



NATÁLIA ALVES BARBOSA

**RETENÇÃO DE CAROTENOIDES EM MILHO
VERDE BIOFORTIFICADO COM
PRECURSORES DE VITAMINA A
APÓS PROCESSAMENTO**

LAVRAS – MG

2013

NATÁLIA ALVES BARBOSA

**RETENÇÃO DE CAROTENOIDES EM MILHO VERDE
BIOFORTIFICADO COM PRECURSORES DE VITAMINA A
APÓS PROCESSAMENTO**

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

Orientadora

Dra. Joelma Pereira

Coorientadora

Dra. Maria Cristina Dias Paes

LAVRAS - MG

2013

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

Barbosa, Natália Alves.

Retenção de carotenoides em milho verde biofortificado com
precursores de vitamina A após processamento / Natália Alves
Barbosa. – Lavras : UFLA, 2013.

122 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Joelma Pereira.

Bibliografia.

1. Biofortificação. 2. Minimamente processado. 3. Cozimento de
grãos. 4. proVA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.725

A Deus, por me ajudar a superar todos os obstáculos.

OFEREÇO

À minha família, presente em todos os momentos da minha vida:

Meus pais: Milton e Márcia;

Meu esposo Leandro;

Minha irmã Danielle;

Vocês são o exemplo de família, amor, e união!!!

São responsáveis por todas as minhas conquistas.

Amo Vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir-me sonhar e realizar meus sonhos. Sou apaixonada por Ti, Jesus. Mais uma vez sonhei, busquei e conquistei!!!

Agradeço, de forma muito carinhosa, a atuação da minha família no período de construção deste trabalho;

Meus pais Milton e Márcia, pelo exemplo de vida e dignidade;

Meu esposo Leandro, pelo apoio amor e carinho;

Minha irmã Danielle, por estar sempre ao meu lado. Agradeço, carinhosamente, por tudo.

À minha orientadora, Profa. Joelma, modelo de educadora, pela compreensão, incentivo, correções, e pela amizade. Por aceitar a orientação de meu mestrado e para quem espero retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada. Obrigada por ser minha orientadora!

À minha coorientadora Maria Cristina Dias Paes, excelência de profissionalismo, pela paciência, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ser o maior incentivador na superação de meus limites. Meu carinho e admiração sempre!!! Obrigada por participar da minha formação!!!

Ao Prof., Luiz Carlos de Oliveira Lima, por aceitar fazer parte da banca e por todos os ensinamentos durante a Pós-Graduação;

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 realização dos experimentos em seus laboratórios e pelo custeio da pesquisa, por meio do projeto BioFort;

A todos os amigos do Laboratório de Grãos, Raízes e Tubérculos UFLA, que sempre me ajudaram quando precisei e pela harmoniosa convivência. Sinto-me engradecida 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, Rita, Andreia, Carine, Gabriela, Cristiane, Jéssica, Mariana, Camila e Denise, pela amizade, convivência durante o trabalho experimental e, em especial, ao Carlos Henrique Pires que muito contribuiu em suas orações e ao Fabiano Okumura, pelo auxílio nas análises;

Às estagiárias do Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo; Ediani Peruggia e Carla Santana, pelo carinho, companheirismo e auxílio no trabalho experimental;

Ao pesquisador, Dr. Antônio Carlos de Oliveira (Embrapa Milho e Sorgo), pela disponibilidade e orientações na condução das análises estatísticas;

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante os anos do curso,

A todos que torceram por mim, acreditaram nesta vitória, e que fazem parte deste momento de conquista, meus sinceros agradecimentos!!!

*“Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos
erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias a
baixam para a terra, sua mãe. ”*

(Leonardo da Vinci)

RESUMO GERAL

Produtos alimentícios processados podem sofrer alterações na sua composição química durante o processamento e/ou armazenamento, causando alterações com prejuízos do ponto de vista nutricional. Assim o objetivo geral com este trabalho foi determinar a retenção de carotenoides em milho verde normal e biofortificado com precursores de vitamina A após processamento. Sendo os objetivos específicos a) avaliar e comparar a retenção de carotenoides de importância biológica durante o período de estocagem das espigas de milho comum e biofortificadas embaladas com e sem vácuo; b) determinar a retenção de carotenoides em milho verde biofortificado submetidos a diferentes tratamentos térmicos. Os carotenoides foram extraídos das amostras de milho verde em esquema sequencial de solventes orgânicos e em seguida quantificados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O experimento foi planejado em DIC, em esquema fatorial. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo teste LSD ($p=0,05$), quando detectado significância do teste F. A retenção de carotenoides em grãos verdes de milho normal e biofortificado com precursores de vitamina A, não é influenciada pelos tipos de embalagens (bandeja de poliestireno envoltas com filme PVC 18 mm e a vácuo nylon poli multicamadas) aplicadas ao processamento mínimo. Foi observado que o processamento mínimo, bem como o armazenamento não afetam a retenção de β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides proVA em grãos verde dos cultivares estudados. Os efeitos estudados sobre a retenção de carotenoides em grãos verdes independem do cultivar, exceto para luteína sendo as concentrações dos carotenoides luteína, β -criptoxantina, β -caroteno, carotenoides totais e o total de carotenoides precursores de vitamina A presentes nos grãos verdes do milho sintético proVA maiores do que no cultivar de milho BRS1030. Quanto ao estudo da influência dos tratamentos térmicos sobre a retenção de cada tratamento aplicado aos grãos das espigas de milho verde das cultivares estudadas conclui-se em grãos verdes da cultivar BRS1030, o cozimento das espigas sem água no micro-ondas e com água em panela de pressão resulta em redução de β -caroteno. Para preservação dos carotenoides os melhores tratamentos, de acordo com as condições estudadas no presente trabalho são: cozimento na panela com tampa e panela sem tampa.

Palavras-chave: Minimamente processado. ProVA. Degradação de carotenoides. Hipovitaminose A. Cozimento de grãos. Melhoramento genético.

GENERAL ABSTRACT

The chemical composition of processed food products may suffer alterations during processing and/or storage, causing nutritional loss. Thus, the objective of this work was to determine carotenoid retention in normal and biofortified with vitamin A precursors corn after processing. The specific objectives were: a) evaluate and compare the retention of biologically important carotenoids during the storage period of normal and biofortified corn ears packaged with and without vacuum; b) determine carotenoid retention in biofortified corn submitted to different thermal treatments. The carotenoids were extracted from the corn samples in a sequential scheme of organic solvents and subsequently quantified through high-performance liquid chromatography (HPLC). The experiment was planned in Completely Randomized Design, in a factorial scheme. The statistical analyses were performed using the SISVAR program. The obtained data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by the LSD test ($p = 0.05$), when significance was detected by the F test. Carotenoid retention in normal and biofortified green corn grain is not influenced by the types of packaging (polyethylene trays enveloped with 18 mm PVC film and vacuum nylon poly multilayers) applied to the minimum processing. We observed that minimum processing, as well as storage, do not affect the retention of β -carotene, total carotenoids and proVA carotenoids in green grains of the studied cultivars. The effects studied on carotenoid retention in green grains are independent of the cultivar, except in the case of lutein, being that the carotenoid concentrations of lutein, β -cryptoxanthin, β -carotene, total carotenoids and total vitamin A precursor carotenoids in the green pro VA synthetic corn grains higher than those of the corn cultivar BRS1030. Regarding the study on the influence of thermal treatments on the retention of each treatment applied to the grains in the corn ear, we concluded that, in green grains of cultivar BRS1030, cooking the corn ears without water in a microwave and with water in a pressure cooker results in the reduction of β -carotene. In order to preserve the carotenoids, the best treatments, according to the conditions studied in this work, are: cooking in a pan with lid and cooking in a pan without lid.

Keywords: Minimally processed. ProVA. Carotenoid degradation. Hypovitaminosis A. Grains cooking. Genetic improvement.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Unidade de isopreno (A) e estrutura química do α - caroteno (B) 20
- Figura 2 Conversão do β -caroteno a retinol 21
- Figura 3 Estruturas dos carotenoides precursores de vitamina A 26
- Figura 4 Anatomia do grão de milho 32

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Fluxograma do processamento mínimo de milho verde utilizado no experimento de retenção de carotenoides ao longo do tempo de armazenamento..... 50
- Figura 2 Imagem das espigas de milho verde acondicionadas em bandejas de poliestireno, envoltas com filme PVC 18 mm de espessura 52
- Figura 3 Imagem das espigas de milho verde acondicionadas em embalagem a vácuo de nylon poli multicamadas..... 52
- Figura 4 Variação da retenção aparente (%) de luteína, durante o armazenamento das cultivares de milho verde a 5 °C com luz por 9 h/dia 62
- Figura 5 Retenção de zeaxantina dos grãos verdes das espigas de milho minimamente processadas no período de armazenamento 66
- Figura 6 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde da cultivar BRS1030 obtidas das espigas armazenadas em bandeja de poli estireno recoberta com filme policloreto de vinila (18 mm) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B)..... 70

Figura 7	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde da cultivar sintética proVA obtidas das espigas armazenadas em bandeja de poliestireno recoberta com filme policloreto de vinila (18mm) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B).....	71
Figura 8	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde da cultivar BRS1030 obtidas das espigas armazenadas em vácuo (nylon poli multicamadas) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B).....	72
Figura 9	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde do sintético proVA obtidas das espigas armazenadas em vácuo (nylon poli multicamadas) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B).....	73

CAPÍTULO 3

Figura 1	Cozimento das espigas de milho verde no micro-ondas por 7 minutos em potência máxima	84
Figura 2	Cozimento das espigas de milho verde em panela de pressão	85
Figura 3	Cozimento das espigas de milho verde em panela com tampa	86
Figura 4	Cozimento das espigas de milho verde em panela sem tampa.....	87
Figura 5	Imagem das espigas onde foram retirados os grãos para análises químicas, mostrando em que parte foram obtidas as amostras	88
Figura 6	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento (A) e após o cozimento com água na panela com tampa (B).....	109

Figura 7	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento na panela sem tampa (A) e após o cozimento na panela sem tampa, (B).....	110
Figura 8	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento em micro-ondas (A) após o cozimento em micro-ondas (B).....	111
Figura 9	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento em panela de pressão (A) após o cozimento em panela de pressão (B).....	112
Figura 10	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento com tampa (A) após cozimento com tampa (B).....	113
Figura 11	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento sem tampa (A) após cozimento sem tampa (B)	114
Figura 12	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento em micro-ondas (A) após cozimento em micro-ondas (B).....	115
Figura 13	Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento em panela de pressão (A) após cozimento em panela de pressão, (B)	116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Concentração de carotenoides em base fresca expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fração quantificada nas amostras de grãos de milho verde de espigas minimamente processadas de a cultivar normal e biofortificada..... 58
- Tabela 2 Síntese do resultado da análise de variância (ANOVA) do efeito dos tratamentos sobre as variáveis estudadas 61
- Tabela 3 Médias da perda de massa (%) dos grãos verdes das espigas das diferentes cultivares de milho armazenadas em bandeja e a vácuo, nos diferentes dias de armazenamento 64
- Tabela 4 Médias da retenção aparente de zeaxantina (%) para grãos verdes das espigas de milho minimamente processadas durante os nove dias de armazenamento..... 65
- Tabela 5 Médias da retenção aparente de β -criptoxantina (%) para os grãos verdes das espigas de milho das cultivares BRS1030 e proVA 67
- Tabela 6 Médias de retenção aparente (%) da fração quantificadas de β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides proVA após processamento mínimo das espigas de milho armazenadas por 9 dias 68

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Concentração de carotenoides expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (base fresca) em grãos de espigas de milho verde normal e biofortificado..... 91
- Tabela 2 Síntese do resultado da análise de variância (ANOVA) do efeito de cultivar, tipo de cozimento, processamento e sobre as variáveis estudadas..... 93

Tabela 3	Médias de retenção real de luteína (%) dos grãos de milho verde das cultivares BRS1030 e proVA antes e após o processamento térmico.....	94
Tabela 4	Médias da retenção real de luteína (%) em grãos verdes, nos diferentes tipos de processamentos térmicos aplicados as espigas de milho	95
Tabela 5	Médias de retenção real de zeaxantina (%) dos grãos verdes nas espigas de milho das cultivares estudadas	97
Tabela 6	Médias da retenção real de β -criptoxantina (%) dos grãos verdes de milho em espigas das cultivares estudadas.....	98
Tabela 7	Médias da retenção real de β -caroteno (%) dos grãos verdes das espigas de milho das cultivares estudadas	100
Tabela 8	Médias da retenção real de carotenoides totais (%) observadas para os grãos verdes das espigas das cultivares de milho estudado	103
Tabela 9	Médias da retenção real de carotenoides proVA (%) observadas para os grãos verdes das espigas de milho das cultivares estudadas.....	105
Tabela 10	Médias da percentagem de perda de massa dos grãos das espigas de milho verde das cultivares estudadas de acordo com o tipo de cozimento.....	107

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	17
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Carotenoides	19
2.1.1	Carotenoides e vitamina A	24
2.1.2	Deficiência de vitamina A e a importância dos carotenoides na saúde humana	27
2.1.3	Degradação dos carotenoides	28
2.1.3.1	Oxidação	28
2.1.3.2	Isomerização	29
2.1.3.3	pH	30
2.2	Milho	31
2.2.1	Milho Verde	33
2.3	Biofortificação	34
	REFERÊNCIAS	36
	CAPÍTULO 2 Retenção de carotenoides em grãos de milho verde após o processamento mínimo e a estocagem de espigas em condições de comercialização a varejo	45
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Matéria-prima	49
2.2	Processamento mínimo	49
2.3	Determinação do perfil de carotenoides	53
2.4	Determinação de umidade das amostras	56
2.5	Delineamento experimental	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	CAPÍTULO 3 Retenção de carotenoides em grãos de espigas de milho verde normal e biofortificado com precursores de vitamina a submetidos a diferentes tratamentos térmicos	79
1	INTRODUÇÃO	81
2	MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1	Matéria-prima	83
2.2	Higienização da amostra	83
2.3	Processamento	83
2.3.1	Cozimento sem adição de água no micro-ondas	84
2.3.2	Cozimento em água com pressão	85
2.3.3	Cozimento em água em panela com tampa	85

2.3.4	Cozimento em água em panela sem tampa.....	86
2.4	Preparo das amostras para análise.....	87
2.5	Determinação do perfil de carotenoides.....	88
2.6	Determinação de umidade das amostras.....	89
2.7	Delineamento experimental.....	89
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
4	CONCLUSÃO.....	117
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
	REFERÊNCIAS.....	119

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, a população mundial adquiriu a visão de que alimentos não são apenas para nutrir, mas oferecem também compostos ou elementos biologicamente ativos, que proporcionam benefícios adicionais à saúde. Surgiu então, o conceito de alimentos funcionais. Entre os compostos bioativos presentes em fontes alimentícias estão os carotenoides, que além de serem corantes naturais dos alimentos, possuem também atividades biológicas.

Algumas estratégias são utilizadas para combater as hipovitaminoses como, por exemplo, a suplementação de vitaminas por meio de distribuição medicamentosa e a fortificação de alimentos processados. Porém, estas alternativas são de elevado custo e exigem infraestruturas e sistemas de saúde altamente funcionais para permitirem o acesso das pessoas a esses tratamentos (DESENVOLVENDO..., 2011). Contudo, programas de melhoria e transformação genética de plantas têm implementado estratégias para aumentar as concentrações de nutrientes essenciais em alimentos básicos da dieta humana, processo denominado biofortificação (DESENVOLVENDO..., 2011; HARVEST PLUS, 2011).

No Brasil encontra-se em fase de desenvolvimento uma cultivar de milho biofortificado com carotenoides precursores da vitamina A (proVA) por meio do melhoramento genético tradicional de plantas, tendo como foco o uso desse na alimentação da população que apresenta deficiência de vitamina A (hipovitaminose A), ainda considerada problema de saúde no país onde o milho é alimento básico (CARDOSO, 2007). Nesse cenário, o milho biofortificado surge como alternativa de um produto com maior valor nutricional e, conseqüentemente, com potencial para auxiliar no combate de carências de

micronutrientes. Porém, até o momento são escassas as informações sobre a retenção de carotenoides em grãos verdes de cultivares e/ou linhagens de milho nas formas usualmente consumidas pela população. Todavia, sabe-se 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.

Considerando ser o milho verde um alimento muito apreciado pela população brasileira, sendo consumidos tanto na forma de espiga cozida, grãos em conserva, como também na preparação de pratos típicos, é imprescindível avaliar a retenção dos carotenoides de materiais biofortificados na forma de milho verde após o processamento e armazenamento. Portanto, objetivou-se com o presente trabalho: a) avaliar e comparar a retenção de carotenoides de importância biológica durante o período de estocagem de espigas de milho comum e biofortificadas minimamente processadas embaladas com e sem vácuo; b) determinar a retenção de carotenoides em milho verde normal e biofortificado submetido a diferentes tratamentos térmicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Carotenoides

O termo carotenoide caracteriza um grupo de pigmentos naturais de cor variável entre o amarelo e vermelho escuro (AZEVEDO-MELEIRO, 2003). Estão amplamente distribuídos nos reinos animal e vegetal, incluindo grande variedade em algas, bactérias, leveduras e fungos (RAO; RAO, 2007). Aqueles encontrados em alimentos vegetais são menos numerosos, ainda assim de composição complexa e variável (AZEVEDO-MELEIRO, 2003). Além da larga distribuição na natureza, possuem ampla diversidade estrutural e inúmeras funções (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). O nome carotenoide é decorrente do nome científico da cenoura – *Daucus carote*, autenticado por Wackenroder em 1831 como a primeira fonte de caroteno (GOODWIN, 1952).

Muitas propriedades dos carotenoides já foram descobertas, como a capacidade de serem convertidos em vitamina A, as propriedades antioxidantes, ação na melhora da acuidade visual e ação contra doenças degenerativas como o câncer, a catarata e a cegueira (PACHECO, 2009).

Já foram identificadas mais de 600 estruturas químicas dos carotenoides, sendo que aproximadamente 50 delas possuem atividade biológica e deste total cerca de 40 podem ser encontradas em alimentos (FRASER; BRAMLEY, 2004). Esses compostos são classificados de acordo com sua estrutura química, em carotenos (p.ex.: β -caroteno e licopeno) e xantofilas (p.ex.: luteína e zeaxantina), sendo o β -caroteno o mais estudado, dada à sua função precursora da vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). A carência dessa vitamina apresenta-se como uma das maiores deficiências nutricionais na população mundial, gerando sérios problemas de saúde, especialmente a cegueira noturna em crianças.

Estes compostos são isoprenoides frequentemente constituídos por oito unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno, que pode conter de 2 a 15 duplas ligações conjugadas, o que permite configurações *cis* e *trans* (FRASER; BRAMLEY, 2004). Na Figura 1 são apresentadas as estruturas químicas do isopreno e do α -caroteno.

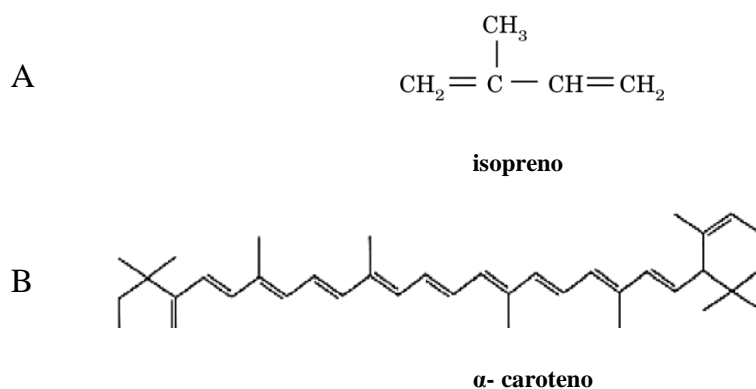


Figura 1 Unidade de isopreno (A) e estrutura química do α - caroteno (B)

Fonte: Fontana et al. (2008)

Os compostos com todas as ligações na forma *trans* exibem cor mais escura, conseqüentemente, o aumento de ligações *cis* resulta em enfraquecimento gradual da cor. Isso pode ser notado durante o processamento e estocagem de alimentos ricos em carotenoides, uma vez que tais procedimentos podem provocar a isomerização das moléculas de carotenoides no produto e alterar sua cor (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Quimicamente, esses compostos são divididos em dois grupos: os carotenos hidrocarbonetos e as xantofilas oxigenadas. Os oxigenados (xantofilas) consistem de diversos derivados, os quais costumam conter

hidroxila, epóxi, aldeídos e ceto. Além disso, os ésteres de ácidos graxos de carotenoides hidroxilados também são muito encontrados na natureza (BRITTON; YOUNG, 2004).

