cromatogramas incluindo não só a β -criptoxantina. Uma segunda possibilidade seria a de que a β -criptoxantina agisse como um carotenóide “reserva” de localização intestinal que, conforme a necessidade, seria suprido pelo intestino para participar da biossíntese dos quilomícrons. Mas, pelo fato de a β -criptoxantina ter aparecido nas LRT, em diferentes tempos e pessoas, não é possível se chegar a qualquer conclusão ainda. Mais estudos específicos sobre este assunto são necessários.

Curvas da concentração em função do tempo

Neste estudo foi medida a resposta absorptiva de um grupo de dez indivíduos (R1 a R10) ao consumo rúcula crua e cozida. Através da quantificação dos carotenóides nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (LRT) apurou-se a concentração circulante nas LRT a cada duas horas. Como controle foi montado um grupo com outros cinco indivíduos (C1 a C5), que receberam uma cápsula contendo 3mg de β -caroteno purificado.

A utilização das LRT em estudos de absorção de nutrientes lipídicos é recomendada devido ao fato de ser nos quilomícrons que os lipídios recentemente

incorporados ao organismo se encontram presentes (Furr & Clark, 1997). Somente algumas horas após a absorção, é que os nutrientes lipídicos aparecem em outras lipoproteínas, mediante remanejamento realizado no fígado (Parker, 1996). A concentração de β -caroteno nas LRT, tanto no caso da rúcula crua como cozida (Figuras 3 e 4, respectivamente), atingiu seu máximo em 4 horas para a maioria dos participantes. Foi observado que não houve diferença, nesse respeito, com relação ao grupo controle (Figura 5). Este achado do aparecimento do pico de absorção em 4 horas já fora relatado na literatura por outros autores (Traber et al., 1994; O'Neill & Thurnham, 1998).

Enquanto que largas variações foram observadas com todos os indivíduos que consumiram as folhas, as curvas dos consumidores da cápsula mostraram maior homogeneidade. Esta situação certamente é indicativa da variabilidade natural que existe entre indivíduos no que diz respeito à mastigação, manejo fisiológico de fibras e demais componentes da verdura, assim como à capacidade de transporte de cada indivíduo. Em outras palavras, a maior homogeneidade encontrada para o nutriente encapsulado foi consequência deste último não estar físico-quimicamente associado a compostos outros que interfiram na absorção.

Com relação ao período de tempo escolhido, observou-se também que para algumas pessoas o pico de absorção obtido se apresentou em 6 e não em 4 horas. Isto ocorreu com três participantes (R1, R7 e R9) que consumiram a rúcula crua, quatro que a consumiram cozida (R1, R4, R7 e R8) e em uma que consumiu a cápsula (C4). Interessante foi observar também que os indivíduos R1 e R7, caracterizados como de mais baixo peso corporal (IMC 19 e 22), apresentaram o pico em 6 horas para o vegetal, tanto cru como cozido.

Em uma das participantes (R4) que consumiu a rúcula crua e duas (R6 e R9) que consumiram o vegetal cozido, o valor encontrado em 4 horas foi muito mais alto do que nas demais. Verificando a possibilidade de que essas pessoas tivessem consumido dietas contendo carotenóides nos dias que antecederam o experimento (período de depleção), foi confirmado que nenhum alimento fonte de β -caroteno fora ingerido.

Foi medida também a concentração de luteína nas LRT, dos mesmos indivíduos que consumiram a rúcula crua e cozida (Figuras 6 e 7, respectivamente). Para a luteína não foi possível montar um grupo controle devido à não disponibilidade do composto purificado. Como ocorreu para o β -caroteno, a concentração deste composto nas LRT atingiu um pico em 4 horas para a maioria das participantes, mas também houve indivíduos em que o pico foi atingido em 6 horas (R1 e R8 para a crua e R8 e R10 para a cozida).

Observou-se, por outro lado, que os indivíduos que mostraram absorção lenta do β -caroteno não foram os mesmos que mostraram absorção lenta de luteína. Essa falta de coincidência sugere três acontecimentos: primeiro, mostra-se uma certa consistência com o já mencionado fenômeno da competição entre os dois carotenóides (proposto por Johnson et al., 1996), segundo, sugere que as velocidades de absorção dos dois carotenóides estejam sujeitas a características individuais e, terceiro, dissipa a possibilidade de ter ocorrido erro ou ineficiência ocasional na extração e análise dos carotenóides. Corroborando essas afirmações, os dados de R8 mostraram que o pico da concentração, tanto de β -caroteno como de luteína, ocorreu em 6 horas, independente da forma em que o vegetal foi consumido.

