
TEZĂ DE DOCTORAT

Surse Alimentare de Zeaxantină și Strategii de Îmbunătățire a Bioaccesibilității Acesteia

Doctorand **Cristina TUDOR**

(REZUMAT AL TEZEI DOCTORALE)

Conducător de doctorat **Prof. dr. Adela PINTEA**



REZUMAT

Introducere

În ultimele decenii, pigmentii carotenoidici au fost în centrul atenției multor cercetători, în principal datorită activității de provitamină A a unor compuși, dar și datorită impactului lor pozitiv asupra sănătății umane. Consumul de fructe și legume bogate în carotenoide a fost asociat cu un risc mai scăzut de dezvoltare a multor boli cronice, precum afecțiunile cardiovasculare, bolile oculare și anumite tipuri de cancer. Deoarece organismul uman nu este capabil să sintetizeze *de novo* carotenoidele, aportul acestor compuși bioactivi este dependent de dietă.

Structural, carotenoidele sunt împărțite în două clase: caroteni (hidrocarburi, carotenoide neoxigenate) și xantofile (derivați oxigenați ai hidrocarburilor). Aparținând celei din urmă categorii, luteina și zeaxantina sunt singurele carotenoide ce se pot acumula în regiunea maculară a retinei umane. La nivelul retinei, cele două xantofile oferă protecție prin filtrarea luminii albastre (cunoscută ca dăunătoare fotoreceptorilor și epitelului pigmentului retinei) și acționează ca antioxidanți, limitând stresul oxidativ (neutralizarea fotosensibilizatorilor în stare excitată și a oxigenului singlet, eliminarea speciilor reactive de oxigen). Mai mult, un număr mare de publicații științifice stabilesc o relație între aportul de luteină și zeaxantină și prevenirea și tratamentul mai multor boli oculare, cum ar fi degenerescența maculară legată de vârstă (DMA) și cataracta.

În general, luteina a constituit subiectul mai multor studii de cercetare decât izomerul său zeaxantina, în principal datorită faptului că luteina este mai abundentă în natură. Deși ambele dihidroxicarotenoide împreună cu *mezo*-zeaxantina (o xantofilă care se formează în retină din luteină) se regăsesc în mod egal în *macula lutea*, aportul alimentar este mai favorabil luteinei decât zeaxantinei. Raportul alimentar alarmant dintre luteină și zeaxantină de aproximativ 5:1 indică în mod clar necesitatea identificării unor surse de hrană cu o concentrație mare de zeaxantină.

Analiza cantității de carotenoide din diferite alimente este în prezent posibilă în orice unitate de cercetare al cărei interes îl constituie carotenoidele. Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) s-a dovedit a fi o metodă bună pentru separarea, identificarea și cuantificarea carotenoidelor din alimente și este prezentă în majoritatea studiilor disponibile în literatura de specialitate. Cu toate

acestea, în afară de analiza cantitativă, un alt aspect de importanță critică în investigarea surselor de hrană cu un conținut ridicat de carotenoide este reprezentat de procesarea acestora la nivelul tubului digestiv în urma ingestiei matricelor alimentare. Fracția din carotenoidul ingerat care este transferată în miclele mixte în timpul digestiei este cunoscută în literatura de specialitate ca fracția bioaccesibilă. Ulterior, cantitatea de carotenoid absorbită la nivelul tractului gastro-intestinal care este capabilă să ajungă la țesuturile adecvate pentru a-și exercita efectele biologice reprezintă fracția biodisponibilă.

În literatura de specialitate studiile umane sunt considerate drept „etalonul de aur” în ceea ce privește digestia carotenoidelor și evaluarea absorbției acestora. Cu toate acestea, modelele *in vitro* care imită condițiile fiziologice *in vivo* au fost folosite recent de cercetători ca alternativă pentru modelele animale și umane deoarece sunt simple, rapide, reproductibile, necostisitoare și fără restricții etice. Modelele de digestie *in vitro* includ de obicei trei faze (faza orală, gastrică și cea a intestinului subțire) și implică utilizarea fluidelor de digestie simulate ca solvenți la care se adaugă soluțiile enzimatiche corespunzătoare și bilă. Recent, un consorțiu de oameni de știință a propus un model standardizat de digestie statică *in vitro* (INFOGEST®) cu scopul de a permite o mai bună comparație între rezultatele obținute prin studiile diferitelor grupuri de cercetare ce utilizează simularea gastro-intestinală.

