

Fatores de conversão em vitamina A dos isômeros 9-*CIS* e 13-*CIS* do β -caroteno

Conversion ratios of isomers 9 and 13-cis of β -carotene

ABSTRACT

COSTA, M.A.L.; ORTEGA-FLORES, C.I.; PENTEADO, M.V.C. Conversion ratios of isomers 9 and 13- *cis* of β -carotene. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = *J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP, v. 21, p. 73-86, jun, 2001.

The purpose of this study was to verify the conversion ratios of 9 and 13-cis isomers of β -carotene. In order to do this, we determined the tissue levels of β -carotene, its isomers and retinol after intragastric administration (during 2 weeks) of 9-cis or 13-cis β -carotene, in oil, to vitamin A-deficient hepatic rats. Vitamin A acetate and all-trans β -carotene, in oil, were used as positive controls, and water and oil as negative controls. Amounts of retinol, β -carotene and isomers in livers, plasma and feces were determined by HPLC. From the hepatic concentrations of carotenoids and vitamin A it was verified that 9-cis and 13-cis β -carotene are metabolized to vitamin A compounds and that the conversion ratios were 37,2% for isomer 9-cis β -carotene and 45,6% for 13-cis β -carotene in comparison to all-trans β -carotene.

Keywords: β -carotene, conversion ratios, isomers, vitamin A

MARIA APARECIDA LOPES DA COSTA¹*, CLAUDIA ISABEL ORTEGA-FLORES² E MARILENE DE VUONO CAMARGO PENTEADO^{3**}

¹Curso Pós-Doutorado em Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas -

Universidade de São Paulo.

²Curso Doutorado em Ciências de Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas -

Universidade de São Paulo.

³Prof. Titular Depto de Alimentos e Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

**Endereço para correspondência:

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - bloco 14 - Cjto das Químicas - Cidade Universitária - USP - São Paulo - SP - 05508-900

Trabalho realizado no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF) baseado na Tese de Doutorado "Biopontências dos isômeros 9-*cis* e 13-*cis* do β -caroteno", defendida na FCF/USP, em 1998.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

RESUMEN

Com el objetivo de verificar las biopotencias de los isómeros 9 y 13-cis del β -caroteno~fue realizado em ratones un ensayo baseado en el modelo de agotamiento de las reservas hepáticas de vitamina A. Ratones depletados de vitamina A hepática recibieron los referidos isómeros del β -caroteno siendo verificada la cantidad de retinol depositada en el hígado de estos animales. A parte de estos valores se observó que los factores de la conversión fueron 37,2% y 45,6% para los isómeros 9 y 13-cis, respectivamente.

Palavras claves: β -caroteno, factores de conversión, isómeros, vitamina A

RESUMO

Com o objetivo de verificar os fatores de conversão em vitamina A dos isômeros 9 e 13-cis do β -caroteno foi realizado ensaio baseado no modelo de esgotamento das reservas hepáticas de vitamina A em ratos. Ratos depletados de vitamina A hepática receberam os referidos isômeros do β -caroteno, sendo verificada a quantidade de retinol depositada no fígado destes animais. A partir destes valores observou-se que os fatores de conversão foram iguais a 37,2% e 45,6% para os isômeros 9 e 13-cis, respectivamente.

Palavras chaves: β -caroteno, fatores de conversão, isômeros, vitamina A

INTRODUÇÃO

Na literatura, há evidências que mostram que a primeira vitamina lipossolúvel a ser conhecida foi a vitamina A. Ela desempenha papel essencial no processo da visão, no crescimento, no desenvolvimento e manutenção do tecido epitelial, no processo imunitário e na reprodução normal (VAN DEN BERG, 1996).

A deficiência de vitamina A é um dos grandes problemas de saúde pública no mundo (UNDERWOOD e ARTHUR, 1996). Nas revisões feitas por SANTOS et al. (1996a e 1996b), são citados vários trabalhos realizados no Brasil, que mostraram a alta prevalência da carência de vitamina A. O trabalho realizado por SLATER-VILLAR (1996), mostrou que das 91 gestantes da cidade de São Paulo que participaram do estudo, 38,5% encontravam-se em alto risco de deficiência de vitamina A.

A administração de carotenóides pró-vitamínicos A pode reverter o quadro de deficiência de vitamina A. Após a completa normalização dos níveis dessa vitamina nos tecidos, ocorre a deposição da mesma, principalmente no fígado.

