

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

COMPOSIÇÃO E BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DOS CAROTENÓIDES EM ALIMENTOS

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira

Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Delia B. Rodriguez Amaya

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos

Campinas

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

OL4c Oliveira, Giovanna Pisanelli Rodrigues
Composição e bioacessibilidade in vitro dos carotenóides em alimentos / Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

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

1. Carotenóides. 2. Verduras. 3. Frutas. 4. Bioacessibilidade. 5. Biodisponibilidade. I. Rodriguez-Amaya, Delia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Composition and in vitro bioaccessibility of carotnoids in foods

Palavras-chave em inglês (Keywords): Carotenoids, Vegetables, Fruits, Bioaccessibility, Bioavailability

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Delia Rodriguez-Amaya

Helena Teixeira Godoy

Márcia Cristina Teixeira Martins

Myrna Sabino

Rosemary Hoffmann Ribani

Data da Defesa: 25/02/2011

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em 25/02/2011 por Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira. Aprovada pela comissão julgadora em ____/____/2011.

Profa. Dra. Delia Rodriguez Amaya

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

Profa. Dra. Márcia Cristina Teixeira Martins

Dra. Myrna Sabino

Profa. Dra. Rosemary Hoffman Ribani

Profa. Dra. Mieko Kimura

Profa. Dra. Cristiane Hess de Azevedo Meleiros

Dra. Marisa Padula

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Vera Helena e Abílio.
As pessoas mais importantes da minha vida,
eternos professores e a quem agradeço
e devo todas as minhas conquistas.
A medida do amor é amar sem medida.

Agradecimentos

À professora Delia Rodriguez-Amaya, pela orientação, carinho e atenção. Obrigada pela privilegiada oportunidade, pela paciência e pelos ensinamentos que levarei por toda minha vida.

Às professoras da banca examinadora, Helena e Mieke que foram minhas professoras e em quem me espelho. Obrigada pelos ensinamentos, pelos conselhos e pelos momentos divertidos. À Rose e Márcia que além de queridas amigas de laboratório, me ensinaram a ter paciência e acreditar nos sonhos. Obrigada pelo apoio e pelo carinho. À Myrna, Marisa e Cristiane, que dispuseram parte do seu tempo para corrigir minha tese. Muito obrigada pelas relevantes correções e apontamentos.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela oportunidade e ao CNPq pelo suporte financeiro.

À funcionária e amiga Renata, que muito me ajudou e que trouxe muita alegria ao laboratório, tornando-o um lugar muito bom de trabalhar. À funcionária Débora pela torcida e pela colaboração em muitos momentos e ao Dag pelo carinho e atenção.

A todos que passaram pelo Laboratório de Carotenóides durante o tempo em que trabalhei: Rose (nossa mãezona), Lísia e Cíntia (as abelhas), Márcia (amiga e conselheira), Natália (super fashion), Renato (muito divertido), Emilson (um amigo pra contar sempre), Aline (amiga de oração) e Michelle (amiga do coração e companheira de república e de todas as horas). Não me esquecerei dos anos em que convivemos juntos. Aprendemos sempre...nos momentos difíceis e nas alegrias.

Aos meus amigos que guardo no coração: Cd e Rô, meus fiéis escudeiros, amigos de alma. À Daniela Pane, Ná Guandalini, Mary, Camila, Fabi e Si, amigas do meu coração pra sempre. Agradeço aos amigos do laboratório de bioaromas, de análise de alimentos e do DEA, que me proporcionaram momentos inesquecíveis.

À minha querida família, em especial aos meus amados irmãos Leopoldo e Ricardo, às minhas cunhadas Maíra e Tininha e à minha princezinha Petra. Amo vocês e sou MUITO mais feliz tendo vocês por perto.

Ao amor da minha vida, Renan, que com toda paciência e carinho do mundo, me incentivou e me ensinou que a minha gotinha é importante para o mar. Obrigada! Agradeço também à sua família que eu gosto tanto, especialmente à Idely, Caio e Luana que me acolheram com tanto carinho.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Agradeço imensamente a **Deus** que em sua infinita bondade colocou em minha vida pessoas tão especiais.

ÍNDICE GERAL

Resumo Geral	xiv
General Summary	xvii
Introdução Geral	xx
 Capítulo 1 – Avaliação da Biodisponibilidade dos Carotenóides	 1
Resumo.....	3
Introdução.....	4
Digestão, absorção e transporte de carotenóides.....	6
Fatores que afetam a biodisponibilidade dos carotenóides.....	9
<i>Espécie do carotenóide</i>	9
<i>Matriz Alimentar</i>	11
<i>Efeito de outros componentes</i>	13
<i>Competição entre carotenóides</i>	15
<i>Estado nutricional e doenças</i>	16
Ferramentas para investigação da biodisponibilidade de carotenóides em alimentos.....	17
<i>Métodos de determinação in vivo</i>	17
<i>Métodos de determinação in vitro</i>	21
<i>Comparação entre os resultados obtidos por métodos in vitro e in vivo</i>	24
Considerações finais.....	26
Referências Bibliográficas.....	35
 Capítulo 2 - Comparação de Métodos de Bioacessibilidade <i>In Vitro</i> de Carotenóides	 55
Resumo.....	56
Introdução.....	57
Materiais e métodos.....	59
Resultados e discussão.....	63

Conclusão.....	66
Referências bibliográficas.....	71
Capítulo 3 - Bioacessibilidade <i>In Vitro</i> de Carotenóides de Vegetais	75
Verdes Folhosos	
Resumo.....	77
Introdução.....	78
Materiais e métodos.....	79
Resultados e discussão.....	83
Conclusão.....	86
Referências bibliográficas.....	90
Capítulo 4 - Bioacessibilidade <i>In Vitro</i> de Carotenóides de Frutas	95
Frescas e Processadas	
Resumo.....	96
Introdução.....	97
Materiais e métodos.....	99
Resultados e discussão.....	103
Referências bibliográficas.....	110
Capítulo 5 – Composição e Bioacessibilidade <i>In Vitro</i> de	117
Carotenóides de Frutas Amazônicas	
Resumo.....	118
Introdução.....	119
Materiais e métodos.....	120
Resultados e discussão.....	125
Conclusão.....	127
Referências bibliográficas.....	130

Capítulo 6 – Efeito da Microencapsulação na Bioacessibilidade dos Carotenóides de Pitanga	135
Resumo.....	136
Introdução.....	137
Materiais e métodos.....	138
Resultados e discussão.....	143
Referências bibliográficas.....	146
 Conclusões Gerais.....	 149

RESUMO GERAL

Dentre os fitoquímicos de maior interesse por proporcionarem benefícios à saúde humana estão os carotenóides. O Brasil possui o maior banco de dados sobre os teores mas faltam estudos da biodisponibilidade.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica descrevendo o mecanismo de digestão, transporte e absorção dos carotenóides, os fatores que podem afetar a biodisponibilidade e os métodos *in vivo* e *in vitro* utilizados para determiná-la.

Métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para determinar a bioacessibilidade dos carotenóides de maneira mais rápida e barata, porém, não houve uma avaliação comparativa dos diferentes métodos.

O Capítulo 2 apresenta a comparação dos resultados obtidos por uma metodologia de determinação da bioacessibilidade *in vitro* e com algumas modificações sugeridas para melhor simular a fisiologia humana. A bioacessibilidade dos carotenóides de cenoura, tomate e espinafre cru e cozido foi, no geral, significativamente maior utilizando-se o método de Reboul *et al.* (2006). A fase oral proposta para integrar a digestão *in vitro* antes da fase gástrica não alterou a bioacessibilidade dos carotenóides nas amostras estudadas, porém, a adição de lipase e carboxil éster lipase aumentou a bioacessibilidade dos carotenóides. O tempo de homogeneização da amostra também afetou significativamente a porcentagem de micelarização dos carotenóides.

O Capítulo 3 apresenta a bioacessibilidade dos carotenóides de vegetais folhosos comerciais e de folhas nativas além de avaliar o efeito do cozimento na

bioacessibilidade. Dentre as amostras cruas analisadas, o espinafre obteve a maior bioacessibilidade para o β -caroteno (14%) e para a luteína (46%), correlacionado com seu baixo teor em fibras (2,1g/100g). A folha nativa “caruru”, mais rica em fibras (4,5g/100g) apresentou a menor bioacessibilidade para o β -caroteno (2,3%) e para a luteína (6,9%). O cozimento aumentou a bioacessibilidade do β -caroteno (3,3 para 16% e 14 para 15%) e da luteína (18 para 38% e 46 para 59%) em couve e espinafre respectivamente.

A bioacessibilidade dos carotenóides de frutas e seus derivados processados foi estudada no Capítulo 4. Entre as frutas cruas, o mamão ‘Solo’ teve a maior bioacessibilidade para β -caroteno (36%) e β -criptoxantina (39%) e a pitanga teve a menor bioacessibilidade para esses carotenóides. A porcentagem de micelarização dos carotenóides foi maior nos produtos processados. Em manga, a bioacessibilidade do β -caroteno aumentou de 19% na fruta crua para 57% no suco, e na goiaba, a bioacessibilidade do licopeno da goiaba aumentou de 1,4% para 27% na goiabada.

No Capítulo 5 encontra-se o estudo da bioacessibilidade das frutas amazônicas buriti, tucumã e pupunha (crua e cozida). Além de ótimas fontes de carotenóides pró-vitâmicos A (150 μ g/g, 147 μ g/g, 48 μ g/g de β -caroteno para o buriti, o tucumã e a pupunha, respectivamente), todas as frutas analisadas apresentaram bioacessibilidade do β -caroteno maior que a das frutas analisadas no capítulo anterior, sendo que a pupunha cozida teve a maior porcentagem (40%).

O Capítulo 6 forneceu informações sobre o efeito da bioacessibilidade na microencapsulação da polpa de pitanga microencapsulada em diferentes materiais de parede para proteger os carotenóides da degradação oxidativa. O licopeno

apresentou baixa bioacessibilidade (1%) em todas as amostras analisadas. A luteína foi o carotenóide mais bioacessível em todas as amostras (6 a 21%). A microencapsulação com maltodextrina diminuiu substancialmente a bioacessibilidade de todos os carotenóides, enquanto que as perdas de bioacessibilidade foram menores com goma arábica. O amido modificado teve um efeito intermediário.

GENERAL SUMMARY

Carotenoids are among the phytochemicals of greater interest in terms of human health benefits. Brazil has the largest database on carotenoid concentrations, but studies on bioavailability are lacking.

Chapter 1 is a review of the literature describing the mechanism of digestion, transport and absorption of carotenoids, the factors that can affect bioavailability and the *in vivo* and *in vitro* methods used for determining bioavailability.

In vitro methods have been developed to determine bioaccessibility of carotenoids rapidly and inexpensively, but comparative evaluation of the different methods has not been carried out. Chapter 2 presents a comparison of the results obtained by a methodology for the determination of bioaccessibility *in vitro* and with modifications suggested to simulate human physiology better. The bioaccessibility of the carotenoids of carrot, tomato, and raw and cooked New Zealand spinach was, in general, significantly greater when the method of Reboul *et al.* (2006) was used. The oral phase proposed to integrate the digestion *in vitro* before the gastric phase did not alter the bioaccessibility of the carotenoids of the samples studied, but the addition of lipase and carboxyl ester lipase increased the bioaccessibility. The homogeneization time also affects significantly the percent micelarization of the carotenoids.

Chapter 3 presents the bioaccessibility of commercial and native leafy vegetables, aside from the evaluation of the effect of cooking on bioaccessibility. Among the raw samples analyzed, New Zealand spinach had the highest

bioaccessibility for β -carotene (14%) and lutein (46%), correlating with its low fiber content (2.1 g/100g). The native leaf “caruru”, richer in fiber (4.5 g/100g) had the lowest bioaccessibility for β -carotene (2.3%) and for lutein (6.9%). Cooking increased the bioaccessibility for β -carotene (3.3 to 16% and 14 to 15%, respectively) and lutein (18 to 38% and 46 to 59%, respectively) in kale and New Zealand spinach.

The bioaccessibility of carotenoids in fruits and their processed derivatives was studied in Chapter 4. Among the raw fruits, the papaya ‘Solo’ had the highest bioaccessibility for β -carotene (36%) and β -cryptoxanthin (39%) and pitanga had the lowest bioaccessibility for these carotenoids (6.3% e 10%, respectively). The percent micelarization of carotenoids was higher in the processed products. In mango, the bioaccessibility for β -carotene increased from 19% in the raw fruit to 57% in the juice, and in guava , the bioaccessibility of lycopene increased from 1.4% to 27% in “goiabada”.

Chapter 5 deals with the bioaccessibility of the Amazonian fruits “buriti”, “tucumã” and pupunha (raw and cooked). Aside from being excellent sources of provitamin A carotenoids (150, 142, 48 μ g/g of β -carotene for “tucumã”, “buriti” and “pupunha”, respectively), all three fruits presented greater bioaccessibility of β -carotene than those of the fruits analyzed in the previous chapter, the cooked “pupunha” having the highest percentage (40%).

Chapter 6 provides information about the bioaccessibility of pitanga pulp and pitanga microencapsulated with different wall materials to protect the carotenoids from oxidative degradation. Lycopene had low bioaccessibility (1%) in

all samples analyzed. Lutein was the most bioaccessible carotenoid in all samples (6 a 21%). Micelarization with maltodextrin substantially decreased the bioaccessibility of all the carotenoids, while there was practically no loss of bioaccessibility with gum Arabic. The modified starch had an intermediate effect.

INTRODUÇÃO GERAL

Além da reconhecida importância como pró-vitamínicos A, os carotenóides possuem propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde humana como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas. Por estas importantes características, estes compostos são muito estudados e o Brasil possui o maior banco de dados de carotenóides em alimentos do mundo.

Embora necessária, a composição quantitativa dos carotenóides nos alimentos não é suficiente. Deve ser complementada pela informação sobre biodisponibilidade, ou seja, a proporção da quantidade do nutriente ingerido disponível para ser utilizada ou armazenada pelo corpo. A bioacessibilidade se refere à fração do carotenóide transferido durante a digestão para as micelas e, portanto, disponíveis para a absorção intestinal.

Estudos bem executados para a determinação de biodisponibilidade *in vivo* em humanos são preferidos, porém são caros, complexos e demandam um grande trabalho laboratorial. Para uma avaliação inicial, métodos *in vitro* de determinação da bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade vêm sendo desenvolvidos para que um maior número de amostras seja analisado, de maneira mais rápida e barata. Observa-se que os resultados obtidos por laboratórios diferentes são substancialmente diferentes, necessitando de avaliação comparativa e padronização dos métodos.

O presente trabalho teve como objetivos: (a) comparar métodos de avaliação da bioacessibilidade de carotenóides *in vitro*; (b) avaliar a bioacessibilidade dos carotenóides dos vegetais folhosos e nativos além de avaliar o efeito do cozimento; (c) determinar a bioacessibilidade dos carotenóides de frutas comumente consumidas no país bem como de produtos processados derivados; (d) determinar o teor de carotenóides e avaliar a bioacessibilidade de importantes frutas amazônicas; (e) avaliar o efeito da microencapsulação por *spray drying* com diferentes materiais de parede na bioacessibilidade da polpa de pitanga.

CAPÍTULO 1

Avaliação da Biodisponibilidade dos Carotenóides

Avaliação da Biodisponibilidade dos Carotenóides

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira e Delia Rodriguez Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

Alguns carotenóides são muito importantes para os homens e outros animais como precursores de vitamina A. Adicionalmente, estes compostos, inclusive os não pró-vitamínicos A, atuam como fortalecedores do sistema imunológico e antioxidantes, prevenindo doenças cardiovasculares, câncer, degeneração macular e catarata. A sua composição em alimentos tem sido determinada em todo o mundo, sendo do Brasil o maior banco de dados a respeito. Porém esta determinação deve ser complementada por dados da biodisponibilidade dos carotenóides, que por sua vez é influenciada por inúmeros fatores como quantidade e natureza do carotenóide, estado físico do carotenóide, natureza da matriz, método de preparo ou processamento, competição entre carotenóides, presença de outros componentes na dieta como fibras, lipídeos, vitamina A, estado fisiológico e presença de patologias. Portanto, muitas investigações e discussões sobre biodisponibilidade de carotenóides têm sido feitas. Os métodos mais adequados são estudos realizados *in vivo* com humanos, contudo, a determinação *in vitro* vem sendo muito utilizada recentemente pelo fato, entre outros fatores, de ser mais barata e mais rápida, permitindo a análise de um grande número de amostras.

Palavras-chave: Carotenóides; biodisponibilidade, métodos *in vivo*; métodos *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Atualmente, um amplo número de compostos presentes nos alimentos vem sendo estudado por exercerem ações biológicas que promovem a saúde do homem. Dentre estes compostos bioativos, estão os carotenóides, pigmentos naturais responsáveis pela coloração de muitas frutas, folhas e flores, variando entre o amarelo, o alaranjado e o vermelho.

Estes compostos são biossintetizados apenas por plantas e certos microrganismos, portanto, homens e animais devem obtê-los através da dieta. Mais de 600 diferentes carotenóides naturais já foram isolados e identificados, no entanto, apenas cerca de 60 podem ser encontrados em fontes alimentícias (Mangels *et al.*, 1993) e aproximadamente 20 deles são detectados no sangue e nos tecidos (Parker, 1989). Os carotenóides encontrados em maiores concentrações no plasma sanguíneo são: β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina (Khachik *et al.*, 1991).

Alguns carotenóides são precursores de vitamina A e devido ao custo geralmente mais baixo das suas fontes vegetais, a contribuição das pró-vitaminas A na dieta pode alcançar 82% em países em desenvolvimento (Simpson, 1983). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a deficiência de vitamina A é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, com conseqüências graves especialmente para crianças da Ásia, África e América Latina. Para que um carotenóide seja considerado pró-vitamínico, ele precisa conter, em sua estrutura, um anel β não substituído, com uma cadeia lateral

poliênica de 11 carbonos. Portanto, o carotenóide pró-vitamínico A mais importante da dieta é o β -caroteno, por possuir elevada biopotência (ao qual é atribuída 100% de atividade) e pela sua larga ocorrência (Rodriguez-Amaya, 1985).

Em anos mais recentes, outras atividades biológicas têm sido conferidas aos carotenóides, como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata (Olson, 1999; Tapiero *et al.*, 2004; Voutilainen *et al.*, 2006). Estes efeitos benéficos à saúde são independentes da atividade pró-vitamínica A e têm sido relacionados à propriedade antioxidante dos carotenóides, mediante o sequestro de oxigênio singlete e de radicais livres (Krinsky, 1989; Palozza e Krinsky, 1992). A capacidade mostrada pelos carotenóides em sequestrar oxigênio singlete está ligada ao sistema de duplas ligações conjugadas, sendo que a máxima eficiência é demonstrada por carotenóides com nove ou mais destas duplas ligações. Outros mecanismos de ação também têm sido relatados: modulação do metabolismo de cancerígenos, regulação do crescimento e diferenciação celular, inibição da proliferação celular, estimulação da comunicação intercelular, estimulação da resposta imunológica, modulação do mecanismo de reparo do DNA, indução de enzimas detoxificantes e filtragem da luz azul (Olson, 1999; Krinsky e Johnson, 2005).

Devido a estes importantes efeitos na saúde, a composição de carotenóides em alimentos vem sendo determinada em todo o mundo. O Brasil possui o maior banco de dados mundialmente, incluindo frutas e hortaliças, suas diferentes variedades produzidas em diversas regiões brasileiras, além das composições dos

alimentos *in natura*, processados e preparados para consumo, somando mais de 270 itens (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

Apesar de necessária, apenas a composição quantitativa dos carotenóides nos alimentos não é suficiente, do ponto de vista nutricional. Deve ser complementada com informações sobre a biodisponibilidade dos mesmos.

O termo biodisponibilidade pode ser definido como a proporção da quantidade do nutriente ingerido disponível para ser utilizada ou armazenada pelo corpo (Castenmiller e West, 1998). O complexo processo de absorção dos carotenóides envolve: a digestão eficiente da matriz alimentar para o desprendimento dos carotenóides, a formação de micelas lipídicas, a captação pelas células da mucosa intestinal (absorção) e a distribuição dos carotenóides e seus produtos metabólicos para o sistema linfático e tecidos alvos (Jackson, 1997). A bioacessibilidade se refere a fração do carotenóide transferido durante a digestão para as micelas e, portanto, disponíveis para a absorção intestinal (Stahl *et al.*, 2002). Em relação aos carotenóides pró-vitamínicos A, a bioconversão representa a conversão de pró-vitamina A para retinol (Rodriguez-Amaya, 2010).

DIGESTÃO, ABSORÇÃO E TRANSPORTE DOS CAROTENÓIDES

Os carotenóides são processados durante a digestão de maneira semelhante a outros compostos lipídicos. A digestão inicia-se na cavidade oral onde o alimento é mecanicamente triturado e lubrificado com a saliva e posteriormente enviado para o estômago. No lúmen gástrico, pela ação de ácidos, pepsina e lipase, os carotenóides são parcialmente liberados das matrizes alimentares e emulsificados em

gotas lipídicas. Os carotenóides apolares acumulam-se no centro dessas gotas e os polares são distribuídos na sua superfície (Borel *et al.*, 1996).

No intestino delgado são liberadas secreções pancreáticas, biliares e lipases, hidrolisando os compostos presentes nas gotículas emulsificadas e formando micelas mistas compostas de ácidos biliares, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolipídeos (Yeum e Russel, 2002). Nesta etapa, os ésteres de hidroxicarotenóides são hidrolisados a carotenóides livres pela ação de colesterol esterase e lipase pancreática (Jacobs *et al.*, 1982; Breithaupt *et al.*, 2002). Subsequentemente, os carotenóides presentes nas micelas são absorvidos pelas células absortivas da mucosa intestinal, que são as células da mucosa do intestino delgado, via difusão passiva (Hollander e Ruble, 1978; Scita *et al.*, 1992; Parker, 1996). De acordo com o mecanismo de difusão passiva, as micelas migram para a camada de água da membrana de borda em escovae os carotenóides deixam a estrutura micelar e se difundem através da membrana para o citoplasma dos enterócitos (células absortivas da mucosa intestinal) (Yonekura e Nagao, 2007).

Uma vez nas células absortivas da mucosa intestinal, os carotenóides pró-vitamínicos A podem ser clivados e convertidos a vitamina A. A clivagem pode ser central, pela ação da enzima β,β -caroteno 15,15'-monoxigenase, ou excêntrica, pela ação da enzima β,β -caroteno 9',10'-dioxigenase (Von Linting e Vogt, 2004; Wyss, 2004). No primeiro, considerado o mecanismo principal, o β -caroteno é dividido ao meio, dando duas moléculas de retinal, que é posteriormente transformado em retinol. No segundo, segmentos podem ser retirados de uma extremidade de β -caroteno, formando apocarotenóides e eventualmente retinal.

Carotenóides e ésteres de retinila sintetizados após a clivagem dos carotenóides pró-vitamínicos A, são incorporados aos quilomícrons (Parker, 1996; Olson, 1999) que são compostos por lipoproteínas de baixa densidade, compostas de triacilgliceróis, fosfolipídios, ésteres de colesterol, colesterol livre e apolipoproteínas. Os quilomícrons são secretados na linfa e alcançam o sistema sanguíneo via ducto linfático. Em seu trajeto pela linfa e circulação sanguínea, processos como a hidrólise e a distribuição de triacilgliceróis e a troca de apolipoproteínas, resultam na formação de quilomícrons remanescentes de menor tamanho e maior densidade. Quase todos os ésteres de retinila e carotenóides livres presentes nos quilomícrons permanecem nas partículas de quilomícrons remanescentes (Blomhoff e Blomhoff, 2006) e são rapidamente captados pelo fígado onde podem ser armazenados ou secretados para o plasma para serem distribuídos aos tecidos (Parker, 1996).

Os carotenóides são transportados no plasma de humanos e animais exclusivamente por lipoproteínas (Parker, 1996). A sua distribuição entre as diferentes classes de lipoproteínas plasmáticas parece ser determinada pelas características físicas dos carotenóides e pela composição de lipídeos das lipoproteínas. Os carotenóides hidrocarbonetos predominam nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), enquanto as xantofilas se encontram distribuídas igualmente entre as lipoproteínas de alta (HDL) e baixa densidade (LDL) (Olson, 1999).

FATORES QUE AFETAM A BIODISPONIBILIDADE DOS CAROTENÓIDES

Complexos fatores influenciam a biodisponibilidade dos carotenóides, tornando-a muito variável: a espécie do carotenóide, a natureza da matriz na qual os carotenóides estão incorporados, os efeitos de absorção, as interações entre os carotenóides, o estado nutricional e os fatores genéticos (Castenmiller e West, 1998).

Espécie do carotenóide

Os carotenóides podem ser divididos em carotenos, compostos constituídos apenas por carbono e hidrogênio, e seus derivados oxigenados, as xantofilas, que possuem caráter menos lipofílico que os carotenos. Devido a esta diferença de hidrofobicidade, as xantofilas acumulam-se na superfície das gotas lipídicas emulsificadas e os carotenos mais ao centro, tornando a transferência das xantofilas para as micelas mais eficiente que a transferência dos carotenos (van het Hof *et al.*, 2000; Yonekura e Nagao, 2007).