Do ponto de vista nutricional, os carotenoides são classificados em pró-vitamínicos A e carotenoides inativos. A atividade pró-vitamina A tem como requisito mínimo, um anel β -ionona com cadeia lateral poliênica de pelo menos 11 carbonos (Figura 2). As outras propriedades funcionais são independentes desta condição, mas também se encontram fortemente ligados à estrutura do carotenoide (AZEVEDO-MELEIRO, 2003), sendo elas a absorção de luz, a atividade antioxidante, a atividade anticancerígena, o transporte de oxigênio (ROCK et al., 1996). Os carotenoides, β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina são os mais investigados quanto à relação com a saúde humana (RODRIGUEZ-AMAYA; RODRIGUEZ; AMAYA-FARFANI, 2006; ZEB; MEHMOOD, 2004).

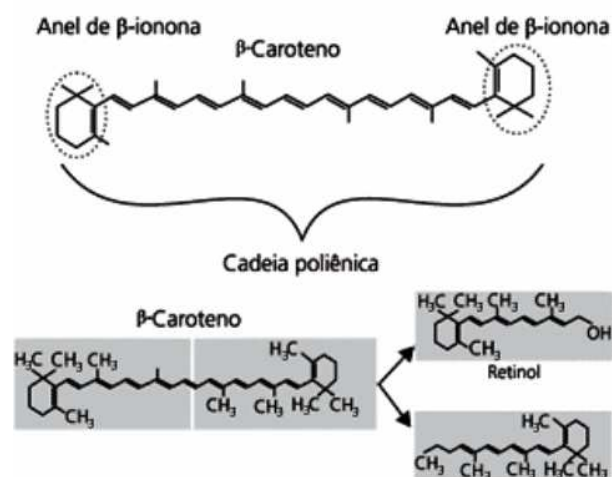


Figura 2 Conversão do β -caroteno a retinol

Fonte: Ambrósio, Campos e Faro (2006)

Os carotenoides, principalmente o licopeno, vêm sendo associados à proteção de doenças cardiovasculares, cânceres de próstata, estômago e pulmão, agindo em possíveis mecanismos de modulação do metabolismo de carcinógenos por meio da inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação de células por meio dos retinoides, estimulação da comunicação intercelular e aumento da resposta imunológica (FRASER; BRAMLEY, 2004; NIIZU, 2003). Já a zeaxantina e a luteína têm maior ação na prevenção da degeneração macular relacionada à idade (FRASER; BRAMLEY, 2004; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Dentre os alimentos que são fontes de carotenoides, destaca-se o milho, um dos cereais mais cultivados no Brasil (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2006) e em diversas regiões do mundo. No grão desse cereal estão presentes as xantofilas (luteína, β -criptoxantina e zeaxantina), que perfazem cerca de 90 % do total, além dos carotenos (β -caroteno e α -caroteno), encontrados em pequena concentração (JANICK-BUCKNER et al., 1999; KURILICH; JUVIK, 1999). Nos milhos normais, existem diferenças significativas na concentração de carotenoides totais (que varia de 0,0 a 68,0 $\mu\text{g g}^{-1}$), e de carotenos (que varia de 0,0 a 4,1 $\mu\text{g g}^{-1}$) (BERALDO et al., 2004; BLESSIN; BRECHER; DIMLER, 1963; QUACKENBUSH et al., 1963).

Neste contexto, pode-se afirmar que as xantofilas são prevalentes em tal cereal, sendo o milho enlatado, as farinhas e os cereais matinais à base de milho, boas fontes de zeaxantina. Por outro lado, os produtos preparados de milho, como pamonha, curau, polenta frita e cozida não contêm teores apreciáveis de carotenoides após processamento, existindo diferença significativa no teor de xantofilas entre diferentes marcas de milho enlatado, farinhas e cereais matinais à base de milho (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2006).

Durante o armazenamento e a manipulação, típicos do processamento da maior parte dos vegetais, os carotenoides são relativamente estáveis. O

congelamento gera poucas mudanças no seu conteúdo, no entanto, o branqueamento é conhecido por influenciar o conteúdo de carotenoides. Muitas vezes, os produtos vegetais branqueados exibem aumento aparente de conteúdo relativo dos carotenoides em tecidos crus. Essa diferença tem sido atribuída à inativação da lipoxigenase, a qual é conhecida por catalisar de modo indireto a decomposição oxidativa dos carotenoides. A perda de componentes solúveis para a água de branqueamento ou em tratamentos térmicos leves, tradicionalmente utilizados durante o branqueamento, pode aumentar a eficiência da extração do pigmento em relação ao tecido fresco. Além disso, a homogeneização física intensa e tratamentos térmicos também aumentam a extração e disponibilidade dos carotenoides (HET HOLF et al., 2000). Entretanto, dependendo da severidade do tratamento usado no processamento de alimentos, a degradação oxidativa pode ser induzida (GAMA; SILOS, 2007). Assim, a retenção de carotenoides é uma preocupação constante, e as atenções estão frequentemente focadas não somente no processo industrial, mas nas preparações caseiras que podem causar perdas, algumas vezes, em grande extensão (RODRIGUEZ-AMAYA; RODRIGUEZ; AMAYA-FARFANI, 2006).

Scott e Eldridge (2005) analisaram o efeito do processamento de dois cultivares de milho doce “WS” e “GWK” fresco, em lata e congelado para a composição de carotenoides, tendo encontrado para ambas as cultivares e tipos de processamento, a zeaxantina e a luteína como carotenoides principais, e em menor quantidade, α -, β - criptoxantina e α -, β -caroteno. Observou em adição, que o processamento não interferiu no perfil de carotenoides do milho doce, nas condições estudadas. Na cultivar WS, a zeaxantina correspondia a 80,3 % dos carotenoides e, na cultivar GWK, a luteína estava presente em menores quantidades, comprovando que a composição dos carotenoides nos alimentos é afetada pela cultivar.

Durante o armazenamento no prazo de validade de nove dias sob refrigeração a 5 °C, com incidência de luz diária de nove horas, em espigas de milho verde biofortificadas com precursores da vitamina A, minimamente processadas colhidas de uma coleção anterior ao do presente trabalho, apresentam redução na retenção de carotenoides totais a partir do sexto dia de armazenamento (BARBOSA et al., 2012).

Santana et al. (1998), analisando o índice de retenção de carotenoides totais em cenoura (*Daucus carota L.*) após o processamento obteve os seguintes resultados: 75,5% de retenção após o cozimento a vapor, e 60,13% após o cozimento com água sem pressão.

Em milho, a retenção de carotenoides após moagem e durante o armazenamento dos derivados (canjica, fubá e creme) as reduções podem chegar a 12,4% dos carotenoides pro-vitamina A na canjica (ao o 14º dia de armazenamento), 24,3% no fubá (ao sétimo dia de armazenamento) e de 19,4% no creme de milho armazenado por 10 dias (CÂNDIDO, 2010). Diante disso, o autor alerta para a necessidade de desenvolvimento de novos processos e o uso de embalagens especiais para promover o aumento da retenção de carotenoides de produtos de milho biofortificado a ser validado em programa de biofortificação. A determinação da retenção real dos carotenoides é essencial para o estabelecimento do volume de produto a ser consumido para alcance do efeito biológico esperado.

2.1.1 Carotenoides e vitamina A

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). Pode ser encontrada em produtos animais, mas algumas frutas e vegetais são boas fontes de pró-vitamina

A (DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 2000). Em países de baixa renda per capita, 82% da vitamina A ingerida resulta do consumo de alimentos de origem vegetal, portanto, na forma de pró-vitamina A (BERG et al., 2000).

Essa vitamina é um nutriente essencial para muitos processos metabólicos, como a diferenciação celular, a visão, a integridade do sistema imunológico e a manutenção e renovação de epitélios, sendo de especial importância durante o crescimento e desenvolvimento humano (UNDERWOOD, 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1996). Assim, a importância do adequado estado nutricional da vitamina A para saúde humana é incontestável, uma vez que ela possui papel fisiológico muito diversificado (MCLAREN; FRIGG, 1999).

A recomendação diária de ingestão de frutas e vegetal é de cinco ou mais porções, o que é suficiente para fornecer de 3 a 6 mg/dia de β -caroteno (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000). Vale ressaltar que os agentes precursores da vitamina A (Figura 2) encontrados em alimentos de origem vegetal fazem parte do grupo conhecido de carotenoides. Estes agentes são considerados como vitamina em potencial, mas não o são na realidade, sendo precursores do retinol, que pode ser biologicamente transformada em vitamina A (Figura 3) (MCLAREN; FRIGG, 1999).

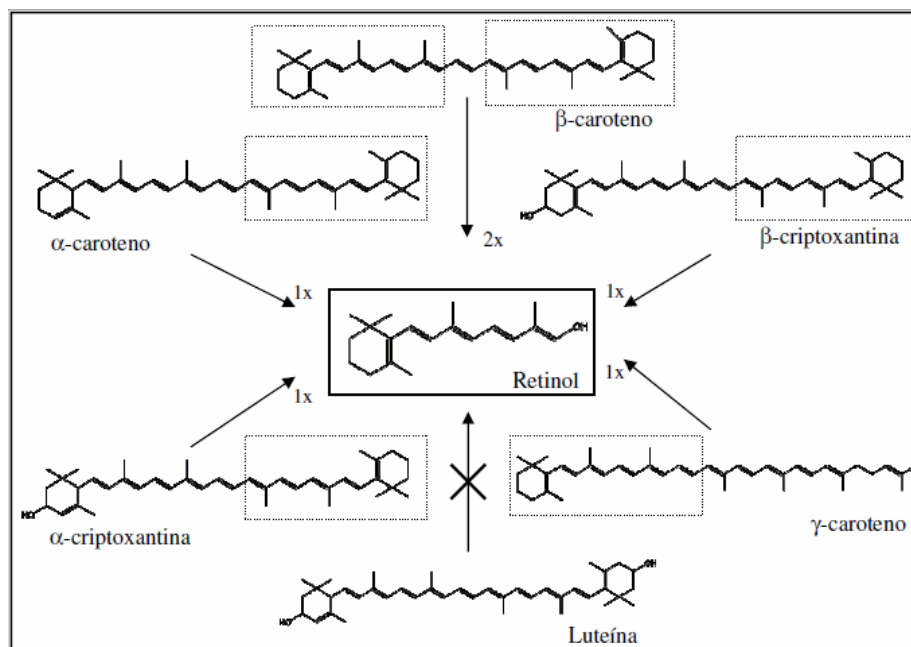


Figura 3 Estruturas dos carotenoides precursores de vitamina A

Fonte: Pacheco (2009)

A síntese da vitamina A dá-se por meio da ação da enzima β -caroteno 15-15'-dioxigenase, que em mamíferos tem sua máxima atividade na mucosa intestinal. O retinol então formado é absorvido juntamente com o retinol pré-formado ingerido pela dieta. Uma molécula de β -caroteno enzimaticamente quebrada forma duas moléculas de retinol (SCOTT; RODRIGUEZ-AMAYA, 2000). Sendo assim, o β -caroteno apresenta 100% da atividade biológica de vitamina A (retinol) pelo fato de sua molécula originar duas moléculas de retinol. Outros carotenoides como o α -caroteno e a β -criptoxantina, também, podem desempenhar essa função, mas dão origem a apenas uma molécula de vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

2.1.2 Deficiência de vitamina A e a importância dos carotenoides na saúde humana

A deficiência de vitamina A pode ser definida como baixas concentrações de retinol no plasma, que resulta na diminuição da visão em crianças e adultos em muitas partes do mundo, tornando a principal causa da cegueira adquirida na infância (WHO, 2002). Crianças abaixo dos cinco anos de idade e mulheres em idade reprodutiva estão no grupo de mais elevado risco desta deficiência e de suas consequências adversas à saúde. É notável também que a sua deficiência aumenta consideravelmente o risco de doenças e mortes por infecções comuns na infância, como diarreias e sarampo (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS, 2013).

Por mais de três décadas, a deficiência de vitamina A ou hipovitaminose 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 socioeconômicas (ALURU et al., 2010). Atualmente, no Brasil, 20% das crianças menores de dois anos apresentam hipovitaminose A, problema decorrente da alimentação inadequada (BRASIL, 2013). O governo reconhece como áreas de risco de desenvolvimento de deficiência de vitamina A, as regiões Norte, Nordeste do país e dos vales do Jequitinhonha e Mucuri, em Minas Gerais (BRASIL, 2012).

Os carotenoides são extremamente importantes também na prevenção da degeneração macular relacionada à idade (DMI). Tal degeneração representa uma patologia degenerativa que se caracteriza pelo aparecimento de mudanças estruturais no epitélio pigmentar da retina e o crescimento anormal de vasos

sanguíneos na zona macular. A zona macular é uma área da retina central responsável pela visão das cores e pela visão detalhada que temos dos objetos. Segundo o Conselho Brasileiro de Oftalmologia, cerca de 10% da população entre 65 e 74 anos sofre de degeneração macular. Esse número tende a subir para 25% em pacientes acima dos 75 anos. Quanto mais avançada à idade, maior a incidência (BERNARDO, 2012).

A luteína e a zeaxantina funcionam como uma espécie de óculos de sol naturais, protegendo a mácula dos raios mais nocivos. A mácula, uma das regiões mais nobres dos olhos, está situada no centro da retina e é responsável pela visão central. Nela encontra-se presentes quantidades abundantes de luteína e zeaxantina. Porém, nos pacientes com degeneração macular, a concentração de tais carotenoides é bastante reduzida (LANDRUM et al., 1999).

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. No entanto, 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 (BONE et al., 2003).

2.1.3 Degradação dos carotenoides

2.1.3.1 Oxidação

A oxidação é a principal causa da degradação de carotenoides em alimentos. Estes compostos são facilmente oxidados em função do grande número de duplas ligações conjugadas. No tecido intacto, os pigmentos estão protegidos da oxidação, entretanto, danos físicos ao tecido ou sua extração aumentam a suscetibilidade desses compostos à oxidação. Os carotenoides

podem sofrer oxidação na presença de luz, calor e compostos pró-oxidantes. Em função de sua estrutura insaturada e conjugada, os produtos de sua degradação são muito complexos. Uma autooxidação intensa irá resultar na quebra dos pigmentos de descoloração (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

A principal causa de perdas de carotenoides durante a análise é a degradação oxidativa. A oxidação natural de carotenoides depende da sua estrutura. Ao final da oxidação, ocorre perda total da cor e da atividade biológica, pois podem ser formados apocarotenoides, por exemplo. Na degradação do β -caroteno são formados B-apo-12'-carotenal, b-apo-carotenal e b-apo-8'-carotenal (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

2.1.3.2 Isomerização

Agentes como a luz, calor, oxigênio, ácidos, e enzimas, como a lipoxigenase, provocam a alteração nos carotenoides, resultando na perda da atividade pró-vitamina A, redução da cor, formação de isômeros *cis*, epóxidos, e quebra da cadeia com formação de apocarotenoides (carotenoides de menos de 40 átomos de carbono) (COSTA; FLORES; PENTEADO, 2001; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004).

Termodinamicamente, os isômeros *cis* são menos estáveis que a forma *trans*. A maior parte dos carotenoides, portanto, ocorrem na natureza predominantemente e inteiramente na forma *todo-trans* (BRITTON; YOUNG, 2004). Com o processamento de alimentos como: a cocção, a desidratação e a trituração os *trans* carotenos podem converter-se em *cis* carotenos. O isômero *cis* é mais polar, conseqüentemente, menos solúvel em óleo e solventes hidrocarbonados, e também se cristaliza menos. No alimento, o isômero *cis* aumenta com o processamento térmico, mas ao ser consumido na dieta, o

intestino converte a forma *cis* para a forma *todo-trans*, sendo essa mais absorvida (ROCK et al., 1998).

O isômero *cis* tem menor atividade pró-vitáminica A que a forma *trans*, sendo, portanto, muito importante evitar a formação do isômero *cis* durante o processamento de alimentos ricos em carotenoides (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004).

Os carotenoides com maior atividade biológica são aqueles que contêm todas as duplas ligações na forma de isômeros *trans*, que se transformam parcialmente na forma *cis* durante tratamentos térmicos e esterização de produtos enlatados. É necessária à adição de antioxidantes e a exclusão do oxigênio para diminuir as perdas dos carotenoides por isomerização durante o processamento e a estocagem dos alimentos (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004).

2.1.3.3 pH

Os carotenoides são estáveis na faixa de pH da maioria dos alimentos (pH 3,0 a 7,0) (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). No entanto, alguns carotenoides não são relativamente resistentes a valores extremos de pH (ácidos e álcalis), podendo sofrer isomerização *cis/trans* de certas duplas ligações. Isto ocorre principalmente na manipulação em laboratórios com fins analíticos. Por exemplo, algumas xantofilas são instáveis em meio alcalino e os epóxi-carotenoides são instáveis em meio ácido (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004).

2.2 Milho

O milho *Zea mays* L. é uma planta pertencente à família das Gramineae/Poaceae (MAGALHÃES et al., 2002). Consumido pelos povos americanos desde o ano 5.000 a.C., esse cereal constituiu alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos. Os Maias, os Astecas e os Incas reverenciavam o cereal na arte e na religião, estando grande parte de suas atividades diárias ligadas ao seu cultivo. Com a descoberta da América e as grandes navegações do século XVI, a cultura do milho se expandiu para outras partes do mundo. Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo e do arroz (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO - ABIMILHO, 2013).

Na América Latina e África, o milho é o alimento preferido de mais de 1,2 bilhões de consumidores, constituindo a base da alimentação de populações em áreas extremamente pobres onde faltam proteínas, vitaminas e minerais importantes na dieta (LOZANO-ALEJO et al., 2007). Partes comestíveis de sementes ou grãos são usadas para preparar refeições que normalmente contêm baixos teores de micronutrientes com baixa biodisponibilidade (ORTIZ-MONASTERI et al., 2007).

O grão de milho é classificado botanicamente como uma cariopse, apresentando basicamente três partes anatômicas: o pericarpo, o endosperma e o embrião, conforme apresentado na Figura 4. O pericarpo, a camada fina e resistente, constitui a parede externa da semente, é rico em fibras e representa 5% do peso do grão. O endosperma, a parte mais volumosa, 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; JOHNSTON; TAYLOR; HAMPL, 2000). A composição dos produtos derivados do milho, portanto, depende de quais partes do grão estes produtos incluem (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2006).

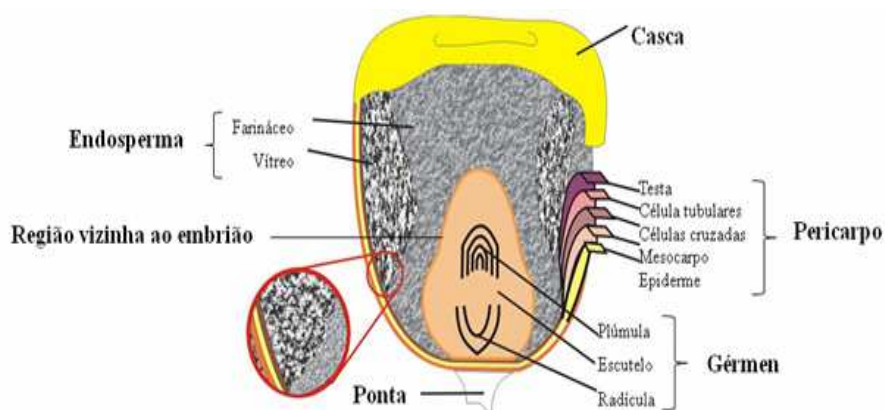


Figura 4 Anatomia do grão de milho

Fonte: Adaptado de Encyclopaedia Britannica (2006)

Todas as cultivares de milho amarelo contém carotenoides, embora a fração de carotenoides com atividade de pró-vitamina A (β -criptoxantina, α - e β -carotenos), ou seja, que são convertidos em retinol são tipicamente pequenos comparados às xantofilas, zeaxantina e luteína (BRENNAN; BERVALDO, 2004; TANUMIHARDJO, 2006). As xantofilas, luteína e zeaxantina, se encontram em maior concentração no grão (90%) enquanto o β -caroteno perfaz a menor concentração (5%) (CABUELA, 1971). Em trabalho realizado, para seleção de germoplasmas para biofortificação, foram encontrados conteúdos 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). Sendo a média para milho normal igual a ($4,5 \mu\text{g g}^{-1}$) (PAES; SANT'ANA; CÂNDIDO, 2011).

