

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

PAULO ROBERTO DE ARAUJO BERNI

**Biodisponibilidade de β -caroteno em mandiocas e batatas-doces
biofortificadas: estudos dos efeitos de genótipos e processamentos**

Piracicaba

2014

PAULO ROBERTO DE ARAUJO BERNI

**Biodisponibilidade de β -caroteno em mandiocas e batatas-doces
biofortificadas: estudos dos efeitos de genótipos e processamentos**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Solange Guidolin Canniatti Brazaca

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Berni, Paulo Roberto de Araujo

Biodisponibilidade de β -caroteno em mandiocas e batatas-doces biofortificadas: estudo dos efeitos de genótipos e processamentos / Paulo Roberto de Araujo Berni; orientadora Solange Guidolin Canniatti Brazaca. - - Piracicaba, 2014.

110 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biofortificação 2. Compostos orgânicos 3. Cultura de tecidos 4. Linhagem celular 5. Melhoramento genético vegetal 6. Processamento de alimentos 7. Química de alimentos 8. Teor vitamínico dos alimentos 9. Valor nutritivo 10. Vitamina A I. Título.

CDU 547.979.48 : 612.332

Ao meu pai, Waldomiro, que me deu as bases
para uma vida espiritual.

À minha mãe, Elizabeth, que me deu as bases
para uma vida material.

Ao meu companheiro, Rodrigo, que viu em mim
muito mais do que eu acreditava ser capaz.

Dedico,

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é resultado do trabalho, dedicação e apoio de muita gente. Tanto que seria desrespeitoso de minha parte reivindicá-la como exclusivamente minha. Esta pesquisa é, antes de tudo, resultado de um esforço coletivo, condições favoráveis e benção divina. Sinto profunda gratidão por todos aqueles citados aqui, e mesmo por muitos que nas exigências do cotidiano não tive a delicadeza de guardar os nomes. Rogo à Deus que abençoe à todos.

À Prof.^a Solange Guidollin Canniatti Brazaca por me receber e orientar desde meus primeiro passos na ciência de alimentos. Pela gentileza, paciência, amabilidade e ética que sempre agiu comigo.

À pesquisadora Dr.^a Teresa Losada Valle, que pra mim é uma professora da vida. Obrigado por confiar em mim e por ceder o material para minha pesquisa, através do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP por financiar meu trabalho através das bolsas de Mestrado e Estágio de Pesquisa no Exterior.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, através do Programa Biofort, na pessoa de Marília Regini Nutti por ceder o material de pesquisa e intermediar a colaboração com a *Ohio State University* (OSU).

Ao Programa Harvestplus do *International Food Policy Research Institute* (IFPRI) por financiar minha pesquisa nos Estados Unidos.

Ao pessoal do Laboratório de Análise de Alimentos e aos alunos do curso de Ciências dos Alimentos que, desde 2007, me deram a alegria e o suporte da amizade de vocês. Neila, Nathaly, Marcelo, Natália, Leilane, Natasha, Laís, Ana Paula e Patrícia, Carolina, Mariana, Miriam, Fernanda, Tamara, Gabriela, Anna Flávia, Anna Paula, Tammye, Susan, Vana ...

À Prof.^a Silvia Maria Guerra Molina e ao grupo de Ecologia Humana por me oferecer a oportunidade de conviver com pessoas brilhantes. Vocês são como um farol em noites de mar agitado reconduzindo os viajante à rota segura.

À Prof.^a Gilma Lucazechi Sturion e Prof.^a Marília Oetterer pelo incentivo, conselhos e exemplos que me ofereceram para trilhar um caminho seguro.

Ao Thiago Mezette, Prof.^a Solange Cadore, Rafaella Peixoto e Ediane Ribeiro pelas contribuições, ideias, parcerias e boa vontade de ajudar com minha pesquisa.

À minha psicóloga Nely Tedesco, meu homeopata Arjuna Perin e minha professora de yoga Jaqueline Borges por promoverem minha saúde física e espiritual. Eu não teria conseguido sem seus cuidados.

Aos grandes amigos, família piracicabana, Igor Ferrari e Família, Laudicéia e família, pessoal do ICEP e Nairzinha.

Ao Rodrigo Amâncio, Thiago Anchieta, Fábio Lima, Marilys Shimano, Alexandre Diniz, Fábio Liberato, Bruna Travagin, Bryan Levy, Thiago Tannous, Leandro Martins e Juliana Ribeiro, obrigado pela convivência, companheirismo e ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu pai Waldomiro, minha mãe Elizabeth, minha irmã Nathália, meu irmão Fernando, minha cunhada Kamila e o mais novo anjo de nossas vidas, meu sobrinho Tom, como é bom poder compartilhar a existência com vocês! Minha eterna gratidão!

To Professor Ph.D. Mark L. Failla, for receiving me at OSU and offer all your scientific experience and friendship. Also, to Lori for being so supportive and to send the cookies with chocolate chips on cold mornings. Thank you both for everything.

Thanks to the team from Failla's and Bruno's Lab with who I've learned a lot. Especially with Julie, Fabi, Eunice, Elizabeth, Teryn and Yi. In addition, thanks to the friends Kellie, Leanna, Jason, Christine, Bolu, Ayat, Raul and James for embrace me at Columbus, Ohio.

“E quando a ciência entrar em teu coração e a sabedoria for doce em tua alma, pede e te será dado.”

Autor desconhecido

RESUMO

BERNI, P. R. A. **Biodisponibilidade de β -caroteno em mandiocas e batatas-doces biofortificadas**: estudo dos efeitos de genótipos e processamentos. 2014. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A deficiência de vitamina A é um problema global de saúde pública que afeta especialmente crianças com menos de 5 anos, mulheres durante o parto e 1 ano pós-parto e é a principal causa de cegueira evitável em crianças. Biofortificação é uma estratégia que visa reduzir as deficiências de micronutrientes em populações vulneráveis ao redor do mundo através do aumento da concentração de nutrientes nos alimentos básicos. Investigou-se os efeitos de genótipos e estilos de cocção sobre o conteúdo, retenção e biodisponibilidade de β -caroteno (β C) em mandiocas biofortificadas e batatas-doces de polpa laranja (BDPL). Cinco genótipos de mandioca biofortificada, três acessos parentais, e uma mandioca branca foram fornecidos por dois programas de melhoramento. Adicionalmente, foram avaliados dois genótipos de BDPL e duas marcas de alimentos infantis. Tanto as raízes de mandioca quanto de batatas-doces foram analisadas cruas, cozidas em água a 100°C, e fritas em óleo de soja a 180°C após cozimento. Os carotenoides foram extraídos e analisados por HPLC-DAD. A biodisponibilidade foi determinada utilizando a digestão oral, gástrica e duodenal *in vitro* e absorção por culturas celulares Caco-2. Somente o β C foi detectado em todos os genótipos de mandioca, embora os teores tenham variado significativamente dependendo do genótipo. As mandiocas melhoradas continham pelo menos 10 vezes mais β C do que a branca. O cozimento e a fritura foram associados com a perda e isomerização de β C na mandioca bem como na BDPL. Houve interação significativa entre genótipo e processamento nos perfis e teores de β C. Eficiência de micelarização do *trans*- β C nas mandiocas cozidas foi menor do que nas fritas. As mandiocas biofortificadas prontas para consumo podem fornecer até 28% da IDR de retinol. A absorção pelas células Caco-2 do *trans*- β C foi analisada em quatro genótipos. Dois deles não foram afetados pela cocção em relação à absorção celular, no entanto, os outros dois genótipos apresentaram aumento com a fritura. Com relação às batatas-doces, o *trans*- β C foi o principal carotenoide encontrado, embora também tenham sido identificados três isômeros do β C e α -caroteno em quantidades menores. O teor do *trans*- β C em um dos genótipos de BDPL foi duas vezes maior do que nos alimentos infantis. Nos alimentos infantis foi encontrada presença relativa de 13-*cis*- β C maior do que nas BDPLs. A eficiência de micelarização de *trans*- β C das batatas-doces foi considerada baixa, e não teve diferença com os processamentos. A absorção por Caco-2 não foi diferente para os genótipos de BDPL e alimentos infantis investigados. A quantidade intracelular acumulada de *trans*- β C foi proporcional à concentração do material inicial. Em resumo, as culturas biofortificadas estudadas podem aumentar a concentração de β C na dieta. A mandioca frita apresenta mais β C biodisponível do que ela cozida. Tanto o genótipo da mandioca quanto o tipo de processamento influenciam a absorção de *trans*- β C. Por outro lado, não foram encontradas evidências de que a redução de partículas, utilizada no alimento infantil, ofereça maior biodisponibilidade de β C das BDPLs.

Palavras-chave: Estabilidade de carotenoides. Vitamina A. Biofortificação. Cultura celular. Células Caco-2. Hipovitaminose A.

ABSTRACT

BERNI, P. R. A. ***In vitro* bioavailability of β -carotene from cassava and sweet-potatoes biofortified in Brazil**: study of the effects of genotypes and processing. 2014. 110 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Vitamin A deficiency is a world public health problem that affects especially infants, children less than 5 years of age, women during birthing and 1 year post-partum and is the primary cause of avoidable blindness in children. Biofortification is a strategy aimed at decreasing global micronutrient deficiencies in vulnerable populations by increasing the nutrient density in staple food crops. It was investigated the effects of genotype and cooking styles on the content, retention and bioavailability of β -carotene (β C) in biofortified cassava and orange fleshed sweet-potatoes (OFSP). Five genotypes of biofortified cassava, three parental accessions, and one white cassava were provided by two different breeding programs. Additionally, two genotypes of OFSP and two brands of high processed baby foods were evaluated. Both cassava and OFSP roots were analyzed raw, after boiling in water at 100°C only or after subsequent frying in soybean oil at 180°C. Carotenoids were extracted and analyzed by HPLC-DAD. Bioavailability was assessed using an *in vitro* oral, gastric and small intestinal digestion coupled with the Caco-2 human intestinal cell model. Only β C was detected in all tested genotypes of cassava root, although its content varied markedly depending on genotype. Biofortified genotypes contained at least 10-fold higher β C than the white variety. Boiling and frying were associated with loss and isomerization of β C in cassava as well as OFSP. There was an interaction of genotype and cooking style on profile of β C contents. Efficiency of micellarization of *trans*- β C in boiled cassava was lower than in fried. Biofortified cassava ready to eat can provide up to 28% of the IDR of retinol. Uptake of *trans*- β C in micelles generated during digestion by Caco-2 cells was analyzed for the four of the five biofortified genotypes. Cell uptake of β C from two genotypes were not affected by processing, however the other two genotypes had increased with frying. Regarding sweet-potatoes, *trans*- β C was the major carotenoid found, although it was identified three β C isomers and α -carotene in minimal quantities. The concentration of *trans*- β C in one genotype of OFSP was two times higher than baby foods and the other genotype. Baby foods had relative presence of the 13-*cis*- β C higher than in the OFSP. Efficiency of micellarization of *trans*- β C from cooked OFSP or Baby foods was considered low, and had no statistic differences between boiling and frying. The Caco-2 cells uptake were not different for the genotypes and baby foods investigated. The absolute amount of accumulated *trans*- β C intracellular was proportional to the concentration of the starting material. In summary, biofortified crops can increase β C contents in diet. Fried cassava presents more bioavailable β C than boiled. Cassava genotype and cooking style may influence uptake of *trans*- β C by absorptive intestinal cells. In contrast, there is no evidence that high processed OFSP has more bioavailability of β C than homemade boiled or fried OFSP.

Keywords: Stability of carotenoids. Vitamin A. Biofortification. Cell culture. Caco-2 cells. Hypovitaminosis A.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Redução da deficiência de vitamina A: um desafio do século XXI	17
2.2 Os carotenoides e sua atividade de vitamina A	19
2.3 As estratégias de biofortificação dos alimentos	23
2.4 Mandioca e batata-doce biofortificadas	26
2.5 Estabilidade e biodisponibilidade dos carotenoides nos alimentos	29
2.6 Métodos de avaliação da biodisponibilidade	36
2.7 Biodisponibilidade pelo modelo de digestão <i>in vitro</i> e absorção por células Caco-2	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Materiais	43
3.2 Delineamento experimental: genótipos e processamentos	43
3.3 Análises de teor de lipídeos e umidade	49
3.4 Extração dos carotenoides	50
3.5 Análise dos carotenoides por cromatografia líquida	51
3.6 Cálculo da retenção dos carotenoides	51
3.7 Simulação <i>in vitro</i> da digestão oral, gástrica e intestinal	52
3.8 Cultivo das células humanas de linhagem Caco-2	53
3.9 Absorção dos carotenoides pelas células Caco-2	54
3.10 Análise estatística dos resultados	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Mandioca	57
4.1.1 Perfil de carotenoides nas mandiocas	60
4.1.2 Estabilidade, retenção e atividade de vitamina A	65
4.1.3 Biodisponibilidade dos carotenoides por digestão <i>in vitro</i>	72
4.1.4 Absorção dos carotenoides pelas células Caco-2	80
4.2 Batata-Doce	85
4.2.1 Carotenoides em batatas-doces <i>in natura</i> e processadas	85
4.2.2 Biodisponibilidade de carotenoides em batatas-doces processadas	88
4.2.3 Absorção por células Caco-2 de carotenoides das batatas-doces processadas.....	91
5 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICES	107

1 INTRODUÇÃO

Superar a fome que afeta 842 milhões de pessoas ao redor do mundo (FAO, 2013a) permanece como um dos mais difíceis e importantes desafios do século XXI. A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2009) estima que pelo menos um terço das crianças em idade pré-escolar sejam afetadas pela deficiência de vitamina A (DVA) crônica (com sintomas clínicos) ou marginal (subclínica). A DVA é a principal causa de cegueira em crianças e também aumenta a incidência de morbidades e mortalidade em gestantes, puérperas, recém-nascidos e crianças menores de 5 anos. Portanto, a deficiência de vitamina A é um grave problema mundial de saúde pública que tem consequências para a sobrevivência e a saúde que poderiam ser evitados com uma alimentação que suprisse a Ingestão Diária Recomendada (IDR).

No Brasil há elevada prevalência da DVA na região Nordeste e também nas áreas com os menores índices de desenvolvimento humano (IDH) do país. Na região Sudeste, ocorre em bolsões de pobreza nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo e também nas mesorregiões dos Vales do Ribeira e do Jequitinhonha (RAMALHO, 2011). A base da dieta destas populações não possui quantidades suficientes de pró-vitamina A para satisfazer as necessidades diárias.

Neste contexto, a biofortificação apresenta-se como uma recente tecnologia com potencial de redução da carência nutricional de vitamina A de forma eficiente e complementar às medidas já adotadas. Apresenta maior possibilidade de ser acessível à população de baixa renda, assim como à população rural e demais grupos de risco. Além de promover resultados em longo prazo, quando os alimentos biofortificados forem amplamente cultivados. Seu diferencial está na inserção dos nutrientes diretamente nos vegetais através do melhoramento genético tradicional ou transgenia. No caso dos alimentos biofortificados para redução da DVA, busca-se aumentar os teores de carotenoides pró vitamínicos A nas culturas alimentares básicas. Para que sejam alcançados os efeitos desejados é necessário considerar o tipo e a concentração dos carotenoides nos alimentos biofortificados, e também os fatores relacionados à sua biodisponibilidade e aos efeitos dos processamentos utilizados.

Dentre os alimentos escolhidos para biofortificação com carotenoides no Brasil, estão a mandioca e a batata-doce. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas mais importantes na alimentação humana dos trópicos, principalmente para as populações de baixa renda. Por razões étnicas e históricas ela é bastante presente na alimentação dos brasileiros e, portanto, muito importante também do ponto de vista cultural e econômico (MEZETTE, 2007). A batata-doce (*Ipomea Batatas* Lam) é uma rica fonte de energia, fibras, minerais e vitaminas e possui grande potencial para biofortificação devido aos genótipos encontrados que produzem

naturalmente carotenoides. O Brasil é o maior produtor de batata-doce da América Latina, e cerca de 90% da produção mundial provém de países em desenvolvimento (DONADO-PESTANA, 2011). Genótipos de mandioca e batata-doce produzidos no Brasil foram estudados neste trabalho.

Desta forma, esta pesquisa pretende contribuir com os programas de biofortificação. Pretende também produzir conhecimentos sobre os fatores que influenciam a biodisponibilidade dos carotenoides e sobre a eficiência dos alimentos biofortificados para a redução da DVA. O objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos dos processamentos e genótipos sobre a estabilidade e a biodisponibilidade dos carotenoides em mandiocas biofortificadas e batatas-doces de polpa laranja submetidas ao cozimento e fritura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Redução da deficiência de vitamina A: um desafio do século XXI

A existência da vitamina A foi descoberta nos alimentos em 1913 por Mc Collum e Davis (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2002), e a descrição dos processos fisiológicos e químicos da visão que incluem a essencialidade do retinol renderam a George Wald o prêmio Nobel de fisiologia e medicina em 1967 (NOBEL FOUNDATION, 2011). A vitamina A possui diversas funções fisiológicas, pois os seus metabólitos são essenciais para aos ciclos bioquímicos da visão, sistema imunológico, diferenciação e proliferação celular, integridade dos tecidos epiteliais, reprodução, crescimento e saúde óssea (KOHLMEIER, 2003). Dentre suas mais conhecidas e estudadas funções está a participação no ciclo visual. Age no crescimento e desenvolvimento da criança por diversas formas, por exemplo, atuando na secreção noturna de hormônio de crescimento. Integra diferentes ciclos metabólicos na manutenção do sistema imunológico e na prevenção e recuperação de doenças infecciosas. É de fundamental importância para a expressão gênica e desenvolvimento do embrião e feto na gestação (RAMALHO; SAUNDERS; PADILHA, 2009). Pode atuar também como potente antioxidante, pois neutraliza radicais livres protegendo o organismo contra o estresse oxidativo. (LPI, 2012; KOHLMEIER, 2003).

Há mais de um século que esta vitamina foi descoberta e até os dias atuais a deficiência de vitamina A (DVA) permanece um desafio à segurança alimentar e nutricional. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a carência de vitamina A é a principal causa de cegueira evitável em crianças e maior contribuinte para a morbidade e mortalidade por infecções em crianças e gestantes (OMS, 2009; FAO, 2013a). Estima-se que um terço da população mundial esteja em risco de desenvolver sintomas clínicos por causa da DVA. Dados da OMS (2009) apontam que nas áreas de maior prevalência 9,75 milhões de gestantes apresentam sinais de cegueira noturna e 19,1 milhões estão com baixos níveis séricos de retinol, além de 190 milhões de crianças em idade pré-escolar que também apresentam baixos níveis séricos de retinol (OMS, 2009).

A DVA é considerada um problema grave ao grupo de risco materno-infantil. Este grupo de risco é determinado pela condição fisiológica de extrema demanda nutricional em gestantes, puerperais e nutrizes e o rápido crescimento e desenvolvimento em recém-nascidos e crianças em idade pré-escolar. A DVA pode ser responsável direta ou indiretamente por cegueira noturna, infecções, diarreias, doenças respiratórias e afetar o crescimento e

desenvolvimento cognitivo em crianças (RAMALHO, 2011). Também desempenha papel fundamental na reprodução humana, já que a depleção de vitamina A bloqueia a espermatogonia em homens e pode levar à falha completa da reprodução ou à malformação fetal em mulheres (CLAGET-DAME; KNUTSON, 2011). Portanto a carência da vitamina A, crônica ou marginal, apresenta consequências graves para a saúde pública que poderiam ser evitadas com o provimento dos valores diários recomendados de vitamina A e seus precursores através da dieta (KOHLMEIER, 2003; RAMALHO, 2011).

Dependendo do grau de DVA, os sintomas variam consideravelmente, porém, se considerados conjuntamente, são responsáveis por uma grande carga global de doenças, direta ou indiretamente. A consequência mais direta e frequente da DVA é a xerofthalmia (cegueira noturna) devido à sua fundamental importância no ciclo da visão. Quando a DVA ocorre por tempo prolongado e com grande severidade pode afetar diversos sistemas orgânicos como o gastrointestinal, renal, reprodutor, imunológico e musculoesquelético, podendo prejudicar o crescimento e o desenvolvimento, aumentar o risco de abortos, e causar anemia. A vitamina A e os carotenoides também são fundamentais para as funções imunológicas e, por isso, sua baixa ingestão pode aumentar a prevalência de doenças infecciosas, como infecções do trato respiratório e da mucosa intestinal, infecções durante a gestação e no período pós-parto (SHERWIN et al., 2012). O consumo de carotenoides também é associado à redução de risco de doenças degenerativas, por sua ação antioxidante, anti-inflamatória, de modulação gênica e redução de danos ao DNA (AZQUETA; COLLINS, 2012; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012).

A DVA ocorre em todas as regiões do Brasil e é decorrente de uma dieta ineficiente em suprir a ingestão adequada de vitamina A. Por exemplo, a dieta tradicional do Nordeste brasileiro, baseada em arroz, feijão e mandioca, é extremamente pobre em pró-vitamina A (RAMALHO, 2011). Embora somente a Região Nordeste e a do Vale do Jequitinhonha sejam prioritárias para a suplementação com vitamina A, estudos vêm documentando elevadas prevalências na região Sudeste, como nas cidades de Rio de Janeiro e São Paulo (RAMALHO; SAUNDERS; PADILHA, 2009). A carência de vitamina A na alimentação está associada tanto às situações de extrema pobreza quanto às questões culturais, hábitos, tabus e restrições alimentares, portanto não somente relacionada com a condição socioeconômica das populações como se pensava (RAMALHO, 2011).

2.2 Os carotenoides e sua atividade de vitamina A

Com relação à atividade de vitamina A, tanto o retinol quanto os carotenoides pró-vitamínicos (principalmente o β -caroteno) são reconhecidos como precursores de vitamina A, pois ambos possuem as estruturas químicas necessárias para realizar suas funções fisiológicas (CHAPMAN, 2012). Pró-vitamínicos ou não os carotenoides tem sido muito estudados pelos seus efeitos benéficos à saúde, pois além de ajudarem a reduzir a DVA, a ingestão adequada de carotenoides é associada à redução de doenças cardiovasculares, câncer, degeneração macular, catarata e doenças degenerativas. Por todas as suas funções e benefícios à saúde, a ingestão adequada de carotenoides pode ser considerada indicativo de hábitos alimentares saudáveis (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008). Com uma alimentação que suprisse a ingestão diária recomendada (IDR) de vitamina A, e inserisse na dieta maior quantidade de carotenoides, facilmente seriam evitadas as consequências para a saúde e sobrevivência das populações atualmente afetadas pela DVA.

Os carotenoides são compostos classificados no grupo dos terpenóides. Estas substâncias são produzidas no metabolismo secundário das plantas e possuem inúmeras funções biológicas. A estrutura básica tetra-terpenóide (C_{40}) com duplas ligações conjugadas dos carotenoides é que lhe proporciona propriedades cromóforas e funções biológicas tão valorizadas. Estes compostos são encontrados principalmente na forma toda *trans*, mais estável, e também em conformações *cis*. De modo geral, os carotenoides têm ampla distribuição na natureza, estruturas químicas diversas e funções variadas, que os fazem serem estudados tão intensamente (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008).

Alguns carotenoides que são encontrados em alimentos podem ser convertidos em vitamina A, dependendo de sua estrutura química. Eles são chamados de provitamina A. Além desta ação, os carotenoides também apresentam função antioxidante e promovem o sistema imunológico, principalmente os que não se convertem em retinol. Na Figura 1, encontram-se as estruturas dos carotenoides de maior importância na alimentação humana e sua capacidade de conversão em vitamina A.

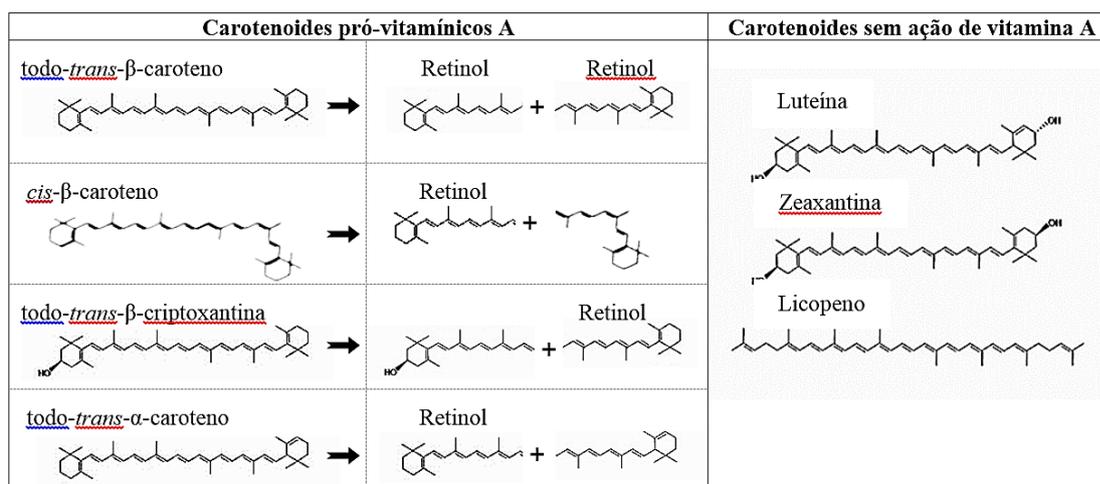


Figura 1 – Estrutura química dos carotenoides encontrados com maior frequência em vegetais, e a bioconversão em retinol pela ação das enzimas β-caroteno 15,15'-oxygenase (BCO1) e β-caroteno 9'10'-oxygenase (BCO2). (Adaptado de: Fernández-García et al. (2012); Harrison (2012) e Rodriguez-Amaya (2001; 2010)

Para ter ação de vitamina A é necessário que os carotenoides contenham pelo menos um anel de conformação β-ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos. O β-caroteno, o α-caroteno e a β-criptoxantina, por possuírem esta estrutura, são considerados pró-vitâmicos A. Basicamente, a estrutura da vitamina A (retinol) é a metade da molécula do β-caroteno, com uma molécula de água adicionada no final da cadeia poliênica. Atribui-se ao *todo-trans-β-caroteno* (*trans-βC*) o maior potencial pró-vitâmico, com 100% de atividade, pois somente ele pode formar duas moléculas de *todo-trans-retinol* após metabolização. Os outros provitamínicos A mais comuns (α-caroteno, *cis-β-caroteno* e β-criptoxantina) tem cerca de 50% de atividade, pois formam apenas uma molécula de retinol (Figura 1). A luteína, zeaxantina e licopeno não possuem atividade de vitamina A, mas atuam como compostos bioativos (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008; KOHLMEIER, 2003; HARRISON, 2012; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Apesar de serem conhecidos aproximadamente 700 carotenoides a maior parte deles não são encontrados nos alimentos integrantes das dietas alimentares. Destes, apenas 40 podem ser absorvidos metabolizados e/ou utilizados pelo corpo humano. Este número reduz para 6 (Figura 1) se forem considerados àqueles encontrados comumente no plasma sanguíneo humano.

Os carotenoides podem ser encontrados nos alimentos de origem vegetal, de coloração que vai de amarelo à vermelho, e também em folhas de cor verde escura, visto que a presença de clorofila mascaram os carotenoides. Também podem ser encontrados em óleos vegetais, manteigas, queijos, ovos e nos alimentos industrializados derivados destas fontes. A vasta

presença destes carotenoides em frutas, legumes e verduras (FLVs), que deveriam ocupar uma parte importante da dieta, fazem destes alimentos a mais importante fonte de provitamina A para o ser humano (FERNANDEZ-GARCÍA et al., 2012; AMBRÓSIO et al., 2006).

Segundo Weber e Grune (2012), cenoura, abóbora, batata-doce de polpa laranja, brócolis e couve são reconhecidas fontes de β -caroteno. Frutas cítricas, como as laranjas e tangerinas, são ricas em β -criptoxantina. Na Tabela Brasileira de Composição de Carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008) são listadas fontes riquíssimas de β -caroteno algumas frutas brasileiras como o buriti, tucumã, fruto da pupunha, bacuri, fruto da palma e o pequi.

Surpreendentemente, mesmo com a vasta ocorrência de carotenoides nos vegetais, a ingestão brasileira é insatisfatória. Os hábitos alimentares dos indivíduos incluem FLVs em pouca quantidade e diversidade, e, portanto, não fornecem quantidades suficientes de carotenoides provitamínicos para satisfazerem as necessidades diárias (FAILLA et al., 2012; HIRSCHI, 2009). Para as comunidades com baixo IDH a alimentação é baseada em alimentos calóricos, de baixo custo ou de fácil cultivo. A dieta é composta em sua maioria por arroz, feijão, trigo, mandioca, milho, carnes, e os derivados desses produtos, que não fornecem os pró-vitamínicos A em quantidades adequadas. Associada à esta problemática está a questão do acesso limitado aos alimentos fontes de carotenoides que afeta as populações mais vulneráveis.

A metabolização do β -caroteno de alimentos vegetais é a principal fonte de vitamina A para a maioria dos indivíduos nos países em desenvolvimento. Ainda que em países industrializados, com grande oferta de produtos cárneos e produtos enriquecidos com vitamina A, estima-se que os carotenoides contribuem com 35% do provimento de retinol da dieta (WEBER; GRUNE, 2012). Deste modo, não é possível atingir os níveis vitamina A necessários unicamente a partir do retinol presente nos alimentos. Por este motivo os carotenoides são tão importantes para a saúde pública das populações.

No Brasil, a ingestão de carotenoides é insuficiente em toda a sua população, principalmente nas faixas de baixa renda e entre os moradores da zona rural. Em estudo realizado por Amâncio e Silva (2012) com dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008-2009 foi constatado que no Brasil a ingestão média *per capita* de carotenoides ficou aquém dos valores de ingestão considerados seguros. Este fato foi percebido em todas as variáveis estudadas, como os níveis de rendimentos, escolaridade e cor/etnia, e em todas as regiões do Brasil. Esta situação é preocupante do ponto de vista da saúde pública, haja visto que a ingestão de carotenoides é considerada como indicadora de alimentação saudável, uma vez que estão presentes predominantemente em frutas, legumes e verduras.

Nos vegetais os carotenoides estão, geralmente, emulsionados na fração lipídica, devido à sua característica hidrofóbica (FAULKS; SOUTHON, 2005). São localizados nas organelas subcelulares, como os cloroplastos e cromoplastos, conseqüentemente protegidos pelas paredes celulares (SCHIEBER; CARLE, 2005). A interação dos carotenoides com os compostos da matriz alimentar na qual se insere interfere positiva ou negativamente na eficiência destes alimentos em prover os carotenoides para o corpo. Geralmente a biodisponibilidade de carotenoides em alimentos vegetais é muito baixa, são absorvidos em média 10% do total ingerido (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). Estes e muitos outros fatores relacionados à matriz alimentar e aos tipos de processamento são fundamentais para compreender o papel dos carotenoides na alimentação humana e serão discutidos mais adiante.

Os carotenoides possuem também importância tecnológica para a indústria de alimentos, uma vez que são pigmentos de tonalidades amarela, laranja e vermelha aos produtos, sendo este fator um dos atributos que mais influencia na aceitação pelos consumidores (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008). Em países nos quais a ciência e tecnologia de alimentos e os sistemas de distribuição de alimentos estão avançados, as estratégias de fortificação de alimentos produzem bons resultados, tanto econômicos quanto de melhoria da saúde pública. Além de ser uma forma segura, a suplementação alimentar pode ser utilizada para toda a população ou direcionada a grupos específicos, como por exemplo, alimentos direcionados à lactentes (RAMALHO, 2011).

Em síntese, os carotenoides nos alimentos possuem a propriedade de reduzir a incidência da DVA nas populações, principalmente as mais vulneráveis. Nas situações em que a indústria pode disponibilizar produtos alimentícios fortificados com carotenoides ou retinol, os resultados são positivos. A suplementação direta com carotenoides ou retinol, por exemplo, durante a gravidez, é outra forma de ação também positiva, porém imediata e pontual. Entretanto, são necessárias outras formas de inserir os carotenoides na alimentação das famílias que carecem desta substância. Prover de forma contínua e sustentável o adequado aporte de carotenoides às comunidades da zona rural, às regiões de baixo IDH e aos grupos vulneráveis específicos são desafios que a biofortificação se propõe a solucionar.