Obiectivele cercetării

Scopul prezentei teze de doctorat a fost investigarea surselor naturale de hrană cu o concentrație mare de zeaxantină și, mai important, cu o bioaccesibilitate crescută a zeaxantinei. Prin urmare, după o examinare riguroasă a literaturii de specialitate existente pe această temă, au fost selectate mai multe surse de alimente bogate în zeaxantină. Uleiul de cătină presat la rece a fost utilizat în prima parte a cercetării ca sursă de origine vegetală a zeaxantinei. După cunoștințele noastre, acesta este primul studiu care investighează bioaccesibilitatea carotenoidelor din această matrice alimentară. Uleiul de cătină se caracterizează printr-o concentrație mare de zeaxantină, în principal în forma sa esterificată cu unul sau doi acizi grași. Având în vedere această formă de stocare a zeaxantinei, metoda de digestie *in vitro* a fost modificată și a fost inclusă enzima numită colesterol esterază pentru a maximiza clivarea formelor esterice în timpul digestiei. Mai mult, o emulsie de tip ulei în apă (U/A) a fost preparată și supusă digestiei *in vitro*. Analiza statistică a fost efectuată între comparând rezultatele obținute pentru ulei și pentru emulsia de tip ulei în apă, în scopul de a evalua potențialul emulsiilor ca sisteme de eliberare a pigmentilor lipofili precum carotenoidele.

Având în vedere că există puține surse de origine animală de zeaxantină, în a doua parte a studiului a fost selectat gălbenușul de ou pentru investigații

suplimentare. Bioaccesibilitatea superioară a zeaxantinei din gălbenușurile fierte de ouă disponibile în comerț a fost în acord cu publicațiile anterioare. Cantitatea mai mică de xantofile maculare din gălbenușul de ou a fost contrabalansată de bioaccesibilitatea lor deosebit de mare datorată compoziției lipidice ridicate a gălbenușurilor de ou.

Există doar câteva publicații cu privire la procesarea gastro-intestinală a carotenoidelor din suplimentele alimentare din microalge. În ultima parte a studiului biomasa organică uscată a *Spirulinei* a fost investigată ca sursă bogată de zeaxantină. Deoarece în literatură s-au folosit diferite extracte biliare în modelele *in vitro*, atât extractul biliar porcine, cât și cel bovine au fost testate în timpul digestiei simulate pentru a evalua influența acestora asupra bioaccesibilității carotenoidelor. Pentru a spori bioaccesibilitatea carotenoidelor din *Spirulina*, a fost inclusă în protocol o grăsime alimentară suplimentară (ulei de cocos presat la rece).

Pentru a atinge scopul cercetării tezei, au fost definite mai multe obiective:

01. Realizarea unui studiu bibliografic exhaustiv asupra surselor naturale de hrană ce conțin zeaxantină și selectarea câtorva surse cu o bioaccesibilitate potențial ridicată

02. Utilizarea și optimizarea protocolului standardizat de digestie statică *in vitro* pentru evaluarea bioaccesibilității zeaxantinei din sursele de alimente selectate

03. Investigarea unor noi strategii pentru a spori bioaccesibilitatea zeaxantinei din sursele de alimente selectate

Rezultatele acestei teze au fost publicate într-un articol de tip review (în jurnalul *Molecules*, revistă indexată ISI cu IF 3.26) și două articole originale (unul în jurnalul *Nutrients*, revistă indexată ISI cu IF 4.54 și unul în jurnalul *Food Science & Nutrition*, revistă indexată ISI cu IF 1.79). În prezent, există încă un articol original submit (în curs de revizuire, minor revision) la un jurnal indexat ISI.

Toate experimentele prezentate în teză au fost efectuate în cadrul Departamentului de Chimie și Biochimie al Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, sub supravegherea Prof. Dr. Adela Pinteș.

Teza de doctorat este structurată în două părți: stadiul actual al cunoașterii ce conține un articol de tip review și cercetarea originală ce cuprinde ipoteza de lucru/obiectivele (**capitolul 1**), metodologiile generale (**capitolul 2**), urmate de trei articole originale de cercetări proprii (**capitolele 3-5**), concluzii generale și recomandări (**capitolul 6**) și originalitatea și contribuția inovativă a tezei (**capitolul 7**).

