

BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DE CAROTENOÍDES EM OITO CULTIVARES DE BATATA DOCE (*Ipomoea batatas Lam*) DE POLPA ALARANJADA

IN VITRO BIOACCESSIBILITY CAROTENOIDS IN EIGHT CULTIVARS OF ORANGE SWEET POTATO (*Ipomoea batatas Lam*)

Fernanda Marques PEIXOTO¹, Renata Galhardo BORGUINI², Sidney PACHECO², Ronoel Luiz de Oliveira GODOY², José L. V. de Carvalho², Marília R. Nutti²

¹Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO)

²Embrapa Agroindústria de Alimentos

Palavras-chave: CLAE, trato gastro-intestinal, carotenoides, biodisponibilidade.

Introdução

A batata-doce é cultivada em 111 países, sendo sua produção de aproximadamente 90% na Ásia, apenas 5% na África e 5% no restante do mundo (FAO, 2000). No Brasil, a batata-doce é cultivada em todas as regiões, com predominância nas regiões norte e nordeste. Nestes locais a batata-doce assume um importante papel da alimentação das famílias, por se constituir em uma fonte energética, vitamínica e proteica. Por isso, ela foi selecionada pelo Projeto de Biofortificação como um alimento alvo para a utilização de técnicas de fitomelhoramento a fim de gerar cultivares que apresentem maiores conteúdos de nutrientes e melhores características agrônomicas. Dentre elas, inclui-se o cruzamento de linhagens com características nutricionais melhores, livre polinização (hibridização), utilização de solo com alto conteúdo mineral e a engenharia genética, através da transgenia (HARVESTPLUS, 2006).

Paralelamente à seleção dessas linhagens promissoras, estudos de bioacessibilidade *in vitro* devem ser realizados, como uma ferramenta inicial de previsão da biodisponibilidade, já que os estudos *in vivo* são mais onerosos, complexos e demandam mais tempo. Num primeiro momento eles têm a função de verificar se a nova linhagem apresentará o mesmo incremento quantitativo na sua absorção, que apresentou em seu conteúdo nutricional, a fim de evitar desperdícios financeiros e humanos em linhagens, que não resultarão em boa biodisponibilidade. Além disso, diversos estudos apontam que a quantidade de carotenóides pró-vitamínicos presentes nos alimentos não corresponde necessariamente à quantidade absorvida e metabolizada pelo organismo. O cálculo da bioacessibilidade para carotenóides é realizado através da determinação da eficiência de micelização, pois esta corresponde a proporção de carotenóides que é transferido da matriz alimentícia para as micelas formadas após a digestão *in vitro* e que, portanto, será passível de ser absorvida, se estivesse no organismo.

Os carotenóides fazem parte do grupo dos compostos bioativos lipofílicos, por apresentarem ação biológica. O interesse sobre eles, não está relacionado somente a sua atividade de provitamina A, mas também a sua ação antioxidante, bem como sua participação no sistema de comunicação, nas junções gap célula-célula, e no sistema imune (KRINSKY, 2001). Os animais são incapazes de biossintetizá-los e por isso, devem ser obtidos através da dieta. O β - caroteno (BC) é o carotenóide mais abundante na dieta humana e o mais eficiente como precursor da vitamina A, pois sua molécula apresenta dois anéis β -ionona, não substituídos, com posição e número corretos dos grupos metil da cadeia poliênica (THURNHAM, 2007), os quais são capazes de gerar duas moléculas de retinol. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a bioacessibilidade *in vitro* de carotenóides totais, em especial do β - caroteno em oito variedades de batata-doce de polpa alaranjada, selecionadas pelo projeto HARVEST PLUS.

Material e Métodos

As amostras de batata doce de polpa alaranjada foram fornecidas pelo Campo Experimental da Embrapa no estado do Maranhão. Elas foram lavadas, cortadas e sofreram quarteamento e depois homogeneizadas em moinho. As amostras foram preparadas em duplicata e acrescidas com 5% (p/p) de óleo de canola.

