

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

CARISSA MICHELLE GOLTARA BICHARA

**Estudo *in vivo* de uma suplementação rica em
betacaroteno: biodisponibilidade e efeito antioxidativo no
plasma humano**

Belém ó PA
2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

CARISSA MICHELLE GOLTARA BICHARA

**Estudo *in vivo* de uma suplementação rica em
betacaroteno: biodisponibilidade e efeito antioxidativo no
plasma humano.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para obtenção do
grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

ORIENTADOR: Profº Dr. Hervé Rogez

**Belém ó PA
2007**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CARISSA MICHELLE GOLTARA BICHARA

**Estudo *in vivo* de uma suplementação rica em betacaroteno:
biodisponibilidade e efeito antioxidativo no plasma humano.**

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Hervé Rogez
(UFPA/CT/DEQAL ó Orientador)

Profº Dr. Alessandra Santos Lopes
(UFPA/CT/DEQAL ó Membro)

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
(UFPA /CCB/DEF - Membro)

Dedico este trabalho à minha família que tanto amo; meus pais Elisete e Walton e meus irmãos Débora e Junior.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por ter me dado forças para alcanças meus objetivos.

Agradeço eternamente ao meu orientador, Profº Hervé Rogez, pela orientação e por todas as oportunidades oferecidas todos esses anos de trabalho.

Ao Jesus e Evaldo, meus sinceros agradecimentos pela paciência e sempre disponibilidade em ajudar. Vocês foram essenciais no meu aprendizado e fazem parte desta conquista.

Aos meus pais, tão especiais na minha vida, que são meu alicerce. À minha irmã Débora a quem tanto admiro e meu irmão Walton pela amizade.

Ao meu namorado Judson, pelo amor e companheirismo em todos esses anos.

Ao Laboratório Dr. Paulo Azevedo, por ter cedido às dependências de seu laboratório para realização do trabalho.

À Lígia e Ruy Bentes, pela disponibilidade e auxílio na realização das análises.

À Majonave Navegação LTDA, em nome de Nelson, por todo apoio oferecido durante a realização deste trabalho.

À todos os 32 voluntários que participaram desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores do Pogal: Rosinelson Pena, Luíza Meller, Antônio Manoel, Alessandra Lopes, pela experiência e aprendizado.

Ao Darly, todas as palavras de agradecimentos serão insuficientes. Mesmo assim, aqui deixo meu muito, muito obrigada, por tudo; pelas conversas, brincadeiras e ajuda tão especial neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório que tanto me ajudaram. Obrigada Socorro, Antônio, Karina, Douglas, Carol, Priscila, Fagner, Rogério, Regi, Fábio, Lore, Anne, Camila, Evelyn, Ivonete, Jonas, Marília, Braz, Kleydson, Alonso, Paula, Leandro e Stéphano, valeu!

Meus agradecimentos especiais à Patrícia e Samuel, pela amizade, disposição e exímia ajuda em todos os momentos.

Aos amigos Adriano, Ana, Alessandra, Ju, Victor, Anderson, Diego, Wellington, Lícia, Heloísa pela amizade.

RESUMO

Os carotenóides são pigmentos naturais sintetizados pelas plantas e responsáveis pela cor de vários vegetais e frutos. São amplamente estudados por sua habilidade em prevenir doenças crônicas, devido sua elevada capacidade antioxidante *in vivo*. Este trabalho teve como objetivos estudar a biodisponibilidade do -caroteno presente no tucumã e avaliar os efeitos *in vivo* de uma suplementação diária. Realizou-se um estudo com 32 voluntários divididos em dois grupos: o grupo 1 (n=21) foi submetido a uma suplementação de 5 mg -caroteno/dia durante 52 dias e o grupo 2 (n=11) não fez ingestão do produto e foi denominado grupo controle. Foram realizadas cinco coletas sanguíneas, com intervalos de 13 dias. Parâmetros bioquímicos como o colesterol total (CT), HDL e LDL-colesterol, triglicerídeos (TG), glicose (GLI), fosfatase alcalina (FA) e Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) foram analisados enzimaticamente. A susceptibilidade oxidativa do plasma foi medida através do método TBARS e a capacidade antioxidante pelo método ORAC. Foi desenvolvida uma metodologia para a quantificação do -caroteno em amostras biológicas e polpa de tucumã. O estudo da biodisponibilidade do -caroteno mostrou uma baixa taxa de absorção e a maior disponibilidade deste composto no organismo 5 horas após a ingestão. No estudo da suplementação, foi observado um aumento significativo ($p<0,05$) na concentração de -caroteno no plasma do grupo 1 e uma diminuição significativa da formação de TBARS, mostrando assim a ação do -caroteno contra a oxidação em sistemas biológicos. O HDL do grupo 1 aumentou significativamente ($p<0,05$) durante os primeiros 28 dias de suplementação. A FA sofreu uma diminuição significativa ($p<0,05$) em ambos os grupos. Os valores ORAC não sofreram modificações significativas, assim como as concentrações de CT, LDL, TG, GLI e TGP. Esses resultados mostram o efeito benéfico do -caroteno em humanos, a curto prazo e baixas concentrações.

ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments synthesized by plants and responsible for many colors of various vegetables and fruits. Carotenoids attracted attention because their preventive effects against chronic diseases associated with their antioxidant activity. This study evaluated the bioavailability of β -carotene from tucumã fruits and the effects of a daily supplementation in vivo. 32 volunteers were divided in two groups: group 1 (n=21) received a supplementation of 5 mg β -carotene per day for 52 days and group 2 (n=11) did not have any supplementation and was denominated control group. It was realized 5 blood collections, with 13 days between them. Biochemical parameters such as cholesterol (CT), HDL and LDL, triglycerides (TG), blood glucose (GLU) alkaline phosphatase (AF), TGP were enzymatically analyzed. The plasma oxidability was measured by TBARS method and the antioxidant capacity was measured by ORAC method. A methodology for carotenoids quantification in matrix biological and foods was developed. The bioavailability study of the β -carotene from tucumã fruits showed a low absorption and greater availability 5 hours later the ingestion. In the supplementation study was observed a significantly increase ($p<0,05$) on the plasma β -carotene concentration in group 1 and a significantly decrease in the TBARS formation, showing the β -carotene action in biological systems. HDL was significantly higher in the supplemented group ($p<0,05$) during 28 days after the beginning of the study. AF significantly decrease ($p<0,05$) in both groups. The ORAC values did not change significantly, the same way CT concentration, LDL, TG, GLU and TGP did not. These results show the beneficial effects of β -carotene in humans in a short time and low concentration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Frutos do tucumã.....	16
FIGURA 2 - Estruturas químicas de alguns carotenóides encontrados na natureza.....	18
FIGURA 3 - Espectro de absorção visível do licopeno, -caroteno, -caroteno e -caroteno, em éter de petróleo.....	19
FIGURA 4 - Possível esquema para a degradação dos carotenóides.....	20
FIGURA 5 - Biodisponibilidade dos carotenóides em função da matriz alimentar.....	25
FIGURA 6 - Progressão natural da aterosclerose.....	28
FIGURA 7 - Fluxograma de obtenção da polpa de tucumã.....	30
FIGURA 8 - Coleta sanguínea.....	35
FIGURA 9 - Cromatograma do padrão de -caroteno, fase móvel metanol:THF (85:15 v/v), à 450 nm.....	44
FIGURA 10 - Espectro de absorção do padrão de -caroteno (C=0,5 g/L), variando de 200 a 600 nm, utilizando acetona como solvente.....	44
FIGURA 11 - Curva da concentração (mg/mL) vs área do pico obtida com o padrão de -caroteno à 450 nm.....	45
FIGURA 12 - Cromatograma de uma amostra de polpa de tucumã à 450 nm.....	46
FIGURA 13 - Cromatograma de uma amostra de plasma humano suplementado com polpa de tucumã à 450 nm.....	46
FIGURA 14 - Evolução da concentração de -caroteno no plasma (mol/L de plasma) em três voluntários após a ingestão de um suplemento rico em -caroteno.....	48
FIGURA 15 - Representação gráfica dos valores LDL-colesterol (mg/dL de plasma) nos voluntários suplementados com -caroteno	51
FIGURA 16 - Representação gráfica dos valores de HDL-colesterol (mg/dL de plasma) nos voluntários suplementados com o -caroteno	52
FIGURA 17 - Representação gráfica dos valores de fosfatase alcalina (mg/dL de plasma) dos voluntários em ambos os grupos.....	53
FIGURA 18 - Representação gráfica dos valores TBARS (nmolMDA/mg proteína) dos voluntários submetidos à suplementação com -caroteno.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais carotenóides no plasma humano e fontes dietéticas	21
TABELA 2 - Classes principais de lipoproteínas humanas e suas propriedades.....	24
TABELA 3 - Dieta dos voluntários no dia do experimento.	34
TABELA 4 - Caracterização física dos frutos de tucumã ^a	42
TABELA 5 - Caracterização físico-química da polpa de tucumã ^a	42
TABELA 6 - Repetibilidade dos tempos de retenção (T _R), superfície e altura dos picos de uma solução padrão de β -caroteno.....	45
TABELA 7 - Repetibilidade à partir de uma amostra de polpa de tucumã.....	47
TABELA 8 - Resultados das análises bioquímicas dos voluntários que foram submetidos à suplementação com β -caroteno durante 52 dias ^a	50
TABELA 9 - Resultados das análises bioquímicas dos voluntários do grupo controle durante 52 dias ^a	50
TABELA 10 -Concentração de β -caroteno ($\mu\text{mol/L}$) no plasma humano em ambos os grupos ^a ..	53
TABELA 11 - Concentração de MDA (nmolMDA/mg proteína) no plasma para ambos os grupos.....	55
TABELA 12 - Resultados da análise ORAC ($\mu\text{molET/L}$ plasma) para ambos os grupos ^a	56

LISTA DE ABREVIACÕES

AAPH: 2 ϕ -2 ϕ -Azobis 2-Amidino Propano Diodrocloreto

BCA: bicinchoninic acid (Ácido bicinconílico);

BSA: bovine serum albumin (Albumina Sérica Bovina);

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DCV: Doenças Cardiovasculares;

ET: Equivalente Trolox

FA: Fosfatase Alcalina

HDL: High density lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)

IMC: Índice de Massa Corporal

LDL: Low density lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)

MDA: Malonaldehyde bis (dimethyl acetal) (Malondialdeído bis dimetil acetal);

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorbância das espécies reativas ao Oxigênio)

PBS: Phosphate Buffered Saline (Solução Tampão Fosfato)

TBA: Acid thiobarbituric (Ácido tiobarbitúrico)

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico)

TCA: Trichloroacetic acid (Ácido tricloro-acético)

TROLOX: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromanol-2- ácido carboxílico (equivalente hidrosolúvel da vitamina E)

TGP: Transaminase Glutâmico Pirúvica

THF: Tetrahidrofurano

VLDL: Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS DA PESQUISA	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 A Amazônia como fonte de matérias-primas.....	15
3.2 Tucumâzeiro (<i>Astrocaryum aculeatum</i>).....	16
3.3 Os fitoquímicos.....	16
3.4 Os carotenóides.....	17
3.4.1 Generalidades.....	17
3.4.2 Estrutura dos carotenóides	17
3.4.3 Propriedades físico-químicas dos carotenóides	19
3.4.4 Fontes dietéticas.....	21
3.4.5 Ingestão diária recomendada (IDR).....	21
3.4.6 Extração, identificação e quantificação dos carotenóides em matrizes alimentares e biológicas.....	22
3.4.7 Absorção, metabolismo e transporte dos carotenóides	23
3.4.8 Biodisponibilidade dos carotenóides	24
3.5 Propriedades biológicas dos carotenóides - Atividade antioxidant.....	25
3.5.1 Os radicais livres	26
3.5.2 Ação dos carotenóides no organismo humano	27
3.5.3 Os antioxidantes e a aterosclerose	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Matéria-prima	30
4.2 Caracterização físico-química.....	31
4.2.1 Lipídeos	31
4.2.2 Umidade	31
4.2.3 Proteínas	31
4.2.4 Cinzas	31
4.2.5 Fibras Totais.....	31
4.2.6 Extração dos carotenos da polpa de tucumã	31
4.2.7 Saponificação do extrato de tucumã.....	32
4.3 Quantificação dos carotenóides	32
4.3.1 Procedimento cromatográfico	33
4.3.2 Detecção e quantificação.....	33
4.5 Estudo da biodisponibilidade dos carotenóides	34
4.5.1 Seleção dos voluntários	34
4.5.2 Coleta sanguínea e obtenção do plasma sanguíneo.....	34
4.5.3 Extração, identificação e quantificação de carotenóides em plasma humano	35
4.6 Estudo da funcionalidade dos carotenóides	36
4.6.1 Seleção dos voluntários	36

4.6.2 Coleta sanguínea.....	37
4.7 Análises realizadas sobre o plasma humano	38
4.7.1 Análises bioquímicas.....	38
4.7.2 Avaliação da susceptibilidade oxidativa pelo método TBARS.....	39
4.7.3 Avaliação da capacidade antioxidativa pelo método ORAC.....	40
4.8 Tratamento estatístico.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Caracterização físico-química dos frutos de tucumã.....	42
5.2 Validação do método cromatográfico	43
5.2.1 Seletividade e especificidade	43
5.2.2 Precisão do tempo de retenção e altura do pico.....	44
5.2.3 Linearidade e curva de calibração	45
5.2.4 Seletividade das amostras	46
5.2.5 Precisão	47
5.2.6 Determinação do teor de carotenóides na polpa de tucumã.....	47
5.3 Estudo da biodisponibilidade do -caroteno no plasma humano	48
5.4 Estudo da funcionalidade do -caroteno no plasma humano.....	49
5.4.1 Perfil dos voluntários.....	49
5.4.2 Análises bioquímicas.....	50
5.4.3 Avaliação da concentração do -caroteno no plasma humano	53
5.4.4 Avaliação da oxidabilidade do plasma pelo método <i>TBARS</i>	55
5.4.5 Análise da capacidade antioxidante do plasma pelo método <i>ORAC</i>	56
6. CONCLUSÃO	58
BIBLIOGRAFIA.....	59
ANEXOS.....	65

AVISO

Este trabalho intitulado **“Estudo *in vivo* de uma suplementação rica em betacaroteno: biodisponibilidade e efeito antioxidativo no plasma humano”** é contextualizado num contrato de prestação de serviços assinado entre a Universidade Federal do Pará, a Coca-Cola Services e a FADESP. As Cláusulas 1 - Definições e Interpretação, 10 - Responsabilidade, 11 - Confidencialidade e 13 - Propriedade Intelectual e Exploração deste contrato estipulam claramente que a propriedade intelectual decorrente deste trabalho é da empresa privada e que este texto ou qualquer parte deste não poderão ser divulgado ou reproduzido sem autorização prévia da mesma e antes do patenteamento do produto a ser eventualmente encaminhado pela empresa.

Por esse motivo, avisamos que todos os membros desta banca são explicitamente avisados destas cláusulas e de sua filiação direta com o Magnífico Reitor, Dr. Alex Fiúza de Melo, o qual assinou o contrato pela Contratada.

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose e o câncer constituem as principais doenças degenerativas nos países industrializados, sendo as principais causas de morte prematura (antes dos 65 anos). Essas patologias foram consideradas de etiologias multifatorais, envolvendo vários fatores ambientais e genéticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

A influência benéfica de muitos alimentos e bebidas na saúde humana, incluindo frutas, vegetais, chá, vinho tinto, entre outros, vem sendo bastante estudada. Este efeito pode ser atribuído à capacidade antioxidante, propriedade de muitas substâncias bioativas naturalmente presente nesses produtos. Os antioxidantes podem ajudar na prevenção de doenças por serem efetivos seqüestradores dos radicais livres, inibindo, portanto, os danos desencadeados por eles (STAHL; SIES, 2005).

No caso de doenças coronarianas, um dos principais fatores de risco para seu desenvolvimento é a oxidação das LDLs (lipoproteínas de baixa densidade) na parede arterial. Estudos comprovaram que os antioxidantes podem reduzir a oxidação dessas partículas e assim reduzir a formação das placas de ateromas (ARROL; MACKNESS; DURRINGTON, 2000).

