



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

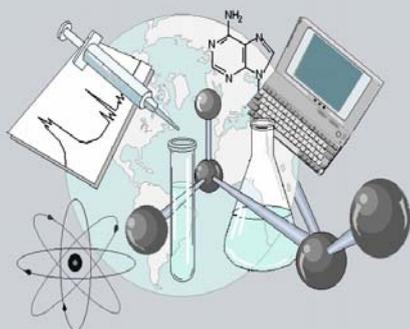
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Otimização do processo de desidratação de folhas de cenoura (*Daucus carota* L.) visando a conservação de ácidos graxos ômega-3”

Dissertação apresentada por
Vanessa Vivian de Almeida ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre
em Química

CEE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, DEZEMBRO/2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

A498o Almeida, Vanessa Vivian de
Otimização do processo de desidratação de folhas de cenoura (*Daucus carota* L.) visando a conservação de ácidos graxos ômega-3 / Vanessa Vivian de Almeida. -- Maringá : [s.n.], 2007.
53 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador : Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Química, 2007.

1.Química analítica. 2.Cromatografia gasosa.
3.Ácidos graxos ômega-3. 4.Ácido Alfa-linolênico.
5.Secagem otimizada-Folha de cenoura.I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Química.

Cdd 21.ed. 543.85

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Otimização do processo de desidratação de folhas de cenoura
(*Daucus carota* L.) visando a conservação de ácidos graxos
ômega-3**

Vanessa Vivian de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer

MARINGÁ
2007

Linha de Pesquisa

Química de Alimentos



“Difícilmente temos consciência do que realmente é significativo em nossa própria existência, e isso certamente não deve preocupar nosso vizinho.

Que sabe um peixe sobre a água em que nada a vida inteira?

O amargo e o doce vêm de fora, o penoso vem de dentro, de nossos próprios esforços.

Na maioria das vezes, faço aquilo que minha própria natureza me impele.

É embaraçoso ganhar tanto respeito e amor por causa disso.

Setas de ódio também foram disparadas contra mim; mas nunca me atingiram, porque de algum modo, pertenciam a um outro mundo, com o qual não tenho nenhuma ligação (...).”

Albert Einstein

Dedico aos meus pais, Hilário e Ivone, que sempre estiveram presentes em todos os momentos de minha vida; que são meus principais incentivadores e me apóiam na busca do conhecimento, e que nunca mediram esforços para que isso se tornasse possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a razão de toda a vida e de toda existência, agradeço pelo dom vida, pela graça da saúde, pela benção que é minha família, e pela oportunidade de aprendizado que me é concedida diariamente.

Aos meus pais, Hilário e Ivone, pela dedicação e amor com seus filhos, por seus exemplos de vida e pelos princípios que foram transmitidos aos seus filhos, e ao meu irmão, Igor, pela companhia, pela amizade, pelo aprendizado, por ter participado deste trabalho com idéias e sugestões.

Ao meu namorado, Márcio Barros Schneider, pelo desprendimento de si próprio, pela companhia, principalmente nos momentos difíceis, pela paciência, dedicação e compreensão, pelas palavras de incentivo quando o desânimo era evidente; pelo ombro amigo, quando foi necessário, pela poesia que inúmeras vezes me fez sorrir.

À Ana Paula Ozima, pela amizade, pela companhia durante os vários desafios enfrentamos juntas, desde as aulas de licenciatura, até o curso de Mestrado.

Ao Departamento de Química, especialmente ao Programa de Pós-Graduação e aos professores, pelos conhecimentos adquiridos durante este curso.

Ao Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer, pela orientação deste trabalho e pela confiança, pela permissão concedida de cursar a licenciatura, pelo incentivo diante das dificuldades.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Profs. Dr. Nilson Evelázio de Souza, Dr. Makoto Matsushita, e Dr. Edvani Curti Muniz, pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Helena Shizuko Nakatani, pela amizade, pelos conselhos, pelo empréstimo de material, por compartilhar de suas experiências e de seus conhecimentos, pelo seu rigor analítico, que muito me ensinou.

Ao Elton Guntendorfer Bonafé, pela amizade, pela prestatividade e pela valiosa ajuda com a parte experimental deste trabalho.

Ao Clayton Antunes Martin, pela acolhida no laboratório, pelo aprendizado, por ser o idealizador do trabalho que gerou este projeto.

Ao Sr. Sérgio Suzuki, que gentilmente forneceu as folhas de cenoura para este estudo.

Ao técnico Dirceu Batista de Souza, pela cooperação durante a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Extensão, André, Airton e Ari, pelo empréstimo de materiais e reagentes.

Aos colegas de laboratório Ailey, Ana Carolina, Alberto, Cristina, Ivane, Juliana A., Juliana S., Paula, Ricardo, Rúbia, pela oportunidade de convivência e pelo aprendizado.

A todos, cujos nomes não foram citados, mas que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Desidratação de alimentos.....	3
2.2. Princípios da agricultura orgânica.....	4
2.3. Composição química da folha de cenoura.....	5
2.4. Lipídios, ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 e essencialidade.....	6
2.5. Importância da razão entre os ácidos graxos n-6 e n-3.....	8
2.6. Ocorrência de ácidos graxos essenciais em alimentos de origem vegetal.....	11
2.7. Ingestão recomendada de ácidos graxos essenciais.....	12
2.8. Metodologia de superfície de resposta.....	13
2.9. Planejamento fatorial completo.....	14
2.10. Planejamento com ponto central.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Amostragem.....	17
4.2. Umidade.....	17
4.3. Extração e determinação de lipídios.....	17
4.4. Transesterificação dos lipídios	18
4.5. Cromatografia dos ésteres metílicos de ácidos graxos.....	19
4.6. Quantificação do LNA.....	19
4.7. Identificação dos ácidos graxos.....	20
4.8. Planejamento fatorial.....	20
4.9. Planejamento fatorial com ponto central e metodologia de superfície de resposta.....	21
4.10. Análise estatística	22
4.11. Análises microbiológicas.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1. Análise fatorial.....	23
5.2. Superfície de resposta.....	28
5.3. Secagem otimizada.....	34
5.4. Composição lipídica e em ácidos graxos de folhas de cenoura submetidas à secagem otimizada.....	35
5.5. Análises microbiológicas.....	39
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42
8. ANEXOS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas pelas quais os ácidos graxos essenciais são convertidos a ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa em animais.....	7
Figura 2. Planejamento 2^2 com ponto central.....	15
Figura 3. Folhas de cenoura submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (A) e a vácuo (B).....	26
Figura 4. Interação das variáveis tempo e temperatura na concentração de LNA em folhas de cenoura submetidas à secagem em estufa com circulação de ar.....	27
Figura 5. Gráfico normal dos resíduos para o ajuste ao modelo quadrático baseado no planejamento fatorial com ponto central.....	31
Figura 6. Superfície de resposta obtida para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 9.....	33
Figura 7. Gráfico de contorno da superfície de resposta para o modelo quadrático obtido.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da composição centesimal de folhas de cenoura e concentração em vitaminas e minerais.....	6
Tabela 2. Valores recomendados para a razão entre os ácidos graxos n-6 e n-3 na dieta.....	10
Tabela 3. Concentração dos ácidos linoléico (LA), alfa-linolênico (LNA) e razão n-6/n-3, em alimentos de origem vegetal.....	12
Tabela 4. Variáveis e níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2^3 completo para o processo de desidratação de folhas de cenoura.	20
Tabela 5. Planejamento fatorial completo 2^3	21
Tabela 6. Concentração de LNA em folhas de cenoura desidratadas obtidas dos experimentos do planejamento fatorial completo 2^3	23
Tabela 7. Valores dos efeitos principais e efeitos de interação para o fatorial completo 2^3	24
Tabela 8. Teor de umidade em folhas de cenoura desidratadas obtidas dos experimentos do planejamento fatorial completo 2^3	24
Tabela 9. Concentração de LNA em folhas de cenoura desidratadas em estufa com circulação de ar, segundo os experimentos do planejamento fatorial 2^2 com ponto central.....	29
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2^2 com ponto central.....	30

Tabela 11. Concentração dos ácidos graxos em folhas de cenoura desidratadas à 70 °C por 43 h, em estufa com circulação de ar.....	36
Tabela 12. Somatório e razões de ácidos graxos em folhas de cenoura desidratadas.....	38
Tabela 13. Análise microbiológica de folhas de cenoura desidratadas e pulverizadas.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido araquidônico

AGMI – ácidos graxos monoinsaturados

AGPI – ácidos graxos poliinsaturados

AGPI/AGS – razão entre o somatório dos ácidos graxos poliinsaturados pelo somatório dos ácidos graxos saturados

AGPI-CML – ácidos graxos poliinsaturados de cadeia muito longa

AGS – ácidos graxos saturados

DHA – ácido docosaheptaenóico

EPA – ácido eicosapentaenóico

LA – ácido linoléico

LNA – ácido alfa-linolênico

ECL – (*equivalent chain length*) - comprimento equivalente de cadeia

n-6/n-3 – razão entre o somatório dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 e ômega-3.

RSM – (*response surface methodology*) - metodologia de superfície de resposta.

RESUMO

A maioria dos nutrientes essenciais à saúde humana é de origem vegetal e partes dos vegetais que poderiam ser aproveitadas, principalmente devido ao elevado valor nutricional, são desperdiçadas por falta de conhecimento sobre a sua utilização ou por falta de tecnologias adequadas que visem seu aproveitamento industrial. Neste estudo foi efetuada a otimização do processo de desidratação de folhas de cenoura, visando evitar perdas por degradação do ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3). Folhas de cenoura foram submetidas à secagem em estufa a vácuo e com circulação de ar. O processo de otimização foi efetuado em estufa com circulação de ar, e empregou-se um fatorial completo 2^2 com ponto central onde foram investigadas as influências dos fatores tempo e temperatura de secagem na resposta (concentração de LNA), estimada sempre em mg/100g de folhas de cenoura desidratadas. Para tanto, foi empregada a Metodologia de Superfície de Resposta. Nos lipídios, o LNA e demais ácidos graxos foram analisados através da cromatografia gasosa, acoplada com detector de ionização de chama, utilizando como padrão interno o metil éster do ácido heneicosanóico (21:0). As folhas de cenoura submetidas à secagem nas condições otimizadas, isto é, a 70 °C por 43 h, apresentaram em média 984 mg LNA por cem gramas da matéria seca. Este valor foi superior aos valores estimados em folhas de cenoura desidratadas em outras condições de secagem, em estufa com circulação de ar. Os principais ácidos graxos das folhas de cenoura detectados foram: LNA, ácido linoléico (LA, 18:2n-6), ácido palmítico (16:0) e ácido hexadecatrienóico (16:3n-3). A razão entre ácidos graxos poliinsaturados e ácidos graxos saturados (AGPI/AGS) foi de 3,19. A taxa entre o somatório dos ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 foi de 1:2,7. Os resultados encontrados permitiram concluir que folhas de cenoura são fonte de ácidos graxos essenciais, com destaque para LNA, e que quando processadas (desidratadas) de maneira otimizada podem conservar o LNA, podendo ser adicionadas em sopas, caldos, entre outros, a fim de agregar valor nutricional e elevar a disponibilidade de ômega-3 nesses alimentos.

Palavras-chave: ácidos graxos ômega-3, folhas de cenoura, secagem otimizada.