Estudos com humanos demonstraram biodisponibilidade de luteína significativamente maior que a de β -caroteno tanto quando administrados em óleo (Castenmiller *et al.*, 1999; Micozzi *et al.*, 1992) como quando administrados através de hortaliças ricas em carotenóides (van het Hoff *et al.*, 1999; Castenmiller *et al.*, 1999; Granado *et al.*, 2006).

Os carotenóides são normalmente encontrados na natureza em sua forma *todo-trans*, porém podem ser isomerizados a *cis*-isômeros pelo contato com ácidos,

tratamento térmico e exposição à luz (Rodriguez-Amaya, 1999). Estudos têm demonstrado que o tipo de isômero também influencia na biodisponibilidade.

No caso do β -caroteno, o *trans*- β -caroteno é mais absorvido que seus isômeros 9- e 13-*cis*- β -caroteno em humanos (Stahl e Sies 1992; Gaziano *et al.*, 1995; Bem-Amotz e Levy, 1996) e em gerbilos (Erdman *et al.*, 1998; Deming *et al.*, 2002). During *et al.* (2002), utilizando como ferramenta de investigação, um método de determinação da biodisponibilidade *in vitro*, também reportou que a absorção do *trans*- β -caroteno por células Caco-2 foi significativamente maior que a de seus isômeros 9- e 13-*cis*- β -caroteno.

Diferentemente do β -caroteno, para o licopeno, observou-se que os *cis*-isômeros são mais biodisponíveis que o *trans*-licopeno (Boileau *et al.*, 1999; Boileau *et al.*, 2002). Stahl e Sies (1992) foram os primeiros a sugerirem que os isômeros *cis*-licopeno são preferencialmente absorvidos comparado com o isômero *todo-trans*. Eles observaram que apesar do suco de tomate conter apenas 20% de *cis*-isômeros, a quantidade destes isômeros no plasma de voluntários saudáveis foi de 50% após o consumo do suco de tomate.

Boileau *et al.* (1999) administraram licopeno oralmente a furões e coletaram o intestino delgado, a linfa e alguns tecidos para determinar a relação dos isômeros *cis-trans*. Foi observado que apesar da dose conter apenas 9% de isômeros *cis*, as células da mucosa (58,8%), da linfa (77,4%), do sangue (52%) e dos tecidos coletados, continham significativamente mais *cis*-licopeno que o estômago (6%) e o intestino (17,5%).

Unlu *et al.* (2007) investigaram a biodisponibilidade do licopeno em humanos através da ingestão de molho de tomate e demonstraram que ela é significativamente maior para o *cis*-licopeno em relação ao *trans*-licopeno. Failla *et al.* (2008) também obtiveram resultados de biodisponibilidade maiores para o *cis*-licopeno utilizando um método de determinação de biodisponibilidade *in vitro*.

Matriz alimentar

Nos alimentos, os carotenóides estão associados a proteínas e protegidos por membranas e paredes celulares, e para que ocorra a absorção, é necessário o seu desprendimento da matriz de origem. Em 1948, van Zeben e Hendriks, já haviam reportado que a homogeneização aumentava a biodisponibilidade do β -caroteno de cenoura em humanos. Desde então, vários estudos têm demonstrado que a destruição da matriz alimentar influencia significativamente na biodisponibilidade dos carotenóides. O processamento dos alimentos, incluindo tratamento térmico, mecânico e enzimático, facilita a destruição da integridade da parede celular e das membranas das organelas nas quais os carotenóides estão localizados, liberando os carotenóides da matriz alimentar e promovendo sua dispersão no trato gastrointestinal (Yonekura e Nagao, 2007).

Van het Hof *et al.* (1999) demonstraram que a quantidade de luteína encontrada no plasma foi aproximadamente 14% maior quando o espinafre foi consumido picado em relação ao consumo de folhas inteiras.

Em um estudo conduzido por Rock *et al.* (1998), mulheres que consumiram 9,3 mg de β -caroteno de cenoura e espinafre, diariamente, por quatro semanas,

apresentaram concentração plasmática do carotenóide três vezes maior quando os alimentos foram submetidos à homogeneização e ao processamento térmico do que quando consumidos crus.

Outro estudo utilizou um grupo de voluntários ileostomizados e mostrou que a absorção de β -caroteno de purê de cenoura cozida foi de 65,1%, enquanto que a absorção de β -caroteno de purê de cenoura crua foi de 41,4% (Livny *et al.*, 2003).

Em um estudo conduzido por Stahl e Sies (1992), foi constatado que a captação de licopeno em indivíduos adultos é superior com suco de tomate processado, aquecido por 1 hora, em relação à que ocorre em suco não processado, e observou-se também que dos diferentes isômeros geométricos, *trans*, 9-*cis* e 15 *cis*, os *cis* isômeros foram mais absorvidos. Resultado diferente foi obtido por Böhm e Bitsch (1999) que avaliaram a biodisponibilidade do licopeno por um grupo de mulheres em diferentes matrizes. Foi observado que a suplementação com 5 mg de licopeno teve absorção semelhante para o licopeno administrado em cápsula oleaginosa, em suco de tomate e tomate cru.

Estes resultados nos mostram que o processamento dos alimentos, embora possam causar isomerização e oxidação dos carotenóides (Rodriguez-Amaya, 1999), pode contribuir para o aumento da biodisponibilidade.

A localização do carotenóide na célula também parece influenciar na bioacessibilidade. Segundo O'Connell *et al.* (2007), a bioacessibilidade dos carotenóides presentes em frutas é maior que a de vegetais verdes.

Efeito de outros componentes dos alimentos

Um passo importante no processo de absorção dos carotenóides envolve a incorporação deles às micelas. A presença de gordura na dieta estimula a secreção de sais biliares e lipases necessários para a formação das micelas e indução da síntese dos quilomícrons, portanto influencia positivamente na biodisponibilidade dos carotenóides (Borel, 2003).

Entretanto, o aumento da quantidade de gordura não parece influenciar igualmente os diferentes carotenóides. Em estudo com humanos, Roodenburg e colaboradores (2000) não encontraram diferença significativa na quantidade de α - e β -caroteno no plasma quando a refeição continha 3 ou 36 g de gordura, porém a concentração de luteína no plasma foi significativamente maior quando a refeição continha 36 g de gordura. Segundo os autores, a baixa quantidade de gordura (3g) pode ter limitado a solubilização dos ésteres de luteína na fase lipídica e/ou a liberação das esterases e lipases requeridas para a hidrólise da luteína esterificada.

Para uma absorção satisfatória de carotenóides de vegetais não processados, o requerimento de gordura parece ser maior que para vegetais cozidos e homogeneizados (Brown, *et al.*, 2004; Unlu, *et al.*, 2005). A adição de abacate ou óleo de abacate em uma refeição baseada em vegetais frescos aumentou significativamente a absorção de luteína, β -caroteno e licopeno no plasma humano. A resposta plasmática destes carotenóides também foi maior em pessoas que consumiram salada com 28 g de óleo do que naquelas que consumiram salada com 6 g de óleo (Unlu, *et al.*, 2005).

Hu *et al.* (2000) reportaram que a eficiência de absorção do β -caroteno por humanos foi maior quando o alimento era rico em óleo de girassol em comparação com a gordura animal. Segundo Borel *et al.* (1998), refeições ricas em triacilgliceróis de cadeia média diminuem a biodisponibilidade dos carotenóides devido ao fato destes triacilgliceróis serem transportados para o fígado via sistema porta hepático, diminuindo a formação de quilomícrons após a refeição.

Inibidores de absorção de lipídeos como olestra (Cooper *et al.*, 1997; Weststrate e van het Hof, 1995) e fitosteróis (Richelle *et al.*, 2004) diminuíram a biodisponibilidade dos carotenóides pelo decrescimento da micelarização.

A absorção dos carotenóides pode ser diminuída pela presença de fibras alimentares, como pode ser observado em estudos com humanos (Rock e Swendseid, 1992; Riedl *et al.*, 1999), ratos (Zanutto *et al.*, 2002), galinhas (Erdman *et al.*, 1986) e gerbilos (Deming *et al.*, 2000).

O tipo de fibra alimentar parece influir nesta diminuição. Riedl *et al.* (1999) avaliaram o efeito da adição de diferentes tipos de fibras, como pectina, goma guar, alginato, celulose e farelo de trigo, na biodisponibilidade dos carotenóides de uma refeição padronizada, suplementada com uma mistura de antioxidantes contendo β -caroteno, luteína, cantaxantina e α -tocoferol em mulheres jovens saudáveis. A adição de fibras solúveis (pectina, alginato e goma guar) reduziu significativamente a resposta plasmática ao β -caroteno, licopeno e luteína e a adição de fibras insolúveis (celulose e farelo de trigo) causou uma redução significativa na resposta plasmática do licopeno e da luteína, mas não de β -caroteno. Segundo os autores, este resultado

não pode ser explicado por um único critério, visto que pode ser o resultado de complexas interações.

Possíveis mecanismos responsáveis por este efeito incluem a diminuição da taxa de micelarização vinculada à interação das fibras com ácidos biliares resultando no aumento da excreção fecal de gorduras e substâncias lipossolúveis como os carotenóides (Riedl *et al.*, 1999).

Competição entre carotenóides

Os carotenóides podem competir entre si em qualquer ponto durante a absorção, metabolismo e processo de transporte (Yeum e Russell, 2002). Pode ocorrer competição pela incorporação nas micelas, pela assimilação da micela pela mucosa intestinal durante a incorporação ao quilomícrom ou pelo transporte linfático (van den Berg, 1999). Estudos de ingestão de diferentes carotenóides simultaneamente têm indicado que o β -caroteno pode interferir na absorção da luteína (Kostic *et al.*, 1995; van den Berg e van Vliet, 1998) e cantaxantina (Paetau *et al.*, 1997) em humanos, resultando na redução da biodisponibilidade da luteína e da cantaxantina.

Reboul *et al.* (2007) verificaram que uma mistura de carotenóides (licopeno e β -caroteno) reduz significativamente a captação de luteína por células intestinais, *in vitro*. A ingestão de doses iguais e combinadas de β -caroteno e luteína em humanos reduziu significativamente a resposta plasmática à luteína, em cerca de 40%, quando comparada com a ingestão de luteína isoladamente (Kostic *et al.*, 1995). Outros pesquisadores observaram que a ingestão concomitante de luteína e

β -caroteno em humanos reduziu significativamente o β -caroteno no plasma quando comparada à ingestão do β -caroteno isoladamente (van den Berg e van Vliet, 1998).

Tyssandier *et al.* (2002) relataram que a absorção do licopeno, β -caroteno e luteína de um vegetal é maior quando o alimento é administrado sozinho do que quando é coadministrado com outro alimento rico em carotenóides ou com o carotenóide puro.

Estado nutricional e doenças

Em 1961, Olson foi o primeiro a reportar que injeções de vitamina A juntamente com β -caroteno no intestino de ratos, inibem a formação de éster de retinila. Desde então, estudos com animais têm demonstrado que a bioconversão de β -caroteno em vitamina A diminui com o aumento da ingestão desta vitamina (Dua *et al.*, 1966; Villard e Bates, 1986; van Vliet *et al.*, 1996).

Algumas doenças afetam a biodisponibilidade dos carotenóides. Colestase, insuficiência pancreática, cirrose biliar, fibrose cística e outras síndromes responsáveis pela má absorção das gorduras, diminuem a biodisponibilidade dos carotenóides e podem induzir a deficiência de vitamina A, especialmente em crianças (Olson, 1999). O parasitismo intestinal também pode prejudicar a absorção e utilização de carotenóides (Jalal, 1998).

As mudanças fisiológicas gastrointestinais que ocorrem com o decorrer da idade também afetam o processo de digestão e absorção dos carotenóides. Gastrites causam diminuição da acidez estomacal, o que pode afetar a absorção já que esta é pH dependente (Russel, 2001). O pH do lúmen estomacal pode afetar a carga da

superfície das partículas micelares e das membranas das células desta região, menos resistentes a pHs baixos (Hollander, 1981).

FERRAMENTAS PARA INVESTIGAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE CAROTENÓIDES EM ALIMENTOS

Faulks e Southon (2005) citaram os quatro principais desafios para entender e determinar a biodisponibilidade dos carotenóides: a) a liberação dos carotenóides do alimento e sua transformação em uma forma potencialmente absorvível (bioacessibilidade), b) a passagem dos carotenóides para o lúmen do intestino delgado (absorção), c) a medição e a interpretação da resposta plasmática e d) a interpretação das diferenças entre indivíduos.

Métodos de determinação *in vivo*

Vários métodos têm sido utilizados para estudar a biodisponibilidade dos carotenóides de fontes alimentares ou suplementos em humanos. A ferramenta mais tradicional, e não invasiva, utilizada para realizar estudos *in vivo* com humanos é através do balanço metabólico, ou seja, estima-se a quantidade de carotenóides absorvida pela diferença entre a quantidade ingerida e a quantidade excretada nas fezes (Bowen *et al.*, 1993; van Lieshout *et al.*, 2003). Segundo Leo *et al.* (1995), a excreção fecal representa a principal rota de eliminação dos carotenóides pelo corpo, portanto sua absorção pode ser estimada pelo monitoramento de sua ingestão e excreção. Estudos de balanço metabólico têm sido realizados através da coleta das fezes (Bowen *et al.*, 1993; van Lieshout *et al.*, 2003), do efluente

intestinal de pessoas ileostomizadas (Faulkus *et al.*, 1997; Livny *et al.*, 2003) e lavagens gastrointestinais (Bowen *et al.*, 1993).

De acordo com Failla e Chitchumroonchokchai (2005), os estudos de balanço são limitados, na medida em que o material coletado contém, além dos carotenóides que não foram transferidos da matriz alimentar para as células absorptivas da mucosa intestinal, aqueles que foram absorvidos e subsequentemente retornaram ao lúmen gastrointestinal com secreções biliares e pancreáticas retro-transportadas através da superfície apical da mucosa epitelial.

Outro método utilizado para estimar a biodisponibilidade dos carotenóides em humanos é a resposta plasmática (Peng, *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1999; van het Hof *et al.*, 1999; van den Berg *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2005), que consiste em monitorar a concentração dos carotenóides no plasma após a ingestão de alimentos ou suplementos por um período de dias ou semanas. Alguns cuidados devem ser tomados na interpretação dos resultados de biodisponibilidade dos carotenóides no plasma: a resposta plasmática a uma dose oral única de carotenóides é altamente variável; a quantidade do carotenóide no plasma depende não só da quantidade ingerida, mas também da eficiência da absorção intestinal, e consequente liberação aos tecidos para o plasma e de sua taxa catabólica; altas concentrações de carotenóides endógenos podem estar presentes no plasma sanguíneo (Yeum e Russel, 2002).

Uma maneira de sanar algumas incertezas do método de biodisponibilidade da resposta plasmática é a utilização de métodos de resposta nas frações de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (TRL) (van Vliet *et al.*, 1995; Tassi e Amaya-

Farfan, 2008) ou nos quilomícrons (Borel, *et al.*, 1996; Faulks *et al.*, 2004). O método consiste em traçar o perfil de concentração do carotenóide ao longo do tempo, ou seja, monitorar seu aumento e declínio após administração de uma dose única ou alimento teste contendo os carotenóides de interesse (van Vleit *et al.*, 1995). Os carotenóides absorvidos são mais facilmente detectados nas frações de TRL e quilomícrons do que no plasma porque estas frações são menores e isentas de carotenóides em voluntários em jejum e não contêm carotenóides retirados e re-exportados pelo fígado (Faulks e Southon, 2005).

Isótopos radioativos e estáveis também têm sido largamente empregados nos estudos de metabolismo de nutrientes em humanos e animais (Kurilich *et al.*, 2003; Lienau *et al.*, 2003). O método se baseia na utilização de alimentos contendo isótopos marcados intrínseca ou extrinsecamente e permite que haja o monitoramento do nutriente ou de seus metabólitos por todo o corpo durante o processo de digestão, absorção e utilização do nutriente. Concomitantemente, pode-se obter informações sobre sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Jackson, 1997). Assim, esse método é considerado o mais completo pela variedade de informações que possibilita. Muitos autores utilizaram espectrometria de massas para examinar a absorção e excreção de traços isotópicos de ^{14}C - β -caroteno em humanos (Dueker *et al.*, 2002; Lemke *et al.*, 2003; Burri e Clifford, 2004) e Yao *et al.* (2000) examinaram a absorção do isótopo ^{13}C -luteína purificado em humanos.

Modelos de investigação da biodisponibilidade com animais também são utilizados. A vantagem em relação à utilização de humanos é que no caso de animais, torna-se possível, por exemplo, induzir deficiências nutricionais, doenças

crônicas ou agudas, utilizar isótopos radioativos e coletar tecidos de interesse para análise (Failla e Chitchumroonchokchai, 2005). Entretanto, nenhum modelo animal imita fielmente a absorção e o metabolismo dos carotenóides nos seres humanos (Boileau, *et al.*, 1999), mesmo com estudos de seleção de animais que metabolizam estes compostos de forma mais semelhante aos humanos. Por exemplo, a bioconversão do β -caroteno para vitamina A no intestino de ratos e camundongos é muito mais eficiente do que nos seres humanos, por isso, estes animais não são apropriados para investigar a biodisponibilidade de carotenóides pró-vitamínicos A em humanos (Lee *et al.*, 1999).

Furões, gerbilos e novilhos, assim como os humanos, absorvem uma porção de carotenóides pró-vitamínicos A e produzem ésteres de retinila em suas células absorptivas da mucosa intestinal. Estudos em furões mostraram que o β -caroteno do suco de cenoura é mais biodisponível que o da cenoura intacta (White *et al.*, 1993), que o 13-*cis*- β -caroteno é menos biodisponível que todo-*trans*- β -caroteno (Erdman *et al.*, 1998) e que a absorção do β -caroteno é antagonizada pela cantaxantina (White *et al.*, 1993). Gerbilos também absorveram mais o todo-*trans*- β -caroteno do que seus isômeros *cis*, e a biodisponibilidade do β -caroteno foi menor quando os gerbilos foram alimentados com dietas pobres em gordura ou ricas em pectina (Deming *et al.*, 2000; Deming *et al.*, 2002). Estes efeitos dos componentes da dieta, como as fibras e gorduras, e a diferença de absorção dos isômeros β -caroteno são similares aos reportados em humanos e demonstram a utilidade de furões e gerbilos para a avaliação da biodisponibilidade de carotenóides pró-vitamínicos A.

Métodos de determinação *in vitro*

Apesar de necessários, os estudos de determinação da biodisponibilidade dos carotenóides *in vivo* com humanos despendem de um grande trabalho laboratorial, consomem muito tempo, são caros, geram resultados de difícil interpretação, e limitam a sua utilização para poucas amostras de alimentos. Modelos *in vitro* constituem uma ferramenta eficaz e prática para a avaliação preliminar da biodisponibilidade de um grande número de amostras e dos vários fatores que a influenciam. Por isso, modelos *in vitro* têm sido utilizados para investigar o efeito da matriz alimentar, do tipo de carotenóide, do processamento de componentes dietéticos na bioacessibilidade, e estudar a estabilidade dos carotenóides ao longo do processo digestivo e a biodisponibilidade, através do transporte destes compostos para células do intestino delgado (Failla e Chitchumroonchokchai, 2005). Esses métodos são menos onerosos e mais rápidos que os métodos de determinação *in vivo*.

Garrett *et al.* (1999) foram os primeiros a propor um modelo *in vitro* para avaliar a biodisponibilidade dos carotenóides, baseados em um método de determinação da disponibilidade de ferro em alimentos descrito por Miller *et al.* (1981). O método baseia-se na simulação da digestão gástrica e intestinal acoplado a células diferenciadas Caco-2 que assumem o papel das células absortivas da mucosa intestinal. Caco2 é uma linhagem de células originárias de adenocarcinomas do cólon humano que exibem algumas características morfológicas e funcionais

similares às das células epiteliais diferenciadas da mucosa intestinal (Sambruy *et al.*, 2001).

Para avaliar a estabilidade dos carotenóides durante a digestão, determina-se a sua concentração na digesta. Para avaliar a bioacessibilidade ou micelarização, determina-se a concentração de carotenóides na fração aquosa, após centrifugação, que corresponde à fração que contém as micelas. E para avaliar a biodisponibilidade, além da bioacessibilidade, determina-se a concentração de carotenóides nas células Caco-2. Algumas características das células diferenciadas Caco-2 diferem das células absorptivas da mucosa intestinal, porém elas exibem características morfológicas e funcionais muito semelhantes.

O método de Garrett *et al.* (1999) tem sido modificado ao longo dos anos para tentar reproduzir melhor as condições fisiológicas. Algumas das modificações propostas foram: inclusão de uma fase oral anterior à fase gástrica (Thakkar *et al.*, 2007), adição de lipase (Ferruzzi, *et al.*, 2001) e colesterol esterase (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2006) na fase intestinal, aumento da concentração de sais biliares, modificações no pH (Reboul *et al.*, 2006) e substituição da ultracentrifugação para isolamento da fração micelar pela centrifugação em alta velocidade (Thakkar *et al.*, 2007).

Outros métodos *in vitro* com o mesmo princípio que o de Garrett *et al.* (1999) foram desenvolvidos por Hedrén *et al.* (2002b) e Liu *et al.* (2004).

É importante salientar que esses modelos relativamente simples são “estáticos”, não sendo influenciados por muitos fatores que podem afetar os processos de digestão e absorção *in vivo*. Estes fatores incluem: mistura da matriz alimentar e seu

trânsito ao longo do aparelho digestório; alterações no conteúdo luminal de enzimas digestivas e sais biliares em resposta à quantidade e composição do alimento ingerido; e influência de fatores humorais secretados pelas células presentes na lâmina própria e tecidos periféricos no transporte e metabolismo de vários compostos pelos enterócitos (Failla e Chitchumroonchokchai, 2005). Um método dinâmico de determinação de bioacessibilidade de carotenóides *in vitro* também tem sido utilizado (Minekus *et al.*, 2001; Blanquet-Diot *et al.*, 2009), porém, a simulação da digestão é controlada por um sistema computacional caro e requer informações sobre o efeito da composição do alimento, do pH gástrico, da velocidade de trânsito do alimento no trato gastrointestinal e concentrações de bile e enzimas digestivas para programar o sistema de forma que ele imite corretamente o meio luminal após a ingestão de um alimento. Além disso, estes fatores dinâmicos variam largamente entre indivíduos humanos.

Nas Tabelas 1 e 2 estão as porcentagens de micelarização (bioacessibilidade) dos carotenóides de inúmeros alimentos analisados isoladamente ou misturados com outros alimentos, através de métodos *in vitro* estáticos.

Pode-se observar que a etapa de preparo da amostra varia muito. Alguns autores utilizam amostras *in natura*, outros, amostras secas e outros utilizaram amostras liofilizadas. A etapa de homogeneização nem sempre foi especificada e a porcentagem de micelarização também variou muito entre os métodos.

De acordo com Rodriguez-Amaya (2010), as marcantes variações entre a bioacessibilidade obtida por diferentes laboratórios, mostraram a necessidade de estudos interlaboratoriais com consequente padronização dos métodos. Os

laboratórios tentaram aproximar o máximo possível as condições de análise às condições de micelarização e absorção em humanos. Não houve, porém, nenhuma preocupação em padronizar o preparo do alimento teste. É necessário também demonstrar a confiabilidade dos métodos utilizados para determinar os carotenóides do material teste, da micela e dos carotenóides absorvidos pelas células Caco-2.

Comparação entre os resultados obtidos por métodos *in vitro* e *in vivo*

Embora haja algumas inconsistências, os resultados dos estudos *in vitro*, em geral, concordam com aqueles encontrados em experimentos *in vivo*, indicando que métodos *in vitro* são válidos.

A influência positiva da destruição da matriz na biodisponibilidade de carotenóides, bastante estudada por métodos *in vivo* (Stahl e Sies, 1992; Gärtner *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998; van het Hof *et al.*, 1999; Livny *et al.*, 2003; Tyssandier *et al.* 2002), foram também demonstradas a partir de experimentos *in vitro*. No caso da cenoura, por exemplo, vários estudos de bioacessibilidade foram feitos (Tabela 1). O processamento térmico aumentou a bioacessibilidade do β -caroteno de 3% para 27% em um dos estudos (Hedrén, *et al.* 2002b) e de 29% para 52% em outro (Hornero-Méndez e Minguez-Mosquera, 2007). Veda *et al.* (2006) reportaram 20,3%, 24,2% e 32,9% de bioacessibilidade do *todo-trans*- β -caroteno de cenoura crua, cozida sob pressão e cozida no vapor, respectivamente. Aherne *et al.* (2010), obtiveram maior assimilação micelar após tratamento térmico não só do *todo-trans*- β -caroteno, mas também de seus isômeros, 13- e 15-*cis*- β -caroteno.

Para o tomate, Ryan *et al.* (2008) obteve porcentagens de micelarização até 8 vezes maiores para o β -caroteno do tomate após processamento térmico. A bioacessibilidade do licopeno aumentou de 4,8% para 7,6%. Reboul, *et al.* (2006), analisando também o tomate, percebeu um aumento da bioacessibilidade do licopeno de 0,1% para 1,6% após processamento térmico. Este mesmo autor reportou aumento significativo do β -caroteno e da luteína do espinafre após processamento.

