



**Avaliação da Bioacessibilidade de  $\beta$ -Caroteno em Raízes de Mandioca Amarela (*Manihot esculenta Crantz*) Melhorada *In natura* e o Efeito do Cozimento e da Fritura**

Suellen Gomes Botelho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências de alimentos.

Orientadores: Alexandre Guedes Torres

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Rio de Janeiro  
Março de 2011

**Avaliação da Bioacessibilidade de  $\beta$ -Caroteno em Raízes de Mandioca Amarela  
(*Manihot esculenta Crantz*) Melhorada *In natura* e o Efeito do Cozimento e da  
Fritura**

Suellen Gomes Botelho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos, sob orientação do Prof. Alexandre Guedes Torres e co-orientação Prof. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Presidente da Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Alexandre Guedes Torres, DSc.

Instituto de Química - UFRJ

Aprovada por: \_\_\_\_\_

Prof. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, DSc.

Embrapa – CTAA

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Lucia Maria Jaeger de Carvalho, DSc.

Instituto de Nutrição – UFRJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Joab Trajano Silva, DSc.

Instituto de Química – UFRJ

Rio de Janeiro  
Março de 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

BOTELHO, Suellen Gomes.

Avaliação da Bioacessibilidade de  $\beta$ -Caroteno em Raízes de Mandioca Amarela (*Manihot esculenta Crantz*) Melhorada *In natura* e o Efeito do Cozimento e da Fritura/ Suellen Gomes Botelho. Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2011.

xv, 107 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Alexandre Guedes Torres e Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química/ Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, 2011.

Referências Bibliográficas: f. 96-107.

1. Vitamina A. 2.  $\beta$ -Caroteno, 3. bioacessibilidade. 4. Digestão *In vitro* 5. Mandioca Melhorada.

I. Torres, Alexandre Guedes e Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira.

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

III. Avaliação da Bioacessibilidade de  $\beta$ -Caroteno em Raízes de Mandioca Amarela (*Manihot esculenta Crantz*) Melhorada *In natura* e o Efeito do Cozimento e da Fritura.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cromatografia Líquida, Embrapa Agroindústria de Alimentos e Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Alexandre Guedes Torres e co-orientação do Prof. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Apoio financeiro: CNPq, Fundo de Pesquisa Embrapa-Monsanto, BioFORT, HarvestPlus e AgroSalud.

**Trabalhos Decorrentes da Presente Dissertação, Apresentados em Anais de Congressos.**

BOTELHO, S. G.; PACHECO, S.; NUTTI, M. R.; CARVALHO, J. L.V; CARVALHO, H. W. L; TORRES, A. G.; GODOY, R. L. O. Separação Rápida de Padrão de  $\beta$ -Caroteno a Partir de Mandioca Jarí Utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). I Seminário em Inovação e Tecnologia na área de Alimentos, 2010, Rio de Janeiro – RJ.

BOTELHO, S. G.; TORRES, A. G.; GODOY, R. L. O; PEIXOTO, F. M; CARVALHO, J. L.V; NUTTI, M. R. Aplicação do modelo de digestão *in vitro* para avaliar a eficiência da micelarização de  $\beta$ -caroteno em mandioca melhorada. In: 4th International Congress on Bioprocess in Food Industries, X Southern Regional Meeting on Food Science and Technology, 2010, Curitiba - PR.

BOTELHO, S. G.; TORRES, A. G.; GODOY, R. L. O; PEIXOTO, F. M; CARVALHO, J. L.V. Efeito de processamentos tradicionais sobre a bioacessibilidade aparente de  $\beta$ -caroteno de mandioca melhorada cultivada no Nordeste brasileiro. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Salvador - BA.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ser a fortaleza em minha vida me dando força e esperança nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Alexandre Torres, pelas suas orientações, oportunidade, ensinamentos e companheirismo ao longo destes dois anos.

Ao meu co-orientador Ronoel Godoy, pela eterna amizade, ensinamentos, conselhos e orientações que me ajudaram a tomar decisões muito importantes em minha vida.

Ao Sidney Pacheco pelo incentivo, por me ajudar em momentos desesperadores no laboratório, por compartilhar seu conhecimento e por sua amizade.

À Fernanda pela amizade e troca de experiências, pois mesmo de longe sempre estava disposta a me ajudar.

A equipe do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa- CTAA: Priscila, Carol, Ana, Luzimar, Claudio, Manuela, Jeane pelo incentivo e amizade.

Aos coordenadores do projeto de Biofortificação, Marília Nutti e José Luiz Vianna pela oportunidade.

Ao CNPq, ao Fundo de Pesquisa Embrapa-Monsanto, pelo suporte financeiro ao projeto BioFORT.

Ao professor Ulysses e ao Laboratório de Microbiologia Geral (ICB/ UFRJ).

A minha amada Mãe Amália, pelo exemplo de força, pelo seu amor e compreensão ao longo desse trabalho.

Ao meu Amor Vitor, por não me deixar fraquejar nos momentos de desespero, por entender a minha longa ausência, por acreditar em mim e pelo seu amor.

A minha amiga Erica, pela grande amizade, minha irmãzinha que dividiu comigo seu lar durante a realização da parte experimental me apoiando ao longo dessa jornada.

As minhas queridas amigas companheiras do mestrado Nara, Raquel, Talita, Marcela, Juliana e Manuela, que ao longo desses dois anos estiveram ouvindo os desabafos, compartilhando suas experiências, dificuldades, alegrias e vitórias.

A minha família e amigos por entenderem a minha ausência em momentos importantes para vocês, os quais eu não pude comparecer.

Enfim a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conquista desta etapa tão importante na minha vida, sem vocês a jornada seria muito mais árdua.

**Muito Obrigada!**

Dedico a minha Amada Mãe Amalia e ao meu Grande Amor Vitor Moreira pelo apoio, incentivo, amor e carinho.

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

DVA - Deficiência de Vitamina A.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde.

UNICEF - *United Nations Children's Fund.*

IVACG - *International Vitamin A Consultative Group.*

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical.

IFPRI - Instituto de Pesquisa sobre Políticas Alimentares.

FAO – *Food and Agriculture Organization*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

FDA - *Food and Drug Administration.*

CO – Cozida

FR – Frita

IN – *In natura*

## SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	6
2.1 A Vitamina A e sua importância no organismo humano	7
2.1.1. A deficiência de Vitamina A: uma questão mundial	9
2.1.2. Medidas no combate a deficiência de vitamina A	11
2.1.2.1. Biofortificação	13
2.2. Mandioca Amarela BRS Jarí, uma Variedade Melhorada	15
2.3. Carotenóides	19
2.4. Metabolismo dos carotenoides na dieta	25
2.4.1 Sistema digestivo humano	25
2.4.2. Digestão e absorção dos carotenóides	28
2.4.3. Conversão dos carotenóides pró-vitamina A em vitamina A	31
2.5. Biodisponibilidade e bioacessibilidade dos carotenóides	34
2.5.1. Fatores que interferem a biodisponibilidade dos carotenóides	37
2.5.1.1. Efeito da matriz do alimento na bioacessibilidade do $\beta$ -caroteno	38
2.5.1.2. Efeito do Processamento e adição de fonte lipídica na bioacessibilidade do $\beta$ -caroteno	40
2.6. Métodos para investigar a biodisponibilidade de carotenóides	44
2.6.1. Modelo de digestão <i>in vitro</i>	44
3. Objetivos	47
3.1. Objetivo Geral	48
3.2. Objetivos Específicos	48
4. Material e Métodos	49
4.1. Amostras e material	50
4.2. Conservação das raízes de mandioca em parafina	50
4.3. Preparo das amostras	52
4.4. Análise da composição centesimal das amostras de mandioca BRS Jarí <i>in natura</i> , cozida e frita.	54
4.5. Extração de carotenóides das amostras de mandioca amarela BRS Jarí, antes do processo de digestão <i>in vitro</i>	54

4.6. Digestão <i>in vitro</i>	56
4.7. Extração dos carotenóides da fração micelar	58
4.8. Análise de carotenóides totais e composição de carotenóides das amostras de mandioca não-digerida e digerida	59
4.9. Preparação do padrão de $\beta$ -caroteno	61
4.9.1. Obtenção do padrão cromatográfico de $\beta$ -caroteno	62
4.9.2. Curva de calibração	65
4.10. Análise da fração micelar por Microscopia de fluorescência	65
4.11. Análise estatística	66
5. Resultados e Discussão	67
6. Conclusão	94
7. Referências Bibliográficas	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química de alguns dos principais retinóides com atividade de vitamina A.	7
<b>Figura 2:</b> Aspestos das raízes de mandioca amarela BRS Jari <i>in natura</i> e cozida em comparação com amostra de mandioca convencional cozida.	19
<b>Figura 3:</b> Estrutura química dos principais carotenóides na alimentação humana.	23
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do $\beta$ -caroteno e sua conversão oxidativa em duas moléculas de retinol.	24
<b>Figura 5:</b> Sistema digestivo humano	27
<b>Figura 6:</b> Esquema das principais fases da digestão e absorção dos carotenóides nos enterócitos.	29
<b>Figura 7:</b> Mecanismos propostos de clivagem central do $\beta$ -caroteno: (1) Reação catalisada por dioxigenase e (2) reação catalisada por monoxigenase.	32
<b>Figura 8:</b> Esquema dos mecanismos de clivagem excêntrica e central do $\beta$ -caroteno e os produtos gerados durante a conversão à vitamina A.	33
<b>Figura 9:</b> Esquema do processo de parafinação: (a) raízes de mandioca com terra; (b) lavagem das raízes de mandioca; (c) secagem; (d) parafinação; (e) raízes de mandioca parafinadas.	51
<b>Figura 10:</b> Ilustração da combinação entre duas raízes 1 e 2 (amostras compostas) para realização dos cortes longitudinais para análises das amostras <i>in natura</i> (IN), cozida (CO) e frita (FR).	52
<b>Figura 11:</b> Fotos da mandioca BRS Jarí melhorada após os processos de cozimento (a) e fritura (b).	53
<b>Figura 12:</b> Desenho experimental das análises realizadas nas amostras de mandioca BRS Jarí.	54
<b>Figura 13:</b> Etapas do procedimento de extração dos carotenóides das amostras de mandioca. (a) maceração da amostra; (b) filtração a vácuo através de funil sinterizado; (c) Separação de fases em funil de separação e recuperação dos carotenóides contidos na fase etérea.	55
<b>Figura 14:</b> Etapas do processo de digestão <i>in vitro</i> : (a) amostras em banho-maria a 37 °C com agitador orbital gyromax TM simulando os movimentos peristálticos do organismo e a temperatura corpórea; (b) separação da fração micelar por centrifugação.	58

<b>Figura 15:</b> Diagrama esquemático do procedimento de obtenção do padrão $\beta$ -caroteno-todo- <i>trans</i> .	63
<b>Figura 16:</b> Comparação dos espectros de absorção de luz visível (350 a 550 nm), obtidos dos extratos de mandioca BRS Jarí melhorada rica em $\beta$ -caroteno (A), do óleo de canola (B) e do óleo de soja (C), para verificar a ausência de $\beta$ -caroteno nos óleos.	71
<b>Figura 17:</b> Análise por CLAE do óleo de canola, confirmando a ausência de $\beta$ -caroteno e seus isômeros no óleo.	72
<b>Figura 18:</b> Cromatograma do padrão todo- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno, indicando a pureza cromatográfica (calculada em 98,34%) e o espectro de absorção UV/Vis.	75
<b>Figura 19:</b> Análises por CLAE dos carotenóides de raízes de mandioca BRS Jarí <i>in natura</i> (A), cozida (B) e frita (C). Detector de arranjo de fotodiodos ajustado a 450 nm.	77
<b>Figura 20:</b> Espectros de absorção UV/Vis dos picos cromatográficos dos carotenóides de mandioca crua, cozida e frita, obtidos por detector de arranjo de fotodiodos e as respectivas estruturas químicas dos isômeros de carotenóides identificados: 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno (A), todo- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno (B), 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno (C).	78
<b>Figura 21:</b> Eficiência de micelarização do $\beta$ -Caroteno (%) da mandioca Jarí <i>in natura</i> , cozida e frita das três compostas produzidas (n= 9) após digestão <i>in vitro</i> . *, diferente significativamente da amostra frita, $P < 0,001$ (ANOVA com medidas repetidas).	86
<b>Figura 22:</b> Cromatogramas dos carotenóides da fração micelar das raízes de mandioca melhorada <i>in natura</i> (a), cozida (b) e frita (c), obtidos após o processo de digestão <i>in vitro</i> .	89
<b>Figura 23:</b> Microscopia de fluorescência: (A) imagem controle utilizando padrão de $\beta$ -caroteno; (B) imagem da fração micelar da mandioca frita contendo o $\beta$ -caroteno; (C) imagem da fração micelar da mandioca cozida contendo o $\beta$ -caroteno. Barra de resolução 50 $\mu$ m.	92

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Concentração dos sete pontos da curva de calibração.	65
<b>Tabela 2:</b> Composição centesimal (g/ 100g) das amostras de mandioca BRS Jarí <i>in natura</i> , cozida e frita, das três compostas analisadas ( $n= 9$ ).	73
<b>Tabela 3:</b> Teores de carotenóides totais ( $\mu\text{g}/ 100 \text{ g}$ ), todo- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}/ 100 \text{ g}$ ) e teores totais ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de isômeros <i>cis</i> em mandioca amarela BRS Jarí <i>in natura</i> , cozida e frita das três compostas produzidas ( $n= 9$ ). Em base seca (BS) e base úmida (BU).	80
<b>Tabela 4:</b> Teores de carotenóides totais ( $\mu\text{g}/ 100 \text{ g}$ ), todo- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}/ 100 \text{ g}$ ), teores totais ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de isômeros <i>cis</i> e eficiência da micelarização (EM %) do todo- <i>trans</i> - $\beta$ -caroteno e carotenóides totais das raízes de mandioca amarela BRS Jarí <i>in natura</i> , cozida e frita nas três amostras compostas produzidas ( $n= 9$ ). Resultados em base seca (BS) e base úmida (BU).	84

## RESUMO

### **Avaliação da Bioacessibilidade de $\beta$ -Caroteno em Raízes de Mandioca Amarela (*Manihot esculenta Crantz*) Melhorada *In natura* e o Efeito do Cozimento e da Fritura.**

Suellen Gomes Botelho

Orientador(es): Alexandre Guedes Torres – IQ – UFRJ

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy – Embrapa – CTAA

O melhoramento de alimentos, através da biofortificação com  $\beta$ -caroteno, é uma estratégia auxiliar no combate à deficiência de vitamina A. A mandioca é uma das culturas alimentares mais consumidas e produzidas nos países em desenvolvimento, onde há áreas endêmicas de hipovitaminose A, o que motiva o melhoramento das raízes com  $\beta$ -caroteno. No entanto a eficácia desta técnica depende da bioacessibilidade desse carotenóide pró-vitamina, que é o fator limitante para sua biodisponibilidade. O cozimento e a fritura são métodos de preparos comumente aplicados as raízes de mandioca para consumo humano, porém, ainda não foi investigada a influência do cozimento e da fritura sobre a bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno de raízes de mandioca amarela BRS Jarí melhorada. O objetivo deste estudo é investigar a bioacessibilidade *in vitro* de  $\beta$ -caroteno de raízes de mandioca amarela BRS Jarí melhorada, após os processos de cozimento e fritura. Aplicou-se a digestão *in vitro*, que consiste em simular as etapas oral, gástrica e intestinal da digestão humana para em seguida determinar a eficiência da micelarização do  $\beta$ -caroteno de raízes de mandioca amarela BRS Jarí melhorada cozidas e fritas. Para simulação da digestão, utilizaram-se as enzimas  $\alpha$ -amilase, pepsina, pancreatina e lipase, além de extrato de bile e mucina, bem como diversos sais, de forma apropriada e em seqüência para simular as fases oral, gástrica e entérica da digestão. A temperatura e o peristaltismo foram simulados em banho de aquecimento com agitação orbital (37°C) e a fração micelar foi separada da fração digerida por centrifugação a 5000 $\times$ g (45 min, 4°C). Os carotenóides da fração micelar foram extraídos com éter de petróleo e a composição de carotenóides foi analisada por CLAE em coluna Carotenoid C<sub>30</sub>. O teor de carotenóides totais foi determinado por espectrofotometria a 450 nm. Foi realizado ainda análise por microscopia de fluorescência da fração micelar das amostras de mandioca processadas para confirmar a presença dos carotenóides na fração emulsificada e observar a estrutura da microemulsão. Os resultados indicam que embora o processamento através do cozimento e fritura tenham promovido redução nos teores de carotenóides totais e todo-*trans*- $\beta$ -caroteno devido a isomerização, a bioacessibilidade foi favorecida, pois a mandioca frita apresentou maior eficiência micelar para carotenóides totais e todo-*trans*- $\beta$ -caroteno (respectivamente 14,1  $\pm$  2,25% e 14,37  $\pm$  2,44 %). As análise microscópicas indicaram que depois do processo de digestão *in vitro* os carotenóides da fração micelar não apresentam-se em estruturas cristalinas. O que contribui para uma maior bioacessibilidade deste nutriente no organismo.

**Palavras-chave:** Deficiência de vitamina A, a biodisponibilidade, carotenóides, digestão *in vitro*.

## ABSTRACT

### Assessment of the Bioaccessibility of $\beta$ -carotene in Improved Yellow Cassava Roots (*Manihot esculenta* Crantz) *In Natura* and Effect of Baking and Frying

Suellen Gomes Botelho

Orientador(es): Alexandre Guedes Torres – IQ – UFRJ

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy – Embrapa – CTAA

Food improvement through biofortification with  $\beta$ -carotene is used as strategy to fight vitamin A deficiency. Cassava is a crop highly produced and consumed in developing countries, in areas with endemic vitamin A deficiency, which motivates the improvement of the roots with  $\beta$ -carotene. However, the effectiveness of this technique depends on the bioaccessibility of this pro-vitamin A carotenoid, which is the limiting factor for its bioavailability. Although cooking and frying are processes commonly used in cassava for human consumption in Brazil, the influence of on the bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in the improved cassava, has not been investigated yet. The aim of the present study was to investigate the *in vitro* bioaccessibility of  $\beta$ -carotene from improved yellow cassava roots *Jari* BRS after processing through boiling and frying. Applied to *in vitro* digestion, which is to simulate the steps oral, gastric and intestinal digestion of human then to determine the efficiency of micellarization the  $\beta$ -carotene of fried and cooked improved yellow cassava roots *Jari* BRS. For simulation of digestion, we used the enzymes  $\alpha$ -amylase, pepsin, pancreatin and lipase, in addition to extract bile and mucin, as well as various salts, as appropriate and in sequence to simulate the oral, gastric and enteric digestion. The temperature and peristalsis were simulated in the heating bath with orbital agitation (37 ° C) and the micellar fraction was separated from the digested fraction by centrifugation at 5000  $\times$  g (45 min, 4°C). Carotenoids micellar fraction were extracted with petroleum ether and carotenoid composition was analyzed by HPLC Carotenoid C30 column. The total carotenoids content was determined by spectrophotometry at 450nm. Further analysis was performed by fluorescence microscopy of micellar fraction of samples of cassava processed to confirm the presence of carotenoids in the micellar fraction and observing the structure of the micro-emulsion. The results indicate that although the processing through baking and frying have promoted a reduction in levels of total carotenoids and  $\beta$ -carotene due to isomerization, the bioaccessibility was favored because the cassava chips for the highest efficiency micellar carotenoids and all-trans- $\beta$ -carotene (respectively  $14.1 \pm 2.25\%$  and  $14.37 \pm 2.44\%$ ). The microscopic analysis indicated that after the process of digestion *in vitro* fraction of micellar carotenoids not present in crystal structures. What contributes to higher bioavailability of this nutrient in the body. What contribution to a higher bioavailability of this nutrient in the body.

**Keywords:** Vitamin A deficiency, Bioavailability, Carotenoids, *In Vitro* Digestion.

## **1. Introdução**

Nos seres humanos, a vitamina A exerce um papel fundamental no crescimento, desenvolvimento, manutenção de tecidos epiteliais, reprodução, sistema imunológico e, em especial, para o funcionamento do ciclo visual na regeneração de fotorreceptores. Sua deficiência é um dos principais problemas de carência nutricional de impacto na saúde pública, causando inúmeras doenças como cegueira noturna e xerofthalmia, além de morte prematura em bebês (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). A deficiência de vitamina A atinge em especial países em desenvolvimento em todo o mundo, especialmente na África, Sudeste da Ásia, e nas Américas, onde segundo a Organização Mundial da Saúde, a prevalência de hipovitaminose A é cerca de 20% (OMS, 2009).

As principais estratégias de saúde pública utilizadas no combate à hipovitaminose A incluem a suplementação e fortificação de alimentos e mudanças na alimentação, tal como o estímulo ao consumo de vegetais ricos em carotenóides pró-vitamina A. Estas, porém, são estratégias que não atingem todos os sub-grupos populacionais de países em desenvolvimento, principais áreas endêmicas da hipovitaminose A. A biofortificação de alimentos é uma estratégia alternativa, que visa elevar os teores de  $\beta$ -caroteno em alimentos tipicamente consumidos por grupos de risco de deficiência de vitamina A. A eficácia dessa estratégia se baseia no fato de que o  $\beta$ -caroteno apresenta elevada atividade pró-vitamina A. Embora ainda pouco difundida, essa estratégia de combate à deficiência de vitamina A tem se mostrado efetiva e, quando aplicada em conjunto com outros métodos, contribui para a erradicação de deficiências de micronutrientes proporcionando soluções sustentáveis e de baixo custo para amenizar problemas nutricionais em populações com limitado acesso aos sistemas formais de mercado e de atenção à saúde (WELCH et al., 2002).

Em nível mundial, existem diversos programas de biofortificação de alimentos, tais como o *HarvestPlus*, *AgroSalud* e o *BioFORT* que visam reduzir a prevalência de

deficiência de micronutrientes. Através desses programas foi possível o melhoramento de plantas e o desenvolvimento de culturas alimentares ricas em micronutrientes nutricionalmente relevantes, tais como os carotenóides, em cultivares de mandioca, milho e batata-doce. Esses programas envolvem alianças mundiais de instituições de pesquisa e agências de implementação nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (KIMURA et al., 2007). No Brasil os programas são coordenados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Esta dissertação faz parte dessa rede de pesquisa e está inserida no macroprojeto “A Biofortificação no Brasil – desenvolvendo produtos agrícolas mais nutritivos”. O desenvolvimento do presente estudo permitiu determinar a bioacessibilidade *in vitro*, como uma estimativa da biodisponibilidade, do  $\beta$ -caroteno de mandioca amarela BRS Jarí melhorada *in natura* e após os processos de cocção em água e fritura.

Existe grande interesse na mandioca, como matriz para biofortificação, por se tratar de uma cultura nativa da América tropical, rústica extraordinariamente adaptável e vigorosa, capaz de crescer em solos marginais e de resistir a doenças, a seca e a certas pragas. No Brasil a mandioca é uma das culturas alimentares mais consumidas, porém apresenta baixos teores de carotenóides em suas raízes comestíveis. Seu elevado consumo e produção, especialmente em áreas pobres do Norte e Nordeste do Brasil, tornaram relevante o melhoramento de novas culturas com teores elevados de  $\beta$ -caroteno (FAO, 2000). O melhoramento genético permitiu triplicar o teor de  $\beta$ -caroteno nas raízes da mandioca elevando de 4  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno por grama de mandioca em variedades como a Dourada e a Gema de Ovo, a híbridos com teores de até 12  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno como na variedade BRS Jarí (HARVESTPLUS, 2005).

No entanto, o aumento na ingestão de  $\beta$ -caroteno, promovido pelo aumento de seus teores em cultivares de alimentos específicos, não é suficiente para garantir sua

eficácia na redução da prevalência de hipovitaminose A. É preciso garantir que o  $\beta$ -caroteno seja absorvido em quantidades suficientes, para atender a demanda fisiológica, que esteja biodisponível. A biodisponibilidade dos carotenóides é um processo complexo, dependente de diversos fatores intrínsecos do alimento e fatores fisiológicos que estão correlacionados e atuam desde a ingestão do alimento rico no carotenóide pró-vitamina A, até sua conversão a retinol.

A absorção de carotenóides é a etapa limitante para sua biodisponibilidade e pode ser dividida em três ou quatro etapas principais: a liberação dos carotenóides da matriz alimentar; sua transferência da matriz alimentar para a fase oleosa, seguida da transferência para a fração micelar, que evolui à formação de micelas mistas que por sua vez carregam os carotenóides até a membrana apical das células do epitélio intestinal para absorção. Na etapa, de transferência dos carotenóides da matriz alimentar para a fase oleosa, são desfeitas interações químicas entre os carotenóides e componentes dos alimentos, especialmente proteínas. Essas interações químicas são difíceis de desfazer em meio aquoso e considera-se que o principal limitante da biodisponibilidade dos carotenóides de alimentos consiste em sua transferência para a fase oleosa durante a digestão. Consistentemente, alimentos processados termicamente e mecanicamente, os quais sofrem desnaturação de proteínas e desagregação física de seus componentes, apresentam aumento na biodisponibilidade de carotenóides. Além disso, o  $\beta$ -caroteno do óleo de palma apresenta elevada biodisponibilidade, das maiores já registradas.

Recentemente tem sido investigada a bioacessibilidade de carotenóides *in vitro*, que consiste em um bom modelo para estudo de sua biodisponibilidade *in vivo*. O estudo da bioacessibilidade consiste na transferência dos carotenóides dos alimentos para micelas mistas, em sistemas de digestão *in vitro* que simulam a digestão humana. Esta etapa é considerada limitante para a bioacessibilidade e eficiência da micelarização

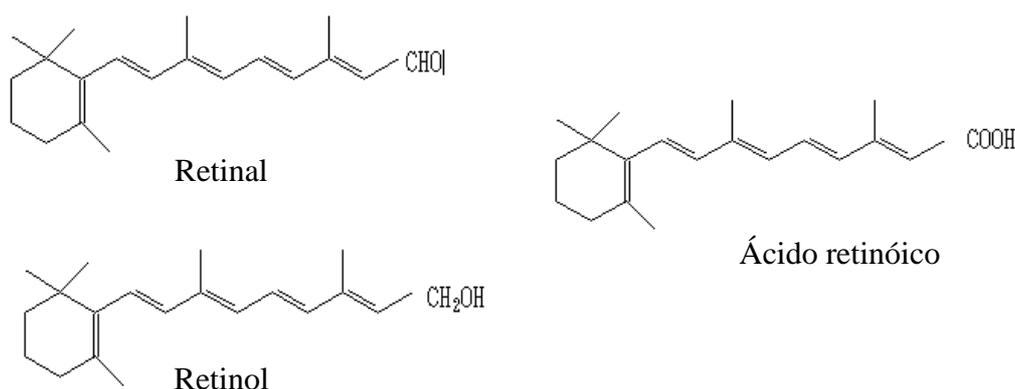
dos carotenóides para uma posterior captação por células de epitélio intestinal humano em cultura (linhagem Caco-2) no estudo de biodisponibilidade *in vitro* (TAKKAR et al., 2009).