ABSTRACT

Most nutrients essential for human health come from vegetables. Vegetable parts that might be used, mainly due to their high nutritional value, are wasted for lack of knowledge of their use or of appropriate technologies for their industrialization. In this study, carrot leaf dehydration was optimized aiming at avoiding the degradation loss of alpha-linolenic acid (LNA, 18:3n-3). Carrot leaves were dried in vacuum and air-circulation oven. The optimization process was carried out in air-circulation oven with center-point full 2^2 factorial. It was investigated the influence of drying time and temperature on drying response (LNA concentration), which was estimated as the amount of LNA in mg/100 g of ground dehydrated carrot leaves by using the response surface methodology. The lipids, LNA and other fatty acids, were analyzed in a gas chromatographer coupled to a flame ionization detector with heneicosanoic acid methyl ester (21:0) as an internal standard. Carrot leaves dried in optimized conditions, 70 °C for 43 h, presented an average of 984.2 mg LNA per 100 g of dried matter. This value is higher than those estimated for carrot leaves dehydrated in other air-circulation oven drying conditions. The main fatty acids detect in ground dehydrated carrot leaves were: LNA, linoleic acid (LA, 18:2n-6), palmitic acid (16:0), and hexadecatrienoic acid (16:3n-3). The ratio between polyunsaturated fatty acids and saturated fatty acids (PUFA/SFA) was 3.19. The omega-6 sum and omega-3 sum ratio was 1:2.7. These results allow concluding that ground dried carrot leaves are a valuable source of essential fatty acids, especially of LNA as it is preserved when the leaves are dehydrated in optimized conditions. The addition of ground dehydrated leaves to soups, broths, and other dishes may raise their nutritional value and increase the availability of omega-3 in supplemented foods.

Keywords: Omega-3 fatty acids, carrot leaves, optimized drying

1. INTRODUÇÃO

A realidade alimentar brasileira é paradoxal, apresentando problemas envolvendo, simultaneamente, a falta e o excesso de alimentos. Ao mesmo tempo em que se observa um aumento na ocorrência de distúrbios associados aos excessos na alimentação, como a obesidade, doenças relacionadas ao aumento dos níveis de colesterol e hipertensão, a desnutrição é responsável por 55% das mortes de crianças no mundo (Sawaya, 2006).

Sabe-se que a maioria dos nutrientes essenciais à saúde humana é de origem vegetal e que muitas partes de vegetais que poderiam ser aproveitadas, são desperdiçadas por falta de conhecimento sobre a sua utilização ou por falta de tecnologias adequadas que visem seu aproveitamento industrial.

O desperdício se caracteriza por qualquer alimento que, em boas condições fisiológicas, é desviado do consumo para o lixo, que se dá, por exemplo, através do aproveitamento parcial de frutos, raízes e folhas, descarte de produtos *in natura* com boas condições físicas ou falta de conhecimento de formas alternativas de aproveitamento.

Especificamente no caso das hortaliças, estudos constataram que as perdas pós-colheita são em média 35%, chegando a atingir até 40% no Brasil, enquanto que nos Estados Unidos não passam de 10% (Vilela *et al.*, 2003).

Nas feiras livres, mercados e distribuidores de legumes e hortaliças, as folhas ou ramas de vegetais são cortadas e descartadas de maneira indiscriminada. Existem muitas folhas ou ramas que são desperdiçadas, dentre estas incluem as folhas de cenoura (*Daucus carota* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.) e nabo (*Brassica nabus* L.). Por uma questão cultural, os brasileiros não encaram como apetitosas essas partes desses alimentos, sendo insignificante a parcela da população que as consome *in natura*.

A maioria dessas folhas, além de ser fonte riquíssima em nutrientes, apresenta sabor agradável e características adequadas ao processamento e podem ser usadas como base para o preparo de diversos alimentos.

O desenvolvimento de novas tecnologias como forma de aproveitamento de partes de vegetais, comumente não consumidas, é um importante aliado do

combate ao desperdício e uma alternativa de minimizar os efeitos da poluição causados pela sua alta carga orgânica.

A desidratação de alimentos permite aumentar a concentração dos nutrientes em relação à sua massa e promove conservação durante os períodos em que não existem alimentos frescos. Folhas de cenoura desidratadas podem ser acrescentadas em sopas, caldos, etc. Trata-se de uma parte comestível que pode ser utilizada como incrementos em merendas escolares, sucos, ensopados, entre outros, com o intuito de agregar valor nutricional aos mesmos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o aproveitamento de folhas de cenoura orgânica pela otimização do processo de desidratação da mesma, visando minimizar perdas por degradação de ácidos graxos essenciais, com destaque para o ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desidratação de alimentos

A desidratação é um dos processos mais antigos utilizados pelo homem na conservação de alimentos (Gava, 1978). Até hoje é tema de inúmeras pesquisas científicas que têm contribuído para o desenvolvimento de novas tecnologias, produtos e ingredientes para a indústria de alimentos (Sampaio & Queiroz, 2006; Gondim *et al.*, 2005; Jesus *et al.*, 2003). Atualmente é grande o consumo de diversos produtos desidratados e ao longo dos anos, houve uma grande diversificação e aplicação dos mesmos. Sopas instantâneas com vegetais desidratados, sucos de frutas em pó, cogumelos desidratados e o tomate seco em conserva são alguns exemplos.

A desidratação diminui a velocidade de deterioração do alimento, por meio da redução no teor de água, atuando regressivamente na ação das enzimas, possibilitando a conservação por maior tempo. Com a redução da quantidade de água, ocorre a concentração de nutrientes em relação à massa úmida.

Na produção de um alimento desidratado, diversas operações são realizadas e para isso, além de equipamentos apropriados, necessita-se de condições adequadas de operação, de acordo com os objetivos pré-estabelecidos para o processo de secagem. A lavagem com água clorada, o descascamento, o corte e tratamentos pré-secagem são as principais etapas que antecedem a desidratação, quando se utiliza desidratadores com circulação forçada por meio de ar aquecido.

A operação de desidratação merece destaque pela influência que tem nos aspectos técnicos e econômicos. A qualidade do produto final depende diretamente da forma que o processo de desidratação é conduzido, sendo os principais parâmetros utilizados na avaliação do produto a cor, o sabor, o aroma, a textura e os aspectos químicos e microbiológicos.

A desidratação além de ser utilizada como um método muito eficiente de conservação, devido à diminuição da atividade de água do tecido desidratado,

impede a deterioração e perda do valor comercial e objetiva também o refinamento do alimento (SBRT, 2005).

A secagem de hortaliças ocupa uma posição muito representativa na área da desidratação de alimentos. É uma prática muito antiga, que se iniciou ao sol, com a finalidade de preservar os excedentes das colheitas para serem consumidos nos períodos de escassez (Aguirre & Gasparino Filho, 2002).

Após a Segunda Guerra Mundial, o mercado de hortaliças desidratadas experimentou um constante crescimento devido o desenvolvimento de tecnologias que possibilitaram a obtenção de produtos de alta qualidade e excelente conservação.

Segundo Aguirre & Gasparino Filho (2002), as hortaliças desidratadas de boa qualidade devem apresentar as seguintes características:

- constituir-se de baixo teor de umidade, usualmente em torno de 5%, para minimizar a deterioração de cor, sabor e odor, provocados pelas reações oxidativas e por outras reações químicas e impedir o desenvolvimento microbiano;
- não apresentar problemas de qualidade causados pelo emprego de matéria inadequada ou pelo tratamento térmico impróprio;
- reidratar-se rapidamente, assumindo a forma e a aparência original do produto antes da secagem;
- cozinhar rapidamente em água fervente e, quando prontos para servir, deverão ser tenros, retendo muito do seu odor e sabor originais;
- quando embaladas, deverão ser isentas de insetos, umidade e ar, em embalagens hermeticamente fechadas, sob vácuo ou atmosfera de gás inerte.

2.2. Princípios da agricultura orgânica

Ultimamente, a procura por produtos e alimentos concebidos de forma mais sustentável ou ecológica pela população tem aumento em razão da preocupação em manter hábitos alimentares mais saudáveis. As estimativas apontam que a procura por produtos orgânicos cresce a uma média de 10% ao

ano no mercado interno e entre 20 e 30% no mercado externo (Ambrosano *et al.*, 2004).

Os sistemas orgânicos de produção agropecuária adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais. Conforme descrição da Lei nº. 10.831, de 23 de dezembro de 2003, uma das finalidades dos sistemas orgânicos é ofertar aos consumidores produtos saudáveis e isentos de contaminantes intencionais (Brasil, 2003).

O processo de manejo da agricultura orgânica obedece a diversos aspectos que conferem valor agregado ao produto e dentre eles, pode-se citar: a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, e emprega, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos (em contraposição ao uso de materiais sintéticos), eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (Brasil, 2003).

2.3. Composição química da folha de cenoura

O estudo da composição química de folha de cenoura para aproveitamento dessa parte comestível na alimentação humana não é inédito. Após análises, Sartorelli (1998) concluiu que a parte aérea de cenoura apresentou-se rica em fibra bruta e teor significativo de β -caroteno e vitamina C total. Os materiais secos da parte aérea de cenoura revelaram uma fonte de fibras solúveis e insolúveis, além disso, as folhas de cenoura apresentaram teor significativo de cálcio e ferro, e teor representativos de fósforo e micronutrientes.

A Tabela 1 apresenta os resultados do estudo de Pereira *et al.* (2003) referente à avaliação química de folhas de cenoura submetidas à secagem a 60 °C por 72 h.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da composição centesimal de folhas de cenoura e concentração em vitaminas e minerais*.

Composição	(%)	Minerais	(mg/100g)
Umidade	7,20 ± 0,07	Sódio	32,80 ± 0,65
Cinzas	10,5 ± 0,33	Fósforo	320 ± 4,90
Fibra bruta	12,0 ± 0,26	Potássio	2744 ± 4,90
Proteína	15,12 ± 0,52	Cálcio	1970 ± 17,32
Extrato Etéreo	2,50 ± 0,12	Magnésio	226 ± 2,45
Carboidrato	52,65 ± 0,67	Manganês	5,50 ± 0,87
Vitaminas	(mg/100g)	Zinco	5,70 ± 1,15
Vitamina C	203,70 ± 3,80	Ferro	57,10 ± 1,30
β-caroteno	8,70 ± 0,32		

* Valores expressos em base seca.

Fonte: Pereira *et al.* (2003).

2.4. Lipídios, ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 e essencialidade

Lipídios são compostos encontrados nos organismos vivos, geralmente insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos (Souza & Visentainer, 2006). A forma mais importante de armazenamento de lipídios ocorre como triacilgliceróis, que são compostos formados por ésteres de ácidos graxos e glicerol. Dentre inúmeros ácidos graxos, dois deles são considerados essenciais, os ácidos LA e LNA.

Os ácidos LA e LNA são chamados essenciais pois, não podem ser sintetizados por células de mamíferos e devem ser fornecidos através da dieta. Após ingestão, por ação de enzimas alongase e dessaturase, os ácidos LA e LNA são convertidos a ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e muito longa (Youdim *et al.*, 2000), como mostra a Figura 1. Dentre estes ácidos, destacam-se como benéficos para os humanos os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia muito longa (AGPI-CML), também conhecidos como VLC-PUFAs (*very-long-chain polyunsaturated fatty acids*).

Os ácidos LA e LNA são precursores dos demais ácidos graxos que compõem as séries de ácidos graxos n-6 e n-3, respectivamente.

As séries (ou famílias) n-6 e n-3 abrangem ácidos graxos que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal. A cadeia dos ácidos graxos também é enumerada a partir da carboxila, de acordo com a designação Δ (delta), que é mais aplicada ao estudar as reações químicas que envolvem esses ácidos. Devido às diferenças fisiológicas entre as séries n-6 e n-3 e à simplicidade da designação n, passou a ser mais apropriado empregar esta designação ao estudar aspectos nutricionais envolvendo os ácidos graxos (Martin *et al.*, 2006).

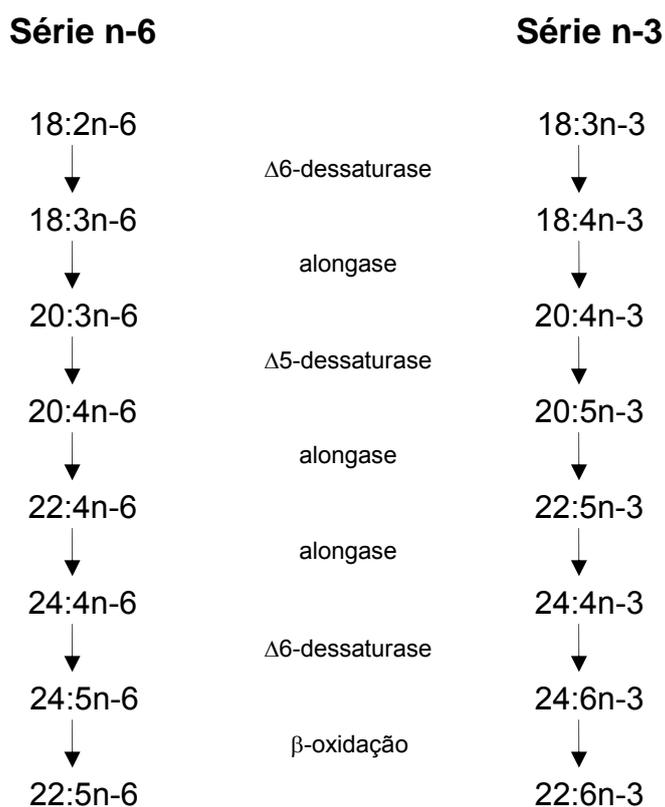


Figura 1. Etapas pelas quais os ácidos graxos essenciais são convertidos a ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa em animais. Fonte: Martin *et al.* (2006).

