

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DO β -CAROTENO NA FRAÇÃO MICELAR DE RAÍZES DE MANDIOCA AMARELA BRS JARI (*Manihot esculenta* Crantz) APÓS DIGESTÃO IN VITRO

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

⁽¹⁾Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ; ⁽²⁾Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

Resumo – A biodisponibilidade de carotenoides pode ser investigada através do estudo de sua bioacessibilidade *in vitro*. Após a liberação da matriz alimentar no final do processo digestivo, o β -caroteno é transferido para a fração emulsionada e por fim para micelas mistas, que atravessam a camada de água ligada que cobre a membrana de borda em escova do intestino delgado. Nessas etapas é necessário que o β -caroteno não esteja em sua forma cristalina. Além disso, essas etapas são essenciais para que haja a absorção de carotenoides no organismo humano. Na literatura são escassos estudos sobre a caracterização microscópica de carotenoides em micelas mistas após o processo de digestão *in vitro*. O objetivo desse trabalho foi caracterizar por microscopia de fluorescência a fração micelar de mandioca amarela BRS Jari cozida e frita após digestão *in vitro*. A microscopia de fluorescência foi aplicada para confirmar a presença do β -caroteno emulsionado na fração micelar das amostras estudadas. Além disso, nas análises de microscopia foi observada a morfologia das estruturas da fração emulsionada contendo os carotenoides das amostras de mandioca amarela BRS Jari cozida e frita, em comparação à morfologia de cristais de β -caroteno de uma solução de padrão. Observou-se que não havia estruturas cristalinas fluorescentes na fração micelar das amostras de mandioca cozidas e fritas analisadas.

Palavras-chave: Micelas, β -caroteno, bioacessibilidade, microscopia

Abstract – Bioavailability of carotenoids might be investigated through the assessment of *in vitro* bioaccessibility. The digestion of foods liberates β -carotene from the food matrix, and after that the carotenoid is transferred to the emulsified fraction and then to mixed micelles, that pass the unstirred water layer of the brush-border membrane of the small intestine. During these phases, β -carotene should not be in the crystalline form, for complete absorption. Additionally, these phases are strictly necessary for β -carotene absorption in humans. The study of β -carotene in mixed micelles through fluorescence microscopy after *in vitro* digestion is poorly reported in the literature. The aim of the present study was to characterize by fluorescence microscopy the micellar fraction of boiled and fried cassava after *in vitro* digestion. Fluorescence microscopy was used to confirm the presence of β -carotene emulsified in the micellar fraction of the samples. Furthermore, we observed the morphologies of the emulsified fraction containing carotenoids from the samples of boiled and fried yellow BRS Jari cassava, in comparison with the morphology of crystals of β -carotene. No fluorescent crystal structures were observed in the micellar fraction of samples of fried and boiled cassava.

Keywords: micelles, β -carotene, bioaccessibility, microscopy

Introdução

Para que haja absorção dos carotenoides da dieta, durante o processo de digestão é necessário que estes compostos sejam liberados da matriz alimentar e transferidos para micelas mistas. Este processo é denominado bioacessibilidade e é considerado etapa limitante na biodisponibilidade de carotenoides e, desta forma, essencial para a sua função de pró-vitamina A.

São escassos na literatura estudos relacionados à caracterização dos carotenoides incorporados na fração micelar após a digestão *in vitro*. Na maior parte dos trabalhos publicados, a investigação da bioacessibilidade de carotenoides se baseia em sua quantificação por CLAE na fração micelar. No presente estudo, realizou-se a microscopia de fluorescência da fração micelar das amostras de mandioca amarela BRS Jari cozidas e fritas após digestão *in vitro*, com a finalidade de confirmar a presença dos carotenoides emulsionados, em contraste com a fase de óleo não emulsionado, 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, composta especialmente por sais biliares (YONEKURA E NAGAO, 2007). A microscopia de fluorescência é aplicada no estudo de células vegetais, em função da autofluorescência apresentada por alguns constituintes, tais como o β -caroteno (GILLBRO, 1989). Os carotenoides ao serem excitados por uma luz de comprimento de onda curto emitem luz de um comprimento de onda maior. O β -caroteno fluoresce com excitação em aproximadamente 500 nm e emissão em aproximadamente 570 nm (KLEINEGRIS, 2010).