Extração e análise de carotenóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência antes e após digestão *in vitro*

Extração antes da digestão *in vitro* (matriz)

O procedimento de extração antes da digestão baseou-se na metodologia descrita por Rodriguez-Amaya e colaboradores (2001). As análises foram realizadas em duplicata e os procedimentos de extração foram realizados em câmara escura e com a maior rapidez possível, a fim de evitar a degradação dos carotenóides.

Digestão *in vitro*

Fase oral foi iniciada com 10g de amostra em tubo 50 mL, foram adicionados 7 mL de solução contendo α -amilase, mucina e demais sais, como descrito por Oomen et al. (2003). As amostras foram colocadas sobre atmosfera de nitrogênio, seladas, homogeneizadas e transferidas para o banho orbital por 37°C a 60 rpm por 10 minutos. Após, a fase gástrica foi iniciada, adicionando-se solução salina, contendo 120 mM NaCl, 6 mM CaCl₂ e 5 mM KCl, até o volume de 30 mL, em seguida foram homogeneizadas em vórtex. Ajustou-se o pH para 2.5 +/- 0.1 com HCl 1 M. Após, foram adicionado 2 mL de solução de pepsina e ajustou-se o volume para 40 mL com solução A. Os tubos foram incubados em banho orbital por 1 h a 37°C a 60 rpm. Após, a fase intestinal iniciou-se, adicionando-se 1 M de NaHCO₃ para ajuste do pH para 6.0 +/- 0.2. Adicionou-se 3 mL de solução de extrato de bile. Após adicionou-se 2 mL de solução de pancreatina-lipase. Ajustou-se o pH para 6.5 +/- 0.1 com 1 M NaOH e avolumou-se para 50 mL com a solução salina. Colocou-se a amostra sob atmosfera de nitrogênio, selou-se o tubo e incubou-se no banho orbital por 2 h a 37°C a 60 rpm. Ao final, os tubos foram removidos do banho e colocados em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas, colocadas sob atmosfera de nitrogênio e 10 mL foram transferidos para os tubos de ultracentrifuga. As mesmas foram colocadas sob atmosfera de nitrogênio e os tubos foram selados e centrifugados por 45 minutos a 4°C a 5.000 g. A fração aquosa de cada tubo foi coletada (FAILLA e CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005 apud GIORI, 2010).

Extração da amostra após a digestão *in vitro* (fração micelar)

Para extração após a digestão, 10 mL da fração micelar foi colocado em funil de separação, adicionados 30 ml de éter de petróleo e 200 mL de solução de NaCl (10%). Foi realizada uma agitação, as frações foram separadas e a fase aquosa descartada. A fase orgânica foi lavada duas vezes com 200 mL de solução de Na₂SO₄ 2%(p/v) (FERNANDEZ-GARCIA, MOSQUERA e PÉREZ-GÁLVEZ, 2007). Posteriormente, a solução foi passada através de Na₂SO₄ anidro para balão volumétrico âmbar e após para evaporador a vácuo até redução do volume e realizada leitura no espectrofotômetro UV-VIS a 450 nm.

Análise dos carotenóides por Cromatografia Líquida de alta Eficiência

A quantificação e determinação do perfil de carotenóides nas amostras antes e após a digestão *in vitro* foram realizadas no Cromatógrafo líquido de alta eficiência, com forno para colunas e detector de rede de diodos UV-Vis Waters®, com coluna YCM® Carotenoid C30 S-