Os diferentes carotenóides com atividade pró-vitamínica A não apresentam a mesma biopotência. Dentre os carotenóides que apresentam esta atividade, destaca-se o β -caroteno, com potencial pró-vitamínico A maior que os demais. Sabe-se, entretanto, que este pigmento ocorre naturalmente como uma mistura de isômeros, sendo a forma *todo-trans* a mais estável BRITTON (1995), e com maior atividade pró-vitamínica A que as formas *cis* (BAUERNFEIND, 1972).

Em função da importância do β -caroteno como fonte de vitamina A e da presença na literatura de dados controversos (DEUEL JR. *et al.*, 1945 e 1944; SWEENEY e MARSH, 1973), obtidos com técnicas ultrapassadas, relativos à biopotência de seus isômeros, buscou-se neste trabalho reavaliar os fatores de conversão em vitamina A desses carotenóides empregando-se metodologia de quantificação mais moderna, precisa e confiável.

MATERIAL E MÉTODOS

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No ensaio biológico, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), com peso médio inicial de 68,00 g \pm 2,04 g provenientes da colônia do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

O estudo foi baseado no modelo de esgotamento das reservas de vitamina A hepáticas em ratos (SWEENEY e MARSH, 1973). O ensaio biológico foi dividido em duas etapas: depleção e testes.

A fase de depleção durou 5 semanas e a de teste, 2 semanas. Os animais foram alojados em gaiolas individuais com bebedouro de plástico ou vidro. A ração fornecida aos

animais era à base de caseína de acordo com REEVES *et al.* (1993) e deficiente em vitamina A. Tanto a ração como a água eram oferecidas *'ad libitum'*.

Quarenta e nove animais foram distribuídos em sete grupos diferentes, num total de sete animais por grupo. No final da quinta semana (tempo Um) um grupo de animais foi sacrificado e os fígados e sangue recolhidos para se verificar se estavam depletados de vitamina A. Este grupo foi denominado de grupo Um.

Os outros seis grupos continuaram, durante 15 dias (período de testes), com a ração sem vitamina A, porém recebendo diferentes quantidades de pró-vitamina A (β -caroteno ou isômeros) em 0,5 mL de óleo de milho, sendo entubados a cada dois dias. Os grupos formados foram: grupos água ou óleo, ambos sem vitamina A, grupos vitamina A, β -caroteno todo-*trans*, 9-*cis* ou 13-*cis*.

Com exceção dos grupos água e óleo, que receberam 0,5 mL de água ou 0,5 mL de óleo, respectivamente, os demais receberam a quantidade de vitamina A diária segundo as recomendações do AIN93 (REEVES *et al.*, 1993). Os teores fornecidos aos animais foram: 28 μ g/dia de acetado de vitamina A, 45 μ g/dia de β -caroteno todo-*trans*, 82 μ g/dia de isômero 9-*cis* do β -caroteno e 68 μ g/dia de isômero 13-*cis* do β -caroteno para os grupos Vitamina A, β -caroteno todo-*trans*, 9-*cis* ou 13-*cis*, respectivamente. No caso dos isômeros *cis*, os cálculos foram feitos levando-se em consideração os fatores de conversão em vitamina A obtidos por (SWEENEY e MARSH, 1973).

Ao final da fase de testes todos os animais foram sacrificados e os fígados, plasma e fezes recolhidos para análise.

OBTENÇÃO DOS CAROTENÓIDES FORNECIDOS AOS ANIMAIS

Os isômeros de β -caroteno fornecidos aos animais foram extraídos de folhas de couve-flor (*Brassica oleracea* L.) no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Os procedimentos de extração e separação dos isômeros do β -caroteno foram realizados de acordo com o método de RODRIGUEZ *et al.* (1976), com algumas modificações conforme descrito em (COSTA e PENTEADO, 1996).

COLHEITA E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

A colheita do sangue e a retirada do fígado foram realizadas com os animais anestesiados por inalação de éter etílico p.a. A colheita do sangue foi feita através da artéria aorta abdominal, sendo este recolhido diretamente em tubo de vidro contendo EDTA. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3000 r.p.m. (centrífuga Sorvall Instruments, EUA, modelo RC5C, rotor SM24) por 15 minutos e a 4°C. O plasma obtido foi acondicionado em tubos de microcentrifugadora e guardado em 'freezer' a -70°C até análise.

Após a colheita do sangue, os fígados foram retirados, lavados em solução salina 0,9% (p/v), resfriada, passados em papel de filtro para secar, pesados, subdivididos em pedaços de até 3 g, embalados em papel alumínio, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em 'freezer' a -70°C até análise.