A atenção está voltada para os antioxidantes lipossolúveis, tais como os carotenóides, entre eles o -caroteno e o licopeno, devido estarem presentes nas LDLs em quantidades que podem ser modificadas pela ingestão de alimentos ou suplementação oral (ARROL; MACKNESS; DURRINGTON, 2000).

Vários efeitos biológicos foram atribuídos aos carotenóides. Destaca-se sua elevada capacidade antioxidante, entretanto, outros mecanismos também contribuem para seu efeito benéfico no organismo humano. A concentração de carotenóides no plasma é considerada um importante biomarcador de uma dieta rica em frutas e vegetais (VOUTILAINEN et al. 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi conduzir um estudo de intervenção humana para avaliar os efeitos de uma suplementação rica em -caroteno, avaliando o aumento da concentração deste componente e a atividade antioxidante no plasma humano.

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos benéficos de uma suplementação diária de β -caroteno *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Determinação dos carotenóides na polpa de tucumã por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- II. Estudo da biodisponibilidade do β -caroteno no organismo humano.
- III. Avaliação do aumento da concentração e ação antioxidant do β -caroteno no plasma humano.
- IV. Avaliação do comportamento de parâmetros bioquímicos como o colesterol (total e frações) e triglicerídeos em função desta suplementação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Amazônia como fonte de matérias-primas

A bacia amazônica apresenta uma riqueza considerável em termos de recursos genéticos em plantas frutíferas e oleaginosas, cuja valorização constitui uma perspectiva importante para região. Entre os frutos provenientes do extrativismo são numerosos os que apresentam composições notáveis em micronutrientes e especialmente em antioxidantes. Assim, sua composição geralmente merece destaque, podendo posicionar-se como alimentos nutricionais e naturais perante os produtos sintéticos.

Os frutos e oleaginosos provenientes do extrativismo têm grande potencial, por várias razões. Sua exploração racional não coloca em risco o estoque de recursos. Provenientes da floresta, esses produtos estão carregados de valores novos, trazidos pela Amazônia e também por seus habitantes; têm uma imagem ecológicamente correta e, portanto encontram facilmente lugar em um mercado verde como o de produtos orgânicos.

Porém, o conhecimento dessas espécies e a caracterização de suas propriedades tecnológicas e nutricionais, em função de sua biodiversidade, ainda é um desafio importante para sua valorização. Sobre esses temas foram realizados poucos trabalhos (PALLET, 2002).

3.2 Tucumâzeiro (*Astrocaryum aculeatum*)

O tucumâzeiro é uma palmeira nativa do norte da América do Sul, possivelmente do estado do Pará. É uma palmeira que geralmente atinge 15 m de altura, a qual origina um fruto de alto valor nutritivo, o tucumã (SILVA; TASSARA, 2005).

Os frutos são amplamente comercializados no mercado local do Estado do Pará e possuem uma polpa comestível amarelada e oleaginosa (Figura 1) (CAVALCANTE, 1991).

A polpa é altamente nutritiva e extremamente rica em compostos pró-vitamina A. Durante a década de 70, dizia-se que o tucumã era o fruto encontrado na natureza que mais dispunha de vitamina A (SILVA; TASSARA, 2005). Esse fato se deve à elevada concentração de β -caroteno em sua polpa.



FIGURA 1 ó Frutos do tucumã.

3.3 Os fitoquímicos

Os alimentos vegetais contêm não apenas os principais nutrientes (isto é, proteínas, gorduras, carboidratos, fibra e micronutrientes, tais como vitaminas e minerais), como também grande número de compostos não nutrientes chamados fitoquímicos. Os fitoquímicos (da palavra grega *phyto*, que significa planta) são compostos químicos biologicamente ativos, de ocorrência natural em alimentos e vegetais. Nas plantas os fitoquímicos atuam como sistemas naturais de defesa, protegendo-as contra infecções e invasões microbianas, além de conferir à elas cor, sabor e aroma. Mais de 200 pigmentos de plantas são considerados fitoquímicos - como os flavonóides, carotenos e antocianinas (GRAIG, 1997).

Os fitoquímicos são temas de pesquisas científicas intensas enfocando a prevenção ou tratamento de doenças crônico-degenerativas, especialmente o câncer e as DCVs. Como proteção contra o câncer, as substâncias químicas à base de vegetais desintoxicam toxinas, carcinógenos e

mutágenos. Essas ações de desintoxicação possuem mecanismo de neutralização dos radicais livres, inibição de enzimas que ativam carcinógenos e indução de enzimas que desintoxicam carcinógenos. Em relação às doenças cardíacas, os fitoquímicos protegem as LDLs contra a oxidação, reduzindo a síntese ou absorção de colesterol e afetando a pressão sanguínea e a coagulação (LAMPE, 1999).

3.4 Os carotenóides

3.4.1 Generalidades

Os carotenóides são os pigmentos naturais mais comuns encontrados na natureza, mais de 600 diferentes compostos já caracterizados. O -caroteno é o mais amplamente distribuído (OLSON; KRINSKY, 1995).

Esses fitoquímicos são responsáveis por muitas cores de folhas, frutos e flores no reino vegetal, tais como vermelho, amarelo e laranja, assim como a cor de alguns pássaros, insetos, peixes e crustáceos. Somente as plantas, bactérias, fungos e algas podem sintetizar os carotenóides, porém, muitos animais incorporam esses compostos na alimentação (STAHL; SIES, 2003).

Estudos epidemiológicos têm revelado que um aumento no consumo de carotenóides na dieta está correlacionado com a diminuição do risco de muitas doenças degenerativas, incluindo vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares ou oftalmológicas (MAYNE, 1996; STAHL; SIES, 2005; ZHANG; OMAYE, 2001; WATZL et al., 2007). O efeito protetor tem sido associado à sua capacidade antioxidante, protegendo células e tecidos de danos oxidativos (STAHL; SIES, 1995).

3.4.2 Estrutura dos carotenóides

A maioria dos carotenóides é derivada de uma cadeia estrutural de 40 carbonos, a qual inclui um sistema de duplas ligações conjugadas. Em geral, os carotenóides podem ser classificados em dois grupos: *carotenos*, os quais apresentam em suas estruturas apenas átomos de carbono e hidrogênio e as *xantofílas*, as quais apresentam pelo menos um átomo de oxigênio.

Estruturalmente, os carotenóides podem ser encontrados na forma acíclica (p. ex. licopeno) ou conter um anel de cinco ou seis carbonos no final de uma ou das duas extremidades da molécula (p. ex. -caroteno). A Figura 2 exemplifica algumas estruturas de carotenos e

xantofilas comuns em alimentos (MÍNGUEZ-MOSQUERA; HONERO-MENDEZ; PEREZ-GÁLVEZ, 2002).

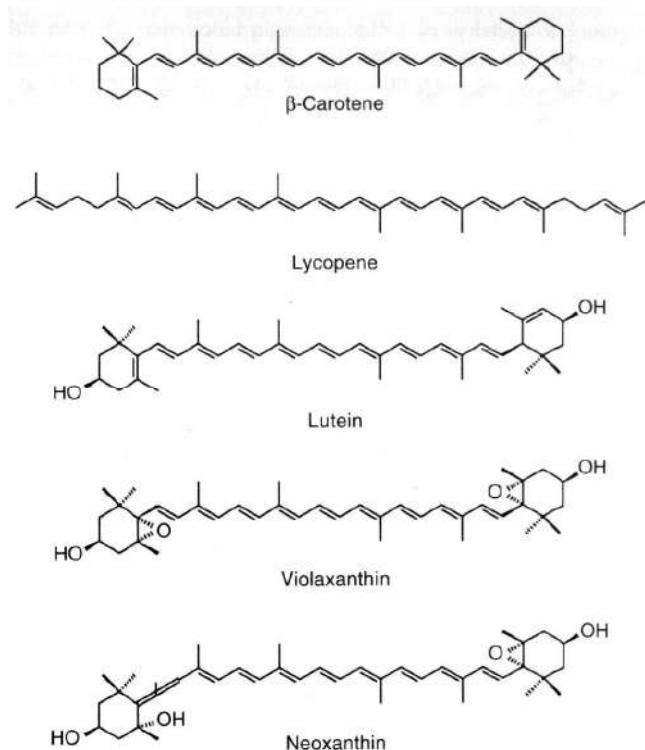


FIGURA 2 - Estruturas químicas de alguns carotenóides encontrados na natureza.

O padrão de duplas ligações conjugadas na cadeia principal dos carotenóides determina sua propriedade de absorção da luz e influencia na capacidade antioxidativa dos carotenóides. De acordo com o número de duplas ligações, muitas configurações *cis/trans* são possíveis para uma dada molécula. Os carotenóides tendem a isomerização e formam misturas de mono- e poli- *cis*-isômeros em adição à sua forma *all-trans*. Geralmente, a forma *all-trans* é predominante na natureza (MÍNGUEZ-MOSQUERA; HONERO-MENDEZ; PEREZ-GÁLVEZ, 2002).

Carotenóides são moléculas lipofílicas que tendem ao acúmulo em compartimentos lipofílicos, como as membranas ou lipoproteínas. A lipofilicidade desses compostos também influencia positivamente na sua absorção, transporte e excreção no organismo (STAHL; SIES, 1995).

3.4.3 Propriedades físico-químicas dos carotenóides

a) Solubilidade

Como dito anteriormente, os carotenóides são moléculas lipofílicas. São insolúveis em água e consequentemente, solúveis em solventes orgânicos, tais como acetona, álcool, éter etílico, clorofórmio e etil acetato. Carotenos são rapidamente solúveis em éter de petróleo, hexano e tolueno; xantofilas são melhor dissolvidas em metanol e etanol. A solubilidade de β -caroteno e luteína (xantofilas) mostrou ser excelente em tetrahidrofurano (CRAFT; SOARES, 1992).

b) Absorção da luz

O sistema de duplas ligações conjugadas constitui o cromóforo que permite a absorção da luz e dá aos carotenóides sua atrativa cor, permitindo também a absorção do espectro na região do visível que serve como base para sua identificação e quantificação.

O espectro ultravioleta e visível é a primeira ferramenta para a identificação dos carotenóides. O comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) e o formato do espectro são característicos do cromóforo e do solvente utilizado para sua diluição. A maioria dos carotenóides absorve em três comprimentos de onda, resultando num espectro de três picos (Figura 3) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

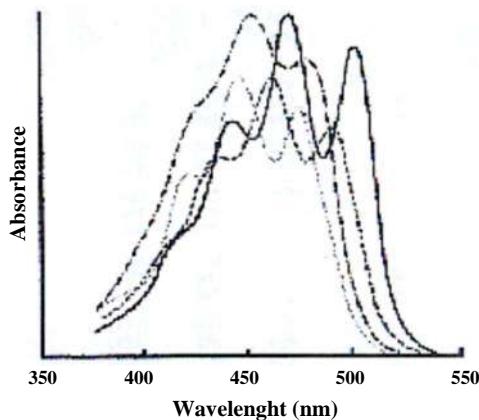


FIGURA 3 ó Espectro de absorção visível do licopeno (—), β -caroteno (- - -), α -caroteno (-.-.) e β -caroteno (....), em éter de petróleo.

Quanto maior o número de duplas ligações conjugadas, maior o valor do $\lambda_{\text{máx}}$. Assim, o licopeno, maior caroteno acíclico insaturado, com 11 duplas ligações conjugadas, é vermelho e absorve no maior comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$ a 444, 470 e 502 nm), conforme visualizado na Figura 3. São necessárias, pelo menos, 7 duplas ligações conjugadas para a percepção de cor dos carotenóides.

c) Isomerização e oxidação

A elevada insaturação dos carotenóides torna esses compostos susceptíveis à isomerização e oxidação. Calor, luz, ácidos e adsorção em superfícies ativas (p. ex. alumina) promovem a isomerização de *trans*-carotenóides, sua conformação usual, para a forma *cis*. Isso resulta em perdas de cor e atividade pró-vitamina A. A degradação oxidativa, a principal causa de perdas extensivas de carotenóides, é positivamente correlacionada a disponibilidade de oxigênio e a exposição à luz, enzimas oxidantes, metais de transição e co-oxidação com lipídeos hidroperóxidos. Carotenóides apresentam diferentes susceptibilidades à oxidação, a luteína e violaxantina sendo as mais lâbeis. A formação de epóxidos e apocarotenóides (carotenóides com menor cadeia carbônica) parecem ser o passo inicial (Figura 4).

A subseqüente fragmentação leva a uma série de compostos de baixo peso molecular similar àqueles produzidos na oxidação de ácidos graxos, cuja as perdas de cor e de atividade biológica são as consequências finais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

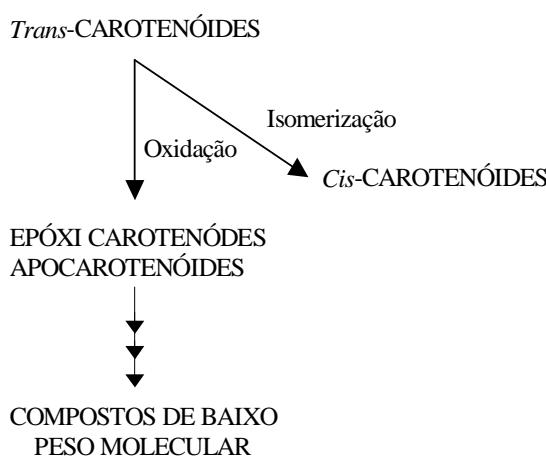


FIGURA 4 ó Possível esquema para a degradação dos carotenóides.

3.4.4 Fontes dietéticas

Devido ao grande número de carotenóides já identificados, estes foram divididos em três grupos de fontes alimentícias. Os carotenóides no primeiro grupo de vegetais e frutas contêm uma grande quantidade de xantofilas e carotenos, o qual inclui o grupo dos vegetais verdes, tais como brócolis, espinafre, feijão verde e ervilhas. A segunda categoria são as frutas de coloração vermelha/amarela e vegetais com uma distribuição mais homogênea de carotenóides que a primeira, incluindo a cenoura, o damasco e os tomates. Na terceira categoria estão a abóbora, laranja, ameixa e pêssegos, frutos amarelos/laranja e vegetais que contêm xantofilas esterificadas com ácidos graxos (HAROLD; FURR; CLARK, 1997). A Tabela 1 contém uma lista de carotenóides amplamente conhecidos, presentes no plasma humano e sua fonte dietética.

TABELA 1 6 Principais carotenóides no plasma humano e fontes dietéticas

Carotenóides	Fontes	Concentração plasma (mol/L)
-caroteno	Vegetais verdes folhosos, cenouras, abóboras, tomates, cenouras e frutas vermelhas e amarelas.	0,25-0,75
-caroteno	Vegetais verdes folhosos, cenouras, abóboras, milho, pimentas verdes.	0,05-0,2
Licopeno	Tomates e derivados.	0,27-1,00
-criptoxantina	Milho, pimentas verdes, limão, laranja.	0,2-0,45
Luteína	Vegetais verdes folhosos, milho, cenoura, pimentas verdes, tomates.	0,28-0,65
Zeaxantina	Milhos, pimentas verdes, pêssego, laranjas.	0,28-0,65

Fonte: HAROLD; FURR; CLARK (1997).

3.4.5 Ingestão diária recomendada (IDR)

A Ingestão Diária Recomendada ou *Recommended Dietary Allowance* (RDA) é a ingestão diária de nutriente que é suficiente para atender as necessidades nutricionais de quase todos (97 a 98%) os indivíduos saudáveis, de um determinado grupo de mesmo sexo e estágio de vida (estágio de vida considera idade e quando aplicável, gestação e lactação).

A IDR para o -caroteno tem sido expressa como parte da IDR para a vitamina A, a qual para o sexo masculino (>11 anos) é de 900 RE (*Retinol Equivalent*) ou 5,4 mg de -caroteno, enquanto para o sexo feminino (>11 anos) é ligeiramente inferior, 700 RE ou 4,8 mg de -caroteno (FOOD AND NUTRITION BOARD/ INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).