O processamento doméstico dos alimentos, através do cozimento ou da fritura, pode aumentar a bioacessibilidade de carotenóides pró vitamina A, no entanto pode promover simultaneamente perdas de carotenóides, por oxidação ou termólise (RUEL et al., 2001). A eficácia do uso da mandioca melhorada como veículo de suplementação de vitamina A depende da bioacessibilidade dessa pró-vitamina A. Apesar dos processos de cozimento e fritura serem comumente aplicados à mandioca para consumo humano no Brasil, ainda não foi investigada a influência desses processos sobre a bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno de mandioca amarela BRS Jarí melhorada. Dessa forma, são necessários estudos a respeito da eficiência da micelarização dos carotenóides pró-vitâmicos, os quais possam ser utilizados como um potencial indicador da bioacessibilidade e posterior biodisponibilidade principalmente do  $\beta$ -caroteno nas raízes de mandioca amarela BRS Jarí melhorada, permitindo traçar melhores estratégias no combate a hipovitaminose A.

## **2. Revisão da Literatura**

## 2.1. A Vitamina A e sua importância no organismo humano

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel que apresenta diversas funções no organismo humano, em especial a participação no processo de visão, de crescimento ósseo, na diferenciação de tecidos, na função imunológica, na prevenção da anemia, no sistema reprodutor e no desenvolvimento embrionário. Vitamina A é um termo genérico que refere-se aos retinóides, que constituem uma classe de compostos químicos que apresentam as propriedades biológicas do retinol e seus metabólitos naturais, além de uma gama de análogos sintéticos. Essas moléculas apresentam estrutura de 20 carbonos com um anel ciclohexenil substituído ( $\beta$ -ionona) e uma cadeia lateral tetraênica que pode se ligar a diferentes grupos funcionais no carbono 15, formando retinóis (hidroxila), ácidos retinóicos (ácido carboxílico) e retinaldeídos (carbonila aldeídica). Estas substâncias apresentam características estruturais semelhantes ao retinol, no entanto desempenham somente algumas ou até mesmo nenhuma das funções naturais da vitamina A (Figura 1) (ROSS et al., 1999).



**Figura 1:** Estrutura química de alguns dos principais retinóides com atividade de vitamina A.

A vitamina A, não pode ser sintetizada pelos seres humanos, os quais necessitam consumi-la através da dieta. Os retinóides são encontrados apenas em alimentos de origem animal e seus derivados; fígado, manteiga, queijo, leite integral, gema de ovo e peixes gordos são algumas das principais fontes alimentares de retinóides pré-formados. Já os alimentos de origem vegetal fornecem a vitamina A na forma de pró-vitaminas, especialmente alguns carotenóides que apresentam ao menos um anel beta não substituído, tais como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e as criptoxantinas, que podem ser convertidos em retinóides por mamíferos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; CAMPOS & ROSADO, 2005).

Pode-se obter vitamina A através de fontes menos convencionais, tais como suplementos farmacêuticos e alimentos fortificados, que são mais consumidos em países desenvolvidos. Nesses países os carotenóides pró-vitamina A provenientes de frutas e hortaliças representam menos de um terço da ingestão total de vitamina A na dieta. Porém, em países em desenvolvimento, por razões sócio-econômicas, é baixo o consumo de produtos de origem animal e de suplementos farmacêuticos de micronutrientes. Esses grupos populacionais são extremamente dependentes da ingestão de alimentos de origem vegetal ricos em carotenóides pró-vitamina A, e que façam parte de sua cultura alimentar permitindo assim maior acesso à vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Segundo a Organização Mundial da Saúde, nas Américas, cerca de 60% da vitamina A ingerida é proveniente de carotenóides pró-vitamina A.

A ingestão de doses insuficientes desta vitamina resulta em inúmeras anormalidades fisiológicas para o organismo humano, que pode resultar em uma doença carencial nutricional. Dentre as terminologias que internacionalmente são utilizadas

para se referir à carência da vitamina A, destaca-se hipovitaminose A, xerofthalmia e desordens ou transtornos da deficiência de vitamina A (DVA).

### **2.1.1. A deficiência de Vitamina A: uma questão mundial**

Os principais grupos de risco para a hipovitaminose A são grupos populacionais de baixo nível socioeconômico, que apresentam alimentação qualitativa ou quantitativamente inadequada e vivem em condições sanitárias pouco satisfatórias. Até a segunda metade da década de 1980, as principais conseqüências reportadas da deficiência de vitamina A apresentavam relação com seus sinais clínicos, que vão desde a cegueira noturna até a cegueira nutricional irreversível (OSGANIAN et al., 2003).

O primeiro sinal clínico da deficiência de vitamina A é a cegueira noturna, pois essa vitamina é a precursora para a síntese da rodopsina, proteína conjugada, que necessita de altas concentrações de 11-*cis*-retinal para exercer a adaptação da visão com pouca luminosidade. Na presença da luz, ocorrem alterações na configuração do retinal, que consiste na conversão de 11-*cis*-retinal a all-*trans*-retinal, que são acompanhadas por uma mudança global da molécula de rodopsina. Tais alterações funcionam como estímulo molecular para um impulso nas terminações do nervo óptico, que é transmitido ao cérebro, propiciando a visão com pouca luz. Desta forma, quando o indivíduo encontra-se em estado inadequado de vitamina A, a ponto de afetar negativamente os níveis de 11-*cis*-retinal nos olhos, pode ocorrer dificuldade do indivíduo em enxergar com baixa luminosidade. Além destes sintomas a cegueira noturna pode estar associada com sintomas mais graves, como o maior risco de doenças infecciosas e anemias, causando maior mortalidade no grupo de mulheres gestantes e dos lactantes. Como a cegueira noturna é um dos primeiros sinais da deficiência de vitamina A e pode ser

detectada facilmente, esta pode ser um indicador promissor do estado nutricional de vitamina A no grupo materno-infantil, especialmente quando não estão disponíveis ensaios bioquímicos sobre o estado dessa vitamina, possibilitando medidas de prevenção e erradicação da DVA (SOMMER, 1995; WOLF, 2001; CHRISTIAN, 2002).

Além das manifestações clínicas da deficiência de vitamina A que acometem a saúde humana, a partir segunda metade da década de 80 surgiram evidências de que a carência subclínica da vitamina A pode contribuir para a morbidade e mortalidade de diversos sub-grupos populacionais que apresentam elevadas demandas por vitamina A (OMS, 2009). Considera-se deficiência sub-clínica aquela na qual as concentrações de vitamina A nos tecidos são suficientemente baixas para produzir consequências adversas para a saúde mesmo que não estejam presentes sinais clínicos da deficiência. Indivíduos com elevada demanda de vitamina A, tais como crianças, recém-nascidos, mulheres em idade fértil, puérperas e nutrizes, que necessitam de níveis adicionais de vitamina A para manter o crescimento de tecidos maternos e fetais e para repor as perdas com a lactação são grupos de risco para deficiência de vitamina A (RAMALHO & FLORES, 2002).

Estima-se que aproximadamente 25% da população de crianças no Brasil com menos de cinco anos apresentam DVA em algum grau e que cerca de 9% apresentam xeroftalmia. A xeroftalmia é o primeiro sinal clínico da deficiência de vitamina A facilmente identificável e consiste no ressecamento da mucosa do olho causado por redução na produção lacrimal. Quanto à prevalência de DVA materna, estima-se em cerca de 18%. A prevalência de deficiência de vitamina A em mulheres e crianças é particularmente elevada no Sul e no Sudeste da Ásia e na África subsaariana. A Organização Pan-Americana de Saúde considera a DVA um problema de saúde pública

em países em desenvolvimento. As principais regiões atingidas pela hipovitaminose A são o Sul e o Sudeste da Ásia, Oeste do Pacífico, a África e partes da América Latina e Central. Nas Américas, a DVA prevalece como uma doença subclínica generalizada em muitos países (COELLHO, 2003 e OMS, 2009).

No Brasil, a ocorrência de cegueira nutricional por DVA é mencionada na literatura desde o século XIX e, historicamente, as regiões Norte e Nordeste apresentam prevalência relativamente elevada. Essa situação se deve principalmente à cultura alimentar básica da região, que consiste em mandioca branca, feijão e milho. Ou seja, uma dieta pobre em vitamina A e carotenóides pró-vitamina A. São grandes os esforços para introduzir vegetais de folhas verde-escura, ricas em  $\beta$ -caroteno, na dieta da população dessas regiões, mas no Nordeste existem resistências culturais, especialmente em zonas semiáridas, pois as folhas verdes são consideradas apropriadas somente para alimentar animais (MARIATH et al., 1989). Outras regiões brasileiras apresentam alta prevalência de DVA, especialmente em bolsões de pobreza, por exemplo, no Sudeste do país. Estes resultados conferem ao Brasil a classificação pela Organização Mundial da Saúde e pela OPAS como área de carência sub-clínica grave de vitamina A (OMS, 2009; OPAS, 1999).

### **2.1.2. Medidas para o combate a deficiência de vitamina A**

Nas últimas décadas, o quadro epidemiológico da carência de vitamina A no Brasil vem demonstrando a necessidade de intervenções eficazes, para reduzir a prevalência elevada dessa deficiência. A deficiência deste micronutriente deixou de ser uma questão de números acadêmicos, frente aos inúmeros trabalhos que abordam esse

tema, e passou a ser considerado um problema de saúde pública grave, que requer medidas com um grau considerável de urgência para combatê-la.

As atividades de controle da deficiência de vitamina A integrada ao programa nacional de imunização tiveram início no Brasil em 1983, com a suplementação com mega doses de vitamina A, para crianças pré-escolares, em áreas específicas de alto risco de desenvolvimento da deficiência desse micronutriente. Posteriormente, essa iniciativa foi preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), *United Nations Children's Fund* (UNICEF) e *International Vitamin A Consultative Group* (IVACG), como forma de tornar mais eficiente o combate dessa deficiência (OMS, 2009, MARTINS et al., 2007).

Atualmente estes órgãos responsáveis, têm promovido programas de controle de deficiência de vitamina A como o aleitamento materno, a distribuição de suplementos de vitamina A para crianças e mães após o parto, a fortificação de alimentos, e a implementação de programas destinados a fomentar a agricultura doméstica, de modo a aumentar a disponibilidade de frutas e vegetais ricos em carotenóides pró-vitamina A (OMS, 2003).

As estratégias para o combate da DVA podem ser descritos em três patamares: a longo prazo, no qual exige a modificação dos hábitos alimentares das famílias, acrescentando na dieta alimentos ricos em vitamina A através de reeducação nutricional, estímulos à implantação de hortas caseiras e estímulos ao aleitamento natural; a médio prazo, enriquecer determinados alimentos com vitamina A, dando preferência aos alimentos com baixo custo, boa aceitação cultural, sabor adequado após o enriquecimento e serem consumidos em quantidades limitadas para evitar problemas de toxicidade; a curto prazo, distribuir, suplementos de vitamina A na forma de cápsulas gelatinosas de 200 000 UI de vitamina A (SOUZA E VILAS BOAS, 2002).

Entretanto, essas medidas embora apresentem eficácia não conseguem atingir todas as populações com risco de DVA. Pois, em sua maioria, são regiões que não apresentam uma infraestrutura de mercado e tem recursos financeiros limitados, para que a fortificação e a suplementação medicamentosa possam ser implementadas de forma eficaz. Assim, considerando que novos enfoques são necessários para complementar as intervenções já em andamento, surge à proposta da Biofortificação, como um novo paradigma para a agricultura e uma ferramenta para combater a hipovitaminose A (HAGENIMANA & LOW, 2000).

#### **2.1.2.1. Biofortificação**

A biofortificação é uma técnica que através da biotecnologia promove o enriquecimento dos alimentos por meio do melhoramento genético, através da seleção de germoplasmas com as melhores características, havendo assim o cruzamento das variedades para gerar cultivares ricas em micronutrientes específicos (vitaminas e minerais) e com características agronomicamente aceitáveis, além de eliminar eventuais componentes antinutricionais que possam reduzir a biodisponibilidade destes (WELCH et al., 2002). É uma alternativa para complementar os programas de intervenção nutricional existentes no combate a hipovitaminose A, e tem se mostrado uma forma sustentável, pois atinge uma grande parte da população dos países em desenvolvimento em especial das áreas rurais que não são alcançadas por outras estratégias (FAO / ILSI, 1997). Seu alvo é a população mais desfavorecida, ao utilizar mecanismos de distribuição de sementes e de integração com os produtores rurais, a fim de complementar as demais intervenções em andamento. Além de proporcionar maior sustentabilidade, produtividade e baixo custo para produtores e consumidores.

Estudos têm avaliado que tão importante quanto o enriquecimento dos grãos com micronutrientes, é a sua biodisponibilidade para os consumidores. Por isso, os programas de melhoramento devem estar voltados também à diminuição de substâncias inibidoras ou ao aumento das promotoras, para assegurar que os alimentos biofortificados contenham altos teores de micronutrientes biodisponíveis, e também que as cultivares sejam bem adaptáveis às condições locais de cultivo, produzindo rendimentos iguais e/ou superiores aos obtidos pelo cultivo convencional (GRAHAM et al., 2001). Enfim, para que o programa de biofortificação de alimentos seja eficaz, uma série de fatores devem ser considerados: superioridade agrônômica, valor nutricional biodisponível, relação custo-benefício, sustentabilidade, entre outros.

O desenvolvimento de variedades de alimentos biofortificados requer investimentos em instituições de pesquisas, para a produção de sementes. Dentre os programas mundiais, que investem em pesquisas estratégicas no combate a deficiência de micronutrientes estão o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e o Instituto de Pesquisa sobre Políticas Alimentares (IFPRI), os quais coordenam o programa *HarvestPlus* de biofortificação de alimentos, uma aliança mundial de instituições de pesquisa e de entidades executoras que se uniram para melhorar e disseminar matérias - primas de maior qualidade nutricional. Inicialmente, as culturas básicas para alimentação humana que estão sendo pesquisadas são a mandioca, o milho, a batata-doce (os quais tem os teores de carotenoides pró-vitamina A elevados), feijão, arroz, e trigo (níveis de ferro e zinco relativamente elevados) (GUIMARÃES et al., 200; HARVESTPLUS, 2004). No Brasil, os projetos *HarvestPlus*, juntamente com os programas AgroSalud e BioFORT, em parceria com diversas universidades, são coordenados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa.

## 2.2. Mandioca Amarela BRS Jarí, uma Variedade Melhorada

A mandioca, também denominada de acordo com sua nomenclatura científica *Manihot esculenta* Crantz, pertence à família *Euphorbiaceae*, é um arbusto de raízes volumosas, folhas pecioladas e flores de cálice amarelado, dispostas em panículas. Seu tubérculo também é conhecido como aipim, aipi, castelinha, macaxeira, mandioca doce e mandioca de acordo com as regiões onde é cultivada. É originária da região Amazônica do Brasil, seu cultivo é muito difundido na América Tropical a mais de 5.000 anos. A mandioca caracteriza-se por ser uma cultura rústica de fácil adaptação a diferentes tipos de solo e clima, o que favorece o seu cultivo em regiões distintas (SIQUEIRA et al., 2003).

A mandioca é considerada um alimento básico de milhões de habitantes em todo o mundo. Tem importância considerável na economia em especial nos países em desenvolvimento, onde pode ser cultivada em pequenas áreas com baixo nível tecnológico. A Nigéria é o maior produtor mundial, com produção aproximada de 34 milhões de toneladas. Já o Brasil, de acordo com a FAO (2000), é o segundo maior produtor mundial de mandioca com produção em cerca de 27,3 milhões de toneladas anuais. Além de ser considerado grande consumidor, apresentando, em 2003, um consumo de raízes *per capita* de 41 kg/hab/ano, em quanto o consumo *per capita* mundial foi 16 kg/hab/ano, sendo esta cultura plantada em 87% dos municípios brasileiros. A cultura de mandioca assume papel importante no desenvolvimento do Brasil, pois é utilizada como um dos principais produtos de subsistência de grande parte da população, onde devido seu alto teor de amido nas raízes faz com que estas sejam consideradas uma das mais importantes fontes de carboidratos de inúmeras regiões do país, em especial as regiões Norte e Nordeste. Além de ter seu consumo em grande

escala nos países da África, Ásia e América do Sul (AWOYINKA et al., 1995; SIQUEIRA et al., 2003).

A forma de consumo e aplicação tecnológica da mandioca vai depender do conteúdo de ácido cianídrico (HCN) em suas raízes, pois de acordo com seu teor classificam-se as raízes de mandioca em mansa ou brava. A mandioca mansa também conhecida como mandioca de mesa, se difere da brava por apresentar teores de ácido cianídrico abaixo de 100 mg/ kg de raízes frescas. O ácido cianídrico é uma substância tóxica, encontrada na raiz que, em contato com outros compostos e com enzimas da polpa, forma o princípio ativo do veneno na planta, usado como uma forma de proteção contra insetos (ROSLING, 1994). A mandioca mansa tem sua aplicação no mercado consumidor na forma *in natura*, podendo ser consumida na forma frita, cozida, assada ou integrando pratos mais complexos. Atualmente, a mandioca para uso culinário é comercializada como vegetal fresco ou minimamente processada, refrigerada ou congelada, ou também na forma pré-cozida facilitando o preparo e consumo (OLIVEIRA et al., 2009). Já a mandioca brava devido aos níveis elevados de HCN é destinada as indústrias de transformação, pois necessitam passar por processos que utilizem altas temperaturas como torrefação, secagem, entre outros, para que haja a eliminação completa do ácido cianídrico. (LORENZI, 1993, KEMDIRIM et al., 1995). A indústria de transformação utiliza as raízes de mandioca na elaboração de diversos produtos como farinha de mesa comum, farinha d'água, farinha seca, goma de tapioca, polvilho doce e azedo e *chips*.

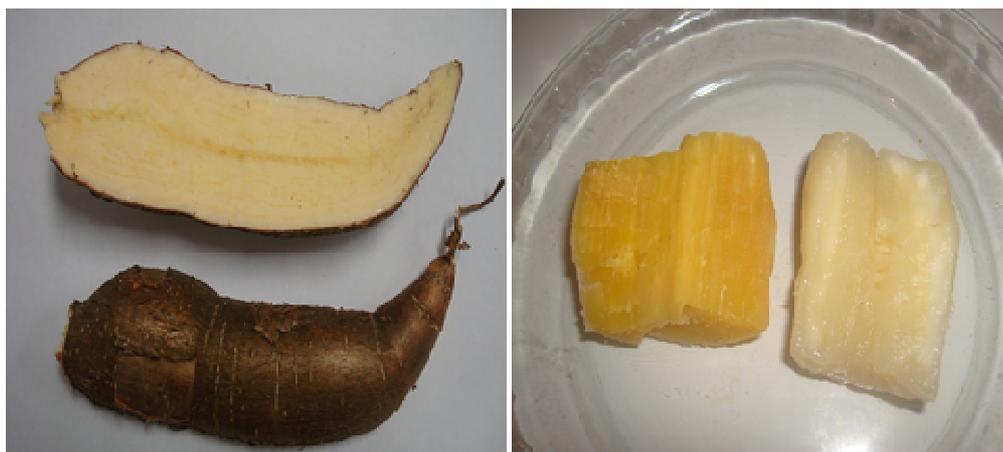
A composição centesimal das raízes de mandioca varia de acordo com a espécie, idade, local e condições de cultivo. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006), a composição média das raízes é de 62% de umidade, 36% de carboidratos, 1,9% de fibras, 1% de proteína, 0,6% de cinzas e traços de lipídios.

Dentre os componentes da raiz de mandioca amarela encontram-se ainda os carotenóides, em destaque o  $\beta$ -caroteno em raízes de polpa amarelada. Embora algumas raízes de mandioca amarela contenham teores elevados de carotenóides pró-vitamina A, as variedades convencionais apresentam baixos teores de  $\beta$ -caroteno, que variam de 0,02 a 3,34  $\mu\text{g/g}$  (FLORES & PENTEADO, 1992). No entanto, a importância econômica que as raízes de mandioca amarela apresentam nos países em desenvolvimento, que apresentam elevado risco de deficiência de vitamina A, promove mais estudos com o propósito de elevar os teores de  $\beta$ -caroteno nestas raízes. A eficácia dessa abordagem relaciona-se com o fato de que a raiz de mandioca é importante fonte de nutrientes nestes países.

As raízes de mandioca amarela estão sendo pesquisadas para o desenvolvimento de germoplasma de mandioca de melhor qualidade nutricional, dentro dos Programas de Biofortificação: *HarvestPlus*, *AgroSalud* e *BioFORT*. Estes programas têm como objetivo principal identificar e desenvolver variedades com altos teores de  $\beta$ -caroteno, baixos teores de ácido cianídrico (HCN) e qualidade para o consumo fresco, especialmente no Nordeste do Brasil, através de técnicas de melhoramento convencional pelo cruzamento de linhagens com características nutricionais favoráveis. As raízes de mandioca amarela apresentam maiores conteúdos de nutrientes e melhores características agronômicas, diferentemente das variedades atualmente cultivadas e consumidas. O melhoramento das raízes de mandioca amarela, permitiu triplicar os teores de  $\beta$ -caroteno de 4  $\mu\text{g/g}$  identificados em variedades como a Dourada e a Gema de ovo, onde obteve-se híbridos com 12  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno em base úmida. Além de elevar o conteúdo deste carótenóide pró-vitamina A, as raízes melhoradas apresentam características diferenciadas das convencionais, tais como: polpa amarelada e menos

fibrosa, são mais macias, tem menor conteúdo de ácido cianídrico, que favorecem sua aceitação para consumo e cultivo, tanto por consumidores como por agricultores.

No ano de 2003 foi desenvolvida na sede da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical a variedade BRS Jarí a qual foi lançada em 2009, o cruzamento controlado foi realizado com o parental feminino que foi a variedade BGM 1721 (Abóbora) e o parental masculino a variedade BRS Dourada. A variedade gerada se destacou das outras pelo seu elevado conteúdo de  $\beta$ -caroteno nas raízes frescas. Apresentou teores de carotenóides totais na raiz de 10,5  $\mu\text{g/g}$  e de  $\beta$ -caroteno de 8,7  $\mu\text{g/g}$  em base úmida, o dobro daquele apresentado pelas variedades lançadas em 2005, BRS Dourada e BRS Gema de Ovo. Observou-se assim um ganho acima de 100% em termos de carotenóides totais e de  $\beta$ -caroteno nas raízes. No entanto, a meta do projeto de biofortificação é atingir teores acima de 15  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno nas raízes frescas, o que permitirá caracterizar a variedade de mandioca amarela BRS Jarí, como uma fonte de carotenóide pró-vitamina A de acordo com a comissão do *Codex Alimentarius*, por isto as raízes desenvolvidas até o presente momento são consideradas melhoradas e não, biofortificadas, já que não atingirão a meta de 15  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno nas raízes frescas. As raízes de mandioca BRS Jarí possuem coloração bastante amarelada em comparação com as raízes de mandioca convencionais e, quando são cozidas ou fritas, esta coloração torna-se ainda mais intensa (Figura 2).



**Figura 2:** Aspecto de raízes de mandioca BRS Jarí *in natura* e cozida, em comparação com amostra de mandioca convencional cozida.

Embora se tenha alcançado níveis elevados de carotenóides pró-vitamina A nas raízes de mandioca BRS Jarí, é necessário investigar se esses teores de  $\beta$ -caroteno são absorvíveis no organismo humano para posterior conversão em vitamina A, através de estudos sobre a biodisponibilidade deste micronutriente.

### 2.3. Carotenóides

Os carotenóides são substâncias que vêm despertando o interesse de cientistas desde o século XVIII, onde em 1831, pela primeira vez o cientista Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder, isolou esse nutriente a partir da cenoura batizando o de caroteno derivando do inglês *carrot* (cenoura). Já o termo carotenóides foi concebido por Tswett em 1911 durante seus estudos de separação de pigmentos de plantas por método cromatográfico (FRANK et al., 2004).

Após muitas pesquisas, hoje já se sabe que os carotenóides são geralmente compostos tetraterpenóides com 40 átomos de carbono, hidrofóbicos, lipofílicos,

insolúveis em água e solúveis em solventes, como acetona, álcool e clorofórmio. São formados a partir de 8 unidades de isoprenóides de 5 unidades de carbono. Esta é a estrutura básica dos carotenóides, no entanto podem sofrer alterações por reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclação, migração da dupla ligação, isomerização, introdução na molécula de funções oxigenadas ou combinações destes processos, o que resulta em uma gama de estruturas diferentes.

Sua biossíntese ocorre em plantas, algas, alguns fungos e bactérias, mas não em animais que são incapazes de biossintetizá-los. Os animais obtém carotenóides através da ingestão de alimentos de origem vegetal que possuem uma composição complexa e variável de carotenóides (FAILLA et al., 2008). Os carotenóides são pigmentos encontrados em vegetais e alimentos com coloração amarela, laranja ou vermelha característica de muitas frutas (manga, mamão, tomate, entre outros), hortaliças, gema do ovo, crustáceos, alguns peixes e também estão presentes em outros tecidos vegetais como flores, raízes (cenoura, mandioca), sementes (milho, urucum) e, nas folhas verdes, em especial nas de coloração verde escura (espinafre, couve e brócolis) onde na maioria das vezes são mascarados pela presença da clorofila.

Essa variedade de cores características de cada tipo de carotenoide se dá pela presença de cromóforos originados por sistemas de ligações duplas conjugadas específicos de cada molécula deste pigmento. Quanto maior o número de ligações duplas conjugadas, maior o comprimento de onda da luz absorvida, que é específico de cada tipo de carotenóide, resultando em diferentes colorações (OLIVER & PALOU, 2000).