2.3 As estratégias de biofortificação dos alimentos

A biofortificação surge num contexto em que as medidas adotadas para reduzir o risco de carência de vitamina A, geralmente a fortificação de alimentos industrializados e a suplementação medicamentosa por via injetável ou oral, são insuficientes ou inviáveis. Assim a biofortificação é uma tecnologia com potencial de redução da DVA de forma mais eficiente, de maior alcance e complementar às medidas já adotadas. Apesar de não haver definição estabelecida, pode-se dizer que a biofortificação é o processo pelo qual os micronutrientes essenciais são introduzidos diretamente no cultivo dos alimentos básicos. Seu objetivo é aumentar os níveis de micronutrientes específicos combinando técnicas de melhoramento clássico, por cruzamento, fertilização, ou técnicas de transgenia (HIRSCHI, 2009).

Apesar do melhoramento genético de alimentos ser utilizado para fins nutricionais já há algum tempo (SILVEIRA, 2012; VILELA et al., 1985; YE et al., 2000) o empenho global em utilizar esta técnica de forma integrada e abrangente é recente. Existe grande esforço mundial em produzir culturas com altas concentrações de nutrientes essenciais (BAI et al., 2011). A partir de 2002, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) passou a priorizar seu projeto de melhoramento nutricional em alimentos, agora nomeado Biofortificação. Em 2004 o grupo lançou oficialmente o programa *HarvestPlus*, uma rede internacional de pesquisadores para atuarem na biofortificação. Em 2005, a Fundação *Bill e Melinda Gates Foundation* passou a financiar parte dos projetos com o objetivo de desenvolver culturas alimentares básicas com altos índices de nutrientes, principalmente a mandioca, muito consumida na região da África Subsaariana. No Brasil, um amplo programa de biofortificação é coordenado pela Embrapa e constitui-se de uma ampla rede nacional de instituições chamada Biofort (CGIAR, 2012; HIRSCHI, 2009; SAYRE et al., 2011).

A estratégia de biofortificação apresenta maior possibilidade de ser acessível à população de baixa renda, assim como a população rural e demais grupos de risco. O ponto forte da biofortificação é a sua possibilidade de se tornar autossustentável, após a ampla adoção dos cultivares pelos produtores e consumidores. Desta forma, poderá promover resultados em longo prazo, quando os alimentos biofortificados forem amplamente cultivados.

Os alimentos melhorados convencionalmente têm potencial para serem culturalmente bem aceitos e apresentarem diversas possibilidades de consumo ou utilização como matéria-prima para produtos tradicionais. Desse modo, a biofortificação com provitamina A é uma estratégia inovadora que pode ser uma importante ferramenta na redução da DVA, com a maior vantagem de não modificar os hábitos alimentares e culturais de produtores e consumidores

(BAI et al., 2011; WELCH; GRAHAM, 2004). Para Zancul (2004), a introdução da biofortificação pode representar um novo e importante papel na redução da deficiência de micronutrientes no mundo.

Alguns fatores precisam ser considerados para se estabelecer um programa de melhoramento da qualidade nutricional dos alimentos. A produtividade deve ser mantida ou aumentada para atender as expectativas dos produtores. Os nutrientes dos cultivos melhorados precisam ser estáveis às condições ambientais. Os teores destes nutrientes devem melhorar a saúde humana de forma significativa. Os nutrientes precisam ter alta biodisponibilidade para os seres humanos em condições tradicionais de preparo do alimento. Os alimentos biofortificados precisam ter boa aceitação do consumidor, com relação à aparência, sabor e textura (MEZETTE et al., 2009; ZANCUL, 2004; WELCH; GRAHAM, 2004).

Existe, ainda, o tema do uso da transgenia para o melhoramento, que apesar de eficaz, gera resistência da população em adotar os cultivares transgênicos. Além disso, existem questões relacionadas à biossegurança dos ecossistemas nos quais estes alimentos são inseridos (NESTEL et al., 2006). Portanto, a prioridade é a utilização do melhoramento convencional, por cruzamento, que é a técnica utilizada para fins de biofortificação no Brasil (FAO, 2013b).

Vale ressaltar que a fim de alcançar o efeito desejado, é necessário considerar a quantidade do alimento consumida, a concentração da vitamina nele contida, os efeitos dos processamentos utilizados, e os fatores de biodisponibilidade e bioconversão do nutriente (AMBRÓSIO et al., 2006; RAMALHO, 2011). Portanto, para estimular o cultivo dos alimentos biofortificados eles precisam ter altos teores de carotenoides, apresentar boa atividade vitamínica e biodisponibilidade do nutriente. Justifica-se então estudos detalhados das formas químicas dos carotenóides nos alimentos melhorados e os efeitos de processamento sobre os mesmos, além da compreensão dos fatores do metabolismo que os convertem em retinol (BALL, 2006).

A questão da biodisponibilidade merece atenção especial, pois é afetada de várias formas. A biodisponibilidade de carotenoides em alimentos naturais é geralmente muito baixa e limitada por diversos fatores, como o grau de processamento e a composição da matriz alimentar (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). Há indícios de que o nível de homogeneização do alimento e o tratamento térmico pode ter efeito positivo na biodisponibilidade (VAN BUGGENHOUT et al., 2010). Em relação à composição do alimento, podem influenciar a biodisponibilidade da provitamina A: a presença de fibras alimentares, outros carotenoides não pró-vitamínicos, e o teor de lipídeos. As características da interação dos carotenoides com a matriz alimentar serão detalhadas adiante no item 2.5.

No que diz respeito à forma de preparo, pode-se dizer que a cocção, a fritura, o vapor, e processamentos industriais também podem influenciar significativamente a estabilidade dos carotenoides (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). Os procedimentos de preparo dos alimentos podem ocasionar perdas, degradação e alterações químicas dos carotenoides. Tais efeitos podem ser mensurados pela retenção dos carotenoides. Esta medida, em porcentagem, refere-se justamente à estabilidade dos carotenoides e pode ser calculada pela diferença dos teores de carotenoides no alimento cru e preparado (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Os fatores citados, que também serão apresentadas no item 2.5, irão interferir na eficiência e eficácia do alimento biofortificado em reduzir a DVA.

Dentre os alimentos de origem brasileira em estudo para biofortificação com altos teores de carotenoides (mandioca, milho, batata-doce e abóbora), a mais pesquisada e desenvolvida é a mandioca de mesa. Foram conseguidos cultivares com teores de β -caroteno de 9-12 $\mu\text{g/g}$ na mandioca cozida (MEZETTE, 2007; MEZETTE et al., 2009). O próximo passo é estudar a composição da matriz alimentar destes cultivares melhorados, além de avaliar o efeito dos processamentos que são tradicionalmente utilizados. Visto que o objetivo foi favorecer o aporte de vitamina A através dos carotenoides da mandioca é importante compreender em quais formas e concentrações estes carotenoides se encontram, qual a biodisponibilidade destes carotenoides e quais os processamentos mais adequados para o consumo.

A proposta da biofortificação da mandioca é conseguir, através do melhoramento genético, que este alimento, tão difundido na dieta da população brasileira, se torne uma importante fonte de β -caroteno e conseqüentemente de vitamina A. Esta proposta é muito interessante pela possibilidade da manutenção autossustentável deste sistema. Visto que, depois que os cultivares biofortificados forem adotados pelos produtores não serão mais necessários gastos com fiscalização e manutenção do processo, como ocorre com a fortificação tradicional.

Com o mesmo objetivo, a batata-doce também está em processo de melhoramento nutricional para aumento do teor de β -caroteno. Ela é uma rica fonte de energia, fibras, minerais e vitaminas e possui grande potencial para biofortificação devido aos genótipos encontrados que produzem naturalmente carotenoides (WOOLFE, 1992). Para tanto, acessos de batata-doce de polpa alaranjada foram selecionados em bancos de germoplasma para o cruzamento e obtenção de cultivares melhorados. Ao mesmo tempo é preciso selecionar genótipos que tenham um bom desempenho agrícola, econômico e aceitação pelos consumidores brasileiros. O genótipo Beauregard utilizado como parental é naturalmente rico em β -caroteno e muito

difundido nos EUA (ROLSTON et al., 1987). Este poderá ser cruzado com genótipos brasileiros em busca de novas variedades mais adaptadas e ricas nutricionalmente.

2.4 Mandioca e batata-doce biofortificadas

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas mais importantes na alimentação humana dos trópicos, principalmente para as populações de baixa renda. A biofortificação da mandioca é potencialmente interessante no caso do Brasil, pois ela integra o cardápio em todas as regiões, desde o período pré-colonial até os dias atuais (VIEIRA et al., 2011; MEZETTE, 2007). Dentre os alimentos em estudo para melhoramento com provitamina A, a mandioca é mais adquirida pelas famílias brasileiras. Segundo dados da mais recente Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008-2009 (IBGE, 2010) a aquisição domiciliar *per capita* anual de mandioca, abóbora e batata doce foi 1,766 Kg, 1,187 kg, 0,639 kg, respectivamente. Estima-se que, caso a mandioca biofortificada substitua as variedades comuns na região nordeste do país, será possível aumentar a ingestão de β C das famílias da zona rural de 1% para 16,4% dos valores diários recomendados (BERNI; AMÂNCIO; CANNIATTI-BRAZACA, 2012).

Existe grande biodiversidade de mandioca no Brasil, pelo fato de este vegetal ser originário da região centro-oeste brasileira (MEZETTE, 2012). Os bancos de germoplasma do país possuem enorme quantidade de acessos oriundos de diversas regiões brasileiras, muitos deles ainda pouco conhecidos e contendo naturalmente compostos bioativos, como os carotenoides. Mezette, Blumer e Veasey (2013) encontraram acessos da região amazônica apresentando naturalmente teores de β C próximos de 20 μ g/g MF. É possível encontrar raízes de mandioca nas cores branca, creme, amarela, laranja, vermelha e até roxas, dependendo dos pigmentos que elas possuem. A presença destes pigmentos faz delas um alimento com grande potencial para biofortificação. Nas variedades comerciais é encontrado majoritariamente β -caroteno e, em certa proporção os seus isômeros, o mesmo tem sido observado nas variedades melhoradas. Isso pode ser positivo, pois o β -caroteno tem maior atividade de vitamina A e a presença de xantofilas pode reduzir a sua biodisponibilidade (MEZETTE, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

A mandioca apresenta potencial genético para ser fonte de carotenoides, em especial de β -caroteno, pois está presente em genótipos com raízes de coloração amarela. Uma vez que existe correlação positiva entre a intensidade da coloração amarela das raízes e os teores de

carotenoides, o melhoramento pode ser feito cruzando genótipos de cor amarelada (VIEIRA et al., 2011). Neste sentido, Mezette et al. (2009) selecionaram clones de mandioca de mesa melhorados, por cruzamento, para boas características agronômicas, tecnológicas e nutricionais. Os referidos autores conseguiram variedades com altos teores de β -caroteno, alta produtividade, resistência à bacteriose e apresenta cor amarelo intenso quando cozida, porém o perfil e biodisponibilidade dos carotenoides não haviam sido estudados, até o momento.

A Embrapa coordena uma rede nacional de pesquisadores com intuito de produzir variedades de mandiocas biofortificadas com β C. Neste caso, o melhoramento convencional é feito não apenas dentro das instituições de pesquisa, mas também em parcerias com os produtores das regiões vulneráveis. Esta forma de atuar vem gerando genótipos produtivos, bem adaptados às condições da região e altamente aceitos. Intervenções, com os genótipos biofortificados, unindo produtores e escolas públicas, foram realizadas nos estados de Sergipe, Maranhão e Minas Gerais. Os resultados demonstraram alta produtividade e boa aceitação dos genótipos em relação às variedades tradicionais (NETO et al., 2009; SILVA et al., 2009; CURADO et al., 2009). Estes resultados preliminares motivaram o aumento de esforços no contínuo melhoramento da mandioca com objetivos nutricionais. No entanto, estudos comparativos com relação aos efeitos das diferenças genotípicas e dos procedimentos de preparo tradicionais sobre a retenção e biodisponibilidade dos carotenoides, está ainda no início.

No Estado de São Paulo, o padrão comercial é o da variedade 576-70, que atende praticamente a 100% dos mercados de comercialização *in natura* e de congelados, aproximadamente 130 mil toneladas anuais (MEZETTE et al., 2009; LORENZI; VALLE, 2002). Em 2011, o IAC lançou o clone de mandioca de mesa com alto teor de carotenoides, o 06-01. Este clone apresenta mais do que o triplo do teor de carotenoide do cultivar 576-70. Além disso, possui alta produtividade e resistência à bacteriose e apresenta intensa cor amarela quando cozida (SILVEIRA, 2012). Este clone é a segunda geração da variedade 576-70 com o qual foi possível atingir até 10 μ g/g de β -caroteno (SILVEIRA, 2012).

No Brasil, somente duas variedade foram lançadas, a 06-01 e a Jari, mas ainda não estão sendo produzidas comercialmente, pois faltam estudos sobre a eficácia da biofortificação deste alimento. Outros genótipos estão em estudo para posterior comercialização. É possível obter variedades com características nutricionais, agronômicas e tecnológicas ainda melhores. Desta forma, os estudos do perfil de carotenoides em variedades de mandioca e os efeitos de processamentos vêm contribuir com os programas de biofortificação. Pode fornecer dados importantes para seleção dos clones e indicar as interações entre os nutrientes que podem reduzir a biodisponibilidade da provitamina A.

Pesquisas recentes estão estudando a biodisponibilidade de carotenoides em cultivares de mandioca biofortificadas, avaliando o efeito dos processamentos tradicionais e desenvolvendo novos produtos. Por exemplo, Vimala et al. (2011) avaliaram o efeito de processamentos sobre a retenção de β C (medida de comparação do teor de carotenoides antes e depois do processamento) em variedades de mandioca amarela e constataram que a retenção é diferente de acordo com a variedade, tipo de processamento e o perfil inicial de carotenoides. Thakkar et al. (2007) estudaram 10 genótipos de mandioca amarela colhidas na Nigéria e identificaram que a biodisponibilidade de provitamina A, medida por micelarização e absorção em células Caco-2, é diretamente proporcional ao teor de *trans*- β C.

A batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam) é originária da América central e do sul e hoje é extensivamente cultivada na África, Ásia e Américas. É um cultivo herbáceo perene que se adapta facilmente às diferentes condições climáticas (WOOLFE, 1992). Apesar de ser uma rica fonte de energia, fibras, minerais e vitaminas e possuir grande potencial como fonte de compostos bioativos, a batata-doce é considerada ainda subutilizada (BOVELL-BENJAMIN, 2007). Na região subsaariana, onde há alta prevalência de DVA, a batata-doce é uma das culturas mais importantes, porém os esforços para aproveitamento de suas raízes para redução da fome e desnutrição são apenas recentes (ANDRADE et al., 2012). Como a batata-doce pode ser encontrada em diversas cores, por produzir naturalmente carotenoides e antocianinas (BOVELL-BENJAMIN, 2007), e ser cultivada e consumida principalmente em países em desenvolvimento (ANDRADE et al., 2012), ela tem grande potencial para biofortificação.

A China é o maior produtor mundial com 75% da produção e o Brasil é o maior produtor de batata-doce da América Latina, conseqüentemente cerca de 90% da produção mundial provém de países em desenvolvimento e que são afetados pela DVA (DONADO-PESTANA, 2011). Muitos cultivares de polpa alaranjada possuem alta concentração de β C, de forma que as populações que adotaram estes cultivares tem na batata-doce um dos maiores contribuintes de provitamina A da dieta (BLOCK, 1994). No entanto, os hábitos alimentares em algumas regiões são orientados para o consumo da batata-doce de polpa branca, ou roxa, como é o caso do Brasil. Assim a biofortificação pode atuar incluindo os cultivares de polpa alaranjada nos sistemas alimentares das populações vulneráveis e também melhorar geneticamente a batata-doce em busca de cultivares mais produtivos, adaptados às condições e hábitos brasileiros e com maiores teores de β C. O programa brasileiro Biofort, vem atuando pelas duas formas.

Em 1987, em Louisiana EUA, foi desenvolvido um cultivar altamente produtivo, de polpa laranja intenso, chamado Beauregard (ROLSTON et al., 1987). Este mesmo cultivar foi

adotado em diversos países, incluindo mais recentemente o Brasil justamente com intuito de combater a DVA. Atualmente este é um dos cultivares mais cultivados nos EUA. No Brasil a pesquisa para biofortificação da batata-doce desenvolveu alguns genótipos que estão em estudo para adoção. Dentre os genótipos produzidos estão o CNPH 1007, CNPH 1194, CNPH 1202, CNPH 1205, que apresentaram de 283 a 456 $\mu\text{g/g}$ MF de βC em estudo de Donado-Pestana et al. (2012).

Assim como em outros alimentos, processamentos térmicos tiveram impacto negativo sobre o teor de carotenoides das batatas-doces biofortificadas no Brasil estudadas por Donado-Pestana et al. (2012). Em contrapartida, sabe-se que os processamento podem atuar nas estruturas físico-químicas das matrizes alimentares de forma a facilitar a liberação dos carotenoides e conseqüentemente aumentar a biodisponibilidade. Portanto, há a necessidade de compreender os impactos dos processamentos mais comuns sobre a estabilidade e a biodisponibilidade dos carotenoides nos alimentos biofortificados. Desta forma, será possível que a adoção de cultivares de batata-doce de polpa alaranjada e mandiocas com altos teores de carotenoides visando a redução da DVA seja eficazmente implantada.

2.5 Estabilidade e biodisponibilidade dos carotenoides nos alimentos

O processamento de alimentos ricos em carotenoides pode causar degradação desses compostos reduzindo sua ação de provitamina A. Os carotenoides podem sofrer degradação pela ação de altas temperaturas, baixo pH, enzimas, presença de luz e oxigênio. Esta sensibilidade dos carotenoides é devida às diversas duplas ligações nas suas estruturas químicas (MERCADANTE, 2007). A degradação pode atuar por duas vias principais. A via de conversão das formas *trans* em isômeros *cis* modifica sua atividade bioativa, enquanto que a via de reações de oxidação rompe as estruturas químicas produzindo resíduos de baixo peso molecular, eliminando sua atividade bioativa (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Na Figura 2, pode ser visualizado o possível esquema das vias de degradação dos carotenoides.

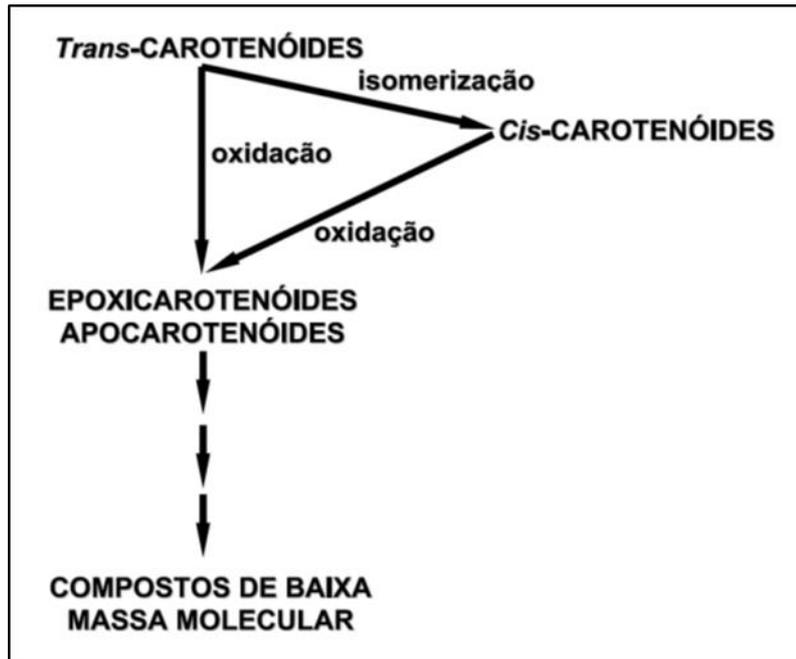


Figura 2 – Possível esquema de degradação dos carotenoides. Fonte: Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfán (2008)

A oxidação pode ocorrer tanto de maneira não-enzimática quanto enzimática é importante destacar que ela sempre ocorre com a presença de oxigênio e é induzida pela ação da temperatura, luz e pH ácido (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008). Nas etapas de pré-preparo, para processamento, cocção ou análises, há a destruição das estruturas celulares dos alimentos com a redução de partícula. É neste momento que inicia-se a degradação dos carotenoides. O rompimento destas estruturas facilita a liberação dos carotenoides e conseqüentemente o contato com enzimas, oxigênio e luz. Tipicamente, a perda por oxidação enzimática ocorre logo após a ruptura das células vegetais, após a qual as concentrações dos carotenoides se estabilizam. A oxidação não enzimática normalmente ocorre algum tempo após, caracterizada por um desaparecimento rápido dos carotenoides, coerente com um mecanismo de radicais livres (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008).

Os efeitos da cocção dos alimentos sobre os carotenoides pode ser visto por três perspectivas: a estabilidade e a retenção dos carotenoides nos alimentos prontos em relação aos crus; as mudanças químicas dos carotenoides como a isomerização, oxidação e rearranjos; efeitos sobre o valor nutricional e bioativo em humanos, por exemplo, a biodisponibilidade e a conversão em vitamina A (MERCADANTE, 2007). No entanto, independentemente da perspectiva abordada, os carotenoides sofrerão ação dos fenômenos intrínsecos aos

processamentos, como a redução de partícula, desidratação, absorção de água, aumento de porosidade entre outros fatores, associados/induzidos com a ação de temperatura, incidência de luz e presença de oxigênio.

Considerando o exposto, precauções devem ser tomadas no sentido de reduzir degradação durante os procedimentos experimentais e analíticos para evitar conclusões equivocadas no estudo de efeitos de processamentos sobre os carotenoides. A compreensão destes fenômenos pode contribuir com a melhor indicação de preparo e uso dos alimentos fontes de carotenoides de forma a aproveitar sua atividade de pro-vitamina A de forma eficiente.

Na natureza, os carotenoides estão protegidos pela estrutura celular e a destruição destas barreiras torna-os automaticamente vulneráveis à degradação. Ironicamente, essas mesmas estruturas se convertem em barreiras que limitam a sua biodisponibilidade (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008). O processamento envolve mudanças na integridade estrutural das matrizes alimentares produzindo dois efeitos antagônicos, por um lado a perda dos carotenoides por isomerização e oxidação, por outro, o aumento da biodisponibilidade.

A palavra biodisponibilidade é originada da junção dos termos e conceitos disponibilidade e biológica (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). Este termo é usado algumas vezes de maneira equivocada, pois envolve diferentes conceitos. A biodisponibilidade, no caso da provitamina A, envolve um conjunto de etapas que inicia com a quebra da matriz alimentar e liberação dos carotenoides, sua incorporação nas micelas emulsionadas na fase aquosa pela ação digestão, movimento das micelas pela fração aquosa até as microvilosidades dos enterócitos intestinais, absorção pelos enterócitos e, por fim, a conversão em retinol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

É possível padronizar o uso da palavra biodisponibilidade para todo o conjunto, visto que em carotenoides pró-vitâmicos A é fundamental a compreensão integrada das estruturas químicas, disponibilidade para absorção, absorção propriamente dita e bioconversão em retinol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). Desta forma, é possível fazer relação entre todos estes fatores e estimar uma bioequivalência, isto é, potencial de ação como retinol expressa em retinol equivalente (RE) (Figura 3). Este é calculado de acordo com a FAO (2001), assumindo que aproximadamente 33% do β C está disponível para absorção e que a conversão em vitamina A é de 50% para o *trans*- β C e de 25% para os *cis*- β C (SCOTT; RODRIGUEZ-AMAYA, 2000). Entenda-se, portanto, por biodisponibilidade todo o processo que engloba estes quatro fatores citados.

Quando as moléculas de carotenoides pró-vitâmicos são convertidas em retinol não acontece conversão de 100% de eficiência, ou seja, a atividade de vitamina A dos carotenoides é menor do que quando é ingerido retinol. Tal fato ocorre devido aos fatores de biodisponibilidade, como a matriz alimentar, as características fisiológicas dos indivíduos, como estado nutricional e o genótipo, e a eficiência na conversão enzimática destes carotenoides em retinol (WEBER; GRUNE, 2012). A eficiência desta bioconversão é conhecida em indivíduos saudáveis, no entanto, o estado fisiológico de um indivíduo com DVA não é o mesmo que em um indivíduo saudável. (SCOTT; RODRIGUEZ-AMAYA, 2000). Foi estabelecida uma relação, chamada de bioeficácia, estudando a eficiência de carotenoides em corrigir a adaptação ao escuro na visão de pessoas com DVA. A partir de vários estudos epidemiológicos, caso-controle, e também em animais, foram determinados valores específicos de bioeficácia para cada carotenoide pró-vitâmico. Foram estes estudos que possibilitaram o estabelecimento desta relação em RE expressa na figura abaixo e utilizada pelo *Dietary Reference Intakes* do *Institute of Medicine* (USDA, 2001).

Forma ingerida	Quant.	Absorção	RE ^a
Vitamina A alimentar	1µg	→ Retinol	→ 1µg Retinol
Suplemento de β-caroteno	2µg	→ β-caroteno	→ 1µg Retinol
β-caroteno alimentar	12µg	→ β-caroteno	→ 1µg Retinol
α-caroteno e β-criptoxantina alimentar	24µg	→ α-caroteno e β-criptoxantina	→ 1µg Retinol

Figura 3 – Fonte, absorção e bioconversão de provitamina A em retinol.
^aRetinol equivalente (RE). Fonte: Adaptado de USDA (2001)

De acordo com Fernández-García et al. (2012), os seres humanos não podem sintetizar carotenoides, mas são capazes de convertê-los em vitamina A, por isso a biodisponibilidade de carotenoides tem sido um fator importante para pesquisas na área de nutrição. Outra questão importante é a fração dos carotenoides absorvidos que serão efetivamente convertidos em retinol. Visto que a biodisponibilidade refere-se à quantidade do nutriente contido nos alimentos que será absorvido e utilizado pelo metabolismo ela se torna um atributo complexo e de difícil avaliação. É necessário então compreender toda a bioquímica envolvida neste processo, considerando a digestão gastrointestinal dos alimentos, a absorção dos carotenoides pelos

enterócitos, a bioconversão em retinol e os fatores de interferência neste processo para desenvolvimento de metodologias adequadas de avaliação da biodisponibilidade.

Primeiramente, na digestão, os carotenoides serão liberados da matriz alimentar (estruturas celulares - cloroplastos, cromoplastos e paredes celulares) pela ação da mastigação, das enzimas digestivas e do peristaltismo. Na primeira etapa a ação física da mastigação e peristaltismo, química do ácido clorídrico do estômago e enzimática da amilase, pepsina e lipases serão fundamentais. Após liberados poderão ser emulsionados na fase lipídica e solubilizados junto com outros compostos lipofílicos (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

Na segunda etapa, no intestino delgado, enzimas pancreáticas e a bile irão agir quimicamente sobre o bolo alimentar. Lipases do lúmen irão produzir gotículas lipídicas, que aumentam a ação das enzimas. Enzimas como a colesterol estearase e a triglicérido lipase pancreática podem converter carotenoides polares esterificados em carotenoides livres. Sais biliares irão formar a micelas lipídicas que tornarão os carotenoides aptos a serem absorvidos pelas células do tecido absorptivo epitelial. Uma vez formadas estas micelas são difundidas através da fase aquosa do quimo até a superfície apical da mucosa intestinal. A absorção dos carotenoides das micelas pelos enterócitos ocorre por difusão passiva. Não são encontrados indícios de que existam proteínas na membrana celular com afinidade específica por carotenoides (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

Nos enterócitos os carotenoides podem ser convertidos em retinol. No caso do β -caroteno, ocorre uma clivagem no centro da molécula, pela enzima β -caroteno monooxigenase 1 – BCO1, e conversão em 2 moléculas de retinol. Pode ocorrer também uma clivagem fora do centro da molécula, pela enzima BCO2, que age também nos outros carotenoides pró-vitamínicos A. Após esta etapa a enzima lecitina:retinol acil transferase – LRAT irá converter o retinol em retinil éster. Estes serão incorporados em quilomicras que estão sendo formadas no complexo de golgi dos enterócitos. As quilomicras uma vez no plasma sanguíneo transportarão a vitamina A para o fígado, onde será utilizada, armazenada e secretada novamente na corrente sanguínea (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). Na Figura 4 encontra-se um modelo que representa um resumo das etapas descritas acima.

Nas etapas da digestão, absorção e conversão dos carotenoides vários fatores físico-químicos e bioquímicos podem interferir no processo. Alguns destes eventos são relacionados à composição alimentar e o perfil dos carotenoides, quantidade da refeição e fatores fisiológicos que afetarão a digestão. Outros eventos são mais relacionados ao estado dos indivíduos, como seu status nutricional, condições fisiológicas e genótipo (WEBER; GRUNE, 2012; FAILLA;

CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). Em relação à composição do alimento podem influenciar: a presença de fibras alimentares, o perfil de carotenoides e o teor de lipídeos (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). Sabe-se também que as formas nas quais os carotenoides estão armazenados dentro das estruturas celulares é fundamental, se associados à proteínas ou emulsionados em lipídeos. (FLESHMAN et al., 2011).

