



**BETÂNIA DINIZ VOLPI CÂNDIDO**

**RETENÇÃO DE CAROTENOIDES APÓS  
MOAGEM DE MILHO BIOFORTIFICADO E  
DURANTE O ARMAZENAMENTO DOS  
DERIVADOS**

**LAVRAS – MG**

**2010**

**BETÂNIA DINIZ VOLPI CÂNDIDO**

**RETENÇÃO DE CAROTENOIDES APÓS MOAGEM DE MILHO  
BIOFORTIFICADO E DURANTE O ARMAZENAMENTO DOS  
DERIVADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dr<sup>a</sup> Joelma Pereira

Co-orientadora

Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Dias Paes

**LAVRAS - MG**

**2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Cândido, Betânia Diniz Volpi.

Retenção de carotenoides após moagem de milho biofortificado  
e durante o armazenamento dos derivados / Betânia Diniz Volpi

Cândido. – Lavras : UFLA, 2010.

98 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Joelma Pereira.

Bibliografia.

1. Processamento. 2. Hipovitaminose A. 3. Extração. 4. *Zea  
mays*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.725

**BETÂNIA DINIZ VOLPI CÂNDIDO**

**RETENÇÃO DE CAROTENOIDES APÓS MOAGEM DE MILHO  
BIOFORTIFICADO E DURANTE O ARMAZENAMENTO DOS  
DERIVADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de julho de 2010.

Dra Maria Cristina Dias Paes

EMBRAPA MILHO E SORGO

Dr. Carlos José Pimenta

UFLA

Dra. Joelma Pereira

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2010**

*A Deus, pelas vitórias alcançadas.*

**OFEREÇO**

*Às seis pessoas mais importantes em minha vida:  
minha mãe Marleni, meu marido Pablo, meus  
filhos, Lucas e Luíza, e meus irmãos Vinícius  
e Marcelinho. Vocês são, em grande parte,  
responsáveis por todas as minhas conquistas.  
Amo Vocês!*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devoto minha fé e a quem recorro nos momentos mais difíceis, e a Nossa Senhora pela constante proteção.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) pela oportunidade de realizar o experimento nos seus laboratórios e pelo custeio da pesquisa por meio do projeto MP2 “Biofortificação no Brasil: desenvolvendo produtos agrícolas mais nutritivos”.

À Professora Joelma Pereira, pela orientação, pelo incentivo que foi decisivo na minha formação e, principalmente, por ter sido mais do que uma orientadora, uma grande amiga. Obrigada por confiar e acreditar em meu trabalho!

À minha co-orientadora, Maria Cristina Dias Paes, exemplo de profissionalismo, pela amizade, paciência, incentivo, estímulo ao desenvolvimento do raciocínio científico e, sobretudo, pelos ensinamentos que levarei para minha vida pessoal. Meu carinho e admiração “sempre”.

Ao professor, Carlos José Pimenta, por aceitar fazer parte da banca e por todos os ensinamentos durante a pós-graduação.

Aos meus pais, Marcelo (*in memoriam*) e Marleni, pelo exemplo de vida e por tantos ensinamentos importantes.

Ao Pablo, Lucas e Luiza minha fonte de amor e incentivo.

À minha vó Cenira e a todos os tios e primos que, mesmo de longe, sempre torceram por mim.

A todos os amigos do Laboratório de Grãos e Cereais da UFLA, que tornaram o meu trabalho mais agradável e que sempre me ajudaram quando precisei. Sinto-me honrada por ter feito parte desta equipe.

A todos os professores, técnicos e funcionários do DCA, que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo, Natália, Camila, Jéssica e Rita pela amizade, auxílio, convivência durante o trabalho experimental e, em especial, ao Carlos Henrique Pires que muito contribuiu na realização das análises químicas.

Às estagiárias, Amanda e Débora, pelo carinho e auxílio no trabalho experimental.

Ao pesquisador, Antônio Carlos de Oliveira (Embrapa Milho e Sorgo) e ao professor “Paulo Bola” (DEX/UFLA), pela disponibilidade e auxílio na condução das análises estatísticas. Vocês foram fundamentais.

Aos meus primos queridos, os engenheiros agrônomos, Pedro e Ricardo Augusto, que foram meus “assessores estatísticos particulares” e que tanto me auxiliaram nas análises estatísticas e na vida acadêmica.

À Juliana, Júlia, Danielly, Jacyara, Fausto, Camila e Eliza, amigos de todas as horas e das longas jornadas de estudos, pelos momentos *gourmet*, por todas as besteiras faladas e por tornarem estes dois anos muito mais divertidos.

Aos amigos da Vigilância Sanitária de Sete Lagoas, pelo apoio e respeito a mim externados durante estes anos incansáveis de luta.

Ao amigo Balu, pela sensatez e por ter acreditado em mim quando todo o universo conspirava contra!

À Ellem e ao professor Contado, por terem me recebido tão bem em sua casa, “Hotel Cinco Estrelas”. Obrigado pelos conselhos sempre pertinentes.

A todos que torceram por mim e que, por motivo de exaustão em que me encontro no final desse trabalho, não foram mencionados. Meus sinceros agradecimentos.

*“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”.*

*(Clarice Lispector)*



## **BIOGRAFIA**

BETÂNIA DINIZ VOLPI CÂNDIDO, filha de Marcelo Luiz Volpi e Marleni Diniz Volpi, nasceu em 06 de novembro de 1973, na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em agosto de 1992, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), em Ouro Preto, MG, concluindo-o em dezembro de 1996.

Em agosto de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras, concluindo os requisitos necessários para obter o título de Mestre em julho de 2010, com a defesa da dissertação.

## RESUMO GERAL

Os carotenoides são compostos naturais de propriedades expressivas. Vários alimentos são fontes de carotenoides, dentre os quais se destaca o milho. Milhos biofortificados com carotenoides com atividade pró-vitáminica A, além de ferro e zinco estão sendo desenvolvidos no Brasil por meio do melhoramento genético tradicional de plantas. Todo o processo de avaliação de linhagem ou variedades biofortificadas se faz com grãos integrais, embora grande parte do consumo humano de milho se realize por meio de seus derivados. Entretanto sabe-se que os produtos alimentícios processados podem sofrer alterações na sua composição química durante o processamento e/ou armazenamento. Essas alterações podem acarretar prejuízos do ponto de vista nutricional, notória a instabilidade dos carotenoides, quando há presença e/ou disponibilidade de oxigênio, luz, calor, metais, enzimas e peróxidos. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar a retenção de carotenoides, após processo de moagem a seco de grãos de milho biofortificado, bem como estimar as perdas ocorridas, durante o armazenamento, por meio do estudo de retenção desses compostos nos derivados canjica, fubá e creme de milho. Para tanto, foi delineado um experimento em esquema inteiramente casualizado com quatro tratamentos: grão, canjica, fubá e creme de milho. Os carotenoides foram extraídos em esquema sequencial de solventes orgânicos e em seguida quantificados através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os derivados obtidos pelo processamento apresentaram redução na retenção real de carotenoides totais, carotenoides proVA, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, quando comparado aos grãos integrais da variedade biofortificada, evidenciando o efeito da moagem a seco sobre a retenção desses compostos. O creme de milho, quando comparado aos demais derivados, foi o produto que apresentou os menores índices de retenção real (%) para carotenoides totais e carotenoides proVA. Durante o armazenamento, foi avaliada a retenção de carotenoides durante 24 dias. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), compondo um esquema fatorial 3 x 8, em que se estudou três derivados do milho (canjica, fubá e creme) durante oito períodos de armazenamento (0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 dias). Para a descrição das variáveis, em função dos períodos de armazenamento, foram realizadas análises de regressão e os modelos de regressão linear foram selecionados, observando a significância do teste F, para cada modelo e seus respectivos coeficientes de determinação. Para os três derivados houve estimativa de diminuição linear da retenção de carotenoides totais e de carotenoides proVA durante o período avaliado. Em relação aos carotenoides proVA verificou-se que ocorrem perdas significativas a partir do 14º dia de armazenamento para a canjica, 7º para o fubá

e 10º dia para o creme de milho. Não foi verificado aumento nos teores de 13-cis- $\beta$ -caroteno e de 9-cis- $\beta$ -caroteno. Em contrapartida, houve decréscimo linear dos índices de retenção de  $\beta$ -caroteno, sugerindo a ocorrência de degradação desse carotenoide. Os teores de carotenoides proVA, em grãos de milho biofortificado, sofrem reduções de 39,5% para canjica, 49,6% para fubá e 59,8% para o creme de milho após o armazenamento desses derivados por período de 24 dias em condições de comercialização a varejo.

Palavras-chave: Hipovitaminose A. Processamento. Degradação. Melhoramento genético.

## ABSTRACT

Carotenoids are natural compounds of expressive properties. Several foods are rich in carotenoids, among which the corn stands out. Maize biofortified with carotenoids with pro-vitamin A activity, as well as iron and zinc are being developed in Brazil through traditional plant breeding. The entire process of evaluating a biofortified strain or strains is done with whole grains, though much of the human consumption of maize is carried out through its derivatives. Currently, it is known that processed food products may change in chemical composition during processing and / or storage. These changes may result in nutritional loss, the notorious instability of these compounds when there is presence and / or oxygen availability, light, heat, metals, enzymes and peroxides. Therefore, the aim of this study is to evaluate the carotenoid retention after the dry milling process of biofortified corn and estimate the losses occurring during storage through the study of retention of these compounds in derivatives. Regarding this goal, an experiment was outlined in a scheme designed with four treatments: beans, hominy, corn and creamed corn. Carotenoids were extracted in sequential scheme of organic solvents and then quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). Derivatives obtained by processing showed reduction in retention of total carotenoids, proVA carotenoid, lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene when compared to whole grain of biofortified variety, showing the effect of dry grinding on the retention of these compounds. The creamed corn, when compared to other derivatives, was the product that had the lowest real retention (%) rates for total and proVA carotenoids. During storage, carotenoid retention was evaluated for 24 days. The experimental design was completely randomized (CRD), forming a 3 x 8 factorial, which studied three corn derivatives (hominy, cornmeal and cream) for eight storage periods (0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 days). For the description of variables, depending on the storage periods, regression analysis was performed and the linear regression models were selected, noting the F test significance for each model and their respective coefficients of determination. For the three derivatives a linear decrease was estimated in the retention of total and proVA carotenoid during the study period. Regarding proVA carotenoids, evidence was found for substantial losses from the 14<sup>th</sup> day of storage for hominy, 7<sup>th</sup> day for corn meal and 10<sup>th</sup> day for creamed corn. No increase was observed in the levels of 13-cis- $\beta$ -carotene and 9-cis- $\beta$ -carotene. In contrast, there was a linear decrease in  $\beta$ -carotene retention rates, suggesting the occurrence of carotenoid degradation. The carotenoid contents in biofortificado corn grains prove that they suffered a reduction of

39.5% for hominy, 4.6% for maize flour and 59.8% for the corn cream after the storage of those derivatives for a period of 24 days under retail commercialization conditions.

Keywords: Hypovitaminosis A. Processing. Degradation. Plant breeding

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1	Unidade de isopreno e estrutura química do $\alpha$ -caroteno.....	22
Figura 2	Estrutura química de alguns carotenoides.....	23
Figura 3	Formação de xantofilas a partir do $\beta$ -caroteno.....	24
Figura 4	Conversão do $\beta$ -caroteno a retinol.....	25
Figura 5	Clivagem do $\beta$ -caroteno.....	27
Figura 6	Principais isômeros do $\beta$ -caroteno.....	29
Figura 7	Anatomia do grão de milho e suas partes .....	33

### Capítulo 2

Figura 1	Cromatogramas de carotenoides do grão de cultivar biofortificada e de creme de milho resultante do processo de moagem a seco.....	67
----------	---	----

### Capítulo 3

Figura 1	Variação da retenção real (%) de carotenoides totais e carotenoides proVA durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia.....	83
Figura 2	Variação da retenção real (%) de $\alpha$ -caroteno e $\beta$ -caroteno durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia.....	86
Figura 3	Variação da retenção real (%) de luteína e zeaxantina durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia.....	88
Figura 4	Variação da retenção real (%) de 9-cis- $\beta$ -caroteno durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia.....	89
Figura 5	Variação da retenção real (%) de $\beta$ -criptoxantina durante o	

	armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia.....	90
Figura 6	Varição da retenção real (%) de 13-cis- $\beta$ -caroteno durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia.....	92

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

Tabela 1	Síntese do resultado da análise de variância do efeito da moagem a seco sobre as variáveis estudadas.....	62
Tabela 2	Índices médios de retenção real de carotenoides totais (%) e carotenoides proVA (%) de derivados de milho biofortificado após processamento por meio de moagem seca.....	63
Tabela 3	Índices médios de retenção real expressos em porcentagens das frações quantificadas de carotenoides de derivados de milho biofortificado após processamento por meio de moagem seca.....	65
Tabela 4	Teores médios de carotenoides totais e carotenoides proVA expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de grãos e derivados de milho biofortificado.....	68
Tabela 5	Teores médios de carotenoides expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de frações quantificadas em grãos e derivados de milho biofortificado.....	69
Tabela 6	Teores médios e redução percentual de carotenoides proVA de derivados de milho biofortificado.....	70

### Capítulo 3

Tabela 1	Síntese da análise de variância do efeito do armazenamento sobre as variáveis estudadas.....	82
Tabela 2	Valores médios de retenção real (%) de $\beta$ -criptoxantina em derivados de milho biofortificado.....	91
Tabela 3	Valores médios de retenção real (%) de 13-cis- $\beta$ -caroteno	



	em derivados de milho biofortificado.....	93
Tabela 4	Varição de peso das amostras (%) durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia.....	94
Tabela 5	Teor de carotenoides proVA em base seca nos derivados de milho biofortificado nos períodos início e final de armazenamento e a redução percentual na concentração dessas substâncias ocorridas devido a estocagem.....	94

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1: Introdução Geral.....</b>	18
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	18
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	20
<b>2.1</b>	<b>Carotenoides .....</b>	20
<b>2.1.1</b>	<b>Alterações em carotenoides.....</b>	26
<b>2.2</b>	<b>Milho .....</b>	30
<b>2.3</b>	<b>Processamento de milho.....</b>	34
<b>2.4</b>	<b>Hipovitaminose A .....</b>	35
<b>2.5</b>	<b>Degeneraçãomacular relacionada à idade.....</b>	38
<b>2.6</b>	<b>Biofortificação.....</b>	40
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	43
	<b>CAPITULO 2: Retenção de carotenoides de importância biológica após processamento via moagem a seco de grãos de milho biofortificado.....</b>	53
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	55
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	57
<b>2.1</b>	<b>Obtenção de grãos .....</b>	57
<b>2.2</b>	<b>Procedimentos de processamento .....</b>	57
<b>2.3</b>	<b>Procedimentos de laboratório .....</b>	59
<b>2.4</b>	<b>Procedimentos biométricos.....</b>	60
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	62
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	71
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	72
	<b>CAPITULO 3: Estabilidade de carotenoides durante o armazenamento de derivados de milho biofortificado com precursores de vitamina A.....</b>	74
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	77
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	79
<b>2.1</b>	<b>Material avaliado e armazenado.....</b>	79
<b>2.2</b>	<b>Procedimentos de laboratório .....</b>	80
<b>2.3</b>	<b>Procedimentos biométricos.....</b>	81
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	82
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	95
<b>5</b>	<b>CONLUSÕES GERAIS.....</b>	96
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	97

## CAPÍTULO 1 Introdução Geral

### 1 INTRODUÇÃO

Dentre os alimentos que são fontes de carotenoides destaca-se o milho, um dos cereais mais cultivados no Brasil (OLIVEIRA JÚNIOR, 2006). Zeaxantina e luteína são os principais carotenoides presentes neste cereal, cuja importância é fundamentada no fato de constituírem os chamados pigmentos maculares envolvidos na prevenção da degeneração macular (NIIZU, 2003). O  $\beta$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina, também, estão presentes nos grãos de milho, porém, em menores quantidades e são precursores da vitamina A (OLIVEIRA, 2006). Possuindo propriedades e funções importantes para as diversas áreas da saúde humana, esses compostos têm atraído a atenção de pesquisadores (ÇINAR, 2004).

Milhos biofortificados com carotenoides proVA, estão sendo desenvolvidos no Brasil, por meio do melhoramento genético de plantas, com vistas a contribuir para a prevenção e tratamento da hipovitaminose A, considerada problema de saúde pública no país, sendo a utilização destes destinada às comunidades onde há alta prevalência da mesma (CARDOSO, 2007). Nesse contexto, o milho biofortificado surge como uma alternativa de um produto com maior valor nutricional e, conseqüentemente, com potencial para auxiliar no combate de carências de micronutrientes. Porém, no processo de desenvolvimento desses materiais biofortificados apenas os grãos são analisados para a composição de carotenoides, que não corresponde às formas usualmente consumidas pela população. Este fato pode afetar profundamente o resultado da biofortificação, já que produtos alimentícios processados podem sofrer alterações na sua composição química durante o processamento e/ou armazenamento. Essas alterações podem acarretar prejuízos do ponto de vista

nutricional, visto que algumas estruturas químicas, como as dos carotenoides, são instáveis e, portanto, susceptíveis à oxidação e isomerização geométrica, principalmente, quando há presença e/ou disponibilidade de oxigênio, luz, calor, metais, enzimas e peróxidos.

Partindo do princípio de que parte razoável da população consome o milho na forma de seus diversos derivados, torna-se necessário avaliar se a retenção dos carotenoides após processamento e armazenamento constitui fato. Portanto, objetivou-se com o presente trabalho: a) avaliar a retenção de carotenoides após o processamento por meio da moagem a seco dos grãos de milho biofortificado com precursores da vitamina A e b) estimar as perdas durante o armazenamento dos derivados mediante o estudo de retenção desses compostos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Carotenoides

Os carotenoides são o grupo mais disseminado de pigmentos na natureza e são responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho de diversos alimentos (MELÉNDEZ –MARTÍNEZ et al., 2007). Com mais de 600 estruturas químicas já caracterizadas, aproximadamente 50 deles possuem atividade biológica. Deste total, cerca de 40 podem ser encontradas nos alimentos e, como resultado de uma absorção seletiva do trato gastrointestinal, apenas 14 carotenoides são biodisponíveis. Khachik, Beecher e Goli (1991), Olson (1999) e Frazer e Bramley (2004). Entre esses se encontram o  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, luteína, zeaxantina, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, fucoxantina, astaxantina, crocetina, capsantina e o fitoeno (GOMES, 2007).