Material e Métodos

Preparação da amostra

As raízes de mandioca amarela BRS Jari fazem parte do projeto BioFORT e foram cultivadas e fornecidas pela Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracaju/ SE. A colheita ocorreu após 12 meses de plantio. As raízes de mandioca 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, purgada com N₂ e refrigeradas a 4° C até análises.

Digestão *in vitro*

As amostras de mandioca amarela BRS Jari cozida e frita foram pesadas, em tubo de polipropileno. O protocolo descrito por Garrett *et al.*(1999), para simulação da digestão humana foi seguido com algumas modificações. O processo de digestão *in vitro* teve início pela simulação da etapa oral onde foram adicionados 7 mL de solução contendo α -amilase, mucina e uma mistura de sais, nos tubos, conforme descrito por Oomen *et al.* (2003). As amostras foram seladas em atmosfera de N₂, 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 CaCl₂ 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, 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. Nestes, foram adicionados 3 mL de solução estoque de extrato de bile (40 mg extrato de bile/ mL 100 mM NaHCO₃) e 2 mL de solução estoque de pancreatina-lipase (10 mg de pancreatina + 5 mg lipase/

mL 100 mM NaHCO₃), e novo ajuste de pH para $6,5 \pm 0,2$ com NaOH 1M. Os tubos foram selados em atmosfera de N₂ 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 ×g, 4 °C/ 45 min).

Análise da fração micelar por microscopia

Alíquotas da fração micelar das amostras de mandioca amarela BRS Jari 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 β-caroteno foi suspensa em acetona e utilizada como controle para observação dos cristais de β-caroteno e comparação com as amostras de mandioca frita e cozida após digestão *in vitro*.

Resultados e Discussão

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 carotenoides fluorescentes. Na Figura 1 podem ser observadas as imagens fotográficas da microscopia de fluorescência das amostras da fração micelar da mandioca frita e cozida após digestão *in vitro*, em comparação com a amostra de padrão de β-caroteno (controle).