Para os indivíduos (R3, R5 e R6, R7, R10, para crua e cozida, respectivamente) que apresentaram os valores de luteína mais elevados, foi feita uma verificação da dieta consumida anterior ao ensaio, mostrando que aqueles valores elevados eram próprios desses indivíduos e não tiveram origem externa ao experimento.

Com relação aos outros carotenóides contidos no vegetal, a neoxantina e a violaxantina, o conteúdo nas LRT ficou abaixo do limite de detecção, não sendo possível estudar a sua incorporação no mesmo experimento. Dessa forma, o trabalho se restringiu ao comportamento do β -caroteno e luteína, que são os carotenóides predominantes na folha.

ASC do β -caroteno e da Luteína

A capacidade de absorção dos carotenóides contidos nas diferentes fontes testadas (rúcula crua, cozida e cápsula) foi estimada calculando-se a área sob a curva (concentração instantânea X tempo, ou ASC). A ASC do β -caroteno encontrada para os indivíduos que consumiram a rúcula crua foi semelhante à daqueles que consumiram o vegetal cozido ($p>0,05$) (Figura 8). Observa-se que para a maioria das participantes a larga variação intra-individual na resposta da ingestão da rúcula crua e cozida impossibilitou a avaliação de tendências que poderiam ser próprias dos indivíduos ou dos grupos.

Não está claramente comprovado que o aquecimento melhore a absorção ou biodisponibilidade dos carotenóides dos vegetais (Poor et al., 1993; Zhou et al., 1996). O tema, entretanto é controverso, pois alguns trabalhos mostram evidências de que a biodisponibilidade dos carotenóides é inferior quando estes são ingeridos crus (Bulux et al., 1994; De Pee et al., 1995; Rock et al., 1998). No nosso trabalho, a absorção do β -caroteno da cápsula foi semelhante à do

composto contido no vegetal cru e cozido ($p > 0,05$). Os nossos resultados contestam ainda o estudo de Rock et al. (1998), que relataram concentrações 3X maiores de β -caroteno no plasma em mulheres após terem consumido vegetais termicamente processados, em relação aos crus. Por sua vez, o trabalho de De Pee et al. (1995), que relataram o β -caroteno sintético ser significativamente mais eficiente do que o β -caroteno contido em espinafre, também diverge dos nossos achados comparando a cápsula com a rúcula.

Para a determinação da ASC, as concentrações individuais foram normalizadas, dividindo cada valor pela quantidade de nutriente ingerido. Apesar de termos utilizado para o nosso experimento uma quantidade maior de rúcula na refeição com a folha cozida, e ainda não termos detectado maior eficiência de absorção após o cozimento, devemos considerar que o método de quantificação do β -caroteno pelos níveis plasmáticos não é o mais recomendável para estudos de biodisponibilidade. Ainda pode ser argumentado em favor do efeito nulo do cozimento o fato de o aumento da ingestão ser muito pequeno para causar diferenças em absorção de 300%, como foi o caso do relato de Rock et al. (1998). Quanto aos outros fatores experimentais que possam ter afetado os nossos resultados, cabe também ressaltar que neste estudo, a composição da refeição do teste foi baseada mais nas características culinárias e sensoriais, particularmente no que se refere ao teor de óleo.

Já foi demonstrado em trabalhos anteriores que a presença das fibras pode interferir negativamente na absorção dos carotenóides (Erdman et al., 1986). Não tendo sido verificada diferença, entretanto, entre a folha crua e cozida, é de se supor que a hidratação das fibras não tenha influenciado significativamente a absorção dos carotenóides. Apesar disso, é pertinente lembrar que todos os participantes foram orientados para mastigar completamente a verdura, a textura da rúcula cozida, aparentemente mais macia, possa ter causado a falsa impressão

de que o vegetal precisava de menor mastigação, levando a uma deglutição precoce.

As quantidades de luteína absorvida da rúcula crua foram indistinguíveis das obtidas com o vegetal cozido (Figura 9). Aqui deveríamos considerar novamente o raciocínio desenvolvido para o β -caroteno.