O comitê do Food and Nutrition Board/ Institute of Medicine (2001) dos Estados Unidos relata que o consumo diário de 3 a 6 mg de -caroteno mantém os níveis sanguíneos deste composto dentro de uma faixa associada com o menor risco de doenças crônicas. Uma dieta composta por cinco ou mais porções de frutas e vegetais por dia, incluindo vegetais verde-escuros e vegetais e/ou frutas amarelas permite uma adequada fonte de -caroteno e outros carotenóides.

3.4.6 Extração, identificação e quantificação dos carotenóides em matrizes alimentares e biológicas

a) Matrizes alimentares

Devido a complexa estrutura dos carotenóides e uma ampla variedade desses compostos em diversos frutos e vegetais, não há um metodologia de referência para os métodos analíticos. Para a extração desses compostos a partir de matrizes alimentares, numerosos solventes orgânicos são citados, dentre eles a acetona (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004), hexano (GANDUL-ROJAS; CEPERO; MÍNGUEZ-MOSQUERA, 1999; FRANÇA et al. 1999), etanol (HOWARD et al. 1999; MOROS et al. 2002), ou mistura deles, entre outros.

Dados na literatura citam um método consistindo de uma extração exaustiva com acetona, transferência a éter de petróleo/dietil em funil de separação, com adição de água; saponificação com volume igual de uma solução de KOH-MetOH (10%) à temperatura ambiente; lavagem e concentração em evaporador rotativo (temperatura abaixo de 35°C) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

O processo de saponificação é uma etapa realizada com o objetivo de simplificar a separação por remoção de substâncias, tais como as clorofilas e lipídios, que podem interferir na análise cromatográfica (MÍNGUEZ-MOSQUERA; HONERO-MENDEZ; PEREZ-GÁLVEZ, 2002).

b) Matrizes biológicas

Em geral, a extração dos carotenóides do plasma humano é realizada com um solvente orgânico e imiscível. O procedimento mais comum é, primeiramente, a desproteinização do plasma com etanol, seguido por extração com hexano (GUEGUEN et al. 2002; OLMEDILLA et al. 1997).

Prior et al. (2003) sugerem duas extrações com hexano (1:4v/v), para uma recuperação mais eficiente de antioxidantes lipofílicos em plasma humano.

As análises de carotenóides, tanto em amostras biológicas, como em matrizes, alimentares são realizadas basicamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A separação em fase reversa (*reverse phase-RP*) tem sido amplamente utilizada na determinação desses tipos de compostos, embora métodos em fase normal tem sido citados na literatura. Tanto sistemas isocráticos quanto a gradientes têm sido utilizados (QUIRO'S; COSTA, 2006).

Acetonitrila e metanol ou misturas deles são os principais solventes utilizados como fase móvel na determinação de carotenóides em HPLC. Entretanto, o metanol tem sido recomendado por alcançar uma recuperação melhor que a acetonitrila ou solventes baseados em acetonitrila (QUIRO'S; COSTA, 2006; EPLER; ZIEGLER; CRAFT, 1993).

3.4.7 Absorção, metabolismo e transporte dos carotenóides

Os carotenóides, por serem compostos lipofílicos, seguem o mesmo caminho de absorção de outros lipídeos na alimentação. Embora a eficiência na digestão e absorção dos lipídeos seja um pré-requisito para a absorção ótima dos carotenóides, sugere-se que os carotenóides apresentam fácil absorção.

Esse processo envolve vários passos, desde a quebra da matriz alimentar e liberação dos carotenóides, dispersão numa emulsão lipídica, solubilização em micelas com sais biliares, absorção passiva através da mucosa intestinal e sua incorporação nos quilomícrons (lipoproteínas constituídas principalmente de triglicerídeos) e consequente liberação para a corrente sanguínea (HAROLD; FURR; CLARK, 1997).

Na corrente sanguínea, os carotenóides são transportados juntamente com as lipoproteínas e distribuídos nos tecidos de maneira similar ao colesterol. O tecido adiposo é o depósito primário dos carotenóides, sendo encontrados também no fígado, pulmão e outros tecidos (OLSON, 1994).

As lipoproteínas são partículas complexas, contendo proteínas na sua membrana externa e são responsáveis pelo transporte dos lipídeos sanguíneos. Essas moléculas variam em tamanho, composição e densidade. As cinco classes de lipoproteínas ó quilomícrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) ó consistem de quantidades

variáveis de triglicerídeos, colesterol e proteínas, conforme pode ser observado na Tabela 2 (MAHAN; SCOTT-STUMP, 2005).

Cerca de 80% do β -caroteno e licopeno do plasma são transportados pelas LDLs. Já os carotenóides polares, tais como a luteína e a zeaxantina, são igualmente distribuídas entre as LDL e HDL (HAROLD; FURR; CLARK, 1997).

TABELA 2 Classes principais de lipoproteínas humanas e suas propriedades.

Lipoproteína	Densidade (g/mL)	Proteína	Fosfolipídeos	Composição		
				Colesterol livre	Ésteres de colesterol	Triglicerídeos
Quilomícrons	<1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	15	4

Fonte: NELSON; COX, 2002.

3.4.8 Biodisponibilidade dos carotenóides

A biodisponibilidade é definida como a fração de carotenóides ingerida que será disponível para o uso acima das condições fisiológicas normais ou de estocagem. Como mencionado antes, a assimilação dos carotenóides envolve sua absorção, transporte e metabolização (VAN HET HOF et al, 2000).

A biodisponibilidade dos carotenóides é determinada por muitos fatores, incluindo as espécies de carotenóides nos alimentos, a matriz a qual os carotenóides estão incorporados, a composição da dieta, entre outras (DE PEE; WEST, 1996). Muitas pesquisas mostram que o β -caroteno dissolvido em óleo ou dispersões é eficientemente absorvido (>50%), entretanto, carotenóides em vegetais não cozidos, como o β -caroteno em cenouras ou o licopeno em suco de tomate são pobramente absorvidos (<3%) (YEUM; RUSSELL, 2002; FAULKS; SOUTHON, 2005) (Figura 5).

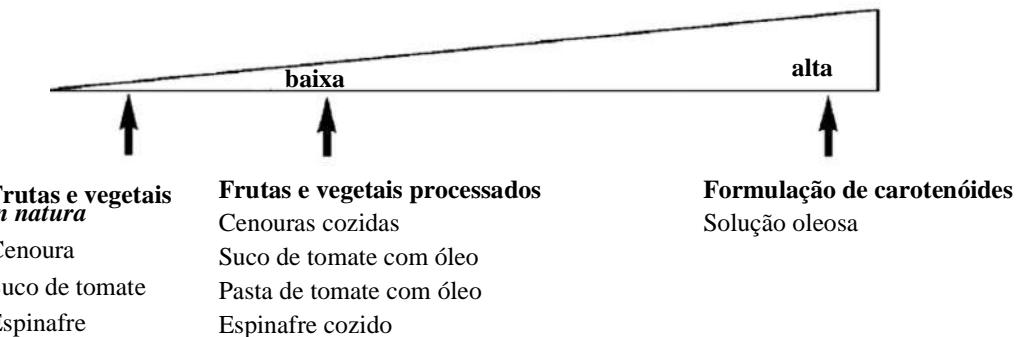


FIGURA 5 ó Biodisponibilidade dos carotenóides em função da matriz alimentar.

Apesar da descoberta de mais de 600 carotenóides na natureza, o perfil de dieta da população ocidental inclui somente 30 a 40, dos quais 13 compostos e 8 metabólitos foram detectados em tecidos humanos, embora o perfil específico é dependente de uma dieta individual (KHACHIK et al. 1991; KHACHIK et al. 1997). Assim, -caroteno, -caroteno, -criptoxantina, luteína, zeaxantina e licopeno são os principais constituintes, representando cerca de aproximadamente 90% do conteúdo de carotenóides no plasma humano (KHACHIK et al. 1997).

A medida da concentração de carotenóides no plasma em indivíduos mantidos em jejum é geralmente aceita como uma medida satisfatória de ingestão habitual. Para o monitoramento desses efeitos de intervenção na dieta ou suplementação a longo prazo, o perfil de carotenóides no plasma, medido através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), é adequado para avaliação do status ou para efeito de comparação de diferentes regimes (FAULKS; SOUTHON, 2005).

3.5 Propriedades biológicas dos carotenóides - Atividade antioxidante

Pesquisas mostram que os carotenóides presentes em frutas e vegetais são a principal fonte de vitamina A na alimentação, especialmente em países pobres onde a deficiência de vitamina A é um grande problema (OLSON, 1993; MAHAN; SCOTT-STUMP, 2005). O -caroteno é o principal composto com atividade pró-vitamina A (OLSON, 1993). Quando incorporada na dieta, essa molécula é quebrada em duas moléculas de retinol (vitamina A), por ação da enzima -caroteno-15,15 β -dioxigenase no intestino.

Entretanto, estudos recentes mostram que a atividade pró-vitamínica A dos carotenos não é a única contribuição desses compostos para a saúde. Numerosos estudos epidemiológicos

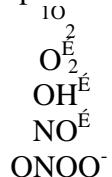
indicam que uma dieta rica em carotenóides está correlacionada com um menor risco de contrair certos tipos de câncer, doenças do coração, e outras importantes doenças humanas. A atenção atual está voltada para a ação do -caroteno como antioxidante e como pode interferir na oxidação dos radicais livres (peroxidação dos lipídeos), primeiro passo típico de muitas doenças degenerativas (MÍNGUEZ-MOSQUERA; HONERO-MENDEZ; PEREZ-GÁLVEZ, 2002).

3.5.1 Os radicais livres

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida excessivamente curta e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996).

Algumas espécies de radicais livres:



Oxigênio singlet
Radical superóxido
Radical hidroxila
Óxido Nítrico
Peroxinitrito

Radicais podem reagir com outras moléculas de várias formas. Assim, se dois radicais se encontram, eles podem combinar seus elétrons desemparelhados para formar um par de elétrons compartilhado, por exemplo, uma ligação covalente.



Equação 1

Entretanto, muitas moléculas biológicas não são radicais. Quando um radical cede e/ou recebe um elétron, pode transformar uma molécula em radical. Assim, a característica da reação de um radical livre com uma molécula não radical é usualmente uma reação em cadeia: um radical gera outro radical (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

A peroxidação lipídica é a reação em cadeia biológica mais relevante e mais conhecida no estudo dos radicais livres.



Equação 2

A peroxidação lipídica aparece como a maior contribuição no desenvolvimento da aterosclerose, como consequência do estresse oxidativo e injúrias na parede arterial. A detecção dos produtos finais da peroxidação lipídica é a evidência mais frequente da ação dos radicais livres nas doenças humanas (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). No Quadro 1 é possível visualizar os principais métodos para a determinação da peroxidação lipídica.

QUADRO 1 - Métodos utilizados para medir a peroxidação lipídica em sistemas biológicos.

Método	O que é medido	Marcadores
Teste TBA (<i>acid thiobarbituric</i>)	TBARS (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)	A amostra é aquecida a baixo pH e o cromóforo róseo resultante da reação MDA:TBA é medido por absorbância a 532nm ou por fluorescência a 553 nm. O cromóforo pode ser extraído com butanol. A maioria dos aldeídos que reagem com o TBA são derivados dos peróxidos e ác. graxos insaturados. É um método simples, porém requer controle rigoroso.
Dienos Conjugados	Estrutura-dienos conjugados	A oxidação de ác. graxos insaturados é acompanhada pelo aumento na absorbância no UV a 230-235 nm. Mais utilizado para as LDLs. Requer extração ou técnicas de separação específicas para fluidos biológicos. Grande sensibilidade, porém apresenta problemas quando usados em fluidos humanos.
Análise de Ácidos Graxos por HPLC	Perda de ácidos graxos insaturados	Muito utilizado para assessoramento da peroxidação lipídica estimulada por diferentes metais que promovem a formação de diferentes produtos.

Fonte: HALLIWELL; CHIRICO, 1993

3.5.2 Ação dos carotenóides no organismo humano

Dentre as várias estratégias defensivas do organismo humano contra os radicais livres, os carotenóides são provavelmente os mais envolvidos na captura de duas das espécies oxigenadas reativas: o oxigênio molecular singlet (1O_2) e os radicais peroxil. Assim, eles são desativadores eficientes de moléculas eletronicamente excitadas, que estão envolvidas na geração de radicais livres (YOUNG; LOWE, 2001).

O oxigênio singlet é extinto pelos carotenóides via reação química ou física. A via física envolve a transferência de energia excitada do 1O_2 para os carotenóides, resultando em um novo

estado de energia normal para o oxigênio, e o carotenóide se encontra em um estado excitado tripleto. Neste caso, o carotenóide retorna ao estado fundamental através da dissipação de energia de sua molécula. Assim, via método físico, os carotenóides continuam intactos e podem ser submetidos a ciclos de extinção do oxigênio singuleto (STAHL; SIES, 2003).

Carotenóides capturam eficientemente radicais peroxil, os quais são gerados nos processos de peroxidação lipídica, sendo que a captura dessas espécies interrompe a sequência de reações que levaria à danos nos compartimentos lipofílicos. Devido sua lipofilicidade e especificidade em seqüestrar os radicais peroxil, os carotenóides apresentam papel importante na proteção de membranas celulares e lipoproteínas contra os danos oxidativos (STAHL; SIES, 2003).

3.5.3 Os antioxidantes e a atherosclerose

A doença da artéria coronária (DAC) resulta do fluxo de sangue impedido na rede de vasos sanguíneos que circundam o coração e servem o miocárdio. A principal causa subjacente de DAC é a atherosclerose, que envolve alterações estruturais e compostionais na camada mais interna ou íntima das artérias (Figura 6) (MAHAN; SCOTT-STUMP, 2005).

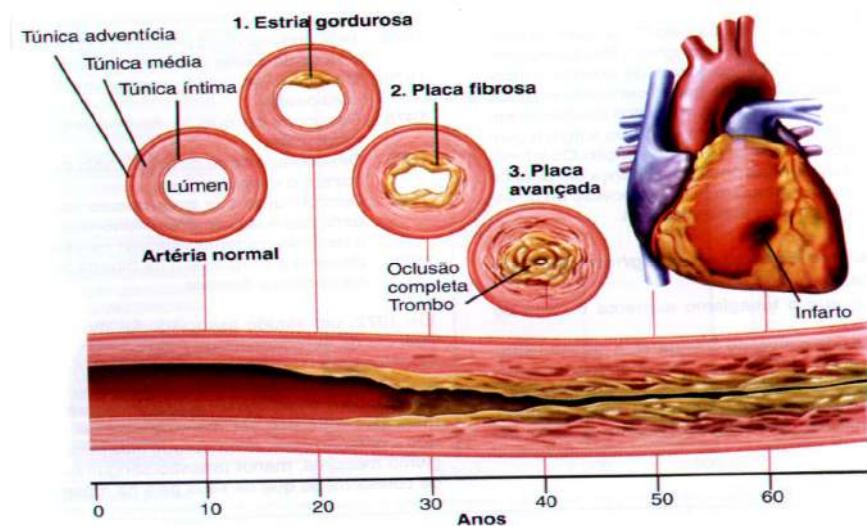


FIGURA 6 Progressão natural da atherosclerose (MAHAN; SCOTT-STUMP, 2005).

O processo da aterosclerose inicia-se na juventude e pode levar décadas para avançar. Agora se sabe que a patogênese da aterosclerose é multifatorial. As lesões que se desenvolvem são resultados de:

1. Proliferação de células de músculo liso, macrófagos e linfócitos (células envolvidas nas respostas inflamatórias);
2. Formação de células de músculo liso em uma matriz de tecido conjuntivo;
3. Acúmulo de lipídeos e colesterol na matriz ao redor das células. Os depósitos de lipídeos e outros materiais (produtos de eliminação celular, cálcio e fibrina), que constituem a camada íntima, são chamados de placa ou ateroma.