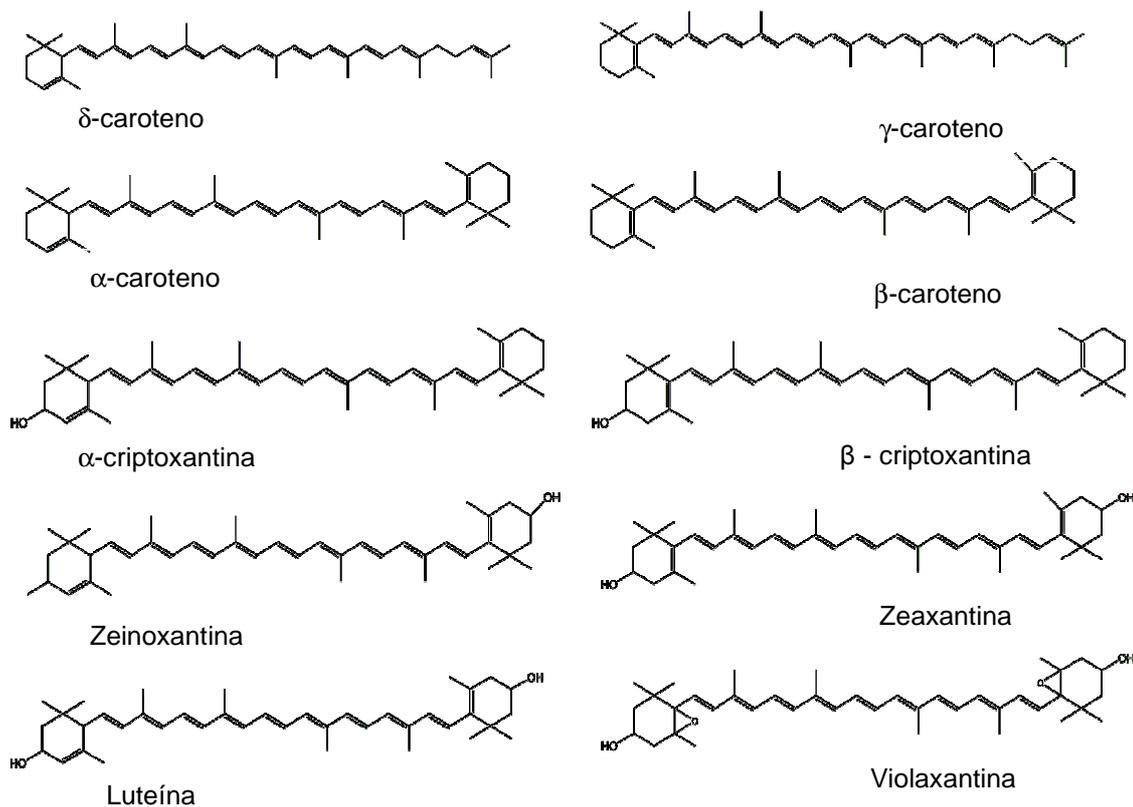
Este extenso sistema de duplas ligações conjugadas é uma característica marcante das moléculas dos carotenóides, responsáveis por suas características espectrais que são utilizadas para identificação e quantificação. Cada carotenóide

apresenta espectro de absorção de luz visível característico. A variação dos espectros está relacionada ao estado de transição dos elétrons dos orbitais  $\pi$  (ligantes) aos orbitais  $\pi^*$  (antiligantes). Quanto maior o número de duplas ligações conjugadas, menos energia é necessária para promover a excitação e, conseqüentemente, o valor do comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{\max}$ ) é maior, e mais intensa é a cor do carotenóide (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007). Nos carotenóides acíclicos embora haja o mesmo número de duplas ligações entre moléculas de carotenóides cíclicos a absorção máxima é maior, isto ocorre devido as tensões de anel relacionada às conjugações, pois as duplas ligações conjugadas dos anéis são coplanares com o restante da cadeia. Um exemplo é a molécula do licopeno que embora tenha o mesmo número de duplas ligações (11 duplas ligações conjugadas) não possui anel em sua cadeia e com isto tem uma absorção máxima em acetona de 474 nm, maior do que a do  $\beta$ -caroteno que possui o mesmo número de duplas ligações conjugadas porem possui duas endocíclicas o que faz com que apresente uma absorção máxima em 454 nm.

Em decorrência da presença de insaturações, os carotenóides são sensíveis à luz, temperatura, acidez, e sofrem reações de oxidação. A configuração natural dos carotenóides nos vegetais é o isômero *todo-trans* e, como são compostos altamente insaturados, são susceptíveis à isomerização e à oxidação durante o processamento e armazenamento dos alimentos. A isomerização dos *trans*-carotenóides a *cis*-carotenóides, promovida pela acidez, aquecimento e exposição à luz, diminui tanto a coloração, quanto o  $\lambda_{\max}$ , ocorre o aparecimento de um pico *cis* no espectro, o que permite a sua identificação, além da diminuição da sua atividade de pró-vitamina A. A quantidade de *cis* isômeros, formada durante o aquecimento, está relacionada com a severidade e extensão do tratamento térmico (BRITTON, 1995). Já a oxidação está mais relacionada com o maior contato com oxigênio e é estimulada pela presença de luz,

enzimas e metais e, em geral leva inicialmente à formação de apocarotenóides, que são carotenóides com a cadeia carbônica mais curta. Estas estruturas são fragmentadas resultando na formação de compostos com baixo peso molecular, similares aos encontrados na oxidação lipídica dos ácidos graxos (SCHIEBER, 2005).

Os carotenóides são classificados em carotenóides hidrocarbonetos ou carotenos ( $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\alpha$ -caroteno) e aqueles com funções oxigenadas em oxicarotenóides ou xantofilas, as quais se diferenciam pelos grupos de substituintes, os mais comuns são hidroxila ( $\beta$ -criptoxantina), ceto (cantaxantina), epóxido (violaxantina) e aldeído ( $\beta$ -citraurina). Os carotenóides também podem ser classificados em acíclicos (licopeno), monocíclicos ( $\gamma$ -caroteno) ou bicíclicos ( $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno) (Figura 3) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

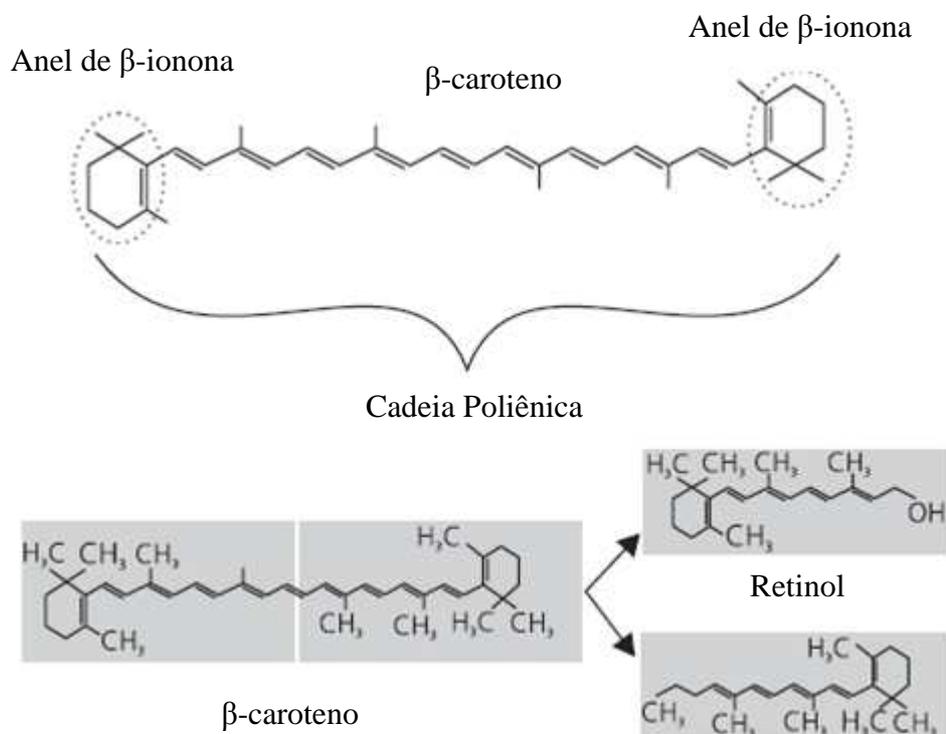


**Figura 3:** Estrutura química dos principais carotenóides da alimentação humana.

Além do seu elevado potencial nutritivo os carotenóides também são considerados compostos bioativos devido sua ação farmacológica no organismo humano, conferido efeitos benéficos a saúde.

Existem mais de 600 carotenóides, destes aproximadamente 50 são precursores da vitamina A que são caracterizados por possuírem em sua estrutura química pelo menos um anel de  $\beta$ -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos. O  $\beta$ -caroteno é um dos carotenóides, mais abundante em alimentos e o que apresenta a maior atividade de pró-vitamina A (100% de bioatividade) (Figura 4). Isto porque dentre os carotenóides é o único que possui em sua estrutura química dois anéis de  $\beta$ -ionona e com isto durante a sua conversão

normalmente ocorre a formação de duas moléculas de retinol (vitamina A) (LEUENBERGER et al., 2001)



**Figura 4:** Estrutura química do  $\beta$ -caroteno e sua conversão oxidativa em duas moléculas de retinol (AMBRÓSIO, 2006).

A forma *trans* do  $\beta$ -caroteno é a que possui maior atividade pró-vitamina A, sendo esta a configuração termodinamicamente mais estável e menos solúvel. No entanto, quando a molécula de  $\beta$ -caroteno sofre isomerização os isômeros comumente encontrados em muitas frutas e hortaliças são o 9 *cis*- $\beta$ -caroteno e o 13-*cis*- $\beta$ -caroteno. As principais fontes de  $\beta$ -caroteno são os vegetais e frutas de coloração amarela escura (como cenoura, batata-doce, abóbora e, mamão papaia, manga carambola, pêsego, respectivamente) e os vegetais de folhas verdes escuras (espinafre, brócolis, couve, chicória, escarola) (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Também se inserem no grupo de carotenóides provitamina A,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e  $\gamma$ -criptoxantina que apresentam 50% de bioatividade em relação ao  $\beta$ -caroteno. O  $\beta$ -caroteno é considerado ainda um importante composto bioativo, devido sua elevada atividade antioxidante com ação protetora contra doenças cardiovasculares, onde atua na inibição do processo de oxidação da lipoproteína durante a oxidação do LDL-colesterol, considerado fator crucial para o desenvolvimento da aterosclerose e também por ter demonstrado alguns outros efeitos biológicos benéficos, como propriedades imunomoduladoras e anti-cancerígenas (BURRI, 1997).

## **2.4. Metabolismo dos carotenoides na dieta**

### **2.4.1 Sistema digestivo humano**

Para iniciar os estudos sobre o metabolismo dos carotenóides no organismo, é importante ter conhecimento de como o sistema digestivo funciona e como o alimento é por ele transportado e as mudanças que sofre até o final da digestão.

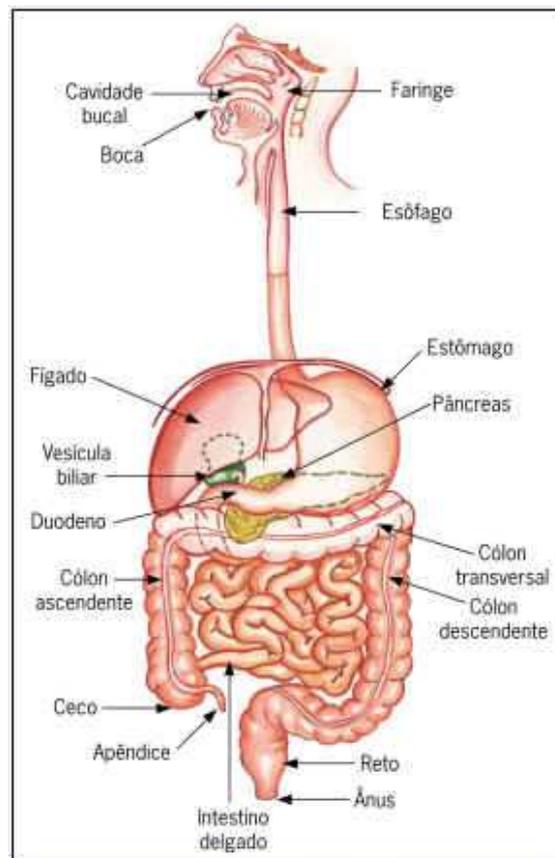
A digestão pode ser definida como um conjunto de transformações mecânicas e químicas, que os alimentos sofrem ao longo de um sistema digestivo, para se converter em compostos menores hidrossolúveis e absorvíveis pelo organismo humano (DEAN & MA, 2007).

O alimento ao ser ingerido passa por um longo processo digestivo que se inicia na boca onde o alimento é triturado através da mastigação e umidificado pela saliva em pH neutro, este processo é rápido dura apenas alguns minutos. Nele ocorre a quebra do alimento em moléculas menores, o que aumenta a superfície de contato e auxilia na liberação de nutrientes da matriz alimentar. Esta etapa tranforma o alimento em um bolo alimentar que é então deglutido, passando pela faringe e sendo transportado pelo

esôfago com o auxílio de movimentos peristálticos até o estômago. No estômago o bolo alimentar passará a sofrer a ação química do suco gástrico produzido pelas células da parede do estômago que secretam pepsinogênio inativo e ácido clorídrico (HCl) que tem a função de transformar o pepsinogênio em pepsina que promovendo quebra parcial das proteínas brutas do bolo alimentar. O ácido clorídrico produzido tem ainda a função de desnaturar estas proteínas. O bolo alimentar após essa etapa da digestão e transformando-se em quimo é transportado para o intestino delgado que é o principal local onde os nutrientes são absorvidos, incluindo gorduras, carboidratos, proteínas, minerais, vitaminas, água e eletrólitos (DEAN & MA, 2007). O intestino delgado é dividido em três porções, a primeira é conhecida como duodeno, nele o quimo recebe os sucos digestivos produzidos pelo pâncreas, pelo fígado e pela parede do intestino. O pâncreas secreta suco pancreático para o duodeno, composto por água, bicarbonato, bem como uma série de enzimas digestivas, incluindo amilase que digere o amido, tripsina que digere a proteína e lipase que digere as gorduras. No duodeno ocorre ainda a digestão das gorduras, onde o fígado produz e secreta a bile que é armazenada na vesícula biliar antes de sua liberação para o duodeno. A bile é composta de sais biliares (principalmente o ácido cólico e ácido desoxicólico), pigmentos biliares (bilirrubina), fosfolípidos (lecitina), colesterol e íons inorgânicos (sódio, potássio, cloreto e bicarbonato). A bile emulsifica a gordura transformando as gotas de gordura em estruturas micelares, aumentando assim a superfície de contato da lipase, com as moléculas de gordura. Com isto, os lipídeos ou gorduras são transformados em componentes mais simples, os ácidos graxos e o glicerol, os quais podem passar pelas paredes dos intestinos (AIRES et al, 1999).

A região seguinte do intestino delgado pode ser subdividida em *jejuno* (por ser encontrado geralmente vazio) e *íleo* (palavra de origem grega que significa voltar onde

o intestino delgado faz circunvoluções no interior do ventre). Nessa região, as enzimas conhecidas como *peptidases* completam a transformação das proteínas em aminoácidos e a *maltase* (uma enzima produzida pela parede do intestino) transforma a maltose em duas moléculas de glicose. Outros açúcares também são digeridos nessa região. Na porção final (íleo) ocorre à absorção das moléculas dos nutrientes que já foram quimicamente transformadas pelas enzimas e assim são capazes de passarem pela parede do intestino e serem transportadas pelo sangue, que distribuirá essas moléculas a todas as células do corpo. No intestino grosso ou colón, grande parte da água e eletrólitos existente no bolo alimentar também é absorvida. Os restos alimentares não digeridos passam para o reto, onde são formadas as fezes pastosas que seguem pelo canal anal, saindo do corpo através do ânus (Figura 5) (DEAN & MA, 2007).



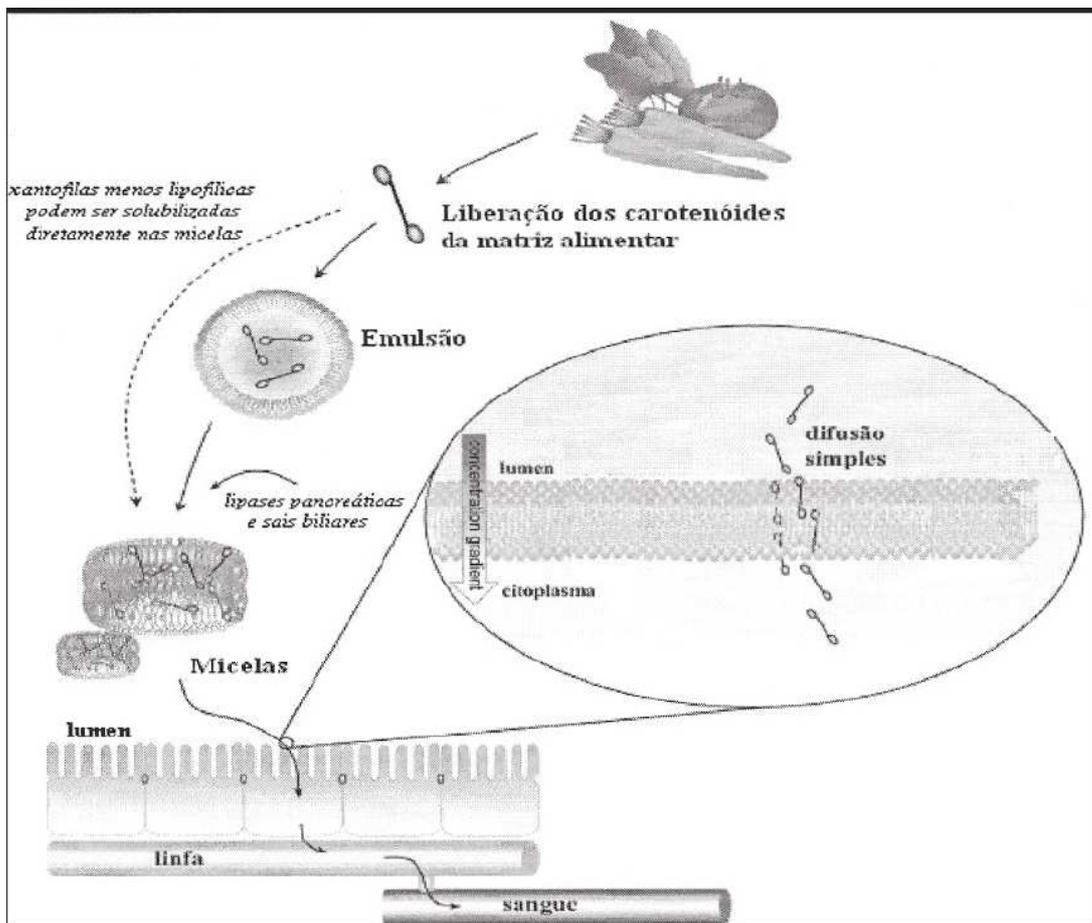
**Figura 5:** Sistema digestivo humano (Fonte:<http://reocities.com>)

#### **2.4.2. Digestão e absorção dos carotenóides**

O processo digestivo e a posterior absorção dos carotenóides pelo organismo vão depender do tipo de carotenóide contido no alimento e da forma que estes micronutrientes estarão dispostos no alimento, pois não são encontrados livres nos alimentos, mas associados a proteínas e a uma variedade de estruturas celulares da planta, como fibras e polissacarídeos (KHACHIK et al, 1995). Para que ocorra a absorção, é necessário o desprendimento destes micronutrientes do alimento. A liberação dos carotenóides da matriz do alimento ocorre através das forças mecânicas realizadas pela cocção, mastigação, deglutição e também no estômago, durante a hidrólise gástrica dos lipídios e proteínas da dieta (PARKER et al., 1996).

Os carotenóides liberados da matriz alimentar são incorporados na fase lipídica e, posteriormente, emulsionados em pequenas gotas lipídicas com o auxílio dos ácidos biliares no duodeno. A solubilidade e a localização dos carotenóides na emulsão variam de acordo com a sua polaridade. Os carotenos, por exemplo, por serem compostos apolares encontram-se exclusivamente no núcleo do triacilglicerol da emulsão (região hidrofóbica) e as xantofilas distribuem-se preferencialmente na superfície da gordura emulsionada (BOREL et al., 1996). Durante o processo digestivo, os compostos menos lipofílicos como as xantofilas, podem ser solubilizados diretamente nas estruturas micelares. Essa localização dos carotenóides na emulsão é importante porque os componentes da superfície desprendem-se espontaneamente das gotículas de gordura e são transferidos para a mistura de micelas de sais biliares no duodeno, enquanto os componentes mais lipofílicos, associados ao núcleo da emulsão, necessitam da digestão do triacilglicerol antes da transferência. As lipases do lúmen hidrolisam triacilgliceróis, fosfolipídeos e ésteres, emulsionando-os totalmente, nas gotículas de óleo. A colesterol-

esterase pancreática e triglicerídeo lipase hidrolisam os carotenóides polares e ésteres de carotenóides livres (AIRES et al., 1999; JACOBS et al., 1982). Em seguida, os carotenóides que foram emulsionados sofrem partição pela ação dos sais biliares, lipase pancreática, lipídeos dietéticos e seus produtos, formando pequenos agregados moleculares denominados micelas mistas (Figura 6). As micelas possuem uma forma de disco helicoidal com diâmetro aproximado de 4 a 60 nm, compostas em grande parte por sais biliares, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolipídios. A incorporação micelar dos carotenóides representa um fator limitante para a sua absorção (YONEKURA & NAGAO, 2007).



**Figura 6:** Esquema das principais fases da digestão e absorção dos carotenóides nos enterócitos (Yonekura & Nagao, 2007).

A absorção é um processo pelo qual as moléculas são transportadas através das células epiteliais, que revestem o trato gastrointestinal para penetrarem no sangue ou na linfa para atingirem os tecidos-alvo. A absorção dos carotenóides ocorre na mucosa do duodeno, onde há a transferência dos carotenóides das micelas mistas para os enterócitos para que haja absorção dos micronutrientes. Esse processo ainda não é totalmente entendido, acreditando-se que ocorra através de um mecanismo de difusão passiva, análogo com o que ocorre com os produtos da lipólise de triglicérides e com o colesterol. As micelas migram para a camada de água da membrana em borda escova, nesta os carotenóides deixam as estruturas micelares e se difundem através da membrana para dentro do citoplasma (PARKER, 1996; YONEKURA & NAGAO, 2007). A difusão é determinada pelo gradiente de concentração entre as micelas e a membrana plasmática do enterócito. Como a solubilidade dos carotenóides em água é muito baixa, o contato entre as micelas e a membrana celular é necessário (ROCK, 1992). A absorção intestinal do  $\beta$ -caroteno micelarizado é influenciada por uma série de fatores intra-luminal, incluindo a composição de sais biliares, pH, concentração de sódio, e comprimento e grau de saturação dos ácidos graxos (HOLLANDER E RUBLE, 1978; OLSON, 1964).

O mecanismo de transferência intracelular dos carotenóides na mucosa intestinal após absorção inicial não é bem conhecido. Sabe-se que no interior das células da mucosa intestinal, os carotenóides pró-vitamina A como o  $\beta$ -caroteno, podem sofrer clivagem e ser convertidos a retinóides (vitamina A). No caso dos carotenóides não precursores da vitamina A, logo após a absorção no intestino delgado, as substâncias ligadas a quilomícrons são absorvidas pela linfa e transportadas pelo sangue, principalmente até os tecidos ocular e adiposo, o fígado, os rins, o pâncreas e as mamas (YOUNG & BRITTON, 1993). Após a absorção, os carotenóides são transportados via

linfa para a circulação portal até o fígado, onde os hepatócitos incorporam a maioria dos carotenóides em lipoproteínas. Os carotenos predominam nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL). No entanto, os carotenóides mais polares, como as xantofilas, são distribuídos em partes iguais entre as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e as LDL e, em menor proporção, aproximadamente 20%, em VLDL. A distribuição dos carotenóides entre as classes de lipoproteínas parece ser determinada pelas características físicas individuais dos carotenóides e pela composição lipídica das lipoproteínas (PARKER, 1996).

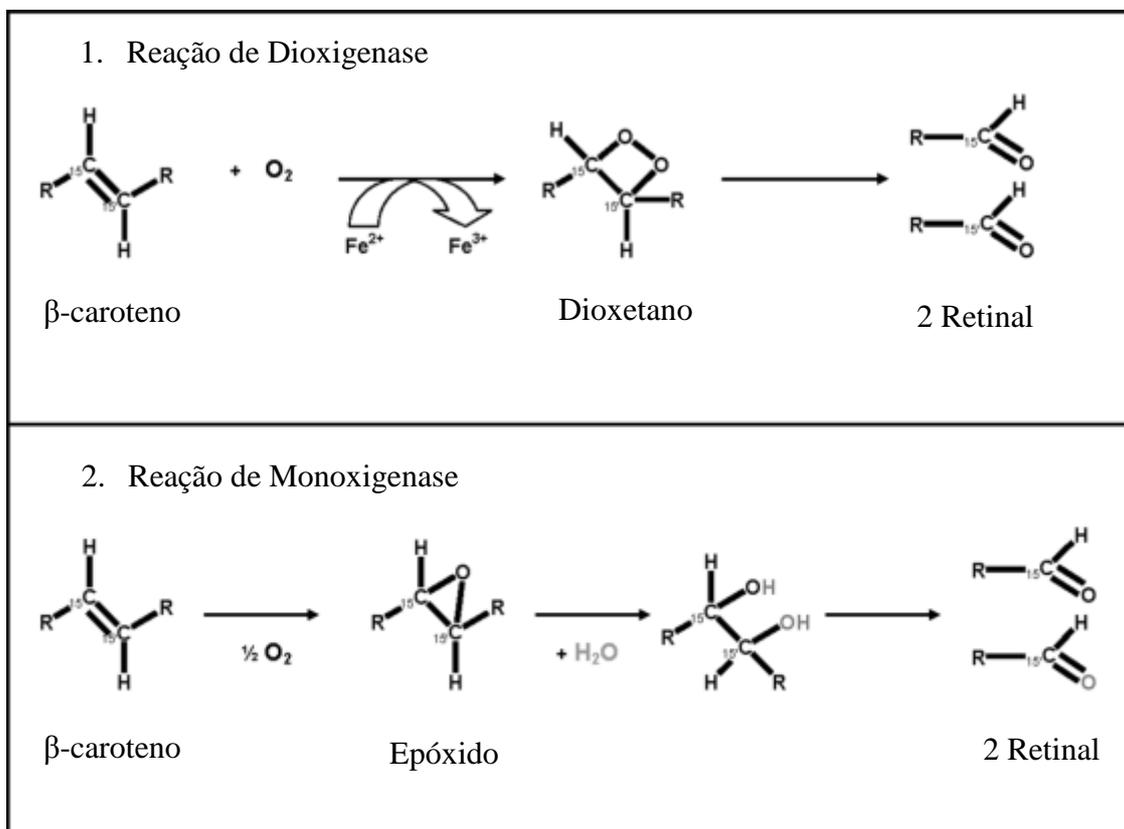
#### **2.4.3. Conversão dos carotenóides pró-vitamina A em vitamina A**

O mecanismo de conversão dos carotenóides pró-vitamina A, em particular do  $\beta$ -caroteno, pode ocorrer de duas formas dentro dos enterócitos, através da clivagem central (simétrica) da molécula de  $\beta$ -caroteno ou pela clivagem excêntrica (assimétrica).