Tais pigmentos são identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais (UENOJO; MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007). Eles são responsáveis por importantes funções no organismo, sendo  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina os mais investigados quanto à relação com a saúde humana (RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; ZEB; MEHMOOD, 2004). Observa-se que alguns tipos de carotenoides, como o  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina, possuem atividade pró-vitámicica A e são extremamente importantes em decorrência da capacidade de serem convertidos no corpo humano em vitamina A ou retinol (MCLAREN, 1999; SHAMI; MOREIRA, 2004). Outros, como a zeaxantina e luteína, são importantes para a estrutura da mácula, região anatômica da retina, responsável pela visão detalhada, sendo essenciais, portanto, na prevenção da degeneração macular associada à idade e da catarata (GAMA; SILOS, 2007). Embora o  $\beta$ -

caroteno possui a maior atividade pró-vitamina A, pode ainda desempenhar, ao lado de outros carotenoides não precursores dessa vitamina, outras importantes funções no organismo humano, em virtude de suas propriedades antioxidantes, antimutagênicas e por seu efeito imunomodulador, oferecendo proteção contra algumas doenças crônicas não transmissíveis, como certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (CHEN, 2007; DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES LÓPEZ , 2000; FRATIANNI; CINQUANTA; PANFILI, 2010; OLIVEIRA; MARCHINI, 2000).

Estudos recentes evidenciaram, ainda, que os carotenoides, também, desempenham função específica na integridade óssea sendo importantes na prevenção da osteoporose. A  $\beta$ -criptoxantina, luteína, licopeno,  $\beta$ -caroteno e astaxantina apresentaram efeito anabólico na calcificação dos ossos *in vitro* (SAHNI et al., 2009; YAMAGUCHI, 2008).

Quimicamente, carotenoides são isoprenoides, geralmente constituídos por oito unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno que pode conter de duas a quinze duplas ligações conjugadas, que permite configurações *cis* e *trans* (FRAZER; BRAMLEY, 2004). Na Figura 1 estão apresentadas as estruturas químicas do isopreno e do  $\alpha$ -caroteno.

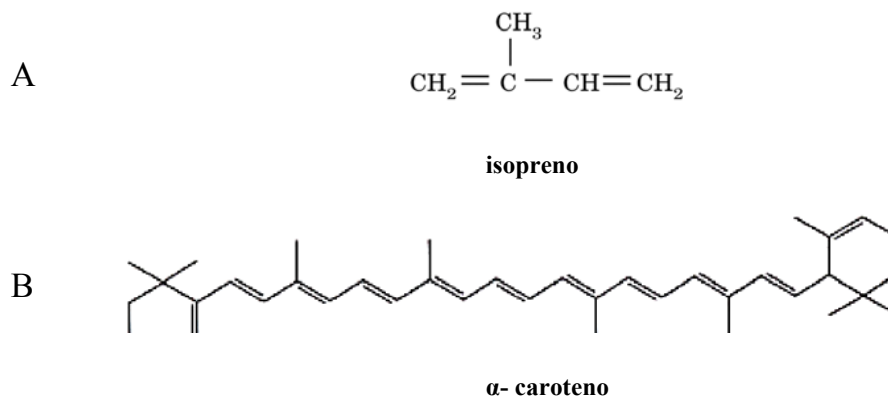


Figura 1 Unidade de isopreno (A) e estrutura química do α- caroteno (B)  
 Fonte: Fontana et al. (2008)

A ciclização e outras modificações, tais como: hidrogenação, desidrogenação, migração da dupla ligação, redução ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de função oxigenada ou, ainda, combinação destes processos dão origem a um extenso número de estruturas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Observa-se, ainda, que é essa estrutura química, que determinará a cor e a potencial função biológica desses pigmentos (AZEVEDO-MELEIRO, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

Os carotenoides classificam-se em carotenos e xantofilas de acordo com sua estrutura química (ZEB; MEHMOOD, 2004). Os carotenos são hidrocarbonetos poliênicos, com variados graus de insaturação, enquanto as xantofilas possuem além de carbono e hidrogênio, também o oxigênio na forma de diferentes grupos como os epóxidos (5,6 ou 5,8-epóxidos), hidroxílicos(OH), metoxílicos (OMe), carbometoxílicos (CO<sub>2</sub>Me), aldeídicos (CHO), cetônicos (C=O) e carboxílicos (CO<sub>2</sub>H). Na figura 2 estão apresentadas as estruturas químicas de alguns carotenoides.

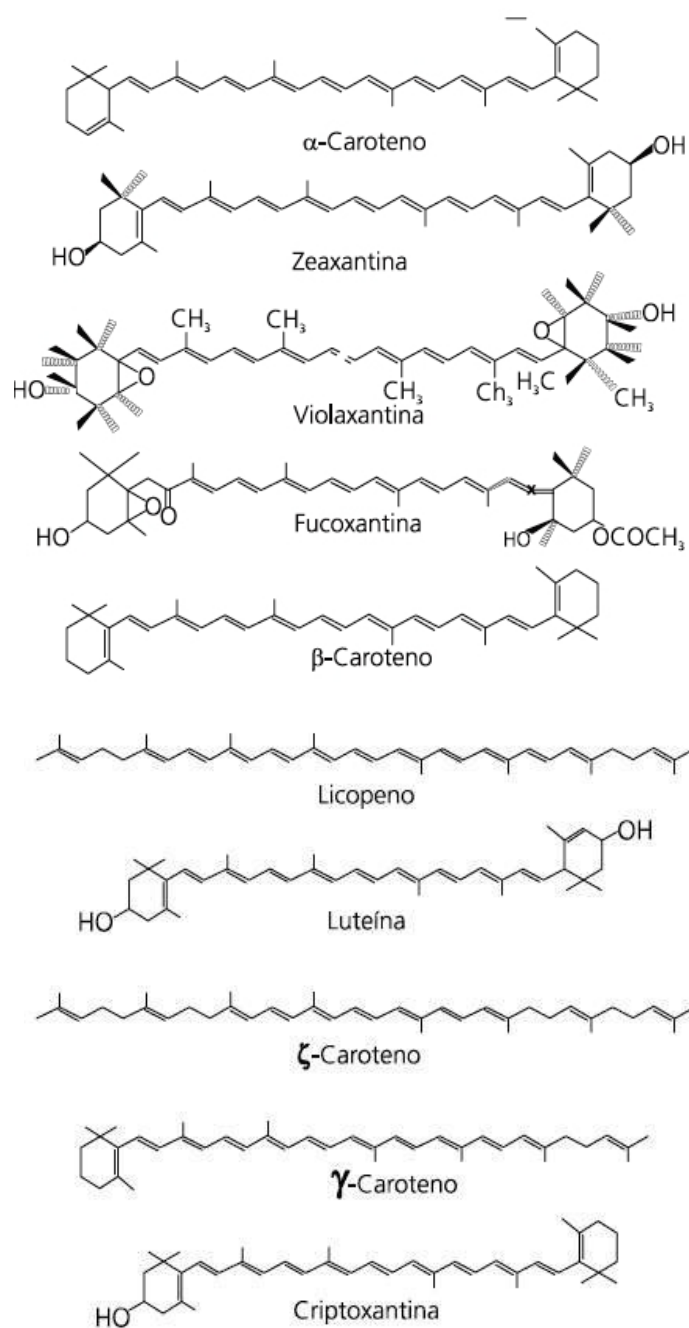


Figura 2 Estrutura química de alguns carotenoides  
 Fonte: Ambrósio (2006)



As xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações de hidroxilação e epoxidação. O  $\beta$ -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (AMBRÓSIO, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; SHI et al., 1999). A via de formação das xantofilas a partir do  $\beta$ -caroteno, está apresentada na Figura 3.

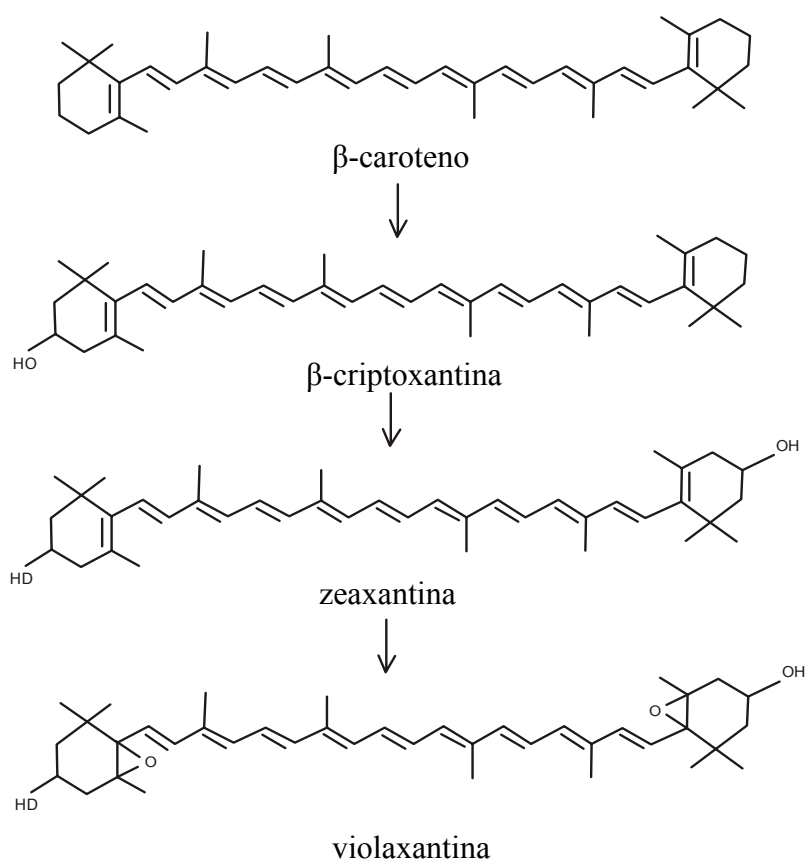


Figura 3 Formação de xantofila a partir do  $\beta$ -caroteno  
Fonte: Valduga (2009)

Alguns carotenoides possuem atividade biológica de vitamina A (retinol), sendo o  $\beta$ -caroteno aquele que apresenta 100% dessa atividade pelo fato de sua molécula originar duas moléculas de retinol. Outros carotenoides, como o  $\alpha$ -caroteno e a  $\beta$ -criptoxantina, também, podem desempenhar essa função, mas dão origem a apenas uma molécula de vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). A conversão do  $\beta$ -caroteno a retinol está apresentada na Figura 4.

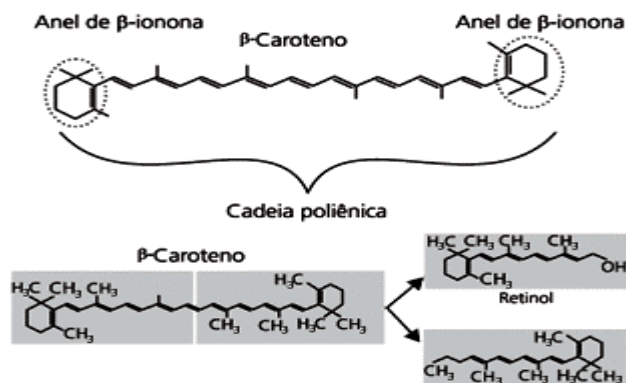


Figura 4 Conversão do  $\beta$ -caroteno a retinol

Fonte: Ambrósio (2006)

O sistema de duplas ligações conjugadas confere alta reatividade química a esses compostos (OLIVER, 2000). A absorção de luz, o bloqueio dos radicais livres, mediante reações, o seu caráter lipofílico com insolubilidade em água, a sua facilidade de isomerização e oxidação, além da capacidade de unir superfícies hidrofílicas são consideradas importantes propriedades físicas e químicas de alguns carotenoides (BIANCHINI; PENTEADO, 1998; RAMOS, 2001).

### 2.1.1 Alterações em carotenoides

Embora os efeitos biológicos dos carotenoides estejam ligados ao alto grau de insaturação nas estruturas químicas, essa propriedade, também, os torna susceptíveis a degradação, sendo altas temperaturas, luminosidade, presença de metais, enzimas, oxigênio e baixo pH, fatores relacionados à diminuição de sua estabilidade (BARBOSA; MERCADANTE, 2008).

A maior causa de perda de carotenoides é a oxidação enzimática ou não enzimática (RODRIGUEZ-AMAYA, 2006; VALDUGA, 2009). Na Figura 5, está apresentada a clivagem do  $\beta$ -caroteno. O primeiro passo na degradação parece ser a formação de apocarotenoides, ou seja, carotenoides com a cadeia carbônica reduzida através da oxidação. A fragmentação dos apocarotenoides resulta na formação de compostos com baixo peso molecular, similar aos encontrados na oxidação dos ácidos graxos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

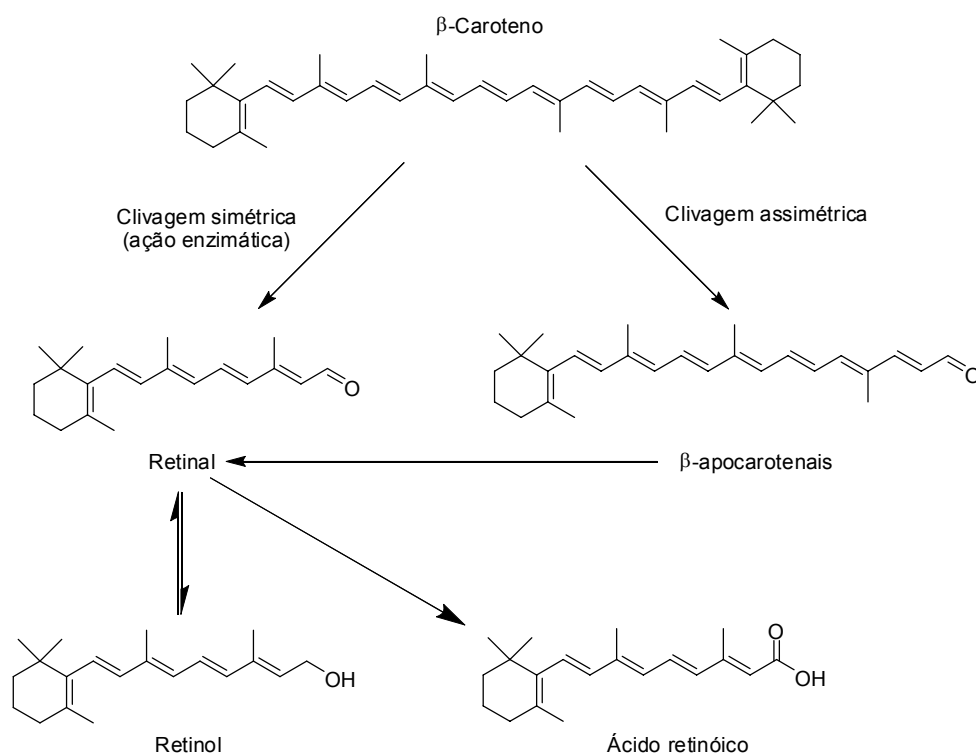


Figura 5 Clivagem do  $\beta$ -caroteno

A possibilidade de ocorrência de oxidação dos carotenoides, durante o processamento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997), faz com que a retenção seja uma preocupação constante e as atenções estejam frequentemente focadas não somente no processo industrial, mas também nas preparações caseiras que podem, também, causar perdas em grande extensão (GAMA; SILOS, 2007). Em contrapartida, o processamento tem demonstrado o efeito positivo sobre biodisponibilidade dos carotenoides por quebrar a estrutura das células e desnaturar proteínas complexadas com os pigmentos, facilitando, então, a liberação desses compostos da matriz alimentícia. Entretanto, as condições de

processamento devem ser otimizadas para aumentar a biodisponibilidade sem intensificar a degradação desses compostos (LI et al., 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

Perdas de zeaxantina e luteína, causadas pelo processo de enlatamento do milho, já foram identificadas em estudo com a determinação dos carotenoides por CLAE com coluna C30. O processo resultou em uma diminuição de 26% e 29% de all-*E*-luteína e all-*E*-zeaxantina, respectivamente, e um aumento de 12% a 30% de *Z*-isômeros de luteína e de 7% a 25% de *Z*-isômeros de zeaxantina (AMAN et al., 2005).

A atividade de água, também, pode interferir na degradação oxidativa e na vida de prateleira de produtos alimentícios (LAVELLI; ZANONI; ZANIBONI, 2007). Em um estudo realizado, para avaliar o efeito do tipo de embalagem e do tempo de armazenamento nas qualidades físico-químicas e microbiológicas de abacaxi desidratado, foi observado efeito significativo para os atributos teor de umidade, carotenoides e atividade de água com relação ao tipo de embalagens. O teor de carotenoides totais foi reduzido ao longo do tempo de armazenamento para todas as embalagens utilizadas. As maiores perdas de carotenoides ocorreram para as rodela embaladas em polietileno e foram atribuídas ao fato deste polímero permitir um aumento na atividade de água no produto, bem como de sofrerem ações de raios ultravioletas (RAMOS, 2008).

A isomerização desses pigmentos, também, é possível. Eles estão presentes na natureza na configuração *trans*, que é mais estável. A forma *cis*-isômero pode ocorrer e até aumentar, durante o processamento e estocagem, alterando a biodisponibilidade (CHANDLER; SCHWARTZ, 1998). Na Figura 6 estão apresentadas os principais isômeros do  $\beta$ -caroteno. Nutricionalmente, a diferença entre *trans* e *cis*-isômeros é muito importante, já que a configuração

*cis* apresenta atividade biológica menor, podendo resultar numa drástica redução da atividade pró-vitamina A desses compostos (SANTANA et al., 1998).