A 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 e a retenção real leva em consideração a mudança de peso da amostra, durante o processo (LI et al., 2007).

2.2.1 Milho Verde

O milho é um alimento muito versátil podendo ser empregado como grão ou hortaliça, na preparação de diversos alimentos. O brasileiro, em especial, aprecia o milho verde sendo consumido como espiga cozida ou utilizado na elaboração de pratos típicos, como cural e pamonha. Pode ser oferecida também na forma de conservas ou in natura atendendo, mercados com características diferentes.

Nutricionalmente, o milho verde é um excelente alimento e, pela sua composição, pode ser consumido por todas as pessoas e em qualquer idade. Possui cerca de 1.290 calorias por kg; 3,3% de proteínas; 27,8% de glicídios e somente 0,8% de gordura (MORAIS, 2012). Já em milho seco a composição é de 72% de amido, 9,5 de proteína, 4% de lipídeos, 9% de fibra, 3 a 6% de minerais (PAES, 2008). Em virtude de seu valor nutricional, o mercado consumidor de milho verde tem se tornado cada vez mais exigente com relação à qualidade do produto. Para tanto, características como aparência, sanidade, concentração de amido, polissacarídeos solúveis em água, açúcares redutores e sacarose, são comumente usadas para descrever a qualidade do milho verde *in*

natura. Tais características variam de acordo com o tipo de semente, condições climáticas e estágio de maturação (MARCOS et al., 1999).

O grão de milho leitoso compreende o estágio caracterizado pela aparência amarela do grão, e por conter no seu interior um fluido de cor leitosa, que representa o início da transformação dos açúcares em amido. Esses açúcares são oriundos da translocação dos fotoassimilados presentes nas folhas e no colmo para a espiga e nos grãos em formação. Contudo é iniciada normalmente de 12 a 15 dias após a polinização (MAGALHÃES; DURÃES, 2003).

2.3 Biofortificação

A biofortificação consiste no desenvolvimento de variedades melhoradas que apresentem conteúdo aumentado de minerais e vitaminas (WHITE; BROADLEY, 2005). Trata-se da produção de alimentos a partir do melhoramento convencional de plantas da mesma espécie que, com o uso de tecnologia agrícola, são selecionadas e cruzadas até que variedades com maiores teores de micronutrientes sejam obtidas.

Esse trabalho é feito por alianças de instituições de pesquisa e de entidades executoras que desempenham papel fundamental no combate à desnutrição, por meio da inserção de novas e enriquecidas variedades de sementes dos principais alimentos consumidos pela população de baixa renda. No Brasil, as atividades do programa de biofortificação são coordenadas pela EMBRAPA. Participam da Rede de Biofortificação várias unidades da EMBRAPA, além de parceiros nacionais e internacionais (NUTTI, 2008).

O programa de biofortificação tem seu foco em três micronutrientes reconhecidos pela WHO (World Health Organization) como mundialmente limitantes na dieta humana: ferro, zinco e vitamina A (HARVEST PLUS, 2011). A proposta da iniciativa internacional de biofortificação de alimentos,

atualmente em andamento, envolve a biofortificação de seis alimentos que demonstraram viabilidade completa e são consumidos pela maioria das populações pobres da África, Ásia e América Latina, sendo arroz, trigo, milho, mandioca, batata doce e feijão (INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE - CIAT, 2002). No Brasil a biofortificação é uma das estratégias do Governo Federal no combate à desnutrição. Em nível internacional, o programa é coordenado pelo CIAT, com sede em Cali, na Colômbia. Os principais financiadores do programa são a Fundação Bill e Melinda Gates e o Banco Mundial (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2012).

Atualmente, o principal componente do HarvestPlus no Brasil é o Projeto de Biofortificação de Produtos Agrícolas para a Nutrição Humana. O programa teve início em 2004, 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 β -caroteno, ferro e zinco. As variedades com os maiores teores de micronutrientes são selecionadas para formar a base para o desenvolvimento das cultivares comercial a serem oferecidas para plantio pelos produtores (EMBRAPA, 2012).

Grandes avanços foram alcançados nesses anos de projeto com caracterização de linhagens elite e cultivares comerciais de milho, além de identificação de processos mais adequados para a obtenção de sementes, apresentando distinto perfil de carotenoides e metodologias rápidas para sua determinação e disponibilidade de minerais em grãos de milho. Por meio do melhoramento, já foi possível obter milho 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 et al., 2011).

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, 2010.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. D. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H. **Análise de carotenoides em alimentos brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massas**. 2003. 246 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BARBOSA, N. A. et al. Retenção de carotenoides durante o armazenamento de espigas de milho verde biofortificado com precursores da vitamina A. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindoia. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA, 2012. 1 CD-ROM.

BERALDO, N. et al. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, London, v. 5, n. 3, p. 393-398, Sept. 2004.

BERG, H. van den 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.

BERNARDO, A. **Degeneração macular relacionada com a idade**. Disponível em: <<http://revistavivasaude.uol.com.br/saude-nutricao/75/artigo142248-1.asp>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

BLESSIN, C. W.; BRECHER, J. D.; DIMLER, R. J. Carotenoids of corn and sorghum: 5., distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow dent corn. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 40, p. 582-586, 1963.

BONE, R. A. et al. Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 28-40, Jan. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Alimentação adequada pode reduzir mortes de crianças**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4910/162/alimentacao-adequada-pode-reduzir-mortes-de-criancas.html>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

_____. **Início da campanha de atualização da caderneta de vacinação e suplementação da vitamina A**. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/6678/162/inicio-da-campanha-de-atualizacao-da-caderneta-de-vacinacao--e-suplementacao-da-vitamina-a.html>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

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

BRITTON, G.; YOUNG, A. J. Methods for isolation and analysis of carotenoids. In: _____. **Carotenoids in photosynthesis**. London: Chapman & Hallcap, 2004. p. 409-455.

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.

CABUELA, I. Contribution to the study of carotenoids metabolism in the maize grain in Eucarpia. In: EUROPEAN ASSOCIATION RESISTANCE PLANT BREEDING, 5., 1971, Budapest. **Proceedings...** Budapest: Akademiai Kiado, 1971. p. 85-91.

CÂNDIDO, B. D. V. **Retenção de carotenoides após moagem de milho biofortificado e durante o armazenamento dos derivados**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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, fev. 2009.

CARDOSO, W. S. **Variabilidade de genótipos quanto à composição de carotenóides nos grãos visando a biofortificação**. 2007. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

COSTA, M. A. L. da; FLORES, C. I. O.; PENTEADO, M. de V. C. Interação dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do β -caroteno na bioconversão desses em vitamina A. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 19-25, jan./abr. 2001.

DESENVOLVENDO produtos agrícolas mais nutritivos. Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/pdfs/brochurepo.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <<http://www.embrapa.org.br>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Ultimate reference suite**. São Paulo, 2006. 1 CD-ROM.

FONTANA, J. D. et al. Carotenoides cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 13, p. 40-45, mar./abr. 2008.

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

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

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

GOODWIN, T. W. The comparative biochemistry of carotenoids. In: **Biochemistry**. London: Chapman & Hall, 1952. p. 207-256.

HARVEST PLUS. **Biofortification frequently asked questions**. Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/about.html>>. Acesso em: 19 jun. 2011.

HET HOLF, K. H. van et al. Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. **Journal Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 1198-1196, 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington: National Academy, 2000. 529 p.

INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE. Cali, 2002. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/pdf/biotech_2002_1_1.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2012.

JANICK-BUCKNER, D. et al. Biochemical and ultra-structural analysis of the y10 mutant of maize. **Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 5, p. 507-513, June 1999.

JOHNSTON, C. S.; TAYLOR, C. A.; HAMPL, J. S. More Americans are eating "5 a day" but intakes of dark green and cruciferous vegetables remain low. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 3063-3067, Dec. 2000.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 5, p. 1948-1955, Apr. 1999.

LANDRUM, J. T. et al. Carotenoids in the human retina. **Pure and Applied Food Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 12, p. 37-44, July 1999.

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

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

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Aspectos fisiológicos para o consumo como milho-verde. In: PEREIRA FILHO, I. A. (Ed.). **O cultivo do milho-verde**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. p. 49-66.

MAGALHÃES, P. C. et al. Caracterização morfológica de milho de diferentes ciclos. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 20., 2002, Goiânia. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA, 2002. 1 CD-ROM.

MARCOS, S. K. et al. Influência do resfriamento do ambiente de armazenamento e da embalagem sobre o comportamento pós-colheita do milho verde. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 41-44, jan./abr. 1999.

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.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latino americanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 2, p. 149-155, jun. 2004.

MORAES, A. R. A. **A cultura do milho verde**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/tecnologias/milhoverde/milhoverde>>. Acesso em: 12 out. 2012.

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. A. **Biofortificação como ferramenta para combate a deficiências em micronutrientes**. Brasília: CPRM, 2008. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/geo_med7.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2012.

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.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Evaluating the public health significance of micronutrient malnutrition**. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/GFF_Part_2_en.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2013.

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.

PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenoides por cromatografia líquida**. 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2008. v. 1, 61 p.

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>. Acesso em: 19 jun. 2011.

PAES, M. C. D.; SANT'ANA, R. C. O.; CÂNDIDO, B. D. V. **Milho biofortificado**. Viçosa, MG: UFV, 2011. 211 p.

QUACKENBUSH, F. W. et al. Carotenoid, oil, and tocopherol content of corn inbreds. **Cereal Chemistry**, London, v. 40, p. 250-259, 1963.

RAO, A. V.; RAO, L. G. A. V. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: E. Blucher, 2004. 157 p.

ROCK, C. L. et al. Bioavailability of β -Carotene is lower in raw than in processed carrots and Spinach in Women. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p. 913-916, 1998.

_____. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 96, n. 7, p. 693-702, 1996.

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: 12 jan. 2013.

_____. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrient Analysis**, Essex, v. 5, n. 1, p. 191-225, 1989.

_____. **Guide to carotenoid analysis in food**. Washington: ILSI, 2001. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2). Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/sites/default/files/tech02.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

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

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.

SCOTT, C. E.; ELDRIDGE, A. L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 18, n. 6, p. 551-559, Sept. 2005.

SCOTT, K. J.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents: fact or fiction? **Food Chemistry**, London, v. 69, n. 2, p. 125-127, May 2000.

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.

UNDERWOOD, B. A. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 59, p. 517s-524s, 1994. Supplement.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes**. Geneva, 1996. 66 p. (Micronutrient Series, 10).

_____. **The world health report: childhood and maternal undernutrition**. Geneva, 2002. Disponível em:
<<http://www.int/whr/2002/chapter4/en/index4/en/index3.html>>. Acesso em: 29 jun. 2011.

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.

CAPÍTULO 2 Retenção de carotenoides em grãos de milho verde após o processamento mínimo e a estocagem de espigas em condições de comercialização a varejo

RESUMO

Os carotenoides são compostos naturais de propriedades expressivas. Porém, notória é a sua instabilidade na presença e/ou disponibilidade de oxigênio, luz, calor, metais, enzimas e peróxidos. Sabe-se que o armazenamento em longo prazo de produtos alimentícios processados pode causar alterações na sua composição química durante o processamento e/ou armazenamento. Essas alterações podem acarretar prejuízos do ponto de vista nutricional, principalmente em se tratando de carotenoides. Sendo assim, com o presente trabalho objetivou-se determinar a retenção de carotenoides em grãos de milho verde normal e biofortificado com precursores de vitamina A em espigas minimamente processadas embaladas em bandeja de poliestireno com cobertura de filme comercial e embalagem nylon poli multicamadas ao longo do período de estocagem do produto. Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos e quantificados por CLAE. O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de três fatores (cultivar, embalagem e tempo de armazenamento). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste LSD ($p=0,05$), quando detectado significância do teste de F. Espigas de milho verde das cultivares BRS1030 e proVA apresentaram semelhança no perfil de carotenoides nos grãos, sendo zeaxantina o principal carotenoide presente nesses materiais. Entretanto, maiores concentrações dos carotenoides luteína, β -criptoxantina, β -caroteno, carotenoides totais e do total de carotenoides precursores de vitamina foram identificadas nos grãos do sintético proVA quando comparado a cultivar BRS1030. A retenção de carotenoides em grãos verdes de milho durante o período de estocagem das espigas minimamente processadas não foi influenciada pelos tipos de embalagens estudadas. Após o processamento mínimo e a estocagem do produto, a retenção dos carotenoides estudados independe da cultivar, exceto para os carotenoides luteína e zeaxantina. Os efeitos estudados não influenciaram a retenção de carotenoides β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides proVA nos grãos verdes de milho das espigas. Independente do tipo de embalagem e da cultivar, ocorre aumento de zeaxantina em grãos de milho verdes em espiga após a estocagem.

Palavras-chave: Embalagem. Armazenamento. Biofortificação. Cromatografia.

**Carotenoid retention in corn grains after minimum processing and stocking
of corn ears in retail commercializing conditions**

ABSTRACT

Carotenoids are natural compounds with expressive properties. However, its instability in the presence and/or availability of oxygen, light, heat, metal, enzymes and peroxides is notorious. It is known that long term storage of processed food products may cause alterations in its chemical composition during processing and/or storage. These alterations may lead to nutritional loss, especially in regard to carotenoids. Thus, the present work aimed at determining carotenoid retention in normal and biofortified with vitamin A precursors corn grains in minimally processed corn ears packaged in polyethylene tray with commercial film and nylon poly multilayer package along the storage period of the product. The carotenoids were extracted from the samples in a sequential scheme of organic solvents and quantified by HPLC. The experiment was planned in a completely randomized block design, in a factorial scheme with three factors (cultivar, packaging and time of storage). The obtained data were submitted to analysis of variance (ANOVA), and the means compared by the LSD test ($p = 0.05$), when significance was detected by the F test. Corn ears of cultivars BRS1030 and proVA presented similar carotenoid profile in the grains, with zeaxanthin as the main carotenoid present in these materials. However, higher concentrations of carotenoids lutein, β -cryptoxanthin, β -carotene, total carotenoids and total vitamin precursor carotenoids were identified in the grains of the synthetic proVA when compared to cultivar BRS1030. Carotenoid retention in corn grains during the minimally processed corn ear storage period was not influenced by the types of packaging studied. After minimum processing and storage of the product, we observed that the retention of the studied carotenoids is independent of the cultivar, except for carotenoids lutein and zeaxanthin. The studied effects did not influence the retention of carotenoids β -carotene, total carotenoids and proVA carotenoids in the corn grains. Independent of the type of packaging and of the cultivar, there is an increase in zeaxanthin in grains in the corn ear after storage.

Keywords: Package. Storage. Biofortification. Chromatography.

1 INTRODUÇÃO

A propriedade dos carotenoides de absorver luz na região visível e, portanto, apresentar cor, deve-se ao sistema de duplas ligações conjugadas presente em suas estruturas, que também se relaciona às outras importantes funções/ações biológicas atribuídas aos carotenoides, como atividade pro-vitamínica A e antioxidante, importantes para a saúde humana. No entanto, a estrutura altamente insaturada, torna-os bastante susceptíveis à degradação.

Nos alimentos *in natura*, os carotenoides encontram-se naturalmente protegidos pela complexa estrutura do tecido vegetal, mas o rompimento da estrutura celular dos alimentos durante as operações como descascamento corte e/ou desintegração, aumentam a área superficial e, por conseguinte, à exposição dos carotenoides ao oxigênio, bem como os colocam em contato com enzimas oxidativas e os expõem à luz, dando início a uma série de reações de degradação: isomerização, oxidação e epoxidação. Portanto, 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 focadas, não somente no processo industrial, mas também nas preparações caseiras que podem, também, causar perdas em grande extensão dos derivados desses materiais biofortificados (GAMA; SILOS, 2007). Por outro lado, o processamento tem demonstrado efeito positivo sobre a biodisponibilidade dos carotenoides por quebrar a estrutura das células e desnaturar proteínas complexadas com os pigmentos, facilitando, então, a liberação desses compostos da matriz das células vegetais (SAUNDERS et al., 2000). Logo, 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 pode aumentar ou diminuir conforme o tempo, a

temperatura, o tamanho e a desintegração das partículas do alimento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). A retenção dos carotenoides pró-vitâmicos, durante a estocagem, é favorecida pela baixa temperatura, proteção da luz, exclusão do 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 retenção de carotenoides após o processamento mínimo e a estocagem do milho verde é essencial, uma vez que representa forma usual de consumo deste produto. Diante do exposto, o objetivo com o presente trabalho foi determinar a retenção de carotenoides em espigas de milho verde normal e biofortificado com precursores de vitamina A minimamente processadas embaladas em bandejas de poliestireno com cobertura de filme comercial (PVC 18 mm) e a vácuo (embalagem nylon poli multicamadas) ao longo do período de estocagem do produto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

O cultivo do milho foi conduzido na área experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, em condições controladas de manejo de solo, adubação, irrigação e de controle de pragas e doenças. A colheita foi realizada nas primeiras horas da manhã, sendo o milho colhido no ponto em que os grãos apresentavam em estágio “leitoso” (aproximadamente 110 dias após o plantio), conhecido como “ponto de milho verde”. As espigas empalhadas foram acondicionadas e transportadas para o laboratório, onde foi realizado o processamento mínimo. Foram utilizadas para o estudo duas cultivares de milho, sendo essas o sintético proVA cultivar experimental biofortificada com precursores de vitamina A, e a cultivar comercial BRS 1030.

2.2 Processamento mínimo

O processamento mínimo das espigas de milho verde das duas cultivares foi realizado imediatamente após a chegada das espigas no laboratório. Esse foi conduzido adotando-se as condições higiênicas necessárias das bancadas e utensílios, que foram previamente lavados com detergente Alconox (apropriado para lavagem de vidrarias de laboratório) e sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200 mg L⁻¹. Os manipuladores usaram máscaras, toucas, jalecos e luvas descartáveis, sempre higienizando as mãos com etanol 70% (v/v) e/ou com a solução de hipoclorito de sódio a 200 mg L⁻¹. As espigas foram processadas seguindo o fluxograma da Figura 1, segundo o qual, primeiramente, realizou-se uma pré-lavagem das espigas com água corrente, seguida de seleção,

onde foram eliminadas aquelas mal granadas, atacadas por insetos ou com comprimento inferior a 15 cm.

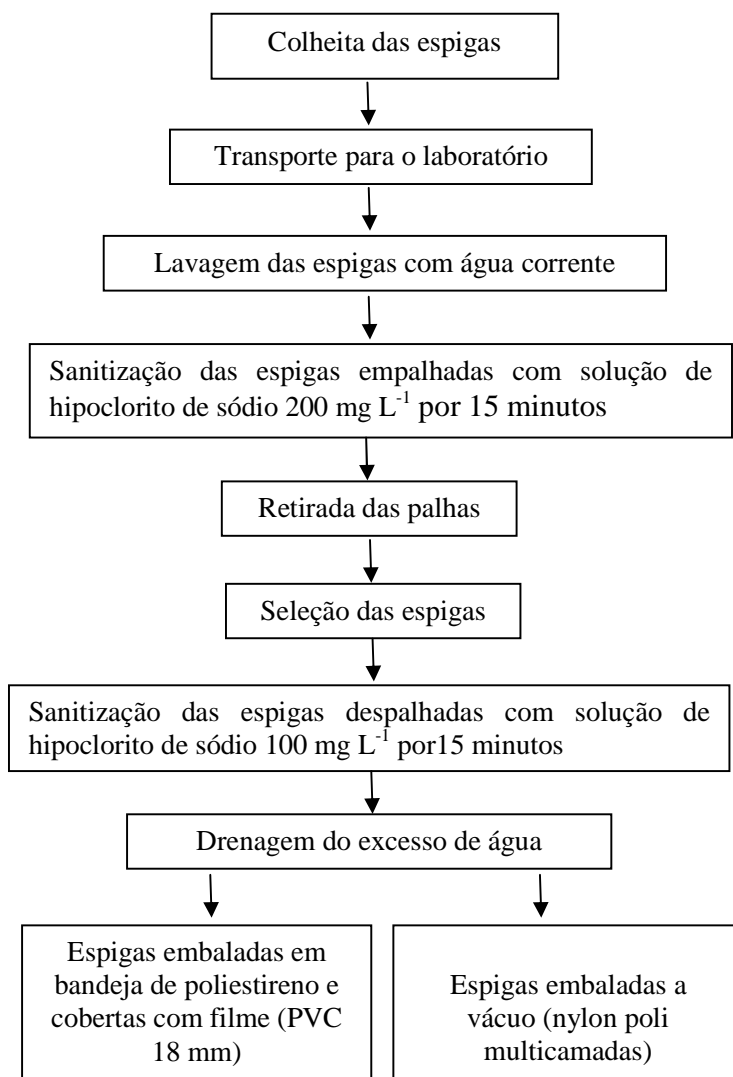


Figura 1 Fluxograma do processamento mínimo de milho verde utilizado no experimento de retenção de carotenoides ao longo do tempo de armazenamento

Após a primeira lavagem, as espigas ainda com palha foram sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio 2% (10 mL para 50 L de água) por 15 minutos. Em seguida, as espigas foram despalhadas. Nesta etapa, promoveu-se nova seleção das espigas retirando-se aquelas mal granadas e atacadas por lagartas que, porventura, não foram detectadas na etapa anterior. As espigas não eliminadas foram novamente sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio 2% (5 mL hipoclorito de sódio 2% para 50 L de água) por 15 minutos. Para a retirada do excesso de água, as espigas foram dispostas, logo após, em bandejas plásticas sanitizadas, sendo essas cobertas com papel toalha e mantidas em bancada, em temperatura de 20 °C.

