

RODRIGO MARTINS DE VARGAS

**BIODISPONIBILIDADE DO β -CAROTENO DO PÓ DA FOLHA DE
MANDIOCA (*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*) EM RATOS**

BRASÍLIA, 2007

**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana**

**BIODISPONIBILIDADE DO β -CAROTENO DO PÓ DA FOLHA DE
MANDIOCA (*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*) EM RATOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana, Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Departamento de Nutrição, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira

Brasília, 2007

Banca Examinadora

Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira

Presidente – Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília – DF

Prof. Dr. Marcelo Hermes-Lima

Membro interno ao programa – Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília – DF

Profa. Dra. Nonete Barbosa Guerra

Membro externo – Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco – PE

Profa. Dra. Wilma Maria Coelho Araújo

Membro interno ao programa – Departamento de Nutrição
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília – DF

Agradecimentos

À minha orientadora, Egle Machado de Almeida Siqueira, pela oportunidade, confiança, amizade e ensinamentos fundamentais para a realização desta tese;

Aos meus pais Alex e Mara e meu irmão Rafael por estarem sempre ao meu lado, auxiliando no meu crescimento pessoal e profissional;

A minha esposa Ana Lúcia pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão;

Aos amigos do Laboratório de Biofísica, em especial aos Professores Doutores Elizabeth Maria Talá de Souza, Sandra Fernandes Arruda, Marcelo Hermes-Lima e Fernando Fortes pelos ensinamentos valiosos que estimularam meu interesse acadêmico.

Às colegas Érika Barbosa e Ivete Teresinha Graebner pela amizade, paciência e ensinamentos sobre carotenóides e vitamina A que tornaram possível a realização desta tese;

Ao amigo do Laboratório de Biofísica, Francisco Erivan da Silva (Chiquinho) pela grande amizade e auxílios prestados.

Enfim, a todos que me apoiaram, incentivaram e auxiliaram para a conclusão desta tese.

MUITO OBRIGADO!

Sumário

Sumário.....	5
Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas.....	7
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Apresentação da Estrutura do Trabalho.....	10
Parte I.....	11
Introdução.....	12
Revisão Bibliográfica.....	13
Objetivos.....	60
Material e Métodos.....	61
Referências Bibliográficas.....	65
Parte II.....	79
Resumo.....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	82
Resultados.....	84
Discussão.....	86
Referências Bibliográficas.....	91
Parte III.....	95
Conclusões Gerais.....	96

Lista de Figuras

Figuras da Parte I

Figura 1: Estrutura química dos principais metabólitos da vitamina A.....	14
Figura 2: Estruturas de alguns retinóides biológicos e sintéticos.....	15
Figura 3: Estruturas de alguns carotenóides encontrados na natureza.....	18
Figura 4: Esquema de absorção dos carotenóides.....	22
Figura 5: Esquema da absorção dos ésteres de retinila e do β -caroteno.....	24
Figura 6: Aspectos do metabolismo hepático da vitamina A e do β -caroteno.....	34
Figura 7: Relação entre os níveis de vitamina A plasmática e hepática.....	35
Figura 8: Captação e metabolismo da vitamina A e carotenóides nas células.....	39
Figura 9: Categorização dos países por grau de deficiência de vitamina A.....	45
Figura 10: Utilidade de metodologias para avaliar o estado nutricional de vitamina A.....	49

Lista de Tabelas

Tabelas da Parte I

Tabela 1: Comparação entre as recomendações de vitamina A.....43

Tabela 2: Critérios para estabelecer a significância da deficiência de vitamina A em crianças entre 6 e 71 meses de idades.....47

Tabela 3: Indicadores biológicos de deficiência sub-clínica de vitamina A em crianças entre 6 e 71 meses de idade e classificação como problema de saúde pública.....48

Tabelas da Parte II

Tabela 1. Ganho de peso, ingestão de dieta e de β -caroteno durante o período de repleção, Acúmulo de Retinol Hepático (LRA), Fator de Acúmulo de Retinol (RAF) e peso dos fígados ao final do estudo.....85

Resumo

O estímulo ao consumo de alimentos ricos em carotenóides pró-vitamínicos A é uma importante estratégia para combater a deficiência de vitamina A. A folha de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), que possui elevadas quantidades de β -caroteno, é utilizada na culinária típica da região Norte do Brasil e como um ingrediente da multimistura, suplemento alimentar alternativo empregado no combate à desnutrição infantil. No entanto, existem questionamentos sobre o potencial vitamínico A da folha de mandioca, principalmente devido à baixa biodisponibilidade dos carotenóides em hortaliças. O presente estudo avaliou a biodisponibilidade do β -caroteno do pó da folha de mandioca em ratos. Quinze ratos que tiveram suas reservas hepáticas de vitamina A depletadas por meio do consumo de uma dieta AIN-93G sem vitamina A (dieta DD) foram divididos em três grupos e tratados por 30 dias com uma das seguintes dietas: dieta DD (grupo deficiente); dieta DD adicionada de 7.200 μ g de β -caroteno sintético (grupo controle) ou dieta DD adicionada de 19,5g de pó de folha de mandioca/kg dieta (grupo mandioca). Ao final do tratamento, os ratos foram sacrificados para a dosagem da vitamina A hepática. A biodisponibilidade do β -caroteno foi expressa pelo Fator de Acúmulo de Retinol (RAF), razão entre o total de β -caroteno ingerido e o conteúdo de retinol hepático. A quantidade média de β -caroteno no pó da folha de mandioca foi de 37mg/kg. O ganho de peso dos ratos dos grupos controle e mandioca foi idêntico, revelando que o β -caroteno do pó da folha de mandioca promoveu o crescimento dos ratos de maneira similar ao β -caroteno sintético. O RAF do grupo mandioca (27,5) foi significativamente maior do que o RAF do grupo controle (16,5), demonstrando que o β -caroteno do pó da folha de mandioca possui 49,1% da biodisponibilidade do β -caroteno sintético. A menor biodisponibilidade do β -caroteno da folha de mandioca pode ser atribuída à influência da matriz da folha. Os resultados demonstram que o β -caroteno do pó da folha de mandioca é biodisponível e eficiente na recuperação do estado nutricional de vitamina A em ratos. Estudos em humanos são necessários para confirmar a eficiência da utilização do pó da folha de mandioca no combate à deficiência de vitamina A.

Palavras-chaves: biodisponibilidade. β -caroteno. folha de mandioca. vitamina A. ratos.

Abstract

Incentive to consumption of provitamin A carotenoid rich foods is an important strategy to reduce vitamin A deficiency. Cassava leaves (*Manihot esculenta Crantz*), a rich source of β -carotene, are part of traditional culinary in the North region of Brazil and have been used as an ingredient of multimistura, a Brazilian alternative dietary supplement utilized in the treatment of undernutrition children. However, there are some questions about the vitamin A potential of cassava leaves, mainly because of the low bioavailability of carotenoids in leafy vegetables. This study aimed to assay the β -carotene bioavailability of cassava leaves powder in rats. Fifteen rats that had their liver vitamin A reserves depleted through the consumption of AIN-93G diet without vitamin A (DD diet) were separated into three groups and treated for 30 days with one of the following diets: DD diet (deficient group), DD diet with of 7,200 μ g of synthetic β -carotene (control group), or DD diet with 19.5 g of cassava leaves powder per kg of diet (cassava group). After treatment, the rats were killed to analyze of liver vitamin A content. The β -carotene bioavailability was estimated as Retinol Accumulation Factor (RAF), division of total β -carotene ingested by the retinol hepatic content. The average content of β -carotene in cassava leaves powder was 37mg/kg. The weight gain of rats from control and cassava groups was identical, showing that the β -carotene from cassava leaves powder promoted growth similarly to the synthetic β -carotene. The RAF of cassava group (27.5) was significantly high than the RAF of control group (16.5), revealing that bioavailability of β -carotene from cassava leaves powder is 49.1% of synthetic β -carotene bioavailability. The lower bioavailability from leaves is probably due to the effect of food matrix. Our findings showed that the β -carotene from cassava leaves powder is bioavailable and capable to repair the vitamin A status of rats. Human interventions are necessary to confirm the efficiency of cassava leaves powder in the reduction of vitamin A deficiency.

Keywords: bioavailability. β -carotene. cassava leaves powder. vitamin A. rats.

Apresentação da Estrutura do Trabalho

A tese foi subdividida em três partes e estruturada da seguinte forma:

Parte I

Introdução

Revisão Bibliográfica

Objetivos

Material e Métodos

Referências Bibliográficas

Parte II

Artigo: β -caroteno da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) melhora o estado nutricional de vitamina A em ratos.

β -Carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats

Situação: Publicado no Comparative Biochemistry and Physiology, Volume 146C, Numbers 1-2 July/August 2007, 235–240.

Parte III

Conclusões

Parte I

Introdução

Revisão Bibliográfica

Objetivos

Material e Métodos

Referências Bibliográficas

Introdução

A deficiência de vitamina A é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Estima-se que mais de 250 milhões de crianças apresentam deficiência sub-clínica de vitamina A e que entre 250 e 500 mil crianças fiquem cegas todos os anos, sendo que metade delas morre até 12 meses após a perda da visão (Sommer e West, 1996; WHO, 1995).

Uma adequação na ingestão de Vitamina A poderia prevenir aproximadamente 2,5 milhões das quase oito milhões de mortes de crianças em idade pré-escolar e na última metade da infância que ocorrem todos os anos nos países de alto risco (Humphrey *et al.*, 1992). Uma das estratégias no combate à hipovitaminose A é o incentivo à diversificação da dieta que envolve uma série de intervenções de longo prazo destinadas a aumentar a identificação, produção, disponibilidade, acesso, consumo e biodisponibilidade de alimentos ricos em vitamina A pré-formada e carotenóides pró-vitamínicos A (WHO, 1996; Ruel, 2001).

O consumo de vegetais ricos em carotenóides pró-vitamínicos A é uma importante fonte de vitamina A nos países em desenvolvimento. Estimativas apontam que na África e na Ásia mais de 80% da vitamina A da dieta é proveniente dos carotenóides pró-vitamínicos A de frutas e hortaliças, enquanto na América do Sul esse valor seria de 60% (ACC/SCN, 1993).

A mandioca é uma cultura extraordinariamente adaptável e vigorosa, sendo a principal fonte de energia para mais de meio bilhão de pessoas em todo mundo, principalmente em países tropicais (FAO, 2000; Chavez *et al.*, 2000). Além da importância energética de sua raiz, a folha da mandioca é utilizada na culinária típica da região Norte e como um suplemento alimentar para crianças desnutridas, desde 1980, devido a sua elevada concentração de micronutrientes, especialmente o β -caroteno e baixo custo (Madruga e Camara, 2000).

No entanto, são raros os estudos que avaliam o potencial nutritivo das folhas de mandioca e há muitos questionamentos sobre sua efetividade no combate à carência de vitamina A, uma vez que evidências científicas apontam uma baixa biodisponibilidade dos carotenóides de hortaliças (Castenmiller e West, 1998).

Assim, o presente estudo investigou a efetividade do pó da folha de mandioca na recuperação do estado nutricional de ratos que tiveram suas reservas hepáticas de vitamina A depletadas.

Revisão Bibliográfica

Histórico

A vitamina A é considerada uma vitamina lipossolúvel essencial aos seres humanos, sendo indispensável à visão, ao crescimento, à reprodução, à proliferação, à diferenciação celular e à integridade do sistema imune (FAO/WHO, 2004).

A história dessa vitamina está relacionada à sua importância para o organismo humano e suas aplicações clínicas. A vitamina A é conhecida provavelmente a mais de 3.500 anos como um fator capaz de curar doenças causadas por deficiência. Alguns papiros dos antigos egípcios (1.825-1.500 A.C.) sugerem que o fígado de animais era utilizado no tratamento de alguns tipos de cegueira (Wolf, 1996).

Hipócrates (460-327 A.C.), na antiga Grécia, descreveu a cegueira noturna – *nyktalopia* – como uma condição que se manifestava principalmente em crianças com doenças infecciosas. Para seu tratamento era recomendada a ingestão de carne de fígado crua (Wolf, 1996). Atualmente, a cegueira noturna é reconhecida como uma manifestação ocular indicativa de deficiência de vitamina A e o fígado, uma das fontes mais importante dessa vitamina.

Os primeiros estudos científicos a respeito de um componente alimentar essencial com atividade de vitamina A foram publicados em 1913. McCollum e Davis demonstraram que certas substâncias extraídas da manteiga ou de ovos eram essenciais ao crescimento de ratos jovens alimentados com rações contendo banha de porco ou óleo de oliva como únicas fontes de gordura. Posteriormente, foi identificado que o óleo de fígado de bacalhau poderia substituir a manteiga. McCollum e Davis chamaram esse fator de crescimento de “fator A lipossolúvel” (Ross, 1999).

Na mesma época outros dois pesquisadores, Osborne e Mendel, utilizando experimentos similares, observaram que a adição de leite em pó integral à dieta de ratos jovens alimentados com rações contendo banha de porco como única fonte de gordura era fundamental para seu crescimento (Wolf, 1996). Steenbock reconheceu que um fator presente em vegetais amarelos estava associado ao fator lipossolúvel A. No entanto, foi Moore, dez anos mais tarde, quem comprovou que o pigmento amarelo, atualmente conhecido como β -caroteno, era um precursor da quase incolor vitamina A (Wolf, 1996; Blomhoff e Blomhoff, 2006).

Na década de 1920, foram realizadas diversas descobertas a respeito da importância da vitamina A no crescimento, na diferenciação celular e na resistência a infecções (Ross, 1999).

Karrer e seus colegas isolaram e elucidaram a estrutura química do β -caroteno e do retinol (Wolf, 1996) e, no final de 1940, Arens e van Dorp descreveram a síntese do ácido retinóico (Ross, 1999).

Outras descobertas importantes na pesquisa da vitamina A incluíram a elucidação do papel da vitamina A no mecanismo da visão por Wald, em 1968, e a descoberta de receptores nucleares específicos para o *todo-trans*-ácido retinóico, em 1987, por dois grupos de pesquisadores independentes (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

Classificação e propriedades

Atualmente, o termo vitamina A descreve uma família de compostos lipossolúveis, relacionados estruturalmente ao retinol e que compartilham suas atividades biológicas. Essas moléculas contêm uma estrutura de 20 carbonos com um anel cicloexenil substituído (β -ionona) e uma cadeia lateral tetraênica com um grupo hidroxila (retinol), aldeído (retinal), ácido carboxílico (ácido retinóico) ou éster (éster de retinila) no carbono 15 (Ross, 1999; IOM, 2001). A figura 1 mostra a estrutura química dos principais metabólitos da vitamina A.

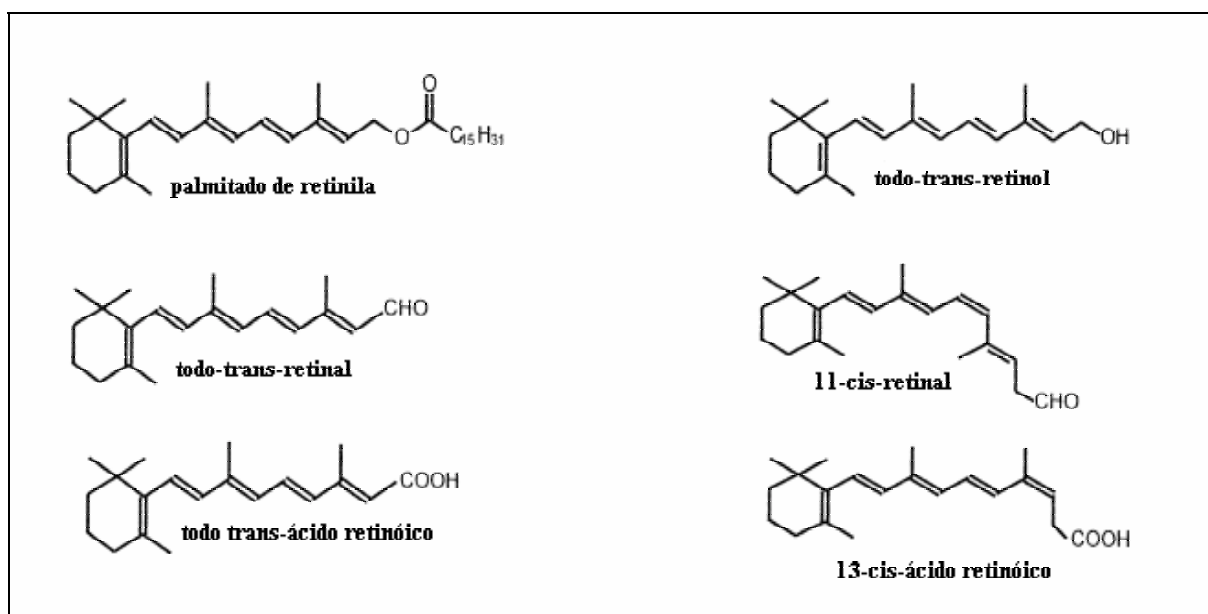


Figura 1: Estrutura química dos principais metabólitos da vitamina A. Fonte: Ross, 1999.

O termo retinóides se refere tanto ao retinol e seus metabólitos naturais quanto a um grande número de análogos sintéticos que apresentam semelhanças estruturais com o retinol, mas que podem desempenhar somente algumas ou nenhuma das funções naturais da vitamina

A (Ross, 1999; IOM, 2001; Blomhoff e Blomhoff, 2006). A figura 2 mostra a estrutura de alguns retinóides biológicos e sintéticos.

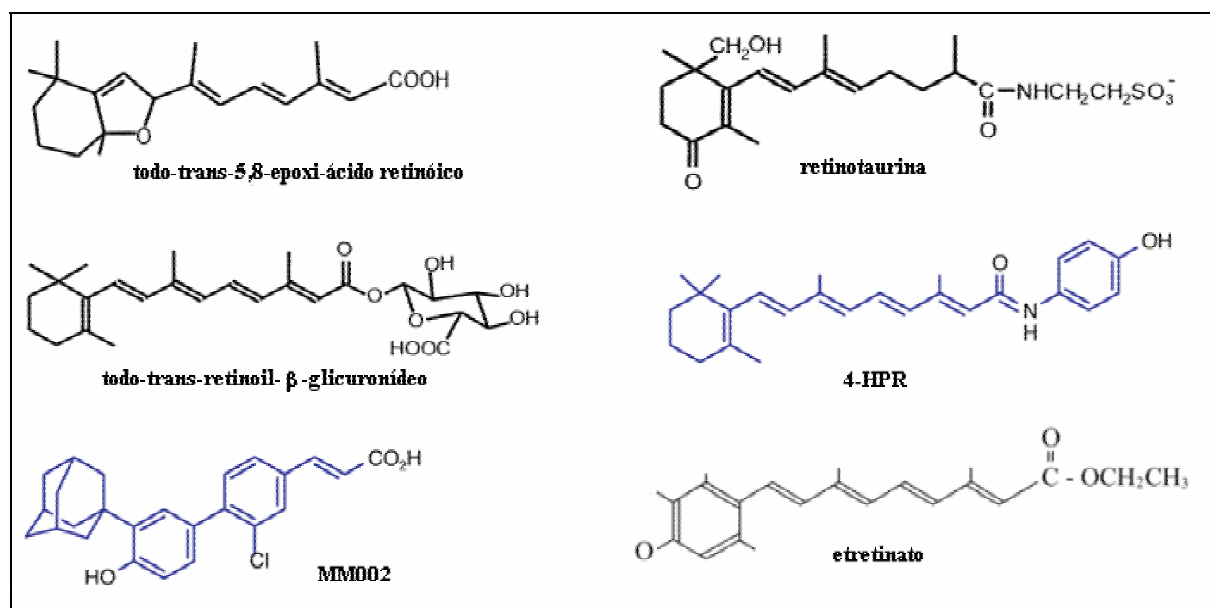


Figura 2: Estruturas de alguns retinóides biológicos e sintéticos. Fonte: Ross, 1999.

O retinol é um álcool primário, polietilênico e lipossolúvel, de massa molecular equivalente a 286,46. Como os outros retinóides, é extremamente instável na presença de agentes oxidantes e fotóns, sofrendo degradação oxidativa e isomeração. Seu sistema de cinco duplas ligações conjugadas confere propriedades espectrais características que são utilizadas na detecção, identificação e quantificação dos retinóides (Ross, 1999).

O grupamento hidroxila do retinol pode ser esterificado com ácidos graxos, formando ésteres de retinila. Na natureza, o retinol é esterificado com ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as preparações farmacêuticas podem incluir ésteres de cadeia curta. A esterificação confere maior estabilidade ao retinol. O retinol pode, ainda, sofrer sucessivas oxidações, produzindo, inicialmente, um aldeído (retinal) que pode ser, posteriormente, oxidado a um ácido carboxílico, o ácido retinóico (Ross, 1999).

A maioria dos retinóides naturais é solúvel na gordura corporal, em óleos e em solventes orgânicos, exceto água (Ross, 1999). No entanto, algumas moléculas apresentam maior grau de solubilidade em água, tais como os conjugados glicuronídeos de retinol e o ácido retinóico. A solubilidade em água, a temperatura ambiente e pH 7,3, do retinol, do retinal e do ácido retinóico é de 60, 110 e 210 nmol/L, respectivamente. Essa propriedade faz do ácido retinóico uma molécula com capacidade de difundir-se, eficientemente, em meio aquoso e em membranas hidrofóbicas (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

Enquanto alguns autores incluem os carotenóides com atividade pró-vitáminica A (carotenóides que atuam como precursores alimentares do retinol) na definição do termo vitamina A (Ross, 2001; IOM, 2001), outros fazem questão de excluí-los (Yuyama *et al.*, 2005; Beitune *et al.*, 2003).

A inclusão dos carotenóides pró-vitáminicos A nesta definição justifica-se pela semelhança química. A vitamina A é essencialmente metade de uma molécula de β -caroteno com a adição de uma molécula de água no final da cadeia lateral. Assim, o requerimento mínimo para que um carotenóide seja considerado pró-vitáminico A é a presença de um anel β -ionona com uma cadeia poliênica de 11 carbonos (Rodríguez-Amaya, 1996; Handelman, 2001).

No entanto, a exclusão dos carotenóides da definição de vitamina A pode ser explicada pela grande variedade desses compostos (mais de 600, excluindo-se os isômeros) e pelo fato de menos de 10% dos carotenóides existentes apresentarem atividade pró-vitáminica A, sendo que nos seres humanos apenas três tem uma importância relevante: o β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina (IVACG, 1999). Além disso, outras funções têm sido atribuídas aos carotenóides que são independentes de seu potencial pró-vitáminico A como, por exemplo, sua ação antioxidante no organismo.

O termo ingestão de vitamina A é utilizado para designar todos os compostos com atividade de vitamina A presentes na dieta (Yuyama *et al.*, 2005). Já o termo *carotenóides* foi inicialmente cunhado por Tsweet, em 1911, durante seus estudos sobre a separação cromatográfica desses compostos. Inicialmente, as pesquisas estabeleceram a importância dos carotenóides para o ótimo funcionamento da via fotossintética. No entanto, aos poucos, esses pigmentos foram sendo encontrados em tecidos humanos, em animais e em microorganismos e novas funções foram atribuídas a esses compostos (Olson, 1999a).

Os carotenóides encontrados em alimentos são geralmente tetraterpenóides com 40 átomos de carbono construídos a partir de oito unidades isoprenóides com cinco átomos de carbonos, unidas de forma que a seqüência é invertida no centro. A cadeia linear básica pode conter uma ou duas estruturas cíclicas nas extremidades de suas cadeias conjugadas (Rodríguez-Amaya, 1999a). Os carotenóides que possuem somente átomos de carbono e hidrogênio em sua composição recebem o nome de carotenos. Aqueles que contêm oxigênio são chamados de xantofilas (Rodríguez-Amaya, 1999a).

Com poucas exceções, os carotenóides são moléculas hidrofóbicas pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como, por exemplo, a acetona, o éter etílico e o

clorofórmio. Já as xantofilas se dissolvem melhor em metanol e etanol (Rodríguez-Amaya, 1999a).

O longo sistema de duplas ligações conjugadas presentes nos carotenóides é responsável por suas características espectrais que são utilizadas para sua identificação e quantificação. Esses pigmentos, na sua maioria, absorvem maximamente em três comprimentos de onda, resultando num espectro com três picos. Quanto maior o número de duplas ligações, maior é o comprimento de onda absorvido (λ_{max}) e mais intensa é a cor do carotenóide. O licopeno, por exemplo, com 11 duplas ligações possui uma cor vermelha. Um mínimo de sete duplas ligações é necessário para que o carotenóide tenha uma cor perceptível. A presença de estruturas cíclicas altera o espectro de absorção dessas moléculas resultando na redução dos λ_{max} , com picos menos definidos de menor intensidade. O β -caroteno, por exemplo, com duas estruturas cíclicas, embora apresente o mesmo número de duplas ligações que o licopeno, tem uma cor alaranjada (Rodríguez-Amaya, 1999a).

A análise dos carotenóides é extremamente difícil devido ao grande número de carotenóides naturalmente existentes, à grande variação quantitativa e qualitativa dos carotenóides nos alimentos, à pouca quantidade de carotenóides pró-vitamínicos A, à sua variada biopotência e ao fato de os carotenóides serem moléculas extremamente insaturadas, o que os tornam propícios a sofrerem isomeração, oxidação e degradação durante sua análise (Rodríguez-Amaya, 1989; Rodríguez-Amaya, 1996).

Os carotenóides estão presentes na natureza, principalmente na forma *trans*, e a presença de certos fatores como temperaturas elevadas, luz e ácidos pode provocar a isomeração da dupla ligação da forma *trans* para a forma *cis*. Essa isomeração causa uma perda de cor, diminuição do λ_{max} e aparecimento de um pico *cis* no espectro, o que permite sua identificação (Rodríguez-Amaya, 1999a).

Já a oxidação depende diretamente da disponibilidade de oxigênio e é estimulada pela presença de luz, enzimas e metais. O primeiro passo na degradação dos carotenóides parece ser a formação de apocarotenóides, ou seja, carotenóides com a cadeia carbônica reduzida através da oxidação. A fragmentação dos apocarotenóides resulta na formação de compostos com baixo peso molecular, similar aos encontrados na oxidação dos ácidos graxos (Rodríguez-Amaya, 1999a). A figura 3 apresenta a estrutura química de alguns carotenóides encontrados na natureza.

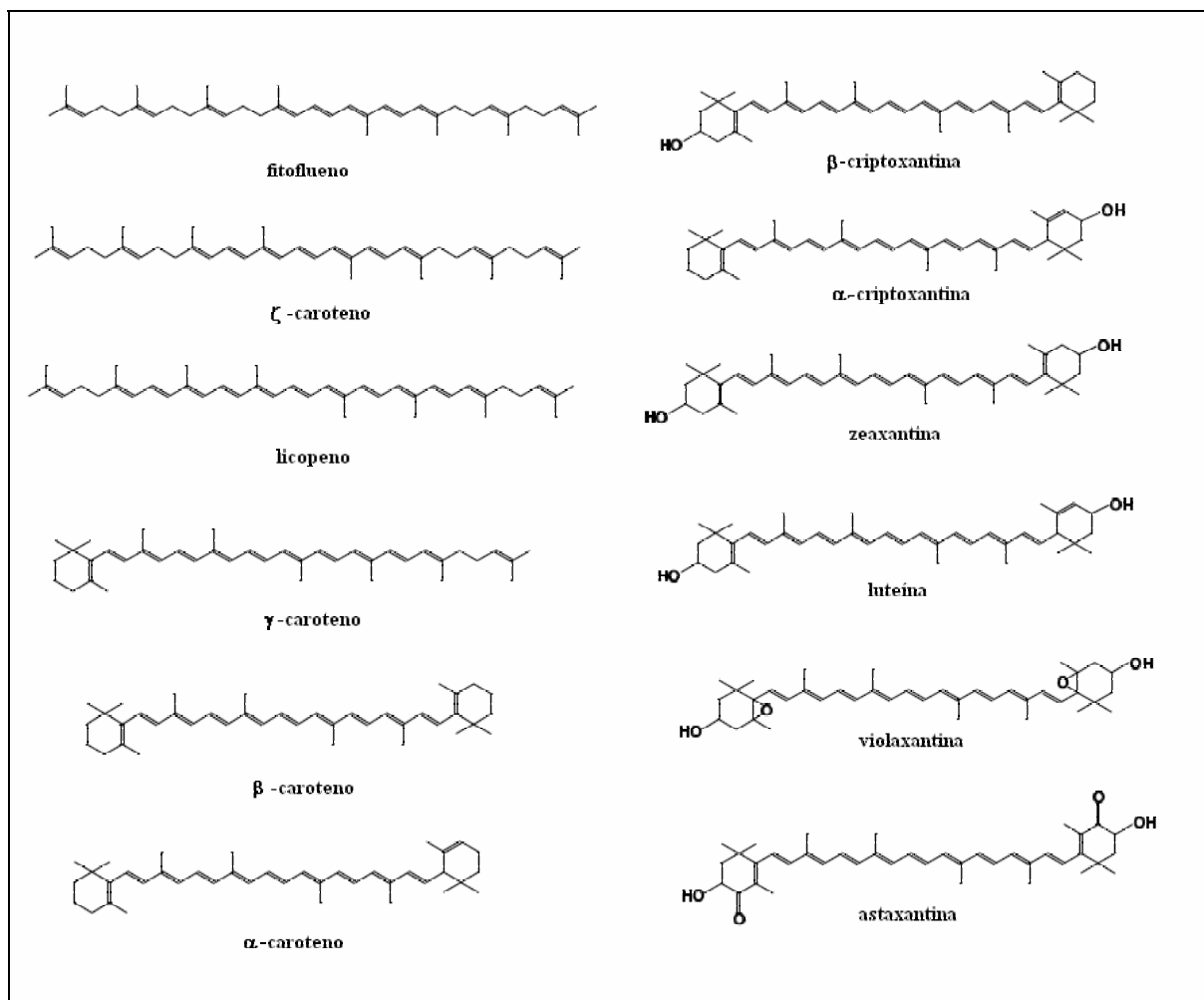


Figura 3: Estruturas de alguns carotenóides encontrados na natureza. Fonte: Rodriguez-Amaya, 1997.