Os fatores de risco influenciam fortemente e aceleram a progressão para as lesões mais complicadas. As LDLs oxidadas são capturadas pelas células endoteliais e macrófagos na parede arterial, levando aos primeiros estágios da aterosclerose. Em razão dessa oxidação, os antioxidantes estão sendo estudados nas experiências clínicas que exploram a prevenção e o tratamento de DAC (MAHAN; SCOTT-STUMP, 2005).

Jialal et al. (1991) estudaram o efeito do -caroteno como constituinte de defesa das LDLs e demonstraram seu consumo durante a oxidação das LDLs e sua eficiência na inibição da oxidação.

Levy et al. (2000) encontraram um aumento significativo na fase lag (medida de resistência das partículas de LDLs à oxidação), após a ingestão de -caroteno durante 3 semanas, sugerindo uma menor susceptibilidade das LDLs à oxidação.

Vários estudos, tanto com animais como em seres humanos, têm demonstrado que a suplementação com -caroteno reduz a peroxidação lipídica *in vivo*, sendo estes ensaios comprovados por vários métodos, entre eles, o TBARS. Além disso, Allard et al. (1994) demonstraram que o -caroteno é capaz de aumentar a circulação do HDL-colesterol, conhecido como -bom colesterol-

Entretanto, estudos ainda são necessários, pois, muitos destes não demonstram sistematicamente efeitos benéficos da suplementação do -caroteno na oxidação das LDLs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

O tucumã foi a matéria-prima base deste estudo, devido ser um fruto regional de alto valor nutritivo, caracterizado pela elevada concentração em β -caroteno.

Os frutos foram adquiridos no mês de abril do ano de 2006, provenientes da cidade de Abaetetuba-PA. O material obtido foi levado para o Laboratório de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foram realizados os devidos procedimentos de recepção, lavagem dos frutos, despolpamento e armazenamento da polpa de tucumã.

Foi realizada uma caracterização física, onde foram selecionados 30 frutos de forma aleatória para a determinação da massa, comprimento e diâmetro, com auxílio de uma balança semi-eletrônica e paquímetro.

O despolpamento foi realizado de forma manual, com auxílio de facas, onde fez-se a separação da polpa e, conseqüentemente, a avaliação do rendimento. Retirou-se uma alíquota para a caracterização físico-química e, em seguida, efetuou-se o armazenamento da polpa em recipientes plásticos em refrigerador à 618°C.

O esquema de obtenção da polpa de tucumã pode ser visualizado na Figura 7.

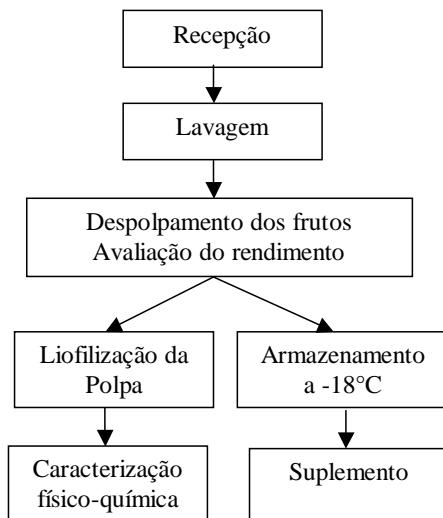


FIGURA 7 ó Fluxograma de obtenção da polpa de tucumã.

4.2 Caracterização físico-química

Na polpa dos frutos de tucumã foram realizadas análises de lipídeos, proteínas, umidade, cinzas, fibras e carotenos, conforme descrito abaixo.

4.2.1 Lipídeos

Os lipídeos foram extraídos e quantificados de acordo com o método AOCS Ba 3-38 (AOCS, 2002), utilizando-se o equipamento de soxhlet. Este método determina as substâncias lipídicas extraídas com hexano. O resultado foi expresso em porcentagem de matéria lipídica em base seca.

4.2.2 Umidade

O método determina umidade e materiais (substâncias) voláteis, expressos em porcentagem a partir da perda de peso da amostra. Para a determinação do teor de umidade, foi utilizado o método AOAC 931.04 (AOAC, 1997).

4.2.3 Proteínas

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método Kjedahl, método oficial descrito na AOAC 920.152 (AOAC, 1997), utilizando-se fator de multiplicação de 6,25 para a transformação deste em proteína.

4.2.4 Cinzas

A determinação das cinzas foi realizada em mufla a 550°C, segundo metodologia oficial AOAC 940.26 (AOAC, 1997).

4.2.5 Fibras Totais

A determinação das fibras totais foi realizada pelo método enzimático, segundo metodologia oficial AOAC 985.29 (AOAC, 1997).

4.2.6 Extração dos carotenos da polpa de tucumã

A metodologia de extração foi realizada segundo Minguéz-Mosquera e Hornero-Méndez (1993) e consistiu em pesar aproximadamente um grama de amostra, fazer uma extração com 50

mL de acetona, por aproximadamente 10 minutos, a temperatura ambiente, com auxílio de um homogeneizador magnético, seguido de filtração em filtro de vidro esmerilado. O resíduo foi novamente extraído com acetona e esta operação foi repetida até a completa exaustão da cor, ou seja, aproximadamente cinco extrações. Ao término da extração, fez-se a combinação dos extratos de cada etapa e completou-se para um volume de 250 mL com o solvente de extração.

O extrato foi transferido a um funil de decantação e tratado com éter etílico. Um volume suficiente de cloreto de sódio (10%) foi adicionado para separar as fases e transferir os pigmentos ao éter. Foi usado sulfato de sódio anidro para a remoção completa da água.

4.2.7 Saponificação do extrato de tucumã

Para a etapa de saponificação, foram adicionados 100 mL de uma solução de hidróxido de potássio/metanol (20%) e a amostra foi deixada em repouso, durante 1 hora, com agitação periódica. Depois a fase orgânica foi lavada várias vezes com água destilada até a neutralidade. O extrato foi então filtrado em leito contendo sulfato de sódio anidro e evaporado em evaporador rotativo a temperatura inferior à 35°C. Os pigmentos foram solubilizados em metanol e mantidos sob refrigeração para a análise cromatográfica.

4.3 Quantificação dos carotenóides

A quantificação dos carotenóides foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, conforme descrito por Koningas; Roomans (1997), que otimizaram uma metodologia para polpa de frutas e Pellegrini; Riso; Porrini (2000), trabalhando com carotenóides em plasma humano. Esta metodologia foi adaptada para a identificação e quantificação de βócaroteno em ambas as matrizes e aqui estarão descritas somente as condições otimizadas.

a) Reagentes

- É Acetona PA (Sigma, USA);
- É Água Milli-Q;
- É Tetrahidrofurano Grau HPLC (THF) (J.T. Baker, USA);
- É Metanol Grau HPLC (J.T. Baker, USA).
- É Padrão βócaroteno 97% pureza (Sigma, USA);

b) Equipamentos

- É HPLC Shimadzu LC10ATVP (Japão)
- É Detectores UV/visível Shimadzu SPD 10AV (Tókio, Japão)
- Filtros de porosidade 0.5 µm (Millipore).
- Evaporador rotativo QUIMIS 344.2 (São Paulo, Brasil)

4.3.1 Procedimento cromatográfico

Para a análise cromatográfica, foi utilizado um sistema isocrático, fase móvel metanol:THF (85:15 v/v), todos solventes com grau de pureza CLAE. As condições para todos os testes foram: cromatografia em fase-reversa, coluna C18 (SHIMADZU ODS 15 cm), fluxo de 1,0 mL/min, tempo de análise de 12 minutos e injeção de 20 µL de amostra.

Um detector ultravioleta/visível foi utilizado para a determinação do -caroteno, onde foi utilizado o comprimento de onda de 450 nm.

4.3.2 Detecção e quantificação

Para a elaboração da curva de calibração do padrão comercial de βócaroteno, foi utilizada uma solução estoque de 0,2g/L. A curva de calibração foi construída a partir de diluições consecutivas dessa solução (n=6), onde a faixa de concentração variou de 3,5 a 100 µg/mL. A concentração de -caroteno na polpa de tucumã e no plasma foi calculada usando a regressão linear $ax + b$ (concentração vs área).

Todas as análises foram realizadas em duplicata, com coeficiente de variação entre as amostras menor que 12%. Uma triplicata foi realizada no ponto central da curva de calibração.

4.5 Estudo da biodisponibilidade dos carotenóides

4.5.1 Seleção dos voluntários

Este estudo foi realizado com 3 pessoas do sexo masculino, com idade de 20 e 22 anos. Os voluntários foram orientados a realizar uma dieta pobre em carotenos na semana que antecedeu a pesquisa.

No dia da pesquisa, foi administrada uma dieta básica igual para todos os participantes, conforme mostrado na Tabela 3.

TABELA 3 Dieta dos voluntários no dia do experimento.

Refeição	Alimentação
Café da manhã	Pão com queijo e iogurte
Lanche	Pão com queijo e iogurte
Almoço	Arroz, feijão, macarrão e frango frito.
Lanche	Pão com queijo e iogurte
Café da manhã (dia seguinte)	Pão com queijo e iogurte.

Uma dose de suplemento à base de tucumã, com uma concentração de 25 mg de -caroteno, foi ingerida pelos voluntários após o café da manhã.

4.5.2 Coleta sanguínea e obtenção do plasma sanguíneo

Alíquotas de sangue (10 mL) foram coletadas nos tempos 0 (antes da ingestão) e 1, 3, 5, 7, 10 e 24 horas após a ingestão do suplemento de -caroteno. A coleta foi realizada por profissional capacitado em tubos a vácuo (BD vacutainer®-USA) contendo heparina sódica com auxílio de um escalpe, como mostrado na Figura 8.



FIGURA 8 ó Coleta sanguínea.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 5000 rpm, à 4°C, durante 5 minutos para a separação do plasma, o qual foi armazenado em tubos plásticos de 2 mL e estocados à -22°C até a realização das análises.

4.5.3 Extração, identificação e quantificação de carotenóides em plasma humano

a) Reagentes

- É n-Henano 95% (Tedia);
- É Água Milli-Q;
- Álcool Etílico Absoluto 99,3% (Quimex)

b) Equipamentos

- Centrífuga Refrigerada FANEN Excelsa 4, Modelo 280R (São Paulo, Brasil) ;
- É HPLC Shimadzu LC10ATVP ;
- É Detectores UV/visível Shimadzu SPD 10AV ;
- Estufa à vácuo QUIMIS Q819V2 (São Paulo, Brasil) ;
- Filtros de porosidade 0.5 µm (Millipore).
- Agitador de tubo Vortex Motion Logen Scientific

4.5.3.1 Extração dos compostos lipofílicos do plasma

A extração de carotenóides do plasma foi baseada na metodologia descrita por Pellegrini; Riso; Porrini (2000), com algumas modificações. 100 µL de plasma foram transferidos para um tubo de 2 mL e posterior adição de 100 µL de etanol e 100 µL de água para a precipitação das proteínas.

Essa mistura foi agitada em vortex e adicionou-se 600 µL de hexano para a extração dos compostos lipofílicos. Fez-se a agitação e centrifugação a 8000 rpm, à 4 °C durante 10 minutos. A camada de hexano foi removida e separada em outro tubo.

Um segundo volume de 600 µL de hexano foi adicionado ao tubo original, onde realizou-se o mesmo procedimento de extração. A camada de hexano foi novamente removida e combinada com o primeiro extrato.

Os extratos combinados foram centrifugados e uma alíquota de 1000 µL foi removida e evaporada em estufa à vácuo. O resíduo foi redissolvido em 200 µL da fase móvel metanol:THF (85:15 v/v).

4.5.3.2 Identificação e quantificação

A quantificação de -caroteno no plasma foi realizada através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, conforme descrito anteriormente.

4.6 Estudo da funcionalidade dos carotenóides

Este trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - CEP do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Os voluntários selecionados assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) onde foram informados de maneira clara e objetiva sobre o desenvolvimento do trabalho, assim como o livre arbítrio na participação da pesquisa.

4.6.1 Seleção dos voluntários

O estudo foi realizado com 32 pessoas do sexo masculino, com idade igual ou superior a 28 anos. Os voluntários foram subdivididos em dois grupos: grupo de estudo, o qual foi administrado o suplemento diariamente (n=21) e o grupo controle ou placebo (n=11).

Este estudo consistiu na ingestão diária de um suplemento contendo 5 mg de -caroteno, divididos em duas doses de 2,5 mg/d, durante um período de 52 dias.

Os voluntários do grupo de estudo foram selecionados de forma aleatória, na própria instituição (UFPA) onde responderam a um questionário de identificação e avaliação clínico-nutricional (Anexo 2). Foram escolhidos a participar da pesquisa os que atendiam aos seguintes critérios: ser do sexo masculino com idade igual ou superior a 28 anos; apresentar perfeita saúde física e mental; não alcoólatras ou praticantes de atividades físicas excessivas e não fazer uso de medicamentos que pudessem interferir nos resultados da pesquisa.

Para o grupo controle, realizou-se a seleção aleatória em uma indústria do setor madeireiro do município de Icoaraci (PA). Os critérios de seleção foram os mesmos do grupo anterior.

4.6.2 Coleta sanguínea

A coleta de sangue foi realizada no período da manhã, sendo necessário um jejum de, no mínimo, 10 horas. Foram realizadas 5 coletas, distribuídas da seguinte forma: a primeira antes da ingestão do suco, contabilizando o tempo zero e mais quatro coletas com tempo entre elas de 13 dias.

O sangue foi coletado em tubos à vácuo (BD vacutainer®-USA) contendo heparina sódica ou gel separador, com auxílio de material descartável, armazenado e levado para centrifugação para obtenção do plasma e soro, respectivamente.

O tubo contendo gel separador destinou-se às seguintes análises bioquímicas:

- Colesterol total;
- HDL e LDL-colesterol;
- Triglicerídeos;
- Glicose;
- Enzimas hepáticas (Fosfatase alcalina e Transaminase Glutâmica Pirúvica)

O plasma obtido dos tubos heparinizados foi destinado as seguintes análises:

- Quantificação de -caroteno por CLAE;
- Avaliação da capacidade antioxidante do plasma pelo método *ORAC*;
- Avaliação da peroxidação lipídica do plasma pelo método *TBARS*.

4.7 Análises realizadas sobre o plasma humano

4.7.1 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Paulo Azevedo (Belém-PA). Foram realizadas as análises de Colesterol Total (CT), suas frações HDL-colesterol e LDL-colesterol, Triglicerídeos (TG), Glicose, Fosfatase Alcalina (FA) e Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP/ALT) através de kits enzimáticos da marca Biosystems®.

Os resultados obtidos foram comparados com a referência da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Quadro 2).

QUADRO 2 Valores de referência CT, LDL-C, HDL-C e TG para adultos (>20 anos).

Parâmetros	Valores desejáveis	Valores limitrofes	Valores aumentados
	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Colesterol total	<200	200-239	>240
LDL-colesterol	<130	130-159	>160
HDL-colesterol	>40	-	-
Triglicerídeos	<150	150-200	>200

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001).

As análises de enzimas hepáticas são aplicadas para uma variedade de provas de sangue e assim averiguar o estado geral do fígado e do sistema biliar.

4.7.2 Avaliação da susceptibilidade oxidativa pelo método TBARS

A análise e o monitoramento da peroxidação de lipídeos é a base deste método que mede a quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico de uma mistura biológica, incluindo hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, que aumentam com o estresse oxidativo. O teste realizado no plasma é um protocolo adaptado por Yagi (1987) e é realizado através da reação do malonaldeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um aducto (MDA/TBA) que pode ser medido por fluorimetria.

a) Reagentes

- Ácido tricloro-acético (TCA) 15% (Fluka);
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (Sigma-Aldrich);
- Malondialdeído bis dimetil acetal (MDA) 99%; (Aldrich Chemical Company);
- Tampão fosfato 7,4 (PBS) (Sigma-Aldrich);
- 1-Butanol (Fluka);
- Hidróxido de sódio, NaOH 1 M (Cromato Produtos Químicos);

b) Equipamentos

- Fluorímetro Microplate Fluorescence Reader ó Bio-Tek Instruments (Winooski, USA);
- Espectrofotômetro à placas BIOTRAK (Cambridge, Inglaterra)
- Centrífuga Refrigerada FANEN Excelsa 4 Mod. 280R (São Paulo, Brasil);
- Estufa QUIMIS (São Paulo, Brasil);
- BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, USA);

4.7.2.1 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína do plasma foi realizada através do kit BCA Protein Assay Reagent. Este método é baseado na formação de um complexo proteína- Cu^{+2} , em condições alcalinas, seguida pela redução do Cu^{+2} a Cu^{+1} . A quantidade de redução é proporcional à quantidade de proteína presente. O ácido bicinconínico (BCA) forma um complexo colorido (roxo) com o Cu^{+1} , permitindo assim o monitoramento da reação de redução a uma absorbância máxima de 562 nm.