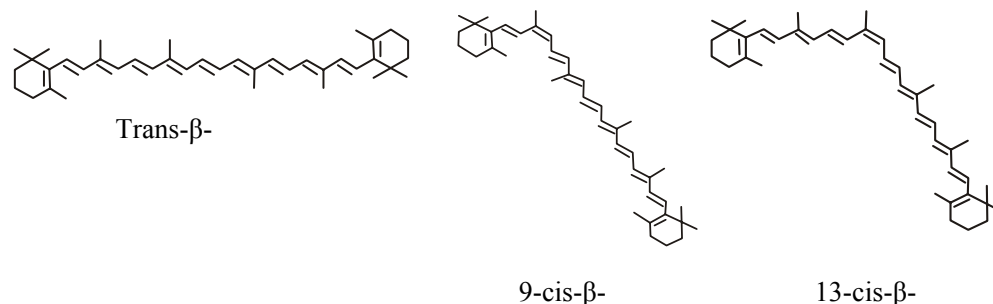


Figura 6 Principais isômeros do  $\beta$ -caroteno

Da mesma forma, é presumível que ocorra degradação durante o armazenamento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). O conteúdo de  $\beta$ -caroteno da polpa de acerola congelada foi avaliada durante o armazenamento. Foi verificada uma redução significativa de 20%, em relação ao conteúdo de polpa-controle ( $7,09 \mu\text{g g}^{-1}$ ), sem alteração significativa após quatro meses de estocagem. A  $\beta$ -criptoxantina ( $1,7 \mu\text{g g}^{-1}$ ), também, apresentou redução em 37%, após o primeiro mês de estocagem, mantendo esses teores estáveis até o décimo primeiro mês, quando totalizou uma perda de 62%. O  $\alpha$ -caroteno foi encontrado apenas em pequenas quantidades (COSTA; ABREU; ROSSETTI, 2003).

A retenção de alguns carotenoides, durante o armazenamento de vegetais minimamente processados, também já foi investigada, tendo sido constatada influência direta do processamento mínimo nos teores de carotenoides de endívia e espinafre armazenado por cinco dias à temperatura de  $7^{\circ}\text{C}$  a  $9^{\circ}\text{C}$ . Diminuição insignificante na concentração de violaxantina (12%) e neoxantina (8%) em endívia aconteceu aos cinco dias após o processamento. Em

contrapartida, ocorreu uma diminuição significativa no  $\beta$ -caroteno (18%) e luteína (19%) durante o mesmo período. Já no espinafre, todos os quatro carotenoides diminuíram significativamente sendo o  $\beta$ -caroteno (42%), luteína (32%), violaxantina (20%) e a neoxantina (20%), indicando haver resposta diferenciada de degradação dos carotenoides durante o armazenamento. Como as perdas ocorreram em um processo onde não havia ótimas condições de embalagem e armazenamento, os autores ressaltaram que essas perdas poderiam ser minimizadas, por exemplo, usando atmosfera modificada durante o empacotamento e controlando a temperatura durante o armazenamento desses produtos (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005).

Em estudo do efeito da temperatura (7°C e 25°C) e da umidade (3% e 11%) sobre os carotenoides, durante o armazenamento do milho por três anos, o fator temperatura exerceu maior influência na perda dos pigmentos do que a umidade, sendo a fração carotenos a mais suscetível à degradação (QUACKENBUSH, 1963). Portanto, a retenção de carotenoides, durante o armazenamento é tão importante quanto durante o processamento, uma vez que a degradação desses compostos pode afetar a cor atrativa, o valor nutritivo e o “flavor” dos alimentos (ÇINAR, 2004; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007).

## **2.2 Milho**

O milho é uma das culturas agrícolas mais importantes no mundo, sendo consumido por milhares de pessoas em diversos países (BERARDO et al., 2004; MUZHINGI et al., 2008).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a produção mundial de milho deve ficar em 798 milhões de toneladas nesta safra de 2010. Um aumento de seis milhões em relação à safra passada. Já o consumo mundial estimado é de 807 milhões de toneladas, com um aumento de 33

milhões de toneladas em relação ao consumo registrado em 2009 (CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO MILHO - CIMILHO, 2010).

Esse cereal é o alimento preferido de mais de 1.2 bilhões de consumidores na América Latina e na África, onde 30 a 50% da população são desnutridos. Constitui a base da alimentação de consumidores em áreas extremamente pobres em que faltam proteínas, vitaminas e minerais importantes (LOZANO-ALEJO, 2007) onde as partes comestíveis de sementes ou grãos são usadas, para preparar refeições que, normalmente, contêm alimentos com baixos teores de micronutrientes com baixa biodisponibilidade (ORTIZ-MONASTERI, 2007).

No Brasil, o milho é considerado de grande importância econômica e segundo estimativa divulgada pela Conab, o país deve colher entre 32,79 milhões de toneladas e 34,06 milhões de toneladas de milho na safra 2009/2010 (CIMILHO, 2010). Em virtude de seu amplo uso nas atividades agropecuárias e na indústria, constitui matéria-prima para as mais variadas aplicações (PAES, 2008). No campo da indústria de alimentos, incluindo bebidas e outras, o seu emprego como matéria-prima pode, ainda, ser aumentado de maneira considerável, abrindo novas fontes de consumo (SARTORI, 2001).

De acordo com a pesquisa de aquisição domiciliar feita no Brasil e coordenada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a população do Nordeste é a maior consumidora deste cereal. Enquanto a média nacional na época da pesquisa, feita em 2002/2003, era de aproximadamente 7,7 kg por pessoa por ano em todo o país, no Nordeste o consumo era em média de 11 kg por pessoa por ano. Ou seja, o nordestino consumia 43% a mais do que a média nacional. Especificamente no meio rural, o consumo de milho no país é ainda maior. A zona rural da região Sudeste é a que mais consome milho e seus derivados: eram, na época da pesquisa, cerca de 31 kg por pessoa por ano. Já na zona rural do Nordeste o consumo era de cerca de 20 kg por pessoa por ano



(EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2008). O Agrosalud, consórcio de instituições que trabalha no desenvolvimento e difusão de cultivos biofortificados na América Latina e no Caribe, reconhece os estados do Piauí, Paraíba e Espírito Santo como regiões onde há alto consumo de cereais (201g a 600g por pessoa por dia), tendo nos estados do Ceará, São Paulo e Minas Gerais um consumo médio (121g a 200g por pessoa por dia) (ZAPATA-CALDAS, 2008).

O grão de milho é classificado botanicamente como uma cariopse, apresentando basicamente três partes anatômicas: o pericarpo, endosperma e o embrião, conforme apresentado na Figura 7. O pericarpo, a camada fina e resistente que constitui a parede externa da semente, é rico em fibra e representa 5% do peso do grão. O endosperma, a parte mais volumosa do grão, representa mais de 80% do grão, é envolvido pelo pericarpo e constituído de substância de reserva, basicamente o amido. A porção mais externa do endosperma e em contato com o pericarpo denomina-se camada de aleurona, rica em proteínas e enzimas que desempenham papel importante no processo de germinação. O embrião está posicionado em uma depressão da superfície superior do endosperma, perto da base do grão. O gérmen é rico em lipídeos e proteínas e pobre em amido (FORNASIERI FILHO, 1992; JOHNSON et al., 2000). A composição dos produtos derivados do milho, portanto, depende de quais partes do grão estes produtos incluem (OLIVEIRA, 2006).

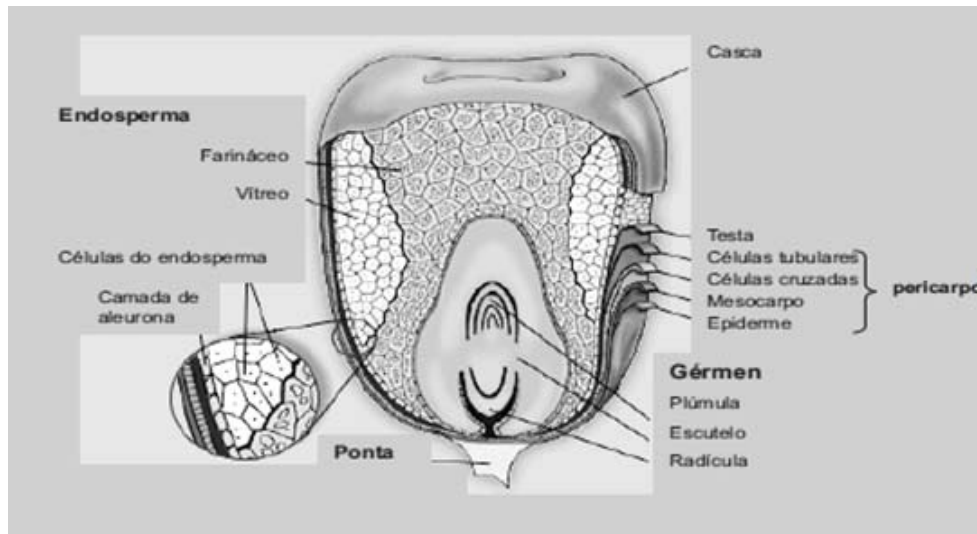


Figura 7 Anatomia do grão de milho e suas partes  
 Fonte: Paes (2008)

Considerando seu valor nutricional, cada 100 gramas do milho em grão contêm 360 kcal, quase 20% da necessidade calórica diária de um adulto (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO - ABIMILHO, 2008). O peso do grão varia, em média, de 250 mg a 300 mg e sua composição média em base seca é de 72% de amido, 9,5% de proteína, 9% de fibra, a maioria resíduo detergente neutro, e 4% de óleo (PAES, 2008). Devido a essa composição, o milho é considerado um alimento energético para as dietas humanas e animal. A proteína presente nesse cereal, embora em quantidade significativa, possui qualidade inferior a de outras fontes vegetais e animais, em decorrência de sua limitação em aminoácidos essenciais especialmente, lisina e triptofano (NAVES et al., 2004). O óleo de milho possui uma composição de ácidos graxos que o define como de grande importância para a dieta humana, podendo, ainda, ser considerado uma importante fonte de fibras alimentares,

especialmente do tipo insolúveis. Os minerais somam de 3% a 6% do grão de milho, sendo o fósforo, o de maior abundância ( $0,3 \mu\text{g/g}$ ) (PAES, 2008).

Todos os cultivares de milho amarelo contêm carotenoides, embora os carotenoides precursores da vitamina A ou que podem ser convertidos em retinol ( $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos), apresentam-se em menor percentual (e.g. 10% a 20%), comparado às xantofilas, zeaxantina e luteína, que representam cerca de 35% a 50% do total desses pigmentos no milho (BRENNA; BERARDO, 2004; TANUMIHARDJO, 2006). Porém, em trabalho realizado, para seleção de germoplasmas para biofortificação, foram encontrados conteúdos maiores de carotenoides pro VA, como na linhagem 540727-1, com  $11,30 \mu\text{g g}^{-1}$  em base úmida, indicando potencial para o desenvolvimento de linhagens biofortificadas (CARDOSO et al., 2009). Logo, os carotenoides são exemplos notáveis de que é possível melhorar o valor nutricional do milho e, assim, agregar valor ao produto (BERARDO et al., 2004). Deste modo, o enriquecimento do milho quanto ao perfil de carotenoides pode ter um impacto positivo na saúde em áreas onde ele é frequentemente consumido (MENKIR et al., 2008).

### **2.3 Processamento do milho**

Para o consumo humano, os grãos de milho necessitam sofrer alguma transformação, à exceção do consumo, quando os grãos estão em estado leitoso, ou “verde”, os grãos secos não podem ser consumidos diretamente pelos seres humanos. Assim, a industrialização ocorre por meio dos processos de moagem úmida e de moagem seca, sendo esse último o mais utilizado no Brasil (PAES, 2008).

Através da moagem úmida, podem ser obtidos subprodutos do milho com alto valor agregado (amidos alimentícios, xaropes de glicose e maltose,

maltodextrina e dextrose), normalmente destinado à outra indústria para ser reprocessado. Já a moagem seca tem como finalidade produzir canjica, farinhas, grits e farelos. Nesse processo, o milho é seco, limpo e degerminado (separação do endosperma e germe). O endosperma é moído e classificado para obtenção de produtos de diversas granulometrias, enquanto que o gérmen é destinado para a indústria de ração ou processado para produção de óleo, resultando no farelo (ASCHERI; GERMANI, 2004). Portanto, é um processo simples que necessita de pouca maquinaria, sendo de pequeno porte as indústrias que utilizam esse tipo de processamento e quase totalmente dedicadas ao consumo local (CRUZ et al., 2008). Outros derivados como canjica especial, canjica para cereais matinais e para produção de pipocas expandidas e grits, também, podem ser produzidos (GONÇALVES, 2003).

Partes desses produtos são de consumo direto pela população, sendo a farinha, a canjica e o fubá os derivados do milho mais consumidos no Brasil (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003). Contudo, os derivados obtidos, por meio de moagem seca do milho, são os mais apreciados, tendo participação efetiva como componente básico na dieta alimentar das camadas mais pobres da população (PAES, 2008).

## **2.4 Hipovitaminose A**

Por mais de três décadas, a deficiência de vitamina A tem sido reconhecida entre os principais problemas de saúde pública em países em desenvolvimento (BUTT; RASOOL; SHARIF, 2006). Essa deficiência afeta cerca de 250 milhões de pessoas no mundo e constitui uma das deficiências nutricionais de maior prevalência em diversos países, resultando em significantes perdas sócio-econômicas (ALURU, 2008).

A importância do adequado estado nutricional de vitamina A para saúde humana é incontestável, uma vez que ela possui papel fisiológico muito diversificado, atuando no bom funcionamento do processo visual, na integridade do tecido epitelial e no sistema imunológico, dentre outros (MCLAREN, 1999). Estudos mais recentes indicam que a vitamina A desempenha papel protetor em relação ao peso ao nascer e à redução da mortalidade em crianças com AIDS (OLIVEIRA; RONDÓ, 2007).

A vitamina A pode ser consumida de duas formas diferentes: na forma biologicamente ativa (obtida de alimentos de origem animal) e na forma de pró-vitamina (obtida de alimentos de origem vegetal). A vitamina A pode ser encontrada em produtos animais, mas algumas frutas e vegetais são boas fontes de pró-vitamina A (OLIVEIRA, 2000).

Populações em risco de deficiência de vitamina A, em geral, dependem de carotenoides pró-vitâmicos A para atingirem suas recomendações diárias (ROCK et al., 1998). Em países de baixa renda, 82% da vitamina A ingerida resulta do consumo de alimentos de origem vegetal, portanto, na forma de pró-vitamina A (VAN DEN BERG et al., 2000).

Os agentes precursores da vitamina A, encontrados em alimentos de origem vegetal fazem parte de um grupo conhecido como carotenoides. Estes agentes são considerados como vitamina em potencial, mas não o são na realidade, sendo precursores do retinol, que pode ser biologicamente transformado em vitamina A (McLAREN, 1999).

A deficiência de vitamina A em humanos ou hipovitaminose A é a principal causa de cegueira evitável no mundo. Também aumenta, consideravelmente, o risco de doenças e mortes por infecções comuns na infância, como diarreias e sarampo. Estima-se que 250.000 a 500.000 crianças com deficiência desta vitamina fiquem cegas a cada ano, das quais metade morre

um ano depois (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS, 2008).

No Brasil, o governo reconhece como áreas de risco de desenvolvimento de deficiência de vitamina A as chamadas regiões de bolsões endêmicos que englobam a Região Nordeste, o Estado de Minas Gerais (região Norte, Vale do Jequitinhonha e Vale do Mucuri) e o Vale do Ribeira no estado de São Paulo (RAMALHO, 2002; BRASIL, 2008). No entanto, de acordo com o Agrosalud, somente os estados do norte e nordeste são considerados área de risco nutricional para crianças abaixo de cinco anos, os demais estados do país são considerados áreas de baixo risco (ZAPATA-CALDAS, 2008). Observa-se, contudo, que a magnitude do problema, ainda, é pouco conhecida e há pouca informação a respeito do impacto social causado pela hipovitaminose A em termos de óbitos e incapacitações (SOUZA; VILAS BOAS, 2002). Há evidências de que a suplementação de vitamina A em crianças esteja associada com redução em torno de 23% a 30% na mortalidade geral de crianças com idade entre seis meses a cinco anos. Sugere-se, também, que a intervenção atenua a gravidade dos quadros de diarreia e sarampo, refletindo na redução do risco de morte associado a essas doenças (OLIVEIRA; RONDÓ, 2007).

Esses vários enfoques relacionados à importância da manutenção de estado adequado de vitamina A, tanto em crianças quanto em adultos, indicam a relevância de se levar em consideração as inúmeras funções que esse nutriente desempenha no corpo humano, assim como a importante tarefa de se desenvolver estratégias e ações eficientes para o adequado controle e a prevenção dessa carência (BRASIL, 2008).

## 2.5 Degeneração macular relacionada à idade (DMRI)

A degeneração macular relacionada à idade é uma desordem degenerativa da mácula, área associada com a acuidade visual (ZHAO; SWEET, 2008). Esse problema é a principal causa de cegueira na população acima de 55 anos, sendo sua prevalência aumentada com a idade, afetando cerca de 8% a 27% da população maior de 75 anos (SOUBRANE; HADDAD; COSCAS, 2002). Dados do Conselho Brasileiro de Oftalmologia estimavam em cerca de 2,9 milhões de brasileiros com mais de 65 anos de idade o número de casos com degeneração macular relacionada à idade (LAJOLO, 2008). A importância epidemiológica da doença resultou em inúmeras pesquisas e tratamentos preventivos para se tentar evitar a instalação e/ou progressão desta grave patologia ocular que pode ser definida como um grupo de alterações degenerativas em pacientes com mais de 50 anos de idade que afetam a retina neuro-sensorial e o epitélio pigmentado da retina, caracterizado clinicamente pela presença de drusas (lesões amareladas) e mobilização de pigmento (AMBATI et al., 2003; TORRES et al. 2008).

Assim, acredita-se que a degeneração macular relacionada à idade seja resultado de um processo oxidativo que resulte em morte de fotorreceptor no interior da mácula. O aumento do risco de ocorrência dessa doença pode ser resultado de baixos níveis dos pigmentos maculares (luteína e zeaxantina) na dieta, no soro ou retina e/ou exposição excessiva à luz azul. Por possuírem atividade antioxidante e capacidade de filtrar a luz, os pigmentos maculares podem reduzir a foto-oxidação na região central da retina (BONÉ, 2003). Verifica-se que a diminuição da concentração plasmática dos pigmentos maculares tem sido associada ao aumento da incidência da degeneração macular, embora ainda esteja obscuro quais seriam os níveis desses carotenoides na retina diretamente relacionados aos índices da doença retinal (SCHUPP, 2004).

Em 2003 foi publicado o primeiro estudo epidemiológico relacionando, especificamente, a redução dos níveis plasmáticos de zeaxantina com um aumento no risco de degeneração macular em 380 participantes, entre 66 a 75 anos, no Reino Unido. Observou-se ser o risco de DMRI (inicial ou tardia) significativamente maior em pessoas com concentrações plasmáticas menores de zeaxantina. As concentrações plasmáticas menores de luteína ou luteína + zeaxantina, também, tiveram tendência elevada de degeneração macular associada à idade, porém, não foram estatisticamente significantes. Sendo assim, os autores concluíram que zeaxantina poderia exercer proteção contra a doença (GALÉ, 2003).