A clivagem central da molécula de  $\beta$ -caroteno é a principal via, ocorre através da enzima  $\beta$ -caroteno 15,15'- dióxigenase localizada no citoplasma que atua clivando a dupla ligação central 15,15' da molécula do  $\beta$ -caroteno gerando duas moléculas de retinal precursor direto do retinol. Estudos propõem dois mecanismos pelo qual ocorrem a clivagem central do  $\beta$ -caroteno. O primeiro seria através de uma reação com a dióxigenase a qual requer uma molécula de oxigênio molecular e tem como produto intermediário uma molécula de dióxetano instável que é transformada rapidamente em retinal (Figura 7) (PARKER, 1996; TANG, 2010).

Um segundo mecanismo proposto, recentemente, seria uma reação com a monoxigenase, o qual requer dois átomos de oxigênio provindos de diferentes fontes (oxigênio molecular e água) e tem como produto intermediário um epóxido. Este

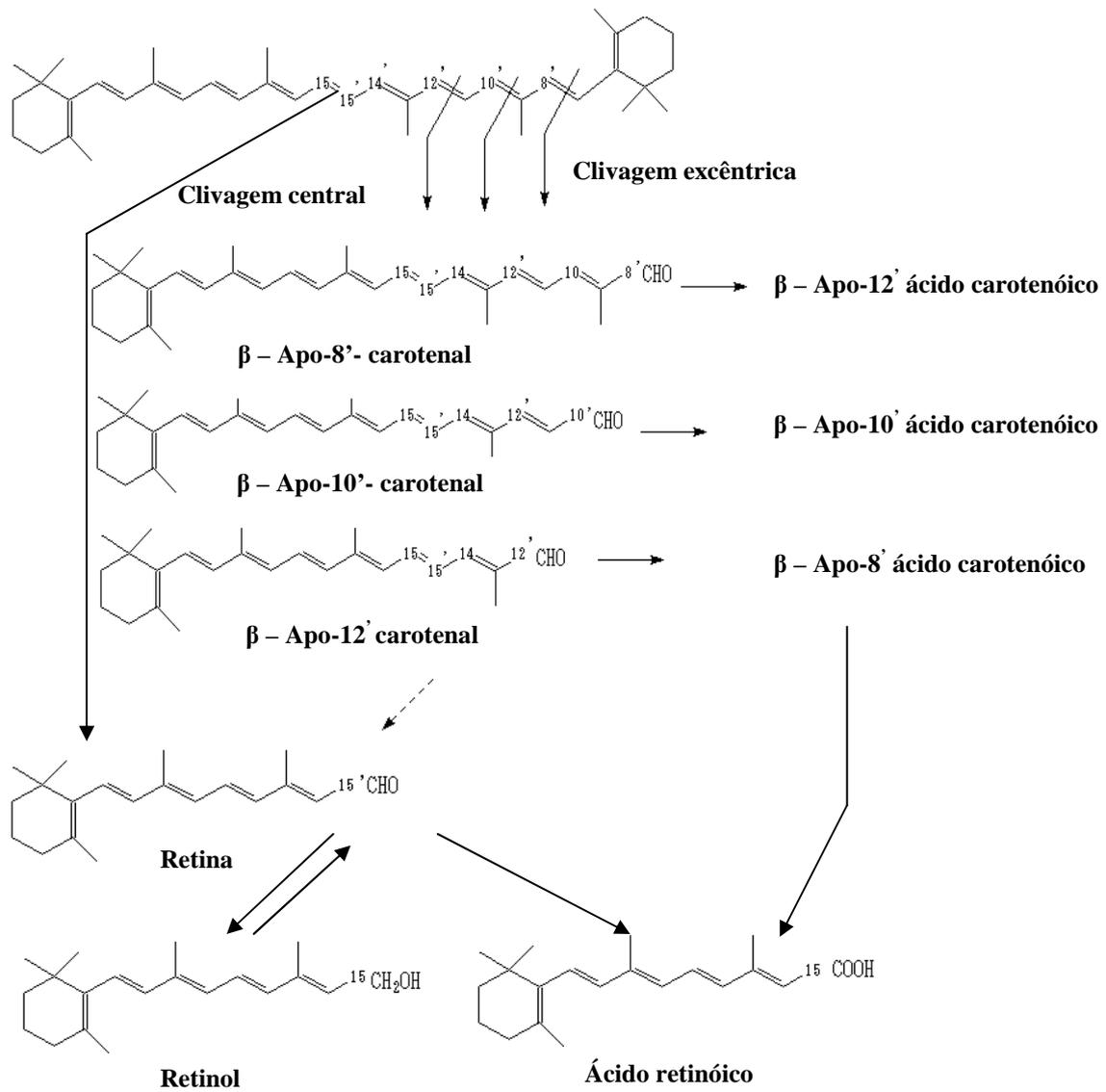
mecanismo, no entanto, ainda não está totalmente elucidado. Porém, independentemente do mecanismo, o produto final da clivagem central do  $\beta$ -caroteno é o retinal (Figura 7) (DURING & HARRISON, 2004).



**Figura 7:** Mecanismos propostos de clivagem central do  $\beta$ -caroteno: (1) Reação catalisada por dioxigenase e (2) reação catalisada por monoxigenase (DURING & HARRISON, 2004).

A clivagem excêntrica do  $\beta$ -caroteno leva à formação de moléculas de apocarotenóides com diferentes comprimentos de cadeia de acordo com a localização da dupla ligação que será clivada na molécula. Cada molécula de apocarotenóide pode ser posteriormente convertida em uma única molécula de retinaldeído ou ácido retinóico (Figura 8) (BLOMHOFF E BLOMHOFF, 2006). Estudos sugerem, que a clivagem excêntrica ocorre preferencialmente sob condições de oxidação (quando os

antioxidantes são insuficientes) como tabagismo e doenças envolvendo um estresse oxidativo e/ ou na presença de níveis elevados  $\beta$ -caroteno. Em contraste, sob condições fisiológicas normais (quando antioxidantes são suficientes), a clivagem central seria a via predominante (YEUM & RUSSELL, 2002).



**Figura 8:** Esquema dos mecanismos de clivagem excêntrica e central do  $\beta$ -caroteno e os produtos gerados durante a conversão à vitamina A.

Geralmente nem todos os carotenóides pró-vitamina A ingeridos são convertidos em retinol, então a vitamina A contida nos alimentos é expressa em termos de equivalente de retinol, ou seja, a soma das vitaminas provenientes do retinol pré-formado e dos carotenóides. Devido ao mecanismo de clivagem da molécula de  $\beta$ -caroteno onde a conversão pode ser completa ou não, geralmente utiliza-se que 12  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno equivalem a 1  $\mu\text{g}$  de retinol, enquanto que, para outros carotenóides pró-vitamina A 24  $\mu\text{g}$  são equivalentes a 1  $\mu\text{g}$  de retinol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

## **2.5. Biodisponibilidade e bioacessibilidade dos carotenóides**

O termo biodisponibilidade, inicialmente, era utilizado apenas na área farmacológica, e foi proposto pelo *Food and Drug Administration* (FDA – EUA) dos Estados Unidos, para estabelecer a proporção que a substância ativa do fármaco era absorvida e alcançava a circulação sistêmica estando assim disponível para atingir o órgão-alvo (SHETH, 1974).

No entanto, na década de 80, foi observado por estudos em nutrição humana, que a simples ingestão de um alimento contendo determinado nutriente não garantia sua utilização pelo organismo. Mas que vários fatores estavam relacionados a este processo, como a estrutura química do nutriente, a quantidade ingerida, a interação entre os vários tipos de nutrientes durante a ingestão e o mecanismo homeostático que regulam a absorção, gerando, assim, a necessidade de estudos sobre a biodisponibilidade destes nutrientes no organismo humano, a fim de conhecer seu modo de ação frente à importância de uma dieta rica em nutrientes para a saúde do indivíduo (TANUMIHARDJO, 2002).

A definição do termo biodisponibilidade de um nutriente é ainda complicada. Inicialmente, o termo era definido como a proporção do nutriente que é digerido, absorvido e metabolizado pelo organismo, estando disponível para uso e armazenamento (BENDER, 1989). Porém, esta definição não era adequada, pois alguns nutrientes não necessitam ser digeridos para serem absorvidos, assim como mesmo aqueles que são hidrolisados podem não ser absorvidos. Adicionalmente, algumas substâncias embora sejam absorvidas podem não ser metabolizadas. Ou seja, a inclusão dos termos absorvíveis e metabolizados na definição de biodisponibilidade de nutrientes gera algumas divergências. Frente ao exposto, foi proposta a seguinte redefinição para o termo biodisponibilidade: “refere-se a fração de qualquer nutriente ingerido que tem o potencial para suprir a demanda fisiológica em tecidos alvos” (YOUNG & BRITTON, 1993).

No entanto, a definição correta para biodisponibilidade ainda é alvo de discussões, em especial para os micronutrientes. Neste estudo adotou-se a definição de que biodisponibilidade, especificamente para os carotenóides, é a quantidade deste micronutriente que é absorvida pelo intestino e chega a ser disponibilizada aos tecidos-alvo.

Estudos realizados sobre a biodisponibilidade de nutrientes concluíram que aspectos como a bioconversão, bioeficácia e bioeficiência, devem ser incluídos quando se estuda a biodisponibilidade de um nutriente. A bioconversão é a proporção do nutriente ingerida que estará biodisponível para a conversão em sua forma ativa, ou seja, quanto de carotenóides pró-vitamina A da dieta estarão disponíveis para serem convertidos à retinol. Já a eficiência com a qual os nutrientes ingeridos serão absorvidos e convertidos a forma ativa do nutriente é a bioeficácia e a bioeficiência é a proporção

da forma ativa do nutriente que já foi convertido e que atingirá o tecido alvo (TANUMIHARDJO, 2002).

Nos procedimentos laboratoriais da absorção de nutrientes dos alimentos a biodisponibilidade é determinada pelo resultado de três etapas: a primeira é a bioacessibilidade, que representa a fração do nutriente que será liberada da matriz do alimento e estará bioacessível nas micelas mistas de sais biliares, representando a concentração máxima de nutrientes disponível para ser transportada através do epitélio intestinal. A segunda etapa é o transporte através do epitélio intestinal onde a fração bioacessível do nutriente será transportada do lúmen para o epitélio intestinal até a linfa e a circulação portal. A última etapa representa o efeito de primeira passagem no qual os nutrientes são metabolizados no epitélio intestinal ou no fígado e será transportada pelo corpo através da circulação sistêmica (OOMEN et al., 2003).

A bioacessibilidade seria a forma mais simples para dar início ao estudo da biodisponibilidade dos carotenóides através de um modelo de digestão *in vitro* que visa simular as etapas oral, gástricas e intestinal. Para que haja absorção dos carotenóide é necessário que ocorra sua liberação da matriz do alimento, a transferência para gotículas lipídicas e incorporação em micelas mistas de sais biliares durante a digestão. Esta seria a primeira etapa da biodisponibilidade, considerada limitante para que haja eficiência na biodisponibilidade dos carotenóides. É primordial conhecer os fatores que interferem na bioacessibilidade, para que posteriormente o estudo possa ser expandido para a captação dos carotenóides que foram incorporados nas micelas, pela célula intestinal humana Caco-2, permitindo assim, a investigação do metabolismo celular e transporte trans-epitelial dos carotenóides indicando a biodisponibilidade *in vitro* deste micronutriente (FAILLA et al., 2008). Portanto, a bioacessibilidade pode ser medida através da eficiência da micelarização dos carotenóides pró-vitamina A durante a simulação da

digestão de alimentos vegetais, mostrando ser uma ferramenta eficaz para as análises iniciais da biodisponibilidade relativa de carotenóides de cultivares como no caso da mandioca amarela BRS Jarí melhorada. Os resultados de tais estudos poderão ser utilizados como facilitadores na seleção de cultivares adequados, para posteriores estudos *in vivo* com roedores ou furões. Portanto, a finalidade primordial dos estudos sobre biodisponibilidade é conseguir correlacionar a quantidade de nutrientes da alimentação ao estado de saúde do indivíduo, para obter respostas mais precisas sobre cada nutriente em particular aos compostos bioativos, devido a ação funcional que muitos destes possuem na saúde humana.

### **2.5.1. Fatores que interferem a biodisponibilidade dos carotenóides**

O estudo da biodisponibilidade dos carotenoides é complexo, devido à influência de diversos fatores relacionados tanto ao alimento quanto ao indivíduo. Dentre os fatores relacionados ao alimento destacam-se a quantidade e natureza dos carotenóides, a natureza da matriz e estado físico do carotenóide, o método de preparo ou processamento do alimento, a interação com outros carotenóides e outros componentes na dieta. Em relação aos fatores inerentes ao indivíduo encontram-se: o estado nutricional deste, a baixa capacidade de absorção de lipídios (devido a baixa produção de pancreatina), infecções, doenças parasitárias e fatores genéticos. Estes fatores geram resultados muita das vezes inconsistentes ou inconclusivos, devido a ampla variação nas respostas obtidas (TANUMIHARDJO, 2002).

Uma forma de resumir os fatores que interferem na biodisponibilidade é a utilização do termo inglês *SLAMANGHI*, como uma técnica de memorização “mnemônica”, onde cada letra representa os fatores potenciais que afetam a

biodisponibilidade dos carotenóides os quais foram adotados dentro dos estudos referentes a biodisponibilidade. Sendo estes: *Species of carotenoids* (tipos de carotenóides), *molecular Linkage* (ligação molecular), *Amount of carotenoids consumed in a meal* (quantidade de carotenóides consumidos em uma refeição), *Matrix in which the carotenoid is incorporated* (matriz na qual os carotenóides são incorporados), *Effects of absorption and bioconversion* (efeitos da absorção e bioconversão), *Nutrient status of the host* (estado nutricional do indivíduo), *Genetic factors* (fatores genéticos), *Host-related factors* (fatores inerentes ao indivíduo) e *Mathematical Interactions* (interações matemáticas) (CASTENMILLER & WEST, 1998).

No presente estudo visou-se destacar alguns destes fatores considerados limitantes e que influenciaram nos resultados obtidos no presente trabalho, tendo um foco, sempre que possível, para uma abordagem maior sobre o  $\beta$ -caroteno.

#### **2.5.1.1. Efeito da matriz do alimento na bioacessibilidade do $\beta$ -caroteno**

Como citado anteriormente, o primeiro passo para que haja absorção dos carotenóides é a sua liberação da matriz alimentar. Sabe-se que se ocorrer uma maior liberação destes micronutrientes do alimento, proporcionalmente haverá uma eficiência maior na sua absorção e biodisponibilidade. A localização intracelular dos carotenóides na matriz alimentar está totalmente relacionada com essa liberação. Por exemplo, os carotenóides contidos nos vegetais estão localizados nos cloroplastos, associados a proteínas enquanto que nos frutos e raízes possivelmente, os carotenóides estariam localizados em cromoplastos ligados a estruturas semi-cristalinas ou podem estar dissolvidos em gotículas de óleo. Esta localização supostamente explica a maior

absorção do  $\beta$ -caroteno de frutas, em que este pigmento está presente em gotículas de óleo em comparação com vegetais de folhas verdes, onde  $\beta$ -caroteno está associado principalmente a proteínas fotossintéticas ou, no caso do tomate e da cenoura os carotenos que estão em formas semi-cristalinas (CASTENMILLER & WEST, 1998).

A maioria dos estudos sobre o efeito da matriz alimentar sobre a biodisponibilidade dos carotenóides é determinada pela resposta plasmática, após a suplementação de carotenóides com frutas e vegetais ricos em carotenóides comparada a resposta à suplementação com carotenóide puro. É necessário ainda, que a matriz utilizada seja homogênea para que a superfície de contato do alimento seja maior e ocorra a maior liberação dos carotenóides da matriz alimentar, para que estejam mais disponíveis para o processo digestivo (HOF et al., 2000). Hussein et al. (1990) realizaram um estudo com diferentes grupos que consumiram cenoura crua ralada e suco de cenoura por duas semanas. Os resultados demonstraram que no grupo que consumiu o suco de cenoura as concentrações plasmáticas de retinol e  $\beta$ -caroteno foram ligeiramente superiores ao outro grupo.

Fatores relacionados às características estruturais e propriedades físico-químicas podem influenciar na biodisponibilidade dos carotenóides. Uma dessas propriedades é a diferença do grau de hidrofobicidade dos carotenóides o que interfere na sua transferência das gotículas de emulsificação lipídica para as micelas mistas. Observado em experimentos *in vitro* os compostos mais hidrofílicos como as xantofilas, por exemplo, estariam localizados na superfície das gotículas de emulsificação lipídica, sendo facilmente transferidas para as micelas mistas durante o processo de digestão e posterior absorção, diferentemente dos carotenos que possuem maior hidrofobicidade e se localizam na parte interna das gotículas lipídicas.

A composição de isômeros do  $\beta$ -caroteno é outro fator que afeta a sua incorporação nas micelas durante o processo de absorção. Tyssandier et al. (2001) verificaram que durante a digestão de refeições ricas em carotenóides, no estômago e duodeno de seres humanos foram encontradas concentrações mínimas de isômeros. Estudos indicam que o *todo-trans*- $\beta$ -caroteno possui maior capacidade de absorção do que os isômeros *9-cis* e *13-cis*- $\beta$ -caroteno. Deming et al. (2002) observaram que após dose única de cada isômero dissolvido em óleo de algodão administradas em gerbils ocorreu uma menor absorção dos isômeros *cis* do  $\beta$ -caroteno em comparação ao isômero *todo-trans*.

#### **2.5.1.2. Efeito do processamento e adição de fonte lipídica na bioacessibilidade do $\beta$ -caroteno**

O processamento de alimentos e a presença de lipídios na dieta são considerados dentre os fatores dietéticos, limitantes para ocorrer a biodisponibilidade de carotenóides em seres humanos. Isto ocorre particularmente pela importância da liberação dos carotenóides da matriz alimentar durante a digestão e sua posterior incorporação nas micelas lipídicas, pois esses são os passos limitantes para a formação da fração acessível contendo esse nutriente que será captada pelas células intestinais.

Embora o tratamento térmico durante o preparo de alimentos, tenha um impacto negativo sobre o teor de carotenóides, um efeito positivo na micelarização de carotenos e, portanto, em sua bioacessibilidade é observado. O processamento de alimentos pelo cozimento, fritura, trituração e obtenção de sucos, juntamente com a interação dos carotenóides com outros componentes dos alimentos ou ingredientes lipofílicos pode

modificar a quantidade de carotenóides liberados da matriz alimentar e, portanto, potencialmente, aumentar ou diminuir a sua bioacessibilidade (GARRET et al., 1999).

O processamento dos alimentos destrói a estrutura de tecidos de plantas havendo dissociação ou enfraquecimento do complexo proteína-carotenóides, ou a dissolução ou dispersão do complexo cristalino de carotenóide. Desta forma, a superfície e interações de enzimas hidrolíticas e emulsionantes com partículas do alimento durante a digestão gástrica e intestinal, assim como a mastigação de frutas e vegetais crus causam o esmagamento e ruptura do tecidos e células. Ambos os mecanismos de redução do tamanho das partículas contribuir para o aumento da liberação dos carotenóides (SOUTHON & FAULKS, 2005). Embora o tratamento térmico, enzimático e mecânico possam causar isomerização e oxidação dos carotenóides, em uma abordagem geral, como visto na maioria dos estudos citados, estes processos promovem a ruptura das estruturas celulares, favorecendo a liberação dos carotenóides o que aumenta sua biodisponibilidade (YONEKURA & NAGAO, 2007).

Sullivan et al. (2010) realizaram estudos *in vitro* e verificaram o efeito do cozimento em diferentes vegetais, observaram que embora tenha havido isomerização do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno para a forma 9-*cis* e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, ao longo do processo de digestão *in vitro* os isômeros se mantiveram estáveis. O cozimento revelou-se um fator positivo na eficiência da micelarização da maioria dos vegetais analisados. No entanto, foi verificado que irá depender do tipo de matriz a ser analisada. Livny et al. (2003) através de estudos *in vivo* avaliaram a absorção de duas refeições, um purê de cenoura cozida e cenouras cruas cortadas. A quantidade de  $\beta$ -caroteno absorvido no grupo que ingeriu a refeição cozida foi significativamente maior em relação ao grupo que ingeriu cenouras cruas.

A incorporação dos carotenóides liberados em micelas mistas de lipídios pode ser considerada o segundo passo no processo de absorção dos carotenóides, o qual afeta a sua biodisponibilidade. A formação das micelas é dependente da presença de gordura no intestino, logo, a ingestão de gordura associada a carotenóides da refeição é considerado crucial para haver o aumento da sua bioacessibilidade . A adição de fontes lipídicas facilita a formação das gotículas lipídicas, que irão atuar como um reservatório de substâncias lipofílicas para os carotenóides que foram liberados da matriz alimentar, a gordura dietética promove a eficiência na solubilização dos compostos lipofílicos. No estômago durante o processo de digestão, os lipídios estimulam a liberação de sais biliares a partir da vesícula biliar e pancreatina lipase, necessários para a formação das micelas mistas de sais biliares (FURR & CLARCK, 1997).

Estudos descrevem a importância da gordura na dieta, em comparação com a sua ausência completa no momento da ingestão de  $\beta$ -caroteno. Os primeiros estudos reportaram que seriam necessários de 3-5 g de gordura para a absorção do  $\beta$ -caroteno a partir de um refeição. No entanto Huo et al. (2007) demonstraram que a transferência *in vitro* do  $\beta$ -caroteno para as micelas mistas durante a digestão exige um mínimo de 0,5-1% de óleo de canola ou trioléina na refeição. No entanto essa quantidade varia em função do tipo de óleo que está sendo utilizado devido ao comprimento das cadeias graxas acil, mas não em relação ao grau de insaturação em triglicerídeos.

Vários fatores estão relacionados à ingestão de gordura e aproveitamento dos carotenóides, tais como: tipo e fonte de gordura ingerida, quantidade, propriedades físico-químicas e a fonte de carotenóides. Borel et al. (1998) constataram que a resposta quilomícron  $\beta$ -caroteno é consideravelmente menor quando a absorção ocorre com triglicerídios de cadeia média do que quando absorvido com os triglicerídios de cadeia longa. Pois estes aumentam a hidrofobicidade dos produtos da digestão de lipídios,

possivelmente facilitando transferência dos carotenos da matriz alimentar. Além dos ácidos graxos de cadeia média serem absorvidos principalmente via portal, o que resulta em menor formação de quilomícrons.

De acordo com o tipo de gordura a absorção de carotenóides pode variar. A absorção de carotenóides em ratos foi mais eficiente quando os carotenóides foram administrados em azeite do que no óleo de milho (CLARK et al., 2000). Da mesma forma, a presença de ácidos graxos insaturados, particularmente oleato, em micelas de  $\beta$ -caroteno estimulou a absorção do intestino de ratos perfundidos (HOLLANDER E RUBLO 1978). Fontes lipídicas de frango, carne, presunto e óleo vegetal com teor de 3% de gordura foram testadas por Garret et al. (1999) em seus resultados, os carotenos foram os mais influenciados pelos lipídios, sendo que o óleo vegetal apresentou 16% de eficiência micelar para o  $\beta$ -caroteno em comparação as outras fontes lipídicas.

Chandrika et al. (2006) testaram sete tipos de vegetais através do modelo de digestão *in vitro*, avaliando o cozimento com ou sem adição de uma fonte lipídica. Os resultados mostraram que, nos métodos tradicionais de cozinhar onde o leite de coco é adicionado aos legumes como fonte lipídica, a bioacessibilidade *in vitro* de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno é muito maior do que nos mesmos legumes cozidos em água. Estes resultados demonstram que não apenas o processamento térmico do alimento, o qual, favorece a liberação dos carotenóides da matriz alimentar, mas a relação desses dois fatores: processamento térmico e adição de uma fonte lipídica, de acordo com o tipo de matriz alimentar que estará sendo empregada favorece a bioacessibilidade dos carotenóides pró-vitamina A.

## **2.6. Métodos para investigar a biodisponibilidade de carotenóides**

Inúmeros métodos têm sido utilizados para estimar a biodisponibilidade de nutrientes em carotenóides baseados, principalmente, na determinação dos níveis séricos, plasmáticos ou das frações lipoprotéicas após a ingestão de refeições ricas em carotenóides. Esta abordagem tem se mostrado útil, no entanto não indica os teores reais dos carotenóides que foram ingeridos, absorvidos e metabolizados (BOWEN et.al., 1993). Métodos como o de balanço químico, medidas dos carotenóides radiotivos na linfa ou estudos cinéticos usando carotenóides isotopicamente marcados também são utilizados no estudo da biodisponibilidade de nutrientes (COZZOLINO, 2007).

Além destes, as técnicas *in vitro*, também são utilizadas desde meados de 1930, e são aplicadas através da simulação da digestão; absorção e metabolismo utilizando células intestinais Caco-2 e a junção do modelo de digestão *in vitro* acoplado as células Caco-2. Esta técnica permite quantificar a fração solúvel ou dialisável do nutriente que estará bioacessível para posterior absorção no organismo e conversão em vitamina A. No caso dos carotenóides pró-vitamina A, a digestão *in vitro* aplicada para investigar a bioacessibilidade destes carotenóides é uma técnica que permite o controle acurado das variáveis que interferem no processo de biodisponibilidade, tornando um modelo de grande importância para prever e sugerir estudos *in vivo*.

### **2.6.1. Modelo de digestão *in vitro***

O modelo de digestão *in vitro* é econômico, eficiente para indicar a bioacessibilidade dos carotenóides em frutas, raízes, vegetais, refeições e suplementos. A digestão *in vitro* visa simular as etapas oral, gástrica e intestinal, permite investigar de

forma mais fácil e eficiente os efeitos da matriz do alimento, espécies químicas, tipo de processamento e vários fatores da dieta que interferem na estabilidade do digesto, micelarização e captação das células intestinais e transporte dos carotenóides dos alimentos e suplementos. Através de estudos *in vitro*, é possível o controle de variáveis como ambiente utilizado *in vitro*, as transformações que ocorrem no decorrer do método e fatores dietéticos que influenciam na biodisponibilidade dos carotenóides em uma matriz alimentar.

Algumas variáveis interferem diretamente no estudo de digestão *in vitro* para verificar, especialmente, a biodisponibilidade de carotenóides e, durante a aplicação da técnica, devem ser adequadas a matriz a ser analisada fatores como a quantidade de bile, pancreatina, pH e fonte lipídica para que sejam encontrados resultados confiáveis após as análises.

Garret et al. (1999) verificaram que o extrato de bile tem papel fundamental no processo de micelarização de compostos hidrofóbicos como os carotenóides. Concentrações diferentes de extrato de bile foram testadas ao longo do processo e, a mais adequada foi a de 2,4 mg/mL. Enquanto que na sua ausência os carotenóides analisados não foram detectados na fração micelar. A concentração de extrato de bile utilizada (2,4m/mL) é semelhante à encontrada no intestino de um indivíduo em jejum. A bile tem papel fundamental no processo de digestão devido suas características surfactantes diminuindo a tensão superficial e auxiliando na formação das misturas micelares com moléculas insolúveis, fosfolipídicas, vitaminas lipossolúveis e colesterol (CHARMAN, 1997; OOMEN, 2003).