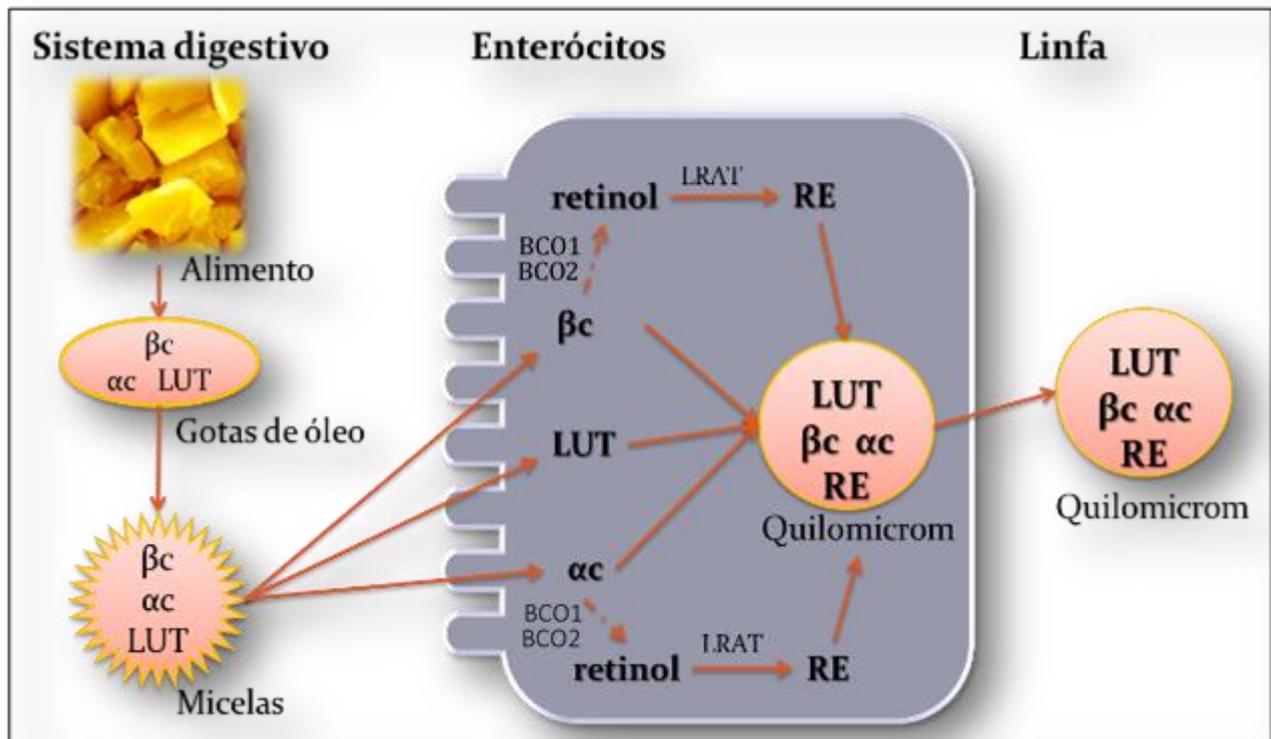


Figura 4 – Esquema resumido da digestão e absorção de carotenoides da dieta. β-caroteno (βc); α-caroteno (αc); β-caroteno 15,15'-oxygenase (BCO1); β-caroteno 9'10'-oxygenase (BCO2); Lecitina:retinol aciltransferase (LRAT); Luteína (LUT); Retinil ester (RE) Fonte: Adaptado de Failla e Chitchumroonchokchai (2005)

A forma de preparo, o cozimento, a fritura, o vapor, ou processamentos industriais podem influenciar significativamente a biodisponibilidade dos carotenoides. Cozimento moderado, preparo de purês e obtenção de sucos são processos que aumentam a biodisponibilidade, pois reduzem o tamanho das partículas, rompem paredes celulares e liberam os carotenoides. Porém estes mesmo processamentos, principalmente se realizados sob temperaturas mais altas, podem degradar os carotenoides ou isomerizá-los das formas trans,

com maior atividade de vitamina A, para formas *cis*, com menores atividades (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

Na Figura 5 são apresentados os fatores conhecidos que afetam a biodisponibilidade de carotenoides. A presença de lipídeos aumenta a solubilização dos carotenoides nas micelas, por outro lado, aumenta o teor energético dos alimentos. As fibras reduzem a ação das enzimas, impedem a liberação dos carotenoides e evita a absorção dos mesmos pelo epitélio intestinal. Os diferentes carotenoides interagem competindo pela incorporação nas micelas, pela absorção celular, pela eficiência da enzima BCO1 e pela incorporação na quilomicra. Os fatores fisiológicos dos indivíduos vão influenciar principalmente quando há depleção nutricional ou a saúde do sistemas gastrointestinal está afetada, por exemplo em infecções. Nestes casos, a adequada digestão e absorção fica comprometida (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

A relação complexa entre processamentos e a biodisponibilidade de carotenoides em alimentos vegetais é desafiadora para cientistas de alimentos, nutricionais e também para os geneticistas de plantas. Segundo Van Buggenhout et al. (2010), para otimizar os processos visando a máxima biodisponibilidade de carotenoides pró-vitamínicos A é necessário primeiramente realizar extenso estudo para compreender as vias pelas quais a matriz alimentar interfere na biodisponibilidade. Aprofundar o conhecimento nos efeitos dos processamentos sobre características microestruturais das paredes celulares das plantas, da deformação e desintegração dos tecidos, nas propriedades reológicas e estruturais dos diversos tipos de alimentos (purês, sopas, molhos, sucos, entre outros) é indispensável (VAN BUGGENHOUT et al., 2010).

Avaliar a biodisponibilidade dos carotenoides é uma tarefa complexa. Modelos *in vivo* e *in vitro* são adotados em diferentes situações, cada qual com suas vantagens e desvantagens. Os modelos *in vitro* estão sendo aprimorados de modo que podem auxiliar nos extensos estudos necessários para compreender as vias pelas quais a matriz alimentar interfere na biodisponibilidade.

Fatores que afetam a biodisponibilidade de carotenoides
<p>Concentração de carotenoides ingerida</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumenta a absorção e aumenta a concentração plasmática de carotenoides e retinol
<p>Características Físico-químicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Perfil dos carotenoides • Estrutura cristalina vs. líquida/lipídeos • Formas <i>trans</i> vs. isômeros <i>cis</i> • Livre vs. esterificados vs. ligados a proteínas
<p>Fonte, matriz e processos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Localização subcelular (cloroplastos vs. cromoplastos) • Folhas vs. Flores/sementes • Tamanho das partículas (purê > picado > folhas/partes inteiras) • Cru vs. alimentos processados
<p>Dieta</p> <ul style="list-style-type: none"> • Quantidade e tipo de lipídeos, proteínas e fibras. • Interações com outros carotenoides
<p>Condições dos indivíduos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Saúde gastrointestinal • Status nutricional • Genótipo

Figura 5 – Fatores que afetam a biodisponibilidade de carotenoides. Fonte: Adaptado de Failla e Chitchumroonchokchai (2005), Weber e Grune (2012)

2.6 Métodos de avaliação da biodisponibilidade

Biodisponibilidade de carotenoides é um bom exemplo de como pouco conhecimento sobre matriz alimentar, complexidade do processo de digestão e diferenças entre indivíduos podem levar á confusão na interpretação de resultados de pesquisas. As diferenças de resultados encontradas acontecem principalmente na dificuldade de escolha de métodos de análise mais precisos, próximos da realidade e com melhor repetitividade. É necessário aprofundar o

conhecimento sobre quatro pontos chave, desafiadores, para melhor compreensão da biodisponibilidade dos carotenoides. Entender os fatores associados à liberação dos carotenoides da matriz alimentar e sua transformação em formas prontas para serem absorvidas. Desvendar toda a bioquímica envolvida na passagem dos carotenoides pelos enterócitos e sua liberação no plasma sanguíneo. Saber como interpretar as respostas das concentrações plasmáticas. Identificar as causas das variações entre indivíduos (FAULKS; SOUTHON, 2005).

Enquanto a escolha de métodos *in vivo* procuram obter resultados mais próximos da realidade, ou seja, dos fenômenos biológicos, o uso de métodos *in vitro* podem avaliar as diferenças dentre os alimentos e os impactos de processamentos. Se os métodos *in vivo* com seres humanos permitem estudar e compreender as causas de diferenças entre indivíduos, não é possível inferir sobre as condições do alimento, justamente devido às variações fisiológicas das pessoas. Em contrapartida, os modelos usados nos métodos *in vitro* são modelos estáticos que não conseguem simular adequadamente o processo de digestão e metabolismo humano. Portanto, é fundamental o estabelecimento de objetivos claros do que se pretende avaliar e também uma análise crítica dos resultados obtidos pelos diferentes métodos. Todas estas questões são fundamentais para não incorrer em afirmativas e interpretações equivocadas.

Estudos *in vivo* utilizando seres humanos são necessários para determinar biodisponibilidade e atividade de vitamina A em populações e também no caso de avaliar o impacto de programas de biofortificação na redução da DVA. Como exemplo, os estudos de balanço de massa e curva de resposta nas concentrações plasmáticas são usados para avaliar a biodisponibilidade e bioconversão de carotenoides como vitamina A. Para avaliar a bioeficácia de programas de intervenção são utilizados métodos que avaliam a eficiência no restauo da cegueira noturna de grupos com DVA crônica (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). Metodologias que usam isótopos estáveis, o ^{13}C no caso, como biomarcadores são utilizadas tanto nos estudos de avaliação de programas de intervenção, como no estudo da dinâmica corporal do metabolismo de vitamina A, já que é possível rastrear os carotenoides marcados (HASKELL; RIBAYA-MERCADO, 2005).

As desvantagens das metodologias *in vivo* estão relacionadas à interpretação correta dos dados, alto custo de instrumentação, trabalho muito intenso, a estabilidade dos carotenoides no sistema digestivo que é pouco conhecida e a interferência dos estoques de vitamina A mantidos pelos organismos. Os estudos realizados com nutrição experimental em animais também são complicados. Foi identificado que ratos e camundongos convertem carotenoides em vitamina A com muito mais eficiência que seres humanos, o que os desqualifica como modelos

apropriados. Bezerros e pequenos primatas já metabolizam vitamina A de forma mais próxima, porém os custos, trabalho e a ética envolvida, dificultam também utilizar estes modelos animais (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). Estes fatores levam a considerar que os estudos *in vivo* são válidos apenas com seres humanos e quando se pretende avaliar programas de intervenção.

Um dos problemas relacionados aos modelos *in vitro* é que todos eles não mimetizam as mudanças contínuas que ocorrem, durante a digestão, nas condições fisiológicas e processos dentro do sistema digestivo, ou seja, estes modelos são estáticos (VAN BUGGENHOUT et al., 2010). Com estes métodos não é possível simular os movimentos do sistema digestivo, o trânsito do quimo na mucosa epitelial, as mudanças nas concentrações das enzimas e da bile em resposta da composição e quantidade dos alimentos. Diferenças entre o organismo humano e um modelo bioquímico simples ou os modelos com cultivo de células chamam a atenção para necessidade de cautela na extrapolação dos dados *in vitro*. No entanto, as metodologias *in vitro*, principalmente a digestão *in vitro* associada à célula Caco-2, são técnicas importantes e úteis na definição de questões chave que mereçam ser aprofundadas em estudos com animais e humanos (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005)

Os custos dos modelos *in vitro* são mais baixos e podem prever rapidamente a biodisponibilidade dos carotenoides. Estes são utilizados para investigar os efeitos da matriz do alimento, efeitos dos processamentos e práticas utilizadas e interação com outros componentes da dieta. Dependendo das questões que se busca responder os modelos *in vitro* são muito mais adequados (VAN BUGGENHOUT et al., 2010).

Na Figura 6 estão apresentados resumidamente os principais modelos, aplicação e problemas associados às técnicas utilizadas para estudar a biodisponibilidade de carotenoides em alimentos.

Modelos	Aplicação e vantagens	Problemas
<i>In vivo</i>		
Animais <ul style="list-style-type: none"> • Amostragem gastrointestinal • Perfusão intestinal • Balanço de massa Humanos <ul style="list-style-type: none"> • Balanço de massa • Resposta plasmática • Isótopos estáveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudos de intervenção e bioeficácia • Aproximado com a realidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Questões Éticas • Alto custo • Gasto de tempo • Variabilidade de resultados
<i>In vitro</i>		
<ul style="list-style-type: none"> • Simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal • Absorção em segmentos de intestino • Digestão <i>in vitro</i> e absorção em células 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudos da biodisponibilidade em diferentes alimentos e processamentos • Permite trabalhar com grande número de amostras e comparações 	<ul style="list-style-type: none"> • Extrapolação de resultados • Modelos estáticos • Proximidade com a realidade

Figura 6 – Métodos de análise da biodisponibilidade de carotenoides *in vivo* e *in vitro*. Fonte: Adaptado de Van Buggenhout et al. (2010), Failla e Chitchumroonchokchai (2005)

2.7 Biodisponibilidade pelo modelo de digestão *in vitro* e absorção por células Caco-2

O método de digestão *in vitro* associada à absorção em células Caco-2 foi recomendado pelo *Harvestplus*, rede mundial de pesquisa, estímulo e desenvolvimento da biofortificação como estratégia de redução da DVA, na monografia técnica *In vitro models as tools for screening the relative bioavailability of provitamin A carotenoids in foods* (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). Neste trabalho estão indicadas as principais e mais confiáveis metodologias para pesquisas com alimentos biofortificados. O método consiste, resumidamente, em realizar a simulação da digestão oral, gástrica e duodenal, fazer a separação da fase aquosa contendo as micelas de carotenoides e aplicar o extrato sobre membranas de cultura de células intestinais humanas da linhagem Caco2 para avaliar a absorção e metabolismo dos carotenoides.

O método de análise da biodisponibilidade por digestão *in vitro* e absorção pelas células Caco-2 permite avaliar a estabilidade à digestão dos carotenoides e sua acessibilidade, verificar e quantificar a absorção pelos enterócitos e, parcialmente, o metabolismo. Esta técnica foi desenvolvida e testada primeiramente por Garrett, Failla e Sarama (1999). Os autores concluíram que ela é boa alternativa aos estudos com animais e humanos, pois possibilita a avaliação rápida da biodisponibilidade dos carotenoides em alimentos, naturais ou industrializados, e em refeições ou interação de componentes da dieta. O fato de poder ter suas condições de análise bem controladas é útil para investigar o impacto de diversos processamentos e fatores da dieta sobre a biodisponibilidade dos carotenoides nos diferentes alimentos. A utilização das células intestinais humanas da linhagem Caco-2 permite estudar o metabolismo intestinal dos carotenoides e sua transferência através da membrana basolateral do enterócito (FAILLA; HUO; THAKKAR, 2008).

O uso das células Caco-2 simula as etapas de absorção, metabolismo inicial e o início do transporte dos carotenoides pelos enterócitos. Estas células, originadas de câncer de cólon humano, tem propriedades morfológicas e funcionais similares às do epitélio da mucosa do intestino humano. Elas se diferenciam espontaneamente em enterócitos quando formam monocamadas (ou tecidos), em aproximadamente 2 semanas em condições convencionais de cultivo. Elas apresentam-se nestas monocamadas em colunas polarizadas com junções e microvilosidades, além de uma bioquímica muito similar aos enterócitos intestinais normais, por isso, similar ao tecido epitelial do duodeno (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005, FAILLA; HUO; THAKKAR, 2008).

Inicialmente estas células foram utilizadas para estudar a absorção de medicamentos. Estudos realizados apontaram alta correlação entre a absorção de medicamentos administrado por via oral com os resultados obtidos em cultivo de células Caco2 (DELIE; RUBAS, 1997). Em 1999, Garrett, Failla e Sarama utilizaram pela primeira vez estas células para estudar a absorção de carotenoides. Eles associaram o uso destas células com a simulação da digestão, que já era muito conhecida e utilizada para outros nutrientes, e obtiveram resultados positivos e condizentes com o esperado. Segundo Reboul et al. (2006) existe alta correlação ($r=0,90$ e $p<0,038$) entre resultados obtidos com o método de análise da biodisponibilidade por digestão *in vitro* e absorção pelas células Caco-2 com a realidade fisiológica em seres humanos. Estes resultados de validaram a confiabilidade da metodologia para estudo da biodisponibilidade de carotenoides em alimentos (REBOUL et al., 2006).

Para realizar a simulação da absorção pelas células Caco-2 é preparado um frasco, onde as células serão cultivadas em meio de cultura que reproduz as características do soro sanguíneo humano. O cultivo é incubado e até obtenção de um tecido similar ao epitélio do duodeno, a partir da diferenciação das células em enterócitos. No experimento o tecido celular é incubado com uma mistura do meio de cultura e a fase aquosa do alimento previamente digerido, contendo os carotenoides micelizados. Após o período de incubação as células são colhidas para análise dos carotenoides absorvidos, por cromatografia líquida (FAILLA; HUO; THAKKAR, 2008). Na Figura 6 estão representados os principais pontos do uso das células Caco-2 para o estudo da biodisponibilidade de carotenoides em alimentos.

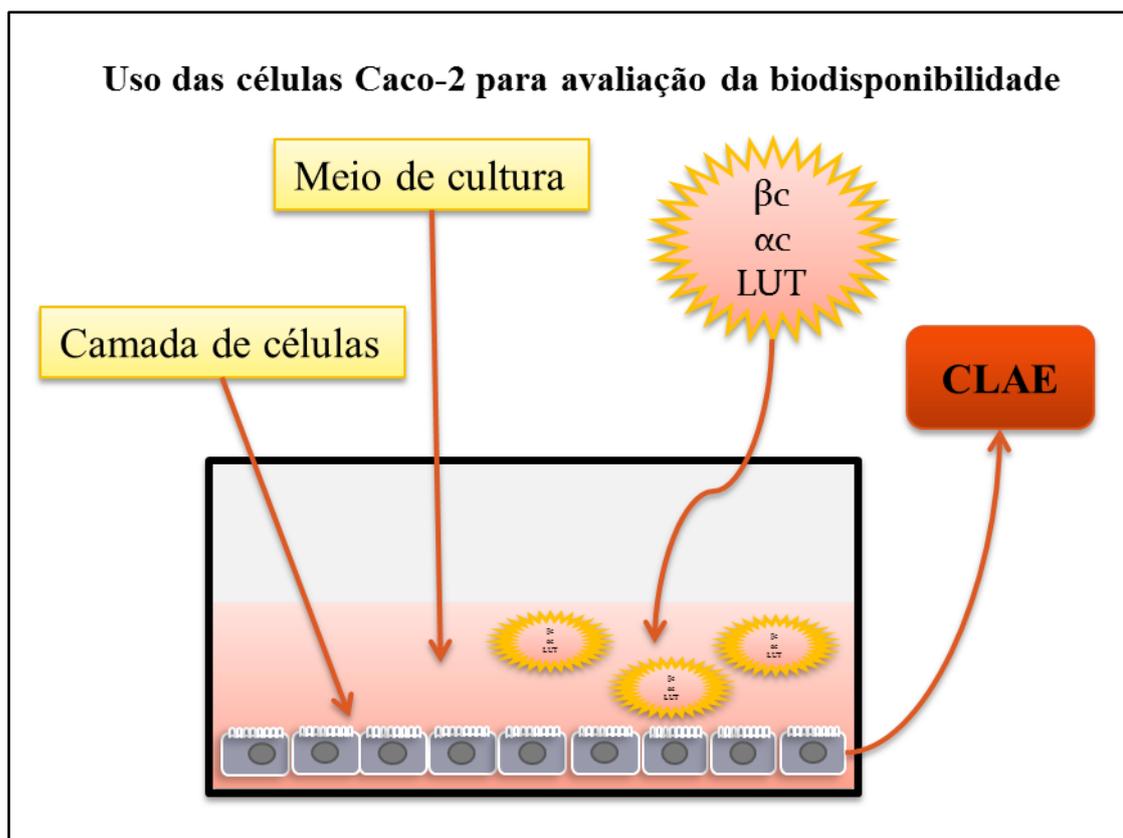


Figura 6 – Modelo dos experimentos de absorção dos carotenoides utilizando cultivo de células Caco-2. Após a simulação *in vitro* da digestão e a separação da fase aquosa, a fração micelar é misturada com o meio de cultura e adicionada às células cultivadas (a figura representa placas com 6 poços) com 21 dias pós-confluência (quando estão diferenciadas em enterócitos). Após 4h de incubação as células são colhidas e analisadas para quantidades de carotenoides por CLAE-DAD. Fonte: Adaptado de Failla e Chitchumroonchokchai (2005)

O método é bem descrito pelos autores em várias publicações (GARRETT; FAILLA; SARAMA, 1999; FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005; FAILLA; HUO; THAKKAR, 2008) e existe grande quantidade de informações sobre ele. O maior desafio é a minuciosidade e complexidade da análise. Existem muitas etapas com manipulação das amostras e extratos, exposição ao ambiente, e muitas fontes de erro, principalmente por envolver material biológico vivo, as células. Os riscos de erros e contaminação podem levar à superestimação ou subestimação dos resultados. Porém, isso não retira a aplicabilidade do método e a importância da análise no contexto da biofortificação para redução da deficiência de vitamina A. A correta aplicação dos procedimentos padronizados evitam estas fontes de erro, principalmente contaminações, e permitem a obtenção de resultados confiáveis.

A biodisponibilidade de carotenoides é um fator importante que precisa ser conhecido com maiores detalhes. Com os programas de biofortificação propondo reduzir a DVA que assola boa parte da população mundial, a biodisponibilidade se torna ainda mais importante. A existência de altos teores de carotenoides em alimentos que anteriormente não eram fonte, levanta questões fundamentais sobre a eficiência e eficácia destes programas. A biodisponibilidade destes pró-vitamínicos dependerá da composição da matriz alimentar, dos hábitos alimentares, dos modos de preparo ou processamentos e das condições da população alvo dos programas.

A técnica de análise da biodisponibilidade de carotenoides pela digestão *in vitro* e absorção pelas células Caco-2 tem alta aplicabilidade nestes estudos. Os resultados poderão ser obtidos rapidamente com certa precisão a um custo relativamente baixo. Este método ainda poderá ser aprimorado, visto que seu uso em análise de alimentos ainda é bem recente. Vale ressaltar que o uso desta técnica e da identificação e quantificação por CLAE-DAD permitirão obter dados de retenção, disponibilidade, absorção e metabolismo dos carotenoides.

Tanto as metodologias *in vivo* quanto *in vitro* são necessárias na avaliação dos programas de biofortificação. Inicialmente os métodos *in vitro* terão maior importância para o estudo dos alimentos biofortificados, pois será possível inferir sobre a biodisponibilidade dos carotenoides nos diferentes genótipos, processamentos e combinações alimentares. Também poderão indicar quais são melhores genótipos para serem adotados, além de possibilitar a adequadas sugestões de conservação, modos de preparo e consumo destes alimentos. Enfim, contribuir com os programas de biofortificação produzindo conhecimentos sobre os fatores que influenciam a biodisponibilidade dos carotenoides e sobre a eficiência dos alimentos biofortificados para a redução da DVA nas populações afetadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os solventes de grau cromatográfico, o soro fetal bovino (FBS), o fungizone, as soluções de penicilina-estreptomicina, a L-glutamina e os aminoácidos não essenciais foram adquiridos da *Life Technologies Corporation* (Grand Island, NY, US). Meios de cultura *Dulbecco's Modified Essential Medium* (DMEM) contendo 25 mmol/L de glicose, o tampão HEPES, o extrato de bile e as enzimas alfa-amilase, pepsina, lipase e pancreatina foram adquiridas da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, US). As células epiteliais de intestino humano *Caucasian Colon Adenocarcinoma* (Caco-2, ATCC[®] HTB37[™]) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, US). Todos os outros reagentes e suprimentos foram adquiridos da *ThermoFisher Scientific* (Pittsburgh, PA, US). No caso de exceções, a origem dos reagentes estará indicada no texto.

3.2 Delineamento experimental: genótipos e processamentos

Os genótipos de mandioca estudadas foram fornecidos pelo programa de melhoramento genético para biofortificação da Embrapa (BIOFORT) e pelo programa de melhoramento genético de mandioca de mesa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Tabela 1). Todas as mandiocas estudadas são consideradas ‘de mesa’, ou ‘doces’, porque possuem teores de ácido cianídrico abaixo de 100ppm e, portanto, seguras para a produção em pequena escala e consumo doméstico. Os 6 genótipos fornecidos pela Embrapa (Tabela 1) foram plantados na cidade de Cruz das Almas – Ba e colhidos com 14 meses de cultivo. Os 3 genótipos fornecidos pelo IAC foram plantados em Santa Maria da Serra – SP e colhidos com 9 meses de cultivo. Todas as raízes foram colhidas em março de 2013.

O conjunto de genótipos de mandiocas estudados foi composto de forma a conter exemplares parentais e progênes formando portanto 2 linhagens dos distintos programas de melhoramento. Foi incluído um genótipo controle (Saracura, Tabela 1) devido à sua polpa de coloração branca e a frequente produção desta variedade na região NE. Os parentais do programa da Embrapa, Dourada e Gema de Ovo (Tabela 1) foram selecionados em bancos de germoplasma e a progênie obtida com o programa de melhoramento genético. Dos parentais do

programa do IAC somente a variedade 576-70 estava disponível para o estudo, a progênie foi obtida pelo cruzamento da 576-70 e a Ouro do Vale. Importante ressaltar que o parental 576-70 já é originário de processo de cruzamento e seleção ocorrido na década de 1970, de forma que o melhoramento genético pode ser caracterizado como um retro-cruzamento.

Tabela 1 – Genótipos de mandioca estudados

Genótipo	Tipo	Ano^a	Origem	Descrição
Linhagem 1^b				
Saracura	Controle	-	Embrapa	Mandioca branca, consumida na região NE
Dourada	Parental	2001	Embrapa	Selecionada em banco de germoplasma
Gema de ovo	Parental	2001	Embrapa	Selecionada em banco de germoplasma
Jari	Progênie	2003	Embrapa	Melhorada para aumento de β C e produtividade
Clone14-11	Progênie	2003	Embrapa	Melhorada para aumento de β C e produtividade
Clone 03-15	Progênie	2003	Embrapa	Melhorada para aumento de β C e produtividade
Linhagem 2^b				
576-70	Parental	1970	IAC	Melhorada para produtividade e cor amarela
265-97	Progênie	1997	IAC	Melhorada para aumento de β C e produtividade
06-01	Progênie	2001	IAC	Melhorada para aumento de β C e produtividade

^a Referente ao ano em que os genótipos Dourada e Gema de ovo foram selecionados para o melhoramento, e ao ano em que os genótipos melhorados foram estudados e descritos pela primeira vez. ^b Os genótipos foram agrupados em linhagens por suas características de parentesco e clima de cultivo.

Para as batatas-doces o conjunto estudado foi composto por um genótipo branco (controle, Brazlândia), dois genótipos de polpa laranja, Beauregard e Amélia. Todos os genótipos foram cultivados e colhidos no Brasil (Tabela 2). Os 3 genótipos fornecidos pela Embrapa foram cultivados em Brasília por um período de 4 meses. Todas as raízes foram

colhidas em março 2013. Foram incluídas duas marcas de alimentos infantis fontes de provitamina A produzidos nos EUA a partir de batatas-doces (Tabela 2). O objetivo da inclusão destes alimentos industrializados foi verificar se o processamento intenso, utilizados nestes tipos de alimentos, é capaz de aumentar a biodisponibilidade e compará-los com a biodisponibilidade dos carotenoides encontrados nas amostras das batatas-doces oriundas do Brasil. As marcas utilizadas foram a Nestle Gerber® e a Earth's Best®. Assim pode-se considerar os alimentos infantis como controles positivos dos experimentos, já que são produzidos para apresentarem a maior biodisponibilidade possível.

Tabela 2 – Genótipos de batatas-doces e alimentos infantis estudados.

Cultivares	Tipo	Ano ^a	Origem	Descrição
Batatas-doces				
Brazlândia	Controle	-	Embrapa	Batata-doce de cor branca comum no Brasil
Beauregard	Polpa laranja	1987	Embrapa	Melhorada em Louisiana EUA, cedida para o Brasil
Amélia	Polpa laranja	2007	Embrapa	Selecionada no Brasil pela Embrapa
Alimentos infantis ^b				
Marca A	Processada	2013	Earth's best® organic	Ingredientes: batatas-doces orgânicas, ácido ascórbico
Marca B	Processada	2013	Nestle Gerber®	Ingredientes: batatas-doces, água, ácido ascórbico

^a Refere-se ao ano em que o cultivar Beauregard foi melhorado, cultivar Amélia lançada e ao ano em que os alimentos infantis foram produzidos. ^b Os alimentos infantis foram escolhidos por serem fontes de provitamina A obtidas a partir de batatas-doces e por passarem por intenso processamento (ação de temperatura e redução de partícula), o que teoricamente tornam os carotenoides mais biodisponíveis.

Amostras das raízes de cada genótipo (mandiocas e batatas-doces) foram oriundas de 3 plantas independentes e selecionadas aleatoriamente no campo. Após a colheita, as raízes foram lavadas, secas e parafinadas para evitar danos durante o transporte e contato com oxigênio. As raízes foram transportadas para a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e processadas imediatamente de maneira que o processamento ocorreu num período

de 24-48h pós colheita. Previamente ao processamento as raízes foram descascadas, lavadas e tiveram as extremidades cortadas e descartadas. As raízes limpas foram quarteadas, em toletes de 10 cm de comprimento (Figura 7). As batatas-doces foram quarteadas em cubos de aproximadamente 4cm. Os procedimentos foram realizados de modo a evitar incidência direta e intensa de luz sobre as amostras, evitando a degradação dos carotenoides.



Figura 7 – Amostras de raízes do genótipo Jari, colhidas, lavadas, descascadas e quarteadas para o processamento, fotografia tirada em 22/03/2013



Figura 8 – Amostras de raízes do genótipo 576-70 no aparelho tipo Mattson adaptado para medir o tempo médio de cozimento de mandiocas. Cada um dos 12 pinos estavam calibrados com 90g, o tempo médio de cozimento é determinado quando 7 pinos descem penetrando os toletes de mandioca. Fotografia tirada em 11/7/2012

Foram realizadas medidas do tempo médio de cozimento utilizando um cozedor tipo Mattson de aço inoxidável, contendo de 12 pinos adaptados para avaliar o cozimento das mandiocas e das batatas-doces (calibrados com 90g de peso por pino). O aparelho foi mergulhado em água destilada fervente ($\cong 100^{\circ}\text{C}$) e o tempo médio de cozimento foi determinado após a descida de 7 pinos segundo a metodologia de Feniman (2004) (Figuras 8 e 9). Após o estabelecimento do tempo adequado, os toletes de 10 cm destinados às análises foram mergulhados em água destilada fervente ($\cong 100^{\circ}\text{C}$) em panelas de alumínio destampadas e mantidos por seus respectivos tempos (Figura 9). O procedimento de cozimento foi repetido três vezes para compor as repetições do experimento.

Do total de toletes obtidos, um terço (em volume) foram mantidos crus, para as análises do material inicial. Os dois terços restantes sofreram cozimento, e metade deles foi armazenada para as análises no material cozido. A outra metade das amostras cozidas, ou seja, um terço do total, foi submetido à fritura em óleo de soja à 180°C por 5 minutos. A fritura foi realizada em uma fritadeira de imersão (Tedesco[®], FE-101) com controle de temperatura e contendo 5 L de óleo de soja. Os toletes foram colocados num cesto para a fritura, e ao término do procedimento foram mantidos no cesto suspenso até completa drenagem do excesso de óleo. Os procedimentos de fritura ocorreram em bateladas e repetidos 3 vezes.

A seleção das raízes e amostras (mandiocas e batatas-doces) destinadas às serem armazenadas cruas, cozidas ou fritas foi realizada aleatoriamente. Cada uma das amostras (cruas, cozidas e fritas) foram embaladas separadamente à vácuo em sacos de Nylon-Polietileno coextrusado liso, pois este material possui baixa permeabilidade ao oxigênio (Figuras 10 e 11). Todas as amostras foram imediatamente conduzidas ao ultrafreezer -80°C e permaneceram até o momento do envio aos Estados Unidos. As amostras congeladas foram cuidadosamente colocadas numa caixa de isopor intercaladas com gelo em gel (-80°C) e lacrada para envio por correio. As amostras chegaram ao departamento de Nutrição Humana da Ohio State University (OSU), Columbus, Ohio, EUA em 44h, e ainda estavam adequadamente congeladas quando atingiram o destino.

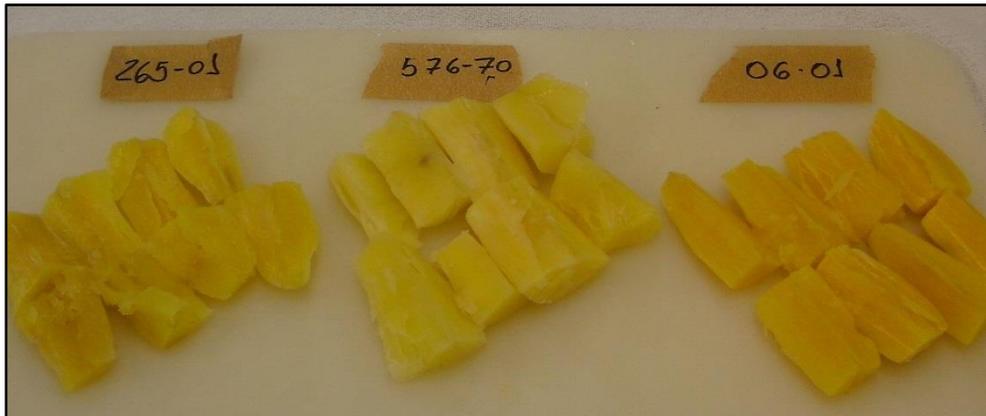


Figura 9 – Amostras cozidas para determinação do tempo médio de cozimento. Genótipos 265-97, 576-70 e 06-01 (11/7/2012)



Figura 10 – Amostras cozidas e embaladas à vácuo em sacos de Nylon-Polietileno, prontas para congelamento. Genótipos 265-97, 576-70 e 06-01 (12/07/2012)



Figura 11 – Amostras fritas e embaladas à vácuo em sacos de Nylon-Polietileno, prontas para congelamento. Genótipos 265-97, 576-70 e 06-01 (120/7/2012)

Todas as análises desta pesquisa foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Humana da OSU. Para a execução dos procedimentos analíticos as amostras foram descongeladas em câmara fria (5°C), sem luz. A homogeneização dos materiais foi realizada num processador de alimentos (Cuisinart® Smart Stick® Hand Blender) e alíquotas foram utilizadas para as análises de lipídeos (somente nas mandiocas fritas), umidade, carotenoides por CLAE-DAD, biodisponibilidade pela simulação da digestão *in vitro* e finalmente a absorção dos carotenoides pelos cultivos das células de epitélio intestinal humano Caco-2 (mandiocas processadas e batatas-doces processadas).