Outro fator que influencia positivamente na absorção dos carotenóides é a presença de lipídeos (Hu *et al.* 2000; Roodenburg *et al.*, 2000; Borel *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004; Unlu *et al.*, 2005). Em estudos *in vitro*, o óleo de amendoim aumentou a bioacessibilidade da luteína e do β -caroteno em folhas de moranga e o óleo de oliva teve uma grande influência no aumento da micelarização dos carotenóides da cenoura (Hornero-Mendez e Minguez-Mosquera, 2007). Vegetais folhosos cozidos com óleo tiveram de 2 a 5 vezes mais β -caroteno bioacessível que vegetais cozidos sem óleo (Mulokozi *et al.*, 2004).

Estudos *in vivo* também têm demonstrado que as xantofilas são mais biodisponíveis que os carotenos (Castenmiller *et al.*, 1999; Gärtner *et al.*, 1996; van het Hof *et al.*, 1999), o que foi também indicado por alguns estudos *in vitro* (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2004; Pullakhandan e Failla, 2007; Garrett *et al.*, 2000; Reboul *et al.*, 2006; O'Connell *et al.*, 2007).

O licopeno pareceu ser pouco bioacessível em ensaios *in vitro* (Tabelas 1 e 2) (Garrett *et al.*, 1999; Garrett *et al.*, 2000; Reboul *et al.*, 2006; Huo *et al.*, 2007; Failla *et al.*, 2008) assim como nos estudos em humanos (Boileau *et al.*, 1999;

Tyssandier *et al.*, 2002). Failla *et al.* (2008) indicou que o *cis*-licopeno foi mais bioacessível que o *trans*, concordando com o fato do isômero *cis* do licopeno ser a forma predominante no sangue e nos tecidos humanos (Stahl e Sies, 1992; Clinton *et al.* 1996; Boileau *et al.*, 2002; Richelle *et al.*, 2002).

De maneira mais direta, Reboul *et al.* (2006), após modificações propostas aos métodos de Garrett *et al.* (1999) de fato, demonstrou boa correlação entre a bioacessibilidade obtida por modelos *in vitro* e os dados de biodisponibilidade determinada em humanos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biodisponibilidade é complexa, influenciada por muitos fatores, e, portanto difícil de analisar. Métodos *in vivo* e *in vitro* para determinação da biodisponibilidade de carotenóides foram desenvolvidos, ambos com as suas vantagens e limitações. A determinação da biodisponibilidade *in vivo* com humanos é o procedimento ideal, porém os métodos são caros, trabalhosos e complexos, sendo possível a análise de poucas amostras. Métodos de determinação *in vitro*, menos onerosos e mais simples, podem ser utilizados para a avaliação inicial de um grande número de amostras.

Tabelas

Tabela 1. Bioacessibilidade (%) de carotenóides em alimentos

Amostra	Preparo da amostra	Método	Carotenóides					Ref
			α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	luteína	licopeno	
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>), fresca ou enlatada (NE)	Homogeneizado em liquidificador por 1 min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a		96	50			7
Abóbora (<i>Curcubita moschata</i>), crua	N.E	Garrett et al. 1999		16,3				16
Abóbora cozida na pressão	N.E	Garrett et al. 1999		15,3				16
Abóbora, frita (contato)	N.E	Garrett et al. 1999		24,9				16
Abóbora, cozida	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., liofilizado	Hedrán, et al. 2002a		10				9
Abóbora, cozida + óleo de girassol	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., liofilizado	Hedrán, et al. 2002a		64				9
Abóbora, cozida + óleo de dendê	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., liofilizado.	Hedrán, et al. 2002a	88	81				9
Abóbora, cozida	Branqueado, cozido exposto à luz por 20-30 min.	Hedrán, et al. 2002a		9,0				10
Abóbora, cozida	Branqueado, picado, cozido sem exposição à luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		10				10
Abóbora, cozida + óleo	Branqueado, picado, cozido sem exposição à luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		39				10
Abóbora	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	6,7	1,3				13
Abobrinha (<i>Curcubita pepo</i>), crua	Picado	Garrett et al. 1999		18	95,4	45,9	17	14
Abobrinha, cozida na água	Picado e cozido por 10 min.	Garrett et al. 1999		79	84,1	60,6		14

Abobrinha, grelhada	Picado e grelhado por 10 min.	Garrett et al. 1999		67,6		27,8	50,4	14
Abobrinha, cozida no microondas	Picado e cozido por 10 min.	Garrett et al. 1999		56,6		50,2	49,9	14
Abobrinha, cozida no vapor	Picado e cozido por 10 min.	Garrett et al. 1999		56,9	77	57	3,9	14
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a		52		14		7
Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>), cozida	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., liofilizado.	Hedrán, et al. 2002a		9,0				9
Batata doce, cozida + óleo de girassol	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., liofilizado.	Hedrán, et al. 2002a		39				9
Batata doce, cozida + óleo de dendê	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., liofilizado.	Hedrán, et al. 2002a	90	61				9
Batata doce, cozida	Branqueado, cozido exposto à luz por 20-30 min.	Hedrán, et al. 2002a	5,0					10
Batata doce, cozida	Branqueado, picado, cozido sem exposição à luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		4,0				10
Batata doce, cozida + 45 % de óleo	Branqueado, picado, cozido sem exposição à luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		21				10
Batata doce	N.E	Garrett et al. 1999		45		97		11
Brócolis (<i>Brassica oleracea</i>)	Homogeneizado em liquidificador por 15 seg. (máximo 4 vezes).	Granado-Lorencio, et al. 2007a		17		27		6
Brócolis, cozido	Cozido em microondas por 5 min., homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a		18		10		5
Brócolis, cozido ou enlatado (NE)	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a		17		6		7
Brócolis	N.E	Garrett et al. 1999		54		38		11

Caruru (<i>Amaranthus</i> <i>ssp</i>), cozido	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., lioofilizado	Hedrán, et al. 2002a		18		9
Caruru, cozido + óleo de girassol	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., lioofilizado	Hedrán, et al. 2002a		58		9
Caruru, cozido + óleo de dendê	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min., lioofilizado	Hedrán, et al. 2002a	86	68		9
Caruru, cozido	Branqueado, cozido exposto à luz por 20-30 min.	Hedrán, et al. 2002a		6,0		10
Caruru, cozido	Branqueado, cortado em pedaços, cozido sem exposição à luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		9,0		10
Caruru, cozido + óleo	Branqueado, cortado em pedaços, cozido sem exposição à luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		18		10
Cenoura (<i>Daucus carota</i>), crua	N.E	Garrett et al. 1999		20,3		16
Cenoura, crua	Picadas, congeladas, lioofilizadas, cortadas em pedaços menores.	Hedrán, et al. 2002a	3,0	3,0		8
Cenoura, crua	Picadas, congeladas, lioofilizadas, moídas finamente.	Hedrán, et al. 2002a	23	21		8
Cenoura, crua	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	1,6	2,6	44	13
Cenoura, cozida	Picadas, cozidas por 20 min, liofilizadas, picados menores.	Hedrán, et al. 2002a	11	6,0		8
Cenoura, cozida	Picadas, cozidas por 20 min, congeladas, lioofilizadas, moídas finamente.	Hedrán, et al. 2002a	40	27		8
Cenoura cozida na pressão	N.E	Garrett et al. 1999		24,2		16
Cenoura, frita (contato)	N.E	Garrett et al. 1999		32,9		16
Cenoura, cozida + 40% óleo	Picadas, cozidas por 20 min, liofilizadas, cortadas em pedaços menores.	Hedrán, et al. 2002a	8,5	8		8

Cenoura, cozida + 40% óleo	Picadas, cozidas por 20 min, congeladas, liofilizadas, moídas finamente.	Hedrán, et al. 2002a	48	42		8
Cenoura, crua + 40% óleo	Picadas, congeladas, liofilizadas, cortadas em pedaços menores.	Hedrán, et al. 2002a	6	4		8
Cenoura, crua + 40% óleo	Picadas, congeladas, liofilizadas, moídas finamente.	Hedrán, et al. 2002a	34	31		8
Cenoura, cozida ou enlatado (NE)	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a	72	75	33	7
Cenoura, enlatada	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	3,4	2,7	54	10
Cenoura, suco	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	15	14		13
Cenoura, purê	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	8,9	4,4		13
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006			59	13
Espinafre (<i>Spinacia oleracea</i>), cozido	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006		17	48	13
Espinafre, folhas	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006		2,4	38	13
Espinafre, picado	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006		5,2	48	13
Espinafre, purê + óleo de milho	-	Garrett et al. 1999 c/ modificações		30	26	4
Espinafre, purê + óleo de milho	Acidificado com ácido acético e aquecido por 20 min a 100°C.	Garrett et al. 1999 c/ modificações		28	25	4
Espinafre, purê + óleo de milho	Adicionado ZnCl ₂ e aquecido por 20 min a 100°C.	Garrett et al. 1999 c/ modificações		5,0	25	4
Espinafre, purê + óleo de oliva + óleo de milho	Cozido em microondas por 3 min., homogeneizado em liquidificador por 4 minutos.	Garrett et al. 1999 c/ modificações		$\simeq 26$ (<i>todo-E</i>) $\simeq 28$ (<i>Z</i>)	$\simeq 55$ (<i>todo-E</i>) $\simeq 38$ (<i>Z</i>)	1

Espinafre	N.E	Garrett et al. 1999		30		19		11
Espinafre, cozido ou enlatado (NE).	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a		26		4,6		7
Feijão caupi (<i>Vigna ssp</i>), cozido	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min. e liofilizado.	Hedrán, et al. 2002a		29				9
Feijão caupi, cozido + óleo de girassol	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min. e liofilizado.	Hedrán, et al. 2002a		94				9
Feijão caupi , cozido+ óleo de dendê	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min. e liofilizado.	Hedrán, et al. 2002a	94	83				9
Feijão caupi , cozido	Branqueado, cozido exposto à luz por 20-30 min.	Hedrán, et al. 2002a		6,0				10
Feijão caupi, cozido	Branqueado, cortado em pequenos pedaços, cozido não exposto a luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		9,0				10
Feijão caupi , cozido+ óleo	Branqueado, cortado em pequenos pedaços, cozido não exposto a luz por 10-15 min.	Hedrán, et al. 2002a		38				10
<i>Gac fruit</i> (<i>momordica cochinchinensis</i>), polpa	Amostra congelada de <i>gac fruit</i> foi moída, misturada com arroz cozido e levada ao vapor por 20 min.	Garrett et al. 1999	41	30 (<i>todo-E</i>) 41(Z)			34 (<i>todo-E</i>) 45(Z)	3
<i>Gac fruit</i> (<i>momordica cochinchinensis</i>), óleo	O óleo de <i>gac fruit</i> foi misturado com arroz cozido e levado ao vapor por 20	Garrett et al. 1999	43	2,1 ± 1,2 (<i>todo-E</i>) 25 ± 1 (Z)			11 ± 2 (<i>todo-E</i>) 28 ± 2 (Z)	3
Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a		55		62		7
Kiwi	N.E	Garrett et al. 1999		47	77	109	TR	11
Laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Homogeneizado em liquidificador por 15 seg. (máximo 4 vezes).	Granado-Lorencio, et al. 2007a			45	26		7
Laranja 'Shamouti', suco	-	Reboul et al. 2006		26	16			2
Laranja	N.E	Garrett et al, 1999		34	98	102	100	11

Limão (<i>Citrus reticulata</i>) 'Meyer', suco	-	Reboul et al. 2006	30	40		2
Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>), cozida	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min. e liofilizado	Hedrán, et al. 2002a	8,0			9
Mandioca , cozida + óleo de girassol	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min. e liofilizado	Hedrán, et al. 2002a	47			9
Mandioca, cozida + óleo de dendê	Branqueado, seco ao sol, cozido por 15 min. e liofilizado	Hedrán, et al. 2002a	56	51		9
Mandioca 'Crantz', cozida	As amostras foram descascadas, cortadas em cubos, e emergidas em água deionizada por 10 h. Foram cozidas em água por 30 min.	Garrett et al. 1999 c/ modificações	30			15
Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>)	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	<0,1		49	0,4
Melão (<i>Cucumis Melo</i>)	N.E	Garrett et al. 1999	TR	TR	100	11
Milho doce (<i>Zea mays</i>), cozido ou enlatado (NE)	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a			59	7
Moringa (<i>Moringa oleifera</i>),	As folhas foram trituradas e homogeneizadas com água em liquidificador até consistência de purê.	Garrett et al., 1999	7			30
Moringa + 5% óleo de amendoim	As folhas foram trituradas e homogeneizadas com água em liquidificador até consistência de purê.	Garrett et al., 1999	25			55
Moringa	As folhas foram trituradas e liofilizadas.	Garrett et al., 1999	3,6			32
Moringa + 5% óleo de amendoim	As folhas foram trituradas e liofilizadas.	Garrett et al., 1999	30			51
Nêspera (<i>Eriobotrya japonica</i>)	Homogeneizado em liquidificador por 15 seg. (máximo 4 vezes).	Granado-Lorencio, et al. 2007a		32		7
Pimentão vermelho (<i>Capsicum anuum</i>), cozido ou enlatado (NE)	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a	70	98	67	7

Pimentão vermelho	N.E	Garrett et al. 1999		21	30	98		11
Pomelo (<i>Citrus paradisi</i>)	N.E	Garrett et al. 1999		2,1	104	104	4,9	11
Tangerina (<i>Citrus deliciosa</i>) 'Willowleaf', suco	-	Reboul et al. 2006		31	18			2
Tangerina 'Hansen', suco	-	Reboul et al. 2006		33	22			2
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>), cru	Homogeneizado em liquidificador por 1min.	Granado-Lorencio, et al. 2007a		100		91	79	7
Tomate, cru	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	17	<0,1		52	0,1	13
Tomate, cru	Picado	Garrett et al. 1999		6,1	97	83	4,8	14
Tomate, processado	Misturado com purê de batatas, carne picada frita e óleo de oliva.	Reboul et al. 2006	2,4	6,0		57	1,6	13
Tomate, cozido na água	Picado e cozido por 10 minutos	Garrett et al. 1999		47	90	85	4,9	14
Tomate, grelhado	Picado e grelhado por 10 minutos.	Garrett et al. 1999		46	0	61	7,6	14
Tomate, cozido no microondas	Picado e cozido por 10 minutos	Garrett et al. 1999		39	0	37	5	14
Tomate, cozido no vapor	Picado e cozido por 10 minutos	Garrett et al. 1999		29	106	51	1,7	14

NE – não especificado; TR-traços.

¹Chitchumroonchokchai *et al.*, 2004; ²Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; ³Failla *et al.*, 2008; ⁴Feruzzi *et al.*, 2001; ⁵Granado *et al.*, 2006; ⁶Granado-Laurencio *et al.*, 2007a; ⁷Granado-Laurencio *et al.*, 2007b; ⁸Hedré *et al.*, 2002^a; ⁹Hedré *et al.*, 2002^b; ¹⁰Mulokozi, *et al.*, 2004; ¹¹O'Connell *et al.*, 2007; ¹²Pullakhandam & Failla, 2007; Veda *et al.*, 2006; ¹³Reboul *et al.*, 2006; ¹⁴Ryan *et al.*, 2008; ¹⁵Thakkar, *et al.*, 2007; ¹⁶Veda *et al.*, 2006

Tabela 2. Bioacessibilidade (%) de carotenóides em alimentos misturados

Amostra	Preparo da amostra	Método	Carotenóides					Ref
			α -caroteno	β -caroteno	β -criptoxantina	luteína	licopeno	
Espinafre + cenoura + pasta de tomate	Picados, fritos em óleo por 4 min. e homogeneizados em liquidificador por 2 min. com solução salina.	Garrett <i>et al.</i> , 1999	15	16		29	3,2	18
Espinafre, purê+ pasta de tomate + cenoura + frango	Misturado em homogeneizador por 30 seg. e aquecido em microondas por 25 seg.	Garrett <i>et al.</i> , 1999	16	16		26	< 0,5	17
Espinafre + tomate, cenoura, + alface romana + pimentão amarelo.	Homogeneizados em “mixer” até a consistência de purê.	Garrett <i>et al.</i> , 1999 c/ modificações	1,9	3,2			1,0	19
Espinafre + tomate + cenoura + alface romana + pimentão amarelo + 1% óleo de canola	Homogeneizados em “mixer” até a consistência de purê.	Garrett <i>et al.</i> , 1999 c/ modificações	20	25			5,6	19
Espinafre + tomate + cenoura + alface romana + pimentão amarelo + 2,5% óleo de canola	Homogeneizados em “mixer” até a consistência de purê.	Garrett <i>et al.</i> , 1999 c/ modificações	13	14			4,8	19
Espinafre + tomate + cenoura + alface romana + pimentão amarelo + 1% óleo de côco	Homogeneizados em “mixer” até a consistência de purê.	Garrett <i>et al.</i> , 1999	5	6			2	19
Espinafre + tomate + cenoura + alface romana + pimentão amarelo + 2,5% óleo de côco	Homogeneizados em “mixer” até a consistência de purê.	Garrett <i>et al.</i> , 1999	18	24			6	19
Espinafre + tomate + cenoura + alface romana + pimentão amarelo + 2,5% óleo de cártamo.	Homogeneizados em “mixer” até a consistência de purê.	Garrett <i>et al.</i> , 1999	17	18			4,5	19

¹⁷Garrett *et al.*, 1999; ¹⁸Garrett *et al.*, 2000; ¹⁹Huo *et al.*, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aherne SA, Daly T, Jiwan MA, O'Sullivan L, O'Brien NM. Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. *Food Res Intern* 43: 1449-1454 (2010).
- Ben-Amotz A, Levy Y. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-*trans*-beta-carotene in human serum. *Am J Clin Nutr* 63: 729-734 (1996).
- Blanquet-Diot S, Soufi M, Rambeau M, Rock E, Alric M. Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system. *J Nutr* 139:876-883 (2009).
- Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66: 606-630 (2006).
- Böhm V e Bitsch R. Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status, and the antioxidant capacity of human plasma. *Eur J Nutr* 38: 118-125 (1999).
- Boileau AC, Merchen NR, Wasson K, Atkinson CA, Erdman JW, Jr. Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J Nutr* 129: 1176-81 (1999).

- Boileau TW, Boileau AC, Erdman JW Jr. Bioavailability of all-*trans* and *cis*-isomers of lycopene. *Exp Biol Med* 227: 914–919 (2002).
- Borel P, Grolier P, Armand M, Partier A, Lafont H, Lairon D, Azais-Braesco V. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *J Lipid Res* 37:250-261 (1996).
- Borel P, Tyssandier V, Mekki N, Grolier P, Rochette Y, Alexandre-Gouabau MC, Lairon D, Azais-Braesco V. Chylomicron β -carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest β -carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *J Nutr* 128:1361–1367 (1998).
- Borel P. Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin Chem Lab Med* 41: 979–994 (2003).
- Bowen PE, Mobarhan S, Smith JC Jr. Carotenoid absorption in humans. *Methods Enzymol* 214: 3–17 (1993).
- Breithaupt D, Bamedi A, Wirt U. Carotenol fatty esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comp Biochem Physiol* 132B: 721–728 (2002).
- Brown MJ, Ferruzzi MG, Nguyen ML, Cooper DA, Eldridge AL, Schwartz SJ, White WS. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr* 80: 396-403 (2004).

- Burri BJ, Clifford AJ. Carotenoid and retinoid metabolism: insights from isotope studies. *Arch Biochem Biophys* 430:110–119 (2004).
- Castenmiller JJM e West CE. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Rev Nutr* 18: 19-38 (1998).
- Castenmiller JJM, West CE, Linssen JPH, van het Hof KH e Voragen AGJ, The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129: 349-355 (1999).
- Chitchumroonchokchai C, Failla ML. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 136: 588-94 (2006).
- Chitchumroonchokchai C, Schwartz SJ, e Failla ML. Assessment of lutein bioavailability from meals and supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 134: 2280-2286 (2004).
- Clinton S K, Emenhiser C, Schwartz SJ, Bostwick D G, Williams A W, Moore BJ, Erdman JW. Lycopene stereoisomers, carotenoids and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 5: 823-833
- Cooper DA, Webb DR, Peters JC. Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr* 127:1699S–1709S (1997).

Deming DM, Boileau AC, Lee CM, Erdman JW Jr. Amount of dietary fat and type of soluble fiber independently modulate postabsorptive conversion of β -carotene to vitamin A in Mongolian Gerbils. *J Nutr* 130: 2789–2796 (2000).

Deming DM, Teixeira SR, Erdman JW Jr. All-*trans*- β -carotene appears to be more bioavailable than 9-*cis* or 13-*cis*- β -carotene in gerbils given single oral doses of each isomer. *J Nutr* 132: 2700–2708 (2002).

Dhuique-Mayer C, Borel P, Reboul E, Caporiccio B, Besançon P, Amiot MJ, Beta-cryptoxanthin from Citrus juices: assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Brit J Nut* 97:883-890 (2007).

Dua PN, Day EJ, Tipton HC, Hill JE. Influence of dietary vitamin A on carotenoid utilization, nitrogen retention and energy utilization by the chick. *J Nutr* 90:117-122 (1996).

Dueker SL, Lin Y, Buchholz PD, Schneider PD, Lame MW, Segall HJ, Vogel JS, Clifford AJ. Long-term kinetic study of α -carotene, using accelerator mass spectrometry in an adult volunteer. *J Lipid Res* 41:1790–1800 (2002).

During A, Hussain MM, Morel DW, Harrison EH. Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: beta-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions *J Lipid Res* 43:1086-1095 (2002).

Erdman JW Jr, Thatcher AJ, Hofmann NE, Lederman JD, Block SS, Lee CM, Mokady S. All-*trans* β -carotene is absorbed preferentially to 9-*cis*- β -carotene, but the

latter accumulated in the tissues of domestic ferrets (*Mustela putorius puro*). *J Nutr* 128: 2009–2013 (1998).

Erdman JW, Fahey GC, White CB. Effects of purified dietary fiber sources on β -carotene utilization by the chick. *J Nutr* 116:2415-2423 (1986).

Failla ML, Chitchumroonchokchai C, Ishida B. In vitro micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. *J Nutr* 138: 482-486 (2008).

Failla, ML and Chitchumroonchokchai C. *In vitro* models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. HarvestPlus Technical Monograph Series 3. p.32 (2005).

Faulks RM e Southon S. Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochim Biophys Acta* 1740: 95-100 (2005).

Faulks RM, Hart DJ, Brett GM, Dainty JR, Southon S. Kinetics of gastro-intestinal transit and carotenoid absorption and disposal in ileostomy volunteers fed spinach meals *Eur J Nutr* 43:15-22 (2004).

Faulks RM, Hart DJ, Wilson PDG, Scott JK, Southon S. Absorption of all-trans and 9-cis- β -carotene in human ileostomy volunteers. *Clin Sci* 93: 582–591 (1997).

Ferruzzi MG, Failla ML, Schwartz SJ. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an

in vitro digestion and Caco-2 human cell model. *J Agric Food Chem* 49: 2082-2089 (2001).

Garrett DA, Failla ML e Samara, RJ, Development of an in Vitro Digestion Method To Assess Carotenoid Bioavailability from Meals. *J Agric Food Chem* 47: 4301-4309 (1999).

Garrett DA, Failla ML e Sarama RJ. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture method. *J Nutr Biochem* 11, 574-580 (2000).

Gärtner C, Stahl W, Sies H, Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr* 66, 116–122 (1997).

Gärtner C, Stahl W, Sies H, Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to β -carotene in the human. *Int J Vitamin Nutr Res* 66, 119–125 (1996).

Gaziano JM, Johnson EJ, Russell RM, Manson JE, Stampfer MJ, Ridker P.M., Frei B, Hennekens CH, Krinsky NI. Discrimination in absorption or transfer of β -carotene isomers after oral supplementation with either all-*trans* or 9-*cis*- β -carotene. *Am J Clin Nutr* 61:1248–1252 (1995).

Granado F, Olmedilla B, Herrero C, Pérez-Sacristtán B, Blanco I, Blázquez S. Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: in vivo and in vitro assessment. *Exp Biol Med* 231: 1733-1738 (2006).

- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B, Blázquez-García S. In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chem* 102: 641–648 (2007a).
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Pérez-Sacristan B, Blanco-Navarro I, Blazquez-García S. Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *J Agric Food Chem* 55:6387-6394 (2007b).
- Hedré E, Diaz V, Svanberg U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *Eur J Clin Nutr* 56: 425–430 (2002a).
- Hedré E, Mulokozi G, Svanberg U. In vitro accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *Int J Food Sci Nutr* 53:445-453 (2002b).
- Hollander D, Intestinal absorption of vitamin A,E,D, and K. *J Lab Clin Med* 97: 449-462 (1981).
- Hollander D, Ruble PE. β -carotene absorption:bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 235: E686–E691 (1978).
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Inn Food Sci Emerg Technol* 8: 407-412 (2007).

- Hu X, Jandacek RJ, White WS. Intestinal absorption of β -carotene ingested with a meal rich in sunflower oil or beef tallow: postprandial appearance in triacylglycerol-rich lipoproteins in women. *Am J Clin Nutr* 71: 1170-1180 (2000).
- Huo T, Ferruzzi MG, Schwartz SJ, Failla ML. Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J Agric Food Chem* 55: 8950-8957 (2007).
- Jackson MJ. Assessment of the bioavailability of micronutrients. *Eur J Clin Nutr* 51:S1-S2 (1997).
- Jacobs PB, LeBoeuf RD, McCommas SA, Tauber JD. The cleavage of carotenoid esters by cholesterol esterase. *Comp Biochem Physiol* 72B: 157-160 (1982).
- Jalal F, Nesheim MC, Agus Z, Sanjur D, Habicht J-P. Serum retinol concentrations are affected by food sources of β -carotene, fat intake, and antihelminthic drug treatment. *Am J Clin Nutr* 68: 623–629 (1998).
- Khachik F, Beecher GR, Goli MB. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl Chem* 63:1871-1880 (1991).
- Kostic D, White WS, Olson JA. Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and β -carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr* 62: 604-610 (1995).