Em uma microplaca de espectrofotometria, 25 μ L de plasma diluído em PBS foi adicionado, juntamente com 225 μ L de uma solução reagente AB, contendo o BCA e sulfato cíprico à 4%. A placa foi aquecida à 37°C durante 30 minutos e em seguida, a medida da absorbância realizada em espectrofotômetro à 562 nm.

Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração. Assim, as amostras de plasma para a dosagem dos TBARS foram padronizadas a uma concentração final de 10 mg de proteína/L de plasma.

4.7.2.2 Dosagem TBARS

Em uma microplaca de fluorometria branca, injetou- se 30 μ L de plasma diluído em PBS, 24 μ L de TCA e 48 μ L de TBA. A microplaca foi coberta por uma capa de polietileno para evitar a evaporação, e colocada em estufa a 95°C, durante 30 minutos.

Após resfriamento, adicionou- se 100 μ L de butanol e misturou-se bem com as ponteiras da micropipeta para uma maior eficiência na extração dos produtos da reação. A microplaca foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos e a leitura da absorbância realizada em fluorímetro (Excitação : 515 nm e Emissão : 555 nm).

A concentração é determinada através da curva de calibração do MDA e expresso em nmol MDA/mg proteína.

4.7.3 Avaliação da capacidade antioxidativa pelo método ORAC

Foi determinada a atividade antioxidante dos extratos lipofílicos do plasma, extraídos conforme descrito anteriormente. O método utilizado baseia-se na medida da diminuição da concentração de um substrato oxidável, a fluoresceína, ao longo do tempo por fluorescência, proposto por Huang et al. (2002) e adaptada por Silva et al. (2006) e Sampaio (2006).

a) Reagentes

- AAPH (0,97%) 0,1528 M (Sigma-Aldrich);
- Fluoresceína de sódio 0,444 mM (Sigma-Aldrich);
- Trolox (Sigma-Aldrich);
- $\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 necessários a preparação do tampão fosfato pH=7,4 a 75 mM (Synth).

b) Equipamentos

- Centrifuga Refrigerada FANEN Excelsa 4, Modelo 280R (São Paulo, Brasil);
- Fluorímetro : Microplate Fluorescence Reader ó Bio-Tek Instruments, (Winoosk USA);
- pH metro MARCONI.

O protocolo consistiu na adição de 20 L de extrato lipofílico diluído em acetona e 150 L de fluoresceína. A placa foi incubada durante 15 minutos a 37°C. A leitura inicia após a injeção automática de 25 L de AAPH. Tampão fosfato pH=7,4 foi usado como branco e o Trolox como padrão. Uma vez os reagentes misturados, a diminuição da fluorescência foi acompanhada durante 50 minutos por leituras com intervalos de 1 minuto (excitação=485nm; emissão= 520 nm). Se após 50 minutos a fluorescência não fosse inferior a 5% do valor inicial, a amostra era rediluída e a análise repetida.

O resultado foi expresso como equivalente em Trolox por litro de plasma ($\mu\text{molET/L}$ plasma).

4.8 Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os efeitos da suplementação com o -caroteno nos dois grupos foram comparados usando um Test t de Student. Os valores $p<0,05$ foram considerados significativos. O tratamento estatístico foi realizado com auxílio do *software* STATISTIC Release 5.1 para Windows 2000 (StatSoft, Inc., Oklahoma, Estados Unidos).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química dos frutos de tucumã

Os frutos de tucumã obtidos apresentavam elevado grau de maturação, com cor e cheiros característicos. Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos na caracterização física dos frutos de tucumã (n=30).

TABELA 4 Caracterização física dos frutos de tucumã^a.

Parâmetros analisados					
Massa (g)	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Casca (%)	Semente (%)	Polpa (%)
Frutos de tucumã	28,60 ±6,2	41,48±3,35	33,55±2,78	16,2	42,7

^a média±desvio padrão

O rendimento do processo de descascamento manual dos frutos foi de aproximadamente 41% em polpa. A relação semente/polpa não é elevada, o que caracteriza os frutos de tucumã com elevado teor em polpa comestível; diferentemente de outras frutas oleaginosas amazônicas, como o patauá, por exemplo, apresentando 18,1% de polpa e 64,66% de semente (Rodrigues et al. 2006).

Na Tabela 5 é possível observar os valores obtidos na caracterização físico-química da polpa do tucumã.

TABELA 5 Caracterização físico-química da polpa de tucumã^a.

	Matéria Seca (%)	Lipídeos (% b.s.) ^b	Proteínas (% b.s.) ^b	Fibras (% b.s.) ^b	Cinzas (% b.s.) ^b
Polpa de tucumã	53,26 ±0,52	40,40 ±0,36	4,42 ±0,03	15,76 ±0,30	2,34 ±0,06

^a média±desvio padrão

^b b.s. base seca

A polpa de tucumã apresentou um alto conteúdo de matéria seca (53,26%), o que torna a polpa pastosa e muito viscosa.

O teor de lipídeos da polpa foi de 40,4% b.s. Essa porcentagem é semelhante ao encontrado por Rodrigues et al. (2006) quando avaliaram oleaginosas amazônicas, como o Inajá, Mari e Patauá, encontrando teores de 36,31, 31,47 e 42,48%, respectivamente.

A polpa apresentou um teor em proteínas de 4,42% b.s. semelhante ao encontrado por Rodrigues et al. (2006) para os frutos de Inajá e Mari, os quais foram 3,56 e 6,57%, respectivamente. O teor de fibras e cinzas foi de 15,76 e 2,34% b.s., respectivamente.

5.2 Validação do método cromatográfico

O processo de validação dos métodos analíticos tem por objetivo demonstrar que o método é perfeitamente adaptável ao objetivo da análise. A validação inclui o entendimento do método, as características da performance do método e seus limites de aceitação. Abaixo estão descritos alguns parâmetros importantes no desenvolvimento de uma metodologia cromatográfica (SOUZA, 2000; RIBANI et al. 2004).

- Seletividade/especificidade (otimização da separação e detecção de padrões e das amostras em estudo);
- Precisão dos tempos de retenção e das alturas e/ou superfície dos picos;
- Teste de linearidade;
- Limites de detecção e quantificação;
- Precisão e repetibilidade de amostras em diferentes concentrações.

5.2.1 Seletividade e especificidade

Os termos “seletividade” e “especificidade” são comumente utilizados com o mesmo sentido. O termo especificidade, geralmente faz referência a um método que produz uma resposta para um só componente. O termo seletividade faz referência ao método que fornece a resposta para vários compostos químicos que podem ou não ser distinguidos. Se a resposta for distinguida de todas as outras respostas, o método é dito seletivo. Como há poucos métodos que respondem à apenas um analito, o termo seletividade é habitualmente mais apropriado.

A seletividade na cromatografia líquida é obtida alcançando as condições ótimas, após a realização de diferentes testes, tais como a composição da fase móvel, a temperatura da coluna e o comprimento de onda ideal do composto.

A Figura 9 ilustra um cromatograma de uma solução padrão de β -caroteno, onde observa-se uma boa definição da linha de base, assim como uma boa seletividade do composto em estudo.

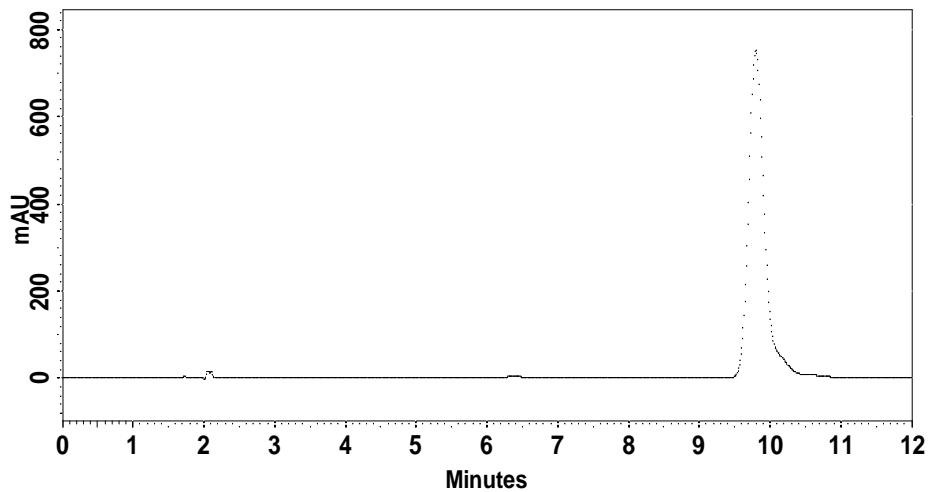


FIGURA 96 Cromatograma do padrão de β -caroteno, fase móvel metanol:THF (85:15 v/v), à 450 nm.

5.2.2 Precisão do tempo de retenção e altura do pico

O tempo de retenção é um parâmetro característico de cada composto, nas condições utilizadas. Através de um espectro de varredura realizado em um detector de arranjo de fotodiodos é possível identificar o pico de máxima absorção e o tempo de retenção do β -caroteno nas condições otimizadas.

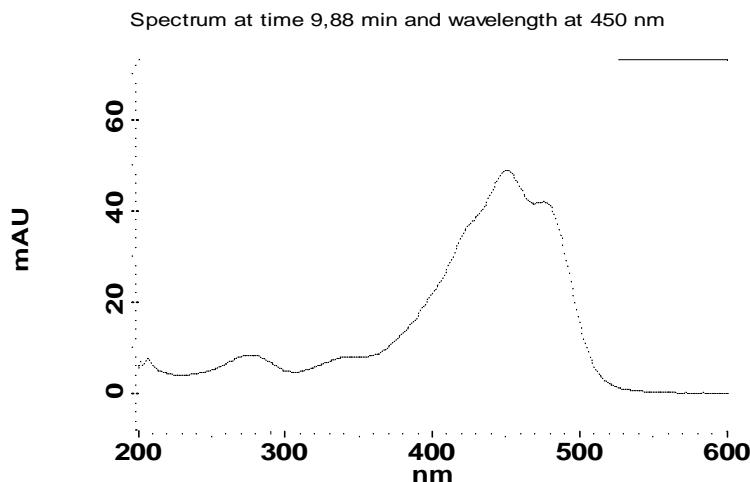


FIGURA 10 ó Espectro de absorção do padrão de β -caroteno (C=0,5 g/L), variando de 200 a 600 nm, utilizando acetona como solvente.

A Tabela 6 mostra a repetibilidade do tempo de retenção, juntamente com as superfícies e alturas dos picos de uma solução padrão de β -caroteno, injetada cinco vezes.

TABELA 6 ó Repetibilidade dos tempos de retenção (T_R), superfície e altura dos picos de uma solução padrão de β -caroteno.

Injeções	β -carotene solution		
	Tempo de retenção (min)	Superfície	Altura (mUA)
1	9,69	13700413	844882
2	9,80	12099831	752785
3	9,78	12085479	759679
4	10,22	11710555	685160
5	9,781	12763404	776889
Mean	9,85	12471936	763879
SD	0,21	784478	57158
%CV	2,12	6,28	7,48

5.2.3 Linearidade e curva de calibração

A linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração do composto em questão, dentro de uma faixa analítica especificada, onde é possível relacionar a resposta do detector à concentração. A Figura 11 mostra a curva de calibração obtida para o padrão β -caroteno ($n=6$), onde o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi maior que 0,99, o que demonstra uma excelente linearidade no intervalo de concentração estudada.

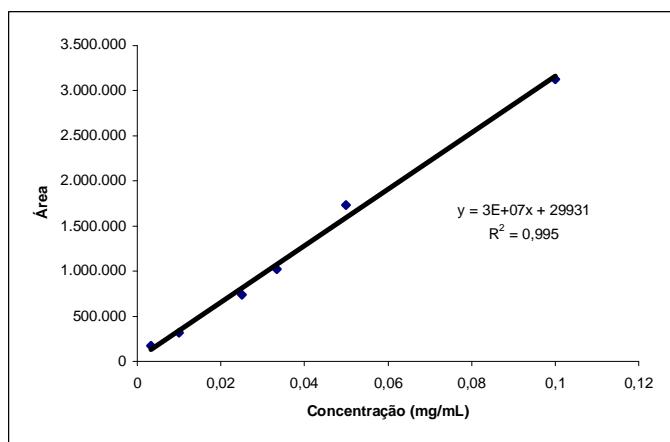


FIGURA 11 - Curva da concentração (mg/mL) vs área do pico obtida com o padrão de - caroteno à 450 nm.

5.2.4 Seletividade das amostras

A seletividade é a habilidade de separar o composto de interesse de outros componentes da amostra. Assegura que o sinal medido não é influenciado por substâncias interferentes. A seletividade é avaliada comparando-se os tempos de retenção dos picos dos padrões com o das amostras a serem analisadas. Nas Figuras 12 e 13 verifica-se a presença do pico correspondente ao β -caroteno nas amostras de polpa de tucumã e plasma humano, respectivamente.

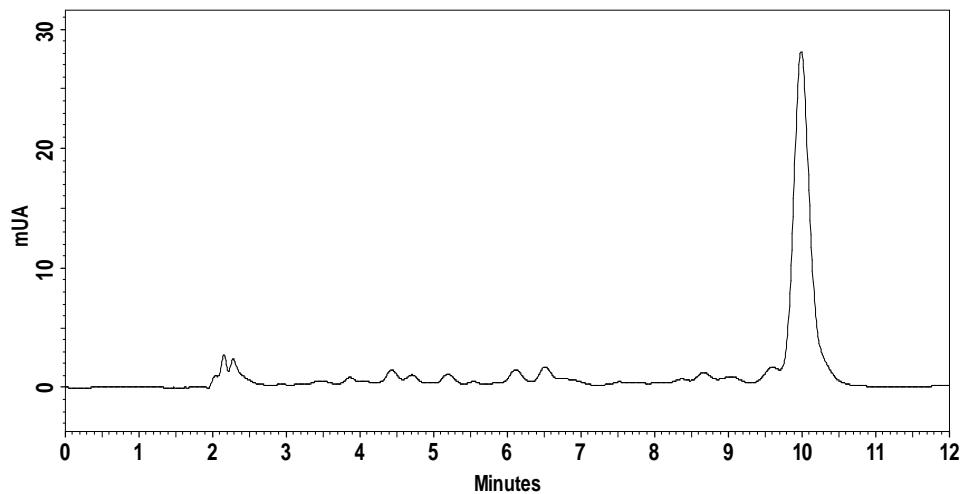


FIGURA 12 ó Cromatograma de uma amostra de polpa de tucumã à 450 nm.