As fezes foram acondicionadas em frascos individuais de vidro à temperatura ambiente, sendo posteriormente colocadas durante 3 dias em estufa a 45°C ventilada, para retirada da umidade. Antes das análises, foram retirados resíduos de pêlos e de ração que porventura estivessem aderidos às fezes. Em seguida, estas foram pesadas e pulverizadas em moinho de aço inoxidável.

ANÁLISE DE RETINOL, β -CAROTENO E ISÔMEROS NO MATERIAL BIOLÓGICO

As análises de retinol, β -caroteno e isômeros no fígado, plasma e fezes foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os procedimentos de saponificação e extração do retinol e β -caroteno total e isômeros, presentes no fígado, plasma e fezes, foram baseados no trabalho de AL-ABDULALY e SIMPSON (1989). Tais procedimentos estão descritos resumidamente a seguir:

O fígado foi pesado (em torno de 2 gramas) em tubo de ensaio e homogeneizado utilizando-se um triturador tipo Turrax. Em seguida, adicionou-se cerca de 30 mL de KOH metanólico 30% (p/v). A mistura permaneceu durante uma noite, no escuro, sob nitrogênio e à temperatura ambiente.

Ao final desse período, a mistura foi transferida para um Erlenmeyer contendo 50 mL de éter etílico e agitada mecanicamente durante 15 minutos. Após este tempo, a mistura foi transferida para um funil de separação e a fase metanólica foi descartada. O álcali residual presente na fase etérea foi removido através de sucessivas lavagens com água destilada. Posteriormente, a solução foi transferida para um Erlenmeyer e a água remanescente foi retirada com a adição de sulfato de sódio anidro. O éter etílico contendo o retinol e o β -caroteno extraídos foi então transferido para um balão e evaporado em rota-evaporador, a vácuo.

Após a secagem, o balão foi lavado com 2 mL de éter etílico. Essa solução foi separada em duas alíquotas de 1 mL cada. O éter etílico foi evaporado por nitrogênio. Em um dos resíduos, adicionou-se de 0,3 a 0,5 mL de metanol, para determinação de β -caroteno e isômeros, e no outro de 0,5 a 1,0 mL de hexano, para análise de retinol.

Os procedimentos de saponificação e extração do retinol e β -caroteno do plasma foram os mesmos descritos para o fígado. 0,25 mL de plasma foram pipetados em Erlenmeyer de 50 mL e adicionou-se aproximadamente 3 mL de KOH 10% (p/v).

Os procedimentos de saponificação e extração do retinol e β -caroteno das fezes foram os mesmos descritos para o fígado, alterando-se apenas a concentração do KOH utilizado na saponificação, que nesse caso foi de 10% (p/v).

Antes da injeção no cromatógrafo as amostras foram filtradas com membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ de malha.

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DO RETINOL, β -CAROTENO E ISÔMERO NO FÍGADO, PLASMA E FEZES

Para determinação do retinol nos fígados e nas fezes foi utilizada cromatografia líquida em fase normal. Para tanto, usou-se uma coluna de sílica com micro-esfera de 5 μ m, 6 mm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento, da marca Shimadzu. O sistema de eluição era isocrático e a fase móvel consistiu de uma mistura de hexano com isopropanol na proporção de 99:1 (v/v). Os comprimentos de onda utilizados foram: emissão = 480 nm e excitação = 330 nm.

O β -caroteno presente nos fígados e no plasma foi determinado através de cromatografia líquida de fase reversa. A coluna de separação utilizada foi a C₁₈, contendo partículas de 5 μ m, com 4,6 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento, marca Vydac 201 TP 54. A fase móvel foi preparada com a mistura de metanol:acetoneitrila:água (88:9:3 v/v/v). O detector empregado foi o UV/visível e o comprimento de onda máximo para quantificação dos isômeros era de 452 nm.

As condições cromatográficas empregadas na determinação do retinol presente no plasma foram baseadas no trabalho de THURNHAM *et al.* (1988). A fase móvel foi preparada com a mistura de acetoneitrila:metanol:clorofórmio (47:47:6 v/v/v). A coluna de separação, o detector e os comprimentos de onda foram os mesmos utilizados para a análise de retinol no fígado

Para a determinação do β -caroteno nas fezes utilizou-se cromatografia de fase reversa. A coluna utilizada na separação foi a C₁₈ contendo partículas de 5 μ m, com 4,6 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento, Capcell Pack-Shiseido. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetoneitrila:diclorometano:metanol (70:20:10 v/v/v). As condições de detecção, fluxo, volume de injeção foram as mesmas utilizadas nas análises de β -caroteno nos fígados. O solvente utilizado para injeção do β -caroteno no cromatógrafo foi o diclorometano.