Os ácidos graxos mostrados na Figura 1, não podem ser interconvertidos, ou seja, um ácido graxo da série n-3, não pode ser transformado em um ácido da série n-6, e desta forma pertencem a duas séries distintas. Além disso, o metabolismo dos ácidos graxos requer as mesmas enzimas, alongases e dessaturases, resultando em competição entre as duas séries. Enquanto as alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis*.

Embora essas enzimas tenham maior afinidade pelos ácidos da série n-3, a conversão do LNA em AGPI-CML é fortemente influenciada pelos níveis de LA na dieta (Emken *et al.*, 1994).

Como o excesso de componentes de uma determinada série de ácidos graxos pode interferir no metabolismo dos ácidos graxos de outra série, reduzindo a incorporação no tecido lipídico e alterando seus efeitos biológicos, a razão entre a ingestão diária de alimentos fontes de ácidos graxos n-6 e n-3 assume grande importância na nutrição humana, resultando em várias recomendações que têm sido estabelecidas por autores e órgãos de saúde, em diferentes países (Martin *et al.*, 2006).

2.5. Importância da razão entre os ácidos graxos n-6 e n-3

A busca de fontes alternativas e complementares de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 tornou-se uma necessidade a fim alterar a razão entre o somatório dos ácidos poliinsaturados ômega-6/ômega-3 (n-6/n-3) ingeridos.

Estima-se que durante muitas gerações e desde os povos da antiguidade, essa razão estava em torno de 1:1 a 2:1, devido ao consumo abundante de vegetais e de alimentos de origem marinha. Contudo, nos últimos anos, com o aperfeiçoamento das tecnologias de extração e desodorização de óleos vegetais, houve um aumento no consumo desses óleos que, sendo oriundos de sementes oleaginosas com elevado teor de LA, levou ao conseqüente desequilíbrio da razão n-6/n-3. Nas últimas décadas tem-se determinado, em diversos países, que a ingestão média de ácidos

graxos resulta em relações n-6/n-3 que estão entre 10:1 a 20:1, ocorrendo registros de até 50:1 (Simopoulos, 2002; Simopoulos, 2004).

A diminuição da ingestão de frutas e verduras, e o consumo excessivo de alimentos industrializados e frituras, observados ultimamente nas dietas ocidentais, têm provido drásticas conseqüências à saúde pública, como incrementos no colesterol sanguíneo acompanhado de hipertensão arterial, que são as duas principais condições predisponentes às doenças coronarianas (Simopoulos, 2002b).

Uma das características da dieta da sociedade moderna, industrializada, é o aumento no consumo de gorduras saturadas, ácidos graxos n-6, ácidos graxos *trans* e diminuição na ingestão de ácidos graxos n-3. Os ácidos graxos *trans*, por sua vez, interferem na desnaturaçã e alongaçã de ambas as séries de ácidos graxos com diminuiçã das quantidades dos ácidos poliinsaturados de cadeia muito longa (AGPI-CML) como araquidônico (AA, 20:4n-6), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) disponíveis ao metabolismo humano (Simopoulos, 2002b).

Os valores relacionados na Tabela 2 evidenciam a tendêcia de convergência da razão entre os ácidos graxos n-6 e n-3 para o intervalo de 4:1 a 5:1. As razões de 2:1 a 3:1 têm sido recomendadas por alguns autores, por possibilitar uma maior conversã do LNA em DHA, que alcança o seu valor máxmo em torno de 2,3:1, conforme demonstrado por Masters (1996). Assim, as razões entre 2:1 e 4:1 têm maior importância para pessoas com hábitos alimentares que resultam em uma baixa ingestã de EPA e DHA. Por outro lado, dietas baseadas em razões n-6/n-3 inferiores a 1:1 não são recomendadas, por inibirem a transformaçã do LA em AGPI-CML.

Tabela 2. Valores recomendados para a razão entre os ácidos graxos n-6 e n-3 na dieta.

País ou Instituição	n-6/n-3	Referências
Canadá	4:1 – 10:1	SRC (1990)
EUA	2:1 – 3:1	Simopoulos <i>et al.</i> (1999)
EUA	4:1	Schaefer (2002)
França	5:1	Legrand <i>et al.</i> (2001)
Inglaterra	4:1	DH (1994)
Japão	2:1 – 4:1	Kris-Etherton <i>et al.</i> (2000)
Suécia	5:1	NCM (1996)
WHO/FAO	5:1 – 10:1	WHO (1995)
Institute of Medicine	5:1	Institute of Medicine (2002)

Fonte: Souza & Visentainer, 2006.

Estudos cinéticos efetuados em humanos, que foram submetidos a dietas com razões n-6/n-3 entre 6:1 e 8:1, demonstraram que a conversão do LNA em EPA e DHA varia de 8% a 21% e de 0% a 9%, respectivamente, sendo observado um nível maior de conversão nas mulheres (Emken *et al.*, 1994; Burdge & Wootton, 2002; Burdge *et al.*, 2002). Essa diferença tem sido atribuída à possível influência do estrogênio sobre a atividade das enzimas dessaturases (Burdge *et al.*, 2002).

A necessidade de diminuir a razão n-6/n-3 nas dietas modernas também tem sido sugerida pelos resultados de alguns estudos clínicos realizados na última década. Entre esses se destacam: a diminuição de 70% na taxa de mortalidade em pacientes com doença cardiovascular, quando a razão LA/LNA na dieta foi de 4:1; a redução nas inflamações decorrentes da artrite reumatóide, quando a razão n-6/n-3 da dieta esteve entre 3 a 4:1, condição que foi alcançada pela suplementação com EPA, DHA e LNA; a diminuição dos sintomas decorrentes da asma, quando a razão n-6/n-3 da dieta esteve ao redor de 5:1, sendo que em 10:1 os sintomas foram intensificados (Lorgeril *et al.*, 1994; Broughton *et al.*, 1997).

2.6. Ocorrência de ácidos graxos essenciais em alimentos de origem vegetal

Os ácidos LA e LNA estão presentes na alimentação humana, tanto em espécies vegetais como em carnes e outros derivados de origem animal, como leite e ovos. Nas hortaliças, o LNA é encontrado em maior quantidade em espécies com folhas de coloração verde-escura, por ser um importante componente da fração dos lipídios polares contidos nos cloroplastos (Simopoulos, 2002). LNA também ocorre em alguns cereais e leguminosas, sendo a sua concentração muito dependente da espécie e de fatores sazonais (Kris-Etherton *et al.*, 2000). No reino vegetal, os AGPI-CML são encontrados em plantas inferiores, que se desenvolvem principalmente em ambientes aquáticos marinhos (Simopoulos, 2002).

A Tabela 3 apresenta as concentrações dos ácidos LA e LNA em alimentos de origem vegetal. Embora as hortaliças apresentem pequenas quantidades do LNA, devido ao seu baixo conteúdo lipídico, o consumo de vegetais, como agrião, couve, alface, espinafre e brócolis, pode contribuir para elevar a sua ingestão, principalmente em dietas vegetarianas. Além disso, hortaliças provêem quantidades significativas de vitamina E e vitamina C, e são ricas em fenóis e outros compostos que aumentam o potencial antioxidante (Simopoulos, 2004b).

Entre os cereais e as leguminosas, a aveia, o arroz, o feijão, a ervilha e a soja, constituem importantes fontes de LNA. Nos óleos vegetais, a maior concentração de LNA ocorre no óleo de linhaça, sendo que os óleos de canola e soja também apresentam concentrações significativas.

Tabela 3. Concentração dos ácidos linoléico (LA), alfa-linolênico (LNA) e razão n-6/n-3, em alimentos de origem vegetal.

Hortaliças	LA (mg/g)	LNA (mg/g)	Razão n-6/n-3	Cereais e Leguminosas	LA (mg/g)	LNA (mg/g)	Razão n-6/n-3
Agrião ¹	0,4	1,8	0,2	Arroz ²	0,6	0,1	4,8
Alface ¹	0,4	0,9	0,4	Arroz ² (parbolizado)	3,1	0,2	17,9
Brócolis ¹	0,5	1,1	0,5	Aveia ¹	24,4	1,1	22,0
Beldroega ¹	0,9	4,1	0,2	Ervilha ²	1,4	0,3	4,9
Couve ¹	1,4	1,8	0,8	Feijão ²	0,8	1,1	0,7
Couve-flor ¹	0,5	1,7	0,3	Lentilha ²	1,4	0,4	3,7
Espinafre ¹	0,3	1,3	0,2	Milho ²	58,6	1,8	32,5
Hortelã ¹	0,3	2,0	0,2	Soja ²	44,6	6,0	7,5
Frutas				Óleos Vegetais			
Abacate ¹	16,7	1,3	12,5	Canola	203,0	93,0	2,2
Banana ¹	0,5	0,3	1,7	Linhaça	127,0	533,0	0,2
Mamão ¹	0,1	0,3	0,3	Milho	523,0	11,6	45,1
Manga ¹	0,4	0,1	4,0	Oliva	97,6	7,60	12,8
Morango ¹	1,8	0,7	2,6	Soja	510,0	68,0	7,5

¹Alimento cru; ²Alimento cozido.

Fonte: Martin *et al.*, 2006.

2.7. Ingestão recomendada de ácidos graxos essenciais

Em 2002, o Instituto de Medicina da Academia Nacional dos Estados Unidos publicou um relatório de referência dietética para ingestão de energia e macronutrientes. O relatório reconheceu o caráter essencial do LNA na dieta, a contribuição de todos os ácidos graxos ômega-3 à saúde humana (Morris, 2003) e estabeleceu a ingestão diária adequada de LA e LNA.

A ingestão adequada dos ácidos graxos essenciais para homens com idade entre 19 e 70 anos é de 17 gramas/dia de LA e de 1,6 gramas/dia de LNA. Para mulheres nessa mesma faixa etária, a ingestão adequada de LA é de 12 gramas/dia e 1,1 gramas/dia de LNA (Davis & Kris-Etherton, 2003). Outra recomendação para o consumo diário desses ácidos graxos sugere a ingestão

de 2-3% do total de calorias para o LA e de 1% do total de calorias para o LNA (Simopoulos *et al.*, 1999b).

2.8. Metodologia de superfície de resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), do inglês, *Response Surface Methodology*, é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por George Edward Pelham Box nos anos cinquenta, e que desde então tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (Barros Neto *et al.*, 2003).

Para aplicar a RSM, são realizados experimentos fatoriais, cujos resultados são ajustados a modelos matemáticos. A modelagem normalmente é feita ajustando-se os modelos mais simples, como o linear e o quadrático. Entretanto, a elaboração de um modelo adequado depende de um estudo amplo e sistemático dos efeitos de cada uma das variáveis empregadas no processo.

A RSM é uma ferramenta que permite prever resultados ou comportamentos do processo em estudo, a partir das condições de trabalho e pode ser definida como um método estatístico que utiliza dados quantitativos de um desenho experimental adequado para determinar e simultaneamente solucionar equações multivariadas. Essas equações podem ser representadas graficamente como superfícies de resposta, que podem ser usadas de três formas: 1) descrever como as variáveis afetam as respostas; 2) determinar as inter-relações entre as variáveis; e 3) descrever efeitos combinados de todas as variáveis sobre a resposta (Montgomery, 2001).

O método baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar o sistema até sua otimização. Otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, ou seja, encontrar a região ótima na superfície definida pelas variáveis (Teófilo & Ferreira, 2006).