Para cada cultivar foram preparadas 12 bandejas de poliestireno e 12 embalagens de nylon poli multicamadas, contendo três espigas (unidade experimental), sendo três unidades de embalagem (triplicatas) por cultivar avaliadas aos dias 0, 3, 6 e 9 pós-colheita.

Foram utilizadas como embalagem das espigas: a) bandejas de poliestireno, com dimensões de 23,5 cm de comprimento x 18,2 cm de largura, envoltas com filme policloreto de vinila (PVC) de 18 mm de espessura (Figura 2) e b) embalagem nylon poli multicamadas (tamanho 20x25 cm), da marca TecMaq, própria para embalagem de alimentos (Figura 3). Foi utilizada a seladora a vácuo modelo TM 150 para a selagem das embalagens a vácuo. As espigas de milho verdes devidamente embaladas foram armazenadas em BOD com temperatura fixa em 5 °C com luz por 9 horas diárias, durante um período de nove dias. Os produtos foram distribuídos aleatoriamente na BOD. Para as determinações de retenção de carotenoides, as espigas foram debulhadas em debulhador automático da marca Mecapau (modelo D 032) e os grãos quarteados e triturados em moinho de café marca Toastmaster grinder (modelo 1119) por 20 segundos. A análise de retenção de carotenoides foi realizada nos dias 3, 6 e 9 de armazenamento.



Figura 2 Imagem das espigas de milho verde acondicionadas em bandejas de poliestireno, envoltas com filme PVC 18 mm de espessura



Figura 3 Imagem das espigas de milho verde acondicionadas em embalagem a vácuo de nylon poli multicamadas

2.3 Determinação do perfil de carotenoides

Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos, conforme protocolo descrito por Kurilich e Juvik (1999) com modificações. A sequência do processo de extração é descrita a seguir.

Em balança analítica (marca GEHAKA AG200), pesou-se 0,6 gramas da amostra, triturada em moinho de café, em duplicata, e transferiu-se para tubos de ensaio de capacidade de 25 mL com tampa rosqueável. Adicionou-se ao tubo 7 mL de etanol grau HPLC (marca Vetec) com 0,1% de BHT (2,6-Di-ter-buthyl-4-methylphenol) (marca Sigma) e agitou-se em vortex (M S1 Minishaker IKA) por 10 segundos. Os tubos foram dispostos em banho maria (marca Precision Scientific modelo 66722) a 85 °C por 5 minutos (a tampa dos tubos foram levemente rosqueados para evitar explosão do vidro). Logo após, os tubos foram removidos do banho maria e adicionados aos mesmos 2 mL de etanol grau HPLC com 0,1% de BHT e 500 µl de solução de 80% KOH (hidróxido de potássio) (marca Merck), agitando os tubos em vortex durante 10 segundos. Retornou-se os tubos para o banho maria a 85 °C por outros 5 minutos. Agitaram-se os tubos em vortex e retornou para o banho maria durante 5 minutos. Removeram-se os tubos do banho, transferindo-os para o banho de gelo, seguido de adição de 4 mL de água deionizada gelada aos tubos, deixando-os permanecer no gelo durante 2 minutos após a adição. Em seguida foram adicionados 7 mL de hexano grau HPLC (marca Vetec), agitando o conteúdo usando vortex. Os tubos foram centrifugados a 1200x g por 60 segundos em centrífuga da marca Jouan, modelo B4i 1-800-621-2454. Após centrifugação, procedeu-se à coleta da fase superior contendo hexano e carotenoides com pipeta Pasteur de vidro, transferindo-a para tubos de ensaio limpos, cobertos com alumínio e devidamente identificados. Os três últimos passos foram repetidos juntando as fases contendo carotenoides coletadas da primeira à última

extração. As extrações com hexano foram repetidas até que a camada superior ficasse bem clara, ou seja, até que todo o carotenoide fosse extraído (aproximadamente por 5 vezes). Logo após foram adicionados 2 mL de água deionizada a cada tudo contendo o extrato de carotenoides. A adição da água foi feita cuidadosamente na parede do tubo a fim de evitar a formação de emulsão entre as fases. Os tubos foram mantidos em repouso para que houvesse a separação das fases aquosa e não aquosa. Coletou-se a fase superior do tubo com auxílio de pipeta pasteur, transferindo-a para tubos limpos de fundo cônico. Os carotenoides remanescentes na camada aquosa foram extraídos outras duas vezes usando 2 mL de hexano, e combinando com a camada não aquosa obtida de cada extração com a primeira. Os extratos foram então, secos em evaporador rotativo marca Buchi (modelo R-144) acoplado com banho maria (Waterbath B-480, Switzerland) com temperatura entre 25 e 30 °C. Logo após foi realizada a troca de atmosfera na superfície do extrato com N₂ gasoso (cilindro de nitrogênio - Nitrogênio comprimido 6,0 – 5,0 ECD Analítico - 4,6 FID Emissão) e armazenado em geladeira até a ressuspensão para injeção no cromatógrafo.

Os carotenoides foram quantificados em técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido Alliance Waters, modelo e 2695, equipado com coluna polimérica YMC C 30 (3 μm, 4,6 x 250 mm, Waters, Milford, MA, USA) e acoplado a detector de arranjo de diodo (modelo 2998 Waters). O gradiente de eluição foi conduzido a 0,8 mL.min⁻¹ em condições de gradiente 80:20 a 20:80 de metanol: éter metil *tert*-butil em 16 minutos, seguido por constante de 80:20 em 4 minutos, finalizando com 6 minutos de equilíbrio. A temperatura de forno utilizada foi de 30 °C, comprimento de onda 450 nm e volume de injeção de 40 μL. A temperatura do laboratório foi mantida a 20 °C durante todo o processo. Para identificação dos compostos foram utilizados padrões purificados a partir de cenoura (α -caroteno 94,64% de pureza), mamão formosa (β -criptoxantina 92,72% de pureza),

seguindo protocolo descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Os padrões dos carotenoides luteína (Lutein 40 mg, Vision Health) (98,68% de pureza) zeaxantina (Swanson, ZeaGold zeaxanthin 4 mg (from paprika (97,99% de pureza)) e β -caroteno (Beta Carotene (vitamina A) 25,000 IU Supplement, Swanson SW007 (94,57% pureza)) foram obtidos de cápsulas da marca Swanson, sendo cada caroteno de sua respectiva capsula. Os resultados da análise de carotenoides foram expressos em base fresca.

A concentração de carotenoides totais (CT) foi obtida pela soma dos valores totais de todas as frações quantificadas sendo: total de luteína, total de zeaxantina, total de β -criptoxantina, total de α -caroteno e total de β -caroteno, como descrito por Cândido (2010).

A concentração de carotenoides com atividade pró-vitamínica A (proVA) foram obtidos por meio da seguinte fórmula: total β -caroteno + $\frac{1}{2}$ total de α -caroteno + $\frac{1}{2}$ do total de β -criptoxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$), como descrito por Cândido (2010). O percentual de retenção aparente foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Murphy, Criner e Gray (1975) para cada variável estudada. Esse cálculo é baseado nas características químicas inerentes a cada uma dessas moléculas. Aquelas estruturas químicas que possuem pelo menos um anel β -ionona e uma cadeia de onze carbonos apresentam atividade pró-vitamínica A. A estrutura molecular do β -caroteno é formada por dois anéis β -ionona que darão origem a duas moléculas de retinol sendo, portanto, atribuída a esse carotenoide 100% de atividade pró-vitamínica. Em menor extensão, a β -criptoxantina e o α -caroteno apresentam cerca de 50% de atividade por apresentarem em suas estruturas químicas apenas um anel β -ionona. Os isômeros *cis* não foram quantificados, uma vez que não apresentam atividade biológica significativa. O percentual de retenção aparente 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 Determinação de umidade das amostras

As amostras foram analisadas quanto ao teor de umidade, sendo utilizadas na análise 2g da amostra trituradas e temperatura de secagem de 60 °C com tempo de secagem de 72 horas, em estufa modelo 1350FX (marca SL Shel Lab). O cálculo de umidade foi realizado de acordo com o método 44- 15, da American Association of Cereal Chemists - AACC (2000), sendo:

$$\% \text{ umidade} = \frac{((\text{massa capsula} + \text{massa amostra fresca}) - (\text{massa capsula} + \text{massa amostra seca}))}{\text{massa amostra integral}}$$

2.5 Delineamento experimental

O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de três fatores cultivar, embalagem e período de armazenamento (dias). Sendo dezesseis tratamentos (T1 =sintético proVA/embalagem a vácuo tempo 0; T2 =sintético proVA/embalagem a vácuo tempo 3; T3 =sintético proVA/embalagem a vácuo tempo 6; T4 =sintético proVA/embalagem a vácuo tempo 9; T5=sintético proVA/embalagem em bandejas tempo 0; T6=sintético proVA/embalagem em bandejas tempo 3; T7=sintético proVA/embalagem em bandejas tempo 6; T8=sintético proVA/embalagem em bandejas tempo 9; T9 =BRS1030/ embalagem à vácuo tempo 0; T10=BRS1030/ embalagem a vácuo tempo 3; T11=BRS1030/ embalagem à vácuo tempo 6; T12=BRS1030/ embalagem à vácuo tempo 9; T13 =BRS1030/ embalagem em bandejas tempo 0; T14 =BRS1030/ embalagem em bandejas tempo 3; T15 =BRS1030/ embalagem em bandejas tempo 6; T16

=BRS1030/ embalagem em bandejas tempo 9) e 3 repetições para cada dia de avaliação, sendo esses aos dias 0, 3, 6 e 9 de armazenamento.

A unidade experimental foi constituída por uma embalagem com três espigas de milho verde. Foram avaliados no estudo os cultivares BRS1030 e o sintético proVA. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (Build. 77) (FERREIRA, 2000).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste LSD ($p=0,05$), quando detectado significancia para o teste de F.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média dos carotenoides estudados nos grãos verdes de milho diferiu significativamente entre as cultivares. Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) da fração quantificada de luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides precursores da vitamina A, obtidas para os grãos verdes das espigas de milho minimamente processadas antes do armazenamento.

O teor médio de carotenoides em grãos verdes das espigas de milho no tempo zero expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso fresco) foi considerado como 100% para o estudo da retenção aparente.

Tabela 1 Concentração de carotenoides em base fresca expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ da fração quantificada nas amostras de grãos de milho verde de espigas minimamente processadas de a cultivar normal e biofortificada

Carotenoides	¹ Concentração de carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	BRS 1030	proVA
Luteína	1,03±0,28 ^b	1,88±0,52 ^a
Zeaxantina	8,38±1,60 ^a	9,26±2,00 ^a
β -criptoxantina	1,36±0,22 ^b	2,95±0,94 ^a
β -caroteno	0,71±0,16 ^b	1,86±0,58 ^a
Carotenoides totais	11,47±2,01 ^b	15,96±3,23 ^a
Carotenoides proVA	1,38±0,22 ^b	3,33±0,94 ^a

¹Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)

DP: Desvio padrão

Os grãos de milho verde da cultivar proVA apresentaram concentrações de carotenoides maiores que aquelas da cultivar BRS1030 ($p < 0,05$), exceto para a variável zeaxantina ($p > 0,05$).

A concentração média dos carotenoides totais dos grãos de milho verde da cultivar biofortificada proVA, além de ser maior do que da cultivar BRS1030, apresenta-se superior quando comparados aos de outras cultivares comerciais de milho QPM brasileiras de grão amarelo como a Assum Preto ($11,7 \mu\text{g g}^{-1}$) e a BR 473 ($9,17 \mu\text{g g}^{-1}$), estudados por Kimura, Rodriguez-Amaya e Nestel (2007). Vale ressaltar que os grãos estudados no presente trabalho são grãos frescos enquanto os estudados no trabalho citado são grãos secos.

Cândido (2010) encontrou valores médios de carotenoides totais iguais a $34,49 \mu\text{g g}^{-1}$, em grãos de milho seco sintético também biofortificado com pró- vitamina A em outro ciclo de desenvolvimento e maturação fisiológica. Este valor foi superior ao encontrado no milho verde também biofortificado com pró- vitamina A, estudado no presente trabalho. Isto pode ser justificado por motivo da interrupção da síntese de carotenoides logo após a colheita e consequentemente o processamento mínimo. Lembrando que as espigas foram colhidas no estágio leitoso, sendo este o ponto ideal para colheita de milho verde, difere do trabalho citado, uma vez que este foi analisado em grãos secos.

Aumento de carotenogêse com maturação ou amadurecimento foi documentada em *Momordica charantia* (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 1976) pimenta vermelha (RAHMAN; BUCKLE, 1980), manga badami (JOHN; SUBBARAYAN; CAMA, 1970). Segundo Rodriguez-Amaya (2001), o único fator que decisivamente aumenta o teor de carotenoides é a maturidade do alimento ou da planta quando colhida e oferecida para o consumo.

A umidade seria outro fator que poderia ter influenciado, os grãos secos apresentam em média 13% de umidade (NUNES, 2013), enquanto os grãos

úmidos entre 70 a 80% de umidade (OLIVEIRA, 2008). Pois em grãos secos os carotenoides poderiam supostamente, estarem mais concentrados.

Segundo Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), a biossíntese dos carotenoides pode continuar após a colheita aumentando o teor de carotenoides em frutas, hortaliças, tubérculos, porém desde que o material seja mantido totalmente intacto, preservando o sistema enzimático responsável pela caracterogênese. Porém, o processamento mínimo, mesmo que ocorra com todos os cuidados recomendados, ainda assim, não mantém o material totalmente intacto após a colheita. Segundo Moretti (2004), o processamento mínimo consiste na aplicação de operações tais como seleção, lavagem, sanitização, descasque e corte, seguidos de centrifugação, embalagem e refrigeração, fornecendo alimentos de qualidade, conveniência e frescor.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da análise de variância para as variáveis estudadas. Para a variável luteína, foi detectado efeito significativo ($p < 0,05$) da interação do fator cultivar x dias ao longo do armazenamento. O efeito dessa interação não foi significativo ($p > 0,05$) para as variáveis zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, carotenoides total e carotenoides proVA. Porém, foi identificada significância do fator dias para a variável zeaxantina e do fator cultivar para a variável β -criptoxantina.

Após o desdobramento, foi aplicada análise de regressão para o fator dias dentro das cultivares. A concentração de α -caroteno foi abaixo do nível de detecção da curva, portanto, não foi aplicado o teste estatístico para os resultados obtidos da análise para essa variável.

Tabela 2 Síntese do resultado da análise de variância (ANOVA) do efeito dos tratamentos sobre as variáveis estudadas

FV	GL	Quadrado médio						
		Luteína	Zeaxantina	β-criptoxantina	β-caroteno	Carotenoides totais	Carotenoides proVA	Umidade
Cultivar	1	202,66 ^{ns}	0,39 ^{ns}	4541,38*	2709,16 ^{ns}	11,77 ^{ns}	0,69 ^{ns}	108,18*
Embalagem	1	1326,89 ^{ns}	6,19 ^{ns}	1317,86 ^{ns}	624,17 ^{ns}	254,52 ^{ns}	995,54 ^{ns}	7,29*
Dias	3	1636,70 ^{ns}	1895,17*	422,21 ^{ns}	523,77 ^{ns}	1154,83 ^{ns}	281,79 ^{ns}	260,39*
Cultivar x embalagem	1	236,34 ^{ns}	239,59 ^{ns}	4,52 ^{ns}	260,45 ^{ns}	16,21 ^{ns}	67,21 ^{ns}	42,45*
Cultivar x dias	3	2000,89*	209,93 ^{ns}	931,94 ^{ns}	1065,99 ^{ns}	280,11 ^{ns}	16,81 ^{ns}	1,33*
Embalagem x dias	3	888,62 ^{ns}	89,14 ^{ns}	213,79 ^{ns}	465,85 ^{ns}	141,98 ^{ns}	286,36 ^{ns}	0,24 ^{ns}
Cultivar x embalagem x dias	3	183,75 ^{ns}	591,26 ^{ns}	784,67 ^{ns}	1253,39 ^{ns}	303,69 ^{ns}	916,27 ^{ns}	3,28*

* significativo a 5% de probabilidade (p<0,05) ns não significativo

Independente do tipo de embalagem, no 3º dia de armazenamento os grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030 apresentaram retenção aparente de luteína igual a 67,92%, enquanto que em grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintética proVA a retenção foi igual a 105,67%, não apresentando perda aparente de luteína nesse período. Entretanto ao 9º dia de armazenamento, os grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030 foram os que apresentaram maior retenção aparente de luteína (124,07%), o qual foi significativamente superior ao da cultivar sintético proVA, com diferença de 26% a mais na retenção.

Na Figura 4 é apresentado o modelo polinomial de 2º grau, da variação da retenção de luteína durante o período de armazenamento dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030.

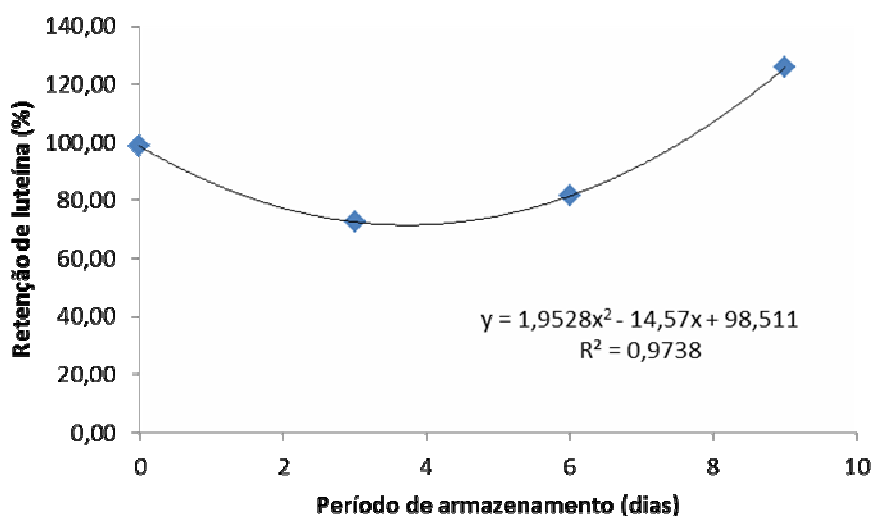


Figura 4 Variação da retenção aparente (%) de luteína, durante o armazenamento das cultivares de milho verde a 5 °C com luz por 9 h/dia

Para o sintético proVA o índice de retenção encontrado no 9º dia foi de 98,97%. Os dados não se ajustaram ao modelo de regressão definido para este cultivar, porém, a retenção estimada no final do período avaliado está próxima a 100% sugerindo que as perdas são inexpressivas para este cultivar durante o período de armazenamento.