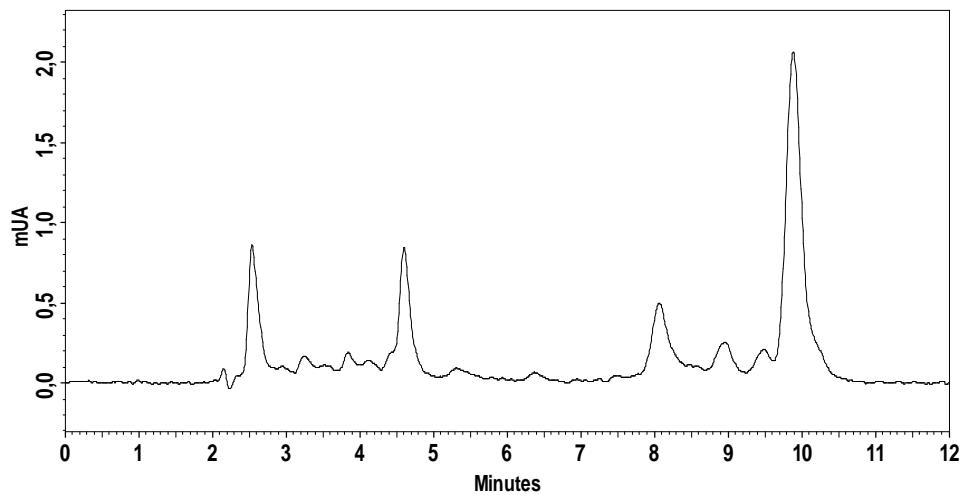


FIGURA 13 - Cromatograma de uma amostra de plasma humano suplementado com polpa de tucumã à 450 nm

5.2.5 Precisão

É a habilidade do método de reproduzir o mesmo resultado, sempre que o procedimento é executado. O critério de precisão depende muito da análise, podendo variar de 2% a mais de 20% no coeficiente de variação. A Tabela 7 mostra a concentração de β -caroteno na polpa de tucumã analisada em triplicata, onde o valor do coeficiente de variação mostra uma boa precisão do método.

TABELA 7 ó Repetibilidade à partir de uma amostra de polpa de tucumã.

Repetições	β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)
1	339,32
2	359,41
3	354,38
Média	351,03
Desvio-padrão	10,45
%CV	2,97

5.2.6 Determinação do teor de carotenóides na polpa de tucumã

Como observado na Tabela 7, a concentração de β -caroteno na polpa de tucumã foi de $351 \pm 10,4 \mu\text{g/g}$ fruto fresco, valor este superior ao encontrado por Rodriguez-Amaya (1996), o qual foi de $107 \mu\text{g/g}$. Entretanto, o teor em carotenóides, assim como os fitoquímicos em geral, varia de acordo com o grau de maturação, o tipo de solo e condições de cultivo, condições climáticas, variedade dos vegetais, a exposição à luz solar, condições de processamento e a estocagem, entre outros fatores, o que pode justificar uma concentração aproximadamente três vezes superior em nossos frutos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1996).

5.3 Estudo da biodisponibilidade do -caroteno no plasma humano

Neste estudo, foi encontrado um pico de máxima absorção após 5 horas de ingestão do suplemento de -caroteno (Figura 14). Este resultado está de acordo com o encontrado por Pérez-Gálvez et al. (2005), os quais verificaram uma concentração máxima no plasma após 5 horas de ingestão de um óleo de oliva rico em carotenóides.

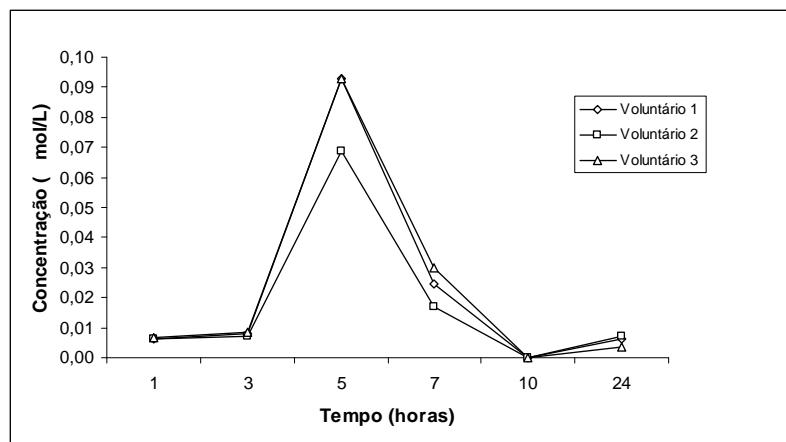


FIGURA 14 Evolução da concentração de -caroteno no plasma (mol/L de plasma) em três voluntários após a ingestão de um suplemento rico em -caroteno.

De fato, após uma alimentação rica em carotenóides, esses compostos são liberados da matriz alimentar e incorporados em micelas, as quais consistem de sais biliares, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolipídeos. Os carotenóides presentes nos quilomícrons apresentam um pico poucas horas após a ingestão (4-8 hs), entretanto, as LDLs apresentam um pico entre 24 e 48 horas, e o HDL entre 16 e 48 horas (CORNWELL; KRUGER; ROBINSON, (1962); SCOTT; RODRIGUEZ-AMAYA, 2000).

Os carotenóides são submetidos a vários caminhos desde a quebra da matriz até a liberação no lúmen do trato intestinal através de sua incorporação nas lipoproteínas e subsequente estocagem (HAROLD; FURR; CLARK, 1997).

A quantidade de -caroteno encontrada no plasma foi estimada, em média, em 800 nmol, considerando que um adulto médio possui 5 litros de sangue e o plasma corresponde a 50% desse total no corpo humano. Esse valor encontrado corresponde a uma absorção de aproximadamente 2%. Entretanto, esse valor não leva em consideração os carotenóides armazenados nos tecidos. Segundo Harold; Furr; Clark, (1997) o -caroteno absorvido pode ser acumulado no fígado,

músculos, estômago, e principalmente nos tecidos adipócitos, sendo este considerado o maior depósito de -caroteno no organismo humano.

A eficiência da absorção dos carotenóides pode ser afetada por vários fatores, tais como (SCOTT & RODRIGUEZ-AMAYA, 2000):

- a. quantidade de carotenóides ingeridos;
- b. processamento e/ou cozimento dos alimentos;
- c. outros componentes da dieta que podem estimular (tipo e quantidade de gordura na dieta) ou inibir (fibras) a absorção;
- d. interações entre carotenóides e/ou outros componentes;
- e. status nutricional do organismo, entre outras.

Outro ponto que deve ser levado em consideração na absorção dos carotenóides é sua atividade pró-vitamina A, uma vez que absorvidos podem ser metabolizados a ésteres de retinil durante a absorção intestinal. Cerca de 70% do -caroteno absorvido é metabolizado, entretanto, esse processo é influenciado pelo status nutricional do indivíduo, níveis de vitamina A no organismo e composição da dieta (CASTENMILLER; WEST, 1998).

5.4 Estudo da funcionalidade do -caroteno no plasma humano

5.4.1 Perfil dos voluntários

Os 21 voluntários selecionados para a suplementação tinham idade média de 47 anos (DP $\pm 9,88$) e índice de massa corpórea (IMC) médio de 27,81 (DP $\pm 3,43$). Esse valor se encontra fora do intervalo de normalidade (20 ó 25 K/m²), indicando um sobre peso desse grupo.

Não foi constatado nenhum voluntário fumante. Aproximadamente 71% dos voluntários relataram o consumo de algum tipo de bebida alcoólica semanalmente e 76% o consumo de frutas e vegetais diariamente.

Os voluntários do grupo controle tinham, em média, 36 anos (DP $\pm 8,35$) e IMC 25,21 (DP $\pm 2,56$), onde nenhum voluntário era fumante. O índice do consumo de bebida alcoólica foi de aproximadamente, 73% e o consumo diário de frutas e vegetais de 45%.

5.4.2 Análises bioquímicas

Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentados os resultados das análises bioquímicas realizadas no soro humano, dos dois grupos em estudo: o grupo suplementado com -caroteno durante 52 dias e o outro grupo, o qual não faz uso de nenhum suplemento.

TABELA 8 ó Resultados das análises bioquímicas dos voluntários que foram submetidos à suplementação com -caroteno durante 52 dias^a.

Dias	Parâmetros						
	Colesterol Total (CT)	LDL-colesterol	HDL-colesterol	Triglicerídeos (TG)	Glicose	Fosfatase Alcalina	TGP
0	215,8 ±41,2	155,2 ±39,8	45,3 ±8,87	198,1 ±146,4	91,1±17,9	81,9 ±16,64	33,71±13,10
14	201,7 ±35,0	142,6 ±29,5	51,8 ±8,85 ^{b,c}	206,7 ±107,7	96,0 ±21,7	47,2 ±9,66 ^b	40,30±14,74
28	206,5 ±35,7	141,0 ±33,2	52,7 ±10,92 ^{b,c}	198,1 ±96,5	100,9 ±20,9	56,3 ±12,46 ^{b,c}	41,67 ±25,79
38	200,0 ±35,1	140,0 ±31,8	49,3 ±9,06 ^c	171,4 ±99,3	102 ±24,5	54,4 ±14,38 ^{b,c}	27,43 ±10,79
52	209,7 ±35,7	147,3 ±31,0	47,0 ±9,29 ^c	168,1 ±102,0	98,4 ±22,0	57,7 ±14,34 ^{b,c}	39,72 ±22,98

^a média±desvio padrão

^b diferente significativamente do tempo 0 (p<0,05).

^c Letras iguais indicam que não há mudanças significativas entre os intervalos de tempo (coluna).

TABELA 9 - Resultados das análises bioquímicas dos voluntários do grupo controle durante 52 dias^a.

Dias	Parâmetros						
	Colesterol Total (CT)	LDL-colesterol	HDL-colesterol	Triglicerídeos	Glicose	Fosfatase Alcalina	TGP
0	190,6 ±43,6	127,5 ±32,6	44,5 ±8,99	186,0 ±112,3	90 ±13,1	75,3 ±26,7	39,4 ±21,5
28	181,9 ±34,9	126,8 ±19,6	51,1 ±8,38	165,7 ±96,9	92,3 ±13,5	56,8 ±8,0 ^{b,d}	55,2 ±31,6
52	183,2 ±45,5	124,5 ±31,3	47,9 ±7,97	169,8 ±93,5	94,8 ±6,0	59,0 ±13,4 ^d	30,9 ±12,9

^a média±desvio padrão

^b diferente significativamente do tempo 0 (p<0,05).

^d Letras iguais indicam que não há mudanças significativas entre os intervalos de tempo (coluna).

Em média, os resultados do primeiro grupo (Tabela 8) apresentaram valores elevados para o colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos, onde os níveis normais seriam valores abaixo de 200, 130 e 150, respectivamente. Para o grupo controle (Tabela 9) todos os valores estão dentro da normalidade, exceto os TG que se encontram numa faixa limítrofe.

Essas alterações encontradas no primeiro grupo podem estar relacionadas diretamente com o perfil desses voluntários, os quais são pessoas acima dos 45 anos com índice de massa

corpórea acima de 25 Kg/m^2 , indicando um sobrepeso. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001) indivíduos que apresentam excesso de peso, associado ao acúmulo de gordura na região abdominal, geralmente apresentam dislipidemia (TG elevado, HDL-C baixo, LDL-C elevado), hipertensão arterial e, consequentemente, maior risco de doença aterosclerótica.

A ingestão do suplemento de β -caroteno não ocasionou diferenças significativas nos valores de colesterol total e LDL-C dos voluntários durante o período estudado. Esse mesmo efeito foi encontrado por Franke et al. (2005), o qual atribuiu essa falta de significância dos parâmetros à uma grande variabilidade da população em estudo, apresentando assim, elevados valores nos desvios padrões.

Entretanto, os valores de LDL apresentaram uma tendência de diminuição do tempo inicial até 38 dias de suplementação, conforme visualizado na Figura 15.

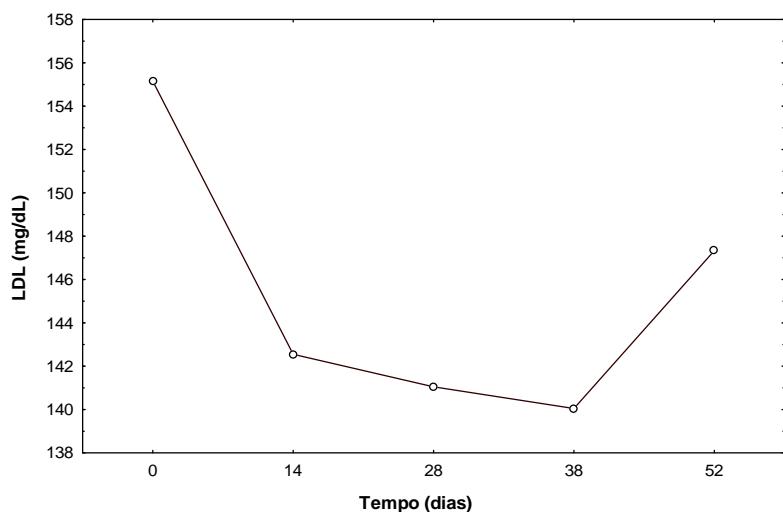


FIGURA 15 6 Representação gráfica dos valores LDL-colesterol (mg/dL de plasma) nos voluntários suplementados com β -caroteno

Para o HDL-C, esse grupo apresentou um aumento significativo ($p<0,05$), passando de $45,3 \pm 8,87$ no tempo zero para $52,7 \pm 10,92 \text{ mg/dL}$ após 28 dias de suplementação com o β -caroteno (Figura 16). Este aumento é desejável, uma vez que o HDL é conhecido como o ‘bom colesterol’ ou seja, é a lipoproteína responsável pelo transporte do colesterol da corrente sanguínea para o fígado, onde este será eliminado, no chamado transporte reverso do colesterol.

De acordo com Allard et al. (1994), a concentração de HDL apresenta uma correlação direta com o aumento da concentração de β -caroteno no plasma.

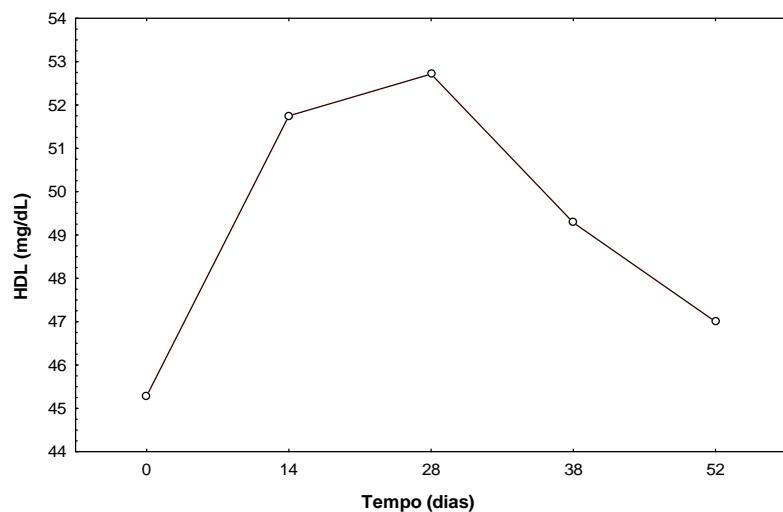


FIGURA 16 ó Representação gráfica dos valores de HDL-colesterol (mg/dL de plasma) nos voluntários suplementados com o β -caroteno.

Elevados níveis de HDL e redução nos níveis de LDL-colesterol no sangue são associados com uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares (SANTOS et al. 2002).

Os TG apresentaram uma leve diminuição durante o período estudado, mas não ocorreram modificações significativas em ambos os grupos.

O teor médio da glicose apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade (90-110 mg/dL), em ambos os grupos, durante o período estudado.

As enzimas hepáticas mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade (FA 65-300 U/L e TGP 8-53 U/L) durante o experimento para todos os participantes, confirmando a baixa toxicidade hepática dos carotenóides, como descrito por Krinsky (2001). Entretanto, houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) da fosfatase alcalina, fato este não atribuído à suplementação com o β -caroteno, já que no grupo controle também foi observado este efeito, como observado na Figura 17.