Vitamina A e carotenóides nos alimentos

Os seres humanos e outros animais não são capazes de sintetizar a vitamina A pré-formada ou qualquer carotenóide (Ross, 1999). Assim, as necessidades diárias de vitamina A devem ser atendidas por meio da ingestão de alimentos que contenham esses nutrientes. Teoricamente, é possível que os seres humanos alcancem uma ingestão adequada dessa vitamina a partir de diversos tipos de dietas, variando de uma exclusivamente vegetariana a uma estritamente carnívora.

A vitamina A pré-formada é encontrada exclusivamente nos alimentos de origem animal, principalmente na forma de ésteres de retinila, ou seja, o retinol está esterificado com ácidos graxos de cadeia longa, principalmente o palmitato e o estereato. Os tecidos animais contêm muito pouco retinal e ácido retinóico e, conseqüentemente, esses compostos contribuem muito pouco para a ingestão de vitamina A pré-formada (Ross, 1999).

O fígado de animais e o óleo de fígado de peixes são as fontes mais concentradas de vitamina A pré-formada, encontradas na natureza. O leite integral e seus derivados e os ovos também são boas fontes dessa vitamina. No entanto, os demais tipos de carnes, geralmente, contêm quantidades insignificantes de vitamina A (NEPA, 2006). Os peixes de água doce contêm outra forma de vitamina A, o 3-deidroretinol, também chamada de vitamina A₂. Esta pode ser reduzida a retinol *in vivo* e proporciona cerca de 40% da atividade biológica da vitamina A (Yuyama *et al.*, 2005; Ross, 1999).

Os carotenóides são encontrados em vários organismos vivos, incluindo animais, plantas e microorganismos. Os carotenóides encontrados em tecidos animais são derivados da dieta e armazenados intactos ou modificados (Ross, 1999). As plantas são capazes de sintetizar carotenóides que estão envolvidos na manutenção da fotossíntese (Niyogi, 2000) ou na atração de insetos que aumentam a polinização (Olson, 1999b).

Apesar do grande número de estudos existentes que avaliaram a composição de carotenóides nos alimentos, não existe uma tabela de composição de carotenóides em alimentos adequadamente validada. Rodriguez-Amaya (1997) chama a atenção para o fato de que os dados sobre o teor de carotenóides pró-vitamínicos A em alimentos ainda estarem longe de serem considerados adequados.

Isto pode ser explicado pela dificuldade de se analisar os carotenóides e pelo grande número de fatores que interferem na composição dos carotenóides nos alimentos, tais como: cultivar, variedade da planta, estágio de maturação, uso de agrotóxicos, clima, localização geográfica, condições de plantio, colheita e pós-colheita, parte da planta consumida, processamento e armazenamento (Mercadante e Rodriguez-Amaya, 1991; Rodriguez-Amaya, 1997; Rodriguez-Amaya, 1999; Agostini-Costa *et al.*, 2003; Scott e Eldridge, 2005; Bernhardt e Schlich, 2006).

De acordo com Rodriguez-Amaya (1997), pesquisas realizadas em diferentes países demonstraram que, em termos de conteúdo pró-vitamínico A, as fontes mais importantes de carotenóides são as hortaliças verde-escuras, as frutas tropicais amarelo-alaranjadas, os óleos de palmeiras e algumas raízes. Os carotenóides nos óleos estão presentes na forma de soluções, enquanto que nas frutas e nas hortaliças estão localizados no interior das matrizes (Olson, 1999b).

Nas hortaliças verde-escuras, a cor característica dos carotenóides está mascarada pela presença da clorofila (IVACG, 1999). As hortaliças têm uma composição de carotenóides qualitativamente mais constante do que as frutas. A luteína, que não possui atividade pró-

vitamínica A, é o carotenóide mais abundante, seguida pelo β -caroteno (Rodríguez-Amaya, 1999; Mercadante e Rodríguez-Amaya, 2001).

As frutas, geralmente, possuem níveis menores de carotenóides pró-vitamínicos A e uma composição mais complexa. As frutas de clima tropical, normalmente, são mais ricas em carotenóides do que aquelas de clima temperado (Rodríguez-Amaya, 1997).

As frutas podem ser divididas em dois grandes grupos em relação à sua composição de carotenóides: aquelas em que o β -caroteno é o principal carotenóide como, por exemplo, o damasco, a acerola, a manga, o buriti e a nêspera; e aquelas em que a β -criptoxantina é o principal carotenóide, tais como: o cajá, a pitanga, o pêssego e o caqui (Khachik *et al.*, 1989; Rodríguez-Amaya, 1996; Godoy e Rodríguez-Amaya, 1995a; Godoy e Rodríguez-Amaya, 1995b; Mercadante *et al.*, 1998b; Cavalcante e Rodríguez-Amaya, 1992).

Os óleos da palmeira *Elaeis guineensis*, conhecido no Brasil como óleo de dendê, é considerada a fonte mais rica de carotenóides pró-vitamínicos A. Embora os carotenóides não estejam amplamente distribuídos nas raízes, a cenoura, com elevado teor de β -caroteno e α -caroteno, e a batata-doce amarela, rica em β -caroteno, são consideradas importantes fontes de carotenóides pró-vitamínicos A em alguns países (Rodríguez-Amaya, 1999b).

O licopeno e o ζ -caroteno são carotenóides acíclicos, portanto, não possuem atividade pró-vitamínica A. O licopeno é o principal pigmento de muitas frutas e vegetais vermelhos, tais como: tomate, melancia, mamão e goiaba (Rodríguez-Amaya, 1999a). Já o ζ -caroteno, apesar de geralmente estar presente em pequenas quantidades, é o principal pigmento do maracujá (Mercadante *et al.*, 1998a) e da carambola (Gross *et al.*, 1983).

O α -caroteno e o γ -caroteno geralmente estão presentes em pequenas quantidades. O α -caroteno pode ser encontrado em cenoura e em algumas variedades de abobrinhas e abóboras (Arima e Rodríguez-Amaya, 1990). Já o γ -caroteno é o principal carotenóide da pitanga (Cavalcante e Rodríguez-Amaya, 1992). A zeaxantina, sem atividade pró-vitamínica A, é um carotenóide presente em pequenos níveis nos alimentos, com exceção do milho e do piqui (Rodríguez-Amaya, 1999a).

Metabolismo

O metabolismo da vitamina A envolve, inicialmente, o processamento dos ésteres de retinila ou dos carotenóides alimentares, seguido pela captação dessas moléculas e seus produtos, pelos enterócitos. A vitamina A absorvida é transportada pelo organismo até o

figado, principal órgão no seu metabolismo, onde pode ser armazenada, oxidada ou transportada para outras células e órgãos do corpo. O metabolismo da vitamina A envolve numerosos ciclos de hidrólise e reesterificação no intestino, fígado e outros tecidos. As proteínas ligadoras de retinóides têm um papel muito importante na absorção, transporte e utilização da vitamina A pelo organismo.

Digestão e Absorção

Após a ingestão de alimentos contendo vitamina A pré-formada, o processo digestivo libera os ésteres de retinila das matrizes alimentares permitindo sua emulsificação, com sais biliares e lipídios, e sua hidrólise, por hidrolases de ésteres de retinila (REH), mais especificamente pela enzima lipase pancreática e pela enzima intestinal da membrana de borda em escova, fosfolipase B (IOM, 2001; Harrison, 2005).

O retinol livre (ROL), obtido pela ação hidrolítica dessas enzimas, é absorvido pelos enterócitos. A eficiência de absorção da vitamina A pré-formada é elevada, em torno de 70 a 90% e, mesmo com o aumento da quantidade ingerida, a absorção ainda se mantém elevada (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999; Yuyama *et al.*, 2005). Acredita-se que, em concentrações fisiológicas, a absorção de retinol é saturável e mediada por carregador, enquanto que, em concentrações farmacológicas, a absorção do retinol é não-saturável e dependente de processo por difusão (Harrison e Hussen, 2001), o que pode ajudar a explicar a toxicidade da vitamina A pré-formada em altas doses (Ross, 1999). Segundo Harrison e Hussen (2001), apesar de existirem evidências sobre a existência de transportador protéico de retinol, até hoje, nenhuma proteína foi identificada ou caracterizada como responsável por esse processo.

No caso da ingestão de alimentos ricos em carotenóides, os pigmentos necessitam ser liberados dos alimentos, por meio dos processos digestivos, incorporados às micelas e absorvidos pela mucosa duodenal. A absorção dos carotenóides se inicia com a quebra mecânica e enzimática da matriz alimentar e posterior liberação dos carotenóides no lúmen intestinal (Parker, 1996; Olson, 1999b; Yonekura e Nagao, 2007).

Os carotenóides liberados são, então, incorporados na fase lipídica, que é emulsificada em pequenas gotículas lipídicas, no estômago. Posteriormente, os carotenóides são transferidos para as micelas produzidas pela ação dos sais biliares, lipídeos dietéticos e seus produtos. As micelas possuem uma estrutura na forma de disco com um diâmetro aproximado

de 4 a 60 nm, consistindo de lipídeos hidrofóbicos cercados por uma camada externa de sais biliares (Parker, 1996; Olson, 1999b; Yonekura e Nagao, 2007).

Os processos envolvidos na transferência dos carotenóides das micelas para os enterócitos não são totalmente compreendidos. Acredita-se que a absorção dos carotenóides ocorra por um processo de difusão passiva similar ao que ocorre com o colesterol e outros produtos da lipólise de triacilgliceróis. Após as micelas migrarem para a camada de água da membrana em borda de escova, os carotenóides deixam a estrutura micelar e se difundem através da membrana para dentro do citoplasma (Parker, 1996; Olson, 1999b; Yonekura e Nagao, 2007).

Yonekura e Nagao (2007), em sua revisão sobre a absorção intestinal dos carotenóides, apontam para o fato de alguns estudos científicos relatarem um possível transporte mediado por receptor para o β -caroteno e para a luteína na membrana apical dos enterócitos. O transportador envolvido seria o SR-BI. No entanto, outros estudos são necessários a fim de confirmar está hipótese ou mesmo o envolvimento de outras proteínas transportadoras. A figura 4 apresenta o esquema de absorção dos carotenóides, proposto pelos autores.

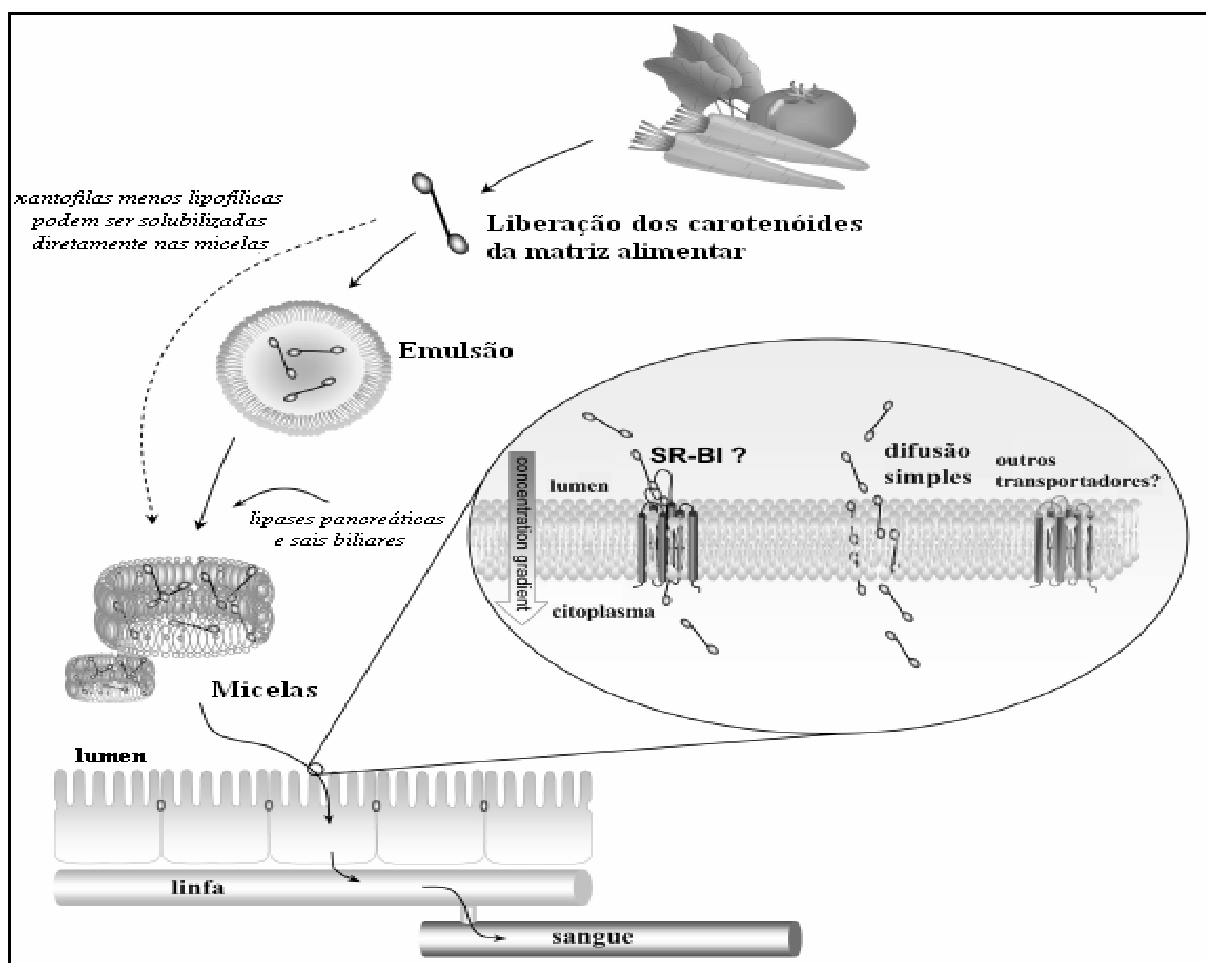


Figura 4: Esquema de absorção dos carotenóides, proposto por Yonekura e Nagao (2007).

Dentro dos enterócitos, o β -caroteno pode ser clivado centralmente pela enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase, formando duas moléculas de retinal (Parker, 1996; Olson, 1999a; Blomhoff e Blomhoff, 2006). Em 2000, von Lintig e Vogt conseguiram clonar essa enzima em drosófilas.

Os carotenóides podem também sofrer uma clivagem excêntrica, levando à formação de duas moléculas de apocarotenóides com diferentes comprimentos de cadeia, que podem subsequenteemente formar retinal ou ácido retinóico (Parker, 1996; Olson, 1999b; Blomhoff e Blomhoff, 2006). Kiefer *et al.* (2001) clonaram a enzima responsável por essa reação, a β - β -caroteno 9',10'-dioxigenase que é capaz de clivar o β -caroteno, e outros carotenóides como a luteína.

O retinol ou o retinal presentes nos enterócitos se ligam rapidamente à proteína celular ligadora de retinol II (CRBP-II). Essa proteína, que também é capaz de se ligar ao 13-*cis* retinol e ao 3-deidroretinol, é expressa principalmente no citoplasma das células intestinais. A CRBP-II tem a função de regular a concentração livre de retinóides na célula e direcioná-los a enzimas específicas envolvidas na sua absorção (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999). Xueping *et al.* (2002) demonstraram que camundongos, que tiveram o gene da CRBP-II inativado e foram mantidos em dietas ricas em vitamina A, apresentaram uma redução de 40% nas reservas hepáticas de vitamina A quando comparados ao grupo controle, confirmando a importância dessa proteína na absorção intestinal de vitamina A.

O retinol nos enterócitos pode ser convertido a retinal pela ação da enzima retinol desidrogenase (RODH). A reação contrária é catalisada pela enzima retinal redutase (RED). O retinal pode, ainda, ser transformado em ácido retinóico pela ação da retinal desidrogenase (RALDH), que reconhece o retinal ligado à CRBP-II. Os apocarotenóides podem formar tanto o retinal como o ácido retinóico (Silveira e Moreno, 1998; Harrison e Hussen, 2001).

O retinol ligado à CRBP-II sofre esterificação com ácidos graxos de cadeia longa, principalmente o ácido palmítico e o esteárico, no retículo endoplasmático. Uma das enzimas envolvidas nesse processo é a lecitina:retinol aciltransferase (LRAT) que utiliza como substratos o retinol ligado à CRBP-II e os ácidos graxos *sn*-1 da fosfatidilcolina, presentes nas membranas. Na presença de concentrações intracelulares elevadas de retinol, a enzima acil:CoA retinol aciltransferase (ARAT), que reconhece apenas o retinol “livre”, irá esterificar o retinol. A ARAT deriva seu ácido graxo da acil-CoA (Silveira e Moreno, 1998; Harrison e Hussen, 2001).

Os ésteres de retinila formados e os carotenóides intactos remanescentes são incorporados aos quilomícrons. Os quilomícrons são lipoproteínas de baixa densidade compostas por moléculas de triacilglicerol, fosfolípidos, carotenóides, ésteres de retinila e ésteres de colesterol. Os quilomícrons são, então, liberados pelos enterócitos no sistema linfático (Silveira e Moreno, 1998; Parker, 1996; Ross, 1999; Olson, 1999b). A figura 5 mostra o esquema de absorção dos ésteres de retinila e do β -caroteno pelo enterócito, conforme proposto por Silveira e Moreno (1998).

Embora a maior parte da vitamina A absorvida seja secretada no sistema linfático como ésteres de retinila, uma quantidade significativa de retinol é, também, liberada na circulação portal como retinol não-esterificado. A absorção portal é provavelmente muito importante em determinadas patologias que afetam a secreção de quilomícrons como, por exemplo, as abetalipoproteinemias (Harrison, 2005).

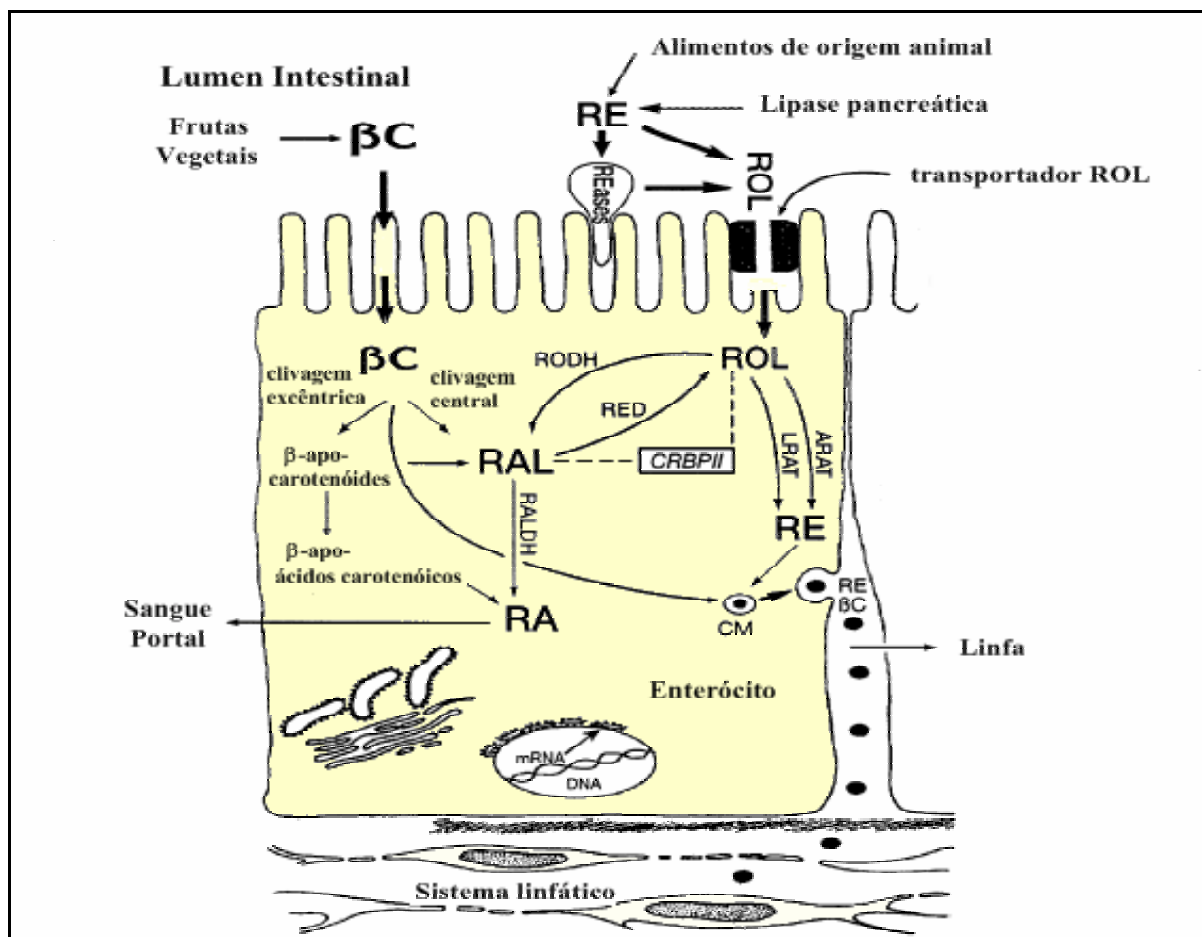


Figura 5: Esquema da absorção dos ésteres de retinila e do β -caroteno. β -caroteno (β C); retinal (RAL); ácido retinóico (RA); retinol (ROL); ésteres de retinila (RE); quilomícrons (CM); lecitina:retinol aciltransferase (LRAT); acil:CoA retinol aciltransferase (ARAT); retinol desidrogenase (RODH); retinal redutase (RED); retinal desidrogenase (RALDH); proteína celular ligadora de retinol II (CRBP-II). Fonte: Silveira e Moreno, 1998.

Biodisponibilidade dos carotenóides

A biodisponibilidade dos carotenóides pró-vitâmicos A é muito inferior àquela da vitamina A pré-formada (Parker, 1996; van het Hof *et al.*, 2000; Mourão *et al.*, 2005; Yonekura e Nagao, 2007). Segundo Castenmiller e West (1998), a biodisponibilidade dos carotenóides é influenciada por diversos fatores, tais como: espécies dos carotenóides, ligação molecular, quantidade de carotenóides consumida, tipos de matrizes alimentares nas quais os carotenóides estão incorporados, estado nutricional do indivíduo, fatores genéticos, fatores relacionados aos indivíduos e interações nutricionais.

Alguns estudos revelaram que a espécie do carotenóide pode influenciar sua biodisponibilidade, devido as suas características estruturais e propriedades físico-químicas. Por exemplo, a transferência de carotenóides de gotículas de emulsificação lipídicas para as micelas *in vitro* está inversamente correlacionada com o seu grau de hidrofobicidade (Tyssandier *et al.*, 2001). Kosnic *et al.* (1995) verificaram que indivíduos, recebendo doses iguais de luteína ou de β -caroteno, apresentaram resposta sérica significativamente maior para a luteína. Outros estudos em humanos demonstraram que a luteína de hortaliças é significativamente mais biodisponível do que o β -caroteno (van het Hof *et al.*, 1999; Castenmiller *et al.*, 1999). Granado *et al.* (2006) observaram que indivíduos suplementados com 200 gramas/dia de brócolis, durante uma semana, apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de luteína e nenhuma alteração nos níveis de β -caroteno.

Acredita-se, portanto, que as xantofilas, por serem mais hidrofílicas, estariam situadas na superfície das gotículas de emulsificação lipídica, enquanto os carotenos, com maior hidrofobicidade, estariam localizados mais internamente. Essa localização diferencial facilitaria a transferência das xantofilas das gotículas de emulsificação lipídicas para as micelas (van het Hof *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2004; Yonekura e Nagao, 2007).

O todo-*trans*- β -caroteno parece ser mais absorvido do que os isômeros *cis*. Stahl *et al.* (1995) observaram que após dose única de uma mistura de todo-*trans* e 9-*cis*- β -caroteno, a forma *trans* foi encontrada em maiores quantidades na fração dos quilomícrons do que o isômero *cis*. A biodisponibilidade do todo-*trans*- β -caroteno também foi superior a dos isômeros 9-*cis* e 13-*cis*- β -caroteno em gerbils após dose única de cada isômero dissolvido em óleo de algodão (Deming *et al.*, 2002).

Diferente dos isômeros de β -caroteno, os isômeros *cis*-licopeno são absorvidos em seres humanos mais eficientemente do que o isômero todo-*trans* (Moritz e Tramonte, 2006). Unlu

et al. (2007) demonstraram em humanos que a biodisponibilidade do licopeno, após o consumo molho de tomate, com elevada quantidade de isômeros *cis*-licopeno, é significativamente maior do que, após a ingestão de molho de tomate, com alto teor do isômero todo-*trans*-licopeno.

A influência da esterificação dos carotenóides sobre sua biodisponibilidade ainda precisa ser mais investigada. Bowel *et al.* (2002) verificaram que a biodisponibilidade dos ésteres de luteína em humanos foi cerca de 60% superior àquela da luteína não-esterificada. Os autores esperavam que os ésteres de luteína apresentassem uma menor biodisponibilidade devido à necessidade de hidrólise antes de sua absorção. Já Chung *et al.* (2004) não identificaram diferenças significativas entre a biodisponibilidade de suplementos contendo ésteres de luteína e de luteína não-esterificada em humanos. No entanto, os autores sugerem que os resultados encontrados suportam as especulações existentes de que o sistema de hidrólise dos ésteres de xantofila é muito eficiente e não pode ser considerado um processo limitante na absorção da luteína.

A matriz alimentar é, sem dúvida, um dos principais fatores interferindo com a biodisponibilidade dos carotenóides (Castenmiller e West, 1998; van het Hof *et al.*, 2000; Yonekura e Nagao, 2007). Mulheres que consumiram 9,3 mg de β -caroteno, diariamente, por quatro semanas, a partir de cenouras e espinafres cozidos, apresentaram concentração plasmática de β -caroteno três vezes maiores do que àquelas que consumiram a mesma quantidade de β -caroteno, a partir de cenouras e espinafres crus (Rock *et al.*, 1998).

Castenmiller *et al.* (1999) avaliaram o efeito do processamento de espinafre nas concentrações séricas de carotenóides em humanos. Os resultados demonstraram, no caso do β -caroteno, que o grupo que recebeu folhas de espinafre enzimaticamente tratadas apresentou uma resposta sérica significativamente maior do que os grupos que receberam folhas intactas ou cortadas.