Ao desdobrar a interação cultivar x dias de armazenamento e analisarmos dias de armazenamento dentro de cultivar, percebe-se variação significativa da retenção de luteína ao decorrer do armazenamento em grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030, mas não em grãos verdes das espigas de milho da cultivar proVA. No último dia de armazenamento os grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030 apresentaram a maior média de retenção. Possivelmente ocorreu perda de luteína nos grãos verdes das espigas de milho desta cultivar como pode ser verificado nos dias 3 e 6, porém a perda de umidade (Tabela 3) favoreceu a concentração de luteína no final do armazenamento. Sendo assim, o aumento de retenção de luteína observada nos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030, superior ao encontrado em grãos verdes das espigas de milho da cultivar proVA, possivelmente ocorreu em função da concentração de componentes da matriz, resultado da perda de umidade no final do armazenamento. Já os grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintética proVA não apresentaram diferença significativa na retenção de luteína entre os dias de armazenamento após o desdobramento da interação, revelando que para esta cultivar a retenção se manteve constante, ao decorrer do armazenamento.

Durante o período de armazenamento houve redução significativa de umidade (Tabela 3) o que revela a maior concentração de carotenoides em decorrência da perda de massa.

Tabela 3 Médias da perda de massa (%) dos grãos verdes das espigas das diferentes cultivares de milho armazenadas em bandeja e a vácuo, nos diferentes dias de armazenamento

Período de armazenamento	¹ Perda de massa (%)			
	BRS1030		proVA	
	Bandeja	Vácuo	Bandeja	Vácuo
0	72,79±0,16 ^{Aa}	72,79±0,16 ^{Aa}	75,67±1,08 ^{Aa}	74,29±0,38 ^{Ab}
3	66,06±0,67 ^{Ba}	66,50±0,18 ^{Ba}	70,47±0,86 ^{Ba}	67,64±0,02 ^{Bb}
6	62,91±0,44 ^{Cb}	64,61±0,30 ^{Ca}	68,22±0,10 ^{Ca}	65,54±0,24 ^{Cb}
9	59,93±0,63 ^{Db}	62,61±0,40 ^{Da}	66,87±0,53 ^{Da}	63,11±0,91 ^{Db}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, dentro do fator cultivar, não diferem entre si pelo Teste t (LSD), com nível de significância de 5%. DP: Desvio padrão

Os grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030 bem como os grãos verdes das espigas de milho da cultivar proVA, apresentam redução de umidade ao longo do período de estocagem do produto, independente da embalagem. Aos dias 0 e 3 de armazenamento, os grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030 não apresentam diferença na percentagem de umidade para os armazenamentos das espigas em bandeja e a vácuo. Já aos dias 6 e 9 a maior média de umidade é observada nos grãos verdes das espigas armazenadas a vácuo. Entretanto, em grãos verdes das espigas de milho da cultivar proVA a umidade é maior em todos os dias do armazenamento em bandeja.

O efeito do processamento mínimo e a estocagem durante cinco dias à temperatura de 5-7 °C em couve propiciaram a redução na retenção de luteína (27%), violaxantina (20%) e neoxantina (31%), e perdas ainda maiores de β-

caroteno. A perda maior foi do dia 0 para o dia 1, não havendo alteração do dia 1 até o dia 5 (AZEVEDO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005).

A retenção de zeaxantina nos grãos verdes das espigas de milho minimamente processadas armazenadas durante nove dias apresentou aumento significativo ao final do período (dia 9), independente da embalagem utilizada. Esse resultado evidencia como relatado anteriormente para a luteína, possível aumento de concentração desse carotenoide em função da perda de umidade (Tabela 3).

Na Tabela 4 são apresentados os valores médios da retenção de zeaxantina nos diferentes dias de armazenamento.

Tabela 4 Médias da retenção aparente de zeaxantina (%) para grãos verdes das espigas de milho minimamente processadas durante os nove dias de armazenamento

Dias de armazenamento	¹ Retenção aparente de zeaxantina (%)
0	100,00 ^b
3	95,86±11,34 ^b
6	93,03±15,50 ^b
9	120,77±17,40 ^a

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade (p<0,05)
DP: Desvio padrão

Na Figura 5 é apresentado o modelo polinomial de 2º grau da variação da retenção de zeaxantina durante o período de armazenamento.

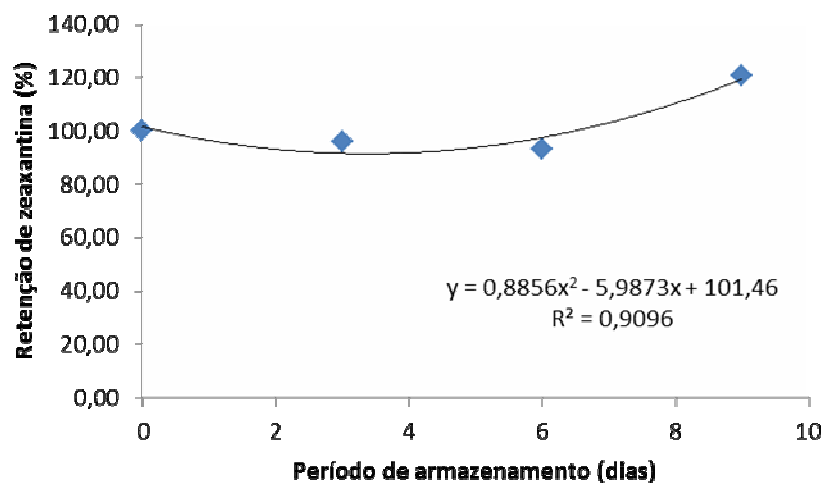


Figura 5 Retenção de zeaxantina dos grãos verdes das espigas de milho minimamente processadas no período de armazenamento

A retenção aparente de β -criptoxantina diferiu significativamente entre os grãos verdes das espigas de milho para as duas cultivares. Os grãos verdes da cultivar proVA apresentaram menor média de retenção de β -criptoxantina, com diferença de 19,46% a menos comparada aos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030. Na Tabela 5 são apresentadas as médias da retenção aparente de β -criptoxantina dos grãos verdes das espigas de milho das diferentes cultivares estudadas.

Tabela 5 Médias da retenção aparente de β -criptoxantina (%) para os grãos verdes das espigas de milho das cultivares BRS1030 e proVA

Cultivares	¹ Retenção aparente de β -criptoxantina (%)
BRS 1030	109,22 \pm 4,70 ^a
proVA	89,76 \pm 4,70 ^b

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade (p<0,05)

DP: Desvio padrão

Para as demais variáveis o processamento mínimo não interferiu na retenção para todos os fatores e suas respectivas interações (Tabela 2). Sendo assim não houve diferença significativa na retenção aparente dos carotenoides β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides proVA, independente dos grãos verdes das espigas das cultivares de milho e da embalagem ao longo do armazenamento. Embora, os dados das análises indicassem aumento na retenção de carotenoides, este aumento não foi estatisticamente considerado significativo. Todavia, o resultado estatístico permite identificar maior estabilidade destes carotenoides no produto estudado, nas condições aplicadas no processamento e armazenamento do estudo. Essas condições, especialmente a temperatura de 5 °C e o curto período de armazenamento podem ter contribuído para preservação destes carotenoides na matriz. As médias dos resultados estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 Médias de retenção aparente (%) da fração quantificadas de β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides próVA após processamento mínimo das espigas de milho armazenadas por 9 dias

	Retenção de carotenoides (%)		
	β -caroteno	Carotenoides totais	Carotenoides pró-vitamínicos
Média mínima	85,93	79,90	81,16
Média máxima	122,24	127,90	129,47
Média geral	106,53	100,86	101,62
CV	3,22	4,56	3,64

Cinquenta carotenoides possuem atividade provitamina A, sendo o mais importante precursor o β -caroteno (OLSON, 1987). Os outros são o α -caroteno e β -criptoxantina, pois apresentam pelo menos um anel ionona no final de sua estrutura (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004).

O processamento e a estocagem dos alimentos podem alterar significativamente a composição qualitativa e quantitativa dos carotenoides (CAVALCANTE, 1991; CAVALCANTE; RODRIGUEZ-AMAYA, 1995). Contudo, a retenção dos carotenoides pró-vitamínicos durante a estocagem de alimentos processados é favorecida pela baixa temperatura, proteção da luz, e antioxidantes, presentes naturalmente ou adicionados como meio de preservação do alimento (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

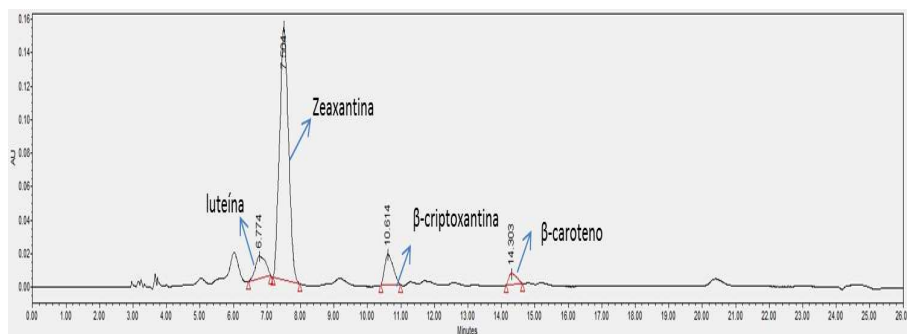
Trabalhos prévios relatam que, reduzindo-se o tempo de processamento e a temperatura, e o tempo entre o descascamento, o corte ou a desintegração e o processamento, a retenção pode melhorar significativamente. Dessa forma, processamento com baixa temperatura em menor tempo é uma boa alternativa para se preservar os carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993).

Hussein et al. (2000), estudando o efeito de duas embalagens (*squeeze* e a vácuo) na retenção de β -caroteno em brócolis minimamente processado e

armazenado durante o período de varejo para este produto (10 dias), percebeu que não há diferença significativa entre as embalagens. O mesmo aconteceu no presente estudo. O tipo de embalagem (poliestireno e nylon poli multicamadas) não influenciou na retenção de nenhuma das variáveis estudadas, independente da cultivar.

Nas Figuras 6, 7, 8 e 9 são apresentados os cromatogramas dos carotenoides da cultivar BRS 1030 e da cultivar sintética proVA resultante do processamento mínimo e armazenamento. Sugere-se concentração de carotenoides quando ocorrido, uma vez que não houve mudança no perfil cromatográfico como ilustra as Figuras 6, 7, 7 e 9.

A



B

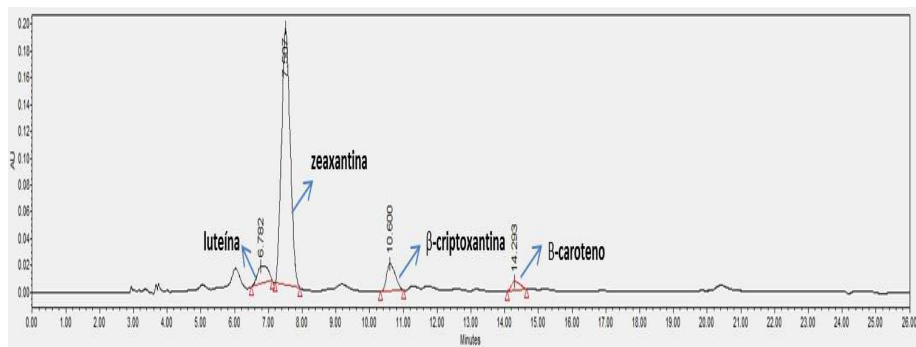
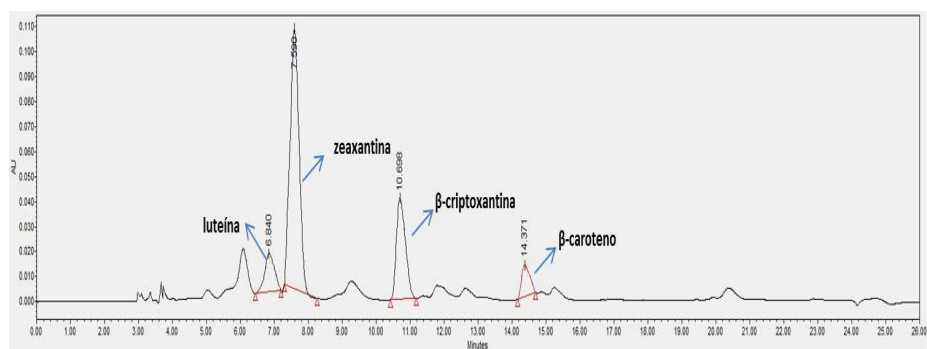


Figura 6 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde da cultivar BRS1030 obtidas das espigas armazenadas em bandeja de poli estireno recoberta com filme policloreto de vinila (18 mm) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B).

A



B

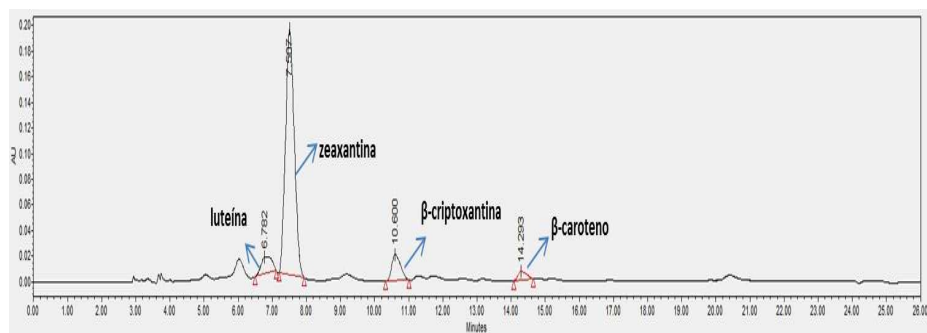
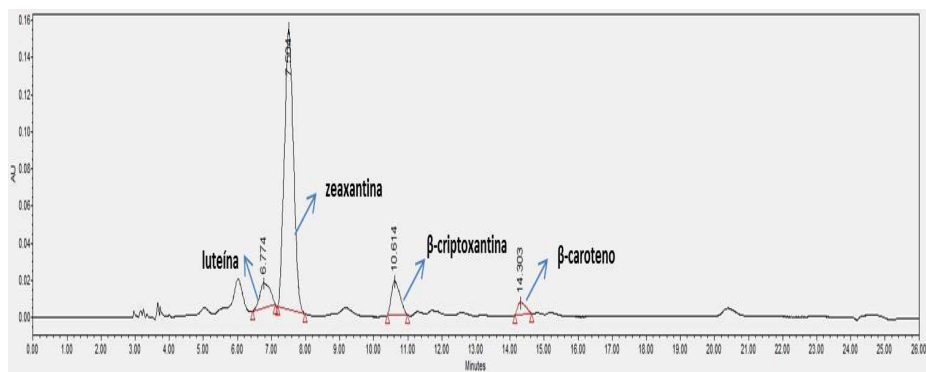


Figura 7 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde da cultivar sintética proVA obtidas das espigas armazenadas em bandeja de poliestireno recoberta com filme policloreto de vinila (18mm) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B)

A



B

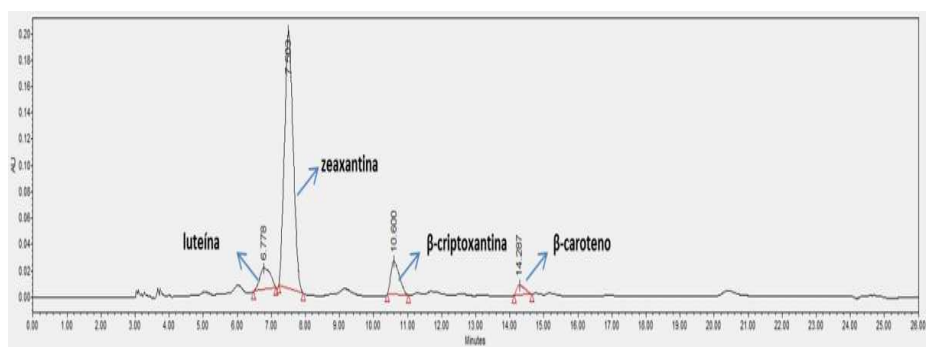
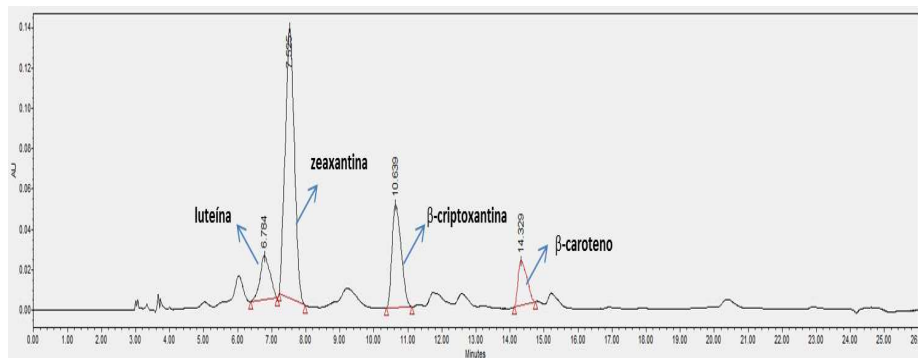


Figura 8 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde da cultivar BRS1030 obtidas das espigas armazenadas em vácuo (nylon poli multicamadas) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B)

A



B

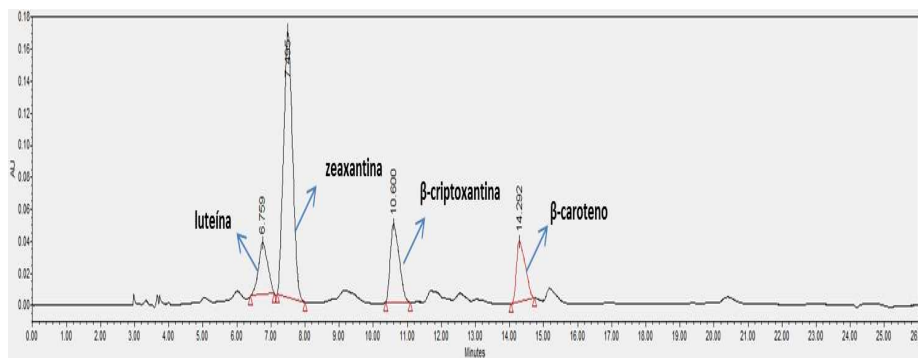


Figura 9 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras de grãos de milho verde do sintético proVA obtidas das espigas armazenadas em vácuo (nylon poli multicamadas) ao dia 0 de armazenamento (A) e ao dia 9 de armazenamento (B)

4 CONCLUSÃO

- a) Os grãos verdes das cultivares de milho BRS1030 e a sintética proVA apresentam semelhança no perfil de carotenoides, sendo zeaxantina o principal carotenoide presente nos grãos verdes desses materiais.
- b) As concentrações dos carotenoides luteína, β -criptoxantina, β -caroteno, carotenoides totais e o total de carotenoides precursores de vitamina A presentes nos grãos verdes do milho sintético proVA são maiores do que na cultivar de milho BRS1030.
- c) A retenção aparente de carotenoides em espigas de milho normal de a cultivar BRS1030 e biofortificada com precursores de vitamina A, não é influenciada pelo tipo de embalagem.
- d) O processamento mínimo e o armazenamento das espigas de milho verde normal e biofortificada com precursores de vitamina A, no período de armazenamento de nove dias não afetam a retenção aparente dos carotenoides β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides proVA.
- e) Independente da cultivar e da embalagem, ocorre redução de umidade durante o período de 9 dias de armazenamento.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods**. 10th ed. Saint Paul, 2000. 1200 p.

AZEVEDO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing: a guide to carotenoid analysis in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 22, p. 591-597, Nov. 2005.

CAVALCANTE, M. L. **Composição de carotenoides e valor de vitamina A em pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e acerola (*Malpighia glabra* L.)**. 1991. 86 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.

CAVALCANTE, M. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Alteration of the carotenoid composition during manufacture and storage of frozen *Eugenia uniflora* fruit. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 9., 1995, Budapest. **Proceedings...** Budapest: WCFST, 1995. 1 CD-ROM.

CÂNDIDO, B. D. V. **Retenção de carotenoides após moagem de milho biofortificado e durante o armazenamento dos derivados**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

FERREIRA, D. F. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/dff02.htm>>. Acesso em: 3 jul. 2012.

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

HUSSEIN, A. et al. Effects of processing and packaging on vitamin C and b-carotene content of ready-to-use (RTU) vegetables. **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 2, p. 131-136, Jan. 2000.