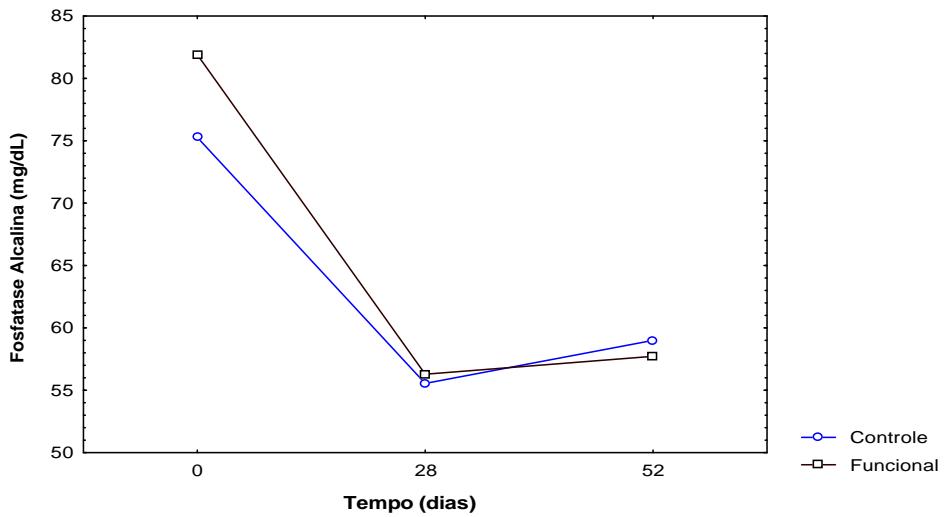


FIGURA 17 ó Representação gráfica dos valores de fosfatase alcalina (U/L de plasma) dos voluntários em ambos os grupos.

5.4.3 Avaliação da concentração do β -caroteno no plasma humano

A suplementação com o β -caroteno, por um período de 52 dias, ocasionou um aumento significativo ($p<0,05$) no plasma humano dos voluntários que foram submetidos à suplementação (Tabela 10).

TABELA 10 ó Concentração de β -caroteno ($\mu\text{mol/L}$) no plasma humano em ambos os grupos^a.

Dias	Concentração de β -caroteno no plasma ($\mu\text{mol/L}$ plasma)	
	Grupo Suplementado	Grupo Controle
0	$0,512 \pm 0,27$	$0,254 \pm 0,19^d$
14	$0,708 \pm 0,33^b$	
28	$0,983 \pm 0,41^{b,c}$	$0,291 \pm 0,23^d$
38	$0,815 \pm 0,32^{b,c}$	
52	$0,906 \pm 0,46^{b,c}$	$0,269 \pm 0,20^d$

^a média \pm desvio padrão

^b diferente significativamente do tempo 0 ($p<0,05$).

^{c, d} Letras iguais indicam que não há mudanças significativas entre os intervalos de tempo (coluna).

O grupo suplementado apresentou um maior valor médio da concentração de -caroteno no plasma ($0,51\mu\text{mol/L}$), no tempo zero, comparado ao grupo controle ($0,25\mu\text{mol/L}$). Este fato pode estar associado a uma dieta balanceada rica em frutas e vegetais apresentada por esses voluntários. Avaliando os resultados obtidos através do questionário de avaliação clínico-nutricional, observou-se que 76% dos voluntários do grupo suplementado apresentavam o hábito de uma alimentação diária saudável, rica nesses compostos. O grupo controle apresentou uma alimentação pobre, onde apenas 45% relataram o consumo de frutas e/ou vegetais diariamente. Diversos estudos afirmam que uma alimentação rica em frutas e vegetais aumenta significativamente a concentração de -caroteno no plasma humano (JOHNSON et al. 1995;).

No grupo suplementado, o aumento da concentração de -caroteno foi de 38%, 91%, 59% e 76% após 14, 28, 38 e 52 dias de suplementação, respectivamente.

O aumento da concentração no plasma já foi estudado por outros autores. Johnson et al. (1995) verificaram um aumento de, aproximadamente, 8 vezes na concentração de -caroteno no plasma após 3 semanas, com uma suplementação de 90mg/d, passando de 0,62 para $5,33\mu\text{mol/L}$.

Pellegrini; Riso; Porrini (1999) verificaram um aumento significativo na concentração de β -caroteno no plasma de 0,24 para $0,31\mu\text{mol/L}$ após 14 dias de suplementação com 25g de purê de tomate, contendo 7 mg de licopeno e 0,25 mg β -caroteno.

Dimitrov et al. (1988) avaliaram uma suplementação com 45 mg/d durante 3 semanas. Os níveis de β -caroteno no plasma aumentam significativamente e permaneceram em um estado constante até a extremidade da administração (21 dias), declinando gradualmente após o término do estudo.

Allard et al. (1994) verificaram um aumento significativo da concentração de β -caroteno após 4 semanas de suplementação com 20 mg de β -caroteno/dia, passando de 0,4 para $3,50\mu\text{mol/L}$.

Grande parte dos trabalhos pesquisados apresentam uma suplementação relativamente elevada de -caroteno quando comparado com este estudo em questão, o qual foi de apenas 5 mg/d. Por isso, este trabalho mostra informações sobre uma suplementação rica em -caroteno, capaz de aumentar significativamente a concentração desse componente no plasma humano, a curto prazo, o qual pode ser um importante parâmetro na prevenção de diversas doenças.

Uma gama de observações e estudos epidemiológicos têm consistentemente mostrado uma relação inversa entre vários tipos de câncer (predominantemente do trato-digestivo) com

uma dieta rica em -caroteno (VAN POPPEL, 1996). Para as doenças coronárias, associações similares foram encontradas e há consistentes evidências *in vivo* para as funções benéficas dos carotenóides (PALOZZA; KRINSKY, 1992; KARDINAAL et al. 1993; KNEKT et al. 1994; MILLER et al. 1996;).

5.4.4 Avaliação da oxidabilidade do plasma pelo método TBARS

A análise TBARS é um método bastante utilizado para a determinação da peroxidação lipídica, dando informações sobre a susceptibilidade de materiais biológicos à oxidação. A redução nos valores TBARS indica uma redução na peroxidação lipídica do material estudado.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos na análise TBARS. Observa-se uma diminuição significativa na formação do MDA ($p<0,05$) do tempo zero até o quarto ponto de coleta.

TABELA 11 ó Concentração de MDA (nmolMDA/mg proteína) no plasma para ambos os grupos.

Dias	TBARS (nmolMDA/mg proteína)	
	Grupo Suplementado	Grupo Controle
0	1,82 ±1,5	0,86 ±0,3
14	1,32 ±0,8	
28	1,15 ±0,7	0,86 ±0,4
38	1,04 ±0,7 ^b	
52	1,10 ±0,6	1,11 ±0,5

^a média±desvio padrão

^b diferente significativamente do tempo 0 ($p<0,05$).

A formação do MDA é o índice mais comumente utilizado em estudos da peroxidação lipídica em humanos e animais, onde um aumento nos níveis de MDA no organismo está diretamente associado ao desenvolvimento de doenças como o infarto do miocárdio, diabetes melitos, Alzheimer, entre outras (KATALINICA et al., 2005).

O grupo controle apresentou um menor valor médio da concentração de MDA no tempo zero (0,86 nmol/mg) em relação ao grupo suplementado (1,82 nmol/mg). Esse fato pode ser atribuído ao estilo de vida desses voluntários, os quais são mais novos, com IMC dentro dos limites, não apresentam alterações nos níveis lipídicos e são praticantes de atividade física diária, levando assim, a uma menor predisposição à formação desses compostos no organismo.

O grupo que foi suplementado apresentou uma redução na formação de MDA de 43% até o 38º dia de estudo, alcançando níveis próximos ao encontrado no grupo controle. Esses

resultados indicam que o -caroteno foi importante na inibição da peroxidação lipídica que ocorre *in vivo*, sob condições de estresse oxidativo.

Rao; Shen (2002) encontraram um resultado similar na proteção da oxidação *in vivo* estudando a ingestão de licopeno, um outro tipo de caroteno, em baixas concentrações (5, 10, 20 mg), onde a redução na formação de MDA foi de 20-23%. A Figura 18 apresenta graficamente os resultados obtidos na análise TBARS.

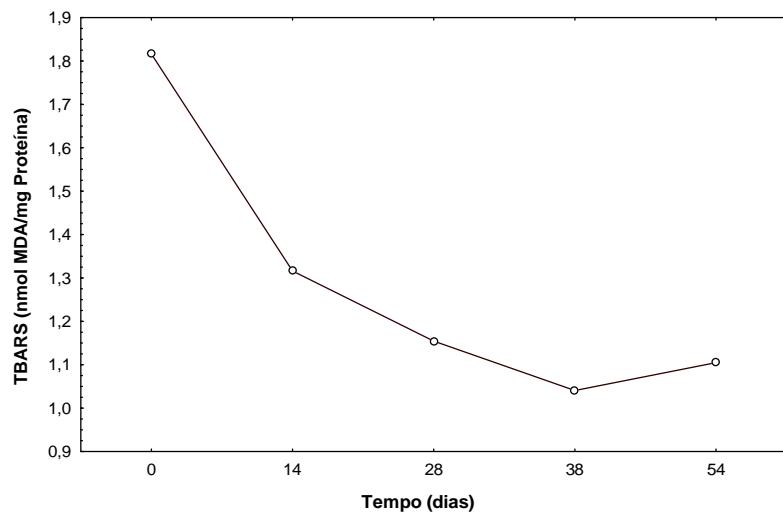


FIGURA 18 ó Representação gráfica dos valores TBARS (nmolMDA/mg proteína) dos voluntários submetidos à suplementação com -caroteno.

5.4.5 Análise da capacidade antioxidante do plasma pelo método *ORAC*

A Tabela 12 apresenta os valores médios obtidos na análise da capacidade antioxidante do plasma pelo método ORAC.

TABELA 12 ó Resultados da análise ORAC ($\mu\text{molET/L}$ plasma) para ambos os grupos^a.

Dias	Valor ORAC ($\mu\text{molET/L}$ plasma)	
	Grupo Suplementado	Grupo Controle
0	131,2 \pm 53,7	106,7 \pm 36,3
14	145,6 \pm 47,7	
28	151,4 \pm 53,2	110,6 \pm 58,1
38	141,4 \pm 55,8	
52	146,0 \pm 61,3	103,0 \pm 34,8

^a média \pm desvio padrão

Não ocorreram diferenças significativas nos valores ORAC em ambos os grupos. Esse mesmo efeito já foi encontrado por outros autores. Van Het Hof et al. (1998) concluíram que o consumo de uma margarina fortificada com antioxidantes (121 mg vitamina C, 2,7 mg α -caroteno e 5,3 mg β -caroteno) durante 4 semanas aumenta os níveis desses antioxidantes no plasma humano mas não afeta a capacidade antioxidante total do plasma.

Pellegrini; Riso; Porrini (1999) avaliaram uma suplementação diária com 25 g de purê de tomate (7 mg de licopeno e 0,25 mg β -caroteno) e após 14 dias consecutivos ocorreu aumento no plasma de ambos os compostos. Entretanto, não ocorreram mudanças significativas na capacidade antioxidante total do plasma.

Apesar dos lipofílicos serem considerados um importante antioxidante *in vivo*, eles não afetam a capacidade antioxidante medida por métodos TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) ou ORAC. Isso pode estar relacionado ao fato das moléculas lipofílicas estarem confinadas no núcleo lipoprotéico, impedindo assim a ação contra os radicais formados pelo APPH, e consequentemente, mascarando os resultados obtidos (PELLEGRINI; RISO; PORRINI, 2000).

6. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada para a determinação de β -caroteno tanto em matrizes biológicas como para matrizes alimentares mostrou-se eficiente com uma boa definição do pico do composto, assim como um tempo de análise curto.

A concentração de β -caroteno na polpa de tucumã foi de $351 \pm 10,4 \mu\text{g/g}$ fruto fresco.

Através do estudo da biodisponibilidade do β -caroteno foi confirmada a baixa taxa de absorção deste caroteno, sendo este índice influenciado por diversos fatores.

A suplementação diária de 5 mg de β -caroteno *in vivo* não alterou de forma significativa os valores dos triglicerídeos, TGP, colesterol total e LDL-colesterol. Entretanto, o LDL apresentou uma tendência à diminuição durante o período estudado.

O HDL-colesterol apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) após 28 dias de suplementação. A relação do aumento do HDL e diminuição do LDL-colesterol foi observada neste trabalho, fator este associado com uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares.

A fosfatase alcalina apresentou uma redução durante o período estudado, não sendo atribuído à suplementação com β -caroteno, já que essa redução foi verificada em ambos os grupos.

Houve um aumento significativo ($p<0,05$) na concentração de β -caroteno no plasma durante o período estudado.

Na avaliação da oxidabilidade do plasma, o grupo suplementado apresentou uma redução significativa ($p<0,05$) de aproximadamente 43% na formação do MDA, o que significa que o β -caroteno pode estar associado na proteção contra peroxidação lipídica *in vivo*.

Na análise ORAC, não houve variações significativas em nenhum dos dois grupos estudados.

A ação protetora observada na suplementação com β -caroteno contra a oxidação lipídica sugere um fator de proteção dos componentes do sangue, tais como uma melhor circulação das lipoproteínas e reforça o conceito que os antioxidantes podem diminuir potencialmente as lesões vasculares que levam à doenças cardiovasculares.

BIBLIOGRAFIA

- ALLARD, J.P.; ROYALL, D.; KURIAN, R.; MUGGLI, R.; JEEJEEBHO, Y.K.N. Effects of beta-carotene supplementation on lipid peroxidation in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition.** 59, p. 884-889, 1994.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research.** 1, p. 103-108, 1996
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official of analysis. 16ed. 3 rev. Washington, 1997.
- AOCS (American Oil Chemists Society) Official Methods and Recommended Practices of the American Chemist& Society. 5ed. Champaign, 2002.
- ARROL, S.; MACKNESS, M. I.; DURRINGTON, P. N. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesteryl ester transfer activity. **Atherosclerosis.** 150, p. 1296134, 2000.
- AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis.** 17, p. 3856396, 2004.
- CASTENMILLER, J.J.M.; WEST, C. E. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. **Annual Review of Nutrition,** 18, p. 19638, 1998.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**, 5^a ed. Museu paraense Emílio Goeldi. Belém-PA: CEJUP 279p, 1991.
- CORNWELL, D.G; KRUGER, F.A.; ROBINSON, H.B. Studies on the absorption of beta-carotene and the distribution of total carotenoid in human serum lipoproteins after oral administration. **Journal of Lipid Research.** 3, p. 65670, 1962.
- CRAFT, N.E.; SOARES, J.N. Relative solubility, stability and absorptivity of lutein and -carotene in organic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 50, p. 431-434, 2002.
- DE PEE, S., AND WEST, C. E. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: review of literature. **European Journal of Clinical Nutrition.** 50 (suppl 3), S38-S53, 1996.
- DIMITROV, N.V.; CHERYLMEYER, M.D.; DUANE, BS; ULIHEY, E.; CHENOWETH, MICHELAKIS, A. MALONE, W.; M.D BOONE; FINK, G. Bioavailability of -carotene in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition.** 48, p. 298-304, 1988.

EPLER, K.S., ZIEGLER, R.G., CRAFT, N.E. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. **Journal of Chromatography**. 619, p. 37648, 1993.

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

FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.A.; MACHADO, N.T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**. 14, p. 247-256, 1999.

FRANKE, A.A.; COONEY, R.V.; HENNING, S.M.; CUSTER, L.J. Bioavailability and antioxidants effects of orange juice components in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, p.5170 ó 5178, 2005.

FOOD AND NUTRITION BOARD. INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

GANDUL-ROJAS, B., CEPERO, M.R.-L., MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. Chlorophyll and carotenoid patterns in olive fruits, *Olea europaea* Cv. Arbequina. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47, p.2207-2212, 1999.

GRAIG, W. Phytochemicals: guardians of our health. **Journal of American Association**. 97, p. 199-205, 1997.

GUEGUEN, S., HERBETH, B., SIEST, G., LEROY, P. An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and β -carotene in human serum. **Journal of Chromatographic Science**. 40, p. 69-76, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford, UK: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition** 57(suppl):7 15S-25S, . 1993

HAROLD, C.; FURR; CLARK, R.M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **Nutritional Biochemistry**. 8, p. 364-377, 1997.

HOWARD, L.A., WONG, A.D., PERRY, A.K., KLEIN, B.P. -Carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. **Journal of Food Science**. 64, p. 929-936, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; PRIOR, R.L. High-Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, **Journal of Food and Agricultural Chemistry**. 50, p. 4437-4444, 2002.