Alguns autores (Brito *et al.*, 2002) citam as quatro etapas básicas do processo da RSM como:

1 – Identificar as variáveis. O primeiro passo é identificar até cinco variáveis que sejam críticas ao estudo, ou seja, as variáveis responsáveis pela maior variação no processo. Esta etapa presume que o pesquisador conheça quais são as variáveis que influenciam o processo. Se as variáveis não forem conhecidas, devem ser realizados experimentos preliminares para identificar as principais variáveis.

2 – Definir os níveis. O segundo passo consiste em definir a faixa em que as variáveis estarão contidas. Se a faixa for muito ampla, corre-se o risco de não encontrar o ponto ótimo. Nesse caso um segundo planejamento com uma faixa mais restrita deve ser realizado.

3 – Escolher o desenho experimental apropriado. Os desenhos estabelecem uma ordem de como os experimentos devem ser realizados. Ao cobrir toda a faixa escolhida para o experimento, enfatizam-se os pontos mais próximos ao ponto médio (ponto central), ao mesmo tempo em que são reduzidos os números de experimentos.

4 – Análise dos dados. O quarto passo é analisar os dados usando um programa computacional adequado. As conclusões desse experimento devem ser confirmadas por experimentos posteriores na condição considerada ótima. Como em qualquer outro estudo científico, os resultados não podem ser extrapolados para além dos limites estabelecidos.

2.9. Planejamento fatorial completo

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k variáveis é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Normalmente, os níveis das variáveis quantitativas (i.e. concentrações de uma substância, valores de pH, etc.) são nomeadas pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto, porém o que importa é a relação inicial entre o

sinal dado e o efeito obtido, não sendo um critério definido a nomeação dos sinais. Para variáveis qualitativas (i.e. tipos de ácidos, tipos de catalisadores, etc.), como não existem valores altos ou baixos, fica a critério do experimentalista nomear os seus níveis (Teófilo & Ferreira, 2006).

2.10. Planejamento com ponto central

Os experimentos com ponto central (nível zero) são empregados quando a realização de repetições autênticas de um experimento pode ser algo inconveniente por diversas razões. Para contornar este infortúnio e obter uma boa estimativa dos erros, um experimento é normalmente incluído no centro do planejamento (Figura 2), em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado. Deste modo, é possível avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes, tanto em planejamentos de triagem como em metodologias de superfície de resposta. Além desta vantagem, recomenda-se este tipo de experimento, pois, o risco de perder a relação não linear entre os intervalos é minimizado e é possível estimar um modelo razoável e verificar se há falta de ajuste (Teófilo & Ferreira, 2006).

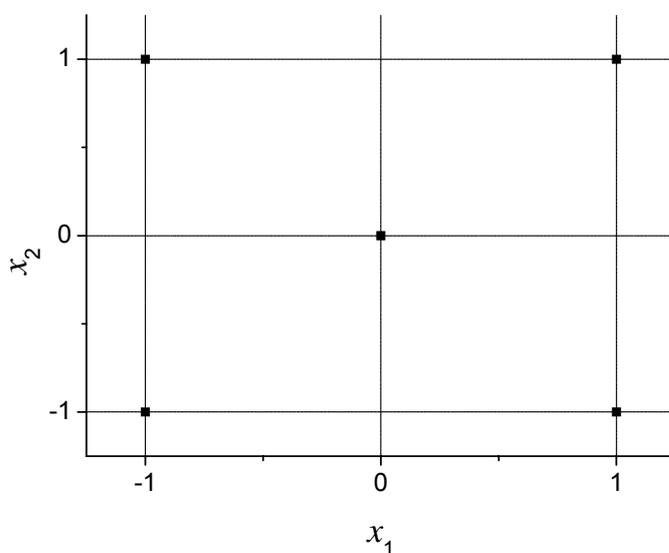


Figura 2. Planejamento 2^2 com ponto central.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Otimizar o processo de desidratação de folhas de cenoura, empregando a RSM, visando manter o máximo do conteúdo de LNA no produto seco.

3.2. Objetivos específicos

Quantificar o LNA (em miligramas/100 g de folhas desidratadas) por Cromatografia Gasosa.

Avaliar a composição em ácidos graxos nos lipídios totais extraídos de folhas de cenoura desidratadas.

Avaliar os somatórios de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3, as razões entre as séries (n-6/n-3) e as razões entre ácidos poliinsaturados por saturados (AGPI/AGS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

As amostras de folhas de cenoura orgânica (certificada pelo Instituto Biodinâmico) foram cedidas por produtor da região de Maringá (PR). Para cada ciclo de ensaios realizados foram utilizadas folhas de um mesmo lote, colhidas em um mesmo dia, totalizando, em média 8,0 kg de folhas de cenoura (entre caules e folhas).

As folhas de cenoura foram selecionadas através da aparência visual e integridade, cortadas na base do pecíolo, lavadas em água corrente e higienizadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,005% à temperatura ambiente, como descreve Couto *et al.* (2004). Após enxágüe, o excesso de água foi retirado com auxílio de papel absorvente.

Seguido ao processo de limpeza, as folhas de cenoura foram submetidas a diferentes condições de secagem, sendo para isso utilizado estufas a vácuo (FANEN Modelo 099EV) e com circulação de ar (Quimis Modelo Q-314M292). As folhas secas foram trituradas (pulverizadas) em moedor de facas, armazenadas em atmosfera de N₂, em embalagens plásticas envolvidas em papel alumínio, e armazenadas à -18 °C para posteriores análises químicas.

4.2. Umidade

O teor de umidade foi determinado gravimetricamente, conforme método da AOAC (1998), por aquecimento em estufa (105 °C). As análises foram realizadas em triplicatas.

4.3. Extração e determinação de lipídios

Os lipídios totais foram extraídos com uma mistura de clorofórmio-metanol-água (2:2:1,8 v/v), segundo Bligh & Dyer (1959). Foi pesado cerca de

1,0000 g de folhas secas de cenoura em béquer de 250 mL, adicionados 30,0 mL de solução clorofórmio-metanol (1:2 v/v) e agitados vigorosamente por 5 min. Depois, foram adicionados à mistura 10,0 mL de clorofórmio e agitados por 2 min e 18,0 mL de água destilada e agitados por 5 min. A mistura foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro quantitativo. A solução resultante foi transferida para um funil de separação de 250 mL. Após a separação das fases, a inferior contendo o clorofórmio e os lipídios, foi drenada para erlenmeyer previamente pesado, e o solvente eliminado em evaporador rotatório, com banho a 30 °C. O teor de lipídios foi determinado gravimetricamente. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.4. Transesterificação dos lipídios

A transesterificação dos ácidos graxos dos lipídios totais foi realizada segundo o procedimento de Joseph & Ackman (1992). Aos lipídios extraídos das folhas de cenoura foi adicionado 100 µL de uma solução padrão de concentração 1,000 mg/mL de heneicosanoato de metila (21:0), como padrão interno, em isooctano e 2,0 mL de heptano. Após homogeneização, a mistura foi transferida para um tubo de esterificação e o solvente foi completamente removido com fluxo de N₂ gasoso. Ao tubo adicionou-se 1,50 mL de solução metanólica de NaOH 0,5 mol/L. O tubo fechado, contendo a mistura, foi aquecido em banho-maria a 100 °C por 5 min e resfriado à temperatura ambiente. 2,0 mL de uma solução de BF₃ (trifluoreto de boro) a 12% em metanol foi adicionado ao tubo que retornou ao aquecimento em banho-maria a 100 °C, por 30 min, e foi resfriado, logo após, em água corrente. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de isooctano, agitando vigorosamente por 30 s e 5,0 mL de uma solução aquosa saturada de NaCl, novamente com agitação, por 30 s. A amostra esterificada foi mantida em repouso na geladeira até a separação das fases. O sobrenadante foi recolhido e transferido para frasco, armazenado a -18 °C, para posterior análise cromatográfica. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.5. Cromatografia dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Os ésteres de ácidos graxos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP Sil-88 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de biscianopropil polisiloxano) e detector de ionização de chama. A vazão dos gases foi de 1,2 mL/min para o gás de arraste H₂, 30 mL/min para o gás auxiliar N₂ e 30 e 300 mL/min para os gases da chama H₂ e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra foi de 1:100. A temperatura da coluna foi elevada de 150 °C a 185 °C uma taxa de 2 °C/min, sendo então elevada para 225 °C a uma taxa de 10 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 20 min. As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 230 °C, respectivamente. As injeções foram realizadas em 9 (nove) replicatas e o volume de injeção foi de 2,0 µL. As áreas dos picos foram determinadas utilizando-se um Integrador-Processador CG-300 (Instrumentos Científicos CG).

4.6. Quantificação do LNA

O LNA contido nas folhas de cenoura foi quantificado em mg/100g de folhas secas de cenoura, através da padronização interna, utilizando como padrão o metil éster do ácido heneicosanóico (21:0 metil heneicosanoato) da marca Sigma (EUA). Os cálculos foram realizados segundo método de (Joseph & Ackman, 1992), conforme Equação 1:

$$M_x = A_x \times M_i \times F_{cd} / A_i \times M_a \times F_{caa} \quad (1)$$

onde, M_x: massa do ácido graxo *x* em mg/100g de folhas de cenoura desidratadas; M_i: massa do padrão interno em mg; M_a: massa da amostra de folhas de cenoura desidratadas, submetidas à extração de lipídios totais, em gramas; A_i: área do padrão interno; A_x: área do ácido graxo *x*; F_{caa}: fator de

conversão de metil éster para ácido graxo; F_c : fator de correção (do detector de ionização chama) teórico do ácido graxo.

4.7. Identificação dos ácidos graxos

A identificação dos ácidos graxos foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção com padrões Sigma (EUA) e por co-eluição “spiking” de padrões junto com a amostra e também calculados os valores do comprimento equivalente de cadeia (ECL) a partir dos tempos de retenção corrigidos das amostras, os quais foram comparados com valores da literatura (Anexo 1).

4.8. Planejamento fatorial

Através de um planejamento fatorial 2^3 foi avaliada a influência das variáveis tempo, temperatura de secagem e estufa, empregadas no processo de desidratação das folhas de cenoura, na resposta concentração de LNA. Na Tabela 4 são apresentados os níveis inferiores (-) e superiores (+) das variáveis tempo, temperatura e estufa. Assim, foram planejados oito experimentos que foram realizados ao acaso (Tabela 5).

Tabela 4. Variáveis e níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2^3 completo para o processo de desidratação de folhas de cenoura.

	Variáveis	Unidade	Tipo	Nível (-1)	Nível (+1)
A	Tempo	h	Numérica	41	65
B	Temperatura	°C	Numérica	40	60
C	Estufa	—	Categórica	Vácuo	Circulação de ar

Tabela 5. Planejamento fatorial completo 2³.

Amostra	Variáveis					
	A		B		C	
	Tempo (h)		Temperatura (°C)		Estufa	
1	(-1)	41	(-1)	40	(-1)	Vácuo
2	(+1)	65	(-1)	40	(-1)	Vácuo
3	(-1)	41	(+1)	60	(-1)	Vácuo
4	(+1)	65	(+1)	60	(-1)	Vácuo
5	(-1)	41	(-1)	40	(+1)	Circulação de ar
6	(+1)	65	(-1)	40	(+1)	Circulação de ar
7	(-1)	41	(+1)	60	(+1)	Circulação de ar
8	(+1)	65	(+1)	60	(+1)	Circulação de ar

A partir da investigação do comportamento das variáveis empregadas nos ensaios realizados, isto é, tempo e temperatura de secagem e estufa, obteve-se a melhor resposta de teor de LNA. A partir dessa resposta projetou-se o planejamento fatorial com ponto central.

4.9. Planejamento fatorial com ponto central e metodologia de superfície de resposta

Após análises efetuadas no planejamento fatorial 2³, optou-se pela construção de um modelo empírico por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), utilizando apenas a secagem em estufa com circulação de ar (que será discutido nos resultados e discussão) e um planejamento fatorial 2² com ponto central, onde foram investigados os efeitos principais e de interação das variáveis tempo e temperatura.

