UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Estudo da absorção aparente da clorofila do espinafre
em ensaio com cães**

Tais Motta Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez

São Paulo
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Estudo da absorção aparente da clorofila do espinafre
em ensaio com cães**

Tais Motta Fernandes

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez

São Paulo

2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010965

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fernandes, Tais Motta

F363e Estudo da absorção aparente da clorofila do espinafre em
ensaio com cães / Tais Motta Fernandes. -- São Paulo, 2005.
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Lanfer Marquez, Ursula Maria

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2.
Biodisponibilidade : Nutrição experimental I. T. II. Lanfer
Marquez, Ursula Maria. Orientador.

641.1 CDD

Tais Motta Fernandes

**Estudo da absorção aparente da clorofila do espinafre
em ensaio com cães**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez
orientador/presidente**

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 22 de agosto de 2005.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Ursula Maria Lanfer Marquez, pela constante orientação na elaboração deste trabalho, por apresentar-se sempre receptiva às idéias e discussões e pela permanente confiança no meu desempenho, cujo incentivo me levou ao envolvimento com a pesquisa.

Aos professores membros da banca de qualificação pela colaboração muito valiosa.

À Empresa Socil Evialis, através dos diretores Denis Arroyo e Fabio Torreta, que permitiram a minha vinda à USP e iniciação no mestrado.

Ao Canil Ricarlos, através dos proprietários Carlos e Riberto, pela realização dos ensaios biológicos.

As empresas Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda e JB Química pelo fornecimento de amostras de Clorofilina Cúprica e Óxido de cromo.

A todas as companheiras e amigas do laboratório de Análise de Alimentos pela amizade e agradável convivência, sempre dispostas a colaborar.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pelo ensinamento.

À Bárbara, por sua incansável ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP pela colaboração.

À bibliotecária Leila Bonadio, da biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos meus familiares e a Eli, pela força e carinho.

Ao Fábio, pela compreensão, amor e incentivo constante ao longo de todos estes anos.

Aos meus pais, Kátia e Valdir, pelo apoio e confiança nas minhas escolhas da vida. Minhas conquistas a cada dia são conseqüências de seus ensinamentos. Hoje, tantas vitórias, dedico a vocês.

A Deus, por estar sempre ao meu lado ajudando a traçar os caminhos da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE QUADROS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ANEXOS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - Clorofila e derivados: estrutura química e ocorrência.....	3
2.2 - Degradação da clorofila.....	7
2.2.1 - Degradação da clorofila em vegetais senescentes.....	8
2.2.2 - Degradação da clorofila durante o processamento e estocagem dos alimentos.....	12
2.2.3 - Degradação da clorofila após ingestão por animais	16
2.3 - Extração e análise da clorofila e derivados	18
2.4 - Propriedades funcionais atribuídas à clorofila	21
2.4.1 - Atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante.....	21
2.5 - Absorção da clorofila	27
2.6 - Comparação da fisiologia gastrointestinal do cão e do homem.....	31
3 - OBJETIVO.....	35
4 - MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 – Material.....	36
4.1.1 – Amostras	36
4.1.1.1 - Espinafre	36
4.1.1.2 - Clorofilina cúprica.....	37

4.1.1.3 - Rações	37
4.1.2 - Reagentes e outros materiais	38
4.1.3 - Animais	39
4.2 - Métodos.....	40
4.2.1 - Ensaio biológico.....	40
4.2.1.1 - Excreção fecal de clorofila e derivados.....	40
4.2.1.2 - Determinação da digestibilidade de clorofila e derivados.....	42
4.2.1.3 - Determinação da digestibilidade protéica.....	42
4.2.1.4 - Detecção da clorofila e derivados no sangue.....	43
4.3 - Métodos Analíticos	44
4.3.1 - Análise dos pigmentos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
4.3.1.1 - Extração dos pigmentos.....	44
4.3.1.2 - Condições cromatográficas.....	47
4.3.1.3 - Identificação e quantificação dos principais pigmentos.....	49
4.3.2 - Determinação do cromo nas fezes	53
4.4 - Teste de recuperação da clorofilina cúprica no material fecal.....	54
 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 – Identificação e quantificação dos principais pigmentos no espinafre e na ração.....	56
5.2 – Alteração dos pigmentos verdes no trato gastrointestinal.....	62
5.2.1 – Identificação e quantificação dos principais pigmentos nas fezes	62
5.3 – Absorção aparente da clorofila e derivados e digestibilidade protéica	65
5.3.1 – Ensaio de digestibilidade.....	66
5.4 – Detecção da clorofila e derivados no sangue	68
5.5 – Absorção aparente da clorofilina	70
 6 - CONCLUSÕES.....	74
 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos cloroplastos.....	4
Figura 2 - Estrutura química das clorofilas a e b.....	5
Figura 3 - Estrutura química da clorina e_4 e clorina e_6	6
Figura 4 - Esquema geral das transformações da clorofila e seus derivados.....	7
Figura 5 - Mecanismo de degradação da clorofila a em tecidos vegetais..	10
Figura 6 - Espectro de absorção da clorofila a, clorofila b e carotenóides..	19
Figura 7 - Fluxograma de extração dos pigmentos verdes.....	46
Figura 8 - Curva padrão da clorofila a em 432 nm.....	51
Figura 9 - Curva padrão da clorofila b em 432 nm.....	51
Figura 10 - Curva padrão da feofitina a em 410 nm.....	52
Figura 11 - Curva padrão da feofitina b em 432 nm.....	52
Figura 12 - Curva padrão do cromo em 440 nm.....	54
Figura 13 - Curva padrão da clorofilina cúprica em 400 nm.....	55
Figura 14 - Cromatograma do extrato de espinafre: (a) 410 nm, (b) 432 nm. A: luteína; B: clorofila b; C: clorofila a; D: feofitina a.....	57
Figura 15 - Espectro de absorção visível: (A) luteína; (B) clorofila b; (C) clorofila a; (D) feofitina a.....	58
Figura 16 - Cromatograma do extrato obtido a partir da ração teste: (a) 410 nm, (b) 432 nm. A: luteína; B: clorofila b; C: clorofila a; D: feofitina a.....	59
Figura 17 - Cromatograma representativo dos extratos de fezes: (a) 410 nm, (b) 432 nm. A: luteína; B: feofitina b; C: feofitina a	63

Figura 18 - Comparação entre a quantidade de clorofilina adicionada às fezes e a quantidade recuperada após extração.....	72
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Via de formação das piroclorofilas e outros derivados em folhas de espinafre durante aquecimento.....	16
Quadro 2 - Composição química da ração comercial.....	38
Quadro 3 - Gradiente de eluição.....	48
Quadro 4 - Condições cromatográficas.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identificação dos animais.....	39
Tabela 2 -	Características das curvas padrão dos principais pigmentos.....	50
Tabela 3 -	Tempos de retenção dos pigmentos encontrados no extrato de espinafre.....	57
Tabela 4 -	Concentração dos principais pigmentos no espinafre.....	60
Tabela 5 -	Perfil quantitativo dos principais pigmentos encontrados na ração.....	61
Tabela 6 -	Quantidade dos principais pigmentos verdes e de cromo nas amostras de fezes dos animais do grupo teste.....	64
Tabela 7 -	Razão entre a quantidade total de pigmentos e de cromo em pool de fezes dos animais do grupo teste, coletads em três dias alternados.....	65
Tabela 8 -	Absorção aparente da clorofila e derivados e da proteína.....	66
Tabela 9 -	% de clorofilina recuperada nas fezes em função da razão fezes/clorofilina.....	71

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal	
	(protocolo nº56).....	87
Anexo 2 -	Carta da Comissão de Ética em Experimentação Animal	
	(adendo ao protocolo nº56).....	88

RESUMO

O interesse pela clorofila vem crescendo recentemente devido a divulgação de dados que atribuem a esta substância muitos efeitos benéficos à saúde, introduzindo a possibilidade desta molécula oferecer proteção contra o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas e cânceres, agindo como um antioxidante e inibindo a mutagênese. Entretanto, as evidências científicas destas ações são ainda controversas. Perguntas estão surgindo a cerca do local de ocorrência de tais propriedades, se no intestino, antes da absorção, ou se devido a uma ação sistêmica, após absorção. O objetivo deste trabalho foi estudar as mudanças químicas da clorofila durante sua passagem pelo trato gastrointestinal, a absorção aparente e a detecção de derivados da clorofila no sangue. O estudo foi realizado durante 10 dias com 12 cães (*Canis familiaris*) divididos em 2 grupos. O grupo controle recebeu uma dieta comercial atendendo as exigências nutricionais, enquanto que o grupo teste recebeu a mesma dieta adicionada de 0,8% de espinafre liofilizado e 0,35% de óxido do cromo (como um indicador não absorvível). Foi realizada coleta parcial das fezes e após análise, a absorção aparente foi calculada. Em um segundo ensaio, o sangue foi coletado em 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos após a ingestão da dieta que continha 10% de espinafre liofilizado. Os pigmentos do espinafre, da dieta, das fezes e do sangue foram extraídos com acetona 80%, isolados e quantificados por CLAE. Os resultados mostraram que a feofitinação foi a via predominante. Somente feofitinas a e b foram encontradas nas fezes. A absorção aparente da clorofila variou entre 4 e 6%. Entretanto, não foi possível detectar a presença de clorofila nem de seus derivados no plasma sanguíneo. Estes achados sugerem que os eventuais efeitos benéficos da clorofila devem ocorrer predominantemente no intestino e caso haja alguma passagem para o sangue, esta molécula parece ser rapidamente metabolizada a fim de prevenir efeitos tóxicos relacionados com a atividade fotossintética.

ABSTRACT

In recent years there has been a growing interest on chlorophyll due to disclosing reports attributing to this substance manifold health benefits, introducing the possibility of this molecule protecting against the development of chronic-degenerative diseases and cancer, acting as an antioxidant and by inhibition of mutagenesis. However, the scientific evidences of these actions are still controversial. Questions have been raised about where these properties take place, if in the gut before absorption or if they are due to a post-absorption systemic action. The purpose of this research was to study the chemical changes of chlorophyll during its passage through the gastrointestinal tract, the apparent absorption and the appearance of any chlorophyll derivative in blood. The study was carried out during 10 days in twelve dogs (*Canis familiaris*) divided into 2 groups. The control group received a commercial diet attending their nutritional requirements, while the test group received the same diet to which 0.8% of freeze-dried spinach and 0.35% of chromium oxide (as a non-absorbable indicator) were added. Partial collection and analysis of excreta was carried out and apparent absorption was calculated. In a second experiment, blood was collected at 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 150 min after the intake of the diet, which contained 10% freeze-dried spinach. Pigments in spinach, diet, excreta and blood were extracted with 80% acetone, isolated and quantified by HPLC. The results showed that pheophytinization was the predominant pathway. Only pheophytins a and b were found in excreta. Apparent absorption of chlorophyll ranged from 4 to 6%. However, it was not possible to detect the presence of chlorophyll or any of its metabolites in blood plasma. These findings suggest that eventual beneficial effects of chlorophyll may occur predominantly in the gut and in case that some uptake occurs, the molecule seems to be metabolized fast enough in order to prevent toxic photosynthetic activity related effects.

1 - INTRODUÇÃO

Uma das discussões mais atuais na área de alimentos é a relação entre nutrição e saúde. O rápido e grande acúmulo de dados de pesquisas científicas nos últimos anos têm fortalecido a associação entre a prevenção de certas doenças e o consumo de alimentos vegetais, ricos em substâncias com ação biológica.

As atividades benéficas de compostos fenólicos, pigmentos, tais como carotenóides, antocianinas e muitas outras substâncias, já comprovadas por ensaios clínicos, são a prova disto.

Com o crescimento explosivo dos “alimentos funcionais”, um grande número de substâncias com atividades biológicas está sendo apresentado para o mercado, porém, o maior desafio do momento está em estabelecer simultaneamente, a atividade biológica e as propriedades biofarmacêuticas, como estabilidade química, absorção, toxicidade, entre outras.

Os estudos de biodisponibilidade de “alimentos funcionais” têm evoluído recentemente e os resultados serão de extrema importância para a definição de dose x efeito.

Atualmente, muito se tem propagado na mídia a respeito da clorofila, conhecida neste meio como “o verde mágico da natureza”. Muitos são os benefícios atribuídos a ela, tais como: prevenção de doenças coronarianas e de certos cânceres, atividade antimutagênica e antioxidante, entre outras, embora o reconhecimento científico dessas propriedades seja bastante controverso.

Ao contrário da maioria das substâncias fitoquímicas que são encontradas nos vegetais comestíveis em concentrações insuficientes para resultar em algum efeito biológico mensurável, a clorofila é encontrada em abundância na natureza.

Contudo, pouco se conhece sobre suas eventuais atividades biológicas, e as informações referentes à digestão, absorção e metabolização destes pigmentos no organismo animal ainda são muito limitadas.

O conhecimento sobre os metabólitos da clorofila e a relação existente entre a sua estrutura molecular e funções biológicas são extremamente fragmentados. O destino da clorofila no corpo humano permanece inexplorado. Por esta razão, maiores estudos sobre a absorção e metabolização da clorofila são importantes para auxiliar na elucidação do verdadeiro impacto desta classe de fitoquímicos na saúde humana.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Clorofila e derivados: estrutura química e ocorrência

A clorofila é o pigmento mais abundante na natureza. Está presente em quase todas as plantas, exceto em formas muito simples e primitivas. A biossíntese de clorofila está estimada em 1,2 bilhões de toneladas por ano, onde 25% são de origem terrestre e 75% de origem marinha (HUMPHREY, 2004). A clorofila foi primeiramente documentada em 1818, em um estudo sobre a cor das folhas e isoladas em 1873 (SCHWARTZ; LORENZO, 1990).

A clorofila é o pigmento responsável pela fotossíntese, o processo que converte a energia da luz solar em energia química, na forma de dois produtos ricos em energia, o ATP e o NADPH, ou seja, na presença de luz são formados carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), com liberação de moléculas de oxigênio (O_2) (GROSS, 1991). A função da clorofila na fotossíntese é universalmente conhecida, porém, a sua biossíntese e o seu destino final na senescência ainda não foram totalmente elucidados (HUMPHREY, 2004).