A quantidade de β -caroteno absorvido por voluntários ileostomizados, a partir de uma refeição composta de purê de cenouras cozidas, foi significativamente maior do que após uma refeição composta de cenouras cortadas cruas (Livny *et al.*, 2003).

Böhm e Bitsch (1999) avaliaram a biodisponibilidade do licopeno presente em diferentes matrizes alimentares, em 22 mulheres não-fumantes, separadas em três grupos e submetidas à ingestão diária de 5 mg de licopeno, por seis semanas. Os grupos que receberam licopeno oleaginoso, em cápsulas e suco de tomate, apresentaram aumento significativo na

concentração plasmática de licopeno, enquanto que o grupo suplementado com tomates crus não apresentou nenhuma diferença em relação ao grupo controle.

Esses dados demonstram que os processamentos dos alimentos, incluindo os tratamentos térmicos, mecânicos e enzimáticos, embora possam causar isomeração e oxidação dos carotenóides (Rodriguez-Amaya, 1997), de maneira geral, promovem a ruptura das estruturas celulares, permitindo uma maior liberação dos carotenóides e, conseqüentemente, um aumento da sua biodisponibilidade (Castenmiller e West, 1998; van het Hof *et al.*, 2000; Yonekura e Nagao, 2007).

Um estudo, conduzido com escolares anêmicos na Indonésia, mostrou que o aumento na concentração sérica de β -caroteno, em relação à quantidade de β -caroteno ingerida, foi de cinco a seis vezes superior no grupo que recebeu frutas do que no grupo que recebeu hortaliças (de Pee *et al.*, 1998).

Khan *et al.* (2007) avaliaram a eficiência de frutas e hortaliças ricas em carotenóides pró-vitâmicos A na melhora do estado nutricional de vitamina A, em mulheres vietnamitas, no período de lactação. Os resultados demonstraram que a atividade de vitamina A dos carotenóides provenientes das frutas é mais de duas vezes superior a das hortaliças.

Esses estudos sugerem que o β -caroteno de frutas é mais eficientemente absorvido do que aquele de hortaliças, provavelmente, devido às diferenças nas matrizes alimentares. Nas hortaliças, os carotenóides estão localizados nos cloroplastos, complexados a proteínas, necessitando da quebra da estrutura celular para sua liberação. Nas frutas, os carotenóides podem ser encontrados nos cromoplastos, que são mais facilmente degradados (van het Hof *et al.*, 2000; Nestel e Nalubola, 2003a; Yonekura e Nagao, 2007).

Muitos fatores dietéticos influenciam a biodisponibilidade de carotenóides. A ingestão de uma quantidade razoável de lipídeos, na dieta, é considerada fundamental para promover a absorção eficiente dos carotenóides, uma vez que a gordura dietética é essencial na formação das micelas (van het Hof *et al.*, 2000).

Roodenburg *et al.* (2002) investigaram o efeito da ingestão de diferentes quantidades de gordura (3 e 36g) sobre os níveis plasmáticos de vitamina E, β -caroteno e luteína em voluntários que receberam suplementação dessas substâncias, por 7 dias. A suplementação com ésteres de luteína produziu uma resposta plasmática significativamente superior quando a ingestão ocorreu com a refeição contendo níveis mais elevados de gordura. A variação na quantidade de gordura não influenciou a resposta plasmática após as suplementações com

vitamina E e β -caroteno. Os autores sugerem que uma pequena quantidade de gordura (3g) seria suficiente para estimular a absorção desses compostos.

Brown *et al.* (2004) compararam a eficiência de absorção de carotenóides após a ingestão de vegetais frescos com molhos para saladas contendo 0, 6 ou 28 gramas de óleo de canola. Os autores observaram que a ingestão dos vegetais com os molhos contendo gordura resultou em aumento significativo do β -caroteno, α -caroteno e licopeno nos quilomícrons quando comparados à ingestão da salada com molho sem gordura. Os resultados encontrados com o uso do molho com maior teor de gordura também foram significativamente superiores àqueles obtidos com o molho com reduzido teor de gordura.

Unlu *et al.* (2005) avaliaram o efeito da adição de abacate ou óleo de abacate sobre a resposta plasmática de carotenóides de indivíduos consumindo salsa ou salada. O grupo que consumiu a salsa, adicionada com 150 gramas de abacate, apresentou concentrações plasmáticas significativamente superiores de luteína e β -caroteno quando comparado ao grupo controle que recebeu somente a salsa. As concentrações plasmáticas de luteína, α -caroteno e β -caroteno também foram significativamente superiores nos grupos que receberam salada com 150 ou 75 gramas de abacate ou 24 gramas de óleo de abacate, quando comparados ao grupo controle, que recebeu somente salada. Os autores concluem que os lipídeos do abacate aumentam significativamente a absorção dos carotenóides das saladas e da salsa, e que a matriz da fruta não interferiu na biodisponibilidade.

Além da quantidade, o tipo de gordura parece exercer efeito sobre a biodisponibilidade dos carotenóides. A adição de β -caroteno a uma refeição, contendo triacilgliceróis de cadeia média, resultou em menor incorporação do β -caroteno aos quilomícrons quando comparada à adição do β -caroteno a uma refeição, contendo triacilgliceróis de cadeia longa (Borel *et al.*, 1998). Isto pode ser explicado pelo fato dos ácidos graxos de cadeia média serem absorvidos principalmente pela via portal, resultando em menor formação de quilomícrons.

A absorção de β -caroteno, em humanos, após a ingestão de β -caroteno com uma refeição rica em ácidos graxos poliinsaturados é significativamente inferior quando comparada à ingestão de β -caroteno com uma refeição rica em ácidos graxos saturados (Hu *et al.*, 2000). During *et al.* (1998) demonstraram que dietas ricas em gorduras monoinsaturadas (15% óleo de oliva) ou poliinsaturadas (15% óleo de soja) são capazes de aumentar a atividade específica da enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase em ratos quando comparadas a uma dieta controle (2,5% óleo de soja). A ingestão da dieta rica em gordura poliinsaturada

aumentou significativamente os níveis de CRBP-II. A ingestão de uma dieta rica em gordura saturada não teve efeitos significativos nos parâmetros avaliados.

Deming *et al.* (2000) avaliaram o efeito de quantidades variadas de gordura (10 ou 30% do valor energético) sobre a biodisponibilidade de β -caroteno em gerbils. O grupo que ingeriu a dieta com elevado teor de gordura apresentou níveis significativamente maiores de vitamina A e menores de β -caroteno no fígado do que o grupo com menor teor dietético de gordura, sugerindo que o consumo de dietas ricas em gordura aumenta a conversão de β -caroteno em vitamina A.

As fibras alimentares são consideradas um fator que contribui para a baixa biodisponibilidade dos carotenóides de frutas e hortaliças. No entanto, as diferentes estruturas de fibras existentes e a presença de outros fitoquímicos nesses alimentos têm dificultado a elucidação da real influência das fibras na absorção dos carotenóides e o seu mecanismo (Yonekura e Nagao, 2007).

Riedl *et al.* (1999) avaliaram o efeito da adição de diferentes tipos de fibras (pectina, alginato, guar, celulose ou farelo de trigo) na biodisponibilidade de carotenóides de uma refeição padronizada, suplementada com uma mistura de antioxidantes contendo β -caroteno, licopeno, luteína, cantaxantina e α -tocoferol em mulheres jovens saudáveis. A adição de fibras solúveis (pectina, alginato, guar) reduziu significativamente a resposta sérica ao β -caroteno, ao licopeno e à luteína quando comparada ao consumo da refeição sem fibras. Já a adição de fibras insolúveis (celulose ou farelo de trigo) causou uma redução significativa na resposta sérica do licopeno e da luteína.

A ingestão de pectina, guar ou de celulose, por mulheres suplementadas com uma mistura de antioxidantes contendo β -caroteno, licopeno, luteína, cantaxantina e α -tocoferol, reduziu a concentração de antioxidantes nas LDL e a resistência da LDL à oxidação em 38, 22 e 18%, respectivamente, quando comparada à ingestão do suplemento sem fibras (Hoffmann *et al.*, 1999).

Deming *et al.* (2000) investigaram o efeito de diferentes tipos de fibra (sílica, pectina cítrica ou fibra de aveia) sobre a biodisponibilidade de β -caroteno em gerbils. O grupo que consumiu pectina cítrica apresentou menores concentrações hepáticas de vitamina A e maiores concentrações de β -caroteno quando comparados aos outros grupos, indicando uma menor conversão de β -caroteno em vitamina A. Já o grupo que ingeriu a dieta com fibra de aveia apresentou níveis hepáticos significativamente maiores de vitamina A e menores de β -caroteno quando comparado ao grupo que recebeu pectina.

Os fitoesteróis, presentes em muitos vegetais e atualmente utilizados como ingredientes funcionais em alimentos devido a sua capacidade de reduzir a absorção e os níveis plasmáticos de colesterol, podem reduzir significativamente a biodisponibilidade do β -caroteno como demonstrado por Richelle *et al.* (2004). O consumo de leite enriquecido com 2,2 gramas de fitoesteróis, livres ou esterificados, reduziu significativamente a biodisponibilidade do β -caroteno de uma dieta padronizada em 48 e 57%, respectivamente.

Algumas evidências sugerem que outros constituintes de frutas e hortaliças, tais como os flavonóides, podem interferir na absorção de carotenóides. Nagao *et al.* (2005) demonstraram, *in vitro*, que alguns flavonóides, tais como, luteolina, quercetina, ramnetina e floretina, inibiram significativamente a atividade da enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenase de maneira não competitiva, enquanto flavononas, isoflavonas, catequinas e antocianidinas apresentaram pouco efeito inibitório.

Reboul *et al.* (2007) verificaram que a adição de uma mistura de antioxidantes (500mg de vitamina C, 67 mg de vitamina E e 1 g de polifenóis) a uma refeição contendo 18 mg de luteína tendeu a reduzir em 23% ($p = 0,07$) o aparecimento de luteína nos quilomícrons de homens saudáveis. Na tentativa de determinar a influência específica de cada antioxidante, os autores avaliaram o efeito, *in vitro*, de diferentes combinações de antioxidantes em relação à captação de luteína por células intestinais humanas e identificaram que a mistura de polifenóis reduziu significativamente a captação de luteína. Posteriormente, foi demonstrado que a naringenina era o único polifenol responsável pelo efeito da mistura de polifenóis.

Os diferentes tipos de carotenóides podem interagir entre si alterando sua biodisponibilidade. Segundo van het Hof *et al.* (2000), competições podem ocorrer em nível intestinal, durante a incorporação nas micelas, ou mesmo no transporte linfático, reduzindo a absorção de determinado carotenóide. A ingestão simultânea de vários carotenóides pode, também, causar um efeito antioxidante poupador e resultar em maior absorção dos carotenóides protegidos.

Reboul *et al.* (2007) verificaram que uma mistura de carotenóides (licopeno e β -caroteno) reduz significativamente a captação de luteína por células intestinais, *in vitro*. A ingestão de doses iguais e combinadas de β -caroteno e luteína em humanos reduziu significativamente a resposta sérica à luteína em cerca de 40% quando comparada com a ingestão de luteína sozinha (Kostic *et al.*, 1995). Outros pesquisadores observaram que a ingestão concomitante de luteína e β -caroteno em humanos reduziu significativamente o β -

caroteno sérico quando comparada à ingestão do β -caroteno sozinho (van den Berg e van Vliet, 1998).

Johnson *et al.* (1997) observaram, por meio de um estudo duplo-cego, que a ingestão concomitante de doses iguais de β -caroteno e licopeno aumentou significativamente a resposta plasmática ao licopeno e não causou alteração nos níveis de β -caroteno quando comparados com a ingestão de licopeno e β -caroteno sozinhos, respectivamente.

Tyssandier *et al.* (2002) avaliaram a interação entre o licopeno, β -caroteno e luteína a partir de diferentes fontes vegetais ou suplementos. O grupo que recebeu purê de tomate e pílulas de luteína apresentou quantidades de licopeno e de β -caroteno significativamente inferiores nos quilomícrons quando comparado ao grupo que recebeu somente purê de tomate. O grupo que recebeu purê de tomate e espinafre apresentou quantidades de β -caroteno significativamente inferiores nos quilomícrons quando comparado ao grupo que recebeu somente purê de tomate. Os grupos que receberam espinafre e purê de tomate ou espinafre e pílulas de licopeno apresentaram quantidades significativamente menores de licopeno nos quilomícrons quando comparado ao grupo que recebeu somente espinafre. Esses resultados sugerem que o licopeno, a luteína e o β -caroteno competem, entre si, pela incorporação nos quilomícrons.

Poliésteres de sacarose, utilizados para substituir a gordura em alimentos, diminuem significativamente a absorção de carotenóides em humanos, mesmo em quantidades relativamente pequenas, como 3 gramas/dia (Weststrate e van het Hof, 1995). Um estudo, conduzido a fim de monitorar o impacto da comercialização do olestra, um poliéster de sacarose, nos níveis plasmáticos de vitaminas lipossolúveis de americanos, revelou que o consumo de mais 4,4 gramas de olestra por semana está associado com uma redução significativa dos carotenóides plasmáticos totais (Neuhouser *et al.*, 2006).

A influência dos fatores genéticos sobre o metabolismo e biodisponibilidade dos carotenóides ainda é pouco conhecida. Erros inatos no metabolismo de carotenóides, relacionados à falha na ruptura do β -caroteno, são raros, mas podem ocorrer levando a uma pigmentação anormal da pele (Monk, 1982).

Segundo Olson (1999b), quando doses moderadas ou elevadas de β -caroteno são administradas oralmente a seres humanos, alguns indivíduos respondem com um aumento pronunciado da concentração de β -caroteno no plasma, com um pico após seis horas e outro após 24 horas. Os indivíduos que apresentam essa resposta são chamados de responsivos. Outros indivíduos, no entanto, apresentam pouco ou nenhum aumento da concentração

plasmática de β -caroteno, após a administração da mesma dose, sendo chamados de não-responsivos. A explicação para esse fenômeno parece residir no fato dos indivíduos não-responsivos serem, na verdade, conversores eficientes de β -caroteno em vitamina A no intestino (Olson, 1999b).

Outros fatores individuais podem influenciar na biodisponibilidade de carotenóides, tais como: o estado nutricional do indivíduo, etilismo, tabagismo, idade, infecções intestinais e doenças de má absorção de gordura (Olson, 1999b; IVACG, 1999; Yuyama *et al.*, 2005). A eficiência de conversão de carotenóides pró-vitamínicos A em vitamina A está inversamente relacionada ao estado nutricional de vitamina A (Ribaya-Mercado *et al.*, 2000). A eficiência de absorção dos carotenóides também diminui à medida que a quantidade ingerida aumenta (Olson, 1999a).

Metabolismo Hepático

O fígado é o principal órgão no metabolismo da vitamina A, atuando na depuração desta vitamina dos quilomícrons remanescentes e no armazenamento do excesso de retinóides. Além disso, o fígado regula a secreção de retinol, associado à proteína ligadora de retinol (RBP), a outras células do organismo e é um importante sítio de oxidação e catabolismo dos retinóides (Ross, 1999).

Existem dois tipos de células responsáveis pelo metabolismo de vitamina A nesse órgão. Os hepatócitos, que estão diretamente envolvidos na absorção dos quilomícrons remanescentes e na síntese e secreção da RBP. As células estreladas, também denominadas de células de Ito, que são responsáveis pelo armazenamento de vitamina A na forma de ésteres de retinila (Silveira e Moreno, 1998).

Após a secreção dos quilomícrons no sistema linfático, essas lipoproteínas são transportadas para a circulação geral, onde processos, como a hidrólise de triacilgliceróis e a troca de apolipoproteínas, resultam na formação dos quilomícrons remanescentes. Quase todos os ésteres de retinila presentes nos quilomícrons permanecem na partícula durante sua conversão em quilomícrons remanescentes (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

Os quilomícrons remanescentes formados são captados e internalizados pelos hepatócitos por endocitose mediada por receptor. Os ésteres de retinila captados são hidrolisados por REH presentes na membrana plasmática e ou no interior dos endossomos. O retinol formado pode ser transferido para o retículo endoplasmático, onde a RBP é sintetizada e encontrada em maiores concentrações. O retinol ligado à RBP é, posteriormente,

transportado para o Complexo de Golgi e liberado no plasma (Silveira e Moreno, 1998; Harrison e Hussen, 2001; Blomhoff e Blomhoff, 2006).

No entanto, quando o estado nutricional de vitamina A no organismo é adequado, aproximadamente 50 a 80% do retinol corporal estão armazenados no fígado. O excesso de retinol é armazenado nas células estreladas na forma de ésteres de retinila (Yuyama *et al.*, 2005). O mecanismo pelo qual o retinol é transportado dos hepatócitos para as células estreladas não é completamente entendido (Silveira e Moreno, 1998).

Nessas células, o retinol se liga à proteína celular ligadora de retinol I (CRBP-I) e é esterificado pela LRAT. A CRBP-I é o principal ligante endógeno do *todo-trans*-retinol e está amplamente distribuída no citoplasma de várias células (Ross, 1999). A CRBP-I e a LRAT são expressas em altos níveis nas células estreladas e desempenham um papel importante no armazenamento de vitamina A. Camundongos, que tiveram os genes para a CRBP-I ou LRAT inativado, apresentam armazenamento alterado de ésteres de retinila (Ghyselinck *et al.*, 1999; Batten *et al.*, 2004).

As reservas de ésteres de retinila, nas células estreladas, representam uma fonte adequada de vitamina A para a maioria dos indivíduos, por muitas semanas ou meses. Essa grande reserva e a habilidade das células de regular o balanço de retinol garantem que os níveis plasmáticos de vitamina A sejam constantes, apesar da variação normal na ingestão dessa vitamina (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

Diversos mecanismos foram sugeridos como capazes de regular o balanço geral entre a esterificação do retinol (armazenamento) e sua hidrólise (mobilização). Ross e Zolfaghari (2004) propuseram um modelo de regulação da expressão da LRAT, pelo ácido retinóico, com base na revisão de estudos experimentais com animais com diferentes estados nutricionais de vitamina A. Em situações de adequação de vitamina A, o ácido retinóico estimularia a expressão do RNAm da LRAT, causando um aumento na quantidade dessa enzima e, conseqüentemente, o armazenamento do retinol na forma de ésteres de retinila. Em situações de deficiência de vitamina A, a redução dos níveis de ácido retinóico levaria a uma diminuição na expressão dessa enzima e, conseqüente redução no armazenamento do retinol, permitindo seu transporte imediato para outros tecidos.

Outros mecanismos também podem estar envolvidos, como, por exemplo, a razão entre as concentrações de apo:holo-CRBP (proteína sem o retinol:proteína ligada ao retinol). Quando os níveis de retinol estão baixos, a concentração de apo-CRBP aumenta, estimulando a REH e inibindo a atividade da LRAT, garantindo que o retinol seja eficientemente

mobilizado de seu local de armazenamento (Silveira e Moreno, 1998; Parker, 1996; Ross, 1999; Napoli, 1999).

O mecanismo responsável pela mobilização do retinol das células estreladas ainda não foi elucidado em detalhes, mas a RBP parece desempenhar um papel importante no processo. Camundongos, que tiveram o gene para a RBP inativado, mantidos em dietas com níveis adequados de vitamina A, são capazes de armazenar ésteres de retinila, mas não conseguem mobilizá-lo adequadamente (Quadro *et al.*, 1999; Quadro *et al.*, 2003; Paik *et al.*, 2004).

Os carotenóides presentes nos quilomícrons remanescentes podem ser convertidos a retinóides no fígado ou serem incorporados em lipoproteínas e transportados para as células periféricas (Silveira e Moreno, 1998). A figura 6 mostra os principais aspectos do metabolismo hepático da vitamina A, conforme proposto por Silveira e Moreno (1998).

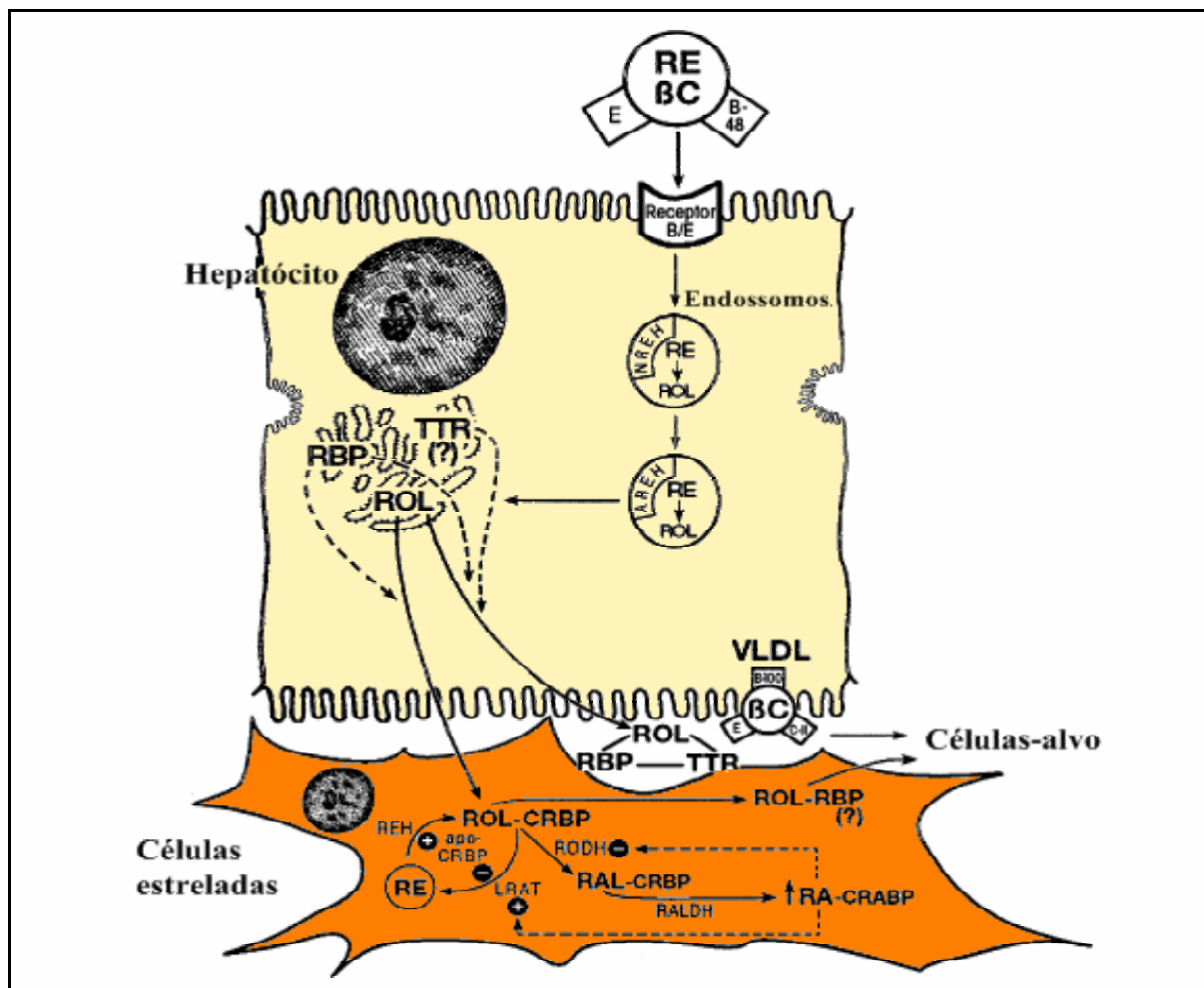


Figura 6: Aspectos do metabolismo hepático da vitamina A e do β -caroteno. Proteína ligadora de retinol (RBP); pré-albumina (TTR); ésteres de retinila (RE); retinol (ROL); retinal (RAL); ácido retinóico (RA); hidrolases de ésteres de retinila (REH); retinol desidrogenase (RODH); retinal desidrogenase (RALDH); lecitina:retinol aciltransferase (LRAT); proteína celular ligadora de retinol I (CRBP); proteína celular ligadora de ácido retinóico (CRABP). Fonte: Silveira e Moreno, 1998.

Transporte plasmático

A solubilização e o transporte do retinol no plasma dependem de sua ligação com a RBP. Após sua liberação no plasma, a RBP ligada ao retinol, se associa a uma proteína co-transportadora, a pré-albumina (TTR), formando um complexo com razão molecular 1:1:1. Essa ligação aumenta a estabilidade do complexo e diminui sua depuração renal (Ross, 1999; IOM, 2001).

Existe uma relação não-linear entre o depósito hepático de vitamina A e a vitamina A plasmática, ou seja, embora as concentrações hepáticas de vitamina A, em humanos saudáveis, variem amplamente (20 a 300 μg de retinol total por grama de fígado), os níveis plasmáticos de retinol são relativamente constantes apresentando-se dentro de uma faixa de variação estreita e regulada (43 a 86 $\mu\text{g}/\text{dL}$). A figura 7 ilustra uma relação teórica entre a vitamina A plasmática e a hepática (Ross, 1999).

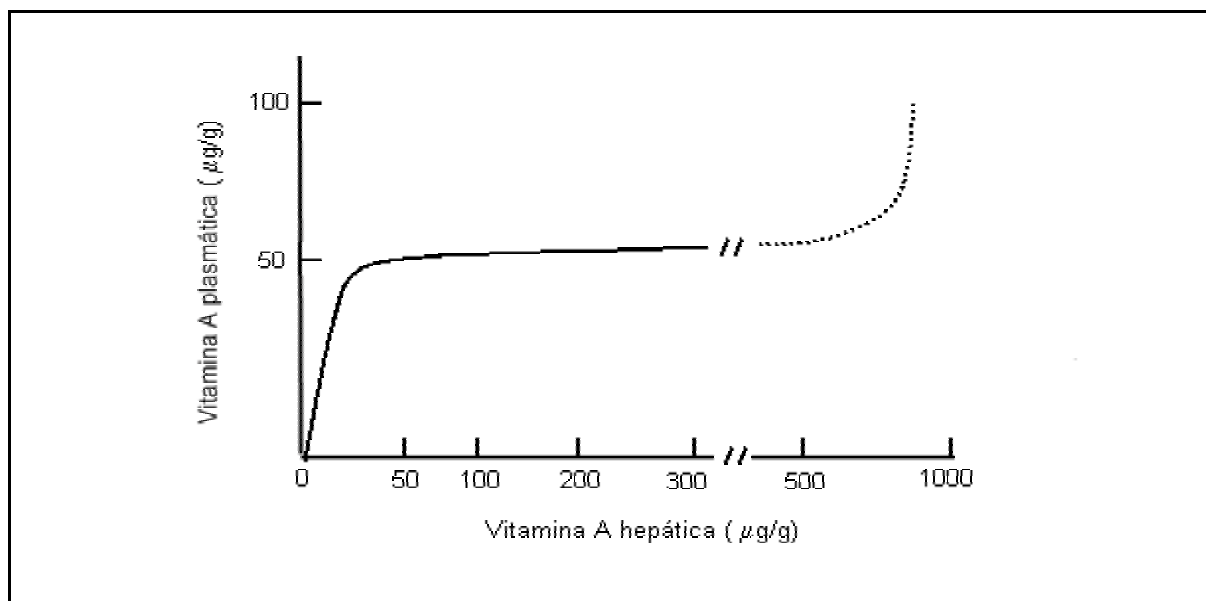


Figura 7: Relação entre os níveis de vitamina A plasmática e hepática. Fonte: Ross, 1999.

Uma ingestão inadequada de vitamina A, por um longo período, causa depleção nos depósitos hepáticos de vitamina A (< 20 μg de retinol total/grama de fígado) e, conseqüentemente, uma concentração plasmática reduzida de retinol. A RBP e a TTR possuem meias-vidas curtas (0,5 dias e 2 a 3 dias, respectivamente) e necessitam de uma alta taxa de síntese protéica para a manutenção de suas concentrações. Portanto, em situações de desnutrição energético-protéica (DEP), os níveis de retinol plasmáticos podem estar significativamente reduzidos apesar de uma concentração hepática adequada de vitamina A.

O zinco é um mineral importante para a síntese de RBP e sua deficiência pode causar deficiência secundária de vitamina A. A RBP e a TTR também se encontram reduzidas durante infecções, inflamações e após traumas (Ross, 1999).