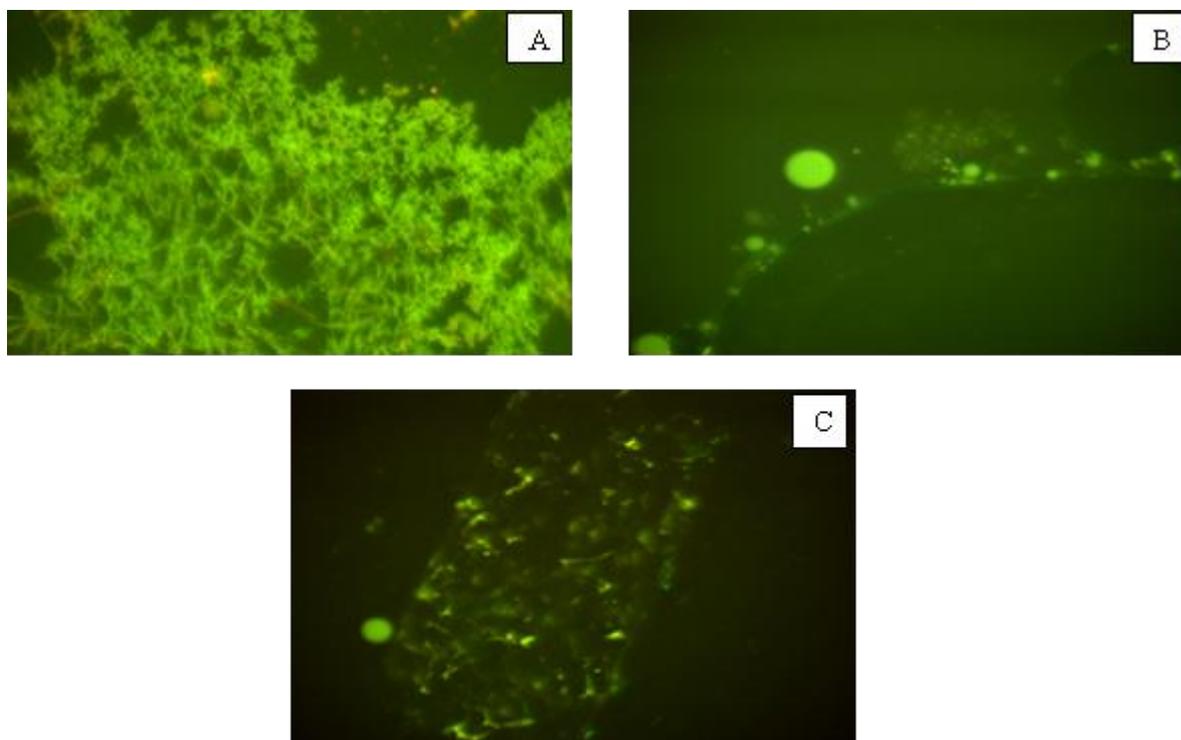


Figura1. Microscopia de fluorescência: (A) imagem controle utilizando padrão de β-caroteno; (B) imagem da fração micelar da mandioca Jari BRS frita contendo o β-caroteno; (C) imagem da fração micelar da mandioca cozida contendo o β-caroteno. Barra de resolução 50 μm.

Na Figura 1, observam-se claramente diversas estruturas cristalinas fluorescentes no controle, em contraste com as amostras da fração micelar da mandioca BRS Jari cozida e frita, nas quais há 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 β -caroteno, indicando que o carotenoide apresenta-se emulsionado na fração micelar das amostras de mandioca cozida e frita.

Na imagem microscópica obtida da fração micelar da mandioca cozida, além das microesferas fluorescentes observam-se pontos de fluorescência verde, característicos do β -caroteno (ZHANG, 1997), 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 β -caroteno promoveu redução da eficiência de micelarização do β -caroteno na mandioca cozida (BOTELHO, 2011). Esses resultados preliminares sobre a caracterização da fração micelar rica em β -caroteno das amostras de mandioca fornecem dados adicionais quanto à bioacessibilidade do β -caroteno da mandioca amarela Jari após o cozimento e a fritura. Embora não tenha sido possível observar as micelas mistas, em função de atributos da técnica de microscopia usada, observaram-se importantes diferenças entre os processamentos empregados, que foram consistentes com os dados quantitativos de eficiência de micelarização do β -caroteno. Além disso, pode-se afirmar que após o processo de digestão *in vitro* os carotenoides da fração micelar não apresentam-se em estruturas cristalinas

Conclusão

Após a digestão *in vitro*, as amostras cozida e frita de mandioca amarela BRS Jari apresentaram o β -caroteno emulsionado na fração micelar. A formação de complexos de inclusão de carotenoides em estruturas supramoleculares amorfas, observadas nas amostras de mandioca cozida, provavelmente reduz a bioacessibilidade do β -caroteno nessa preparação de mandioca, em comparação com a frita. Não se observaram estruturas cristalinas fluorescentes, nos comprimentos de onda de absorção e emissão característicos do β -caroteno. Esses resultados são consistentes com a hipótese de bioacessibilidade do β -caroteno após digestão *in vitro*.

Agradecimentos

Embrapa Agroindústria de Alimentos; Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracajú/ SE; CNPq; Fundo de Pesquisa Embrapa-Monsanto, pelo suporte financeiro ao projeto BioFORT; Laboratório de Microbiologia Geral (ICB/ UFRJ).

Referências

- Botelho, S G. **Avaliação da Bioacessibilidade de β -Caroteno em Raízes de Mandioca Amarela (*anilot esculenta Crantz*) Melhorada *In natura* e o Efeito do Cozimento e da Fritura**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ/ IQ. Rio de Janeiro, 2011.
- 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

- 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.
- Gillbro T, Cogdell RJ. Carotenoid fluorescence. **Chem Phys Lett.**, v. 158, p. 312–316, 1989.
- Kleinegris D. M. M., *et al.*, Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. **J Appl Phycol**, v. 22, p. 645–649, 2010.
- 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.
- Yonekura, L. & Nagao, A., Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p.107-115, 2007
- Zhang D. H. *et al.*, Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. **J. Appl Phycol.**, v. 9, p. 147–155, 1997.