Nas plantas superiores a clorofila está localizada em organelas celulares denominadas de plastídeos ou cloroplastos, de tamanho microscópico. Os cloroplastos estão envolvidos por um envelope, formado por duas membranas lipoprotéicas, que atuam como uma barreira seletiva ao transporte de vários metabólitos para dentro e fora dos cloroplastos. No compartimento interno, há uma matriz, o estroma, onde se encontram muitas vesículas ou sacos achatados, chamados de tilacóides, que também são revestidos por uma membrana. A clorofila

encontra-se incrustada nestas membranas tilacóides, que usualmente são arranjadas em pilhas denominadas de grana, intimamente associadas com outros componentes lipofílicos e proteínas (GROSS, 1991) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura dos cloroplastos

Nos vegetais superiores existem duas formas de clorofila, clorofila a e b, na razão aproximada de 3:1. Algas e bactérias fotossintéticas apresentam tipos diferentes de clorofilas (GROSS, 1991).

Quimicamente, a clorofila é uma porfirina na forma de diéster, formada por quatro anéis pirrólicos, coordenados com um íon de magnésio (Mg^{2+}) e possui um quinto (V) anel isocíclico, localizado ao lado do terceiro (III) anel pirrólico. No quarto (IV) anel, a carbonila é esterificada com álcool isoprenóide monoinsaturado, fitol ($C_{20}H_{39}OH$), que representa o lado hidrofóbico da molécula, sendo o resto da molécula hidrofílico. A presença do fitol confere à clorofila uma característica apolar

alimentar e também nas pesquisas, como modelo para o estudo da clorofila (INOUE *et al.*, 1994).

As preparações comerciais de clorofilina compreendem uma mistura de ácidos, mono, di e tricarboxílicos (Figura 3). A composição depende da fonte utilizada para a obtenção da clorofilina (ex.: alfafa, algas, espinafre, etc.) e os derivados mais encontrados são clorina e_4 e clorina e_6 (DASHWOOD, 1997).

Figura 3 - Estrutura química da clorina e_4 e clorina e_6

2.2 - Degradação da clorofila

A clorofila é susceptível a diversas reações de degradação, tanto químicas como enzimáticas. A ação de ácidos, oxigênio, luz e calor podem formar um grande número de produtos de degradação (MANGOS; BERGER, 1997). O átomo central de magnésio é facilmente removido, principalmente em condições ácidas, sendo substituído por hidrogênio, formando as feofitinas. A hidrólise do grupo fitol das feofitinas dá origem aos feoforbídeos. A clivagem do grupo fitol, geralmente catalisada enzimaticamente pela clorofilase endógena, mas sem a remoção do átomo de magnésio, produz os clorofilídeos. A epimerização no C₁₀, induzida por aquecimento brando, forma os isômeros a' e b', que são também denominados de 10-epiclorofilas, e apresentam o mesmo espectro de absorção que os pigmentos que lhe deram origem. O prolongamento do aquecimento causa uma descarbometoxilação no C₁₀, dando origem aos "piro" derivados (SCHWARTZ; LORENZO, 1990) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema geral das transformações da clorofila e seus derivados

2.2.1 - Degradação da clorofila em vegetais senescentes

Senescência é o termo que representa um conjunto de mudanças deteriorativas controladas endogenamente, que resultam na morte natural de células, tecidos e órgãos e também na degradação da clorofila. Fatores externos como estresse hídrico, redução da luz e mudanças na temperatura podem contribuir para a degradação da clorofila. Como exemplo, é possível observar mudanças na coloração dos pigmentos durante o amadurecimento dos frutos e no período de senescência das plantas (HEATON; MARANGONI, 1996).

O catabolismo da clorofila e dos carotenóides durante a senescência é acompanhado pela degradação de organelas celulares, especialmente os cloroplastos, observando-se mudanças estruturais (HEATON; MARANGONI, 1996; SUSUKI; SHIOI, 2004). Geralmente, a degradação dos carotenóides é mais lenta do que a degradação da clorofila e é possível identificar a presença de ésteres de xantofilas em folhas senescentes (HEATON; MARANGONI, 1996).

O processo de degradação da clorofila ocorre por uma seqüência de ações enzimáticas, químicas ou ambas. O processo inicial da degradação resulta em catabólitos coloridos, verde-amarronzados. Embora bilhões de toneladas de clorofila sejam degradadas todos os anos no outono, principalmente em países de clima frio, somente recentemente foi descoberto que o processo final de degradação da clorofila envolve a formação de catabólitos incolores, fluorescentes e não fluorescentes, que se acumulam nos vacúolos das células. A diferença entre os fluorescentes e não-fluorescentes está na localização das duplas ligações dos anéis pirrólicos (GANDUL-ROJAS; ROCA; MINGUEZ-MOSQUERA, 2004).

A degradação da clorofila tem por objetivo aumentar a solubilidade dos pigmentos e abolir as suas propriedades fotodinâmicas, podendo ser considerado um processo de detoxificação (HEATON; MARANGONI, 1996; HÖRTENSTEINER, 2004).

Resumidamente, a degradação da clorofila nos vegetais pode ser descrita da seguinte forma: a enzima clorofilase é responsável pela defitilação (remoção do fitol), transformando as clorofilas em clorofilídeos; a Mg-dequelatase elimina o magnésio e produz as feofitinas e os feoforbídeos; a feoforbídeo a oxigenase, conduz à abertura oxigenolítica do anel tetrapirrólico, formando os catabólitos vermelhos, conhecidos como “red chlorophyll catabolites” (RCC), que darão origem aos compostos incolores, fluorescentes e não fluorescentes, através das enzimas RCC redutase e oxigenase, como pode ser observado na figura 5. Nos vegetais é possível ainda identificar outros catabólitos, mas suas implicações no metabolismo vegetal permanecem desconhecidas (GANDUL-ROJAS; ROCA; MINGUEZ-MOSQUERA, 2004).

Figura 5 - Mecanismo de degradação da clorofila *a* em tecidos vegetais

A presença de clorofilas oxidadas em certos estágios do desenvolvimento de frutos e vegetais sugere que uma oxidação direta da clorofila pode estar envolvida

no seu catabolismo, juntamente com a rota de degradação iniciada pela clorofilase. Nesta degradação oxidativa tem sido observado, em estudos *in vitro*, o envolvimento de três tipos de enzimas (clorofila oxidase, lipoxigenase e peroxidase), entretanto, não há concordância sobre o tipo de participação destas enzimas na degradação dos pigmentos. Não está claro se estas enzimas trabalham independentemente ou em conjunto com a clorofilase (GANDUL-ROJAS; ROCA; MINGUEZ-MOSQUERA, 2004).

A liberação de ácidos graxos a partir das moléculas dos triacilgliceróis pela ação da lipase facilita o processo oxidativo (SUSUKI; SHIOI, 2004). Gandul-Rojas, Roca e Minguez-Mosquera (2004), identificaram a 13²-hidroxiclorofila a e 13²-hidroxiclorofila b como os primeiros catabólitos na reação oxidativa da clorofila.

A degradação da clorofila e carotenóides pode ocorrer durante a indução da senescência no escuro. Neste caso, a metabolização dos pigmentos fotossintéticos é presumivelmente decorrente da ação de enzimas. Susuki e Shioi (2004), analisando os pigmentos extraídos de rabanetes durante várias fases do período de senescência, induzida no escuro, identificaram a presença de derivados da clorofila, como clorofilídeo, feofitina a e b, porém, não identificaram a presença de feoforbídeos e pirofeoforbídeos, indicando que o *turnover* dos feoforbídeos em rabanetes deva ser extremamente rápido, impossibilitando o acúmulo dos mesmos.

O acúmulo de catabólitos fotoreativos produz espécies reativas de oxigênio, induzindo a morte celular. Portanto, o metabolismo funcional da clorofila, como biossíntese, *turnover* e degradação são importantes para a prevenção do acúmulo de intermediários fotodinâmicos. As propriedades fotodinâmicas da clorofila, que possibilitam a conversão da energia luminosa em energia química durante a fotossíntese, podem se tornar uma ameaça durante a senescência, portanto, em

paralelo ao mecanismo da fotossíntese, as plantas desenvolveram um mecanismo para a detoxificação da clorofila (HÖRTENSTEINER, 2004).

Estudos realizados com tecidos de plantas geneticamente modificados, para prevenir ou minimizar a degradação da clorofila, mostraram que a retenção da clorofila está associada à preservação da ligação clorofila-proteína e à inibição do catabolismo dos lipídeos da membrana tilacóide (HEATON; MARANGONI, 1996).

2.2.2 - Degradação da clorofila durante o processamento e estocagem dos alimentos

A aparência é um dos mais importantes critérios de qualidade que o consumidor dispõe na hora da decisão da compra. Desde o início do processamento do alimento, na cozinha ou na indústria, existe o desejo de manter as cores naturais do alimento a ser processado (COULTATE, 2004).

Os consumidores observam a cor dos vegetais como um indicador de “frescor”. Os ingredientes e as condições de processamento dos alimentos influenciam diretamente na degradação da clorofila. A perda da clorofila nos alimentos processados causa mudança na coloração e a conversão da clorofila em feofitina e feoforbídeo resulta em mudança do verde brilhante para verde oliva escuro ou amarelo oliva e isto é visto pelos consumidores como perda da qualidade (GAUTHIER-JAQUES *et al.*, 2001).

O passo inicial da degradação da clorofila em alimentos processados é o rompimento do tecido por forças externas e isto resulta em mudanças químicas e

enzimáticas que levam a uma redução na concentração da clorofila (HEATON; LENCKI; MARANGONI, 1996; HEATON; MARANGONI, 1996).

Durante o corte, cozimento ou congelamento dos vegetais ocorre liberação de ácidos e enzimas intracelulares que podem estabelecer um contato direto com o complexo clorofila-proteína e este contato, bem como a injúria física ao tecido vegetal, podem iniciar a degradação da clorofila. Assim, os produtos da degradação diferem entre alimentos processados (ex. ervilha enlatada) e minimamente processados (ex.: salada fresca empacotada). A inativação enzimática nos alimentos processados resulta em degradação da clorofila causada somente por fatores químicos. Por outro lado, em alimentos minimamente processados, ainda há atividade metabólica, e a degradação da clorofila é decorrente principalmente da ação enzimática (HEATON; MARANGONI, 1996).

A feofitinização (perda do íon magnésio) e epimerização (mudança na conformação da molécula) são observadas durante o aquecimento, e se este for prolongado, pode levar a descarbometoxilação (perda do grupamento CO_2CH_3), também observada em vegetais enlatados. A defitilação da clorofila (perda do grupo fitol) ocorre por via enzimática tanto durante a fermentação como estocagem dos alimentos. A alomerização (adição de oxigênio no anel isocíclico) é observada durante o processo de fervura dos alimentos (GAUTHIER-JAQUES *et al.*, 2001).

Heaton e Marangoni (1996) em uma revisão reportaram o acúmulo de diferentes catabólitos da clorofila em função da estocagem e/ou processamento dos alimentos, sendo que os catabólitos formados e a velocidade de formação variaram de alimento para alimento e foram pH dependentes. A feofitina foi o primeiro catabólito identificado em pH inicial de 4,8 em salada de repolho cru finamente

cortado, enquanto que o clorofilídeo foi o catabólito inicial formado em pH 7,0 durante a salmoura de azeitonas verdes.

A dependência do meio ácido e/ou calor para a conversão da clorofila em feofitina tem estimulado uma série de investigações para preservar a cor verde nos vegetais, através do controle do pH ou minimizando a exposição ao calor, com a utilização de altas temperaturas por curto tempo ou até mesmo combinando alta temperatura, processamento rápido e ajustes de pH. Muitos destes procedimentos provaram ser útil na retenção da clorofila imediatamente após o processamento, porém, a clorofila retida era degradada rapidamente durante a estocagem (SCHWARTZ; LORENZO, 1990).

A conversão da clorofila para feofitina pode ser retardada quando a umidade contida nos vegetais é reduzida ou quando a atividade de água é baixa. Em amostras de espinafre seco congelado, com um valor de atividade de água menor que 0,32, a velocidade de formação da feofitina foi muito lenta (SCHWARTZ; LORENZO, 1990).

Muitos estudos referentes à degradação da clorofila vêm sendo realizados com espinafre devido à sua alta concentração e fácil extração. O espinafre (*Spinacia oleracea*) contém ao redor de 150 mg de clorofila por 100g de folhas frescas (GROSS, 1991).

Em um estudo realizado por Teng e Chen (1999), nenhum derivado da clorofila foi observado nas folhas frescas do espinafre e os principais derivados do espinafre formados durante o tratamento por calor seco e cozimento em água fervente compreenderam os epímeros da clorofila e as feofitinas. Piroclorofilas a e b foram detectadas em folhas de espinafre após cozimento a vapor por 30 minutos ou cozimento por microondas por 1 minuto. Pirofeofitinas não foram formadas até o

cozimento a vapor ou o cozimento por microondas alcançar 30 ou 5 minutos, respectivamente.

Na presença de calor e umidade há liberação de ácidos orgânicos da matriz das folhas de espinafre, facilitando a formação de feofitinas. Na presença de calor, porém na ausência de umidade, a matriz é desidratada e uma quantidade menor de ácidos orgânicos fica disponível para a formação das feofitinas (TENG; CHEN, 1999).

Schwartz e Elbe (1983) demonstraram que as pirofeofitinas a e b são os principais derivados da clorofila do espinafre após processamento térmico com altas temperaturas.

Yamauchi e Watada (1991), demonstraram que os níveis de clorofilas a e b, em espinafre mantido a 1°C durante seis dias de armazenamento, não se alteraram. Por outro lado, quando mantidos a 25°C por quatro dias, a clorofila diminuiu gradativamente até 65% do nível original.

O quadro 1 indica a via de formação das piroclorofilas e outros derivados durante o cozimento de folhas de espinafre (TENG; CHEN, 1999).

Quadro 1 - Via de formação das piroclorofilas e outros derivados em folhas de espinafre durante aquecimento (adaptado de TENG; CHEN, 1999)

2.2.3 - Degradação da clorofila após ingestão por animais

Embora muitos estudos têm sugerido benefícios à saúde provindos dos derivados da clorofila, informações sobre a digestão, absorção e metabolização destes pigmentos são muito limitadas (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2001). A clorofila, além das mudanças causadas pelo processamento e armazenamento dos alimentos, é susceptível a modificações durante o processo digestivo,

particularmente nos grupos periféricos do anel macrocíclico, o que dificulta a identificação dos produtos formados (MA; DOLPHIN, 1999).