Como ponto médio deste planejamento, escolheu-se a condição de secagem em estufa com circulação de ar que forneceu a melhor resposta para a concentração de LNA em folhas cenoura desidratadas. O processo de

secagem e determinação de LNA foi repetido mais duas vezes para obter uma triplicata de valores deste ponto (ponto central).

No planejamento fatorial 2^2 com ponto central, foram realizados ensaios em tempos de 12 h e temperaturas 10 °C superiores e inferiores às condições de tempo e temperatura empregados no ponto médio.

A RSM foi usada para calcular os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta (Barros Neto *et al.*, 2003). O polinômio de segundo grau empregado para o ajuste das variáveis de resposta foi:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (2)$$

onde, x_1 e x_2 são o tempo e a temperatura do processo de secagem, expressos em forma codificada; β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} , β_{12} , são os parâmetros a serem estimados; Y é a variável de resposta (concentração de LNA).

4.10. Análise Estatística

As análises de ácidos graxos nas folhas de cenoura foram realizadas em nove replicatas e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com 5% de significância, e a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey, através do programa Statistic versão 5.0 (StatSoft, 1995). A modelagem e construção das linhas de contorno foram realizadas através do programa Design-Expert versão 6.0.5 (Stat-Ease, 2001).

4.11. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas pelo Departamento de Análises Clínicas (Laboratórios de Microbiologia e Microscopia de Alimentos) da Universidade Estadual de Maringá, onde foram procedidas análises de número mais provável de coliformes totais, número mais provável de coliformes a 45 °C, pesquisa de *Salmonella ssp* em 25 g, contagem de *Bacillus cereus* (FDA, 1995).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise fatorial

Na Tabela 6 são apresentados os valores de concentração média do LNA, a partir dos experimentos obtidos da combinação das três variáveis envolvidas no processo de desidratação de folhas de cenoura, usando o planejamento fatorial completo 2^3 .

Tabela 6. Concentração de LNA em folhas de cenoura desidratadas obtidas dos experimentos do planejamento fatorial completo 2^3 .

Amostra	Variáveis						LNA ¹ (mg/100g)
	A		B		C		
	Tempo (h)		Temperatura (°C)			Estufa	
1	(-1)	41	(-1)	40	(-1)	Vácuo	999,4 ^a ± 38,7
2	(+1)	65	(-1)	40	(-1)	Vácuo	1209,5 ^b ± 52,2
3	(-1)	41	(+1)	60	(-1)	Vácuo	1274,9 ^b ± 52,5
4	(+1)	65	(+1)	60	(-1)	Vácuo	1377,2 ^c ± 16,0
5	(-1)	41	(-1)	40	(+1)	Circulação de ar	571,3 ^d ± 60,1
6	(+1)	65	(-1)	40	(+1)	Circulação de ar	653,1 ^{de} ± 37,9
7	(-1)	41	(+1)	60	(+1)	Circulação de ar	723,9 ^f ± 51,2
8	(+1)	65	(+1)	60	(+1)	Circulação de ar	668,6 ^{ef} ± 65,9

¹ Concentração média do ácido alfa-linolênico em mg/100g de folhas de cenoura secas ± desvio padrão. As análises foram realizadas em nove replicatas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Com os valores da Tabela 6, utilizando programa computacional Design-Expert versão 6.0.5 (Stat-Ease, 2001), obteve-se a análise de variância (ANOVA) do modelo e foi verificado que apenas o fator estufa é estatisticamente significativo no processo de desidratação de conservação do LNA. Tempo e temperatura não apresentaram efeito principal significativo e as

interações entre quaisquer das variáveis não foi significativa ($p < 0,05$). Os valores dos efeitos principais e de interação das variáveis estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores dos efeitos principais e efeitos de interação para o fatorial completo 2^3 .

A	B	C	AB	AC	BC	ABC
84,72	152,83	-561,03	-61,22	-71,47	-68,78	-7,33

Todas as secagens efetuadas permitiram concentrar o LNA. Em folhas de cenoura *in natura* o teor médio de LNA constituiu-se de 116 mg/100g de matéria fresca.

Tabela 8. Teor de umidade em folhas de cenoura desidratadas obtidas dos experimentos do planejamento fatorial completo 2^3 .

Amostra	Variáveis						Umidade ¹ %
	A		B		C		
	Tempo (h)	Temperatura (°C)				Estufa	
1	(-1)	41	(-1)	40	(-1)	Vácuo	8,57 ^a ± 0,11
2	(+1)	65	(-1)	40	(-1)	Vácuo	4,65 ^b ± 0,17
3	(-1)	41	(+1)	60	(-1)	Vácuo	5,79 ^c ± 0,13
4	(+1)	65	(+1)	60	(-1)	Vácuo	4,63 ^b ± 0,05
5	(-1)	41	(-1)	40	(+1)	Circulação de ar	10,15 ^d ± 0,03
6	(+1)	65	(-1)	40	(+1)	Circulação de ar	7,72 ^e ± 0,13
7	(-1)	41	(+1)	60	(+1)	Circulação de ar	7,65 ^e ± 0,17
8	(+1)	65	(+1)	60	(+1)	Circulação de ar	7,70 ^e ± 0,06

¹ Teor médio de umidade em folhas de cenoura desidratadas ± desvio padrão. As análises foram realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ao comparar, pela Tabela 6, os valores de concentração do LNA entre folhas desidratadas em estufa com circulação de ar (571,3 – 723,9 mg/100g) e a vácuo (999,4 – 1377,2 mg/100g), constatou-se que houve uma maior concentração de LNA em folhas submetidas à secagem em estufa a vácuo. Com o propósito de avaliar o teor de umidade contido nas folhas desidratadas, que poderia estar contribuindo para a diferença na concentração de LNA (em massa) entre folhas desidratadas em estufa a vácuo e com circulação de ar, foi efetuado análises de umidade, cujos resultados são mostrados na Tabela 8, para cada ensaio do planejamento fatorial 2³.

Foi procedida a análise de variância dos resultados obtidos nos experimentos da Tabela 8, a partir do modelo quadrático. Verificou-se que os valores referentes ao teor de umidade não se ajustaram ao modelo quadrático.

Entretanto, as determinações de umidade nas folhas desidratadas mostraram que as folhas submetidas à secagem em estufa a vácuo apresentaram menor teor de umidade. Em folhas de cenoura desidratadas em estufa com circulação de ar, as determinações apresentaram valores estatisticamente iguais ($p < 0,05$) em três amostras submetidas a diferentes condições de secagem. O maior teor de umidade, com percentual de 10,15%, foi observado em folhas desidratadas em estufa com circulação de ar, nas menores condições de tempo e temperatura empregadas.

Observou-se que a variável estufa foi significativa na resposta “umidade”, pois, os valores determinados nos ensaios processados a vácuo se diferenciaram dos resultados determinados nos ensaios processados em estufa com circulação de ar.

Contudo, a diferença de umidade observada entre folhas desidratadas em estufa a vácuo e com circulação de ar (de aproximadamente 3%) não foi discrepante, a ponto de ser a principal responsável pelas diferenças de concentração de LNA determinadas em folhas desidratadas na estufas empregadas no processo. Esta observação sugere que o ambiente com ausência de ar, usado na estufa a vácuo, protege a molécula de LNA, que por apresentar três insaturações está susceptível à oxidação pela ação do oxigênio atmosférico.

Os resultados obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2^3 forneceram informações que sustentaram os experimentos decorrentes, inclusive a escolha pela secagem em estufa com circulação de ar e o emprego de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

A secagem em estufa a vácuo apresentou resultados desejáveis (devido ao maior conteúdo de LNA), pois foi possível certificar a proteção conferida aos ácidos graxos poliinsaturados presentes em folhas de cenoura, através do emprego do vácuo. Contudo, algumas desvantagens foram notadas. Propriedades organolépticas importantes do alimento como cor e aroma foram parcialmente perdidas nas folhas submetidas à secagem na estufa a vácuo. Enquanto que folhas desidratadas em estufa com circulação de ar mantiveram a coloração verde e aroma agradável (semelhante ao da cenoura), as folhas de cenoura desidratadas sob vácuo apresentaram coloração escura e aparente ausência do aroma característico da folha. A Figura 3 ilustra as diferentes colorações da folha de cenoura desidratada.



Figura 3. Folhas de cenoura submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (A) e a vácuo (B).

De acordo com Baritoux *et al.*, (1992), a secagem pode aumentar o número de modificações físicas e químicas negativas, alterando a qualidade da matéria prima para a sua comercialização, como, por exemplo, mudanças em aparência, cheiro e possíveis perdas de constituintes voláteis.

Perante essas observações, optou-se em otimizar as condições de secagem de folhas de cenoura em estufa com circulação de ar. Para isso, foi examinado o comportamento do efeito principal e de interação entre as variáveis tempo e temperatura, no processo de desidratação.

O bloco referente aos ensaios realizados em estufa a vácuo foi descartado, permanecendo o grupo de ensaios em estufa com circulação de ar.

A Figura 4 apresenta o comportamento de interação entre as variáveis tempo e temperatura na resposta “concentração de LNA”, dos experimentos realizados em estufa com circulação de ar.

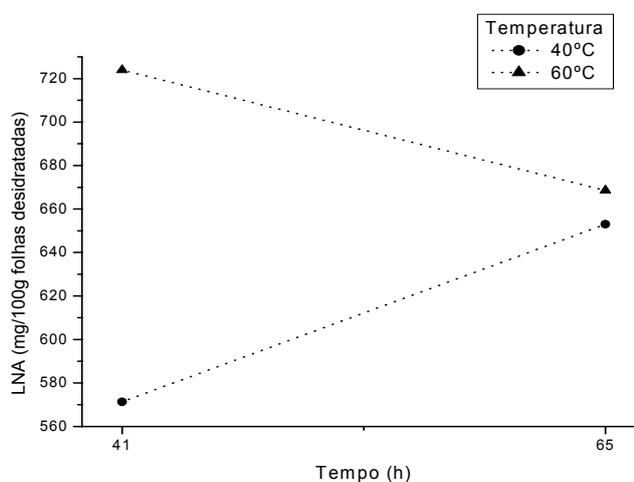


Figura 4. Interação das variáveis tempo e temperatura na concentração de LNA em folhas de cenoura submetidas à secagem em estufa com circulação de ar.

Por meio da Figura 4 pode ser verificado que a interação entre as variáveis tempo e temperatura foi significativa na resposta “concentração de LNA”. O estudo sugere a inviabilidade do emprego de temperatura elevada durante período longo. Verificou-se maior concentração de LNA em folhas

desidratadas a 60 °C por 41 h comparado as folhas submetidas à secagem em temperatura de 60 °C por 65 h.

Os resultados apontam, portanto, a necessidade do emprego de temperaturas mais elevadas que 40 °C para obtenção de melhor resposta.

5.2. Superfície de resposta

Como foi citado anteriormente, após avaliação dos resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 , optou-se pela construção de um modelo empírico pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).

Na Tabela 9 são apresentadas as condições (níveis e variáveis) e a concentração de LNA determinada nos experimentos realizados conforme o planejamento fatorial 2^2 com ponto central. Este planejamento foi usado na otimização do processo de desidratação de folhas de cenoura em estufa com circulação de ar.

O ponto médio deste planejamento, definido pelos níveis (0,0) foi determinado quando, no planejamento fatorial 2^3 , investigou-se o efeito de interação entre as variáveis tempo e temperatura, e verificou-se que a melhor condição e secagem em estufa com circulação de ar seria aquela procedida na temperatura correspondente ao nível superior, isto é, 60 °C, e tempo de secagem correspondente ao nível inferior, ou seja, 41 h. Assim, como mostra a Tabela 9, há três ensaios procedidos nestas condições. Dois deles (amostras 5 e 6) foram repetições do ensaio realizado no planejamento fatorial 2^3 (amostra 7).

Outros quatro ensaios foram realizados nas condições de tempo e temperatura superiores e inferiores às condições empregadas no ponto médio (60 °C, 41 h).

Tabela 9. Concentração de LNA em folhas de cenoura desidratadas em estufa com circulação de ar, segundo os experimentos do planejamento fatorial 2² com ponto central.