Krinsky NI, Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biol Med* 7: 617-635 (1989).

Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 26:459-516 (2005).

Kurilich AC, Britz SJ, Clevidence BA, Novotny Dura J. Isotopic labeling and lc-apci-ms quantification for investigating absorption of carotenoids and vitamin k1 from kale. *J Agr Food Chem* 51: 4877-4889 (2003).

Lee CM, Boileau AC, Boileau TW, Williams AW, Swanson KS, Heintz KA, Erdman JW Jr. Review of animal models in carotenoid research. *J Nutr* 129:2271–2277 (1999).

Lemke SL, Ducker SR, Follett JR, Lin Y, Carkeet C, Buchholz BA, Vogel JS, Clifford AJ. Absorption and retinol equivalence of β -carotene in humans is influenced by dietary vitamin A intake. *J Lipid Res* 44:1591–1600 (2003).

Leo MA, Ahmed S, Aleynik SI, Siegel JH, Kasmin F, Lieber CS. Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions. *J Hepatol* 23:550–556 (1995).

Lienau A, Glaser T, Tang G, Dolnikowski GG, Grusak MA, Albert K. Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS. *J Nutr Biochem* 14: 663-670 (2003).

- Liu C S, Glahn RP, Liu RH. Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. *Journal of Agric Food Chem* 52: 4330–4337 (2004).
- Livny O, Reifen R, Levy I, Madar Z, Faulks R, Southon S, Schwartz B, β -carotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. *Eur J Nutr* 42: 338-345 (2003).
- Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E, Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc* 93: 284-296 (1993).
- Micozzi MS, Brown ED, Edwards BK, Bieri JG, Taylor PR, Khachik F, Beecher GR, Smith JC Jr. Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and β -carotene supplements in men. *Am J Clin Nutr* 55: 1120–1125 (1992).
- Miller DD, Schricker RR, Rasmussen RR, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 34: 2248-2256 (1981).
- Minekus M, Lelieveld J, van den Berg HA. A dynamic model of the stomach and small intestine to study the bio-accessibility of carotenoids from vegetables and the effect of processing. In: Abstract Book of the Bioavailability Congress, Switzerland: Interlaken (2001).

- Mulokozi G, Hedren E, Svanberg U. In vitro accessibility and intake of β -carotene from cooked green leafy vegetables and their estimated contribution to vitamin A requirements. *Plant Foods Human Nutr* 59:1-9 (2004).
- O'Connell O, Ryan L., O'Brien NM. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutr Res* 27: 258-264 (2007).
- Olson JA, Carotenoids and human health. *Arch Latinoamer Nutr* 49: 7-11 (1999)
- Olson JA. The conversion of radioactive beta-carotene into vitamin A by the rat intestine in vivo. *J Biol Chem* 236: 349–356 (1961).
- Oomen, AG, Tompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Slips, AJAM. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants, *Arch Environ Contam Toxic* 44: 281–287 (2003).
- Paetau I, Chen HP, Goh NMY, White WS. Interactions in the postprandial appearance of β -carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol-rich lipoproteins in humans. *Am J Clin Nutr* 66: 1133-1143 (1997).
- Palozza P, Krinsky NI, Antioxidant effects of carotenoids *in vitro* and *in vivo*: an overview. *Methods Enzymol* 213: 403-420 (1992).
- Parker RS, Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Faseb J* 10: 542–551 (1996).

Parker RS, Carotenoids in blood and human tissue. *J Nutr* 199: 101–104 (1989).

Parker RS, Swanson JE, You CS, Edwards AJ, Huang T. Bioavailability of carotenoids in human subjects. *Proc Nutr Soc* 58: 155-162 (1999).

Peng YM, Peng YS, Lin Y, Moon T, Roe DJ, Ritenbaugh C. Concentrations and plasma-tissue-diet relationships of carotenoids, retinoids, and tocopherols in humans. *Nutr Cancer* 23: 233-46 (1995).

Pullakhandam R, Failla ML. Micellarization and intestinal cell uptake of beta-carotene and lutein from drumstick (*Moringa oleifera*) leaves. *J Med Food* 10: 252-257 (2007).

Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54: 8749-8755 (2006).

Reboul E, Thap S, Tourniaire F, André M, Juhel C, Morange S, Amiot MJ, Lairon D, Borel P. Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *Br J Nutr* 97: 440-446 (2007).

Richelle M, Enslin M, Hager C, Groux M, Tavazzi I, Godin J, Berger A, Metairon S, Quail S, Piquet-Welsch C, Sagalowicz L, Green H, Fay LB. Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of β -

- carotene and α -tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am J Clin Nutr* 80: 171–177 (2004).
- Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J Nutr* 129: 2170–2176 (1999).
- Rock CL, Lovaldo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW, Schwartz SJ. Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr* 128: 913-916 (1998).
- Rock CL, Swendseid ME. Plasma β -carotene response in human after meals supplemented with dietary pectin. *Am J Clin Nutr* 55: 96–99 (1992).
- Rodriguez-Amaya D, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfán J, Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Comp Anal* 21: 445-463 (2008).
- Rodriguez-Amaya DB, Os carotenóides como precursores de vitamina A. *Bol SBCTA*. 19: 227-242 (1985).
- Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, 64p (1999).
- Rodriguez-Amaya DB. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. *J Food Comp Anal: in press* (2010).

- Roodenburg AJC, Leenen R, van het Hof KH, Weststrate JA, Tijburg LBM, Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr* 71: 1187-1193 (2000).
- Russel RM, Factors in aging that effect the bioavailability of nutrients. *J Nutr* 131: 1355-1615 (2001).
- Ryan L, O'Connell O, O'Sullivan L, Aherne SA, O'Brien NM, Micellarization of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods Human Nutr* 63, 127–133 (2008).
- Sambruy Y, Ferruzza S, Ranaldi G, De Angelis I. Intestinal cell culture models. *Cell Biol Toxicol* 17:301–317 (2001).
- Scita G, Aponte GW, Wolf G. Uptake and cleavage of β -carotene by cultures of rat small intestinal cells and human lung fibroblasts. *J Nutr Biochem* 3: 118-123 (1992).
- Simpson KL, Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc Nutr Soc* 42: 7-17 (1983).
- Stahl W, Ale-Agha N, Polidori CM. Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem* 383: 553–558 (2002).

- Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr* 122: 2161-6 (1992).
- Tang GW, Qin J, Dolnikowski GG, Russell RM, Grusak MA. Spinach or carrots can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterated vegetables. *Am J Clin Nutr* 82: 821–828 (2005).
- Tapiero H, Townsend DM , Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 58: 100-110 (2004).
- Tassi EMM , Amaya-Farfan J, Carotenoid Uptake by Human Triacylglycerol-Rich Lipoproteins from the Green Leafy Vegetable *Eruca sativa*. *Ecol Food Nutr* 47: 77–94 (2008).
- Thakkar SK, Maziya-Dixon B, Dixon AG, Failla ML. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137:2229-33 (2007).
- Tyssandier V, Cardinault N, Caris-Veyrat C, Amiot MJ, Grolier P, Bouteloup C., Azais-Braesco V, Borel P. Vegetable-borne lutein, lycopene, and β -carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr* 75: 526-534 (2002).

Unlu NZ, Bohn T, Clinton SK, Schwartz SJ. Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *J Nutr* 135: 431-436 (2005).

Unlu NZ, Bohn T, Francis DM, Nagaraja HN, Clinton SK, Schwartz SJ, Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *Br J Nutr* 29: 1-7 (2007).

van den Berg H, Faulks R, Fernando Granado H, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, Stahl W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J Sci Food Agric* 80: 880-912 (2000).

van den Berg H, van Vliet T. Effect of simultaneous, single oral doses of beta-carotene with lutein or lycopene on the beta-carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men. *Am J Clin Nutr* 68: 82-89 (1998).

van den Berg H. Carotenoid interactions. *Nutr Rev* 57: 1–10 (1999).

van het Hof K, Brouwer IA, West CE, Haddeman E, Steegers-Theunissen RPM, van Dusseldorp M, Weststrate JA, Eskes, TKAB, Howtvast JGAJ, Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. *Am J Clin Nutr* 70: 261–268 (1999).

- van het Hof K, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130: 503–506 (2000).
- van Lieshout M, West CE, van de Bovenkamp P, Wang Y, Sun Y, van Breemen RB, Muhilal DP, Verhoeven MA, Creemers AF, Lugtenburg J. Extraction of carotenoids from feces, enabling the bioavailability of β -carotene to be studied in Indonesian children. *J Agric Food Chem* 51: 5123–5130 (2003).
- van Vliet T, Fentener van Vlissingen M, van Schaik F, van den Berg H. β -carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J Nutr* 126:499–508 (1996).
- van Vliet T, Schreurs WH, van den Berg H, Intestinal beta-carotene absorption and cleavage in men: response of β -carotene and retinyl esters in the triglyceride-rich lipoprotein fraction after a single oral dose of β -carotene. *Am J Clin Nutr* 62: 110-116 (1995).
- van Zeben W, Hendriks TF. The absorption of carotene from cooked carrots. *Zschr Vitamin Forsch* 19: 265-266 (1948).
- Veda S, Kamath A, Platel K, Begum K, Srinivasan K. Determination of bioaccessibility of beta-carotene in vegetables by in vitro methods. *Mol Nutr Food Res* 50: 1047-1052 (2006).
- Villard L, Bates CJ. Carotene dioxygenase (EC 1.13.11.21) activity in rat intestine: effects of vitamin A deficiency and of pregnancy. *J Nutr* 56: 115-122 (1986).

- von Lintig J, Vogt K. Vitamin A formation in animals: molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *J Nutr* 134: 251S–256S (2004).
- Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83: 1265–1271 (2006).
- Weststrate JA, van het Hof KH. Sucrose polyester and plasma carotenoids concentrations in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 62: 591–597 (1995).
- White WS, Peck KM, Bierer TL, Gugger ET, Erdman Jr JW. Interaction of oral β -carotene and canthaxanthin in ferrets. *J Nutr* 123: 1405–1413 (1993).
- Wyss A. Carotene oxygenases: a new family of double bond cleavage enzymes. *J Nutr* 134: 246S–250S (2004).
- Yao L, Liang Y, Trahanovsky WS, Serfass RE, White WS. Use of a ^{13}C tracer to quantify the plasma appearance of a physiological dose of lutein in humans. *Lipids* 35: 339-48 (2000).
- Yeum KJ, Russel RM. Carotenoid Bioavailability and Bioconversion. *Annu Rev Nutr* 22: 483-540 (2002).
- Yonekura L, Nagao A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51: 107-115 (2007).

Zanutto ME, Jordao Junior AA, Meirelles MS, Favaro RM, Vannucchi H. Effect of citric pectin on beta-carotene bioavailability in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 72: 199-203 (2002).

CAPÍTULO 2

Comparação de Métodos de Bioacessibilidade *In Vitro* de Carotenóides

Comparação de Métodos de Bioacessibilidade *In Vitro* de Carotenóides

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira e Delia Rodriguez Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Devido aos importantes benefícios que os carotenóides promovem em nossa saúde, a composição destes pigmentos naturais em alimentos vem sendo estudada em todo o mundo. Estes dados necessitam ser complementados pela investigação da biodisponibilidade e para isto, estudos *in vivo* com humanos são a abordagem preferida, porém são caros, trabalhosos e não permitem a avaliação de grande número de alimentos. A digestão *in vitro* pode ser uma ferramenta eficaz e prática para a avaliação de grande número de amostras, apontando a bioacessibilidade relativa. O objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de determinação de bioacessibilidade *in vitro* utilizando cenoura, espinafre e tomate, crus e cozidos, como amostras. Além disso, foram comparadas outras modificações propostas no intuito de representar melhor a digestão no corpo humano. Resultados obtidos com as modificações propostas por Reboul et al. (2006) ao método de Garrett (1999) mostraram diferença significativa, assim como a adição de lipase e carboxil ester lipase na fase intestinal aumentaram a bioacessibilidade das xantofilas significativamente. A introdução de uma fase oral não alterou a porcentagem de micelarização dos carotenóides, porém, o tempo de homogeneização da amostra alterou-a de forma significativa.

Palavras-chave: carotenóides; bioacessibilidade *in vitro*; comparação de métodos.

INTRODUÇÃO

Carotenóides são uma família de compostos encontrados largamente na natureza e podem ser percebidos pela coloração amarela, laranja e vermelha de muitas frutas e vegetais, além de flores, alguns animais, e microorganismos. Dos mais de 600 diferentes carotenóides naturais já isolados e identificados até os dias de hoje, cerca de 60 podem ser encontrados em fontes alimentícias (Mangels *et al.*, 1993) porém, apenas β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina aparecem em concentrações significativas no plasma sanguíneo (Khachik *et al.*, 1991).

No nosso organismo, os carotenóides desempenham importantes papéis funcionais, ou seja, seu consumo regular está diretamente ligado à diminuição do risco de se desenvolver alguns tipos de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata (Olson, 1999; Tapiero *et al.*, 2004; Voutilainen *et al.*, 2006 Nishino *et al.*, 2009). Além disso, alguns carotenóides são pró-vitamínicos A.

Em vista das importantes funções destes corantes naturais, os carotenóides são muito estudados, sendo o Brasil o país que reuniu o maior banco de dados de composição de carotenóides em alimentos do mundo (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008). Apesar de necessários, os dados sobre a composição dos carotenóides podem ser melhor utilizados se complementados com dados sobre sua biodisponibilidade. Biodisponibilidade é a fração do nutriente ingerido que se torna

disponível para utilização em funções fisiológicas normais ou para armazenamento no corpo humano (Castenmiller e West, 1998).

Estudos com humanos e com animais têm sido realizados a fim de determinar a biodisponibilidade relativa e a bioconversão dos carotenóides. Entretanto, métodos de determinação *in vivo* são muito dispendiosos, complexos, além de trabalhosos, limitando seu uso para poucas de amostras. A avaliação de um grande número de amostras de alimento é necessária em experimentos de melhoramento, investigação dos efeitos de diferentes preparações domésticas e processamentos industriais. Portanto, métodos *in vitro* mais simples, menos onerosos, rápidos e reproduzíveis têm sido desenvolvidos para a triagem inicial da biodisponibilidade relativa dos carotenóides (Rodriguez-Amaya, 2010).

Garrett *et al.* (1999) foram pioneiros em desenvolver um método de determinação da biodisponibilidade de carotenóides *in vitro* baseado em uma metodologia de Miller *et al.* (1981) para determinação da biodisponibilidade de ferro. O método simula a digestão dos carotenóides até sua incorporação nas micelas mistas, denominada bioacessibilidade e posteriormente, células diferenciadas Caco-2 assumem o papel dos enterócitos para determinação da absorção.

O método de Garret *et al.* (1999) sofreu algumas modificações ao longo dos anos para que se assemelhasse mais à fisiologia humana. Algumas modificações foram: inclusão de uma fase oral anterior à fase gástrica (Thakkar *et al.*, 2007), adição de lipase (Ferruzzi, *et al.*, 2001) e colesterol éster lipase (Chitchumroonchokchai *et al.*, 2006) na fase intestinal e substituição da

ultracentrifugação para isolamento da fração micelar pela centrifugação em alta velocidade (Takkar *et al.*, 2007).

Reboul *et al.* (2006) também propôs modificações ao método de Garrett *et al.* (1999): aumento da concentração de sais biliares na fase intestinal, modificações no pH da fase intestinal e gástrica, substituição do antioxidante e modificações nos tempos de incubação. Com o método modificado, estes autores demonstraram boa correlação entre a bioacessibilidade obtida por esse modelo *in vitro* e os dados de biodisponibilidade determinada em humanos.

Apesar de muitas modificações terem sido propostas, elas nunca foram comparadas, portanto, este trabalho teve como objetivo a comparação de metodologias para a determinação da bioacessibilidade dos carotenóides em alimentos e das modificações propostas. Além disso, levando em consideração que não houve preocupação dos grupos de pesquisa em padronizar o preparo do alimento teste, este trabalho também teve como objetivo avaliar a etapa de homogeneização da amostra para que se pareça mais com a mastigação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e enzimas. Para as etapas pré-cromatográficas foram utilizados reagentes de grau analítico e aqueles utilizados nas etapas cromatográficas foram de grau HPLC. As enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina, lipase, carboxil éster lipase e extrato biliar foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Preparo da amostra teste. As amostras de espinafre (*Tetragonia tetragonioides*), cenoura (*Daucus carota*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*) foram adquiridas em supermercados de Campinas.

Foram analisadas triplicatas de amostras cruas e cozidas em água em ebulição durante 10 minutos na ausência de luz e trituradas em processador de alimentos até consistência de purê.

Método de Garret *et al.* (1999). Em um tubo de centrífuga de 50 ml foram adicionados 3 g da amostra preparada e 32 mL de solução salina contendo 150 $\mu\text{mol/L}$ de BHT. Para simulação da fase gástrica, o pH foi ajustado para 2 com HCl 1 M, e foram adicionados 2 mL de pepsina (40 mg/mL em 0,1 M de HCl). O conteúdo foi incubado em banho-maria com agitação por 1 hora a 37 °C. Para simulação da fase intestinal, o pH foi ajustado para 5,3 com NaOH 1M e foram adicionados 9 mL de solução de extrato biliar e pancreatina (12 mg/mL e 2 mg/mL em 0,1 M de NaHCO_3). O volume foi completado para 50 mL com solução de NaCl e o conteúdo foi incubado em banho-maria com agitação por 2 hora a 37 °C.

Método de Reboul *et al.* (2006). As modificações feitas por Reboul *et al.* (2006) no método de Garrett *et al.* (1999) estão na Figura 1. Em um tubo de centrífuga de 50 ml, foram adicionados 3 g do alimento preparado e 32 mL de solução salina com 12,6 mg/mL de pirogalol. Para simulação da fase gástrica, o conteúdo foi incubado em banho-maria com agitação por 10 minutos a 37 °C. O pH foi ajustado para 4 com solução de HCL 1M, e foram adicionados 2 mL de pepsina (40 mg/mL em 0,1 M de HCl). O conteúdo foi incubado por 30 minutos em banho-maria com agitação a 37 °C. Para a simulação da fase intestinal, o pH foi

ajustado para 6 com NaHCO_3 0,9M e foram adicionados 9 mL de solução de extrato biliar e pancreatina (12 mg/mL e 2 mg/mL em 0,1 M de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e 4 mL de extrato biliar a 0,1g/mL. O conteúdo foi incubado por 30 minutos em banho-maria com agitação a 37 °C.

Isolamento da fração micelar. A fração micelar (fase aquosa) de ambos os métodos foi separada das partículas de alimentos por centrifugação a 5.000 g, 4 °C por 45 minutos (Allegra 64R High-Speed Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA). Imediatamente após a centrifugação a fase aquosa foi coletada e filtrada em filtro de 0,22 μm (Millipore) para remover microcristais de carotenóides não micelarizados.

Modificação proposta por Takkar *et al.* (2007). Foi adicionada uma etapa inicial de simulação da fase oral contendo: 150 mm/L de NaCl, KCl e CaCl_2 e 3000 unidades de α -amilase por grama de alimento.

Modificação proposta por Ferruzzi *et al.* (2001). Foram adicionados 0,2 mg/mL de lipase durante a simulação da fase intestinal.

Modificação proposta por Chitchumroonchokchai *et al.* (2006). Foram adicionados 50 unidades de carboxil ester lipase bovina (CEL) durante a simulação da fase intestinal.

Homogeneização da amostra. Para simular melhor a etapa de mastigação, os alimentos foram homogeneizados em processador de alimentos por 1, 1,5 e 2 minutos. Para cada tempo foi avaliada a bioacessibilidade dos carotenóides do alimento teste, além de comparados visualmente com os mesmos alimentos após sofrerem mastigação humana.

Análise de carotenóides. A análise de carotenóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada na metodologia de Kimura e Rodriguez-Amaya (2002).

Os carotenóides da amostra teste, da digesta e da fração aquosa (micelar) foram extraídos com acetona e transferidos para éter de petróleo por partição. O extrato foi então concentrado em evaporador rotatório ($T \leq 35^{\circ} \text{C}$) e seco com N_2 . Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo, o extrato seco foi redissolvido em acetona de grau cromatográfico e filtrado em filtro de $0,22 \mu\text{m}$.

Os padrões foram isolados por cromatografia em coluna aberta de vidro empacotada com mistura de $\text{MgO}:\text{hyflosupercel}$ (1:1) ativada por 4 horas a 110°C (Kimura e Rodriguez-Amaya, 2002). As soluções foram quantificadas espectrofotometricamente na região visível e as concentrações foram corrigidas de acordo com a pureza da solução determinada por cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises cromatográficas foram realizadas em um módulo de separação da Waters (modelo 2690, Milford, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos UV-visível (modelo Waters 996), controlado por “software” Millenium (versão 2010). Utilizou-se uma coluna monomérica C_{18} , Spherisorb ODS2 ($4,6 \times 150\text{mm}$, $3\mu\text{m}$) (Waters Corp, Milford, EUA). A fase móvel consistiu de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina, metanol e acetato de etila, com um fluxo de $0,7 \text{ ml/min}$. Um gradiente côncavo foi aplicado de 95:5:0 a 60:20:20 em 20 min, mantendo esta proporção até o final dos 60 minutos de corrida. O tempo de reequilíbrio da coluna levou 15 minutos.

A identificação dos carotenóides foi realizada de acordo com Rodriguez-Amaya (1999), utilizando em conjunto o comportamento cromatográfico e co-cromatografia com padrões de carotenóides, análise dos espectros de absorção (λ_{max} e estrutura espectral fina) obtidos pelo detector de arranjo de diodos e espectrofotômetro UV-Visível e reações químicas específicas para grupos substituintes como acetilação, metilação, redução e rearranjo de grupos epóxidos.

A concentração de carotenóides das amostras foi determinada por padronização externa. A curva foi composta por cinco pontos em triplicata.

Cálculo da bioacessibilidade

A bioacessibilidade foi calculada a partir da porcentagem da quantidade de carotenóides presentes fração micelar pela quantidade presente na amostra inicial.

Análise estatística

A análise estatística foi feita mediante teste de Tukey, a um nível de significância de 0,05%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação de métodos. A primeira etapa deste trabalho foi comparar a bioacessibilidade obtida pelos métodos de Garrett *et al.* (1999) e Reboul *et al.* (2006). Conforme se pode observar na Tabela 1, as modificações propostas por Reboul *et al.* (2006) aumentaram significamente a bioacessibilidade dos carotenóides de todas as amostras analisadas. Como os resultados obtidos no trabalho de Reboul foram bem correlacionados com dados de biodisponibilidade

determinada em humanos, optou-se por utilizar este método nas próximas etapas deste estudo.

Adição da fase oral. Ao método de Reboul, adicionou-se uma etapa de simulação da fase oral, porém, no geral, não foi encontrada diferença significativa entre as amostras passando ou não por esta fase (Tabela 1). Takkar *et al.* (2007) propôs que se adicionasse esta etapa em um estudo realizado com mandioca, um alimento muito rico em amido, já que na fase oral inicia-se sua digestão. Porém, as amostras analisadas no presente trabalho não são fontes de amido e por isso, provavelmente, a fase oral não tenha representado diferença em relação à bioacessibilidade dos carotenóides.

Adição de lipase e carboxil éter lipase. A adição de lipase e carboxil éter lipase à fase intestinal aumentaram significativamente a bioacessibilidade dos carotenóides, especialmente da luteína (Tabela 1). A bioacessibilidade da luteína com a presença de lipase e CEL na fase intestinal aumentou em média 4,35% e a do β -caroteno teve um aumento, em média de 1,85%. A carboxil éter lipase catalisa a hidrólise de diversos substratos, entre eles os ésteres das xantofilas luteína, capsantina, β -criptoxantina (Breithaupt *et al.*, 2002) e zeaxantina (Chitchumroonchokchai e Failla, 2006).

Homogeneização da amostra. A influencia positiva da destruição da matriz na biodisponibilidade de carotenóides foi bastante estudada por métodos *in vivo* (Stahl e Sies, 1992; Gärtner *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998; van het Hof *et al.*, 1999; Livny *et al.*, 2003; Tyssandier *et al.*, 2002) e também *in vitro* (Hedrén *et al.*, 2002; Hornero-Méndez e Minguez-Mosquera, 2007; Veda *et al.*, 2006, Ryan *et al.*,

2008), porém estes estudos *in vitro* focaram a destruição da matriz na etapa de processamento do alimento. No presente trabalho a destruição da matriz foi estudada com relação à etapa de mastigação (Tabela 2). Visualmente, a homogeneização das amostras em processador de alimentos por 1,5 minutos parece ser o mais parecido com a mastigação humana. As amostras homogeneizadas por 1 minuto tiveram menor bioacessibilidade e as amostras em consistência de purê, utilizadas nas metodologias de Garrett *et al.* (1999) e Reboul *et al.* (2006), tiveram a maior porcentagem de micelarização, porém, em alguns alimentos, a mastigação não é suficiente para que o alimento se torne purê, portanto, esse tipo de procedimento pode superestimar a bioacessibilidade dos carotenóides. No espinafre cozido e homogeneizado até consistência de purê, a bioacessibilidade da luteína foi 65,3%, no entanto, quando homogeneizado em processador por 1,5 minutos, o resultado foi 50%. Já no caso do tomate, um minuto de processamento foi o suficiente para que ele tomasse a consistência de purê, e como se pode observar na Tabela, não houve diferença significativa quanto às porcentagens de micelarização dos carotenóides entre os diferentes tempos testados.