A captação extra-hepática dos quilomícrons ou dos quilomícrons remanescentes pode ser uma via alternativa importante para fornecer vitamina A aos tecidos. Os resultados de estudos, que utilizaram camundongos com gene da RBP inativado, demonstraram que esses animais são capazes de manter níveis adequados dessa vitamina nos tecidos mesmo, na ausência de RBP (Quadro *et al.*, 1999; Quadro *et al.*, 2003; Paik *et al.*, 2004).

Quantidades elevadas de ésteres de retinila podem ser detectadas no plasma pós-prandial, refletindo as taxas de absorção de vitamina A e sua depuração dos quilomícrons. Níveis elevados também são detectados em situações de hipervitaminose A, quando as concentrações hepáticas de retinol encontram-se elevadas, maiores do que 300 µg de retinol total/grama de fígado (Ross, 1999).

Outros retinóides, além do retinol e dos ésteres de retinila, estão presentes no plasma em baixíssimas concentrações (5 a 10 nmol/L). Esses compostos incluem o todo-*trans*-ácido retinóico, 13-*cis*-ácido retinóico, 13-*cis*-4-oxo-ácido retinóico, todo-*trans*-4-oxo-ácido retinóico e o retinoil-β-glicuronídeo (Blomhoff e Blomhoff, 2006). Com exceção do retinoil-β-glicuronídeo, os demais retinóides são transportados em associação com a albumina sérica (Ross, 1999).

Os níveis plasmáticos desses retinóides aumentam após a ingestão de uma grande quantidade de vitamina A (Hartmann *et al.*, 2005). No entanto, não se sabe se esses retinóides possuem alguma atividade funcional *in vivo* ou refletem, simplesmente, o catabolismo dos retinóides. O fato de a maioria desses retinóides possuir atividade *in vitro*, em concentrações nanomolares, é um indício de uma possível ação funcional.

Os carotenóides são transportados no plasma de humanos e animais, exclusivamente, por lipoproteínas (Parker, 1996). A distribuição dos carotenóides entre as diferentes classes de lipoproteínas plasmáticas parece ser determinada pelas características físicas dos carotenóides e pela composição de lipídeos das lipoproteínas. Os carotenóides hidrocarbonetos predominam nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), enquanto as xantofilas se encontram distribuídas igualmente entre as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e as LDL (Olson, 1999b).

A distribuição e as quantidades dos carotenóides diferem pronunciadamente nos indivíduos, provavelmente em função da dieta. Dos 30 ou mais carotenóides presentes no

plasma, seis compreendem de 60 a 70% do total: luteína, licopeno, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno e α -caroteno (Olson, 1999b).

Captação e metabolismo intracelular

O mecanismo pelo qual o retinol ligado ao complexo RBP:TTR é captado para o interior das células ainda permanece incerto. Dois mecanismos foram propostos: a RBP pode ser captada por um receptor de membrana plasmática nas células-alvo ou o retinol pode se dissociar da RBP e penetrar na célula por difusão, na presença de concentrações elevadas de apo-CRBP (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999).

Considera-se que os retinóides mais polares, como o ácido retinóico e os glicuronídeos de retinóides, penetrem nas células por difusão. Ésteres de retinila associados a lipoproteínas podem ser assimilados em consequência da internalização da lipoproteína através dos receptores celulares de superfície (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999).

Uma vez dentro das células, o retinol se liga à CRBP-I e pode seguir diferentes rotas metabólicas (Figura 8). O retinol pode ser armazenado na forma de ésteres de retinila, oxidado a retinal ou ácido retinóico ou reciclado de volta ao sistema circulatório, uma vez que vários tecidos, além do fígado, podem sintetizar RBP, tais como: os rins, a placenta e o tecido adiposo (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999).

As enzimas RODH e álcool desidrogenase (ADH) atuam na oxidação do retinol a retinal. A RODH está presente no citoplasma e na fração microsomal da célula e é específica para o substrato todo-*trans*-retinol ligado à CRBP-I. A enzima presente no citoplasma tem baixa afinidade pelo substrato e é inibida pela apo-CRBP. Em contraste, a enzima microsomal tem uma afinidade elevada pelo retinol e não é inibida pela apo-CRBP, garantindo a produção de retinal e de ácido retinóico em casos de hipovitaminose A (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999). A ADH está presente no citoplasma e é responsável pela catálise de diversos substratos, entre eles o etanol, o todo-*trans*-retinol, 9-*cis*-retinol e 13-*cis*-retinol (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999). No entanto, essas enzimas parecem não oxidar o retinol ligado à CRBP-I (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

O retinal formado pode ser transformado em ácido retinóico pela ação da RALDH. O ácido retinóico formado se liga às proteínas celulares ligadoras de ácido retinóico I e II (CRABP-I e CRABP-II). A CRABP-I pode ser encontrada no citoplasma de muitas células, em baixos níveis, e se liga principalmente ao ácido retinóico, mas também é capaz de se ligar a seus isômeros e metabólitos mais polares. A CRABP-II possui elevada afinidade pelo ácido

retinóico, se expressa de forma pronunciada em uma série de tecidos durante a embriogênese, mas se restringe à pele em adultos humanos. A expressão do RNAm da CRABP-II é induzida pelo *todo-trans*-retinol. Essas proteínas controlam a concentração de ácido retinóico nas células e facilitam sua ação e catabolismo (Silveira e Moreno, 1998; Ross, 1999).

O ácido retinóico é o metabólito mais ativo da vitamina A e, por meio de sua ligação a receptores nucleares, é capaz de regular a transcrição de diversos genes. Existem dois receptores nucleares aos quais o ácido retinóico se liga: o receptor do ácido retinóico (RAR) e o receptor X de retinóides (RXR). Ambos os receptores possuem subfamílias α , β e γ e essas subfamílias possuem vários subtipos (Silveira e Moreno, 1998; Parker, 1996; Ross, 1999; Olson, 1999b; Napoli, 1999).

Cada um dos receptores de retinóides consiste de uma proteína de aproximadamente 48 kDa, organizada de forma similar em quatro principais domínios funcionais: um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ligação ao ligante, um domínio de heterodimerização e um ou mais domínios de ativação da transcrição dependente do ligante (Ross, 1999).

O RAR se liga ao *todo-trans*-ácido retinóico e ao *9-cis*-ácido retinóico, forma heterodímeros com o RXR e se liga a seqüências de nucleotídeos específicas do DNA, denominadas elementos responsivos do ácido retinóico (RARE). O RXR se liga somente ao *9-cis*-ácido retinóico e pode formar homodímeros com outro RXR ligando-se a elementos responsivos X de retinóides (RXRE) ou pode formar heterodímeros com o RAR e muitos outros receptores nucleares, tais como: o receptor para a vitamina D e do hormônio da tireóide. (Silveira e Moreno, 1998; Parker, 1996; Ross, 1999; Olson, 1999b; Napoli, 1999).

Supõe-se, também, que o ácido retinóico possa ser formado a partir da hidrólise excêntrica das moléculas de carotenóides. Essa via resultaria em β -apo-carotenóides que podem dar origem ao ácido retinóico diretamente (Silveira e Moreno, 1998; Napoli, 1999).

O isômero *9-cis*-ácido retinóico é considerado um metabólito ativo da vitamina A devido a sua capacidade de se ligar aos receptores nucleares de ácido retinóico. No entanto, recentemente, o papel biológico desse metabólito tem sido questionado. Segundo Blomhoff e Blomhoff (2006), a presença do *9-cis*-ácido retinóico só foi adequadamente identificada em humanos após a administração de quantidades excessivas de retinol e, em camundongos, após doses tóxicas e teratogênicas de *todo-trans*-ácido retinóico. Além disso, o mecanismo de síntese do isômero *9-cis*-ácido retinóico permanece incerto. Uma das possibilidades existentes é sua formação por meio da isomeração, enzimática ou não, do *todo-trans*-ácido retinóico.

Outra possibilidade é que o isômero seja formado a partir do 9-*cis*- β -caroteno ou do 9-*cis*-retinol, presentes na dieta (Silveira e Moreno, 1998; Napoli, 1999).

Assim, apesar da incerteza existente sobre o papel 9-*cis*-ácido retinóico no metabolismo, os dados disponíveis sugerem que a toxicidade da vitamina A pode estar relacionada à produção desse isômero e uma ativação anormal dos genes controlados pelo RAR-RXR ou RXR-RXR (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

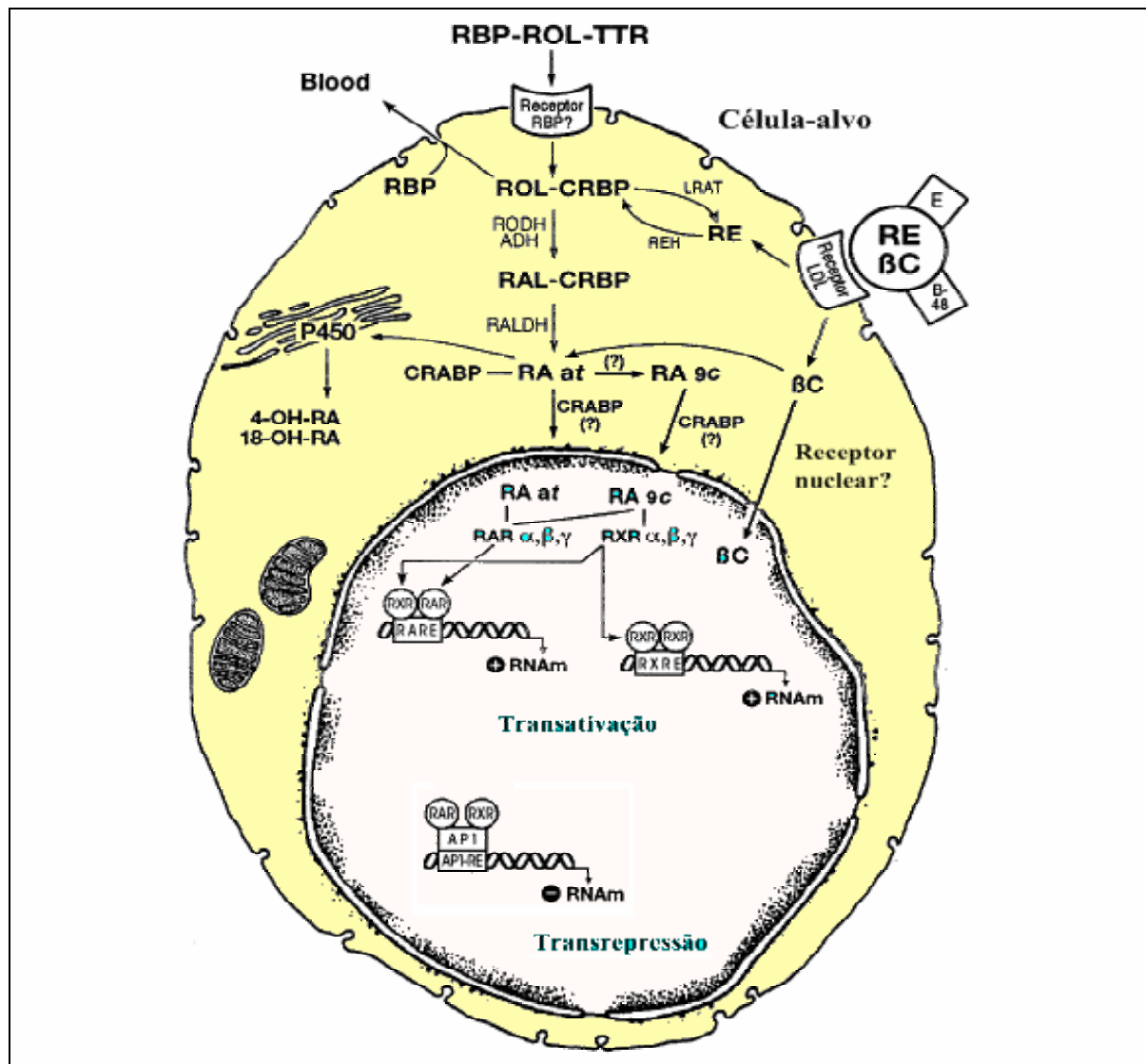


Figura 8: Captação e metabolismo da vitamina A e carotenóides nas células. Proteína ligadora de retinol (RBP); pré-albumina (TTR); ésteres de retinila (RE); retinol (ROL); retinal (RAL); *trans*-ácido retinóico (RA at); 9-*cis*-ácido retinóico (RA 9c); 4-hidroxi-ácido retinóico (4-OH-RA); 18-hidroxi-ácido retinóico (18-OH-RA); β -caroteno (β C); hidrolases de ésteres de retinila (REH); retinol desidrogenase (RODH); álcool desidrogenase (ADH); retinal desidrogenase (RALDH); lecitina:retinol aciltransferase (LRAT); superfamília de enzimas citocromo P450 (P450); proteína celular ligadora de retinol I (CRBP); proteína celular ligadora de ácido retinóico (CRABP); receptor do ácido retinóico (RAR); receptor X de retinóides (RXR); elementos responsivos do ácido retinóico (RARE); elementos responsivos X de retinóides (RXRE). Fonte: Silveira e Moreno, 1998.

O catabolismo do todo-*trans*-ácido retinóico é um mecanismo importante no controle dos níveis de ácido retinóico nas células e tecidos. O ácido retinóico induz seu próprio metabolismo *in vivo* e muitos tecidos são capazes de converter o ácido retinóico em isômeros e metabólitos mais polares. A superfamília de enzimas citocromo P450 (CYP26A1, CYP26B1 e CYP26C1) desempenha um papel importante no metabolismo do retinol e do ácido retinóico, produzindo compostos mais polares, tais como o 4-hidroxi-ácido retinóico e o 18-hidroxi-ácido retinóico que podem, posteriormente, ser eliminados pela urina (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

A CYP26A1 está presente em maiores concentrações no fígado, duodeno, colón e placenta e em certas regiões do cérebro e sua transcrição é induzida pelo ácido retinóico, sugerindo um mecanismo direto, pelo qual o gene da CYP26A1 percebe a concentração de ácido retinóico e regula seu metabolismo. A CYP26B1 possui atividade catalítica similar a da CYP26A1. Já a CYP26C1 é capaz de catalisar o 9-*cis*-ácido retinóico mais eficientemente que as outras duas enzimas. Os padrões de expressão teciduais dessas três enzimas não se sobrepõem, sugerindo papéis individuais no catabolismo de ácido retinóico (Blomhoff e Blomhoff, 2006).

Alguns metabólitos podem, também, ser conjugados com o ácido glicurônico ou a taurina para, posteriormente, serem excretados na bile. A proporção de metabólitos excretados na bile aumenta à medida que os níveis de vitamina A excedem uma concentração crítica, reduzindo o risco de armazenamento excessivo de vitamina A (Napoli, 1999; IOM, 2001).

Blomhoff e Blomhoff (2006) apontam, ainda, possíveis mecanismos de ação do ácido retinóico e seus metabólitos que não dependem de sua ligação aos receptores nucleares, como, por exemplo, a ligação covalente de retinóides a proteínas.

Fatores de conversão

Com o intuito de expressar a atividade dos carotenóides pró-vitamínicos A da dieta em bases comuns, um grupo de especialistas da FAO/WHO (1967) introduziu o conceito de equivalentes de retinol (RE) e estabeleceram que 1 µg de RE seria equivalente a 1 µg de retinol, a 6 µg de β-caroteno ou a 12 µg de outros carotenóides pró-vitamínicos A (FAO/WHO, 2004; IOM, 2001).

Esses fatores de equivalência foram derivados de estudos de balanço de vitamina A e refletem a menor eficiência de absorção e de conversão dos carotenóides em vitamina A. A

eficiência de absorção dos carotenóides foi estimada como sendo de um terço daquela do retinol. Já os valores de bioconversão do β -caroteno e dos demais carotenóides pró-vitamínicos A foram calculadas como 1:2 e 1:4, respectivamente. No entanto, o grupo reconheceu que os fatores de conversão eram resultados de estimativas para uma alimentação mista e que poderiam subestimar ou superestimar a biodisponibilidade dos carotenóides da dieta que é influenciada por diversos fatores (FAO/WHO, 2004; IOM, 2001).

Recentemente, os fatores de conversão têm sido reavaliados, por estudos que empregam metodologias mais avançadas, para avaliar a biodisponibilidade de carotenóides, tais como a diluição de isótopos estáveis e a quantificação de carotenóides na fração lipoprotéica rica em triacilgliceróis, após a ingestão controlada de fontes alimentares de carotenóides (van den Berg *et al.*, 1998; de Pee *et al.*, 1998; van het Hof *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999). Esses estudos demonstram que os fatores que interferem na absorção dos carotenóides têm uma importância maior do que anteriormente pensado e que os fatores de conversão dos carotenóides deveriam ser reduzidos.

Os dados analisados sugerem que os fatores de conversão seriam de 1:14 para o β -caroteno e de 1:28 para outros carotenóides pró-vitamínicos A. No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos estudos foi realizada a partir da ingestão de hortaliças, que possuem menor biodisponibilidade do que as frutas. Assim, adaptações podem ser necessárias, de acordo com o padrão de alimentação da população (IOM, 2001; FAO/WHO, 2004).

Apesar da FAO/WHO (2004) sugerirem a adoção dos valores acima, suas recomendações de vitamina A utilizam os fatores de conversão antigos. O Instituto de Medicina dos Estados Unidos adotou, recentemente, novos valores de conversão para os carotenóides pró-vitamínicos A em substituição aos valores de RE. Os novos fatores de conversão, denominados de equivalentes de atividade de retinol (RAE), são de 1:12 para o β -caroteno e de 1:24 para outros carotenóides pró-vitamínicos A. Esses fatores são um pouco superiores aos sugeridos pelos estudos que reavaliaram a biodisponibilidade dos carotenóides, pois considerou-se que a alimentação americana seria mais biodisponível, por apresentar uma proporção significativa de frutas (IOM, 2001).

Recomendações de Vitamina A

O Instituto de Medicina dos Estados Unidos (IOM, 2001) publicou, recentemente, valores de ingestão de referência atualizados para a vitamina A e outros nutrientes. Esses valores, chamados de valores de ingestão de referência dietéticas (DRI), são constituídos por quatro valores de referência para cada nutriente: requerimento médio estimado (EAR), ingestão diária recomendada (RDA), ingestão adequada (AI) e nível de ingestão máximo tolerável (UL).

A EAR corresponde à quantidade estimada de um nutriente que deve ser ingerida, diariamente, para atender as necessidades de metade dos indivíduos saudáveis do mesmo sexo e estágio de vida. A RDA, valor derivado da EAR, representa a quantidade de um nutriente que deve ser ingerida, diariamente, para atender as necessidades de 97 a 98% dos indivíduos do mesmo sexo e estágio de vida. A AI é um valor utilizado quando a RDA não pode ser determinada, calculado a partir de levantamentos, determinações ou aproximações de dados experimentais, ou ainda de estimativas de ingestão de nutrientes para grupos de indivíduos aparentemente saudáveis. O UL é definido como o mais alto valor de ingestão diária prolongada de um nutriente que, aparentemente, não oferece risco de efeito adverso à saúde em quase todos os indivíduos de um estágio de vida ou sexo (IOM, 2001).

A EAR de vitamina A, para adultos, foi calculada utilizando-se como referência a quantidade de vitamina A necessária para assegurar reservas hepáticas adequadas em indivíduos bem nutridos. Para a faixa etária de zero a doze meses foi estabelecido um valor de AI com base na ingestão média de vitamina A de recém-nascidos, a partir do leite materno. O UL foi calculado somente para a vitamina A pré-formada levando em conta os dados toxicológicos sobre os efeitos teratogênicos e hepáticos (IOM, 2001).

As recomendações da consultoria de especialistas da FAO/WHO (2004) sobre as necessidades de vitaminas e minerais foram revisadas recentemente. No caso específico da vitamina A, os valores e a metodologia utilizada para determinar as necessidades desse nutriente são um pouco diferentes daqueles utilizados pelo IOM (2001). O requerimento médio de vitamina A utilizado é definido como a quantidade mínima de vitamina A que deve ser ingerida para prevenir a xerofthalmia na ausência de infecções. O nível de ingestão seguro de vitamina A foi definido como a média de ingestão de vitamina A necessária para permitir um crescimento adequado e para manter reservas corporais adequadas de vitamina A.

Os valores das recomendações americanas de vitamina A para adultos, de ambos os sexos, nutrízes e lactentes, são superiores aos níveis de ingestão seguro de vitamina A

propostos pela FAO/WHO (2004), enquanto que para as crianças e gestantes esses valores são inferiores. No entanto, deve-se ressaltar que os valores recomendados pelo IOM (2001) são apresentados na forma de equivalentes de atividade de retinol (RAE), enquanto que as recomendações da FAO/WHO utilizaram o fator de conversão de equivalentes de retinol (RE). Isto significa que para se atingir determinada recomendação de vitamina A, exclusivamente a partir de alimentos de origem vegetal utilizando o fator de conversão americano, seria necessário ingerir o dobro da quantidade de alimentos.

Tabela 1: Comparação entre as recomendações de vitamina A.

Estágio de Vida	IOM		FAO/WHO	
	RDA/AI* (µg retinol)	UL (µg retinol)	Ingestão Média (µg retinol)	Nível de Ingestão Seguro (µg retinol)
Lactentes				
0 a 6 meses	400*	600	180	375
7 a 12 meses	500*	600	190	400
Crianças				
1 a 3 anos	300	600	200	400
4 a 6 anos	400	900	200	450
7 a 9 anos	400	900	250	500
Homens				
9 a 13 anos	600	1.700	330-400	600
14 a 18 anos	900	2.800	330-400	600
19 a 65 anos	900	3.000	300	600
> 65 anos	900	3.000	300	600
Mulheres				
9 a 13 anos	600	1.700	330-400	600
14 a 18 anos	700	2.800	330-400	600
19 a 65 anos	700	3.000	270	500
> 65 anos	700	3.000	300	600
Gestantes				
≤ 18 anos	750	2.800	370	800
19 a 50 anos	770	3.000	370	800
Nutrizes				
≤ 18 anos	1.200	2.800	450	850
19 a 50 anos	1.300	3.000	450	850

Ingestão diária recomendada (RDA); ingestão adequada (AI); nível de ingestão máximo tolerável (UL).

Deficiência de vitamina A:

Até a segunda metade da década de 1980, a deficiência de vitamina A causava preocupação apenas em relação a seus sinais clínicos, que vão desde a cegueira noturna até a cegueira nutricional irreversível. No entanto, a partir da segunda metade dessa década

surgiram evidências de que a carência sub-clínica de vitamina A poderia ter outros impactos negativos à saúde (Ramalho *et al.*, 2002).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde define a deficiência de vitamina A como uma concentração tecidual de vitamina A baixa o suficiente para ter consequências adversas à saúde, mesmo na ausência de sinais clínicos de xeroftalmia (WHO, 1996). Portanto, considera-se que os casos de xeroftalmia representam apenas a ponta do *iceberg*, sob a qual podem se encontrar proporções muito maiores da população em estágios menos avançados de carência (Ramalho *et al.*, 2002).

A deficiência de vitamina A ocorre, geralmente, devido a uma ingestão inadequada dessa vitamina, principalmente em períodos de demanda elevada, tais como: nas fases de crescimento acelerado, gestação e lactação e no caso de doenças (Humphrey *et al.*, 1992). Assim, o problema é significativamente maior nas crianças abaixo de seis anos de idade e nas mulheres em idade fértil, gestantes e nutrizes. As crianças, nesse período, apresentam uma necessidade elevada de vitamina A necessária para permitir o rápido crescimento. As gestantes e nutrizes necessitam de vitamina A adicional para manter o crescimento dos tecidos maternos e fetais e para repor as perdas com a lactação (FAO/WHO, 2004).

As implicações da deficiência de vitamina A variam de acordo com o grupo de risco. Em crianças em idade pré-escolar, este distúrbio nutricional é a causa mais importante de cegueira infantil e contribui, significativamente, no aumento da morbidade e da mortalidade por infecções. Em mulheres gestantes e nutrizes, a deficiência pode levar à cegueira noturna e parece ter implicações também na elevação da taxa de morbidade e de mortalidade materna (WHO, 1996; Geraldo *et al.*, 2003).

Estima-se que mais de 250 milhões de crianças em todo o mundo apresentem deficiência sub-clínica de vitamina A e que entre três e dez milhões de crianças, a maioria em países em desenvolvimento, tenha alguma forma de xeroftalmia. As estimativas apontam, ainda, que entre 250 e 500 mil crianças, deficientes em vitamina A, ficam cegas todos os anos, sendo que metade delas morre até 12 meses, após a perda da visão (Sommer e West, 1996; WHO, 1995).

A prevalência da deficiência de vitamina A é particularmente alta na Ásia, na África e na América Latina, ainda que os inquéritos nacionais sejam escassos. O Brasil foi classificado pela OMS como uma área de carência sub-clínica (WHO, 1995; McLaren e Frigg, 2001). A figura 9 mostra a categorização dos países por grau de deficiência de vitamina A, segundo dados da OMS em 1998.

Apesar da classificação da OMS, não existem dados representativos que permitam estabelecer a prevalência e a gravidade da deficiência de vitamina A para a população brasileira. Contudo, dispõe-se de apreciável número de estudos pontuais, realizados em várias regiões do Brasil, que fornecem indicações sobre a situação nutricional relacionada a esta vitamina. Em um número significativo dessas pesquisas, a hipovitaminose A foi reconhecida como um problema de saúde pública (Ramalho *et al.*, 2002; Geraldo *et al.*, 2003; Yuyama *et al.*, 2005).

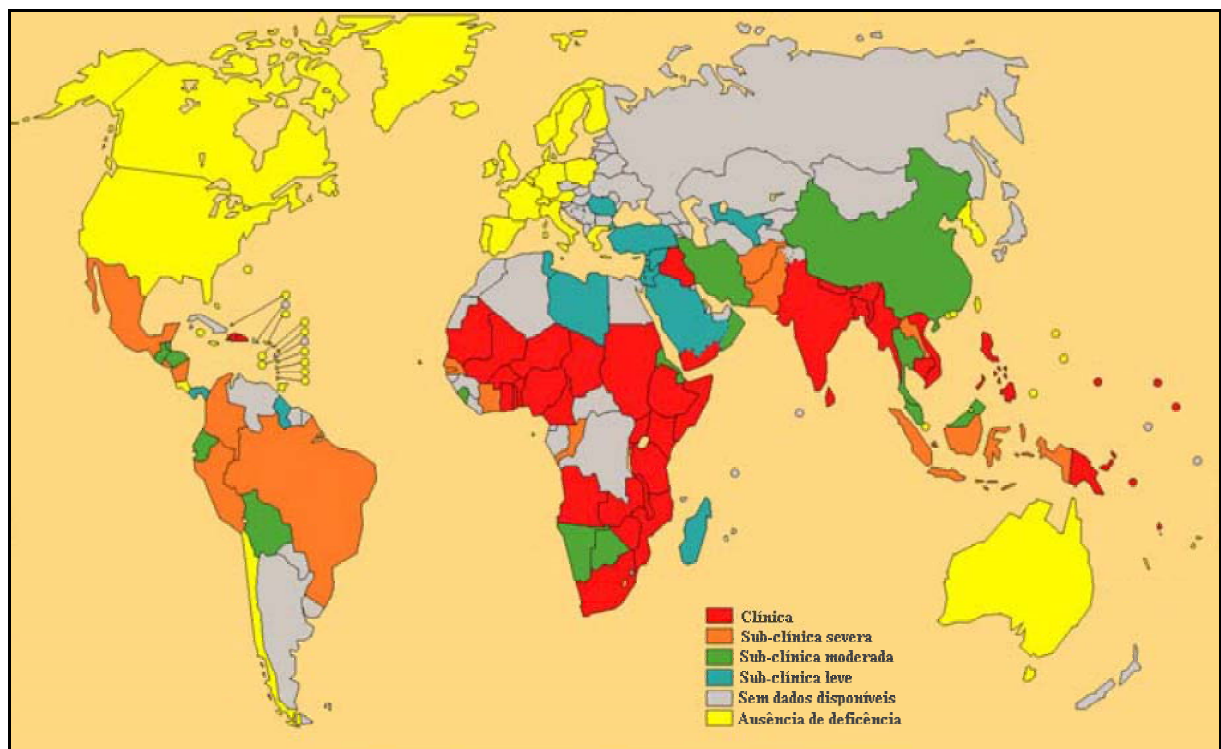


Figura 9: Categorização dos países por grau de deficiência de vitamina A. Fonte: FAO/WHO, 2004.