Interação entre o β -caroteno e a luteína

Durante a absorção intestinal ocorrem mecanismos distintos de incorporação do β -caroteno e da luteína nas lipoproteínas (Paetau et al., 1997). A solubilidade dos carotenóides nos quilomícrons depende da sua polaridade, da composição e saturação dos ácidos graxos (Borel et al., 1996). No centro dos quilomícrons encontram-se os carotenóides apolares e na periferia os polares, que são os mais propensos a mudarem para outras lipoproteínas durante a circulação, como já foi observado com os tocoferóis, que também são compostos lipossolúveis (Traber et al., 1992; Borel et al., 1996).

No presente estudo, quando comparamos a absorção do β -caroteno à da luteína em humanos, observamos que a absorção desta última foi menor do que a do β -caroteno, independente da forma de apresentação (Figuras 10 e 11). Foi constatado que, de fato, a proporção β -caroteno/luteína originalmente existente na folha, que era de 0,6, ficou alterada para um valor médio de 7,2; ou seja, que houve um aumento da concentração relativa de β -caroteno/luteína, de mais do que 10 vezes durante o processo absorptivo.

Como tem sido proposto por alguns autores (Paetau et al. 1997), o β -caroteno e hidroxicarotenóides (como a luteína) são dois tipos de carotenóides que competem entre si para serem absorvidos. A existência de uma interação entre estes carotenóides foi inicialmente relatada por Johnson & Baumann (1948) e Kelley & Day (1950), mas a aparente absorção preferencial ou seletiva que se atribui a estes compostos ainda é um tanto controversa. Existem estudos relatando que, quando ingeridos conjuntamente, a luteína afeta negativamente a absorção do β -caroteno (Gärtner et al., 1996; van Den Berg & Van Vliet, 1998; Van Het Hof et al., 1999), enquanto outros trabalhos mostram que ocorre o inverso (Kostic et al., 1995; Paetau et al., 1997).

Gärtner et al. (1996) estudaram a competição entre xantofilas (luteína, zeaxantina) e o β -caroteno na absorção intestinal de ratos após a ingestão do Betateno (extrato da alga *Dunaliella salina*, rico em β -caroteno), e observaram que existe uma preferência pela absorção das xantofilas, em prejuízo do β -caroteno. Outro trabalho, realizado por van Den Berg & van Vliet (1998), também mostrou que em homens a luteína age negativamente no aparecimento do β -caroteno na fração LRT.

Em um estudo realizado por Van Het Hof et al. (1999), a biodisponibilidade da luteína foi cinco vezes maior do que a do β -caroteno. Estes compostos foram dosados no plasma de indivíduos que receberam dietas ricas em vegetais e nos que foram suplementados. Os autores colocaram que a diferença relativa da resposta plasmática entre o β -caroteno e a luteína não reflete a diferença verdadeira de absorção, pois parte do β -caroteno absorvido é convertido para éster de retinila antes de entrar na corrente sanguínea, o que não ocorre com a luteína, que não tem função pró-vitamina A. Isto pode resultar em subestimação da biodisponibilidade relativa do β -caroteno, quando comparado com a luteína.

Em contraposição, Kostic et al. (1995), estudando a resposta plasmática, à ingestão de β -caroteno e luteína, juntamente e em separado, observaram que para a luteína ingerida junto com β -caroteno, a ASC foi entre 54 e 61% menor do que quando ingerida separadamente. O trabalho de Paetau et al. (1997), mostrou ainda que o β -caroteno, ingerido junto com a cantaxantina (uma xantofila semelhante à luteína), inibiu o aparecimento da cantaxantina no plasma, quilomícrons e nas subfrações das VLDL. Kostic et al. (1995) já tinham proposto que aqueles participantes com pequenos valores (ASC) plasmáticos de β -caroteno poderiam ter uma conversão mais eficiente do β -caroteno em retinol, sendo que, a luteína (sem função provitamínica A) poderia ter uma função inibitória da conversão do β -caroteno no intestino. Dessa forma, uma maior quantidade de β -caroteno intacto estaria sendo absorvido e quantificado. Em apoio à idéia anterior, estudo com hamsters (van Vliet et al., 1996) também indicou que a conversão do β -caroteno para retinol pode ser inibida na presença de luteína.