Bioacessibilidade dos carotenóides. A bioacessibilidade do licopeno nas amostras de tomate analisadas foi baixa, variando de 1,1 a 2,8% no tomate cru e de 2,5 a 6,3% para o tomate cozido. Estes dados corroboram com os resultados obtidos em experimentos *in vivo*, nos quais a bioacessibilidade do licopeno parece ser menor que dos outros carotenóides, em torno de 2,23% (Tyssandier *et al.*, 2002).

Por outro lado, a luteína foi o carotenóide mais bioacessível em todos os alimentos analisados, sendo que a porcentagem de micelarização deste carotenóide chegou a 75,4% na cenoura cozida. Estudos *in vivo* têm demonstrado que as xantofilas são mais biodisponíveis que os carotenos (Castenmiller *et al.*, 1999; Gärtner *et al.*, 1996; van het Hof *et al.*, 1999).

A bioacessibilidade do β -caroteno foi maior para o tomate cozido (31,7%), porém, cabe lembrar que a cenoura e o espinafre possuem quantidades muito maiores de β -caroteno que o tomate. O α -caroteno foi, em geral, ligeiramente menos bioacessível que o β -caroteno.

CONCLUSÃO

Pela comparação realizada, recomenda-se o método de Garret *et al.* (1999) modificado por Reboul *et al.* (2006), incorporando modificações de Chitchumroonchokchai e Failla (2006), Thakkar *et al.* (2007) e Ferruzzi *et al.* (2001) (Figura 2).

A fase oral se mostrou desnecessária para as amostras aqui analisadas devido ao baixo teor de carboidratos. A homogeneização de 1,5 minutos é adequada para simular a mastigação destas amostras.

Tabela 1. Comparação da bioacessibilidade (%) dos carotenóides de alimentos por diferentes métodos^a.

Amostra	Método de Garret <i>et al.</i> (1999)				Método Reboul de <i>et al.</i> (2006)				Método de Reboul <i>et al.</i> (2006) + fase oral				Método de Reboul <i>et al.</i> (2006) + CEL e lipase			
	α	β	Lut	Lic	α	β	Lut	Lic	α	β	Lut	Lic	α	β	Lut	Lic
Espinafre cru	-	6,5c*	17,6c*	-	-	11,3b*	47,6b*	-	-	11,5b*	48,6ab*	-	-	14,2a*	49,1a*	-
Espinafre cozido	-	7,8c**	19,2c*	-	-	16,1b**	59,6b**	-	-	15,9b**	60,2b**	-	-	17,4a**	65,3a**	-
Cenoura crua	2,3b*	1,9c*	28,7c*	-	2,3b*	2,4b*	41,2b*	-	2,5b*	2,6b*	40,1b*	-	4,1a*	3,8a*	46,2a*	-
Cenoura cozida	7,4c**	9,1c**	59,7c**	-	12,1b**	16,0b**	68,2b**	-	12,3b**	17,4b**	69,2b**	-	16,2a**	19,2a**	75,4a**	-
Tomate cru	-	15,7c*	16,6c*	1,1b*	-	18,4b*	30,1b*	2,5a*	-	18,9ab*	29,8b*	2,4a*	-	19,3a*	35,2a*	2,8a*
Tomate cozido	-	26,7c**	39,3c**	2,5c**	-	27,3bc**	56,2b**	5,3b**	-	28,2b**	58,2b**	5,7b**	-	31,7a**	62,8a**	6,3a**

α = α caroteno; β = β -caroteno; Lut = luteína e Lic = licopeno

^a médias de triplicatas

Valores na mesma linha para o mesmo carotenóide com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Valores na mesma coluna para o mesmo alimento com diferentes números de asterisco (*) são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 2. Comparação da bioacessibilidade (%) dos carotenóides em alimentos com diferentes tipos de homogeneização ^a.

Amostra	Purê			Homogeneizado por 1 minuto			Homogeneizado por 1,5 minutos			Homogeneizado por 2 minuto		
	β	Lut	Lic	β	Lut	Lic	β	Lut	Lic	β	Lut	Lic
Espinafre cru	14,1a	49,1a	-	10,2c	43,1c	-	13,6b	46,3b	-	13,9b	46,9b	-
Espinafre cozido	17,4a	65,3a	-	14,5c	57,2c	-	15,1c	59,3bc	-	17,2b	60,2b	-
Tomate cru	19,3a	35,2a	2,8a	19,2a	34,9a	2,7a	19,1a	34,8a	2,8a	19,5a	35,1a	2,9a

β = β-caroteno; Lut = luteína e Lic = licopeno

^a médias de triplicatas

Valores na mesma linha para o mesmo carotenóide com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

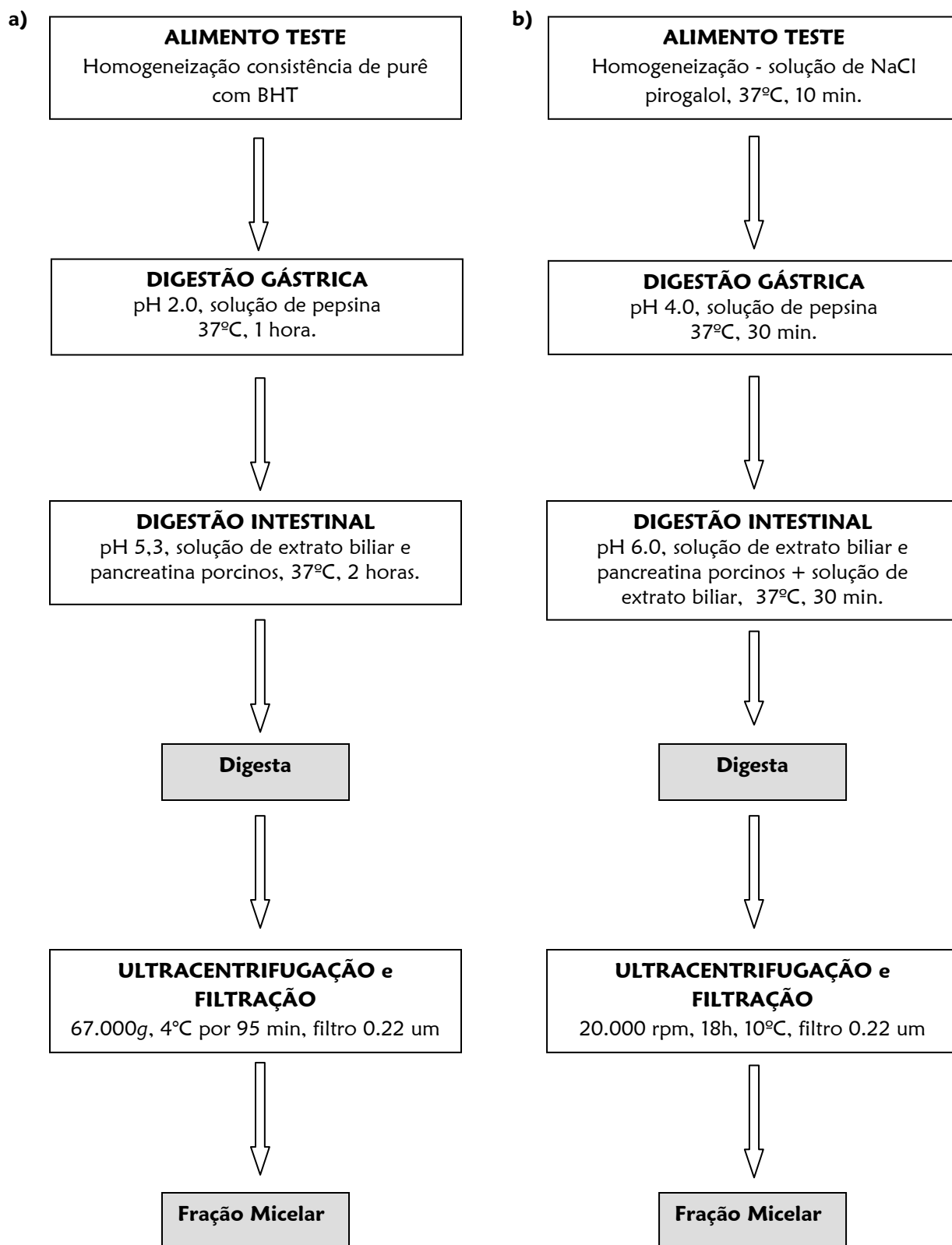


Figura 1. Fluxograma do método de digestão *in vitro* de Garrett *et al.* (1999) e Reboul *et al.* (2006).

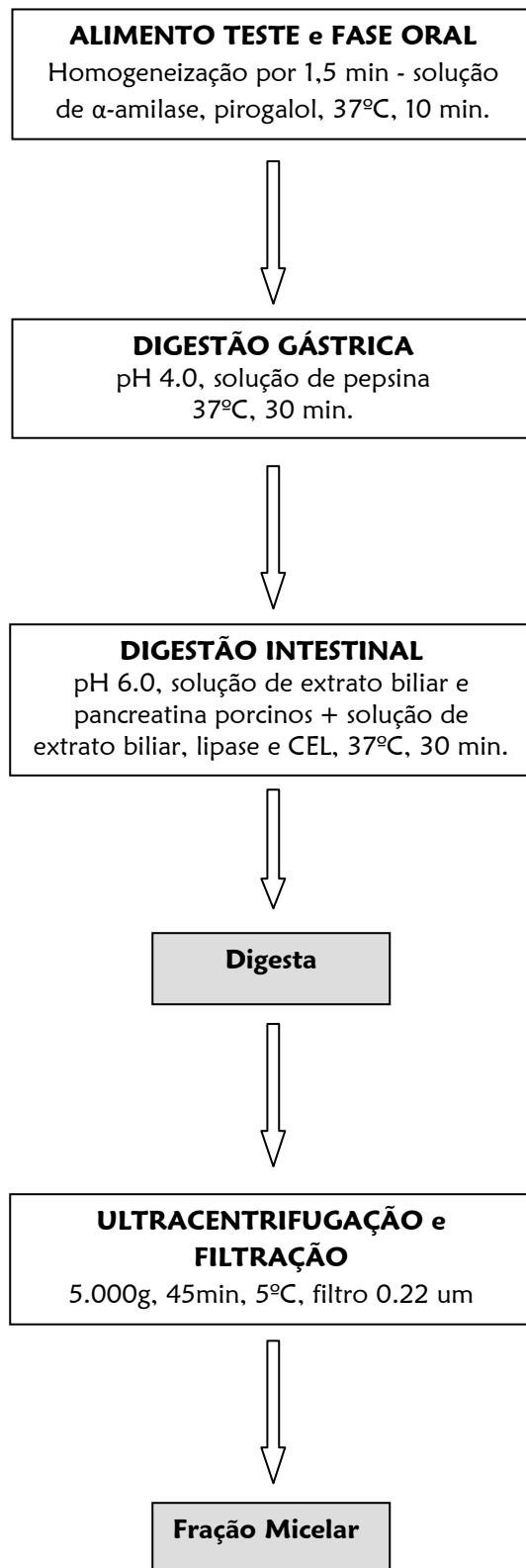


Figura 2. Fluxograma do método recomendado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Breithaupt DE, Bamedi A, Wirt U. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132:721–728 (2002).
2. Castenmiller JJM, West CE. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Rev Nutr* 18: 19-38 (1998).
3. Castenmiller JJM, West CE, Linssen JPH, van het Hof KH, Voragen AGJ, The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129: 349-355 (1999).
4. Chitchumroonchokchai C, Failla ML. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 136: 588-594 (2006).
5. Ferruzzi MG, Failla ML, Schwartz SJ. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and Caco-2 human cell model. *J Agric Food Chem* 49: 2082-2089 (2001).
6. Garrett DA, Failla ML, Samara, RJ. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* 47: 4301-4309 (1999).
7. Gärtner C, Stahl W, Sies H, Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr* 66, 116–122 (1997).

8. Gärtner C, Stahl W, Sies H. Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to β -carotene in the human. *Int J Vitamin Nutr Res* 66: 119–125 (1996).
9. Hedrén E, Diaz V, Svanberg U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *Eur J Clin Nutr* 56: 425–430 (2002).
10. Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Inn Food Sci Emerg Technol* 8: 407-412 (2007).
11. Khachik F, Beecher GR, Goli MB. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl Chem* 63: 1871-1880 (1991).
12. Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem* 78: 389-398 (2002).
13. Livny O, Reifen R, Levy I, Madar Z, Faulks R, Southon S, Schwartz B, β -carotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. *Eur J Nutr* 42: 338-345 (2003).
14. Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E, Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc* 93: 284-296 (1993).

15. Miller DD, Schricker RR, Rasmussen RR, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 34: 2248-2256 (1981).
16. Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, Satomi Y. Cancer prevention by carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 483: 165-168 (2009).
17. Olson JA, Carotenoids and human health. *Arch. Latinoamer Nutr* 49: 7-11 (1999).
18. Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54: 8749-8755 (2006).
19. Rock CL, Lovaldo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW e Schwartz SJ, Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr* 128: 913-916 (1998).
20. Rodriguez-Amaya D, Kimura M, Godoy HT e Amaya-Farfán J, Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Comp Anal* 21: 445-463 (2008).
21. Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, 64p (1999).
22. Rodriguez-Amaya DB. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. *J Food Comp Anal: in press* (2010).

23. Ryan L, O'Connell O, O'Sullivan L, Aherne SA, O'Brien NM, Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods Human Nutr* 63, 127–133 (2008).
24. Stahl W e Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr* 122: 2161-2166 (1992).
25. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 58:100-110 (2004).
26. Thakkar SK, Maziya-Dixon B, Dixon AG, Failla ML. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137:2229-33 (2007).
27. Tyssandier V, Cardinault N, Caris-Veyrat C, Amiot M.J, Grolier P, Bouteloup C., Azais-Braesco V, Borel P, Vegetable-borne lutein, lycopene, and β -carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr* 75: 526-534 (2002).
28. van het Hof K, Brouwer IA, West CE Haddeman E, Steegers-Theunissen RPM, van Dusseldorp M, Weststrate JA, Eskes, TKAB. Howtvast JGAJ, Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. *Am J Clin Nutr* 70: 261–268 (1999).

29. Veda S, Kamath A, Platel K, Begum K, Srinivasan K. Determination of bioaccessibility of beta-carotene in vegetables by in vitro methods. *Mol Nutr Food Res* 50: 1047-1052 (2006).
30. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83: 1265–1271 (2006).

CAPÍTULO 3

Bioacessibilidade *In Vitro* de Vegetais Folhosos

Bioacessibilidade *In Vitro* de Vegetais Folhosos

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira e Delia Rodriguez Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Dados sobre a composição de carotenóides deveriam ser acompanhados por informações da sua biodisponibilidade. Estudos de biodisponibilidade em humanos são, ultimamente, os mais utilizados para este propósito, porém, os métodos são complexos e consomem muito tempo, limitando seu uso para poucas amostras. Portanto, métodos *in vitro*, mais rápidos e simples, têm sido desenvolvidos para uma seleção inicial da biodisponibilidade/bioacessibilidade relativa dos carotenóides. A bioacessibilidade *in vitro* de folhas comerciais e nativas do Brasil (chicória, coentro, couve, alface, espinafre, rúcula, “caruru”, “serralha” e “taioba”) foi determinada neste estudo. Entre as amostras de folhas cruas analisadas, o espinafre teve a maior bioacessibilidade (14% para β -caroteno, 46% para luteína), correlacionado com o seu baixo teor de fibras (4,5g/100g). A folha nativa “caruru”, rica em fibras, entretanto, teve a menor bioacessibilidade (2,3% de β -caroteno, 6,9% para luteína), entretanto teve os maiores teores (122 μ g/g de β -caroteno, 136 μ g/g de luteína). O cozimento aumentou a bioacessibilidade. A micelarização do β -caroteno e da luteína foi de 3.3 e 18%, respectivamente, na couve crua para 16 e 38%, respectivamente na couve cozida. As porcentagens correspondentes no espinafre foram de 14 e 46% na folha crua para 15 and 59 na cozida.

Palavras-chave: carotenóides; bioacessibilidade; vegetais folhosos; folhas nativas.

INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos naturais muito estudados devido a atividade pró-vitâmica A de alguns deles e sua associação com a diminuição de doenças degenerativas (Olson, 1999; Tapiero *et al.*, 2004; Voutilainen *et al.*, 2006; Nishino *et al.*, 2009). Devido a estas importantes características, a composição de carotenóides em alimentos vem sendo determinada em todo o mundo. O Brasil possui o maior banco de dados mundial, incluindo frutas e hortaliças, suas diferentes variedades produzidas em diversas regiões brasileiras, além das composições dos alimentos *in natura*, processados e preparados para consumo, somando mais de 270 itens (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

Dentre todos os alimentos ricos em carotenóides, os vegetais folhosos constituem umas das maiores fontes. Possuem em sua composição, β -caroteno, violaxantina, neoxantina e principalmente luteína. Folhas nativas (caruru, cerralha, mentruz e taioba) possuem concentrações maiores desses carotenóides do que as maiores fontes folhosas (salsa e coentro) (Kobori e Rodriguez-Amaya, 2007).

A composição dos carotenóides deve ser complementada com informações sobre a biodisponibilidade e a bioacessibilidade dos mesmos. Métodos de determinação de biodisponibilidade *in vivo* são caros, demandam tempo, poucos alimentos podem ser estudados de cada vez, além de requererem uma equipe grande de pesquisadores. Por isso, a utilização de metodologias de determinação mais rápidas e menos onerosas como bioacessibilidade *in vitro* constituem uma boa

ferramenta para avaliar os diferentes fatores que podem influenciar a incorporação dos carotenóides às micelas em um grande número de amostras.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioacessibilidade dos carotenóides dos vegetais folhosos comerciais (almeirão, alface, chicória, coentro, couve, espinafre e rúcula) e das folhas nativas (caruru, serralha, taioba), além de avaliar o efeito do cozimento na bioacessibilidade dos carotenóides de espinafre e couve.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e enzimas

Para as etapas pré-cromatográficas foram utilizados reagentes de grau analítico e aqueles utilizados nas etapas cromatográficas foram de grau HPLC. As enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina, lipase, carboxil éster lipase e extrato biliar foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Preparo da amostra teste

As amostras de folhas comerciais, almeirão, alface, chicória, coentro fresco, couve, espinafre e rúcula, foram adquiridas em supermercados de Campinas. As folhas nativas, caruru, serralha e taioba foram colhidas em sítios da região de Campinas.

O espinafre e a couve foram cozidos em água de fervura durante 10 minutos na ausência de luz. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

Determinação da bioacessibilidade *in vitro*

O método de determinação de carotenóides *in vitro*, foi baseado em uma metodologia desenvolvida por Garrett *et al.* (1999), incorporando modificações de Reboul *et al.* (2006), Chitchumroonchokchai e Failla (2006), Thakkar *et al.* (2007). Este método modificado foi previamente avaliado no Capítulo 2.

Tanto os alimentos crus como os cozidos foram homogeneizados em processador de alimentos por 1,5 minutos para simular a mastigação.

Foram pesados 3 g da folha previamente homogeneizada em um tubo de centrífuga de 50 ml, no qual foram adicionados 7 mL de uma solução de α -amilase (9000 U) para simulação da fase oral. Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 10 minutos. Para a fase gástrica, o pH foi ajustado para 4 com HCl 1 M e adicionou-se 2 mL de solução de pepsina em HCl 0,1M (40 mg/mL). Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos. Para a fase intestinal, o pH foi ajustado para 6 com NaHCO_3 0,9M e então, adicionou-se 4 mL de solução de extrato biliar (1g/mL), 2 ml de solução de lipase e pancreatina (5 e 10 mg/mL), 50 U de colesterol esterase e incubou-se em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos a 37 °C.

A fração micelar (fase aquosa) foi separada das partículas de alimentos e de para microcristais de carotenóides não micelarizados por centrifugação a 5.000 g, 4 °C por 45 minutos (Allegra 64R High-Speed Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA). Imediatamente após a centrifugação a fase aquosa foi coletada e filtrada em

filtro de 0,22 μm (Millipore) para remover microcristais de carotenóides não micelarizados.

A bioacessibilidade foi calculada a partir da porcentagem da quantidade de carotenóides presentes nas micelas pela quantidade presente na amostra inicial.

Análise de carotenóides

Foram determinados os teores de carotenóides de 3 g de cada amostra teste, de 25 ml das digestas e de 25 ml das frações aquosas após micelarização. A determinação de carotenóides foi realizada de acordo com procedimento descrito por Kimura e Rodriguez-Amaya (2002). Os carotenóides foram extraídos com acetona PA, homogeneizados por um minuto em homogeneizador Polytron (Kinematica AG – Suíça) e filtrados em funil de Buchner com placa porosa de vidro sinterizado. A homogeneização e filtração foram feitas de 3 a 4 vezes até remoção total da cor. Os carotenóides foram transferidos, aos poucos, para aproximadamente 30 mL de éter de petróleo com 10 ml de éter etílico em funil de separação, seguido pela adição de água, separação das fases e descarte da fase inferior de água-acetona após cada adição. Quando todos os carotenóides estavam transferidos para o éter, a fase etérea foi lavada três ou quatro vezes com água para a remoção da acetona residual. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo ($T < 36^{\circ}\text{C}$) e seco sob fluxo de nitrogênio. Imediatamente antes da injeção, os carotenóides foram redissolvidos em 1 ml de acetona e filtrados em filtro de 0,22 μm .

As análises cromatográficas foram realizadas em um módulo de separação da Waters (modelo 2690, Milford, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos UV-visível (modelo Waters 996), controlado por “software” Millenium (versão 2010). Utilizou-se uma coluna monomérica C₁₈, Spherisorb ODS2 (4,6 x 150mm, 3µm) (Waters Corp, Milford, EUA). A fase móvel consistiu de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina, metanol e acetato de etila, com um fluxo de 0,7 ml/min. Um gradiente côncavo foi aplicado de 95:5:0 a 60:20:20 em 20 min, mantendo esta proporção até o final dos 60 minutos de corrida. O tempo de reequilíbrio da coluna levou 15 minutos.

A quantificação dos carotenóides foi realizada por padronização externa. Curvas de calibração construídas com cinco pontos, incluindo as concentrações esperadas das amostras, demonstraram linearidade. Para a obtenção das curvas, soluções dos padrões foram misturadas, nas proporções correspondentes àquelas encontradas nas amostras analisadas, em balão volumétrico e o volume foi completado com éter de petróleo, para obtenção de 50 mL de mistura final. Alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL foram tomadas em triplicata, levadas à secar sob fluxo de nitrogênio, diluídas em 1mL de acetona grau cromatográfico e injetadas no cromatógrafo.

Os padrões de carotenóides foram extraídos da batata doce (β-caroteno), da couve (luteína) e isolados por cromatografia em coluna aberta. As purezas foram determinadas por CLAE e ficaram acima de 90%. As concentrações das soluções padrão foram determinadas por espectrofotometria e corrigidas de acordo com as porcentagens de pureza.

Os carotenóides foram identificados pela comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia com padrões e pelo espectro de absorção na região visível, considerando tanto os comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) quanto a estrutura espectral fina (expressa em % III/II) e por reações químicas específicas: acetilação de grupos hidroxílicos por anidrido acético e metilação de hidroxilas em posição alílica por metanol acidificado (Rodriguez-Amaya, 1999).

Análise estatística

A análise estatística foi feita mediante teste de Tukey, a um nível de significância de 0,05%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assim como no estudo conduzido por Kobori e Rodriguez-Amaya (2007), as folhas nativas, “caruru”, “serralha” e “taioba”, tiveram maiores teores de carotenóides que as folhas comerciais (Tabela 1), sendo o caruru a folha mais rica tanto em β -caroteno (121,5 ug/g) como em luteína (136,6 ug/g).

No entanto, com relação à bioacessibilidade, pode-se observar (Tabela 2) que as folhas nativas, em especial a “taioba” e o “caruru”, apresentaram os menores valores de porcentagem de micelarização, sendo 2,3% de β -caroteno e 9,2% de luteína para a “taioba” e 1,4% de β -caroteno e 6,9% de luteína para o “caruru”. Valores marcadamente inferiores se comparados aos encontrados para o espinafre, a folha que apresentou os maiores teores de bioacessibilidade, tanto do β -caroteno (13,6%) como da luteína (46%).

A biodisponibilidade dos carotenóides pode ser influenciada por inúmeros fatores (Yonekura e Nagao, 2007). Um dos fatores que pode afetar negativamente a absorção dos carotenóides é o teor de fibras (Riedl *et al.*, 1999; Deming *et al.*, 2000; Zanutto *et al.*, 2002). O presente trabalho confirma esta relação inversa entre a presença de fibras e a incorporação dos carotenóides às micelas, como pode ser observado no gráfico de correlação na Figura 1. Os coeficientes de correlação ($r=0,91$ para β -caroteno e $r=0,94$ para luteína) para essas variáveis foram altamente significativos ($p<0,01$). As folhas nativas “caruru” e “taioba” apesar de conterem teores de carotenóides superiores aos vegetais comerciais crus, possuem, no geral, baixa bioacessibilidade tanto para o β -caroteno como para a luteína, devido a presença de maiores teores de fibras em sua composição. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006), o “caruru” e a “taioba” apresentam o mesmo teor de fibras (4,5g/100g). Possíveis mecanismos responsáveis por este efeito incluem a diminuição da taxa de micelarização vinculada à interação das fibras com ácidos biliares resultando no aumento da excreção fecal de gorduras e substâncias lipossolúveis como os carotenóides (Riedl *et al.*, 1999).