Pentru articolul de tip review prezentat în stadiul actual al cunoașterii, publicațiile care au raportat surse alimentare de zeaxantină, evaluarea bioaccesibilității și beneficiile pentru sănătate ale zeaxantinei au fost revizuite utilizând bazele de date electronice Web of Science, Scopus și ScienceDirect. În urma acestui studiu de literatură, au fost selectate câteva surse alimentare de origine diferită, cu o concentrație ridicată de zeaxantină iar bioaccesibilitatea zeaxantinei a fost investigată printr-un model de digestie *in vitro*. Uleiul de cătină presat la rece, gălbenușurile de ouă ecologice și pulberea organică de *Spirulina* achiziționate fie din supermarketuri, fie din magazine naturiste au fost alese drept reprezentanți pentru sursele de zeaxantină de origine vegetală, animală și din microalge. Alimentele/suplimentele au fost selectate pe baza accesibilității populației generale la acestea și pe baza prețurilor convenabile.

Identificarea și cuantificarea carotenoidelor au fost efectuate utilizând HPLC-DAD iar profilul lipidic prin GC-MS. Protocolul internațional standardizat de digestie *in vitro* (INFOGEST®) a fost utilizat și optimizat pentru fiecare dintre sursele de alimente investigate. Pentru sursa alimentară de origine vegetală și cea din microalge s-au folosit strategii adecvate pentru a îmbunătăți bioaccesibilitatea zeaxantinei. În cazul uleiului de cătină, a fost preparată o emulsie de tip ulei în apă care a fost supusă digestiei gastro-intestinale, în timp ce biomasa organică de *Spirulinei* a fost digerată împreună cu o cantitate de ulei de cocos pentru a spori bioaccesibilitatea zeaxantinei. Toate analizele au fost efectuate în triplicat iar rezultatele au fost prezentate ca media \pm deviația standard.

Analiza statistică a fost efectuată folosind software-ul Graph Pad Prism, versiunea 6.0 (Graph Pad Software Inc.) și programul SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, SUA). Probele au fost analizate utilizând testul t “nepereche”, testele ANOVA unidirecționale post-hoc iar comparațiile multiple au fost efectuate folosind testul Tukey. Valorile $p < 0.05$ au fost considerate semnificative statistic.

Capitolul 3 vizează validarea uleiului de cătină ca sursă valoroasă de xantofile bioaccesibile. Acest studiu a investigat profilul lipidic și al carotenoidelor din uleiul de cătină presat la rece și a examinat bioaccesibilitatea *in vitro* a carotenoidelor din această matrice alimentară în comparație cu o emulsie de tip ulei în apă preparată folosind uleiul investigat.

Capitolul 4 oferă o perspectivă asupra calității unor ouă disponibile în comerț în ceea ce privește conținutul și profilul carotenoidelor și bioaccesibilitatea *in vitro* a pigmentilor maculari din gălbenușurile de ou organic fiert.

În **capitolul 5** a fost investigat profilul lipidic și al carotenoidelor din suplimente sub formă de pulbere din microalge, împreună cu bioaccesibilitatea carotenoidelor din aceste matrici alimentare. Acest studiu evidențiază potențialul biomasei comestibile a microalgelor ca surse valoroase de carotenoide și subliniază

influența pozitivă a consumului unei grăsimi alimentare asupra bioaccesibilității carotenoidelor în timpul digestiei gastrointestinale.

Concluziile generale au fost:

1. Uleiul de cătină presat la rece reprezintă o sursă naturală foarte bogată de carotenoide, în special de zeaxantină.

2. Adăugarea de colesterol esterază în protocolul de digestie *in vitro* reprezintă cea mai bună abordare pentru digestia probelor alimentare care conțin o cantitate mare de esteri ai xantofilelor.

3. Furnizarea unei surse lipidice în timpul digestiei gastro-intestinale facilitează transferul carotenoidelor în micelle mixte, sporind astfel bioaccesibilitatea acestora.