3 de 4,6 x 250mm. A separação foi obtida utilizando eluição por gradiente, com fase móvel binária de metanol/éter metil *tert*-butílico, fluxo de 0,8mL/min, volume de injeção de 15µL e tempo de corrida de 28 minutos. A quantificação de carotenóides totais foi realizada por espectrofotometria de UV-VIS a 450nm.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da quantificação dos carotenoides dos cultivares antes e após o processo de digestão *in vitro* (Tabela 1) mostraram-se inferiores a valores de outras cultivares da batata doce de polpa alaranjada, previamente relatados por GIORI (2010), corroborando para a hipótese de seleção dos melhores cultivares a partir do estudo da bioacessibilidade dos carotenoides. Quanto ao perfil cromatográfico, todos os cultivares, tanto antes como depois, demonstrou-se semelhante, uma vez que observou-se uma mudança nos teores dos carotenóides antes e após a digestão, já que inicialmente o β -caroteno apresentou teor médio de 86% e o α -caroteno de 11% e após a execução da digestão, o perfil do β -caroteno passou a configurar teor médio de 100%, além de configurar traços de α -caroteno (Figura 1). O desaparecimento deste composto corrobora com estudos anteriores, que relatam que o β -caroteno apresenta um efeito inibitório sobre α -caroteno, por alterar o grau de micelização deste composto (HUO et al, 2007). O tempo de retenção de 17 minutos do todo-trans β -caroteno foi característico em todos os cultivares e o pH 2,5 não causou maior isomerização, em oposição a relatos anteriores (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Não há relatos da bioacessibilidade *in vitro* de carotenoides dos cultivares estudados, no entanto, os valores confirmam os de outras variedades já descritas, nos quais foram encontrados valores de eficiência de micelização de β -caroteno entre 0,6 e 6% (FAILLA et al, 2009). Além disso, já há relatos sobre o tomate, onde foram encontrados valores entre 6,1 e 47,2%, sobre a pimenta vermelha, entre 13,3 e 76,7%, sobre a abóbora, entre 18,0 e 79,4%, e sobre a mandioca, entre 12 e 15% (RYAN et al, 2008). Estas variações confirmam a hipótese de que a matriz, o tipo de óleo presente e o tipo de carotenoide, são grandes fatores de variabilidade e interferem criticamente para as quantidades finais passíveis de serem absorvíveis.

Os cultivares 1 e 2, por apresentarem baixas concentrações iniciais de carotenoides, impossibilitou a sua detecção na fração micelar, já que ocorre grandes perdas durante o processo digestivo. Os cultivares 4, 5 e 6, apesar de apresentarem quantidades iniciais aproximadamente 100% superiores, geraram valores de bioacessibilidade semelhantes ao do cultivar 3, evidenciando que os altos teores de um determinado micronutriente no alimento, não é garantia de que o mesmo esteja disponível para absorção. Além disso, os diferentes percentuais de bioacessibilidade encontrados, principalmente entre os cultivares 7 e 8, com os demais indicam não existir uma equivalência clara entre a transferência dos carotenoides de uma mesma matriz alimentícia para as micelas formadas.



Tabela 1: Concentrações totais antes e após digestão *in vitro* e cálculo da bioacessibilidade dos carotenóides totais presentes na batata doce de polpa alaranjada (n=2)

Batata doce de polpa alaranjada (Cultivares)	Carotenóides totais ($\mu\text{g}/100\text{g}$) antes da digestão <i>in vitro</i>	Carotenóides totais ($\mu\text{g}/100\text{g}$) após a digestão <i>in vitro</i>	Bioacessibilidade de carotenóides totais (%)
1	62,5	Não detectável	-
2	255,5	Não detectável	-
3	1920,0	25,40	1,32
4	3810,2	41,85	1,10
5	4180,0	68,63	1,64
6	4356,2	51,45	1,18
7	7277,5	385,28	5,30
8	7405,2	414,12	5,60