A clorofila a, que representa aproximadamente 75% dos pigmentos verdes das plantas, é extremamente sensível a várias reações, como já foi dito anteriormente, destacando-se a perda do íon magnésio. Em herbívoros terrestres e animais aquáticos que se alimentam de algas, o meio ácido do estômago favorece a remoção do íon magnésio e o grupo fitol permanece ligado à molécula após o processo digestivo, formando feofitina (MA; DOLPHIN, 1999).

Ferruzzi, Failla e Schwartz (2001), empregando um método de digestão *in vitro*, simularam a degradação da clorofila durante a digestão. A fase gástrica envolveu acidificação das amostras com ácido clorídrico e adição de pepsina. A fase intestinal iniciou-se com a neutralização das amostras com bicarbonato de sódio e posterior adição de pancreatina, lipase e extrato de bile de porco. Os autores demonstraram que a clorofila proveniente do purê de espinafre foi transformada em feofitina durante o processo digestivo, ao contrário do que foi observado com a Zn-feofitina, um complexo formado entre moléculas de feofitina e zinco, que permaneceu estável. Aproximadamente 76% do total de derivados da clorofila foram recuperados na forma de feofitina a e a'. Níveis elevados de feofitinas alomerizadas (hidroxifeofitina a e b) também estavam presentes após a digestão.

Estes mesmos autores, estudando o efeito do pH na conversão da clorofila em seus derivados, observaram que a clorofila é estável durante incubação em pH 6,0 por 1 hora e uma conversão mínima (6%) de clorofilas a e b em feofitinas a e b foi observada em pH 4,0. Contudo, a conversão foi quase completa (95%) após incubação em pH 2,0 por 30 minutos. Estes resultados mostram que a feofitinização deve ocorrer no estômago em condições fisiológicas, mas pode ser menor em casos

de hipocloridria. Os autores consideram pouco provável que ocorra a clivagem do fitol para a produção de feoforbídeos durante a digestão, confirmando assim os resultados obtidos por Ma e Dolphin (1999).

Ferruzzi, Failla e Schwartz (2002) também estudaram a estabilidade da clorofilina, o derivado hidrossolúvel da clorofila, durante a simulação *in vitro* da digestão gástrica e intestinal. A clorina e_4 , um dos principais componentes da clorofilina, foi relativamente estável durante a digestão, enquanto que mais que 90% da clorina e_6 , outro componente da clorofilina, foi degradado em produtos não identificados. A recuperação da clorina e_6 foi maior quando a clorofilina foi incorporada a uma matriz (purê de maçã), sugerindo que a matriz pode desempenhar um importante papel de proteção para a estabilização deste componente.

2.3 - Extração e análise da clorofila e derivados

Pigmentos como a clorofila, apresentam um caráter hidrofóbico e são geralmente extraídos por solventes orgânicos. A extração deve ser cuidadosa com a finalidade de minimizar os efeitos causados pela presença de luz, ácidos e calor e o processo deve ser repetido várias vezes até que o tecido não apresente mais cor (GROSS, 1991; SCHOEFS, 2004).

A análise e quantificação das clorofilas e seus derivados presentes em extratos vegetais é difícil devido a grande quantidade de componentes. Métodos espectrofotométricos são os mais simples, porém, há uma grande limitação devido à sobreposição do perfil de absorção de cada composto (Figura 6). Inúmeras

equações foram desenvolvidas para a quantificação de cada componente numa mistura, mas os resultados, na maioria das vezes, são questionáveis (SCHOEFS, 2004).

Por esta razão a clorofila e seus derivados são geralmente separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel utilizada para separação das moléculas hidrofóbicas é constituída de solventes orgânicos, enquanto para moléculas polares, defitiladas, é recomendada a utilização de um solvente polar orgânico, misturado com uma pequena quantidade de água (SCHOEFS, 2004).

Figura 6 - Espectro de absorção da clorofila a, clorofila b e carotenóides

A identificação de cada pigmento é baseada no tempo de retenção na separação por CLAE e confirmada pelos espectros de absorção e de massa (YAMAUCHI; WATADA, 1991). Os tempos de retenção dos derivados piroclorofila e pirofeofitina são maiores do que o da clorofila e o da feofitina, respectivamente. Isto

ocorre devido à eliminação do grupo carbometoxila, reduzindo a polaridade destes pigmentos e resultando em uma maior interação com a fase estacionária (TENG; CHEN, 1999).

A clorofila é verde porque absorve luz vermelha e azul-violeta (GROSS, 1991). Os comprimentos de onda exatos da absorção máxima não são definidos facilmente, eles variam dependendo do solvente orgânico usado e da presença de traços de umidade (COULTATE, 2004). O comprimento de onda mais apropriado para a detecção simultânea da clorofila e seus derivados é 430nm (TENG; CHEN, 1999). A presença do grupo aldeído na clorofila b e em seus derivados aumenta a polaridade em relação à clorofila a e seus derivados, o que é demonstrado por um menor tempo de retenção no cromatograma (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2001).

O espectro de absorção da clorofila e de seus derivados pode ser atribuído à estrutura porfirínica primária, portanto, a epimerização no C-10 ou a descarbometoxilação não altera a cor dos vegetais (TENG; CHEN, 1999).

Para quantificação, o detector de arranjos de fotodiodos oferece grande sensibilidade, porém, há uma dificuldade em encontrar soluções padrão no mercado. Decorrente disto, os pesquisadores vem desenvolvendo técnicas de purificação e caracterização dos pigmentos para que estes possam ser utilizados como padrões (HUMPHREY, 2004).

2.4 - Propriedades funcionais atribuídas à clorofila

2.4.1 - Atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante

Em áreas urbanizadas, devido à influência da mídia e de tradições locais, o interesse dos consumidores vem aumentando quando o assunto se refere à importância dos alimentos na promoção da saúde. É possível encontrar no comércio uma variedade de produtos conhecidos como naturais e com benefícios para a saúde, porém, pouco se sabe sobre a composição, segurança e atividade da maioria (LAJOLO, 2002).

Ao contrário de grande parte das substâncias fitoquímicas encontradas nos vegetais comestíveis em concentrações insuficientes para resultar em algum efeito biológico mensurável, a clorofila está presente em quantidades elevadas. Dessa forma, não faltam divulgações nos meios de comunicação de que grande parte dos benefícios para a saúde humana poderia ser atribuída à clorofila. Porém, existem poucos trabalhos científicos que confirmam que a ingestão de clorofila está associada com algum efeito benéfico sobre a saúde humana (LANFER-MARQUEZ, 2003).

Se realmente houver algum efeito benéfico que pode ser atribuído à clorofila, seria importante saber se esta ação ocorre em estágio pré-absortivo, ou pós-absortivo. No último caso, é fundamental que ocorra a efetiva absorção no trato gastrointestinal, assunto este que permanece questionável no meio científico (LANFER-MARQUEZ, 2003).

Estudos *in vivo* relativos à atividade biológica da clorofila natural são escassos, fato justificado, de um lado pela instabilidade química da molécula e por

outro lado, pelo alto custo da clorofila purificada. Portanto, a maior parte dos trabalhos vem sendo realizada com a clorofilina comercial, mais barata e mais estável (DASHWOOD *et al.*, 1998).

O efeito anticarcinogênico da clorofilina foi detectado contra substâncias comprovadamente hepatocarcinogênicas, tais como a aflatoxina B₁ (AFB₁), uma micotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. O efeito quimiopreventivo contra a hepatocarcinogênese induzida por aflatoxina resulta em um decréscimo nos níveis de adutos de DNA hepáticos, sendo esta medida considerada um indicativo de proteção (GROOPMAN *et al.*, 1992).

A primeira evidência de que a clorofilina poderia atuar, não somente como um agente antimutagênico, mas também como um agente anticarcinogênico, foi revelada em um estudo com trutas, onde a clorofilina apresentou um efeito inibitório sobre a carcinogênese induzida pela aflatoxina B₁ avaliada pela redução na formação de adutos com o DNA (BREINHOLT *et al.*, 1995a).

Em uma revisão realizada por Waters e colaboradores (1996), foi verificado que a clorofilina apresenta um efeito antimutagênico contra uma variedade de agentes incluindo a aflatoxina B₁, hidrocarbonos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas e fumaça de cigarro. Nesta mesma revisão foi citado que a clorofilina apresentou um efeito antimutagênico mais efetivo que o retinol em estudo *in vitro*.

Harttig e Bailey (1998), também utilizando trutas como modelo animal, realizaram o primeiro estudo que demonstrou o potencial da clorofila proveniente de fontes dietéticas, como o extrato bruto de espinafre, na inibição da formação de adutos *in vivo*, entre o dibenzo[*a,l*]pireno (DBP) e o DNA.

Contudo, é necessário ter cautela ao extrapolar os dados obtidos com peixes para a nutrição humana. No intestino dos peixes ocorre absorção e transporte de

macromoléculas intactas em grande quantidade, o que não ocorre em mamíferos (HERNANDEZ-BLAZQUEZ; SILVA, 1998). O processo de absorção nos mamíferos é mais seletivo, não permitindo, em geral, o transporte de significativas quantidades de moléculas intactas, como a clorofila, que apresenta um peso molecular ao redor de 890 daltons (AURICCHIO; FERGUSON; TRONCONE, 1995).

Uma hipótese para o mecanismo anticarcinogênico da clorofila e derivados vem sendo demonstrada em estudos recentes. Esta consiste na formação de complexos moleculares entre a clorofila e carcinógenos aromáticos planares, ainda no lúmen intestinal. Ao formar tais complexos, a clorofila e seus derivados poderiam reduzir a biodisponibilidade destes compostos por agirem como moléculas interceptoras (BREINHOLT *et al.*, 1995b; DASHWOOD *et al.*, 1998; MATA *et al.*, 2004).

Segundo Dashwood (1997), duas forças estão envolvidas na formação destes complexos. A primeira envolve uma ligação do tipo Van der Waals, aproximando e sobrepondo o agente mutagênico e o agente inibidor. A segunda força envolve interações eletrostáticas ou pontes de hidrogênio entre o agente mutagênico e o grupo carboxila do agente inibidor.

Células intestinais humanas da linhagem Caco-2, por apresentarem características semelhantes aos enterócitos, são empregadas em estudos de absorção intestinal de muitas drogas lipofílicas, nutrientes e fitoquímicos. O modelo de células Caco-2 foi utilizado por Mata e colaboradores (2004) para avaliar a absorção de carcinógenos (AFB₁ e DBP), na presença de clorofilina. Os resultados mostraram que a absorção destes carcinógenos pode ser reduzida pela clorofilina, apoiando a hipótese de atuarem como moléculas interceptoras.

Estudos indicam que a estrutura macrocíclica tetrapirrólica intacta é a característica indispensável para a complexação não covalente dessa molécula com a aflatoxina B₁, numa estequiometria de aproximadamente 1:1, tornando a aflatoxina indisponível para formar adutos com o DNA (BREINHOLT *et al.*, 1995b).

Conforme já descrito, a clorofila pode ser convertida em feofitina, pirofeofitina e feoforbídeo em alimentos processados. Sendo assim, Chernomorsky, Segelman e Poretz (1999), realizaram um estudo utilizando feofitina, feoforbídeo e pirofeoforbídeo, para verificar os seus respectivos potenciais antimutagênicos, contra o 3-metilcolantreno (3-MC), um carcinógeno que se forma na gordura da carne em altas temperaturas. Todos os derivados apresentaram o mesmo efeito antimutagênico contra 3-MC, apoiando a hipótese de que o núcleo porfirínico seria importante, ou até imprescindível para se complexar diretamente com o agente mutagênico.

Outra teoria bastante conhecida para explicar a atividade antimutagênica está relacionada com o “reparo” do DNA, danificado por substâncias mutagênicas por intermédio de ligações cruzadas. Muitos agentes associados ao processo de ligação cruzada com o DNA são produzidos durante o metabolismo oxidativo e correspondem aos radicais livres do oxigênio (MURAKAMI; OHIGASHI; KOSHIMIZY, 1996).

Sato e colaboradores (1986) reportaram que a clorofilina apresentou atividade antioxidante *in vitro* por supressão da peroxidação lipídica em homogenatos de fígado de rato. Além disso, sugeriram que as clorinas, os principais derivados da clorofilina, foram responsáveis por atividade semelhante. A clorina e₄ foi identificada como o principal componente antioxidante encontrado nas soluções comerciais de clorofilina cúprica de sódio.

Kamat, Boloor e Devasagayam (2000) avaliaram *in vitro* e *ex vivo* o efeito da clorofilina contra danos a membrana por exposição de mitocôndrias do fígado de rato à radiação e a agentes indutores de estresse oxidativo, demonstrando que a clorofilina foi um antioxidante altamente efetivo. O mesmo grupo de pesquisadores, utilizando também mitocôndrias hepáticas de rato, examinaram *in vitro* o possível efeito preventivo da clorofilina na indução de dano oxidativo induzido pela radiação gama e pela fotossensibilização e observaram que a clorofilina ofereceu um grau maior de proteção quando comparado com antioxidantes convencionais como o ácido ascórbico e a glutatona (BOLOOR; KAMAT; DEVASAGAYAM, 2000).

A clorofilina foi testada também quanto à sua atividade protetora contra agentes carcinogênicos em ensaio com culturas de células ovarianas de hamster que foram incubadas com 6,25, 12,5 e 25 µg/mL de clorofilina. Os resultados mostraram que as células tratadas com clorofilina apresentaram uma redução no dano do DNA, previamente induzido por etil metano sulfonato. Esta redução foi calculada através da identificação de aberrações cromossômicas (NEGRAES *et al.*, 2004).

Kumar, Shankar e Sainis (2004), realizaram um estudo com linfócitos esplênicos de ratos para verificar o efeito da clorofilina contra o estresse oxidativo induzido por radiação e pelo composto 2,2'-azobis(2-propionimidinadihidrocloreto) (AAPH). Foi verificado que a clorofilina ofereceu proteção contra a peroxidação lipídica e a apoptose. O AAPH induziu um aumento significativo nos TBARS na ausência de clorofilina, porém, na sua presença, a concentração de TBARS mostrou um comportamento inversamente proporcional com a concentração de clorofilina.

Neste mesmo estudo, a presença de clorofilina resultou na supressão da mitogênese *in vitro* induzida por radiação (raios gama). Os níveis de espécies

reativas de oxigênio foram mensurados em células expostas à radiação ou ao AAPH, na presença ou ausência de clorofilina e os resultados mostraram que a clorofilina agiu efetivamente varrendo as espécies reativas de oxigênio geradas.