3.3 Análises de teor de lipídeos e umidade

Foram realizados testes preliminares do teor de lipídeos em amostras de 3 genótipos de mandiocas cruas através da extração em éter de petróleo no equipamento Soxhlet seguindo a metodologia descrita na AOAC (1995). Os resultados foram muito próximos do fornecido pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA, 2011), isto é, aproximadamente 0,3% sobre Matéria Fresca. Consequentemente foram determinados os teores de lipídeos somente nas amostras de todos os genótipos de mandiocas fritas seguindo o método de Folch, Lees e Stanley (1957). Amostras (1,5g) foram homogeneizadas em 3mL de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 em um homogeneizador do tipo Polytron. Foram adicionados 4mL de metanol (MeOH) e agitados em vortex por 2 min. Em seguida foram adicionados 8mL de clorofórmio e a mistura foi agitada em vortex por 2 min. O material foi centrifugado à 1000 x g durante 15 minutos à 4°C e deixada na câmara fria durante toda a noite. A fase inferior foi transferida para tubos de vidro previamente pesados e o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. A diferença entre o peso inicial do tubo e o peso do tubo após a evaporação do solvente equivale à quantidade de lipídeos das amostras. Não foram conduzidas análises dos teores de lipídeos nas amostras de batatas-doces.

A determinação da umidade foi realizada nas amostras das mandiocas cruas, cozidas e fritas. Foi realizada a metodologia descrita na AOAC (1995). Amostras (1g) foram pesadas e mantidas em estufa com circulação de ar à 65°C até peso constante. A diferença entre o peso inicial e o peso final foi considerada como a umidade do material.

3.4 Extração dos carotenoides

A extração dos carotenoides para quantificação nas amostras de mandiocas e batatas-doces cruas, cozidas, fritas e alimentos infantis foi realizada de acordo com o descrito em Kimura et al. (2007). Amostras homogeneizadas (3g) foram extraídas com 30 mL de acetona fria em um almofariz de porcelana contendo 5 g de celite. O extrato foi filtrado em funil de Büchner com placa porosa sob vácuo. A extração e filtração foram repetidas até a descoloração completa do material (3-4 vezes). Em funil de separação realizou-se uma etapa de partição adicionando o extrato a 25 mL de éter de petróleo. A mistura foi lavada com 400 mL de água destilada, e após a separação de fases descartou-se a inferior. A fase éter de petróleo foi recolhida em frascos de vidro passando por um funil contendo sulfato de sódio anidro. Os extratos finais tiveram o solvente completamente evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho-maria à 30-35°C. Os frascos foram fechados e armazenados em freezer -26°C até o momento da análise (máx. 7 dias).

No caso das análises de carotenoides nos materiais digeridos, frações aquosas e células Caco-2 a extração seguiu o descrito adiante. Os *pellets* celulares foram suspensos em 5mL de PBS e tiveram as células rompidas para a liberação dos carotenoides com a ajuda de um aparelho de ultrassom, no qual a suspensão permaneceu por 2 min. Alíquotas dos digeridos, frações aquosas e suspensão de células (5-7 mL) foram extraídas através da adição de 10 mL da solução de tetrahidrofurano (THF) e metanol (1:1, v/v) em tubos de 50 mL. Os tubos foram agitados em vortex por 1min, em seguida foram adicionados 10mL de hexano e a mistura foi novamente agitada em vortex por 1min. Os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 10 min à 4°C. A fase superior, contendo os carotenoides, foi coletada em frascos de vidro e o solvente foi completamente evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 35°C. Os frascos foram fechados e armazenados em freezer -26°C até o momento da análise (máx. 7 dias).

Os extratos secos foram solubilizados na solução de MeOH e metil-*tert*-butil-eter (MTBE) (1:1, v/v) e filtrados (filtros 0.22 µm de poro, Millipore®) diretamente nos vials de análise que foram colocados no sistema cromatográfico para análise imediata. Em algumas extrações (escolhidas aleatoriamente) foi adicionado o padrão interno apo-8'-carotenal (10 µg/mL em MeOH) para calcular a recuperação do padrão e estimar a eficiência da extração dos carotenoides. Os valores de recuperação do padrão interno foram 97,5 ± 7%, 96,9 ± 9% e 94,5 ± 10%, respectivamente, para os extratos das amostras cruas, cozidas e fritas. No caso dos digeridos e das frações aquosas, os valores de recuperação do

Apo-8'-carotenal foram respectivamente $99,7 \pm 3\%$ e $95,7 \pm 3\%$, nas amostras cozidas e respectivamente $97,8 \pm 4\%$ e $90,9 \pm 12\%$, nas amostras fritas. A recuperação do Apo-8'-carotenal nos extratos das células Caco-2 foi de $93,4 \pm 6\%$, $91,9 \pm 7\%$ e $96,1 \pm 8\%$ respectivamente, para os experimentos conduzidos com amostras das mandiocas cozidas, mandiocas fritas e batatas-doces.

3.5 Análise dos carotenoides por cromatografia líquida

O sistema cromatográfico utilizado foi composto por um equipamento Waters 2695 conectado à um detector de arranjo de diodos modelo Waters 2996. As condições cromatográficas foram as descritas por Chitchumroonchokchai, Schwartz e Failla (2004) com adaptações. A coluna polimérica de fase reversa utilizada foi a YMC™ C₃₀ (4,6 mm x 150 mm, 5 μm de tamanho de partícula; Waters, Milford, MA) protegida por uma pré-coluna C₁₈ *guard column* (4,6 mm x 50 mm, 5 μm de tamanho de partícula, Waters, Milford, MA). A fase móvel constituída por MeOH:MTBE (85:15, v/v) e fluxo de 0,8 ml/min. O detector monitorou as corridas durante 40 min. Um exemplar do espectro de absorção completo pode ser visto no apêndice A. No entanto, os cálculos foram realizados no comprimento de onda 450 nm, referente ao *trans*-βC. O *trans*-βC foi identificados e quantificados por comparação com o auxílio de curvas-padrão de *trans*-βC (>98% pureza). Na ausência de padrões analíticos dos isômeros *cis*-βC, a identificação e quantificação foi realizada com a comparação dos espectros de absorção e calculados com a curva padrão de *trans*-βC, sendo corrigidos pelo coeficiente de absortividade específico de cada isômero (BRITTON, 2011).

3.6 Cálculo da retenção dos carotenoides

O cálculo da porcentagem de retenção foi realizado de acordo com descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Foram utilizados os resultados dos teores de carotenoides das amostras de mandiocas cruas, cozidas e fritas e dos valores de umidade das amostras para calcular a porcentagem de retenção em base de matéria seca. Assim foi possível obter a retenção real devido ao cozimento e devido a fritura. A fórmula de cálculo utilizada foi:

$$\% \text{ retenção} = \frac{\text{teor de } \beta\text{C na amostra processada } (\mu\text{g/g M.S.})}{\text{teor de } \beta\text{C na amostra crua } (\mu\text{g/g M.S.})} \times 100$$

3.7 Simulação *in vitro* da digestão oral, gástrica e intestinal

Para as análises das amostras de mandiocas cozidas (2,0 – 2,5 g), batatas-doces cozidas e alimentos infantis (0,5g), foram adicionados 2,5% de óleo de soja por reação em relação ao peso da amostra. Não foi adicionado óleo de soja nas amostras fritas de mandiocas e batatas-doces, mas o peso analisado por reação foi entre 0,3 e 1,5g para as amostras de mandiocas fritas, e 0,25g para as amostras de batatas-doces fritas objetivando manter a quantidade de óleo menor que 0,075g por reação. Este balanço é necessário para garantir a completa digestão dos triglicerídeos.

As etapas da digestão oral, gástrica e intestinal foram simuladas *in vitro* seguindo o descrito por Thakkar et al. (2007) com pequenas adaptações. No apêndice B há um fluxograma resumido de todas as etapas integradas da análise da biodisponibilidade de carotenoides pela simulação *in vitro* da digestão e absorção pelo cultivo de células Caco-2. Resumidamente, cada amostra foi digerida em triplicata e o experimento repetido pelo menos uma vez em semanas diferentes, totalizando no mínimo 6 repetições ($n \geq 6$). Aliquotas foram homogeneizadas em 10 mL de uma solução basal de sais (SBS, contendo 120 mol/L NaCl, 6 mmol/L CaCl₂ and 5 mmol/L KCl) com um homogeneizador tipo Polytron em tubos de 50mL. A mesma solução SBS foi utilizada para os ajustes de volumes em cada etapa da digestão. Todos os procedimentos analíticos foram realizados evitando a exposição excessiva à luz direta, temperatura e oxigênio para não ocorrerem degradações dos carotenoides durante as análises. Em cada uma das etapas de incubação os tubos foram cobertos por gás inerte nitrogênio (N₂) e selados com *parafilm*[®].

Foi adicionada uma solução sintética de saliva (6 mL) preparada de acordo com Oomen et al. (2003) contendo 106 unidades/mL de α -amilase (Sigma[®] A3176) para iniciar a etapa oral. O volume foi ajustado para 30 mL. Os tubos foram incubados à 37 °C por 10 min em banho-maria com agitação (85 rpm). Em sequência o pH foi ajustado para 2,5 com HCl 1N, foram adicionados 2 mL de solução de pepsina (Sigma[®] P7000) na concentração de 10000 unidades/mL HCl 100 mM. O volume foi ajustado para 40 mL. Os tubos foram novamente incubados nas mesmas condições anteriores por 1h. A reação da fase gástrica foi interrompida pelo ajuste do pH à 6,0 com NaHCO₃ 1M. Foram adicionados 3mL de solução de extrato de bile (Sigma[®] B8631) na concentração 40 mg/mL 100 mM NaHCO₃ e 2 mL de solução de pancreatina (Sigma[®] P1750) e lipase (Sigma[®] L3126) nas concentrações de ~4000 unidades/mL 100 mM NaHCO₃ e ~1000 unidades/mL 100 mM NaHCO₃, respectivamente.

O pH foi então ajustado para 6,5 e o volume ajustado para 50mL. Os tubos foram incubados à 37° por 2h com agitação (85 rpm) para simulação da etapa intestinal (duodenal).

Ao final das digestões o material digerido foi dividido em duas alíquotas homogêneas. A primeira para análise da recuperação dos carotenoides em relação ao material final e verificação da estabilidade dos carotenoides à digestão. A recuperação de todas os materiais foi maior do que 70%, como esperado (THAKKAR et al., 2007). A segunda alíquota foi centrifugada à 12000 g por 45 min em 4°C. O sobrenadante foi coletado com ajuda de pipetas *pasteur* e em seguida filtrados por membranas de acetato-celulose (Milipore®, 0,22µm de poro) para separar apenas a fração aquosa contendo as micelas lipídicas mistas, isto é, a fração biodisponível dos carotenoides. A relação entre os carotenoides incorporados à micelas e os carotenoides no material inicial representa a eficiência de micelarização (EM), que é preditiva da biodisponibilidade. As alíquotas foram cobertas por N₂ seladas e congeladas em freezer - 26°C até a extração (no máximo 7 dias) dos carotenoides e análise por HPLC, como descrito acima.

3.8 Cultivo das células humanas de linhagem Caco-2

As células epiteliais de intestino humano da linhagem Caco-2 (ATCC®HTB37™) foram cultivadas em frascos de cultura T75 seguindo os procedimentos descritos em Garret, Failla e Sarama (1999) e Chitchumroonchokchai, Schwartz e Failla (2004). Aos frascos T75 foram adicionadas células Caco-2 na concentração de 0,4 – 0,6 x 10⁶ células por frasco.

O meio de cultura utilizado foi o *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (D7777; Sigma®) com alto teor de glicose suplementado com 4 mmol/L de L-glutamina, 15 mmol/L de tampão HEPES, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina, 0,2% de antimicótico fungizone, 15% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS). O pH do meio foi ajustado para 7,4. No período pós-confluência o meio de cultura teve a proporção de FBS reduzida para 7,5%. O meio foi esterilizado por filtração asséptica, assim como todos os procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica (CSB nível 2) em condições assépticas. Os frascos foram mantidos em incubadora com atmosfera úmida, ar/CO₂ (95:5 v/v) a 37 °C. A cada 2 dias o meio de cultura dos frascos foi trocado por meio novo recém preparado.

O acompanhamento do crescimento das células, a confluência e o período pós-confluência foi realizado visualmente num microscópio invertido. Considera-se que um cultivo celular está conflúente quando as células cobriram mais de 90% da área do frasco na qual estão

sendo cultivadas. Em média as culturas atingiram a confluência em 7 dias, e foram utilizadas entre o 11º e o 14º dias pós-confluência. Este é o período ideal no qual as células estão diferenciadas em enterócitos (GARRET; FAILLA; SARAMA, 1999). Foram utilizadas nos experimentos culturas nas passagens entre 22 – 31. Para a determinação da quantidade média de proteína por frasco foi utilizado o teste ELISA do ácido bicinonínico (BCA), utilizando albumina como padrão. O teor médio de proteína por frasco foi $12,1 \pm 0,9$ mg/T75, valor considerado na normalidade (GARRET; FAILLA; SARAMA, 1999).

3.9 Absorção dos carotenoides pelas células Caco-2

Os experimentos de absorção celular, pelas células Caco-2, do β C contido nas micelas formadas durante a digestão das amostras foram realizados apenas nos quatro genótipos de mandioca cozidas e fritas que continham a maior concentração de β C, ou seja, os genótipos Jari, 06-01, 265-97, Clone 03-15. Os experimentos também foram realizados nas batatas-doces Beauregard e Amélia, e nas duas marcas de alimentos infantis. Devido às várias etapas das análises e dos valores relativos de biodisponibilidade se torna inviável a realização destes testes em materiais com níveis muito baixos de β C, visto que, ao final sua concentração certamente estaria abaixo do limite de detecção do sistema cromatográfico.

Para iniciar o experimento foram coletadas as frações aquosas dos digeridos das amostras e mantidas resfriadas em gelo até o momento da filtração de forma estéril (filtros acetato celulose, 0,22 μ m estéreis). Os filtrados foram diluídos (1:4) em meio de cultura basal DMEM, pH 6,5. Os tecidos celulares foram lavados com meio basal DMEM e em seguida adicionou-se 12,5mL do basal DMEM, pH 6,5, contendo os 25% de fração aquosa, na qual estão as micelas que incorporaram os carotenoides. Os frascos foram incubados por 4h, e durante este período a integridade do tecido celular foi certificada em microscópio após 1h, 2h e 4h. Não foram observados grandes descolamentos de células, morte celular ou desintegração do tecido, de maneira que todos os frascos puderam ser considerados nos resultados. Após o período de incubação de 4h, o meio de cultura foi removido e os tecidos foram lavados uma vez com tampão fosfato (PBS) gelado, contendo 2g/L de albumina sérica bovina, e lavados mais duas vezes com PBS gelado para retirar os carotenoides extracelulares que estivessem aderidos ao tecido. Em cada frasco foram adicionados 6 mL de PBS e com ajuda de um raspador de borracha as células foram coletadas e transferidas para tubos de centrifuga. Os tubos foram centrifugados à 400 x g por 5 min à 4 °C e o sobrenadante descartado. Os *pellets* de células foram cobertos com N₂, fechados e armazenados à -26°C até o momento da extração dos

carotenoides intracelulares para análise (máximo de 7 dias). A extração foi realizada conforme o descrito acima no item 3.5. Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições e em duas semanas diferentes, visto que um dos frascos foi retirado aleatoriamente para análise de proteína, o número final de repetições foi $n=7$. Ver o apêndice B para o fluxograma resumido de todas as etapas integradas da análise da biodisponibilidade de carotenoides.

3.10 Análise estatística dos resultados

Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, para os efeitos dos genótipos e formas de cocção e a interação genótipo e formas de cocção. O teste de interação teve o modelo fatorial 9 genótipos x 3 estilos de cocção no caso das mandiocas e foi considerado significativo ($p<0,01$). As diferenças significativas entre médias foram testadas utilizando o teste de comparação de médias Tukey e considerado significativo ao nível de 5% ($p<0,05$). Foram realizados testes de correlação de Pearson e considerado significativo à 1% ($p<0,01$). O software utilizado para os testes ANOVA e TUKEY foi o *Statistical Analysis System – SAS* (SAS Inc., Cary, NC, US) e os testes de correlação com o software *Statistical Assistance Software – Assistat 7.7 beta* (UFCG, Campo Grande, PB, Brasil).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Mandioca

As mandiocas tiveram o tempo médio de cozimento (TC) determinado e foram cozidas de acordo com este tempo medido. Para o tratamento que utilizou fritura, foram posteriormente fritas. Amostras fritas foram avaliadas para o teor de lipídeos. A umidade foi determinada em todos os genótipos crus, cozidos e fritos. Estes resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados das análises dos 9 genótipos de mandiocas referentes ao tempo médio de cozimento (TC), à umidade nas amostras cruas, cozidas e fritas, e ao teor de lipídeos das amostras fritas^a

Genótipo	TC (min) ^b	Umidade (% MF) ^c			Lipídeos nas mandiocas fritas (% MF) ^c
		Crua	Cozida	Frita	
Linhagem 1					
Saracura	38,3	66,7± 4,4 ^{bcA}	68,5± 3,0 ^{dA}	55,5± 5,0 ^{bcB}	4,8± 0,49 ^d
Dourada	41,3	69,4± 2,8 ^{bA}	70,6± 2,0 ^{cdA}	60,8± 2,6 ^{bB}	2,6± 0,17 ^f
Gema de Ovo	35,2	65,9± 3,3 ^{bcA}	64,2± 2,3 ^{dA}	57,1± 1,5 ^{bB}	2,0± 0,01 ^g
Clone 14-11	25,4	79,3± 3,9 ^{aA}	77,6± 1,5 ^{bcAB}	72,3± 2,3 ^{aB}	3,2± 0,08 ^e
Jari	33,5	83,0± 1,2 ^{aA}	86,9± 2,5 ^{aA}	76,2± 3,2 ^{aB}	2,1± 0,14 ^g
Clone 03-15	22,6	79,7± 0,7 ^{aAB}	80,2± 2,1 ^{abA}	74,3± 3,2 ^{aB}	2,1± 0,04 ^g
Linhagem 2					
576-70	16,4	60,2± 2,1 ^{cB}	67,0± 0,3 ^{dA}	48,1± 2,9 ^{cdC}	8,4 ± 0,25 ^b
265-97	12,4	63,3± 2,0 ^{bcA}	65,0± 0,6 ^{dA}	44,6± 5,6 ^{dB}	6,7± 0,13 ^c
06-01	28,1	63,3± 2,1 ^{bcB}	71,3± 3,4 ^{cdA}	45,1± 1,7 ^{dC}	13,7± 0,37 ^a

^a Resultados de umidade e lipídeos estão expressos em média ± DP, n=3, ^b Tempo médio de cozimento foi determinado como o tempo em que 7 de 12 hastes (90g cada) perfuraram os cubos de mandioca, ^c Letras minúsculas diferentes nas colunas da umidade e do teor de lipídeos significam diferença estatística significativa para os genótipos (p<0,05), Letras maiúsculas diferentes nas linhas dos genótipos significam diferença estatística significativa entre as mandiocas cruas, cozidas e fritas (p<0,05).

A mandioca é um alimento vegetal que necessita de cocção antes do consumo. É uma raiz tuberosa de polpa dura quando *in natura*, e pode acumular altos níveis de ácido cianídrico

(HCN) tóxico aos seres humanos. No caso das mandiocas com altos teores de HCN, conhecidas como ‘bravas’ ou ‘amargas’, a maceração em água e o processamento visam garantir a segurança para consumo. As mandiocas de mesa, ou ‘mansas’, mesmo sendo seguras (teor de HCN <100ppm), precisam de algum tipo de cocção para adquirir textura adequada para consumo.

O TC das mandiocas estudadas variou de 12 a 41 minutos dependendo do genótipo, enquanto que Mezette (2007) obteve o TC de 13 variedades de mandioca, incluindo a 576-70 e a 265-97, variando de 29 a 52 minutos (Tabela 3). Os pesquisadores usualmente cozinham os pedaços de mandioca, para pesquisar o efeito deste processamento, por imersão em água fervente durante 30 minutos (THAKKAR et al., 2009; CARVALHO et al., 2012; VIMALA et al., 2011). No entanto a dureza das variedades é dependente das características genéticas da polpa, do solo de cultivo e das condições climáticas, ocasionando grande variação do TC (MAIEVES et al., 2012; MEZETTE et al., 2009).

A textura e a estrutura física da polpa dos vegetais tem influência decisiva sobre o impacto da cocção na estabilidade, retenção e biodisponibilidade dos carotenoides (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012; VAN BUGGENHOUT et al., 2010). As mandiocas em que os grãos de amido estão mais profundamente ligados ao tecido parenquimatoso, celulose e pectina, tendem a ser mais duras tanto cruas quanto após o cozimento das raízes (MAIEVES et al., 2012). Deste modo, os consumidores sempre as cozinham até a textura desejada e não por um tempo padrão. Sendo assim o tempo de cocção é um fator crucial no que se refere às mandiocas destinadas ao preparo e consumo doméstico.

Foram os genótipos biofortificados que apresentaram os menores TC dentro de suas linhagens, com destaque para o Clone 03-15 e o 265-97 (Tabela 3). Estes serão pontos positivos para as mandiocas biofortificadas, e com baixo TC, no momento da escolha dos consumidores. Aquelas que apresentaram mais de 30 minutos de TC poderão ter dificuldades para serem aceitas sensorialmente. De maneira geral a linhagem 1 apresentou maiores TC (dureza) do que a linhagem 2.

A umidade das mandiocas cruas da linhagem 1 foi significativamente maior do que a umidade das mandiocas da linhagem 2 (Tabela 3). A diferença entre os valores de umidade pode ser explicada pelas diferentes condições edafoclimáticas de cada linhagem. Enquanto as variedades oriundas da Embrapa foram cultivadas no nordeste do Brasil por 14 meses em clima semi-árido, as variedades do IAC foram cultivadas na região sudeste do Brasil por 9 meses em clima tropical.

O cozimento afetou significativamente a umidade de 4 genótipos, a diminuindo levemente no Clone 14-11 e aumentando nos outros três (Tabela 3). Nas mandiocas 576-70 e 06-01 a umidade aumentou 7-8%. A composição da matriz alimentar é responsável pelos seus diferentes comportamentos frente ao cozimento. O tipo de amido, tamanho dos grânulos e sua localização, assim como o teor inicial de água interna da polpa, promovem a absorção ou não de água e a perda de sólidos solúveis durante o cozimento por imersão (MAIEVES et al., 2012).

A fritura reduziu significativamente o teor de água em todas as nove mandiocas estudadas. Mas a dimensão deste impacto variou de acordo com os genótipos. Durante a fritura das mandiocas previamente cozidas a perda de água foi maior na linhagem 2. A umidade das mandiocas da linhagem 2 reduziu em aproximadamente 30%. A redução da umidade das mandiocas da linhagem 1 ficou entre 5 - 10%. Em acordo com estas observações, a análise estatística apontou interação significativa entre genótipos e tipos de cocção como causa dos efeitos sobre a umidade ($p < 0,01$).

As características da matriz alimentar também interferiram na capacidade de absorção de lipídeos durante a fritura. Testes preliminares dos teores de lipídeos em três variedades cruas e cozidas resultaram em valores de 0,3 - 0,5% da matéria fresca (MF). Estes resultados são muito próximos dos existentes na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA, 2011). Por isso a determinação de lipídeos completa foi realizada somente nas amostras fritas. Os resultados dos 6 genótipos da linhagem 1 variaram de 2,0 - 4,8% MF e foram menores do que os 3 genótipos da linhagem 2 (6,7 - 13,7% MF). Portanto a linhagem 2 teve maior incorporação de óleo durante a fritura.

A absorção de óleo durante a fritura de alimentos é altamente afetada pela sua composição e organização da matriz. Durante a fritura de vegetais fenômenos complexos de transferência de massa e calor ocorrem ocasionando a absorção de lipídeos, perda de umidade, modificações da estrutura dos tecidos, formação de crosta superficial entre outros (FARINU; BAIK, 2007). De fato, foi possível correlacionar positivamente a maior incorporação de óleo nos genótipos da linhagem 2 com maiores teores de matéria seca ($p < 0,001$, $r = 0,7546$). Esta característica da linhagem 2 não causa significativas alterações sobre os fatores de retenção e estabilidade dos carotenoides, porém, tem grande importância na biodisponibilidade dos carotenoides, como será discutido adiante.

Em síntese, as características intrínsecas dos genótipos associadas às diferenças edafoclimáticas de cada linhagem são, em boa medida, responsáveis pelos diferentes comportamentos frente aos processamentos. Coerentemente, as variedades da linhagem 1 que são mais adaptadas à região semiárida, apresentaram maior umidade, maior dureza, maior

capacidade de reter água e menor incorporação de lipídeos. As variedades da linhagem 2, que são adaptadas à uma região mais úmida que a região semiárida, são mais macias e apresentam menor umidade, menor retenção de água e maior absorção de óleo.

4.1.1 Perfil de carotenoides nas mandiocas

Na Figura 12, abaixo, são apresentados os cromatogramas, obtidos para o genótipo Jari, representativos das mandiocas biofortificadas cruas, cozidas e fritas.

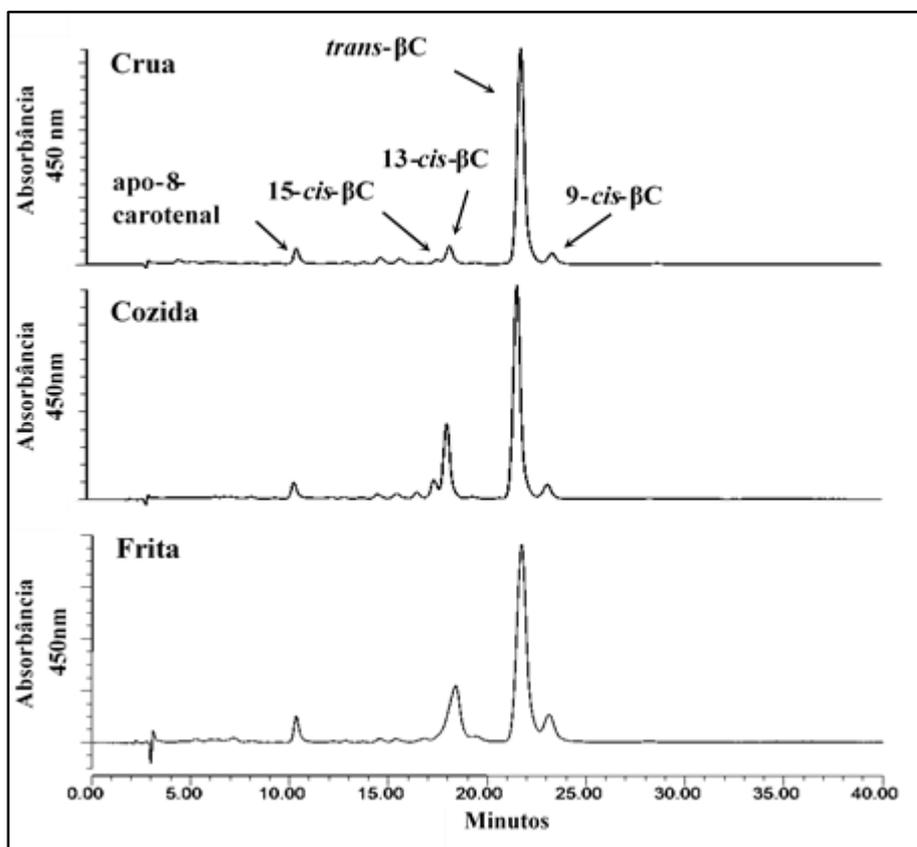


Figura 12 – Cromatogramas representativos das mandiocas biofortificadas cruas, cozidas e fritas (Genótipo Jari). Condições cromatográficas foram: sistema CLAE-DAD com coluna YMC™ C₃₀ (4,6 mm x 150 mm, 5 μm tamanho de partícula) e fase móvel composta por MeOH:MTBE (85:15) em gradiente de eluição (descrito na metodologia), fluxo 0,8 mL, volume de injeção 10 μl. Ver o espectro de absorção completo no apêndice A

O betacaroteno (β C) foi o único carotenoide encontrado em quantidades significativas em todas as amostras de mandioca estudadas e suas quantidades variaram marcadamente entre os genótipos. Foi possível separar e identificar os isômeros do β C, que eluíram na seguinte sequência: 15-*cis*- β C, 13-*cis*- β C, todo-*trans*- β C (*trans*- β C) e 9-*cis*- β C (Figura 12). Visto que a presença relativa do *trans*- β C é muito superior aos isômeros, estes últimos foram quantificados conjuntamente e serão expressos em total de isômeros *cis* do β C (total *cis* β C), exceto quando indicado no texto. O padrão interno apo-8'-carotenal foi utilizado para estimar a eficiência das extrações. Adicionado à algumas amostras homogeneizadas, escolhidas aleatoriamente, o padrão interno eluiu perto dos 10 minutos de corrida e as áreas dos picos foram comparadas com as de injeções diretas da solução do padrão (Figura 12). Os valores médios de recuperação estiveram sempre acima de 90%, o que auxiliou na confiabilidade dos resultados.

Na natureza os carotenoides se apresentam predominantemente na forma *trans*- β C, que é mais estável, embora pequenas quantidades de isômeros *cis*- β C também possam ser encontrados (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFÁN, 2008). Pode haver alguma variação na proporção *trans*- β C/*cis*- β C dos vegetais, e na presença de outros carotenoides, relacionada à bioquímica particular de cada genótipo. Porém, é o *trans*- β C que está majoritariamente presente nas mandiocas e também batatas-doces melhoradas pelos programas de biofortificação (KIMURA et al., 2007). Embora ocorra isomerização pós-colheita do *trans*- β C nas raízes frescas, geralmente este aparece em maior quantidade do que as formas *cis*.

Raízes cruas das mandiocas, genótipos Saracura e Clone 03-15, apresentaram o menor e o maior teor de β C total MF, respectivamente (Tabela 4). A variedade Saracura tem polpa branca e é tipicamente cultivada na região nordeste para consumo cozida, produção de farinha ou como ingrediente em receitas culinárias. O Clone 14-11, Jari, Clone 03-15, 265-97 e 06-01 foram melhorados geneticamente com a intenção de aumentar a concentração de provitamina A. Os resultados mostraram que eles contém pelo menos 10 vezes mais β C por grama da raiz fresca do que a variedade Saracura. Com exceção do Clone 14-11, os quatro genótipos que foram melhorados por cruzamento contém significativamente mais β C total MF do que seus respectivos parentais (Tabela 4).

Os programas de biofortificação permitiram a geração de novas variedades de mandioca contendo maiores quantidades de βC a partir do aproveitamento da biodiversidade brasileira desta planta. Os genótipos Jari, 265-97, 06-01 e Clone 03-15, apresentaram total βC na faixa de 7 - 10 $\mu\text{g/g}$. Atualmente, eles estão entre os maiores teores de total βC reportados para mandiocas biofortificadas.

Valores de total βC de 7 $\mu\text{g/g}$ MF foram encontrados em cultivares de mandiocas biofortificadas pelo programa *HarvestPlus* para a Nigéria (THAKKAR et al., 2007; THAKKAR et al., 2009). Mandiocas transgênicas visando a biofortificação do mesmo programa foram estudadas por Failla et al. (2012) que determinaram nos genótipos até 6 $\mu\text{g/g}$ MF. Ceballos et al. (2013) apresentaram resultados do cruzamento e seleção rápidas para biofortificação com βC na Colômbia, onde obtiveram progênes com concentração média de 10 $\mu\text{g/g}$ MF.