Um estudo prospectivo, envolvendo 77.562 mulheres e 40.866 homens, acima de 50 anos, que não tinham diagnóstico de DMRI no início do experimento, avaliou o vínculo de consumo de frutas com risco de DMRI. Foi realizado um questionário para avaliação da dieta diária. Ocorreram 464 casos de DMRI tipo “não exsudativa” e 316 casos de DMRI “exsudativa”. Observou-se que a ingestão de frutas foi inversamente associada com o risco de DMRI neovascular. Participantes que consumiram três ou mais porções por dia de frutas tiveram chance menor de desenvolvimento de DMRI (CHU et al., 2004).

Evidências revelaram que as xantofilas luteína e zeaxantina, carotenoides encontrados em uma variedade de frutas e vegetais, podem estar envolvidas na proteção dessa desordem degenerativa (MOZAFFARIEH; SACU; WEDRICH, 2003). Sabe-se que o milho é uma das poucas fontes de ambos os carotenoides sendo, portanto, reconhecida sua importância como fonte de pigmentos maculares (MOROS et al., 2002). Esses pigmentos podem ser seletivamente acumulados na retina e particularmente estarem presentes em grande quantidade na mácula elucidando essa proteção (JOHNSON, 2000).



## 2.6 Biofortificação

O aumento do valor nutricional de partes comestíveis de culturas agrícolas amplamente consumidas em todo o mundo, por meio do melhoramento genético tradicional ou transgênico, denominado biofortificação, surge como estratégia sustentável para atenuar problemas de deficiências em micronutrientes (HULSOFF, 2007; RIOS et al., 2009). Nesse sentido, a biofortificação desponta com o princípio de desenvolver variedades melhoradas, que apresentem conteúdo aumentado de minerais e vitaminas (WHITE; BROADLEY, 2005). O processo avalia, principalmente, a dieta comum das populações em risco nutricional, considerando o consumo diário de alimentos básicos, sobretudo, das mulheres e crianças para definir os teores alvo para cada produto a ser biofortificado (HARVEST PLUS, 2008).

A introdução de produtos agrícolas biofortificados complementa intervenções em nutrição já existentes, além de proporcionar maior sustentabilidade e baixo custo para produtores e consumidores (HARVEST PLUS, 2008), sendo necessário para se analisar o impacto da biofortificação entender, também, como esses produtos são comprados, armazenados e como estão sendo preparados e consumidos (DE GROOTE; KIMENJU, 2008).

O Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e o Instituto de Pesquisa sobre Políticas Alimentares (IFPRI) coordenam o programa *Harvest Plus* de biofortificação de alimentos, uma aliança mundial de instituições de pesquisa e de entidades executoras que se uniram para melhorar e disseminar produtos de melhor qualidade nutricional (EMBRAPA, 2008). A fase inicial do programa contempla seis culturas básicas para a alimentação humana: feijão, mandioca, milho, arroz, batata-doce e trigo, que demonstraram viabilidade completa e são consumidos pela maioria da população pobre da África, Ásia e América Latina (INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL

AGRICULTURE - CIAT, 2002; WELCH, 2002). O objetivo é gerar tecnologias e conhecimentos para o desenvolvimento de cultivares com melhor qualidade proteica, maiores teores de ferro, zinco e provitamina A nas partes comestíveis, que deverão ser plantados e consumidos em diversos países em desenvolvimento (GUIMARÃES et al., 2005).

No Brasil, as atividades dos programas de biofortificação *HarvestPlus* e *AgroSalud* são coordenadas pela EMBRAPA, onde são pesquisados: arroz, feijão, batata doce, mandioca, milho, feijão-caupi, trigo e abóbora. Participam da Rede de Biofortificação várias unidades da EMBRAPA, além de parceiros nacionais e internacionais (NUTTI, 2008).

Atualmente, o principal componente do *HarvestPlus* no Brasil é o Projeto de Biofortificação de Produtos Agrícolas para a Nutrição Humana. Esse programa teve início em 2007, onde foram formadas equipes e realizada a seleção em banco de germoplasma de material com maior diversidade genética, seu plantio e o treinamento para determinação de carotenoides. Os anos subsequentes foram dedicados às análises de milho, mandioca e feijão para determinação de carotenoides, com ênfase em  $\beta$ -caroteno, ferro e zinco. As variedades com os maiores teores de micronutrientes foram selecionadas para formar a base para o desenvolvimento das cultivares comerciais a serem oferecidas para plantio pelos produtos (EMBRAPA, 2008).

Para o milho, grandes avanços foram alcançados em três anos, com caracterização de linhagens elite e cultivares comerciais, além de identificação de processos mais adequados para a obtenção de sementes apresentando distinto perfil de carotenoides e metodologias rápidas para determinação de carotenoides e disponibilidade de minerais em grãos de milho. Por meio do melhoramento, já foi possível obter sintético com conteúdo de precursores de vitamina A superior ( $13 \mu\text{g g}^{-1}$ ) à média para grãos de milho ( $4,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (PAES, 2009).

Sabe-se, portanto, que o milho biofortificado apresenta conteúdo aumentado de nutrientes, dos quais se destacam os carotenoides, que tem sua importância reconhecida na saúde humana. Dentre os carotenoides presentes no milho destacam-se os chamados pigmentos maculares (luteína e zeaxantina), importantes na prevenção da degeneração macular e os compostos que apresentam atividade biológica de pró-vitamina A. Entretanto, esses pigmentos são instáveis na presença de luz, calor, ácidos e oxigênio e podem, com o processamento e/ou armazenamento dos alimentos, sofrer alterações na sua composição química ocasionando prejuízo do ponto de vista nutricional. Logo, tornam-se prementes estudos que analisem a retenção dos carotenoides em milho biofortificado após o processamento via moagem a seco, e estimem sua perda durante o armazenamento dos derivados resultantes, sendo, portanto objetivos deste trabalho:

Objetivo geral:

- a) Avaliar a retenção de carotenoides em milho biofortificado após o processamento e estimar suas perdas nos derivados ocorridas durante o armazenamento.

Objetivos específicos:

- a) Avaliar a retenção de carotenoides após processo de moagem a seco dos grãos de milho amarelo biofortificado proVA;
- b) Determinar o perfil de carotenoides em grãos e subprodutos farináceos do milho resultantes da moagem;
- c) Verificar a estabilidade dos carotenoides de importância biológica em produtos processados, estimando as perdas ocorridas por meio do estudo da retenção desses compostos durante o período de 24 dias.

## REFERÊNCIAS

ALURU, M. et al. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 59, n. 13, p. 3551-3562, 2008.

AMAN, R. et al. Application of HPLC coupled with DAD, APcI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. **Food Chemistry**, Essex, v. 92, n. 4, p. 753-763, 2005.

AMBATI, J. et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis and therapeutic strategies. **Survey of Ophthalmology**, Brookline, v. 48, n. 3, p. 257-293, 2003.

AMBRÓSIO, C. L. B. et al. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

ASCHERI, J. L. R.; GERMANI, R. **Protocolo de qualidade de milho**. Rio de Janeiro: EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, 2004. 23 p. (Documentos, 59). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CTAA-2009-09/8053/1/doc59-2004.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/>>. Acesso em: 3 ago. 2008.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 18, n. 8, p. 845-855, 2005.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, n. 3/4, p. 385-396, 2004.

BARBOSA, M. I. M. J.; MERCADANTE, A. Z. Avaliação da estabilidade de microcápsulas de bixina em diferentes matrizes alimentícias. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 1, p. 23-26, 2008.

BERARDO, N. et al. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Arnhem, v. 5, p. 393-398, 2004.

BIANCHINI, R. P.; PENTEADO, M. V. C. Carotenoides de pimentões amarelos (*Capsicum annuum* L.). Caracterização e verificação de mudanças com o cozimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 283-288, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Carências de micronutrientes**. Disponível em: <[http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/cadernos\\_ab/abcad20.pdf](http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcad20.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2008.

BRENNA, O. V.; BERARDO, N. Application of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to the evaluation of carotenoids content in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 18, p. 5577-5582, 2004.

BUTT, M. S.; RASOOL, J.; SHARIF, K. Preparation and characterisation of cake rusks by using red palm oil fortified shortening. **Food Science and Technology International**, London, v. 12, n. 1, p. 85-90, 2006.

CARDOSO, W. S. **Variabilidade de genótipos quanto à composição de carotenoides nos grãos visando a biofortificação**. 2007. (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

CARDOSO, W. S. et al. Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 164-173, 2009.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO MILHO. **Mercado do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2010. Disponível em: <<http://cimilho.cnpmembrapa.br/inicio/mostranoticia.php?codigo=635>>. Acesso em: 6 jun. 2010

CHANDLER, L. A.; SCHWARTZ, S. J. Isomerization and losses of trans-b-carotene in sweet potatoes as affected by processing treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 1, p. 129-133, 1998.

CHU, E. et al. Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 122, n. 6, p. 883-892, 2004.

ÇINAR, I. Carotenoid pigment loss of freeze-dried plant samples under different storage conditions. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 37, n. 3, p. 363-367, 2004.

COSTA, T. S. A.; ABREU, L. N.; ROSSETTI, A. G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenoides. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 56-58, 2003.

CRUZ, J. C. et al. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2008, v. 1, p. 47-61.

DE GROOTE, H.; KIMENJU, S. C. Comparing consumer preferences for color and nutritional quality in maize: Application of a semi-double-bound logistic model on urban consumers in Kenya. **Food Policy**, Guildford, v. 33, n. 4, p. 362-370, 2008.

DELGADO VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains: characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 3 set. 2008.

FONTANA, J. D. et al. **Carotenoides**: cores atraentes e ação biológica. 2000. Disponível em: <<http://www.bioteecnologia.com.br/>>. Acesso em: 12 ago. 2008.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273 p.

FRATIANNI, A.; CINQUANTA, L.; PANFILI, G. Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. **Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 6, p. 867-871, 2010.

FRAZER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

GALE, C. R. et al. Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Philadelphia, v. 44, n. 6, p. 2461-2465, 2003.

GAMA, J. J. T.; SILOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. **Food Chemistry**, Essex, v. 100, n. 4, p. 1686-1690, 2007.

GOMES, F. S. Carotenoides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.

GONÇALVES, R. A. et al. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grits. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 643-650, 2003.

GUIMARÃES, P. E. et al. **Caracterização de linhagens de milho quanto aos teores de minerais nos grãos**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2005. 4 p. (EMBRAPA Milho e Sorgo. Circular Técnica, 64). Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2005/circular/Circ\\_64.pdf](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2005/circular/Circ_64.pdf)>. Acesso em: 9 fev. 2010.

HARVEST PLUS. **Biofortification frequently asked questions**. Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/about.html>>. Acesso em: 10 set. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 29 mar. 2009.

INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE. Cali. Disponível em: <[http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/pdf/biotech\\_2002\\_1\\_1.pdf](http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/pdf/biotech_2002_1_1.pdf)>. Acesso em: 1 ago. 2008.

JOHNSON, E. J. et al. Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 71, n. 6, p. 1555-1562, 2000.

JOHNSON, L. A. Corn: the major cereal of the Americas. In: KULP, K.; PONTE, J. G. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 31-80.

KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; GOLI, M. B. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 61-80, 1991.

LAJOLO, F. **Zeaxantina e luteína reduzem riscos de degeneração macular.**

Disponível em: <[http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista\\_artigo.php?cod=325](http://nutricaoempauta.locaweb.com.br/lista_artigo.php?cod=325)>. Acesso em: 20 jul. 2008.

LAVELLI, V.; ZANONI, B.; ZANIBONI, A. Effect of water activity on carotenoid degradation in dehydrated carrots. **Food Chemistry**, Essex, v. 104, n. 4, p. 1705-1711, 2007.

LI, S. et al. Retention of provitamin A carotenoids in high alfa-carotene maize (Zea mays) during traditional african household processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 26, p. 10744-10750, 2007.

LOZANO-ALEJO, N. et al. Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Arnhem, v. 8, n. 3, p. 385-389, 2007.

MCLAREN, D. S.; FRIGG, M. **Manual de ver y vivir sobre los trastornos por deficiencia de vitamina A.** Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1999. 143 p.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. et al. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, Essex, v. 101, n. 3, p. 1145-1150, 2007.

MENKIR, A. et al. Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. **Food Chemistry**, Essex, v. 109, n. 3, p. 521-529, 2008.

MOROS, E. E. et al. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 20, p. 5787-5790, 2002.

MOZAFFARIEH, M.; SACU, S.; WEDRICH, A. The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: a review based on controversial evidence. **Nutrition Journal**, London, v. 2, n. 20, p. 1-8, 2003.

MUZHINGI, T. et al. Consumer acceptability of yellow maize products in Zimbabwe. **Food Policy**, Guildford, v. 33, n. 4, p. 352-361, 2008.



NAVES, M. M. V. et al. Avaliação química e biológica do grão em cultivares de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 1-8, 2004.

NIIZU, P. Y. **Fontes de carotenoides importantes para saúde humana**. 2003. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

NUTTI, M. R. **Biofortificação no Brasil**: desenvolvendo produtos agrícolas mais nutritivos. Disponível em: <[http://www.embrapa.br/eu\\_quero/inovaecria/comunicacoes/086\\_biofortificacao\\_marilianutti\\_ctaa\\_0822\\_1612.pdf](http://www.embrapa.br/eu_quero/inovaecria/comunicacoes/086_biofortificacao_marilianutti_ctaa_0822_1612.pdf)>. Acesso em: 14 dez. 2008.

OLIVEIRA, G. P. R. **Avaliação de milho e derivados de milho como fontes de luteína e zeaxantina**. 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI J. S. **Ciências nutricionais**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 403 p.

OLIVEIRA, J. M.; RONDÓ, P. H. C. Evidências do impacto da suplementação de vitamina A no grupo materno-infantil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 11, p. 2565-2575, nov. 2007.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. F. G. et al. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo in natura. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 159-166, 2006.

OLIVER, J. P. A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1, p. 543-555, 2000.

OLSON, J. A. Carotenoides. In: SHILS, M. E. et al. **Modern nutrition in health and disease**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. p. 525-541. Disponível em: <[www.who.int/aboutwho/en/promoting/nutrition.htm](http://www.who.int/aboutwho/en/promoting/nutrition.htm)>. Acesso em: 10 ago. 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (Brasil). Disponível em: <[www.who.int/aboutwho/en/promoting/nutrition.htm](http://www.who.int/aboutwho/en/promoting/nutrition.htm)>. Acesso em: 10 ago. 2008.

ORTIZ-MONASTERIO, J. I. et al. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 3, p. 293-307, 2007.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. In: CRUZ, J. C. et al. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2008. cap. 2, p. 47-61.

PAES, M. C. D. et al. **Desenvolvimento de cultivares de milho biofortificadas com precursores da vitamina A, ferro e zinco**. Disponível em: <[http://www.embrapa.br/eu\\_quero/inovaecria/comunicacoes/140\\_milhobiofortificadocarotenoides\\_cnpms\\_0826\\_1516.pdf](http://www.embrapa.br/eu_quero/inovaecria/comunicacoes/140_milhobiofortificadocarotenoides_cnpms_0826_1516.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2009.

PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M.; REZENDE, A. M. Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba, n. 104, p. 23-40, 2003.

QUACKENBUSH, F. W. Corn Carotenoids effects of temperature and moisture on losses during storage. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 40, p. 266-269, 1963.

RAMOS, M. I. L. et al. Efeitos do cozimento convencional sobre os carotenoides próvitaminicos "A" da polpa do piqui (Caryocar brasiliense Camb). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 23-32, 2001.

RIOS, S. A. et al. Biofortificação: culturas enriquecidas com micronutrientes pelo melhoramento genético. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 6, p. 713-718, 2009.

ROCK, C. L. L. et al. Bioavailability of  $\beta$ -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 128, n. 5, p. 913-916, 1998.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin carotenoids in prepared, processed, and stored foods**. Washington: USAID, 1997. Disponível em: <<http://www.mostproject.org/PDF/carrots2.pdf>> Acesso em: 25 set. 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrient Analysis**, Essex, v. 5, n. 1, p. 192-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004. 58 p. Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/sites/default/files/tech02.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUEZ, E. B.; AMAYA-FARFAN, J. Advances in food carotenoid research: chemical and technological aspects, implications in human health. **Malaysian Journal of Nutrition**, Kuala Lumpur, v. 12, n. 1, p. 101-121, 2006.

SAHNI, S. et al. Inverse association of carotenoid intakes with 4-y change in bone mineral density in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 89, n. 1, p. 416-424, 2009.

SANTANA, H. M. P. et al. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, Essex, v. 61, n. 1, p. 145-151, 1998.

SARTORI, J. A. **Qualidade dos grãos de milho após processamento de secagem**. 2001. 76 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SCHUPP, C. et al. Lutein, zeaxanthin, macular pigment, and visual function in adult cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Nutrition**, Philadelphia, v. 79, n. 6, p. 1045-1052, 2004.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHI, J. et al. Lycopene degradation and isomeration in tomato dehydration. **Food Research International**, Barking, v. 32, n. 1, p. 15-21, 1999.

SOUBRANE, G.; HADDAD, W. M.; COSCAS, G. Age-related macular degeneration. **Presse Méd Journal Articles**, St. Louis, v. 31, n. 27, p. 1282-1287, 2002.

SOUZA, W. A.; VILAS BOAS, O. M. G. C. A deficiência de vitamina A no Brasil: um panorama. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 12, n. 3, p. 173-179, 2002.

TANUMIHARDJO, S. A. Factors influencing the conversion of carotenoids to retinol: bioavailability to bioconversion to bioefficacy. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Berne, v. 72, n. 1, p. 40-45, 2006.

TORRES, R. J. A. et al. Conceitos atuais e perspectivas na prevenção da degeneração macular relacionada à idade. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 3, p. 142-155, 2008.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VAN DEN BERG, H. et al. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 880-912, 2000.

WELCH, R. M. Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 32, n. 3, p. 495-499, 2002.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortifying crops with essential mineral elements. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 12, p. 586-593, 2005.

YAMAGUCHI, M.  $\beta$ -Cryptoxanthin and bone metabolism: the preventive role in osteoporosis. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 54, n. 4, p. 356-369, 2008.