Com exceção do retinol no plasma, cujo fluxo foi de 1,5 mL/minuto, o fluxo das outras injeções foi de 2,0 mL/minuto e o volume de injeção de todos foi de 20 μ L.

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS MATERIAIS BIOLÓGICOS

Os compostos foram identificados através da comparação entre os tempos de retenção dos seus picos e os tempos de retenção dos picos do padrões correspondentes.

A quantificação foi feita utilizando-se as respectivas curvas de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar se as reservas de vitamina A hepáticas dos animais estão ou não esgotadas, os parâmetros utilizados são a interrupção do crescimento do animal e a queda brusca na concentração de retinol plasmático (ANZANO *et al.*, 1979). De acordo com

dados da literatura o tempo para se esgotar as reservas do rato tem variado entre 4 e 12 semanas (SHARMA *et al.*, 1976; MITTAL, 1983).

Usando apenas o primeiro parâmetro SHARMA *et al.* (1976), conseguiram alcançar um platô no crescimento dos animais com 4 semanas de restrição de vitamina A. MITTAL (1983), também utilizando esse critério obteve resposta após 12 semanas de depleção. O segundo parâmetro foi utilizado por MIYASAKA (1993) e por YUYAMA *et al.* (1991), que observaram o esgotamento após cinco semanas de depleção, e por LEWIS *et al.* (1990) que necessitaram de 7 semanas para depletar a vitamina A hepática dos animais.

Alguns pesquisadores demonstraram que o fígado já se encontra depletado de vitamina A algum tempo antes do animal deixar de ganhar peso, e que, para os ensaios de recuperação, parece ser mais conveniente iniciar a administração dos carotenóides antes que o fígado esteja completamente depletado (SWEENEY e MARSH, 1973; DOWLING e WALD, 1958).

No presente estudo, após um período de cinco semanas, os animais estavam depletados de vitamina A hepática, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Os resultados dos teores de retinol e β -caroteno, expressos em $\mu\text{g/g}$ ou $\mu\text{g/mL}$, encontrados nos fígados, plasma e fezes de ratos analisados por CLAE estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Teores médios e desvios-padrão, expressos em $\mu\text{g/g}$ ou $\mu\text{g/mL}$, de retinol e β -caroteno total em fígados, fezes e plasma de ratos, analisados após os períodos de depleção e repleção.

Grupos	Fígado ($\mu\text{g/g}$)		Plasma ($\mu\text{g/mL}$) Retinol	Fezes ($\mu\text{g/g}$) β -car. total
	Retinol	β -car. total		
Um (*)	nd	0,01 \pm 0,03	0,13 \pm 0,2	-
Água ¹	nd	nd	0,09 \pm 0,1	nd
Óleo ¹	nd	nd	0,11 \pm 0,1	nd
Vitamina A ¹	2,39 \pm 0,9	nd	0,85 \pm 0,5	nd
β -caroteno todo- <i>trans</i> ¹	2,90 \pm 0,8	0,18 \pm 0,1	0,44 \pm 0,2	0,01 \pm 0,01
9- <i>cis</i> β -caroteno ¹	1,77 \pm 1,8	0,18 \pm 0,2	0,50 \pm 0,3	0,03 \pm 0,03
13- <i>cis</i> β -caroteno ¹	1,85 \pm 0,6	0,10 \pm 0,1	0,40 \pm 0,2	0,03 \pm 0,02

¹ grupos correspondentes ao período de repleção de vitamina A

nd = não detectado

(*) n = 6

os demais, n = 7

Para determinar os teores de retinol e β -caroteno hepático, foram analisados apenas o lóbulo direito do fígado. Este tipo de cuidado foi adotado para se evitar a análise de amostras muito heterogêneas. OLSON (1979), encontrou uma distribuição não homogênea de retinol no fígado.

De acordo com a literatura, todo β -caroteno absorvido pelo rato é convertido em retinol no enterócito, sendo depois transportado até o fígado ou outros tecidos, de modo que não é possível se encontrar β -caroteno no fígado.

O trabalho de RIBAYA-MERCADO *et al.* (1989), dá uma certa sustentação a essa hipótese, uma vez que esses pesquisadores não detectaram β -caroteno no fígado de ratos. De acordo com (Bondi e Sklan, 1984), mesmo quando altas doses são ingeridas, ratos e galináceos convertem eficientemente β -caroteno, uma vez que muito pouco ou nenhum pigmento é absorvido intacto.

