

## **AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE $\beta$ -CAROTENO EM RAÍZES DE MANDIOCA AMARELA JARÍ BRS (*Manihot esculenta Crantz*) MELHORADA IN NATURA E O EFEITO DO COZIMENTO E DA FRITURA**

Suellen Gomes Botelho<sup>(1, 2)</sup>, Alexandre Guedes Torres<sup>(1)</sup>, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy<sup>(2)</sup>, Sidney Pacheco<sup>(2)</sup>, José Luiz Vianna de Carvalho<sup>(2)</sup> e Marília Regina Nutti<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; <sup>(2)</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, suellenquimica2008@gmail.com

**Resumo** – 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 carotenóides pró-vitamina, que é o fator limitante para sua biodisponibilidade. O objetivo deste estudo é investigar a bioacessibilidade *in vitro* de  $\beta$ -caroteno de raízes de mandioca amarela Jarí BRS melhorada, após os processos de cozimento e fritura. As raízes de mandioca na forma *in natura*, cozida e frita foram submetidas à análise de digestão *in vitro*, para em seguida determinar a eficiência da micelarização. A composição de carotenóides antes e após o processo de digestão *in vitro* foi analisada por CLAE (em coluna C<sub>30</sub>) e os teores de carotenóides totais foram determinados por espectrofotometria a 450 nm. A bioacessibilidade foi favorecida, especialmente no processo de fritura que apresentou maior eficiência micelar para carotenóides totais e todo-*trans*- $\beta$ -caroteno (respectivamente  $14,1 \pm 2,2\%$  e  $14,4 \pm 2,4 \%$ ). Possivelmente pela temperatura mais elevada, que contribui para desfazer interações caroteno-proteínas, e pela incorporação de maiores quantidades de lipídios à amostra.

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

**Abstract** – 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. The aim of the present study was to investigate the *in vitro* bioaccessibility of  $\beta$ -carotene from improved yellow cassava roots *Jari* after processing through boiling and frying. Uncooked cassava roots, used as controls, and boiled and fried cassava roots were subjected to *in vitro* digestion, and then the micellarization efficiency was determined. The composition of carotenoids before and after the process of *in vitro* digestion was analyzed by HPLC (on a C<sub>30</sub> column), and the total contents of carotenoids were determined by spectrophotometry at 450 nm. The bioaccessibility was favored by the thermal processes evaluated, especially in the fried cassavas, which presented the highest efficiency of micellarization of total carotenoids and of all-*trans*  $\beta$ -carotene ( $14.1 \pm 2.2\%$  and  $14.4 \pm 2.4\%$ , respectively). The higher bioaccessibility of carotenoids in the fried cassava could be attributed to two main factors, the higher temperature might have released more effectively carotenoids from caroteno-proteins, and also the incorporation of lipids in the sample increased the transference of carotenes to micelles.

Keywords: Vitamin A deficiency, bioavailability, carotenoids, *in vitro* digestion

## Introdução

A deficiência de vitamina A 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, 2008). Essa deficiência nutricional atinge em especial países em desenvolvimento em todo o mundo, especialmente na África, Sudeste da Ásia, e nas Américas, onde a prevalência de hipovitaminose A é de aproximadamente 20% (OMS, 2009). A biofortificação de alimentos é uma estratégia alternativa no combate a hipovitaminose A, e visa elevar os teores de  $\beta$ -caroteno em alimentos tipicamente consumidos por grupos de risco de deficiência de vitamina A (WELCH, 2002). A mandioca é nativa da América tropical e é uma das culturas alimentares mais consumidas e produzidas nos países em desenvolvimento, porém apresenta baixos teores de carotenóides pró-vitamina A em suas raízes comestíveis (FAO, 2000). 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 esteja biodisponível e, dessa forma, que seja absorvido em quantidades suficientes para atender a demanda fisiológica. A biodisponibilidade dos carotenóides é um processo complexo e 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. Considera-se limitante para a biodisponibilidade de carotenóides sua transferência dos alimentos para micelas mistas. Esses fatores podem ser investigados em sistemas de digestão *in vitro* que simulam a digestão humana e denomina-se bioacessibilidade (TAKKAR, 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 isomerização (RUEL, 2001). A eficácia do uso da mandioca amarela Jarí BRS 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, ainda não foi investigada a influência desses processos sobre a bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno nas raízes da mandioca estudada. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar a eficiência da micelarização do  $\beta$ -caroteno na mandioca amarela Jarí BRS melhorada após os processos de cozimento e fritura, como indicador da bioacessibilidade desse carotenóide neste alimento, de modo a contribuir para melhorar as estratégias de combate a hipovitaminose A.