4. Utilizarea emulsiilor de tip ulei în apă ca sisteme de livrare a carotenoidelor îmbunătățește bioaccesibilitatea acestor compuși bioactivi naturali.

5. Datorită matricei bogate în lipidice, gălbenușul de ou reprezintă o sursă accesibilă de pigmenți maculari foarte bioaccesibili în nutriția umană.

6. Producția organică de ouă asigură un conținut total de carotenoide ridicat în gălbenușurile de ou, împreună cu un profil al acestora compus în cea mai mare parte din luteină și zeaxantină și absența compușilor sintetici.

7. Biomasa uscată a microalgelor reprezintă o sursă naturală bună de carotenoide, în special de xantofile.

8. Utilizarea extractului de bilă bovină în modelul de digestie *in vitro* este recomandat în comparație cu extractul de bilă porcine datorită similitudinii sale în compoziția acizilor biliari cu conținutul duodenal uman.

9. Adăugarea uleiului de cocos, o sursă de lipide bogată în acizi grași saturați cu lanț mediu, a condus la formarea micelilor mixte mai mici și, astfel, a îmbunătățit bioaccesibilitatea zeaxantinei din *Spirulina*.

Originalitate și contribuții personale

Actuala teză de doctorat a investigat surse naturale bioaccesibile de zeaxantină iar rezultatele obținute pot fi considerate utile în industria alimentară și pentru comunitatea științifică din domeniul biotehnologiei și nutriției. Cercetările efectuate în cadrul acestei teze au fost realizate în așa fel încât bioaccesibilitatea zeaxantinei din diferite matrice alimentare să poată fi evaluată, comparată și îmbunătățită prin diferite abordări.

Articolul prezentat în capitolul intitulat stadiul actual al cunoașterii oferă un studiu cuprinzător asupra literaturii existente cu privire la sursele naturale de zeaxantină, studiu ce facilitează dezvoltarea alimentelor funcționale cu o

bioaccesibilitate îmbunătățită a zeaxantinei și oferă o bază de date la scară mică care permite consumatorilor și nutriționiștilor să aleagă sau să recomande surse dietetice mai bune de zeaxantină pentru populațiile vulnerabile sau afectate de boli oftalmice, precum degenerescenta maculară legată de vârstă.

În general, cercetările anterioare asupra zeaxantinei s-au concentrat mai mult pe concentrația sa în diferite surse dietetice decât pe soarta sa gastrointestinală după ingestie. După cunoștințele noastre, aceasta este prima publicație ce investighează bioaccesibilitatea carotenoidelor din uleiul de cătină. Referitor la binecunoscuta pulbere de *Spirulină* ce a câștigat o atenție sporită în ultimii ani, există o singură publicație disponibilă cu privire la bioaccesibilitatea zeaxantinei din această matrice alimentară. Cu toate acestea, în respectiva publicație condițiile de digestie *in vitro* nu au fost furnizate în totalitate și nu a fost menționată specia investigată de *Spirulina*, în timp ce în prezenta teză a fost aplicat un protocol standardizat de digestie *in vitro* pentru simularea digestiei unei pulberi comerciale obținute din *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

Prin utilizarea metodei INFOGEST® pentru a evalua bioaccesibilitatea carotenoidelor din matrici alimentare de origine vegetală, animală și din microalge s-a permis o comparație directă între rezultatele prezentate și alte rezultate obținute de diferite grupuri de cercetare din întreaga lume.

Deoarece majoritatea surselor alimentare bogate în zeaxantină sunt fructe exotice indisponibile peste tot în lume, în teza actuală au fost cercetate și validate trei matrici alimentare accesibile și disponibile pentru populația generală ca surse dietetice cu o bioaccesibilitate crescută a zeaxantinei.

În cele din urmă, îmbunătățirea cu succes a bioaccesibilității zeaxantinei prin formularea unei emulsii de tip ulei în apă și prin includerea unei surse de grăsime compusă în principal din acizi grași saturați (ulei de cocos) în digestia *Spirulinei* constituie informații extrem de utile pentru dezvoltatorii de alimente în dezvoltarea de alimente funcționale.