Neste sentido, os resultados do trabalho aqui apresentados são consistentes com o relatado por Kostic et al. (1995) e Paetau et al. (1997). Além disso, o presente estudo mostra que a proporção de β -caroteno/luteína é, no mínimo, 10× maior nos quilomícrons do que na folha ingerida. Este é um novo achado que demonstra a absorção seletiva do β -caroteno, em prejuízo da luteína, o qual não contradiz resultados anteriores, pois o presente estudo foi desenvolvido com um alimento, enquanto que estudos anteriores foram realizados com misturas de carotenóides purificados ou extrato de algas. Ressalte-se também a característica de todas as participantes do presente estudo serem pessoas eutróficas, o que resultaria em inexpressiva conversão de β -caroteno em retinol, poupando-se assim a maior parte do β -caroteno para ser absorvido intacto.

No presente estudo foi possível constatar a existência de grande variação inter e intra-individual, como já relatado em outros estudos (O'Neill & Thurnham, 1998). Esses autores pesquisaram a absorção de luteína, licopeno e β -caroteno purificados através da dosagem nas LRT. Eles concluíram que a ingestão de 40mg de β -caroteno resultava em baixa absorção (1,4 mg) devido ao fato de o processo ser facilmente saturável. Esses autores chegaram a conclusão semelhante com respeito ao licopeno e a luteína, sendo que para esta última a absorvibilidade foi ainda significativamente menor.

Conclusão

De acordo com a metodologia utilizada, podemos concluir que a biodisponibilidade dos carotenóides β -caroteno e luteína, contidos na rúcula (*Eruca sativa*), quer crua ou cozida, não é tão baixa em pessoas saudáveis, eutróficas, como pode ser inferido dos trabalhos de Bulux et al. (1994), de Pee et al. (1995) e Rock et al. (1998). Vale ressaltar que, embora pareça existir divergência com os resultados desses autores, os trabalhos citados utilizaram técnicas que deixam margem para dúvidas. Em primeiro lugar, a determinação dos carotenóides plasmáticos não é considerada como a técnica mais apropriada para medir a absorção. O nível dos carotenóides plasmáticos é uma medida do total dos carotenóides circulantes, da qual os carotenóides recentemente absorvidos representam apenas uma pequena fração. Em segundo lugar, existem dúvidas quanto à verdadeira dosagem do β -caroteno na cenoura, além dos alimentos estudados representarem matrizes alimentares muito diferentes da rúcula. Tais considerações podem ter induzido a erros de quantificação, mais provavelmente levando a superestimação dos carotenóides que de fato foram fornecidos pelo alimento.

A biodisponibilidade dos carotenóides, já sendo considerada boa na rúcula crua, não melhorou após o cozimento a 97°C durante 5 minutos. Este foi um fato que não necessariamente se espera que ocorra com outras folhas, pois as suas características e componentes químicos variam amplamente.

Constatou-se também a existência de uma possível interação negativa do β -caroteno sobre a absorção da luteína, o que leva ao enriquecimento da proporção β -caroteno/luteína nas LRT.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado (EMMT) e ao FINEP/MCT, pelo apoio financeiro (Projeto PRONEX/CAROTENÓIDES).

Referências Bibliográficas

BOREL, P.; GROLIER, P.; ARMAND, M.; PARTIER, A. LANFONT, H.; LAIRON, D.; AZAIS-BRAESCO, V. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.37, n.2, p.250-261, 1996.

BOREL, P.; TYSSANDIER V.; MEKKI, N.; GROLIER, P.; ROCHETTE, Y.; ALEXANDRE-GOUABAU M. C.; LAIRON D.; AZAIS-BRASCO, V. Chylomicrons beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.8, p.1361-1367, 1998.

BULUX, J.; DESERRANO, J. Q.; GIULIANO, A.; PEREZ, R.; LOPEZ, C. Y.; RIVERA, C.; SOLOMONS, N. W.; CANFIELD, L. M. Plasma response of children to short-term chronic beta-carotene supplementation. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.59, n.6, p.1369-1375, 1994.

CASTENMILLER, J. J. M.; WEST, C. E. Bioavailability of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, Great Britain, v.69, n.10, p.2145-2150, 1997.