A afirmação de que β -caroteno não é absorvido intacto e que, não é possível, portanto, detectá-lo no fígado de ratos, merece ser questionada. Constatam da literatura vários trabalhos que demonstraram a presença de β -caroteno nesse tecido (BEN-AMOTZ *et al.*, 1988; STAHL *et al.*, 1992; SHLOMAI *et al.*, 1992; LEVIN *et al.*, 1994). Nos trabalhos realizados pelo grupo de MORENO *et al.* (1991 e 1995), foram detectadas quantidades mensuráveis de β -caroteno no fígado de ratos tratados com esse carotenóide.

Trabalhando com β -caroteno marcado com C^{14} KRINSKY *et al.* (1990), conseguiram encontrar o pigmento no fígado e outros órgãos de ratos. Esses pesquisadores são da opinião de que ratos podem acumular carotenóides tanto no sangue quanto em órgãos, desde que tenham ingerido altas doses do pigmento.

Teores de β -caroteno foram analisados em diferentes tecidos por SHAPIRO *et al.* (1984) que concluíram que o fígado é o principal sítio de estocagem deste pigmento.

Ainda contrários à idéia de não se encontrar β -caroteno em fígado, estão os resultados desse trabalho, uma vez que foram encontradas pequenas, mas quantificáveis concentrações deste pigmento nesse tecido.

Após o período de recuperação, como era esperado, não se encontrou retinol hepático nos grupos controle negativo (água e óleo). Os estoques de retinol hepático aumentaram acentuadamente em todos os grupos que receberam β -caroteno como fonte de vitamina A (Tabela 1). Embora os teores de retinol hepático dos grupos β -caroteno total e β -caroteno todo-*trans* sejam semelhantes entre si e maiores do que aqueles observados no grupo que recebeu vitamina A, estatisticamente as diferenças não foram significativas.

Ao término da fase de depleção os animais apresentaram níveis de retinol plasmático bastante reduzido. Entretanto, no final do período de repleção os níveis de retinol plasmático aumentaram, sendo que o grupo que recebeu vitamina A foi o que apresentou aumento mais acentuado, cerca de 6,5 vezes. Os demais grupos também apresentaram boa recuperação nos níveis plasmáticos, cerca de 3,5 a 4,5 vezes, quando comparados com o grupo Um, ou seja os isômeros de β -caroteno foram convertidos em retinol.

Após o fornecimento das fontes de vitamina A, houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis de retinol plasmático dos grupos vitamina A, β -caroteno total, β -caroteno todo-*trans* e 9-*cis*.

Os níveis de retinol circulante do grupo 13-*cis* aumentaram 3 vezes em relação ao grupo Um, sendo este aumento estatisticamente significativo. Os teores de retinol circulante dos grupos água e óleo caíram durante a fase de repleção, porém, as diferenças entre estes dois grupos e o Um não foram estatisticamente significantes.

Assim como observado por TEE *et al.* (1996), também não foi detectado β -caroteno no plasma dos ratos de todos os grupos estudados.

Embora na literatura existam dados sobre o aparecimento de vitamina A nas fezes (OLSON, 1988), no presente estudo não foi encontrado retinol nesse material biológico.

De acordo com dados da literatura, menos de 50% dos carotenóides ingeridos são absorvidos (OLSON, 1994); logo, era esperado o encontro de grande quantidade de pigmento nas fezes. Isto porém não ocorreu. Na realidade, menos de 1% da quantidade dos pigmentos ingeridos foi detectado nas fezes. Desta forma, sugeriu-se duas hipóteses sobre o que pode ter ocorrido: 1) parte do pigmento foi eliminada e depois degradada devido ao fato do material ter ficado exposto à luz durante muito tempo, pois as fezes foram recolhidas a cada dois dias; além disso, esse material foi colocado em estufa a 45°C durante 72 horas; 2) em função dos animais estarem depletados, estes absorveram praticamente todo o pigmento que receberam e converteram em retinol.

São poucos os estudos encontrados na literatura, sobre fatores de conversão em vitamina A de isômeros de carotenóides (DEUEL JR. *et al.* 1944, 1945; JOHNSON e BAUMANN, 1947; SWEENEY e MARSH, 1973; WEISER *et al.*, 1993). Os fatores relatados pelos diferentes grupos de pesquisadores, tanto dos apocarotenais como dos isômeros *cis* do β -caroteno, são contraditórios.