As enzimas pancreáticas também exercem papel indispensável no processo de digestão, influenciam diretamente nos resultados da análise de digestão *in vitro*. No estudo de Garret et al. (1999), ao variar a concentração das enzimas pancreáticas de 0 a

0,6 mg/mL, houve diminuição de até 50% de  $\beta$ -caroteno na ausência de pancreatina. Foi verificado que 0,4 mg/mL de enzimas pancreáticas, foi ideal para obter a transferência dos carotenóides para a fração micelar. Portanto, a combinação de sais biliares e enzimas pancreáticas são alguns dos fatores considerados essenciais para uma eficiente micelarização de espécies lipofílicas.

### **3. Objetivos**

### 3.1 Objetivo Geral

Investigar a bioacessibilidade *in vitro* de  $\beta$ -caroteno de raízes de mandioca amarela (*Manihot esculenta Crantz*) BRS Jarí melhorada, *in natura* e após os processos de cozimento e fritura.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar os teores de carotenóides totais e  $\beta$ -caroteno nas raízes de mandioca amarela melhorada *in natura*, cozida e frita. E avaliar as perdas após os métodos de preparo empregados e após o processo de digestão *in vitro*.
- Adequar as condições da metodologia de ensaio de bioacessibilidade *in vitro* para a mandioca amarela melhorada *in natura*, cozida e frita, e realizar o estudo de digestão *in vitro* às raízes de mandioca *in natura*, cozida e frita.
- Verificar a eficiência de micelarização e qual forma de preparo resulta em maior bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno.
- Caracterizar a fração micelar de mandioca cozida e frita, por microscopia e determinar seu teor de  $\beta$ -caroteno por CLAE.

## **4. Material e Métodos**

#### **4.1. Amostras e material**

As raízes de mandioca amarela BRS Jarí melhorada utilizadas neste trabalho de dissertação fazem parte do projeto “A Biofortificação no Brasil - desenvolvendo produtos agrícolas mais nutritivos” e foram cultivadas e fornecidas pela Embrapa Tabuleiros Costeiros – Sergipe/ Aracaju. A colheita ocorreu após 12 meses de plantio, em junho de 2009 a maio de 2010, quando as amostras foram recebidas e os experimentos realizados no Laboratório de Cromatografia Líquida na Embrapa Agroindústria de Alimentos, acreditado pelo Inmetro para os ensaios de carotenóides.

Todos os solventes orgânicos utilizados nos experimentos (acetona, éter de petróleo, acetonitrila, metanol, éter metil-*terc*-butílico) apresentavam grau cromatográfico (“HPLC grade”, Tedia<sup>®</sup>, Brasil), os sais (NaCl, KCl, NaPO<sub>4</sub>, NaOH, CaCl<sub>2</sub>, KSCN, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>), as enzimas  $\alpha$ -amilase, pancreatina porcina, pepsina, lipase tipo II de pâncreas de suíno e os reagentes extrato de bile porcina, mucina e uréia foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil) Utilizou-se ainda cloreto de sódio grau P.A, sulfato de sódio grau pesticida Tedia<sup>®</sup>, sulfato de sódio anidro Tedia<sup>®</sup> e HCl suprapur Merck<sup>®</sup>. Durante todo o estudo foi utilizada água ultrapura (Milli-Q).

#### **4.2. Conservação das raízes de mandioca em parafina**

As raízes de mandioca BRS Jarí foram lavadas em água corrente e com escova para retirada da terra do plantio, foram secas em estufa a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) e com circulação de ar. Para prolongar o seu período de conservação, após secagem as raízes de mandioca, foram banhadas em parafina líquida (parafina de vela derretida em

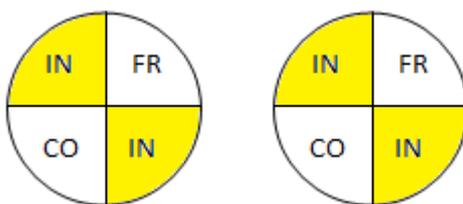
estufa a 100 °C) durante 1 min, a fim de formar uma camada espessa de parafina (Figura 9), promovendo assim, a diminuição da permeabilidade ao oxigênio e à conseqüente inativação de algumas enzimas oxidativas (peroxidase e polifenoloxidase), que reduzem as perdas de umidades das raízes (PEDROSO, 2005). Em seguida as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C até análises.



**Figura 9:** Esquema do processo de parafinação: (a) raízes de mandioca com terra; (b) lavagem das raízes de mandioca; (c) secagem; (d) parafinação; (e) raízes de mandioca parafinadas.

### 4.3. Preparo das amostras

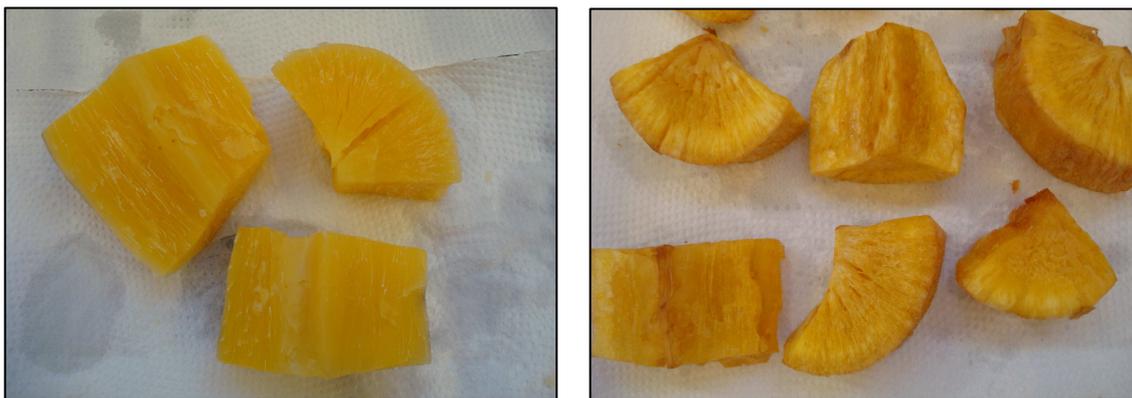
Para todas as análises subseqüentes foram utilizadas amostras compostas de raízes de mandioca amarela BRS Jarí melhorada. A camada de parafina foi retirada das raízes, foram descascadas e quarteadas longitudinalmente, com faca de aço inox, de uma extremidade a outra da raiz. As raízes foram divididas em quatro partes e duas destas, opostas entre si, foram usadas para a análise da amostra *in natura*, e as duas partes restantes foram cortados em cubos e utilizados para o processo de cozimento e fritura (Figura 10).



**Figura 10:** Ilustração da combinação entre duas raízes 1 e 2 (amostras compostas) para realização dos cortes longitudinais para análises das amostras *in natura* (IN), cozida (CO) e frita (FR).

**Cozimento.** Adicionou-se água sobre os cubos de mandioca até cobri-los completamente. O cozimento foi realizado em panela de pressão por 45 min após fervura. Em seguida as amostras foram drenadas e resfriadas (Figura 11a).

**Fritura.** Para o processo de fritura, as raízes de mandioca foram cozidas em panela de pressão por 30 min, a água foi drenada, as amostras foram resfriadas e levadas à fritura em óleo de soja a 180 °C por 8 min até atingir consistência firme (Figura 11b). O excesso de óleo foi removido com papel absorvente e resfriadas até temperatura ambiente.



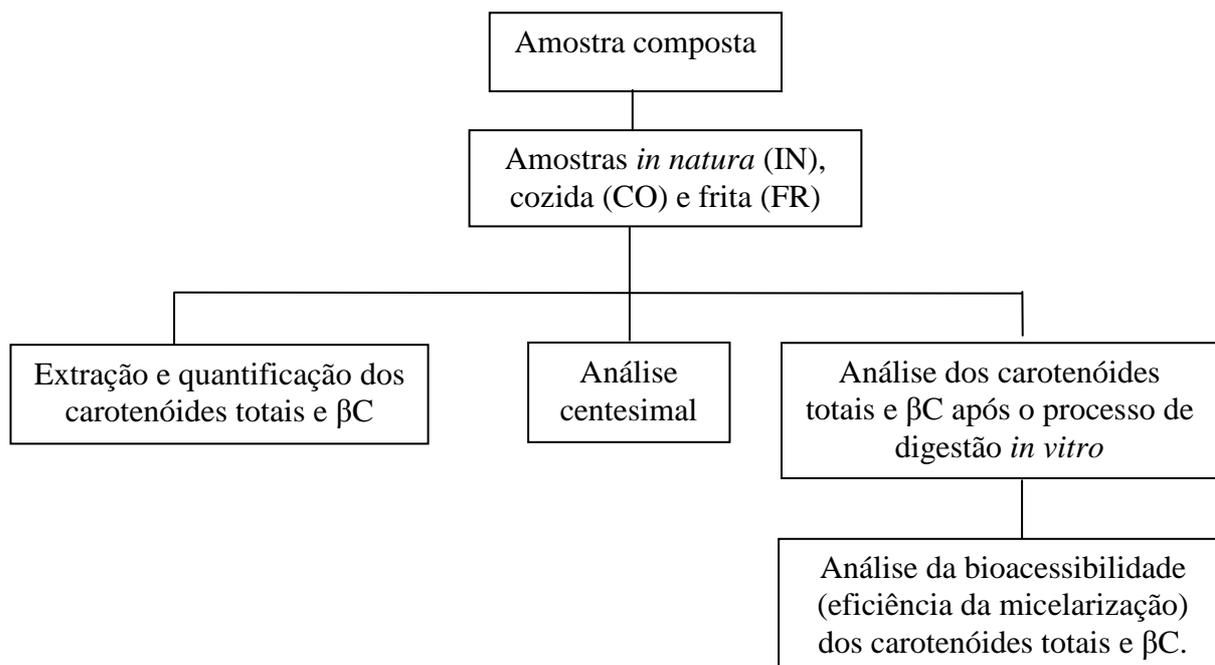
(a)

(b)

**Figura 11:** Fotos da mandioca amarela BRS Jarí melhorada após os processos de cozimento (a) e fritura (b).

Após preparo das amostras, cada uma delas (*in natura*, cozida e frita) foram separadamente trituradas em moinho (Moinho simples IKA<sup>®</sup> A11), para homogeneização, seguida de armazenagem em embalagens metalizadas em atmosfera purgada com nitrogênio e refrigeradas a 4° C até análises.

Os experimentos foram realizados com três amostras compostas (A, B e C) e cada uma delas em triplicata, tendo no final do experimento um total de nove replicatas (n= 9) para cada processo (mandioca *in natura*, cozida e frita). O diagrama esquemático abaixo ilustra o fluxo das análises realizadas para cada amostra composta (Figura 12).



**Figura 12:** Desenho experimental das análises realizadas nas raízes de mandioca amarela BRS Jarí.

#### **4.4. Análise da composição centesimal das amostras de mandioca BRS Jarí *in natura*, cozida e frita.**

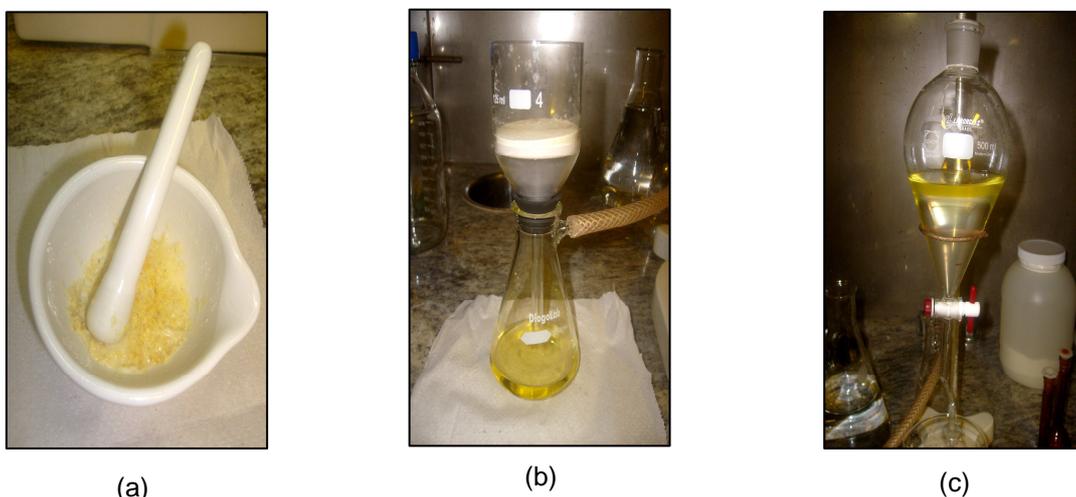
Foram realizadas análises de umidade, cinzas, lipídios (extrato etéreo) e N total nas amostras *in natura*, cozida e frita. Todas as análises foram realizadas de acordo com métodos oficiais (AOAC, 2005) no laboratório de físico-química da Embrapa – Agroindústria de Alimentos.

#### **4.5. Extração dos carotenóides das amostras de mandioca amarela BRS Jarí, antes do processo de digestão *in vitro***

As análises foram realizadas em triplicata para cada composta (A, B e C), utilizando 10g para as amostras de mandioca *in natura* e cozida e 7g para a mandioca frita. A extração foi realizada com maceração das amostras em gral e pistilo utilizando

celite, para homogeneização, e acetona (Figura 13a). O extrato obtido foi vertido para funil de vidro sinterizado e filtrado a vácuo (Figura 13b). A extração foi repetida por três ou mais vezes, até que houvesse ausência da coloração amarelada indicativa de carotenóides na celite. O extrato obtido foi transferido, quantitativamente, para funil de separação, contendo éter de petróleo e lavado com aproximadamente 300 mL de água ultra-pura (Água Milli- Q<sup>®</sup>) por três vezes (Figura 13c). O extrato final foi transferido para balão volumétrico âmbar de 50 mL, com auxílio de funil contendo lã de vidro e 15g de sulfato de sódio anidro e avolumado com éter de petróleo. Em seguida, para a quantificação de carotenóides totais realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu – UV – 1800) a 450 nm.

Uma alíquota de 2 mL do extrato foi seca sob fluxo de nitrogênio constante e ressuspensa para 100  $\mu$ L de acetona e analisada por CLAE para a separação, identificação e quantificação dos carotenóides das amostras (RODRIGUEZ-AMAYA, et al., 2001).



**Figura 13:** Etapas do procedimento de extração dos carotenóides das amostras de mandioca: (a) maceração da amostra; (b) filtração a vácuo em funil sinterizado; (c) Separação das fases em funil de separação e recuperação dos carotenóides contidos na fase etérea.

#### 4.6. Digestão *in vitro*

O procedimento de digestão *in vitro* buscou simular as etapas oral, gástrica e intestinal da digestão humana. As formulações dos modelos de sucos digestivos foram baseadas na fisiologia humana, assim como o tempo de transição entre as etapas, a temperatura e o movimento peristáltico, através de agitação a 60 rpm em banho com giro orbital (banho-maria com agitador orbital gyromax TM). O protocolo descrito por Garrett et al. (1999) para simulação da digestão humana foi seguido com algumas modificações. Foram realizados testes preliminares com o intuito de adequar e otimizar o método para as matrizes em questão (mandioca *in natura*, cozida e frita). Foram ajustados a massa das amostras a serem analisadas, volume da alíquota para extração da fração micelar e o percentual de fonte lipídica (óleo de canola) adicionada para auxiliar a formação das micelas na fase intestinal. A pureza do óleo de canola utilizado no processo de digestão *in vitro* foi analisada por espectrofotometria, para garantir que não havia quantidades residuais de carotenóides que pudessem interferir nos resultados obtidos. As condições apresentadas a seguir foram definidas nos testes preliminares.

**Preparo da amostra.** Foram adicionados 1% (p/p) de óleo de canola nas amostras *in natura* e cozida, e homogenizou-se. Em seguida as amostras foram pesadas, em tubo de polipropileno de 50 mL com tampa de rosca, 15, 20 e 10 g das amostras de mandioca *in natura*, cozida e frita respectivamente. As análises foram realizadas em triplicatas.

**Simulação da fase oral da digestão.** Em cada tubo de polipropileno com as amostras foram adicionados 7 mL de solução contendo  $\alpha$ -amilase, mucina e uma mistura de sais (KCl, KSCN,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , Uréia, NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ), conforme descrito por Oomen et al. (2003). As amostras foram seladas em atmosfera de nitrogênio, homogeneizadas e colocadas sob agitação em banho orbital a 37 °C e 60 rpm

por 10 min. Em seguida, foram transferidas para uma cuba com gelo a fim de inibir a ação enzimática.

**Simulação da fase gástrica da digestão.** Nos tubos provenientes da fase oral adicionou-se solução A (120 mM NaCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub> e 5 mM KCl) até o volume de 30 mL, em seguida foram homogeneizadas em vórtex. O pH foi ajustado para  $2,5 \pm 0,1$  com HCl 1 mM, em seguida adicionou-se 2 mL de pepsina estoque (40 mg/mL 100 mM HCl) em cada tubo. Ajustou-se o volume para 40 mL com a solução A, de modo que a concentração final de pepsina fosse de 2 mg/mL. Em seguida os tubos foram incubados novamente em banho com agitação orbital por 1 h, nas mesmas condições descritas anteriormente.

**Simulação da fase intestinal da digestão.** Pela adição de solução de NaHCO<sub>3</sub> o pH das amostras foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$ , nos tubos provenientes da fase gástrica da digestão. Em seguida, foram adicionados 3 mL de solução estoque de extrato de bile (40 mg extrato de bile/ mL 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) e 2 mL de solução estoque de pancreatina-lipase (10 mg de pancreatina + 5 mg lípase/ mL 100 mM NaHCO<sub>3</sub>), e o pH foi ajustado para  $6,5 \pm 0,2$  com NaOH 1M. O volume foi aferido para 50 mL com a solução A e os tubos foram selados em atmosfera de nitrogênio e colocados no banho com agitação orbital por 2 h (Figura 14a), nas condições descritas anteriormente (FAILLA & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

**Separação da fração micelar.** A fração micelar consiste na fração emulsificada pelos sais biliares, também chamada de fração micelarizada. Para a separação, os tubos com as amostras digeridas foram homogeneizados e uma alíquota de 30mL foi transferida para um outro tubo de polipropileno, sendo então centrifugados ( $5000 \times g$  a 4 °C/ 45 min) para separação da fração micelar (Figura 14b). Através da centrifugação separou-se a fase aquosa da fração emulsificada, que pode conter quantidades variadas

de óleo, caso tenha sido separado fisicamente da mandioca, porém não tenha sido emulsificada pelas quantidades de sais biliares adicionadas no ensaio.



**Figura 14:** Etapas do processo de digestão *in vitro*: (a) amostras em banho-maria a 37 °C com agitador orbital gyromax TM simulando os movimentos peristálticos do organismo à temperatura corpórea; (b) separação da fração micelar por centrifugação.

#### 4.7. Extração dos carotenóides da fração micelar

A fração micelar foi transferida, quantitativamente, com auxílio de uma pipeta automática dos tubos de polipropileno para um funil de separação. Foram adicionados 30 mL de éter de petróleo e 200 mL de uma solução aquosa de NaCl 10%, em seguida foram homogeneizados. Após a separação das fases aquosa e orgânica, a fase orgânica foi lavada com solução de NaSO<sub>4</sub> 2% por duas vezes, para retirar possíveis resíduos de fase aquosa. A fase orgânica da extração contendo o  $\beta$ -caroteno foi filtrada em funil com lã de vidro contendo NaSO<sub>4</sub> anidro e recolhida em balão de fundo redondo (FERNANDEZ-GARCIA, MOSQUERA & PÉREZ-GÁLVEZ, 2007). O extrato foi

concentrado em evaporador rotativo por aproximadamente 10 min e o resíduo do extrato foi ressuspensão e avolumado com éter de petróleo em balão volumétrico de 5 mL. Uma alíquota de cada amostra foi analisada em espectrofotômetro a 450 nm para determinação do teor de carotenóides totais, e outra alíquota de 2 mL de cada extrato foi seca sob fluxo de nitrogênio constante, ressuspensa com 100µL de acetona, transferida para microtubo de 1,5 mL, centrifugada (80 rpm/ 1 min) e transferida, com auxílio de uma pipeta automática, para vial âmbar com redutor de volume, até análise por cromatografia.

#### **4.8. Análise de carotenóides totais e composição de carotenóides das amostras de mandioca não-digerida e digerida**

A determinação dos teores de carotenóides totais das amostras antes e após o processo de digestão *in vitro* foi realizada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 450 nm (UV-1800; SHIMADZU, Japão). Todas as leituras válidas usadas nos cálculos apresentaram valores de absorvância entre 0,2 e 0,8. Quando valores fora desse intervalo eram obtidos, as amostras eram diluídas ou concentradas apropriadamente. A determinação da concentração dos carotenóides totais foi dada de acordo com a lei de Lambert-Bier, calculados em base seca e em base úmida, para fins de comparação tanto entre as amostras estudadas, quanto com outros estudos já reportados na literatura (Equação 1).

$$\text{Conc. carotenóides totais } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Abs} \times f_{\text{dil}} \times V \times 10000}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times m} \quad (1)$$

Onde:

Abs = Absorbância

$f_{\text{dil}}$  = Fator de diluição da amostra

V = Volume total de extrato (mL)

m = Massa da amostra (g)

$A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$  (absortividade do  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo).

A separação, identificação e quantificação do  $\beta$ -caroteno *todo-trans* e dos isômeros *cis* nas amostras analisadas foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo Waters (EUA), composto por bomba W600, degaseificador, forno de coluna, injetor automático 717 Plus, detector de arranjo de fotodiodo - PDA 996, operados pelo software Empower (Waters, EUA). Os carotenóides foram separados em coluna de fase reversa C<sub>30</sub> YCM Carotenoid S-3 (4,6 mm × 250 mm; Waters, EUA). Os analitos foram eluídos com gradiente dos solventes metanol e éter metil terc-butílico como descrito em Pacheco (2009). As condições de análise foram: fluxo 0,8 mL/min; injeção automática de 15  $\mu$ L do extrato obtido das amostras; temperatura 33 °C e tempo total de análise de 28 min (PACHECO, 2009). Os dados foram armazenados e processados pelo programa Empower.

Os carotenóides foram identificados através dos tempos de retenção de padrões isolados no laboratório, e dos espectros de absorção UV/Vis dos picos cromatográficos, por comparação com espectros publicados. A quantificação do  $\beta$ -caroteno foi feita de acordo com a curva de calibração, baseada nas áreas dos picos cromatográficos. Todos

os resultados foram calculados em base seca e em base úmida em triplicatas de cada amostra composta.

A retenção dos carotenóides foi estimada para cada método de preparação aos quais as raízes de mandioca BRS Jarí foram submetidas, comparando-se os valores obtidos das amostras processadas com seu controle *in natura* correspondente de acordo com a Equação 2:

$$\text{Retenção (\%)} = \frac{\text{Conc. Carotenóides nas raízes processadas}}{\text{Conc. Carotenóides nas raízes } in natura} \times 100 \quad (2)$$

A eficiência da micelarização (bioacessibilidade) de carotenóides totais e do  $\beta$ -caroteno nas amostras foi obtida a partir dos resultados da quantificação dos carotenóides na amostra antes de ser submetida ao processo de digestão e após o processo de digestão ou seja, quantificação da fração micelar de acordo com a Equação 3 (OOMEN et al, 2003):

$$\text{Eficiência de micelização (\%)} = \frac{[\beta\text{-caroteno}]_{\text{Fração Micelar}}}{[\beta\text{-caroteno}]_{\text{Mandioca}}} \times 100 \quad (3)$$

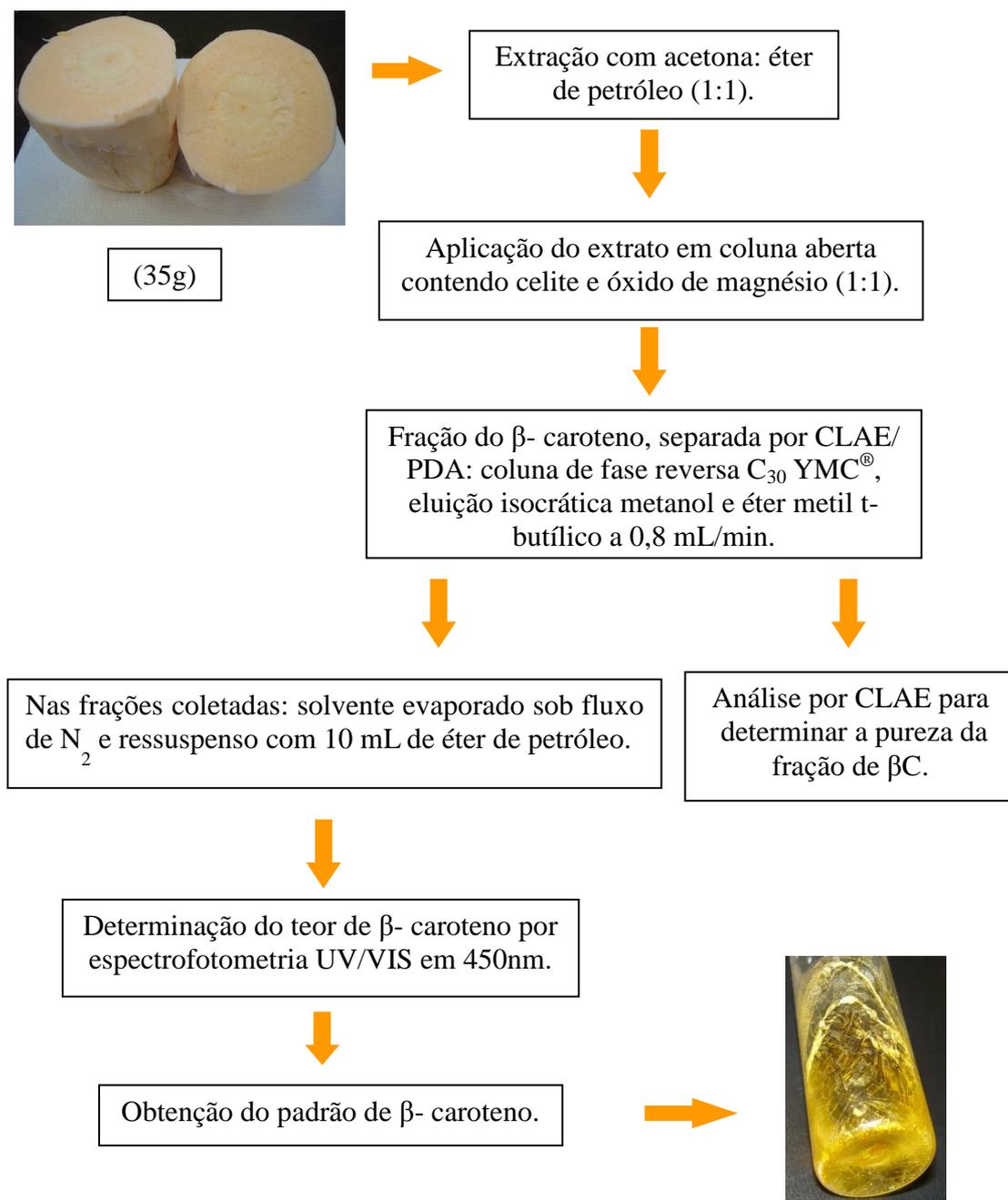
#### **4.9. Preparação do padrão de $\beta$ -caroteno**

Um dos desafios na análise de carotenóides de alimentos reside na obtenção de padrões cromatográficos, com alto grau de pureza, em quantidades satisfatórias e com um baixo custo na produção, além da sua apropriada conservação. Os padrões comerciais muitas das vezes, ao chegar no laboratório acabam por se degradar

facilmente, devido a sensibilidade dos carotenóides a fatores físicos e químicos, tais como a luz, temperaturas elevadas, oxigenação entre outros, que podem resultar em comprometimento dos resultados analíticos obtidos com sua aplicação (PACHECO, 2009). Portanto uma das formas de minimizar estes problemas é a obtenção dos padrões analíticos a partir de fonte vegetal em escala laboratorial, como foi aplicada no presente trabalho.