Apesar de conterem o mesmo teor de fibras, a “taioba” apresentou maior bioacessibilidade para luteína e β -caroteno que o “caruru”. Isso pode ser explicado pelo fato do “caruru” apresentar menor teor de lipídeos (0,6g/100g) que a “taioba” (0,9g/100g), segundo a tabela TACO. A presença de lipídeos, diferentemente das fibras, pode aumentar a bioacessibilidade dos carotenóides.

A espécie do carotenóide também influencia na biodisponibilidade. Na Tabela 2, observa-se que para todas as amostras de folhas analisadas a luteína foi mais bioacessível que o β -caroteno, em média 4 vezes mais. O resultado concorda com os dados obtidos em estudos com humanos (Micozzi *et al.*, 1992; Castenmiller *et al.*, 1999; van het Hoff *et al.*, 1999; Granado *et al.*, 2006) Devido a diferença de hidrofobicidade, as xantofilas acumulam-se na superfície das gotas lipídicas emulsificadas e os carotenos mais ao centro, tornando a transferência das xantofilas para as micelas mais eficiente que a transferência dos carotenos (van het Hof *et al.*, 2000; Yonekura e Nagao, 2007).

Outro fator que influencia na biodisponibilidade dos carotenóides de forma positiva, é o processamento, como pode ser verificado através da Tabela 2. Muitos estudos demonstraram que a destruição da matriz alimentar influencia significativamente na biodisponibilidade dos carotenóides (Hedren *et al.*, 2002; Livny *et al.*, 2003; Veda *et al.*, 2006; Hornero-Méndez e Minguez-Mosquera, 2007; Aherne *et al.*, 2010). Neste estudo, o cozimento do espinafre e da couve, apesar de causar perda e isomerização dos carotenóides, aumentou significativamente a porcentagem de micelarização. A bioacessibilidade de β -caroteno e luteína foram 3.3% e 18%, respectivamente, em couve crua, aumentando para 16% e 38%, respectivamente na couve cozida. As porcentagens correspondentes em espinafre foram 14% e 46% no cru e 15% and 59% no cozido.

CONCLUSÃO

As folhas nativas, 'caruru' e 'taioba', com maiores concentrações de carotenóides, porém mais ricas em fibras, apresentaram menor porcentagem de micelarização, comparadas com folhas produzidas comercialmente como o espinafre, couve, coentro, chicória, alface e rúcula. O espinafre apresentou a maior bioacessibilidade tanto para β -caroteno como para a luteína e o cozimento aumentou significativamente a bioacessibilidade. A luteína foi mais bioacessível que o β -caroteno em todas as folhas analisadas.

Tabela 1. Composição de carotenóides (µg/g) nos vegetais folhosos investigados^a

Folhas	Carotenóides (µg/g)			
	β-caroteno total	β-caroteno <i>trans</i>	Luteína total	Luteína <i>trans</i>
Alface lisa	23,6 ± 0,5	19,7 ± 0,3	17,6 ± 1,0	17,6 ± 0,2
Caruru	121,5 ± 2,2	100,3 ± 1,8	136,6 ± 1,3	136,6 ± 2,4
Chicória	20,2 ± 0,3	16,7 ± 0,6	30,1 ± 0,2	30,1 ± 0,8
Coentro	42,9 ± 1,1	35,5 ± 0,6	66,9 ± 0,6	66,9 ± 1,5
Couve crua	42,8 ± 2,0	34,6 ± 1,2	46,2 ± 1,0	46,2 ± 1,2
Couve cozida	33,3 ± 0,7	24,3 ± 0,8	34,9 ± 0,4	32,3 ± 0,9
Espinafre cru	36,3 ± 0,9	28,0 ± 0,8	45,7 ± 0,5	45,7 ± 1,1
Espinafre cozido	23,9 ± 0,7	20,1 ± 0,7	32,6 ± 0,3	30,9 ± 0,2
Rúcula	35,1 ± 0,9	29,0 ± 0,3	63,4 ± 1,4	63,4 ± 1,2
Serralha	60,4 ± 1,1	52,2 ± 1,0	86,4 ± 2,3	86,4 ± 1,5
Taioba	55,5 ± 1,2	46,6 ± 0,5	80,5 ± 1,3	80,5 ± 1,5

^a médias de triplicatas e desvios padrões.

Tabela 2. Porcentagem de micelarização (%) dos carotenóides nos vegetais folhosos investigados

Folhas	Bioacessibilidade (%)	
	Carotenóides	
	β-caroteno	Luteína
Alface lisa	12,1c	33,6d
Caruru	1,4i	6,9j
Chicória	10,6d	27,2e
Coentro	5,3f	17,3h
Couve crua	3,3g	17,5h
Couve cozida	15,7a	37,3c
Espinafre cru	13,6b	46,2b
Espinafre cozido	15,1a	59,3a
Rúcula	2,7	21,9f
Serralha	8,4e	18,7g
Taioba	2,3h	9,2i

^a médias de triplicatas

Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p≤0,05)

Figura

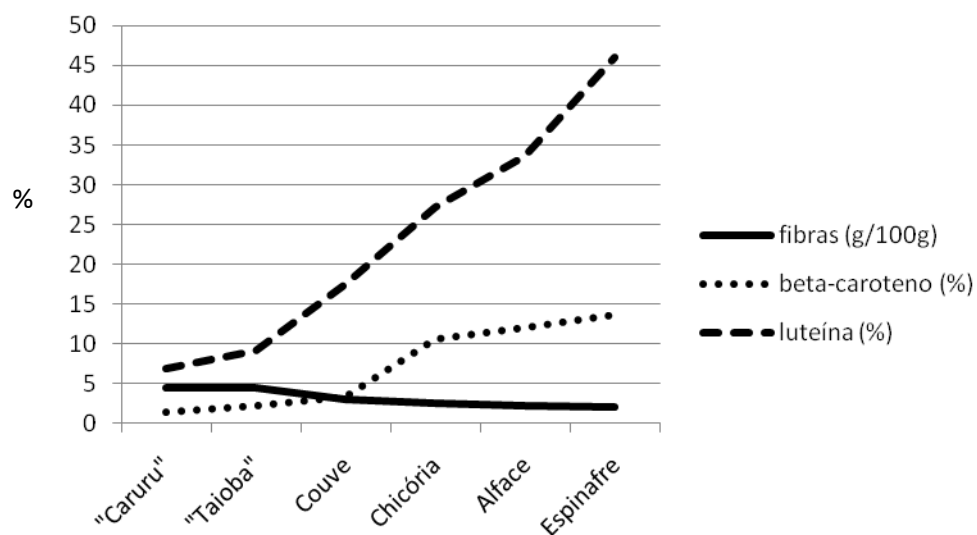


Figura 1. Correlação entre teor de fibras e bioacessibilidade dos carotenóides de vegetais folhosos.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aherne SA, Daly T, Jiwan MA, O'Sullivan L, O'Brien NM. 2010. Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. *Food Res Intern* 43: 1449-1454.
- Castenmiller JJM, West CE, Linssen JPH, van het Hof KH e Voragen AGJ. 1999. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129: 349-355.
- Chitchumroonchokchai C e Failla ML. 2006. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 136: 588-94.
- Deming DM, Boileau AC, Lee CM, Erdman Jr JW. 2000. Amount of dietary fat and type of soluble fiber independently modulate postabsorptive conversion of β -carotene to vitamin A in Mongolian Gerbils. *J Nutr* 130: 2789-2796.
- Garret DA, Failla ML, Samara RJ. 1999. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* 47: 4301-4309.
- Granado F, Olmedilla B, Herrero C, Pérez-Sacristán B, Blanco I, Blázquez S. 2006. Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: in vivo and in vitro assessment. *Exp Biol Med* 231: 1733-1738.

- Hedren E, Diaz V, Svanberg U. 2002. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *Eur J Clin Nutr* 56: 425–430.
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. 2007. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Inn Food Sci Emerg Technol* 8: 407-412.
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. 2002. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem* 78: 389-398.
- Kobori CN, Rodriguez-Amaya DB. 2007. Native Brazilian green leafy vegetables are richer sources of carotenoids than comercial leafy vegetables. Paper presented at the 7th International Food Data Conference, São Paulo, Brasil.
- Livny O, Reifen R, Levy I, Madar Z, Faulks R, Southon S, Schwartz B. 2003. β -carotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. *Eur J Nutr* 42: 338-345.
- Micozzi MS, Brown ED, Edwards BK, Bieri JG, Taylor PR, Khachik F, Beecher GR, Smith JC Jr. 1992. Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and β -carotene supplements in men. *Am J Clin Nutr* 55: 1120–1125.
- Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, Satomi Y. 2009. Cancer prevention by carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 483:165-168.
- Olson JA. 1999. Carotenoids and human health. *Arch Latinoamer Nutr* 49: 7-11.

- Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. 2006. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54: 8749-55.
- Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G. 1999. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J Nutr* 129: 2170–2176.
- Rodriguez-Amaya D, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfán J. 2008. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Comp and Anal* 21: 445-463.
- Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. 1999. Washington: ILSI Press, 64p.
- TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos)/ NEPA-UNICAMP - Versão II. 2006. Campinas: NEPA-UNICAMP, 105p.
- Tapiero H, Townsend DM e Tew KD. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 58:100-110.
- Thakkar SK, Maziya-Dixon B, Dixon AG, Failla ML. 2007. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137:2229-2233.
- van het Hof K, Brouwer IA, West CE, Haddeman E, Steegers-Theunissen RPM, van Dusseldorp M, Weststrate JA, Eskes, TKAB, Howtvast JGAJ. 1998.

Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. *Am J Clin Nutr* 70: 261–268.

van het Hof K, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130: 503–506.

Veda S, Kamath A, Platel K, Begum K, Srinivasan K. 2006. Determination of bioaccessibility of beta-carotene in vegetables by in vitro methods. *Mol Nutr Food Res* 50: 1047-1052.

Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. 2006. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83:1265–1271.

Yonekura L e Nagao A. 2007. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51: 107-115.

Zanutto ME, Jordão Jr AA, Meirelles MS, Favaro RM, Vannucchi H. 2002. Effect of citric pectin on beta-carotene bioavailability in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 72: 199-203.

CAPÍTULO 4

Bioacessibilidade *In Vitro* de Frutas Frescas e Processadas

Bioacessibilidade *In Vitro* de Frutas Frescas e Processadas

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira e Delia Rodriguez Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Os carotenóides possuem funções biológicas benéficas à saúde humana, por este motivo, a composição de carotenóides em alimentos brasileiros vem sendo estudada resultando em um extensivo banco de dados. Estas informações, entretanto, deveriam ser complementadas com estimativas de sua biodisponibilidade. Métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar a biodisponibilidade/bioacessibilidade relativa de alimentos. Em um estudo comparativo, o método desenvolvido por Garrett et al. (1999), com modificações de Reboul et al. (2006), Chitchumroonchokchai e Failla (2006) e Thakkar et al. (2007) pareceu ser o mais adequado. Utilizando este método modificado, a bioacessibilidade da manga, goiaba, mamão 'Solo', pêssego, melancia, pitanga, suco de goiaba, geléia de goiaba, suco de manga e pêssego enlatado foi determinada. Entre as frutas *in natura*, o mamão 'Solo' teve a maior bioacessibilidade para o β -caroteno (36%) e para a β -criptoxantina (39%). A Pitanga apresentou a maior concentração de β -criptoxantina (30 $\mu\text{g/g}$) e licopeno (74 $\mu\text{g/g}$), porém, baixa bioacessibilidade para ambos (1,0%). A bioacessibilidade foi significativamente maior para as frutas processadas. Para o licopeno a bioacessibilidade foi 1.4% na goiaba *in natura*, 12% no suco de goiaba e 27% na geléia de goiaba. Para o β -caroteno, a bioacessibilidade ficou em torno de 19% nos dois cultivares analisados mas foi 57% no suco de manga.

Palavras-chave: carotenóides, frutas, bioacessibilidade *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Carotenóides são compostos notáveis por possuírem ampla distribuição na natureza, estruturas químicas diversificadas e importantes benefícios à saúde. Alguns são precursores de vitamina A, sendo utilizados no combate à deficiência desta vitamina. Estes fitoquímicos também atuam, independentemente de sua ação pró-vitamínica A, no fortalecimento do sistema imunológico e na diminuição do risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis degenerativas (Tapiero *et al.*, 2004; Krinsky e Johnson, 2005; Voutilainen *et al.*, 2006).

Os carotenóides mais pesquisados por seu envolvimento na saúde humana são o β -caroteno, o α -caroteno, a β -criptoxantina, o licopeno, a luteína e a zeaxantina. Além de serem os principais carotenóides presentes no sangue humano (Epler *et al.*, 1993), são também, com exceção da zeaxantina, os mais comumente encontrados nos alimentos.

Dados sobre a composição detalhada de carotenóides em alimentos de origem vegetal vêm sendo obtidos. No Brasil, que possui uma grande variedade de alimentos ricos em carotenóides, estes dados foram compilados no maior banco de dados do mundo sobre carotenóides em alimentos (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008). Porém, ainda são poucos os trabalhos que determinaram sua bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade.

Dentre os estudos já realizados, a maioria envolve determinação de biodisponibilidade *in vivo*, que constituem em investigações caras, trabalhosas e demoradas, necessitando grandes equipes e recursos. Além disso, resultados de

estudos sobre biodisponibilidade têm sido, em alguns casos, inconsistentes ou inconclusivos devido à grande variação nas respostas individuais e à existência de indivíduos que não respondem à intervenção (Rodriguez-Amaya, 2010).

Com a necessidade de se obter resultados de maneira mais rápida, prática e menos onerosa, alguns pesquisadores têm desenvolvido metodologias de determinação de bioacessibilidade e biodisponibilidade *in vitro* de carotenóides (Garrett *et al.*, 1999; Hédren *et al.*, 2002; Granado *et al.*, 2006; Reboul *et al.*, 2006).

Este trabalho teve como objetivo a determinação da bioacessibilidade dos carotenóides de frutas comumente consumidas no país e fontes de carotenóides como manga, melancia, mamão, pitanga, goiaba e pêssego e produtos processados derivados destas frutas como a goiabada, suco de manga, suco de goiaba e doce de pêssego enlatado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e enzimas

Para as etapas pré-cromatográficas foram utilizados reagentes de grau analítico e aqueles utilizados nas etapas cromatográficas foram de grau HPLC. As enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina, lipase, carboxil éster lipase e extrato biliar foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Preparo da amostra teste

As amostras de frutas comerciais, manga Tommy, manga Haden, melancia, mamão, pitanga, goiaba vermelha e pêsego, e os produtos processados goiabada, suco de manga, suco de goiaba e doce de pêsego enlatado foram adquiridos em supermercados de Campinas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Determinação da bioacessibilidade *in vitro*

O método de determinação de carotenóides *in vitro*, foi baseado em uma metodologia desenvolvida por Garrett *et al.* (1999), incorporando modificações de Reboul *et al.* (2006), Chitchumroonchokchai e Failla (2006), Thakkar *et al.* (2007). Este método modificado foi previamente avaliado no Capítulo 2.

Tanto as frutas *in natura* como as processados foram homogeneizados em processador de alimentos por um minuto e meio para simular a mastigação.

Foram pesados 3 g da fruta ou produto processado previamente homogeneizado em um tubo de centrífuga de 50 ml, no qual foram adicionados 7 mL de uma solução de α -amilase (9000 U) para simulação da fase oral. Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 10 minutos. Para a fase gástrica, o pH foi ajustado para 4 com HCl 1 M, e acrescentou-se 2 mL de solução de pepsina em HCl 0,1M (40 mg/mL). Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos. Para a fase intestinal, o pH foi ajustado para 6 com NaHCO₃ 0,9M, e então, adicionou-se 4 mL de solução de extrato biliar

(1g/mL), 2 ml de solução de lipase e pancreatina (5 e 10 mg/mL), 50 U de colesterol esterase e incubou-se em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos a 37 °C.

A fração micelar (fase aquosa) foi separada das partículas de alimentos e de para microcristais de carotenóides não micelarizados por centrifugação a 5.000 g, 4 °C por 45 minutos (Allegra 64R High-Speed Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA). Imediatamente após a centrifugação a fase aquosa foi coletada e filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore) para remover microcristais de carotenóides não micelarizados.

Análise de carotenóides

Foram determinados os teores de carotenóides de 3 g de cada amostra teste, de 25 ml das digestas e de 25 ml das frações aquosas após micelarização. A determinação de carotenóides foi realizada de acordo com procedimento descrito por Kimura e Rodriguez-Amaya (2002). Os carotenóides foram extraídos com acetona, homogeneizados por um minuto em homogeneizador Polytron (Kinematica AG – Suíça) e filtrados em funil de placa sinterizado. A homogeneização e filtração foram feitas de 3 a 4 vezes até remoção total da cor. Os carotenóides foram transferidos, aos poucos, para aproximadamente 30 mL de éter de petróleo com 10 ml de éter etílico em funil de separação, seguido pela adição de água, separação das fases e descarte da fase inferior de água-acetona após cada adição. Quando todos os carotenóides estavam transferidos para o éter, a fase etérea foi lavada três ou quatro vezes com água para a remoção da acetona.

Com exceção da goiaba e de seus produtos processados, goiabada e suco de goiaba, o extrato etéreo de todas as outras frutas e produtos foram saponificados com uma solução de 10% de KOH em metanol em volume igual ao extrato e aproximadamente 0,3 g de BHT. A mistura foi deixada no escuro durante 16 horas à temperatura ambiente e seguiu-se novamente a partição para éter etílico e éter de petróleo.

O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo ($T < 36^{\circ} \text{C}$) e seco em nitrogênio. Imediatamente antes da injeção, os carotenóides foram redissolvidos em 1 ml de acetona e filtrados em filtro de 0,22 μm .

As análises cromatográficas foram realizadas em um módulo de separação da Waters (modelo 2690, Milford, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos UV-visível (modelo Waters 996), controlado por “software” Millennium (versão 2010). Utilizou-se uma coluna monomérica C_{18} , Spherisorb ODS2 (4,6 x 150mm, 3 μm) (Waters Corp, Milford, EUA). A fase móvel consistiu de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina, metanol e acetato de etila, com um fluxo de 0,7 ml/min. Um gradiente côncavo foi aplicado de 95:5:0 a 60:20:20 em 20 min, mantendo esta proporção até o final dos 60 minutos de corrida. O tempo de reequilíbrio da coluna levou 15 minutos.

A quantificação dos carotenóides foi realizada por padronização externa. Curvas de calibração construídas com cinco pontos, incluindo as concentrações esperadas das amostras, demonstraram linearidade. Para a obtenção das curvas, soluções dos padrões, nas proporções correspondentes àsquelas encontradas nas amostras analisadas, foram misturadas em balão volumétrico e o volume foi

completado com éter de petróleo, para obtenção de 50mL de mistura final. Alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL foram tomadas em triplicata, levadas à secura com nitrogênio, diluídas em 1mL de acetona grau cromatográfico e injetadas no cromatógrafo.

Os padrões de carotenóides foram extraídos da batata doce (β -caroteno), da couve (luteína), do mamão (β -criptoxantina) e da melancia (licopeno) e isolados por cromatografia em coluna aberta, de acordo com procedimento descrito por Kimura e Rodriguez-Amaya (2002). As purezas foram determinadas por CLAE e ficaram acima de 90%. As concentrações das soluções padrão foram determinadas por espectrofotometria e corrigidas de acordo com as porcentagens de pureza.

Os carotenóides foram identificados pela comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia com padrões e pelo espectro de absorção na região visível, considerando tanto os comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) quanto a estrutura espectral fina (expressa em % III/II) e por reações químicas específicas: acetilação de grupos hidroxílicos por anidrido acético e metilação de hidroxilas em posição alílica por metanol acidificado (Rodriguez-Amaya, 1999).

A bioacessibilidade foi calculada a partir da porcentagem da quantidade de carotenóides presentes nas micelas pela quantidade presente na amostra inicial.

Análise estatística

A análise estatística foi feita mediante teste de Tukey, a um nível de significância de 0,05%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bioacessibilidade dos carotenóides medida através do modelo de digestão *in vitro* nas diferentes matrizes está apresentada Tabela 1.

Todas as amostras analisadas continham β -caroteno em sua composição e fração micelar. A bioacessibilidade deste carotenóide em frutas *in natura* variou de 8,2, em pêssego, a 36% em mamão 'Solo'. Essa variação pode ser explicada, ao menos em parte, pelas diferentes quantidades de fibras presentes em cada fruta, já que as fibras contribuem negativamente para incorporação dos carotenóides às micelas (Riedl *et al.*, 1999; Deming *et al.*, 2000; Zanutto *et al.*, 2002). Contudo, a correlação entre a quantidade de fibras e de β -caroteno foi 0,56, ou seja, não foi muito significativa (Figura 1). Porém se a melancia e o pêssego, as duas frutas cuja correlação não seguiu a linha de tendência, fossem desconsideradas, a correlação subiria para 0,92, ou seja, altamente significativa. Estas duas frutas, segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006), contêm quantidades traço de lipídeos, enquanto que as outras frutas contêm de 0,1 (mamão 'Solo') a 0,4% (goiaba). Os lipídeos, ao contrário das fibras, contribuem de forma positiva para o processo de micelarização dos carotenóides (Borel, 2003; Brown, *et al.*, 2004; Homero-Méndez e Mínguez-Mosquera, 2007).

A estrutura química do carotenóide também influenciou sua bioacessibilidade. No geral, as xantofilas luteína e β -criptoxantina, foram mais assimiladas pelas micelas que os carotenos, β -caroteno e licopeno, concordando com outros trabalhos *in vitro* (Garret *et al.*, 1999; Garret *et al.*, 2000; Reboul *et al.*, 2006; Granado-

Lorencio *et al.*, 2007) e *in vivo* em humanos (Castenmiller *et al.*, 1999; van het Hoff *et al.*, 1999; Granado *et al.*, 2006). As xantofilas, carotenóides que contêm oxigênio, acumulam-se na superfície das gotas lipídicas e os carotenos mais ao centro, tornando a transferência das xantofilas para as micelas, mais eficiente que a transferência dos carotenos (van het Hof *et al.*, 2000; Yonekura e Nagao, 2007).

O licopeno foi o carotenóide menos bioacessível em todas as amostras, concordando com os resultados do Capítulo 2 de outros estudos de bioacessibilidade *in vitro*. No estudo conduzido por Garrett *et al.* (1999), a bioacessibilidade do licopeno foi menor que 0,5% e no de Reboul *et al.* (2006) a porcentagem de micelarização ficou entre 0,1 e 1,6%. Huo *et al.* (2007) encontraram valores de 1 a 5,6%. Tyssandier *et al.* (2003) analisaram a micelarização dos carotenóides *in vivo* e também encontraram valores baixos, em torno de 1,1%. Segundo Boileau *et al.* (1999), a diferença estrutural que confere ao β -caroteno e ao licopeno diferentes colorações, é também responsável pela diferença de incorporação destes carotenóides às micelas. Os anéis do β -caroteno o tornam uma molécula menos extensa que o licopeno, sendo esta a provável causa da menor bioacessibilidade deste carotenóide.

Apesar da forma predominante do licopeno em alimentos ser a *trans*, os seus isômeros *cis* estão presentes em maior concentração no sangue e nos tecidos (Stahl e Sies, 1992; Clinton *et al.* 1996; Boileau *et al.*, 2002; Richelle *et al.*, 2002). *Cis*-isômeros de licopeno têm menor tendência a cristalizar e provavelmente por isso são mais bioacessíveis que a conformação *trans* (Britton, 1995). A Tabela 2 mostra a bioacessibilidade do licopeno nas formas isoméricas *trans* e *cis* das frutas analisadas e

seus produtos processados. Em todas as amostras analisadas a porcentagem de micelarização foi maior para o *cis* licopeno. Outros estudos de biodisponibilidade *in vitro* utilizando fruta gac (Failla *et al.*, 2008) e padrão de licopeno (Boileau *et al.*, 1999) também reportaram que a micelarização do *cis* licopeno foi maior que a do *trans* licopeno.

Ao contrário do licopeno, o *trans*- β -caroteno teve maior bioacessibilidade que seus isômeros *cis* (Tabela 3), concordando com os resultados de estudos *in vivo* com humanos (Stahl *et al.*, 1995; Bem-Amotz e Levy, 1996; Deming *et al.*, 2002).