Referințe

1. AL-DELAIMY W.K., A.L. KAPPEL, P. FERRARI, N. SLIMANI, J.P. STEGHENS, S. BINGHAM, I. JOHANSSON, P. WALLSTRÖM, K. OVERVAD, A. TJØNNELAND, T.J. KEY, A.A. WELCH, H.B. BUENO-DE-MESQUITA, P.H.M. PEETERS, H. BOEING, J. LINSEISEN, F. CLAVEL-CHAPELON, C. GUIBOUT, C. NAVARRO, J.R. QUIRÓS, D. PALLI, E. CELENTANO, A. TRICHOPOULOU, V. BENETOU, R. KAAKS, E. RIBOLI, 2004, Plasma levels of six carotenoids in nine European countries: Report from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), *Public Health Nutr* 7:713-722. doi:10.1079/PHN2004598.
2. ASENSIO GRAU A., I. PEINADO, A. HEREDIA, A. ANDRÉS, 2018, Effect of cooking methods and intestinal conditions on lipolysis, proteolysis and xanthophylls bioaccessibility of eggs, *J Funct Foods* 46:579-586. doi:10.1016/j.jff.2018.05.025.
3. BERNAERTS T.M.M., H. VERSTREKEN, C. DEJONGHE, L. GHEYSEN, I. FOUBERT, T. GRAUWET, A.M. LOEY, 2020, Cell disruption of *Nannochloropsis* sp. improves in vitro bioaccessibility of carotenoids and ω 3-LC-PUFA, *J Funct Foods* 65:103770. doi:10.1016/j.jff.2019.103770.
4. BREITHAUPT D.E., 2007, Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review, *Trends Food Sci Technol* 18(10):501-506. doi:10.1016/j.tifs.2007.04.009.
5. BUNEA A., F.M. COPACIU, S. PAȘCALĂU, F. DULF, D. RUGINĂ, R. CHIRA, A. PINTEA, 2017, Chromatographic analysis of lipophilic compounds in eggs from organically fed hens, *J App Poult Res*, 26(4):498-508. doi:10.3382/japr/pfx022.
6. CANENE-ADAMS K., J. ERDMAN, 2009, Absorption, Transport, Distribution in Tissues and Bioavailability, In: Britton G., Pfander H., Liaaen-Jensen S. (eds), *Carotenoids*, 115-148, Birkhäuser Basel. doi:10.1007/978-3-7643-7501-0_7.
7. CHACÓN-ORDÓÑEZ T., R. CARLE, R. SCHWEIGGERT, 2018, Bioaccessibility of carotenoids from plant and animal foods, *J Sci Food Agric* 99:3220-3239. doi:10.1002/jsfa.9525.
8. EGGERSDORFER M., A. WYSS, 2018, Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys* 652:18-26. doi:10.1016/j.abb.2018.06.001.
9. FERNÁNDEZ-GARCÍA E., I. CARVAJAL-LÉRIDA, A. PÉREZ-GÁLVEZ, 2009, In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency, *Nutr Res* 29 (11):751-760. doi:10.1016/j.nutres.2009.09.016.
10. GALE C.R., N.F. HALL, D.I.W. PHILLIPS, C.N. MARTYN, 2003, Lutein and Zeaxanthin Status and Risk of Age-Related Macular Degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2461-2465. doi:10.1167/iovs.02-0929.
11. GILLE A., A. TRAUTMANN, C. POSTEN, K. BRIVIBA, 2015, Bioaccessibility of carotenoids from *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Int J Food Sci Nutr* 67:507-513. doi:10.1080/09637486.2016.1181158.
12. GLEIZE B., F. TOURNIAIRE, L. DEPEZAY, R. BOTT, M. NOWICKI, L. ALBINO, D. LAIRON, E. KESSE-GUYOT, P. GALAN, S. HERCBERG, P. BOREL, 2013, Effect of type of TAG fatty acids