JOHN, J.; SUBBARAYAN, C.; CAMA, H. R. Carotenoids in 3 stages of ripening of mango. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 35, n. 3, p. 262-265, May 1970.

KIMURA, M. K. C. N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweet potato, 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**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1948-1955, Apr. 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.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 2, p. 149-155, jun. 2004.

MORETTI, C. L. Panorama do processamento mínimo de hortaliças. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MÍNIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 3., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2004. p. 1-8.

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.

NUNES, J. L. S. **Cultura do milho**. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/colheita.aspx>>. Acesso em: 7 mar. 2013.

OLIVEIRA, M. S. **Aptidão de genótipos para produção de milho verde**. 2008. 27 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

OLSON, J. A. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 45, p. 704-716, 1987.

RAHMAN, F. M. M.; BUCKLE, K. A. Pigment changes in capsicum cultivars during maturation and ripening. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 241-249, June 1980.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin carotenoids in prepared, processed, and stored foods**. Washington: USAID, 1997. 93 p.

_____. **Guide to carotenoid analysis in food**. Washington: ILSI, 2001. 64 p.

_____. **Guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI, 1999. 64 p.

_____. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: CHATALAMBOUS, F. (Ed.). **Shelf life of foods and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects**. Amsterdam: Elsevier Science, 1993. p. 547-589.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. et al. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Annals of Botany**, London, v. 40, n. 3, p. 615-624, Mar. 1976.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: IFPRI; Cali: CIAT, 2004. 58 p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2). Disponível em: <<http://www.harvestplus.org/sites/default/files/tech02.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 100 p.

SAUNDERS, C. et al. Utilização de tabelas de composição de alimentos na avaliação do risco de hipovitaminose A. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 50, n. 3, sett. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.org.ve/>>. Acesso em: 28 dez. 2012.

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.

CAPITULO 3 Retenção de carotenoides em grãos de espigas de milho verde normal e biofortificado com precursores de vitamina a submetidos a diferentes tratamentos térmicos

RESUMO

A introdução de produtos agrícolas biofortificados com carotenoides precursores da vitamina A, como o milho, tem sido vista como uma forma complementar de programas intervencionistas já existentes para o combate à hipovitaminose A. Entretanto, a possibilidade de ocorrência de oxidação dos carotenoides, durante o processamento dos alimentos, faz com que a retenção desses compostos seja uma preocupação constante e as atenções estejam constantemente focadas não somente no processo industrial, mas também nas preparações caseiras. Sendo assim, o objetivo com o presente trabalho foi determinar a retenção de carotenoides em grãos verdes de milho normal BRS1030 e o sintético proVA submetidos a diferentes tratamentos térmicos. O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado em esquema fatorial constituído de três fatores (cultivar x tipo de cozimento x processamento). Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos e quantificados por CLAE. Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA, quando detectado significância as médias foram comparadas pelo teste LSD ($p=0,05$) utilizando o programa SISVAR. Grãos verdes da cultivar BRS1030 após cozimento no micro-ondas e panela de pressão apresentaram redução na concentração de β -caroteno, sendo as retenções iguais a 29,41% e 32,88% respectivamente. Para a cultivar proVA o processamento das espigas de milho verde no micro-ondas e panela com tampa resultou em redução de β -caroteno, sendo as retenções iguais à 44,65% e 58,54%, respectivamente. Independente da cultivar, ocorre redução na concentração de carotenoides precursores da vitamina A e carotenoides totais nos grãos verdes após o cozimento das espigas em micro-ondas e em panela de pressão. Ainda para a cultivar proVA ocorre perda na retenção de carotenoides totais após o processamento na panela com tampa. Para preservação dos carotenoides os melhores tratamentos, de acordo com as condições estudadas no presente trabalho são: cozimento na panela com tampa e panela sem tampa.

Palavras-chave: Milho cozido. Biofortificação. Cultivares de milho. Cromatografia. Oxidação de carotenóides. β -caroteno.

Carotenoid retention in normal and biofortified with vitamin A precursor grains of corn ears submitted to different thermal treatments

ABSTRACT

The introduction of agricultural products biofortified with vitamin A precursor carotenoids, such as corn, has been seen as a form to compliment the interventionist programs already existent to combat hypovitaminosis A. However, the possibility of occurring carotenoid oxidation during food processing makes of the retention of these compounds a constant preoccupation and the attentions are constantly focused on not only in the industrial process, but also in homemade preparations. Thus, the objective of this work was to determine carotenoid retention in normal BRS1030 and synthetic proVA corn grains submitted to different thermal treatments. The experiment was planned in a completely randomized block design in a factorial scheme with three factors (cultivar x type of cooking x processing). The carotenoids were extracted from the samples in a sequential scheme of organic solvents and quantified by HPLC. The obtained results were submitted to ANOVA and, when significance was detected, the means were compared by LSD ($p = 0.05$) using the SISVAR program. The concentration of β -carotene decreased in green grains of cultivar BRS1030 after cooking in a microwave and pressure cooker, with retentions of 29.41% and 32.88%, respectively. For cultivar proVA, the processing of the corn ears in the microwave and in a pan with lid resulted in reduction of β -carotene, with retentions of 44.65% and 58.54%, respectively. Independent of the cultivar, the concentration of vitamin A precursor carotenoids and total carotenoids in green grains decreased after cooking the corn ears in microwave and pressure cooker. We also observed, for this cultivar, the loss of total carotenoid retention after processing in a pan with lid. The best treatments for preserving carotenoid retention, according to the conditions studies in this work are: cooking in a pan with lid and in a pan without lid.

Keywords: Cooked corn. Biofortification. Corn cultivars. Chromatography. Carotenoid oxidation. β -carotene.

1 INTRODUÇÃO

A hipovitaminose A e a deficiência de ferro são ainda problemas nutricionais prevalentes nas populações brasileira e mundial para as quais esforços ainda são envidados na solução. O programa de desenvolvimento de milho biofortificado para minerais e carotenoides precursores de vitamina A (proVA), iniciado no ano 2004, é uma das estratégias para redução desses problemas (GUIMARÃES et al., 2005).

O milho biofortificado em desenvolvimento no programa de melhoramento nacional coordenado pela Embrapa e também no programa africano (Zâmbia) apresenta conteúdo aumentado dos carotenoides de importância reconhecida na saúde humana, especialmente aqueles que apresentam atividade biológica de provitamina A e as xantofilas presentes na composição da mácula ocular. Contudo, sabe-se que os carotenoides presentes nos alimentos apresentam instabilidade na presença de alta temperatura, luz, calor, ácido e oxigênio e podem, com o processamento dos alimentos, sofrer alterações na sua composição química ocasionando prejuízo do ponto de vista nutricional. Assim sendo, 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).

Embora cultivares de milho biofortificados estarão brevemente disponíveis para comercialização, alterações químicas e físicas decorrentes do processamento dos grãos verdes desses materiais ainda não foram determinadas. Assim, o presente estudo foi realizado tendo como o principal objetivo determinar a retenção de carotenoides em grãos de milho verde em espigas de

cultivares de milho normal e biofortificada com carotenoides precursores de vitamina A após serem submetidas a diferentes tratamentos térmicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

O cultivo do milho utilizado no experimento foi conduzido na área experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, em condições controladas de manejo de solo, adubação, irrigação e controle de pragas e doenças. Para o estudo foram utilizados a cultivar comercial BRS1030 (comum) e o sintético proVA (biofortificado com carotenoides precursores da vitamina A. A colheita das espigas foi realizada nas primeiras horas da manhã, sendo o milho colhido no ponto em que os grãos apresentavam fase leitosa (aproximadamente 110 dias após o plantio), conhecido como “ponto de milho verde”. As espigas empalhadas foram acondicionadas em caixas de poliestireno contendo gelo e transportadas, para o laboratório imediatamente após a colheita.

2.2 Higienização da amostra

A higienização das amostras utilizadas nos diferentes tratamentos térmicos foi idêntica às espigas do capítulo 2.

2.3 Processamento

Para o estudo do efeito do tratamento térmico na retenção de carotenoides nos grãos verdes das espigas de milho foram avaliados quatro diferentes tratamentos: 1) cozimento sem água em micro-ondas 2) cozimento em imersão na água com pressão 3) cozimento em imersão na água em panela com

tampa e 4) cozimento em imersão na água em panela sem tampa. Para cada tratamento foram preparadas 3 repetições, constituídas de 3 espigas cada.

2.3.1 Cozimento sem adição de água no micro-ondas

A cocção foi realizada em micro-ondas da marca Sharp (potência 1100 v). Para tanto, as espigas foram individualmente envolvidas por três vezes com filme PVC de espessura 18 mm, e dispostas no prato do micro-ondas, conforme ilustrado na Figura 1. A cocção foi realizada durante 7 minutos em potência máxima. As espigas de milho verde foram arrefecidas a temperatura ambiente de 22 °C durante 30 minutos sobre bandejas de poliestireno. Destes 30 minutos, as espigas foram mantidas envoltas em filme (PVC) durante 5 minutos após a cocção. A unidade experimental foi constituída de três espigas de milho, sendo o processamento realizado em três repetições.



Figura 1 Cozimento das espigas de milho verde no micro-ondas por 7 minutos em potência máxima

2.3.2 Cozimento em água com pressão

A cocção foi realizada em panela de pressão doméstica antiaderente da marca Marcolar, capacidade 10 L. Para tanto, as espigas foram imersas em 5 L de água deionizada na panela de pressão e submetidas ao calor em fogão industrial por 15 minutos contados a partir do início da emissão de vapor pela válvula. Em seguida, as espigas foram retiradas das águas de cozimento e arrefecidas a temperatura ambiente de 22 °C durante 30 minutos sobre bandejas de poliestireno. A unidade experimental foi constituída de três espigas de milho.



Figura 2 Cozimento das espigas de milho verde em panela de pressão

2.3.3 Cozimento em água em panela com tampa

O cozimento foi realizado por imersão das espigas em água fervente em panela de inox com tampa contendo 5 litros de água deionizada em ebulição (98 °C) por 30 minutos, contados a partir do início da fervura. Logo após o

cozimento, as espigas foram retiradas da água e transferidas a bandejas de poliestireno onde foram arrefecidas a temperatura ambiente (22 °C) durante 30 minutos antes da obtenção das amostras para análises. A unidade experimental foi constituída de uma panela com três espigas de milho, sendo realizado o processamento em três repetições.



Figura 3 Cozimento das espigas de milho verde em panela com tampa

2.3.4 Cozimento em água em panela sem tampa

O cozimento sem tampa foi realizado por imersão das espigas em panela de inox contendo 5 litros de água deionizada em ebulição (98 °C) por 30 minutos, contados a partir do início da fervura. Logo após o cozimento, as espigas foram retiradas da água e transferidas a bandejas de poliestireno para serem arrefecidas a temperatura ambiente durante 30 minutos. A unidade experimental foi constituída de uma panela com três espigas de milho, sendo o processamento realizado em 3 repetições.



Figura 4 Cozimento das espigas de milho verde em panela sem tampa

2.4 Preparo das amostras para análise

Para as análises de carotenoides e umidade, os grãos foram retirados da mesma espiga antes e após o processamento. Para tanto se identificou transversalmente três partes na espiga, recolhendo os grãos de uma fileira da região proximal, outra da região medial e ainda outra da porção distal das espigas (Figura 5) a fim de obter amostras homogêneas. Após o processamento, os grãos foram retirados de fileiras imediatamente abaixo daquelas que tiveram os grãos anteriormente retirados antes do processamento. As espigas foram pesadas antes e após o processamento a fim de proceder à correção quanto ao ganho ou perda de massa na avaliação de retenção de carotenoides.

As análises foram realizadas nos grãos *in natura* e cozidos.



Figura 5 Imagem das espigas onde foram retirados os grãos para análises químicas, mostrando em que parte foram obtidas as amostras

2.5 Determinação do perfil de carotenoides

Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos, conforme protocolo descrito por Kurilich e Juvik (1999) com modificações. A sequência do processo de extração esta descrita no capítulo 1 desta dissertação. A concentração de carotenoides totais (CT) foi obtida pela soma dos valores totais de todas as frações quantificadas sendo: luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno e β -caroteno, como descrito por Cândido (2010).

A concentração de carotenoides com atividade pró-vitâmica A (proVA) foi obtida por meio da seguinte fórmula: total β -caroteno + $\frac{1}{2}$ total de α -caroteno + $\frac{1}{2}$ do total de β -criptoxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$), como descrito em Cândido (2010). O percentual de retenção aparente foi calculado de acordo com a

fórmula proposta por Murphy, Criner e Gray (1975) para cada variável estudada. Esse cálculo é baseado nas características químicas inerentes a cada uma dessas moléculas. Aquelas estruturas químicas que possuem pelo menos um anel β -ionona e uma cadeia de onze carbonos apresentam atividade pró-vitáminica A. A estrutura molecular do β -caroteno é formada por dois anéis β -ionona que darão origem a duas moléculas de retinol sendo, portanto, atribuída a esse carotenoide 100% de atividade pró-vitáminica. Em menor extensão, o β -criptoxantina e o α -caroteno apresentam cerca de 50% de atividade por apresentarem em suas estruturas químicas apenas um anel β -ionona. Os isômeros *cis* não foram quantificados, uma vez que não apresentam atividade biológica significativa.

O percentual de retenção aparente foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Murphy, Criner e Gray (1975):

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

2.6 Determinação de umidade das amostras

As amostras foram analisadas quanto ao teor de umidade, sendo utilizadas na análise 2 g da amostra triturada e temperatura de secagem de 60 °C com tempo de secagem de 72 horas. O cálculo de umidade foi realizado de acordo com o método 44-15, da American Association of Cereal Chemists - AACC (2000).

2.7 Delineamento experimental

O experimento foi planejado em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em esquema fatorial constituído de três fatores cultivar x tipo de cozimento x processamento, sendo dezesseis tratamentos (T1 = sintético

proVA/antes do cozimento panela com tampa; T2=sintético proVA/após cozimento panela com tampa; T3=sintético proVA/antes do cozimento panela sem tampa; T4=sintético proVA/após cozimento panela sem tampa; T5=sintético proVA/antes do cozimento panela sem tampa; T6=sintético proVA/após cozimento panela sem tampa; T7=sintético proVA/antes do cozimento em micro-ondas; T8=sintético proVA/após cozimento em micro-ondas; T9=BRS1030/antes do cozimento panela com tampa; T10=BRS1030/após cozimento panela com tampa; T11=BRS1030/ antes do cozimento panela sem tampa; T12=BRS1030/ após cozimento panela sem tampa; T13=BRS1030/antes do cozimento panela de pressão; T14=BRS1030/após cozimento panela de pressão; T15=BRS1030/ antes do cozimento em micro-ondas; T16=BRS1030/ após cozimento em micro-ondas).

A unidade experimental foi constituída de três espigas de milho verde. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (Build. 77) (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cultivares apresentaram diferenças significativas para a concentração dos carotenoides nos grãos de espigas de milho verde. Na Tabela 1 são apresentados os teores médios em $\mu\text{g g}^{-1}$ quantificados de luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, carotenoides totais e carotenoides proVA para as cultivares de milho normal e proVA.

A concentração de carotenoides dos grãos verdes das espigas de milho expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso fresco) foi considerado como 100% para o estudo da retenção.

Tabela 1 Concentração de carotenoides expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ (base fresca) em grãos de espigas de milho verde normal e biofortificado

Carotenoides	¹ Concentração de carotenoides	
	BRS1030	proVA
Luteína	0,91±0,24 ^b	1,74±0,35 ^a
Zeaxantina	7,18±3,59 ^a	7,22±2,15 ^a
β -criptoxantina	1,12±0,59 ^b	2,22±0,67 ^a
β -caroteno	0,71±0,34 ^b	1,03±0,54 ^a
Carotenoides totais	9,91±4,62 ^b	12,20±3,37 ^a
Carotenoides proVA	1,27±0,62 ^b	2,13±0,79 ^a

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

DP: Desvio padrão

Na Tabela 2 são apresentados os valores do teste F da análise de variância para as variáveis estudadas. Significância foi identificada para a interação tipo de cozimento e processamento e a interação cultivar x processamento para a variável luteína. Para as variáveis zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno e carotenoides totais foram detectados efeitos significativos ($p < 0,05$) da interação dos fatores cultivar, tipo de cozimento e

processamento. Para a variável carotenoides proVA foi detectado efeito significativo na associação tipo de cozimento x processamento.

Tabela 2 Síntese do resultado da análise de variância (ANOVA) do efeito de cultivar, tipo de cozimento, processamento e sobre as variáveis estudadas

FV	GL	Quadrado médio						
		Luteína	Zeaxantina	β-criptoxantina	β-caroteno	Carotenoides totais	Carotenoides proVA	Umidade
Cultivar	1	5673,27*	17,27 ^{ns}	514,44*	98,70 ^{ns}	17,14 ^{ns}	442,26 ^{ns}	488,58*
Tipo de cozimento	3	2372,78*	6298,23*	5054,07*	3287,63*	4973,79*	4060,19*	276,16*
Processamento	1	329,18 ^{ns}	6722,99*	8660,74*	7402,57*	6553,42*	7454,57*	174,80*
Cultivar x Tipo de cozimento	3	17,76 ^{ns}	602,68*	1460,16*	1657,90*	711,96*	287,42 ^{ns}	36,09*
Cultivar x Processamento	1	5673,27*	17,23 ^{ns}	514,44*	98,70 ^{ns}	17,14 ^{ns}	442,26 ^{ns}	95,82*
Tipo de cozimento x processamento	3	2372,78*	6298,23*	5054,07*	3287,63*	04973,79*	4060,19*	180,16*
Cultivar x Tipo de cozimento x processamento	3	17,76 ^{ns}	602,68*	1460,16*	1657,90*	711,96*	287,42 ^{ns}	33,01*

* significativo a 5% de probabilidade (p<0,05) ns não significativo

Após o desdobramento da associação dos fatores cultivar e processamento aplicou-se o teste LSD a 5% de probabilidade. Observou-se diferença na resposta das cultivares submetidas aos tratamentos térmicos quanto à retenção de luteína em grãos de milho verde. Na Tabela 3 estão apresentadas as médias de retenção de luteína dos grãos verdes das cultivares estudadas antes e após o tratamento térmico.

Tabela 3 Médias de retenção real de luteína (%) dos grãos de milho verde das cultivares BRS1030 e proVA antes e após o processamento térmico

Cultivar	¹ Retenção real de luteína (%)	
	Processamento	
	Milho <i>in natura</i>	Milho Cozido
BRS 1030	100,00 ^{Aa}	83,49±12,72 ^{Ba}
proVA	100,00 ^{Ab}	126,98±14,65 ^{Aa}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade (p<0,05).

DP: Desvio padrão

Os grãos verdes das espigas de milho normal não apresentaram redução de luteína após o processamento. Todavia, a cultivar proVA apresentou aumento na retenção real de luteína, porém não existe síntese de carotenoides após o processamento. Assim sendo, o aumento na concentração de luteína para a cultivar proVA, possivelmente, pode ser explicado por alterações sofridas pelo material em função do processamento favorecendo assim, a extração da luteína.

Alguns estudos avaliando o conteúdo de carotenoides em alimentos reportaram que há maior facilidade de extração dos carotenoides após o processamento térmico, induzindo a um aumento da concentração total de carotenoides pro-vitamínicos A em relação aos vegetais frescos. Provavelmente, devendo-se a uma desnaturação (desagregação) mais eficiente do complexo

carotenoide-proteína pós-cozimento (CAMPOS; ROSADO, 2005; KHACHIK et al., 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Outro fator que pode acarretar o aumento da concentração de carotenoides após o processamento térmico é a inativação de enzimas oxidativas presentes no tecido *in natura* as quais estimulam a isomerização e degradação oxidativa dos carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Como, por exemplo, a lipoxigenase, conhecida por catalisar de modo indireto a decomposição oxidativa dos carotenoides (HET HOLF; BOER; TIJBURG, 2000). No entanto, durante o processamento térmico estas enzimas podem ser inativadas.

Ainda, percebe-se que o tipo de processamento interferiu na retenção real de luteína nos grãos verdes das espigas de milho após o tratamento térmico. Na Tabela 4 encontram-se os valores médios da retenção de luteína (%) para os diferentes tipos de processamento térmico.