Amostra	Variáveis				LNA ¹ (mg/100g)
	A		B		
		Tempo (h)		Temperatura (°C)	
1	(-1)	29	(-1)	50	479 ^a ± 18,0
2	(+1)	53	(-1)	50	641 ^b ± 28,1
3	(-1)	29	(+1)	70	645 ^b ± 24,4
4	(+1)	53	(+1)	70	730 ^c ± 31,3
5	(0)	41	(0)	60	714 ^c ± 35,7
6	(0)	41	(0)	60	748 ^c ± 29,6
7*	(0)	41	(0)	60	724 ^c ± 51,2

¹Resultados expressos como média da concentração do ácido alfa-linolênico em mg/100g de folhas de cenoura desidratadas ± desvio padrão. As análises foram realizadas em nove replicatas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey.

* Ensaio realizado no planejamento fatorial completo 2³.

Foram investigadas as variáveis tempo, nos níveis inferior e superior a 12 h ao ponto médio, e temperatura, nos níveis inferior e superior a 10 °C ao ponto médio. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Nessas condições, empregamos o fatorial 2² utilizando os tempos de 29 e 53 h e as temperaturas de 50 e 70 °C. A condição experimental empregada no ponto médio foi de 41 h e 60 °C.

Com os valores da Tabela 9, utilizando programa computacional Design-Expert versão 6.0.5 (Stat-Ease, 2001), foi efetuada a análise de variância (ANOVA) do modelo e foram verificados os efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2² com ponto central.

Efeitos	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média Quadrática	Valor F	Prob > F
Modelo	4	51860,76	12965,19	42,46	0.0231
Tempo	1	15252,25	15252,25	49,95	0.0194
Temperatura	1	16256,25	16256,25	53,24	0.0183
Tempo ²	1	18870,01	18870,01	61,80	0.0158
Temperatura ²	0	0,00			
Tempo <i>x</i>					
Temperatura	1	1482,25	1482,25	4,85	0.1584
Erro puro	2	610,67	305,33		
Total	6	52471,43			
R ²	0,9884				

A análise de variância, Tabela 10, com 5% de significância ($p < 0,05$), indicou que o modelo quadrático proposto para concentração de LNA em folhas de cenoura desidratadas é significativo. O coeficiente de determinação do modelo (R^2), obtido pela razão entre a soma quadrática da regressão pela soma quadrática total do modelo, demonstrou que o modelo quadrático ajustou-se bem aos dados experimentais. O valor de R^2 , igual a 0,9884, indicou que 98,84% do modelo é ajustado. O valor máximo de R^2 é 1, e só ocorrerá se não houver resíduo nenhum no modelo e portanto, toda variação em torno da média for explicada pela regressão (Barros Neto *et al.*, 2003). Quanto mais perto de 1 estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas.

O modelo quadrático avaliado não apresentou erro por falta de ajuste e o erro puro apresentado não foi significativo. O exame dos resíduos é fundamental no processo de avaliação da qualidade do ajuste do modelo

empírico. Os resíduos devem ser pequenos, pois quando o modelo deixa resíduos consideráveis, ele é um modelo ruim. No modelo ideal, todas as previsões (ou predições) devem coincidir exatamente com as respostas observadas, e o resíduo seria o mínimo (Barros Neto *et al.*, 2003).

Pode ser confirmado pela análise do gráfico normal dos resíduos, apresentado na Figura 5, que o modelo não apresentou indícios de falta de ajuste, pois os resíduos se distribuíram normalmente e aleatoriamente, na forma de uma reta, não apresentando nenhum padrão diferente do linear.

A soma quadrática residual, no modelo, representada pelo erro puro, representa parte da variação das respostas em torno da média que o modelo não conseguiu reproduzir. A média quadrática residual, que é uma estimativa, com $n - 2$ graus de liberdade, da variância dos pontos em torno da equação de regressão, ou seja, do modelo quadrático ajustado. Essa estimativa pode ser interpretada como uma medida aproximada do erro médio que é cometido quando se usa a equação de regressão para prever a resposta “ y ” correspondente a um dado valor de uma variável independente, por exemplo, tempo ou temperatura.

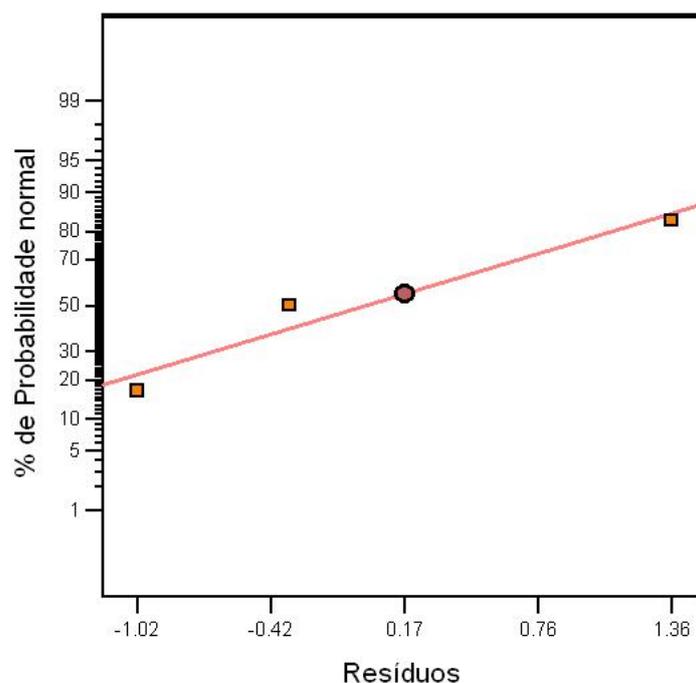


Figura 5. Gráfico normal dos resíduos para o ajuste ao modelo quadrático baseado no planejamento fatorial com ponto central.

Pela Tabela 10 é possível observar também que tanto o termo linear, como o termo quadrático, para a variável tempo mostraram-se significativos. Quanto à variável temperatura, notou-se que somente o termo linear foi significativo. A interação entre as variáveis tempo e temperatura não foi significativa ($p < 0,05$).

A Figura 6 apresenta a superfície de resposta obtida quando o modelo quadrático foi ajustado.

A otimização do processo de desidratação de folhas de cenoura em estufa com circulação de ar, visando conservar o LNA, para fins alimentícios foi realizada através da avaliação da região da superfície de resposta, apresentada na Figura 6.

Pela Figura 6 pode ser observado que o fator resposta estudado, ou seja, a concentração de LNA, apresentou comportamento linear conforme a variação de temperatura. Verificou-se que a resposta tende a aumentar linearmente com a elevação da temperatura empregada no processo de secagem.

No entanto, se relacionada à variação de tempo, a resposta apresentou comportamento quadrático. O tempo interferiu na resposta provocando uma elevação até esta alcançar um limite máximo e a partir deste ponto, a resposta começou a diminuir.

Observou-se que as melhores condições de secagem, isto é, onde a resposta foi maior para a concentração de LNA, estão na região próxima a temperatura de 70 °C e entre 41 e 47 h de processamento. Isto pode ser melhor observado no gráfico de contorno, mostrado na Figura 7, onde são apresentadas somente as curvas de níveis relativas ao modelo.

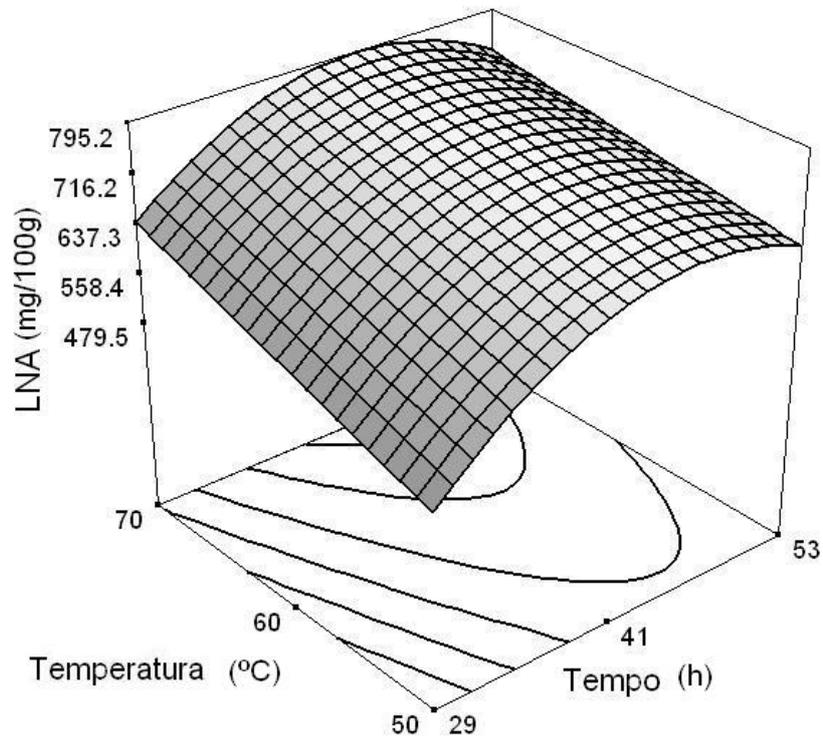


Figura 6. Superfície de resposta obtida para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 9.

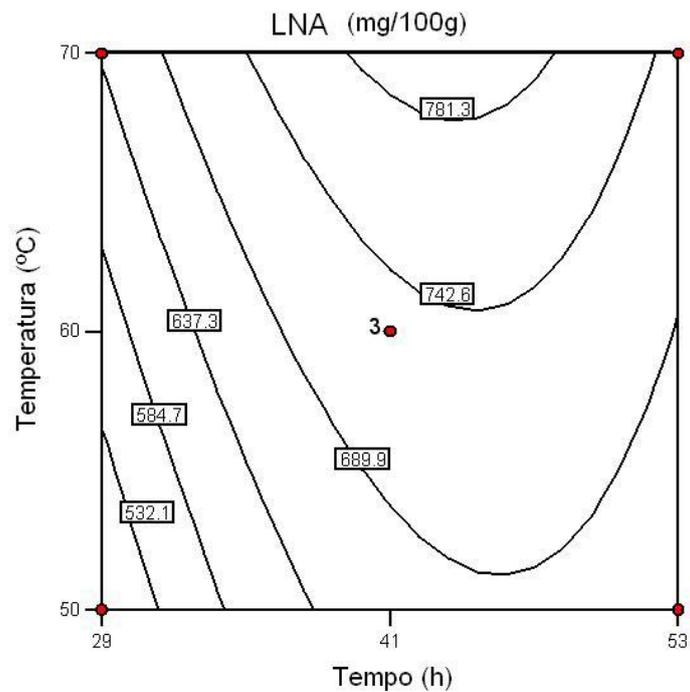


Figura 7. Gráfico de contorno da superfície de resposta para o modelo quadrático obtido.

A Equação 2 teve seus parâmetros estimados, resultando na Equação 3, que representa o modelo quadrático estudado,

$$Y = 728,67 + 61,75x_1 + 63,75x_2 - 104,92x_1^2 - 19,25x_1x_2 \quad (3)$$

em que x_1 e x_2 são o tempo e a temperatura do processo de secagem, expressos em forma codificada e Y é a variável de resposta (concentração de LNA).

O modelo matemático sugere que uma maior concentração de LNA pode ser determinada em folhas de cenoura submetidas à secagem em temperatura de 70 °C por aproximadamente 43 h (Figura 7). A escolha desses parâmetros no processo de desidratação de folhas de cenoura previu uma maior resposta na concentração de LNA e não extrapolou os limites estabelecidos dentro do modelo quadrático avaliado.

Assim, um novo experimento foi realizado, onde folhas de cenoura foram desidratadas nas condições de secagem otimizada, ou seja, a 70 °C por 43 h.

5.3. Secagem Otimizada

Foi evidente a maior proteção conferida ao LNA pelo processo de desidratação de folhas de cenoura em estufa com circulação de ar na condição de tempo e temperatura de secagem otimizada.

A concentração média de LNA determinada em folhas de cenoura submetidas à secagem otimizada foi de 984 mg/100g de folhas desidratadas, sendo que havíamos estimado pelo modelo uma concentração de LNA ao redor de 800 mg/100g de folhas desidratadas à 70 °C por 43 h.