CASTENMILLER, J. J M.; WEST, C. E.; LINSSSEN, J. P. H.; VANHETHOF, K. H.; VORAGEN, A. G. J. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-carotene and to a lesser extent of lutein in human. **Journal of Nutrition**. Bethesda, v.129, n.2, p.349-355, 1998.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T. W. (ed.). **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. London: v.2, Academic Press, 1976.

De PEE, S.; WEST, C. E.; MUHILAL, KARYADI, D.; HAUTVAST, J. G. A. J. Lack of improvement of vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. **The Lancet**, London, v.346, n.12, p.75-81, 1995.

DiMASCIO, P. Lycopene and other carotenoids as singlet molecular oxygen quenchers. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CAROTENÓIDES EM ALIMENTOS. **Resumos**. 1998. Campinas, SP, Brasil.

ERDMAN, J. W.; FAHEY, G. C.; WHITE, CB. Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.116, n.12, p.2415-2423, 1986.

ERDMAN, J. W.; POOR, C. L.; DIETZ, J. M. Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenoids, and vitamin E. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.10, p.214-221, 1988.

FURR, H. C.; CLARK, R. M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.8, n.7, p.364-377, 1997.

GÄRTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.66, n.1, p.116-122, 1997.

GÄRTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to beta-carotene in the human. **International Journal For Vitamin And Nutrition Research**, Bern, v.66, n.2, p.119-125, 1996.

GAZIANO, J. M.; JOHSON, E. J; RUSSEL, R. M.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; REDKER, P. M.; FREI, B.; HENNEKENS, C. H.; KRINSKY, N. I. Discrimination in absorption or transport of betas-carotene isomers after oral supplementation with either all-trans carotene or 9-cis beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.61, n.6, p.1248-1252, 1995.

HAVEL, R. J.; EDER, H. A.; BRAGDON, J. H. Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 34, n.9, p.1345-1353, 1955.

IBGE. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Tabelas de composição de alimentos**. 3ed. Rio de Janeiro, 1977. 216p.

JOHNSON, RM; BAUMANN, CA. Storage of vitamin A rats fed cryptoxanthin and certain other carotenoids, with parallel data on absorbability. **Archives of Biochemistry**, San Diego, v.19, n.3, p.493-501, 1948.

JOHSON, E. J; RUSSEL, R. M. Distribution of orally administered beta-carotene among lipoproteins in healthy men. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.56, n.1, p.128-135, 1992.

KAVISHE, F. P. Development of vitamin A control programs: an example from Tanzania. **NU Nytt U-Landshalsovard**, v.3, n.6, p.21-26, 1992. Special issue.

KELLEY, B; DAY H. G. Effect of xanthophyll on the utilization of carotene and vitamin A by the rat. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.40, n.1, p.159-168, 1950.

KIMURA, M. **Aprimoramento da metodologia para determinação de carotenóides em alimentos**. Campinas, 1999. 96p. Tese (Doutorado). – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; WILEY, E. R.; KRAMER, T. R.; BROWN, E.; SMITH, J. C.; CLEVIDENCE, B. A. Bioavailability and metabolism of carotenoids in healthy humans with high intake of foods rich in lutein, lycopene, and beta Carotene. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAROTENOIDS, 11th. 1996., **Abstracts Poster**. Leiden. Netherlands: IUPAC, 1996.

KOSTIC, D; WHITE, W. S.; OLSON, J. A. Intestinal absorption, serum clearance, and interations between lutein and beta-caroten when administered to human adults in separate or combined oral doses. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.3, p.604-610, 1995.

MOORE, A. C.; GUGGER, E. T.; ERDMAN, J. W. Competition between beta-carotene and selected carotenoids for uptake by rat and human brush border membrane vesicles. **FASEB Journal**, Bethesda, v.11, n.3, p.2262-2262, 1997.

OLSON, J. A. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in human. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.45, n.4, p.704-716, 1987.

O'NEILL, M. E.; THURNHAM, D. I. Intestinal absorption of beta-carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal response curves in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction. **British Journal of Nutrition**, Willingford, v.79, n.2, p.149-159, 1998.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. **FASEB**, Bethesda, v.10, n.5, p.542-5, 1996.

PASSOS, P. A. **Carotenóide e Vitamina A em colostro de mães de recém nascidos pretermo atendidas no CAISM**, Campinas, 1993. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 100p.