#### **4.9.1. Obtenção do padrão cromatográfico de $\beta$ -caroteno**

O padrão cromatográfico de  $\beta$ -caroteno foi obtido das próprias amostras de mandioca amarela BRS Jarí, utilizadas no presente trabalho. Aproximadamente 35 g de mandioca foram usadas para extração dos carotenóides de acordo com o procedimento 4.5. O extrato etéreo obtido contendo os carotenóides foi aplicado em coluna aberta contendo celite e óxido de magnésio (1:1), para sua pré-separação. A fração representativa do  $\beta$ -caroteno foi coletada e seca sob fluxo de  $N_2$ , em seguida, ressuspensa com acetona e separada por CLAE usando um método isocrático (55% metanol e 45% de éter metil terc-butílico; fluxo de 0,8mL/min; 25  $\mu$ L de injeção e coluna  $C_{30}$  YCM Carotenoid S-3 4,6 mm x 250 mm da Waters de fase reversa), o pico do  $\beta$ -caroteno foi coletado na saída do detector em ampola de vidro (Figura 15).



**Figura 15:** Diagrama esquemático do procedimento de obtenção do padrão *todo-trans*- $\beta$ -caroteno.

Foram necessárias 24 injeções de 25 $\mu$ L com intervalo de 5 min cada. A concentração da solução padrão foi calculada com base na absorbância a 450 nm e com o coeficiente de absorvidade específico de 2592 para o  $\beta$ -caroteno em éter de petróleo (Equação 4).

$$C(\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs} \times 10^4}{2592} \quad (4)$$

A pureza do padrão cromatográfico foi determinada por CLAE, conforme descrito anteriormente, em fração do extrato concentrada 20 vezes e calculada conforme a Equação 5 abaixo:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{Área Pico padrão} \times 100}{\text{Área Total}} \quad (5)$$

A pureza do padrão de  $\beta$ -caroteno obtido foi maior ou igual a 90%, que é a mínima necessária para se considerar uma substância padrão. A pureza do padrão foi usada para corrigir concentração de  $\beta$ -caroteno no extrato isolado, conforme apresentado na Equação 6 abaixo:

$$C \text{ corrigida } (\mu\text{g/mL}) = \frac{C (\mu\text{g/mL}) \times \text{pureza (\%)}}{100} \quad (6)$$

100

Para conservação do padrão, adicionou-se cristais de antioxidante BHT à solução, secou-se em ampola sob fluxo de  $\text{N}_2$ , selou-se com sistema de maçarico e está foi armazenada em freezer a  $-18^\circ\text{C}$  até utilização.

#### 4.9.2. Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração, imediatamente após a abertura da ampola, o padrão de  $\beta$ -caroteno foi dissolvido em 100  $\mu$ L de acetona, com auxílio de agitador vórtex. Com pipetadores automáticos apropriados, alíquotas quantitativas foram obtidas para construção da curva de calibração de sete pontos, em triplicata de cada concentração (Tabela 1). As soluções foram transferidas para vial com redutor de volume, e analisadas por CLAE (PACHECO, 2009).

**Tabela 1.** Concentrações dos sete pontos da curva de calibração.

Ponto da Curva de calibração	Alíquota da solução de padrão de $\beta$ -caroteno ( $\mu$ L)	Concentração final $\mu$ g/ mL
1	10	0,5
2	30	1,5
3	50	2,5
4	70	3,5
5	100	5,0
6	130	6,5
7	160	8,0

#### 4.10. Análise da fração micelar por microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi aplicada para confirmar a presença do  $\beta$ -caroteno emulsionado na fração micelar das amostras estudadas. Além disso, nas análises de microscopia foi observada a morfologia das estruturas dos carotenóides das

amostras de mandioca amarela BRS Jarí cozida e frita e comparada à morfologia de cristais de  $\beta$ -caroteno.

Alíquotas da fração micelar das amostras de mandioca amarela Jarí BRS cozida e frita obtidas após o processo de digestão foram submetidas à análise em microscópio de fluorescência convencional com sistema de captura color View XS acoplado em microscópio Karl-Zeiss (EUA), com filtro GFP–Axioplan (excitação em 488 nm e emissão em 565 nm), com aumento de 400 vezes. Uma alíquota de cada amostra de mandioca foi colocada em um sistema de lamina e lamínula e observada no microscópio nas condições acima. Uma amostra de padrão comercial de  $\beta$ -caroteno foi suspendida em acetona e utilizada como controle para observação dos cristais de  $\beta$ -caroteno e comparação com as amostras de mandioca frita e cozida após digestão *in vitro*.

#### **4.11 Análise estatística.**

Todos os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística descritiva para calcular médias aritméticas e desvio padrão (DP), como medidas de centralidade e de dispersão, respectivamente. Para comparar os resultados das concentrações de carotenoides totais,  $\beta$ -caroteno e isômeros *cis* e a eficiência da micelarização entre os métodos de preparos das amostras estudadas (mandioca *in natura*, cozida e frita), foi realizada análise de variância (*one way* ANOVA) com medidas repetidas com teste posterior de Tukey. A determinação de significância da diferença entre os métodos de preparo foi obtida pelo teste (t) pareado utilizando-se nível de significância de  $p < 0,05$ . Todas as análises dos resultados obtidos foram realizadas através do programa de estatística GraphPad Prim V 4.0 (GraphPad Software, EUA).

## **5. Resultados e Discussão**

## **5.1. Resultados dos testes preliminares para o processo de digestão *in vitro***

Para otimização da metodologia foram realizados alguns testes preliminares e serão expostos apenas os resultados mais relevantes.

### **5.1.1. Quantidade de amostra, e alíquota para extração dos carotenóides da fração micelar**

Para verificar a melhor quantidade de amostra a ser utilizada nas análises durante o procedimento de digestão *in vitro*, foram testadas diferentes massas da amostra (10, 15 e 20 g) *in natura* como testes preliminares. O melhor resultado da eficiência de micelarização foi obtido com 15 g, sendo este utilizado nas análises, pois com 10 g não obteve-se leitura da absorbância do extrato no espectrofotômetro na faixa de 0,2 a 0,8, necessária para haver quantificação. Enquanto que com, massa maior do que 15 g, não houve boa homogeneização dificultando a extração dos carotenóides da matriz alimentar levando a erros na quantificação. As massas usadas para as amostras processadas (cozida e frita) foram corrigidas de acordo com o teor de umidade da amostra *in natura*, de modo que a proporção água:solventes orgânicos de extração fosse constante. Houve ainda a necessidade de otimizar o volume da alíquota da fração micelar, necessária para obter absorbância entre 0,2 e 0,8, foram testados os volumes de 10, 20 e 30 mL e os melhores resultados foram obtidos com uma alíquota de 30 mL para a extração dos carotenóides da fração micelar com valores de absorbância dentro da faixa necessária para quantificação dos carotenóides.

### **5.1.2. Tipo, quantidade (%) e pureza da fonte lipídica usada no processo de digestão *in vitro***

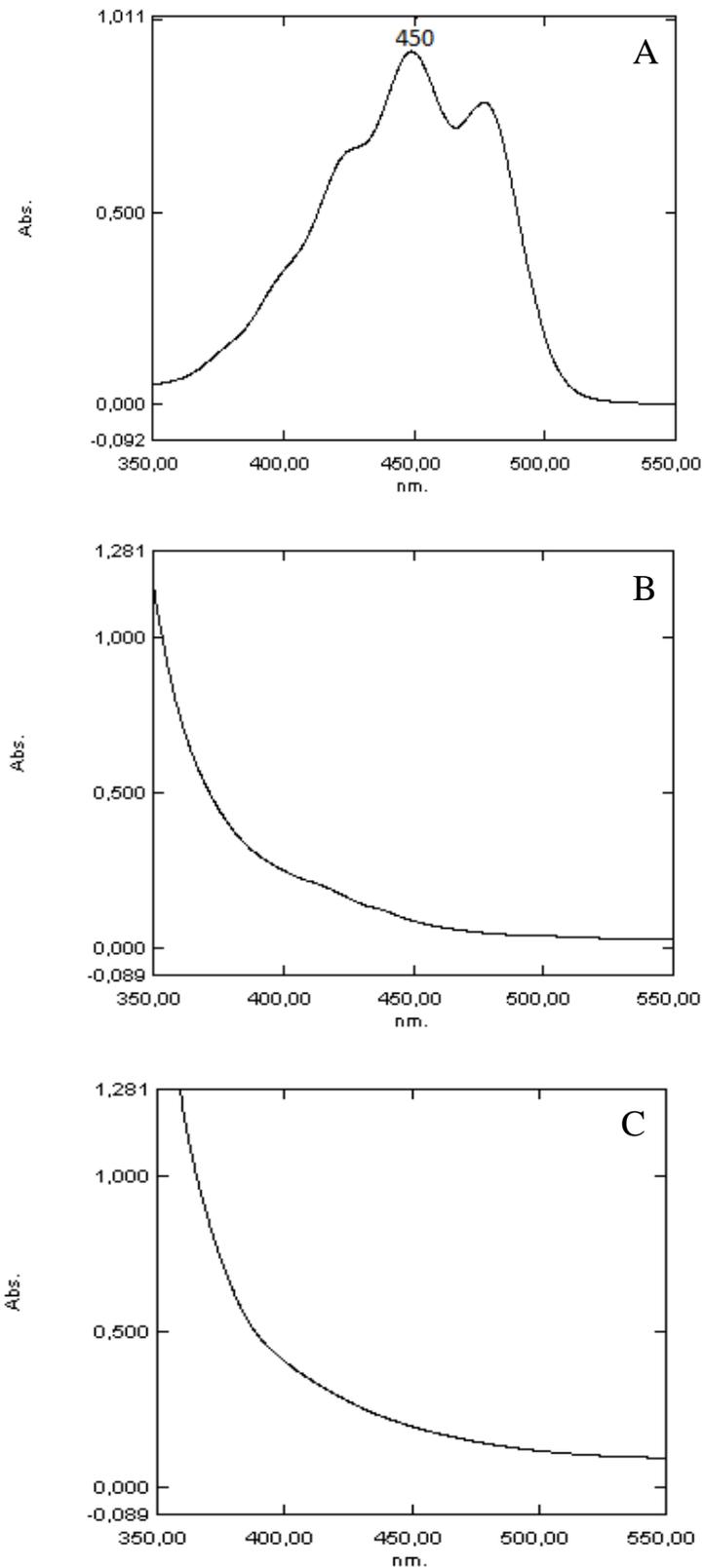
Para a correta preparação das amostras para a digestão *in vitro* foi observada a necessidade da adição de um óleo nas amostras com teores reduzidos de lipídios, afim de permitir a formação das micelas e micro-emulsões contendo os carotenóides. A escolha do tipo de óleo de canola ocorreu de acordo com resultados anteriores já obtidos pelo grupo de pesquisa do laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos e dados da literatura (HUO et al., 2007). Foi utilizado óleo de canola refinado por este não apresentar quantidades relevantes de carotenóides e por apresentar conteúdos elevados de ácidos graxos de cadeia longa, especialmente os de 18 C, tais como: ácido oléico (C18:1- 53-70%), ácido linoléico (C18:2- 15-30%) e ácido linolênico (C18:3- 5- 13%). Os ácidos graxos de cadeia longa favorecem as interações dos carotenóides com os lipídios, favorecendo a bioaccessibilidade.

Huo et al. (2007) investigaram a adição de três tipos de óleos vegetais disponíveis no mercado: de soja, de girassol e de canola, a fim de determinar qual dos óleos proporcionaria maior eficiência de micelarização, uma vez que o tamanho da cadeia e o número de insaturações podem afetar a micelarização dos carotenóides. Entre os óleos investigados, o óleo de canola apresentou melhor capacidade de emulsificação dos carotenóides, promovendo uma maior transferência dos carotenóides da matriz do alimento para as gotículas lipídicas que seriam emulsionadas, em função de propriedades estruturais dos lipídios do óleo de canola. Quanto à quantidade de óleo a ser adicionada, os autores observaram que com 1% (p/p) de óleo de canola adicionado, obteve-se eficiência na micelarização do  $\beta$ -caroteno, enquanto que com o aumento na

quantidade de óleo de canola até 2,5% (p/p) houve diminuição na eficiência da micelarização do  $\beta$ -caroteno.

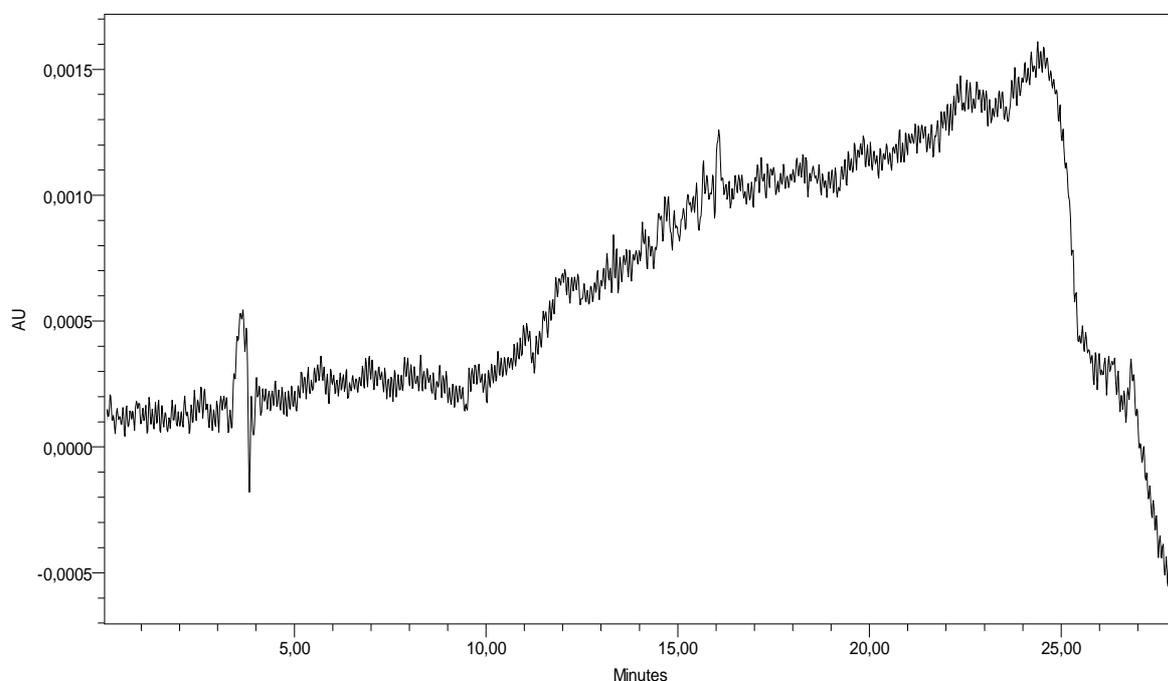
No presente estudo utilizou-se nas análises de digestão *in vitro* 1% de óleo de canola como fonte lipídica, pois foram realizados testes com 3% de óleo de canola, porém os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois observou-se aderência na superfície do tubo de digestão de uma camada de gotículas lipídicas, as quais não sofreram hidrólise e, com isto, diminuiu a formação de estruturas micelares promovendo a diminuição da eficiência da micelarização.

Com o intuito de evitar contaminações das amostras e incorporação de fontes de erros analíticos que pudessem reduzir a qualidade dos resultados obtidos, a pureza do óleo de canola, assim como a pureza do óleo de soja que foi utilizado no processo de fritura, foram testados através de análises espectrofotométricas e cromatográficas. O espectro obtido da leitura de uma alíquota de óleo de canola (Figura 16B) e de uma alíquota de óleo de soja (Figura 16C) foram comparados com o espectro do extrato etéreo de mandioca (Figura 16A) contendo os carotenóides. O espectro foi extraído na faixa de absorvância para o  $\beta$ -caroteno (450 nm) e foi verificado que entre 350 a 550 nm não houve a presença da banda característica do  $\beta$ -caroteno na faixa de 450 nm como observado no espectro da solução etérea de mandioca contendo esse carotenóide.



**Figura 16:** Comparação dos espectros de absorção de luz visível (350 a 550 nm), obtidos dos extratos de mandioca BRS Jarí melhorada rica em  $\beta$ -caroteno (A), do óleo de canola (B) e do óleo de soja (C), para verificar a ausência de  $\beta$ -caroteno nos óleos.

A análise do óleo de canola por CLAE certificou a ausência de carotenóides, como apresentado na Figura 17 a ausência de picos cromatográficos característicos do  $\beta$ -caroteno ou de seus isômeros.



**Figura 17:** Análise por CLAE do óleo de canola, confirmando a ausência de  $\beta$ -caroteno e seus isômeros no óleo de canola.

Estes resultados confirmam dados publicados de que os carotenóides do óleo de canola, que contribuem para sua coloração, são degradados durante seu processo de refino que tem como objetivo remover compostos indesejáveis e padronizar suas características sensoriais. No processo de refino são eliminados completamente ou quase completamente os ácidos graxos livres, pigmentos como clorofila, xantofilas e carotenóides, além de compostos voláteis (SHAHIDI, 2005).

## 5.2. Análise centesimal

A análise da composição centesimal das amostras de raízes de mandioca amarela BRS Jarí permite conhecer os componentes químicos da matriz, verificando se estes podem ou não afetar as análises posteriores, em especial o processo de digestão *in vitro*. Os resultados dos teores de umidade, extrato etéreo, cinzas, nitrogênio e fibras (realizada apenas nas amostras cozida e frita) estão descritos na Tabela 2. Os resultados são semelhantes com os descritos na literatura para a mandioca convencional onde as raízes apresentam uma composição média de 68,2% de umidade, 2% de cinzas, 1,3% de proteínas, 0,2% de lipídeos e 0,3% de fibras (ALBUQUERQUE et al., 1993; NASSAR et al., 2009). Pequenas diferenças podem ter sido promovidas, entre outros fatores, pelo processo de melhoramento das amostras de mandioca amarela analisadas. Além da variação nas cultivares, diferentes em épocas de plantio e colheita, composição do solo e níveis de insolação e pluviosidade podem ter promovido as diferenças observadas.

**Tabela 2.** Composição centesimal (g/ 100g) das amostras de mandioca BRS Jarí *in natura*, cozida e frita, das três compostas analisadas ( $n= 9$ ).

<b>Amostra (processo)</b>	<b>Umidade (média±DP)</b>	<b>Cinzas (média ±DP)</b>	<b>Ext. etéreo (média ±DP)</b>	<b>Nitrogênio (média ±DP)</b>	<b>Fibras (média ±DP)</b>
<i>In natura</i>	68,0 ± 0,15	0,8 ± 0,08	0,6 ± 0,27	0,14 ± 0,02	—
Cozida	73,0 ± 0,31	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,28	0,10 ± 0,03	2,4 ± 0,14
Frita	52,4 ± 0,19	0,7 ± 0,09	11,1 ± 3,3	0,16 ± 0,03	3,4 ± 0,01

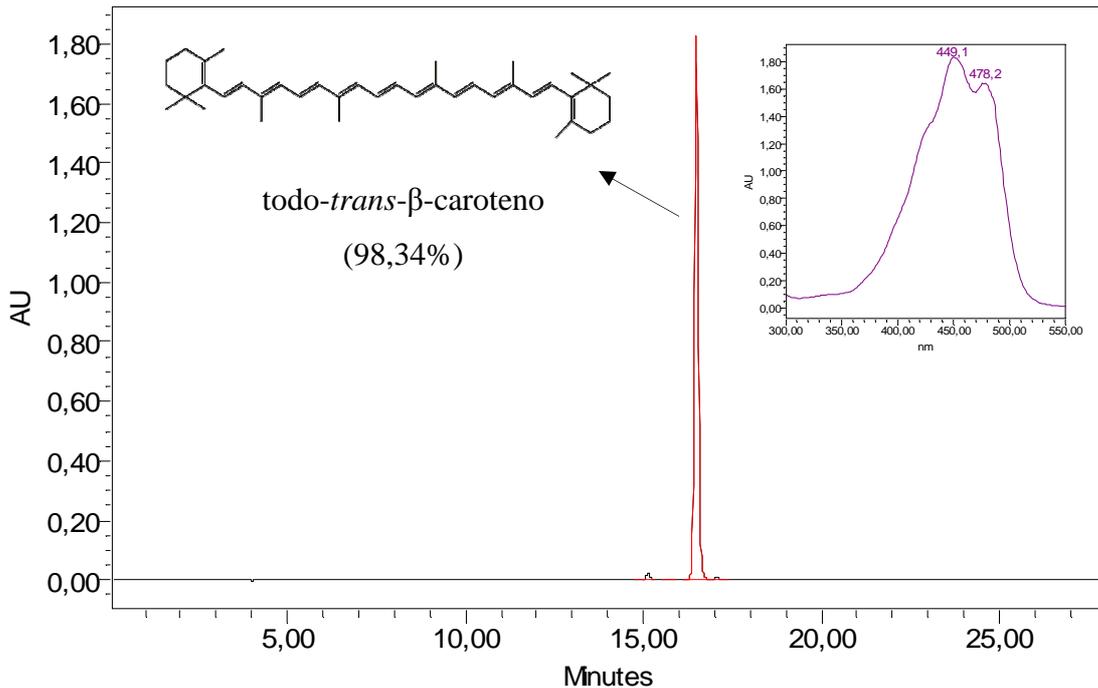
A partir dos valores de umidade foi realizada a correção das massas de amostras utilizadas em todas as análises. Dessa forma, os teores de carotenóides são apresentados

em base seca o que permite a comparação direta dos resultados obtidos com a amostra *in natura* e seus diferentes métodos de preparação (cozido e frita). No entanto para facilitar a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho, com estudos já reportados na literatura nossos resultados também estão descritos em base úmida.

### **5.3 Extração do padrão de $\beta$ -caroteno das raízes da mandioca amarela BRS Jarí**

No presente estudo o padrão de  $\beta$ -caroteno utilizado para identificação e quantificação dos carotenóides das amostras analisadas de mandioca BRS Jarí melhorada nas formas *in natura*, cozida e frita, foi isolado da própria amostra (raízes de mandioca BRS Jarí *in natura*), aplicando uma abordagem analítica que permitiu de forma rápida o isolamento do padrão de  $\beta$ -caroteno através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência resultou no isolamento do  $\beta$ -caroteno da mandioca BRS Jarí melhorada, com pureza cromatográfica de 98,34% (Figura 18) que o classifica como uma substância padrão (pureza > 90%). O espectro de absorvância obtido com o detector de arranjo de fotodiodo permitiu a confirmação qualitativa do  $\beta$ -caroteno que apresenta absorção máxima em 450 nm. A determinação quantitativa da solução de padrão por espectrofotometria na região do visível (Figura 18) indicou concentração de 1,98  $\mu\text{g/mL}$  de  $\beta$ -caroteno.



**Figura 18** Cromatograma do padrão todo-*trans*-β-caroteno, indicando a pureza cromatográfica (calculada em 98,34%) e o espectro de absorção UV/Vis.

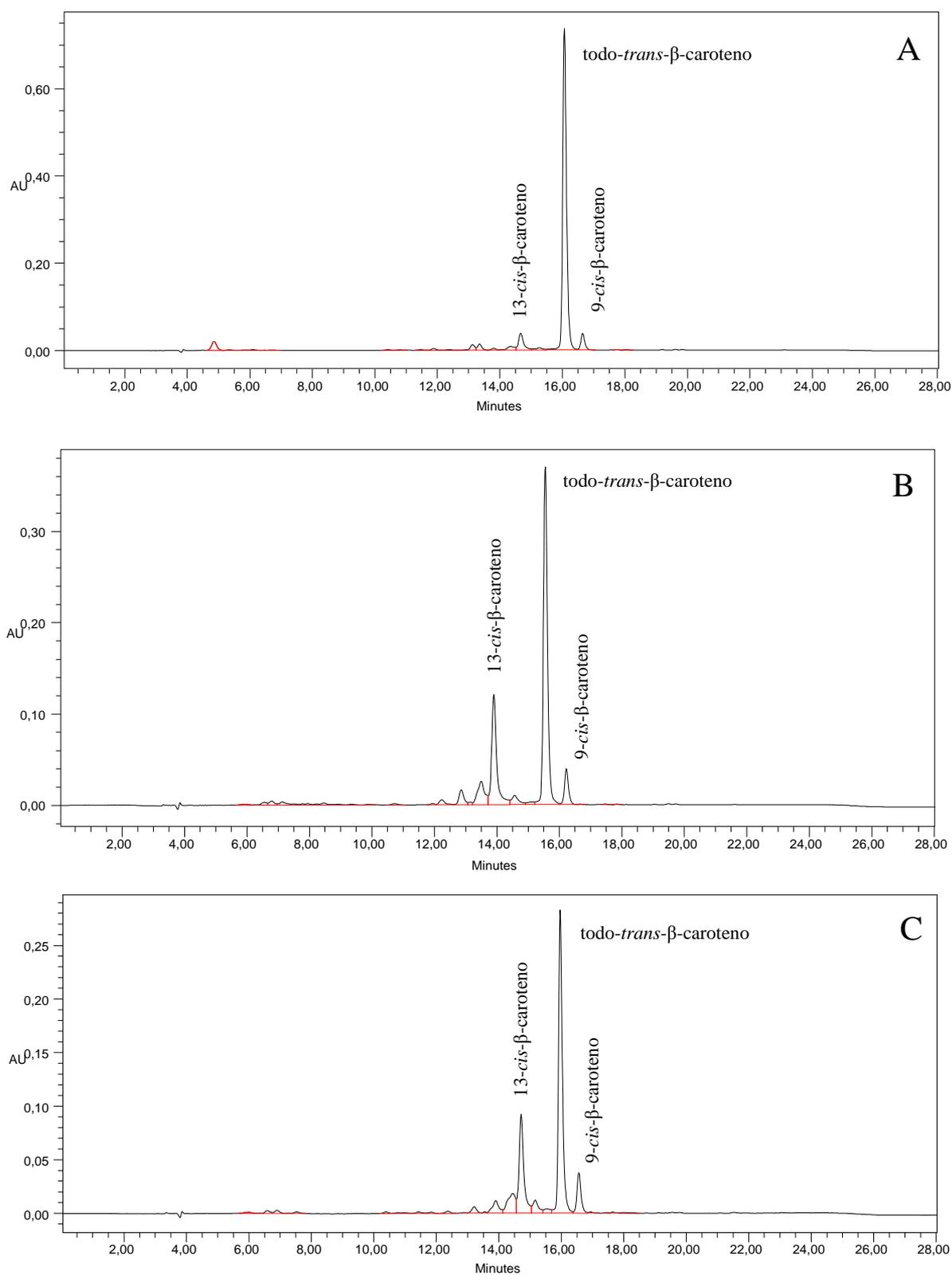
**a. Resultados das Análises dos carotenóides antes do processo de digestão *in vitro***

As amostras de mandioca melhorada apresentaram como único carotenóide presente em sua composição o β-caroteno, tendo o todo-*trans*-β-caroteno como forma predominante e baixos teores ( $9,78 \pm 0,91$  %) de isômeros *cis* nas amostras *in natura* (Fig. 19A). Os métodos de cozimento e fritura promoveram aumento significativo nos teores dos isômeros 9-*cis*-β-caroteno e 13-*cis*-β-caroteno, os quais foram identificados através de seus respectivos espectros de absorção (Figura 20) e de seus tempos de retenção nos cromatogramas (Figura 19 B e C).