Os fatores de conversão em vitamina A dos isômeros *cis* foram normalmente obtidos em comparação com a forma todo-*trans*, e expressos em porcentagem de retinol estocado no fígado. Considerando-se a atividade do isômero β -caroteno todo-*trans* como 100%, os fatores de conversão em vitamina A dos isômeros *cis* foram calculados através do método de SWEENEY e MARSH (1973), conforme indicado a seguir:

$$\frac{\text{dose de todo-}trans \text{ disponível X retinol oriundo do isômero } cis}{\text{dose de isômero } cis \text{ disponível X retinol oriundo do todo-}trans} = \% \text{ fator de conversão}$$

Assim, quando 748,24 μg de β -caroteno todo-*trans* estavam disponíveis para serem convertidos, 24,998 μg de retinol foram estocados no fígado. Quando, 1227,93 μg de β -caroteno 9-*cis* e 1018,62 μg de β -caroteno 13-*cis* estavam disponíveis para serem convertidos, foram estocados no fígado, 15,26 μg e 15,54 μg de retinol, respectivamente.

Antes de se calcular os fatores de conversão em vitamina A, foi necessária a verificação dos valores de carotenos disponíveis a serem convertidos, o que foi conseguido simplesmente descontando-se do total de carotenos ingeridos, as quantidades depositadas no fígado e as eliminadas nas fezes.

Utilizando-se a quantidade de retinol estocado no fígado do rato, foi calculada a biopotência do isômero 9-*cis*, como sendo 37,2%. Este valor está bem próximo do sugerido por DEUEL JR. *et al.* (1944 e 1945), 38%, que utilizaram o parâmetro de crescimento de ratos para obter a atividade relativa desse isômero.

No caso do isômero β -caroteno 13-*cis*, o valor 45,6%, obtido no presente trabalho, está mais próximo do encontrado por JOHNSON e BAUMANN (1947), que também usaram a reserva hepática para estimar a biopotência desse isômero, e que foi igual a 48%. Assim, como os valores sugeridos por DEUEL JR. *et al.* (1944 e 1945) e JOHNSON e BAUMANN (1947), os valores observados no presente trabalho também são menores que os encontrados por (SWEENEY e MARSH, 1973).

WEISER *et al.* (1993) determinaram a biopotência relativa destes dois isômeros, através de ensaio onde verificaram a capacidade dos isômeros *cis* em proteger o epitélio vaginal de ratas depletadas de vitamina A. Os valores por eles estimados foram 26% e 41% para os isômeros 9-*cis* e 13-*cis* do β -caroteno, respectivamente.

Os menores fatores de conversão dos isômeros *cis* do β -caroteno em relação ao todo-*trans*, poderiam ser decorrentes de dois motivos: uma reduzida absorção dos isômeros *cis* ou a diferente configuração espacial da molécula dos isômeros que dificultaria a absorção dos mesmos pelas células intestinais. JENSEN *et al.* (1987) acreditam que as estruturas não lineares dos isômeros *cis* dificultem as suas passagens para o interior dos enterócitos. Uma absorção ineficiente dos isômeros *cis* e uma absorção eficiente do isômero todo-*trans* poderiam explicar a maior biopotência desse último em relação às formas *cis*.

De acordo com LEVIN *et al.* (1994) a biopotência dos isômeros 9-*cis* determinadas em galinhas é menor que a do todo-*trans*, embora estas acumulem maiores quantidades do isômero β -caroteno 9-*cis* do que β -caroteno todo-*trans*. Desta forma, a baixa biodisponibilidade do β -caroteno 9-*cis* não seria a razão para a baixa biopotência do mesmo em galinhas. Parece que a ocorrência da dupla ligação na posição 9 resulta em uma configuração que prejudica a conversão enzimática desse isômero até retinol.

WEISER e SOMORJAI (1992) determinaram os fatores de conversão de vários isômeros *cis* e *dicis* do retinol, e concluíram que o fator de conversão de um isômero *cis* depende da distância entre o anel β -ionona e a posição da configuração *cis* na molécula. Essa pode ser uma explicação para os menores fatores de conversão encontrados para o isômero β -caroteno 9-*cis*. A distância entre a dobra na molécula desse isômero e o anel β -ionona é menor que a existente no isômero 13-*cis*. Em todos os estudos a respeito da biopotência dos isômeros *cis*, os valores estimados para o β -caroteno 9-*cis* foram sempre menores do que aqueles dos isômeros β -caroteno 13-*cis*.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que o β -caroteno total e seus isômeros 9, 13-*cis* e todo-*trans* em solução oleosa, administrados via intragástrica, foram convertidos em retinol, demonstrando serem os mesmos fontes adequadas de retinol. Os fatores de conversão em vitamina A dos isômeros 9 e 13-*cis* do carotenóide em relação ao isômero todo-*trans*, determinados através da conversão destes em retinol, corresponderam a 37,2% e 45,6%, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES*