ZAPATA-CALDAS, E. et al. **Identificación de sitios candidatos para la biofortificación de cultivos en latinoamérica y el Caribe**. 2008. Disponível em: <<http://sites.google.com/a/cgiar.org/sitios-candidatos-para-la-biofortificacion/Home>>. Acesso em: 14 jun. 2010.

ZEB, A.; MEHMOOD, S. Carotenoids contents from various sources and their potential health applications. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 3, n. 3, p. 199-204, 2004.

ZHAO, L.; SWEET, B. V. Lutein and zeaxanthin for macular degeneration. **American Society of Health-System Pharmacists**, Bethesda, v. 65, n. 13, p. 1232-1238, 2008.

## CAPITULO 2

### **RETENÇÃO DE CAROTENOIDES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA APÓS MOAGEM A SECO DE GRÃOS DE MILHO BIOFORTIFICADO**

#### **RESUMO**

O milho é um dos cereais de maior importância no cenário social e econômico, constituindo alimento preferido de grande parte dos consumidores em regiões em que há deficiências importantes de vitaminas e minerais. Em cultivares de milho amarelo, há presença dos carotenoides, podendo, entretanto, variar tanto o perfil como o teor desses compostos entre os cultivares. Em linhagens utilizadas, para a geração de milho sintético biofortificado com carotenoides proVA, os teores dessas substâncias podem ser até 3,5 vezes aumentadas. Considerando que grande parte do consumo humano de milho se faz por meio dos seus derivados, produzidos por meio de moagem a seco e durante esse processo podem ocorrer perdas significativas desses compostos, instáveis na presença de fatores adversos como: altas temperaturas, luminosidade, presença de metais, enzimas, oxigênio e baixo pH, o presente estudo objetivou avaliar a retenção de carotenoides de importância biológica em derivados após a moagem via seco dos grãos de milho de uma variedade sintética biofortificada. Para tanto, foi delineado um experimento em esquema inteiramente casualizado, com quatro tratamentos: grão, canjica, fubá e creme de milho e quatro repetições. A extração dos carotenoides foi realizada em esquema sequencial de solventes orgânicos e a quantificação através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Os derivados obtidos, após processamento, apresentaram menor retenção real dos carotenoides totais, carotenoides proVA, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, quando comparado aos grãos integrais, evidenciando o efeito da moagem a seco sobre a retenção desses carotenoides presentes nos grãos da variedade sintética. O processamento via moagem a seco dos grãos afetou negativamente o teor de carotenoides totais nos grãos, revelando, ao fim do processo, médias de redução na retenção de carotenoides totais de 75,37% para canjica, 73,51% para o fubá e 59,47% para o creme de milho. O creme de milho apresentou os menores índices de retenção de carotenoides proVA, quando comparado aos demais derivados, evidenciando a influência do tipo e condições de processamento sobre a retenção desses compostos, bem como das características que são inerentes a cada matriz alimentícia.

Palavras-chave: Cereais. Extração. Derivados. Cromatografia.

## ABSTRACT

Corn is one of the most important cereals in the social and economic scenario, making up a preferred food for most consumers in regions where there are major vitamins and mineral deficiencies. In yellow corn cultivars there is the presence of carotenoids, however, the profile as well as the content of these compounds can vary among the cultivars. In strains used to generate biofortified synthetic maize with proVA carotenoids, the levels of these substances can be increased up to 3.5 times. Whereas much of the human consumption of corn is done through their derivatives produced by dry grinding, and that during this process losses can occur of these compounds which are unstable in the presence of adverse factors such as high temperature, light, presence of metals, enzymes, oxygen and low pH, this study aimed to evaluate the retention of biologically important carotenoids in derivatives after the dry milling of a biofortified synthetic variety corn grain. For this, an experiment was outlined in scheme design with four treatments: beans, hominy, corn and creamed corn. The carotenoid extraction was performed in a sequential scheme of organic solvents and quantified by high performance liquid chromatography. The derivatives obtained after processing presented lower real of total carotenoids, proVA carotenoids, lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene retention when compared to whole grains, showing the effect of dry grinding on the carotenoid retention present in the grains of the synthetic variety. Processing via dry milling of the grain negatively affected their total carotenoids content, revealing an average reduction in the total carotenoid retention at the end of the process of 75.37% for hominy, 73.51% for corn and 59.47 % for the creamed corn. The creamed corn had the lowest retention rates of proVA carotenoids when compared to other derivatives, indicating the influence of type and processing conditions on the retention of these compounds and the characteristics that are inherent in each food matrix.

Keywords: Cereals. Extraction. Derivatives. Chromatography.

## 1 INTRODUÇÃO

A introdução de produtos agrícolas biofortificados com carotenoides precursores da vitamina A, como o milho, tem sido visto como uma forma de complementar programas intervencionistas já existentes para o combate à hipovitaminose A, em populações com limitado acesso aos sistemas formais de mercado e de saúde, proporcionando de uma maneira sustentável e de baixo custo ao combate às principais deficiências nutricionais no mundo (Nutti, 2008). As áreas geográficas em que a biofortificação terá maior impacto serão aquelas que, além de apresentarem alta prevalência de deficiências nutricionais, consumam e produzam os produtos que estão sendo biofortificados (MONSERRATE ROJAS, 2009).

O desenvolvimento de milho biofortificado no Brasil em 2010 se encontra em fase de avaliação de materiais experimentais quanto ao desempenho agrônomico e nutricional. Mas até o momento, estão sendo avaliados quanto à composição de carotenoides grãos de variedades e/ou linhagens de milho biofortificado, não refletindo a forma usualmente consumida. O milho é consumido, principalmente, na forma de seus derivados, sendo a farinha, a canjica e o fubá os mais apreciados no país (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003). No entanto, sabe-se que o processamento pode afetar o conteúdo, a atividade e a biodisponibilidade de compostos bioativos nos alimentos (NICOLI; ANESE; PARPINEL, 1999). Qualquer que seja o método de processamento escolhido, a degradação de carotenoides aumenta conforme o tempo, a temperatura, o tamanho e a desintegração das partículas do alimento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Assim, o valor nutricional de um alimento pode ser reduzido, durante as diversas etapas a que são submetidos desde a colheita até a ingestão pelo consumidor, consequência da alta capacidade de oxidação desses compostos, bem como do grande número de insaturações em

suas estruturas que os tornam susceptíveis à degradação (BIANCHI; ANTUNES, 1999; ESKIN, 1990).

Tão importante quanto o enriquecimento dos grãos com micronutrientes é sua retenção após o processamento. A retenção de um alimento pode ser calculada como retenção aparente ou retenção real. Na retenção aparente os cálculos são baseados nos conteúdos de nutrientes antes e após processamento em base seca corrigindo mudanças nas concentrações que resultam do ganho de umidade durante o processo (LI et al., 2007). O cálculo de retenção real leva em consideração a mudança de peso da amostra, durante o processo, sendo deste modo calculado em base fresca. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar a retenção de carotenoides de importância biológica após a moagem via seco dos grãos de milho de uma variedade sintética biofortificada com carotenoides precursores de vitamina A.



## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos grãos**

A variedade de milho sintético biofortificado com carotenoides proVA, em desenvolvimento no Programa de Melhoramento da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas MG, foi produzida com plantio na safra 2008-2009, na fazenda experimental da unidade, sendo a colheita, a secagem e a debulha realizadas seguindo protocolo padrão para controle de luz e temperatura a fim de assegurar a preservação dos carotenoides nos grãos. Os grãos secos resultantes de cada repetição (aproximadamente 60 kg) foram armazenados em containers escuros com tampa em câmara com controle de temperatura (5°C) e umidade relativa (30%). Quatro repetições foram obtidas em campo para as avaliações no laboratório. As amostras de grãos para análise foram quarteadas para homogeneidade e redução de tamanho usando protocolo descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). As alíquotas resultantes foram moídas em micro moinho tipo ciclone MA 020 MARCONI (Piracicaba – SP), sendo acondicionadas em frascos de vidro, tampados, lacrados com parafilme e envoltos em papel alumínio, sendo mantidas à temperatura de -20°C até condução das análises químicas. A moagem foi realizada no dia anterior às análises.

### **2.2 Procedimentos de processamento**

O processamento via seco dos grãos de milho foi conduzido na Indústria Farsete (Branco e Cia.Ltda) em Sete Lagoas, MG. Os grãos passaram inicialmente por uma pré-limpeza e a seguir pelo processo de degerminação, realizado em canjiqueira da marca D'ANDREA, tipo 03, motor 15 HP. Como

produto dessa etapa foi obtida a canjica do milho, cujas amostras foram coletadas durante o processo e acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade fornecidas pela indústria. Todas as embalagens com o produto foram lacradas e envoltas em papel alumínio para proteção contra a luz. Os demais derivados foram produzidos a partir da canjica. Para obtenção do fubá e do creme de milho, a canjica, devidamente limpa, foi processada em um conjunto de moinhos de martelos da marca BARTH J/B, composto por dois moinhos – um menor para pré-moagem com motor de 20 HP e outro maior com peneiras permutáveis com motor de 40 HP, ambos trifásicos. A seguir, foi obtido o fubá por meio do uso de uma peneira circular de 0,6 mm. O mesmo processo foi utilizado para obtenção do creme de milho, trocando-se apenas a peneira circular por peneira cônica de 0,3 mm. Após o processamento dos derivados, foram coletadas as amostras desses subprodutos em embalagens com descrições anteriormente mencionadas. As amostras dos derivados canjica, fubá e creme de milho foram empacotadas e seladas em embalagens de polietileno, utilizando uma balança da marca MATISA, modelo MB-3/A e MB-5/B e uma máquina de solda da marca MATISA, modelo MS-3, como protocolo de rotina da indústria. As amostras foram embaladas com papel alumínio, acondicionadas em caixas térmicas e conduzidas ao Laboratório de Qualidade de Grãos do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa, Sete Lagoas, MG. Durante o processo de moagem a seco, todas as amostras foram pesadas antes e depois processamento de cada derivado, computando as perdas, bem como o rendimento de cada processo a fim de fornecer os dados para o cálculo da retenção real.

### 2.3 Procedimentos de laboratório

As amostras de grãos e canjica foram moídas em moinho do tipo ciclone (modelo MA 020 da marca MARCONI, Brasil) com objetivo de obter um produto mais homogêneo, como protocolo padrão no processo de extração. Para o fubá e creme de milho não foram necessários esse procedimento, uma vez que esses produtos possuíam granulometria adequada (0,5mm) para o processo de extração.

Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos conforme protocolo descrito por Kurilich e Juvik (1999) modificado. As modificações se referem: ao volume de etanol utilizado (7 ml), volume de água deionizada utilizada (4 ml), exclusão da adição de padrão interno, volume de hexano utilizado (4 ml), substituição do metanol dicloroetano por acetona (2 ml) para reconstituição do extrato, volume de injeção de amostra no HPLC (20  $\mu$ l) e exclusão da injeção do padrão  $\beta$ -Apo-8'-carotenal no HPLC. Após a extração os carotenoides, foram quantificados em técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10, equipado com coluna polimérica YMC C 30 (5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm, Waters, Milford, MA, USA), acoplado a detector de arranjo de diiodo. O gradiente de eluição foi conduzido a 0,8 mLmin<sup>-1</sup> em condições de gradiente linear 80:20 a 20:80 de metanol: éter metil *tert*-butil em 25 minutos, seguido por constante de 80:20 em cinco minutos, finalizando com nove minutos de equilíbrio. A temperatura de forno utilizada foi de 30 °C, comprimento de onda 450 nm e volume de injeção de 40  $\mu$ L. A temperatura do laboratório foi mantida a 22 °C durante todo o processo. Para identificação dos compostos foram utilizados padrões purificados a partir de cenoura, pimenta amarela e milho verde, seguindo protocolo descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Os resultados foram expressos em base seca, por meio da análise de

umidade, seguindo o método 44-15 da AACC (2000). O teor de carotenoides totais (CT) foi obtido pela soma dos valores de todas as frações quantificadas sendo: luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, 9-cis- $\beta$ -caroteno e 13-cis- $\beta$ -caroteno. O total de carotenoides com atividade ProVA foi calculado tomando-se por base os resultados para todos os carotenoides quantificados nas amostras, por meio da seguinte fórmula: total  $\beta$ -caroteno +  $\frac{1}{2}$  total de  $\alpha$ -caroteno +  $\frac{1}{2}$  do total de  $\beta$ -criptoxantina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Esse cálculo é baseado nas características químicas inerentes a cada uma dessas moléculas. Aquelas estruturas químicas que possuem pelo menos um anel  $\beta$ -ionona e uma cadeia de onze carbonos apresentam atividade pró-vitáminica A. A estrutura molecular do  $\beta$ -caroteno é formada por dois anéis  $\beta$ -ionona que darão origem a duas moléculas de retinol sendo, portanto, atribuída a esse carotenóide 100% de atividade pró-vitáminica. Em menor extensão a  $\beta$ -criptoxantina e o  $\alpha$ -caroteno apresentam cerca de 50% de atividade por apresentarem em suas estruturas químicas apenas um anel  $\beta$ -ionona. O percentual de retenção real foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Murphy, Criner e Gray (1975):

$$\% \text{ de retenção} = \frac{(\text{teor de carotenoides/g de alimento processado}) \times \text{g de alimento após processamento}}{(\text{teor de carotenoides/g de alimento cru}) \times \text{g de alimento antes do processamento}}$$

## 2.4 Procedimentos biométricos

O experimento foi instalado em Delineamento Inteiramente Casualizado, sendo 4 tratamentos (grão, canjica, fubá e creme) e 4 repetições. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para a separação de médias, quando identificada significância para o teste de F, sendo utilizado para tais análises o Programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

O modelo utilizado para as análises de variância foi:

$$Y_{ij} = \mu_i + \epsilon_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

em que

As observações são designadas por  $Y_{ij}$  onde  $i = 1, \dots, g$  identifica o grupo e  $j = 1, \dots, n$  identifica a posição de cada observação dentro do seu grupo.

- $\mu_i$  representa a média de cada grupo,
- $\mu$  representa a média de todos os grupos,
- $\tau_i$  representa a diferença entre a média total e a média de cada grupo ( $\sum_{i=1}^g \tau_i = 0$ ) e,
- $\epsilon_{ij}$  representa um erro aleatório de cada observação.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os valores do teste F da análise de variância. Diferenças significativas foram identificadas entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas, evidenciando o efeito da moagem sobre a retenção de carotenoides presentes nos grãos da variedade sintética de milho biofortificado.

Tabela 1 Síntese do resultado da análise de variância do efeito moagem sobre as variáveis estudadas

	F
Carotenoides totais	834,44 **
Carotenoides pro VA	495,94 **
Luteína	571,82 **
Zeaxantina	739,21 **
$\beta$ -criptoxantina	81,85 **
$\beta$ -caroteno	475,08 **
$\alpha$ -caroteno	55,29 **
9-cis- $\beta$ -caroteno	93,25 **
13-cis- $\beta$ -caroteno	43,05 **

\*\* significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

Os derivados obtidos pelo processamento apresentaram retenção real de carotenoides totais, carotenoides proVA, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno significativamente inferior quando comparado aos grãos integrais da variedade biofortificada.

Na Tabela 2 estão apresentados os índices de retenção real de carotenoides totais e carotenoides proVA após moagem a seco de grãos de milho biofortificado.

Tabela 2 Índices médios da retenção real de carotenoides totais (%) e carotenoides proVA (%) de derivados de milho biofortificado após processamento por meio de moagem seca

Tratamento	Carotenoides totais (%) média <sup>1</sup> ±DP	Carotenoides proVA (%) média±DP
Grão	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>
Canjica	75,37±15,09 <sup>b</sup>	74,2±14,75 <sup>b</sup>
Fubá	73,51±15,09 <sup>b</sup>	75,21±14,75 <sup>b</sup>
Creme	59,47±15,09 <sup>c</sup>	60,55±14,75 <sup>c</sup>
CV	1,51	1,90

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (p>0,01)

DP: Desvio padrão

CV: Coeficiente de variação

O efeito mais expressivo do processamento para as variáveis carotenoides totais e carotenoides proVA foi observado para o creme de milho, quando comparado aos demais derivados, embora a moagem tenha afetado a retenção de carotenoides em todos os produtos. Possivelmente, as perdas tenham ocorrido como consequência das alterações sofridas pela matriz alimentícia durante o processamento, que promove destruição da estrutura celular, expondo os pigmentos à degradação oxidativa.

No caso do creme de milho, o processamento envolve maior exposição do produto ao atrito dentro do moinho. Essa exposição ocorre, principalmente, quando não há uma estabilidade estrutural dos produtos obtidos. Durante o processamento, as estruturas que protegem os carotenoides podem ser quebradas. O menor tamanho das partículas promove um aumento na superfície de contato permitindo uma maior exposição do produto a fatores externos, como o oxigênio. As condições desse processamento, como variação de tempo e temperatura, também, podem ter contribuído para degradação dos carotenoides e, conseqüentemente, influenciado na retenção dos carotenoides.

Em contrapartida, os carotenoides presentes na canjica e no fubá permaneceriam menos expostos a esses fatores adversos, uma vez que as estruturas celulares que os protegem estariam mais preservadas após o processamento em relação ao creme de milho.

Percebe-se que a maior parte dos carotenoides no milho está armazenada no endosperma (LI et al., 2007), especificamente, na camada de aleurona e no endosperma vítreo (PAES, 2008). Entretanto, após a degerminação do grão, são eliminados o pericarpo e o gérmen, limitando, assim, a atividade das lipases, enzimas concentradas, principalmente, na camada de aleurona (ARAÚJO, 2004). Essas enzimas são conhecidas por ocorrer em óleos de cereais (BORGSTROM; BROCKMAN, 1984) e podem acelerar o processo de oxidação dos carotenoides. Porém, com a retirada do gérmen, após o processamento, eliminam-se, também, os tocoferóis, substâncias presentes naturalmente em óleos vegetais, que possuem atividade antioxidante e que poderiam contribuir para preservação dos carotenoides.

Os índices de retenção real de carotenoides totais observados na canjica e no creme de milho, após processamento via seco dos grãos da variedade sintética de milho biofortificado, foram semelhantes aos valores encontrados por Santana et al. (1998) em cenoura (*Daucus carota L.*), posteriormente, ao cozimento a vapor (75,5%) e ao cozimento com água sem pressão (60,13%), embora as matrizes alimentícias fossem distintas em condições de processamentos diferentes.

Índices de retenção real de carotenoides proVA, nos três derivados sofreram redução considerável, quando comparados aos grãos. Esse resultado evidencia o efeito da moagem a seco sobre a redução de valor nutricional desses produtos após o processamento.