Tabela 4 Médias da retenção real de luteína (%) em grãos verdes, nos diferentes tipos de processamentos térmicos aplicados as espigas de milho

Tipo de cozimento	¹ Retenção real de luteína (%)	
	Processamento	
	Milho <i>In natura</i>	Milho Cozido
Sem água em micro-ondas	100,00 ^{Aa}	73,86±15,12 ^{Cb}
Com água em panela de pressão	100,00 ^{Aa}	92,08±12,41 ^{BCa}
Com água em panela com tampa	100,00 ^{Aa}	116,96±10,56 ^{Aba}
Com água em panela sem tampa	100,00 ^{Ab}	138,06±13,48 ^{Aa}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade (p<0,05)

DP: Desvio padrão

Os grãos verdes das espigas de milho cozidas com diferentes tratamentos térmicos tiveram menor retenção aparente de luteína após cozimento no micro-ondas, não havendo diferença entre essa resposta e a retenção real obtida para as espigas cozidas em panela de pressão. Porém, as médias para retenção de luteína dos grãos das espigas cozidas em panela de pressão e panela com tampa, bem como esse e panela sem tampa, não diferiram, indicando similaridade de efeito desses tratamentos na retenção de luteína. Estes três processamentos têm em comum a submersão das espigas em água durante a cocção.

Segundo Chandler e Schwartz (1987) e Lessin, Catigani e Schwartz (1997), a maior biodisponibilidade de carotenoides dos alimentos é alcançada quando o cozimento em água é empregado. Entretanto, a perda de componentes solúveis para a água de cocção pode aumentar a eficiência da extração dos carotenoides (HET HOF; BOER; TIJBURG, 2000). O que poderia ter influenciado na extração dos grãos verdes cozidos no tratamento micro-ondas, uma vez que não foi utilizada água no processo de cocção.

Para a variável zeaxantina, a associação dos fatores cultivar, tipo de processamento e processamento foi significativa. Na Tabela 5 são apresentados os valores médios da retenção de zeaxantina dos grãos de milho verde das cultivares estudadas.

Tabela 5 Médias de retenção real de zeaxantina (%) dos grãos verdes nas espigas de milho das cultivares estudadas

Tipo de cozimento	¹ Retenção real de zeaxantina (%)			
	BRS1030		proVA	
	Milho <i>in natura</i>	Milho cozido	Milho <i>in natura</i>	Milho cozido
Sem água em micro-ondas	100,00 ^{aA}	26,70±2,01 ^{bB}	100,00 ^{aA}	50,79±7,81 ^{bB}
Com água em panela de pressão	100,00 ^{aA}	24,31±1,81 ^{bB}	100,00 ^{aA}	53,78±7,97 ^{bB}
Com água em panela com tampa	100,00 ^{aA}	107,63±1,50 ^{aA}	100,00 ^{aA}	82,68±5,01 ^{aA}
Com água em panela sem tampa	100,00 ^{aA}	134,89±2,16 ^{aA}	100,00 ^{aA}	120,87±7,18 ^{aA}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, dentro do fator cultivar, não diferem entre si pelo Teste t (LSD), com nível de significância de 5%. DP: Desvio padrão

Após o cozimento no micro-ondas e na panela de pressão houve redução de zeaxantina nos grãos verdes das espigas de milho, independente da cultivar. Diferentemente, o tratamento na panela com tampa e sem tampa não afetou a concentração de zeaxantina em grãos verdes de milho, independente da cultivar.

Para a variável β -criptoxantina, a associação dos fatores cultivar, tipo de cozimento e processamento foi significativa. Na Tabela 6 são apresentados os valores médios da retenção de β -criptoxantina nos grãos verdes das cultivares estudadas.

Tabela 6 Médias da retenção real de β -criptoxantina (%) dos grãos verdes de milho em espigas das cultivares estudadas

Tipo de cozimento	¹ Retenção real de β -criptoxantina (%)			
	BRS1030		proVA	
	Milho <i>in natura</i>	Milho Cozido	Milho <i>in natura</i>	Milho cozido
Sem água micro-ondas	100,00 ^{Aa}	32,47±4,34 ^{Cb}	100,00 ^{Aa}	37,01±2,11 ^{Cb}
Com água panela de pressão	100,00 ^{Aa}	27,78±1,70 ^{Cb}	100,00 ^{Aa}	67,08±1,59 ^{Bb}
Com água em panela com tampa	100,00 ^{Aa}	101,98±4,21 ^{Ba}	100,00 ^{Aa}	66,79±1,63 ^{Bb}
Com água em panela sem tampa	100,00 ^{Aa}	125,49±3,82 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	95,47±1,45 ^{Aa}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha dentro do fator cultivar, não diferem entre si pelo Teste t (LSD), com nível de significância de 5%. DP: Desvio padrão

Assim como a variável zeaxantina, o processo de cocção das espigas de milho verde no micro-ondas e na panela de pressão resultaram em perdas de β -criptoxantina nos grãos das cultivares BRS1030 e proVA. Essa tendência ainda foi observada para os grãos verdes cozidos desta última cultivar por meio do processamento em panela com tampa. O processamento na panela sem tampa não alterou a concentração de β -criptoxantina nos grãos de milho verde nas espigas para ambas cultivares.

Após o processamento das espigas de grãos verdes da cultivar BRS1030 nos diferentes tratamentos, a menor retenção de β -criptoxantina foi observada para o cozimento em micro-ondas e panela de pressão, seguido do processamento na panela com tampa. Entretanto, a menor retenção foi observada

em grãos verdes da cultivar proVA após o cozimento no micro-ondas, seguido pelo cozimento em panela de pressão e panela com tampa, não havendo diferença na retenção de β -criptoxantina nas espigas de milho verde cozidas usando estes dois últimos tratamentos.

Para a variável β -caroteno, a associação dos fatores cultivar, cozimento e processamento também foram significativa para a resposta. Na Tabela 7 são apresentados os valores médios da retenção de β -caroteno em grãos verdes em espigas das cultivares estudado antes e após serem submetidas aos diferentes cozimentos.

Tabela 7 Médias da retenção real de β -caroteno (%) dos grãos verdes das espigas de milho das cultivares estudadas

Tipo de cozimento	¹ Retenção real de β -caroteno (%)			
	BRS1030		proVA	
	Milho	Milho	Milho	Milho
	<i>In natura</i>	Cozido	<i>In natura</i>	Cozido
Sem água em micro-ondas	100,00 ^{Aa}	29,41±2,01 ^{Bb}	100,00 ^{Aa}	44,65±2,87 ^{Bb}
Com água em panela de pressão	100,00 ^{Aa}	32,88±4,07 ^{Bb}	100,00 ^{Aa}	97,95±5,43 ^{Aa}
Com água em panela com tampa	100,00 ^{Aa}	105,27±3,01 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	58,54±3,21 ^{Bb}
Com água em panela sem tampa	100,00 ^{Aa}	121,62±5,76 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	110,99±4,47 ^{Aa}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, dentro do fator cultivar, não diferem entre si pelo Teste t (LSD), com nível de significância de 5%. DP: Desvio padrão

Para os grãos verdes nas espigas da cultivar BRS1030, após o cozimento no micro-ondas e na panela de pressão, foi observada redução de β -caroteno, enquanto a mesma foi mantida quando aplicado cozimento em panela com e sem tampa. Todavia, houve redução de β -caroteno nos grãos verdes nas espigas de milho proVA cozidos no micro-ondas e na panela com tampa, diferentemente dos cozimentos na panela de pressão e panela sem tampa.

A retenção real de β -caroteno observada para os grãos em espigas da cultivar BRS1030 cozidos em micro-ondas e panela de pressão não

apresentaram diferença, assim como a retenção de β -caroteno após cozimento das espigas em panela com e sem tampa. Porém, as maiores médias de retenção de β -caroteno foram observadas para os dois últimos tratamentos citados. Para as espigas da cultivar proVA, a diferença não foi notada na retenção entre os tratamentos micro-ondas e panela com tampa, e entre, panela de pressão e panela sem tampa. Sendo as menores médias de retenção observada nos dois primeiros tratamentos citados.

Almeida-Muradian e Penteado (2000) relataram perdas de β -caroteno em folhas preparadas por cocção em água fervente por 10 minutos ou por 7 minutos em forno de micro-ondas. As perdas de β -caroteno foram de 21 e 20% em serralha e 11 e 26% em aipo cozidos convencionalmente e em micro-ondas, respectivamente. Estas perdas são menores comparados com as perdas obtidas após os mesmos processamentos nas espigas de milho normal e proVA. Porém o tempo de cocção na água fervente foi menor, uma vez que os materiais estudados pelos autores requerem um tempo de cocção menor que as espigas de milho, e no caso do micro-ondas, diferentemente da presente dissertação foi utilizada água para cocção.

Nascimento (2006) encontrou percentuais de retenção de β -caroteno que variaram de 103 a 107%, em amostras de batata doce amarela, cozidas por imersão em água e, nas amostras fritas de 77 a 79%.

Campos et al. (2003), após avaliarem preparações de vegetais cozidos concluíram que, de uma forma geral, o cozimento em água melhor preservou o β -caroteno em vegetais folhosos, ainda que tenham sido observadas perdas próximas a 30%.

Oliveira et al. (2007), analisando mandioca amarela mansa cozida por imersão em água, encontraram percentual de retenção de β -caroteno de 79,80%. Dentre os métodos utilizados pelos autores, foi o que melhor preservou o teor de β -caroteno.

Nascimento (2006) encontrou um percentual de retenção real de β -caroteno de 102% em abóbora branqueada e seca a 80 °C.

Pesquisas com outros alimentos apontam perdas de carotenoides provocadas pelo cozimento. Pinheiro-Santana et al. (1998) relataram perdas de 39,87% nos carotenóides totais e 22 % no β -caroteno de cenouras cozidas por fervura. Enquanto Bianchini e Penteado (1998) observaram perdas de 33,23% no β -caroteno de pimentões amarelos (*Capsicum annuum*, L.), após 10 minutos a 100 °C.

A interação dos três fatores estudados cultivar, cozimento e processamento, também influenciaram a resposta da variável carotenoides totais. Na Tabela 8 são apresentados os valores médios da retenção de carotenoides totais em grãos verdes das cultivares estudadas.

Tabela 8 Médias da retenção real de carotenoides totais (%) observadas para os grãos verdes das espigas das cultivares de milho estudado

Tipo de cozimento	¹ Retenção real de carotenoides totais (%)			
	BRS1030		proVA	
	Milho	Milho	Milho	Milho
	<i>In natura</i>	Cozido	<i>In natura</i>	Cozido
Sem água em micro-ondas	100,00 ^{Aa}	29,41±2,01 ^{Cb}	100,00 ^{Aa}	51,77±4,36 ^{Cb}
Com água em panela de pressão	100,00 ^{Aa}	28,24±2,18 ^{Cb}	100,00 ^{Aa}	63,26±6,92 ^{Cb}
Com água em panela com tampa	100,00 ^{Aa}	106,33±2,80 ^{Ba}	100,00 ^{Aa}	82,87±5,92 ^{Bb}
Com água em panela sem tampa	100,00 ^{Ab}	137,77±4,33 ^{Aa}	100,00 ^{Aa}	113,45±6,43 ^{Aa}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, dentro do fator cultivar, não diferem entre si pelo Teste t (LSD), com nível de significância de 5%. DP: Desvio padrão

Após o cozimento das espigas do milho verde BRS1030, sem água no micro-ondas e com água na panela de pressão foi observada redução de carotenoides totais nos grãos. De forma contrária, os grãos de milho cozidos em água na panela com tampa apresentou maior retenção, indicando possível concentração dos carotenoides. Para a cultivar proVA, foi identificada perda na concentração de carotenoides após o cozimento das espigas no micro-ondas, com água na panela de pressão e com água em panela com tampa, não havendo alteração após o cozimento na panela sem tampa.

O índice de retenção real de carotenoides totais para os dos grãos verdes em espigas da cultivar proVA cozidas na panela com tampa e sem tampa, bem como os índices de retenção dos grãos verdes da cultivar BRS1030 após o cozimento na panela com e sem tampa foi maior ao valor encontrado por Sant'Ana et al. (1998) para cenoura (*Daucus carota L.*), posteriormente, ao cozimento com água sem pressão 60,13 %. Todavia, em grãos verdes das cultivares estudadas, o melhor tratamento para retenção de carotenoides totais foi o cozimento em água sem pressão em panela com e sem tampa.

Percentual de retenção real de carotenoides totais de 93,73% foi reportado por Oliveira et al. (2007) para mandioca amarela mansa cozida por imersão em água. Este valor é menor aos encontrados nos grãos verdes após o cozimento das espigas das cultivares BRS1030 e proVA em água na panela sem tampa, bem como os grãos verdes da cultivar BRS1030 após cozimento em água na panela com tampa. Apesar de que a estabilidade dos carotenoides depende da matriz do alimento e pode diferir de alimento para alimento, mesmo em se tratando das mesmas condições de processamento ou estocagem. Por isso, as condições de máxima retenção variam de um alimento para outro.

A concentração de carotenoides totais nos grãos verdes das espigas da cultivar BRS1030, após o cozimento em água na panela sem tampa, pode ser explicada pela possível desintegração celular após o tratamento térmico, favorecendo a disponibilidade exposição dos carotenoides aos solventes usados na extração, conseqüentemente favorecendo a extração pode durante a análise. Ou seja, a cocção possivelmente ocasionou a maior quantificação dos carotenoides totais ter favorecido a extração na amostra processada, uma vez que, segundo Campos (2006), o tratamento térmico além de inativar enzimas oxidativas desnatura complexos carotenoide-proteína existente nas células vegetais. O rompimento das estruturas do complexo carotenoide-proteína facilita então a liberação dos carotenoides durante a digestão. Na literatura é relatado

que a disponibilidade do licopeno é maior em tomates processados termicamente em comparação com o tomate *in natura* (GÄRTNER; STAHL; SIES, 1997; HET HOF; BOER; TIJBURG, 2000; STAHL; SIES, 1992). Entretanto, a perda de carotenoides na amostra fresca, catalisada por enzimas liberadas durante o preparo para a análise, a maior extratibilidade do analito na amostra processada, as perdas de água não contabilizadas e a lixiviação de sólidos da matriz para a água de cocção são fatores que podem levar aos supostos aumentos de carotenoides (RODRIGUES-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Na Tabela 9 estão apresentadas as médias da retenção de carotenoides proVA observadas para os grãos verdes nas espigas de acordo com o tipo de processamento antes e após o processamento térmico.

Tabela 9 Médias da retenção real de carotenoides proVA (%) observadas para os grãos verdes das espigas de milho das cultivares estudadas

Tipo de cozimento	¹ Retenção real de carotenoides proVA (%)	
	Milho <i>In natura</i>	Milho Cozido
Sem água em micro-ondas	100,00 ^{Aa}	36,42±8,09 ^{Bb}
Com água em panela de pressão	100,00 ^{Aa}	50,92±4,34 ^{Bb}
Com água em panela com tampa	100,00 ^{Aa}	104,37±6,60 ^{Aa}
Com água em panela sem tampa	100,00 ^{Aa}	108,60±7,13 ^{Aa}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, dentro do fator cultivar, não diferem estatisticamente pelo teste de LSD a 5% de probabilidade (p<0,05).

DP: Desvio padrão

O cozimento das espigas de milho verde em micro-ondas sem água e em imersão na água em panela de pressão resultou em menor retenção para carotenoides proVA. Os demais tratamentos não afetaram a retenção desses carotenoides nos grãos verdes em espigas. Sendo assim, o cozimento dos grãos verdes das espigas nos outros dois tratamentos panela com e sem tampa, seria o melhor processo de cocção para que a concentração de carotenoides com atividade pro-vitamina A fosse preservada.

Para a variável umidade nos grãos, significância foi identificada para a interação dos fatores cultivar, tipo de cozimento e processamento. Na Tabela 10 são apresentados os teores médios da percentagem da perda de massa.

Tabela 10 Médias da percentagem de perda de massa dos grãos das espigas de milho verde das cultivares estudadas de acordo com o tipo de cozimento

Tipo de cozimento	¹ Perda de massa (%)			
	BRS1030		proVA	
	Milho <i>In natura</i>	Milho Cozido	Milho <i>In natura</i>	Milho cozido
Sem água em micro-ondas	73,67±0,58 ^{Ba}	58,51±0,92 ^{Db}	74,78±0,80 ^{Ca}	60,61±0,57 ^{Cb}
Com água em panela de pressão	73,22±0,94 ^{BCb}	76,72±0,73 ^{Aa}	79,20±0,30 ^{Ab}	82,89±0,81 ^{Aa}
Com água em panela com tampa	75,75±0,32 ^{Aa}	67,26±1,97 ^{Bb}	76,96±0,47 ^{Bb}	83,02±0,22 ^{Aa}
Com água em panela sem tampa	71,98±1,85 ^{Ca}	65,55±0,68 ^{Cb}	77,89±0,10 ^{ABa}	78,34±0,47 ^{Ba}

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, dentro do fator cultivar, não diferem entre si pelo Teste t (LSD), com nível de significância de 5%. DP: Desvio padrão

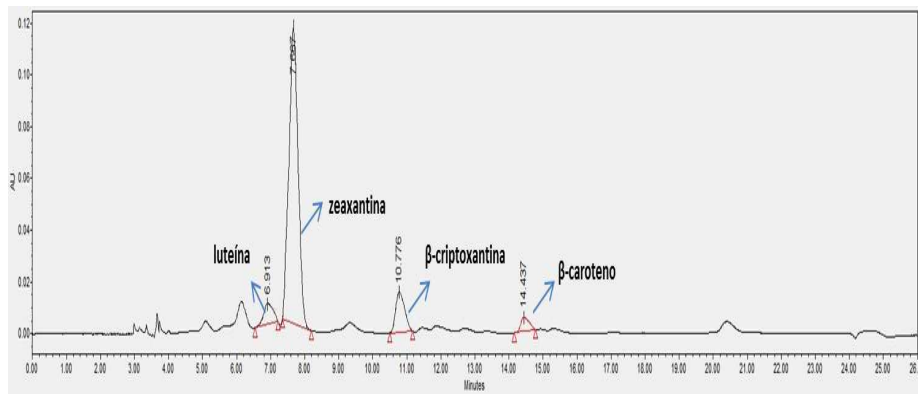
Os grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS1030 apresentaram perda de massa após cozimento no micro-ondas, com água em panela com tampa e com água em panela sem tampa, sendo aumentada após o cozimento em água na panela de pressão. Todavia, os grãos verdes da cultivar proVA apresentou perda de massa após o processamento no micro-ondas, sendo conservada após o processamento na panela sem tampa e aumentada após cozimento na panela de pressão e na panela com tampa.

Conforme dados apresentados na Tabela 10, as espigas foram colhidas respeitando o padrão comercial para milho verde (estádio leitoso), quando os grãos apresentam de 70 a 80% de umidade.

O cozimento no micro-ondas resultou em perda de massa dos grãos verdes nas espigas de milho, independente da cultivar. De forma contrária, o cozimento em panela de pressão para ambas as cultivares. O cozimento na panela com tampa e panela sem tampa para os grãos verdes da cultivar BRS1030 também resultou perda de massa. Entretanto o cozimento na panela com tampa para os grãos verdes da cultivar proVA resultou em ganho de massa já o cozimento sem tampa não alterou o teor de umidade dos grãos.

Nas Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 estão apresentados os cromatogramas dos carotenoides das cultivares BRS1030 e proVA resultante do processamento térmico.