- AL-ABDULALY, A. B.; SIMPSON, K. L. Reversed-phase flash column chromatography for the determination of retinol in some foods. *J. Micronutr. Anal.*, Barking, v. 5, p. 161-9, 1989.
- ANZANO, M. A.; LAMB, A. J.; OLSON, J. A. Growth, appetite, sequence of pathological signs and survival following the induction of rapid, synchronous vitamin A deficiency in the rat. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 109, p. 1419-31, 1979.
- BAUERNFEIND, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, D.C., v. 20, n. 3, p. 456-73, 1972.
- BEN-AMOTZ, A.; MOKADY, S.; AVRON, M. The β -carotene-rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol in a rat diet. *Br. J. Nutr.*, London, v. 59, p. 443-9, 1988.
- BONDI, A.; SKLAN, D. Vitamin A and carotene in animal nutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.*, Oxford, GB., v. 8, p. 165-191, 1984.
- BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, Bethesda, v. 9, n. 15, p. 1551-8, 1995.
- COSTA, M. A. L.; PENTEADO, M. V. C. Alterações decorrentes de dois tipos de cozimento sobre os teores de carotenóides pró-vitamínicos A em escarolas (*Cichorium endivia* L.). *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 95-100, 1996.
- DEUEL Jr., H. J.; JOHNSTON, C.; MESER VE, E. R.; POLGAÁR, A.; ZECHEMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity IV. Neo β -carotene B and neo β -carotene B. *Arch. Biochem.*, New York, v. 7, p. 247-55, 1945.
- DEUEL Jr., H. J.; JOHNSTON, C.; SUMMER, E.; POLGÁR, A.; ZECHMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity I. All-*trans*- β -carotene and neo β -carotene U. *Arch. Biochem.*, New York, v. 5, p. 107-14, 1944.
- DOWLING, J. E.; WALD, G. Vitamin A deficiency and night blindness. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Washington, DC., v. 44, p. 648-61, 1958.
- DRICOT D'ANS, C.; DRICOT, J.; DINIZ, S. A.; MARITATH, J. G. R.; SANTOS, L. M. P. Geographic distribution of xer ophthalmia in the state of Paraíba, Northeast Brazil. *Ecol. Food Nutr.*, London, v. 22, p. 131-8, 1988.
- JENSEN, C. D.; HOWES, T. W.; SPILLER, G. A.; PATTISON, T. S.; WHITTAM, J. H.; SCALA, J. Observations of the effects of ingesting *cis*- and *trans*-beta-carotene isomers on human serum concentrations. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, California, v. 35, n. 2, p. 413-23, 1987.
- JOHNSON, R. M.; BAUMANN, C. A. Storage and distribution of vitamin A in rats certain isomers of carotene. *Arch. Biochem.*, New York, v. 14, p. 361-7, 1947.

* De acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Index Medicus.