PAETAU, I.; CHEN, H.; GOH, N. M-Y.; WHITE, W. S.; Interactions in the post prandial appearance of beta-carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol-rich lipoproteins in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.66, n.5, p.1133-1143, 1997.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 10°.ed. São Paulo: Nobel, 1982. 430p.

POOR, C. L.; BIERER, T. L.; MERCHEN, N. R.; FAHEY, G. C.; ERDMAN, J. W. Jr. The accumulation of alpha-carotene and beta-carotene in serum and tissues of preruminant calves fed raw and steamed carrot slurries. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.7, p.1296-1304, 1993.

Programa de apoio à nutrição. Centro de Informática e Saúde. Escola Paulista de Medicina. Universidade de São Paulo.

REDDY, V.; UNDERWOOD, B. A.; de PEE, S.; WEST, E. C.; KARYADI, D.; HAUTVAST, J. G. A. J. Vitamin A status and dark green leafy vegetables. **The Lancet**, London, v.346, n.8990, p.1634-1636, 1995.

ROCK, C. L.; LOVALVO, J. L.; EMENHESER, E.; RULFIN, M. T.; FLATL, W. S.; SCHWARTZ, S. J. Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.5, p.913-916, 1998.

ROCK, C. L.; SWENDSEID, M. E. Plasma beta-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.55, n.23, p.96-99, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation**: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. *Arlington: John Snow, OMNI*, 1997. 88p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Assessment of the provitamin A content of foods. the Brazilian experience. **Journal of Food Composition Analysis**, v.9, p.196-230, 1996.

RODRIGUEZ, D. B.; RAYMUNDO, L. C.; LEE, T. C.; SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, London, v.40, n.167, p.615-624, 1976.

SALOMONS, N. W.; BULUX, J. Effects of nutritional status on carotene uptake and bioconversion. In: Carotenoids in human health. **The New York Academy of Science**, v.691, 1993.

SHARMA, A.; KUMAR, A. Concurrent analysis of plasma retinol and α -tocopherol by isocratic HPLC. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.28, n.7, p.780-782, 1990.

STAHL, W.; SCHWARZ, W.; SIES, H. Human serum concentration of all-trans beta and alpha-carotene but not 9-cis beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.5, p.847-851, 1993.

STAHL, W.; SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.122, n.11, p.2161-2166, 1992.

TAKYI, E. E. K. Children's consumption of dark green leafy vegetables with added fat enhances serum retinol. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, n.8, p.1549-1554, 1999.

TANG, G.; DOLNIKOWSK, G. G.; BLANCO, M. C.; FOX, J. G.; RUSSEL, R. M. Serum carotenoids and retinoids in ferrets fed canthaxanthin. **Journal of Nutrition Biochemistry**, New York, v.4, n.1, p. 58-63, 1993.

TANG, G.; SERFATY, C.; RUSSEL, R. M. Effects of gastric acidity on intestinal absorption of beta-carotene in human. **FASEB**, Bethesda, v.9, p.442, 1995. Abstract,

THANE, C; REDDY, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. **Nutrition Food Science**, v.2, n.2, p.58-65, 1997.

TRABER, M. G; DIAMOND, S. R; LANE, J. C; BRODY, R. I.; KAYDEN, H. J. Beta-carotene transport in human lipoproteins. Comparations with alpha-tocoferol. **Lipids**, Champaign, v.29, n.10, p.665-669, 1994.

TRABER, M. G; LANE, J. C.; LAGMAY, N. R; KAYDEN, H. J. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. **Lipids**, Champaign, v.27, n.9, p.657-663, 1992.

VAN DENBERG, H.; VAN SCHARK, F.; VAN VLIET, T. Beta-carotene absorption and Cleavage in men, interaction with lycopene and lutein. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM, ON CAROTENOIDS*. 1996, 11th 1996. Luden. Abstracts poster. IUPAC.

VAN DENBERG, H.; VAN VLIET, T. The effect of simultaneos (single) oral dosage of betas-carotene with lutein or lycopene on the beta-carotene and retinyl ester responses in triglyceride-rich lipoprotein fraction in adult males. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.68, p.82-89, 1998.

VAN HET HOF, K. H.; BROUWER, I.; WEST, C. E.; HADDEMAN, E.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M.; Van DUSSELDORP, M.; WESTSTRATE, J. Á; EKES, TKAB; HAUTVAST, G. A. J. Bioavailability of lutein from vegetables in 5 times than that beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.70, n.2, p.261-268, 1999.