É importante destacar que o alto teor de total βC não é a característica desejável única nos programas de biofortificação. É necessário selecionar genótipos com potencial para serem amplamente cultivados. Por exemplo, boas características agronômicas, como a resistência à doenças, e de viabilidade econômica, como produtividade e aceitação no mercado. Todos estes aspectos fazem da biofortificação uma tarefa que exige esforço intenso, longo período de dedicação, perspectiva multidisciplinar e atuação em equipes de colaboração (ZANCUL, 2004; MILLER; WELCH, 2013).

O Brasil realiza o melhoramento nutricional de mandioca há algum tempo. Em 1970 a variedade 576-70 foi obtida de um cruzamento que pretendia gerar mandiocas mais produtivas, resistentes à bacteriose, coloração amarela (teor de βC) e características organolépticas mais desejáveis, como a maciez. Bem sucedido, o programa lançou o cultivar 576-70 que hoje é o mais cultivado em São Paulo. Ele foi cruzado com a variedade SRT-797, 'Ouro do vale', e de sua progênie foram selecionados os genótipos 265-97 e 06-01.

Investimentos do *HarvestPlus* iniciados em 2004 intensificaram os programas de melhoramento da mandioca, gerando novos genótipos, incluindo a Jari e os Clones 03-15 e 14-11, no Brasil. A biodiversidade genética de mandioca no Brasil oferece potencial para maiores incrementos de βC . Há grande diversidade de material genético de mandioca oriundas da região amazônica que poderão ser cruzados com outros genótipos para obtenção das características desejadas. Mezette, Blumer, Veasey (2013) identificaram acessos desta região muito ricos em βC , contendo de 19 a 25 $\mu\text{g/g}$ MF.

Tabela 4 – β -caroteno total (β C) em 9 genótipos de mandiocas cruas, cozidas e fritas.^a

Genótipo	β C (μ g/g MF) ^b		
	Crua	Cozida	Frita
Linhagem 1			
Saracura	0,45 \pm 0,06 ^{fA}	0,41 \pm 0,11 ^{fA}	0,34 \pm 0,03 ^{eA}
Dourada	2,4 \pm 0,16 ^{eA}	2,4 \pm 0,26 ^{eA}	2,2 \pm 0,36 ^{dA}
Gema de Ovo	4,0 \pm 0,26 ^{dA}	2,9 \pm 0,44 ^{deB}	3,1 \pm 0,21 ^{dAB}
Clone 14-11	5,3 \pm 0,34 ^{dA}	4,0 \pm 0,43 ^{cdB}	5,0 \pm 0,33 ^{cAB}
Jari	8,1 \pm 0,47 ^{bcB}	6,4 \pm 0,48 ^{abC}	9,1 \pm 0,49 ^{aA}
Clone 03-15	10,3 \pm 1,69 ^{aA}	7,2 \pm 1,14 ^{aB}	7,8 \pm 0,56 ^{bB}
Linhagem 2			
576-70	2,6 \pm 0,32 ^{eA}	2,0 \pm 0,20 ^{eA}	2,5 \pm 0,56 ^{dA}
265-97	7,3 \pm 0,55 ^{cA}	5,3 \pm 0,48 ^{bcB}	5,2 \pm 1,32 ^{cB}
06-01	8,7 \pm 0,23 ^{bA}	7,1 \pm 1,34 ^{aB}	5,9 \pm 1,77 ^{cC}

^a Resultados de β -caroteno total estão expressos em média \pm DP, n=6.

^b Letras minúsculas diferentes nas colunas significam diferença estatística significativa para os genótipos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes nas linhas significam diferença estatística significativa entre as mandiocas cruas, cozidas e fritas ($p < 0,05$).

Observa-se na Tabela 4 a relação entre os processamentos e genótipos sobre o teor de β C. Houve interação estatística significativa entre genótipo e tipo de cocção como causa dos efeitos sobre a concentração de β C total MF ($p < 0,01$). O cozimento causou redução significativa do β C total MF em 6 dos 9 genótipos. A fritura, no entanto, causou redução significativa do teor de β C total MF em relação às mandiocas cozidas, apenas em 1 genótipos, manteve em 5 e aumentou em 3 genótipos (Tabela 4). Importante ressaltar que durante a fritura acontece a perda de água, que pode concentrar os carotenoides no material. Ocorre, também a incorporação de óleo, que pode diluir os carotenoides no material. Conjuntamente, ocorrem os fenômenos de degradação dos carotenoides.

Dentre as mandiocas cozidas, a Jari, o Clone 03-15 e a 06-01 são as que fornecem os maiores teores de β C total MF, enquanto que a Jari frita é a que mais fornece β C total MF dentre todos os genótipos prontos para o consumo.

As quantidades dos isômeros *trans*- β C e das formas do *cis*- β C presentes nas amostras cruas e processadas também foram determinadas (Figura 13 e Tabela 5). O *trans*- β C tem duas vezes maior atividade de vitamina A do que os isômeros *cis*- β C, por que, a quebra do *trans*- β C pela ação da enzima β -caroteno-15,15'-oxygenase 1 ocorre exatamente na dupla ligação central da molécula, partindo-lhe em duas moléculas de retinol (HARRISON, 2012). Desta maneira, a quantificação do total de β C não é mais importante do que proporção *trans*- β C/*cis*- β C e como os procedimentos podem interferir nesta relação

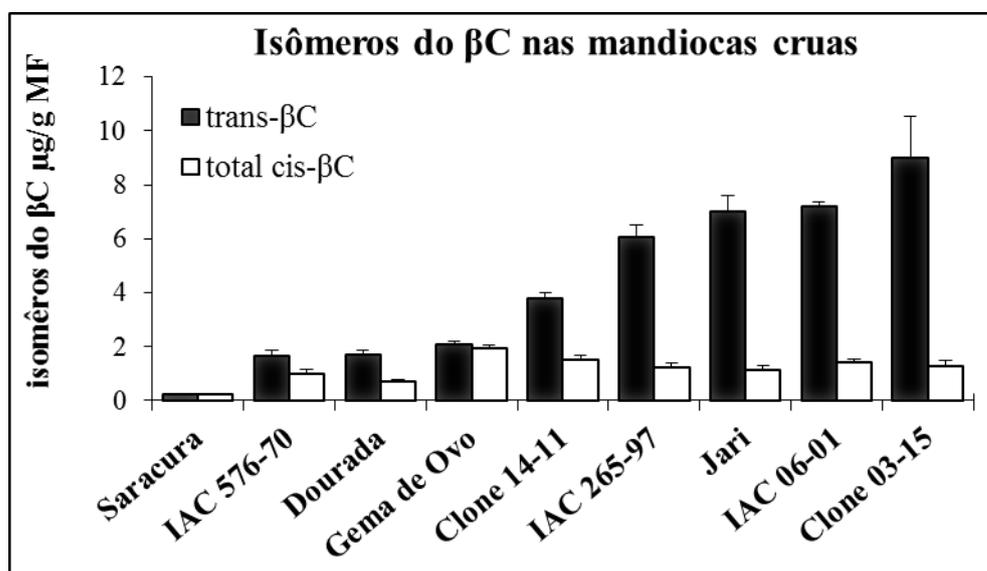


Figura 13 – Isômeros do β C nas mandiocas cruas em μ g/g da matéria fresca (MF). *Trans*- β C na progênie, *i. e.* mandiocas bifortificadas, é significativamente maior ($p < 0,05$) do que nos parentais e controle. Não há diferença significativa ($p < 0,05$) nos teores de *cis*- β C em relação aos parentais e a progênie.

A presença de *cis*- β C é altamente afetada por fatores exógenos que podem induzir a erros de interpretação dos resultados da porcentagem de *trans*- β C (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). Rigorosas precauções foram tomadas para minimizar a isomerização e a degradação de carotenoides durante a colheita, o transporte, o processamento, a remessa aos EUA e os procedimentos analíticos. Detalhadas no método, as precauções incluíram rápido transporte e processamento, redução da incidência de luz, embalagem à vácuo, congelamento à -80°C entre outras. De forma que os resultados estão o mais próximo do valor verdadeiro de *trans*- β C e *cis*- β C que foi possível obter.

A porcentagem de *trans*- β C nos genótipos biofortificados ficou entre 83 e 87% em relação à quantidade total de β C. Os quatro genótipos que possuem os menores teores de total β C, isto é, os parentais tinham somente de 50 a 70% de *trans*- β C. Esta relação pode ser notada na Figura 13. Estes dados indicam que o cruzamento para biofortificação pode ser associado com o aumento seletivo de *trans*- β C.

Kimura et al. (2007) avaliaram a variedade 576-70, e Mezette et al. (2009) analisaram a 576-70 e a 265-97, nos dois casos foi reportada a porcentagem de *trans*- β C maior do que 70%. A variedade Jari apresentou aproximadamente 90% de *trans*- β C na pesquisa de Gomes et al. (2013), enquanto que Ceballos et al. (2013) obtiveram média de 61% de *trans*- β C em progênes no melhoramento convencional de mandioca. Similarmente Failla et al. (2012) encontraram a porcentagem de *trans*- β C próxima de 85% em linhagens transgênicas de mandiocas biofortificadas.

É possível inferir, baseando-se nos resultados apresentados, que o melhoramento de mandioca para aumentar a concentração de carotenoides tende a induzir o acúmulo de *trans*- β C. Esta possibilidade de seletivamente aumentar o teor de *trans*- β C em detrimento do *cis*- β C através do melhoramento genético é realmente relevante em se tratando de redução da DVA. Os dados obtidos, conjuntamente com a literatura científica específica da área mostram que a biofortificação vem sendo bem sucedida nos seus propósitos. Apesar disso, muito ainda é necessário ser feito para desenvolver variedades que possam realmente fornecer adequadas quantidades de β C para atingir as recomendações diárias de ingestão. A estabilidade, a retenção e a atividade de vitamina A dos carotenoides nas mandiocas processadas de acordo com as preparações típicas das populações em risco de DVA são de fundamental importância. Em especial na escolha dos melhores genótipos e modos de preparo.

4.1.2 Estabilidade, retenção e atividade de vitamina A

O preparo doméstico da mandioca, quando não é designada à produção artesanal de farinha, invariavelmente inclui o cozimento. Ela é consumida cozida ou vai posteriormente integrar outras receitas culinárias. A fritura em óleo de soja da mandioca previamente cozida é típica da região sudeste do país, mas também ocorre nas outras regiões. Estes dois estilos mais básicos de preparo expõe os carotenoides das raízes da mandioca à fatores chave para a compreensão da estabilidade e retenção, assim como sua biodisponibilidade, a ação do calor e a presença de oxigênio.

No sentido de reduzir a DVA o perfil dos isômeros do β C é de grande relevância pois somente o *trans*- β C pode ser partido centralmente originando duas moléculas de retinol. Já as formas *cis*- β C produzem apenas uma molécula de retinol (HARRISON, 2012). Portanto o *cis*- β C apresenta menor atividade de vitamina A e conseqüentemente os fenômenos de isomerização do *trans*- β C em *cis*- β C e a degradação dos dois à compostos de baixo peso molecular é extremamente indesejável.

Vários processos bioquímicos podem afetar a quantidade e o perfil dos isômeros dos carotenoides durante a cocção das raízes. Ocorrem principalmente a oxidação induzida pelo calor e presença de oxigênio, causando a isomerização e a degradação, e também o intercâmbio de massa, de água fervente ou óleo quente, alterando as concentrações dos carotenoides no alimento pronto. O intercâmbio de massa pode mascarar efeitos da degradação dos carotenoides conduzindo à erros nos cálculos de retenção (MERCADANTE, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Os dois fenômenos puderam ser notados nos resultados obtidos, apresentados na Tabela 5 e na Figura 14.

Na Tabela 5 os resultados estão expressos em matéria fresca (MF) e possuem relevância nutricional. A partir deles foi possível calcular o potencial de equivalência de retinol. Houve redução significativa dos teores de *trans*- β C e aumento significativo dos teores de *cis*- β C nos genótipos da progênie quando comparadas as mandiocas processadas com as cruas. Ao comparar as mandiocas fritas com as cozidas o genótipo Jari teve aumento significativo e o 06-01 teve redução significativa de *trans*- β C. Nota-se que a mandioca Jari teve, durante a fritura, perda de água (~10%) e pouco ganho de óleo (~1,5%), já a mandioca 06-01 teve perda de água (~25%) e alto ganho de óleo (~13%) com a fritura. O teor de *cis*- β C foi maior nas mandiocas fritas do que nas cozidas somente para os genótipos Clone 14-11, Jari e 265-97. A mandioca 06-01 teve redução do teor de *cis*- β C na fritura em relação à cozida.

Tabela 5 – *Trans*- β C, *cis*- β C, retinol equivalente (RE) e porcentagem da ingestão diária recomendada (%IDR) em 9 genótipos de mandiocas cruas, cozidas e fritas^a

Genótipo	<i>trans</i> - β C (μ g/g MF) ^b			<i>cis</i> - β C (μ g/g MF) ^b			RE ^c (μ g/100g MF) ^b		% IDR ^d	
	Crua	Cozida	Frita	Crua	Cozida	Frita	Cozida	Frita	Cozida	Frita
Linhagem 1										
Saracura	0,23± 0,04 ^{fA}	0,20± 0,07 ^{eA}	0,20± 0,02 ^{fA}	0,22± 0,03 ^{dA}	0,17± 0,05 ^{dA}	0,15± 0,02 ^{fA}	4,7± 1,5 ^{eA}	4,4± 0,5 ^{dA}	1,0	1,0
Dourada	1,70± 0,17 ^{eA}	1,42± 0,07 ^{dA}	1,24± 0,40 ^{eA}	0,73± 0,05 ^{cA}	1,02± 0,28 ^{cA}	1,00± 0,37 ^{eA}	32,2± 2,2 ^{dA}	29,1± 5,6 ^{cA}	7,1	6,5
Gema de Ovo	2,07± 0,15 ^{eA}	1,46± 0,14 ^{dA}	1,59± 0,10 ^{eA}	1,96± 0,12 ^{aA}	1,42± 0,31 ^{bB}	1,48± 0,12 ^{dB}	36,2± 4,8 ^{cdA}	38,9± 2,6 ^{cA}	8,0	8,6
Clone 14-11	3,78± 0,21 ^{dA}	2,27± 0,36 ^{cB}	2,61± 0,14 ^{dB}	1,51± 0,19 ^{bB}	1,75± 0,18 ^{bB}	2,37± 0,21 ^{bA}	52,6± 6,5 ^{cA}	63,5± 3,9 ^{bA}	11,7	14,1
Jari	7,01± 0,59 ^{bA}	4,28± 0,33 ^{bC}	6,03± 0,34 ^{aB}	1,13± 0,15 ^{bC}	2,08± 0,20 ^{aB}	3,10± 0,19 ^{aA}	89,0± 6,7 ^{abB}	127,0± 6,9 ^{aA}	19,8	28,2
Clone 03-15	8,99± 1,56 ^{aA}	5,09± 0,85 ^{aB}	5,45± 0,40 ^{bB}	1,30± 0,18 ^{bB}	2,13± 0,31 ^{aA}	2,30± 0,19 ^{bA}	103,0± 16,6 ^{aA}	110,0± 8,0 ^{aA}	22,9	24,4
Linhagem 2										
576-70	1,64± 0,24 ^{eA}	1,11± 0,11 ^{dA}	1,34± 0,32 ^{eA}	0,98± 0,20 ^{cA}	0,87± 0,10 ^{cA}	1,11± 0,25 ^{eA}	25,8± 2,5 ^{dA}	31,7± 7,4 ^{cA}	5,7	7,0
265-97	6,06± 0,44 ^{cA}	3,78± 0,27 ^{bB}	3,40± 0,90 ^{cB}	1,25± 0,16 ^{bB}	1,48± 0,39 ^{bB}	1,82± 0,43 ^{cA}	75,6± 5,7 ^{bA}	72,0± 18,6 ^{bA}	16,8	16,0
06-01	7,22± 0,16 ^{bA}	4,74± 0,87 ^{aB}	3,93± 1,11 ^{cC}	1,44± 0,09 ^{bC}	2,33± 0,49 ^{aA}	1,99± 0,66 ^{cB}	98,8± 18,5 ^{aA}	82,2± 24,1 ^{bB}	22,0	18,3

^a Resultados estão expressos em média ± DP, n=6. ^b Letras minúsculas diferentes nas colunas significam diferença estatística significativa para os genótipos (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes nas linhas significam diferença estatística significativa entre as mandiocas cruas, cozidas e fritas (p<0,05). ^c RE foi calculado de acordo com a FAO (2001), assumindo que aproximadamente 33% do β C está disponível para absorção e que a conversão em vitamina A é de 50% para o *trans*- β C e de 25% para os *cis*- β C (SCOTT; RODRIGUEZ-AMAYA, 2000) ^d Ingestão diária recomendada de 450 μ g de RE por dia para crianças de 4 a 6 anos de idade. %IDR calculada sobre porção de 100g de mandioca cozida ou frita pronta para consumo.

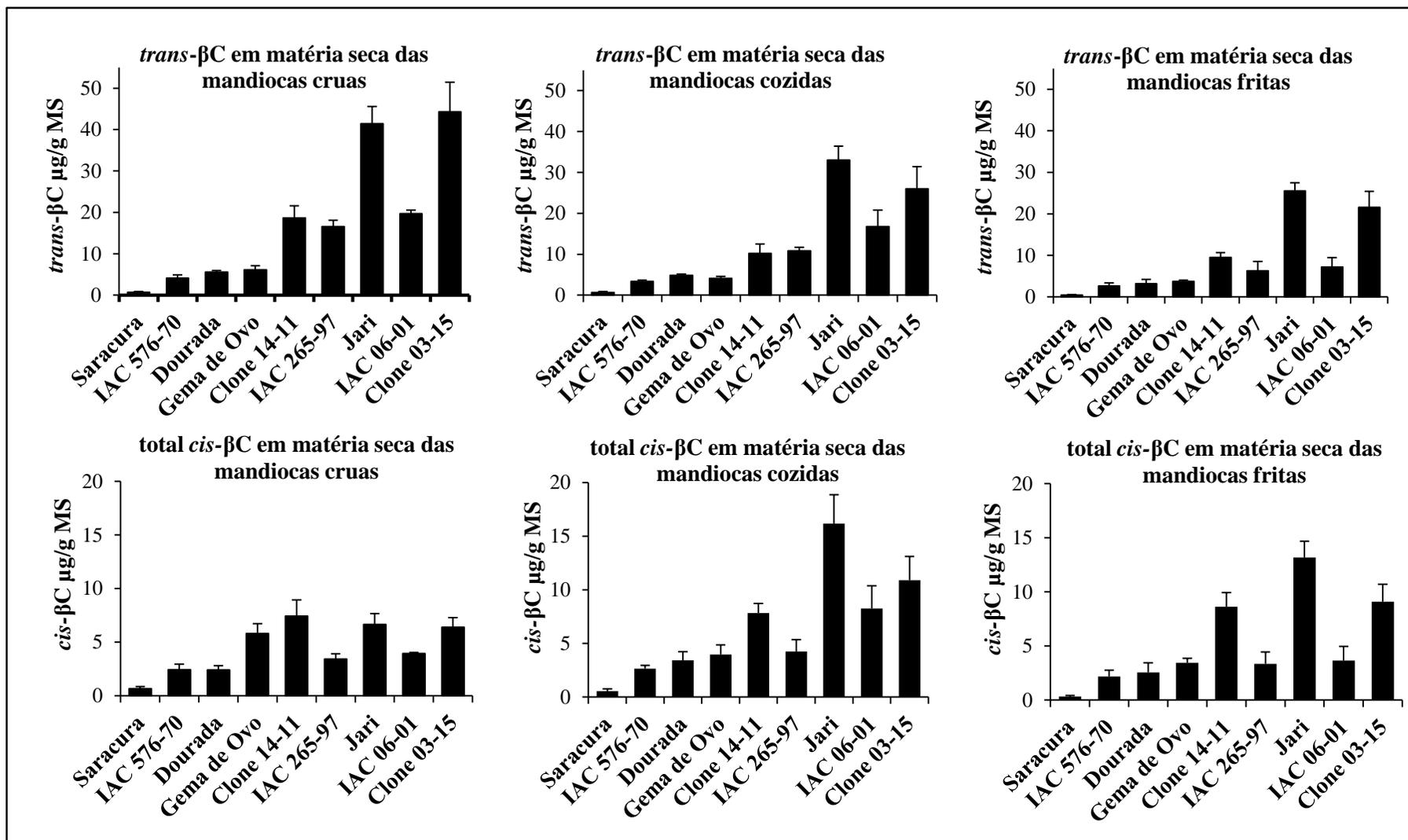


Figura 14 – Teores de *trans*-βC, na seqüência superior, e total *cis*-βC, na seqüência inferior, em mandiocas cruas, cozidas e fritas, respectivamente, da esquerda para a direita, em μg/g da matéria seca (MS). Cozimento e fritura significativamente reduzem ($p < 0,05$) o teor de *trans*-βC enquanto que as mesmas cocções aumentam significativamente ($p < 0,05$) o teor de *cis*-βC, em relação às mandiocas cruas

O teor de retinol equivalente (RE) considera as quantidades de *trans*- β C e *cis*- β C em $\mu\text{g}/100\text{g}$ na mandioca pronta para o consumo. Ele representa o potencial que uma porção de 100g da mandioca tem em ser absorvido e convertido em retinol plasmáticos (SCOTT; RODRIGUEZ-AMAYA, 2000). Os genótipos biofortificados analisados apresentam maiores quantidades de RE do que os seus respectivos parentais, tanto para as mandiocas cozidas quanto fritas (Tabela 5). A fritura significativamente aumentou o potencial de RE da Jari, mas diminuiu na 06-01, fatos relacionados com as trocas de massa ocorridas nestes genótipos.

Para crianças de 4 a 6 anos de idade a ingestão diária recomendada (IDR) de RE é $450\mu\text{g}$, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA na resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005). Uma porção de 100g das mandiocas biofortificadas pode fornecer de 11 a 28% da IDR para este grupo infantil, dependendo do genótipo e do tipo de cocção (Tabela 5). A mandioca Jari frita é a que apresentou a maior porcentagem da IDR, e pode fornecer até 28 vezes mais RE do que a Saracura. Mezette et al. (2009) apresentaram resultados das variedades 576-70 e 265-97, cultivadas em 2006 na região de Engenheiro Coelho-SP, que poderiam fornecer valores de porcentagem da IDR, quando cozidas, muito similares aos encontrados, isto é, aproximadamente 6% e 16% para os mesmos genótipos. Isso demonstra certa estabilidade dos genótipos quando cultivados em condições edafoclimáticas parecidas.

Na Figura 14 os resultados estão expressos em matéria seca (MS) e são relevantes para a compreensão do impacto dos processamentos sobre o *trans*- β C e os *cis*- β C. A partir deles foi possível calcular a retenção dos carotenoides. Nota-se nos gráficos de *trans*- β C e *cis*- β C das mandiocas cruas que os genótipos da Linhagem 1 possuem maior concentração desses carotenoides na matéria seca. Processamentos que causem desidratação parcial de suas raízes pode ser interessante, pois irá concentrar os carotenoides, como ocorre com a Jari frita.

Comparando os gráficos da figura 14, das mandiocas cruas com as cozidas e as fritas, observa-se a redução significativa dos teores de *trans*- β C e aumento significativo dos teores de *cis*- β C causados pela cocção ($p < 0,01$). Pelos resultados destes carotenoides em base de matéria seca é visível a isomerização do *trans*- β C em *cis*- β C, principalmente com o cozimento. Concomitantemente, mas em menor intensidade, acontece a degradação tanto do *trans*- β C quanto do *cis*- β C por oxidação. Por isso, alguns genótipos apresentam também a redução do *cis*- β C nas amostras fritas em relação às amostras cozidas. Do mesmo modo, as mandiocas Jari e Clone 03-15, que contém as maiores quantidades de *trans*- β C no material inicial (crus), apresentam o maior incremento de isômeros *cis*- β C quando cozidas e, em seguida, redução do *cis*- β C quando fritas.

A isomerização do *trans*- β C se deu preferencialmente na forma de 13-*cis*- β C. Por exemplo, as raízes da mandioca Jari continham em média 3,1 μ g/g MS de 13-*cis*- β C quando cruas e 9,4 μ g/g MS quando fritas. Outros trabalhos também fizeram a mesma observação em mandiocas melhoradas convencionalmente, transgênicas ou naturalmente com β C (THAKKAR et al., 2009; FAILLA et al., 2012; CEBALLOS et al., 2012). De fato, é bem estabelecido que altas temperaturas induzem a isomerização da forma toda *trans* do betacaroteno inicialmente na dupla ligação do carbono 13, gerando o 13-*cis*- β C, por causa da energia de ativação da isomerização na região próxima ao centro da cadeia carbônica é menor do que nas outras duplas ligações (MERCADANTE, 2007; ZECHMEISTER, 1944).

Embora o preparo claramente reduza os conteúdos de β C nas mandiocas seguindo as vias de degradação preconizadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001), a intensidade da isomerização e da degradação é dependente do genótipo observado. Houve interação estatisticamente significativa entre genótipo e tipo de cocção como causas dos efeitos sobre o teor de *trans*- β C e *cis*- β C na matéria seca ($p < 0,01$). Estes resultados confirmam as publicações de outros pesquisadores. Iglesias et al. (1997) avaliaram o efeito da cocção sobre a retenção de carotenoides em acessos de mandioca da Colômbia visando a melhor escolha para o melhoramento e concluíram que há interação dos genótipos com a cocção. A mesma conclusão foi apresentada por Vimala et al. (2011) que avaliaram variedades de mandioca de polpa amarela da Índia submetidas à diferentes formas de processamento, como a secagem, cozimento e torra.

A retenção é um importante fator para avaliar o impacto dos processamentos sobre os teores de β C. Por isso, é de fundamental importância que a retenção seja calculada em MS ou considere o balanço de massa, isto é, peso das amostras antes e depois dos processamentos. Somente assim é possível evitar os enganos que podem ocorrer com o cálculo da retenção do β C. Valores de retenção de β C superiores à 100% geralmente são causados por equívocos de cálculo, ou de extração dos carotenoides. Se for calculada a retenção do *cis*- β C isoladamente, é provável a obtenção de valores maiores de 100% causada pela isomerização do *trans*- β C. Se isso ocorrer com a retenção do total de β C ou do *trans*- β C mesmo quando é considerado o balanço de massa, é por que a metodologia de extração não está adequada ao tipo de amostra, e precisa ser revista (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004).

A retenção do *trans*- β C foi calculada com os resultados em MS e estão apresentados na Figura 15.

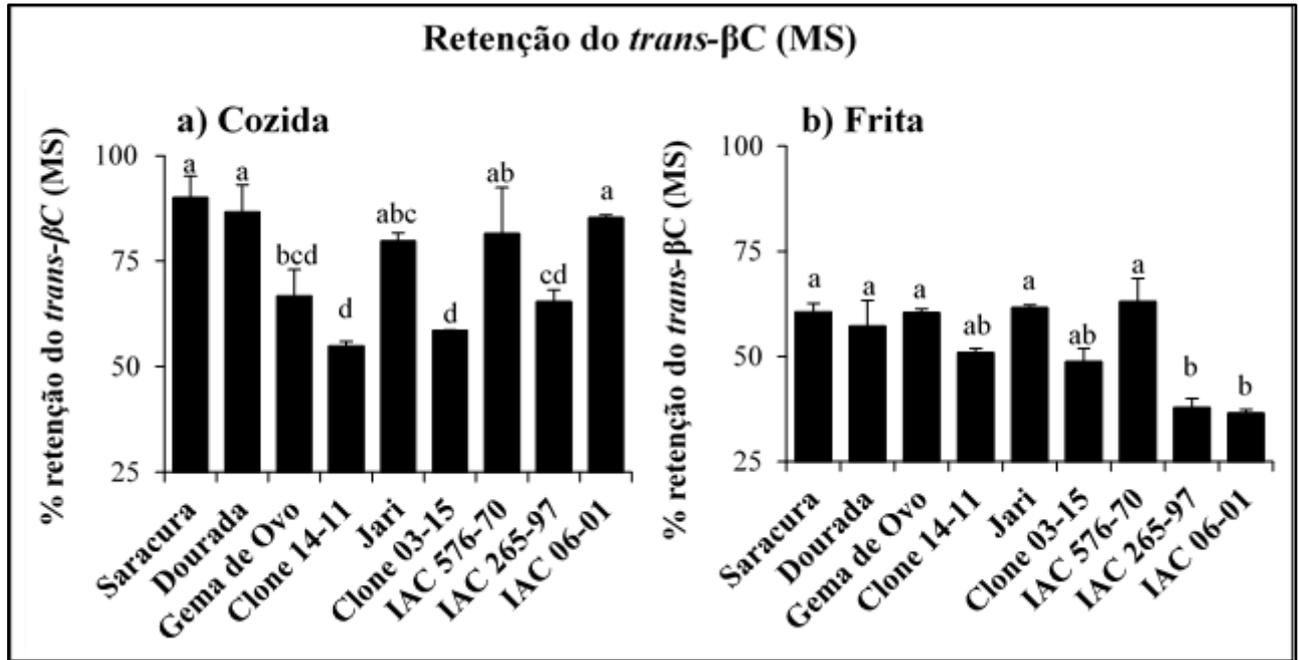


Figura 15 – Resultados de retenção do *trans*-βC obtidos para as mandiocas cozidas e fritas. Os valores são calculados em base de matéria seca (MS) para evitar a interferência do ganho ou perda de água durante a cocção. Resultados expressão a porcentagem de *trans*-βC que permaneceu nas amostras processadas em relação à mandioca crua. Letras diferentes em cada gráfico significam diferença estatística entre os genótipos ($p < 0,05$). Há interferência estatisticamente significativa dos modos de cocção ($p < 0,01$)

A retenção do *trans*-βC nas amostras cozidas variou de 55 a 90% e nas amostras fritas de 36 a 63% (Figura 15). A retenção nas mandiocas fritas foi significativamente menor do que nas mandiocas cozidas. Tanto pela fritura ser realizada nas mandiocas previamente cozidas, como também por utilizar maior temperatura (180°C) do que a do cozimento. Houve interferência dos genótipos sobre a retenção do *trans*-βC, no entanto, esta interferência foi maior durante o cozimento. Já na fritura houve maior homogeneidade dos valores de retenção, as exceções foram os genótipos 265-97 e o 06-01, com os menores resultados de retenção. Não houve correlação significativa entre a retenção do *trans*-βC com o tempo de cozimento, umidade, lipídeos ou teor inicial de carotenoides. De maneira que outro fator intrínseco aos genótipos deve ser o responsável pelas diferenças encontradas, em especial nas amostras cozidas.

Recente estudo da mandioca Jari apresentou valores de retenção do *trans*-βC de 59%, quando cozida em panela de pressão por 45min, e de 48%, quando cozida e frita em óleo de soja por 8min (GOMES et al., 2013). Vimala et al. (2011) estudaram a retenção do βC em

mandiocas de polpa amarela submetidas a diversos processamentos. Seus resultados apontaram que a retenção é relacionada ao tipo de processamento, sendo que a maior retenção ocorreu nas amostras secas em forno (63 a 95%), seguidas das amostras cozidas (47 a 83%) e por fim as amostras fritas (48 a 79%).

Os resultados encontrados na literatura corroboram com a afirmação de que a retenção do β C em mandiocas submetidas ao cozimento é maior do que nas mandiocas fritas. A extensão do impacto destes procedimentos é dependente das características da matriz alimentar dos diferentes genótipos. Assim os estudos da retenção do β C nas mandiocas biofortificadas pode auxiliar na seleção dos genótipos que serão adotados e na melhor indicação de como prepará-los, tirando o melhor proveito possível das novas variedades. Ressaltando que há outro fator que não pode ser desconsiderado pelos programas de biofortificação, a biodisponibilidade. Esta também sofre influência dos processamentos e da composição físico-química dos alimentos.