- KRINSKY, N. I.; MATHEWS-ROTH, M. M.; WELANKIWAR, S.; SEHGAL, P. K.; LAUSEN, N. C. G.; RUSSETT, M. The metabolism of [^{14}C] β -carotene and the presence of other carotenoids in rats and monkeys. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 120, p. 81-7, 1990.
- LEVIN, G.; BEN-AMOTZ, A.; MOKADY, S. Liver accumulation of soluble all- *trans* ou 9- *cis*- β -carotene in rats and chicks. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford (GB), v. 107A, n. 1, p. 203-7, 1994.
- LEWIS, K. C.; GREEN, M. H.; GREEN, J. B.; ZECH, L. A. Retinol metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model. *J. Lipid Res.*, New York, v. 31, p. 1535-48, 1990.
- MARUSICH, W.; De RITTER, E.; VREELAND, J.; KRUKAR., R. Vitamin A activity of beta-apo-8'-carotenol. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, DC., v. 8, n. 5, p. 390-3, 1960.
- MITTAL, P. C. β -carotene utilization in rats fed either vitamin a or carotene in early life. *Nutr. Rep. Int.*, v. 28, n. 1, p. 181-6, 1983.
- MIYASAKA, C. K. *Estudo em ratos sobre a atividade pró-vitamínica A do luteocromo (5,6,5',8' diepoxi-beta-caroteno)*. São Paulo. Dissertação. [Mestrado em Ciência dos Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. 1983. 117 p.
- MORENO, F. S.; RIZZI, M. B. S. L.; DAGLI, M. L. Z.; PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*, London, v. 12, n. 10, p. 1817-22, 1991.
- MORENO, F. S.; WU, T.-S.; PENTEADO, M. V. C.; RIZZI, M. B. S. L.; JORDÃO Jr., A. A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; DAGLI, M. L. Z. A comparison of β -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v. 65, p. 87-94, 1995.
- OLSON, J. A. A simple dual assay for vitamin A and carotenoids in human liver. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, California, v. 19, n. 6, p. 807-13, 1979.
- _____. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure Appl. Chem.*, London, v. 66, n. 5, p. 1011-16, 1994.
- _____. Vitamin A, retinoids, and carotenoids. In: SKILS, M. E.; YOUNG, V. R. [Eds.] *Modern nutrition in health and disease*. 7th. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1988. p. 292-312.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY Jr., G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 123, p. 1939-51, 1993.
- RIBAYA-MERCADO, J. D.; HOLMGREN, S. C.; FOX, J. G.; RUSSEL, R. M. Dietary β -carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 119, p. 665-8, 1989.
- RODRIGUEZ, D. B.; RAYMUNDO, L. C.; LEE, T.; SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.*, London, v. 49, p. 615-24, 1976.
- SANTOS, L. M. P.; ASSIS, A. M. O.; MARTINS, M. C.; ARAÚJO M. P. N.; MORRIS, S. S.; BARRETO, M. L. Situação nutricional e alimentar de pré-escolares no semi-árido da Bahia (Brasil): II – Hipovitaminose A. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 67-74, 1996a.
- SANTOS, L. M. P., BATISTA FILHO, M., DINIZ, A. S. Epidemiologia da carência de vitamina A no Nordeste do Brasil. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, Washington DC, v. 120, n. 6, p.525-37, 1996b.
- SHAPIRO, S. S.; MOTT, D. J.; MACHLIN, L. J. Kinetic characteristic of β -carotene uptake and depletion in rat tissue. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 114, p. 1924-33, 1984.
- SHARMA, R. V.; MATHUR, S. N.; GANGULY, J. Studies on the relative biopotencies and intestinal absorption of different apo- β -carotenoids in rats and chickens. *Biochem. J.*, London, v. 158, p. 377-83, 1976.

- SHLOMAI, P.; BEN-AMOTZ, A.; MARGALITH, P.; MOKADY, S. Utilization of a natural β -carotene stereoisomers mixture from the fungus *Phycomyces blakesleeanus* as a source of vitamin A and β -carotene in rats' diet. *J. Nutr. Biochem.*, Stoneham, v. 3, p. 415-9, 1992.
- STAHL, W.; SCHWARZ, W.; SUNDQUIST, A. R.; SIES, H. *cis-trans* isomers of lycopene and β -carotene in human serum and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 294, n. 1, p. 173-7, 1992.
- SWEENEY, J. P.; MARSH, A. C. Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 103, p. 20-5, 1973.
- TEE, E. S.; LIM, C. L.; CHONG, Y. -H.; KHOR, S.-C. A study of the biological utilization of carotenoids of carrot and swamp cabbage in rats. *Food Chem.*, Barking, v. 6, n. 1, p. 21-32, 1996.
- THURNHAM, D. I.; SMITH, E.; FLORA, P. S., Concurrent liquid-chromatographic assay of retinol, α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene, and β -cryptoxanthin in plasma, with tocopherol acetate as internal standard. *Clin. Chem.*, Winston Salem, v. 34, n. 2, p. 377-81, 1988.
- UNDERWOOD, B. A. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 59, suppl., p. 517S-24, 1994.
- UNDERWOOD, B. A.; ARTHUR, P. The contribution of vitamin A to public health. *FASEBJ.*, Bethesda, v. 10, n. 9, p. 1040-48, 1996.
- van der BERG, H. Vitamin A intake and status. *Eur. J. Clin. Nutr.*, London, v. 50, suppl. 3, p. S7-12, 1996.
- WEISER, H.; RISS, G.; BIESALSKI, H. K. Uptake and metabolism of β -carotene isomers in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 691, p. 223-5, 1993.
- WEISER, H.; SOMORJAI, G. Bioactivity of *cis* and *dicis* isomers of vitamin A esters. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v. 62, p. 201-8, 1992.
- YUYAMA, L. K. O.; FÁVARO, R. M. D.; YUYAMA, K.; VANNUCCHI, H. Bioavailability of vitamin A from peach palm (*Bactris gasipaes* H. B. K.) and from mango (*Mangifera indica* L.) in rats. *Nutr. Res.*, New York, v. 11, n. 10, p. 19-26, 1991.

Recebido para publicação em 31/08/2000