O valor encontrado, referente ao teor de LNA em folhas de cenoura desidratadas nessas condições, se aproxima daqueles obtidos em folhas submetidas à secagem em estufa a vácuo (Tabela 6) e é superior a todas as medidas de concentração de LNA determinadas em folhas desidratadas em estufa com circulação de ar (Tabelas 6 e 9).

A secagem rápida, isto é, com uso de temperaturas mais elevadas, interrompe a ação enzimática e microbiana, preservando os constituintes químicos no tecido seco (Melo *et al.*, 2004). Segundo Silva (2006), a secagem inviabiliza o processo de desenvolvimento de agentes responsáveis pela degradação, como fungos e bactérias, e bloqueia a ocorrência de reações enzimáticas e químicas que propiciam auto-degeneração e transformações do alimento.

O emprego da temperatura de 70 °C por um tempo relativamente curto, 43 h, parece ter acelerado o processo de inativação enzimática e microbiana, de forma que diminuiu a ocorrência de reações responsável pelo processo de degradação do LNA presente nas folhas de cenoura.

5.4. Composição lipídica e em ácidos graxos de folhas de cenoura submetidas à secagem otimizada

Em média, 1,0000 g de folhas de cenoura desidratadas nas condições otimizadas e pulverizadas apresentaram concentração de 33,6 mg de lipídios totais. A estimativa do desvio foi de 3,5 mg de lipídios por grama de folhas secas. A média e a estimativa do desvio padrão foi de nove replicatas.

Vardavas *et al.* (2006), determinaram o conteúdo em lipídios totais em seis hortaliças e em quarenta e oito espécies vegetais consumidos na ilha de Creta. Os vegetais frescos apresentaram conteúdos lipídios que variaram de 10 a 380 mg por 100 g de matéria fresca.

O conteúdo lipídico de seis espécies vegetais pesquisadas por Guirguerrero & Rodríguez-García (1999) variou de 1,46 a 3,81 g por 100 g de matéria seca.

Quanto ao perfil e concentração de ácidos graxos presentes em folhas de cenoura, foram encontrados ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI). A Tabela 11 mostra a composição em ácidos graxos de folhas de cenoura desidratadas.

Tabela 11. Concentração dos ácidos graxos em folhas de cenoura desidratadas à 70 °C por 43 h, em estufa com circulação de ar.

Ácido Graxo	mg/100g* (matéria seca)
14:0	16,2 ± 1,46
16:0	409 ± 13,5
16:1n-7	46,3 ± 7,01
16:3n-3	312 ± 33,1
18:0	45,6 ± 3,64
18:1n-9	69,0 ± 1,54
18:2n-6	467 ± 44,6
18:3n-3	984 ± 97,9
22:0	9,0 ± 1,16
24:0	17,2 ± 2,14

* Resultados expressos como média ± desvio padrão.

O principal AGS foi o ácido palmítico com concentração média de 409 mg/100g. Outro AGS determinado e quantificado foi o ácido esteárico (18:0), com teor de 45,6 mg/100g, e com concentrações pouco significativas, os ácidos mirístico (14:0), behênico (22:0) e lignocérico (24:0), com concentrações que variaram de 9,0 a 17,2 mg/100g de folhas desidratadas.

Dentre os AGMI, destacaram-se os ácidos palmitotélico (16:1n-7) e oléico (18:1n-9), com concentrações de 46,3 e 69,0 mg/100g, respectivamente.

LNA, LA e ácido hexadecatrienóico (16:3n-3) constituíram a fração de AGPI. O LNA, presente em 984 mg/100g, apresentou concentração duas vezes superior à concentração de LA (467 mg/100g). Verificou-se a presença do ácido graxo 16:3n-3 em concentração significativa de 312 mg/100g de folhas de cenoura desidratadas.

A predominância dos ácidos graxos em todos os experimentos realizados foi dos ácidos graxos 18:3n-3, 18:2n-6, 16:0. Essa ocorrência foi

verificada nos trabalhos de Guil-Guerrero & Rodríguez-García (1999); Liu *et al.* (2000); Pereira *et al.* (2001); Palaniswamy *et al.* (2001); Ercisli, (2007).

Não foi constatada a presença de AGPI-CML, como 20:5n-3 e 22:6n-3, apesar de haver estudos que confirmam a presença desses ácidos graxos em algumas espécies (Simopoulos, 2002; Almazan & Adeyeye, 1998). Por outro lado, Qi *et al.* (2004) publicaram um estudo em que os ácidos araquidônico (AA, 20:4n-6) e eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) estão sendo produzidos em plantas através da introdução de três genes (sendo dois de algas e um de fungo) em *Arabidopsis thaliana*. Como resultado, a acumulação de EPA e AA foi alcançada em plantas transgênicas.

Foi verificado também a presença do ácido graxo 16:3n-3 em quantidades significativas. Esse ácido graxo foi encontrado em hortaliças (Pereira *et al.*, 2001) e em plantas silvestres (Guil-Guerrero & Rodríguez-García, 1999). Neste estudo, Guil-Guerrero & Rodríguez-García identificaram o ácido 16:3n-3 em algumas espécies vegetais analisadas através de espectrômetro de massa acoplado ao cromatógrafo à gás.

Em nosso estudo, a identificação do ácido 16:3n-3 foi realizada através de ECL (Anexo 1). Apesar das técnicas de identificação de ácidos graxos, baseadas em parâmetros de retenção dos ésteres metílicos, não serem conclusivas, a combinação de outros parâmetros de retenção, como o método de ECL, pode proporcionar confiabilidade na identificação de ácidos graxos (Visentainer & Franco, 2006), principalmente se o conteúdo lipídico da amostra não apresentar um número elevado desses componentes.

A presença do ácido graxo 16:3n-3 em folhas de cenoura eleva o teor de ácidos graxos ômega-3, disponíveis ao consumo. Este ácido graxo pode ser precursor do 18:3n-3 em humanos, como relata o trabalho de Cunnane *et al.* (1995) cujos experimentos realizados em animais mostraram que o ácido graxo 16:3n-3 pode ser alongado a 18:3n-3.

Liu *et al.* (2002), quantificaram o LNA presente na matéria seca de nove espécies vegetais. A concentração para o LNA nessas amostras variou de 4,78 a 19,88 mg/g de matéria seca. As folhas de cenoura desidratadas nas

condições otimizadas também apresentaram concentração de LNA (984 mg/100g ou 9,84 mg/g) dentro desse intervalo.

Além do teor de AGPI ser superior ao teor de AGS, as folhas de cenoura apresentaram razão entre ácidos graxos ômega-6 e ácidos graxos ômega-3 (n-6/n-3) baixa, em torno de 0,36 (Tabela 12). As razões entre ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 das hortaliças e plantas silvestres estudadas por Vardavas *et al.* (2006), abrangeram o intervalo entre 0,21 e 4,23 e apenas em 7 espécies do total de 54 analisadas, a razão n-6/n-3 foi superior a 1,00.

Tabela 12. Somatório e razões de ácidos graxos em folhas de cenoura desidratadas.

AGS ¹	AGMI ¹	AGPI ¹	n-6 ¹	n-3 ¹	AGPI/AGS ²	n-6/n-3 ²
497 ±	115,3 ±	1763	467 ±	1296 ±	3,55 ±	0,36
14,3	7,18	± 112,5	44,6	103,3	0,25	± 0,04

¹ Resultados expressos em mg/100g de folhas desidratadas

^{1,2} Valores da média ± desvio padrão.

De acordo com o *Department of Health and Social Security*, (DHSS, 1984) da Inglaterra, valores da razão AGPI/AGS inferior a 0,45 indicam alimentos pouco saudáveis, especialmente em relações às doenças cardiovasculares. O valor encontrado para a razão AGPI/AGS para folhas de cenoura desidratadas foi de 3,55.

Vários estudos afirmam que a razão de ingestão de ácidos graxos n-6 em relação aos n-3 deve diminuir, passando a proporções entre 10-2:1 (Wijendran & Hayes, 2004). Estudos já provaram que uma dieta balanceada entre LA e LNA pode reduzir o potencial de câncer de pulmão (Xia, Wang & Kang, 2005), asma (Oddy *et al.*, 2004) e pode prevenir trombose e arteriosclerose (Hu *et al.*, 2001). Em contraposição, elevada proporção de LA em relação ao LNA pode aumentar os riscos de depressão (Maes *et al.*, 1996) e doenças coronarianas (Sanders *et al.*, 1997).

Nas folhas de cenoura a proporção entre ômega-6 e ômega-3 foi de 1:2,7 (ou 0,36). Isso mostra que as folhas de cenoura podem ser aproveitadas na dieta alimentar, como fonte de ácidos graxos essenciais, em especial de LNA, além de vitaminas, antioxidantes e minerais (Pereira *et al.*, 2003). As folhas de cenoura podem ser consumidas *in natura*, e quando processadas, podem ser adicionadas em sopas, caldos, vitaminas, a fim de agregar valor nutricional aos mesmos.

5.5. Análises microbiológicas

A Tabela 13 apresenta os resultados das análises microbiológicas de folhas de cenoura desidratadas (em condição de processamento otimizada) e pulverizadas.

Tabela 13. Análise microbiológica de folhas de cenoura desidratadas e pulverizadas.

Microorganismo	Resultado (unidades)	Limite estabelecido*
Coliformes totais (NMP/g)	9	-
Coliformes a 45 °C (NMP/g)	<3	10 ³
Pesquisa de <i>Salmonella ssp</i> (em25 g)	Ausente	Ausente
Contagem de <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	<1x10 ²	5x10 ³

NMP/g (número mais provável por grama); UFC/g (unidade formadora de colônia por grama).

* Conforme Resolução da ANVISA.

De acordo com a Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001, que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001), hortaliças, legumes e similares desidratados deve haver ausência de *Salmonella*, que por ser

patogênica, pode causar infecções quando encontrada no produto. Nas folhas desidratadas houve ausência de *Salmonella*.

No que se refere à pesquisa de coliformes a 45 °C, os valores encontrados estão dentro da normalidade. A ANVISA (2001) estabelece o limite do número mais provável de coliformes, por grama, igual a um mil unidades. Quanto aos coliformes totais, a legislação não indica limite nas hortaliças e similares desidratados, mas é importante a análise já que estão relacionados com a qualidade higiênica sanitária.

O número mais provável de *Bacillus cereus*, por grama, permitido pela Resolução deve ser inferior a cinco mil unidades. Este bacilo é encontrado no solo e é um contaminante comum de cereais e outros alimentos.

As análises microbiológicas mostraram que as folhas de cenoura se enquadraram dentro dos padrões exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

6. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer um modelo matemático para prever as condições de tempo de 43 h e temperatura de 70 °C empregados no processo de desidratação de folhas de cenoura, em estufa com circulação de ar, com máximo teor de LNA.

O processo de secagem de folhas de cenoura nas condições previstas pelo modelo matemático permitiu obter uma concentração de 984 mg LNA/100g de folhas de cenoura desidratadas.

Os principais ácidos graxos constituintes das folhas de cenoura foram os ácidos LNA, LA, palmítico (16:0) e hexadecatrienóico (16:3n-3).

O valor encontrado para a razão AGPI/AGS em folhas de cenoura desidratadas foi de 3,19. Este valor foi superior ao valor recomendado de 0,45.

A relação entre ácidos graxos n-6/n-3 foi de 1:2,7, o que contribui para uma maior ingestão de ácidos graxos ômega-3 em relação aos ômega-6.

7. REFERÊNCIAS

- Aguirre J. M., & Gasparino Filho, J. (2002). *Desidratação de Frutas e Hortaliças: Manual Técnico*. Campinas, SP: ITAL.
- Almazan, A. M., & Adeyeye, S. O. (1998). Fat and fatty acid concentrations in some green vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11, 375-380.
- Ambrosano, A. J., Rossi, F., Groppo, G. A., Guirado, N., Mendes, P. C. D., & Arevalo, R. A. (2004). *Curso de Capacitação em Agricultura Orgânica*. Campinas, SP: CECOR.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2001). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em julho de 2006.
- AOAC (1998). *Official methods of analysis of AOAC international* (16th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Baritoux, O., Richard, H., Touche, J., & Derbesy, M. (1992). Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. *Flavor and Fragrance Journal*, 7, 267-271.
- Barros Neto, B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E. (2003). *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas, SP: Editora Unicamp.
- Bligh, F. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Brasil (2003). Ministério da Justiça. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Disponível

em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/LEIS/2003/L10.831.htm>>. Acesso em outubro de 2006.