## Material e Métodos

### *Material*

As raízes de mandioca amarela Jarí BRS melhorada fazem parte do projeto BioFORT e foram cultivadas e fornecidas pela Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracaju/ SE. A colheita ocorreu após 12 meses de plantio, os experimentos foram 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 foram de grau cromatográfico e durante todo o estudo foi utilizada água ultrapura (Milli-Q).

### *Preparação da amostra*

As raízes de mandioca amarela Jarí BRS melhorada, foram descascadas e quarteadas longitudinalmente, de uma extremidade a outra da raiz e foram cortadas em cubos. O cozimento foi realizado em panela de pressão por 45 min após ebulição. Para o processo de fritura, as raízes de mandioca foram cozidas da mesma forma por 30 min, a água foi drenada, as amostras foram resfriadas e levadas a fritura em óleo de soja a 180 °C por 8 min. Em seguida, as amostras (*in natura*, cozida e frita) foram separadamente trituradas em moinho (IKA® A11, Alemanha), para homogeneização,

seguida de armazenagem em embalagens metalizadas em atmosfera, purgadas com N<sub>2</sub> e refrigeradas a 4° C até análises.

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

A extração dos carotenoides das amostras de mandioca *in natura*, cozida e frita antes do processo de digestão *in vitro* foi realizada com maceração das amostras, utilizando celite e acetona. O extrato obtido foi transferido, quantitativamente, para funil de separação, contendo éter de petróleo e lavado com aproximadamente 300 mL de água ultra-pura (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) e levado para as análises cromatográficas.

#### *Digestão in vitro*

Nas amostras *in natura* e cozida foi adicionado 1% (p/p) de óleo de canola. Em seguida as amostras de mandioca *in natura*, cozida e frita foram pesadas, em tubo de polipropileno. O processo de digestão *in vitro* teve início pela simulação da etapa oral onde foram adicionados 7 mL de solução contendo  $\alpha$ -amilase, mucina e uma mistura de sais, conforme descrito por Oomen *et al.* (2003). As amostras foram seladas em atmosfera de N<sub>2</sub>, homogeneizadas e colocadas sob agitação em banho orbital a 37 °C e 60 rpm por 10 min. Na fase gástrica da digestão adicionou-se solução de sais (120 mM NaCl, 6 mM CaCl<sub>2</sub> e 5 mM KCl). 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 e estes foram incubados novamente por 1 h (37 °C; 60 rpm de agitação orbital). A Simulação da fase intestinal da digestão se deu pelo ajuste do pH para  $6,0 \pm 0,1$  com NaHCO<sub>3</sub>, seguido da adição de 3 mL de solução estoque de extrato de bile (40 mg extrato de bile/ mL e 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) e 2 mL de solução estoque de pancreatina-lipase (10 mg de pancreatina + 5 mg lipase/ mL 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) e novo ajuste de pH para  $6,5 \pm 0,2$  com NaOH 1M. Os tubos foram selados em atmosfera de N<sub>2</sub> e incubados novamente no banho com agitação orbital por 2 h (FAILLA M. L. & CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). No final da simulação da fase intestinal da digestão, a fração micelar foi separada por centrifugação (5000  $\times$ g, 4 °C/ 45 min).

#### *Extração dos carotenóides da fração micelar*

Os carotenoides da fração micelar, os quais estão bioacessíveis nas condições investigadas, foram extraídos utilizando éter de petróleo, solução aquosa de NaCl 10% e solução de NaSO<sub>4</sub> 2% (FERNANDEZ-GARCIA, MOSQUERA & PÉREZ-GÁLVEZ, 2007). O extrato foi concentrado em evaporador rotativo e em seguida dissolvido e avolumado em éter de petróleo, até análise por cromatografia.

#### *Análises cromatográficas dos carotenóides das amostras antes e após digestão in vitro*

A quantificação dos carotenoides totais das amostras foi realizada por espectrofotometria, em comprimento de onda de 450 nm (UV-1800; Shimadzu, Japão). A separação, identificação e quantificação do  $\beta$ -caroteno *todo-trans* e dos isômeros *cis* nas amostras analisadas foram realizadas por CLAE-PDA em coluna de fase reversa C<sub>30</sub> (Pacheco, 2009). A quantificação dos carotenóides foi feita por padronização externa, através de curva de calibração de padrão de  $\beta$ -caroteno isolado da mandioca. A eficiência da micelarização (bioacessibilidade) de carotenóides totais e do  $\beta$ -caroteno nas amostras foi calculada a partir dos teores de carotenóides nas amostras digeridas em comparação aos seus respectivos teores nas amostras não-digeridas (OOMEN, 2003).