4.1.3 Biodisponibilidade dos carotenoides por digestão *in vitro*

A biodisponibilidade refere-se à quantidade dos carotenoides que foram liberados das estruturas celulares das raízes e, em seguida, puderam ser incorporados às micelas lipídicas mistas que são formadas pela ação dos sais de bile. As micelas se tornam solúveis na fase aquosa do alimento digerido, ou o quimo alimentar, podendo migrar até o tecido epitelial do intestino onde serão absorvidas pelos enterócitos (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005).

Para analisar a biodisponibilidade foi aplicado um método composto pela simulação *in vitro* das três fases, oral, gástrica e intestinal. A fase oral é necessária para digerir os amidos, que compõem grande parte dos alimentos estudados. Após a fase intestinal é possível retirar alíquotas para análises dos teores de carotenoides que fornecem duas informações importantes, a estabilidade à digestão e eficiência de micelarização. Este método vem sendo utilizado positivamente para diversos tipos de alimentos, entre eles, mandioca, batata-doce, cereais, cenouras e refeições (THAKKAR et al., 2007; GOMES et al., 2013; FAILLA; THAKKAR; KIM, 2009; KEAN; HAMAKER; FERRUZZI, 2008; HEDRÉN; DIAZ; SVANBERG, 2002).

A estabilidade dos carotenoides à digestão é a quantidade de βC recuperado no material digerido em relação à quantidade existente no material inicial, isto é, antes da digestão. Dos 9 genótipos, 8 foram digeridos para análises, a mandioca Saracura não possui carotenoides suficientes para ser analisada. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

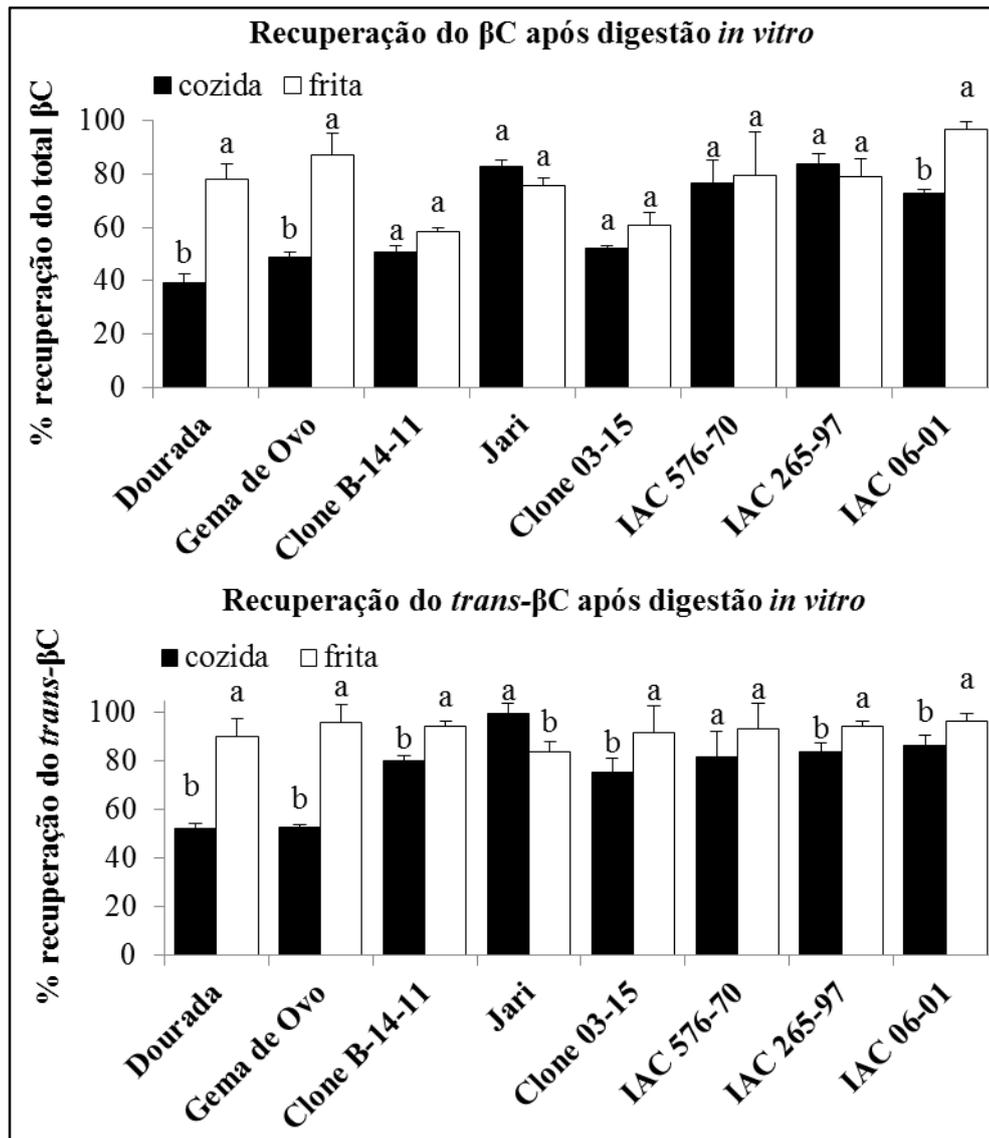


Figura 16 – Resultados da porcentagem de recuperação do total de βC , gráfico superior, e do *trans*- βC , gráfico inferior, obtidos para as mandiocas cozidas e fritas. Letras diferentes entre barras pretas (cozidas) e brancas (fritas) para cada genótipo significam diferença estatística entre os modos de cocção ($p < 0,01$)

Em geral a recuperação do total β C ficou acima de 60%, com algumas exceções. A recuperação do *trans*- β C foi maior do que 70% para quase todos os genótipos, sejam eles cozidos ou fritos. No caso dos genótipos Dourada, Gema de Ovo, Clone 14-11 e Clone 03-15, quando cozidos, tiveram baixos resultados de recuperação do total β C (entre 40 e 50%). O que ocorreu foi maior degradação dos isômeros *cis*- β C durante os procedimentos da simulação da digestão, o que poderia ser esperado, haja visto a maior instabilidade destes isômeros.

São tomadas precauções para evitar esta deterioração enquanto as amostras estão dentro dos tubos de análises durante a digestão, como o preenchimento dos tubos com N_2 e a manutenção dos tubos em cesta de gelo no intervalo das etapas de digestão. No entanto, certa instabilidade do β C durante a digestão acontece por que estes se encontram num meio propício para os fenômenos de degradação. Etapas passam por mudanças bruscas de acidez, reações enzimáticas intensas, agitação, temperatura (37°C) em uma solução aquosa que possui oxigênio dissolvido.

Mesmo assim, os resultados do presente trabalho e, também de trabalhos anteriores, demonstram manutenção dos carotenoides durante a simulação *in vitro* da digestão. São comuns os resultados de recuperação dos carotenoides entre 80% e 100%. Como é o caso da recuperação do *trans*- β C após a digestão *in vitro* de todas as mandiocas fritas (Figura 16)

Mandiocas com altos teores de carotenoides, melhoradas geneticamente por cruzamento ou por transgenia, preparadas por cozimento, fermentação e farinha foram submetidas à simulação *in vitro* da digestão, utilizando a mesma metodologia. Estas apresentaram resultados de recuperação do *trans*- β C entre 75% e 90% (FAILLA et al., 2012; THAKKAR et al., 2009; THAKKAR et al., 2007). Em outros vegetais os isômeros do β C mostraram-se mais estáveis durante a digestão, ocorrendo isomerização e degradação minimamente, mas com efeitos dependentes da matriz estudada (FERRUZZI et al., 2006; O'SULLIVAN et al., 2010).

O β C que permaneceu no digerido ao final da digestão e que tenha sido liberado de dentro das estruturas celulares precisa necessariamente ser incorporado às micelas lipídicas mistas para se tornarem acessíveis à absorção nas microvilosidades das células epiteliais do intestino, e sofrerem a clivagem em retinol e distribuição aos tecidos periféricos (VAN BUGGENHOUT et al., 2010). Para avaliar a micelarização, é preciso realizar uma etapa de centrifugação do digerido que separe a fração aquosa na qual as micelas estão emulsionadas

pela ação dos sais biliares (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005). A relação do β C extraído da fração aquosa com a quantidade inicial de β C nas amostras permite gerar os resultados de eficiência de micelarização (EM) que estão apresentados nas figuras 17 e 18.

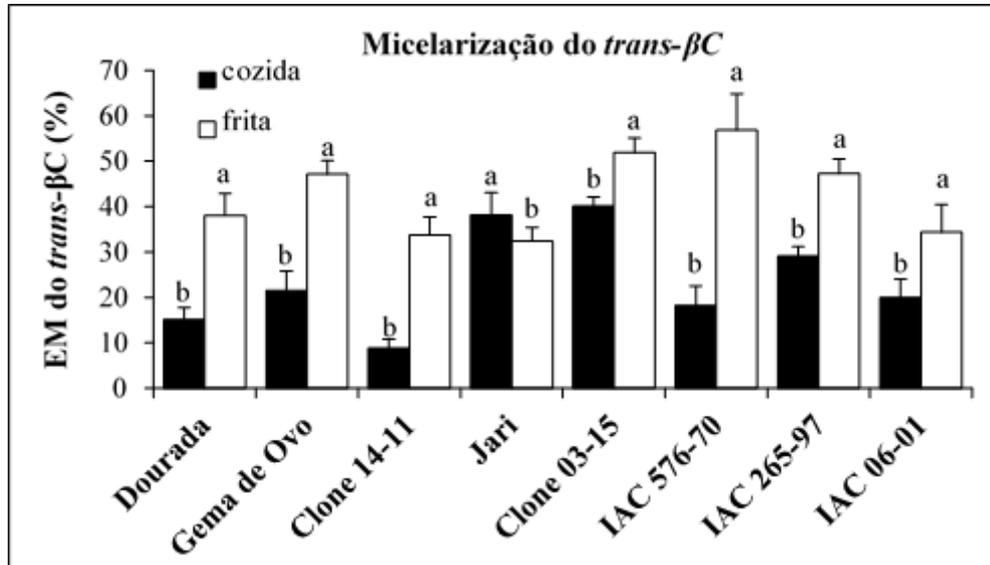


Figura 17 – Eficiência de micelarização (EM) do *trans*- β C obtidos para as mandiocas cozidas e fritas. A EM refere-se à proporção do *trans*- β C que foi liberada da matriz alimentar e incorporada às micelas que estão emulsionadas na fração aquosa do digerido por ação da simulação *in vitro* da digestão. Letras diferentes entre barras pretas (cozidas) e brancas (fritas) para cada genótipo significam diferença estatística entre os modos de cocção ($p < 0,01$)

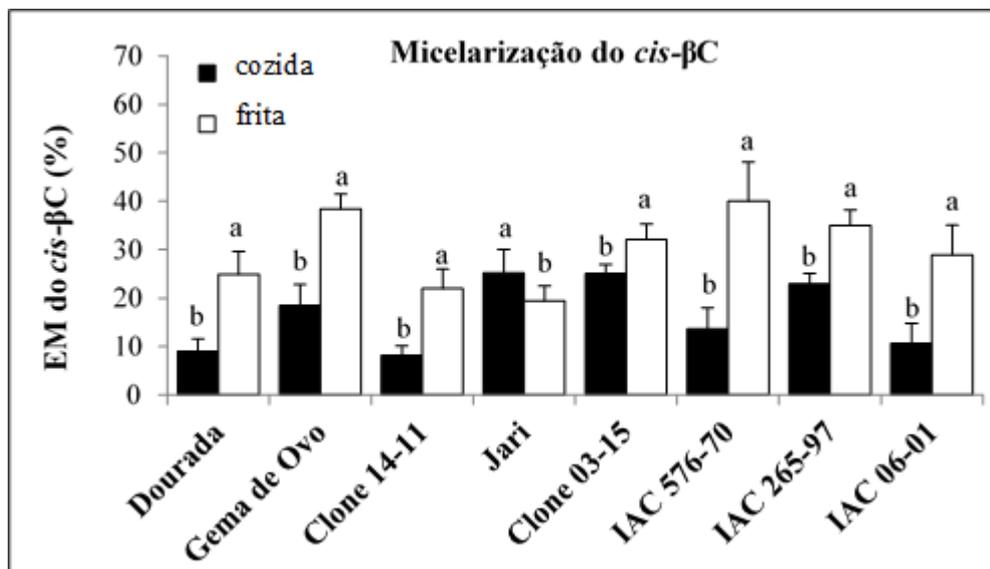


Figura 18 – Resultados de eficiência de micelarização (EM) do *cis*- β C obtidos para as mandiocas cozidas e fritas. A EM refere-se à proporção do *cis*- β C que foi liberada da matriz alimentar e incorporada às micelas que estão emulsionadas na fração aquosa do digerido por ação da simulação *in vitro* da digestão. Letras diferentes entre barras pretas (cozidas) e brancas (fritas) para cada genótipo significam diferença estatística entre os modos de cocção ($p < 0,01$).

Foi observada grande variação na EM dos isômeros do β C nas mandiocas cozidas, isto é, 9 – 40%, dependendo do genótipo (Figura 17). Mesmo com esta variação causada pelas diferentes matrizes alimentares os resultados foram condizentes com pesquisas anteriores realizadas em genótipos de mandiocas melhoradas na Nigéria e em genótipos modificados geneticamente (transgenia) cultivados em Porto Rico. No material da Nigéria observou-se EM entre 25% e 30% de acordo com o genótipo, e correlação positiva entre o teor inicial de *trans*- β C e a quantidade de *trans*- β C na fração aquosa (THAKKAR et al., 2007). No material transgênico a EM do *trans*- β C variou de 30% a 45% dependendo do cultivar (FAILLA et al., 2012). Os resultados destes autores são consistentes com os obtidos (Figura 17), porém, as evidências apontam para maior homogeneidade nas características físico-químicas da polpa das mandiocas estudadas por eles.

A faixa de EM do *trans*- β C nas amostras fritas foi de 19% a 56% e foi estatisticamente maior do que a EM do *trans*- β C nas amostras cozidas ($p < 0,05$) (Figura 17). Isto significa que a fritura é capaz de aumentar a biodisponibilidade do β C. De fato, a fritura aumentou a EM do *trans*- β C nos 7 dos 8 genótipos analisados em 1,3 até 3,7 vezes. A intensidade do aumento foi relacionada ao genótipo observado, de forma que houve interação genótipo x tipo de cocção confirmada pela análise estatística ($p < 0,01$). A maior capacidade de absorver óleo durante a fritura das mandiocas da linhagem 2 resultou em maior aumento da EM do *trans*- β C.

A observação do aumento da biodisponibilidade com a fritura era esperada, visto que os lipídeos facilitam a solubilização e consequente micelarização dos carotenoides. Do mesmo modo que as vitaminas lipofílicas que são dependentes da existência de lipídeos nas refeições para ficarem acessíveis à absorção, os carotenoides precisam de quantidades mínimas de óleo para estarem bioacessíveis. A quantidade e o tipo de lipídeo também influencia a biodisponibilidade de carotenoides, em especial aqueles com maior presença de ácidos graxos insaturados, como o óleo de soja. (FAILLA et al., 2014).

A mandioca Jari foi a única exceção dentre os genótipos que não tiveram aumento da micelarização do *trans*- β C e do *cis*- β C (Figuras 17 e 18). Ao contrário, apresentou pequena, mas significativa ($p < 0,05$), redução com a fritura. Gomes et al. (2013) estudaram este genótipo em relação à micelarização do β C e encontraram duas vezes mais β C incorporado nas micelas após a digestão em amostras fritas do que em amostras cozidas. Este aparente contraste pode ser explicado pelas diferenças no processamento, análise e comportamento da matriz. Os autores cozinharam a mandioca Jari em panela de pressão por 30 minutos, na sequência elas foram fritas em óleo de soja à 180°C por 8 minutos. Estes processamentos resultaram em 0,6% e 11% de lipídeos (MF) nas amostras cozidas e fritas, respectivamente. Em oposição, os

procedimentos aplicados no presente trabalho resultou em aumento do teor de lipídeos de 0,3% à somente 2% com fritura da mandioca cozida por imersão.

A análise da EM do *cis*- β C durante a digestão das mandiocas cozidas e fritas detectou valores que foram em geral menores, e significativos para alguns genótipos, do que a micelarização do *trans*- β C. No entanto, o efeito da fritura sobre a EM do *cis*- β C foi o mesmo para o *trans*- β C. A fritura aumentou a EM do *cis*- β C, a intensidade do aumento foi dependente do genótipo e houve maior aumento para os genótipos da linhagem 2.

A menor EM do *cis*- β C contrasta com estudos prévios que não observaram diferenças na capacidade de micelarização destes isômeros (THAKKAR et al., 2007; FAILLA et al., 2012). No entanto, Levin e Mokady (1995) demonstraram que a incorporação dos isômeros *cis*- β C ocorre mais rápida e facilmente do que o *trans*- β C nos testes *in vitro*. Tyssandier et al. (2003) também encontraram maior proporção dos isômeros *cis*- β C na fração aquosa de vegetais processados e submetidos à digestão *in vitro*. Muitos fatores relacionados com a capacidade de micelarização dos isômeros do β C não estão completamente desvendadas. Por exemplo, a relação entre diferentes proporções dos isômeros, competição entre diferentes carotenoides, interferência de outros componentes da matriz, e em diferentes tipos de óleo.

Considerando que a EM representa um fator relativo, há a necessidade de identificar, enfim, qual genótipo processado de qual maneira pode fornecer a maior quantidade de provitamina A para o organismo. Os valores absolutos de β C emulsionados na fração aquosa estão em função tanto da micelarização quanto da retenção dos carotenoides. Na tabela 6 encontram-se os resultados de β C biodisponível após a digestão *in vitro*, por 100g de mandioca pronta para o consumo, de cada um dos 8 genótipos avaliados.

Tabela 6 – β C biodisponível em $\mu\text{g}/100\text{g}$ da matéria fresca em 8 genótipos de mandiocas cozidas e fritas prontas para consumo^a

Genótipo	β C biodisponível ($\mu\text{g}/100\text{g MF}$) ^b					
	Total β C		<i>Trans</i> - β C		Total <i>cis</i> - β C	
	Cozida	Frita	Cozida	Frita	Cozida	Frita
Linhagem 1						
Dourada	30 \pm 2,8 ^{fB}	73 \pm 4,3 ^{fA}	21 \pm 3,3 ^{dB}	48 \pm 1,6 ^{fA}	9 \pm 2,3 ^{dB}	25 \pm 2,9 ^{fA}
Gema de Ovo	56 \pm 1,3 ^{eB}	132 \pm 5,3 ^{eA}	30 \pm 1,9 ^{dB}	75 \pm 5,2 ^{eA}	26 \pm 1,4 ^{cB}	57 \pm 1,4 ^{cdA}
Clone 14-11	35 \pm 4,8 ^{fB}	138 \pm 2,6 ^{eA}	21 \pm 4,2 ^{dB}	86 \pm 1,4 ^{eA}	14 \pm 1,7 ^{dB}	52 \pm 1,2 ^{dA}
Jari	216 \pm 21,7 ^{bB}	255 \pm 12,9 ^{bA}	163 \pm 29,8 ^{bbB}	195 \pm 18,3 ^{bA}	52 \pm 6,2 ^{aB}	60 \pm 4,3 ^{bcA}
Clone 03-15	258 \pm 3,5 ^{aB}	352 \pm 19,8 ^{aA}	206 \pm 4,0 ^{aB}	278 \pm 21,1 ^{aA}	53 \pm 1,6 ^{aB}	74 \pm 5,4 ^{aA}
Linhagem 2						
576-70	32 \pm 1,6 ^{fB}	122 \pm 8,2 ^{eA}	20 \pm 3,3 ^{dB}	78 \pm 7,0 ^{eA}	12 \pm 2,3 ^{dB}	44 \pm 1,7 ^{eA}
265-97	140 \pm 16,7 ^{cB}	225 \pm 5,7 ^{eA}	106 \pm 13,1 ^{cB}	162 \pm 5,6 ^{eA}	34 \pm 5,9 ^{bbB}	64 \pm 1,7 ^{bA}
06-01	118 \pm 6,2 ^{dB}	195 \pm 5,0 ^{dA}	93 \pm 6,9 ^{cB}	137 \pm 25,4 ^{dA}	25 \pm 2,3 ^{cB}	58 \pm 13,5 ^{bcA}

^a β C biodisponível refere-se à quantidade de β C que foi liberada de dentro das células e incorporada às micelas na fração aquosa obtida após a simulação da digestão *in vitro*. Resultados estão expressos em média \pm DP, n=6. ^b Letras minúsculas diferentes nas colunas significam diferença estatística significativa para os genótipos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes nas linhas significam diferença estatística significativa entre as mandiocas cozidas e fritas ($p < 0,05$).

Os resultados da tabela 6 apontam três observações relevantes. A primeira de que os programas de biofortificação produziram as variedades Jari, Clone 03-15, 265-97 e 06-01 que fornecem até 8,5 vezes mais β C biodisponível total do que os parentais, se cozidas até textura adequada, e até 5 vezes mais, se fritas após o cozimento. O clone 14-11 é uma exceção que não diferiu dos parentais neste caso. A fritura da mandioca previamente cozida significativamente aumentou as quantidades de *trans*- β C e *cis*- β C biodisponível em todas as variedades estudadas. De modo que mesmo a fritura apresentando menor retenção do β C isto é compensado pela maior micelarização dos mesmos. E, por fim, que existe interação significativa entre genótipos e os tipos de cocção como causa dos efeitos sobre a biodisponibilidade do β C nas mandiocas. O que equivale dizer que é possível definir os melhores tipos de cocção para cada cultivar, e quais os procedimentos mais adequados para que o consumidor tenha o melhor proveito das variedades biofortificadas.

Dentre a progênie da linhagem 1 o genótipo Clone 03-15 apresentou as maiores quantidades de total β C, *trans*- β C, e *cis*- β C biodisponíveis por porção de 100g de mandioca pronta para o consumo (cozida ou frita). Dentre a progênie da linhagem 2 foi o genótipo 265-97 que se destacou fornecendo as maiores quantidades de total β C, *trans*- β C, e *cis*- β C biodisponíveis por porção. Estes dois genótipos estão até o presente momento em estudo para lançamento como cultivares biofortificadas, e portanto, são cultivados em campos experimentais exclusivos para pesquisa.

Há relação interessante que foi identificada por Thakkar et al. (2007) em mandiocas desenvolvidas na Nigéria e processada por métodos típicos de cocção naquele país. Eles encontraram forte correlação positiva entre a quantidade de β C micelarizado e a concentração de β C na polpa das mandiocas *in natura*. A mesma correlação foi obtida com a aplicação do teste de correlação de Pearson com os resultados do presente trabalho. As correlações estão mostradas na Figura 19.

O β C micelarizado durante a simulação *in vitro* da digestão dos genótipos de mandioca estudados foi diretamente proporcional ao teor de β C nas raízes frescas dos respectivos genótipos processados ($p < 0,01$, $r = 0,948$). Há também o mesmo tipo de correlação do total β C e do *trans*- β C biodisponíveis com os conteúdos do mesmo carotenoide nas mandiocas cozidas e fritas (Figura 19). Observa-se que as linhas de tendência das mandiocas fritas estão localizadas acima das linhas de tendência das mandiocas cozidas, o que indica a maior biodisponibilidade do β C com a fritura. Os valores de r mais próximos de 1 para as correlações do *trans*- β C são consequência de sua maior presença, estabilidade e micelarização nos genótipos estudados.

A conclusão que pode ser obtida com estas correlações é que, mesmo havendo interação do genótipo com os tipos de cocção para a retenção e para a biodisponibilidade dos carotenoides, os geneticistas que trabalham com o melhoramento da mandioca para redução da DVA podem utilizar somente o teor de β C como biomarcador para seleção. Há uma ideia difundida de que é necessário selecionar os genótipos e cruzá-los baseando-se também na sua performance de retenção e biodisponibilidade dos carotenoides frente os diferentes processamentos (IGLESIAS et al., 1997; CEBALLOS et al., 2012). Obviamente, sugere-se que outros fatores sejam utilizados para a seleção e melhoramento, mas visando as características agrônomicas e sensoriais, como o teor de HCN, produtividade, tempo de cozimento e resistência à doenças.

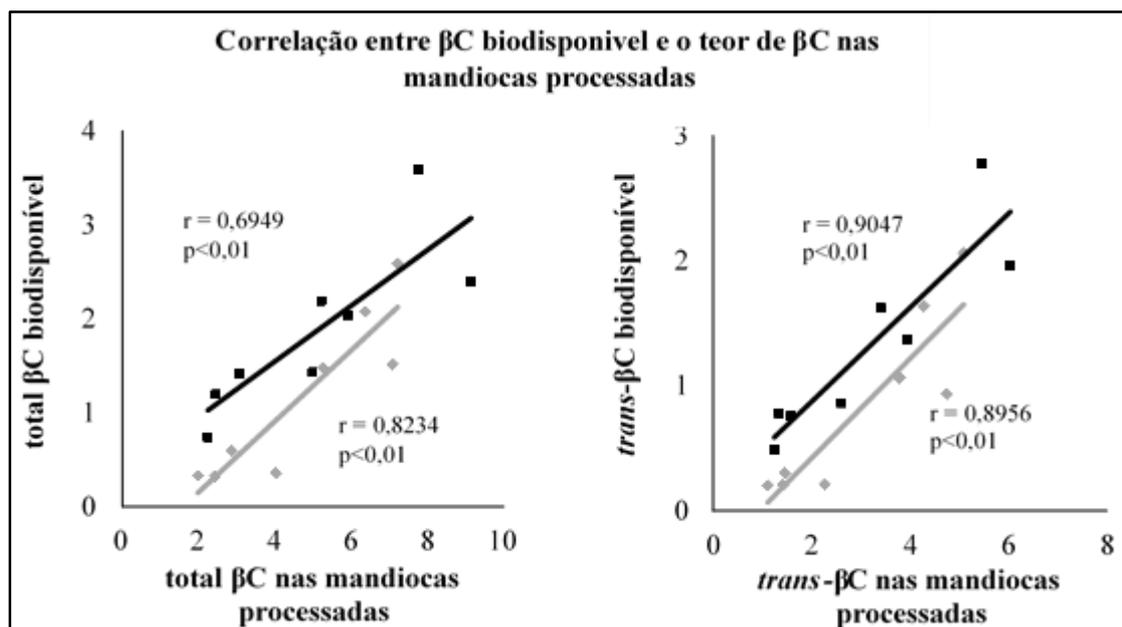


Figura 19 – Correlação entre teor de total β C (à esquerda) e de *trans*- β C (à direita) com os conteúdos dos respectivos carotenoides nas mandiocas prontas para o consumo. Teste estatístico de correlação de Pearson e significativo se $p < 0,01$

4.1.4 Absorção dos carotenoides pelas células humanas Caco-2

Os tecidos obtidos com os cultivos das células Caco-2 foram utilizados para verificar se o β C incorporado às micelas mistas geradas com a digestão *in vitro* das mandiocas processadas estava acessível para a absorção nas microvilosidades do intestino delgado. Foram analisados os quatro genótipos que continham as maiores concentrações de β C inicial, isto porque, há a necessidade de uma quantidade mínima que garanta a confiabilidade dos resultados. Além da relativa instabilidade dos carotenoides durante os procedimentos da digestão e da extração dos carotenoides intracelulares após a incubação, há também as etapas de diluição das amostras durante a digestão *in vitro* e da fração aquosa do digerido no meio de cultura utilizado no experimento. Assim, a concentração dos carotenoides que foram absorvidos pelas células no extrato conduzido à análise por CLAE-DAD está próxima do limite de detecção. Como a presença dos isômeros *cis*- β C é em menor proporção e concentração do que a do *trans*- β C não é possível quantificá-los adequadamente. Isto pode ser observado na figura 20. Portanto, os resultados de absorção de carotenoides pelas células Caco-2 foram apresentados apenas para o *trans*- β C, o que não implica em não absorção de isômeros *cis*- β C. Foram notados indícios da presença de *cis*- β C nos cromatogramas dos *pellets* celulares recolhidos após a incubação com a fração micelar e meio de cultura (Figura 20).

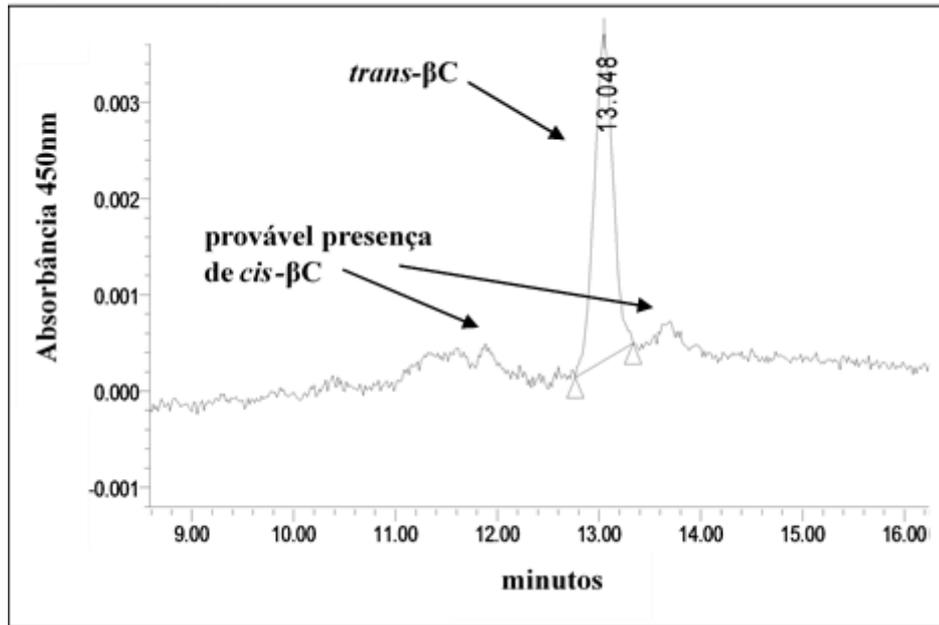


Figura 20 – Cromatograma obtido a partir da análise por CLAE-DAD do *pellet* celular utilizado no experimento da mandioca Jari cozida. Condições cromatográficas foram: sistema CLAE-DAD com coluna YMC™ C₃₀ (4,6 mm x 150 mm, 5 μm tamanho de partícula) e fase móvel composta por MeOH:MTBE (85:15) em gradiente de eluição (descrito na metodologia), fluxo 1 mL, volume de injeção 60 μL.

Na Figura 21 estão apresentados os valores de absorção relativa, que correspondem à fração dos carotenoides que foi absorvida pelas células em relação à quantidade presente no meio de cultura utilizado nos experimentos. Essa absorção ocorrida foi afetada significativamente pelos genótipos ($p < 0,01$). A influência do tipo de cocção foi significativa somente para os genótipos da linhagem 2 ($p < 0,01$). Os tecidos de células Caco-2 utilizados para analisar as mandiocas Jari e Clone 03-15 incorporaram, respectivamente, 11% e 8,5% do *trans*-βC micelar, independentemente se cozidas ou fritas. As análises das mandiocas 265-97 e 06-01, da linhagem 2, quando cozidas, resultaram em 13% e 10% de absorção celular, respectivamente, enquanto que, quando estas foram fritas, a absorção foi de 19% e 12%, respectivamente. Portanto, a linhagem 2 possui características que possibilitam maior absorção celular relativa do *trans*-βC previamente incorporado às micelas lipídicas mistas. A fritura das mandiocas previamente cozidas é um fator de aumento da capacidade de absorção celular somente para estes genótipos da linhagem 2.