O efeito do processamento sobre a retenção das xantofilas nos derivados milho biofortificado, quando comparado aos grãos, também, foi significativo,



com reduções apreciáveis, conforme apresentado na Tabela 3. Valores de retenção mais elevados de luteína (95,3%) e zeaxantina (94,9%) foram verificados em cenoura, quando estudados a retenção de carotenoides, após o processo de fritura (RAPAGOPAL et al., 2007). Ressalta-se que essa diferença pode ser justificada pela disparidade de cada processo. No caso do processamento de moagem via a seco, a estrutura do alimento é alterada expondo os pigmentos a fatores adversos. Em contrapartida, durante o processo de fritura, os alimentos ficam parcialmente submersos no óleo propiciando proteção do contato direto com oxigênio, além da presença dos tocoferóis, substâncias já reconhecidas como antioxidantes (LIMA; GONÇALVES, 1997).

Tabela 3 Índices médios de retenção real expressos em percentagens das frações quantificadas de carotenoides de derivados de milho biofortificado após processamento por meio de moagem seca

Tratamento	Luteína (%) média <sup>1</sup> ±DP	Zeaxantina (%) média±DP	β-criptoxantina (%) média±DP	α-caroteno (%) média±DP	β-caroteno (%) média±DP	9-cis-β-caroteno (%) média±DP	13-cis-β-caroteno (%) média±DP
Grão	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>
Canjica	77,96 <sup>b</sup> ±15,3						74,38 <sup>b</sup>
	2	74,60 <sup>b</sup> ±15,45	83,22 <sup>b</sup> ±13,41	62,92 <sup>b</sup> ±13,41	68,09 <sup>b</sup> ±16,69	79,96 <sup>b</sup> ±12,07	±15,04
Fubá	75,80 <sup>b</sup> ±15,3						69,80 <sup>bc</sup> ±15,
	2	71,61 <sup>c</sup> ±15,45	82,30 <sup>b</sup> ±13,41	61,05 <sup>bc</sup> ±13,41	70,01 <sup>b</sup> ±16,69	82,91 <sup>b</sup> ±12,07	04
Creme	58,36 <sup>c</sup> ±15,3						63,28 <sup>c</sup>
	2	58,86 <sup>d</sup> ±15,45	64,16 <sup>c</sup> ±13,41	49,83 <sup>c</sup> ±13,41	56,41 <sup>c</sup> ±16,69	67,97 <sup>c</sup> ±12,07	±15,04
CV	1,83	1,66	3,93	8,57	2,31	3,31	6,38

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (p>0,01)

DP: Desvio padrão

CV: Coeficiente de variação

O creme de milho apresentou retenção de  $\beta$ -caroteno semelhante ao índice verificado em mandioca (55,7%) posterior ao processo de fervura por 30 minutos (CHÁVEZ et al., 2007). Índices de retenção de  $\beta$ -caroteno, superiores aos encontrados nos derivados, foram verificados em cenoura (93,4%) e pimentão-vermelho (86,8%) após o processo de fritura (RAPAGOPAL et al., 2007).

Na Figura 1 estão apresentados os cromatogramas do grão de cultivar biofortificada e do creme de milho resultante do processo de moagem a seco para as variáveis estudadas. Não foi observado aumento dos isômeros 9-cis- $\beta$ -caroteno e 13 cis- $\beta$ -caroteno, após o processamento, evidenciando a degradação dos carotenoides ocorreu por oxidação e não por meio de isomerização.

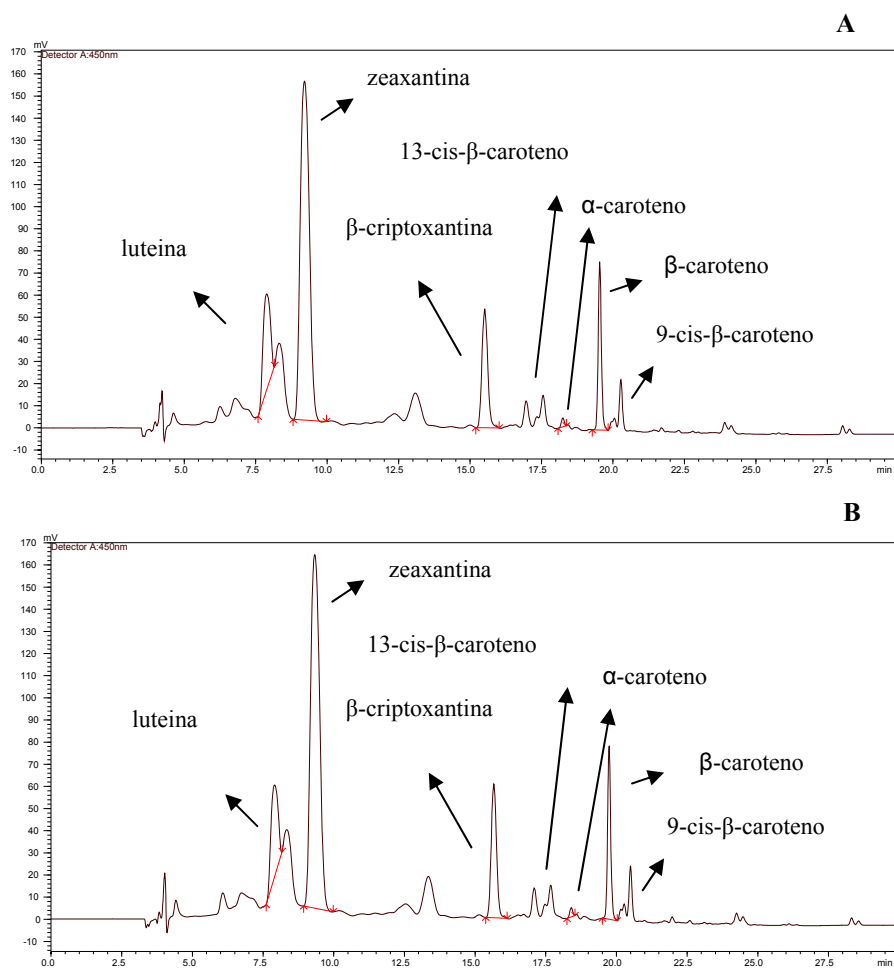


Figura 1 Cromatogramas dos carotenoides de (A) Grão de milho de cultivar biofortificada e (B) Creme de milho, a 450nm e espectro de absorção dos picos principais obtidos pelo detector de arranjo de diodos. Coluna polimérica YMC C 30

Os teores e perfil de carotenoides em grãos e derivados de milho biofortificado estão apresentados na Tabela 4 e 5, respectivamente. Todos os derivados apresentaram redução significativa no teor de carotenoides totais,

carotenoides proVA e nas demais frações em base seca quando comparados ao grão.

Tabela 4 Teores médios de carotenoides totais e carotenoides proVA expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de grãos e derivados de milho biofortificado

Tratamento	carotenoides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Média <sup>1</sup> ±DP	Carotenoides proVA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média±DP
Grão	34,49±5,57 <sup>a</sup>	7,53±1,19 <sup>a</sup>
Canjica	25,97±5,57 <sup>b</sup>	5,58±1,19 <sup>b</sup>
Fubá	24,82±5,57 <sup>c</sup>	5,55±1,19 <sup>b</sup>
Creme	19,49±5,57 <sup>d</sup>	4,33±1,19 <sup>c</sup>
CV	1,75	2,76

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a 1% de probabilidade ( $p>0,01$ ) pelo Teste de Tukey

DP: Desvio padrão

CV: Coeficiente de variação

O teor médio de carotenoides totais dos grãos da variedade de milho biofortificada avaliada ( $34,49 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) foi significativamente superior quando comparados aos de outras cultivares comerciais de milho QPM brasileiras de grãos amarelos como a Assum Preto ( $11,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e a BR 473 ( $9,17 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) (KIMURA et al., 2007).

Tabela 5 Teores médios de carotenoides expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de frações quantificadas em grãos e derivados de milho biofortificado.

Tratamento	Luteína ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média <sup>1</sup> ±DP p	Zeaxantina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média±DP	$\beta$ - criptoxantina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média±DP	$\alpha$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média±DP	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média±DP	9-cis- $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média±DP	13-cis- $\beta$ - caroteno ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) média±DP
Grão	4,00±1,46 <sup>a</sup>	20,66±7,59 <sup>a</sup>	4,37±1,4 <sup>a</sup>	0,23±0,10 <sup>a</sup>	3,51±1,38 <sup>a</sup>	0,77±0,23 <sup>a</sup>	0,95±0,32 <sup>a</sup>
Canjica	3,12±1,46 <sup>b</sup>	15,4±7,59 <sup>b</sup>	3,60±1,4 <sup>b</sup>	0,14±0,10 <sup>b</sup>	2,39±1,38 <sup>b</sup>	0,62±0,23 <sup>b</sup>	0,70±0,32 <sup>b</sup>
Fubá	2,97±1,46 <sup>c</sup>	14,48±7,59 <sup>c</sup>	3,51±1,4 <sup>b</sup>	0,14±0,10 <sup>b</sup>	2,41±1,38 <sup>b</sup>	0,63±0,23 <sup>b</sup>	0,69±0,32 <sup>b</sup>
Creme	2,22±1,46 <sup>d</sup>	11,55±7,59 <sup>d</sup>	2,66±1,4 <sup>c</sup>	0,11±0,10 <sup>c</sup>	1,88±1,38 <sup>c</sup>	0,50±0,23 <sup>c</sup>	0,57±0,32 <sup>c</sup>
CV	1,84	1,83	4,05	7,86	2,51	4,37	5,15

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ( $p>0,01$ ) pelo Teste de Tukey

DP: Desvio padrão

CV: Coeficiente de variação

A localização dos carotenoides nos grãos de milho, o tipo de matriz alimentícia, bem como características inerentes à composição do grão, tais como pH e presença de enzimas podem ter influenciado no processo de oxidação e, conseqüentemente, na redução dos carotenoides (COSTA; ABREU; ROSSETTI, 2003; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Destaque para o creme de milho em que foi observada uma redução considerável (42,5%) para carotenoides com atividade pro vitamínica após o processamento conforme apresentado na Tabela 6.

Na Tabela 6 são reportados os dados da percentagem de redução observada para carotenoides totais e de carotenoides proVA, após o processamento via seco dos grãos de milho de cultivar biofortificada.

Tabela 6 Teores médios em  $\mu\text{g}^{-1}\text{g}$  e a redução percentual de carotenoides proVA nos derivados de milho biofortificado

	carotenoides proVA ( $\mu\text{g}^{-1}\text{g}$ )	(%) redução
Grãos	7,53	
Canjica	5,58	25,9
Fubá	5,54	26,3
Creme	4,33	42,5

A retenção de carotenoides proVA foi avaliada em milhos biofortificados, durante preparações caseiras tradicionais africanas, onde foram verificadas reduções de  $\beta$ -caroteno de 24,5% e 24,8%, em mingau de milho cozido para o processo com fermentação e sem fermentação, respectivamente. Nesse estudo, também, foi analisado o comportamento do 9-cis- $\beta$ -caroteno e 13 cis- $\beta$ -caroteno, sendo observado um pequeno aumento desses compostos, durante a preparação, mas sem importância prática em termos de valor de valores de carotenoides proVA (LI et al., 2007).

#### **4 CONCLUSÃO**

- a) O processamento realizado via moagem a seco dos grãos de milho afeta a retenção de carotenoides em canjica, fubá e creme de milho, revelando perdas expressivas nessas substâncias ao fim do processo;
- b) O creme de milho, quando comparado aos demais derivados avaliados, é o produto que apresenta os menores índices de retenção real para carotenoides totais e carotenoides proVA, evidenciando a influência do tipo e condições de processamento, bem como das características inerentes a cada matriz alimentícia na composição de carotenóides;
- c) A consideração dos valores de retenção real de carotenoides é essencial, pois, direciona o volume de derivado a ser consumido para efeito biológico de suplementação esperado em populações foco, após lançamento de um cultivar de milho comercial.



## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 416 p.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BORGSTROM, B.; BROCKMAN, H. L. **Lipases**. Amsterdam: Elsevier, 1984. 527 p.

CHÁVEZ, A. et al. Retention of carotenoids in cassava roots submitted to different processing methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 3, p. 388-393, 2007.

COSTA, T. S.; ABREU, L. N.; ROSSETTI, A. G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenoides. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 56-58, 2003.

ESKIN, M. N. A. Biochemical changes in raw foods: fruits and vegetables. In: \_\_\_\_\_. **Biochemistry of food**. 2. ed. San Diego: Academic, 1990. v. 1, p. 69-145.

FERREIRA, D. F. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA. 2000. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/dff02.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2010.

KIMURA, M. et al. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, Essex, v. 100, n. 4, p. 1734-1746, 2007.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 5, p. 1948-1995, 1999.

LI, S. et al. Retention of provitamin a carotenoids in hight  $\beta$ -carotene maize (*zea mays*) during traditional, African household processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 26, p. 10744-10750, 2007.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Quantificação de tocoferóis em óleo de milho, soja, castanha-do-pará e castanha de caju, por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 8, n. 1, p. 65-73, 1997.

MONSERRATE ROJAS, F. A. et al. Metodología para seleccionar zonas de intervención con cultivos biofortificados. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 26, n. 5, p. 419-428, 2009.

MURPHY, E. W.; CRINER, P. E.; GRAY, B. C. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 23, n. 6, p. 1153-1157, 1975.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends Food Trends in Science & Technology**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 94-100, 1999.

NUTTI, M. A. **Biofortificação como ferramenta para combate a deficiências em micronutrientes**. Disponível em: <[http://www.cprm.gov.br/publique/media/geo\\_med7.pdf](http://www.cprm.gov.br/publique/media/geo_med7.pdf)>. Acesso em: 19 nov. 2008.

PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M.; REZENDE, A. M. Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba, n. 104, p. 23-40, 2003.

RAPAGOPAL, L. et al. Carotenoid retention and sensory characteristics of selected vegetables prepared by induction stir-frying. **Journal of Food Quality**, Westport, v. 30, n. 5, p. 703-717, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin carotenoids in prepared, processed, and stored foods**. Washington: USAID, 1997. Disponível em: <<http://www.mostproject.org/PDF/carrots2.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2008.

SANTANA, H. M. P. et al. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, Essex, v. 61, n. 1, p. 145-151, 1998.

## **CAPÍTULO 3**

### **ESTABILIDADE DE CAROTENOIDES DURANTE O ARMAZENAMENTO DE DERIVADOS DE MILHO BIOFORTIFICADO COM PRECURSORES DE VITAMINA A**

#### **RESUMO**

Produtos agrícolas biofortificados estão sendo produzidos no Brasil visando à complementação de intervenções já existentes direcionadas ao combate aos principais problemas de saúde pública no país (hipovitaminose A, deficiência de zinco e ferro). Milhos com altos teores de carotenoides precursores de vitamina A estão sendo avaliados quanto ao desempenho agrônômico e nutricional, sendo apenas a composição dos grãos inteiros, considerados no processo de desenvolvimento, não refletindo a forma usual de consumo por humanos, que é representada por seus derivados. A estabilidade dos carotenoides é um fator crítico, quando se avalia retenção desses compostos após o processamento, bem como durante o armazenamento de produtos processados. A degradação desses pigmentos pode afetar a cor, o sabor e valor nutritivo dos alimentos. Sendo assim, a presença de oxigênio, metais, enzimas, lipídios insaturados e antioxidantes; exposição à luz, tipo e estado físico do carotenoide presente; severidade do tratamento; material da embalagem e condições de estocagem, estão diretamente ligados à degradação desses compostos. O armazenamento de produtos processados é uma prática bastante difundida por contribuir para um sistema produtivo mais econômico, bem como pelo fato de estar atrelado a uma conveniência que conduz os consumidores. Entretanto, alterações químicas ocorridas nos carotenoides nesses processos podem trazer prejuízos do ponto de vista nutricional. É nesse contexto que surge a necessidade de verificar a estabilidade dos carotenoides em produtos processados durante a estocagem. Objetivou-se, neste trabalho, estimar as perdas de carotenoides ocorridas, durante o armazenamento, por meio do estudo de retenção desses compostos em derivados de um cultivar de milho biofortificado com carotenoides precursores de vitamina A. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), compondo um esquema fatorial 3 x 8, em que se estudou três derivados do milho (canjica, fubá e creme) durante oito períodos de armazenamento (0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 dias). Para a descrição das variáveis, em função dos períodos de armazenamento, foram feitas análises de regressão e os modelos de regressão linear foram selecionados,

observando a significância do teste F, para cada modelo e seus respectivos coeficientes de determinação. Foram realizadas análises químicas após o armazenamento em três derivados (canjica, fubá e creme de milho) por 24 dias, em oito períodos de tempo subsequentes. A extração dos carotenoides foi conduzida em esquema sequencial de solventes orgânicos e, posteriormente, quantificação em técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Para os três derivados houve estimativa de diminuição linear da retenção de carotenoides totais e de carotenoides proVA durante o período avaliado. Perdas significativas de carotenoides proVA ocorreram a partir do 14º dia para canjica, 7º dia para fubá e 10º dia para creme de milho. Não foi verificado aumento nos teores de 13-cis- $\beta$ -caroteno e de 9-cis- $\beta$ -caroteno, nos derivados de milho armazenados, durante o estudo, evidenciando que a degradação de carotenoides não ocorre por isomerização. Em contrapartida, foi verificada a estimativa de decréscimo linear dos índices de retenção de  $\beta$ -caroteno, indicando que há degradação de carotenoides com a formação de compostos de menor peso molecular durante o período avaliado.

Palavras-chave: Retenção. Pigmentos. Estocagem. Alterações químicas.

