

RETENÇÃO DE CAROTENOIDES EM MILHO BIOFORTIFICADO APÓS MOAGEM VIA SECA E DURANTE ARMAZENAMENTO DOS SEUS DERIVADOS

MARIA CRISTINA DIAS PAES¹, BETANIA DINIZ VOLPI²
e PAULO EVARISTO DE OLIVEIRA GUIMARÃES¹

¹EMBRAPA MILHO E SORGO, Rod. MG 424 Km 65, Sete Lagoas, MG.

cristina.paes@embrapa.br; paulo.guimaraes@embrapa.br

²VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Sete Lagoas, MG, *betaniavolpi@yahoo.com.br*

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.17, n.3, p. 502-521, 2018

RESUMO - O presente estudo teve por objetivo determinar a retenção de carotenoides em milho biofortificado com carotenoides precursores de vitamina A (ProVA) processado através da moagem a seco e nos derivados canjica, fubá e creme de milho, durante o armazenamento pós-processamento por 24 dias. O perfil de carotenoides foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o total de carotenoides precursores de vitamina A foi quantificado a partir das concentrações de α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina. Os produtos da moagem via seca dos grãos de milho biofortificado (BRS 4104) apresentaram médias percentuais de retenção real de carotenoides totais (CT) de 75,37% (canjica), 73,51% (fubá) e 59,47% (creme) em relação aos grãos, enquanto para carotenoides ProVA os percentuais foram de 74,20% (canjica), 75,21% (fubá) e 60,55% (creme), evidenciando, em média, 30% de perdas como efeito da moagem a seco na retenção de carotenoides presentes nos grãos de milho. Durante o armazenamento ao longo do período de 24 dias ocorreu diminuição linear da retenção de CT e de ProVA nos três derivados estudados. Menores concentrações de carotenoides totais e ProVA nos produtos da moagem via seca de milho (canjica, fubá e creme de milho) e a redução na retenção dessas substâncias observadas durante armazenamento devem ser consideradas, quando da utilização de produtos do milho biofortificado como estratégia complementar em programas nutricionais para redução da deficiência de vitamina A em humanos.

Palavras-chave: *Zea mays*, processamento, degradação, pró-vitamina A, compostos bioativos.

CAROTENOIDS RETENTION IN BIOFORTIFIED MAIZE PROCESSED THROUGH DRY MILLING AND DURING STORAGE OF THE RESULTING PRODUCTS

ABSTRACT - The objective of the present study was to determine the retention of carotenoids in maize biofortified with vitamin A precursors (ProVA) processed through dry milling and during storage of the products flaking grits, corn meal and fine meal. Carotenoid profile was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the total vitamin A precursor carotenoids quantified considering the concentration of α -carotene, β -carotene and β -cryptoxanthin. Dry-milling products of ProVA maize BRS 4104 showed mean true retention for total carotenoids of 75.37% (flaking grits), 73.51% (corn meal) and 59.47% (fine meal), whereas retention for ProVA carotenoids were 74.20% (flaking grits), 75.21% (corn meal) and 60.55% (fine meal) revealing 30% of losses on average due to dry milling effect on the retention of carotenoids present in the maize grains. During the 24-day storage period there was a linear decrease in the retention of total carotenoids and ProVA in the three maize biofortified products. Reduced total carotenoids and ProVA contents in the maize dry milling products (flaking grits, corn meal and fine meal) compared to the whole kernels as well as the important losses of these substances during storage is recommended to be taking into account when using biofortified maize as a complementary strategy in nutrition programs focused on improvement of vitamin A deficiency in humans.

Keywords: *Zea mays*, processing, degradation, pro-vitamin A, bioactive compounds.

Em anos recentes, os avanços da ciência tornaram possível a população conhecer a importância dos alimentos como fontes de compostos biologicamente ativos associados à saúde humana (Assunção & Mercadante, 2003). Entre esses compostos estão os carotenoides, grupo de pigmentos responsáveis pelas cores de plantas, cerca de 50 deles possuindo atividade biológica (Meléndez-Martínez et al., 2007). Deste total, aproximadamente de 40 podem ser encontrados nos alimentos e, como resultado de uma absorção seletiva do trato gastrointestinal, 14 carotenoides são biodisponíveis (Khachik et al., 1991; Olson, 1999; Frazer & Bramley, 2004).

Dentre os alimentos fontes de carotenoides, destaca-se o milho, um dos cereais mais cultivados no mundo (FAO, 2014). Zeaxantina e luteína são os principais carotenoides presentes neste cereal (Hulshof et al., 2007; Li et al., 2007; Burt et al., 2010; Paes et al., 2011), cuja importância é fundamentada no fato de constituírem os chamados pigmentos maculares, envolvidos na prevenção da degeneração macular (Janick-Buckner et al., 1999; Mozaffarieh et al., 2003). Entretanto, α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina, considerados carotenoides precursores da vitamina A, também estão presentes nos grãos de milho (Cardoso et al., 2009; Mugode et al., 2014; Rios et al., 2014), tornando essa cultura uma importante fonte dessa vitamina, especialmente para populações onde o seu consumo é elevado (Rodríguez-Amaya et al., 2006; International Institute of Tropical Agriculture, 2010; Nuss & Tanumihardjo, 2010). Por essa razão milhos biofortificados com carotenoides ProVA estão sendo desenvolvidos através do melhoramento genético de plantas (BRS 4104, 2013; Pixley et al., 2013), com vistas a contribuir para a prevenção e tratamento da hipovitaminose A, considerada um dos principais problemas de saúde pública em países em desen-

volvimento (Butt et al., 2006; Zapata-Caldas et al., 2008). É nesse contexto que o milho biofortificado surge como uma alternativa auxiliar no combate de carências nutricionais, considerando conter os genótipos biofortificados de 6 a 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de carotenoides precursores de vitamina A nos grãos secos (BRS 4104, 2013; Dhliwayo et al., 2014; Menkir et al., 2017), enquanto no milho convencional essa concentração varia de 0,25 a 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Harjes et al., 2008; Cardoso et al., 2009; Nuss & Tanumihardjo, 2010). Entretanto, no processo de desenvolvimento de milho biofortificado por melhoramento genético, apenas os grãos secos são analisados para a composição de carotenoides (Menkir et al., 2008), o que não corresponde às formas usualmente consumidas pela população. Este fato pode afetar profundamente o resultado da biofortificação, já que produtos alimentícios processados podem sofrer alterações na sua composição química durante o processamento e/ou armazenamento (Rodríguez-Amaya, 1997). Essas alterações podem acarretar prejuízos do ponto de vista nutricional, já que algumas estruturas químicas, como as dos carotenoides, são instáveis e, portanto, suscetíveis a oxidação e isomerização geométrica, principalmente quando há presença e/ou disponibilidade de oxigênio, luz, calor, metais, ácidos, enzimas e peróxidos (Rodríguez-Amaya, 1997; Çinar, 2004). Deste modo, a estabilidade dos carotenoides é um fator crítico quando se avalia retenção desses compostos em produtos processados e seu valor nutritivo.

Partindo do princípio que parte razoável da população consome o milho na forma de seus diversos derivados, torna-se importante a determinação dos teores dos carotenoides após processamento e armazenamento dessas matérias-primas, sendo os objetivos do presente trabalho: a) determinar a retenção de carotenoides de milho biofortificado com precursores

da vitamina A após o processamento dos grãos através da moagem a seco; e b) avaliar a retenção de carotenoides nos derivados canjica, fubá e creme de milho durante o armazenamento pós-processamento.

Material e Métodos

Obtenção e preparo das amostras

Amostras de grãos da variedade de milho BRS 4104 biofortificada com carotenoides precursores de vitamina A (ProVA) foram fornecidas pela Embrapa Milho e Sorgo. O plantio ocorreu na safra de verão 2009/2010 em Sete Lagoas-MG (19°26' 39,7" S e 44° 10' 02,22" O, em altitude de 705 m), sendo a colheita realizada em abril de 2010, quando a umidade nos grãos atingiu 18%. As espigas colhidas foram mantidas com palha até umidade final de 13% e os grãos, debulhados das espigas em debulhadeira mecânica mantida em galpão no escuro. Os grãos foram coletados em tambores plásticos com tampa, que foram armazenados em câmara com controle de temperatura (5 °C) e umidade relativa (30%) até o processamento, ocorrido no dia seguinte da debulha. Para as avaliações, quatro repetições foram obtidas no campo de produção e para a análise química dos grãos foram utilizadas alíquotas de 50 g de cada repetição, obtidas por quarteamento, conforme descrito em Rodriguez-Amaya e Kimura (2004).

O processamento via moagem a seco dos grãos de milho foi conduzido na Indústria Farsete (Branco e Cia. Ltda), em Sete Lagoas-MG, Brasil. Os grãos passaram por pré-limpeza e a seguir por decorticação/degerminação em canjiqueira tipo 3, motor 15HP (D'ANDRÉA, Limeira-SP, Brasil). Nessa etapa, foi produzida a canjica do milho BRS 4104. Os demais produtos derivados foram obtidos por moagem deste

produto, sendo eles o fubá e o creme de milho. A canjica foi processada em conjunto de moinhos martelo JB (BARTH) composto por dois moinhos, um menor para pré-moagem com motor de 20HP e outro maior com motor de 40HP e peneiras permutáveis, ambos trifásicos. Os produtos canjica, fubá e creme foram empacotados em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade e selados em protocolo rotina da indústria. A totalidade dos derivados resultantes do processamento de cada uma das 4 repetições de grãos foi coletada à medida que eram produzidos. Os produtos já embalados foram imediatamente envoltos em papel alumínio para proteção contra a luz e acrescidos de identificação por produto e data. Para o transporte, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas ao Laboratório de Qualidade de Grãos da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, Brasil.

Durante o processo de moagem a seco, os grãos e os derivados foram pesados antes e depois de cada etapa do processamento, computando-se as perdas, bem como o rendimento em cada fase do processo, a fim de obter os dados para o cálculo da retenção real dos carotenoides.

Após o processamento, quatro repetições de cada produto, identificadas segundo o fator tempo, foram distribuídas de forma aleatória em prateleiras dispostas no interior de uma câmara de estoque, com controle de luz e temperatura para estudo do efeito de armazenamento na composição de carotenoides. As condições e o período de estocagem simulavam os praticados nas áreas de estoque e comercialização em varejo desses produtos, obtidos por monitoramento de dois supermercados locais previamente à instalação do experimento. O período de permanência foi reportado para um mesmo lote de produto de milho no supermercado (24 dias). Temperatura e umidade foram monitoradas na câmara de estocagem com uso

de termômetro e termo-higrômetro, permanecendo a temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e exposição do produto à luz em intensidade por 14 horas/dia. A intensidade de luz foi monitorada com o uso de fotômetro, sendo a intensidade de luz média de $0,01\text{ WATTS m}^2$.

As amostras destinadas à análise de carotenoides para cada dia de avaliação foram coletadas de acordo com a identificação de cada tempo, sendo dias 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21 e 24 após o processamento. Estas foram transferidas da câmara ao laboratório de análises químicas em caixas térmicas, a fim de evitar transmissibilidade à luz, bem como variações de temperatura.

O preparo de amostras foi realizado no dia imediatamente anterior às análises químicas, tanto no dia do processamento, como nos dias de avaliação no período do armazenamento, utilizando alíquotas de canjica obtidas por quarteamento até o volume de 25 g. Visando obter granulometria adequada à extração de carotenoides, amostras de grãos e canjica foram moídas em micromoinho tipo ciclone modelo MA 020 (MARCONI, Piracicaba-SP, Brasil) acoplado de peneira com malha de abertura 0,5 mm. Essas amostras foram acondicionadas em frascos de vidro, tampados, lacrados com Parafilm® e envoltos em papel alumínio. Os frascos contendo o material moído foram mantidos na temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o fubá e o creme de milho, não foi necessário esse procedimento, uma vez que esses produtos possuíam granulometria adequada para o processo de extração, apresentando tamanho de partículas inferiores a 0,5 mm.

Análises químicas e retenção real

Os carotenoides foram extraídos das amostras em esquema sequencial de solventes orgânicos, conforme protocolo descrito por Kurilich e Juvik

(1999), com modificações. Amostras de 0,6 g foram transferidas a tubos de ensaio com tampa rosqueável de capacidade 25 mL, adicionando-se 7 mL de etanol PACS (99,8%) (grau ACS, marca Sigma-Aldrich) contendo 0,1% de BHT (grau ACS, marca Sigma-Aldrich) a cada tubo. O conteúdo foi agitado em agitador de tubos modelo MS1 (IKA, Wilmington-NC, Estados Unidos) por 20 segundos e os tubos que foram incubados sem agitação em banho-maria modelo MA127 (MARCONI, Piracicaba, SP, Brasil) a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Ao final desse tempo, os tubos foram removidos e a cada um foram adicionados 500 μL de hidróxido de potássio 80% (m/v) (grau ACS, marca Merck), seguido de agitação em agitador de tubos modelo MS1 (IKA, Wilmington-NC, Estados Unidos) por 10 segundos e novamente os tubos foram incubados sem agitação na temperatura de $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos em banho-maria modelo MA127 (MARCONI, Piracicaba-SP, Brasil). Ao final do tempo, os tubos foram transferidos para banho de gelo, sendo adicionados a eles 4 mL de água deionizada gelada e 4 mL de hexano (grau ACS, marca Tedia). O conteúdo resultante foi homogeneizado em agitador de tubos modelo MS1 (IKA, Wilmington-NC, Estados Unidos) e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 1.200g por 60 segundos em centrífuga modelo B4i (JOUAN, França). A camada superior resultante em cada tubo foi coletada utilizando pipeta Pasteur de vidro e transferida para tubo de ensaio limpo com mesma identificação. Após limpos os tubos com fase etanólica foram novamente adicionados 4 mL de hexano, repetindo-se as etapas de centrifugação e coleta da fase superior até a completa extração dos pigmentos, observada pela ausência de cor na amostra depositada no fundo do tubo. Ao extrato final de carotenoides em hexano foram adicionados 3 mL de água deionizada, lentamente, através da parede

do tubo, agitando-se a seguir os tubos em agitador modelo MS1 (IKA, Wilmington-NC, Estados Unidos), seguido de repouso até a separação de fases, o que permitiu coletar a fase não aquosa de cada tubo (extrato de carotenoides), que foi transferida a balões de fundo redondo de 50 mL. Os carotenoides remanescentes da camada aquosa foram extraídos duas outras vezes usando 3 mL de hexano e combinando a camada não aquosa, obtida de cada extração, com a primeira. Os extratos coletados nos balões foram secos em evaporador rotativo modelo R-114 acoplado a banho B-480 (BUCHI, Suíça) e, então, inertizados com nitrogênio gasoso grau ultrapuro, com posterior reconstituição em 2 mL de acetona (grau HPLC, TEDIA).

Os carotenoides foram analisados a partir de 40 µL de cada extrato reconstituído em acetona, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido modelo LC-10 (SHIMADZU, Japão), equipado com coluna polimérica YMC C30 (250 mm x 4,6 mm x 5µm, YMC America Inc, Allentown-PA, USA), acoplada a detector de arranjo de dióxido e detector de UV visível. O gradiente de eluição foi conduzido a 0,8 mL min⁻¹ em condições de gradiente linear 80:20 a 20:80 de metanol: éter metil *tert*-butil em 25 minutos, seguido por constante de 80:20 em cinco minutos, finalizando com nove minutos de equilíbrio. A temperatura de forno foi mantida a 30 °C e o comprimento de onda a 450 nm no detector de UV visível. A temperatura do laboratório foi mantida a 22 °C durante todo o processo. Para identificação dos compostos foram utilizados padrões de carotenoides purificados a partir de cenoura, pimenta amarela e milho verde, seguindo protocolo descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004).

Os resultados de concentração de carotenoides foram expressos em base seca, utilizando resultados de análise de umidade das amostras, conduzidas seguindo o método 44-15 da American Association of Cereal Chemistry (2000).

A concentração de carotenoides totais (CT) foi obtida pela soma dos valores de todas as frações quantificadas, sendo luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, α-caroteno, β-caroteno, 9-cis-β-caroteno e 13-cis-β-caroteno. O total de carotenoides precursores de vitamina A (ProVA) foi calculado a partir das concentrações dos carotenoides quantificados nas amostras, através da aplicação da seguinte fórmula: total *all trans* β-caroteno + ½ total de α-caroteno + ½ do total de β-criptoxantina (µg g⁻¹). O percentual de retenção real foi calculado de acordo com a fórmula proposta por Murphy et al. (1975):

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

Delineamento experimental e análise estatística

Para o estudo do efeito da moagem na composição de carotenoides no milho biofortificado o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído de quatro tratamentos (grão, canjica, fubá e creme) e quatro repetições.

O delineamento experimental adotado para o teste de armazenamento foi o inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial 3x8, constituído de três produtos do milho (canjica, fubá e creme) e oito períodos de armazenamento (0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 dias).

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo aplicado o teste de Tukey

para a comparação de médias, quando identificada significância para o teste de F a 5% de probabilidade. Análises de regressão foram aplicadas para a descrição das variáveis em função dos períodos de armazenamento, e os modelos foram selecionados observando a significância do teste F para cada modelo e seus respectivos coeficientes de determinação com auxílio do Programa Estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

Resultados e Discussão

Retenção de carotenoides nos produtos da moagem dos grãos do milho biofortificado

Diferenças significativas foram identificadas para todas as variáveis analisadas, evidenciando o efeito da moagem sobre a retenção de carotenoides presentes nos grãos da variedade sintética de milho biofortificado BRS 4104. Na Tabela 1 estão apresentados os valores do teste F da análise de variância.

A concentração média de carotenoides totais, expressos em base seca, observada para os grãos do milho BRS 4104, foi 34,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ e nos produtos foi

25,97 $\mu\text{g g}^{-1}$ (canjica), 24,82 $\mu\text{g g}^{-1}$ (fubá) e 19,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ (creme), diferindo entre si a 5% de probabilidade. Para milhos comuns de grãos amarelos, a concentração de CT reportada na literatura é aproximadamente 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cardoso et al., 2009), enquanto para milhos biofortificados varia de 25 a 35 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Pillay et al., 2011; Mugode et al., 2014; Menkir et al., 2017). Dessa maneira o obtido para a cultivar avaliada no estudo se assemelha ao reportado para outras cultivares de milho biofortificadas.

Os dados de retenção real de carotenoides totais, carotenoides ProVA, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno e β -caroteno nos produtos derivados obtidos pelo processamento comparados aos grãos da variedade de milho biofortificada BRS 4104 são apresentados na Figura 1. O efeito negativo mais expressivo do processamento na retenção de carotenoides totais, carotenoides ProVA, zeaxantina, luteína, β -caroteno e β -criptoxantina foi observado para o produto creme de milho (Figura 2), permitindo inferir que a maior extração do grão a produto de menor tamanho de partícula (creme de milho) influencia negativamente a retenção real de carotenoides.

Tabela 1. Síntese do resultado da análise de variância do efeito moagem de grãos sobre as médias de carotenoides em milho biofortificado.

Variáveis dependentes	Teste F
Carotenoides totais	834,44 **
Carotenoides pro VA	495,94 **
Luteína	571,82 **
Zeaxantina	739,21 **
β -criptoxantina	81,85 **
β -caroteno	475,08 **
α -caroteno	55,29 **
9-cis- β -caroteno	93,25 **
13-cis- β -caroteno	43,05 **

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

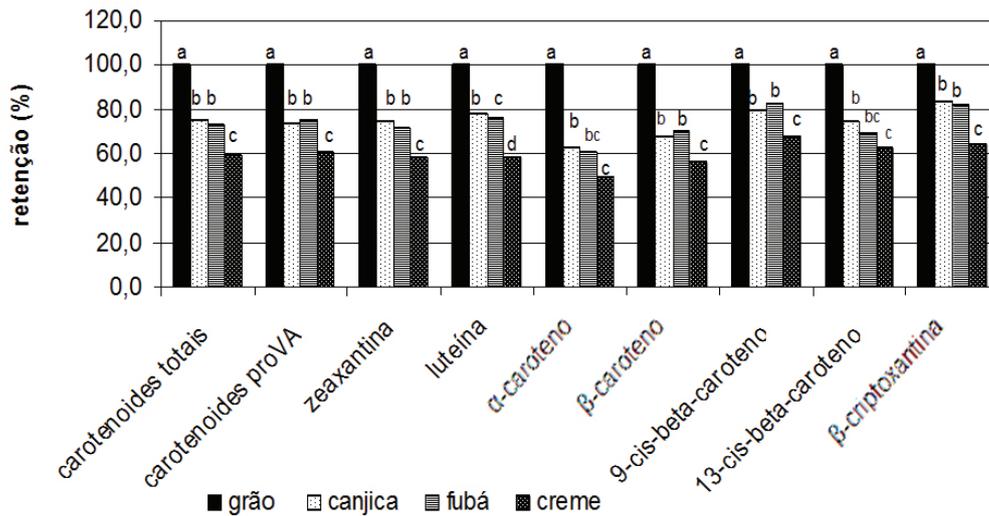


Figura 1. Retenção (%) de carotenoides em grãos e produtos derivados por moagem via seca do milho biofortificado BRS 4104. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey ($p > 0,01$).

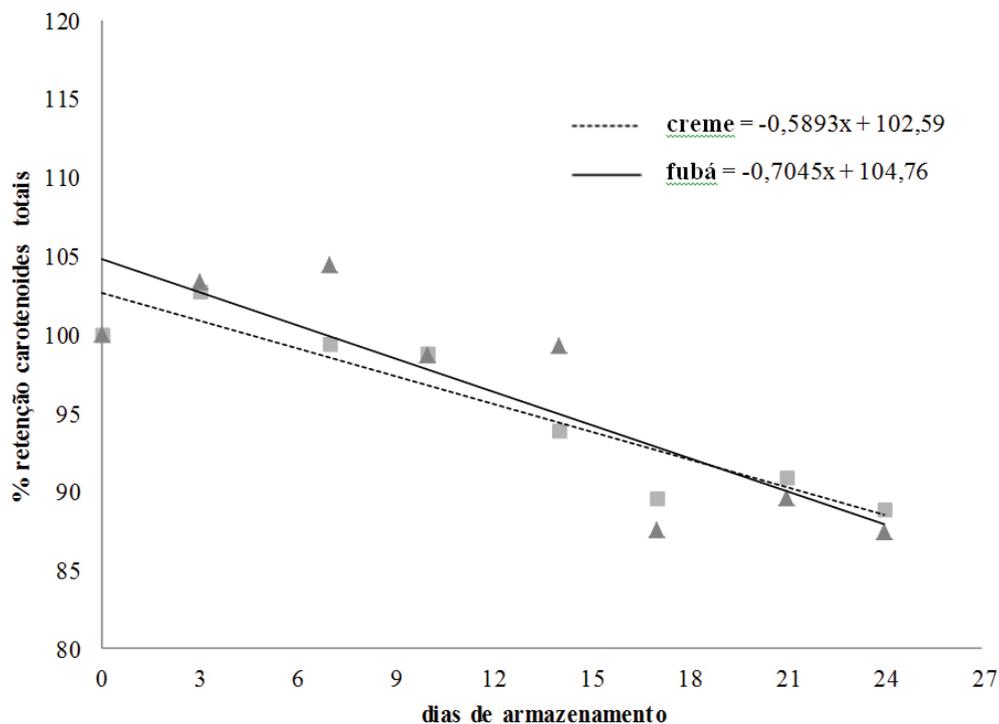


Figura 2. Variação da retenção real de carotenoides totais durante o armazenamento por 24 dias dos produtos fubá e creme da moagem via seca de milho biofortificado BRS 4104 por 24 dias a 27 °C com luz por 14h/dia.

Na Tabela 2 é possível verificar que a média de concentração de carotenoides ProVA ($7,53 \mu\text{g g}^{-1}$) nos grãos da variedade BRS 4104 se assemelha àquelas reportadas na literatura para linhagens de milho consideradas no terço superior para ProVA (Hulshof et al., 2007) e para híbridos de milho biofortificados desenvolvidos na África (Menkir et al., 2008, 2017; Mugode et al., 2014).

Os derivados obtidos no processamento por moagem via seca do milho BRS 4104 apresentaram concentrações de carotenoides ProVA significativamente menores do que nos grãos, sendo a menor redução observada para a canjica (25,9%) e maior para o creme (42,5%) (Tabela 2). Entretanto, resultado diferente foi reportado quando grãos de milho biofortificado com ProVA desenvolvido na Zâmbia foram processados a farinha integral de milho (*mealie meal*) e milho descascado (*samp*), a primeira obtida por moagem direta dos grãos em moinho tipo martelo com peneira de 8 mm de abertura e a segunda, por condicionamento em água seguido de decorticação em descascadora (Mugode et al., 2014). No estudo africano, não foi notada alteração na concentração de carotenoides em relação aos grãos após o processamento. A diferença nos resultados nos dois estudos para retenção de carotenoides pode ser atribuída aos diferentes processos aplicados aos grãos e também

à composição de carotenoides das cultivares de milho biofortificadas. No processamento via moagem a seco utilizada no presente estudo para obtenção do fubá e do creme a partir do endosperma (canjica), os grãos foram degerminados e decorticados em degerminador de faca, separando o endosperma, o germe e o pericarpo, sendo a moagem realizada em moinho tipo martelo, composto de dois moinhos, o segundo de alta potência. Portanto, matrizes e moinhos com distintas ações mecânicas foram utilizados nos dois processamentos. O uso do moinho de maior atrito tende a promover maior ruptura da estrutura celular da matriz, expondo os pigmentos carotenoides à degradação oxidativa (Alves et al., 2008). Ademais, a maior parte dos carotenoides no milho está armazenada no endosperma (Li et al., 2007), especificamente na camada de aleurona e no endosperma vítreo (Paes, 2008). Quanto maior a retirada da camada de aleurona na decorticação, maior seria a redução na concentração de carotenoides no derivado. Além disso, a eliminação do gérmen antes da moagem pode explicar parte da redução no teor de carotenoides observada para a canjica e seus derivados da moagem via seco em relação à moagem de grãos integrais em farinha (*mealie meal*) e do *samp*, já que o gérmen do grão de milho, embora represente apenas 11% do grão (Watson, 2003), contém carotenoides (Blessin et al. 1963;

Tabela 2. Concentrações médias de carotenoides precursores de vitamina A nos grãos do milho biofortificado BRS 4104 e a redução percentual observada nesses compostos nos produtos derivados da moagem via seca.

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

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. Erro padrão: 0,079

Cardoso et al., 2007; Ndolo & Beta, 2013) e também tocoferóis (Gwirtz & Garcia-Casal, 2014), estes antioxidantes naturais que contribuem para prevenir a oxidação não enzimática de carotenoides. As diferenças entre a retenção de carotenoides ProVA na canjica observada nos dois estudos, 108% para *samp* e 74,2% para canjica, poderiam ser atribuídas à degerminação e aos diferentes equipamentos utilizados na degerminação/decorticação. No caso da canjica, foi utilizado degerminador de faca, enquanto para *samp* usou-se um descascador com discos abrasivos com preservação do gérmen, que poderiam ter causado diferentes resultados na extração da camada de aleurona e na composição de carotenoides dos produtos.

Para a obtenção do creme de milho a partir da canjica, o processamento promove ainda maior atrito das partículas do endosperma dentro do moinho do que aquele para o fubá, portanto, maior ação mecânica sobre células do endosperma, favorecendo a exposição dos amiloplastos onde estão armazenados os carotenoides (Matioli & Rodriguez-Amaya, 2002). Durante o processamento, a parede celular que protege os carotenoides da ação degradativa por oxidação, isomerização e ação enzimática, pode ser rompida, assim, o menor tamanho das partículas observadas no creme, decorrente de maior exposição ao moinho no processo de moagem, em relação ao fubá, promove um aumento na superfície de contato, permitindo maior exposição do produto a fatores externos envolvidos na degradação de carotenoides, como o oxigênio. Variação de tempo e temperatura na moagem, menores na produção da farinha integral e maiores para a moagem aplicada nos grãos moídos via seco na indústria, também podem ter contribuído para maior degradação dos carotenoides (Rodriguez-Amaya, 1997; Rodriguez-Amaya et al.,

2006) no fubá e creme em relação à farinha de milho integral, conseqüentemente, resultando em diferentes índices de retenção. Em contrapartida, os carotenoides presentes na canjica e no fubá integral permaneceriam menos expostos a esses fatores adversos, já que as estruturas celulares que os protegem estariam mais preservadas após o processamento em relação ao creme de milho.

Retenção de carotenoides durante o armazenamento dos produtos de milho biofortificado

As variáveis carotenoides totais, carotenoides ProVA, α -caroteno, β -caroteno, luteína, zeaxantina e 9-cis- β -caroteno apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para a interação dos fatores produtos e tempo de armazenamento, conforme apresentado na Tabela 3. O efeito da interação não foi significativo ($p > 0,05$) para as variáveis β -criptoxantina e 13-cis- β -caroteno, evidenciando que essas são independentes e, portanto, foram analisadas separadamente. Após o desdobramento, foi aplicada a análise de regressão para o fator tempo dentro dos produtos das equações resultantes da análise de regressão. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

A retenção real das variáveis carotenoides totais e carotenoides ProVA, obtidos em função do tempo de armazenamento, foi significativamente diferente para os três produtos ($p < 0,05$).

Em relação aos carotenoides totais, o índice de retenção observado no 24º dia de armazenamento para canjica foi de 98,56%, sendo que os dados não se ajustaram ao modelo de regressão definido para esse produto. A retenção estimada ao final do período avaliado é próxima a 100%, sugerindo que as perdas de CT são inexpressivas para esse produto durante o

Tabela 3. Síntese da análise de variância (ANOVA) do efeito do armazenamento e derivados de milho sobre as variáveis estudadas no experimento.

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

** significativo a 5% de probabilidade.

NS=não significativo.

Tabela 4. Equações obtidas por análise de regressão e seus respectivos coeficientes de correlação, geradas a partir dos dados de retenção de carotenoides observados em derivados de milho biofortificados durante o armazenamento por 24 dias.

Carotenoides	Produto	Equação	R ²
Carotenoides totais	canjica	Y= -0,167x + 102,57	0,21 NA
	fubá	Y= -0,7045x + 104,76	0,73
	creme	Y= -0,5893x + 102,59	0,87
Carotenoides ProVA	canjica	Y= -0,46x + 98,66	0,70
	fubá	Y= -0,9397x + 98,23	0,94
	creme	Y= -0,7417x + 98,37	0,95
Luteína	fubá	Y= -0,5509x + 105,57	0,49 NA
Zeaxantina	fubá	Y= -0,62x + 107,95	0,51 NA
	creme	Y= -0,60x + 104,43	0,99
	canjica	Y= -0,49x + 97,31	0,21 NA
α-caroteno	fubá	Y= -0,91x + 98,74	0,91
	creme	Y= -0,75x + 98,12	0,98
β-caroteno	canjica	Y= -0,51x + 98,19	0,72
	fubá	Y= -1,07x + 97,84	0,96
	creme	Y= -0,88x + 97,96	0,95
9-cis-β-caroteno	fubá	Y= -0,74x + 98,05	0,88
	creme	Y= -0,54x + 98,39	0,94
13-cis-β-caroteno	produtos	Y= -0,58x + 100,14	0,91
β-criptoxantina	produtos	Y= -0,71x + 98,53	0,91

*NA = não ajustado ao modelo linear

período de estocagem.

A análise de regressão com ajuste significativo indicou tendência linear negativa para a retenção de carotenoides ProVA nos três derivados (canjica, fubá e creme de milho) (Figura 3). Observa-se que, ao final do período de armazenamento, a canjica foi o derivado que mostrou essa evolução menos acentuada e, conseqüentemente, maior retenção de carotenoides ProVA durante o período de estocagem. Para o fubá e o creme de milho foram estimados índices de retenção de 75,67% e 80,58%, respectivamente, ao 24º dia, indicando menor estabilidade destes produtos durante o armazenamento.

Os derivados canjica e creme não apresentaram

variação significativa de retenção de luteína ao longo do armazenamento, portanto, o armazenamento não influenciou os índices de retenção desse composto durante o período avaliado. Para o fubá não houve ajuste de dados ao modelo em regressão do tipo linear.

Para a variável zeaxantina (Figura 4), os índices foram significativamente diferentes para fubá e creme de milho, não havendo, entretanto, o ajuste dos dados ao modelo proposto para canjica, sendo plotada a linha da média de retenção. No 24º dia de armazenamento as retenções de zeaxantina foram 93,05% para fubá e 89,92% para creme de milho, sugerindo perdas relativamente pequenas desta xantofila duran-

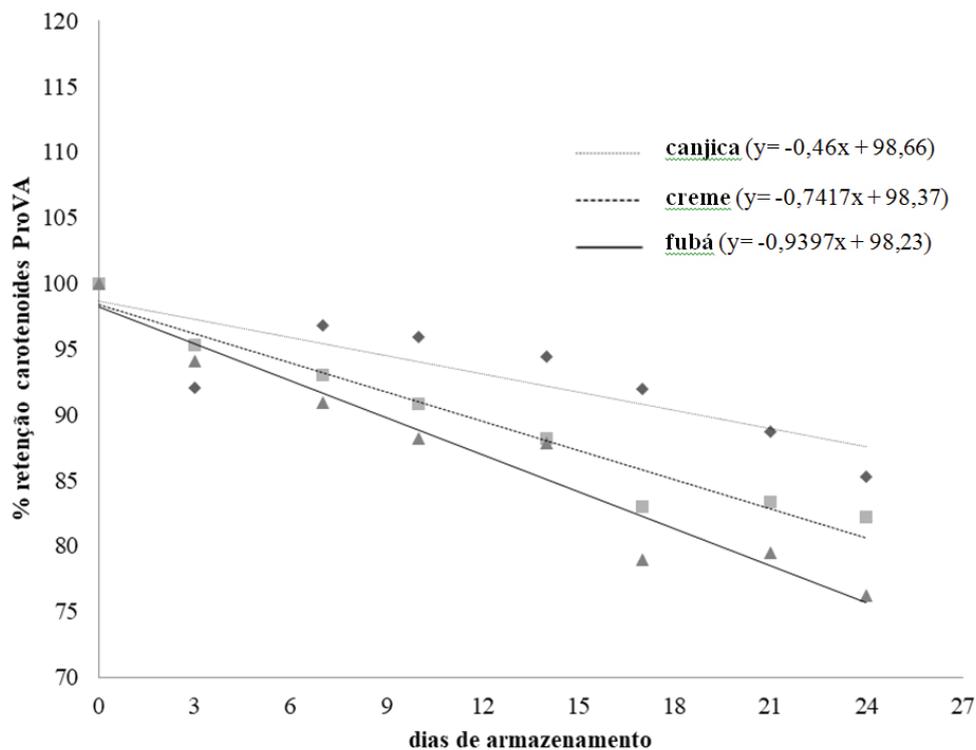


Figura 3. Variação da retenção real de carotenoides precursoros de vitamina A (ProVA) durante o armazenamento por 24 dias dos produtos obtidos da moagem via seca do milho biofortificado BRS 4104 a 27 °C com luz por 14h/dia.

te o período estudado.

Efetuada a regressão para a variável β -criptoxantina (Figura 5), verificou-se no tempo tendência de redução linear semelhante na retenção deste carotenoide para produtos obtidos da moagem via seca dos grãos do milho BRS 4104, com estimativa de 80,97% de retenção real ao final do período. No caso do fator produto, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade e os índices de retenção de β -criptoxantina foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os três derivados. Os valores médios de retenção real de β -criptoxantina observados foram 92,70%, 87,40% e 89,81% para canjica, fubá e creme, sendo as médias diferentes entre si a 5% probabilidade.

Os índices percentuais de retenção real da variável α -caroteno, obtidos em função do tempo de armazenamento, foram significativamente diferentes para os três produtos ($p < 0,05$) (Tabela 3), porém, somente os dados de fubá e creme foram ajustados ao modelo linear definido (Figura 6). Os índices de retenção deste carotenoide estimados ao final do 24º dia de armazenamento para fubá e creme de milho foram 76,9% e 80,12%, respectivamente.

Para o β -caroteno (Figura 7) os índices de retenção foram diferentes entre os produtos no tempo, sendo ao final do período do armazenamento estimados 85,94%, 72,16% e 76,73% para canjica, fubá e creme, respectivamente.

Os *cis*-isômeros dos carotenoides foram considerados no monitoramento da degradação (Khachik et al., 1992), uma vez que as formas usualmente presentes na natureza são os isômeros *trans*, mais estáveis. A isomerização geométrica pode ocorrer por ação deletéria da luz ou por isomerases expostas por rompimento das estruturas celulares (Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004). Para carotenoides precursores de vitamina A, a isomerização tem grande importância

nutricional, pois a configuração *cis* confere menor atividade vitamínica em comparação ao *trans* (Santana et al., 1998). Durante o armazenamento dos produtos da moagem do milho biofortificado BRS 4104, foi observada redução na retenção de 9-*cis*- β -caroteno (Figura 8) para os produtos fubá e creme e 13-*cis*- β -caroteno (Figura 9) de forma semelhante para os três derivados avaliados no tempo. Possivelmente os *cis*-isômeros formados durante a moagem sofreram degradação e tiveram sua concentração reduzida ao longo da armazenagem, à semelhança do *trans*- β -caroteno.

Considerando as concentrações dos carotenoides ProVA nos produtos derivados da moagem imediatamente após o processamento, a redução total dessas substâncias em relação ao grão foi de 35,9%, 43,6% e 52,5%, respectivamente para canjica, fubá e creme de milho até o final do período de estocagem.

A maior retenção de xantofilas (luteína e zeaxantina), identificados como os principais carotenoides reportados no milho comum (Li et al., 2007; Lozano-Alejo et al., 2007; Harjes et al., 2008; Burt et al., 2010; Pillay et al., 2011) e também no BRS 4104 e outros milhos biofortificados (Pillay et al., 2011; Mugode et al., 2014), e a menor retenção para os carotenos precursores de vitamina A, observadas no presente estudo após processamento e armazenamento nos produtos, permitem inferir que genótipos de milho biofortificados ou comuns, com semelhante composição de carotenoides (% de determinado carotenoide em relação ao total de carotenoides), especialmente para percentual de xantofilas e β -criptoxantina, possivelmente apresentem mesma susceptibilidade ao processamento. Entretanto, genótipos de milho com maior concentração de carotenos nos grãos podem apresentar distinta resposta para efeito de fatores como processamento e armazenamento de derivados,

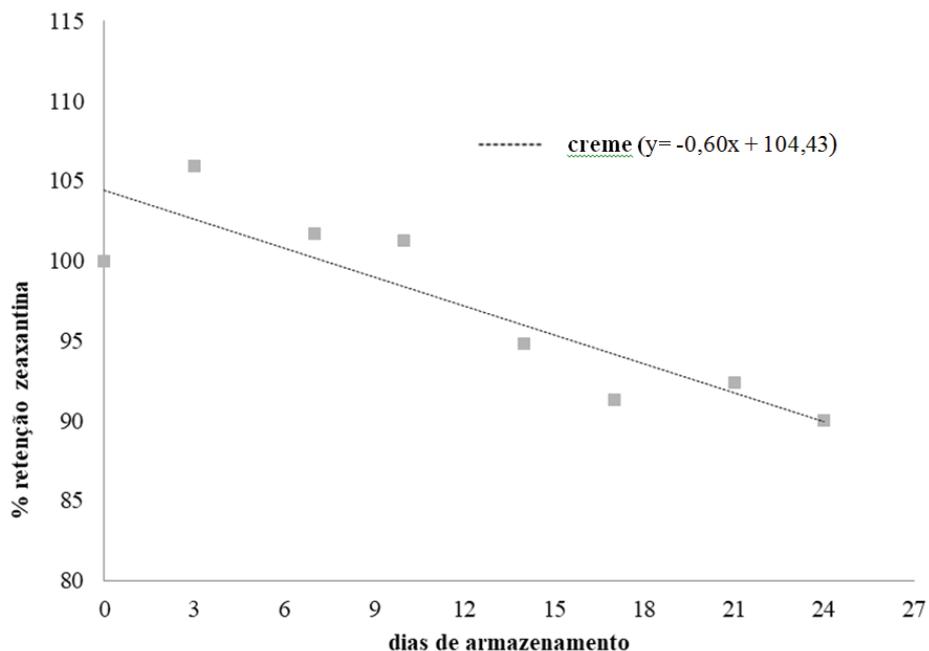


Figura 4. Variação da retenção real de zeaxantina durante o armazenamento por 24 dias do creme de milho biofortificado a 27 °C com luz por 14h/dia.

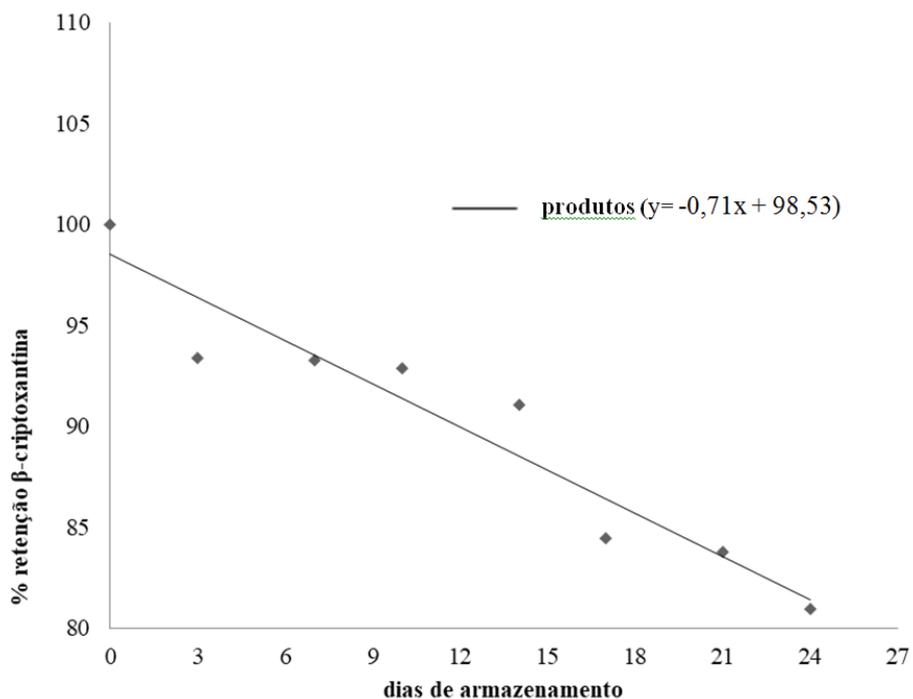


Figura 5. Variação da retenção real de beta-criptoxantina durante o armazenamento de todos os produtos da moagem via seca de milho biofortificado BRS 4104 a 27 °C com luz por 14h/dia.

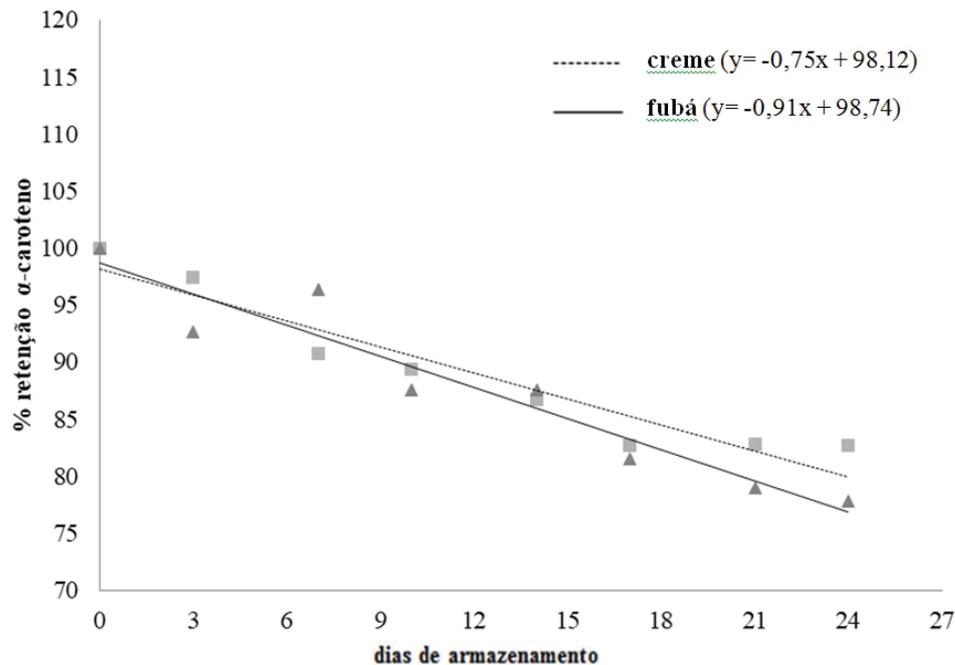


Figura 6. Variação da retenção real de α -caroteno durante o armazenamento de creme e fubá obtidos da moagem via seca do milho biofortificado BRS 4104 a 27 °C com luz por 14h/dia.

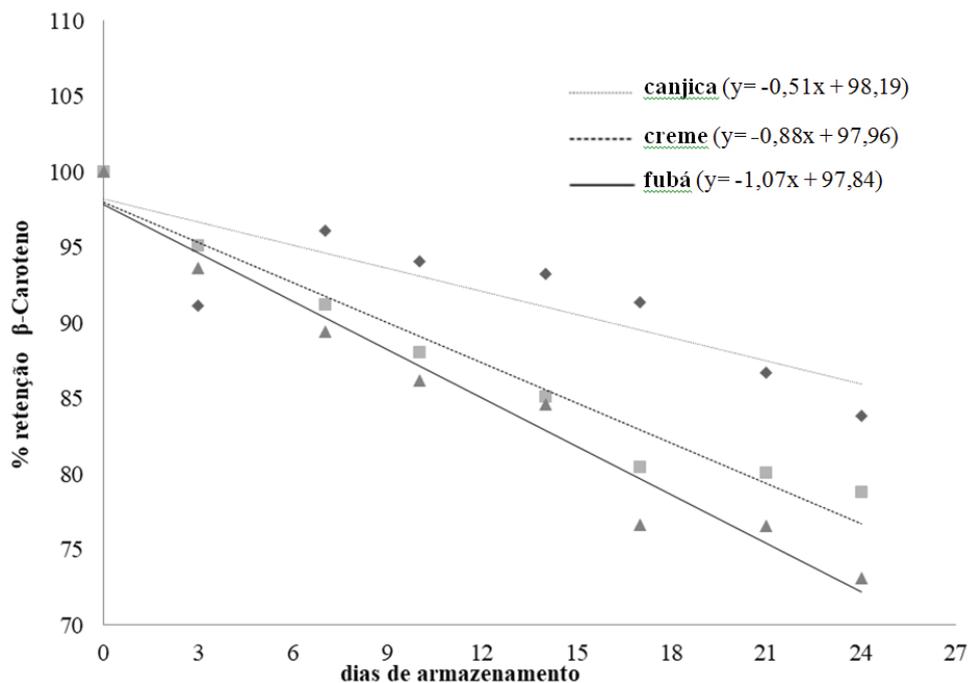


Figura 7. Variação da retenção real de β -caroteno durante o armazenamento de derivados da moagem via seca de milho biofortificado BRS 4104 a 27 °C com luz por 14h/dia.

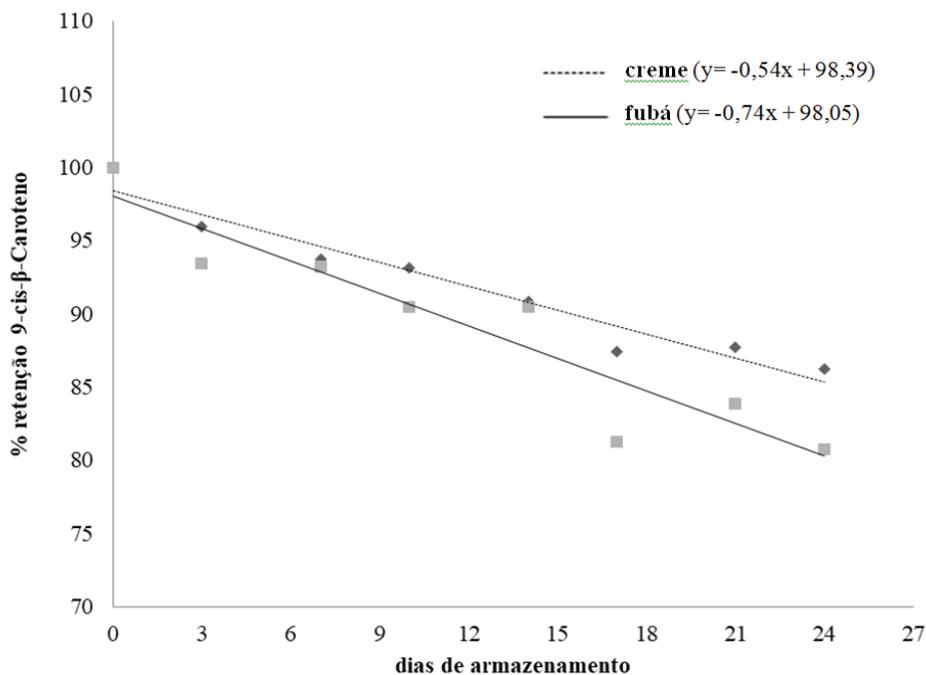


Figura 8. Variação da retenção real de 9-cis-β-caroteno durante o armazenamento por 24 dias dos produtos fubá e creme de milho biofortificado BRS 4104 a 27 °C com luz por 14h/dia.

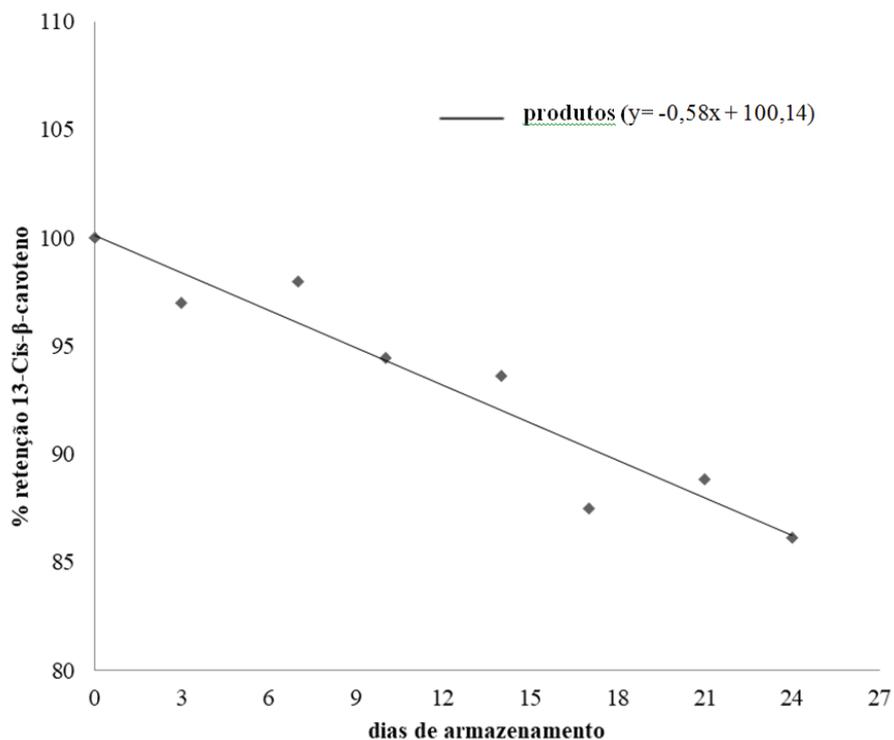


Figura 9. Variação da retenção real de 13-cis-β-caroteno durante o armazenamento por 24 dias para produtos de milho biofortificado BRS 4104 a 27 °C com luz por 14h/dia.

comparados a outras cultivares de milho.

O efeito mais expressivo do armazenamento sobre a retenção de carotenoides totais observado nos produtos fubá e creme, quando comparados à canjica, pode ser justificado pelo fato desses pigmentos, após a desintegração da matriz e o rompimento de sua estrutura celular, permanecerem mais expostos a fatores adversos do meio, como a presença de oxigênio e a luz durante a estocagem. A embalagem utilizada nas amostras foi o polietileno de baixa densidade, sem barreira à luminosidade, e com permeabilidade ao oxigênio em torno de 20%, que contribuiu para a exposição dos carotenoides aos fatores adversos mencionados anteriormente. Assim, o tipo e a característica da embalagem utilizada podem ter contribuído para a troca de gases e vapor de água com o ambiente, e conseqüentemente para a degradação dos carotenoides. Considerando ser a vida de prateleira destes derivados do milho no mercado de 180 dias, é provável que variações ainda maiores possam ocorrer durante período superior a 24 dias, e as perdas de carotenoides, ainda, podem ser potencializadas se as condições de armazenamento não forem as ideais, chegando possivelmente a um patamar de estabilização, como observado por Burt et al. (2010) para grãos secos de milho com elevadas concentrações de carotenoides estocados por seis meses.

Reduções significativas na retenção de carotenoides ProVA ocorreram em tempos de armazenamento inferiores aos que os produtos derivados da moagem a seco de milho usualmente permanecem estocados no comércio local, que compreende cerca de 20 dias, bem como do prazo de validade desses produtos estipulados pela indústria de 180 dias (dados fornecidos pela Farsete). Os resultados encontrados no presente trabalho possibilitam inferir que a vida de prateleira dos produtos de milho avaliados deve

ser menor do que a estipulada pela indústria, conseqüência, nesse caso específico, da redução de seu valor nutricional em relação aos carotenoides. Como estes conferem cor amarela aos produtos de milho, a degradação desses compostos pode afetar também a cor, um atributo desejável pelos consumidores para esses produtos (Meléndez-Martínez et al., 2007). Essa informação é importante uma vez que a vida de prateleira de um produto está diretamente ligada ao planejamento de produção e armazenamento dele. Do mesmo modo, as perdas de carotenoides poderiam ser minimizadas com o uso de outros tipos de embalagem com barreira à luz, ao oxigênio e ao vapor de água.

Conclusão

O processamento via moagem a seco dos grãos de milho biofortificado com carotenoides precursores da vitamina A resulta em menor retenção de carotenoides em canjica, fubá e creme de milho, com menores concentrações dessas substâncias nos derivados obtidos a partir dos grãos. O creme de milho é o produto que apresenta os menores índices de retenção real para carotenoides totais e carotenoides ProVA quando comparado à canjica e ao fubá. Há estimativa de diminuição linear da retenção de carotenoides totais para fubá e creme de milho e de carotenoides ProVA para todos os produtos ao longo do período de 24 dias de armazenamento. Considerando a redução da concentração destas substâncias após 24 dias de estocagem em embalagem de polietileno comercial, um tempo menor de vida de prateleira em relação ao praticado pela indústria deve ser adotado para derivados de milho biofortificados com ProVA, afim de preservar a composição de carotenoides, especialmente quando esses produtos forem destinados a programas nutricionais focados na redução da deficiência de vi-

tamina A em humanos.

Referências

- ALVES, C. C. O.; RESENDE, J. V.; CRUVINEL, R. S. R.; PRADO, M. E. T. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenoides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) liofilizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 830-839, 2008. DOI: [10.1590/S0101-20612008000400011](https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400011).
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTRY - AACC. **Approved methods of analysis**. 11th ed. St. Paul, 2000.
- ARAÚJO, J. M. S. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 416 p.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*). **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 16, n. 6, p. 647-657, 2003. DOI: [10.1016/S0889-1575\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00098-X).
- BLESSIN, C. W.; BRECHER, J. D.; DIMLER, R. J. Carotenoids of corn and sorghum. V. Distribution of xanthophylls and carotenes of yellow dent corn. **Cereal Chemistry**, v. 40, p. 582-586, 1963.
- BRS 4104: milho pró-vitamina A: saúde à vista. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 1 folder Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/960382>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- BURT, A.; GRAINGER, C.; YOUNG, C.; SHELP, B.; LEE, E. Impact of postharvest handling on carotenoid concentration and composition in high-carotenoid maize (*Zea mays L.*) kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8286-8292, 2010. DOI: [10.1021/jf100161r](https://doi.org/10.1021/jf100161r).
- BUTT, M. S.; RASOOL, J.; SHARIF, K. Preparation and characterization of cake rusks by using red palm oil fortified shortening. **Food Science and Technology International**, London, v. 12, n. 1, p. 85-90, 2006. DOI: [10.1177/1082013206062506](https://doi.org/10.1177/1082013206062506).
- CARDOSO, W. S.; RIOS, S. A.; PAES, M. C. D.; BORÉM, A.; GUIMARÃES, P. E. de O.; SCHAFFERT, R. E.; GOMES, E. A. Carotenoides totais nas principais frações dos grãos de diferentes cultivares de milhos. In: REUNIÃO ANUAL DE BIOFORTIFICAÇÃO NO BRASIL, 2., 2007, Niterói. **Posteress**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2007.
- CARDOSO, W. S.; PAES, M. C. D.; GALVÃO, J. C. C.; RIOS, S. de A.; GUIMARÃES, P. E. de O.; SCHAFFERT, R. E.; BOREM, A. Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 164-172, 2009. DOI: [10.1590/S0100-204X2009000200008](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000200008).
- ÇINAR, I. Carotenoid pigment loss of freeze-dried plant samples under different storage conditions. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 37, n. 3, 363-367, 2004. DOI: [10.1016/j.lwt.2003.10.006](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.006).
- DHLIWAYO, T.; PALACIOS-ROJAS, N.; CROSSA, J.; PIXLEY, K. V. Effects of S1 Recurrent selection for provitamin A carotenoid content for three open-pollinated maize cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 54, n. 6, p. 2449-2460, 2014. DOI: [10.2135/cropsci2013.11.0764](https://doi.org/10.2135/cropsci2013.11.0764).
- FAO. **Food and agriculture data**. Roma, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- FERREIRA, D. F. **Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/~danielff/dff02.htm>. Acesso em: 12 fev. 2017.
- FRAZER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004. DOI: [10.1016/j.plipres.2003.10.002](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002).
- GWIRTZ, J. A.; GARCIA-CASAL, M. N. Processing maize flour and corn meal food products. **Annals of the**

- New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 66-75, 2014. DOI: [10.1111/nyas.12299](https://doi.org/10.1111/nyas.12299).
- HARJES, C. E.; ROCHEFORD, T. R.; BAI, L. B. T. P.; KANDIANIS, C. B.; SOWINSKI, S. G.; STAPLETON, A. E.; VALLABHANENI, R.; WILLIAMS, M.; WURTZEL, E. T.; YAN, J.; BUCKLER, E. S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. **Science**, v. 319, p. 330-333, 2008. DOI: [10.1126/science.1150255](https://doi.org/10.1126/science.1150255).
- HULSHOF, P. J. M.; KOSMEIJER-SCHUIL, T.; WEST, C. E.; HOLLMAN, P. C. H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 8, p. 655-661, 2007. DOI: [10.1016/j.jfca.2006.04.014](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.014).
- INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE - IITA. **New varieties to boost maize output in West and Central Africa**. Ibadan, 2010. Disponível em: http://old.iita.org/cms/details/news_details.aspx?articleid=3286&zoneid=81. Acesso em: 12 nov. 2017.
- JANICK-BUCKNER, D.; HAMMOCK, D. J.; JOHNSON, J. M.; OSBORN, J. M.; BUCKNER, B. Biochemical and ultrastructural analysis of the y10 mutant of maize. **Journal of Heredity**, Washington, v. 90, n. 5, p. 507-513, 1999. DOI: [10.1093/jhered/90.5.507](https://doi.org/10.1093/jhered/90.5.507).
- KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; GOLI, M. B. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 61-80, 1991. DOI: [10.1351/pac199163010071](https://doi.org/10.1351/pac199163010071).
- KHACHIK, F.; GOLI, M. B.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J.; LUSBY, W. R.; TENORIO, M. D.; BARRERA, M. R. Effects of food preparation on quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 3, p. 390-398, 1992. DOI: [10.1021/jf00015a006](https://doi.org/10.1021/jf00015a006).
- KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 5, p. 1948-1995, 1999. DOI: [10.1021/jf981029d](https://doi.org/10.1021/jf981029d).
- LI, S.; TAYIE, F.; YOUNG, M.; ROCHEFORD, T.; WHITE, W. Retention of provitamin A carotenoids in high β -carotene maize (*Zea mays* L.) during traditional African household processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 26, p. 10744-10750, 2007. DOI: [10.1021/jf071815v](https://doi.org/10.1021/jf071815v).
- LOZANO-ALEJO, N.; CARRILO, G. V.; PIXLEY, K.; PALACIOS-ROJAS, N. Physical properties and carotenoid contents of maize kernels and its nixtamalized snacks. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 385-389, 2007. DOI: [10.1016/j.ifset.2007.03.015](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.015).
- MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: estudo da estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 5, n. 99, p. 197-203, 2002.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 3, p. 1145-1150, 2007. DOI: [10.1016/j.foodchem.2006.03.015](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.015).
- MENKIR, A.; LIU, W.; WHITE, W. S.; MAZIYA-DIXON, B.; ROCHEFORD, T. Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. **Food Chemistry**, London, v. 109, n. 3, p. 521-529, 2008. DOI: [10.1016/j.foodchem.2008.01.002](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.002).
- MENKIR, A.; MAZIYA-DIXON, B.; MENGESHA, W.; ROCHEFORD, T.; ALAMU, E. O. Accruing genetic gain in pro-vitamin A enrichment from harnessing diverse maize germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 213, n. 105, p. 1-12, 2017. DOI: [10.1007/s10681-017-1890-8](https://doi.org/10.1007/s10681-017-1890-8).
- MOZAFFARIEH, M.; SACU, S.; WEDRICH, A. The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: a review based on controversial evidence. **Nutrition Journal**, v. 2, n. 20,

p. 1-8, 2003.

DOI: [10.1186/1475-2891-2-20](https://doi.org/10.1186/1475-2891-2-20).

MUGODE, L.; HA, B.; KAUNDA, A.; SIKOMBE, T.; PHIRI, S.; MUTALE, R.; DAVIS, C.; TANUMIHARDJO, S.; MOURA, F. F. de. Carotenoid retention of biofortified provitamin a maize (*Zea mays* L.) after Zambian traditional methods of milling, cooking and storage. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 27, p. 6317-6325, 2014.

DOI: [10.1021/jf501233f](https://doi.org/10.1021/jf501233f).

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.

DOI: [10.1021/jf60202a021](https://doi.org/10.1021/jf60202a021).

NDOLO, V. U.; BETA, T. Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1/4, p. 663-671, 2013.

DOI: [10.1016/j.foodchem.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.014).

NUSS, E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: a paramount staple crop in the context of global nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 417-436, 2010.

DOI: [10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x](https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x).

OLSON, J. A. Carotenoids. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. (Ed.). **Modern nutrition in health and disease**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. p. 525-541.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grãos de milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 2, p. 47-61.

PAES, M. C. D.; SANT'ANA, R. de C. O.; VOLPI, B. D. Características físicas e químicas do grão de milho. In: BORÉM, A.; RIOS, S. de A. (Org.). **Milho biofortificado**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. cap. 3, p. 45-86.

PILLAY, K.; SIWELA, M.; DERERA, J.; VELDMAN, F. J. Provitamin A carotenoids in biofortified maize and their retention during processing and preparation of South African maize foods. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 51, n. 4, p. 634-644. 2011.

DOI: [10.1007/s13197-011-0559-x](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0559-x).

PIXLEY, K.; PALACIOS-ROJAS, N.; BABU, R.; MUTALE, R.; SURLES, R.; SIMPUNGWE, E. Biofortification of maize with provitamin A carotenoids. In: TANUMIHARDJO, S. A. (Ed.). **Carotenoids and human health**. New York: Springer Science, 2013. p. 271-293.

DOI: [10.1007/978-1-62703-203-2_17](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-203-2_17).

RIOS, S. de A.; PAES, M. C. D.; CARDOSO, W. S.; BORÉM, A.; TEIXEIRA, F. F. Color of corn grains and carotenoid profile of importance for human health. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 6, p. 857-862, 2014.

DOI: [10.4236/ajps.2014.56099](https://doi.org/10.4236/ajps.2014.56099).

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation**: the retention of provitamin carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Washington: USAID, 1997. Disponível em: <<http://www.mostproject.org/PDF/carrots2.pdf>> Acesso em: 25 set. 2017.

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

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: 12 nov. 2017.

SANTANA, H. M. P.; STRINHETAB, P. C.; BRANDÃO, S. C. C.; AZEVEDO, R. M. C. de. 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, 1998.

DOI: [10.1016/S0308-8146\(97\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00084-8).

WATSON, S. A. Description, development, structure, and composition of the corn kernel. In: WHITE, P. J.; JOHNSON, L. A. (Ed.). **Corn: chemistry and technology**.

St. Paul: AACC Headquarters, 2003. p. 69-106.

ZAPATA-CALDAS, E.; HYMAN, G.; PACHÓN, H.; MONSERRATE, F.; VESGA, L. **Identificación de sitios candidatos para la biofortificación de cultivos en latinoamérica y el Caribe**. 2008. Disponível em: <<http://sites.google.com/a/cgiar.org/sitios-candidatos-para-la-biofortificaci-n/Home>>. Acesso em: 14 jun. 2017.