Ferruzzi e colaboradores (2002) testaram a capacidade antioxidante da clorofila natural e derivados, assim como da clorofilina comercial, através do método de captação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e ensaio de descoloração do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS•+). Foi verificado que a clorofilina apresentou maior capacidade antioxidante quando comparada às clorofilas naturais, sugerindo que este resultado pode estar relacionado com a substituição do magnésio pelo cobre e com a solubilidade da molécula.

Mais recentemente um outro estudo foi realizado com clorofila e seus derivados isolados (feofitina e feoforbídeo), e todos os pigmentos apresentaram atividade antioxidante dose-dependente quando avaliados pela metodologia do descoloramento do beta-caroteno em sistema de emulsão água/ácido linoléico. O feoforbídeo b e a feofitina b foram os compostos naturais que apresentaram maior atividade antioxidante neste sistema, comparável à atividade do BHT. Porém, vale ressaltar que a clorofilina apresentou atividade antioxidante superior a todas as clorofilas naturais. Comparando a metodologia da oxidação do ácido linoléico com o método do DPPH•, foi verificado que os pigmentos naturais apresentaram uma baixa atividade antioxidante, sugerindo que o mecanismo antioxidante da clorofila e derivados não parece estar associado a habilidade em doar hidrogênio, mas sim em oferecer proteção à oxidação do ácido linoléico e/ou prevenindo a decomposição dos hidroperóxidos (LANFER-MARQUEZ; BARROS; SINNECKER, 2005). Estes

resultados indicam a necessidade de se aplicar diferentes metodologias ao testar a atividade antioxidante de um composto, como já apontado por Aruoma (2003).

Enquanto diversos estudos têm demonstrado o potencial de proteção da clorofilina contra vários agentes mutagênicos e carcinogênicos, pouco se sabe sobre a habilidade da clorofilina na proteção contra danos ao DNA induzido por vírus. Botelho e colaboradores (2004), em um estudo utilizando culturas de células Hep-2, mostraram que houve uma redução no percentual de fragmentações nucleares em células infectadas com poliovírus, quando estas células foram tratadas com clorofilina antes da infecção, ou quando expostas continuamente a clorofilina após infecção. Entretanto, o maior grau de proteção foi obtido quando o vírus foi exposto a clorofilina antes da infecção, sugerindo que a mesma se liga ao vírus, inibindo sua penetração na célula, mantendo assim a integridade nuclear.

2.5 - Absorção da clorofila

O termo biodisponibilidade começou a ser utilizado na área de nutrição na década de 1980, a partir do conhecimento de que a simples presença do nutriente no alimento ingerido não garantia sua utilização pelo organismo. Inicialmente foi definido como a proporção do nutriente que é digerida, absorvida e metabolizada pelo organismo, capaz de estar disponível para uso ou armazenamento, ou seja, a proporção do nutriente que realmente é utilizada pelo organismo (COZZOLINO; MICHELAZZO, 2005).

Em 1984 foi proposta a diferença entre os termos absorção verdadeira e absorção aparente. Absorção aparente foi definida como a diferença entre o

conteúdo de nutrientes dos alimentos ingeridos e das fezes, enquanto que absorção verdadeira indica a proporção de nutrientes nos alimentos que se move do lúmen intestinal através da mucosa (COZZOLINO; MICHELAZZO, 2005).

O transporte de substâncias através da membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico. A absorção pode ocorrer através da membrana celular dos enterócitos (transporte transcelular) ou entre os enterócitos, através das *tight-junctions* (transporte paracelular) (BARTHE; WOODLEY; HOUIN, 1999; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Os únicos estudos encontrados referentes à absorção da clorofila e seus derivados em humanos são antigos e reportam baixos níveis de absorção (BRUGSCH; SHEARD, 1938; BAXTER, 1968), fato que, se for verdadeiro, dificulta qualquer ação da clorofila a nível sistêmico.

Brugsch e Sheard (1938) estudaram a degradação da clorofila no corpo humano, fornecendo a indivíduos saudáveis, cápsulas contendo 100 mg de clorofila por quatro dias. Contudo, o delineamento experimental e os resultados não permitem interpretação quanto à taxa de absorção, uma vez que a recuperação foi avaliada em diferentes frações das fezes após extração com éter e concentrações variáveis de ácido clorídrico. Os próprios autores discutem a possibilidade de ter ocorrido uma extração incompleta ou algum outro tipo de degradação, mas concluíram que a clorofila não é excretada sob a forma de porfirinas.

Baxter (1968), em seu estudo, isolou a clorofila e seus derivados em amostras biológicas humanas (fezes, sangue e urina). A feofitina marcada com ^{14}C foi extraída de folhas de tabaco e oferecida aos indivíduos misturada com óleo de milho e disperso sobre uma fatia de torrada. Foi demonstrado que 90 a 95% do material

radioativo se encontrava nas fezes, enquanto que somente 0,5% e 1% foram identificados no sangue e na urina, respectivamente.

Sato e colaboradores (1986) verificaram que a clorofilina, administrada por via intraperitoneal em ratos, foi carregada para dentro do fígado e distribuída entre mitocôndrias, microsomos e frações solúveis.

Egner e colaboradores (2000) conduziram um estudo clínico duplo cego e randomizado na China. Neste estudo os participantes receberam, durante quatro meses, diariamente, três comprimidos contendo placebo ou 100 mg de clorofilina. A identificação dos componentes clorina e_4 e éster etílico da clorina e_4 , conferindo uma cor verde ao soro dos indivíduos que ingeriram a clorofilina, forneceu a primeira evidência de que a clorina pode ser absorvida por humanos. Não foi identificada a presença da clorina e_6 , sugerindo uma degradação deste componente durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Embora este estudo seja o primeiro a fornecer evidências de que os derivados da clorofilina podem ser absorvidos por humanos, faltaram quaisquer informações relativas à condução do experimento, cinética de absorção e metabolização destes compostos bem como taxas de absorção, impossibilitando a reprodução do trabalho.

Células intestinais humanas da linhagem Caco-2, como já citado anteriormente, por apresentarem características semelhantes aos enterócitos, são empregadas em estudos de absorção intestinal. Utilizando este modelo, Ferruzzi, Failla e Schwartz (2001), estudaram a absorção intestinal de clorofila e carotenóides, utilizando purê de espinafre fresco, tratado com calor e ácido ou tratado com cloreto de zinco. Observaram que somente 5 a 10% da quantidade total de clorofila, presentes na fração micelar, foram acumuladas dentro das células, enquanto que 20 a 40% dos compostos carotenóides estavam presentes nas células.

Esta diferença entre clorofila e carotenóides pode ser o resultado de propriedades físico-químicas específicas da clorofila. Parâmetros como hidrofobicidade, ionização e tamanho molecular estão fortemente relacionados com a absorção intestinal. Em modelos experimentais como perfusão intestinal em ratos e células Caco-2, o aumento do peso molecular está relacionado com uma menor permeabilidade intestinal (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2001).

No ano seguinte, Ferruzzi, Failla e Schwartz (2002), realizaram outro estudo *in vitro*, porém, com a clorofilina. Células Caco-2 foram incubadas a 4°C e a 37°C, em um meio contendo 30 ppm de clorofilina. O meio foi removido, as células foram lavadas e a quantidade de clorofilina foi determinada em diferentes tempos (15, 30 e 60 minutos). A quantidade de clorofilina total (clorina e_4 + clorina e_6) encontrada nas células aumentou linearmente com o tempo quando as células foram incubadas a 37°C. Após uma hora as células apresentavam 10,3 µg de clorofilina total por mg de proteína celular. A quantidade de clorofilina encontrada nas células incubadas a 4°C, foi 75% menor quando comparada com as células incubadas a 37°C.

Neste mesmo estudo foi observado que a quantidade intracelular de clorofilina (µg de clorofilina total / mg de proteína celular) foi proporcional à quantidade de clorofilina presente no meio (µg de clorofilina total por mL do meio), após quatro horas de incubação. A quantidade de clorofilina encontrada nas células representou 45 a 60% da quantidade total adicionada ao meio. O acúmulo de clorofilina nas células Caco-2, através de um processo não saturado e temperatura dependente, sugere a possibilidade de haver transporte passivo e ativo através do epitélio intestinal.

Em um recente estudo, Kumar, Shankar e Sainis (2004), incubaram células esplênicas de camundongos, em soluções com diferentes concentrações de

clorofilina (10, 25 e 50 μM). Após 4 horas, as células foram lavadas e lisadas com água destilada. Após análise espectrofotométrica, em 408 e 630 nm, foi observado que a clorofilina estava presente nos lisados celulares, proporcionalmente à dose, enquanto que as células não tratadas com clorofilina, mostraram absorção insignificante nestes dois comprimentos de onda.

2.6 - Comparação da fisiologia gastrointestinal do cão e do homem

Embora haja algumas diferenças fisiológicas entre os animais e o homem, novos medicamentos e suplementos alimentares são freqüentemente avaliados em animais antes da administração destes em humanos (AKIMOTO *et al.*, 2000). Animais têm sido utilizados como modelos para estudos sobre a fisiologia, bioquímica, nutrição, farmacologia e toxicologia humana, sendo os animais mais comumente utilizados, os camundongos, ratos, porcos e cães. Embora o modelo com ratos seja freqüentemente utilizado devido ao seu baixo custo, os cães representam um modelo mais apropriado para pesquisas relacionadas a fisiologia e nutrição humana. Os cães foram o primeiro modelo utilizado para estabelecer os princípios básicos nutricionais na Europa no século XIX e continuam sendo, até hoje, um modelo satisfatório (FLICKINGER, 2002).

A seleção da espécie animal e do desenho experimental do estudo é importante para o fornecimento de uma predição confiável da absorção e eliminação de drogas e outros compostos em humanos. De um ponto de vista evolucionário, todos os mamíferos são similares, pois foram originados de um ancestral comum, embora haja diferenças relacionadas à adaptação ambiental (LIN, 1995).

Os fatores que influenciam a taxa de absorção podem ser classificados como fatores fisiológicos ou físico-químicos. Os fatores fisiológicos incluem principalmente o tempo de trânsito gastrointestinal, taxa de fluxo sanguíneo e pH e são espécie-dependentes, enquanto que os fatores físico-químicos são as propriedades intrínsecas da substância, como peso molecular, caráter lipofílico, solubilidade e são espécie-independentes. Como a natureza das membranas das células epiteliais intestinais é similar entre as espécies e por ser o processo de absorção basicamente uma interação entre a substância e a membrana, a absorção através da parede do trato gastrointestinal é provavelmente muito similar entre as espécies (LIN, 1995).

Por apresentarem uma anatomia similar a do homem, e por serem facilmente manuseados, os cães são freqüentemente utilizados em testes de dosagens orais de drogas antes da administração de um novo produto em humanos, (DRESSMAN, 1986; LIN, 1995; AKIMOTO *et al.*, 2000).

Com o intuito de mostrar a similaridade entre a absorção oral no homem e no cão, Chiou e colaboradores (2000) avaliaram 43 drogas com características físico-químicas e farmacológicas distintas e estabeleceram uma comparação entre a absorção no homem e no cão, após administração oral. Do total, 28% das drogas mostraram melhor absorção no cão do que no homem e somente 4 drogas foram menos absorvidas no cão. Com isso, os autores sugerem que quando uma droga é bem absorvida em humanos esta também é absorvida em cães, entretanto, o inverso nem sempre deve ser considerado verdadeiro.

Neste mesmo estudo foi observado que o tempo de aparecimento do pico plasmático, após administração oral de uma droga, foi maior no homem do que no cão, variando de 1,3 a 4 horas e 0,13 a 1,8 horas, respectivamente.

O tempo de permanência de uma substância no estômago depende de muitos fatores, tais como a forma de administração, o volume administrado e o tamanho da partícula. Um outro fator a ser considerado, que afeta o tempo de permanência gástrica, é a variação da motilidade na fase de jejum quando comparado com um estado pós-prandial. No jejum, existe um ciclo padrão de motilidade do trato gastrointestinal superior que se constitui de três fases. A primeira fase é denominada de fase de quiescência, na qual há uma pequena atividade de contração. Na segunda fase, contrações irregulares começam a aparecer e vão aumentando gradativamente em amplitude e frequência. Na fase III observa-se máxima amplitude e frequência nas contrações. A atividade da fase III dura $18,6 \pm 4$ minutos no homem e é quase idêntica a duração no cão, 19 ± 2 minutos (DRESSMAN, 1986).

O tempo de esvaziamento gástrico observado nos cães e no homem foi de 74 ± 27 e 77 ± 19 minutos, respectivamente. O tempo de trânsito intestinal é menor no cão, quando comparado ao homem, sugerindo que a absorção intestinal pode ser variável e menos efetiva no cão. De modo geral, o trânsito intestinal dura de 3 a 5 horas e independe do tamanho da partícula, mas pode ser prolongado após uma grande refeição. A média do tempo de permanência no intestino delgado, é de 238 ± 14 minutos para o homem e 111 ± 17 minutos para o cão (DRESSMAN, 1986). O pH gástrico do cão em jejum é aproximadamente 1,5 e no homem pode variar de 1,4 a 2,1 (KARARLI, 1995).

Enquanto ratos e porcos apresentam alta atividade de fermentação cecal, os cecos do cão e do homem são subdesenvolvidos, portanto, estas espécies apresentam uma microflora colônica que predispõe à fermentação no cólon. O cólon do cão é proporcional em tamanho ao cólon do homem. Em média, um cão que tenha 0,75 metros de comprimento apresenta um cólon de 0,6 metros, enquanto que

um homem que tenha 1,7 metros de altura apresenta um cólon de 1,2 metros (FLICKINGER, 2002).

Os cães apresentam hábitos alimentares semelhantes aos dos homens. Embora descendentes dos carnívoros, os cães se adaptaram a uma dieta onívora e com exceção da vitamina C, eles requerem os mesmos nutrientes considerados essenciais para os homens (FLICKINGER, 2002).

A elevada ocorrência de processos neoplásicos em cães, muitas vezes de caráter maligno e com comprometimento de diversos órgãos (PIRES; TRAVASSOS; PIRES, 2003), justificaria maiores estudos dos efeitos anticarcinogênicos da clorofila e de outras substâncias nesta espécie, se estes efeitos forem efetivamente comprovados *in vitro*.

Tendo em vista a escassez de trabalhos realizados *in vivo* referentes à absorção da clorofila e devido à incerteza sobre o efetivo transporte para o sangue, foi proposto um estudo com cães, visando contribuir com a elucidação dessa questão.

3 - OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar a absorção aparente da clorofila do espinafre e seus derivados, em estudo *in vivo* com cães.