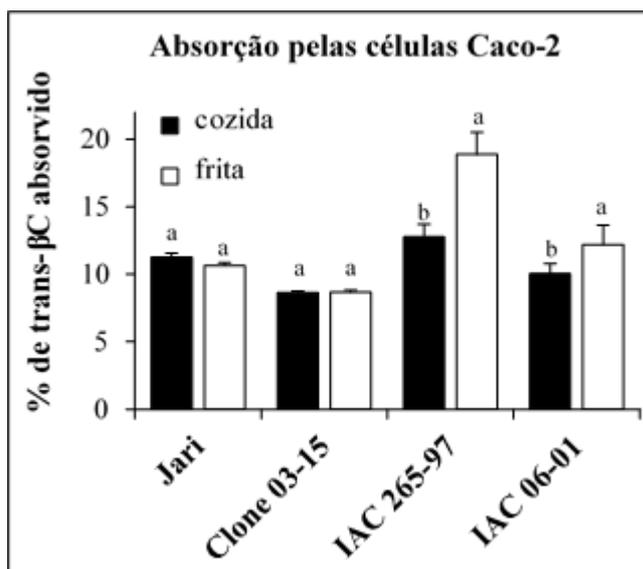


Figura 21 – Absorção pelas células Caco-2 do *trans*-βC micelar dos digeridos de mandioca. Considera-se como carotenoide absorvido a fração que foi detectada no interior das células, e oriundo das micelas obtidas com a digestão *in vitro*. Letras diferentes entre barras pretas (cozidas) e brancas (fritas) para cada genótipo significam diferença estatística entre os modos de cocção ($p < 0,01$)

Estudos anteriores da absorção de βC por células Caco-2 realizados tanto com digeridos de mandiocas (FAILLA et al., 2012; THAKKAR et al., 2007), cenouras (NETZEL et al., 2011) ou soluções com micelas artificiais (DURING et al., 2002) indicaram que usualmente 10% do βC é absorvido nos cultivos desta célula. A fração micelar obtida com a digestão *in vitro* de mandiocas transgênicas ou melhoradas convencionalmente, processadas por 3 formas diferentes, foram incubadas em tecidos de células Caco-2 e a absorção de *trans*-βC foi, respectivamente, de 8-12% e 10-11% (FAILLA et al., 2012; THAKKAR et al., 2007). Netzel et al. (2011) examinaram o efeito do tamanho de partícula de purê de cenouras cruas, branqueadas ou cozidas, sobre a absorção e transporte celular (culturas com Caco-2) de *trans*-βC e identificaram que aproximadamente 11% do presente no meio utilizado no experimento foi absorvido.

Depois que o *trans*-βC foi liberado da matriz alimentar e incorporado nas micelas poucos são os fatores bioquímicos relacionados à dieta que podem interferir na absorção pelo epitélio intestinal. During et al. (2002) estudaram os efeitos de combinações de diferentes carotenoides e em diferentes concentrações sobre a absorção, metabolismo e transporte celular. Eles encontraram 11% de absorção do *trans*-βC presente no meio experimental e determinaram

que a absorção é dependente da concentração no meio, tempo de incubação e acumulação intracelular.

A presença de isômeros ou outros carotenoides na fração micelar pode influenciar a absorção, mas neste caso a participação de isômeros *cis*- β C é relativamente pequena. O *trans*- β C é o carotenoide majoritário nas micelas emulsionadas no meio de cultura que foi incubado para avaliação da absorção. Assim, pode-se deduzir que o fator que proporcionou o aumento da absorção celular do *trans*- β C com a fritura na linhagem 2, especialmente no genótipo 265-97 foram os lipídeos presentes. No trabalho de Failla et al. (2014) ficou demonstrado que ácidos graxos insaturados promovem a absorção e secreção basolateral de carotenoides pelas células Caco-2. Neste estudo observou-se a maior absorção celular de β C oriundo de saladas com vegetais ricos em carotenoides quando estas foram adicionadas de óleo de soja, em seguida, o azeite de oliva, óleo de canola e a manteiga.

Os valores absolutos de *trans*- β C acumulados no interior das células Caco-2 após 4h de incubação com a fração micelar foram padronizados pela quantidade de proteína média nos frascos T75 utilizados nos experimentos. Estes valores foram contabilizados para 100g de mandioca preparada pronta para o consumo. Eles significam a quantidade de *trans*- β C, por 100g (MF), que foi liberado da matriz alimentar, incorporado às micelas e absorvido por uma quantidade padrão de células. Esta quantidade padrão de células foi medida pela análise de proteína por BCA e resultou em $12,1 \pm 0,2$ mg/T75. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

É importante ressaltar que estes valores não podem ser considerados juntos à quantidade de *trans*- β C biodisponível. Diversos fatores impedem esta afirmação. Os experimentos com cultivos celulares são conduzidos em frascos com áreas expressivamente menores do que o epitélio intestinal de um ser humano comum. É um modelo estático, com incubação por tempo determinado e ausência de microbiota. Desta forma a utilidade do experimento com os cultivos de células Caco-2 é a confirmação de que o β C micelarizado está apto a ser absorvido nas microvilosidades dos enterócitos. Do mesmo modo estes experimentos permitem avaliar a interferência positiva ou negativa de fatores bioquímicos intrínsecos ao alimento estudado. Portanto devem haver ressalvas na utilização destes resultados para calcular a atividade de retinol, ou a eficácia, dos alimentos biofortificados.

Tabela 7 – Acumulação intracelular de *trans*-βC pelos tecidos de células Caco-2 a partir da fração micelar obtida com a simulação da digestão *in vitro* de 4 genótipos de mandiocas biofortificadas cozidas e fritas^a

Genótipo	Acumulação intracelular de <i>trans</i> -βC (ng/mg proteína celular) ^{b, c}	
	Cozida	Frita
Linhagem 1		
Jari	95 ± 2,3 ^{aB}	107 ± 2,4 ^{cA}
Clone 03-15	92 ± 1,2 ^{aB}	125 ± 2,1 ^{bA}
Linhagem 2		
265-97	70 ± 5,3 ^{bB}	158 ± 13,6 ^{aA}
06-01	48 ± 3,6 ^{cB}	86 ± 10,2 ^{dA}

^aCulturas de células Caco-2 diferenciadas em enterócitos, entre 11 e 14 dias após confluência, foram incubadas com o meio experimental por 4h. Resultados estão expressos em média ± DP, n=7. ^bResultados foram calculados por 100g de mandioca pronta para o consumo e padronizados pela concentração de proteína por frasco T75 (12,11mg/T75). ^cLetras minúsculas diferentes nas colunas, e letras maiúsculas diferentes nas linhas, significam diferença estatística significativa entre os genótipos, e entre o tipo de cocção, respectivamente (p<0,05).

As quantidades de *trans*-βC acumuladas pelas células Caco-2 dos experimentos com as micelas das mandiocas fritas foram maiores do que as quantidades acumuladas a partir das mandiocas cozidas. O genótipo 265-97 frito destacou-se por apresentar a maior acumulação de *trans*-βC. Como este genótipo não apresentava maior quantidade de *trans*-βC biodisponível do que os genótipos Jari e Clone 03-15 (Tabela 6) pode-se afirmar que outros componentes da fração micelar do genótipo 265-97 promoveram a maior absorção. Deste modo, a quantidade de *trans*-βC acumulada intracelularmente é consequência de todo o processo, desde o impacto dos tipos de cocção sobre a estabilidade e a concentração dos carotenoides inicialmente presentes até a presença de promotores da biodisponibilidade, como os lipídeos. Mesmo com a ocorrência de interação significativa entre os genótipos e os tipos de cocção em todas as etapas estudadas, ainda procede a relação de que quanto maior a concentração inicial de βC maior será a quantidade dele que será fornecida para o metabolismo.

4.2 Batata-doce

4.2.1 Carotenoides em batatas-doces *in natura* e processadas

Batatas-doces de polpa laranja (BDPL), cultivadas em Brasília, foram acrescentadas na pesquisa para um levantamento preliminar de dados sobre estes genótipos. A biofortificação da batata-doce no Brasil está se iniciando com a seleção de genótipos com potencial para os cruzamentos. Dentro do programa Harvestplus, o cultivar norte-americano Beauregard foi cedido ao Brasil para ser utilizado dentro dos programas de biofortificação. O cultivar Amélia vem sendo selecionado e cultivado desde 1992, e em 2007 passou a ter sua adoção estimulada, em especial para alimentação escolar. Até o momento os dois são cultivados como genótipos com altas concentrações de provitamina A e indicados para alimentação de populações em risco de DVA, e os dois são indicados como possíveis parentais no processo de melhoramento (CASTRO; BECKER, 2011; RODRIGUES; TEORO, 2014).

Os experimentos realizados com os dois cultivares de BDPL citados acima foram complementares ao estudo das linhagens de mandiocas biofortificadas. Os genótipos das batatas-doces dos programas de biofortificação foram caracterizados quanto ao perfil de carotenoides e comparados com um cultivar de batata-doce de polpa branca, cultivada e comercializada em diversas regiões do Brasil. Também foram comparados com alimentos infantis produzidos nos EUA a partir de BDPLs (cultivares desconhecidos). Estas comparações visaram avaliar as diferenças entre os procedimentos caseiros de preparo e os processamentos industriais sobre o perfil e a biodisponibilidade dos carotenoides. Os resultados obtidos sobre o perfil de carotenoides estão apresentados na tabela 8.

Há grande variação nos teores de carotenoides encontrados em batatas-doces. Desde genótipos de polpa branca, que neste caso apresentou mínimas quantidades de *trans*- β C, 9-*cis*- β C e 15-*cis*- β C (Tabela 8) até cultivares de polpa com coloração laranja intenso. A batata-doce Beauregard é a que conteve a maior quantidade de carotenoides dentre os cultivares analisados (Tabela 8). No trabalho de Failla, Thakkar e Kim (2009), foram reportados genótipos cultivados na Colômbia que variaram de 0,5 μ g/g (MF) até 280 μ g/g (MF) de *trans*- β C nas raízes cruas. Desta forma, os resultados dos teores de carotenoides apresentados na tabela 8 encontram-se, como esperado, dentro da faixa encontrada na literatura. Em outros genótipos brasileiros de BDPL foram encontradas concentrações ainda maiores de β C, variando, por

exemplo, de 290 a 456 $\mu\text{g/g}$ (MF) (DONADO-PESTANA, 2011). Estes resultados indicam o grande potencial que esta planta possui, do ponto de vista nutricional, já que além de grandes quantidades de βC também é fonte de energia, fibras e minerais (BOVELL-BENJAMIN, 2007).

Tabela 8 – Perfil de carotenoides dos 3 cultivares de batatas-doces cruas, cozidas e fritas, e das 2 marcas de alimentos infantis^a

Cultivares e processamentos	Carotenoides ($\mu\text{g/g}$ MF) ^b				
	<i>Trans-β</i>	<i>9-cis- βC</i>	<i>13-cis-βC</i>	<i>15-cis-βC</i>	<i>α-caroteno</i>
Brazlândia					
Crua	0,01 \pm 0,0 ^f	0,006 \pm 0,0 ^e	0,0 ^h	0,004 \pm 0,0 ^f	0,0 ^e
Cozida	0,0 ^f	0,0 ^e	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^e
Frita	0,0 ^f	0,0 ^e	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^e
Amélia					
Crua	38,2 \pm 4,9 ^{de}	1,53 \pm 0,3 ^c	1,14 \pm 0,1 ^g	0,14 \pm 0,03 ^{ef}	0,11 \pm 0,05 ^d
Cozida	33,5 \pm 1,1 ^e	0,58 \pm 0,01 ^d	1,93 \pm 0,2 ^f	0,30 \pm 0,03 ^{de}	0,0 ^e
Frita	39,0 \pm 2,3 ^{de}	1,46 \pm 0,2 ^c	3,58 \pm 0,2 ^d	0,56 \pm 0,08 ^c	0,0 ^e
Beauregard					
Crua	114,4 \pm 10,8 ^a	2,82 \pm 0,6 ^b	2,30 \pm 0,2 ^f	0,39 \pm 0,06 ^d	0,27 \pm 0,05 ^c
Cozida	96,7 \pm 4,0 ^b	0,47 \pm 0,02 ^d	4,29 \pm 0,2 ^c	0,77 \pm 0,08 ^b	0,0 ^e
Frita	69,0 \pm 4,4 ^c	1,51 \pm 0,2 ^c	6,32 \pm 0,6 ^a	1,31 \pm 0,2 ^a	0,0 ^e
Alimentos infantis					
Earth's Best[®]	44,2 \pm 0,6 ^d	2,47 \pm 0,1 ^b	2,91 \pm 0,1 ^e	0,60 \pm 0,07 ^{bc}	0,36 \pm 0,07 ^b
Nestlé Gerber[®]	40,4 \pm 0,7 ^{de}	3,32 \pm 0,1 ^a	5,59 \pm 0,1 ^b	1,46 \pm 0,1 ^a	0,50 \pm 0,03 ^a

^a Resultados estão expressos em média \pm DP, n=6. ^b Foram considerados como 0 (zero) os valores dos carotenoides nas amostras em que não foram detectados os picos cromatográficos. Letras minúsculas diferentes nas colunas significam diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$).

O carotenoide mais presente nas BDPL, assim como nos alimentos infantis, foi o *trans*- β C correspondendo até 95% do total de carotenoides nas amostras cruas. Esta observação também foi feita por outros trabalhos que apresentaram a presença relativa do β C sempre acima de 80% (FAILLA; THAKKAR; KIM, 2009; DONADO-PESTANA et al., 2012; ACHIR et al., 2014). Os carotenoides minoritários encontrados foram os isômeros *cis*- β C e o α -caroteno. Além destes, podem ser encontrados em BDPLs a luteína, zeaxantina e epóxi-carotenoides (DONADO-PESTANA et al., 2012; BECHOFF et al., 2011).

O cozimento e a fritura causaram redução do *trans*- β C, 9-*cis*- β C e do α -caroteno e aumento do teor de 13-*cis*- β C e 15-*cis*- β C, podendo ser observado principalmente no genótipo Beauregard (Tabela 8). Estes fenômenos são típicos das vias de degradação dos carotenoides e aconteceram também nas mandiocas analisadas. Vale destacar que a redução do *trans*- β C com o cozimento e posterior aumento com a fritura, na batata-doce Amélia, é aparente, visto que os valores estão em base fresca e pode acontecer ganho ou perda de umidade nos processos. Como esperado, há maior participação dos isômeros *cis*- β C em relação ao *trans*- β C nos alimentos infantis, pois eles sofreram diversas etapas de processamento, como a redução de partículas, aquecimento e pasteurização.

Dentre os genótipos estudados, o Beauregard possui a maior concentração de *trans*- β C nas raízes frescas. O cozimento deste cultivar causou redução de 15% na concentração de *trans*- β C, na matéria fresca, enquanto que a fritura causou mais 28% de redução. Ainda assim, este cultivar pode fornecer a maior quantidade de *trans*- β C, e conseqüentemente de retinol, numa refeição, do que o genótipo Amélia ou os alimentos infantis. Desta forma, uma porção de 100g da batata-doce Beauregard cozida pode fornecer aproximadamente 1650 μ g de equivalente de retinol (RE), calculados a partir dos dados da Tabela 8, provendo até 366% da IDR de vitamina A para crianças de 5 anos de idade. A batata-doce Amélia, cozida ou frita, e os alimentos infantis podem prover cerca de 170% da IDR de vitamina A por porção de 100g.

Nos rótulos das duas marcas de alimentos infantis estava destacada a informação de que uma unidade (porção de 120g) poderia fornecer “300% da IDR de vitamina A, em β C de alta disponibilidade”. No entanto os resultados apontam que os alimentos infantis analisados continham cerca de 930 μ g de RE por porção, isto é 208% da IDR. Estes valores são muito expressivos e podem suprir mais do que o necessário para as adequadas funções fisiológicas das crianças. Mas, há a necessidade de um alerta para a degradação que pode ocorrer durante a estocagem destes alimentos processados, e a conseqüente informação incorreta para o

consumidor. A desidratação industrial, visando a conservação, de BDPL, originárias de Uganda e Moçambique, não evitou redução de até 70% no teor de β C durante 4 meses de armazenamento (BECHOFF et al., 2010a; 2010b).

A afirmação do rótulo de que o β C presente tem alta disponibilidade baseia-se no processamento destes alimentos que visam reduzir o tamanho das partículas e romper as paredes celulares ao máximo através de altas temperaturas, homogeneização e centrifugação. Mas a biodisponibilidade não depende apenas destes fatores. Foi demonstrado nos resultados apresentados anteriormente como o teor de lipídeos nas mandiocas é essencial para a incorporação dos carotenoides na fração micelar. Nos alimentos de origem vegetal, compreender a biodisponibilidade dos carotenoides é uma tarefa bastante complexa. Ela depende também da localização dos carotenoides dentro da organização celular, da forma química em que eles se encontram, se estão armazenados emulsionados em gotículas lipídicas ou complexados com proteínas dentro de cloroplastos (LA FRANO et al., 2014).

4.2.2 Biodisponibilidade de carotenoides em batatas-doces processadas

A biodisponibilidade de carotenoides em batatas-doces variam consideravelmente dependendo dos genótipos, processamentos, combinações de ingredientes, composição da matriz alimentar e também dos tipos de métodos analíticos empregados (LA FRANO et al., 2014; BECHOFF et al., 2011; MILLS et al., 2009). Dentre estas variáveis, há indícios de que os processamentos e as combinações de componentes da dieta possuem a maior influência sobre a biodisponibilidade de carotenoides em batatas-doces (FAILLA; THAKKAR; KIM, 2009; BECHOFF et al., 2011).

A simulação da digestão *in vitro* com as amostras das batatas-doces de polpa laranja cozidas, fritas e alimentos infantis foi conduzida para avaliar a biodisponibilidade. O genótipo de polpa branca, Brazlândia, não foi analisado quanto à biodisponibilidade ou absorção em células devido a não identificação de carotenoides nas amostras cozidas ou fritas. Os carotenoides foram relativamente estáveis aos procedimentos da digestão *in vitro*. A recuperação dos carotenoides após as etapas da digestão ficou entre 78 e 102%, sendo ainda mais estáveis do que nas amostras de mandioca. Isto pode ter ocorrido pela menor concentração de carotenoides nas mandiocas, de 4 a 10 vezes menos. Amostras contendo menores concentrações de carotenoides são mais suscetíveis a erros analíticos, e qualquer perda por instabilidade pode se mostrar alta em relação à concentração inicial.

Como a concentração dos isômeros do β C e do α -caroteno nas amostras de batatas-doces foram suficientes para adequada identificação e quantificação, foi possível avaliá-los separadamente, mesmo após a digestão *in vitro*. Na Figura 22 estão apresentados os dados de eficiência de micelarização do *trans*- β C, 9-*cis*- β C, 13-*cis*- β C, 15-*cis*- β C e α -caroteno nas amostras analisadas. O α -caroteno não foi encontrado nas amostras das BDPL cozidas e fritas e por isso foi considerado como 0 (zero) de concentração, para permitir análises estatísticas.

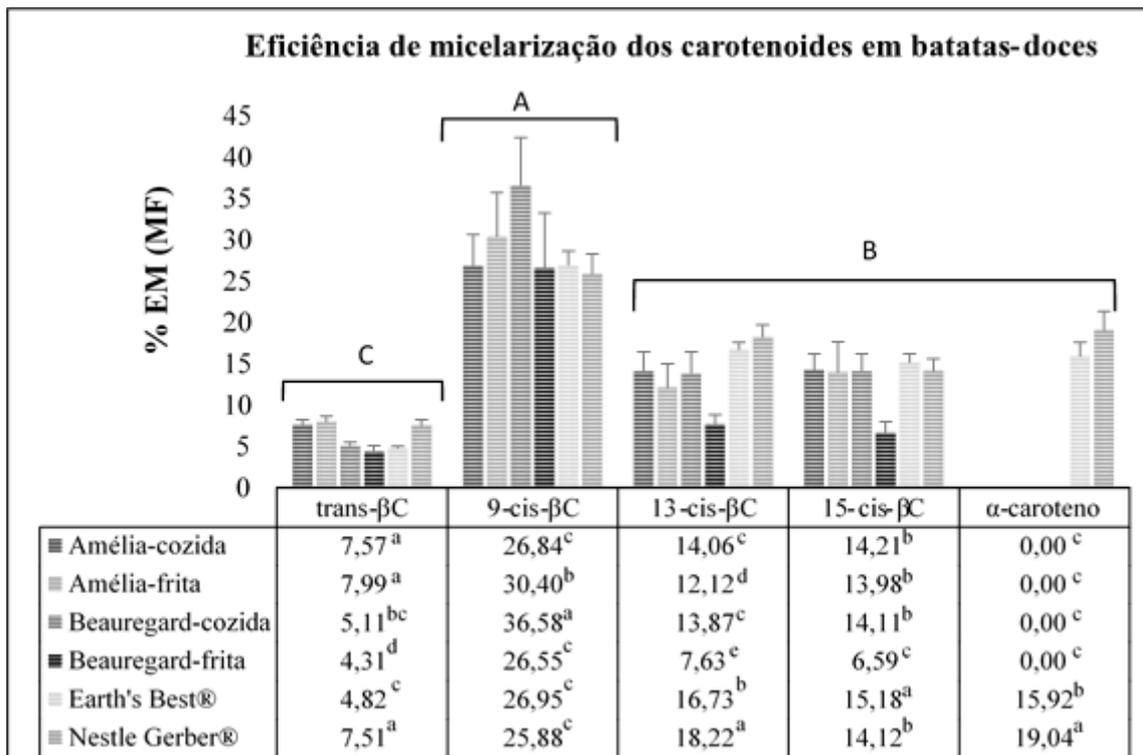


Figura 22 – Eficiência de micelarização dos carotenoides após a simulação *in vitro* da digestão nas amostras de batatas-doces de polpa laranja cozidas, fritas e alimentos infantis. Letras maiúsculas sobre as colunas do *trans*- β C, 9-*cis*- β C e, conjuntamente, 13-*cis*- β C, 15-*cis*- β C e α -caroteno, significam diferença estatística entre os carotenoides ($p < 0,05$). Na tabela inferior de dados, as letras minúsculas nas colunas significam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$)

A eficiência de micelarização (EM) do *trans*- β C é considerada baixa, levando em consideração a alta concentração deste carotenoide nas amostras. As diferenças entre os dois genótipos cozidos e os alimentos infantis não é grande, variando de 4,8 a 7,5% (Figura 22). Estes resultados são concordantes com outros estudos publicados na área. Por exemplo, foram encontrados valores de EM do *trans*- β C em 10 cultivares de BDPL cozidas da ordem de 0,6 a 3%, analisados sem adição de óleo, 2,9 a 9,8%, com a adição de 2% de óleo de soja (FAILLA;

THAKKAR; KIM, 2009), e de 9,9% no cultivar Ejumula, da Uganda, cozido, analisado com adição de óleo (BECHOFF et al., 2011). A incorporação do *trans*- β C às micelas durante a digestão *in vitro* foi menos eficiente no genótipo Beaugard, que possuía quantidade muito maior de *trans*- β C inicial. O genótipo Amélia e o alimento infantil Nestlé Gerber® tiveram maior eficiência de micelarização, e estas foram as amostras com menores quantidades de *trans*- β C no material inicial. Há a possibilidade da EM ser influenciada por saturação e/ou competição devido às altas concentrações de carotenoides no meio. Isto também foi observado por Failla, Thakkar e Kim (2009) que relataram correlação inversa entre a EM e a concentração inicial de *trans*- β C nos 10 cultivares estudados.

Como a biodisponibilidade de *trans*- β C em BDPL simplesmente cozidas é normalmente baixa, diferentes formas de processamentos vem sendo estudadas para aumentá-la. O processamento intenso ao qual são submetidos alimentos infantis visam este aumento de biodisponibilidade. Os resultados não apontaram EM nos alimentos infantis estudados muito maior do que nas batatas-doces preparadas de forma caseira. Foi encontrada EM do *trans*- β C de 7,2%, que é bastante similar ao apresentado na Figura 22, em alimentos infantis comprados nos EUA em 2009, e analisados pela mesma metodologia utilizada no presente estudo (FAILLA; THAKKAR; KIM, 2009).

Inesperadamente a fritura não proporcionou aumento da biodisponibilidade dos carotenoides nos dois genótipos estudados, ao contrário, reduziu a EM do *trans*- β C e dos *cis*- β C no genótipo Beaugard (figura 22). Num estudo anterior, a adição de 2% de óleo de soja durante os procedimentos da simulação *in vitro* da digestão de BDPL cozidas pôde aumentar a EM do *trans*- β C em até 3 vezes (FAILLA; THAKKAR; KIM, 2009). No trabalho presente, foram adicionados os 2% de óleo de soja nas análises dos genótipos cozidos e nos alimentos infantis, mas não foi adicionado nos genótipos fritos. De maneira que a fritura garante a quantidade mínima de óleo para formação das micelas lipídicas mistas por ação da bile. Como não houve o aumento significativo da biodisponibilidade dos carotenoides por ação da fritura pode-se inferir que a EM não é proporcional a quantidade de lipídeos. Estas evidências corroboram a hipótese de que a biodisponibilidade pode ser influenciada pela concentração dos carotenoides e interações entre os isômeros.

O aumento da biodisponibilidade dos carotenoides por ação de processamentos foi reportado por Bechoff et al. (2011). Os autores avaliaram, por digestão *in vitro*, preparações de Chapati, Porridge e Mandazzi com a inclusão de farinha de batatas-doces de polpa laranja como ingrediente principal. A maior EM de *trans*- β C foi a do Chapati (72%), que é uma espécie de pão, que tem na receita cerca de 7,5% de óleo de girassol adicionado à massa. Os autores

sugeriram que apenas a adição de óleo não atinge a máxima EM, mas sim a incorporação no início do preparo e etapa de ‘sova’ da massa que permitem adequada migração dos carotenoides para as gotículas de óleo distribuídas na matriz do alimento.

A biodisponibilidade do 9-*cis*- β C foi estatisticamente maior do que a do 13-*cis*- β C, 15-*cis*- β C, α -caroteno e, por último, do *trans*- β C (Figura 22). Esta maior micelarização de isômeros *cis*- β C foi, também, observada em BDPL processadas e em preparações, assim como em outras combinações de alimentos, como saladas (MILLS et al., 2009; BENGTSSON et al., 2010; FERRUZZI et al., 2006). Sugere-se como provável motivo para esta maior capacidade de incorporação às micelas lipídicas que os isômeros *cis*- β C possuem, a características de essas moléculas orgânicas serem naturalmente mais solúveis em água, diminuindo a dependência de óleo para a micelarização (LA FRANO et al., 2014).

Apesar da maior biodisponibilidade observada do *cis*- β C e do α -caroteno, sua contribuição para o atividade de vitamina A é pequena. Primeiro por que estes estavam presentes em proporções mínimas no material inicial. Mesmo com a ocorrência de isomerização durante os processamentos convertendo *trans*- β C em *cis*- β C a quantidade relativa desses carotenoides na fração aquosa dos digeridos permanece baixa. Em segundo, por que após a absorção celular destes carotenoides haverá a conversão deles à retinol. Esta conversão bioquímica intracelular é menos eficiente (25%) do que o *trans*- β C (50%), pois eles resultam em apenas 1 molécula de retinol após a clivagem pelas enzimas BCO1 e BCO2 (HARRISON, 2012).

4.2.3 Absorção por células Caco-2 de carotenoides das batatas-doces processadas

Foram realizados os experimentos de absorção por culturas celulares com as amostras dos 2 genótipos de batatas-doces de polpa laranja e com as duas marcas de alimentos infantis. Foi possível detectar dentro das células o *trans*- β C, o 9-*cis*- β C e o 13-*cis*- β C. Não foram observados sinais de 15-*cis*- β C ou do α -caroteno devido a baixa concentração destes carotenoides nas frações aquosas. A Figura 23 demonstra a porcentagem de carotenoides do meio que foi absorvido pelas células Caco-2 e a Tabela 9 apresenta os valores absolutos dos carotenoides acumulados intracelularmente.

O uso dos cultivos de células Caco-2 permite a avaliação da absorção dos carotenoides inseridos dentro das micelas lipídicas. Os tecidos celulares diferenciados (14 dias após a confluência) apresentam microvilosidades e metabolismo bastante similar aos enterócitos intestinais. As células são incubadas por 4 horas com uma mistura de meio de

cultura e fração aquosa obtida a partir do digerido das amostras. Nesta fração aquosa encontram-se emulsionadas as micelas mistas. No entanto, este modelo não simula a presença da motilidade intestinal, ação da microbiota, área de contato total do epitélio e características fisiológicas dos indivíduos. Por isso, a partir dos resultados pode-se inferir apenas sobre a confirmação da biodisponibilidade dos carotenoides micelarizados para a absorção celular (FAILLA; HUO; THAKKAR, 2008).

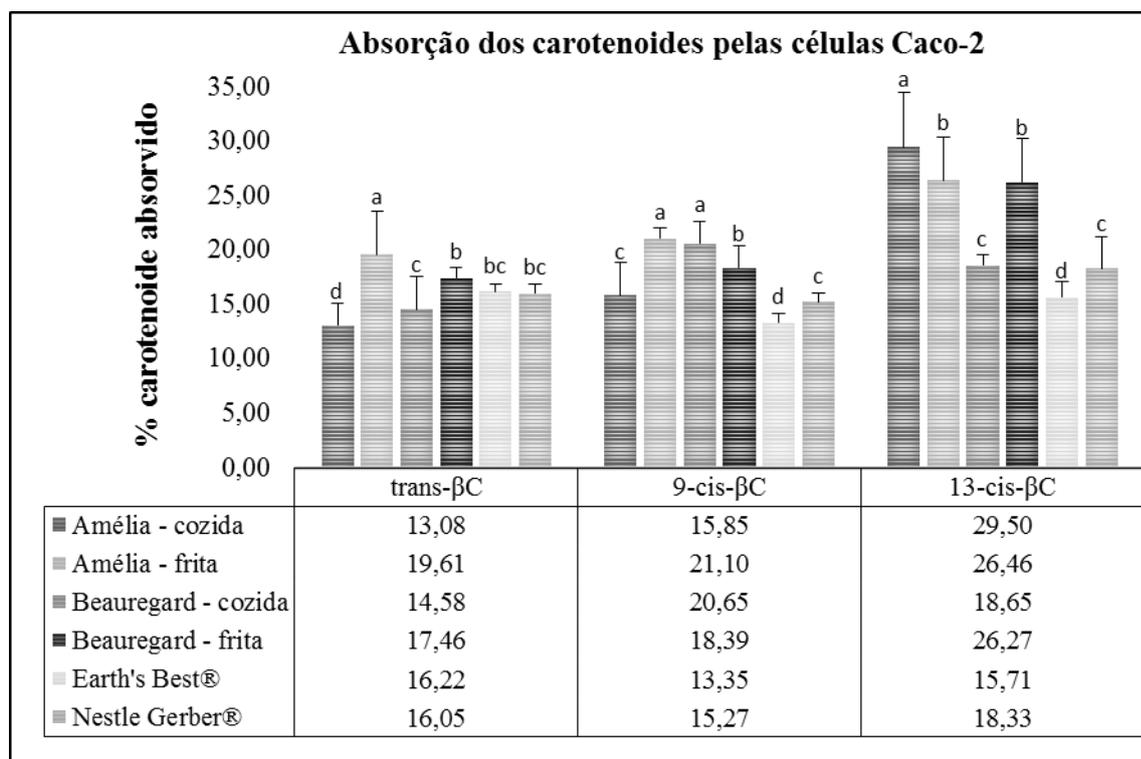


Figura 23 – Absorção, pelas células Caco-2, dos carotenoides micelarizados após a digestão *in vitro* das amostras de batatas-doces de polpa laranja cozidas, fritas e alimentos infantis. Letras maiúsculas sobre as colunas do *trans*-βC, *9-cis*-βC e, conjuntamente, *13-cis*-βC, *15-cis*-βC e α -caroteno, significam diferença estatística entre os carotenoides ($p < 0,05$). Na tabela inferior de dados, as letras minúsculas nas colunas significam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$)

Os dados expressos em porcentagem de absorção (Figura 23) permitem avaliar interferências bioquímicas oriundas da matriz alimentar que ocorram no momento do transporte passivo do meio aquoso para o interior das células. A absorção celular observada confirma que os carotenoides que puderam ser liberados da matriz alimentar e incorporados à micelas mistas lipídicas estão acessíveis para os enterócitos do epitélio intestinal humano, ou seja biodisponíveis. Os valores na Figura 7 mostram que a absorção foi dependente do cultivar e do

tipo de processamento e não obedeceu à um padrão de acordo com isômero do β C observado. Houve preferência de absorção pelo 13-*cis*- β C seguido do 9-*cis*- β C e do *trans*- β C, porém esta sequência não foi estatisticamente significativa para todos os genótipos ou processamentos.