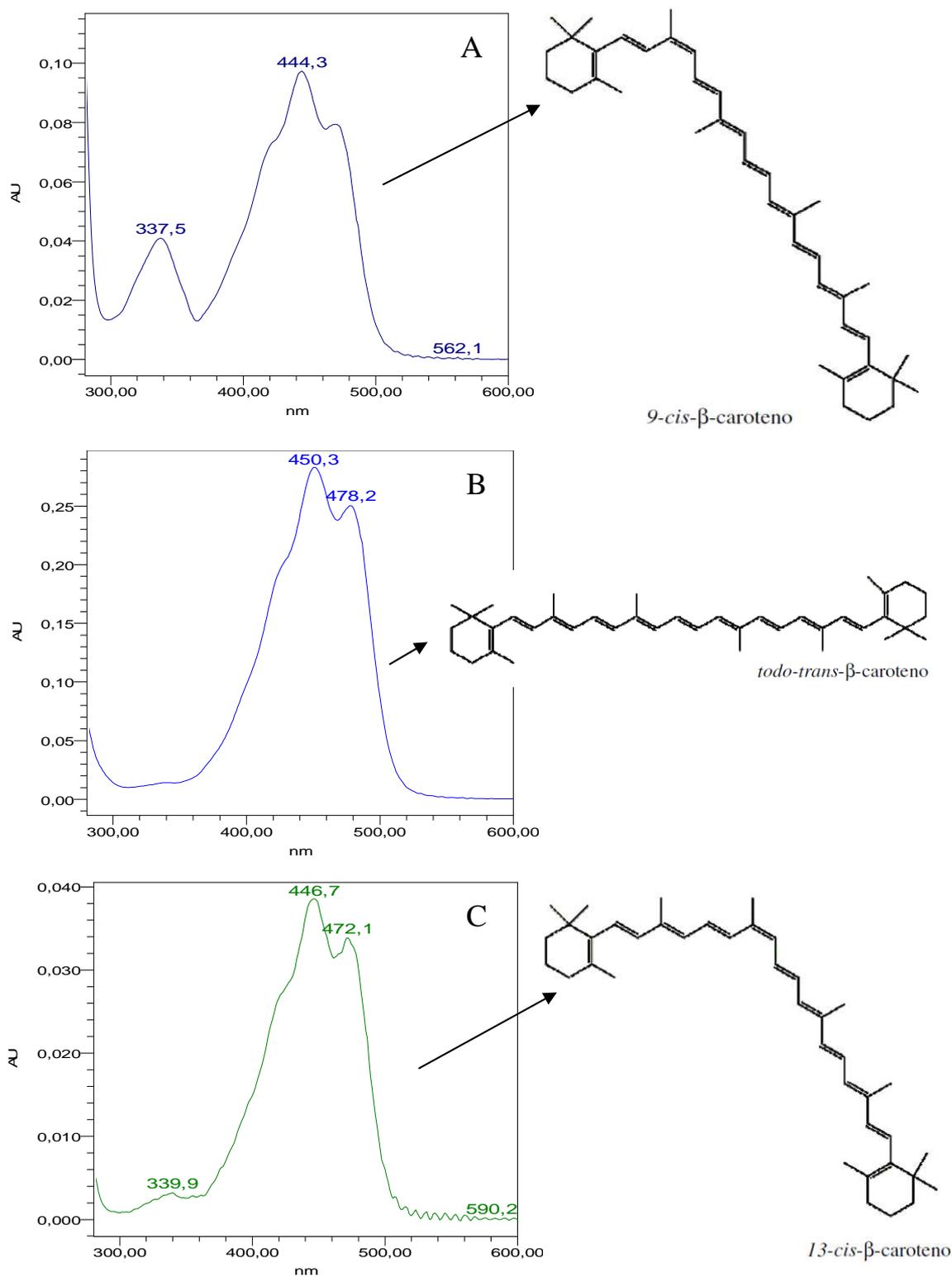
Os carotenóides são compostos que se degradam por tratamento térmico, exposição à luz durante o processamento e durante armazenamento prolongado do alimento, especialmente por oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Os carotenóides

pró-vitamina A, possuem grande importância no combate a hipovitaminose A e a investigação dos alimentos ricos nesse micronutriente requer atenção especial.

As raízes de mandioca não são consumidas *in natura*. Uma vez que o processamento térmico, comumente utilizado no uso doméstico da mandioca, pode promover degradação dos carotenóides e influenciar nos níveis de retenção dos carotenóides pró-vitamina A é relevante investigar os efeitos de preparações típicas, tais como o cozimento e a fritura, sobre a retenção de carotenóides. Além disso, esses processos promovem alterações na composição química da mandioca que, por sua vez, pode alterar a eficiência da micelarização e conseqüentemente a biodisponibilidade dos carotenóides. Dessa forma, os resultados obtidos nas análises de teores de  $\beta$ -caroteno nas amostras de mandioca foram utilizados para determinar a eficiência da micelarização desse micronutriente.



**Figura 19:** Análises por CLAE dos carotenóides de raízes de mandioca BRS Jarí *in natura* (A), cozida (B) e frita (C). Detector de arranjo de fotodiodos ajustado a 450 nm.



**Figura 20** Espectros de absorção UV/Vis dos picos cromatográficos dos carotenóides de mandioca crua, cozida e frita, obtidos por detector PDA e as respectivas estruturas químicas dos isômeros de carotenóides identificados: 9-*cis*- $\beta$ -caroteno (A), *todo-trans*- $\beta$ -caroteno (B), 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (C).

Os resultados dos teores de carotenóides totais e de  $\beta$ -caroteno na mandioca BRS Jarí melhorada, para os dois métodos de preparo e o controle *in natura* antes e após a digestão *in vitro* estão apresentados na Tabela 3. O cozimento e a fritura promoveram redução significativa nos teores de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno e conseqüente aumento nos teores dos isômeros 9-*cis* e 13-*cis* desse carotenóide. Estas isomerizações estão diretamente relacionadas com as altas temperaturas usadas nos processos de cozimento e de fritura (BENGTSSON et al., 2008). Como pode-se observar na Tabela 3, a fritura foi o método que promoveu maior redução nas concentrações de carotenóides totais e de  $\beta$ -caroteno nas raízes de mandioca BRS Jarí melhorada. Esse resultado pode ter ocorrido devido à exposição a temperaturas mais elevadas durante o processo de fritura (180 °C), quando comparado com a temperatura de cozimento (aproximadamente 121 °C). A maior formação de isômeros *cis* está relacionada à intensidade e duração do tratamento térmico. As amostras de mandioca BRS Jarí melhoradas *in natura*, também apresentaram teores detectáveis de isômeros *cis*, os quais podem ser explicados pelo período de armazenamento pelo qual as amostras foram submetidas até análise, além de outros fatores durante as análises que podem ter promovido a isomerização, tais como a iluminação e a exposição a vapores de ácidos no laboratório, que contribuem para a isomerização dos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

**Tabela 3.** Teores de carotenóides totais ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), *todo-trans*- $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e teores totais ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de isômeros *cis* em mandioca amarela BRS Jarí *in natura*, cozida e frita das três compostas produzidas ( $n=9$ ). Em base seca (BS) e base úmida (BU).

Amostras	Carotenóides	Carotenóides	<i>todo-trans</i> - $\beta$ -caroteno	<i>todo-trans</i> - $\beta$ -caroteno	isômeros <i>cis</i> totais	isômeros <i>cis</i> totais
	Totais	Totais	( $\mu\text{g}/100\text{g BS}$ )	( $\mu\text{g}/100\text{g BU}$ )	( $\mu\text{g}/100\text{g BS}$ )	( $\mu\text{g}/100\text{g BU}$ )
	( $\mu\text{g}/100\text{g BS}$ )	( $\mu\text{g}/100\text{g BU}$ )	(média $\pm$ DP)	(média $\pm$ DP)	(média $\pm$ DP)	(média $\pm$ DP)
	(média $\pm$ DP)	(média $\pm$ DP)				
<i>In natura</i>	2973 $\pm$ 112 <sup>a</sup>	944 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	2341 $\pm$ 144 <sup>a</sup>	743 $\pm$ 23,1 <sup>a</sup>	290,7 $\pm$ 0,912 <sup>a</sup>	92,4 $\pm$ 8,91 <sup>a</sup>
Cozida	2525 $\pm$ 205 <sup>b</sup>	675 $\pm$ 52,9 <sup>b</sup>	1359 $\pm$ 163 <sup>b</sup>	363 $\pm$ 42,5 <sup>b</sup>	678,7 $\pm$ 1,04 <sup>b</sup>	181,9 $\pm$ 19,6 <sup>b</sup>
Frita	2155 $\pm$ 57,7 <sup>c</sup>	1020 $\pm$ 33,0 <sup>c</sup>	1110 $\pm$ 31,5 <sup>c</sup>	525 $\pm$ 21,2 <sup>c</sup>	614,6 $\pm$ 2,59 <sup>c</sup>	291,0 $\pm$ 29,7 <sup>c</sup>

Resultados em uma mesma coluna com letras diferentes no sobrescrito apresentam diferença significativa (ANOVA;  $p<0,05$ ).

As alterações estruturais de carotenóides por isomerização de *trans*-carotenóides para *cis*-carotenóides durante processamento são atribuídas a isomerização geométrica e enzimática ou oxidação não-enzimática (RODRIGUEZ-AMAYA, 2002). Essas alterações resultam na degradação dos carotenóides durante o processamento e também, como pode ser observado na amostra *in natura* durante a sua estocagem, e essas reações aumentam com a destruição da estrutura celular dos alimentos, aumento da área superficial, período ou severidade das condições de processamento, tempo e temperatura de estocagem, exposição à luz e permeabilidade da embalagem ao oxigênio. Essas modificações promoveram descoloração e alteração da atividade biológica pró-vitamina A nas raízes de mandioca BRS Jarí devido a forma *trans* do  $\beta$ -caroteno apresentar mais atividade pró-vitamina A do que a forma *cis*.

Inúmeros estudos indicam que o processo de aquecimento leva a formação de isômeros *cis*. Aman et al. (2005) relataram que a exposição de espinafre ao calor resultou na isomerização do  $\beta$ -caroteno. Nascimento (2006) em estudo sobre a influência de diferentes processamentos sobre a retenção de  $\beta$ -caroteno em raízes de mandioca observou que a retenção da mandioca cozida (79% a 82 %) foi a mesma tanto para o  $\beta$ -caroteno total quanto para o *trans*- $\beta$ -caroteno. Já na mandioca BRS Jarí frita a retenção foi de 54 a 56% de  $\beta$ -caroteno total e todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, obtendo, portanto menor retenção nas amostras fritas. Independentemente do método de processamento utilizado, a retenção dos carotenóides tende a diminuir de forma proporcional ao tempo e à temperatura de processamento (RODRIGUES-AMAYA, 2002).

No presente estudo os valores médios de retenção do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno variaram de 59% nas amostras cozidas a 48% nas amostras fritas. Estes resultados são aparentemente menores do que valores reportados na literatura (de 60% a 85%) (GAYATHRI et al., 2004), porem pode ser devido ao fato de que as amostras utilizadas

no presente estudo, em ambos processamentos, foram cozidas em panela de pressão, e conseqüentemente submetidas a uma maior temperatura (121 °C) quando comparadas àquela do cozimento convencional (100 °C).

Gayathri et al. (2004) observaram que a perda de  $\beta$ -caroteno na cenoura foi mais elevada quando cozido sob alta pressão por 10 min (27%) do que no cozimento simples em água (16%), no mesmo intervalo de tempo. Pinheiro-Santana (1998) investigou a retenção de carotenóides totais em cenoura submetida aos métodos de cocção a vapor d'água, cocção em água, com e sem alta pressão, e à desidratação convencional. A retenção dos carotenóides totais após os diferentes cozimentos variou de 60 a 85%. A cocção convencional em água promoveu os maiores percentuais de retenção de  $\beta$ -caroteno, quando comparados aos outros métodos. Desta forma, em trabalhos futuros, pode ser relevante investigar outras formas de preparo da mandioca amarela BRS Jarí melhorada que resultem em maior retenção de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, uma vez que o cozimento convencional não promoveu hidratação e abrandamento das raízes de mandioca, que fossem suficientes para torná-la sensorialmente adequada ao consumo humano. No presente trabalho, o cozimento em panela de pressão foi adotado para permitir a adequação das características sensoriais do produto processado. Um dos motivos que pode justificar a necessidade do uso de panela de pressão para o cozimento apropriado é que as raízes podem ter sido colhidas após período de chuvas o que faz com que a planta transforme o amido que havia acumulado para a produção de novas folhas, enrijecendo as raízes. Alternativamente, pode ter relação com a idade da planta da mandioca, pois raízes velhas são mais duras e demoram mais tempo para cozinhar. De acordo com resultados encontrados na literatura, o cozimento convencional (100 °C) em condições controladas de tempo e temperatura, é o melhor método para reduzir as perdas do  $\beta$ -caroteno por oxidação e isomerização, aumentando sua retenção.

### **5.5. Digestão *in vitro*, eficiência da micelarização (bioacessibilidade)**

Os resultados obtidos no presente estudo quanto aos teores de carotenóides totais,  $\beta$ -caroteno, teores de isômeros totais e principalmente a eficiência de micelarização do *todo-trans*- $\beta$ -caroteno estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Teores de carotenóides totais ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), todo-*trans*- $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), teores totais ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de isômeros *cis* e eficiência da micelarização (EM %) do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno e carotenóides totais das raízes de mandioca amarela BRS Jarí *in natura*, cozida e frita nas três amostras compostas produzidas ( $n=9$ ). Resultados em base seca (BS) e base úmida (BU).

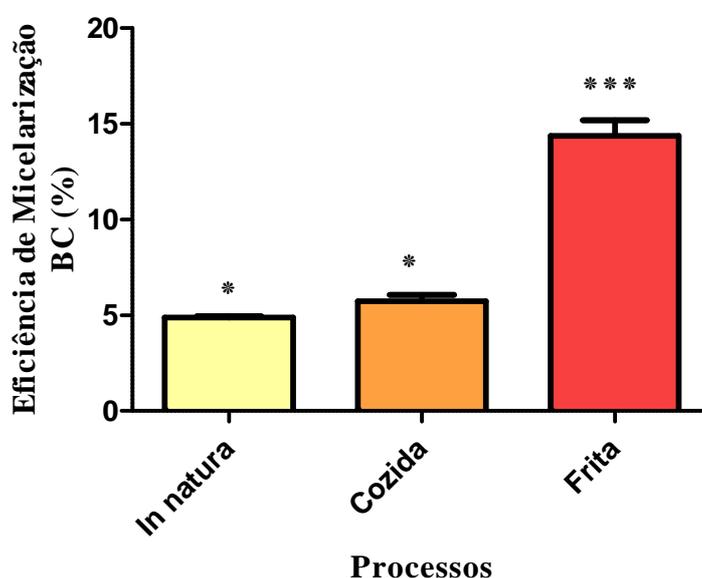
Amostras	Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}/100\text{g BS}$ ) média $\pm$ DP	Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}/100\text{g BU}$ ) média $\pm$ DP	EM de Carotenóides Totais (% BS) média $\pm$ DP	EM de Carotenóides Totais (% BU) média $\pm$ DP	$\beta\text{C-todo-}$ <i>trans</i> ( $\mu\text{g}/100\text{g BS}$ ) média $\pm$ DP	$\beta\text{C-todo-}$ <i>trans</i> ( $\mu\text{g}/100\text{g BU}$ ) média $\pm$ DP	EM de $\beta\text{C}$ (% BS) média $\pm$ DP	EM de $\beta\text{C}$ (% BU) média $\pm$ DP	Isômeros <i>cis totais</i> ( $\mu\text{g}/100\text{g BS}$ ) média $\pm$ DP	Isômeros <i>cis totais</i> ( $\mu\text{g}/100\text{g BU}$ ) média $\pm$ DP
<i>In natura</i>	163,3 $\pm$ 4,73 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup>	5,36 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	5,53 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	113,5 $\pm$ 10,8 <sup>a</sup>	36,18 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>	4,89 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	4,87 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	49,9 $\pm$ 5,33 <sup>a</sup>	16,02 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup>
Cozida	153,0 $\pm$ 11,5 <sup>b</sup>	41 $\pm$ 1,82 <sup>b</sup>	6,03 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	6,11 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	77,1 $\pm$ 8,32 <sup>b</sup>	20,81 $\pm$ 1,88 <sup>b</sup>	5,74 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	5,73 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	75,6 $\pm$ 5,49 <sup>b</sup>	20,44 $\pm$ 2,90 <sup>b</sup>
Frita	300,0 $\pm$ 39,9 <sup>c</sup>	143 $\pm$ 21,7 <sup>c</sup>	14,1 $\pm$ 2,25 <sup>b</sup>	14,1 $\pm$ 2,13 <sup>b</sup>	157,5 $\pm$ 22,4 <sup>c</sup>	75,33 $\pm$ 12,2 <sup>c</sup>	14,37 $\pm$ 2,44 <sup>b</sup>	14,34 $\pm$ 2,33 <sup>b</sup>	142,5 $\pm$ 1,13 <sup>c</sup>	68,08 $\pm$ 9,76 <sup>c</sup>

Resultados em uma mesma coluna com letras diferentes no sobrescrito apresentam diferença significativa (ANOVA;  $p < 0,05$ ).

Após o processo de digestão *in vitro* observa-se que as concentrações de carotenóides totais e de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno na fração micelar foram maiores após o processo de fritura da mandioca amarela BRS Jarí melhorada, quando comparada ao cozimento e à amostra *in natura* (Tabela 4). Portanto, apesar da amostra frita ter sofrido as maiores perdas nos teores de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, a transferência do carotenóide para a fração micelar emulsificada foi mais eficaz na amostra frita. Pode-se supor que as temperaturas mais altas durante a fritura, assim como a incorporação dos lipídios do óleo à mandioca tenham favorecido a transferência dos carotenóides da amostra para gotículas de óleo e em seguida para a fração micelar. Consistentemente, a mandioca frita também apresentou maior eficiência de micelarização de carotenóides totais e todo-*trans*- $\beta$ -caroteno (respectivamente  $14,1 \pm 2,25\%$  e  $14,4 \pm 2,44\%$ ) (Figura 21). A maior eficiência de micelarização observada nos carotenóides da mandioca frita, permite concluir que a fritura aumentou a sua bioacessibilidade devendo resultar em maior biodisponibilidade de carotenóides pró-vitamina A e conseqüentemente maior eficiência dessa preparação como veículo da vitamina A.

Os resultados da eficiência de micelarização do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno estão de acordo com Garret et al. (1999) os quais demonstraram que normalmente menos de 5% do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno é liberado da matriz alimentar para incorporação nas micelas mistas. Por outro lado, ao contrário do esperado, não houve diferença significativa entre as amostras *In natura* e cozida ( $p > 0,05$ ). Thakkar et al. (2007) estudaram a acessibilidade de  $\beta$ -caroteno de dez cultivares de mandioca em modelo *in vitro* verificando que a eficiência da micelarização aumentou após o processo de cozimento. A aparente inconsistência com dados da literatura pode ser explicada pela complexidade de homogeneização da mandioca cozida para o processo de digestão. A amostra de raízes de mandioca cozida apresentou-se como uma massa de difícil dispersão nos fluídos

digestivos, possivelmente como resultado da hidratação do amido, que dificultou a liberação dos carotenóides para a fração micelar e com isto resultou em uma baixa eficiência de micelarização de carotenóides totais e do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno. A formação de complexos amorfos com inclusões de carotenóides foi observada por microscopia de fluorescência somente na amostra cozida, como será discutido na Seção 5.6 A formação desses complexos supra-moleculares pode ter promovido menor eficiência de micelarização dos carotenóides.



**Figura 21:** Eficiência de micelarização do  $\beta$ -Caroteno (%) das raízes de mandioca amarela BRS Jarí *in natura*, cozida e frita das três amostras compostas produzidas (n= 9) após digestão *in vitro*. \*, diferente significativamente da amostra frita,  $P < 0,001$  (ANOVA com medidas repetidas).

Os métodos de preparo de cozimento e fritura dos alimentos e a mastigação facilitam a liberação dos carotenóides da matriz alimentar, pelo rompimento das ligações com proteínas, amido entre outros compostos de sua parede celular. Hornero-Méndez, et al. (2007) relatam que os métodos de preparo dos alimentos e a interação com lipídios (óleos e gorduras) são fatores limitantes para determinar a fração de

carotenóides, que será extraída da matriz alimentar para ser incorporada nas micelas mistas e assim estarem acessíveis para absorção intestinal.

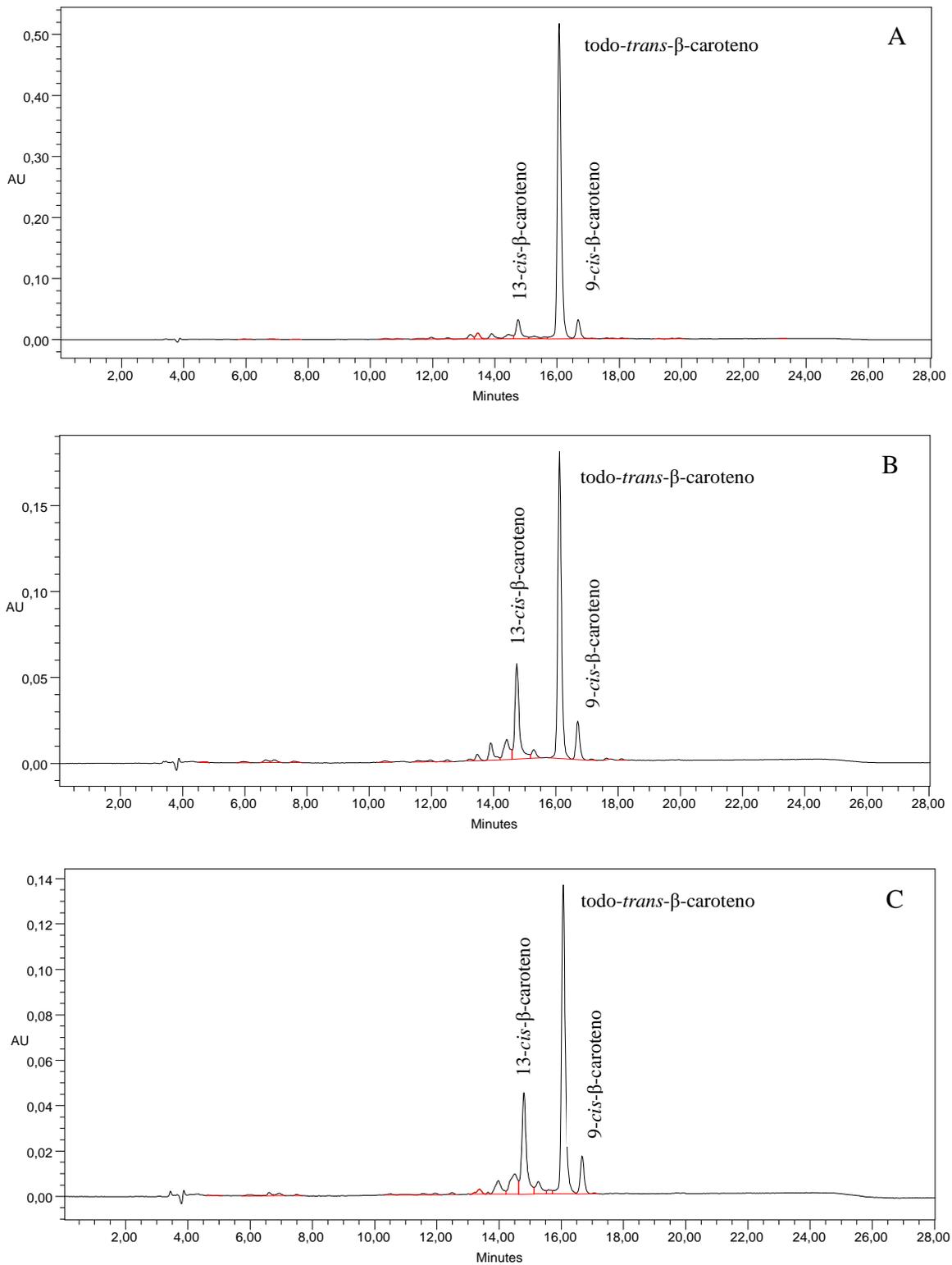
Diversos trabalhos na literatura reportam que métodos de preparo como cozimento e a fritura favorecem a liberação do *todo-trans*- $\beta$ -caroteno da matriz alimentar promovendo a sua bioacessibilidade (HENDREN, DIAS & VANBERG, 2002; LIU et al., 2004; THAKKAR et al., 2007). O processamento térmico aumenta a biodisponibilidade dos carotenóides, em comparação aos vegetais frescos e se deve, provavelmente, à desnaturação de complexos carotenóide-proteína, favorecendo a sua absorção. Sabe-se, por exemplo, que, em indivíduos adultos, a absorção de licopeno do suco de tomate processado aquecido por 1 hora é superior à do licopeno de suco não processado termicamente (RYAN, 2008).