A porcentagem de micelarização variou muito entre as amostras, sendo que os produtos processados apresentaram maior bioacessibilidade que suas respectivas frutas *in natura*. Para o licopeno, a bioacessibilidade foi de 1,4% para a goiaba não processada, 12% no suco de goiaba e 27% na goiabada. O mesmo pode ser observado com relação ao suco de manga, já que sua bioacessibilidade para o β -caroteno foi 56,8%, valor cerca de 3 vezes maior que os dois cultivares de manga analisados (17,4% para a manga Tommy e 19,2% para a manga Haden). O pêssago enlatado apresentou bioacessibilidades do β -caroteno (21,4%) e da β -criptoxantiina (33,8%) sensivelmente maiores que o pêssago *in natura* (8,2 e 10,8% respectivamente). A influência do processamento na assimilação dos carotenóides pelas micelas também foram observados por outros estudos *in vitro* (Hédren *et al.*, 2002; Hornero-Méndez e Mínguez-Mosquera, 2007; Reboul *et al.*, 2006) e *in vivo* em humanos (Stahl e Sies, 1992; Rock *et al.*, 1998; Borel, 2003; Livny *et al.*, 2003). O processamento dos alimentos contribui para a destruição das paredes celulares e das membranas das organelas nas quais os carotenóides estão localizados. Isto

facilita a ação das enzimas digestivas, a liberação dos carotenóides da matriz e a consequente incorporação às micelas (Yonekura e Nagao, 2007).

Tabela 1. Porcentagem de micelarização (%) dos carotenóides nas frutas cruas e processadas investigadas

Amostra	Bioacessibilidade (%)			
	Carotenóides			
	β -caroteno	β -criptoxantina	Luteína	Licopeno
Goiaba	9,0 $\pm$ 0,4	-	-	1,3 $\pm$ 0,0
Goiaba, suco	12,0 $\pm$ 0,5	-	-	11,7 $\pm$ 1,2
Goiabada	28,0 $\pm$ 1,0	-	-	27,8 $\pm$ 1,1
Mamão 'Solo'	36,0 $\pm$ 1,2	39,2 $\pm$ 1,2	-	8,8 $\pm$ 0,1
Manga "Haden"	19,2 $\pm$ 1,2	-	-	-
Manga "Tommy"	17,4 $\pm$ 0,8	-	-	-
Manga, suco	56,8 $\pm$ 1,5	-	-	-
Melancia	29,7 $\pm$ 0,8	-	-	4,3 $\pm$ 0,2
Pêssego	8,2 $\pm$ 0,0	10,8 $\pm$ 0,1	-	-
Pêssego em calda	21,4 $\pm$ 0,6	33,8 $\pm$ 1,4	-	-
Pitanga	16,0 $\pm$ 1,1	6,3 $\pm$ 0,0	27,3 $\pm$ 1,2	1,0 $\pm$ 0,0

^a médias de triplicatas e desvios padrões.

Tabela 2. Micelarização dos isômeros de licopeno de frutas e seus derivados

Amostra	Licopeno					
	Concentração na amostra teste (μ g/g)		Concentração na micela (μ g/g)		Bioacessibilidade (%)	
	<i>Trans</i>	<i>Cis</i>	<i>Trans</i>	<i>Cis</i>	<i>Trans</i>	<i>Cis</i>
Goiaba	47,6	2,0	0,5	0,2	1,1e	8,0c
Goiaba, suco	49,2	1,8	5,5	0,4	11,2b	25,0b
Goiabada	35,0	2,0	9,1	1,3	25,7a	65,0a
Mamão 'Solo'	30,0	1,1	2,6	0,1	8,7c	9,1c
Melancia	32,2	2,3	1,4	0,1	4,2d	5,2d
Pitanga	56,6	16,8	0,5	0,2	0,9e	1,2e

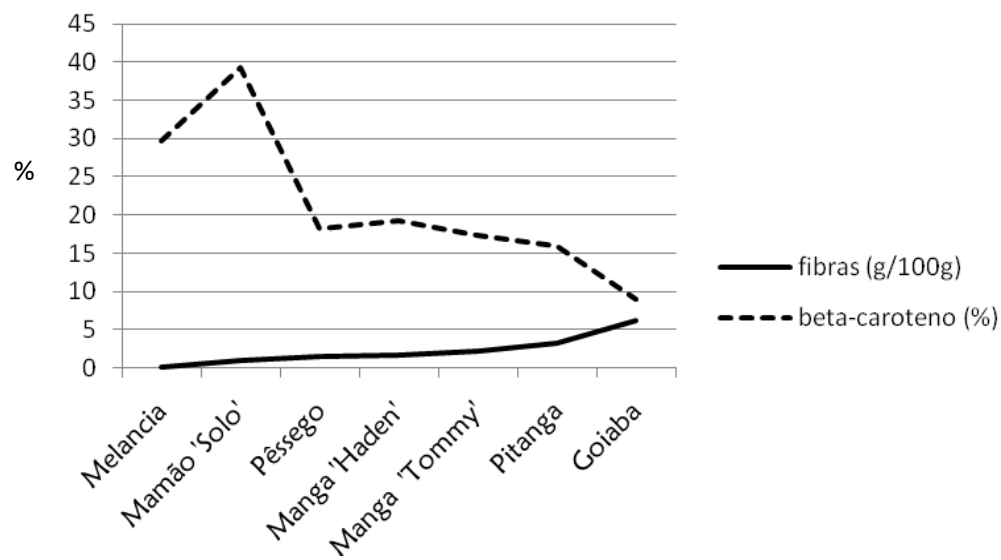
^a médias de triplicatas

Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 3. Micelarização dos isômeros de β -caroteno de frutas e seus derivados

Amostra	β -caroteno					
	Concentração na amostra teste ($\mu\text{g/g}$)		Concentração na micela ($\mu\text{g/g}$)		Bioacessibilidade (%)	
	<i>Trans</i>	<i>Cis</i>	<i>Trans</i>	<i>Cis</i>	<i>Trans</i>	<i>Cis</i>
Goiaba	4,0	tr	0,36	nd	9,0g	0
Goiaba, suco	2,9	tr	0,35	nd	12,0f	0
Goiabada	7,3	1,6	2,3	0,2	31,5c	12,5b
Mamão 'Solo'	1,2	0,2	0,47	0,03	39,2b	15,1a
Manga 'Haden'	9,8	2,4	2,1	0,2	21,5d	8,3c
Manga 'Tommy'	4,1	0,7	0,77	0,06	16,4e	8,5c
Manga, suco	9,7	1,6	6,4	0,02	65,9a	1,2d
Melancia	2,5	tr	0,75	nd	29,7c	0
Pêssego	9,0	tr	0,74	nd	8,2g	0
Pêssego em calda	1,0	0,1	0,22	nd	21,4d	0
Pitanga	11,7	tr	1,87	nd	16,0e	0

^a médias de triplicatasValores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)



Teor de lipídios (g/100) segundo TACO (2006): melancia-tr; mamão 'Solo'-0,1; pêssego-tr; manga Haden-0,3; manga Tommy-0,2; Pitanga-0,2; goiaba-0,4.

Figura 1. Correlação entre teor de fibras e bioacessibilidade dos carotenóides de frutas.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ben-Amotz A e Levy Y. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans-beta-carotene in human serum. *Am J Clin Nutr* 63: 729-734 (1996).

Boileau AC, Merchen NR, Wasson K, Atkinson CA, Erdman JW, Jr. Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J Nutr* 129: 1176-81 (1999).

Boileau TW, Boileau AC, Erdman JW Jr. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Exp Biol Med* 227: 914–919 (2002).

Borel P. Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin Chem Lab Med* 41: 979–994 (2003).

Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 9: 1551–1558 (1995).

Brown MJ, Ferruzzi MG, Nguyen ML, Cooper DA, Eldridge AL, Schwartz SJ, White WS. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr* 80: 396-403 (2004).

Castenmiller JJM, West CE, Linssen JPH, van het Hof KH, Voragen AGJ, The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129: 349-355 (1999).

Chitchumroonchokchai C, Failla ML. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 136: 588-94 (2006).

Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ, Bostwick DG, Williams AW, Moore BJ, Erdman JW. Lycopene stereoisomers, carotenoids and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 5: 823-833 (1996).

Deming DM, Boileau AC, Lee CM, Erdman Jr JW. Amount of dietary fat and type of soluble fiber independently modulate postabsorptive conversion of β -carotene to vitamin A in Mongolian Gerbils. *J Nutr* 130: 2789–2796 (2000).

Deming DM, Teixeira SR, Erdman Jr JW. All-trans- β -carotene appears to be more bioavailable than 9-cis or 13-cis- β -carotene in gerbils given single oral doses of each isomer. *J Nutr* 132: 2700–2708 (2002).

Epler KS, Ziegler RG, Craft NE. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. *J Chromatogr* 619:37-48 (1993).

- Failla ML, Chitchumroonchokchai C, Ishida B. In vitro micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. *J Nutr* 138: 482-486 (2008).
- Garrett DA, Failla ML, Samara RJ. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* 47: 4301-4309 (1999).
- Garrett DA, Failla ML, Sarama RJ. Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J Nutr Biochem* 11: 574-580 (2000).
- Granado F, Olmedilla B, Herrero C, Pérez-Sacristtán B, Blanco I, Blázquez S. Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: in vivo and in vitro assessment. *Exp Biol Med* 231: 1733-1738 (2006).
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Perez-Sacristan B e Blazquez-Garcya S. In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chem* 102: 641–648 (2007).
- Hédren E, Diaz V Svanberg U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *Eur J Clin Nutr* 56: 425–430 (2002).

- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Inn Food Sci Emerg Technol* 8: 407-412 (2007).
- Huo T, Ferruzzi MG, Schwartz SJ, Failla ML. Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J Agric Food Chem* 55: 8950-8957 (2007).
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem* 78: 389-398 (2002).
- Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 26: 459-516 (2005).
- Livny O, Reifen R, Levy I, Madar Z, Faulks R, Southon S, Schwartz B, β -carotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. *Eur J Nutr* 42: 338-345 (2003).
- Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54: 8749-8755 (2006).
- Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M, Applegate LA, Offord EA. A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *J Nutr* 132: 404-408 (2002).

- Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J Nutr* 129: 2170–2176 (1999).
- Rock CL, Lovaldo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW, Schwartz SJ, Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr* 128: 913-916 (1998).
- Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, 64p (1999).
- Rodriguez-Amaya DB. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. *J Food Comp Anal*: in press (2010).
- Rodriguez-Amaya D, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfán J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Comp Anal* 21: 445-463 (2008).
- Stahl W, Schwarz W, Laar JV, Sies H. All-trans β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cis geometrical isomer. *J Nutr* 125: 2128-2133 (1995).
- Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr* 122: 2161-2166 (1992).

TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos) /NEPA-UNICAMP - Versão II. 2006. Campinas: NEPA-UNICAMP, 105p.

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 58: 100-110 (2004).

Thakkar SK, Maziya-Dixon B, Dixon AG, Failla ML. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137: 2229-33 (2007).

Tyssandier V, Reboul E, Dumsa J-F, Bouteloup-Demange C, Armand M, Marcand J, Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G913-G923 (2003).

van het Hof K, Brouwer IA, West CE, Haddeman E, Steegers-Theunissen RPM, van Dusseldorp M, Weststrate JA, Eskes TKAB, Howtvast JGAJ, Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. *Am J Clin Nutr* 70: 261–268 (1999).

van het Hof K, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130: 503–506 (2000).

Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83: 1265–1271 (2006).

Yonekura L, Nagao A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51: 107-115 (2007).

Zanutto ME, Jordao Junior AA, Meirelles MS, Favaro RM, Vannucchi H. Effect of citric pectin on beta-carotene bioavailability in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 72: 199-203 (2002).

CAPÍTULO 5

Composição e Bioacessibilidade *In Vitro* de Carotenóides de Frutas Amazônicas

Composição e Bioacessibilidade *In Vitro* de Carotenóides de Frutas Amazônicas

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira, Michelle Andriati Sentanin e

Delia B Rodriguez Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Carotenóides são compostos bioativos muito estudados devido à sua associação com a diminuição de doenças degenerativas e atividade pró-vitâmica A de alguns deles. O Brasil tem, hoje, o maior banco de dados sobre carotenóides do mundo, porém a determinação da composição deve ser complementada pela investigação da biodisponibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioacessibilidade de carotenóides em frutas amazônicas: buriti, pupunha (crua e cozida) e tucumã, utilizando um método de determinação *in vitro*. Das três frutas analisadas, a pupunha apresentou a maior bioacessibilidade quanto ao β -caroteno (40%) e ainda teve 37% e 39% de bioacessibilidade de γ - e δ -caroteno, respectivamente e tucumã e buriti apresentaram menores bioacessibilidades de β -caroteno (30% e 28%, respectivamente), porém, teores iniciais (147 e 150 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) aproximadamente três vezes maiores que a pupunha (48 $\mu\text{g/g}$ crua e 47 $\mu\text{g/g}$ cozida). O tucumã também apresentou 20% de bioacessibilidade de α -caroteno. Esses dados mostraram que além de ótimas fontes, os carotenóides destas frutas são mais bioacessíveis que os de outras frutas produzidas comercialmente.

Palavras-chave: carotenóides; bioacessibilidades; buriti; tucumã; pupunha.

INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos naturais encontrados principalmente em várias frutas. São compostos muito estudados por seu envolvimento na saúde humana já que alguns carotenóides são pró-vitamínicos A e mesmo aqueles que não possuem atividade pró-vitamínica são considerados importantes antioxidantes, atuando na diminuição do desenvolvimento de certas patologias crônicas não transmissíveis degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata. (Olson, 1999; Tapiero *et al.*, 2004; Voutilainen *et al.*, 2006; Nishino *et al.*, 2009).

Com seu extenso território, especialmente de áreas tropicais e subtropicais, onde o clima contribui para promover a biossíntese de carotenóides, o Brasil oferece uma grande variedade de alimentos ricos nestes compostos, uma boa parte dos quais já foi analisada e integrada no maior banco de dados do mundo (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

As frutas amazônicas pupunha (*Bactris gasipae*) (Rodriguez-Amaya, 1996), tucumã (*Astrocaryum vulgare*) (Rodriguez-Amaya 1996; Marinho e Castro, 2002; De Rosso e Mercadante, 2007) e o buriti (*Mauritia vinifera*) (Godoy e Rodriguez-Amaya, 1995; De Rosso e Mercadante, 2007) são altamente carotenogênicos. O buriti é o produto alimentar detentor da maior concentração conhecida de β -caroteno dentro da vasta gama já analisada de alimentos brasileiros (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

Os dados de composição são muito úteis, porém devem ser complementados por dados sobre a biodisponibilidade e a bioacessibilidade dos carotenóides. Métodos de determinação de biodisponibilidade *in vivo* são complicados, caros, e demandam tempo; poucos alimentos podem ser estudados de cada vez, além de requererem uma equipe grande de pesquisadores. Por isso, a utilização de metodologias *in vitro*, mais rápidas, simples e menos onerosas, constituem uma boa ferramenta para avaliar os diferentes fatores que podem influenciar a incorporação dos carotenóides às micelas em um grande número de amostras.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioacessibilidade *in vitro* dos carotenóides das frutas amazônicas carotenogênicas pupunha, tucumã e buriti e o efeito do cozimento na bioacessibilidade da pupunha.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e enzimas

Para as etapas pré-cromatográficas foram utilizados reagentes de grau analítico e aqueles utilizados nas etapas cromatográficas foram de grau HPLC. As enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina, lipase, carboxil éster lipase e extrato biliar foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Preparo da amostra teste

30 kg de cada fruta (pupunha, tucumã e buriti) foram adquiridos de quatro grandes fornecedores das cidades de Manaus – AM e Belém – PA. De cada 30 kg,

foram retirados 3 kg de polpa que foram homogeneizados em processador de alimentos. Desta amostra composta retirou-se 3 sub-amostras para a determinação da composição e bioacessibilidade dos carotenóides.

O fruto da pupunha foi cozido em água de fervura durante 20 minutos na ausência de luz. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Determinação da bioacessibilidade *in vitro*

O método de determinação de carotenóides *in vitro* baseou-se em uma metodologia desenvolvida por Garrett *et al.* (1999), incorporando modificações de Reboul *et al.* (2006), Chitchumroonchokchai e Failla (2006), Thakkar *et al.* (2007). Este método modificado foi previamente avaliado no Capítulo 2.

As frutas foram descascadas e homogeneizadas em processador de alimentos por um minuto e meio para simular a mastigação.

Foram pesados 3 g de cada amostra em um tubo de centrífuga de 50 ml, no qual foram adicionados 7 mL de uma solução de α -amilase (9000 U) para simulação da fase oral. Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 10 minutos. Para a fase gástrica, o pH foi ajustado para 4 adicionando-se HCl 1 M e adicionou-se 2 mL de solução de pepsina em HCl 0,1M (40 mg/mL). Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos. Para a fase intestinal, o pH foi ajustado para 6 adicionando-se NaHCO₃ 0,9M e então, adicionou-se 4 mL de solução de extrato biliar (1g/mL), 2 ml de solução de lipase e

pancreatina (5 e 10 mg/mL), 50 U de colesterol esterase e incubou-se em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos a 37 °C.

A fração micelar (fase aquosa) foi separada das partículas de alimentos e de para microcristais de carotenóides não micelarizados por centrifugação a 5.000 g, 4 °C por 45 minutos (Allegra 64R High-Speed Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA). Imediatamente após a centrifugação a fase aquosa foi coletada e filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore) para remover microcristais de carotenóides não micelarizados.

Análise de carotenóides

Foram determinados os teores de carotenóides na polpa de 3 g de cada amostra teste, de 25 ml das digestas e de 25 ml das frações aquosas após micelarização. A determinação de carotenóides foi realizada de acordo com procedimento descrito por Kimura e Rodriguez-Amaya (2002). Os carotenóides foram extraídos com acetona, homogeneizados por um minuto em homogeneizador Polytron (Kinematica AG – Suíça) e filtrados em funil de placa sinterizado. A homogeneização e filtração foram feitas de 3 a 4 vezes até remoção total da cor. Os carotenóides foram transferidos, aos poucos, para aproximadamente 30 mL de éter de petróleo com 10 ml de éter etílico em funil de separação, seguido pela adição de água, separação das fases e descarte da fase inferior de água-acetona após cada adição. Quando todos os carotenóides estavam

transferidos para o éter, a fase etérea foi lavada três ou quatro vezes com água para a remoção da acetona.

O extrato etéreo das frutas foi saponificado com uma solução de 10% de KOH em metanol em volume igual ao extrato e aproximadamente 0,3 g de BHT. A mistura foi deixada no escuro durante 16 horas à temperatura ambiente e seguiu-se novamente a partição para éter etílico e éter de petróleo. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo ($T < 36^{\circ} \text{C}$) e seco com nitrogênio. Imediatamente antes da injeção, os carotenóides foram redissolvidos em 1 ml de acetona e filtrados em filtro PTFE 0,22 μm .

As análises cromatográficas foram realizadas em um módulo de separação da Waters (modelo 2690, Milford, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos UV-visível (modelo Waters 996), controlado por “software” Millennium (versão 2010). Utilizou-se uma coluna monomérica C_{18} , Spherisorb ODS2 (4,6 x 150mm, 3 μm) (Waters Corp, Milford, EUA). A fase móvel consistiu de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina, metanol e acetato de etila, com um fluxo de 0,7 ml/min. Um gradiente côncavo foi aplicado de 95:5:0 a 60:20:20 em 20 min, mantendo esta proporção até o final dos 60 minutos de corrida. O tempo de reequilíbrio da coluna levou 15 minutos.

A quantificação dos carotenóides foi realizada por padronização externa. Curvas de calibração construídas com cinco pontos, incluindo as concentrações esperadas das amostras, demonstraram linearidade. Para a obtenção das curvas, soluções dos padrões, nas proporções correspondentes àsquelas encontradas nas

amostras analisadas, foram misturadas em balão volumétrico e o volume foi completado com éter de petróleo, para obtenção de 50 mL de mistura final. Alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL foram tomadas em triplicata, levadas à secura com nitrogênio, diluídas em 1mL de acetona grau cromatográfico e injetadas no cromatógrafo.

Os padrões de carotenóides foram extraídos da batata doce (β -caroteno), da cenoura (α -caroteno) e da pupunha (δ -caroteno e γ -caroteno) e isolados por cromatografia em coluna aberta. As purezas foram determinadas por CLAE e ficaram acima de 90%. As concentrações das soluções padrão foram determinadas por espectrofotometria e corrigidas de acordo com as porcentagens de pureza.

Os carotenóides foram identificados pela comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia com padrões e pelo espectro de absorção na região visível, considerando tanto os comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) quanto a estrutura espectral fina (expressa em % III/II) e por reações químicas específicas: acetilação de grupos hidroxílicos por anidrido acético e metilação de hidroxilas em posição alílica por metanol acidificado (Rodriguez-Amaya, 1999).

A bioacessibilidade foi calculada a partir da porcentagem da quantidade de carotenóides presentes nas micelas pela quantidade presente na amostra inicial.

Análise estatística

A análise estatística foi feita mediante teste de Tukey, a um nível de significância de 0,05%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de carotenóides obtidos nas amostras de pupunha (crua e cozida), tucumã e buriti estão na Tabela 1. Todas as frutas apresentaram como carotenóide majoritário o β -caroteno. O cozimento da pupunha causou isomerização do β -caroteno (45,9 $\mu\text{g/g}$ de *trans*- β -caroteno para a pupunha crua e 35,9 $\mu\text{g/g}$ para a pupunha cozida). Rodriguez-Amaya (1996) encontrou teores bem menores de β -caroteno na pupunha cozida (22 $\mu\text{g/g}$). Além do β -caroteno a pupunha também apresentou em sua composição o γ -caroteno, que assim como o β -caroteno também é pró-vitâmico A e o não pró-vitâmico δ -caroteno (Figura 1).

O buriti e o tucumã apresentaram teores maiores de β -caroteno (150 e 147 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) que a pupunha. Rodriguez-Amaya (1995) encontraram menor teor para o tucumã (99 $\mu\text{g/g}$). Godoy e Rodriguez-Amaya (1995), utilizando metodologia de coluna aberta encontraram maiores teores de β -caroteno para o buriti (360 $\mu\text{g/g}$). De Rosso e Mercadante (2007) encontraram 513 $\mu\text{g/g}$ de carotenóides totais em buriti, mas apenas 63 $\mu\text{g/g}$ em tucumã.

As concentrações de β -caroteno destas frutas amazônicas são marcadamente maiores que as encontradas em outros alimentos reconhecidamente ricos em β -caroteno como a cenoura (em torno de 30 $\mu\text{g/g}$) (Almeida-Muradian *et al.*, 1997; Godoy e Rodriguez-Amaya, 1998).

Conforme se pode observar na Tabela 2, das três frutas analisadas, a pupunha cozida apresentou 37% e 39% de bioacessibilidade de γ - e δ -caroteno, respectivamente, e a maior bioacessibilidade quanto ao teor de β -caroteno (40%).

Vários estudos demonstraram que o processamento térmico influencia positivamente na biodisponibilidade dos carotenóides (Livny *et al.*, 2003; Veda *et al.*, 2006; Hedrén *et al.*, 2002; Hornero-Méndez e Minguez-Mosquera, 2007; Aherne *et al.*, 2010).

Tucumã e buriti apresentaram 30 e 28% de bioacessibilidades de β -caroteno, respectivamente. Estes valores são ligeiramente menores que os encontrados para mamão ‘Solo’ (36%), porém estes são maiores que aqueles encontrados em duas variedades de manga (17% para manga ‘Haden’ e 19% para a manga ‘Tommy Atkins’ (Capítulo 4) e em cenoura (3,6%) (Capítulo 2). O α -caroteno do tucumã teve 20% de bioacessibilidade.

As frutas amazônicas analisadas neste estudo possuem mais fibras que a grande maioria das frutas usualmente consumidas. Por exemplo, o tucumã possui 12,7 g/100g de fibras e a pupunha, 4,3g/100 (TACO, *in press*), enquanto que a manga ‘Haden’ e o mamão ‘Solo’ possuem 1,6 e 1,0g/100g, respectivamente. Esta característica poderia, segundo dados de estudos *in vivo* com humanos (Rock e Swendseid, 1992; Riedl *et al.*, 1999), contribuir negativamente para a incorporação dos carotenóides às micelas, no entanto, não foi o que ocorreu. A alta taxa de micelarização provavelmente se deve pela grande quantidade de lipídeos contidos nestas frutas (19,1 e 12,8 g/100g o tucumã e a pupunha cozida, respectivamente) (TACO, *in press*) que, ao contrário das fibras, exercem um papel positivo na bioacessibilidade dos carotenóides (Hu *et al.* 2000; Roodenburg *et al.*, 2000; Borel *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004; Unlu *et al.*, 2005).

CONCLUSÃO

Os dados deste trabalho mostram que além das frutas amazônicas buriti, tucumã e pupunha constituírem ótimas fontes de carotenóides, eles também são, no geral, mais bioacessíveis que outras fontes.

Tabela 1. Composição de carotenóides de frutas amazônicas ^a

Amostras	Carotenóides (µg/g)					
	β-caroteno total	β-caroteno <i>trans</i>	γ-caroteno total	δ-caroteno total	δ-caroteno <i>trans</i>	α-caroteno total
Pupunha crua	48,5	45,9	23,2 ± 0,7	40,6 ± 1,2	17,4 ± 0,3	
Pupunha cozida	47,4	35,9	21,8 ± 0,2	39,3 ± 0,7	17,9 ± 0,7	
Tucumã	146,9 ± 3,3	142,6 ± 3,2				
Buriti	150,3 ± 5,5	116,2 ± 4,6				5,3 ± 0,4

^a médias de triplicatas e desvios padrões.