Foi encontrado apenas uma publicação que avaliou a absorção dos carotenoides por cultivo de células Caco-2 em um cultivar de BDPL de Israel, cozido por 30 minutos (POULAERT et al., 2012). Os autores relataram 20% de absorção celular do *trans*- β C presente na fração aquosa. Este resultado é condizente com os obtidos com os experimentos da presente pesquisa e os expostos na Figura 23, ou seja, absorção celular de 13% a 19%. O resultado discordante foi a absorção celular do 13-*cis*- β C reportada por Poulaert et al. (2012) que foi menor (9,9%) do que a do *trans*- β C. Os mesmos autores também relataram interferência de compostos flavonoides que reduzem eficiência das células Caco-2 em absorverem os carotenoides. Sabe-se que a batata-doce, assim como diversos alimentos vegetais, possui grandes quantidades de ácidos fenólicos e flavonoides (POULAERT et al., 2012).

Tabela 9 – Acumulação intracelular de carotenoides nos tecidos de células Caco-2 a partir da fração micelar obtida com a simulação da digestão *in vitro* de 2 cultivares de batatas-doces de polpa laranja e alimentos infantis^a

Cultivares e processamentos	Acumulação intracelular pelas células Caco-2 (ng/mg proteína) ^{b, c}		
	<i>Trans</i> - β	9- <i>cis</i> - β C	13- <i>cis</i> - β C
Amélia			
Cozida	171,2± 21,5 ^f	7,98± 6,8 ^e	42,7± 8,1 ^c
Frita	315,3± 31,5 ^b	48,3± 3,2 ^b	59,4± 4,7 ^b
Beauregard			
Cozida	371,8± 15,8 ^a	18,3± 0,92 ^d	32,8± 3,6 ^e
Frita	267,9± 29,6 ^c	21,8± 1,3 ^c	37,5± 1,6 ^d
Alimentos infantis			
Earth's Best [®]	215,9± 6,9 ^e	45,8± 5,1 ^b	39,4± 2,4 ^{cd}
Nestlé Gerber [®]	251,3± 13,8 ^d	67,5± 6,1 ^a	95,3± 5,9 ^a

^a Culturas de células Caco-2 diferenciadas em enterócitos, entre 11 e 14 dias após confluência, foram incubadas com o meio experimental por 4h. Resultados estão expressos em média ± DP, n=6. ^b Resultados foram calculados por 100g de batata-doce ou alimento infantil e padronizados pela concentração de proteína por frasco T75 (12,11mg/T75). ^c Letras minúsculas diferentes nas colunas significam diferença estatística significativa entre as médias (p<0,05).

Os dados expressos em quantidade de carotenoides acumulados por mg de proteína celular (Tabela 9) representam uma generalização de todos os fatores que possam interferir no aproveitamento da provitamina A pelo corpo, desde o alimento pronto para o consumo até o interior das células. Duas conclusões relevantes podem ser extraídas destes valores.

A primeira, que os genótipos Amélia e a Beauregard preparados de forma caseira fornecem quantidades de *trans*- β C maiores do que os alimentos infantis, com exceção da Amélia cozida (Tabela 9). Isso se deve, possivelmente, à degradação e isomerização que o *trans*- β C sofre no armazenamento, visto que os alimentos infantis apresentaram maior acumulação de *cis*- β C no interior das células.

A segunda conclusão é que, diferentemente das mandiocas, a maior concentração de β C nas batatas-doces *in natura* não garante maior quantidade intracelular acumulada de β C. O genótipo com menor concentração de *trans*- β C inicial, Amélia, quando frito, acaba fornecendo mais *trans*- β C para os enterócitos do que o genótipo Beauregard frito, que teve a maior concentração inicial de *trans*- β C. Há interação dos tipos de processamentos com a matriz alimentar dos genótipos de maneira que se torna necessário os programas de biofortificação divulguem adequadas instruções de preparo das BDPL.

O consumo de uma porção de 100g da batata-doce Beauregard cozida resulta na maior quantidade de carotenoides aproveitáveis pelo organismo, dentre os genótipos e preparos estudados. A inclusão das BDPL na dieta pode trazer muitos benefícios, em especial para as populações em risco de DVA. Mesmo com as degradações, isomerizações e baixa micelarização as batatas-doces cozidas, fritas e os alimentos infantis terminam fornecendo quantidades de carotenoides ao epitélio intestinal muito maiores do que as mandiocas biofortificadas. A adoção conjunta dos dois alimentos tem potencial para aumentar a ingestão de carotenoides com atividade de vitamina A de maneira saudável e sustentável permitindo também a manutenção da diversidade alimentar e respeitando os hábitos alimentares tradicionais.

5 CONCLUSÕES

O melhoramento genético produziu genótipos de mandioca contendo até 23 vezes mais β -caroteno nas raízes frescas do que a variedade branca. Este acréscimo ocorreu majoritariamente no todo-*trans*- β -caroteno que possui duas vezes mais atividade de vitamina A do que os isômeros *cis*- β -caroteno e outros carotenoides. Os cultivares de batatas-doces de polpa laranja analisados, selecionados pelo programa de biofortificação, contém expressivas quantidades de β -caroteno, muito maiores do que nas mandiocas.

Dentre os genótipos de mandioca investigados, os da linhagem 2 possuem algumas vantagens para adoção em relação à biodisponibilidade de carotenoides. Os genótipos desenvolvidos no estado de São Paulo apresentaram menor tempo de cocção, maior capacidade de absorção de óleo com a fritura, e alta eficiência de micelarização. Eles são mais apropriados para serem fritos, resultando em grandes quantidades de todo-*trans*- β -caroteno biodisponível.

As mandiocas da linhagem 1 podem integrar o cardápio das famílias em regiões onde há risco de deficiência de vitamina A e serem incluídas, por exemplo, na merenda escolar. Os genótipos Jari e Clone 03-15 se destacaram dentre os desenvolvidos pela Embrapa, pois eles podem fornecer altas quantidades de todo-*trans*- β -caroteno biodisponível estando apenas cozidas. No entanto, é essencial que produtores e consumidores sejam orientados com relação ao tempo de cozimento que deve ser adequado à textura ‘macia’, mesmo que seja necessário maior tempo de preparo.

As batatas-doces de polpa laranja podem suprir até 3,6 vezes as quantidades diárias recomendadas para ingestão de vitamina A. O cultivar Amélia cozido ou frito não diferiu dos alimentos infantis estudados, enquanto que, o cultivar Beauregard cozido apresentou mais do que o dobro de β -caroteno. A fritura causou redução significativa do teor de β -caroteno na matéria fresca do cultivar Beauregard, contudo, ele permaneceu com a maior quantidade de provitamina A.

O processamento das mandiocas e batatas-doces resultou em degradação e isomerização do todo-*trans*- β -caroteno com conseqüente perda de atividade de vitamina A. A fritura possui o maior impacto, ocasionando maior perda, porém esta perda é compensada pela maior eficiência de micelarização dos carotenoides. A fritura também aumentou a absorção pelas células Caco-2 e resultou em maior quantidade de todo-*trans*- β -caroteno acumulados intracelularmente, com exceção da batata-doce Beauregard.

A biodisponibilidade *in vitro* dos carotenoides revelou-se alta para as mandiocas, e baixa para as batatas-doces. Na etapa de micelarização a incorporação do β -caroteno à fração

micelar foi até 3 vezes mais eficiente em amostras de mandiocas. Inversamente, na etapa de absorção pelas células Caco-2, as batatas-doces promoveram cerca de 2 vezes mais captação dos carotenoides do meio.

A aplicação da simulação *in vitro* da digestão oral, gástrica, intestinal e absorção por células Caco-2 facultou a avaliação da biodisponibilidade de carotenoides nos alimentos estudados. No que tange a avaliação do impacto de processamentos e variações da matriz alimentar este método se apresentou eficaz. A partir das análises foi possível confirmar a biodisponibilidade do β -caroteno micelarizado e concluir que há interações dos genótipos e processamentos com efeitos sobre absorção final destes carotenoides pelos enterócitos do intestino.

Enfim, as conclusões obtidas apoiam positivamente a utilidade das estratégias de biofortificação da mandioca e da batata-doce para o aumento da concentração de β -caroteno. Estes novos cultivares podem aumentar a ingestão de provitamina A das populações em risco de carência nutricional sem a necessidade de grandes alterações nos hábitos alimentares.

REFERÊNCIAS

- ACHIR, N.; PÉNICAUD, C.; BECHOFF, A.; BOULANGER, R.; DORNIER, M.; DHUIQUE-MAYER, C. Use of multi-response modelling to investigate mechanisms of β -carotene degradation in dried orange-fleshed sweet potato during storage: from carotenoids to aroma compounds. **Food and Bioprocess Technology**, Heidelberg, v. 7, n. 6, p 1656-1669, 2014.
- AMANCIO, D. R.; SILVA, M. V. Consumo de carotenoides no Brasil: a contribuição da alimentação fora do domicílio. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 130-141, 2012.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.
- ANDRADE, J. V. C.; VIANA, D. J. S.; PINTO, N. A. V. D.; RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, R. C.; NEIVA, I. P.; AZEVEDO, A. M.; ANDRADE, P. C. R. Características produtivas e qualitativas de ramas e raízes de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 4, p. 584-589, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington, DC: AOAC International, 1995.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. Carotenoids and DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 733, n. 1-2, p. 4-13, 2012.
- BAI, C.; TWYMAN, R. M.; FARRÉ, G.; SANAHUJA, G.; CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; ZHU, C. A golden era: pro-vitamin A enhancement in diverse crops. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Oxon, v. 47, p. 205-221, 2011.
- BALL, G. F. M. Vitamin A - Retinoids and the provitamin A carotenoids. In: _____. **Vitamins in foods: Analysis, bioavailability and stability**. Boca Raton: CRC Press, 2006. chap. 3.
- BECHOFF, A.; POULAERT, M.; TOMLINS, K.I.; WESTBY, A.; MENYA, G.; YOUNG, S.; DHUIQUE-MAYER, C. Retention and bioaccessibility of β -carotene in blended foods containing orange-fleshed sweet potato flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, p. 10373-10380, 2011.
- BECHOFF, A.; TOMLINS, K.; DHUIQUE-MAYER, C.; DOVE, R.; WESTBY, A. On farm evaluation of the impact of drying and storage on the carotenoid content of orange-fleshed sweet potato (*Ipomea batata* Lam.). **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 52-60, 2010a.

BECHOFF, A.; WESTBY, A.; OWORI, C.; MENYA, G.; DHUIQUE-MAYER, C.; DUFOUR, D.; TOMLINS, K. Effect of drying and storage on the degradation of total carotenoids in orange-fleshed sweetpotato cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 15, p. 622-629, 2010b.

BENGTSSON, A.; BRACKMANN, C.; ENEJDER, A.; ALMINGER, M. L.; SVANBERG, U. Effects of thermal processing on the *in vitro* bioaccessibility and microstructure of β -carotene in orange-fleshed sweet potato. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 20, p. 11090–11096, 2010.

BERNI, P. R. A.; AMANCIO, R. D.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Potential of vitamin A intake from Brazilian biofortified crops. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 16. IUFOST, 2012, Foz do Iguaçu, PR. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://iufost.org.br/sites/iufost.org.br/files/anais/07703.pdf>.

BLOCK, G. Nutrient sources of provitamin A carotenoids in the American diet. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 139, n. 3, p. 290-293, 1994.

BOVELL-BENJAMIN, A. C. Sweet potato: a review of its past, present, and future role in human nutrition. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 52, p. 1–59, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 269**, de 22 de setembro de 2005, dispõe sobre o Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. [on line] Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1884970047457811857dd53fbc4c6735/RDC_269_2005.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 05 jun. 2014.

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; JENSEN, S. L.; PFANDER, H. (Ed.). **Carotenoids**. Basel: Birkhauser, 2011. p. 13-62.

CARVALHO, L. M. J.; OLIVEIRA, A. R. G.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S.; NUTTI, M.; CARVALHO, J. L. V.; PEREIRA, E. J.; FUKUDA, W. G. Retention of total carotenoid and beta-carotene in yellow sweet cassava (*Manihot esculenta Crantz*) after domestic cooking. **Food & Nutrition Research**, Lund, v. 56, p. 1-8, 2012. Suplemento 1.

CASTRO, L. A. S.; BECKER, A. **Batata-doce BRS Amélia**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2011. (Folder)

CEBALLOS, H.; LUNA, J.; ESCOBAR, A. F.; ORTIZ, D.; PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, T.; PACHÓN, H.; DUFOUR, D. Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. **Food Research International**, Essex, v. 45, n. 1, p. 52–59, 2012.

CEBALLOS, H.; MORANTE, N.; SÁNCHEZ, T.; ORTIZ, D.; ARAGÓN, I.; CHÁVEZ, A. L.; PIZARRO, M.; CALLE, F.; DUFOUR, D. Rapid cycling recurrent selection for increased carotenoids content in Cassava roots. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 1, p. 2342-2351, 2013.

CHAPMAN, M. S. Vitamin A: history, current uses, and controversies. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, Philadelphia, v. 31, p. 11-16, 2012.

CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; SCHWARTZ, S. J.; FAILLA, M. L. Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, p. 2280-2286, 2004.

CLAGET-DAME, M.; KNUTSON, D. Vitamin A in reproduction and development. **Nutrients**, Basel, v. 3, p. 385-428, 2011.

CONSULTATIVE GROUP ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH. **On the Path to Better Nutrition & Health**. A4NH 2012 Annual Report. Washington, DC: International Food Policy Research Institute, 2012.

CURADO, F. F.; QUEIROZ, V. A. V.; DIAS, A. C. P.; SILVA, M. D. R.; NETO, R. S. M. Evaluation of the potential use of biofortified foods in school diets in municipalities of Maranhao, Sergipe and Minas Gerais, Brazil. In: ANNUAL BIOFORTIFICATION MEETING IN BRAZIL, 3., 2009, Aracaju. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.biofort.com.br>. Acesso em: 20 nov. 2013.

DELIE, F.; RUBAS, W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advances and limitations of the Caco-2 model. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Danbury, v. 14, p. 221-286, 1997.

DONADO-PESTANA, C. M. **Efeitos do processamento sobre a disponibilidade de carotenóides, fenólicos totais e atividade antioxidante em quatro cultivares de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) biofortificados**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

DONADO-PESTANA, C. M.; Salgado, J. M.; Rios, A. O.; Santos, P. R.; Jablonski, A. Stability of carotenoids, total phenolics and in vitro antioxidant capacity in the thermal processing of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) cultivars grown in Brazil. **Plant Foods for Human Nutrition** [online], Dordrecht, v. 67, n. 3, p. 262-270, 2012.

DURING, A.; HUSSAIN, M. M.; MOREL, D. W.; HARRISON, E. H. Carotenoid uptake and secretion by Caco-2 cells: β -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. **Journal of Lipid Research**, New York, v. 43, p. 1086-1095, 2002.

FAO. Human vitamin and mineral requirements. In: JOINT FAO/OMS EXPERT CONSULTATION, 7., 2001, Bangkok, Thailand. **Report**. Rome, 2001.

_____. **Synthesis of guiding principles on agriculture programing for nutrition.** Rome, 2013b. 83 p.

_____. **The state of food insecurity in the world.** Rome, 2013a.

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; SIRITUNGA, D.; DE MOURA, F. F.; FREGENE, M.; MANARY, M. J.; SAYRE, R. T. Retention during Processing and Bioaccessibility of β -Carotene in High β -Carotene Transgenic Cassava Root. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p. 3861–3866, 2012.

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. ***In vitro* models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods.** Washington, DC: HarvestPlus, 2005. (HarvestPlus Technical Monograph Series, 3).

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; FERRUZZI, M. L.; GOLTZ, S. R.; CAMPBELL, W. Unsaturated fatty acids promote bioaccessibility and basolateral secretion of carotenoids and α -tocopherol. **Food and Function**, Cambridge, v. 28, n. 5, p. 1101-1112, 2014.

FAILLA, M. L.; HUO, T.; THAKKAR, S. K. In vitro screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 17, p. 200–203, 2008. Supplement 1.

FAILLA, M. L.; THAKKAR, S. K.; KIM, J. Y. *In vitro* bioaccessibility of β -carotene in orange fleshed sweet-potato (*Ipomoea batatas*. Lam.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 1, p. 10922–10927, 2009.

FARINU, A.; BAIK, O. D. Heat transfer coefficients during deep fat frying of sweetpotato: Effects of product size and oil temperature. **Food Research International**, Essex, v. 40, p. 989–994, 2007.

FAULKS, R. M.; SOUTHON, S. Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1740, p. 95–100, 2005.

FENIMAN, C. M. **Caracterização de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do cultivar IAC 576-70 quanto à cocção, composição química e propriedades do amido em duas épocas de colheita.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; JARÉN-GALÁN, M.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, Essex, v. 46, n. 2, p. 438-450, 2012.

FERRUZZI, M. G.; LUMPKIN, J. L.; SCHWARTZ, S. J.; FAILLA, M. L. Digestive stability, micellarization, and uptake of beta-carotene isomers by Caco-2 human intestinal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2780-2785, 2006.

FLESHMAN, M. K.; LESTER, G. E.; RIEDL, K. M.; KOPEC, R. E.; NARAYANASAMY, S.; CURLEY JUNIOR, R. W.; SCHWARTZ, S. J.; HARRISON, E. H. Carotene and novel apocarotenoid concentrations in orange-fleshed cucumis melo melons: determinations of β -barotene bioaccessibility and bioavailability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 9, p. 4448–4454, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, p. 497–509, 1957.

GARRETT, D. A.; FAILLA, M. L.; SARAMA, R. J. Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4301–4309, 1999.

GOMES, S.; TORRES, A. G.; GODOY, R.; PACHECO, S.; CARVALHO, J.; NUTTI, M. Effects of boiling and frying on the bioaccessibility of β -carotene in yellow-fleshed cassava roots (*Manihot esculenta* Crantz cv. BRS Jari), **Food and Nutrition Bulletin**, Tokyo, v. 34, p. 65–74, 2013.

HARRISON, E. H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1821, p. 70–77, 2012.

HASKELL, M. J.; RIBAYA-MERCADO, J. D. **Handbook on vitamin A tracer dilution methods to assess status and evaluate intervention programs**. Washington, DC: HarvestPlus, 2005. (HarvestPlus Technical Monograph Series, 5).

HEDRÉN, E.; DIAZ, V.; SVANBERG, U. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstoke, v. 56, n. 5, p. 425–430, 2002.

HIRSCHI, K. D. Nutrient biofortification of food crops. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 29, p. 401–421, 2009.

IGLESIAS, C.; MAYER, J.; CHAVEZ, L.; CALLE, F. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. **Euphytica**, Wageningen, v. 94, p. 367–373, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: Aquisição alimentar domiciliar *per capita* - Brasil e Grandes regiões. Rio de Janeiro, 2010. 282 p.

KEAN, E. G.; HAMAKER, B. R.; FERRUZZI, M. G. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and degermed maize meal products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 9918–9926, 2008.

KIMURA, M.; KOBORI, C. N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweet-potato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 1734–1746. 2007.

KOHLMEIER, M. **Nutrient metabolism**. London: Academic Press, 2003. p. 464-478. (Food Science and Technology International Series).

LA FRANO, M. R.; MOURA, F. F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B. J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Reviews**, New York, v. 72, n. 5, p. 289–307, 2014.

LEVIN, G.; MOKADY, S. Incorporation of all-trans- or 9-cis-beta-carotene into mixed micelles in vitro. **Lipids**, Chicago, v. 30, n. 2, p. 177-179, 1995.

LINUS PAULING INSTITUTE – LPI, Micronutrient Information Center. Vitamin A. Disponível em: <<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminA/index.html>> Acesso em: 15 jun. 2012.

LORENZI, J. O.; VALLE, T. L. **IAC 576** – A variedade de mandioca de mesa mais cultivada no Estado de São Paulo. Campinas: Instituto Agrônomo, 2002. 4 p. (Folder).

MAHAN, K. L.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Editora Roca, 2002, 1157 p.

MAIEVES, H. A.; OLIVEIRA, D. C.; BERNARDO, C.; MÜLLER, C. M. O.; AMANTE, E. R. Microscopy and texture of raw and cooked cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 43, p. 164–173, 2012.

MERCADANTE, A. Z. Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. In: SOCACIU, S. (Ed.). **Food colorants: chemical and functional properties**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 213-235.

MEZETTE, T. F. **Diversidade agronômica, bioquímica e molecular de acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletados em diferentes regiões do Brasil**. 2012. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MEZETTE, T. F. **Seleção de variedades de mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) com altos teores de carotenoides e vitamina A**. 2007. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo, Campinas, 2007.

MEZETTE, T. F.; BLUMER, C. G.; VEASEY, E. A. Morphological and molecular diversity among cassava genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 48, n. 5, p. 510-518, 2013.

MEZETTE, T. F.; CARVALHO, C. R. L.; MORGANO, M. A.; SILVA, M. G.; PARRA, E. S. B.; GALERA, J. M. V.; VALLE, T. L. Selection of sweet cassava elite-clones for agronomical, technological and chemical characteristics. **Bragantia**, Campinas, v. 68, p. 601-609, 2009.

MILLER, D. D.; WELCH, R. M. Food system strategies for preventing micronutrient malnutrition. **Food Policy**, Oxford, v. 42, p. 115–128, 2013.

MILLS, J. P.; TUMUHIMBISE, G. A.; JAMIL, K. M.; THAKKAR, S. K.; FAILLA, M. L.; TANUMIHARDJO, S. A. Sweet potato beta-carotene bioefficacy is enhanced by dietary fat and not reduced by soluble fiber intake in Mongolian gerbils. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 139, n. 1, p. 44-50, 2009.

NESTEL, P.; BOUIS, H. E.; MEENAKSHI, J. V.; PFEIFFER, W. Biofortification of Staple Food Crops. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, p. 1064–1067, 2006.

NETO, R. S. M.; CURADO, F. F.; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; MORAIS, R. S. Food intake of students to Pacatuba's rural area, Sergipe. In: 3rd ANNUAL BIOFORTIFICATION MEETING IN BRAZIL, 3., 2009, Aracaju. [on line]. Disponível em: <<http://www.biofort.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

NETZEL, M.; NETZEL, G.; ZABARAS, D.; LUNDIN, L.; DAY, L.; ADDEPALLI, R.; OSBORNE, S. A.; SEYMOUR, R. Release and absorption of carotenes from processed carrots (*Daucus carota*) using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model. **Food Research International**, Essex, v. 44, n. 4, p. 868–874, 2011.

NOBEL FOUNDATION. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1967**. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1967/. Acesso em: 12 ago. 2011.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO - NEPA. **Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO**. 4. ed. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011.

OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J.; BRUIL, M. A.; DOBBE, C. J.; PEREBOOM, D. P.; SIPS, A. J. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 44, p. 281–287, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. **Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005**. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva, Switzerland, 2009.

O'SULLIVAN, L.; JIWAN, M. A.; DALY, T.; O'BRIEN, N. M.; AHERNE, S. A. Bioaccessibility, uptake, and transport of carotenoids from peppers (*capsicum* spp.) using the coupled *in vitro* digestion and human intestinal caco-2 cell model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 9, p. 5374-5379, 2010.

POULAERT, M.; BOREL, P.; CAPORICCIO, B., GUNATA, Z.; DHUIQUE-MAYER, C. Grapefruit juices impair the bioaccessibility of β -carotene from orange-fleshed sweet potato but not its intestinal uptake by Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 18, p. 685-691, 2012.

RAMALHO, A.; SAUNDERS, C.; PADILHA, P. C. Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da fome oculta. In: RAMALHO, A. **Fome oculta: diagnóstico, tratamento e prevenção**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. 378 p.

RAMALHO, R. A. Hipovitaminose A. In: TADDEI, J. A.; LANG, R. M. F.; SILVA, G. L.; TOLO, M. H. A. (Ed.). **Nutrição em Saúde Pública**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2011. p. 211-221.

REBOUL, E.; RICHELLE, M.; PERROT, E.; DESMOULINS-MALEZET, C.; PIRISI, V.; BOREL, P. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 8749–8755, 2006.

RODRIGUES, E. P.; TEORO, B. Z. **Novas cultivares de batata-doce da Embrapa chegam ao mercado**. Brasília, DF: Embrapa Transferência de Tecnologia. [on line] Disponível em: http://www.spm.embrapa.br/noticias/noticia_completa/133/ Acesso em: 04 jun. 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington, DC: ILSI Press, 2001. 64 p. (OMNI Monography).

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 7, p. 726–740, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Handbook for carotenoids analysis**. Washington, DC: HarvestPlus, 2004. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2).

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFÁN, J. **Tabela Brasileira de Composição de Carotenoides em Alimentos: Fontes brasileiras de carotenoides**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Floresta, 2008. 100 p.

ROLSTON, L. H.; CLARK, C. A.; CANNON, J. M.; RANDLE, W. M.; RILEY, E. G.; WILSON, P. W.; ROBBINS, M. L. 'Beauregard' sweet potato. **HortScience**, St. Joseph, v. 22, p. 1338-1339, 1987.

SAYRE, R.; BEECHING, J. R.; CAHOON, E. B.; EGESI, C.; FAUQUET, C.; FELLMAN, J.; FREGENE, M.; GRUISSEM, W.; MALLOWA, S.; MANARY, M.; MAZIYA-DIXON, B.; MBANASO, A.; SCHACHTMAN, D. P.; SIRITUNGA, D.; TAYLOR, N.; VANDERSCHUREN, H.; ZHANG, P. The BioCassava Plus Program: Biofortification of cassava for Sub-Saharan Africa. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 251-272, 2011.

SCHIEBER, A.; CARLE, R. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical and nutritional implications. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 16, p. 416-422, 2005.

SCOTT, K. J.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents, fact or fiction? **Food Chemistry**, Barking, v. 69, p. 125-127, 2000.

SHERWIN, J. C.; REACHER, M. H.; DEAN, W. H.; NGONDI, J. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, p. 205-214, 2012.

SILVA, M. D. R. et al. Potential evaluation of food utilizations with more high levels of iron and zinc and in the school meals of São Luis – Maranhão. In: ANNUAL BIOFORTIFICATION MEETING IN BRAZIL, 3., 2009, Aracaju. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.biofort.com.br> Acesso em 20/11/2013.

SILVEIRA, E. Mandioca vitaminada: tubérculo e feijão mais nutritivos estão disponíveis para a alimentação dos brasileiros. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v. 200, p. 100-103, 2012.

THAKKAR, S. K. ; MAZIYA-DIXON, B.; DIXON, A. G.; FAILLA, M. L. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, p. 2229-2233, 2007.

THAKKAR, S. K.; HUO, T.; MAZIYA-DIXON, B.; FAILLA, M. L. Impact of style of processing on retention and bioaccessibility of β -carotene in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1344–1348, 2009.

THAKKAR, S. K.; MAZIYA-DIXON, B.; DIXON, A. G. O.; FAILLA, M. L. β -carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, p. 2229-2233, 2007.

TYSSANDIER, V.; REBOUL, E.; DUMAS, J.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; ARMAND, M.; MARCAND, J.; SALLAS, M.; BOREL, P. Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, Baltimore, v. 284, n. 6, p. G913-G923, 2003.

USDA. **Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC: National Academy of Sciences. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 2001.

VAN BUGGENHOUT, S. V.; ALMINGER, M.; LEMMENS, L.; COLLE, I.; KNOCKAERT, G.; MOELANTS, K.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. *In vitro* approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 12, p. 607- 618, 2010.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; SILVA, M. S. Caracterização molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento genético. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 457-463, 2011.

VILLELA, O. V.; PEREIRA, A. S.; LORENZI, J. O.; VALLE, T. L.; MONTEIRO, D. A.; RAMOS, M. T. B.; SCHMIDT, N. C. Competition among cassava clones selected for table and industry. **Bragantia**, Campinas, v. 44, p. 559-568, 1985.

VIMALA, B.; THUSHARA, R.; NAMBISAN, B.; SREEKUMAR, J. Effect of processing on the retention of carotenoids in yellow-fleshed cassava (*Manihot esculenta Crantz*) roots. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 166–169, 2011.

WEBER, D.; GRUNE, T. The contribution of b-carotene to vitamin A supply of humans **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 56, p. 251–258, 2012.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R.D. Breeding crops for enhanced micronutrient content. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 205-214, 2002.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 353-364, 2004.

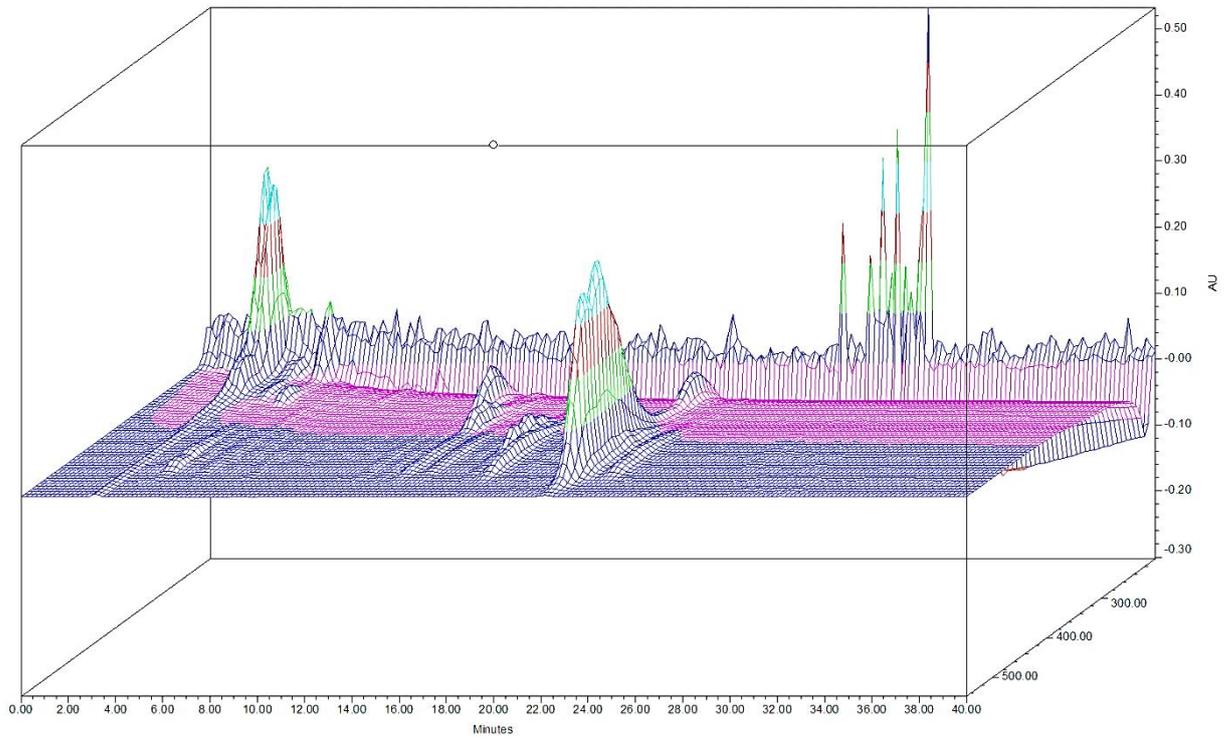
WOOLFE, J. A. **Sweet-potato: an untapped food resource**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 643 p.

YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering the provitamin A (β -Carotene) biosynthetic pathway into (Carotenoid-Free) rice endosperm. **Science**, Washington, DC, v. 287, n. 5451, p. 303-305, 2000.

ZANCUL, M. S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 45-50, 2004.

ZECHMEISTER, L. Cis-trans isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenylpolyenes. **Chemical Reviews**, v. 34, p. 267-339, 1944.

APÊNDICES

Apêndice A: Espectro de absorção completo obtido pelo detector de arranjo de diodos

Apêndice B: Fluxograma da análise de biodisponibilidade de carotenoides pela simulação *in vitro* da digestão e absorção por cultivos de células Caco-2