O governo brasileiro reconhece como áreas de risco de desenvolvimento de deficiência de vitamina A as chamadas regiões de bolsões endêmicos que englobam a região Nordeste, o Estado de Minas Gerais (região Norte, Vale do Jequitinhonha e Vale do Mucurici) e o Vale do Ribeira em São Paulo (Brasil, 2004). No entanto, os dados de outras localidades em nada diferem dos dados dessas regiões, tornando a deficiência de vitamina A independente do mapa econômico do país (Ramalho *et al.*, 2002).

Segundo Ramalho *et al.* (2002), os resultados dos inquéritos de consumo alimentar realizados, nos últimos 25 anos, em âmbito nacional, regional ou local, indicam que a ingestão de vitamina A, de fontes naturais, no Brasil é extremamente baixa em 60% ou mais da população. Os inquéritos bioquímicos disponíveis confirmam que a deficiência de

vitamina A é um problema de saúde pública nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Bahia e Amazonas.

Algumas evidências científicas recentes demonstram, também, que a situação de hipovitaminose A parece não estar restrita aos grupos de risco no Brasil. Estudo realizado com escolares de 7 a 17 anos, regularmente matriculados na rede municipal de ensino no Rio de Janeiro, demonstrou que um total de 10,30% dos escolares apresentou níveis baixos de retinol sérico, sendo 11,98% na faixa etária de 7 a 10 anos e 7,92% na faixa etária de 10 a 17 anos (Ramalho *et al.*, 2004).

Vítolo *et al.* (2004) avaliaram os níveis séricos de vitamina A em adolescentes matriculados na rede privada de ensino da cidade de São Paulo. Foi demonstrado que 30% dos adolescentes, em ambos os sexos, estavam com níveis séricos de vitamina A abaixo do adequado. Segundo os autores, esses achados sugerem a necessidade da realização de mais investigações sobre vitamina A no período da adolescência, para verificar se o nível sérico baixo desse nutriente é um fator de risco à saúde do adolescente ou é reflexo da captação acelerada que ocorre para atender necessidades metabólicas.

Indicadores de deficiência de vitamina A

O único método direto para mensurar o estado nutricional de vitamina A é a medida das reservas de ésteres de retinila após biópsia hepática. No entanto, esse é um procedimento invasivo que não pode ser considerado para investigações de rotina e pesquisas de população. Portanto, é necessário que o estado nutricional de vitamina A dos indivíduos seja medido por meio de outros testes (Yuyama *et al.*, 2005).

Os primeiros passos no estabelecimento de indicadores e critérios para classificar a deficiência de vitamina A como um problema de Saúde Pública foram tomados em 1974, quando a OMS reuniu um grupo de especialistas com o objetivo de discutir o conhecimento existente entre a deficiência de vitamina A e o desenvolvimento de xerofthalmia (McLaren e Frigg, 2001). A classificação das lesões oculares e os critérios propostos por esse grupo foram posteriormente revisados, com base em novas evidências científicas disponíveis naquela época (WHO, 1982).

A xerofthalmia é um conjunto de sinais e sintomas que afetam o olho durante a deficiência de vitamina A, englobando desde a cegueira noturna até o fundo xerofáltmico (McLaren e Frigg, 2001). A OMS classificou os sinais oculares da xerofthalmia da seguinte forma: cegueira noturna (XN), xerose conjuntival (X1A), mancha de Bitot (X1B), xerose da

córnea (X2), ulceração da córnea em área inferior a 1/3 (X3A), ulceração da córnea em área superior a 1/3 (X3B), deformação cicatricial da córnea (XS) e fundo xeroftálmico (XF) (WHO, 1982). A Tabela 2 mostra os critérios propostos para a classificação da deficiência de vitamina A como problema de Saúde Pública.

No entanto, as observações epidemiológicas relacionando à deficiência marginal de vitamina A ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade infantil impulsionaram o desenvolvimento de métodos diagnósticos cada vez mais sensíveis (McLaren e Frigg, 2001; Ramalho *et al.*, 2002).

Tabela 2: Critérios para estabelecer a significância da deficiência de vitamina A como problema de saúde pública em crianças entre 6 e 71 meses de idades. Fonte: WHO, 1982.

Indicadores	Prevalência Mínima ¹
Cegueira Noturna (XN)	1,0%
Mancha de Bitot (X1B)	0,5%
Xerose da Córnea e/ou ulceração (X2 + X3A + X3B)	0,01%
Deformação Cicatricial da Córnea (XS)	0,05%

1. A prevalência de um ou mais indicadores acima do valor estabelecido indicada problema de saúde pública.

Desta forma, a OMS estabeleceu indicadores biológicos para os diferentes tipos de deficiência sub-clínica de vitamina A, classificando-os da seguinte forma: indicadores funcionais (cegueira noturna), indicadores bioquímicos (retinol sérico, retinol no leite materno, RBP sérica, teste de resposta relativa à dose de retinol, teste de resposta relativa à dose de retinol modificado e resposta sérica de 30 dias) e indicadores histológicos (impressão citológica conjuntival) (WHO, 1996).

Outros indicadores ecológicos e demográficos também podem ser utilizados no mapeamento de populações com risco aumentado de deficiência de vitamina A, tais como: indicadores nutricionais e alimentares, padrão de doenças e as variáveis socioeconômicas. No entanto, os indicadores biológicos são essenciais para avaliar o estado nutricional de vitamina A da população e permitem um direcionamento adequado de programas de intervenção e sua avaliação (WHO, 1996). A Tabela 3 mostra os limites de prevalência para cada indicador biológico acima dos quais a deficiência sub-clínica de vitamina A adquire magnitude de problema de saúde pública.

A dosagem de retinol sérico é um dos indicadores bioquímicos mais utilizados no diagnóstico do estado nutricional de vitamina A, apesar da sua baixa sensibilidade nos casos de depleção moderada das reservas hepáticas e nos casos de infecção e DEP (Yuyama *et al.*,

2005). Concentrações de retinol sérico inferiores a 20 µg/dL (0,70 µmol/L) são consideradas baixas e utilizadas para caracterizar deficiência sub-clínica em crianças entre 6 e 71 meses (WHO, 1996). No entanto, a deficiência sub-clínica de vitamina A pode estar presente entre níveis entre 0,70 e 1,05 µmol/L e, ocasionalmente, acima de 1,05 µmol/L (FAO/WHO, 2004).

Tabela 3: Indicadores biológicos de deficiência sub-clínica de vitamina A em crianças entre 6 e 71 meses de idade e classificação como problema de saúde pública. Fonte: WHO, 1996.

Indicadores (ponto de corte)	Problema de Saúde Pública ¹		
	Leve	Moderada	Severa
Funcionais			
Cegueira Noturna (presente 24-71 meses)	> 0 – < 1%	≥ 1 – < 5%	≥ 5%
Bioquímico			
Retinol sérico (≤ 0,70 µmol/L)	≥ 2 – < 10%	≥ 10 – < 20%	≥ 20%
Retinol no leite materno (≤ 1,05 µmol/L)	< 10%	≥ 10 – < 25%	≥ 25%
RDR (≥ 20%)	< 20%	≥ 20 – < 30%	≥ 30%
MRDR (≥ 0,06)	< 20%	≥ 20 – < 30%	≥ 30%
S30DR (≥ 20%)	< 20%	≥ 20 – < 30%	≥ 30%
Histológico			
CIC (anormal para 24-71 meses)	< 20%	≥ 20 – < 40%	≥ 40%

1. A prevalência de pelo menos dois indicadores acima do valor estabelecido revela problema de saúde pública.

A proposta de utilizar o retinol no leite materno, como um indicador do estado nutricional de vitamina A, é relativamente nova e ainda precisa ser avaliada em diferentes condições, mas possui as vantagens de não ser invasiva e de ser de fácil amostragem. Níveis iguais ou inferiores a 30 µg/dL (1,05 µmol/L) são considerados indicativos de hipovitaminose A (WHO, 1996; McLaren e Frigg, 2001).

O teste de resposta relativa à dose de retinol (RDR) é um método indireto capaz de estimar as reservas hepáticas de vitamina A. O RDR é baseado no princípio de que, em situações de depleção hepática de vitamina A, ocorre acúmulo de apo-RBP e o fornecimento de retinol promove a liberação de holo-RBP. Portanto, a magnitude de liberação de retinol do fígado, quando uma dose teste é fornecida, é proporcional ao grau de depleção hepática de vitamina A (McLaren e Frigg, 2001; Yuyama *et al.*, 2005). Resultados superiores a 20% indicam reservas hepáticas inadequadas de vitamina A (WHO, 1996).

O teste de resposta relativa à dose de retinol modificado (MRDR) é semelhante ao RDR, com a diferença de que o palmitato de retinila é substituído pelo 3,4-didesidroretinol, composto natural capaz de se ligar à RBP sem alterar as concentrações de retinol.

A impressão citológica conjuntival (CIC) é uma técnica por meio da qual camadas superficiais da conjuntiva ocular são removidas com a utilização de um papel-filtro de acetato de celulose, para análise histológica posterior (Yuyama *et al.*, 2005).

Na última década, o uso de testes de isótopos estáveis para avaliar o estado nutricional de vitamina A e a biodisponibilidade de carotenóides pró-vitamínicos A tem aumentado significativamente. A diluição de isótopos envolve a administração de uma dose de retinol marcado e sua quantificação em tecidos ou plasma, após sua adequada diluição no organismo (IVACG, 2004).

Apesar da evolução dos métodos para determinar o estado nutricional de vitamina A é importante observar que a escolha dos indicadores do estado de vitamina A dependerá de suas vantagens e limitações e dos recursos e das técnicas analíticas disponíveis. Os testes e sinais clínicos, apesar do baixo custo, possuem utilidade restrita ao diagnóstico da deficiência de vitamina A clínica. Já a determinação do retinol sérico, embora seja um procedimento invasivo, é capaz de diagnosticar casos de deficiência sub-clínica de vitamina A.

A Figura 10 mostra a utilidade de cada método para determinar o estado nutricional de vitamina A, no organismo. Podemos observar que a amostragem hepática é o método mais útil, capaz de identificar desde a deficiência clínica a níveis tóxicos de vitamina A. No entanto, este procedimento está limitado a estudos experimentais.

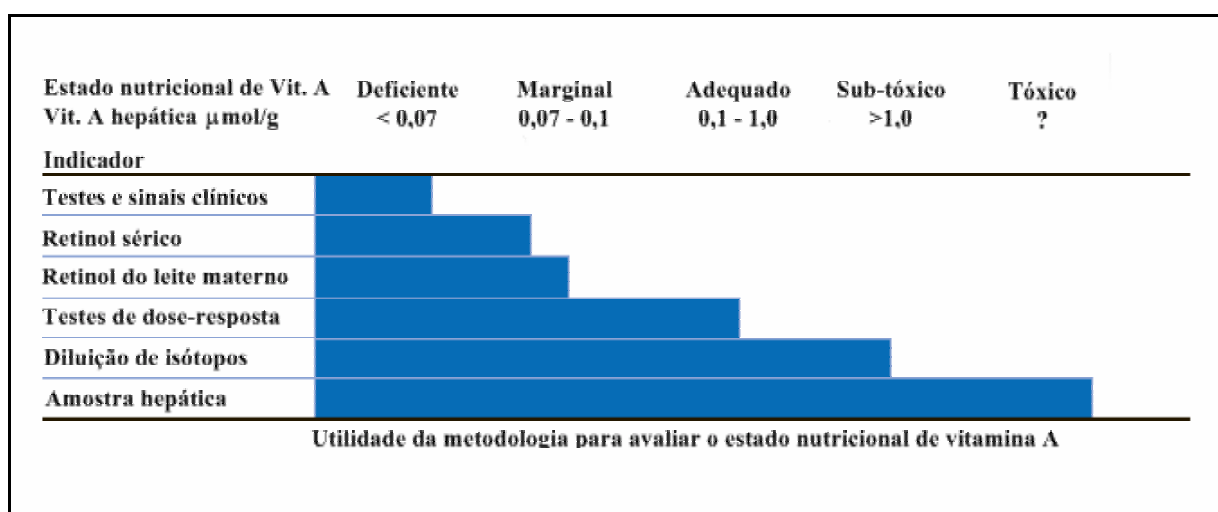


Figura 10: Utilidade de metodologias para avaliar o estado nutricional de vitamina A. Fonte: IVACG, 2004.

Combate à deficiência de vitamina A

A ingestão adequada de Vitamina A, por si só, poderia prevenir aproximadamente de 1,3 a 2,5 milhões das quase 8 milhões de mortes de crianças em idade pré-escolar e na última metade da infância que ocorrem, todos os anos, nos países de alto risco (Humphrey *et al.*, 1992). Reservas adequadas de vitamina A, em crianças e mulheres, reduzem em 23% a mortalidade infantil e em 40% a mortalidade materna (Brasil, 2004). Além disso, a ingestão adequada de vitamina A reduz o risco do desenvolvimento de infecções respiratórias e gastrintestinais.

As atividades de controle da deficiência de vitamina A podem ser enquadradas dentro de três categorias principais: suplementação medicamentosa, adequada e freqüente, de vitamina A aos grupos de risco, programas de fortificação de alimentos e melhora da diversificação da alimentação. Recomenda-se que essas atividades sejam simultâneas e que estejam em consonância com outras medidas de saúde pública destinadas a reduzir a prevalência de infecções e com programas econômicos para melhorar a renda e, conseqüentemente, o acesso ao alimento (WHO, 1996).

A suplementação oral de megadoses de vitamina A é uma estratégia de baixo custo, amplamente difundida e útil no combate à deficiência de vitamina A (WHO, 1996). Geralmente, doses entre 100.000 e 200.000 UI (30.000 a 60.000 µg) de acetato ou palmitato de retinol, em óleo ou como comprimidos dispersos em água, são administrados em intervalos de quatro a seis meses. O fato de a vitamina A pré-formada ser bem absorvida pelo organismo e eficientemente armazenada no fígado, faz com que cerca da metade dessa dose seja absorvida e retida no organismo (Yuyama *et al.*, 2005).

No entanto, essa é uma estratégia imediata que tem como objetivo cobrir grupos de risco específicos, em áreas endêmicas de deficiência de vitamina A. Embora a suplementação oral com vitamina A possa ser utilizada para o tratamento e prevenção da deficiência de vitamina A, não é recomendada sua utilização em longo prazo, a não ser que as doses sejam reduzidas a níveis próximos da RDA e que o seu fornecimento esteja integrado a um sistema de distribuição na comunidade (WHO, 1996).

As doses administradas podem, ocasionalmente, provocar sinais transientes de intoxicação, afetando de 0,7 a 2,5% das crianças (Yuyama *et al.*, 2005). Além disso, é necessário que ocorra um levantamento adequado a fim de se determinar se a população é deficiente em vitamina A, para que não exista o risco de toxicidade. Recentemente, o Unicef foi criticado por especialistas em Saúde Pública da Índia, após sua campanha medicamentosa

para tratar crianças com deficiência em vitamina A, ter deixado mais de 700 crianças doentes e 15 mortas, no estado de Assam (Sharma, 2001).

O Brasil assumiu, em 1990, junto a mais de cem outros países, na Reunião de Cúpula de Nova Iorque sobre a Sobrevivência, Proteção e Desenvolvimento das Crianças que, até 2000, chegaria ao controle da deficiência de vitamina A e das suas conseqüências. Esta posição foi referendada em 1992, na Conferência Internacional sobre Nutrição, promovida pela FAO/OMS, em Roma (Brasil, 1994).

No entanto, a falta de um mapeamento adequado da prevalência da deficiência de vitamina A, no País, fez com que as ações de combate dessa deficiência fossem focadas principalmente, na distribuição de megadoses de vitamina A aos grupos de risco (crianças entre 6 e 59 meses e puérperas), nas chamadas regiões de bolsões endêmicos.

Em 1994, foi criado o Programa Nacional de Controle das Deficiências de Vitamina A com os objetivos de: assegurar a suplementação de doses de vitamina A a crianças de 6 a 59 meses de idade, residentes em áreas de risco; ampliar o conhecimento das famílias residentes em áreas de risco sobre a deficiência de vitamina A, visando o aumento do consumo de alimentos ricos em vitamina A; desenvolver um processo de comunicação social para a importância da vitamina A e as conseqüências de sua deficiência; e estabelecer um sistema de monitoramento do programa, que permita sua avaliação (Brasil, 1994).

Posteriormente, o programa foi estendido as puérperas e, em 2004, o Ministério da Saúde publicou o manual técnico sobre as condutas gerais a serem adotadas no Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A, recomendando que a prevenção da deficiência de vitamina A deveria contemplar medidas como a promoção do aleitamento materno exclusivo até o 6º mês e complementar até dois anos de idade, a garantia da suplementação periódica e regular das crianças de 6 a 59 meses de idade e de puérperas, com megadoses de vitamina A distribuídas pelo Ministério da Saúde e a promoção da alimentação saudável, assegurando informações para incentivar o consumo de alimentos ricos em vitamina A pela população (Brasil, 2004).

As crianças entre 6 e 11 meses de idade, que residem nas áreas de risco, devem receber doses de 100.000 UI uma vez a cada 6 meses e as crianças de 12 a 59 meses de idade devem receber doses de 200.000 UI uma vez a cada 6 meses. As mulheres em idade fértil, no pós-parto imediato, devem receber uma única dose de vitamina A na concentração de 200.000 UI, imediatamente após o parto, na maternidade ou hospital (Brasil, 2004).

Dados do Ministério da Saúde revelam que, em 2006, foram fornecidas 633.558 megadoses de vitamina A (100.000 UI) a crianças entre 6 e 11 meses em 1.972 municípios

localizados em áreas de risco, representando cerca de 75% da meta estipulada. Já o fornecimento de megadoses de vitamina A (200.000 UI) a crianças entre 12 e 59 meses ficou bem aquém das metas estabelecidas para a 1ª dose (42,86%) e 2ª dose (23,15%). O quantitativo de megadoses aplicadas a puérperas, no pós-parto imediato, atingiu 66,32% da meta estabelecida (CGPAN, 2007).

Atualmente, o Ministério da Saúde está em fase final de planejamento da Pesquisa Nacional sobre Deficiências de Micronutrientes e, a partir dos resultados obtidos, pode ocorrer a ampliação da cobertura da suplementação de Vitamina A para outras regiões do País que sejam apontadas como áreas de risco (CGPAN, 2007).

A fortificação de alimentos com vitamina A é uma maneira sustentável e eficaz de aumentar a ingestão dessa vitamina pela população, sendo recomendada, principalmente, para localidades com elevada prevalência de deficiência de vitamina A (OMS, 1996). A prática da fortificação pode ser utilizada para toda a população ou direcionada a grupos populacionais específicos, uma vez que não modifica os hábitos alimentares e exige uma participação mínima do consumidor (Zancul, 2004).

O sucesso da fortificação depende de inúmeros fatores, tais como: mapeamento adequado da prevalência de deficiência de vitamina A, seleção correta do tipo de composto a ser utilizado e do alimento usado como veículo, capacidade e capacitação industrial, controle de qualidade, viabilidade econômica, apoio legislativo e monitoramento adequado (OMS, 1996; Zancul, 2004).

O alimento selecionado deve ser tecnicamente fortificável, interferindo o mínimo possível na biodisponibilidade do composto utilizado. O alimento deve ter, também, um preço acessível e ser consumido em quantidades adequadas pela população em risco. A quantidade e o tipo de composto a ser utilizado devem ser cuidadosamente escolhidos, a fim de garantir sua biodisponibilidade, evitar que as características do alimento sejam alteradas de maneira negativa e diminuir os riscos de toxicidade (OMS, 1996; Zancul, 2004; IVACG, 2004).

Atualmente, mais de 25 países possuem políticas de fortificação de vitamina A e muitos outros praticam a fortificação voluntária (Nestel e Nalubola, 2003b). Os alimentos geralmente fortificados são o açúcar, o glutamato monossódico e a margarina (WHO, 1996). A fortificação dos alimentos, por exemplo, tem sido utilizada com sucesso em áreas onde a vitamina A é escassa, como no caso da fortificação do açúcar, na Guatemala (Mejia & Arroyave, 1982) e do glutamato de sódio, na Indonésia (Muhilal *et al.*, 1988).

Outros alimentos, no entanto, também podem ser fortificados com sucesso. Solon *et al.* (2000) demonstraram que o consumo de 60 g de um produto contendo farinha de trigo,

fortificada com vitamina A, cinco dias da semana, durante 30 semanas, resultou na diminuição significativa da porcentagem de crianças com reservas inadequadas de vitamina A, quando comparado com o grupo controle.

No entanto, a implantação e a sustentabilidade da fortificação de alimentos tem sido precária em países onde a indústria processadora de alimentos é pouco desenvolvida, locais estes onde, normalmente, as populações mais vulneráveis estão localizadas (WHO, 1996).

O Brasil não possui um programa compulsório de fortificação de vitamina A como existe para o iodo, o ferro e o ácido fólico. Com a publicação da Lei nº. 1.974, de 14 de agosto de 1953, a fortificação do sal para consumo humano, com iodo, tornou-se obrigatória nas áreas bocígenas, na proporção de 10 ppm. Posteriormente, a Lei nº. 6.150, de 3 de dezembro de 1974, estendeu a obrigatoriedade da iodação do sal para consumo humano a todo território nacional. Desde então, adequações vêm sendo realizadas à legislação para atender melhor à população na prevenção dos distúrbios causados pela deficiência de iodo. Em 1999, os teores de iodação do sal foram alterados para as faixas de 40 a 100 ppm (Brasil, 1999) e, em 2003, a faixa de iodação foi ajustada entre 20 e 60 ppm (Brasil, 2003).

A obrigatoriedade da fortificação das farinhas de trigo e de milho, com ferro e ácido fólico, com o objetivo reduzir os níveis de anemia ferropriva e o risco de patologias do tubo neural e da mielomeningocele, foi estabelecida com a publicação, pela Anvisa, da Resolução RDC nº. 344, de 13 de dezembro de 2002. A norma determina que cada 100 g de farinha de trigo e de farinha de milho devem fornecer, no mínimo, 4,2 mg de ferro e 150 µg ácido fólico. As empresas receberam um prazo de 18 meses para adequarem seus produtos, sendo que as farinhas de bijú ou farinhas de milho obtidas por maceração, o flocão, a farinha de trigo integral e a farinha de trigo durum foram excluídas da obrigatoriedade da fortificação devido a limitações de processamento tecnológico (Brasil, 2002a).

A adição voluntária de vitaminas e ou de minerais aos alimentos encontra-se regulamentada pela Anvisa, por meio da Portaria nº. 31, de 13 de janeiro de 1998, que aprovou o regulamento técnico referente a alimentos adicionados com nutrientes essenciais (Brasil, 1998).

De acordo com a Portaria nº. 31/1998, considera-se alimento fortificado/enriquecido ou simplesmente adicionado de nutrientes, todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo ou corrigir deficiências demonstradas em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma.

Os alimentos adicionados de nutrientes devem fornecer no mínimo 7,5% e 15% da ingestão diária recomendada de referência (IDR) em 100 ml e 100 gramas do alimento pronto para o consumo, respectivamente. Já os alimentos fortificados/enriquecidos devem fornecer no mínimo 15% e 30% da IDR em 100 ml e 100 gramas do alimento pronto para o consumo, respectivamente (Brasil, 1998).

A vitamina A poderá ser adicionada nas formas de vitamina A pré-formada ou de carotenóides pró-vitamínicos A e a adição não poderá alcançar níveis terapêuticos, ou seja, não deve ultrapassar 100% da IDR de referência em 100 ml ou 100 g do alimento pronto para o consumo (Brasil, 1998). As IDR de referência são, atualmente, regulamentadas por meio da Resolução RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005, e o valor estabelecido para a vitamina A é de 600 µg de retinol equivalente.

Atualmente, esses alimentos são dispensados de registro conforme estabelece o Anexo I da Resolução RDC nº. 278, de 22 de setembro de 2005, que dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens dispensados e com obrigatoriedade de registro. A isenção de registro, a voluntariedade da fortificação e as poucas exigências da Portaria nº. 31, de 13 de janeiro de 1998 faz com que a quantidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais e sua contribuição para a ingestão de micronutrientes, pela população brasileira, sejam desconhecidas.

Com o avanço científico e tecnológico, a biofortificação de culturas alimentares de subsistência, por técnicas de melhoramento convencional ou de engenharia genética, passou a ser uma possibilidade viável e interessante para o combate à deficiência de vitamina A e outros micronutrientes (Stein *et al.*, 2005). Projetos de biofortificação, por técnicas de melhoramento convencional, em culturas de mandioca, milho e batata-doce estão em desenvolvimento, na tentativa de identificar variedades ricas em carotenóides pró-vitamínicos A (HarvestPlus, 2006a; HarvestPlus, 2006b; HarvestPlus, 2006c).

A manipulação genética da biossíntese de carotenóides pró-vitamínicos A, em alimentos de origem vegetal, é outra maneira de se obter alimentos fortificados com vitamina A. A produção do arroz dourado, que foi modificado geneticamente para produzir β-caroteno é um bom exemplo. O arroz dourado fornece 1,6 µg de β-caroteno por grama de arroz, ou seja, 300 gramas de arroz seriam suficientes para fornecer em torno de 10 a 20% das recomendações diárias de vitamina A (Ye *et al.*, 2000). No entanto, questões como biodisponibilidade, perdas durante o cozimento, estabilidade durante o armazenamento e aceitação por parte dos consumidores e produtores devem, ainda, ser melhor investigadas (IVACG, 2004). Além

disso, a manipulação com sucesso das vias de biossíntese de carotenóides enfrenta três problemas básicos: os precursores são consumidos a custo de outras vias já existentes, pode ocorrer interferência com a regulação bem balanceada das vias metabólicas; e o armazenamento adequado do produto precisa ser assegurado, principalmente quando compostos altamente lipofílicos, como os carotenóides, são produzidos (Sandmann, 2001).

Outra ação estratégica, considerada fundamental para a erradicação da deficiência de vitamina A, é o incentivo à diversificação alimentar, que envolve uma série de intervenções de longo prazo destinadas a aumentar a identificação, produção, disponibilidade, acesso, consumo e biodisponibilidade de alimentos ricos em vitamina A pré-formada e de carotenóides pró-vitamínicos A (WHO, 1996; Ruel, 2001).

Ações destinadas a aumentar a produção de alimentos ricos em vitamina A envolvem programas agrícolas, bem como políticas para aumentar a produção comercial de frutas e hortaliças. O aumento da ingestão de vitamina A, pela população, requer ações de incentivo ao aleitamento materno, educação nutricional, comunicação, marketing social e programas de modificação comportamental destinados a orientar as escolhas alimentares e a aumentar a demanda por alimentos ricos em vitamina A, incluindo técnicas de conservação, como a secagem e a produção de concentrados de folhas, a fim de aumentar a disponibilidade de frutas e de hortaliças sazonais (Ruel, 2001).

Estratégias para aumentar a biodisponibilidade de vitamina A incluem o incentivo a técnicas de processamento que possam tornar a vitamina A mais disponível e a combinação de alimentos que, quando consumidos juntos, aumentem a biodisponibilidade de vitamina A (Ruel, 2001).

O aleitamento materno exclusivo é recomendado durante os primeiros seis meses de vida (WHO, 2001). Recém-nascidos apresentam reservas marginais de vitamina A e dependem do leite materno para atingir suas necessidades de vitamina A. O leite materno é uma fonte natural de vitamina A e o seu conteúdo está diretamente relacionado à ingestão de vitamina A pela mãe (Nestel e Nalubola, 2003c).

O Brasil possui uma política de referência internacional no incentivo ao aleitamento materno que tem obtido progressos relevantes na última década (Brasil, 2000a). A Política Nacional de Alimentação e Nutrição reconhece a importância do estímulo ao aleitamento materno na promoção de práticas alimentares e de estilos de vida saudáveis e como estratégia para a prevenção da desnutrição energético-protéica, da anemia e da deficiência de vitamina A, nos primeiros meses de vida (Brasil, 2000a). No entanto, apesar do aumento da

prevalência de amamentação no País, os valores ainda estão muito inferiores ao recomendado pela OMS (Brasil, 2002b).