- on lutein and zeaxanthin bioavailability, *Br J Nutr* 110:1-10. doi:10.1017/s0007114512004813.
13. GRANADO-LORENCIO F., C. HERRERO-BARBUDO, G. ACIEN-FERNANDEZ, E. MOLINA-GRIMA, J.M. FERNANDEZ-SEVILLA, B. PÉREZ-SACRISTÁN, I. BLANCO-NAVARRO, 2009, In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*, *Food Chem* 114:747-752. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.058.
 14. GRANADO-LORENCIO F., B. OLMEDILLA-ALONSO, C. HERRERO-BARBUDO, B. PÉREZ-SACRISTAN, I. BLANCO-NAVARRO, S. BLAZQUEZ-GARCÍA, 2007, Comparative in Vitro Bioaccessibility of Carotenoids from Relevant Contributors to Carotenoid Intake, *J Agric Food Chem* 55:6387-6394. doi:10.1021/jf070301t.
 15. GROSSHAGAUER S., K. KRAEMER, V. SOMOZA, 2020, The True Value of Spirulina. *J Agric Food Chem* 68:4109-4115. doi:10.1021/acs.jafc.9b08251.
 16. HEMPEL J., C.N. SCHÄDLE, J. SPRENGER, A. HELLER, R. CARLE, R.M. SCHWEIGGERT, 2017, Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (*Lycium barbarum* L.), *Food Chem* 218:525-533. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.065.
 17. HENRÍQUEZ V., C. ESCOBAR, J. GALARZA, J. GIMPEL, 2016, Carotenoids in Microalgae, In: Stange C. (ed), *Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry* 219-237, Springer. doi:10.1007/978-3-319-39126-7_8.
 18. HUMPHRIES J.M., F. KHACHIK, 2003, Distribution of Lutein, Zeaxanthin, and Related Geometrical Isomers in Fruit, Vegetables, Wheat, and Pasta Products, *J Agric Food Chem* 51:1322-1327. doi:10.1021/jf026073e.
 19. KAULMANN A., C.M. ANDRÉ, Y.J. SCHNEIDER, L. HOFFMANN, T. BOHN, 2016, Carotenoid and Polyphenol Bioaccessibility and Cellular Uptake from Plum and Cabbage Varieties, *Food Chem* 197:325-332. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.049.
 20. LEMMENS L., I. COLLE, S. VAN BUGGENHOUT, P. PALMERO, A. VAN LOEY, M. HENDRICKX, 2014, Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro) structural characteristics and the presence of lipids: A review, *Trends Food Sci Technol* 38:125-135. doi:10.1016/j.tifs.2014.05.005.
 21. MA L., H.L. DOU, Y.Q. WU, Y.M. HUANG, Y.B. HUANG, X.R. XU, Z.Y. ZOU, X.M. LIN, 2011, Lutein and zeaxanthin intake and the risk of age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis, *Br J Nutr* 107:350-359, doi:10.1017/S0007114511004260.
 22. MARIUTTI L.R.B., A.Z. MERCADANTE , 2018, Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? *Arch Biochem Biophys* 648:36-43. doi:10.1016/j.abb.2018.04.005.
 23. MERCADANTE A.Z., D.B. RODRIGUES, F.C. PETRY, L.R.B. MARIUTTI, 2017, Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence, *Food Res Int* 99:830-850. doi:10.1016/j.foodres.2016.12.018.
 24. MINEKUS M., M. ALMINGER, P. ALVITO, S. BALLANCE, T. BOHN, C. BOURLIEU, F. CARRIÈRE, R. BOUTROU, M. CORREDIG, D. DUPONT, C. DUFOUR, L. EGGER, M. GOLDING, S. KARAKAYA, B. KIRKHUS, S. LE FEUNTEUN, U. LESMES, A. MACIERZANKA, A. MACKIE, S. MARZE, D.J. MCCLEMENTS, O. MÉNARD, I. RECIO, C.N. SANTOS, R.P. SINGH, G.E. VEGARUD, M.S.J. WICKHAM, W. WEITSCHIES, A. BRODKORB, 2014, A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus, *Food Funct* 5:1113-1124. doi:10.1039/C3FO60702J.