Para atingir este objetivo foram planejados os seguintes ensaios:

- Caracterização do espinafre (*Spinacea oleracea*), matéria-prima utilizada para o ensaio de absorção aparente, quanto à sua composição em pigmentos derivados da clorofila;
- Realização de ensaio de digestibilidade com cães, para avaliar a absorção aparente da clorofila e seus derivados;
- Avaliação da degradação química da clorofila e seus derivados durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal;
- Detecção da presença de clorofila e derivados no sangue.
- Realização de ensaio de digestibilidade com cães, para verificar a absorção aparente da clorofilina cúprica comercial.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

4.1.1 – Amostras

4.1.1.1 - Espinafre

O espinafre (*Spinacea oleracea*) foi escolhido para este estudo por apresentar uma alta concentração de clorofila e pela facilidade de extração da mesma (GROSS, 1991). O espinafre fresco foi adquirido no comércio da cidade de São Paulo, onde se encontrava sob refrigeração.

As folhas foram separadas manualmente dos caules, lavadas em água corrente e homogeneizadas em um liquidificador doméstico com a menor quantidade de água destilada, suficiente para a obtenção de um purê. Este purê foi distribuído em bandejas, congelado e posteriormente liofilizado (Edwards, E-C Super Modulyo). O espinafre já liofilizado foi moído (Polymix KCH – Analytical Mill A 10, Kinematica AG) e homogeneizado.

4.1.1.2 - Clorofilina cúprica

A clorofilina cúprica foi fornecida pela empresa Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda, situada na cidade de Valinhos (SP), em forma de solução álcali-aquosa, apresentando um teor mínimo de 95% de clorofilina.

4.1.1.3 - Rações

Foi oferecido aos animais do grupo controle, ração comercial seca e extrusada, da marca Must, fabricada pela empresa Socil Evialis Nutrição Animal Ind. e Com. Ltda. e classificada como “alimento completo para cães adultos”, de acordo com a Instrução Normativa 9 (Brasil, 2003), contendo os seguintes ingredientes: farinha de vísceras de frango, quirera de arroz, óleo de salmão, gordura de frango, polpa de beterraba, milho integral moído, farelo de trigo, fosfato monossódico, hidrolisado de frango, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e probiótico. A composição química da ração comercial é apresentada no quadro 2.

Umidade (máx.).....	10,0%
Proteína Bruta (mín.).....	24,0%
Extrato Etéreo (mín.).....	15,0%
Matéria Fibrosa* máx.).....	4,0%
Matéria Mineral* (máx.).....	8,0%
Cálcio (Ca) (máx.).....	1,3%
Fósforo (P) (mín.).....	0,9%

Quadro 2 - Composição química da ração comercial

*nomenclatura adotada na Instrução Normativa 9 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003)

A ração experimental era a mesma ração do grupo controle, tendo sido moída e adicionada de 0,8% de espinafre liofilizado. Acrescentou-se ainda, 0,35% de óxido de cromo, como um indicador não absorvível. Assim, os animais ingeriram uma dose diária média de 1,55 mg de clorofila/kg peso vivo, o que corresponde a aproximadamente 110 mg de clorofila para um ser humano de 70 kg. Esta quantidade é empiricamente recomendada como sendo suficiente para exercer os benefícios atribuídos à clorofila.

A mistura foi homogeneizada durante 2 horas, com a ajuda de um homogeneizador de 2 eixos e 6 pás (C.A.F., M60, WEG, 60Hz) e oferecida aos animais do grupo teste.

4.1.2 - Reagentes e outros materiais

Acetona e metanol (grau HPLC – Carlo Erba e Merck); acetato de amônio, acetona, ácido perclórico, molibdato de sódio, ácido sulfúrico concentrado, éter de

petróleo, sulfato de sódio anidro e ácido acético, todos de grau analítico, membrana de filtração de 0,45 μM da Millipore Corporation e óxido de cromo (Cr_2O_3), apresentando um teor mínimo de 99% de óxido de cromo e 68% de Cromo (Cr), fornecido pela empresa JB Química.

4.1.3 - Animais

Foram utilizados 12 cães (*Canis familiaris*) da raça Cocker Spaniel Inglês, fêmeas, pesando entre 9 e 13 kg, com idade entre 3 e 7 anos, vacinados e vermifugados, gozando de excelente estado de saúde, provenientes do canil de testes da empresa de nutrição animal Socil Evialis, localizado no estado de São Paulo, na cidade de Itatiba.

A escolha dos animais levou em consideração parâmetros como: procedência conhecida, mesma raça, ausência de doenças pregressas, condição nutricional adequada, peso e idade.

Os cães foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: um grupo controle (n=6) e um grupo teste (n=6) (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação dos animais

Grupo Controle			Grupo Teste		
Número de Identificação	Idade (anos)	Peso (kg)	Número de Identificação	Idade (anos)	Peso (kg)
1	7	11,0	7	4	12,7
2	5	9,8	8	7	9,7
3	7	13,0	9	7	12,8
4	7	12,5	10	7	13,0
5	6	10,7	11	5	10,6
6	4	11,8	12	3	11,3
Média $\pm$ dp	6,0 $\pm$ 1,3	11,5 $\pm$ 1,2	Média $\pm$ dp	5,5 $\pm$ 1,8	11,7 $\pm$ 1,4

4.2 - Métodos

4.2.1 - Ensaio biológico

Todo o experimento foi aprovado previamente pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP (anexos I e II).

4.2.1.1 - Excreção fecal de clorofila e derivados

A avaliação da excreção fecal de clorofila e derivados seguiu o protocolo de ensaio de digestibilidade de proteínas (ASSOCIATION OF FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO), 2003), que inclui um marcador exógeno não absorvível (óxido de cromo).

Os cães, tanto do grupo controle quanto do grupo teste, ficaram alojados em baias individuais (1 animal/baia), com água *ad libitum* e foram alimentados 1 vez ao dia, em horário pré-determinado (16:00 hs).

Os cães do grupo controle receberam somente ração comercial enquanto que os cães do grupo teste receberam a mesma ração, porém, moída e adicionada de espinafre liofilizado e óxido de cromo, hidratada com 250 mL de água antes de ser oferecida aos cães. A quantidade diária de ração oferecida aos animais foi calculada atendendo às exigências do "National Research Council" (UNITED STATES, 1985).

O requerimento energético diário para cães adultos em manutenção, expresso em Kcal, foi calculado pela equação (UNITED STATES, 1985):

$$\text{MER} = 132 \times \text{PV}^{0,75}$$

Onde, MER é o requerimento energético diário e PV, peso vivo.

A energia metabolizável da ração (Kcal/100g) foi calculada pela equação:

$$EM = (ENN \times 3,5) + (PB \times 3,5) + (EE \times 8,5)$$

Onde, EM significa energia metabolizável; ENN, extrativo não nitrogenado (carboidratos); PB, proteína bruta e EE, extrato etéreo.

A porcentagem de extrativo não nitrogenado (carboidratos) da ração foi calculada pela equação:

$$ENN = 100 - (U + PB + EE + MF + MM)$$

Onde, ENN significa extrativo não nitrogenado (carboidratos); U, umidade; PB, proteína bruta; EE, extrato etéreo; MF, matéria fibrosa e MM, matéria mineral.

A quantidade de ração oferecida aos cães foi padronizada em 250 g/dia/animal, atendendo ao requerimento energético de todos os animais utilizados no experimento.

Os animais passaram por um período de adaptação de 5 dias (D₁ ao D₅), onde foram observados quanto à aceitação da ração e consistência das fezes. Após este período foi iniciada a coleta das fezes que aconteceu durante 3 dias alternados (D₆, D₈ e D₁₀). As fezes foram coletadas em recipientes individuais (frascos rígidos

de polietileno), devidamente identificados e transportados para o laboratório sob refrigeração, onde foram congeladas e posteriormente liofilizadas.

As fezes dos 3 dias de coleta de cada animal foram misturadas, formando um *pool* de fezes por animal, moídas e homogeneizadas, para serem analisadas posteriormente.

4.2.1.2 - Determinação da digestibilidade de clorofila e derivados

A digestibilidade da clorofila e derivados foi avaliada pelo método de coleta parcial das fezes com a utilização de um indicador exógeno e foi calculada através da equação (AAFCO, 2003):

$$\text{Digestibilidade} = \left(1 - \frac{\% \text{ Clorofilas e derivados nas fezes} \times \% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ na ração}}{\% \text{ Clorofilas e derivados na ração} \times \% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes}} \right) \times \% \text{ Clorofilas e derivados na ração}$$

4.2.1.3 - Determinação da digestibilidade protéica

A análise de proteína (N x 6,25) foi realizada pelo método de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1995), na ração oferecida aos animais do grupo teste e nas amostras de fezes dos mesmos animais, em triplicata, e a digestibilidade protéica foi calculada através da equação (AAFCO, 2003):

$$\text{Digestibilidade} = \left(1 - \frac{\% \text{ proteína nas fezes} \times \% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ na ração}}{\% \text{ proteína na ração} \times \% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes}} \right) \times \% \text{ proteína na ração}$$

4.2.1.4 – Detecção da clorofila e derivados no sangue

Para identificar a presença de clorofila e de seus derivados no sangue, foram utilizados os mesmos animais do ensaio de digestibilidade.

Foi realizado um primeiro ensaio e aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado de cada animal, tanto do grupo controle, como do grupo teste, pela veia cefálica, com seringas descartáveis (1 seringa/animal) no sexto (D₆) e décimo dia (D₁₀) do experimento, em horário pré-determinado (10:00 hs), 16 horas após a ingestão da ração. O sangue foi acondicionado em tubos Eppendorf devidamente identificados e transportados para o laboratório sob refrigeração.

Em um segundo ensaio com a finalidade de estabelecer uma cinética de absorção da clorofila e seus derivados, os animais receberam uma dose única de espinafre liofilizado. Foram utilizados 3 cães, selecionados aleatoriamente dentro do grupo teste. Os cães ficaram em jejum de 16 horas e após este período receberam 250 g de ração comercial moída (mesma ração utilizada no ensaio de digestibilidade), acrescida de 10% de espinafre liofilizado.

Foi introduzido na veia cefálica dos animais um cateter estéril e descartável (1 cateter/animal) e aproximadamente 3 mL de sangue foram coletados de cada animal nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos após a ingestão da ração (HANSSON *et al.*, 2004). Para a obtenção do plasma, o sangue foi acondicionado em tubos contendo EDTA, devidamente identificados e transportados para o laboratório sob refrigeração.

4.3 - Métodos Analíticos

4.3.1 - Análise dos pigmentos por cromatografia líquida de alta eficiência

4.3.1.1 - Extração dos pigmentos

A extração dos pigmentos foi realizada a partir do espinafre, da ração, das fezes (grupo controle e grupo teste) e do sangue, protegendo, sempre que possível, as vidrarias contendo as amostras contra a incidência de luz e utilizando solventes de extração gelados, minimizando a degradação da clorofila. Outro cuidado tomado foi reduzir o tempo de extração.

A extração dos pigmentos (espinafre, ração e fezes) foi baseada na metodologia descrita por Yamauchi e Watada (1991) e realizada em triplicata, adicionando 20 mL de acetona 80% a 40 mg de espinafre, ou a 5 g de ração, ou ainda a 500 mg de fezes (para cada repetição), pesados diretamente em tubos de centrífuga de 45 mL.

As suspensões foram homogeneizadas por 2 minutos, com o auxílio de um agitador de tubos (Phoenix, AT 56). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (RC 5C, Sorvall Instruments, Du Pont) a 9000 x g por 5 minutos. Os resíduos foram reextraídos consecutivamente até as amostras não apresentarem mais coloração verde (em torno de 4 vezes). As soluções contendo os pigmentos foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e os volumes completados com acetona 80%. No caso da ração e das fezes, as soluções contendo os pigmentos apresentavam-se muito diluídas e foram transferidas para um funil de separação, ao qual se adicionou aproximadamente 20 mL de éter de petróleo, para

que os pigmentos migrassem para a fase etérea. Posteriormente, o funil foi lavado com água destilada, a fase aquosa foi descartada e o procedimento foi repetido. O éter de petróleo contendo os pigmentos foi desidratado com sulfato de sódio anidro e concentrado até securo em rotaevaporador (Heidolph Elektro GmbH & Co., WB2000, Kelheim). O resíduo contido no balão do rotaevaporador foi ressuspensão em 7 mL de acetona 80%. Aproximadamente 1,5 mL destas soluções, assim como do espinafre, foram filtrados em membrana PTFE-Millipore (0,45µm), transferidos para um vial de 1,5 mL e imediatamente analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. O fluxograma do processo de extração encontra-se na figura 7.

As amostras de sangue contendo ou não anticoagulante, foram centrifugadas (Brinkmann, Eppendorf – centrifuge 5410) a 600 x g por 10 minutos, para a obtenção do plasma e soro sanguíneo. Com µL de cada amostra foram transferidos para outro tubo Eppendorf e adicionou-se 1 mL de uma solução de acetona 80% (YAMAUCHI; WATADA, 1991). Após centrifugação (6500 x g por 5 minutos), a camada orgânica foi coletada e filtrada em membrana PTFE-Millipore (0,45µm), transferida para um vial de 1,5 mL e a seguir, analisada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Além destas análises, tanto o espinafre quanto a ração também foram analisados quanto ao teor de umidade pelo método de aquecimento direto em estufa a 105°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976).

Figura 7 - Fluxograma de extração dos pigmentos verdes

4.3.1.2 - Condições cromatográficas

Após o procedimento de extração, todas as amostras, preparadas em triplicata, foram imediatamente submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência para evitar possíveis reações de degradação.

As condições cromatográficas descritas a seguir foram utilizadas para as análises de espinafre, ração, fezes e sangue.

A análise por CLAE foi baseada no método descrito por Mangos e Berger (1997). Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, Tokyo, Japan (CLASS-M10A) UV/Vis, composto de um sistema de três bombas (LC-10ADVP), injetor automático (SIL-10ADVP), forno com controle de temperatura (CTO-10ASVP), detector de arranjos de fotodiodos (SPD-M10AVP) e um sistema de software (CLASS-VP 5.032) para aquisição dos dados. A separação dos pigmentos foi feita em coluna Nucleosil EC 250/4 ODS 100-5, conectada a uma coluna de guarda CC8/4 Nucleosil 100-5 C18.