Apesar dos alimentos de origem animal serem excelentes fontes de vitamina A pré-formada, com elevada biodisponibilidade, seu preço impossibilita o consumo por populações pobres, principalmente aquelas que vivem em países em desenvolvimento (WHO, 1995). Assim, o consumo de frutas e hortaliças ricas em carotenóides pró-vitamínicos A faz com que o consumo desses alimentos seja importante fonte de vitamina A nos países em desenvolvimento. Estimativas apontam que na África e na Ásia mais de 80% da vitamina A da dieta é proveniente dos carotenóides pró-vitamínicos A de frutas e hortaliças, enquanto na América do Sul esse valor seria de 60% (ACC/SCN, 1993).

Rodriguez-Amaya (1999b) ressalta que a América Latina, devido a sua localização privilegiada em uma região de clima tropical que favorece o crescimento de hortaliças verde-escuras, possui uma enorme variedade de vegetais nativos, semi-cultivados e pouco explorados que provavelmente são fontes de carotenóides pró-vitamínicos A.

No entanto, os dados limitados sobre a composição quantitativa e qualitativa dos carotenóides nas hortaliças, os poucos estudos sobre sua biodisponibilidade e a falta de informação da população acerca das fontes de carotenóides são fatores limitantes para um melhor aproveitamento dessas fontes alimentares como uma alternativa contra a hipovitaminose A. Olson (1999a) ressalta que o nosso conhecimento sobre a biodisponibilidade dos carotenóides pró-vitamínicos A é insuficiente, fragmentada e de difícil interpretação. A biodisponibilidade absoluta de carotenóides pró-vitamínicos A é definida como a massa de vitamina A formada pelo organismo após a ingestão de uma determinada quantidade de carotenóide pró-vitamínicos A (IVACG, 1999). No entanto, o fato de os carotenóides serem substâncias orgânicas facilmente oxidáveis faz com que sua biodisponibilidade absoluta seja difícil de quantificar (Olson, 1999a). Assim, a maioria dos estudos utiliza a biodisponibilidade relativa que é a resposta de um indicador à administração de determinado carotenóide pró-vitamínico A em relação a uma forma de referência que, geralmente, é o β -caroteno dissolvido em óleo (IVACG, 1999). Zaripheh e Erdman (2002) definem a biodisponibilidade de xantofilas como a proporção da quantidade de xantofila ingerida que está disponível para suas ações, por exemplo, presentes no plasma.

Mercadante e Rodriguez-Amaya (1990) demonstraram que algumas folhas nativas brasileiras, tais como, mentruz, serralha, beldroega, caruru e taioba possuem um elevado teor de carotenóides pró-vitamínicos A, principalmente de β -caroteno. Posteriormente, Graebner *et al.* (2004) verificaram que a biodisponibilidade relativa das folhas de serralha, beldroega e

taioaba, em ratos, foram de 36%, 16% e 9%, respectivamente. Tang *et al.* (1999) demonstraram que o consumo de 238 gramas de vegetais verdes e amarelos por crianças chinesas, cinco vezes na semana, durante dez semanas, foi capaz de fornecer quantidades adequadas de vitamina A e evitar sua deficiência em algumas épocas do ano, quando a disponibilidade de alimentos ricos em vitamina A é baixa.

A mandioca é uma cultura perene nativa da América tropical, cujo consumo também se difundiu na África Subsaariana e em partes da Ásia. Essa planta é capaz de crescer em solos marginais, resistir a doenças, à seca e a pragas, além de ser flexível quanto à época de colheita (HarvestPlus, 2006a). Por tudo isso, a mandioca é uma cultura extraordinariamente adaptável e vigorosa, sendo a principal fonte de energia para mais de meio bilhão de pessoas em todo mundo, principalmente em países tropicais (FAO, 2000; Chavez *et al.*, 2000). Cinco países são responsáveis por mais de 70% da produção de mandioca no mundo: Brasil, República Democrática do Congo, Indonésia, Nigéria e Tailândia. Em 1999, a produção mundial de mandioca foi superior a 160 milhões de toneladas (FAO, 2000).

Além da importância da raiz como fonte energética, as folhas de mandioca, consideradas um subproduto da colheita da raiz, possuem elevada concentração de β -caroteno, minerais e proteína (Penteado *et al.*, 1986; Adewusi e Bradbury, 1993; FAO, 2000; Chavez *et al.*, 2000; Nassar *et al.*, 2007).

Penteado *et al.* (1986), ao analisarem o teor de β -caroteno da folha da mandioca da região Norte do Brasil, nos meses de dezembro e maio, encontraram valores de 151 $\mu\text{g/g}$ e 108 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Adewusi e Bradbury (1993) demonstraram que folhas de diferentes idades e cultivares, apresentaram valores de β -caroteno entre 13 $\mu\text{g/g}$ e 78 $\mu\text{g/g}$. Recentemente, pesquisadores da Universidade de Brasília encontraram valores entre 13,85 $\mu\text{g/g}$ a 24,12 $\mu\text{g/g}$, nas folhas das variedades analisadas (Nassar *et al.*, 2007).

No Brasil, as folhas de mandioca fazem parte da culinária tradicional da região Norte, sendo utilizadas no preparo de um prato típico conhecido como maniçoba. Essa preparação leva folhas de mandioca que são trituradas e cozidas juntamente com a carne seca, o mocotó e o toucinho de boi (Brasil, 2002c). A folha de mandioca em pó também tem sido utilizada há algumas décadas no País, como um ingrediente da multimistura. A multimistura é um suplemento alternativo, de baixo custo e de elevado teor de nutrientes, que além do pó da folha de mandioca (5-10%), contém quantidades variadas de farelo de cereais, de sementes secas e trituradas e de casca de ovos em pó (Madruga e Camara, 2000; Siqueira *et al.*, 2003).

Em 2000, a Anvisa publicou a Resolução RDC nº. 53, de 15 de junho, que aprovou o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de mistura à base de farelo de cereais. Foram estabelecidos os ingredientes obrigatórios e opcionais, os limites máximos permitidos de ácido cianídrico (4ppm) e ácido fítico (0,1%) e os requisitos de rotulagem, tais como: advertências de que o produto não poderia ser consumido como única fonte de alimento e de que não deveria ser utilizado na alimentação de crianças nos primeiros doze meses de vida. O produto, também, não deveria ser indicado para o tratamento de deficiências nutricionais.

Posteriormente, esta norma foi revogada pela Resolução RDC nº. 263, de 22 de setembro de 2005, que aprovou o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. A nova norma não estabeleceu os ingredientes obrigatórios e opcionais e os limites máximos de ácido cianídrico e ácido fítico. As únicas exigências existentes são referentes aos requisitos de rotulagem, que vedam a indicação do produto para suprir deficiências nutricionais e exigem que a seguinte advertência esteja presente no rótulo em destaque e em negrito: “O Ministério da Saúde adverte: não existem evidências científicas de que este produto previna, trate ou cure doenças”.

Recentemente, o Conselho Federal de Nutrição (CFN) emitiu sua posição final sobre o uso da multimistura determinando que os nutricionistas não devem prescrever a multimistura com base no disposto no Código de Ética, capítulo I, artigos 1º, 2º e 3º (CFN, 2007). Segundo o Conselho, a utilização do suplemento não tem respaldo científico, a presença de fatores anti-nutricionais, como glicosídeos cianogênicos, ácidos fítico e tânico, interfere na biodisponibilidade das vitaminas e minerais e a produção do suplemento muitas vezes não atende aos requisitos microbiológicos e de contaminantes (CFN, 2007).

Apesar do posicionamento do Conselho, existem evidências científicas que sustentam a eficácia da multimistura no tratamento da desnutrição. Siqueira *et al.* (2003) demonstraram que a suplementação da dieta de estudantes com 10 gramas de multimistura contribuiu significativamente para a melhora da estatura das crianças, identificada por uma razão altura/idade significativamente superior ao grupo que não recebeu a suplementação.

Quanto à presença de fatores anti-nutricionais é importante salientar que a mandioca pertence ao grupo de plantas cianogênicas. A linamarina é o principal glicosídeo cianogênico na mandioca e está presente em todos os órgãos da planta (White *et al.*, 1994). A partir da ruptura da estrutura celular, as enzimas presentes (linamarase) degradam estes compostos, liberando o ácido cianídrico (HCN), que é o princípio tóxico da mandioca e cuja ingestão ou mesmo inalação pode causar efeitos adversos à saúde (White *et al.*, 1994).

O Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) não foi capaz de estabelecer um nível máximo seguro para a ingestão de glicosídeos cianogênicos devido à ausência de informações epidemiológicas e toxicológicas. Entretanto, o Comitê concluiu que o nível máximo de 10 ppm de cianeto permitido pelo Padrão do Codex Alimentarius, para a farinha de mandioca, não está associado com a toxicidade aguda (WHO, 1993).

Diversos processos como cocção, desidratação e a maceração são capazes de reduzir os teores de cianeto. A secagem e a combinação da maceração com a secagem reduzem o teor de ácido cianídrico nas folhas de mandioca em mais de 95% (Fasuyi, 2005). Ngudi *et al.* (2003) demonstraram que a cocção também é capaz de reduzir significativamente o teor de cianogênicos totais nas folhas de mandioca.

Apesar do processamento da folha de mandioca tornar os carotenóides mais susceptíveis a oxidação e isomeração, é provável que contribua para o aumento da sua biodisponibilidade, facilitando a liberação dos carotenóides da matriz alimentar. Até o momento, somente dois estudos avaliaram a biodisponibilidade do β -caroteno da folha de mandioca, sendo que, somente em um deles, a biodisponibilidade foi quantificada (Zakaria-Rungkat *et al.*, 2000; Ortega-Flores *et al.*, 2003).

Zakaria-Rungkat *et al.* (2000) demonstraram que os teores de β -caroteno das folhas de mandioca fervidas (35,1 $\mu\text{g/g}$) ou fervidas e cozidas (26,1 $\mu\text{g/g}$) apresentam uma redução no seu teor de β -caroteno em relação às folhas de mandioca frescas (42 $\mu\text{g/g}$) de aproximadamente 16,5 e 38%, respectivamente. No entanto, a biodisponibilidade do β -caroteno das folhas de mandioca fervidas e cozidas foi duas vezes superior a das folhas de mandioca, somente fervidas. Ortega-Flores *et al.*, (2003) ao analisarem o teor de β -caroteno no pó da folha de mandioca encontraram um valor aproximado de 12,5 mg/100g.

Tendo em vista a grande produção de mandioca no País, sua importância na alimentação da população, principalmente nas áreas mais carentes, e o elevado teor de β -caroteno de suas folhas, existe a possibilidade de as folhas de mandioca processadas serem utilizadas como uma fonte potencialmente biodisponível de vitamina A. No entanto, é importante que se investigue a biodisponibilidade do β -caroteno da folha de mandioca, a fim de respaldar futuras orientações na utilização dessa planta como fonte de vitamina A.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a biodisponibilidade relativa do β -caroteno do pó da folha de mandioca em ratos.

Objetivos específicos

Determinar o teor de β -caroteno no pó da folha de mandioca.

Avaliar o ganho de peso e o consumo de ração dos ratos

Determinar o fator de acúmulo de retinol hepático nos ratos, após o tratamento

Material e Métodos

Obtenção do pó da folha de mandioca

As folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Distrito Federal, Brasil, com seis a oito meses de plantio, foram colhidas em agosto. As folhas foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e foram deixadas para secar a sombra, em temperatura ambiente (28°C), por sete dias. O pó foi obtido após a maceração das folhas secas.

Extração e Quantificação do β -caroteno no pó da folha de mandioca

Os carotenóides do pó da folha de mandioca foram extraídos e saponificados de acordo com a metodologia proposta por Mercadante *et al.* (1997) e, posteriormente, quantificados por meio de cromatografia líquida de alta precisão. As extrações foram realizadas em triplicatas, em ambiente protegido de luz.

Inicialmente, foram pesadas 100 mg do pó da folha de mandioca, com auxílio de uma balança de precisão. A amostra foi transferida para um cadinho, adicionada de acetona P.A. gelada, macerada e filtrada a vácuo. A operação foi repetida três vezes. Num funil de separação foram adicionados 50 mililitros de água destilada, 50 mililitros de éter de petróleo P.A. e parte do extrato obtido. A amostra foi lavada com água e após ocorrer a separação, a parte inferior (acetona + água) foi descartada. A operação foi repetida até todo o extrato ter sido utilizado.

Após a extração dos carotenóides, foi realizada a saponificação para a hidrólise dos ésteres de xantofilas e de carotenos, bem como a remoção de outros lipídeos e da clorofila, a fim de facilitar a separação e a quantificação dos carotenóides. O extrato em éter de petróleo obtido foi transferido para Erlenmeyer e adicionado de um mesmo volume de hidróxido de sódio (KOH) 10% em metanol. A amostra foi armazenada à temperatura ambiente, em ambiente protegido de luz, por 16 horas.

Após a saponificação, a amostra foi transferida para um funil de separação, adicionada de água destilada e, após a separação, a parte de baixo foi descartada. A operação foi repetida três vezes. O extrato obtido foi então concentrado em um evaporador rotatório à temperatura de 35°C. O extrato concentrado foi seco sob nitrogênio e armazenado em frasco escuro, sob refrigeração, a -70°C.

Os carotenóides extraídos foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Shimadzu com coluna cromatográfica Vydac C₁₈ polimérica 201TP54 250 x 4,6 mm, 5µm. A temperatura interna do forno foi mantida em 22°C e a fase móvel utilizada foi metanol (MeOH) 100% com fluxo de 1,5 ml/min. Tanto as amostras quanto os padrões foram injetados automaticamente.

O β-caroteno foi identificado por meio do tempo de retenção a 450nm e da co-cromatografia com padrão. A concentração do β-caroteno no pó da folha de mandioca foi determinada com auxílio de uma curva padrão, construída a partir de diferentes concentrações de soluções-padrão de β-caroteno sintético, utilizando-se um coeficiente de extinção de 2500. Todos os reagentes utilizados foram de grau CLAE, adquiridos junto à Companhia Química Sigma. O β-caroteno sintético foi adquirido junto à Fluka.

Delineamento experimental

O delineamento experimental do estudo foi baseado no método de depleção e repleção da vitamina A hepática de ratos, de acordo com o proposto por Furusho et al. (2000) e Zakaria-Rungkat *et al.* (2000) e modificado por Graebner *et al.* (2004).

Vinte e três ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), recém desmamados (21 dias, peso entre 40 e 50 gramas) foram fornecidos pelo Biotério da Universidade de Brasília. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais, com bandeja revestida de filó para a coleta das sobras de dieta. As gaiolas foram mantidas no biotério do laboratório de Biofísica com temperatura controlada (22 ± 2°C) e ciclo de luz:escuro de 12 horas. Os ratos receberam dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) modificada (a vitamina A foi substituída por β-caroteno) entre 16h00min e 08h00min, com livre acesso à água. Após cinco dias, quatro ratos foram sacrificados para determinar o conteúdo basal de retinol hepático.

Os demais ratos foram submetidos à dieta AIN-93G deficiente em vitamina A por um período de 30 dias para a depleção de suas reservas hepáticas de vitamina A (período de depleção). Após esse período, quatro ratos foram sacrificados para análise do seu teor hepático de vitamina A.

Os ratos restantes foram então separados em três grupos (cinco ratos/grupo) e tratados com dietas AIN-93-G modificadas, por um período de 30 dias (período de repleção). O grupo controle (GC) recebeu a dieta AIN-93G, contendo 4.000 UI de vitamina A na forma de β-caroteno dissolvido em óleo de soja comercial (7.200 µg/kg). O grupo mandioca (GM)

recebeu a dieta AIN-93G acrescida de 19,5 gramas de pó da folha de mandioca por quilo de dieta, o que correspondente a 4.000 UI de vitamina A na forma de β -caroteno. O grupo deficiente (GD) continuou recebendo a dieta AIN-93G deficiente em vitamina A.

Após o período de repleção, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os fígados foram extraídos, lavados com solução salina 0,9%, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C , protegidos da luz para posterior determinação dos conteúdos de vitamina A hepática. A quantidade de dieta ingerida e o ganho de peso foram verificados diária e semanalmente, respectivamente. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Cuidados Animais da Universidade de Brasília.

Preparação das dietas

A dieta administrada aos ratos foi a AIN-93G (Reeves, *et al*, 1993) preparada e armazenada de acordo com as orientações. No preparo da dieta deficiente em vitamina A, utilizada para a depleção da vitamina A hepática, todos os nutrientes foram incluídos com exceção da vitamina A. Na formulação da dieta do grupo controle (GC), a quantidade de vitamina A da dieta (4.000 UI/kg) foi substituída pelo β -caroteno (7.200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dissolvido em óleo de soja comercial. Já no preparo da dieta com o pó da folha de mandioca (GM), nenhuma vitamina A foi adicionada, sendo o β -caroteno do pó a única fonte de vitamina A. A quantidade de pó da folha adicionada à dieta (19,5g/kg) foi estimada a partir dos valores de β -caroteno obtidos na análise e que continha 7.200 μg de β -caroteno por quilo de dieta. Para a conversão do β -caroteno em vitamina A foi utilizado o fator de conversão de 1,8.

Extração e quantificação do retinol hepático

A extração da vitamina A hepática foi realizada segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1976). Uma amostra de 500 miligramas de fígado foi pesada, homogeneizada e transferida para um balão de saponificação. A saponificação foi realizada com o objetivo de hidrolisar os ésteres de retinil que são a principal forma de armazenamento da vitamina A no fígado.

Ao fígado homogeneizado foram adicionados 10 ml de glicerina P.A., 50 ml de álcool etílico P.A. e 10 ml de hidróxido de potássio (KOH) 30% em água. Essa mistura foi aquecida em refluxo por 40 minutos à temperatura de 40°C . A mistura foi transferida para um funil de

separação, lavada quatro vezes com éter de petróleo P.A. em volumes decrescentes de 40 ml, 30 ml, 20 ml e 10 ml e, então, lavada com água destilada até que a fase aquosa não apresentasse mais coloração rósea pela adição de gotas de fenolftaleína 1% em álcool para neutralizar o KOH. O extrato foi então concentrado em evaporador rotatório, seco sob nitrogênio e armazenado em frasco escuro sob refrigeração a -70°C .

As análises de retinol foram realizadas de acordo com Furusho *et al.* (2000) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, aparelho Shimadzu com coluna cromatográfica Shimadzu C₁₈ 4,6 mmID x 25 cm, 5 μm . A temperatura interna do forno foi mantida em 25 °C e a fase móvel foi metanol (MeOH) 95% e água (H₂O) 5% com fluxo de 1,5 ml/mim. Tanto as amostras quanto os padrões foram injetados automaticamente.

O retinol foi identificado por meio do tempo de retenção a 325 nm e da co-cromatografia com padrão. As concentrações da vitamina A hepática foram calculadas com auxílio de uma curva padrão de retinol sintético, construída a partir de diferentes concentrações de soluções-padrão de retinol, utilizando um coeficiente de extinção de 2704. Todos os reagentes utilizados foram de grau CLAE adquiridos junto à Sigma. O β -caroteno sintético também foi adquirido junto a Sigma.

Determinação da biodisponibilidade

A biodisponibilidade do β -caroteno foi avaliada pelo Fator de Acúmulo de Retinol (RAF) durante o período de repleção de acordo com Zakaria-Rungkat *et al.* (2000). O RAF foi calculado dividindo-se a ingestão de β -caroteno pelo total de retinol acumulado no fígado (LRA). A biodisponibilidade relativa foi determinada dividindo-se o RAF do grupo controle, que recebeu β -caroteno sintético, pelo RAF do grupo mandioca e multiplicando por 100.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão. Análises de variância (ANOVA) foram utilizadas para determinar diferenças entre os grupos. Análises estatísticas foram realizadas para o ganho de peso, ingestão de β -caroteno da dieta e biodisponibilidade relativa. Diferenças associadas com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Referências Bibliográficas

- ACC/SCN, United Nations Administrative Committee on Coordination/United Nations System Standing Committee on Nutrition, 1993. Second report on the world nutrition situation. Global and regional results.
- Adewusi, S.R.A., Bradbury, J.H., 1993. Carotenoids in cassava: comparison of open column and HPLC methods of analysis. *J. Sci. Food Agric.* 62, 375-383.
- Agostini-Costa, T.S., Abreu, L.N., Rossetti, A.G., 2003. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. *Rev. Bras. Frutic.* 25, 56-58.
- Ambrósio, C.L.B., Campos, F.A.C.S., Faro, Z.P., 2006 Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. *Rev. Nutr.* 19, 233-243.
- Arima, H.K., Rodriguez-Amaya, D.B., 1990. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from Northeastern Brasil. *Arch. Latinoam. Nutr.* 40, 284-292.
- Barua, A.B., Olson, J.A., 2000. β -carotene is converted primarily to retinol in rats *in vivo*. *J. Nutr.* 130, 1996-2001.
- Batten, M.L., Imanishi, Y., Maeda, T., Tu, D.C., Moise, A.R., Bronson, D., Possin, D., Van Gelder, R.N., Baehr, W., Palczewski, K., 2004. Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J. Biol. Chem.* 279, 10422-10432.
- Beitune, P.E.L., Duarte, G., Nunes de Moraes, E., Quintana, S.M., Vannucchi, H., 2003. Deficiência da vitamina A e associações clínicas: revisão. *Arch. Latinoam. Nutr.* 53, 355-363.
- Bernhardt, S., Schlich, E., 2006. Impact of different cooking methods on food quality: Retention of lipophilic vitamins in fresh and frozen vegetables. *Journal of Food Engineering* 77, 327-333.
- Blomhoff, R., Blomhoff, H.K., 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology.* 66, 606-630.
- Böhm, V., Bitsch R., 1999. Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status, and the antioxidant capacity of human plasma. *Eur. J. Nutr.* 38, 118-25.
- Borel, P., Tyssandier, V., Mekki, N., Grolier, P., Rochette, Y., Alexandre-Gouabau, M.C., Lairon, D., Azaïs-Braesco, V., 1998. Chylomicron β -carotene and retinyl palmitate

responses are dramatically diminished when men ingest β -carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *J. Nutr.* 128, 1361-1367.

Bowen, P.E., Herbst-Espinosa, S.M., Hussain, E.A., Stacewicz-Sapuntzakis, M., 2002.

Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *J. Nutr.* 132, 3668–3673.

Brasil. Presidência da República, 1953. Lei nº. 1944, de 14 de agosto de 1953. Torna obrigatória a iodação do sal de consumo humano nas áreas de bócio endêmico.

Brasil. Presidência da República, 1974. Lei nº. 6.150, de 03 de dezembro de 1974. Dispõe sobre a obrigatoriedade da iodação do sal, destinado ao consumo humano, seu controle pelos órgãos sanitários e dá outras providências.

Brasil. Ministério da Saúde, 1994. Portaria nº. 2.160, de 29 de dezembro de 1994. Criou, no Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN), o Programa Nacional de Controle das Deficiências de Vitamina A.

Brasil. Congresso Nacional, 1995. Lei nº. 9.005, de 16 de março de 1995. Altera disposições das Leis nº. 6.150, de 3 de dezembro de 1974, e nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977, que dispõem sobre a obrigatoriedade da iodação do sal destinado ao consumo humano, seu controle pelos órgãos sanitários e dá outras providências.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, 1998. Portaria nº. 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais, constante do anexo desta Portaria.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº. 218, de 24 de março de 1999. Somente será considerado próprio para consumo humano o sal que contiver teor igual ou superior a 40 (quarenta) miligramas até o limite máximo de 100 (cem) miligramas de iodo por quilograma de produto.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, 2000a. Política nacional de alimentação e nutrição. Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2000b. Resolução RDC nº. 53, de 15 de junho de 2000. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de mistura à base de farelo de cereais.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002a. Resolução RDC nº. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Política de Saúde. Organização Pan Americana da Saúde, 2002b. Guia alimentar para crianças menores de dois anos. Brasília: Ministério da Saúde.

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição, 2002c. Alimentos Regionais Brasileiros. Brasília: Ministério da Saúde, 140p.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. Resolução RDC nº. 130, de 26 de maio de 2003. Considera próprio para consumo humano o sal que contiver teor igual ou superior a 20 (vinte) miligramas até o limite máximo de 60 (sessenta) miligramas de iodo por quilograma de produto.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, 2004. Vitamina A Mais: Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A: Condutas Gerais / Brasília: Ministério da Saúde, 28 p.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005a. Resolução RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005b. Resolução RDC nº. 278, de 22 de setembro de 2005. Aprova as categorias de alimentos e embalagens dispensados e com obrigatoriedade de registro.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005c. Resolução RDC nº. 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos.
- Britton, G., 1995. Spectroscopy. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.). Carotenoids. Spectroscopy. Birkhauser, Basel.
- Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J., White, W.S., 2004. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 396–403.
- Castenmiller, J.J.M., West, C.E., 1998. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*.18, 19-38.
- Castenmiller, J.J.M., West, C.E., Linssen, J.P.H., van het Hof, K.H., Voragen, A.G.J., 1999. The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of β -carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J. Nutr.* 129, 349-355.
- Cavalcante, M.L., Rodriguez-Amaya, D.B., 1992. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In Charalambous, G. Food science and human nutrition. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 643-650.

- Chavez, A.L., Bedoya, J.M., Sánchez, T., Iglesias, C., Ceballos, H., Roca, W., 2000. Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves. *Food and Nutrition Bulletin*. 21, 410-413.
- Chung, H.Y., Rasmussen, H.M., Johnson, E.J., 2004. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J. Nutr.* 134, 1887–1893.
- CFN, Conselho Federal de Nutrição, 2007. CFN define posição sobre multimistura. Disponível em: <http://www.cfn.org.br>
- CGPAN, Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição, 2007. Programa Nacional de Suplementação de Vitamina A. Disponível em: www.saude.gov.br/nutricao.
- de Pee, S., West, C.E., 1996. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, S38-53.
- de Pee, S., West, C.E., Permaeshi, D., Martuti, S., Muhilal, Hautvast, J.A.A.J., 1998. Orange fruit is more effective than are dark-green, leafy vegetables in increasing serum concentrations of retinol and β -carotene in school-children in Indonesia. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1058-1067.
- Dawe, D., Robertson, R., Unnevehr, L., 2002. Golden rice: what role could it play in alleviation of vitamin A deficiency? *Food Policy*. 27, 541–560.
- Deming, D.M., Boileau, A.C., Lee, C.M., Erdman, J.W., 2000. Amount of dietary fat and type of soluble fiber independently modulate postabsorptive conversion of β -carotene to vitamin A in Mongolian gerbils. *J. Nutr.* 130, 2789–2796.
- Deming, D.M., Teixeira, S.R., Erdman, J.W., 2002. All-*trans*-carotene appears to be more bioavailable than 9-*cis* or 13-*cis*-carotene in gerbils given single oral doses of each isomer. *J. Nutr.* 132, 2700–2708.
- During, A., Nagao, A., Terao, J., 1998. β -carotene-15,15'-dioxygenase activity and cellular retinol-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestine. *J. Nutr.* 128, 1614-9.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Group, 1967. Requirements of vitamin A, thiamine, riboflavin and niacin. Geneva.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation, 1988. Requirements of Vitamin A, Iron, Folate, and Vitamin B12. Rome.

- FAO/WHO, Food Agriculture Organization of the United Nation and World Health Organization, 2004. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2000. Championing the cause of cassava. Disponível em: <http://www.fao.org/NEWS/2000/000405-e.htm>
- Furusho, T., Kataoka, E., Yasuhara, T., Wada, M., Masushige, S., 2000. Retinol equivalence of carotenoids can be evaluated by hepatic vitamin A content. *Int. J. Vitam. Nutr Res.* 70, 43-47.
- Fasuyi. A.O., 2005. Nutrient Composition and Processing Effects on Cassava Leaf (*Manihot esculenta*, Crantz) Antinutrients. *Pakistan Journal of Nutrition.* 4, 37-42.
- Geraldo, R.R.C., Paiva, S.A.R., Pitas, A.M.C.S., Godoy, I., Campana, A.O., 2003. Distribution of hipovitaminosis A in Brazil in the last four decades: dietary intake, clinical signs and biochemical data. *Rev. Nutr.*, 16, 443-460.
- Ghyselinck, N.B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C.B., Hakansson, H., Sauvant, P., Azais-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S., Chambon, P., 1999. Cellular retinol binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* 18, 4903-4914.
- Godoy, H.T., Rodriguez-Amaya, D.B., 1995a. Buriti (*Mauritia vinifera* Mart), uma fonte riquíssima de pró-vitamina A. *Arq. Biol. Tec.* 38,109-120.
- Godoy, H.T., Rodriguez-Amaya, D.B., 1995b. Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) *Arch. Latinoam. Nutr.* 45, 336-339.
- Graebner, I.T., Siqueira, E.M.A., Arruda, S.F., Souza, E.M.T., 2004. Carotenoids from native brazilian dark-green vegetables are bioavailable: a study in rats. *Nutr Res.* 24, 671-9.
- Granado, F., Olmedilla, B., Herrero, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco, I., Blázquez, S., 2006. Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: *in vivo* and *in vitro* assessment. *Experimental Biology and Medicine.* 231, 1733-1738.
- Gross, J., Ikan, R., Eckhardt, G., 1983. Carotenoids of the fruit of *Overrhoa carambola*. *Phytochemistry.* 22, 1479-1481.
- Gundersen, T.E., Blomhoff, R., 2001. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J. Chromatogr.* 935, 13-43.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. In: *Free radicals in biology and medicine.* 3rd ed. Oxford Univ. Press. Oxford.
- Handelman, G.J., 2001. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition* 17, 818-822.