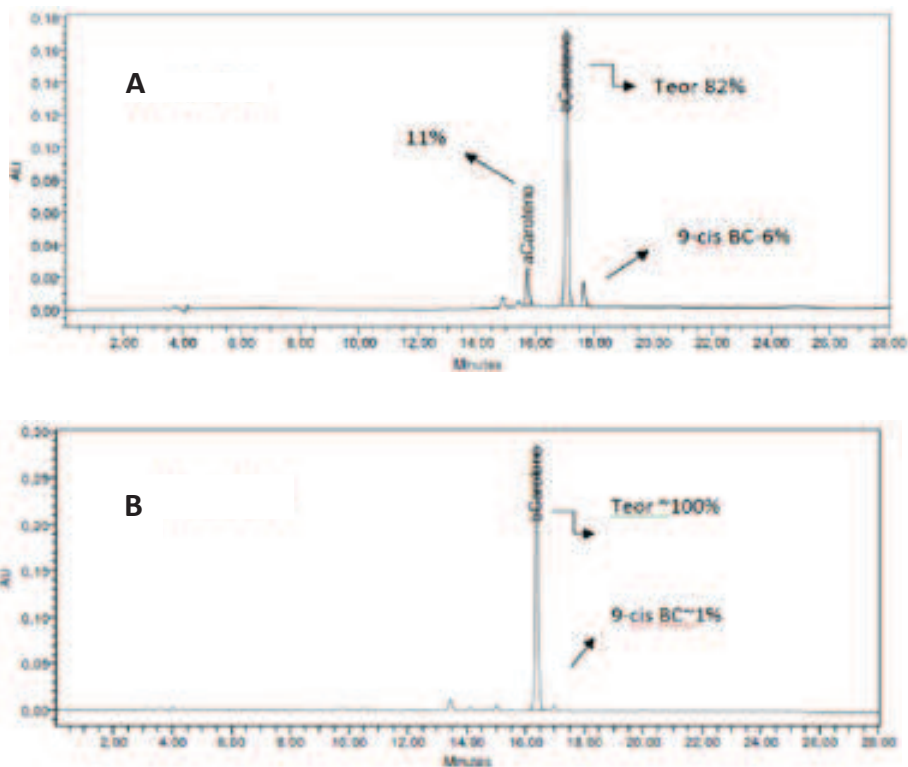


Figura 1: Cromatogramas dos carotenóides encontrados nos oitos cultivares de batata doce de polpa alaranjada antes (A) e após (B) a digestão *in vitro*.

Conclusão

Desta forma, conclui-se que a bioacessibilidade dos carotenoides totais presentes nos oito cultivares de batata doce de polpa alaranjada variou entre 1,10 e 5,60%, e que estes dados fornecem informações valiosas para selecionar as matrizes mais capazes de assegurar a quantidades de micronutrientes, que potencialmente serão absorvidas pelo organismo. Além disso, pode ser utilizada como ferramenta de apoio na estimativa de medições de atividade de compostos potencialmente bioativos e na investigação de seus possíveis benefícios a saúde.

Referências

FAILLA, M. L.; THAKKAR, S. K.; KIM, J. Y. In Vitro Bioaccessibility of β -Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). **J. Agric. Food Chemistry**, v.57, p.10922–10927, 2009.

FAO . Food and Agriculture Organization. The sixth food survey, _____ . The state of food insecurity in the world (SOFI), 2000.

GIORI, F. P.. **Adaptação de metodologia de digestão *in vitro* e determinação da Bioacessibilidade *in vitro* de β - caroteno em três variedades de batata-doce de polpa alaranjada**. Dissertação (Mestrado).Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica . 2010.

HARVESTPLUS.2006b.Batata-doce biofortificada. Disponível em:<
<http://www.harvestplus.org>>. Acesso em 01 de dezembro de 2009.

HUO, T.; FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S.J.; FAILLA, M. L.Impact of Fatty Acyl Composition and Quantity of Triglycerides on Bioaccessibility of Dietary Carotenoid. **Agric. Food Chem**, v.55, p. 8950–8957, 2007.

KRINSKY N. I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v. 17, f.10, p. 815-817, 2001.

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.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington DC: International Life Sciences Institute (ILSI) Press, 1999, 64p.

RYAN, L.; O'CONNELL, O.; O'SULLIVAN, L.; AHERNE, S. A. Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. **Plat. Foods Hum Nutr.**, v. 63, p.127-133, 2008.

Autor a ser contatado: Fernanda Marques Peixoto. Centro Universitário da Zona Oeste (UEZO). End: Praia Belo Jardim, 841, apto 102, Galeão, Rio de Janeiro CEP:21941-290. Email:fpeixoto24@gmail.com