Tabela 2. Porcentagem de micelarização (%) dos carotenóides nas frutas amazônicas ^a

Amostras	Carotenóides			
	β-caroteno	γ-caroteno	δ-caroteno	α-caroteno
Pupunha crua	12,7c	6,6b	7,9b	
Pupunha cozida	39,7a	36,7a	38,7a	
Tucumã	30,2b			
Buriti	28,7b			20,1

^a médias de triplicatas

Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

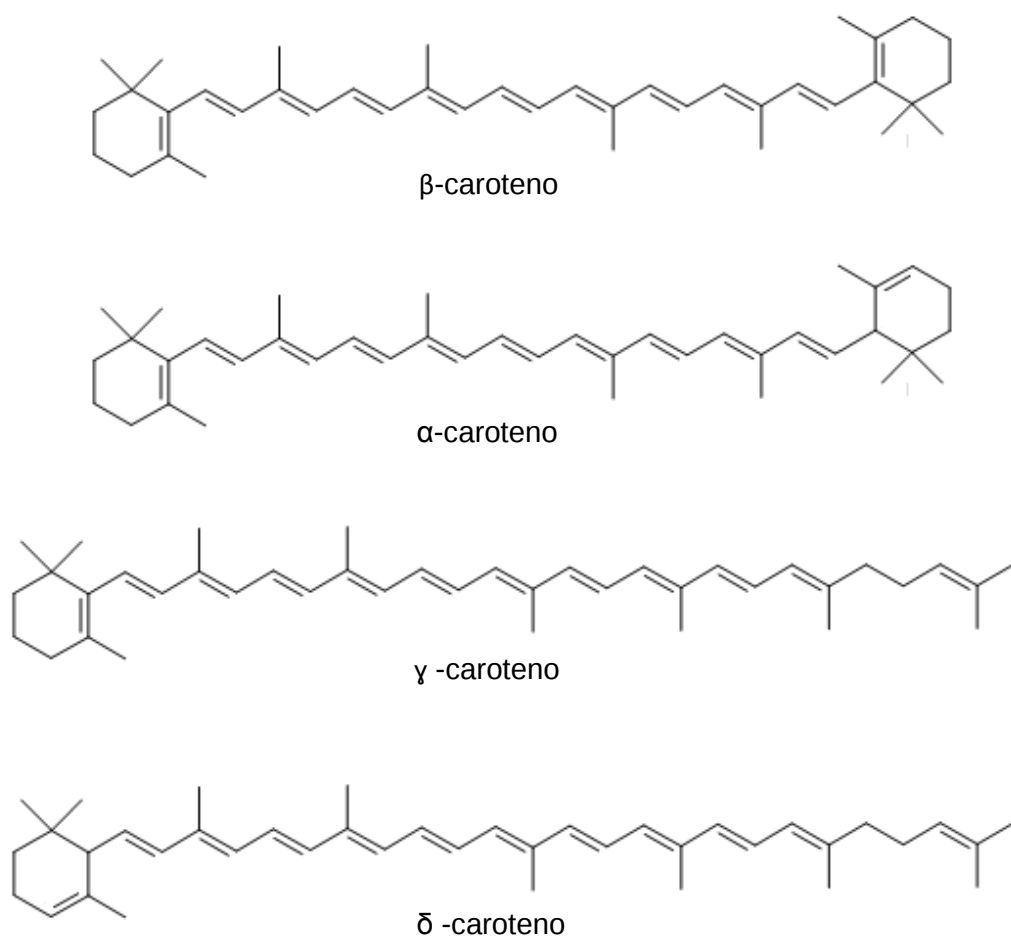


Figura 1. Estruturas químicas dos carotenóides das frutas amazônicas.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aherne SA, Daly T, Jiwan MA, O'Sullivan L, O'Brien NM. Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. *Food Res Intern* 43: 1449-1454 (2010).

Almeida-Muradian LB, Popp V, Farias MP. Provitamin A activity of Brazilian carrots: leaves and roots, raw and cooked and their chemical composition. *Revista CBCTA* 17: 120-124 (1997).

Borel P. Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin Chem Lab Med* 41: 979–994 (2003).

Brown MJ, Ferruzzi MG, Nguyen ML, Cooper DA, Eldridge AL, Schwartz SJ, White WS. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr* 80: 396-403 (2004).

Chitchumroonchokchai C, Failla ML. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 136: 588-94 (2006).

- De Rosso VV, Mercadante AZ. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruit J Agric Food Chem 55: 5062–5072 (2007).
- Garrett DA, Failla ML, Samara RJ. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. J Agric Food Chem 47: 4301-4309 (1999).
- Godoy HT, Rodriguez-Amaya DB. Buriti (*Mauritia vinifera* Mart), uma fonte riquíssima de pro-vitamina A. Arq Biol Tecnol 38: 109-120 (1995).
- Godoy HT, Rodriguez-Amaya DB. Occurrence of cis isomers of provitamins A in Brazilian vegetables. J Agric Food Chem 46: 3081-3086 (1998).
- Hedré E, Diaz V, Svanberg U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. Eur J Clin Nutr 56: 425–430 (2002).
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. Inn Food Sci Emerg Technol 8: 407-412 (2007).
- Hu X, Jandacek RJ, White WS, Intestinal absorption of β -carotene ingested with a meal rich in sunflower oil or beef tallow: postprandial appearance in triacylglycerol-rich lipoproteins in women. Am J Clin Nutr 71: 1170-1180 (2000).

- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem* 78: 389-398 (2002).
- Livny O, Reifen R, Levy I, Madar Z, Faulks R, Southon S, Schwartz B, β -carotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. *Eur J Nutr* 42: 338-345 (2003).
- Marinho HA, Castro JS. Carotenoides e valor de pró-vitamina A em frutos da região Amazonica: Pajura, piquia, tucuma e umari. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 27. Anais. Belém, Brasil (2002).
- Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, Satomi Y. Cancer prevention by carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 483: 165-168 (2009).
- Olson JA, Carotenoids and human health. *Arch. Latinoamer Nutr* 49: 7-11 (1999).
- Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54: 8749-8755 (2006).
- Riedl J, Linseisen J, Hoffmann J, Wolfram G. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J Nutr* 129: 2170–2176 (1999).
- Rock CL, Swendseid ME. Plasma β -carotene response in human after meals supplemented with dietary pectin. *Am J Clin Nutr* 55: 96–99 (1992).

- Rodriguez-Amaya D, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfán J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Comp Anal* 21: 445-463 (2008).
- Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, 64p (1999).
- Rodriguez-Amaya DB. Assessment of the provitamin A contents of foods – The Brazilian experience. *J Food Comp Anal* 9: 196-230 (1996).
- Roodenburg AJC, Leenen R, van het Hof KH, Weststrate JA, Tijburg LBM. Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr* 71: 1187-1193 (2000).
- TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos)/ NEPA-UNICAMP - Versão III. Campinas: NEPA-UNICAMP, *in press*.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 58: 100-110 (2004).
- Thakkar SK, Maziya-Dixon B, Dixon AG, Failla ML. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137: 2229-2233 (2007).

Unlu NZ, Bohn T, Clinton SK, Schwartz SJ. Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *J Nutr* 135: 431-436 (2005).

Veda S, Kamath A, Platel K, Begum K, Srinivasan K. Determination of bioaccessibility of beta-carotene in vegetables by in vitro methods. *Mol Nutr Food Res* 50: 1047-1052 (2006).

Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83: 1265–1271 (2006).

CAPÍTULO 6

Efeito da Microencapsulação na Bioacessibilidade dos Carotenóides de Pitanga

Efeito da Microencapsulação na Bioacessibilidade dos Carotenóides de Pitanga

Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira, José Emilson Macêdo Ferreira e
Delia Rodriguez Amaya

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, CEP13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Resumo

A pitanga (*Eugenia uniflora* L.) é uma fruta tropical brasileira fonte de carotenóides e flavonóides que são compostos bioativos associados com a redução no risco de doenças crônicas não transmissíveis degenerativas. O processamento de alimentos deve ser avaliado, além da retenção, pelos efeitos na biodisponibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioacessibilidade dos carotenóides em polpa de pitanga *in natura* e microencapsulada por *spray dryer* com diferentes materiais de parede (maltodextrina, amido modificado e goma arábica). O licopeno apresentou baixa bioacessibilidade (1%) em todas as amostras analisadas mesmo contendo altos teores em todas as matrizes. A maior bioacessibilidade foi da luteína (6 a 27%) apesar do seu baixo teor inicial (2,5 µg/g na microcápsula de goma arábica a 4,7 µg/g microcápsula de maltodextrina). Entre os carotenóides pró-vitamínicos A, a bioacessibilidade do β-caroteno (4% na microcápsula de maltodextrina a 16% na polpa) foi maior que da β-criptoxantina (3% na microcápsula de maltodextrina a 6% na polpa e microcápsula de goma arábica). Dentre os materiais de parede estudados, a goma arábica apresentou a melhor bioacessibilidade para todos os carotenóides.

Palavras-chave: pitanga; bioacessibilidade; carotenóides; microencapsulação.

INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos funcionais e produtos alimentícios cada vez mais sofisticados vem levando ao aprimoramento de técnicas de prevenção de perdas por oxidação de compostos bioativos. Uma das técnicas mais utilizadas para esta proteção é a microencapsulação, que consiste na formação de membranas ou sistemas de paredes que envolvem gotas ou partículas do material microencapsulado ou recheio (Shu *et al.*, 2006).

Dentre os compostos funcionais, um dos mais susceptíveis à perdas por oxidação são os carotenóides. A retenção destes compostos em alimentos é de suma importância pelas suas ações promotoras da saúde humana. Há um grande número de evidências científicas que relacionam o alto consumo de frutas e hortaliças ricas em carotenóides com a diminuição do risco de se desenvolver doenças crônicas não transmissíveis (Olson, 1999; Tapiero *et al.*, 2004; Voutilainen *et al.*, 2006; Nishino *et al.*, 2009) e uma das frutas mais ricas nestes compostos é a pitanga (*Eugenia uniflora* L) (Porcu e Rodriguez-Amaya, 2008).

A pitanga é uma fruta tropical brasileira rica em carotenóides como o licopeno, rubixantina, luteína e os pró-vitamínicos A, β -caroteno e β -criptoxantina (Porcu e Rodriguez-Amaya, 2008). Apesar de estudos terem sido feitos a fim de determinar a composição dos carotenóides em pitanga e produtos derivados, pesquisas sobre a sua absorção nunca foram realizadas. Estudos sobre bioacessibilidade dos carotenóides são importantes para se indicar a fração destes

compostos transferidos durante a digestão para as micelas e disponíveis para a absorção intestinal e utilização pelo corpo humano.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioacessibilidade *in vitro* da polpa de pitanga *in natura* e microencapsulada por *spray drying* com diferentes materiais de parede (maltodextrina, amido modificado e goma arábica).

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes, enzimas e materiais de parede

Para as etapas pré-cromatográficas foram utilizados reagentes de grau analítico e aqueles utilizados nas etapas cromatográficas foram de grau HPLC. As enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina, lipase, carboxil éster lipase e extrato biliar foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A maltodextrina foi fornecida pela Corn Products Brazil (Mogi Guaçu/SP). O amido modificado pela National Starch Brazil (Trombudo Central/SC) e a goma arábica pela Colloids Naturels Brazil - Instant Gum BA (São Paulo/SP).

Preparo da amostra teste

A pitanga, adquirida no CEASA de Recife – Pernambuco, transportada por via aérea foi despulpada manualmente. A polpa e os materiais de parede foram pesados em proporções previamente otimizadas (25:75). A homogeneização das soluções/dispersões em meio aquoso foi feita com o auxílio de Polytron (PT-2100, Kinematica GA, Luzernerstrasse, GE), a 15.000 rpm por 5 minutos e em temperatura

ambiente. Na secagem por *spray drying* (Lab-Plant, modelo SD-04, Huddersfield, UK), as soluções/dispersões foram mantidas sob agitação contínua (agitador mecânico com barra magnética) a 30°C. A temperatura de secagem foi de 150°C. A pressão do ar foi de 5 kgf/cm², num fluxo de 13 mL/minuto e com bico aspersor de 2mm.

Imediatamente antes do início da digestão *in vitro*, 3 g de material microencapsulado foram hidratados com 7 ml de água para hidratação das microcápsulas. As amostras foram analisadas em triplicatas.

Determinação da bioacessibilidade *in vitro*

O método de determinação da bioacessibilidade de carotenóides *in vitro* baseou-se em uma metodologia desenvolvida por Garrett *et al.* (1999), incorporando modificações de Reboul *et al.* (2006), Chitchumroonchokchai e Failla (2006), Thakkar *et al.* (2007). Este método modificado foi previamente avaliado no Capítulo 2.

Foram pesados 3 g de cada amostra (polpa de pitanga ou microcápsulas hidratadas) em um tubo de centrífuga de 50 ml, no qual foram adicionados 7 mL de uma solução de α -amilase (9000 U) para simulação da fase oral. Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 10 minutos. Para a fase gástrica, o pH foi ajustado para 4 com HCl 1 M e adicionou-se 2 mL de solução de pepsina em HCl 0,1M (40 mg/mL). Esta mistura foi incubada em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos. Para a fase intestinal, o pH foi ajustado para 6 com

NaHCO₃ 0,9M e então, adicionou-se 4 mL de solução de extrato biliar (1g/mL), 2 ml de solução de lipase e pancreatina (5 e 10 mg/mL), 50 U de colesterol esterase e incubou-se em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos a 37 °C.

A fração micelar (fase aquosa) foi separada das partículas de alimentos e de para microcristais de carotenóides não micelarizados por centrifugação a 5.000 g, 4 °C por 45 minutos (Allegra 64R High-Speed Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA). Imediatamente após a centrifugação a fase aquosa foi coletada e filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore) para remover microcristais de carotenóides não micelarizados.

Análise de carotenóides

Foram determinados os teores de carotenóides de 3 g de cada amostra teste, de 25 ml das digestas e de 25 ml das frações aquosas após micelarização. A determinação de carotenóides foi realizada de acordo com procedimento descrito por Kimura e Rodriguez-Amaya (2002). Os carotenóides foram extraídos com acetona, homogeneizados por um minuto em homogeneizador Polytron (Kinematica AG – Suíça) e filtrados em funil de placa sinterizado. A homogeneização e filtração foram feitas de 3 a 4 vezes até remoção total da cor. Os carotenóides foram transferidos, aos poucos, para aproximadamente 30 mL de éter de petróleo com 10 ml de éter etílico em funil de separação, seguido pela adição de água, separação das fases e descarte da fase inferior de água-acetona após cada adição.

Quando todos os carotenóides estavam transferidos para o éter, a fase etérea foi lavada três ou quatro vezes com água para a remoção da acetona.

O extrato etéreo da polpa de pitanga foi saponificado com uma solução de 10% de KOH em metanol em volume igual ao extrato e aproximadamente 0,3 g de BHT. A mistura foi deixada no escuro durante 16 horas à temperatura ambiente e seguiu-se novamente a partição para éter etílico e éter de petróleo. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo ($T < 36^{\circ} \text{C}$) e seco com nitrogênio. Imediatamente antes da injeção, os carotenóides foram redissolvidos em 1 ml de acetona e filtrados em filtro PTFE 0,22 μm .

As análises cromatográficas foram realizadas em um módulo de separação da Waters (modelo 2690, Milford, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos UV-visível (modelo Waters 996), controlado por “software” Millennium (versão 2010). Utilizou-se uma coluna monomérica C_{18} , Spherisorb ODS2 (4,6 x 150mm, 3 μm) (Waters Corp, Milford, EUA). A fase móvel consistiu de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina, metanol e acetato de etila, com um fluxo de 0,7 ml/min. Um gradiente côncavo foi aplicado de 95:5:0 a 60:20:20 em 20 min, mantendo esta proporção até o final dos 60 minutos de corrida. O tempo de reequilíbrio da coluna levou 15 minutos.

A quantificação dos carotenóides foi realizada por padronização externa. Curvas de calibração construídas com cinco pontos, incluindo as concentrações esperadas das amostras, demonstraram linearidade. Para a obtenção das curvas, soluções dos padrões, nas proporções correspondentes àsquelas encontradas nas

amostras analisadas, foram misturadas em balão volumétrico e o volume foi completado com éter de petróleo, para obtenção de 50 mL de mistura final. Alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL foram tomadas em triplicata, levadas à secura com nitrogênio, diluídas em 1mL de acetona grau cromatográfico e injetadas no cromatógrafo.

Os padrões de carotenóides foram extraídos da batata doce (β -caroteno), da couve (luteína), do mamão (β -criptoxantina) e da melancia (licopeno) e isolados por cromatografia em coluna aberta (Kimura e Rodriguez Amaya, 2002). As purezas foram determinadas por CLAE e ficaram acima de 90%. As concentrações das soluções padrão foram determinadas por espectrofotometria e corrigidas de acordo com as porcentagens de pureza.

Os carotenóides foram identificados pela comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia com padrões e pelo espectro de absorção na região visível, considerando tanto os comprimentos de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) quanto a estrutura espectral fina (expressa em % III/II) e por reações químicas específicas: acetilação de grupos hidroxílicos por anidrido acético e metilação de hidroxilas em posição alílica por metanol acidificado (Rodriguez-Amaya, 1999).

A bioacessibilidade foi calculada a partir da porcentagem da quantidade de carotenóides presentes nas micelas pela quantidade presente na amostra inicial.

Análise estatística

A análise estatística foi feita mediante teste de Tukey, a um nível de significância de 0,05%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de carotenóides e as porcentagens de micelarização estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. O licopeno apresentou baixa bioacessibilidade (<0,5 a 1%) em todas as amostras analisadas mesmo apresentando altos teores (Tabela 1) (74 a 128 µg/g na polpa de pitanga *in natura* e na amostra microencapsulada com maltodextrina respectivamente), concordando com os resultados de outros trabalhos de biacessibilidade *in vitro*. No estudo conduzido por Garrett *et al.* (1999), a bioacessibilidade do licopeno foi menor que 0,5% e no de Reboul *et al.* (2006), a porcentagem de micelarização ficou entre 0,1 e 1,6%. Huo *et al.* (2007) encontraram valores de 1 a 5,6%. Tyssandier *et al.* (2002) analisaram a micelarização dos carotenóides *in vivo* e também encontraram valores baixos, em torno de 1,1%.

Em todas as matrizes a maior bioacessibilidade foi da luteína (7 a 27%) apesar do seu baixo teor inicial (2,5 µg/g na microcápsula de goma arábica a 4,7 µg/g na microcápsula de maltodextrina). Estudos *in vivo* indicaram que a luteína é mais biodisponível que o β-caroteno (Castenmiller *et al.*, 1999; Gärtner *et al.*, 1996; van het Hof *et al.*, 1999). Devido a diferença de hidrofobicidade, as xantofilas acumulam-se na superfície das gotas lipídicas emulsificadas e os carotenos mais ao

centro, tornando a transferência das xantofilas para as micelas mais eficiente que a transferência dos carotenos (van het Hof *et al.*, 2000; Yonekura e Nagao, 2007). Apesar disso, a β -criptoxantina, que também é um carotenóide hidroxilado, teve menor absorção pelas micelas que o β -caroteno em todas as amostras analisadas.

O efeito da microencapsulação na bioacessibilidade dos carotenóides depende no material de parede utilizado. A microencapsulação com maltodextrina diminuiu significativamente a bioacessibilidade de todos os carotenóides, enquanto as perdas de bioacessibilidade foram menores com goma arábica. O amido modificado teve um efeito intermediário.

Coincidentemente, no estudo de Kobori (2010), a goma arábica foi também o material de parede que ofereceu maior proteção de β -caroteno de acerola durante estocagem.

Tabela 1. Composição de carotenóides de polpa de pitanga ($\mu\text{g/g}$) *in natura* e microencapsulada^a

Amostra de polpa de pitanga	Carotenóides ($\mu\text{g/g}$)			
	Licopeno total	β -caroteno total	β -criptoxantina total	Luteína total
<i>In natura</i>	73,5 $\pm$ 1,7	11,9 $\pm$ 0,3	44,4 $\pm$ 1,3	4,2 $\pm$ 0,2
Microencapsulada (MD)	128,3 $\pm$ 1,9	12,0 $\pm$ 0,5	60,6 $\pm$ 2,8	4,7 $\pm$ 0,1
Microencapsulada (AM)	106,4 $\pm$ 1,4	10,3 $\pm$ 0,6	58,7 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,1
Microencapsulada (GA)	94,0 $\pm$ 2,8	67,3 $\pm$ 2,8	60,8 $\pm$ 2,8	2,5 $\pm$ 0,0

MD – maltodextrina; AM – amido modificado; GA – goma arábica.

^amédias e desvios padrões de triplicatas.

Tabela 2. Bioacessibilidade (%) de carotenóides de polpa de pitanga *in natura* e microencapsulada^a

Amostra de polpa de pitanga	Bioacessibilidade (%)			
	Licopeno total	β -caroteno total	β -criptoxantina total	Luteína total
<i>In natura</i>	1,1a	15,9a	6,3a	27,3a
Microencapsulada (MD)	< 0,5b	4,1c	3,2b	6,6d
Microencapsulada (AM)	1,0a	12,8b	3,9b	14,5c
Microencapsulada (GA)	1,0a	11,4b	6,2a	21,1b

MD – maltodextrina; AM – amido modificado; GA – goma arábica.

^amédias e desvios padrões de triplicatas.

Valores da mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Agradecimentos: Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castenmiller JJM, West CE, Linssen JPH, van het Hof KH, Voragen AGJ. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129: 349-355 (1999).
- Chitchumroonchokchai C e Failla ML. Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 136: 588-94 (2006).
- Garret DA, Failla ML, Samara RJ. Development of an in Vitro Digestion Method To Assess Carotenoid Bioavailability from Meals. *J Agric Food Chem* 47: 4301-4309 (1999).
- Gärtner C, Stahl W, Sies H, Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to b-carotene in the human. *Int J Vitamin Nutr Res* 66, 119–125 (1996).
- Huo T, Ferruzzi MG, Schwartz SJ, Failla ML. Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J Agric Food Chem* 55: 8950-8957 (2007).
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem* 78: 389-398 (2002).

Kobori CN, Optimization of microencapsulation by spray drying. Satability of β -carotene and vitamin C in microencapsulated acerola. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (2010).

Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, Satomi Y. Cancer prevention by carotenoids. Arch Biochem Biophys 483: 165-168 (2009).

Olson JA, Carotenoids and human health. Arch Latinoamer Nutr 49: 7-11 (1999).

Porcu O, Rodriguez-Amaya DB. Variation in the carotenoid composition of lycopene-rich pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Plant Foods Human Nutr 63:195-199, 2008.

Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. J Agric Food Chem 54: 8749-8755 (2006).

Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: ILSI Press, 64p (1999).

Shu B, Yu W, Zhao Y, Liu X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. J Food Eng, 76:664-669, 2006.

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. Biomed Pharmacother 58: 100-110 (2004).

Thakkar SK, Maziya-Dixon B, Dixon AG, Failla ML. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137: 2229-33 (2007).

Tyssandier V, Cardinault N, Caris-Veyrat C, Amiot M.J, Grolier P, Bouteloup C, Azais-Braesco V, Borel P, Vegetable-borne lutein, lycopene, and β -carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr* 75: 526-534 (2002).

van het Hof K, Brouwer IA, West CE, Haddeman E, Steegers-Theunissen RPM, van Dusseldorp M, Weststrate JA, Eskes, TKAB e Howtvast JGAJ, Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. *Amerc J Clin Nutr* 70: 261–268 (1999).

van het Hof K, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130: 503–506 (2000).

Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83: 1265–1271 (2006).

Yonekura L, Nagao A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51: 107-115 (2007).

CONCLUSÕES GERAIS

1. O método de bioacessibilidade *in vitro* de carotenóides de Reboul *et al.* (2006) com adição de lipase e carboxil ester lipase na fase intestinal parece ser o mais recomendado.
2. A inclusão de uma fase oral anterior à fase gástrica pode não ser necessária para amostras de baixo teor de carboidratos.
3. A homogeneização de alimento por 1,5 minutos em processador de alimentos é adequada para simular a mastigação das amostras analisadas.
4. A luteína, no geral, foi mais bioacessível que o β -caroteno e o licopeno teve baixa bioacessibilidade.
5. O *cis* licopeno teve maior porcentagem de micelarização que o *trans*. Diferentemente, o *trans* β -caroteno foi mais bioacessível que o *cis*.
6. A presença de fibras diminui substancialmente a bioacessibilidade dos carotenóides. A presença de lipídios tem efeito contrário.
7. O cozimento e o processamento industrial aumentaram significativamente a bioacessibilidade dos carotenóides, apesar de ter causado isomerização.
8. As folhas nativas, 'caruru' e 'taioba', com maiores concentrações de carotenóides, apresentaram porcentagens de micelarização dos carotenóides significativamente menores que as folhas produzidas comercialmente como o espinafre, couve,

coentro, chicória, alface e rúcula. O espinafre apresentou a maior bioacessibilidade tanto para β -caroteno como para a luteína.

9. Entre as frutas analisadas, o mamão 'Solo' teve a maior bioacessibilidade para o β -caroteno, seguido das frutas amazônicas, buriti e tucumã. O mamão 'Solo' também apresentou maior bioacessibilidade para o licopeno.

10. A microencapsulação dos carotenóides de pitanga com maltodextrina diminuiu significativamente a bioacessibilidade de todos os carotenóides, enquanto que as perdas de bioacessibilidade com goma arábica foram menores.