- JIALAL, I.; NORKUS, E.P.; CRISTOL, L.; GRUNDY, S.M. -carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta.** 134, p. 1086-1091, 1991.
- JOHNSON, E.J.; SUTER, P.M.; SAHYOUN, N.; RIBAYA-MERCADO, J.D.; RUSSELL R.M. Relation between -carotene intake and plasma and adipose tissue concentrations of carotenoids and retinoids. **The American Journal of Clinical Nutrition.** 62, p. 598 ó 60, 1995.
- KARDINAAL, A.F.; VANØT VEER, P.; KOKL, F.J.; KOHLMEIER, L.; MARTIN-MORENO, J.M.; HUTTUNEN, J.K.; HALLEN, M.; ARO, A.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; GOMEZ-ARACENA, J.; EURAMIC Study: antioxidants, myocardial infarction and breast cancer. Design and main hypotheses. **European Journal of Clinical Nutrition.** 47, p. S64ó72, 1993.
- KATALINICA, V.; MODUNB, D.; MUSICB, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 140, p. 47652, 2005.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G.R.; GOLI, M.B.; LUSBY, W.R. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. **Pure Applied Chemistry.** 63, 71-80, 1991.
- KHACHIK, F.; SPANGLER, C.J.; SMITH, J.C.; CANFIELD, L.M.; STECK, A., PFANDER, H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids, and their metabolites in human milk and serum. **Analytical Chemistry.** 69, p. 1873- 1881, 1997.
- KNEKT, P.; REUNANEN, A.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, R.; HELIOVAARA, M.; AROMAA, A.; Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. **American Journal of Epidemiology.** 139, p. 1180ó1189, 1994.
- KONINGAS, E.J.M.; ROOMANS, H.H.S. Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruits. **Food Chemistry.** 59, pp. 199-603, 1997.
- KRINSKY, N.I. Carotenoids as Antioxidants. **Nutrition.** 17, p. 815ó 817, 2001.
- LAMPE, J. Health effects of vegetables and fruits:assessing mechanism of action in human experimental studies, **The American Journal of Clinical Nutrition.** 70, p. 475-482, 1999.
- LEVY, Y.; ZALTSBERG, H.; BEN AMOTZ, A.; KANTER, Y.; AVIRAM M. Dietary supplementation of a natural isomer mixture of beta-carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus. **Annals of Nutrition & Metabolism.** 44, p. 54ó60, 2000.
- MAHAN, K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia.** 11^a Ed. São Paulo: Roca, 2005.
- MAYNE, S.T. **Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans.** FASEB J. 10, 690ó701, 1996.

- MILLER, N.J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L.P.; BRAMLEY, P.M.; RICE-EVANS, Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **C.A. FEBS Letters.** 384, p. 2406242, 1996.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I.; HONERO-MENDEZ, D.; PEREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods, In: HUST, W.J. **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**, CRC Press, p. 400, 2002.
- MINGUÉZ-MOSQUERA, M.I.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika, and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 41, p. 1616-1620, 1993.
- MOROS, E.E., DARNOKO, D., CHERYAN, M., PERKINS, E.G., JERRELL, J. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 50, p. 57876 5790, 2002.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger, Princípios de Bioquímica.** 3^aed. São Paulo: Xavier, 2002.
- OLMEDILLA, B., GRANADO, F., GIL-MARTINEZ, E., BLANCO, I., ROJAS-HIDALGO, E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. **Clinical Chemistry,** 43, p. 106661071, 1997.
- OLSON, J.A. Absortion, transport and metabolism of carotenoids in humans. **Pure Applied Chemistry.** 66, p. 1011-1016, 1994.
- OLSON, J.A. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a phisical context, **Journal of Nutrition Science Vitaminology.** 39, p. 57-65, 1993.
- OLSON, J.A.; KRINSKY, N.I. **Introduction: the colorful fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators.** FASEB J. 9, p. 154761550, 1995.
- PALLET, D. **Perspectivas de valorização dos frutos amazônicos obtidos por extrativismo** ó colóquio SYAL ó São Paulo: Montpellier, Cirad Flhor, 2002.
- PALOZZA, P.; KRINSKY, N.I. Antioxidant effects of carotenoids in vitro and in vivo: an overview, **Methods in Enzymology.** 213, p. 4036420.1992.
- PELLEGRINI, N.; RISO, P.; PORRINI, M. Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma. **Nutrition.** 16, p. 268 6271, 2000.
- PÉREZ-GÁLVEZ, A.; PACHECO, Y.M.; BERMUDEZ, B.; LÓPEZ, S.; ABIA, R.; MURIANA, F.J.G.; VILLAR, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. Postprandial evolution of the carotenoid content in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction after a single ingestion of virgin olive oil in humans A. **Food Research International** 38, p. 109761102, 2005.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research,** 67, p. 289-297, 1997.

- PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hidrophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, p. 3273-3279, 2003.
- QUIRO'S, A.R.G.B.; COSTA, H.S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**. 19, p. 976111, 2006.
- RAO, A.V.; SHEN, H. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. **Nutrition Research**. 22, p. 112561131, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.F.S. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. 27, p. 771-780, 2004.
- RODRIGUES, A. M. C.; GAMA, S. S; LINS, R. T.; RODRIGUES, P. R.; SILVA, L.H.M. Estudo da Potencialidade de Três Oleaginosas Amazônicas para a Produção de Biodiesel. <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/Outros/EstudoPotencialidade6.pdf>. Acesso em 08.abril.07.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A Guide to Carotenoids Analysis in Foods**. Washington, DC, 2001.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Assessment of the Provitamin A Contents of Foods-The Brazilian Experience. **Journal of Food Composition and Analysis**. 9, p. 196-230, 1996.
- SAMPAIO, P.B. Avaliação das propriedades funcionais do açaí (*Euterpe oleracea*) em plasma humano. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) 6 Universidade Federal do Pará. Belém, 2006.
- SANTOS, A.A.A.; SILVA, M.V.G.; GUERREIRO, L.T.A.; ALVES, M.V.A.; CUNHA BASTOS, V.L.F.; BASTOS, J.C.; KOVARY, K. Influence of norbixin on plasma cholesterol-associated lipoproteins, plasma arylesterase/paraoxonase activity and hepatic lipid peroxidation of Swiss mice on a high fat diet. **Food Chemistry**. 77, p. 3936399, 2002.
- SCOTT, K.J.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents - fact or fiction? **Food Chemistry**, 69, p. 125-127, 2000.
- SILVA, E., M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian Region. **Food Chemistry**, Disponível on line, 2006.
- SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas Brasil Frutas**. São Paulo: Empresa das Artes, 2005.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**. 77, Suplemento III, 2001.

SOUZA, J.N.S. Caractérisation et quantification des anthocyanines du fruit de Içaçayer (*Euterpe oleracea*). 2000. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) ó Université Catholic de Louvain. Brussels, Belgium, 2000.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**. 24, p. 345-351, 2003.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta** ó Molecular Basis of Disease. 1740, p. 101-107, 2005.

STAHL, W.; SIES, H. Vitamins E and C, carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 62, p. 1315-1321, 1995.

VAN HET HOF, K.H.; TIJBURG, L.B.M.; DE BOER, H.S.M.; WISEMAN, S.A. WESTSTRATE, J.A. Antioxidant fortified margarine increases the antioxidant status. **European Journal of Clinical Nutrition**. 52, p. 292-199, 1998

VAN HET HOF, K.H.; WEST, C.E.; WESTSTRATE, J.A.; HAUTVAST, J.G. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **Journal of Nutrition**. 130, p. 503-506, 2000.

VAN POPPEL, G. Epidemiological evidence for beta-carotene in prevention of cancer and cardiovascular disease. **European Journal of Clinical Nutrition**. 50, p. S57-61, 1996.

VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T.H. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 8, p. 1265-1271, 2006.

WATZL, B.; KULLING, S.E.; MÖSENEDER, J.; BARTH, S.W. BUB, A. A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 82, p. 1052-1058, 2005.

YAGI, K. Lipid peroxides and human diseases. **Chemical and Physical of Lipids**. 45, p. 337-351, 1987.

YEUM, K.J.; RUSSELL, R.M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**. 22, p. 483-504, 2002.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids, **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 385, p. 20-27, 2001.

ZHANG, P.; OMAYE, S.T. -Carotene: interactions with -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 12, p. 38-45, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O tucumã é um fruto regional rico em substâncias protetoras, os carotenóides, e por esse motivo este trabalho tem como objetivo estudar os efeitos benéficos desses compostos no organismo humano na prevenção de doenças do sistema circulatório, tais como a aterosclerose.

Esta pesquisa baseia-se na ingestão diária de suplemento rico em β -caroteno, aos funcionários em seu local de trabalho, por um período de seis semanas. Será necessária a coleta de dados (sociais e de consumo alimentar) através de questionários e ainda verificação de peso e pressão arterial antes do início da pesquisa.

Para as análises de colesterol (gordura), antioxidantes (substâncias protetoras) e oxidação do plasma, serão coletadas amostras de sangue, sendo sempre realizadas por profissional experiente e com garantia de uso de material descartável, portanto não oferecendo risco aos participantes da pesquisa. Para isso, os voluntários deverão estar em jejum de 10 horas, em horário que será previamente agendado, recebendo café da manhã logo após a coleta de sangue.

Será necessário um grupo controle, o qual não fará ingestão da bebida, apenas a coleta de sangue da mesma maneira que o grupo de estudo. Este grupo será necessário para que, caso haja variações significativas no grupo de estudo, essas possam ser observadas.

Os resultados das análises realizadas serão entregues ao participante em seu local de trabalho ou em sua residência, tendo garantia de sigilo por parte do pesquisador.

Os voluntários serão livres para participar desta pesquisa, assim como para retirar-se a qualquer momento, sem qualquer represália.

Carissa Michelle Goltara Bichara

Universidade Federal do Pará
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Telefones para contato: 3201-7456/8127-5683
e-mail: carissa@ufpa.br

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como os seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando com a coleta de material para exame.

Belém ____/____/____

NOME LEGÍVEL: _____

ASSINATURA: _____

ANEXO 2**Ficha de Identificação e Avaliação Clínico-Nutricional****A) IDENTIFICAÇÃO**

Nome:

Idade: ____ anos

Naturalidade:

Local de Trabalho (setor/sala/andar):

Telefone do Trabalho:

Telefone Residencial:

Profissão:

Horas de Trabalho/dia:

Dias de Trabalho/semana:

B) AVALIAÇÃO CLÍNICO-NUTRICIONAL:

Peso: ____ Kg

Pressão Arterial: ____ mmHg

Altura: ____ cm

IMC: ____

C) FATORES DE RISCO

<u>Antecedentes Familiares:</u>	Mãe	Pai	Ambos	Não sabe
Hipertensão:	()	()	()	()
<i>Hiperlipidemia</i>	()	()	()	()
Diabetes:	()	()	()	()
Câncer/Tipo:_____	()	()	()	()

Dieta:

No momento está fazendo alguma dieta? ()Sim ()Não

Qual o objetivo da dieta? () Controle de dieta. Qual? _____

() Emagrecer () Engordar () Outro

Há quanto tempo?

Fumo:

Fumante Ex-fumante Nunca fumou

Caso seja fumante, quanto tempo fumo?

Menos de um ano Mais de um ano, nº anos: _____

O que fuma?

Cigarro Cachimbo Charuto Outros

Quantas unidades/dia? _____

Caso seja ex-fumante, fumou por quanto tempo?

Menos de uma ano Mais de um ano, nº anos: _____

A quanto tempo parou de fumar? _____

Bebida Alcoólica:

Qual bebida consome?

Vinho Cerveja Uísque, vodka, cachaça Outros

Consume com que freqüência?

Dia Semana Mês Raramente Nunca

Atividade Física:

Pratica atividade física? Sim Não

Caso sim, qual das atividades abaixo?

Atividade	<u>Atividade leve</u> Caminhada com velocidade moderada e exercício em forma de lazer	<u>Atividade Moderada</u> Pedalar levemente, nadar, dançar, ginástica/aeróbica leve, vôlei recreativo ou qualquer atividade que faça suar levemente ou que aumente moderadamente a respiração e os batimentos cardíacos.	<u>Atividade intensa</u> Correr, ginástica aeróbica intensa, pedalada rápida, basquete ou qualquer atividade física que faça suar bastante ou acelerar a respiração e os batimentos cardíacos.
nº dias/semana			
Tempo/dia			

Horas de sono/dia: _____

Meio de locomoção para o trabalho: _____

Tempo gasto na locomoção (ida/volta): _____

D) ALIMENTAÇÃO

Quais refeições costuma fazer habitualmente?

Café da Manhã Lanche Almoço Lanche 2 Jantar Ceia

Com que freqüência, (nº vezes por semana) utiliza os serviços do restaurante?

Almoço: 1 2 3 4 5 6

Lanche: 1 2 3 4 5 6

Têm costume de comer frutas? Sim Não

Quais? _____

Com qual freqüência? Uma /Dia Mais de uma/dia

Uma/Semana Mais de uma/Semana

Por qual motivo faz refeições no local de trabalho?

Preço Falta de tempo Qualidade Variedade Outros _____

Toma algum tipo de suplemento vitamínico? Sim Não

Caso sim: Às vezes Sempre Qual? _____

Toma algum medicamento? Sim Não

Caso sim, qual? _____

Retira a gordura visível da carne? Sim Não

Caso sim: Às vezes Sempre

Retira a pele do frango? Sim Não

Caso sim: Às vezes Sempre

Consome alimentos fritos? Sim Não

Caso sim: Diariamente Semanalmente Mensalmente Raramente

Consome carne assada de brasa? Sim Não

Caso sim: Diariamente Semanalmente Mensalmente Raramente

Ficha de Freqüência Semiquantitativa de Alimentos

Alimentos	Porção consumida (nº/descrição)	Vezez/dia	Vezez/semana	Vezez/mês	Raro	Nunca
Leite e Derivados						
Leite desnatado ou semidesnatado						
Leite integral						
Iogurte						
Queijo branco						
Queijo amarelo						
Requeijão						
Carne e Ovos						
Ovo frito						
Ovo cozido						
Carne bovina/bubalina						
Carne de porco						
Frango						
Peixe fresco						
Peixe salgado (pirarucu, bacalhau)						
Peixe enlatado (atum sardinha)						
Carne conservada em sal (carne seca, sarne de sol pertences da feijoada)						
Embutidos (salsicha, linguiça, presunto, mortadela, salame)						
Víscera (fígado, coração)						
Camarão						
Caranguejo						

Óleos e Gorduras						
Azeite						
Bacon, toucinho						
Manteiga						
Margarina						
Maionese						
Petiços e Lanches						
Salgados fritos e assados (batata frita caseira, coxinha, quibe, pastel)						
Snacks (cheetos, batata frita industrial, amendoim)						
Fast foods (pizza, sanduíches, comida chinesa)						
Cereais e Leguminosas						
Arroz integral						
Arroz polido						
Macarrão						
Farinha de mandioca						
Feijão						
Pão Integral						
Pão Careca						
Pão de forma						
Biscoito salgado						
Biscoito doce						
Bolos						
Tapioquinhas						
Hortaliças e Frutas						
Folha crua						
Folha refogada/cozida						
Vegetal cru						
Vegetal cozido						
Tubérculos (macaxeira, batata, cará)						
Frutas						

Sobremesa, doces e outros						
Tortas						
Geléia/mel						
Doces, bombons						
Chocolate						
Sorvete						
Picolé						
Barra de cereal						
Bebidas						
Café com açúcar						
Café sem açúcar						
Suco natural com açúcar						
Suco natural sem açúcar						
Suco industrial com açúcar						
Suco industrial sem açúcar						
Refrigerante						
Produtos Light e Diet						
Adoçante						
Geléia						
Margarina						
Regueijão, iorgutes, leite, condensado, creme de leite						
Chocolate, doce, picolé, sorvete, gelatina						
Barra de cereais						
Outros						