## ABSTRACT

Biofortified crops are being produced in Brazil aimed at complementing existing interventions designed to combat the major public health problems in the country (vitamin A, zinc and iron deficiency). Corn with high levels of carotenoids vitamin A precursors, are being assessed for agronomic performance and nutritional status, and only the composition of whole grains is considered in the development process, which does not reflect the usual form of consumption by humans, which is represented by its derivatives. The stability of carotenoids is a critical factor when assessing retention of these compounds after processing and during processed product storage. The degradation of these pigments can affect the color, flavor and nutritional value of foods. Thus, the presence of oxygen, metals, enzymes, unsaturated lipids and antioxidants, light exposure, type and physical state of the carotenoid; severity of treatment, packing materials and storage conditions are directly linked to the degradation of these compounds. The storage of processed products is a very common practice to contribute to a more economical production system, well as their being coupled to a convenience that attracts consumers. However, chemical changes occurring in the carotenoids in these processes may cause damage from a nutritional standpoint. It is in this context that the need to verify the carotenoid stability in processed products during storage and therefore, this paper aims to estimate carotenoid losses suffered during storage through the study of retention of these compounds. The experimental design was completely randomized (CRD), forming a 3 x 8 factorial, which studied three corn derivatives (hominy, cornmeal and cream) during eight storage periods (0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 days). For the description of variables, in function the storage periods, regression analyses were conducted and linear regression models were selected, noting the significance of the F test for each model and their coefficients of determination. Chemical analyses of the three derivatives (hominy, corn and creamed corn) were performed after storage for 24 days in eight subsequent time periods. The carotenoid extraction was carried out in a sequential scheme of organic solvents and subsequently quantified in high performance liquid chromatography. For the three derivatives, the linear decrease of the retention of total and proVA carotenoids during the study period was estimated. Significant loss of proVA carotenoids occurred from the 14th day for hominy, corn meal from the 7th day and from the 10th day for creamed corn. No increase was observed in the levels of 13-cis- $\beta$ -carotene and 9-cis- $\beta$ -carotene in corn derivatives stored during the study, showing that the degradation of carotenoids does not occur by isomerization. By contrast, there was an estimated decrease of linear retention indices of  $\beta$ -carotene, indicating the carotenoid degradation with the formation of lower molecular weight compounds during the study period.

Keywords: Retention. Pigments. Storage. Chemical changes.

## 1 INTRODUÇÃO

Produtos agrícolas biofortificados estão sendo desenvolvidos no país por meio de melhoramento genético convencional. As pesquisas e o desenvolvimento de linhagens de milho biofortificadas com alto teor de carotenoides serão direcionadas a regiões onde há alta prevalência de hipovitaminose A e onde há maior consumo desse cereal (CARDOSO, 2007).

Dada as funções nutricionais e funcionais atribuídas aos carotenoides no organismo humano, é crescente a demanda por conhecimento tanto da composição desses compostos quando da estabilidade deles nos alimentos após o processamento e durante o armazenamento. Além do mais, a estabilidade desses pigmentos, também, é crítica para aceitação de um produto.

A degradação de carotenoides não só afeta a cor dos alimentos, como também o valor nutritivo e o sabor. As formas mais comuns de degradação são isomerização, oxidação e fragmentação das moléculas desses, que podem resultar em perdas da atividade biológica, além da formação de compostos voláteis, que conferem aromas e sabores desejáveis ou indesejáveis aos alimentos (ÇINAR, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Essa degradação está diretamente ligada à presença de oxigênio, metais, enzimas, lipídios insaturados e antioxidantes; exposição à luz, tipo e estado físico do carotenoide presente; severidade do tratamento; material da embalagem e condições de estocagem (BIANCHINI; PENTEADO, 1998; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Em contrapartida, a retenção dos carotenoides pró-vitâmicos, durante a estocagem, é favorecida pela baixa temperatura, proteção da luz, exclusão do oxigênio (por vácuo, enchimento a quente, atmosfera modificada ou embalagem impermeável ao oxigênio) e antioxidantes presentes naturalmente ou adicionados como meio de preservação do alimento (LOPES; MATTIETTO; MENEZES, 2005; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Observa-se, que o fator nutricional e a conveniência continuam sendo fatores desejáveis pelos consumidores. Essa última, quando atribuída aos alimentos, relaciona-se com a facilidade de estocagem (SGARBIERI, 1986), porém, o armazenamento de um produto torna-se mais interessante quando é preservado o valor nutricional do mesmo. Assim, investigar a viabilidade desse processo é essencial, uma vez que esses derivados resultam do processamento de grãos de milho de uma variedade sintética biofortificada e representam a forma usual de consumo desse cereal. Portanto, objetivou-se neste trabalho avaliar a estabilidade de carotenoides em derivados de milho biofortificado estimando suas perdas, durante o armazenamento, por meio do estudo de retenção desses compostos.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material avaliado e armazenamento**

Três derivados (canjica, fubá e creme de milho) de uma variedade sintética de milho biofortificado com carotenoides proVA, em desenvolvimento na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, foram avaliados neste estudo, após processamento dos grãos, por meio de moagem a seco, realizada na indústria Farsete, Sete Lagoas MG. Amostras de 500 g, embaladas em polietileno de baixa densidade, foram identificadas, conforme o produto e o tempo de armazenamento na indústria, após o processamento. Posteriormente, distribuídas de forma aleatória em prateleiras no interior de uma câmara localizada na Embrapa Milho e Sorgo. Durante 24 dias as amostras foram mantidas em condições de temperatura e luz, simulando condições usuais de armazenamento para comercialização em varejo. Quatro repetições de cada produto foram utilizadas para a avaliação a cada tempo de armazenamento, sendo as mesmas ocorridas aos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 e 24 após o processamento. Uma vez que esses produtos permanecem armazenados para comercialização a varejo por cerca de 20 dias, optou-se por fazer avaliação pelo período de 24 dias. As condições de temperatura e umidade foram monitoradas, com uso de termômetro e termo-higrômetro, permanecendo a temperatura da câmara a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e exposição do produto à luz, em intensidade semelhante à de supermercado, por 14 horas/dia. A intensidade de luz foi monitorada com o uso de fotômetro. As condições da câmara, como temperatura e tempo de exposição à luz, também, foram definidas após o monitoramento da área destinada ao armazenamento desses produtos em supermercado local. Amostras foram retiradas para as análises químicas, de acordo com a identificação de cada



tempo e transferidas ao local de análise em caixas térmicas de isopor a fim de evitar transmissibilidade à luz, bem como variações de temperatura.

## 2.2 Procedimentos de laboratório

As amostras de canjica foram moídas em moinho do tipo ciclone acoplado com peneira de 0,5mm, modelo MA 020 da marca MARCONI, com o objetivo de obtenção de um produto com granulometria adequada (0,5mm) para o processo de extração. Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos, conforme protocolo descrito por Kurilich e Juvik (1999) modificado e quantificados em técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10 equipado com coluna polimérica YMC C 30 (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm, Waters, Milford, MA, USA); acoplado a detector de arranjo de diodo. O gradiente de eluição foi conduzido a 0,8 mL.min<sup>-1</sup> em condições de gradiente linear 80:20 a 20:80 de metanol: éter metil *tert*-butil em 25 minutos, seguido por constante de 80:20 em 5 minutos, finalizando com 9 minutos de equilíbrio. A temperatura de forno utilizada foi de 30°C, comprimento de onda 450nm e volume de injeção de 40 $\mu\text{L}$ . A temperatura do laboratório foi mantida a 22°C durante todo o processo. Para identificação dos compostos foram utilizados padrões purificados a partir de cenoura, pimenta amarela e milho verde, seguindo protocolo descrito em Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Os resultados foram expressos em base seca, por meio da análise de umidade, seguindo o método 44-15 da AACC (2000). O teor de carotenoides totais (CT) foi obtido pela soma dos valores de todas as frações quantificadas sendo: luteína, zeaxantina (zeax),  $\beta$ -criptoxantina ( $\beta$ -cripto),  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -carot), 9-cis- $\beta$ -caroteno (9-cis), 13-cis- $\beta$ -caroteno (13-cis). Os teores de carotenoides com atividade pró-vitáminica A (Pro VA) foram obtidos a por meio da seguinte

fórmula: total  $\beta$ -caroteno +  $\frac{1}{2}$  total de  $\alpha$ -caroteno+  $\frac{1}{2}$  do total de  $\beta$ -criptoxantina ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ ).O percentual de retenção real foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Murphy (1975) para cada variável estudada.

### 2.3 Procedimentos biométricos

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), compondo um esquema fatorial 3 x 8, em que se estudou três derivados do milho (canjica, fubá e creme) durante oito períodos de armazenamento (0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 dias). Foram realizados os ajustes quanto aos tempos de armazenamento para realização das análises estatísticas. Para a descrição das variáveis, em função dos períodos de armazenamento, foram feitas análises de regressão e os modelos de regressão linear foram selecionados, observando a significância do teste F, para cada modelo e seus respectivos coeficientes de determinação. Foi utilizado o Programa Sisvar (FERREIRA, 2000) para tais análises.

O modelo de regressão linear simples utilizado foi:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \epsilon$$

em que:

X= variável explicativa ou independente medida sem erro (não aleatória);

$\epsilon$ = variável aleatória residual na qual se procuram incluir todas as influências no comportamento a variável Y que não podem ser explicadas linearmente pelo comportamento da variável X;

$\beta_0$  e  $\beta_1$  parâmetros desconhecidos do modelo (a estimar);

Y= variável explicada ou dependente (aleatória).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis carotenoides totais, carotenoides proVA,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina e 9-cis- $\beta$ -caroteno, foram detectados efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) da interação dos fatores tratamentos e tempo de armazenamento, conforme apresentado na Tabela 1. Após o desdobramento, foi aplicada a análise de regressão para o fator tempo dentro dos produtos. Entretanto, o efeito da interação não foi significativo ( $p > 0,05$ ) para as variáveis  $\beta$ -criptoxantina e 13-cis- $\beta$ -caroteno, evidenciando que esses são independentes e, portanto, foram analisados separadamente.

Tabela 1 Síntese da análise de variância do efeito do armazenamento sobre as variáveis estudadas

Variáveis	Efeitos		
	produto	tempo	produto x tempo
Carotenoides totais	24,89**	26,14**	5,38**
Carotenoides pro VA	40,51**	61,66**	3,79**
Luteína	4,77 <sup>NS</sup>	5,49**	5,76**
Zeaxantina	23,58**	16,39**	4,35**
$\alpha$ -criptoxantina	18,04**	38,74**	1,71 <sup>NS</sup>
$\beta$ -caroteno	47,69**	70,12**	4,45**
$\alpha$ -caroteno	2,62 <sup>NS</sup>	12,22**	3,13**
9-cis- $\beta$ -caroteno	32,08**	15,54**	3,4**
13-cis- $\beta$ -caroteno	8,84**	15,11**	1,21 <sup>NS</sup>

\*\* significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

NS não significativo

Na Figura 1 são apresentados os modelos lineares da variação de retenção real de carotenoides totais e carotenoides proVA, durante o período de

armazenamento da canjica, fubá e creme produzidos a partir dos grãos da variedade de milho biofortificado.

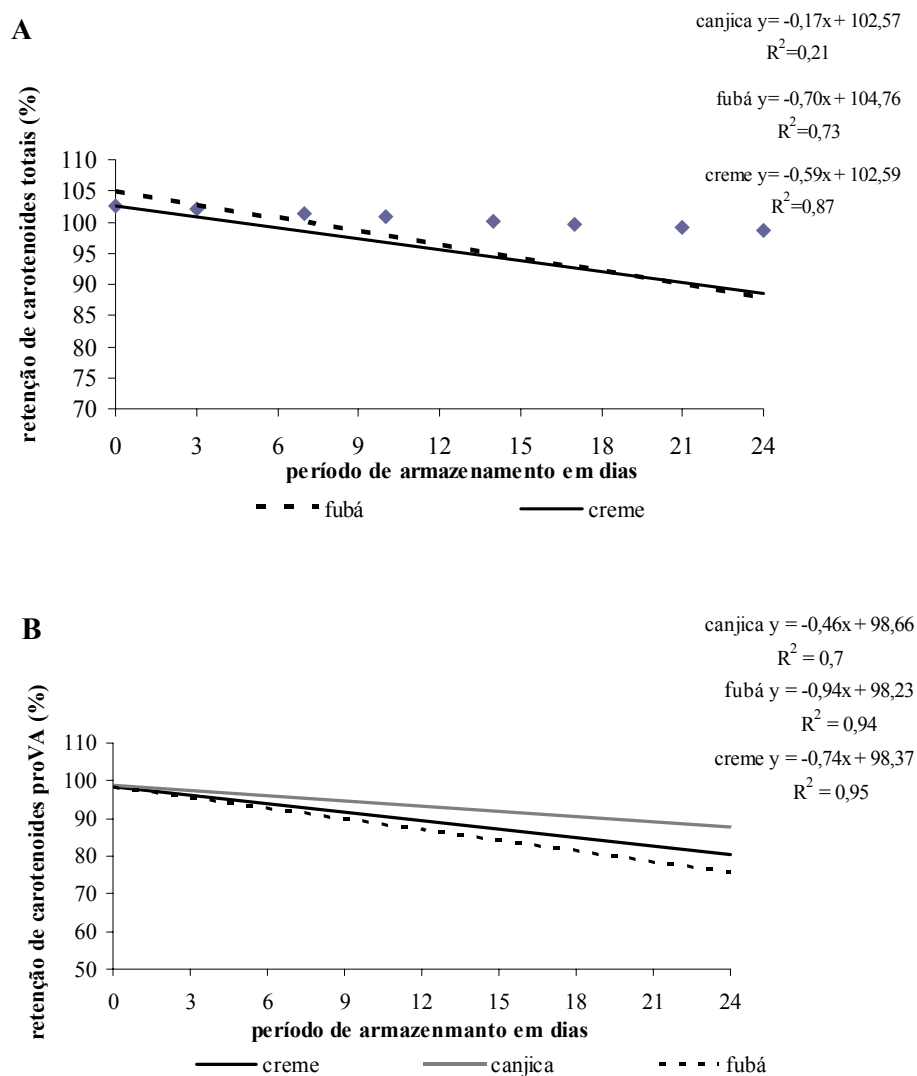


Figura 1 Variação da retenção real (%) de carotenoides totais (A) e carotenoides proVA (B), durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia

Os índices percentuais de retenção real das variáveis carotenoides totais, carotenoides proVA,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, obtidos em função do tempo de armazenamento, foram significativamente diferentes para os três produtos ( $p < 0,05$ ), em regressão do tipo linear.

Em relação aos carotenoides totais, o índice de retenção encontrado no 24º dia de armazenamento para canjica foi de (98,56%). Os dados não se ajustaram ao modelo de regressão definido para esse produto, porém, a retenção estimada ao final do período avaliado está próxima a 100% sugerindo que as perdas são inexpressivas para esse produto durante esse período.

O efeito mais expressivo do armazenamento sobre a retenção de carotenoides totais nos derivados fubá e creme, quando comparados à canjica, pode ser justificado pelo fato desses pigmentos, após a desintegração do alimento e o rompimento de sua estrutura celular, permanecerem mais expostos a fatores adversos do meio, como presença de oxigênio e luminosidade durante a estocagem. Conforme informações da indústria em que foi realizado o processamento das amostras, a embalagem utilizada foi o polietileno de baixa densidade, sem barreira à luz, e com permeabilidade ao oxigênio em torno de 20%, que contribuiria para a exposição dos carotenoides a fatores adversos nesses alimentos.

Índices de retenção de carotenoides totais verificados, ao final do período de armazenamento, foram de 87,86% para fubá e 88,44%, para o creme de milho. Valor semelhante (86,24%) foi reportado em um estudo em que foi avaliada a retenção de carotenoides totais em polpa de pitanga sob congelamento, após 30 dias de estocagem (LOPES, MATTIETTO; MENEZES, 2005), embora sejam distintas as matrizes alimentícias e o tipo e condições de armazenamento de cada estudo.

A análise de regressão, com ajuste significativo, indicou tendência linear negativa para a retenção de carotenoides proVA nos três derivados (canjica, fubá

e creme de milho). Observa-se, ao final do período de armazenamento, que a canjica foi o derivado que apresentou essa evolução menos acentuada e, conseqüentemente, maior retenção de carotenoides pro VA durante o período de armazenamento (87,57%). Para o fubá e o creme de milho foram encontrados índices de retenção de (75,67%) e (80,58%), respectivamente, indicando menor estabilidade desses produtos durante o armazenamento. Nota-se, ainda, que as reduções significativas na retenção de carotenoides proVA ocorreram a partir do 14º dia de armazenamento para canjica, 7º dia para fubá e 10º dia para creme de milho. Esses tempos de armazenamento são inferiores ao tempo em que os produtos usualmente permanecem estocados no comércio local, cerca de 20 dias, bem como do prazo de validade desses produtos estipulados pela indústria que compreende cerca de 180 dias. Estes dados possibilitam inferir que a vida de prateleira desses produtos é pequena, conseqüência, nesse caso específico, da redução de seu valor nutricional. Essa informação é importante uma vez que a vida de prateleira de um produto está diretamente ligada ao planejamento de produção e armazenamento do mesmo.

Na Figura 2 são apresentados os modelos lineares da variação de retenção real de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, durante o período de armazenamento da canjica, fubá e creme produzidos a partir dos grãos da variedade de milho biofortificado.