Todos os reagentes utilizados na análise foram de grau HPLC e foram previamente filtrados em membrana Millipore 0,45 µm PVDF (solventes aquosos) e PTFE (solventes orgânicos), conforme o caso. No preparo das soluções foi utilizada água purificada pelo sistema purificador de água Millipore, modelo Milli-Q PLUS. Antes de cada corrida os solventes foram desgaseificados durante 10 minutos, com desgaseificador (gás Hélio), da marca Shimadzu, modelo DGU-2A.

Para a separação dos pigmentos foi utilizado um sistema de três fases móveis, com gradiente ternário: (A) Metanol, (B) Acetato de amônio – 1M tamponado (pH 7.0 ajustado com ácido acético) e (C) Acetona, seguindo o gradiente de eluição e as condições cromatográficas descritos nos quadros 3 e 4, respectivamente.

Iniciou-se o gradiente com 80% de A e 20% de B, prosseguindo linearmente até

80% de A e 20% de C, em 20 minutos

fluxo isocrático de A e C, por 2,5 minutos

fluxo linear de A e C até 100% de C, em 7,5 minutos

fluxo isocrático de C, por 5 minutos

fluxo linear de C até 80% de A e 20% de B, em 2 minutos

recondicionamento da coluna com 80% de A e 20% de B, por 3 minutos

Quadro 3 - Gradiente de eluição

Vazão: 1,0 mL / minuto

Volume de injeção: 50 μ L

Pressão máxima: 300 Kgf/cm²

Detector: arranjo de fotodiodos

Canais de detecção: 410 e 432 nm

Espectro de absorção gravado de: 380 a 700 nm

Quadro 4 - Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram eficientes e proporcionaram a separação dos principais produtos polares e não-polares em uma mesma coluna, sem necessidade de uma etapa de pré-fracionamento em coluna aberta. A incorporação do acetato de amônio tamponado foi necessária para manter os compostos polares parcialmente dissociados, permitindo assim a sua eluição (MANGOS; BERGER, 1997). A acetona como eluente final foi necessário para eluir o pigmento mais apolar, as feofitinas.

4.3.1.3 - Identificação e quantificação dos principais pigmentos

Os pigmentos foram identificados com base nas características espectrais e nos tempos de retenção da clorofila e seus derivados obtidos em trabalho anterior realizado no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (SINNECKER, 2002) e quantificados através das respectivas curvas padrão.

As curvas padrão da clorofila a e b e feofitina a e b foram construídas a partir de 5 diluições entre 0,001 e 0,1 mg/mL, sendo cada diluição preparada em triplicata. A curva da feofitina a foi lida em 410 nm e as demais em 432 nm. Os limites de detecção e quantificação foram 1,2; 1,3; 1,4 e 1,4 µg e 2; 2,16; 2,33 e 2,33 µg, para clorofila a, clorofila b, feofitina a e feofitina b, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação foram determinados segundo Synder e Kirkland (1979), utilizando-se as soluções padrão e foram calculados considerando-se três e cinco vezes a altura média do ruído, respectivamente.

As áreas debaixo das curvas foram utilizadas para quantificar os correspondentes pigmentos através da equação de regressão das curvas padrão. Na tabela 2 estão apresentadas as faixas de concentração, regressões lineares e R^2 , obtidos das curvas padrão para clorofila a, clorofila b, feofitina a, feofitina b.

Tabela 2 - Características das curvas padrão dos principais pigmentos

Pigmento	Faixa (mg/mL)	$y = ax + b$	$R^2_{\text{regressão}}$
Clorofila a	0,001 - 0,1	$y = 4,2516E-09 x + 1,6682E-04$	0,9890
Clorofila b	0,001 - 0,1	$y = 8,3579E-09 x + 1,9778E-03$	0,9939
Feofitina a	0,001 - 0,1	$y = 3,2356E-09 x - 1,3507E-03$	0,9934
Feofitina b	0,001 - 0,1	$y = 6,7334E-09 x + 7,2552E-05$	0,9974

y = concentração em mg/mL
 x = área do pico

As curvas padrão da clorofila a, clorofila b, feofitina a e feofitina b, são apresentadas nas figura 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

Figura 8 - Curva padrão da clorofila a em 432 nm

Figura 9 - Curva padrão da clorofila b em 432 nm

Figura 10 - Curva padrão da feofitina a em 410 nm

Figura 11 - Curva padrão da feofitina b em 432 m

4.3.2 - Determinação do cromo nas fezes

O óxido de cromo foi quantificado, utilizando-se o método colorimétrico descrito por Fenton e Fenton (1979).

Uma amostra de 1 g de fezes de cada animal, liofilizadas e homogeneizadas foi incinerado em mufla a 450°C por 12 horas. Após resfriamento, foram adicionados às cinzas 15 mL de uma solução contendo 10 g de molibdato de sódio dissolvido em 500 mL de solvente constituído por 150 mL de água destilada, 150 mL de ácido sulfúrico concentrado e 200 mL de ácido perclórico. As suspensões foram aquecidas em chapa quente e mantidas por aproximadamente 15 minutos até o aparecimento de uma coloração amarelada ou avermelhada. Após resfriamento, as amostras foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL e o volume completado com água destilada; 10 mL foram transferidos para tubos de centrifuga e centrifugados a 700 x g por 5 minutos.

A absorbância foi medida em 440 nm contra um branco de solvente. As amostras foram analisadas em triplicata e a concentração de cromo foi calculada mediante análise de regressão linear da curva padrão construída a partir de quatro concentrações entre 0,034 e 0,204 mg/mL (Figura 12). Cada concentração foi preparada em triplicata. Os resultados foram interpolados na curva para estimar a concentração de cromo existente nas amostras analisadas e cada ponto representa o valor médio da análise em triplicata.

Figura 12 - Curva padrão do cromo em 440 nm

4.4 - Teste de recuperação da clorofilina cúprica no material fecal

A clorofilina cúprica foi extraída das fezes de cães, adaptando-se a metodologia descrita por Pudek, Schreiber e Jamani (1991).

Vinte e cinco mg de fezes liofilizadas foram pesadas diretamente em uma série de 7 tubos de centrífuga de 45 mL e acrescidas de 25 mL de uma solução contendo quantidades crescentes de clorofilina (0,125 mg, 0,166 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,83 mg, 1,66 mg e 3,57 mg). As suspensões foram homogeneizadas com o auxílio de um bastão de vidro e centrifugadas a 4500 x g por 10 minutos.

Os sobrenadantes foram recolhidos e as absorbâncias medidas em 400 nm contra um branco de água destilada. Os resultados foram interpolados na curva padrão para estimar a recuperação da clorofilina nas fezes e cada ponto representa

o valor médio da análise me triplicata. A curva padrão foi construída a partir de seis concentrações entre 0,0035 e 0,02 mg/mL, em triplicata (Figura 13).

Figura 13 - Curva padrão da clorofilina cúprica em 400 nm

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Identificação e quantificação dos principais pigmentos no espinafre e na ração

O espinafre utilizado para os ensaios biológicos foi analisado após liofilização quanto à sua composição em pigmentos, que foram extraídos com solventes orgânicos e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência como descrito no item 4.3.1.2.

Na figura 14 (a e b) são apresentados os cromatogramas do extrato de espinafre que ilustra a diversidade de pigmentos existentes no espinafre, e também demonstra a boa separação dos mesmos, nas condições analíticas empregadas. A feofitina a foi analisada em 410 nm e os demais pigmentos em 432 nm.

A identificação dos pigmentos do espinafre obtidos neste experimento foi feita por comparação com os tempos de retenção reportados por Mangos e Berger (1997). Os resultados apresentados correspondem ao valor médio de análise em quadruplicata e encontram-se na tabela 3. Outros picos menores, que não foram identificados, parecem ser xantofilas, por comparação com dados da literatura.

Figura 14 - Cromatograma do extrato de espinafre: (a) 410 nm, (b) 432 nm. A: luteína; B: clorofila b; C: clorofila a; D: feofitina a

Tabela 3 - Tempos de retenção dos pigmentos encontrados no extrato de espinafre

Picos	Pigmentos	Tempos de retenção (minutos) $\pm$ dp	
		<u>Mangos e Berger (1997)</u>	<u>Espinafre</u>
A	Luteína	23,22	$21,84 \pm 0,03$
B	Clorofila b	25,02	$24,54 \pm 0,03$
C	Clorofila a	27,07	$26,48 \pm 0,03$
D	Feofitina a	32,95	$31,36 \pm 0,09$

n = 4

Os pigmentos encontrados neste experimento tiveram a mesma ordem de eluição encontrada por Mangos e Berger (1997), porém, os tempos de retenção foram ligeiramente diferentes, provavelmente pelas diferenças de equipamento e condições cromatográficas utilizadas.

A confirmação da identidade desses compostos foi realizada tanto pelos tempos de retenção de cada pico como pela comparação das características espectrais de absorção, com as características dos respectivos padrões (Figura 15 A-D). O espectro corresponde à absorção das duplas ligações presentes no anel tetrapirrólico.

Figura 15 - Espectro de absorção visível: (A) luteína, (B) clorofila b, (C) clorofila a, (D) feofitina a

A ração adicionada de espinafre liofilizado, assim como a ração controle foram analisadas quanto à composição de pigmentos. Estes foram extraídos de maneira semelhante à realizada com o espinafre e separados por cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito no item 4.3.1.2.

Os cromatogramas apresentados na figura 16 a e b correspondem ao perfil de pigmentos recuperados a partir da ração adicionada de espinafre, em 410 e 432 nm, respectivamente. Como era de se esperar, não foi eluída nenhuma substância na ração controle.

Figura 16 - Cromatograma do extrato obtido a partir da ração teste: (a) 410nm, (b) 432nm. A: luteína; B: clorofila b; C: clorofila a; D: feofitina a

Os pigmentos identificados na ração por ordem de eluição foram: luteína, clorofila b, clorofila a e feofitina a, sendo a clorofila a e b os pigmentos verdes predominantes, correspondendo, portanto, ao mesmo perfil encontrado no espinafre. Os picos menores, que não foram identificados, parecem ser xantofilas, por comparação com dados da literatura.

A confirmação da identidade desses compostos foi realizada novamente pela comparação das características espectrais de absorção no espectro visível de cada pico, com as características dos padrões.

As áreas debaixo das curvas dos cromatogramas, resultantes das análises do espinafre e da ração foram utilizadas para quantificar os correspondentes pigmentos através da equação de regressão das curvas padrão.

Na tabela 4 é apresentada a concentração dos principais pigmentos encontrados no espinafre.

Tabela 4 – Concentração dos principais pigmentos encontrados no espinafre

Pigmentos	mg / 100 g de espinafre liofilizado	mg / 100 g de espinafre fresco
Clorofila a	690	38
Clorofila b	218	12
Feofitina a	Traços	Traços
Feofitina b	n.d.	n.d
Total	908	50

n.d. = não detectado

No espinafre, os pigmentos verdes em maior quantidade foram a clorofila a e a clorofila b. A feofitina a apareceu em quantidade insignificante, o que pode ser explicado pelo curto tempo em que o espinafre fresco foi homogeneizado, congelado e liofilizado. Este tempo foi insuficiente para que ocorressem reações de

feofitinação, catalisadas em meio ácido. Os resultados confirmam a relação de clorofila a para clorofila b de 3:1 observado por Eder (2000) na maioria dos vegetais, porém, a quantidade total de pigmentos verdes presentes no espinafre fresco (50 mg/100g) foi inferior a quantidade de 150mg/100g reportada por Gross (1991). O cálculo da quantidade de pigmentos verdes nas folhas frescas do espinafre foi baseado em um teor médio de umidade de 94,5%.

A quantidade total de pigmentos verdes recuperada na ração representou 96,62% em relação à quantidade adicionada. Analisando o perfil cromatográfico dos pigmentos extraídos da ração, verificou-se uma recuperação de 94,25% de clorofila a e 98,96% de clorofila b (tabela 5), sendo assim, a digestibilidade da clorofila foi calculada a partir dos valores encontrados na ração. O cálculo da quantidade de pigmentos verdes na ração foi expressa em base seca considerando um teor médio de umidade de 5,3%.

Tabela 5 – Perfil quantitativo dos principais pigmentos encontrados na ração

Pigmentos	mg / 100 g de ração*	% recuperação**
Clorofila a	5,50	94,25
Clorofila b	1,83	98,96
Feofitina a	Traços	-----
Feofitina b	n.d.	-----
Total	7,33	96,62

n.d = não detectado

* em base seca

** em relação a quantidade de espinafre adicionada

5.2 – Alteração dos pigmentos verdes no trato gastrointestinal

5.2.1 – Identificação e quantificação dos principais pigmentos nas fezes

No material fecal dos animais que receberam espinafre foi possível identificar presença de feofitina a e b, em ordem decrescente de concentração, e também foi observada a presença de luteína, porém, esta não foi quantificada. Nas fezes dos animais do grupo controle, não houve eluição de nenhuma substância no comprimento de onda de absorção das clorofilas.

Como era de se esperar, as clorofilas a e b foram transformadas em feofitinas a e b, respectivamente, durante a passagem pelo estômago dos animais, uma vez que o pH ácido promove a feofitinização.

Ferruzzi, Failla e Schwartz (2001) realizaram ensaio simulando a digestão *in vitro* e reportaram que a feofitinização foi quase completa (95%) após incubação em pH 2,0 por 30 minutos.

A ausência de clorofilídeos e feoforbídeos nas amostras de fezes sugere que não ocorreu rompimento do fitol na molécula da clorofila durante a digestão. Além disso, não foi observada a presença de piroderivados, sugerindo que, além da feofitinização, nenhuma outra degradação importante ocorre durante a passagem da clorofila pelo trato gastrointestinal.

Na figura 17 (a e b) são apresentados os cromatogramas representativos das amostras de fezes dos animais do grupo teste em 410 e 432 nm.

Figura 17 - Cromatograma representativo dos extratos de fezes: (a) 410 nm, (b) 432 nm. A: luteína; B: feofitina b; C: feofitina a

Na tabela 6 são apresentadas as quantidades de cada um dos principais pigmentos e do cromo encontradas nas amostras de fezes de cada animal do grupo teste.

Tabela 6 - Quantidade dos principais pigmentos verdes e de cromo nas amostras de fezes dos animais do grupo teste

Animal	Feofitina a	Feofitina b	Total de pigmentos	Cromo
			mg / g fezes	
7	0,0770	0,0850	0,1620	7,48
8	0,1011	0,0933	0,1944	9,18
9	0,0937	0,0889	0,1826	8,80
10	0,1145	0,1008	0,2153	9,78
11	0,1073	0,0778	0,1851	9,66
12	0,0995	0,0964	0,1959	8,70

Pelo fato dos animais terem excretado somente feofitinas ficou comprovado que o grupo fitol permaneceu ligado à molécula após o processo digestivo. Este fato é de fundamental importância no contexto da “Síndrome de Refsum”, doença inata do metabolismo dos ácidos graxos.