Os carotenóides são lipossolúveis e são absorvidos, em geral, de maneira semelhante aos demais lipídios da dieta. Desta forma, necessitam da formação de micelas na luz intestinal para garantir sua solubilização. Portanto, a presença de fatores que interferem na formação das micelas podem influenciar na absorção dos carotenóides. Dimitrov et al. (1998) demonstraram que a absorção de  $\beta$ -caroteno é afetada pela concentração de gordura da dieta. Os voluntários que receberam dieta hiperlipídica apresentaram elevação significativa na concentração plasmática de  $\beta$ -caroteno quando comparados aos indivíduos que receberam uma dieta hipolipídica.

Existe necessidade de uma fonte lipídica no processo de digestão e absorção de carotenóides, pois a formação das micelas mistas é dependente da presença de gordura no intestino, ou seja, a co-ingestão de gordura com carotenóides na dieta é um fator crucial para uma eficiente micelarização dos carotenóides (STAHL et al., 2002). A elevada lipossolubilidade dos carotenóides faz com que sua absorção seja estritamente dependente da formação das micelas mistas e, conseqüentemente, da presença de

lipídios na dieta, necessários para estimular a secreção de sais biliares e da lípase pancreática, responsáveis pela formação destas micelas. Por isso houve necessidade de se adicionar 1% de óleo de canola às amostras de baixos teores de gordura (mandioca *in natura* e cozida). De acordo com Huo et al. (2007) com essa quantidade de óleo foi possível obter micelarização satisfatória dos carotenóides e foi suficiente para permitir que houvesse hidrólise completa dos triglicerídeos e sua emulsificação pelos sais biliares durante o processo de digestão *in vitro*. Portanto, a adição de lipídios à mandioca aumenta a eficiência da transferência dos carotenóides da mandioca para as micelas mistas, como ocorre *in vivo*, favorecendo a absorção do  $\beta$ -Caroteno (HOF et al., 2000).

No presente estudo o perfil cromatográfico do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno e dos seus isômeros 9-*cis* e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno se manteve estável após o processo de digestão *in vitro* (Figura 22). No entanto, os dados obtidos na Tabela 4 mostram que houve um aumento nos teores de isômeros *cis* quando comparados às amostras antes do processo de digestão. Essa isomerização observada durante a digestão *in vitro* pode ser resultado da maior exposição dos carotenóides a fatores de degradação que levam a formação de isômeros *cis*, tais como, ambientes mais ácidos e variações de pH durante os ajustes necessários para adequação das fases gástrica e intestinal; temperaturas superiores a temperatura ambiente (25°C) e maior exposição a luz e ao oxigênio do ar durante a digestão e as análises, são alguns dos fatores que podem ter contribuído para o aumento dos teores de isômeros *cis* após o processo de digestão.



**Figura 22:** Cromatogramas dos carotenóides da fração micelar das raízes de mandioca amarela BRS Jarí melhorada *in natura* (A), cozida (B) e frita (C), obtidos após o processo de digestão *in vitro*.

## 5.6. Caracterização microscópica da fração micelar

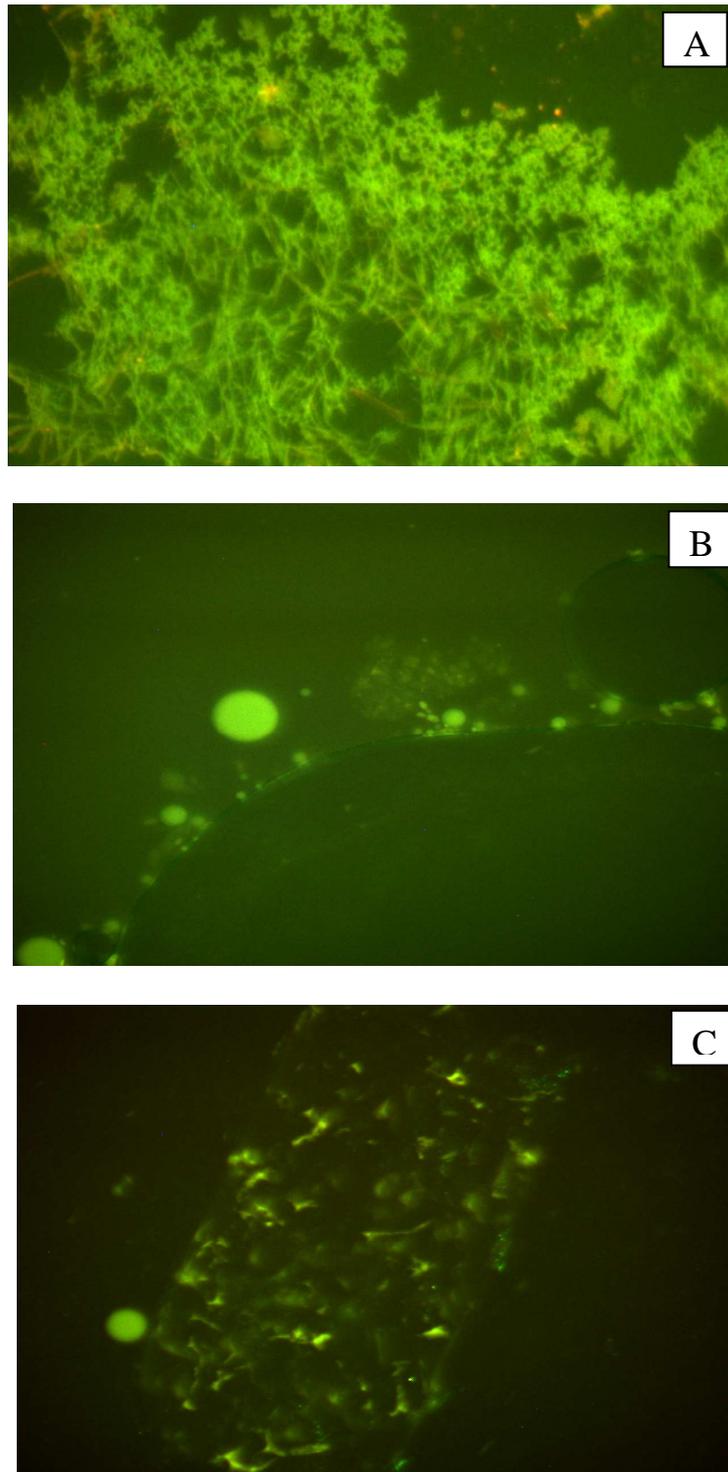
São escassos na literatura estudos relacionados à caracterização dos carotenóides incorporados na fração micelar após a digestão *in vitro*. Na maior parte dos trabalhos publicados, a investigação da bioacessibilidade de carotenóides se baseia em sua quantificação por CLAE na fração micelar. No presente estudo a análise por microscopia de fluorescência da fração micelar das amostras de mandioca BRS Jarí amarela cozidas e fritas foi realizada com a finalidade de confirmar a presença dos carotenóides emulsionados e observar a estrutura da micro-emulsão.

As micelas mistas apresentam forma discóide, diâmetro aproximado de 4 a 60 nm e são constituídas de lipídios hidrofóbicos cercados por uma monocamada externa de lipídios anfipáticos, especialmente sais biliares (YONEKURA & NAGAO, 2007). Nas condições da análise pôde-se observar constituintes celulares que manifestem autofluorescência, como por exemplo, o  $\beta$ -caroteno. Os carotenóides ao serem excitados por uma luz de comprimento de onda curto, emitem luz de um comprimento de onda maior e por serem substâncias cromóforas florescem em determinados comprimentos de excitação, como o  $\beta$ -caroteno que fluoresce com excitação de 488-514 nm (KLEINEGRIS et al., 2010). O reduzido diâmetro das micelas mistas inviabiliza sua observação em microscópios ópticos. Desta forma, o intuito dessa análise foi observar estruturas maiores, nas quais houvesse a presença de carotenóides fluorescentes.

Na Figura 23 podem ser observadas as imagens fotográficas da microscopia de fluorescência das amostras da fração micelar da mandioca BRS Jarí frita e cozida após digestão, em comparação com amostra de padrão de  $\beta$ -caroteno (controle). Observa-se claramente diversas estruturas cristalinas fluorescentes no controle, em contraste com as amostras da fração micelar da mandioca cozida e frita, as quais apresentaram fluorescência em estruturas diversas e não-cristalinas. Observam-se estruturas esféricas

de diâmetros variados, indicando a presença de uma microemulsão, de fase dispersa lipídica as quais apresentaram fluorescência verde no comprimento de onda específico para o  $\beta$ -caroteno, indicando que o carotenóide apresenta-se emulsionado na fração micelar das amostras de mandioca BRS Jarí cozida e frita.

Na imagem microscópica obtida da fração micelar da mandioca cozida, além das micro-esferas fluorescentes observam-se pontos de fluorescência verde, característicos do  $\beta$ -caroteno, envolvidos em uma estrutura supra-molecular amorfa e complexa que apresenta morfologia compatível com a de géis de amido, possivelmente resultante do processo de cocção em água mais prolongado nessa preparação. A presença desses complexos agregados que aprisionaram o  $\beta$ -caroteno é consistente com o resultado da eficiência de micelarização do  $\beta$ -caroteno na mandioca cozida que, em contraste com dados da literatura, não foi diferente da mandioca *in natura*.



**Figura 23:** Microscopia de fluorescência: (A) imagem controle utilizando padrão de  $\beta$ -caroteno; (B) imagem da fração micelar da mandioca frita contendo o  $\beta$ -caroteno; (C) imagem da fração micelar da mandioca cozida contendo o  $\beta$ -caroteno. Barra de resolução 50 $\mu$ m.

Esses resultados preliminares sobre a caracterização da fração micelar rica em  $\beta$ -caroteno das amostras de mandioca fornecem dados adicionais quanto à bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno da mandioca amarela BRS Jarí melhorada após o cozimento e a fritura. Embora não tenha sido possível observar as micelas mistas, em função de atributos da técnica de microscopia usada, pode-se observar importantes diferenças entre os processamentos empregados, que foram consistentes com os dados quantitativos de eficiência de micelarização do  $\beta$ -caroteno. Além disso, pode-se afirmar que após o processo de digestão *in vitro* os carotenóides da fração micelar não apresentam-se em estruturas cristalinas, o que é consistente com a sua elevada bioacessibilidade dos carotenóides nessa fração.

## **6. Conclusões**

- O preparo da mandioca amarela BRS Jarí melhorada, por cozimento em panela de pressão e por fritura, promoveu perdas de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, especialmente por isomerização para formas *cis*.
- O modelo de digestão *in vitro* foi apropriado para investigar a bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno da mandioca amarela BRS Jarí melhorada, conforme análises por cromatografia (CLAE) e por microscopia de fluorescência.
- O método de fritura das raízes de mandioca apresentou maior eficiência na micelarização do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, promovendo assim um aumento da bioacessibilidade do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, possivelmente pela temperatura mais elevada, que contribui para desfazer interações caroteno-proteínas, e pela incorporação de maiores quantidades de lipídios à amostra.
- A formação de complexos de inclusão de carotenóides em estruturas supramoleculares amorfas provavelmente explica a bioacessibilidade relativamente baixa do todo-*trans*- $\beta$ -caroteno na mandioca cozida.

## 7. Referências Bibliográficas

1. AIRES, M M. **Fisiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, p. 652- 657, 1999.
2. ALBUQUERQUE, T T O et al., Composição centesimal da raiz de 10 variedades de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) cultivadas em Minas Gerais. **Rev. Brasileira da mandioca**, v.12, n.1, p.7-12, 1993
3. AMBRÓSIO, C L B et al., Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 19(2), p. 233-243, 2006.
4. AWOYINKA, A. F., ABEGUNDE, V.O., ADEWUSI, S.R., Nutrient content of young cassava leaves and assessment of their acceptance as a green vegetable in Nigeria. **Plant Foods Hum. Nutr.** v. 47, p. 21–28, 1995.
5. BENGTTSSON, A. *et al.*, Effects of various traditional processing methods on the all-trans- $\beta$ -carotene content of orange-fleshed sweet potato, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 134–143, 2008.
6. BLOMHOFF, R. & BLOMHOFF, H. K., Overview of retinoid metabolism and function. **Journal of Neurobiology**. v. 66, p. 606-630, 2006.
7. BOREL, P., *et al.*, Chylomicron  $\beta$ -carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest  $\beta$ -carotene with medium- chain rather than long-chain triglycerides. **J. Nutr.**, v. 128, p. 1361–1367, 1998.
8. BOREL, P. *et al.*, Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. **J. Lipid. Res.**, v. 37, p. 250-61, 1996.
9. BOWEN, P E.; MOBARHAN; S., SMITH, J C Jr., Carotenoid absorption in humans. **Methods Enzymol.**, v. 214, p. 3-21, 1993.

10. BRITTON, G. (1995). UV/visible spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids vol. 1B: Spectroscopy* (pp. 13–63). Basel: Birkhäuser Verlag.
11. BURRI, B.J.,  $\beta$ -caroteno and human health: a review of current research. **Nutr. Res.**, v.17, n.3, p 547-580, 1997.
12. CAMPOS F. M., ROSADO G. P. Novos fatores de conversão de carotenóides pró vitamínicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25 n.3, p.571-578, 2005.
13. CASTENMILLER & WEST. Bioavailability And Bioconversion of Carotenoids, **Annu. Rev. Nutr.** v. 18, p.19–38, 1998.
14. CHANDRIKA U. G., *et al.*, *In vitro* accessibility of  $\beta$ -carotene from cooked Sri Lankan green leafy vegetables and their estimated contribution to vitamin A requirement. **J Sci Food Agri.**, v. 86, p.54–61, 2006.
15. CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J.; MITHANI, S.; DRESSEN, J. B., Physiochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. **J. Pharm. Sci.**, v. 86, p. 269-282, 1997.
16. CHRISTIAN P., Recommendations for indicators: night blindness during pregnancy – a simple tool to assess vitamin A deficiency in a population. **J. Nutr.**, v. 132, p. 2884S-8S, 2002.
17. CHITCHUMROONCHOKCHAI C. & FAILLA M. L., 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.
18. CLARK, R. M.; YAO, L.; SHE, L.; FURR, H. C. A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions. **Lipids**, v. 35, p. 803-806, 2000.

19. COELHO C. S. P., Deficiência de vitamina A no binômio mãe-filho e distribuição intra-placentária de retinol [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2003.
20. COZZOLINO, S. M., Biodisponibilidade de nutrientes. 2º edição atual. e ampl, São Paulo: Manole, 2007.
21. DE PEE S., *et al.*, Orange fruit is more effective than are dark-green, leafy vegetables in increasing serum concentrations of retinol and b-carotene in schoolchildren in Indonesia. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 68, p. 1058–1067, 1998.
22. DEAN, J. R. & MA, R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: a critical review. **Chemosphere**, v. 68, f.8, p. 1399-1407, 2007.
23. DEMING, D. M., BAKER, D. H., & ERDMAN, J. W. JR., The relative vitamin A value of 9-cis beta-carotene is less and that of 13-cis beta-carotene may be greater than the accepted 50% that of all-trans beta-carotene in gerbils. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2709–2712, 2002.
24. DIMITROV, N. V., *et al.*, Bioavailability of  $\beta$ -carotene in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 48, p. 298–304, 1988.
25. DURING, A. & HARRISON, E. H., Intestinal absorption metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 430, p.77-88, 2004.
26. FAILLA, M. L. & CHITCHUMROONCHOKCHAI, C., In vitro Models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. Harvest Plus Technical monograph series 3. International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for tropical Agriculture (CIAT). Washington, DC. 2005.

27. FAILLA, M. L., HUO, T., & THAKKAR, S. K., In vitro screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17(Suppl 1), p. 200–203, 2008.
28. FAO, Food And Agriculture Organization of the United Nations, 2000. Championing cause of cassava. Disponível em: <http://www.fao.org/news/2010>.
29. FAO/ILSI, Preventing micronutrient malnutrition: A guide to food based approaches. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Life Sciences Institute, Washington, DC.,1997.
30. FERNÁNDEZ-GARCÍA, E; MOSQUERA, M. I. M.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Changes in composition of the lipid matrix produce a differential incorporation of carotenoids in micelles. Interaction effect of cholesterol and oil. **Innovative food science and Emerging Technologies**, v.8, p.3379-384, 2007.
31. FLORES, C. I. O & PENTEADO, M. V. C. Carotenóides com atividade pró-vitamínica A em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do estado de São Paulo. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**. São Paulo, v. 28, n. 1, p. 51-60, jan./jun. 1992.
32. FRANK, H. A. *et al.*, The Photochemistry of Carotenoids. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, p. 399, 2004.
33. FURR, H. C. & CLARK, R. M., Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **J. Nutr. Biochem.**, v. 8, p. 364-377, 1997.
34. GAYATHRI G. N., et al., Influence of antioxidante spices on the retention of  $\beta$ -carotene in vegetables during domestic cooking processes. **Food Chemistry**, v. 84, p. 35-43, 2004.
35. GARRETT, D. A., et al., Accumulation and retention of micellar  $\beta$ -carotene and lutein by Caco-2 human intestinal cells. **J. Nutr. Biochem.**, v. 10, p. 573-581, 1999.

36. GARRETT D. A. & FAILLA M. L., Development of an in Vitro Digestion Method to Assess Carotenoid Bioavailability from Meals. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 4301-4309, 1999.
37. HAGENIMANA, V. & LOW, J., Potential of orange-fleshed sweet potatoes for raising vitamin A intake in Africa. **Food and Nutrition Bulletin.**, v. 21, p. 414–418, 2000.
38. HARVESTPLUS (Brasil). **Desenvolvendo Produtos Agrícolas mais Nutritivos**. Catálogo. Brasil. Junho, 2004.
39. HARVESTPLUS Program Partial Progress Report. Improving the Nutritional Quality of Cassava Roots to Improve the Livelihoods of Farmers in the Northeast of Brasil from July to December, *In press.*, 2005.
40. HENDREN, E., DIAZ, V., & SVANBERG, U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. **European Journal of Clinical Nutrition**, 56, 425–430, (2002).
41. HOF V. H., *et al.*, Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.503-506, 2000.
42. HOLLANDER, D.; RUBLE, P. E., Jr. Beta carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. **Am. J. Physiol.**, v. 235, p. 686-691, 1978.
43. HORNERO-MÉNDEZ D., MÍNGUEZ-MOSQUERA M. I., Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.**, v. 8, p. 407–412, 2007.
44. HUO, T., *et al.*, Impact of Fatty Acyl Composition and Quantity of Triglycerides on Bioaccessibility of Dietary Carotenoid. **Agric. Food Chem**, v.55, p. 8950–8957, 2007.

45. JACOBS P. B., *et al.*, The cleavage of carotenoid esters by cholesterol esterase. **Comp. Biochem Physiol**, v. 72, p.157–160, 1982.
46. KEMDIRIM OC, CHUKWU O A, Achinewhu SC. Effect of traditional processing of cassava on the cyanide content of gari and cassava flour. **Plant Foods Hum Nutr**. v.48(4), p. 335-9, 1995.
47. KHACHIK, F. *et al.*, Isolation, structural elucidation, and partial synthesis of lutein dehydration products in extracts from human plasma. **J. chromatography B**, v. 670, p. 219-33, 1995.
48. KIMURA M. *et al.*, Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1734–1746, 2007.
49. KLEINEGRIS D. M. M., *et al.*, Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. **J Appl Phycol**, v. 22, p. 645–649, 2010.
50. LEUENBERGER, M. G.; ENGELCH-JARRET, C.; WOGGON, W. D. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of  $\beta$ -carotene to retinal. **Angew Chem-Int**, v. 40, p.2614-2617, 2001.
51. LIU, C. S., GLAHN, R.P., LIU, R.H., Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v. 52, p. 4330–4337, 2004.
52. LIVNY, O., *et al.* Betacarotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 338–345, 2003.
53. LORENZI J. O. *et al.*, Teor de ácido cianídrico em variedades de mandioca cultivadas em quintais do estado de São Paulo, Bragantia, Campinas, v. 52, n. 1, p. 1-5, 1993.

54. MARIATH J. G. R, LIMA M. C. C, SANTOS L. M. P. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera*, M.) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 49(5), p. 849–853, 1989.
55. MARTINS M.C. *et al.*, Panorama do Programa de Vitamina A no Brasil, **Rev. Nutr.**, v. 20(1), p. 5-18, 2007.
56. MCLAREN D & FRIGG M., Manual de ver y vivir sobre los trastornos por deficiencia de vitamina A (VADD). Washington: OPAS/OMS; 1999.
57. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J., *et al.*, Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1145-1150, 2007.
58. NASSAR N M, JUNIOR O P, SOUSA M V, ORTIZ R. Improving carotenoids and amino-acids in cassava. **Recent Pat Food Nutr Agric.**, v. 1(1), p. 32-8, 2009.
59. NASCIMENTO P., **Avaliação da Retenção de Carotenóides de Abóbora, Mandioca e Batata Doce**, 2006, 67f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2006.
60. OLIVEIRA M. A. *et al.*, Características Físico-Químicas, Cozimento e Produtividade de Mandioca Cultivar IAC 576-70 em Diferentes Épocas de Colheita., **Ciênc. agrotec.**, v. 33, n. 3, p. 837-843, 2009.
61. OLIVER, J. & PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of chromatography A** , v. 881, p. 543-555, 2000.
62. OLSON J. A., The effect of bile and bile salts on the uptake and cleavage of  $\beta$ -carotene into retinol ester (vitamin A ester) by intestinal slices. **Journal of Lipid Reseach.**, v.5, p.402–408, 1964.

63. OOMEN, A. G., *et al.*, Development of in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and toxicology**, v. 44, p.281-287, 2003.
64. OSGANIAN S. K, *et al.*, Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. **Am J Clin Nutr.**, v. 77(6), p. 1390-9, 2003.
65. PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 2009.
66. PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J**, v.10, p.542-551, 1996.
67. PEDROSO, B. M. **Avaliação do efeito sinérgico da embalagem a vácuo, irradiação e refrigeração da mandioca minimamente processada.** 2005, 34f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo, 2005.
68. PINHEIRO-SANT'ANA, M. H., *et al.*, Evaluation of Total Carotenoids,  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in Carrots (*Daucus carota* L.) During Home Processing. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.18 n.1 Campinas Jan./Abr. 1998.
69. RAMALHO R. A.; FLORES H.; SAUNDERS C., Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. **Pan. Am. J. Public Health**, v. 12, p.117-123, 2002.
70. RYAN L, O'CONNELL O, O'SULLIVAN L, AHERNE SA, O'BRIEN NM. Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 63(3), p. 127-33, 2008.

71. ROCK, C. L. & SWENDSEID, M. E. Plasma  $\beta$ -carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 55, p. 96–99, 1992.
72. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods. John Snow, Inc./OMNI Project, Arlington, VA, 1997.
73. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, p. 64, 2001.
74. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., Effects of processing and storage on food carotenoids. **Sight and Life Newsletter**, v. 3, p. 25–35, 2002.
75. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., *et al.*, Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 6, p. 445-463, 2008.
76. ROSLING, H., Measuring effects in humans of dietary cyanide exposure from cassava. **Acta Hortic.**, v. 375, p. 271–283, 1994.
77. ROSS A. C., Vitamin A and retinoids. Modern nutrition in health and disease, 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 305-327, 1999.
78. RUEL, M. T., Can Food- based Strategies Help reduce Vitamin A and Iron deficiencies/ A review of recent Evidence. **International Food Policy research Institute**. Washington. p. 79, 2001.
79. SCHIEBER A. **Occurrence of carotenoids cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications**. Trends in Food Science & Technology., v. 16 p. 416–422, 2005.

80. SIQUEIRA, E. M. A., *et al.*, Regional low-cost diet supplement improves the nutritional status of school children in a semi-arid region of Brazil. **Nutr. Res.**, v. 23, p. 703–712, 2003.
81. SOMMER A. La carencia de vitamina A y sus consecuencias. Guía práctica para la detección y el tratamiento. Ginebra: OMS; 1995.
82. SOUZA W. A. & VILAS BOAS. A deficiência de vitamina A no Brasil: um panorama. **Pan Am J Public Health.**, v. 12(3),p. 173-179, 2002.
83. SOUTHON S. & FAULKES R. M. **Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability.** *Biochimica et Biophysica Acta.*, v. 1740, p. 95– 100, 2005.
84. STAHL W. & SIES H., Bioactivity and Protective Effects of Natural Carotenoids. **Biochimica e Biophysica Acta.** v. 1740, p. 101-107, 2005.
85. STAHL W., ALE-AGHA N., POLIDORI M. C., Non-antioxidant properties of carotenoids. **Biological Chemistry.**, v. 383, p. 553–558, 2002.
86. SULLIVAN L. O. *et al.* Effects of cooking on the profile and micellarization of 9-*cis*-, 13-*cis* and all-*trans*- $\beta$ -carotene in green vegetables. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1130-1135, 2010.
87. **TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** 2006. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco>>. Acesso em 15 novembro 2010.
88. TANG G., *et al.*, Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. **Am J Clin Nutr.**, v. 91(5), p. 1468S-1473S, 2010.
89. TANUMIHARDJO S. A. Factors Influencing the Conversion of Ccarotenoids to Retinol: Bioavailability to Conversion to Bioefficacy. **Int. J. Vitam. Nutri Res. Bern**, v 72, n 1, 2002.

90. THAKKAR S. K.; DIXON B. M.; DIXON A.G.O.; FAILLA M. L.,  $\beta$ -carotene micellarization during *in Vitro* Digestion and Uptake by Caco-2 Cells is directly proportional to  $\beta$ -carotene content in different genotypes of cassava. **The Journal of Nutrition**, v.137, p. 2229-2233, 2007.
91. THAKKAR, S. K. *et al.*, Impact of style of processing on retention and bioaccessibility of  $\beta$ -Carotene in Cassava (*Manihot esculanta*, Crantz). **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 1344-1348, 2009.
92. TYSSANDIER V, LYAN B., BOREL P., Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1533, p. 285-292, 2001.
93. VARGAS R. M., **Biodisponibilidade do  $\beta$ -caroteno do pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta crantz*) em ratos.** 2007, 96f. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília. 2007.
94. WELCH R. M., Breeding Strategies for Biofortified Staple Plant Foods to Reduce Micronutrient Malnutrition Globally. **J. Nutr.** v. 132, p. 495S–499S, 2002.
95. WOLF G. The discovery of the visual function of vitamin A. **J. Nutr.**, v. 131, n. 6, p. 1647-50, 2001.
96. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency.* Geneva, World Health Organization, 2009.
97. YEUM, K. J. & RUSSELL, R. M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 483–504, 2002.
98. YONEKURA, L. & NAGAO, A., Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p.107-115, 2007.

99. YOUNG, A. & BRITTON, G., Carotenoids in photosynthesis. New York: Chapman & Hall, p. 206, 1993.