25. MUGNAI C., E.N. SOSSIDOU, A. DAL BOSCO, S. RUGGERI, S. MATTIOLI, C. CASTELLINI, 2014, The effects of husbandry system on the grass intake and egg nutritive characteristics of laying hens, *J Sci Food Agric* 94(3):459-467. doi:10.1002/jsfa.6269.
26. NAGAO A., E. KOTAKE-NARA, M. HASE, 2013, Effects of Fats and Oils on the Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E in Vegetables, *Biosci Biotechnol Biochem* 77:1055-1060. doi:10.1271/bbb.130025.
27. NYS Y., 2000, Dietary carotenoids and egg yolk coloration - A review, *Archiv fur Geflugelkunde* 64:45-54.
28. O'SULLIVAN A.M., Y.C. O'CALLAGHAN, T.P. O'CONNOR, N.M. O'BRIEN, 2011, The content and bioaccessibility of carotenoids from selected commercially available health supplements, *Proceedings of the Nutrition Society* 70:E62. doi:10.1017/S0029665111001029.
29. PEHOWICH D.J., A.V. GOMES, J.A. BARNES, 2000, Fatty acid composition and possible health effects of coconut constituents, *West Indian Med J* 49(2):128-133.
30. PERRY A., H. RASMUSSEN, E.J. JOHNSON, 2009, Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products, *J Food Compos Anal* 22:9-15. doi:10.1016/j.jfca.2008.07.006.
31. PETRY F.C., A.Z. MERCADANTE, 2019, Bile amount affects both the degree of micellarization and the hydrolysis extent of carotenoid esters during in vitro digestion, *Food Funct* 10:8250-8262. doi:10.1039/C9FO01453E.
32. PINTEA A., F.V. DULF, A. BUNEA, C. MATEA, S. ANDREI, 2012, Comparative analysis of lipophilic compounds in eggs of organically raised ISA Brown and Araucana hens, *Chem Pap* 66(10):955-963. doi:10.2478/s11696-012-0219-2.
33. POP R.M., Y. WEESEPOEL, C. SOCACIU, A. PINTEA, J.P. VINCKEN, H. GRUPPEN, 2014, Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties, *Food Chem* 147:1-9. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.083.
34. RODRIGUES D.B., C. CHITCHUMROONCHOKCHAI, L.R.B. MARIUTTI, A.Z. MERCADANTE, M.L. FAILLA, 2017, Comparison of two static in vitro digestion methods for screening bioaccessibility of carotenoids in fruits, vegetables and animal products, *J Agric Food Chem* 65:11220-11228. doi:10.1021/acs.jafc.7b04854.
35. SALVIA-TRUJILLO L., S.H.E. VERKEMPINCK, L. SUN, A.M. VAN LOEY, T. GRAUWET, M.E. HENDRICKX, 2017, Lipid digestion, micelle formation and carotenoid bioaccessibility kinetics: Influence of emulsion droplet size, *Food Chem* 229:653-662. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.146.
36. SCHWEIGGERT R.M., R. CARLE, 2015, Carotenoid Deposition in Plant And Animal Foods and Its Impact on Bioavailability, *Crit Rev Food Sci Nutr* 57(9):1807-1830. doi:10.1080/10408398.2015.1012756.
37. TYSSANDIER V., B. LYAN, P. BOREL, 2001, Main Factors Governing the Transfer of Carotenoids from Emulsion Lipid Droplets to Micelles, *Biochim Biophys Acta* 1533:285-292. doi:10.1016/S1388-1981(01)00163-9.
38. VAN RUTH S., M. ALEWIJN, K. ROGERS, E. NEWTON-SMITH, N. TENA, M. BOLLEN, A. KOOT, 2011, Authentication of organic and conventional eggs by carotenoid profiling, *Food Chem* 126(3):1299-1305. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.081.

39. VILLARRUEL-LOPEZ A., F. ASCENCIO, K. NUÑO, 2017, Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source - A Review, *Pol J Food Nutr Sci* 67:251-263. doi:10.1515/pjfn-2017-0017.
40. WEN X., J. HEMPEL, R.M. SCHWEIGGERT, Y. WANG, Y. NI, R. CARLE, 2018, Screening of critical factors influencing the efficient hydrolysis of zeaxanthin dipalmitate in an adapted in vitro- digestion model, *Food Chem* 257:36-43. doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.116.
41. XAVIER A.A.O., A.Z. MERCADANTE, 2019, The bioaccessibility of carotenoids impacts the design of functional foods, *Curr Opin Food Sci* 26:1-8. doi:10.1016/j.cofs.2019.02.015.
42. YU B., J. WANG, P.M. SUTER, R.M. RUSSELL, M.A. GRUSAK, Y. WANG, Z. WANG, S. YIN, G. TANG, 2012, Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to humans, *Br J Nutr* 108:611-619. doi:10.1017/S0007114511005885.