O fitol, liberado da clorofila pela ação da clorofilase ou mesmo durante o processamento de vegetais verdes, é prontamente absorvido pelo intestino e transformado em ácido fitânico. Em pessoas saudáveis, o ácido fitânico é metabolizado por uma enzima e no plasma são encontradas quantidades muito reduzidas deste ácido graxo. Entretanto, indivíduos acometidos da “Síndrome de Refsum” são incapazes de metabolizar o ácido fitânico, que se acumula no sangue e em diversos órgãos, resultando em consequências graves para a saúde (degeneração da visão, ataxia cerebelar, entre outras) (STEINBERG, 1995).

Na década de 1960 era sugerido que os pacientes com essa desordem evitassem ingerir dietas contendo clorofila, fitol ou ácido fitânico (ELDJARN *et al.*, 1966). Esta limitação na ingestão de vegetais verdes foi revista recentemente com base nos conhecimentos sobre o mecanismo de degradação da clorofila no organismo animal, permitindo a estes pacientes a ingestão de vegetais verdes frescos.

Tanto Ma e Dolphin (1999), quanto Ferruzzi, Failla e Schwartz (2001) já consideravam pouco provável a clivagem do fitol para a produção de feoforbídeos durante a digestão.

5.3 – Absorção aparente da clorofila e derivados e digestibilidade protéica

O termo absorção aparente será utilizado como sinônimo de digestibilidade, para designar apenas a diferença entre a quantidade ingerida e excretada, e não se refere à quantidade de pigmentos efetivamente utilizada pelo organismo animal.

A análise quantitativa dos pigmentos nas fezes deve estar associada à análise do cromo, utilizado como indicador exógeno, uma vez que o método utilizado para o ensaio de digestibilidade foi o de coleta parcial das fezes. O valor médio da razão entre a quantidade total de pigmentos e de cromo em pool de fezes dos animais do grupo teste, coletadas em três dias alternados, foi de $0,0212 \pm 0,0012$, sendo apresentado na tabela 7. O reduzido desvio padrão indica uma excreção similar entre os 6 animais, bem como uma perfeita homogeneização da ração.

Tabela 7 - Razão entre a quantidade total de pigmentos e de cromo em pool de fezes dos animais do grupo teste, coletadas em três dias alternados

Animal	mg total pigmentos / mg cromo em 1 g de fezes
7	0,0217
8	0,0212
9	0,0208
10	0,0220
11	0,0192
12	0,0225
Média $\pm$ dp	$0,0212 \pm 0,0012$

5.3.1 – Ensaio de digestibilidade

A absorção aparente da clorofila e derivados, bem como da proteína, foram calculadas mediante equação descrita no protocolo de ensaio de digestibilidade protéica da “Association of American Feed Control Officials” (AAFCO, 2003), conforme item 4.2.1.2, e os resultados encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Absorção aparente da clorofila e derivados e da proteína

Animal	Absorção aparente (%)	
	Clorofila e derivados	Proteína
7	4,66	72,87
8	4,91	78,25
9	5,13	80,09
10	4,48	78,34
11	5,96	77,88
12	4,21	79,30
Média ± dp	4,89 ± 0,61	77,79 ± 2,54

A absorção aparente da clorofila e seus derivados variou entre 4,21 e 5,96%, apresentando uma absorção média de 4,89%. A digestibilidade protéica foi realizada apenas como um controle das condições digestivas dos animais. Os resultados encontrados mostram uma pequena variação entre eles, tendo como valor mínimo 72,87% e máximo 80,09% e estão de acordo com os dados de literatura (CASE; CAREY; HIRAKAWA, 1998). Desta forma, nenhum animal foi descartado do grupo teste.

Os poucos dados de literatura indicam que a digestibilidade da clorofila natural é insignificante. Baxter, em 1968 reportou que 90 a 95% da feofitina ingerida por indivíduos sadios foram recuperados nas fezes, enquanto que somente 0,5% e

1% foram identificados no sangue e na urina, respectivamente. A partir dessa data e nos 30 anos seguintes, nenhum trabalho dessa natureza foi encontrado. Somente em 2001, Ferruzzi e colaboradores, estudaram a absorção intestinal de clorofila e carotenóides, empregando um modelo de estudo com culturas de células da linhagem Caco-2 e utilizando purê de espinafre fresco. Observaram que somente 5 a 10% da quantidade total de clorofila, presentes na fração micelar, foram acumuladas dentro das células, enquanto que em ensaio similar com carotenóides, estes tiveram uma absorção entre 20 a 40%.

No ano seguinte, em 2002, Ferruzzi, Failla e Schwartz realizaram estudo semelhante ao anterior, porém, com a clorofilina cúprica. Neste estudo foi observado que a quantidade de clorofilina encontrada nas células Caco-2 representou 45 a 60% da quantidade total adicionada ao meio, portanto muito maior do que a quantidade acumulada a partir da clorofila natural. Estas diferenças foram atribuídas a hidrofiliidade, ionização e tamanho molecular, parâmetros estes fortemente relacionados com a absorção intestinal, e por consequência, com uma possível ação biológica sistêmica. Enquanto que, o acúmulo de clorofilina nas células Caco-2, parece ocorrer por um transporte passivo e ativo através do epitélio intestinal, nada se sabe sobre o eventual mecanismo de transporte da clorofila natural.

A maior parte dos trabalhos relacionados com ação sistêmica, como atividade anticarcinogênica e antioxidante foram desenvolvidos com a clorofilina. A instabilidade química e o elevado custo da clorofila natural purificada justificam a preferência pelo uso do derivado sintético. Contudo, deve ser lembrado que, embora a clorofilina seja um corante alimentar empregado principalmente em gomas de mascar e em pastas dentífricas, aprovado em diversos países, inclusive no Brasil, a

ingestão de vegetais verdes proporciona grandes quantidades de clorofila natural e não de clorofilina.

O conjunto dessas informações, de um lado as ações benéficas sistêmicas atribuídas a clorofilina, mas com ausência de dados referentes à absorção intestinal e do outro, a possibilidade de absorção intestinal da clorofila natural observada nesse trabalho, mas com ausência de ações benéficas comprovadas, justificam maiores estudos com ambas as moléculas.

5.4 – Detecção da clorofila e derivados no sangue

No sangue dos animais que receberam ração adicionada de espinafre, coletado 16 horas após a ingestão da ração (1º ensaio), não foi possível detectar a presença de clorofila nem de seus derivados. Pela grande diferença de tempo entre a ingestão da ração e a coleta do sangue, pensou-se na possibilidade dos pigmentos terem sido metabolizados e por esta razão um segundo ensaio foi realizado, coletando o sangue nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos após a ingestão da ração, porém, os resultados se mantiveram, ou seja, nenhum pigmento foi detectado no sangue.

Na literatura foi encontrado um único trabalho onde os autores reportam ter identificado os derivados clorina e_4 e éster etílico da clorina e_4 no soro sanguíneo de indivíduos que receberam durante quatro meses, diariamente, três comprimidos contendo 100 mg de clorofilina (EGNER *et al.*, 2000). Embora este estudo seja o primeiro a fornecer evidências de que os derivados da clorofilina podem ser

absorvidos por humanos, faltaram quaisquer informações sobre a cinética de absorção e metabolização destes compostos bem como taxas de absorção.

Não é possível realizar uma comparação direta entre os resultados reportados por Egner e colaboradores (2000) e os encontrados neste trabalho, pois, embora semelhantes, as moléculas de clorofila e clorofilina diferem quanto à solubilidade.

Em farmacologia o termo biodisponibilidade é definido como a fração da dose ingerida de um fármaco que tem acesso à circulação sistêmica. Esta fração pode ser baixa pela absorção incompleta ou pela metabolização do fármaco na parede intestinal ou no fígado antes de chegar à circulação sistêmica. Alguns fármacos são removidos da circulação porta e metabolizados com grande eficiência pelo fígado, de modo que a quantidade que chega à circulação periférica é consideravelmente menor do que aquela absorvida pela veia porta. Este mecanismo é conhecido como efeito de primeira passagem ou metabolismo pré-sistêmico e implica na necessidade de uma dose elevada do fármaco quando administrado oralmente (RANG; RITTER; DALE, 1997).

Isto poderia também explicar o resultado encontrado neste experimento. A rápida metabolização da clorofila justificaria a ausência da mesma na circulação periférica. A clorofila poderia ser reconhecida pelo organismo como uma substância xenobiótica e, dessa forma, o organismo lançaria mão de mecanismos de detoxificação para evitar eventuais efeitos tóxicos e/ou fotossensibilizantes, semelhante aos mecanismos que ocorrem nas plantas senescentes.

Ao contrário de outros metabólitos secundários como antocianinas, isoflavonas e carotenóides, não existe nenhum estudo relativo à excreção da clorofila e seus derivados. A clorofila poderia, após metabolização, ser excretada pela urina ou pela bile. As porfirinas são subprodutos oxidados, originados durante o

processo de biossíntese do heme e apresentam estrutura química muito semelhante a derivados da clorofila. Em indivíduos saudáveis estes intermediários são excretados pela urina (ALVES *et al.*, 2004).

Em uma revisão que englobou 97 estudos de biodisponibilidade de compostos polifenólicos em humanos, realizada por Manach e colaboradores (2005), foi verificado que a excreção urinária destes compostos variou entre 0,3% e 43% da dose ingerida, dependendo do tipo de polifenol. O ácido gálico e as isoflavonas foram os polifenóis que apresentaram melhor absorção, por outro lado, as antocianinas, pigmentos com características funcionais comprovadas, apresentaram a menor absorção.

Em um estudo referente a biodisponibilidade do licopeno em indivíduos que receberam suco de melancia, foi verificado que a absorção deste composto variou de 0,05 a 0,381% (UNLU *et al.*, 2004).

Os efeitos biológicos da clorofila devem ocorrer predominantemente no intestino e caso haja alguma passagem para o sangue, a clorofila deve sofrer rápida metabolização hepática, evitando possíveis efeitos tóxicos, como reações de fotossensibilização.

5.5 – Absorção aparente da clorofilina

Foi idealizado um experimento de absorção aparente da clorofilina cúprica comercial, porém, devido à ausência de trabalhos no meio científico, referentes à extração e recuperação de clorofilina das fezes, tornou-se necessário a padronização do procedimento a ser utilizado. Inicialmente foi realizado um ensaio

de recuperação da clorofilina quando misturada às fezes, adaptando-se uma metodologia descrita para extração de porfirinas, pela similaridade na estrutura química entre as porfirinas e a clorofilina (PUDEK; SCHREIBER; JAMANI, 1991).

Foram testadas extrações sucessivas com acetona e metanol, nas concentrações de 20, 40 e 60%, porém, os resultados encontrados foram insatisfatórios e a recuperação variou entre 60 e 90%. Inúmeras tentativas, modificando os procedimentos de extração e substituindo os solventes, foram realizadas com o intuito de aumentar a recuperação da clorofilina, mas tampouco melhoraram a recuperação.

Ainda foi realizado um teste para verificar se havia uma relação direta entre a porcentagem de recuperação e a razão fezes/clorofilina. Os resultados são apresentados na tabela 9 e na figura 18. A porcentagem de recuperação da clorofilina continuou variando entre 62 e 87% em função da razão mg fezes / mg clorofilina, sem, contudo, manter uma relação direta. Em todas as condições testadas a quantidade recuperada foi menor do que a quantidade adicionada.

Tabela 9 - % de clorofilina recuperada nas fezes em função da razão fezes/clorofilina

fezes/clorofilina	clorofilina recuperada (%)
200	87,25
151	76,89
100	69,09
50	62,36
30	69,13
15	70,55
7	78,31

Na figura 18 é estabelecida uma comparação entre a quantidade de clorofilina adicionada à 25 mg de fezes e a quantidade recuperada após o processo de extração.

Figura 18 - Comparação entre a quantidade de clorofilina adicionada às fezes e a quantidade recuperada após extração

Estes resultados sugerem uma possível formação de complexo indissociável entre a clorofilina e algum componente das fezes, o que até o momento inviabilizou o teste de digestibilidade da clorofilina.

Se de fato ocorre esta complexação, hipoteticamente a clorofilina poderia assumir funções semelhantes às das fibras alimentares, removendo substâncias

indesejáveis do organismo, porém, permanece obscuro o tipo de substância a qual a clorofilina eventualmente se complexa.

Sobre este assunto, estudos recentes mostraram a formação de complexos moleculares entre a clorofilina e carcinógenos aromáticos planares, atribuindo à clorofilina uma atividade anticarcinogênica por reduzir a biodisponibilidade destes compostos (BREINHOLT *et al.*, 1995; DASHWOOD *et al.*, 1998; MATA *et al.*, 2004).

Segundo Dashwood (1997), duas forças estão envolvidas na formação destes complexos. A primeira envolve uma ligação do tipo Van der Waals aproximando e sobrepondo o agente mutagênico e o agente inibidor. A segunda força envolve interações eletrostáticas ou pontes de hidrogênio entre substituintes do agente mutagênico e o grupo carboxila do agente inibidor.

Estudos adicionais são necessários para avaliar uma possível complexação da clorofilina com outras substâncias e o seu impacto sobre a biodisponibilidade de nutrientes e não-nutrientes.

Caso comprovadas as mesmas atividades benéficas observadas para a clorofilina, quanto à redução da biodisponibilidade de substâncias cancerígenas, a ingestão da clorofila durante a alimentação habitual, incluindo vegetais, poderia ser de grande valia na quimioprevenção.

6 - CONCLUSÕES

1. O espinafre (*Spinacea oleracea*) apresentou uma mistura de pigmentos verdes, constituída predominantemente de clorofila a e clorofila b. Foi observado que, assim como a maioria dos vegetais, o espinafre apresentou uma relação de clorofila a para clorofila b de 3:1;
2. Houve absorção aparente da clorofila do espinafre, em estudo modelo com cães, que variou entre 4 e 6%;
3. As clorofilas a e b foram transformadas em seus respectivos derivados, feofitinas a e b durante a passagem pelo trato gastrointestinal, sendo excretadas como tal. Não houve formação de feoforbídeos, nem de piroderivados durante a digestão;
4. Nas condições experimentais, não foi possível detectar a presença de clorofila ou qualquer um de seus derivados no sangue dos animais;
5. A baixa recuperação da clorofilina cúprica comercial, quando misturada às fezes, em ensaio *in vitro*, impediu a quantificação deste pigmento, impossibilitando a realização do ensaio de digestibilidade nas mesmas condições empregadas para a clorofila natural, sugerindo que a clorofilina forma um complexo com algum componente das fezes, ainda não identificado.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **Official publication.**

S.I.: Association of American Feed Control, 2003. 437p. (Inclui Proceedings da 92nd. Annual Meeting da Association of American Feed Control Officials, realizado de 3-5 August, 2002 em Kansas City, Missouri).