A



B

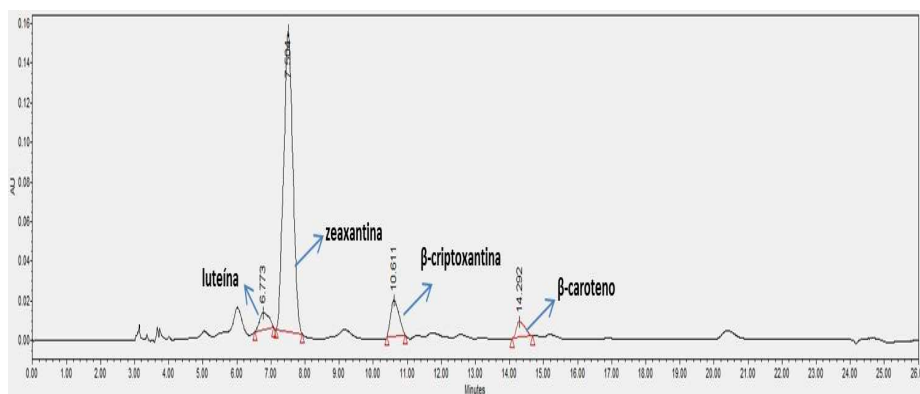
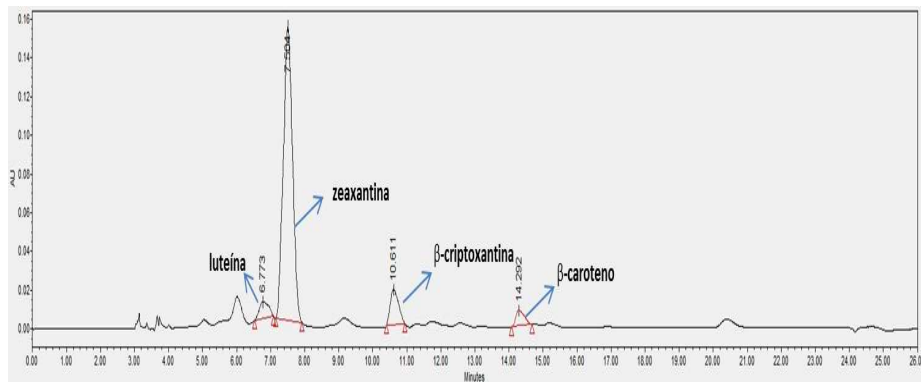


Figura 6 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento (A) e após o cozimento com água na panela com tampa (B)

A



B

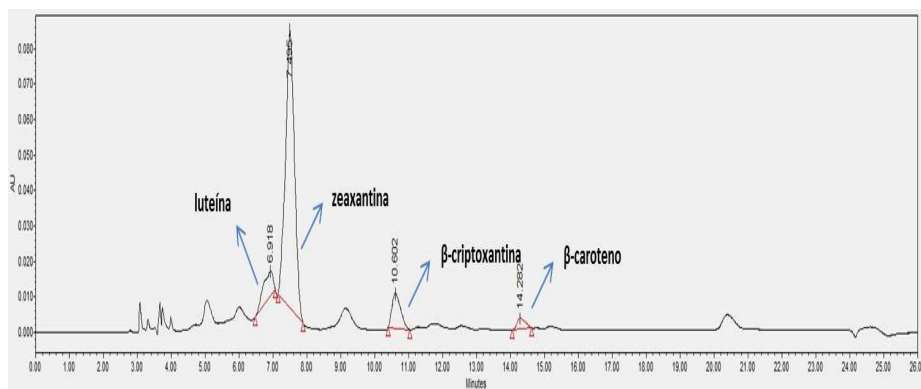


Figura 7 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento na panela sem tampa (A) e após o cozimento na panela sem tampa, (B)

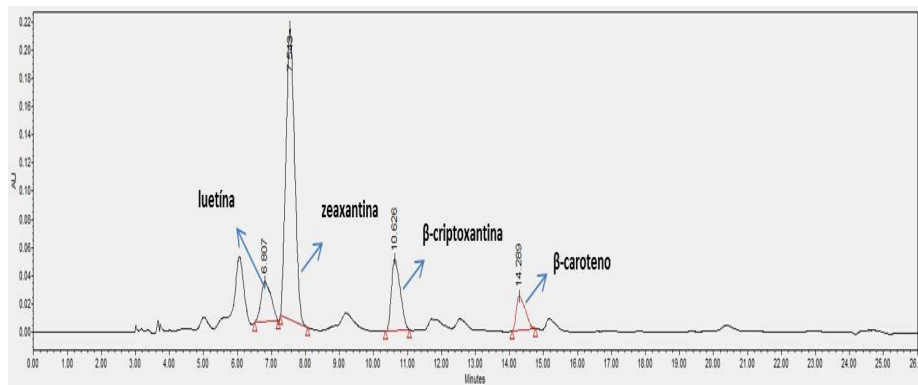
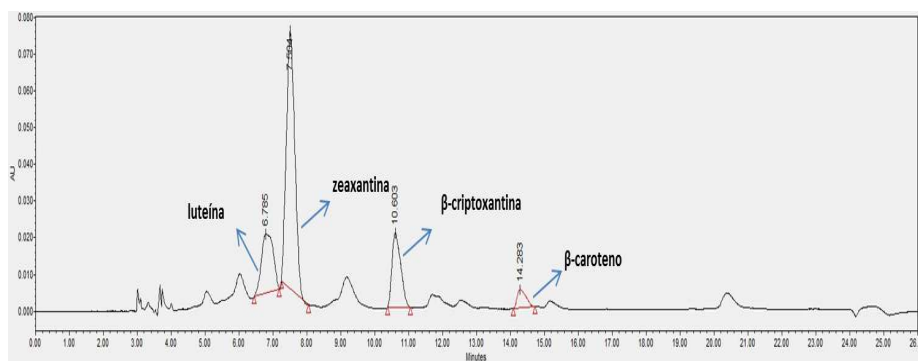
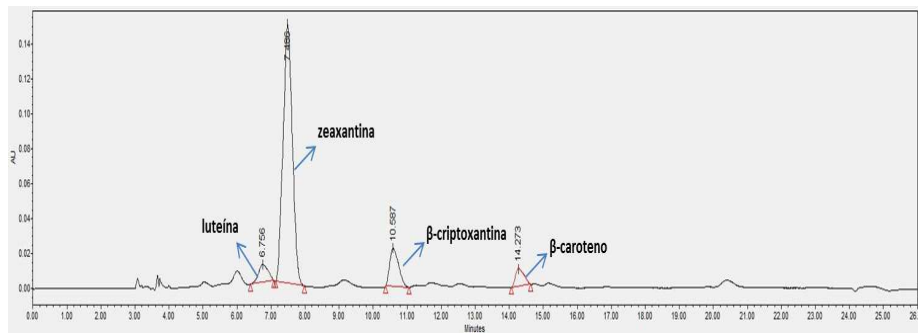
A**B**

Figura 8 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento em micro-ondas (A) após o cozimento em micro-ondas (B)

A



B

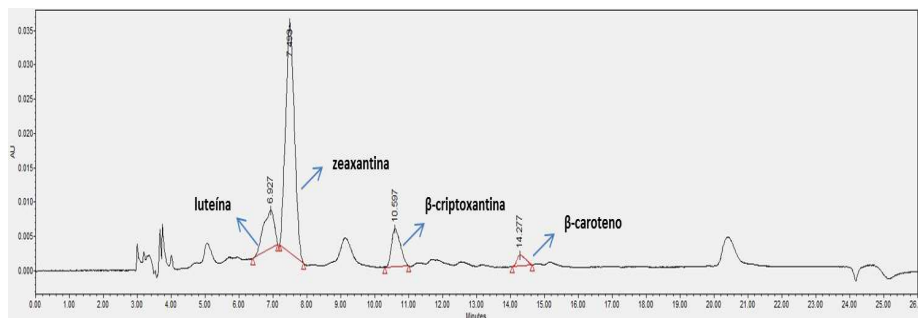
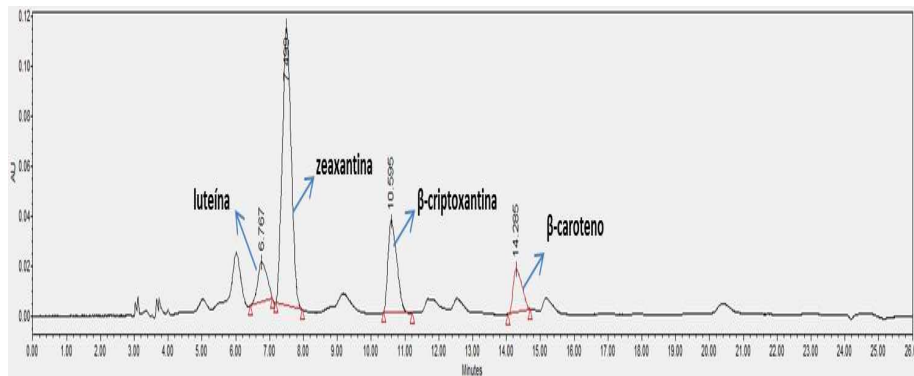


Figura 9 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar BRS 1030, antes do cozimento em panela de pressão (A) após o cozimento em panela de pressão (B)

A



B

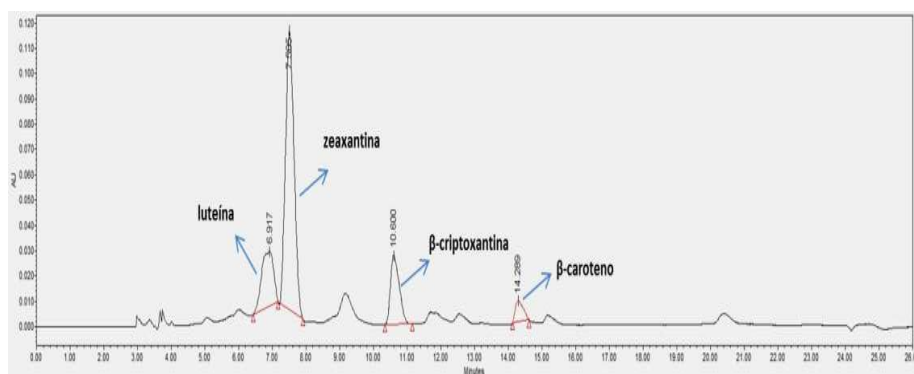


Figura 10 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento com tampa (A) após cozimento com tampa (B)

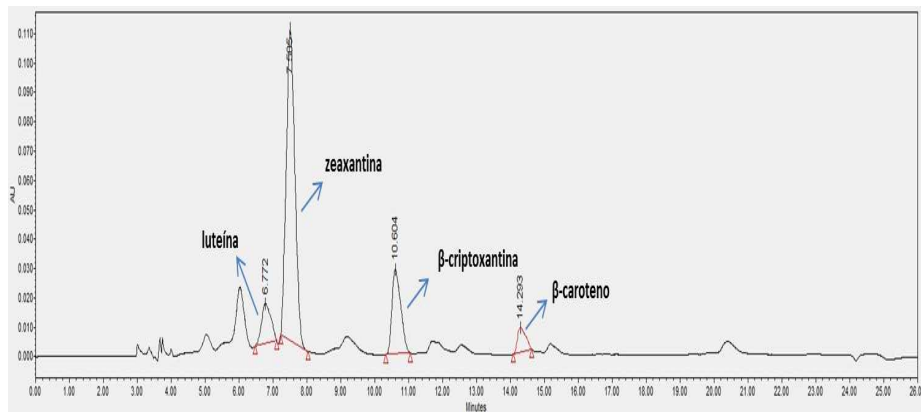
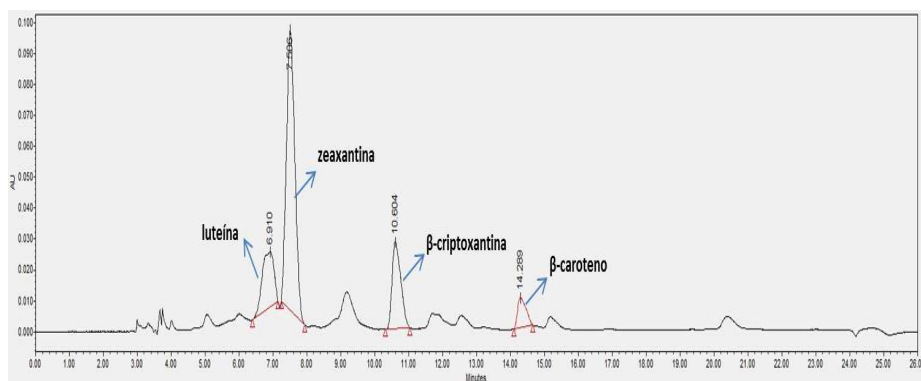
A**B**

Figura 11 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento sem tampa (A) após cozimento sem tampa (B)

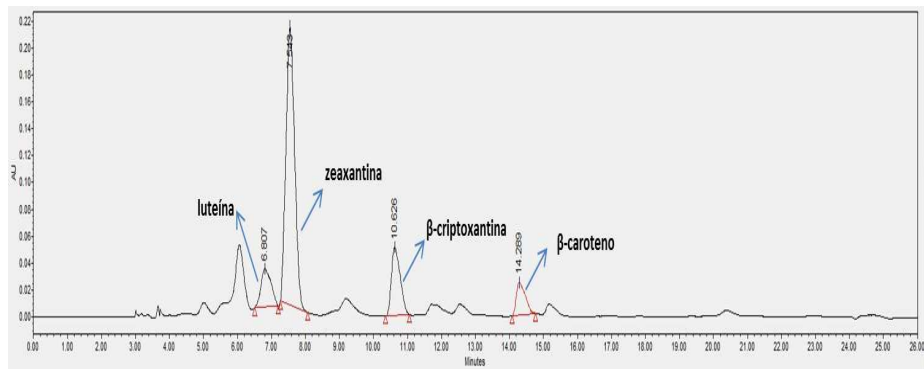
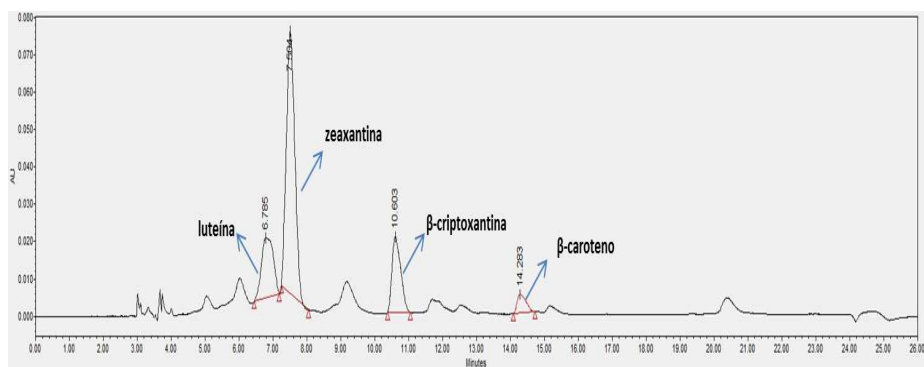
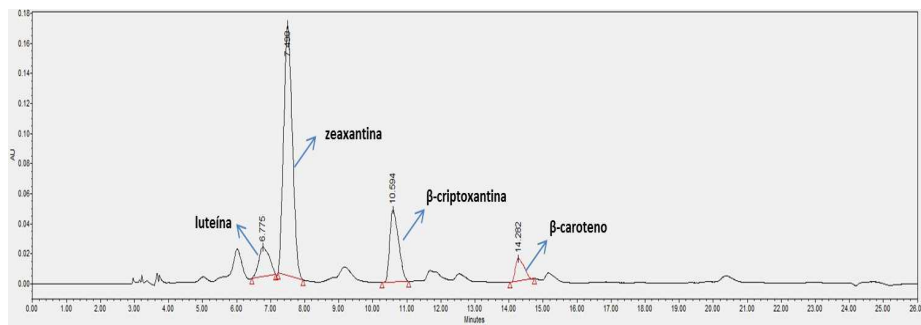
A**B**

Figura 12 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento em micro-ondas (A) após cozimento em micro-ondas (B)

A



B

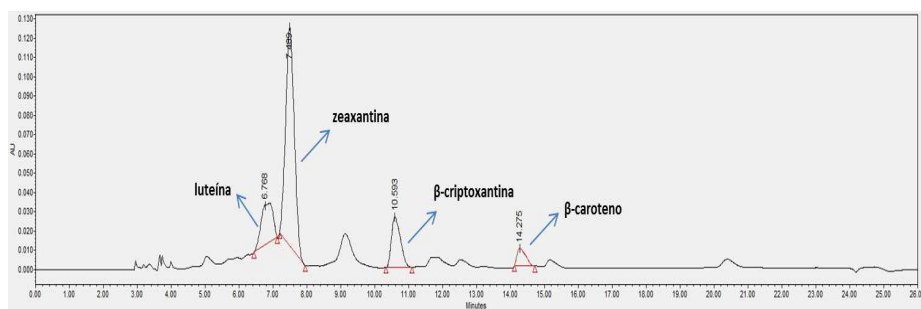


Figura 13 Cromatogramas resultantes da análise de carotenoides das amostras dos grãos verdes das espigas de milho da cultivar sintético proVA, antes do cozimento em panela de pressão (A) após cozimento em panela de pressão, (B)

4 CONCLUSÃO

- a) Os grãos verdes das cultivares de milho BRS1030 e o sintético proVA apresentam semelhança no perfil de carotenoides, sendo zeaxantina o principal carotenoide presente.
- b) Em grãos verdes da cultivar BRS1030, o cozimento das espigas sem água no micro-ondas e com água em panela de pressão resulta em redução de β -caroteno, sendo as retenções iguais à 29,41 e 32,88% respectivamente. Para a cultivar proVA a retenção de β -caroteno em grãos verdes em espigas cozidas sem água no micro-ondas e com água em panela com tampa são, respectivamente, 44,65% e 58,54%.
- c) Independente da cultivar, ocorre redução na concentração de carotenoides precursores da vitamina A e carotenoides totais nos grãos verdes após o cozimento das espigas em micro-ondas e em panela de pressão. Ainda para a cultivar proVA ocorre perda na retenção de carotenoides totais após o processamento na panela com tampa.
- d) Para preservação dos carotenoides os melhores tratamentos, de acordo com as condições estudadas no presente trabalho são: cozimento na panela com tampa e panela sem tampa.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados de retenção de carotenoides em grãos verdes de milho do biofortificado com precursores de vitamina A, estudado no processamento mínimo e nos diferentes tipos de tratamentos térmicos poderão auxiliar os programas intervencionistas que desejam utilizar o milho verde na dieta de populações que sofrem de hipovitaminose A.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PENTEADO, M. V. C. Carotenoids and provitamin A value of some Brazilian sweet potato cultivars (*Ipomoea batatas* Lam.). **Revista Farmácia Bioquímica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 145-154, jul./dez. 2000.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the AACC**. 10th ed. Saint Paul, 2000. 1200 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.
- BIANCHINI, R.; 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.
- CAMPOS, F. M. **Avaliação de práticas de manipulação de hortaliças visando a preservação de vitamina C e carotenoides**. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- CAMPOS, F. M.; ROSADO, G. P. Novos fatores de conversão de carotenoides provitamínicos A. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 571-578, jul./set. 2005.
- CAMPOS, M. F. et al. Teores de Betacaroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa, MG. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 163-169, 2003.
- CÂNDIDO, B. D. V. **Retenção de carotenoides após moagem de milho biofortificado e durante o armazenamento dos derivados**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CHANDLER, L. A.; SCHWARTZ, S. J. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 3, p. 669-672, 1987.

ESKIN, M. N. A. Biochemical changes in raw foods: fruits and vegetables. In: _____. **Biochemistry of food**. 2nd 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: 3 jul. 2012.

GÄRTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. **Journal of Clinical Nutrition**, Philadelphia, v. 66, n. 6, p. 116-122, July 1997.

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. (Circular Técnica, 64). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2005/circular/Circ_64.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2012.

HET HOF, K. H. van; BOER, B. C. J. de; TIJBURG, L. B. M. Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 1189-1196, May 2000.

KHACHIK, F. et al. Effect of food preparation on qualitative and constituents of tomatoes and several green vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 3, p. 390-398, Mar. 1992.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 5, p. 1948-1955, May 1999.

LESSIN, W. J.; CATIGANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 10, p. 3728-3732, Oct. 1997.

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.

NASCIMENTO, P. **Avaliação da retenção de carotenoides de abóbora, mandioca e batata doce**. 2006. 67 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

OLIVEIRA, A. R. G. et al. Estudo da retenção real de carotenoides totais e β -caroteno em variedades de mandioca amarela mansa. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 9., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ERSCTA, 2007. p. 634-638.

PINHEIRO-SANTANA, H. M. et al. Evaluation of total carotenoids, α - and β -carotene in carrots (*Daucus carota* L.) during home processing. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 39-44, jan./abr. 1998.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrient Analysis**, Essex, v. 5, p. 191-225, 1989.

_____. **Guide to carotenoid analysis in food**. Washington: ILSI, 2001. 64 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides**: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 100 p.

SANT'ANA, H. M. P. et al. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. **Food Chemistry**, London, v. 61, n. 1/2, p. 145-151, Jan. 1998.

STAHL, W.; SIES, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 122, n. 11, p. 2161-2166, Nov. 1992.