#### *Análise estatística*

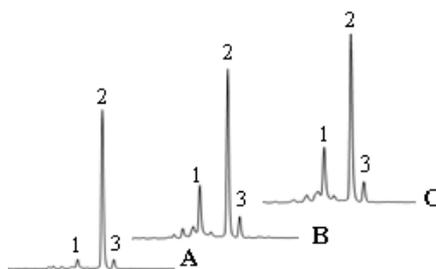
Para a análise de estatística descritiva, foram calculados médias aritméticas e desvios-padrão (DP), como medidas de centralidade e de dispersão, respectivamente. Os resultados foram tratados por análise de variância (*one-way* ANOVA) com medidas repetidas com teste posterior de Tukey. A determinação 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).

## Resultados e Discussão

### *Digestão In vitro, eficiência da micelarização (bioacessibilidade)*

As amostras de mandioca amarela Jarí BRS apresentaram como único carotenóide presente em sua composição o todo-*trans*- $\beta$ -caroteno e suas formas isoméricas 9-*cis* e 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (Figura 1). A mandioca Jarí não digerida apresentou elevados teores ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ; média  $\pm$  DP) de carotenóides totais e todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, respectivamente: *in natura*,  $944 \pm 6,6$  e  $743 \pm 23,1$ ; cozida,  $675 \pm 52$  e  $363 \pm 42,5$ ; frita,  $1020 \pm 33$  e  $525 \pm 21,2$ . Após o processo de digestão *in vitro* observa-se que a mandioca amarela Jari BRS frita apresentou as maiores concentrações de carotenóides totais e de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno na fração micelar, em comparação às amostras cozida e *in natura* (Tabela 1).



**Figura 1.** Cromatogramas da fração micelar das amostras de mandioca *in natura* (A), cozida (B) e frita (C), após o processo de digestão *in vitro*. Identidade dos picos cromatográficos: (1) 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, (2) todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, (3) e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno.

**Tabela 1.** Teores de carotenóides totais ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) e eficiência da micelarização (EM %) do  $\beta$ -caroteno das raízes de mandioca amarela Jarí BRS *in natura*, cozida e frita ( $n=9$ ).

Amostras	Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) média $\pm$ DP	EM de Carotenóides Totais (%) média $\pm$ DP	$\beta\text{C}$ -todo- <i>trans</i> ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) média $\pm$ DP	EM de $\beta\text{C}$ (%) média $\pm$ DP
<i>In natura</i>	$52 \pm 1,40^a$	$5,53 \pm 0,15^a$	$36,18 \pm 2,25^a$	$4,87 \pm 0,30^a$
Cozida	$41 \pm 1,82^b$	$6,11 \pm 0,27^a$	$20,81 \pm 1,88^b$	$5,73 \pm 0,52^a$
Frita	$143 \pm 21,7^c$	$14,1 \pm 2,13^b$	$75,33 \pm 12,2^c$	$14,34 \pm 2,33^b$

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

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  $14,4 \pm 2,44\%$ ). Por outro lado, ao contrário do esperado, não houve diferença significativa entre as amostras *in natura* e cozida ( $p > 0,05$ ), que pode ser explicado pela complexidade de homogeneização da mandioca cozida no processo de digestão. Em função da hidratação do amido, as raízes de mandioca cozida apresentaram-se como uma massa de difícil dispersão nos fluidos digestivos, que possivelmente resultou em baixa eficiência de micelarização dos carotenóides.

### Conclusão

O método de preparo e a adição de lipídios são fatores limitantes na bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno. A maior eficiência de micelarização observada nos carotenóides da mandioca amarela Jarí BRS melhorada frita, permite concluir ainda, que a fritura aumentou a sua bioacessibilidade devendo resultar em maior biodisponibilidade de carotenóides pró-vitamina A e conseqüentemente maior eficácia dessa preparação como veículo da vitamina A.

### Agradecimentos

Embrapa Agroindústria de Alimentos; Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracajú/ SE; CNPq; Fundo de Pesquisa Embrapa-Monsanto, pelo suporte financeiro ao projeto BioFORT.

### Referências

- 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
- FAO, Food And Agriculture Organization of the United Nations, 2000. Championing cause of cassava. Disponível em: <http://www.fao.org/news/2010>.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, p. 64, 2001.
- THAKKAR, S. K. *et al.*, Impact of style of processing on retention and bioaccessibility of  $\beta$ -Carotene in Cassava (Manihot esculanta, Crantz). **J. Agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 1344-1348, 2009.
- WELCH R. M., Breeding Strategies for Biofortified Staple Plant Foods to Reduce Micronutrient Malnutrition Globally. **J. Nutr.** v. 132, p. 495S-499S, 2002.

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.