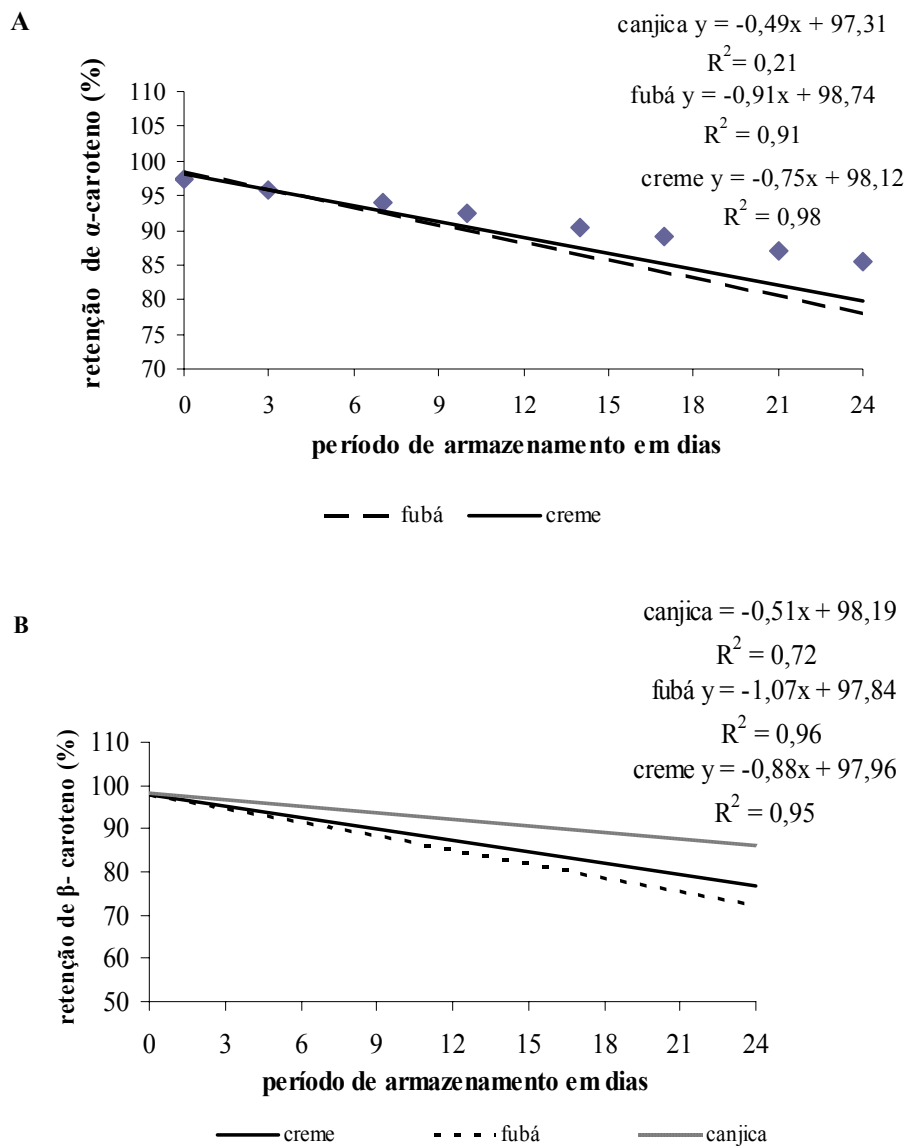


Figura 2 Variação da retenção real (%) de  $\alpha$ -caroteno (A) e  $\beta$ -caroteno (B), durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia

Em relação ao  $\alpha$ -caroteno, os dados referentes à canjica não se ajustaram ao modelo de regressão definido. O índice de retenção estimado para fubá e creme de milho foi (79,9% e 79,93%) ao final do 24º dia de armazenamento.

Para o  $\beta$ -caroteno, os índices de retenção encontrados ao final do período para canjica, fubá e creme foram (85,94%) (72,17%) e (76,73%), respectivamente. Valores semelhantes ao encontrado em creme de milho de retenção de  $\beta$ -caroteno foram encontrados após avaliação do efeito de congelamento e de tempo de estocagem da polpa de acerola posterior ao décimo primeiro mês de congelamento (74%) (COSTA; ABREU; ROSSETTI, 2003).

Na Figura 3 está apresentada a variação de retenção das xantofilas luteína e zeaxantina durante o período de armazenamento de derivados de milho biofortificado.

Os índices de retenção de luteína, obtidos em função do tempo de armazenamento, foram significativamente diferentes para o fubá ( $p < 0,05$ ), em regressão do tipo linear, embora nem todos os dados tenham se ajustado ao modelo proposto. Para a variável zeaxantina esses índices foram significativamente diferentes para fubá e creme de milho, não havendo, entretanto, o ajuste dos dados ao modelo proposto para o derivado fubá.

Os derivados canjica e creme não apresentaram variação significativa de retenção de luteína ao longo do armazenamento, sugerindo que o armazenamento não afeta os índices de retenção desses compostos durante o período avaliado.



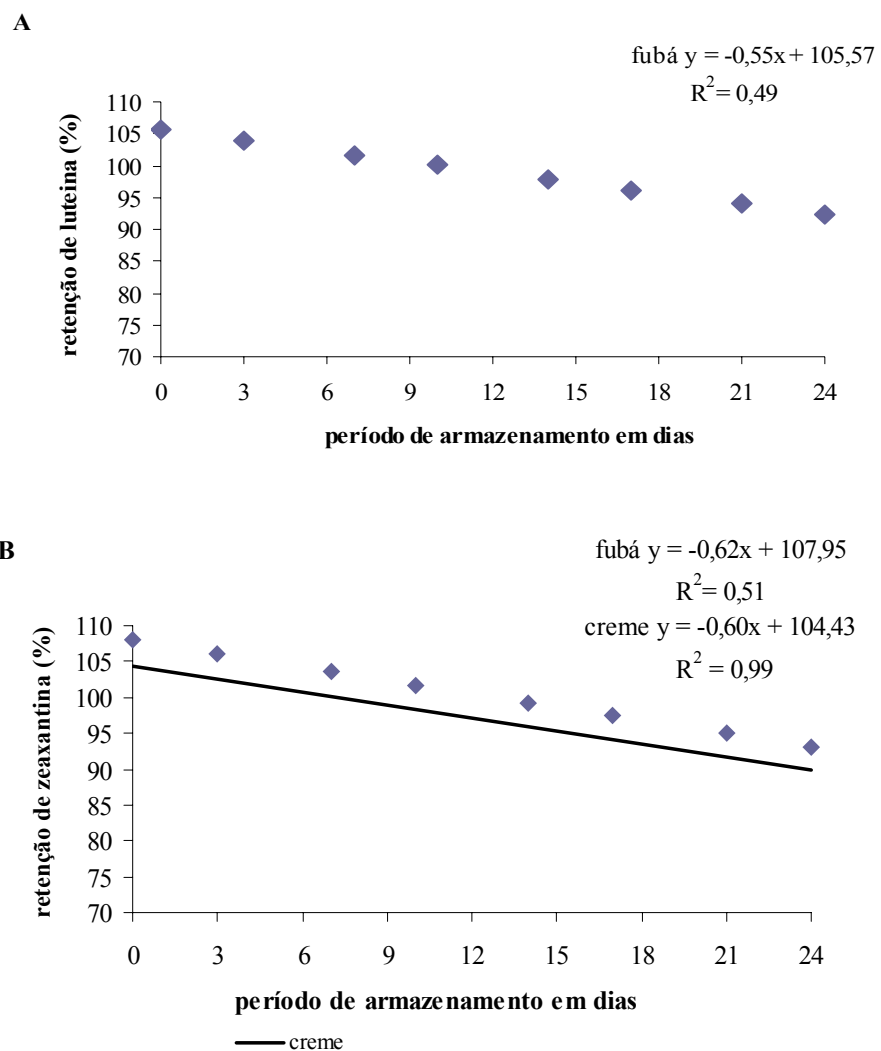


Figura 3 Variação da retenção real (%) de luteína (A) e zeaxantina(B) durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia

No 24º dia de armazenamento as retenções de zeaxantina foram de 93,05% para fubá e 89,92% para creme de milho, sugerindo perdas relativamente pequenas durante o período estudado.

A canjica não apresentou variação significativa ao longo do armazenamento, permitindo inferir que não ocorreu perda importante durante o período de 24 dias.

Índices de retenção de luteína inferiores ao observado, para os derivados do milho biofortificado neste estudo, foram verificados por Pandrangi e Laborde (2004), após avaliação de espinafres embalados armazenados a 4°C, 10°C e 20°C (61%, 65% e 48,3% respectivamente) por 8, 6 e 4 dias respectivamente.

Na Figura 4 está apresentada a variação da retenção real (%) de 9-cis- $\beta$ -caroteno durante o armazenamento de derivados de milho biofortificado.

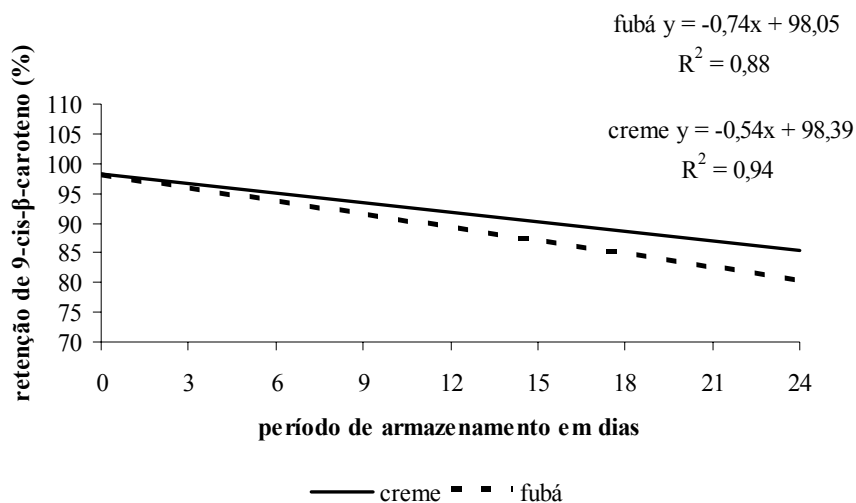


Figura 4 Variação da retenção real (%) de 9-cis- $\beta$ -caroteno durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia

Os índices de retenção de 9-cis- $\beta$ -caroteno, obtidos em função do tempo de armazenamento, foram significativamente diferentes para fubá e creme de milho ( $p < 0,05$ ), em regressão do tipo linear.

A análise de variância do modelo de regressão linear não foi significativa para a canjica, sendo o índice de retenção ao final do período de 93,65%. Entretanto, não foi verificado aumento do 9-cis- $\beta$ -caroteno, para os três derivados, o que pode ser interpretado como ausência de isomerização durante o armazenamento.

Na Figura 5 está apresentada a variação da retenção real percentual de  $\beta$ -criptoxantina durante o armazenamento de derivados de milho biofortificado. Após efetuada a análise de regressão para essa variável, verificou-se tendência de redução linear com estimativa de índice de retenção de (80,97%) ao final do período para os três derivados.

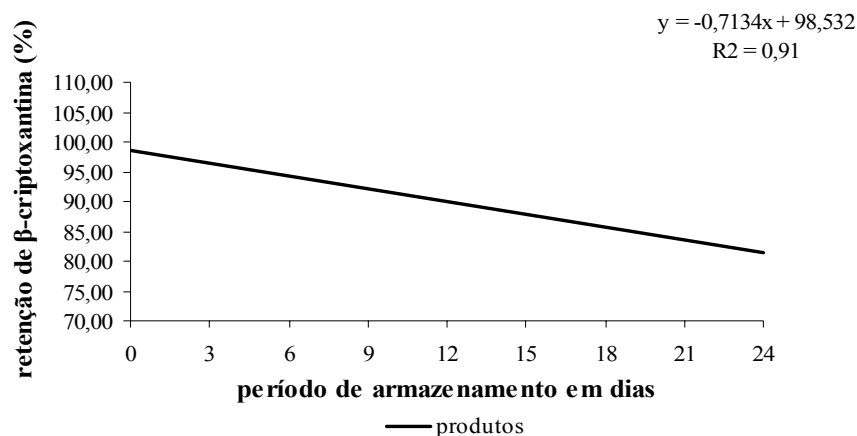


Figura 5 Variação da retenção real (%) de  $\beta$ -criptoxantina durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia

Para o fator produto, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os índices de retenção de  $\beta$ -criptoxantina foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), para os três derivados. Os valores médios de retenção real de  $\beta$ -criptoxantina observados nos derivados de milho biofortificado estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Valores médios de retenção real (%) de  $\beta$ -criptoxantina em derivados de milho biofortificado

		Canjica	Fubá	Creme
Armazenamento (em dias)		Retenção real		
$\beta$ - criptoxantina	0	100,00	100,00	100,00
	3	92,69	93,28	94,13
	7	96,34	90,79	92,68
	10	97,73	88,96	91,94
	14	94,10	89,68	89,42
	17	90,33	80,18	82,82
	21	87,90	79,41	84,02
	24	82,53	76,89	83,49
	Média de cada produto/desvi o padrão		92,70 <sup>a</sup> ±6,67	87,40 <sup>b</sup> ±7,95
CV (%) 3,93				

O índice de retenção de  $\beta$ -criptoxantina foi superior para a canjica, indicando bom nível de retenção após o período estudado.

Na Figura 6 está apresentada a resposta da variação da retenção real percentual de 13-cis- $\beta$ -caroteno durante o armazenamento de derivados de milho biofortificado. Após efetuada a análise de regressão, verificou-se tendência de

redução linear com índice de retenção de (86,26%) ao final do período para os três derivados.

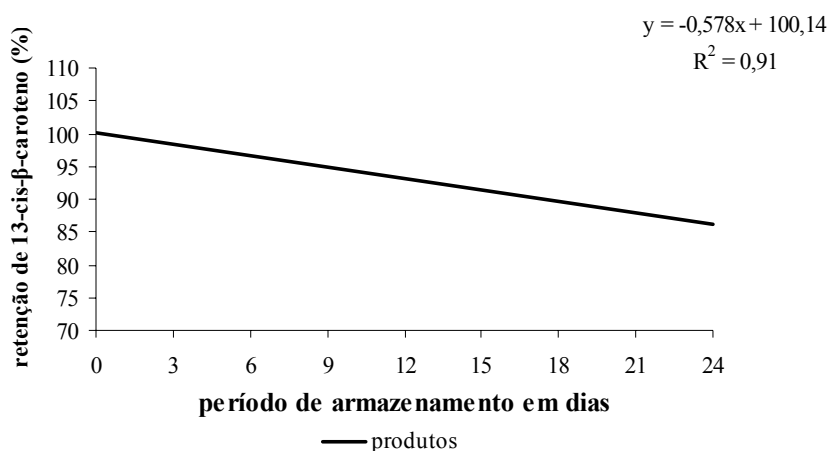


Figura 6 Variação da retenção real (%) de 13-cis-β-caroteno durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia

Para o fator produto as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os índices de retenção de β-criptoxantina foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para o fubá quando comparados aos demais derivados. Não foi verificada diferença significativa entre creme de milho e canjica quanto à retenção de 13-cis-β-caroteno.

Os valores médios de retenção real de 13-cis-β-caroteno observados nos derivados de milho biofortificado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Valores médios de retenção real (%) de 13-cis- $\beta$ -caroteno em derivados de milho biofortificado

	Canjica	Fubá	Creme
Tempo (em dias)	Retenção real (%)	Retenção real (%)	Retenção real (%)
0	100,00	100,00	100,00
3	94,40	98,57	98,06
7	100,69	94,17	99,14
10	96,70	91,03	95,59
14	95,83	91,99	93,07
17	92,87	81,68	88,00
21	91,53	85,97	89,05
24	90,59	81,14	86,68
Médias	95,33 <sup>a</sup> ±6,61	90,57 <sup>a</sup> ±7,18	93,70 <sup>b</sup> ±6,14

CV (%) 4,94

A variabilidade, quanto ao ganho de massa dos derivados, durante o armazenamento, está apresentada na Tabela 4. O aumento na massa sugere que o tipo e a característica da embalagem utilizada no experimento podem ter contribuído para a troca de gases e vapor de água com o ambiente, e assim, conseqüentemente, para degradação dos carotenoides. Considerando a vida de prateleira desses derivados no mercado que é, em média de 180 dias, é provável que variações de peso ainda maiores possam ocorrer durante esse período. As perdas de carotenoides, ainda, podem ser potencializadas se as condições de armazenamento não forem as ideais.

Tabela 4 Variação de peso médio das amostras (%) durante o armazenamento de derivados de milho a 27°C com luz por 14h/dia

	Canjica	Fubá	Creme
	% de ganho de massa das amostras		
3	0,29	0	0,07
7	0,04	0,05	0,15
10	0,29	0,07	0,17
14	0,23	0,27	0,35
17	0,06	0,13	0,24
21	0	0,13	0,24
24	0,03	0,11	0,27

A redução do teor de carotenoides proVA em base seca após os 24 dias de armazenamento pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5 Teor de carotenoides proVA em base seca nos derivados de milho biofortificado nos períodos início e final de armazenamento e a redução percentual na concentração dessas substâncias ocorridas devido a estocagem

	Após processamento ( $\mu\text{g}^{-1}\text{g}$ )	Após 24 dias de armazenamento ( $\mu\text{g}^{-1}\text{g}$ )	Redução (%)
Canjica	5,58	4,82	13,6
Fubá	5,54	4,25	23,3
Creme	4,33	3,58	17,3

#### 4 CONCLUSÃO

- a) O armazenamento afeta de forma distinta a retenção de carotenoides em canjica, fubá e creme de milho biofortificado com carotenoides proVA;
- b) Há estimativa de diminuição linear da retenção de carotenoides totais e de carotenoides proVA, ao longo do período de 24 dias de armazenamento, para os derivados canjica, fubá e creme de milho, com perdas importantes de carotenoides proVA a partir do 14º, 7º e 10º dia, respectivamente, limitando o período de estocagem desses produtos de forma diferenciada quando considerado o aspecto nutricional;
- c) Os teores de 13-cis- $\beta$ -caroteno e de 9-cis- $\beta$ -caroteno não apresentam aumento com o armazenamento nos derivados de milho, evidenciando que a degradação de carotenoides em canjica, fubá e creme de milho biofortificado com carotenoides precursores de vitamina A não ocorre por isomerização;
- d) Para os produtos canjica, fubá e creme, obtidos de milho biofortificado com proVA, há decréscimo linear dos índices de retenção de  $\beta$ -caroteno, durante o armazenamento do produto, em condições de comercialização a varejo, indicando que há degradação desse composto, com consequente redução da disponibilidade de proVA nesses derivados.



## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os teores de carotenoides proVA, em grãos de milho biofortificado, sofrem reduções de 39,5% para canjica, 49,6% para fubá e 59,8% para o creme de milho, após o armazenamento desses derivados, por período de 24 dias, em condições de comercialização a varejo.

## REFERÊNCIAS

BIANCHINI, R. P.; PENTEADO, M. V. C. Carotenoides de pimentões amarelos (*Capsicum annuum* L.). Caracterização e verificação de mudanças com o cozimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 283-288, 1998.

ÇINAR, I. Carotenoid pigment loss of freeze-dried plant samples under different storage conditions. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 37, n. 3, p. 363-367, 2004.

COSTA, T. S. A.; ABREU, L. N.; ROSSETTI, A. G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenoides. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 56-58, 2003.

FERREIRA, D. F. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA. 2000. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/dff02.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2010.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 5, p. 1948-1995, 1999.

LOPES, A. S.; MATTIETTO, R. A.; MENEZES, H. C. Estabilidade da polpa de pitanga sob refrigeração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 553-559, 2005.

PANDRANGI, S.; LABORDE, L. F. Retention of folate, carotenoids, and other quality characteristics in commercially packaged fresh spinach. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 9, p. 702-707, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin carotenoids in prepared, processed, and stored foods**. Washington: USAID, 1997. Disponível em: <<http://www.mostproject.org/PDF/carrots2.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI, 1999. 64 p.

SÁ, M. C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables – Comparison of analytical and calculated data. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, n. 1, p. 37-51, 2004.

SGARBIERI, V. C. Nutrição e tecnologia de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 115-139, 1986.