- Harrison, E.H., 2005. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annual Review of Nutrition*. 25, 87-103.
- Harrison, E.H., Hussain, M.M., 2001. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J. Nutr.* 131, 1405–1408.
- Hartmann, S., Brors, O., Bock, J., Blomhoff, R., Bausch, J., Wiegand, U.W., Hartmann, D., Hornig, D.H., 2005. Exposure to retinyl esters, retinol, and retinoic acids in non-pregnant women following increasing single and repeated oral doses of vitamin A. *Ann. Nutr. Metab.* 49, 155-164.
- HarvestPlus, 2004. Desenvolvendo produtos agrícolas mais nutritivos. Disponível em: <http://www.harvestplus.org>
- HarvestPlus, 2006a. Mandioca biofortificada. Disponível em: <http://www.harvestplus.org>
- HarvestPlus, 2006b. Milho biofortificado. Disponível em: <http://www.harvestplus.org>
- HarvestPlus, 2006c. Batata-doce biofortificada. Disponível em: <http://www.harvestplus.org>
- Hoffmann, J., Linseisen, J., Reidl, J., Wolfram, G., 1999. Dietary fiber reduces the antioxidative effect of a carotenoid and alpha-tocopherol mixture on LDL oxidation *ex vivo* in humans. *Eur. J. Nutr.* 38, 278–85.
- Hu, X., Jandacek, R.J., White, W.S., 2000. Intestinal absorption of β -carotene ingested with a meal rich in sunflower oil or beef tallow: postprandial appearance in triacylglycerol-rich lipoproteins in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1170–1180.
- Humphrey, K.P., West, K.P., Sommer, A., 1992. Vitamin A deficiency and attributable mortality among under-5-year-olds. *Bulletin of the World Organization*. 70, 225-232.
- Institute Adolfo Lutz, 1976. Normas analíticas métodos químicos e físicos para análise em alimentos, 2nd ed. São Paulo, Brazil.
- IOM, Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Nova York, National Academy Press, 82-161.
- IVACG, International Vitamin A Consultive Group, 1999. The bioavailability of dietary carotenoids: current concepts. Disponível em: <http://ivacg.ilsa.org/>
- IVACG, International Vitamin A Consultive Group, 2004. Report of the XXII International Vitamin A consultative group meeting. Disponível em: <http://ivacg.ilsa.org/>
- Johnson, E.J., Qin, J., Krinsky, N.I., Russell, R.M., 1997. Ingestion by men of a combined dose of beta-carotene and lycopene does not affect the absorption of beta-carotene but improves that of lycopene. *J. Nutr.* 127, 1833-7.

- Khachik, F., Beecher, G.R., Lusby, W.R., 1989. Separation, identification and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, cantaloupe and pink grape fruit by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1465-1473.
- Khan, N.C., West, C.E., de Pee, S., Bosch, D., Phuong, H.D., Hulshof, P.J.M., Khoi, H.H., Verhoef, H., Hautvast, J.G.A.J., 2007. The contribution of plant foods to the vitamin A supply of lactating women in Vietnam: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition.* 85, 1112-1120.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt, K., Lederer, M.O., Breithaupt, D.E., von Lintig, J., 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276, 14110–14116.
- Kostic, D., White, W.S., Olson, J.A., 1995. Intestinal absorption, serum clearance and interactions between lutein and β -carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 604–610.
- Krinsky, N.I., 2001. Carotenoids as Antioxidants. *Nutrition* 17, 815-817.
- Lee, C.M., Boileau, A.C., Boileau, T.W.M., Williams, A.W., Swanson, K.S., Heintz, K.A., Erdman J.W., 1999. Review of animal models in carotenoid research. *J. Nutr.* 129, 2271-2277.
- Livny, O., Reifen, R., Levy, I., Madar, Z., Faulks, R., Southon, S., Schwartz, B., 2003. β -carotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. *European Journal of Nutrition.* 42, 338-45.
- Madruga, M.S., Camara, F.S., 2000. The chemical composition of Multimistura as a food supplement. *Food Chemistry* 68, 41-44.
- McLaren, D.S., Frigg, M., 2001. Sight and Life Manual on vitamin A deficiency disorders (VADD). Second Edition. Task Force Sight and Life, 176p.
- Mejia, L.A., Arroyave, G., 1982. The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *Am. J. Clin. Nutr.* 36, 87-93.
- Mercadante, A.Z., 1999. Chromatographic separation of carotenoids. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49, 52S-57S.
- Mercadante, A.Z., Britton, G., Rodriguez-Amaya, D.B., 1998a. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agri. Food Chem.* 46, 4102-4106.
- Mercadante, A.Z., Britton, G., Rodriguez-Amaya, D.B., 1998b. Effects of ripening, cultivar differences and processing on the carotenoids composition of mango. *J. Agri. Food Chem.* 46, 128-130.

- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., 1990. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. *Inst. J Food Sci Technol* 39, 1094-1097.
- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., 1991. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *J. Agri. Food Chem.* 39, 1094-1097.
- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., 2001. Confirmação da identidade da α -criptoxantina e da incidência de carotenóides minoritários pró-vitamínicos A em verduras folhosas verdes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 21, 216-222.
- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., Britton, G., 1997. HPLC and mass espectrofotometric analysis of carotenoids from mango. *J. Agri. Food Chem.* 45, 120-123.
- Monk, B.E., 1982. Metabolic carotenaemia. *Br. J. Dermatol.* 106, 485-8.
- Moritz, B., Tramonte, V.L.C., 2006. Biodisponibilidade do licopeno. *Rev. Nutr.* 19, 265-273.
- Mourão, D.M., Sales, N.S., Coelho, S.B., Pinheiro-Santana, H.M., 2005. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. *Rev. Nutr.* 18, 529-539.
- Muhilal, Permaesih, D., Idjradinata, Muherdiyantiningsih, Karyadi, D., 1988. Vitamin A fortified monosodium glutamate and health, growth and survival of children: a controlled field trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 1271-1276.
- Nagao, A., Maeda, M., Lim, B.P., Kobayashi, H., Terao, J., 2000. Inhibition of β -carotene-15,15-dioxygenase activity by dietary flavonoids. *J. Nutr. Biochem.* 11, 348-355.
- Napoli, J.L., 1999. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1440, 139-162.
- Nassar, N., Vizzotto, C.S., Schwartz, C.A., Pires, O.R.J., 2007. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. *Genet. Mol. Res.* 6, 116-121.
- NEPA, Núcleo de Estudos e Pesquisas em Nutrição, 2006. Tabela brasileira de composição de alimentos. 2ª Edição, 113p.
- Nestel, P., Nalubola, R., 2003a. β -carotene in fruits is more bioavailable than that in vegetables. International Life Sciences Institute. Disponível em: <http://ilsi.org/>
- Nestel, P., Nalubola, R., 2003b. Fortification of foods with vitamin A is a safe intervention. International Life Sciences Institute. Disponível em: <http://ilsi.org/>
- Nestel, P., Nalubola, R., 2003c. Breast Milk Can Provide Sufficient Vitamin A to Meet Requirements During the First 6 Months of Life. International Life Sciences Institute. Disponível em: <http://ilsi.org/>

- Neuhouser, M.L., Rock, C.L., Kristal, A.R., Patterson, R.E., Neumark-Sztainer, D., Cheskin, L.J., Thornquist, M.D., 2006. Olestra is associated with slight reductions in serum carotenoids but does not markedly influence serum fat-soluble vitamin concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 624–31.
- Ngudi, D.D., Kuo, Y.H., Lambein, F., 2003. Cassava cyanogens and free amino acids in raw and cooked leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 1193-1197.
- Niyogi, K.K., 2000. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 455–460.
- Oliver, J., Palou, A., 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr. A.* 881, 543-55.
- Olson, J.A., 1999a. Bioavailability of carotenoids. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49: 21S-25S.
- Olson, J.A., 1999b. Carotenoids. In: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. eds. *Modern nutrition in health and disease*, 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 525-541.
- Ortega-Flores, C.I., Penteado, M.V.C., 1992. Carotenóides com atividade pró-vitáminica A em cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Rev. Far. Bioquím.* 28, 51-60.
- Ortega-Flores, C.I., Costa, M.A.L., Cereda, M.P., Penteado, M.C.V., 2003. Biodisponibilidade do b-caroteno da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23, 473-477.
- Paetau, I., Chen, H., Goh, N.M.Y., White, W.S., 1997. Interactions in the postprandial appearance of β -carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol-rich lipoproteins in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 1133–1143.
- Paik, J., Vogel, S., Quadro, L., Piantadosi, R., Gottesman, M., Lai, K., Hamberger, L., Vieira, M.M., Blaner, W.S., 2004. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J. Nutr.* 134, 276S-280S.
- Parker, R.S., 1996. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J.* 10, 542-551.
- Penteado, M.V.C., Minazzi-Rodrigues, R.S., Almeida, L.B., 1986. Carotenóides e atividade pró-vitáminica A de folhas de hortaliças consumidas no Norte do Brasil. *Rev. Farm. Bioquím.* 22, 97-102.
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantadosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V., Gottesman, M.E., 1999. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol binding protein. *EMBO J.* 18, 4633-4644.

- Quadro, L., Hamberger, L., Colantuoni, V., Gottesman, M.E., Blaner, W.S., 2003. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med.* 24, 421-430.
- Ramalho, R.A., Saunders, C., 2000. O papel da educação nutricional no combate às carências nutricionais. *Rev. Nutr.*, 13, 11-16.
- Ramalho, R.A., Flores, H., Saunders, C., 2002. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. *Pan Am J Public Health* 12, 117-123.
- Ramalho, R.A., Saunders, C., Natalizi, D.A., Cardoso, L.O., Accioly, E., 2004. Níveis séricos de retinol em escolares de 7 a 17 anos no município do Rio de Janeiro. *Rev. Nutr.* 17: 461-468.
- Reboul, E., Thap, S., Tourniaire F., André, M., Juhel, C., Morange, S., Amiot, M.J., Lairon, D., Borel, P., 2007. Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *Br. J. Nutr.* 97, 440-6.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *Ad Hoc* Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123, 1939-1951.
- Ribaya-Mercado, J.D., Solon, F.S., Solon, M.A., Cabal-Barza, M.A., Perfecto, C.S., Tang, G., Solon, J.A.A., Fjeld, C.R., Russel, R.M., 2000. Bioconversion of plant carotenoids to vitamin A in Filipino school-aged children varies inversely with vitamin A status. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 455-65.
- Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J., Berger, A., Métaïron, S., Quaile, S., Piguet-Welsch, C., Sagalowicz, L., Green, H., Fay, L.B., 2004. Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of β -carotene and α -tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80,171–7.
- Riedl, J., Linseisen, J., Hoffmann, J., Wolfram, G., 1999. Some dietary fibers reduce the absorption of carotenoids in women. *J. Nutr.* 129, 2170–2176.
- Rigtruo, K.M., Ong, D., 1992. A retinyl ester hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of the rat small intestine. *Biochemistry.* 31, 2920-2926.
- Rigtruo, K.M., McEwen, L.R., Said, H.M., Ong, D.E., 1994. Retinyl ester hydrolytic activity associated with human intestinal brush border membranes. *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 111–116.

- Rock, C.L., Loalvo, H., Ementhiser, C. Ruffin, M.T., Flatt, S.W., Schwartz, S.J., 1998. Bioavailability of β -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J. Nutr.* 128, 913-916.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 1989. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *Journal of Micronutrient Analysis*, 5: 191-225.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 1996. Assessment of the provitamin A contents of foods: the brazilian experience. *Journal of Food Composition and Analysis*. 9, 196-230.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 1997. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. U.S. Agency for International Development, Washington, DC, p.93.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 1999a. Some physicochemical properties of carotenoids. In: Rodriguez-Amaya, D.B., eds *A guide to carotenoid analysis in foods*. Ed. ILSI Press, 14-22.
- Rodriguez-Amaya, D.B., 1999b. Latin american food sources of carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 49, 74S-84S.
- Roodenburg, A.J.C., Leenen, R., van het Hof, K.H., Weststrate, J.A., Tijburg, L.B.M., 2000. Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1187-93.
- Ross, A.C., 1999. Vitamin A and retinoids. In: Shills, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C., eds. *Modern nutrition in health and disease*, 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 305-327.
- Ross, A.C., Zolfaghari, R., 2004. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J. Nutr.* 134, 269S-275S.
- Ruel, M.T., 2001. *Can Food-Based Strategies Help Reduce Vitamin A and Iron Deficiencies? A Review of Recent Evidence*. International Food Policy Research Institute. Washington, D.C., 79p.
- Sandmann, G., 2001. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends in Plant Science*. 6, 14-17.
- Scott, C.E., Eldridge, A.L., 2005. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18, 551-559.
- Sharma, D.C., 2001. UN vitamin A campaign in India under fire. *The Lancet*, 358, 1791.
- Silveira, E.R., Moreno, F.S., 1998. Natural retinoids and β -carotene: From foods to their actions on gene expression. *J. Nutr. Biochem.* 9, 446-456.

- Simpson, R.L., 1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 43, 7-17.
- Siqueira, E.M.A., Azevedo, I.T., Arruda, S.F., Lima, S.M.D., Gonçalves, C.A., Souza, E.M.T., 2003. Regional low-cost diet supplement improves the nutritional status of school children in a semi-arid region of Brazil. *Nutrition Research*. 23, 703-712.
- Solon, F.S., Klemm, R.D.W., Sanchez, L., Darnton-Hill, I., Craft, N.E., Christian, P., West K.P.J., 2000. Efficacy of a vitamin A–fortified wheat-flour bun on the vitamin A status of Filipino schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 72, 738–44.
- Sommer, A., West, K.P., 1996. *Vitamin deficiency: health, survival, and vision*. New York: Oxford University Press.
- Stahl, W., Schwars, W., von Laar, J., Sies H., 1995. All-*trans* β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-*cis* geometrical isomer. *J Nutr.* 125, 2128-33.
- Stein, A.J., Meenakshi, J.V., Qaim, M., Nestel, P., Sachdev, H.P.S., Bhutta, Z.A., 2005. Analyzing the Health Benefits of Biofortified Staple Crops by Means of the Disability-Adjusted Life Years Approach: a Handbook Focusing on Iron, Zinc and Vitamin A. HarvestPlus Technical Monograph 4. Disponível em: <http://www.harvestplus.org>
- Tang, G., Gu, X., Hu, S., Xu, Q., Quin, J., Dolnikowski, G.G., Fjeld, C.R., Gao, X., Russel, R.M., Yin, S., 1999. Green and yellow vegetables can maintain body stores of vitamin A in Chinese children. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 1069-76.
- Tyssandier, V., Cardinault, N., Caris-Veyrat, C., Amiot, M.J., Grolier, P., Bouteloup, C., Azais-Braesco, V., Borel, P., 2002. Vegetable-borne lutein, lycopene, and β -carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 526–34.
- Tyssandier, V., Lyan, B., Borel, P., 2001. Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochim Biophys Acta.* 1533, 285-92.
- Unlu, N. Z.; Bohn, T., Clinton, S.K., Schwartz, S.J., 2005. Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil. *J. Nutr.* 135, 431–436.
- Unlu, N.Z., Bohn, T., Francis, D.M., Nagaraja, H.N., Clinton, S.K., Schwartz, S.J., 2007. Lycopene from heat-induced *cis*-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-*trans*-rich tomato sauce in human subjects. *Br. J. Nutr.* Mar 29, 1-7.

- van den Berg, H., van Vliet, T., 1998. Effect of simultaneous, single oral doses of β -carotene with lutein or lycopene on the β -carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 82–89.
- van het Hof, K.H., Brouwer, I.A., West, C.E., Haddeman, E., Steegers-Theunissen, R.P.M., van Dusseldorp, M., Weststrate, J.A., Eskes, T.K.A.B., Hautvast J.G.A.J., 1999. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 261-8.
- van het Hof, K.H., West, C.E., Weststrate, J.A., Hautvast J.G.A.J., 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J. Nutr.* 130, 503-506.
- Vítolo, M.R., Gama, C.M., Queiroz, S.S., Lopez, F.A., Colugnati, F.A.B., 2004. Retinol sérico de adolescentes de uma escola da cidade de São Paulo. *Rev. Nutr.*, 17:291-299.
- von Lintig, J., Vogt, K., 2000. Filling the gap in vitamin A research: Molecular identification of an enzyme cleaving β -carotene to retinal. *The Journal of Biological Chemistry.* 275, 11915–11920.
- Wald, G., 1968. Molecular basis of visual excitation. *Science*; 162, 230–239.
- Weststrate, J.A., van het Hof, K.H., 1995. Sucrose polyester and plasma carotenoid concentrations in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 591–7.
- White, W.L.B., McMahon, J.M., Sayre, R.T., 1994. Regulation of cyanogenesis in cassava. *Acta Horticulturae* 375, 69–85.
- Wolf, G., 1996. A history of vitamin A and retinoids. *FASEB Journal.* 10, 1102-7.
- WHO, World Health Organization Expert Group, 1982. Control of vitamin A deficiency and xerophthalmia. Tech Rep Ser n°. 672, Geneva.
- WHO, World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1993. WHO Food Additives Series 30. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Naturally Occurring Toxicants. Geneva.
- WHO, World Health Organization, 1995. Global prevalence of vitamin A deficiency: micronutrient deficiencies information system. Working paper no. 2. Geneva: WHO.
- WHO, World Health Organization, 1996. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva: WHO.
- WHO, World Health Organization, 2001. The optimal duration of exclusive breast-feeding: results of a WHO systematic review. Note for the Press n°. 7.

- Xueping, E., Zhang, L., Lu, J., Tso, P., Blaner, W.S., Levin, M.S., Li, E., 2002. Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II. *The Journal of Biological Chemistry*. 277, 36617–36623.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I., 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*. 287, 303-5.
- Yonekura, L., Nagao, A., 2007. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 107-115.
- Young, A., Britton, G., 1990. Carotenoids and stress. In Alscher, R.G., Cumming, J.R. (eds), *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. Plant Biology, vol 12. Wiley-Liss Inc, New York.
- Young, A.J., Lowe, G.M., 2001. Antioxidante and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 385, 20 – 27.
- Yuyama, L.K.O., Alencar, F.H., Marinho, H.A., Cozzolino, S.M.F., 2005. Vitamina A (retinol) e carotenóides. In: Cozzolino, S.M.F. *Biodisponibilidade de nutrientes*. Barueri, SP. Manole, 213-257.
- Zakaria-Rungkat, F., Djaelani, M., Setiana, Rumondange, E., Nurrochmah, 2000. Carotenoid bioavailability of vegetables and carbohydrate-containing foods measured by retinal accumulation in rat livers. *J. Food Compos. Anal.* 13, 297–310.
- Zancul, M.S., 2004. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. *Medicina*. 37, 45-50.
- Zanuttoa, M.E., Jordão, A.A., Vannucchi, H., 2003. Improvement in vitamin A status with consumption of dark-green vegetables – a bioavailability study in rabbits. *Nutrition Research*, 23, 271–278.
- Zaripheh, S., Erdman, J.W., 2002. Factors that influence the bioavailability of xanthophylls. *J. Nutr.* 132, 531S–534S.
- Ziegler, R.G., Mayne, S.T., Swanson, C.A., 1996. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control* 7, 157-177.

PARTE II

**β -caroteno da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) melhora o estado
nutricional de vitamina A em ratos**

**(Versão original em inglês publicada no *Comparative Biochemistry and Physiology*,
Volume 146C, Numbers 1-2 July/August 2007, 235–240).**

β -caroteno da folha de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) melhora o estado nutricional de vitamina A em ratos

Egle Machado de Almeida Siqueira, Sandra Fernandes Arruda, Rodrigo Martins de Vargas, Elizabeth Maria Talá de Souza.

Resumo

A biodisponibilidade do β -caroteno da folha de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) foi avaliada em ratos Wistar, deficientes em vitamina A, que foram separados em três grupos e tratados com uma dieta AIN-93G modificada da seguinte forma: 7.200 μg de β -caroteno sintético (Controle); ou 19,5 gramas de pó da folha de mandioca (Teste) por quilo de dieta, em substituição as necessidades de vitamina A; ou sem nenhuma fonte de vitamina A (Deficiente). O β -caroteno das folhas de mandioca promoveu um crescimento dos ratos e do peso dos tecidos similar ao β -caroteno sintético. A biodisponibilidade relativa, estimada por meio do Fator de Acúmulo de Retinol (RAF), foi de 16,5 e 27,5 para os grupos controle e teste, respectivamente. Isto significa que os grupos controle e teste deveriam ingerir 16,5 μg ou 27,5 μg de β -caroteno na forma sintética ou na forma do pó da folha de mandioca para cada 1 μg de retinol hepático armazenado, respectivamente. A biodisponibilidade do β -caroteno das folhas de mandioca foi menor do que a do β -caroteno sintético, provavelmente, devido ao fato do β -caroteno, na matriz das folhas, estar ligado a complexos protéicos ou dentro de organelas, que diminuem sua absorção. Nossos resultados demonstram que, além da recuperação do retinol hepático, o β -caroteno das folhas de mandioca foi capaz de manter o crescimento dos ratos e evitar sintomas de deficiência de vitamina A.

Palavras-chaves: biodisponibilidade, β -caroteno, carotenóides, mandioca, hortaliças verde-escuras, vitamina A.

1. Introdução

A raiz da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), um alimento relativamente desconhecido nos países desenvolvidos, é um importante tubérculo que fornece energia para milhões de pessoas nos países tropicais, onde foi considerada a quarta maior fonte de calorias de humanos, atrás do arroz, da cana-de-açúcar e do milho (FAO, 1995). As folhas da mandioca são, também, amplamente consumidas em algumas regiões da África, da Ásia e da América do Sul (Awoyinka 1995; Siqueira *et al.*, 2003) como uma fonte de proteínas, de minerais, de fibras, de vitaminas e de aminoácidos essenciais (Castellanos *et al.*, 1994; Madruga and Câmara, 2000). Tanto a raiz quanto as folhas da mandioca contêm glicosídeos cianogênicos; quando hidrolisados, durante o processo digestivo, produzem o ácido cianídrico que representa um risco sério de intoxicação, limitando o uso da mandioca (Rosling, 1994; Kamalu, 1995). No entanto, técnicas de processamento adequadas da mandioca, tais como maceração e cocção das preparações de raízes ou das folhas (Bokanga, 1994), reduzem significativamente os níveis de ácido cianídrico a limites seguros para o consumo humano (Ngudi *et al.*, 2003). As folhas de mandioca contêm altos teores de β -caroteno, quando comparadas a hortaliças como o espinafre e a couve, reconhecidas como importantes fontes de precursores de vitamina A. Apesar das inúmeras e indispensáveis funções que a vitamina A desenvolve no organismo, sua deficiência é um problema de saúde pública mundial, e nos países em desenvolvimento a situação é mais grave devido à coexistência de deficiências energéticas. Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, a folha de mandioca tem sido consumida como pratos típicos regionais e também como um suplemento alimentar na forma de pó misturado com outros subprodutos (farelo de cereais, casca de ovos em pó e semente de abóbora), conhecida como multimistura. A multimistura tem sido distribuída a populações de baixa renda, desde 1985, por organizações não-governamentais (Velho and Velho 2002), com o propósito de combater a desnutrição. A Unicef (2005) estima que pelo menos 15 milhões de brasileiros, cerca de 10% de toda a população, consomem o pó da folha de mandioca na multimistura, como um suplemento alimentar.

Apesar da rica composição de micronutrientes das folhas de mandioca (Madruga and Camara, 2000), a biodisponibilidade desses nutrientes é desconhecida. A menor biodisponibilidade dos carotenóides das hortaliças, em comparação às frutas ou formas sintéticas, tem sido amplamente relatada (Castenmiller and West, 1998). Os carotenóides parecem serem absorvidos pelos enterócitos das células do intestino delgado, via difusão

passiva, para então serem incorporados nos quilomícrons. A liberação do β -caroteno das matrizes alimentares é um passo inicial e importante no processo de absorção (Yeum and Russel, 2002; Faulks and Southon, 2005). Portanto, qualquer processamento de alimento como a maceração, empregada na produção do pó da folha de mandioca, pode aumentar a biodisponibilidade dos carotenóides dessas folhas. O objetivo do estudo foi investigar os potenciais benefícios dos carotenóides pró-vitamínicos A do pó da folha de mandioca, por meio da quantificação da efetividade do pó da folha de mandioca em relação ao β -caroteno sintético, em recuperar as reservas hepáticas de vitamina A após indução de deficiência de vitamina A, em ratos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Pó da Folha de Mandioca

As folhas de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) do Distrito Federal, Brasil, com seis a oito meses de plantio foram colhidas em agosto (inverno). As folhas foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% e foram deixadas para secar a sombra, em temperatura ambiente (28°C), por sete dias. O pó foi obtido após maceração das folhas secas. O pó foi misturado com a dieta padrão AIN-93G, em substituição aos requerimentos de vitamina A (4.000 UI/kg dieta).

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental do estudo foi baseado no método de depleção e repleção da vitamina A hepática de ratos, de acordo com o proposto por Furusho et al. (2000) e Zakaria-Rungkat et al. (2000) e modificado por Graebner et al. (2004). Resumidamente, vinte e três ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), recém desmamados (21 dias, pesando entre de 40 a 50 gramas) foram fornecidos pelo Biotério da Universidade de Brasília e distribuídos em gaiolas individuais com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo de luz:escuro de 12 horas. Os ratos receberam dieta AIN-93G (Reeves et al., 1993) modificada (os requerimentos de vitamina A foram substituídos por β -caroteno) entre 16h00min e 08h00min, com livre acesso à água. Após cinco dias, quatro ratos foram sacrificados para determinar o conteúdo basal de retinol hepático. Os outros ratos foram submetidos à dieta AIN-93G deficiente em vitamina A

por um período de 30 dias, para a depleção de suas reservas hepáticas de vitamina A (período de depleção). Ao final desse período, quatro ratos foram sacrificados para análise do seu teor hepático de vitamina A. Os ratos restantes foram então separados em três grupos (5 ratos/grupo) e tratados com dietas AIN-93-G modificadas, (por um período de 30 dias, período de repleção), onde a fonte de vitamina A foi: 7.200 µg de β-caroteno sintético / kg de dieta (grupo controle); 19,5 gramas de pó da folha de mandioca por quilo de dieta, o que correspondente a 7.200 µg de β-caroteno sintético / kg de dieta (grupo teste); ou nenhuma fonte de vitamina A (grupo deficientes). A quantidade de 7.200 µg de β-caroteno por kg de dieta foi encontrado após a conversão de 4.000 UI/ kg dieta (requerimentos de vitamina A de roedores de acordo com Reeves *et al.*, 1993) em µg de β-caroteno, usando o fator de 1,8. Após o período de repleção, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado foi extraído, lavado com solução salina 0,9%, limpos com toalhas de papel para remover o excesso de sangue e solução salina e foram pesados. Os fígados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido N₂ e armazenados a -70°C, até as análises. A quantidade de dieta ingerida e o ganho de peso foram monitorados diária e semanalmente, respectivamente. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Cuidados Animais da Universidade de Brasília, DF.