VAN HET HOF, K. H.; GARTNER, C.; WEST, C. E.; TIJBURG, L. B. M. Potential of vegetable processing to increase the delivery of carotenoids in man. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v.68, n.6, p.366-370, 1998.

VAN VLIET, T.; SCHREURS, W. H. P.; VANDENBERG, H. Intestinal beta-carotene absorption and cleavage in men: response of beta-carotene and retinyl esters in the triglyceride-rich lipoprotein fraction after a single oral doses of beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.1, p.10-116, 1995.

VAN VLIET, T.; VANVLISINGEN, M. F.; VANSCHAIK, F.; VANDENBERG, H. beta-carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.126, n.2, p.499-508, 1996.

VAN VLIET, T.; VANSCHAIK, F.; VANSCHOONHOVEN, J.; SCHRIJVER, J. Determination of several retinoids, carotenoids and E vitamers by high-performance liquid chromatography. Application to plasma and tissue of rats fed a diet rich in either beta-carotene or canthaxanthin. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.553, n.1-2, p.179-186, 1991.

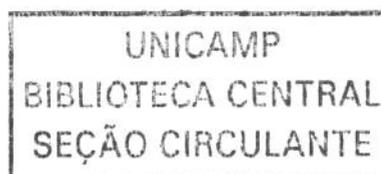
ZEITLIN, M. F.; MEGAWANGI, R.; KRAMER, E. M.; ARMSTRONG, H. C. Mother's and children's intakes of vitamin A in rural Bangladesh. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.56, n.1, p.136-147, 1992.

ZHOU, J. R.; GUGGER, E. T.; ERDMAN Jr, J. W. The crystalline form of carotenes and the food matrix in carrot root decrease the relative bioavailability of beta and alpha-carotene in the ferret model. **Journal of the American College Nutrition**, Bethesda, v.15, n.11, p. 84-91, 1996.

WALD, N. Retinol, beta-carotene and cancer. **Cancer Surveys**, Plainview, v.6, n.4, p.635-653, 1987.

WHITE, W. S.; PECK, K. M; BIERER, T. L.; GUGGER, E. T.; ERDMAN J. W. Interactions of oral beta-carotene and canthaxanthin in ferrets. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.8, p.1405-1413, 1993.

WINGERATH T.; STHAL W.; SIES H. β -cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in β -cryptoxanthin esters. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.324, n.2, p.385-390, 1995.



6. Conclusão Geral

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A composição em ácidos graxos na rúcula mostra que o ácido linolênico é predominante (48%) neste vegetal;
- A atividade da enzima lipoxigenase foi reduzida em 50% após 15 min de cozimento;
- A metodologia utilizada para o α -tocoferol foi eficiente e poderá ser utilizada para estudos em outras folhas;
- A biodisponibilidade dos carotenóides β -caroteno e luteína, contidos na rúcula (*Eruca sativa*), quer crua ou cozida, é similar à do β -caroteno sintético em pessoas adultas saudáveis;
- O cozimento a 97°C durante 5 minutos não melhorou a biodisponibilidade dos carotenóides da rúcula;
- Houve uma interação negativa do β -caroteno sobre a absorção da luteína.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 611

13083-970 Campinas-S.P.

☎ 0 XX 19 7888936

fax 0 XX 19 7888925

✉ cep@nead.fcm.unicamp.br

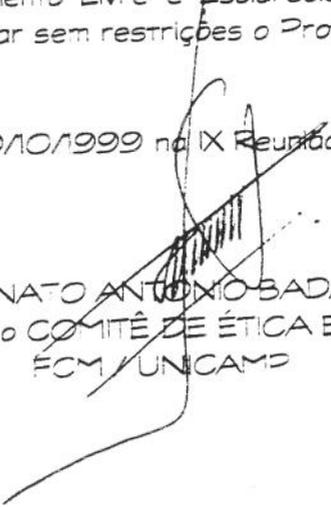
PARECER: N° 092/99

P. DE PESQUISA: EFICÁCIA NUTRICIONAL DA RÚCULA (*ERUCA SATIVA*) COMO FONTE DE VITAMINA A

PESQUISADOR: Érika Maria Marcondes Tass

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

A ser homologado em 19/10/1999 na IX Reunião Ordinária do CEP


Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP