

COMUNICADO  
TÉCNICO

240

Sete Lagoas, MG  
Novembro, 2019

**Embrapa**

# Metodologia Científica: Determinação de Carotenoides em Milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Maria Cristina Dias Paes  
Fabiano Okumura  
Cristiane de Carvalho Guimarães

# Metodologia Científica: Determinação de Carotenoides em Milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência <sup>1</sup>

## Introdução

Os carotenoides constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais, apresentando ampla distribuição, diversidade estrutural e inúmeras funções (Rock et al., 1996; Ribeiro; Seravalli, 2004). Com mais de 600 estruturas químicas já caracterizadas, aproximadamente 50 deles possuem atividade biológica, entre elas atividade antioxidante, transporte de oxigênio e atividade pró-vitamínica A, sendo  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina os mais investigados quanto à relação com a saúde humana (Rodriguez-Amaya et al., 2006; Zed; Mehmood, 2004). O milho é uma importante fonte de carotenoides, especialmente das xantofilas zeaxantina e luteína (Hulshof et al., 2007; Li et al., 2007; Menkir et al., 2008; 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,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, considerados carotenoides precursores da vitamina A, também estão presentes nos grãos deste cereal (Cardoso et al., 2009; Mugode et al., 2014; Rios et al., 2014). Para determinar as concentrações individuais destes compostos no milho é necessária a extração em solvente e posterior análise do extrato obtido por CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (DAD)) (Rodriguez-Amaya; Kimura, 2004; Paes et al., 2018). Alguns protocolos já publicados referente à mesma matriz envolvem o uso de outros solventes, outras colunas e maior tempo de corrida, a exemplo dos publicados por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004) e Kurilich e Jovic (1999), restringindo o número de amostras analisadas por dia. Outros métodos são aplicados ainda a outras matrizes, cujas composições de carotenoides são distintas do milho (Murphy et al., 1975). O procedimento apresentado neste documento foi validado para uso em amostras de grãos de milho. Na

<sup>1</sup>Nutricionista, Ph.D em Ciências de Alimentos e Nutrição Humana, Analista da Embrapa Milho e Sorgo; Bacharel e licenciado em Química, Doutor em Ciências, Analista da Embrapa Pecuária Sudeste; Bacharel em Química, Mestre em Química Analítica, Analista da Embrapa Milho e Sorgo.

validação foi utilizada amostra controle de ensaio internacional e comparação a outros métodos já validados para a mesma matriz (Rodriguez-Amaya; Kimura, 2004; Tanumihardjo, 2006).

## Materiais / Reagentes/ Equipamentos

### Materiais

- Balões de fundo redondo de 125 mL.
- Balão volumétrico de 100 mL.
- Bastões de vidro.
- Barquinhas para pesagem de reagentes em poliestireno de alta densidade, material estático, cor branca, dimensões 80 x 80 mm.
- Béquer de plástico de 250 mL.
- Béqueres de vidro borossilicato de 400 e 600 mL.
- Caixa de isopor com tampa.
- Dispensador de líquidos de volume 1 a 10 mL.
- Dispensador de líquidos de volume 0,5 a 5 mL.
- Espátulas de aço.
- Filme de vedação para uso em laboratório (Parafilm M).
- Filtro de seringa PTFE, diâmetro 13 mm e 0,45 µm de poro.
- Frascos de plástico de 50 e 100 mL com tampa rosqueável.
- Frasco de vidro âmbar de 1000 mL com tampa rosqueável e vedação.
- Micropipetas de 1000, 2000 e 5000 µL.
- Papel alumínio.
- Papel de pesagem de amostras gramatura 40 g/m<sup>2</sup>, espessura 0,03 mm e dimensões 9x11,5 cm.
- Pipetas de Pasteur de vidro.
- Pipetador para pipetas de Pasteur de borracha para volume de 5 mL.
- Pipetas de dispenser múltiplo de 1 a 5 mL.
- Pissetas para água e solventes orgânicos.
- Ponteiras de micropipetas de 500 e 1000 µL.
- Provetas de 50, 100, 500 e 1000 mL.
- Rolhas de silicone tipo 8 (26 ´ 21 ´ 31 mm).
- Sacos plásticos com vedação tipo “zip bag” ou envelopes de papel com revestimento interno plástico para amostras.
- Seringas descartáveis de 5 mL.
- Suporte tipo estante para tubos de vidro de 30 mm de diâmetro.

- Tubos de vidro de 50 mL com tampa rosqueável.
- Vials de vidro de 2 mL.

## Reagentes

- 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT).
- Acetona grau HPLC.
- Água deionizada.
- Ar comprimido.
- Etanol grau HPLC.
- Éter metil-terc-butil grau HPLC.
- Hidróxido de potássio P.A (KOH).
- Metanol grau HPLC.
- *n*-hexano grau HPLC.
- Nitrogênio gasoso ultrapuro 5.0.
- Padrões de carotenoides extraídos de fontes naturais (Pacheco, 2009) ou comercialmente disponíveis, sendo recomendados:
- *β-caroteno*: Premium beta-carotene, 25000UI, Swanson, USA
- *Zeaxantina*: Ultra zeaxanthin, 4mg, Swanson, USA
- *Luteína*: Ultra lutein, 10mg, Swanson, USA
- Para verificar a pureza deve-se injetar os padrões nas condições analíticas.

## Equipamentos

- Agitador de tubos tipo Vortex.
- Balança analítica com precisão de 0,001 g.
- Banho termostatizado.
- Bomba de vácuo.
- Capela de exaustão de gases.
- Centrífuga.
- Cronômetro digital.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com coluna cromatográfica YMC Carotenoid Column C30, 4,6 mm x 250 mm, 3 μm, forno e autoamostrador com ajuste de temperatura.
- Detector de arranjo de diodos (DAD).
- Micromoinho de rotor tipo ciclone acoplado com peneira de 0,5 mm.
- Rotaevaporador.

## Preparo De Soluções

### Solução de BHT 0,1% (m/v)

Pesar 0,500 g de BHT e transferir a massa para béquero de 600 mL. Adicionar 500 mL de etanol grau HPLC com o auxílio de uma proveta e homogeneizar a solução com bastão de vidro. Transferir

a solução para frasco âmbar de 1000 mL, identificado com as seguintes informações: nome da solução, concentração, data do preparo e nome de quem a preparou. Guardar em geladeira por até 60 dias.

## **Solução de KOH 80% (m/v)**

Pesar 80,000 g de KOH em um béquer de plástico de 250 mL e adicionar aproximadamente 50 mL de água deionizada com auxílio de uma proveta. Homogeneizar a solução com um bastão de vidro e aguardar a solução atingir a temperatura ambiente. Transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 100 mL. Utilizando uma pisseta, lavar o béquer com pequenas porções de água deionizada e transferir para o balão com cuidado para que o volume não ultrapasse a marca do menisco do balão. Homogeneizar a solução e transferir para frasco plástico com tampa rosqueável, identificado com as seguintes informações: nome da solução, concentração, data do preparo e nome de quem a preparou. Guardar o frasco contendo a solução em armário. Prazo de validade indeterminado.

## **Protocolo Analítico**

### **Preparo das amostras**

Moer imediatamente antes da análise, 15 g de grãos de milho de cada

amostra a ser analisada em moinho ciclone acoplado de peneira 0,5 mm de abertura tomando o cuidado de limpar adequadamente o moinho com pincel e ar comprimido entre a moagem das amostras. Coletar a amostra moída em frasco ou ziploc coberto com papel alumínio ou saquinho de papel com revestimento interno de plástico.

### **Extração de carotenoides das amostras**

Avolumar 100 mL de água deionizada em béquer e levar ao congelador. Ligar o banho termostatizado e ajustar a temperatura para 85 °C. Pesar em duplicata cerca de 0,600 g de cada amostra de milho a ser analisada, anotar a massa e transferir quantitativamente cada uma para tubo de ensaio de 50 mL com tampa rosqueável devidamente identificado. Utilizar suporte para manter em posição os tubos. Em capela de exaustão, com a luz desligada, dispensar 7 mL de solução BHT 0,1% (m/v) em etanol a cada tubo e agitar em agitador de tubos tipo vortex por 10 segundos em potência máxima. Desrosquear levemente a tampa dos tubos e colocar o suporte com eles dentro de banho termostatizado a 85 °C. Deixar por 5 minutos, utilizando cronômetro com alarme para controle do tempo. Após esse período, retirar o suporte com tubos do banho termostatizado e dispor sobre pano seco, drenando a água externa. Adicionar a cada tubo 2,00 mL de solução BHT 0,1% (m/v) em

etanol e 500 µl de solução KOH 80% (m/v). Fechar a tampa dos tubos e agitar o conteúdo em agitador tipo vortex por 10 segundos em potência máxima. Em seguida, desrosquear a tampa do tubo, mantendo-a sobre a borda. Retornar o suporte com os tubos de ensaio para o banho termostatizado a 85 °C por 5 minutos. Neste tempo preparar um banho de gelo e água em um béquer de 400 mL. Retirar os tubos do banho-maria e aguardar 1 minuto para os tubos resfriarem, transferindo os tubos para o banho de gelo, onde deverão ser mantidos por 2 minutos. Retirar os tubos do banho de gelo e adicionar 4 mL de água gelada. Em capela de exaustão, dispensar a cada tubo 7 mL de *n*-hexano para realizar a partição. Agitar o conteúdo em agitador tipo vortex por 10 segundos em potência máxima, seguido de centrifugação a 1200 rpm por 30 segundos. Serão formadas duas camadas, uma aquosa e outra hexânica contendo os carotenoides extraídos. Recolher a fase hexânica para um tubo de vidro de 50 mL recoberto com papel alumínio, utilizando pipeta de Pasteur. Deve ser feita a pipetagem da fase de hexânica com bastante cuidado para não coletar a fase aquosa. Se necessário, durante extrações, repetir a adição de *n*-hexano no tubo contendo etanol diversas vezes para garantir a total transferência dos carotenoides para o *n*-hexano. Esta etapa de adição do solvente deve ser repetida até que a fase de *n*-hexano da partição fique incolor. Caso o volume ultrapasse o volume do tubo de 50 mL, utilizar outros tubos de vidro adicionais para a mesma amostra.

Observar no fundo do tubo contendo *n*-hexano, se existir uma gota como água, isto é indício que passou KOH ao recolher a fase *n*-hexano, o que irá oxidar a amostra, impossibilitando a análise. Caso tenha ocorrido este problema, descartar a amostra.

Adicionar lentamente pela parede do tubo com *n*-hexano contendo carotenoides extraídos 2 mL de água deionizada. Haverá formação de duas fases. Transferir com auxílio de pipeta de Pasteur ou micropipeta a fase hexânica amarela superior para um balão de fundo redondo de 125 mL envolto em papel alumínio e identificado com a numeração da respectiva amostra sendo analisada. Deixar pequena quantidade da fase superior amarela no tubo para evitar coleta da fase aquosa ou da interface entre as duas fases. Repetir a adição de água, o que favorecerá a melhor visualização das fases e garantirá total coleta da fase hexânica contendo os carotenoides. Juntar este segundo coletado ao resultante da primeira coleta no balão. Se necessário repetir as etapas de adição da água deionizada e coleta da fase hexânica. Ao extrato hexânico de carotenoides no balão de fundo redondo, adicionar uma pequena quantidade de BHT (uma ponta de espátula de inox pequena) e evaporar o hexano em rotaevaporador, em rotação média e temperatura de 30 a 35 °C (observar a temperatura de evaporação do *n*-hexano no rótulo do solvente). Inertizar o extrato de carotenoides seco no balão com nitrogênio gasoso. Fechar o balão com rolha de silicone, vedar com filme de



vedação (Parafilm) e embrulhar toda a superfície com papel alumínio. Identificar o balão com a amostra. Armazenar a -18 °C, até a análise cromatográfica, se não for analisar no dia da extração. O tempo máximo de congelamento deverá ser dois dias.

A cada tubo de extrato seco em temperatura ambiente, adicionar uma alíquota de 750 µL de acetona pelas paredes do balão de forma lenta. Girar o balão de modo que o solvente escorra pelas paredes e solubilize parte do extrato que esteja aderida acima da linha de secagem. Repetir a adição de 750 µL de acetona uma vez mais. Tampar o balão com a rolha de Teflon e agitar lentamente em movimento circular o balão sem permitir a subida do extrato pelas paredes (todo o extrato solubilizado deve ser recolhido). Conectar a unidade filtrante de PTFE a uma seringa sem o êmbolo e com o auxílio da micropipeta transferir o extrato de acetona do balão para a seringa. Conectar o êmbolo na seringa e filtrar com cuidado o extrato para um vial de 2 mL. Fechar o vial com a tampa rosqueável e transportar para o carrossel do cromatógrafo em caixa de isopor se o equipamento estiver em outra sala, assim prevenindo incidência de luz nos vials. Injetar 25 µL para análise.

## Método cromatográfico

Preparar curva padrão de carotenoides conforme descrito em Rodriguez-Amaya e Kimura (2004) e Pacheco (2009). Utilizar padrões extraídos de

fontes naturais ou adquiridos comercialmente. A pureza dos padrões deve ser superior a 95%.

A curva analítica de 5 pontos em triplicata deve ser construída correlacionando concentração (µg) e área do pico. O intervalo de concentração deverá ser:

- Luteína: 0,016 a 0,265 µg
- Zeaxantina: 0,035 a 0,648 µg
- β-criptoxantina: 0,009 a 0,132 µg
- α-caroteno: 0,000625 a 0,010 µg
- β-caroteno: 0,006 a 0,102 µg

Para análise em CLAE-DAD com coluna YMC Carotenoid Column C30, 4,6 x 250 mm, 3 µm utilizar o seguinte sistema gradiente:

**Fase móvel:** Metanol: Éter metil-*tert*-butil

Gradiente de eluição:

0 min, 20% Éter metil-*tert*-butil

16 min, 60% Éter metil-*tert*-butil

16,01 min, 80% Éter metil-*tert*-butil

20 min, 20% Éter metil-*tert*-butil

**Fluxo:** 0,8 mL/min

**Temperatura da coluna:** 30 °C

**Temperatura do amostrador:** 4 °C

**Tempo de corrida:** 26 minutos

**Solução de limpeza da coluna:** Éter metil-*tert*-butil:metanol (80:20).

Os cromatogramas para os padrões devem apresentar perfil conforme apresentado nas **Figuras 1A a 1E**.

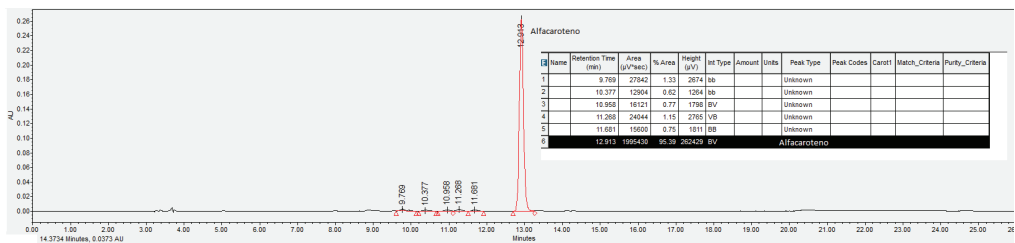


Figura 1A. Cromatograma obtido para  $\alpha$ -caroteno nas condições cromatográficas definidas no ensaio.

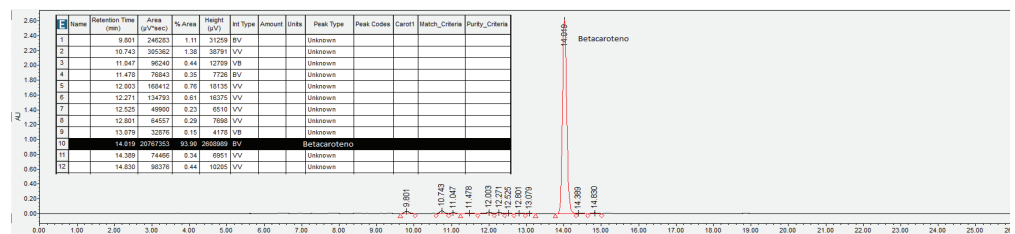


Figura 1B. Cromatograma obtido para  $\beta$ -caroteno nas condições cromatográficas definidas no ensaio.

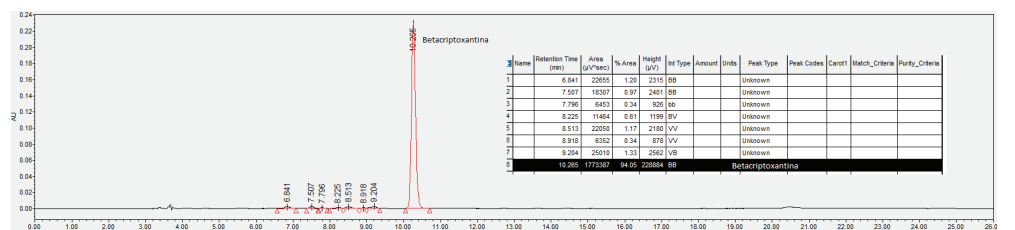


Figura 1C. Cromatograma obtido para  $\beta$ -criptoxantina nas condições cromatográficas definidas no ensaio.

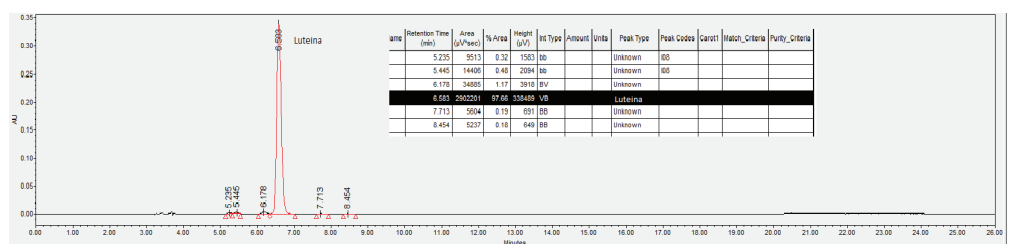


Figura 1D. Cromatograma obtido para luteina nas condições cromatográficas definidas no ensaio.

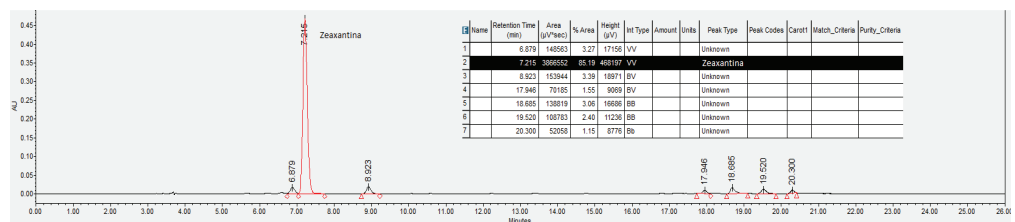


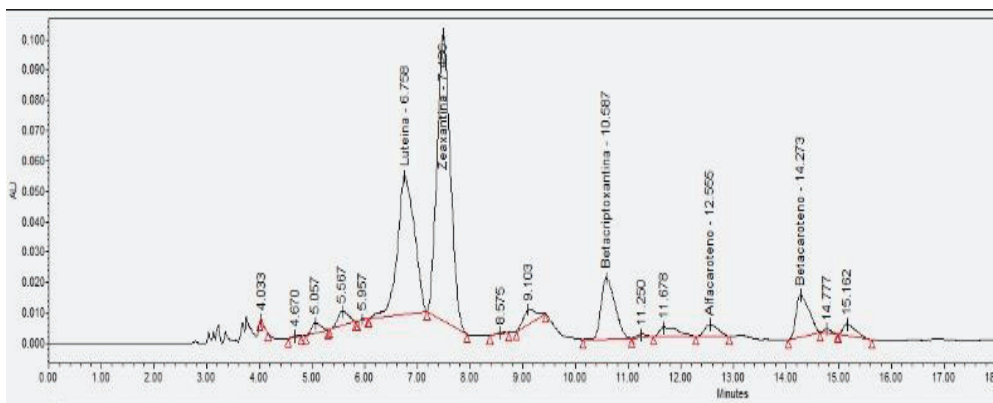
Figura 1E. Cromatograma obtido para zeaxantina nas condições cromatográficas definidas no ensaio.



O cromatograma obtido para o extrato de carotenoides de uma amostra de grãos de milho amarelo deve apresentar o padrão da **Figura 2**. A integração deve ser conduzida apenas para os principais carotenoides do milho (zeaxantina, luteína,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos), conforme os tempos de retenção e a ordem de eluição da curva padrão, confirmados pelos espectros de absorção na região do visível (próximo a 450 nm).

## Cálculos

Integrar as áreas dos picos conforme descrito em Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Anotar os valores das áreas, registrando na coluna ÁREA da planilha exemplificada na **Figura 3**.



**Figura 2.** Cromatograma do perfil de carotenoides obtido de amostra de grãos de milho.

Empower

$$f_x = (C2+37800)/(18100000)$$

$$f_x = (E2*1500)/(40*0,6007)$$

$$f_x = (G2)/(I2)*100$$

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1			ÁREA		EQUAÇÃO		$\mu\text{g/g}$		T.T.C / $\mu\text{g/g}$		% CAROTENÓIDES	
2	LUTEINA		1619958		0,09158884		5,717632		22,7525		25,12969	
3	ZEAXANTINA		3870350		0,217491935		13,57741		22,7525		59,67435	
4	$\beta$ -CRIPTOXANTINA		551199		0,03639628		2,272117		22,7525		9,986229	
5	$\alpha$ -CAROTENO		3314		0,000272849		0,017033		22,7525		0,074863	
6	$\beta$ -CAROTENO		287138		0,018714769		1,16831		22,7525		5,134865	
7							22,7525				99,99999	

$$f_x = \text{=SOMA}(G2:G6)$$

$$f_x = \text{=SOMA}(K2:K6)$$

**Figura 3.** Planilha para anotação de dados obtidos na análise em relação à curva padrão. As fórmulas estão descritas em Rodriguez-Amaya e Kimura (2004)

Na equação da coluna G deve ser observado que o valor 0,6007 é a massa inicial da amostra exemplo, portanto este valor variará em função da massa inicial anotada no procedimento. Poderá ser criada uma coluna adicional com estes valores para correlacionar na fórmula. Passar os valores da coluna G para planilha de resultados.

## Resultados Esperados

Grãos de todas as cultivares de milho amarelo contêm carotenoides, sendo 20 a 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  (base seca) a média do total destes compostos presentes em genótipos comuns, embora os carotenoides precursores da vitamina A ou que podem ser convertidos em retinol ( $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos), apresentem-se em menor percentual (e.g. 10% a 20%), comparados a xantofilas zeaxantina e luteína, que representam cerca de 35% a 50% do total desses pigmentos nos grãos de milho, podendo chegar a até 75% do total (Blessin et al., 1963; Berardo et al., 2004; Tanumihardjo, 2006; Menkir et al., 2004).

As concentrações e as proporções dos carotenoides em amostras de milho brasileiros avaliados entre 2005 a 2018 na Embrapa Milho e Sorgo são exemplificadas na **Tabela 1**.

## Informações relevantes

- Sempre utilizar equipamentos de proteção individual, como jaleco e sapatos fechados, óculos de segurança, abafador de som, máscara de partículas e luvas, durante a moagem.
- Manusear os solventes voláteis em capela de exaustão e, além dos três primeiros EPIs citados anteriormente, usar filtro respirador durante o processo extrativo.
- Os carotenoides são sensíveis à luz e ao calor, portanto realizar o ensaio na ausência de luz incidente e ambiente climatizado em temperatura de aproximadamente 20 °C. Cobrir os frascos de amostras e extratos com papel alumínio.
- Desrosquear levemente as tampas dos tubos quando estes forem colocados no banho termostatizado. Se estiverem totalmente fechados pode ocorrer a quebra do tubo por causa do aquecimento e da liberação de gases.
- Fechar com cuidado os tubos antes de dispô-los na centrífuga, equilibrando o peso nos espaços do rotor, pois se não forem dispostos adequadamente poderão quebrar e perder a amostra.
- Para expressão das médias em base seca será necessário determinar a matéria seca da amostra e fazer as correções necessárias.

**Tabela 1.** Médias das concentrações de carotenoides de grãos de milho de cor amarela determinadas por CLAE-DAD.

Identificação da amostra	$\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca)					
	Luteína	Zeaxantina	$\beta$ -criptoxantina	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	Total de carotenoides
Milho (grãos amarelos)	3,86	15,93	2,14	0,07	2,48	24,48

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Técnico em Química Carlos Henrique Pires pela sua participação nas atividades laboratoriais durante o desenvolvimento do método

## Referências

BERARDO, N.; BRENA, A.; AMATO, P.; VALOTI, V.; PISACANE, M. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 3, p. 393-398, 2004.

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.

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.

CARDOSO, W. S.; PAES, M. C. D.; GALVÃO, J. C. C.; RIOS, S. A.; GUIMARÃES, P. E. V.; SHAFFERT, R. E.; BORÉM, A. Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 2, p. 164-173, 2009.

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**, v. 20, n. 8, p. 655-661, 2007.

JANICK-BUCKNER, D.; HAMMOCK, D. J.; JOHNSON, J. M.; OSBORN, J. M.; BUCKNER, B. Biochemical and ultra-structural analysis of the y10 mutant of maize. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 5, p. 507-513, 1999.

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

Li, S.; Tayie, F.; Young, M.; Rocheford, T.; White, W. Retention of provitamin A carotenoids in high  $\beta$ -carotene maize (*Zea mays* L.) during traditional African household processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10744-10750, 2007.

MENKIR, A.; LIU, W.; WHITE, W. S.; MAZIYA-DIXON, B.; ROCHEFORD, T. Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 521-529, 2008.

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.

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**, v. 62, n. 27, p. 6317-6325, 2014.

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

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 em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

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. (Ed.). **Milho biofortificado**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 45-86.

PAES, M. C. D.; VOLPI, B. D.; GUIMARÃES, P. E. de O. Retenção de carotenoides em milho biofortificado após moagem via seca e durante armazenamento dos seus derivados. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 17, n. 3, p. 502-521, 2018.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2004. p. 155-157.

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, p. 857-862, 2014.

ROCK, C. L.; FADA, R. D.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidante micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, n. 7, p. 693-702, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington: International

Food Policy Research Institute, 2004. (Technical Monograph, 2).

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

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

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

Esta publicação está disponível no endereço:  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

**1ª edição**

*Formato digital (2019)*



Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Maria Marta Pastina*

Secretário-Executivo

*Elena Charlotte Landau*

Membros

Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria  
Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira  
Simeone, Roberto dos Santos Trindade e  
Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto

*Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica

*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

Tratamento das ilustrações

*Tânia Mara Assunção Barbosa*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*Tânia Mara Assunção Barbosa*

Foto da capa

*Maria Cristina Paes*