AKIMOTO, M.; NAGAHATA, N.; FURUYA, A.; FUKUSHIMA, K.; HIGUCHI, S.; SUWA,

T. Gastric pH profiles of beagle dogs and their use as an alternative to human testing. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v.49, p.99-102, 2000.

ALVES, A.N.L.; SUMITA, N.M.; MENDES, M.E.; ROSA, H.V.D. Exposição

ocupacional a substância porfirinogênicas e o padrão de excreção das porfirinas urinárias. **Rev. Bras. Med. Trab.**, Belo Horizonte, v.2, n.2, p.133-139, 2004.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant

actions of bioactive components in plant foods. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.523-524, p.9-20, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**

of AOAC International. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. v.1, p.5, n.955, p.13, n.2,4,03.

*De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2004.

- AURICCHIO, S.; FERGUSON, A.; TRONCONE, R. **Mucosal immunity and the gut epithelium**: interactions in health and disease. Basel: Karger, 1995. 188p. (Dynamic nutrition research, v.4) (Symposium on Mucosal Immunity and Gut Epithelium: Interactions in Health and Disease, held in Capri on April 22-23, 1994).
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, Amsterdam, v.44, p.301-312, 2000.
- BARTHE, L.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v.13, p.154-168, 1999.
- BAXTER, J.H. Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with refsum's disease. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.9, p.636-641, 1968.
- BOLOOR, K.K.; KAMAT, J.P.; DEVASAGAYAM, T.P.A. Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization. **Toxicology**, Amsterdam, v.55, n.1/3, p.63-71, 2000.
- BOTELHO, M.V.J.; ORLANDI, J.M.; MELO, F.L.; MANTOVANI, M.S.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C. Chlorophyllin protects Hep-2 cells from nuclear fragmentation induced by polivirus. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.39, p.174-177, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. Departamento de Fomento e Fiscalização da Produção Animal. **Instrução Normativa n.9, de 09 de julho de 2003**. Publicada em 14 de julho de 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 12 jan./2005.

BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.; PEREIRA, C.; ARBOGAST, D.; BAILEY, G. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B₁ hepatocarcinogenesis in rainbow trout. **Cancer Res.**, Birmingham, v.55, p.57-62, 1995a.

BREINHOLT, V.; SCHIMERLIK, M.; DASHWOOD, R.; BAILEY, G. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B₁: complex formation with the carcinogen. **Chem. Res. Toxicol.**, Columbus, v.8, p.506-514, 1995b.

BRUGSCH, J.T.; SHEARD, C. Determination and quantitative estimation of the decomposition of chlorophyll in the human body. **J. Lab. Clin. Med.**, Orlando, v.24, p.230-240, 1938.

CASE, L.P.; CAREY, D.P.; HIRAKAWA, D.A. Avaliação dos alimentos comerciais para animais domésticos. In: CASE, L.P.; CAREY, D.P.; HIRAKAWA, D.A. **Nutrição canina e felina: manual para profissionais**. Madrid: Harcourt Brace, 1998. p.168-181.

- CHERNOMORSKY, S.; SEGELMAN, A.; PORETZ, R.D. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. **Teratog., Carcinog., Mutagen.**, New York, v.19, p.313-322, 1999.
- CHIOU, W.L.; JEONG, H.Y.; CHUNG, S.M.; WU, T.C. Evaluation of using dog as an animal model to study the fraction of oral dose absorbed of 43 drugs in humans. **Pharm. Res.**, Norwell, v.17, n.2, p.135-140, 2000.
- COULTATE, T.P. Corantes. In: COULTATE, T.P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.145-182.
- COZZOLINO, S.M.F.; MICHELAZZO, F.B. Biodisponibilidade: conceitos, definições e aplicabilidade. In: COZZOLINO, S.M.F., org. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005. p.3-11.
- DASHWOOD, R.H. The importance of using pure chemicals in (anti)mutagenicity studies: chlorophyllin as a case in point. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.381, p.283-286, 1997.
- DASHWOOD, R.; NEGISHI, T.; HAYATSU, H.; BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.; BAILEY, G. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B₁: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.399, p.245-253, 1998.

- DRESSMAN, J.B. Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. **Pharm. Res.**, Norwell, v.3, n.3, p.123-131, 1986. [Review].
- EDER, R. Pigments. In: NOLLET, L.M.L., ed. **Food analysis by HPLC**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2000. p.825-880. (Food Science and technology, 100).
- EGNER, P.A.; STANSBURY, K.H.; SNYDER, E.P.; ROGERS, M.E.; HINTZ, P.A.; KENSLER, T.W. Identification and characterization of chlorin e_4 ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. **Chem. Res. Toxicol.**, Columbus, v.13, n.9, p.900-906, 2000.
- ELDJARN, L.; TRY, K.; STOKKE, O.; MUNTHEKA, A.W.; REFSUM, S.; STEINBERG, D.; AVIGAN, J.; MIZE, C. Dietary effects on serum-phytanic-acid levels and on clinical manifestations in heredopathia atactica polyneuritiformis. **Lancet**, London, v.1, n.7439, p.691-693, 1966.
- FENTON, T.W.; FENTON, M. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.59, n.3, p.631-634, 1979.
- FERRUZZI, M.G.; FAILLA, M.L.; SCHWARTZ, S.J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vivo* digestion and Caco-2 human cell model. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, p.2082-2089, 2001.

FERRUZZI, M.G.; BÖHM, V.; COURTNEY, P.D.; SCHWARTZ, S.J. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. **J. Food Sci.**, Chicago, v.67, n.7, p.2589-2595, 2002.

FERRUZZI, M.G.; FAILLA, M.L.; SCHWARTZ, S.J. Sodium copper chlorophyllin: *in vitro* digestive stability and accumulation by Caco-2 human intestinal cells. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, p.2173-2179, 2002.

FLICKINGER, E.A. Applying human research to companion animals. In: PET FOOD FORUM, 2002: PRODUCTION SYMPOSIUM & TRADE SHOW, Chicago, 2002. **Anal.** Chicago, 2002. p.47-55.

GANDUL-ROJAS, B.; ROCA, M.; MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. Chlorophyll and carotenoid degradation mediated by thylakoid-associated peroxidative activity in olives (*Olea europaea*) cv. Hojiblanca. **J. Plant Physiol.**, Jena, v.161, p.499-507, 2004.

GAUTHIER-JAQUES, A.; BORTLIK, K.; HAU, J.; FAY, L.B. Improved method to track chlorophyll degradation. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.49, n.3, p.1117-1122, 2001.

GROOPMAN, J.D.; DEMATOS, P.; EGNER, P.A.; LOVE-HUNT, A.; KENSLER, T.W. Molecular densimetry of urinary aflatoxin-N⁷-guanine and serum aflatoxin albumin

adducts predicts chemoprotection by 1,2-dithiole-3-thione. **Carcinogenesis**, Oxford, v.13, p.101-106, 1992.

GROSS, J. **Pigments in vegetables**: chlorophylls and carotenoids. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 351p.

HANSSON, H.; BERGVALL, K.; BONDESSON, U.; HEDELAND, M.; TORNEKE, K. Clinical pharmacology of clemastine in healthy dogs. **Vet. Dermatol.**, Oxford, v.15, p.152-158, 2004.

HARTTIG, U.; BAILEY, G.S. Chemoprotection by natural chlorophylls *in vivo*: inhibition of diabenzo(a,l)pyrene-DNA adducts in rainbow trout liver. **Carcinogenesis**, Oxford, v.19, n.7, p.1323-1326, 1998.

HEATON, J.W.; LENCKI, R.W.; MARANGONI, A.G. Kinetic model for chlorophyll degradation in green tissue. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.399-402, 1996.

HEATON, J.W.; MARANGONI, A.G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.7, p.8-15, 1996.

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; SILVA, J.R.M.C. Absorption of macromolecular proteins by rectal epithelium of the Antarctic fish *Notothenia neglecta*. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v.76, p.1247-1253, 1998.

HÖRTENSTEINER, S. The loss of green color during chlorophyll degradation: a prerequisite to prevent cell death? **Planta**, Heidelberg, v.219, n.2, p.191-194, 2004.

HUMPHREY, A.M. Chlorophyll as a color and functional ingredient. **J. Food Sci.**, Chicago, v.69, n.5, p.422-425, 2004.

INOUE, H.; YAMASHITA, H.; FURUYA, K.; NONOMURA, Y.; YOSHIOKA, N.; LI, S. Determination of copper(II) chlorophyllin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.679, p.99-104, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2.ed. São Paulo, 1976. v.1, p.20.

KAMAT, J.P.; BOLLOR, K.K.; DEVASAGAYAM, T.P.A. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1487, p.113-127, 2000.

KARARLI, T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharm. Drug Dispos.**, Bognor Regis, v.16, p.351-380, 1995.

KUMAR, S.S.; SHANKAR, B.; SAINIS, K.B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1672, p.100-111, 2004.

- LAJOLO, F.M. Functional foods: Latin American perspectives. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.88, n.2, p.145-150, 2002.
- LANFER-MARQUEZ, U.M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.39, n.3, p.227-242, 2003.
- LANFER-MARQUEZ, U.M.; BARROS, R.M.C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophyll and their derivatives. **Food Res. Int.**, Amsterdam, 2005. [In Press].
- LIN, J.H. Species similarities and differences in pharmacokinetics. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v.23, n.10, p.1008-1021, 1995.
- MA, L.; DOLPHIN, D. The metabolites of dietary chlorophylls. **Phytochemistry**, New York, v.50, p.195-202, 1999.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.81, p.230-242, 2005.
- MANGOS, T.J.; BERGER, R.G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. A**, Berlin, v.204, p.345-350, 1997.
- MATA, J.E.; YU, Z.; GRAY, J.E.; WILLIAMS, D.E.; RODRIGUES-PROTEAU, R. Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo(a,l)pyrene, 2-amino-1-methyl-6-

phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine, and aflatoxin B₁ across Caco-2 cell monolayers. **Toxicology**, Amsterdam, v.196, p.117-125, 2004.

MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Anti-tumoral promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, Tokyo, v.60, n.1, p.1-8, 1996.

NEGRAES, P.D.; JORDÃO, B.Q.; VICENTINI, V.E.P.; MANTOVANI, M.S. Anticlastogenicity of chlorophyllin in the different cell cycle phases in cultured mammalian cells. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.557, p.177-182, 2004.

PIRES, M.A.; TRAVASSOS, F.S.; PIRES, I. Neoplasias em canídeos: um estudo descritivo de 6 anos. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, Lisbon, v.98, n.547, p.111-118, 2003.

PUDEK, M.R.; SCHREIBER, W.E.; JAMANI, A. Quantitative fluorometric screening test for fecal porphyrins. **Clin. Chem.**, Washington, v.37, n.6, p.826-831, 1991.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. Absorção, distribuição e destino de fármacos. In: _____. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.51-75.

SATO, M.; FUJIMOTO, I.; SAKAI, T.; AIMOT, T.; KIMURA, R.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IX. On the antioxidant

components in commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.34, n.6, p.2428-2434, 1986.

SCHOEFS, B. Determination of pigments in vegetables. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.1054, p.217-226, 2004.

SCHWARTZ, S.J.; ELBE, J.H.V. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. **J. Food Sci.**, Chicago, v.48, p.1303-1306, 1983.

SCHWARTZ, S.J.; LORENZO, T.V. Chlorophyll in foods. **Food Sci. Nutr.**, London, v.29, n.1, p.1-17, 1990.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a secagem e maturação da semente de soja**. São Paulo, 2002. 102p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2.ed. New York: Wiley, 1979. 863p.

STEINBERG, D. Refsum disease. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., eds. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 7.ed. New York: McGraw Hill, 1995. v.2, p.2351-2369.

- SUZUKI, Y.; SHIOI Y. Changes in chlorophyll and carotenoid contents in radish (*Raphanus sativus*) cotyledons show different time course during senescence. **Physiol. Plant.**, Oxford, v.122, p.291-296, 2004.
- TENG, S.S.; CHEN, B.H. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. **Food Chem.**, Amsterdam, v.65, p.367-373, 1999.
- YAMAUCHI, N.; WATADA, A.E. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v.116, n.1, p.58-62, 1991.
- UNITED STATES. National Research Council. Subcommittee on Dog Nutrition. **Nutrient requirements of dogs**. Washington: National Academy Press, 1985. 79p. (Nutrient requirement of domestic animals).
- UNLU, Z.N., CLINTON, S.K., FRANCIS, D.M., SCHWARTZ, S.J. Bioavailability of lycopene isomers from sauces prepared from different tomato varieties. In: DUFOSSÉ, L., ed. **PIGMENTS in food, more than colours...**Quimper: Université de Bretagne, 2004. (3rd International Congress on Pigments in Food). p.295-297.
- WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BROCKMAN, H.E.; FLORA, S.D. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.350, p.109-129, 1996.

ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal
(protocolo nº 56)

OJ/CEEA nº 002/2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Avaliação da absorção intestinal da clorofila através de ensaio de digestibilidade in vivo com cães” (Protocolo nº56), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Tais Motta Fernandes e do orientador(a) Úrsula Maria Lanfer Marquez, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 31/01/2005.

São Paulo, 02 de fevereiro de 2005.

Prof. Associada Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 30913677 / Fax: (11) 3031-8986 - e-mail: rtrigo@usp.br

ANEXO II – Carta da Comissão de Ética em Experimentação Animal (adendo ao protocolo nº 56)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 20/2005

São Paulo, 17 de maio de 2004.

Ilmo(a) Sr(a).

Tais Motta Fernandes

Orientador: Prof. Úrsula Maria Lanfer Marquez
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 16 de maio, **aprovou** as alterações do projeto "Avaliação da absorção intestinal da clorofila através de ensaio de digestibilidade in vivo com cães" (Protocolo CEEA nº 56), apresentado por Vossa Senhoria.

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA/FCF/USP