2.3 Análise das folhas de β-caroteno

Os carotenóides do pó da folha de mandioca foram extraídos e saponificados de acordo com Mercadante *et al.* (1997), sob atmosfera N₂ e separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando colunas C18 Vydac poliméricas, com metanol como a fase móvel a um fluxo de 1,5 ml / min. O β-caroteno foi identificado por meio do seu tempo de retenção a 450 nm, usando o β-caroteno sintético como padrão externo, e seu espectro foi obtido com um detector de arranjos de diiodo. A concentração do β-caroteno no pó da folha de mandioca foi determinada usando uma curva padrão obtida para o β-caroteno sintético, com a concentração calculada pelo coeficiente de extinção a 450 nm = 2.500. Todos os reagentes utilizados foram de grau CLAE adquiridos junto à Companhia Química Sigma. O β-caroteno sintético (pureza > 97%) foi adquirido junto à Fluka.

2.4 Determinação de retinol hepático

Uma amostra de 0,5 g de fígado foi homogeneizada e saponificada em 50 ml de etanol contendo 10 ml de 5,3 mol/L hidróxido de potássio (Instituto Adolfo Lutz, 1976). A mistura foi lavada em um funil de separação com éter de petróleo (4 vezes), lavada com água e filtrada sob sulfato de sódio, para remover a umidade residual. O extrato foi evaporado até secar e o resíduo dissolvido com éter de petróleo (2 ml). As análises de retinol foram realizadas de acordo com Furusho *et al.* (2000) utilizando as seguintes condições no CLAE: coluna Shim-park C₁₈ 25 cm CLC-ODS, fase móvel metanol/água (95:5) com fluxo de 1,5 ml/mim. O retinol foi identificado a 325 nm. A concentração de retinol hepático foi determinada usando a curva padrão obtida com retinol sintético, com concentração calculada pelo fator de extinção de 2.704 a 325 nm. Todos os reagentes utilizados foram de grau CLAE adquiridos junto à Sigma. O β-caroteno sintético foi adquirido, também, junto a Sigma

2.4.1 Determinação da biodisponibilidade

A biodisponibilidade do β-caroteno foi avaliada pelo Fator de Acúmulo de Retinol (RAF) durante o período de repleção, de acordo com Zakaria-Rungkat *et al.* (2000). O RAF foi calculado dividindo-se a ingestão de β-caroteno pelo total de retinol acumulado no fígado (LRA). A biodisponibilidade relativa foi determinada dividindo-se o RAF do grupo controle, que recebeu β-caroteno sintético, pelo RAF do grupo mandioca e multiplicando por 100.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão. Análises de variância (ANOVA) foram utilizadas para determinar diferenças entre os grupos tratamentos. Análises estatísticas foram realizadas para o ganho de peso, ingestão de β-caroteno da dieta e biodisponibilidade relativa. Diferenças associadas com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

3. Resultados

O principal carotenóide identificado no perfil cromatográfico, a partir do extrato de carotenóides do pó da folha de mandioca, foi o β-caroteno. Foram encontrados, também, menores porcentagens de outros carotenóides sem atividade pró-vitamina A, não identificados

nesse estudo. O conteúdo de 37 mg de β -caroteno por 100 gramas de pó da folha de mandioca foi calculado utilizando a curva padrão $y = 5e+06X+348698$, que mostrou um elevado coeficiente de correlação, $r^2 = 0,9953$ ($p < 0,0001$ por correlação de Pearson).

Ao final do período de depleção a concentração de retinol hepático dos ratos diminuiu significativamente de $22,8 \pm 3,4$ para $0,69 \pm 0,42$ μg de retinol por grama de fígado ($p < 0,0001$). Este resultado confirma a eficiência do período de depleção. Durante o período de repleção, o grupo deficiente apresentou uma ingestão de ração inferior ao grupo controle ($p = 0,004$) e ao grupo teste ($p = 0,036$). Os últimos dois grupos não demonstraram diferença na quantidade de ração ingerida, o que resultou em ingestão similar de β -caroteno (Tabela 1). Não houve diferença entre o ganho de peso médio dos ratos do grupo controle e mandioca; no entanto, o grupo deficiente demonstrou um ganho de peso inferior aos outros dois ($p = 0,001$; $p = 0,013$, respectivamente). Resultados similares foram observados quando foi comparado o peso médio dos fígados do grupo controle e teste, que não foram diferentes entre si; no entanto, o grupo deficiente apresentou pesos médios menores em relação aos outros dois grupos ($p = 0,005$ e $p = 0,03$, respectivamente). Esses resultados sugerem que a deficiência de vitamina A prejudica o desenvolvimento dos ratos e que os carotenóides do pó da folha de mandioca podem fornecer vitamina A suficiente para manter o crescimento dos ratos.

Tabela 1. Ganho de peso, ingestão de dieta e de β -caroteno durante o período de repleção, Acúmulo de Retinol Hepático (LRA), Fator de Acúmulo de Retinol (RAF) e peso dos fígados ao final do estudo.

*Dieta n=5	Ganho de peso (g)	Peso fígado (g)	Ingestão de dieta (g)	Ingestão de β -caroteno (I) (μg)	**LRA (μg)	**RAF (I / LRA)
Deficiente	$108,3 \pm 17,4^b$	$13,3 \pm 1,9^b$	$811,77 \pm 77,1^b$	-	< LD	-
Controle	$176,3 \pm 19,8^a$	$18,3 \pm 2,5^a$	$1008,9 \pm 74,9^a$	$7276,3 \pm 53,5^a$	$579,7 \pm 130,4^a$	$13,5 \pm 2,4^b$
Mandioca	$155,7 \pm 25,9^a$	$17,1 \pm 1,4^a$	$952,1 \pm 72,5^a$	$6854,7 \pm 52,3^a$	$259,2 \pm 24,2^b$	$27,5 \pm 3,2^a$

*Ratos previamente depletados em vitamina A foram alimentados da seguinte forma: dieta deficiente, AIN-93G sem vitamina A, dieta controle, AIN-93G com 7.200 μg de β -caroteno sintético e dieta com folha de mandioca, AIN-93G com folhas de mandioca como fonte de vitamina A.

** RAF = Fator de Acúmulo de Retinol, LRA = Acúmulo de Retinol Hepático

DL = limite de detecção do método para determinação de retinol

Valores em colunas com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Apesar da similaridade entre o peso corporal e dos órgãos dos ratos dos grupos controle e mandioca, o acúmulo de retinol hepático (LRA) variou significativamente entre esses grupos. Em fato, o LRA encontrado para o grupo controle foi duas vezes maior do que o valor encontrado para o grupo mandioca ($p = 0,001$).

A biodisponibilidade do β -caroteno sintético, expresso como o fator de acúmulo de retinol (RAF), foi significativamente maior que o β -caroteno das folhas de mandioca em pó (Tabela 1). Em outras palavras, os valores encontrados na Tabela 1 significam que 13,5 μ g de β -caroteno sintético produzem 1 mg de retinol hepático, enquanto 27,5 μ g de β -caroteno das folhas de mandioca em pó produzem 1 mg de retinol hepático, em ratos. Desta forma, quanto menor o valor de RAF, maior a biodisponibilidade. Assim, a biodisponibilidade relativa do β -caroteno das folhas de mandioca foi 49,1% da biodisponibilidade do β -caroteno sintético ($p = 0,0002$).

4. Discussão

Ratos têm sido utilizados exaustivamente para avaliar a eficiência da conversão do β -caroteno em vitamina A pelo monitoramento das alterações hepáticas de vitamina A (Mittal, 1983; Biesalski and Weiser, 1993; Grolier *et al.*, 1995; Furusho *et al.*, 2000). Diferentemente dos seres humanos, os ratos não absorvem β -caroteno intacto a não ser que presente, em níveis farmacológicos, na dieta (Grolier *et al.*, 1995; Barua and Olson, 2000). Com doses orais fisiológicas, o β -caroteno é completamente convertido em vitamina A pelos enterócitos dos ratos, resultando em retinóides, que são incorporados nos quilomícrons e secretados no sistema linfático para transporte até o sangue, onde eles são captados pelo fígado e armazenados (Yeum and Russel, 2002).

A mensuração direta das reservas hepáticas de vitamina A foi descrita como o método padrão-ouro para avaliar o estado nutricional de vitamina A (Tanumihardjo, 2004). Assim, esse indicador tem sido amplamente utilizado para avaliar a efetividade dos alimentos, na melhora do estado nutricional de vitamina A (Furusho *et al.*, 2000; Zakaria-Rungkat *et al.*, 2000; Howe and Tanumihardjo, 2006). Outros métodos, como isótopos radioativos e testes de dose resposta, têm sido validados em comparação com as reservas hepáticas, tanto em animais quanto em humanos (Tanumihardjo, 2004). Algumas considerações devem ser realizadas quando a mensuração do retinol plasmático é utilizada para avaliar o alimento como fonte de vitamina A, uma vez que as concentrações séricas de retinol são homeostaticamente controladas e não começam a diminuir até que as reservas de vitamina A estejam depletadas, levando a erros de interpretação dos dados.

No presente trabalho, apesar da baixa biodisponibilidade esperada do β -caroteno das folhas verde-escuras (Castenmiller and West, 1998; Graebner *et al.*, 2004), o β -caroteno do

pó da folha de mandioca aumentou as reservas hepáticas de retinol nos ratos deficientes em vitamina A.

O conteúdo de carotenóides dos vegetais é influenciado por vários fatores, tais como: as condições de cultivo, a variedade e a idade (Penteado *et al.*, 1986). O cozimento, a maceração, a secagem e outros processos resultam na ruptura das matrizes alimentares e na liberação dos carotenóides da matriz alimentar. Esses processos, embora aumentem a susceptibilidade dos carotenóides à oxidação, à degradação pela luz ou à hidrólise térmica, contribuem para aumentar a biodisponibilidade (Sungpuag *et al.*, 1999). No presente estudo, foi encontrado um conteúdo de $37 \pm 3,7$ μg de β -caroteno por 100 gramas de pó da folha de mandioca, que é o maior valor descrito na literatura. Estudos sobre as hortaliças, consumidas na região Norte do Brasil, realizados por Penteado *et al.* (1986), revelaram que lotes de folhas de mandioca coletadas em dezembro e maio apresentaram, em média, 15,1 e 10,8 μg de β -caroteno por 100 g de folhas, respectivamente. Enquanto Adewusi e Bradbury (1993), utilizando folhas de mandioca em diferentes estágios de desenvolvimento e cultivares, encontraram valores de 3 e 7,8 mg de β -caroteno por 100 gramas de folhas maduras frescas. Neste estudo, os processos de secagem e maceração aos quais as folhas de mandioca foram submetidas, durante a produção do pó, foram provavelmente responsáveis pelo aumento do conteúdo de β -caroteno do pó da folha de mandioca. Esses processos são muito convenientes. Primeiramente porque aumentam a ingestão de pró-vitamina A pelo pó da folha de mandioca, além da vantagem de melhorar a biodisponibilidade pela ruptura das matrizes das folhas de mandioca e, finalmente, porque esses processos têm sido indicados como um método efetivo para a redução do conteúdo de ácido cianídrico nas folhas de mandioca, que é um fator anti-nutricional (Aregheore and Agunblade, 1991; Eruvbetine *et al.*, 2003).

A mensuração da biodisponibilidade de carotenóides das folhas de mandioca não é um assunto trivial porque o uso desse vegetal é restrito às nações mais pobres e a pessoas com pouco acesso aos alimentos ou devido às dificuldades inerentes de analisar a eficiência da bioconversão. Na verdade, até o momento, existem somente duas publicações de estudos que utilizaram ratos para avaliar a biodisponibilidade do β -caroteno das folhas de mandioca, sendo que somente em um deles, a biodisponibilidade foi quantificada (Zakaria-Rungkat *et al.*, 2000; Ortega-Flores *et al.*, 2003). O pó da folha de mandioca tem sido utilizada a mais de 20 anos no Brasil por ONGs que distribuem o pó como um suplemento alimentar, em programas nutricionais, para populações de baixa renda, com o propósito de combater a desnutrição, principalmente entre crianças.

Neste estudo, ao final do período de repleção, os ratos deficientes ficaram irritáveis; desenvolveram infecções oculares, demonstraram um menor ganho de peso e as reservas de retinol hepática caíram drasticamente (inferior ao limite de detecção do método). Antes do período de repleção, os ratos deficientes dos três grupos não eram significativamente diferentes, e a presente investigação demonstrou um efeito significativo da ingestão das folhas de mandioca no fornecimento de vitamina A, de forma a restaurar o crescimento dos ratos e suprimir os sintomas de deficiência de vitamina A.

Os resultados, demonstrando que o peso corporal e dos órgãos dos ratos não foram afetados pela fonte de vitamina A, sugerem que as dietas experimentais têm o mesmo valor nutricional sem nenhum efeito adverso aparente do pó da folha de mandioca. Embora o total de retinol hepático acumulado (LRA) dos ratos alimentados com folhas de mandioca tenha sido menor do que o do grupo controle, provavelmente as concentrações plasmáticas de retinol foram iguais ao do grupo controle porque os sintomas de deficiência de vitamina A demonstrados pelos ratos deficientes em vitamina A não foram observados nos ratos alimentados com folhas de mandioca e, também, devido ao controle homeostático existente dos níveis séricos de vitamina A (Tanumihardjo, 2004).

Os grupos controle e teste apresentaram ingestões similares de β -caroteno, mas as análises hepáticas mostraram, claramente, um menor acúmulo de vitamina A no último grupo. Grolier *et al.* (1995) observaram que o conteúdo de vitamina A hepática depende tanto do veículo de suplementação, quanto do estado nutricional de vitamina A dos ratos. Esses autores verificaram que os níveis de retinol hepático são significativamente aumentados quando a suplementação é realizada por emulsão fina comparada a uma solução de óleo ou misturada a uma dieta. A emulsão fina também foi mais efetiva no aumento da taxa de crescimento dos ratos severamente deficientes em vitamina A, em relação aos ratos com deficiência moderada de vitamina A. No presente estudo, as diferenças entre as fontes de β -caroteno sintético ou da matriz das folhas de mandioca misturadas às rações dos ratos, foram refletidas na concentração de vitamina A hepática. Micozzi *et al.* (1992) demonstraram, também, um aumento de cinco vezes no β -caroteno plasmático em resposta à administração de β -caroteno em cápsulas versus a de uma preparação de cenouras em humanos.

Neste estudo, os grupos controle e mandioca receberam dietas com quantidades similares de energia, nutrientes e gordura; assim, a menor biodisponibilidade do β -caroteno do pó da folha de mandioca pode ser devido à forma como o β -caroteno está presente na matriz das folhas de mandioca. Geralmente, o β -caroteno é encontrado na matriz das folhas

como pigmentos protéicos (Faulks and Southon, 2005) localizados nos cloroplastos, que dificultam a liberação do β -caroteno no trato gastrointestinal. As folhas de mandioca, secas e trituradas, usadas no presente estudo, mostraram um valor médio de biodisponibilidade (RAF = 27) entre os valores encontrados por Zakaria-Rungkat *et al.* (2000) para as folhas de mandioca fervidas e as folhas de mandioca fervidas e cozidas (RAF = 35,5 e RAF = 16, respectivamente). Essas observações corroboram as afirmações de que a biodisponibilidade depende, também, do processamento do alimento que pode aumentar a liberação do nutriente no trato gastrointestinal.

Os enterócitos da mucosa intestinal são o principal local de conversão do β -caroteno em vitamina A. No entanto, em humanos e outros mamíferos, como cavalos e furões, cerca de 15% do β -caroteno pode ser encontrado na forma intacta no sangue e em outros tecidos tissues (van Vliet, 1996, Lee *et al.*, 1999). Em contraste, ratos são conversores extremamente eficientes de β -caroteno em vitamina A no enterócito (Ribaya-Mercado *et al.*, 1989 e 1992). Assim, devido ao fato dos ratos não absorverem carotenóides intactos, alguns autores não consideram esses animais os modelos mais apropriados para o estudo da biodisponibilidade de carotenóides (Lee *et al.*, 1999). No entanto, estudos comparativos de biodisponibilidade de carotenóides usando ratos são muito úteis para investigar os fatores dietéticos como a matriz alimentar, um dos passos mais críticos na absorção de carotenóides, e que, provavelmente, são similares em ratos e humanos. Além disso, a maior vantagem de se utilizar ratos é o curto período de tempo necessário para a depleção e repleção das reservas de vitamina A hepáticas (Lee *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, resíduos ou subprodutos agrícolas têm sido valorizados pela sua concentração elevada de nutrientes ou de componentes com potenciais nutracêuticos (Jariwalla, 2001). Em muitos países da África, tais como Congo, Zaire e Nigéria, entre outros, as folhas de mandioca são consumidas, como hortaliças, na dieta (Lutaladio, 1994; Awoyinka *et al.*, 1995). No Brasil, embora a folha de mandioca seja tradicionalmente utilizada em alguns pratos regionais e como um suplemento alimentar para crianças desnutridas, desde 1980, raros são os estudos que investigam o potencial nutritivo das suas folhas (Siqueira *et al.*, 2003).

Concluimos, no estudo, que o β -caroteno das folhas de mandioca foram efetivos na melhora do estado nutricional de vitamina A, em ratos deficientes. Foi capaz de restaurar o crescimento, impedir os sintomas de deficiência de vitamina A e, também, de aumentar as reservas hepáticas de retinol.

Apesar do interesse crescente sobre os componentes antioxidantes dos vegetais, como os carotenóides, devido ao seu potencial papel benéfico na prevenção de doenças crônicas, (Collins *et al.*, 1998; Sarada *et al.*, 2002; Arruda *et al.*, 2004a; Arruda *et al.*, 2005b) o presente protocolo teve o objetivo especial de estudar as folhas de mandioca como fonte de vitamina A, porque acreditamos que é necessário identificar fontes seguras, novas e de baixo custo para melhorar a ingestão de vitamina A pré-formada, como uma alternativa para populações carentes, que não consomem outras fontes de vitamina A. No entanto, é necessário enfatizar que, em qualquer estudo experimental com animais, incluindo o presente, as extrapolações dos resultados para o organismo humano devem ser vistas com cautela e necessitam de confirmação.

Referências

- Adewusi, S.R.A., Bradbury, J.H., 1993. Carotenoids in cassava: comparison of open-column and HPLC methods of analysis. *J. Sci. Food Agric.* 62, 375-383.
- Aregheore, E.M., Agunblade, B.S., 1991. The toxic effects of cassava diets on humans. A Review. *Vet. Hum Toxicol.* 33, 274-275.
- Arruda, S.F, Siqueira, E.M.A. Souza, E.M.T., 2004a. Malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) and purslane (*Portulaca oleracea*) leaves reduce oxidative stress in vitamin A-deficient rats. *Ann Nutr Metab.* 48, 288-295.
- Arruda, S.F, Siqueira, E.M.A. Souza, E.M.T., 2005b. Carotenoids from malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves protect cells against oxidative stress in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Research.* 75, 161-168.
- Awoyinka, A.F., Abegunde, V.O., Adewusi, S.R., 1995. Nutrient content of young cassava leaves and assessment of their acceptance as a green vegetable in Nigeria. *Plant Foods Hum Nutr.* 47, 21-28.
- Barua, A.B., Olson J.A., 2000. β -Carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo. *J. Nutr.* 130, 1996–2001, 2000.
- Biesalski, H. K. and Weiser, H., 1993. β -Carotene supplements cannot meet all vitamin A requirements of vitamin A-deficient rats. New York Academy of Science, New York, NY.
- Bokanga, M., 1994. Processing of cassava leaves for human consumption. *Acta Hort.* 375, 203-207.
- Castellanos, R., Altamirano, S.B., Moretti, R.H., 1994. Nutritional characteristics of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) leaf protein concentrates obtained by ultrafiltration and acidic thermocoagulation. *Plant Foods Hum. Nutr.* 45, 357-363.
- Castenmiller, J.J., West, C.E., 1998. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* 18, 19-38.
- Collins, A.R., Gedik, C.M., Olmedilla, B.A, Southon, S. Bellizzi, M., 1998. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J.* 12, 1397–1400
- Eruvbetine, D., Tajudeen, I.D., Adeosun, A.T., Olojede, A.A., 2003. Cassava (*Manihot esculenta*) leaf and tuber concentrate in diets for broiler chickens. *Bioresource Techn.* 86, 277-281.

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995. Plant production and protection papers available from: <http://www.fao.org/documents/show> (24/02/06)
- Unicef, 2005. Corporate Document available from: <http://www.unicef.org/brazil> (12/03/2005)
- Faulks, R.M., Southon, S., 2005. Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1740, 95-100
- Furusho, T., Kataoka, E., Yasuhara, T., Wada, M., Masushige, S., 2000. Retinol equivalence of carotenoids can be evaluated by hepatic vitamin A content. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70, 43-47.
- Graebner, I.T, Siqueira, E.M.A., Arruda, S. F., Souza, E. M.T., 2004. Carotenoids from native Brazilian dark-green vegetables are bioavailable: a study in rats. *Nutr. Res.* 24, 671-679.
- Grolier, P., Agoudavis, S. A., Azais-Braesco, V., 1995. Comparative bioavailability of diet oil and emulsion-based preparations of vitamin a and β -carotene in rat. *Nutr. Res.* 15, 1507-1516.
- Howe, J.A., Tanumihardjo, S.A., 2006. Carotenoid-biofortified maize maintains adequate vitamin a status in Mongolian gerbils. *J Nutr.* 136, 2562-7.
- Institute Adolfo Lutz, 1976. Analytic norms. The chemical and physical methods for food analysis (Normas analíticas métodos químicos e físicos para análise em alimentos). 2nd ed. São Paulo, Brazil.
- Jariwalla, R.J., 2001. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp. Clin. Res.* 27, 17-26.
- Kamalu, B.P., 1995. The adverse effects of long-term cassava (*Manihot esculenta Crantz*) consumption. *Int. J. Food Sci. Nut.* 46, 65-93.
- Lee, C.M., Boileau, A.C., Boileau, T.W.M., Williams, A.W., Swanson, K.S., Heintz, K.A., Erdman, J.W., 1999. Review of animal models in carotenoid research. *J. Nutr.* 129, 2271-2277.
- Lutaladio, N.B., 1994. Evaluation of cassava clones for leaf production in Zaire. In Terry, E.R., Doku, E.V., Arene, O.B., Mahungu, N.M. (Eds.), *Tropical Root crops: Production and uses*. Develop. Res. Centre, Ottawa, pp. 41-44.
- Madruga, M.S., Câmara, F.S., 2000. The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. *Food Chemistry.* 68, 41-44
- Mercadante, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B., Britton, G., 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 120-123.

- Micozzi, M.S., Brown, E.D., Edwards, B.K., Bieri, J.G., Taylor, P.R., Khachik, F., Beecher, G.R., Smith, J.C.Jr., 1992. Plasma carotenoid response to chronic intake of selected foods and β -carotene supplements in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 1120-1125.
- Mittal, P. C., 1983. β -Carotene utilization in rats fed either vitamin A or carotene in early life. *Nutr. Rep. Int.* 28: 181–188.
- Ngudi, D.D.; Kuo, Y-H., Lambein, F., 2003. Cassava cyanogens and free amino acids in raw and cooked leaves. *Food Chem Toxicol.* 41, 1193–1197.
- Ortega-Flores, Costa M.A.L., Cereda M.P., Penteado, M. V. C., 2003. Biodisponibilidade do β -caroteno da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta crantz*). *Ciênc.Tecnol.Aliment.* 23, 473-477.
- Penteado, M.V.C., Minazzi-Rodrigues, R.S.; Almeida, L.B., 1986. Carotenóides e atividade pró-vitamina A de folhas de hortaliças consumidas no norte do Brasil. *Rev. Farm.Bioquim.* 22, 97-102.
- Ribaya-Mercado, J.D., Holmgren, S.C., Fox, J.G., Russell, R.M., 1989. Dietary beta-carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. *J. Nutr.* 119, 665-668.
- Ribaya-Mercado, L.D., Fox, J.G, Rosenblad, W.D., Blanco, M.C., Russell R.M., 1992. Beta-carotene, retinol and retinyl ester concentrations in serum and selected tissues of ferrets fed beta-carotene. *J. Nutr.* 122, 1898-1903.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C. Jr., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123, 1939–1951.
- Rosling, H., 1994. Measuring effects in humans of dietary cyanide exposure from cassava. *Acta Hort.* 375, 271–283.
- Sarada, S.K.S., Dipti, P., Anju, B, Pauline, T., Kain, A.K., Saíram, M., Sharma, S.K., Ilavazhagan G., Devendra Kumar, Selvamurthy, W., 2002. Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. *J Ethnopharmacol.* 79, 149-153.
- Siqueira, E.M.A., Azevedo, I.T., Arruda, S.F., Lima, S.M.D., Alves, C.A.G., Souza, E.M.T., 2003. Regional low-cost diet supplement improves the nutritional status of school children in a semi-arid region of Brazil. *Nutr. Res.* 23, 703–712.
- Sungpuag, P., Tangehitpianvit, S., Chittchang, U., Wasantwisut, E., 1999. Retinol and beta carotene content of indigenous raw and home-prepared foods in Northern Thailand. *Food Chem.* 64, 162-167.

- Tanumihardjo, S.A., 2004. Assessing Vitamin A Status: Past, Present and Future. *J. Nutr.* 134, 290S–293S.
- van Vliet. T., 1996. Absorption of beta-carotene and other carotenoids in humans and animal models. *Euro. J. Clin. Nutr.* 50, 3, S32-37.
- Velho, L., Velho, P., 2002. Controversy on the use of alternative feeding in the undernutrition combat in Brazil. *História, Ciência, Saúde, Manguinhos, Rio de Janeiro, R.J.* 9,125-157.
- Yeum K.J.; Russell, R.M., 2002. Carotenoid Bioavailability and Bioconversion. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 483–504.
- Zakaria-Rungkat, F., Djaelani, M., Setiana, Rumondange E, Nurrochmah , 2000. Carotenoid bioavailability of vegetables and carbohydrate-containing foods measured by retinal accumulation in rat livers. *J Food Comp. Anal.* 13, 297–310.

Parte III

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

A eliminação da deficiência de vitamina A depende da combinação de uma série de estratégias, de curto e longo prazo, que garantam o atendimento às necessidades dos grupos de risco, nas áreas mais carentes, e o incentivo à diversificação alimentar como forma de aumentar a ingestão de alimentos ricos em vitamina A, pela população.

A identificação de espécies vegetais produzidas localmente, de baixo preço e elevada disponibilidade durante todo ano, que contenham quantidades apreciáveis de carotenóides pró-vitâmicos A, bem como o uso de técnicas simples de processamento desses alimentos, a fim de aumentar sua biodisponibilidade são ações que merecem um maior incentivo por parte da sociedade no combate à deficiência de vitamina A devido à sua sustentabilidade e efetividade.

A mandioca é uma cultura que atende a esses requisitos. O Brasil é um dos principais produtores mundiais dessa planta, que é capaz de crescer em solos pobres, que possui uma elevada resistência a doenças, à seca e a pragas e que apresenta flexibilidade quanto à época de colheita. Sua raiz é a principal fonte de energia para milhões de pessoas e as suas folhas são ricas em micronutrientes, apresentando uma quantidade elevada de β -caroteno.

O presente estudo demonstrou que as folhas de mandioca submetidas a processamentos simples de desidratação e trituração apresentam um elevado teor de β -caroteno, que é biodisponível e capaz de recuperar o estado nutricional de ratos deficientes em vitamina A. Outros estudos demonstraram, também, que esses tipos de processamentos reduzem significativamente as quantidades de ácido cianídrico nas folhas de mandioca.

Apesar de o presente estudo ter demonstrado uma elevada biodisponibilidade do β -caroteno do pó da folha de mandioca é importante ressaltar que a extrapolação dos resultados de estudos experimentais em animais para o organismo humano deve ser realizada com cautela e necessitam de confirmação.

Finalmente, é importante enfatizar que a seleção de alimentos é uma ação muito complexa e influenciada por muitos outros fatores, além do acesso aos alimentos e do conhecimento de nutrição. A disponibilidade de alimentos ricos em vitamina A não assegura uma adequação de vitamina A devido ao componente comportamental que determina a escolha dos alimentos. Assim, é imprescindível que as ações educativas, que visam modificar as práticas alimentares e a qualidade da dieta como estratégia de combate à carência de vitamina A, na população, levem esses fatos em consideração.