- Brito, E. S., Pinto, G. A. S., Bruno, L. M., & Azeredo, H. M. C. (2002). *A metodologia de superfície de resposta (MSR) na otimização de processos biológicos: a determinação dos valores de pH e de temperatura ótimos para a atividade enzimática*. Disponível em <<http://sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Estendido/001.pdf>>. Acesso em abril de 2007.
- Broughton, K. S., Johnson, C. S., Pace, B. K., Liebman, M., & Kleppinger, K. M. (1997). Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. *American Journal of Clinical Nutrition*, *65*(4), 1011-1017.
- Burdge, G. C., & Wootton, S. A. (2002). Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal of Nutrition*, *88*(4), 411-420.
- Burdge, G. C., Jones A. E., & Wootton, S. A. (2002). Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *British Journal of Nutrition*, *88*(4), 355-363.
- Couto, S. R. M., Derivi, S. C. N., & Mendez, M. H. M. (2004). Utilização tecnológica de subprodutos da indústria de vegetais. *Higiene Alimentar* *124*(18), 12-22.
- Cunnane, S. C., Ryan, M. A., Craig, K. S., Brookes, S., Koletzko, B., Demmelmair, H., Singer, J., & Kyle, D. J. (1995). Synthesis of linoleate and α -linolenate by chain elongation in the rat. *Lipids* *30*, 781-783.
- Davis B. C., & Kris-Etherton, P. M. (2003). Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: current knowledge and practical implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, *78*(Suppl), 640S-646S.

- DH – Department of Health (1994). *Nutritional aspects of cardiovascular disease*. Report on Health and Social Subjects, 46. London: HMSO.
- DHSS – Department of Health and Social Security. (1984). Report on health and social subjects n°28, Diet and cardiovascular Disease, London. Apud: *Meat Science* (42), 443-456.
- Emken, E. A., Adlof, R.O., & Gulley, R. M. (1994). Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1213(3), 277-288.
- Ercisli, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa spp*) species. *Food Chemistry*, 104, 1379-1384.
- FDA – Food and Drug Administration. (1995). Bacteriological analytical manual (8th ed.). Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington.
- Gava, A. J. (1978). *Princípios de Tecnologia de Alimentos*. São Paulo, SP: Nobel.
- Gondim, J. A. M., Moura, M. F. V., Dantas, A. S., Medeiros, R. L. S., & Santos, K. M. (2005). Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 825-827.
- Guil-Guerrero, J. L., & Rodríguez-García, I. (1999). Lipids classes, fatty acids and carotenes of the leaves of six edible wild plants. *European Food Research and Technology*, 209, 313-316.
- Hu, F., Manson, J., & Willet, W. (2001). Type of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(1), 5-19.

- Institute of Medicine of the National Academies (2002). *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington, DC: National Academies Press,
- Jesus, M. F., Scaranto, V. L., Jalali, V. R. R., & Silva, G. F. (2003). Produção de passas de acerola em secador de bandeja. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 5(1), 81-87.
- Joseph, J. D., & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488–506.
- Kris-Etherton, P. M., Taylor, D. S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R. L., Zhao, G., & Etherton, T. D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1 Suppl), 179S-188S.
- Legrand, P., Bourre, J. M., Descomps, B., Durand, G., & Renaud, S. (2001). Lipides. In: *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Paris.
- Liu, L., Howe, P., Zhou, Y., Hocart, C., & Zhang, R. (2002). Fatty acid profiles of leaves of nine edible wild plants: An Australian study. *Journal of Food Lipids*, 9(1), 65-71.
- Liu, L., Howe, P., Zhou, Y., Xu, Z., Hocart, C., & Zhang, R. (2000). Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *Journal of Chromatography A*, 893, 207-213.
- Lorgeril, M., Renaud, S., Salen, P., Monjaud, I., Mamelle, N., Martin, J. L., Guidollet, J., Touboul, P., & Delaye, J. (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*, 343(8911), 1454-1459.

- Maes, M., Smith, R., Christophe, A., Cosyns, P., Desnyder, R., & Meltzer, H. (1996). Fatty acid composition in major depression: Decreased omega 3 fractions in cholesteryl esters and increased C20:4 omega 6/C20:5omega 3 ratio in cholesteryl esters and phospholipids. *Journal of Affective Disorders*, 38(1), 35-46.
- Maia, E. L. (1992). *Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos em peixes de água doce*. Tese de doutorado. FEA/Unicamp, Campinas, SP.
- Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matsushita, M., Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2006). Ácidos graxos poliinsaturados omega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, 19(6), 761-770.
- Masters, C. (1996). Omega-3 fatty acids and the peroxisome. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 165(2), 83-93.
- Melo, E. C., Radünz, L. L., & Melo, R. C. A. (2004). Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais: revisão. *Engenharia na Agricultura*, 12(4), 307-315.
- Montgomery, D. G. (2001). *Design and analysis of experiments*. New York: John Wiley & Sons.
- Morris, D. H. (2003). *Flax – A Health and Nutrition Primer*. Flax Council of Canada, Winnipeg, MB. Disponível em <http://www.flaxcouncil.ca/english/pdf/FlaxPrimer_Chptr3.pdf>. Acesso em abril de 2006.
- NCM – Nordic Council of Ministers (1996). Nordic nutrition recommendations. *Scandinavian Journal of Food & Nutrition*, 40(4), 161-165.

- Oddy, W. H., De Klerk, N. H., Kendall, G. E., Miharshahi, S., & Peat, J. K. (2004). Ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids and childhood asthma. *Journal of Asthma*, 41(3), 319-326.
- Palaniswamy, U. R., McAvoy, R. J., & Bible, B. B. (2001). Stage of harvest and polyunsaturated essential fatty acid concentrations in purslane (*Portulaca oleraceae*) leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3490-3493.
- Pereira, C., Li, D., & Sinclair, A. J. (2001). The α -linolenic acid content of green vegetables commonly available in Australia. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 71(4), 223-228.
- Pereira, G. I. S., Pereira, R. G. F. A., Barcelos, M. F. P., & Morais, A. R. (2003). Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 27(4), 852-857.
- Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J. A., Stobart, A. K., & Lazarus, C. M. (2004). Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnology*, 22(6), 739-745.
- Sampaio, S. M., & Queiroz, M. R. (2006). Influência do processo de secagem na qualidade do cogumelo Shiitake. *Engenharia Agrícola*, 26(2), 570-577.
- Sanders, T., Oakley, F., Miller, G., Mitropoulos, K., Crook, D., & Oliver, M. (1997). Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acid on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17, 3449-3460.
- Sartorelli, C. S. C. (1998). *Caracterização química da parte aérea de cenoura (Daucus carota) e beterraba (Beta vulgaris) visando ao aproveitamento na alimentação humana*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras.

- Sawaya, A. L. (2006). Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estudos Avançados*, 20(58), 147-158.
- SBRT (2005). Portal do Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Disponível em <www.sbrt.ibict.br>. Acesso em julho de 2006.
- Schaefer, E. J. (2002). Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(2),191-212.
- Silva, A. J. I. (2000). *Composição lipídica e quantificação dos ácidos graxos poliinsaturados EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3) de peixes de água doce*. Tese de doutorado. FEA/Unicamp, Campinas, SP.
- Silva, L. C. (2006). Processamento de alimentos. Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em <http://www.agais.com/sa0106_processamento_de_alimentos.pdf>. Acesso em agosto de 2007.
- Simopoulos, A. P., Leaf, A., & Salem, N. (1999). Essentiality and recommended dietary intakes for omega 6 and omega-3 fatty acids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 43(3), 127-130.
- Simopoulos, A. P., Leaf, A., & Salem, N. (1999b). *Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for n-6 and n-3 fatty acids*. Bethesda, MD: National Institutes of Health.
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11(S6), S163-S173.
- Simopoulos, A. P. (2002b). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- Simopoulos, A. P. (2004). Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, 20(1), 77-90.

- Simopoulos, A. P. (2004b). Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biological Research*, 37, 263-277.
- Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2006). *Colesterol da mesa ao corpo*. São Paulo, SP: Varela.
- SRC – Scientific Review Committee (1990). *Nutrition recommendations*. Ottawa: Canadian Government Publishing Centre, Supply and Services Canada.
- Stat-Ease (2001). Design expert 6.0.5 Software. Stat-Ease Inc.: Minneapolis, MN.
- StatSoft (1995). Statistica 5.0 Software. Statsoft: Tucksa.
- Stránský, K., Jursík, T., & Vitek, A. (1997). Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene interrupted) fatty acids. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, 143-158.
- Teófilo, R. F., & Ferreira, M. C. (2006). Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quimica Nova*, 29(2), 338-350.
- Thompson, R. H. (1996). A simplified fatty acid analyses in multicomponent foods with a standard set of isothermal GLC conditions coupled with ECL determinations. *Journal Chromatography Science*, 34, 495–504.
- Vardavas, C. I., Majchrzak, D., Wagner, K. H., Elmadfa, I., & Kafatos, A. (2006). Lipid concentrations of wild edible greens in Crete. *Food Chemistry*, 99, 822-834.
- Vilela, N. J., Lana, M. M., Nascimento, E. F., & Makishima, N. (2003). O peso da perda de alimentos para a sociedade: o caso das hortaliças. *Horticultura Brasileira*, 21(2), 141-143.

- Visentainer, J. V. (2003). *Quantificação dos ácidos graxos poliinsaturados alfa-linolênico (LNA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em tilápias (Oreochromis niloticus) submetidas a diferentes tratamentos com óleo de linhaça*. Tese de Doutorado. FEA/Unicamp, Campinas, SP.
- Visentainer, J. V., & Franco, M. R. B. (2006). *Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação*. São Paulo, SP: Varela.
- WHO – World Health Organization (1995). Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. *Nutrition Reviews*, 53(7), 202-205.
- Wijendran, V., & Hayes, K. C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24, 597-615.
- Xia, S. H., Wang, J., & Kang, J. X. (2005). Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by down-regulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis*, 26(4), 779-784.
- Youdim, K. A., Martin, A., & Joseph, J. A. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18, 383-399.

8. ANEXOS

Anexo 1. Valores de comprimento equivalente de cadeia (ECL) calculados a partir do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostra de folhas de cenoura desidratadas dopada com alguns ésteres metílicos padrões.

Ésteres de ácidos graxos	Amostra*	Referências de literatura				
		A	B	C	D	E
14:0	13,94 ± 0,01	14,00	14,00	14,00	14,0000	14,000
16:0	16,02 ± 0,00	16,00	16,00	16,00	16,0000	16,000
16:1n-7	16,29 ± 0,04	16,31	16,30	16,26	16,3120	16,310
16:3n-3	17,33 ± 0,04			17,49		
18:0	18,05 ± 0,00	18,00	18,00	18,00	18,0000	18,000
18:1n-9	18,29 ± 0,05	18,26	18,24	18,21	18,2334	18,236
18:2n-6	18,74 ± 0,01	18,74	18,72	18,64	18,7093	18,699
18:3n-3	19,36 ± 0,02	19,38	19,38	19,25	19,3598	19,347
20:0	20,04 ± 0,00	20,00	20,00	20,00	20,0000	20,000
20:3n-3	21,34 ± 0,02	21,38	21,38	21,24	21,3528	21,337
21:0	21,01 ± 0,01		21,00		21,0000	21,000
22:0	22,01 ± 0,00	22,00	22,00	22,00	22,0000	22,000
24:0	23,96 ± 0,00	24,00	24,00	24,00	24,0000	24,000

* Coluna Carbowax 20M – 50m x 0,25mm x 0,25µm; 200°C/isotérmica (condições utilizadas para determinação de ECL neste experimento).

A - Visentainer, (2003). (Coluna DB-WAX 20M - 30m x 0,247mm x 0,25µm; 200°C/isotérmica).

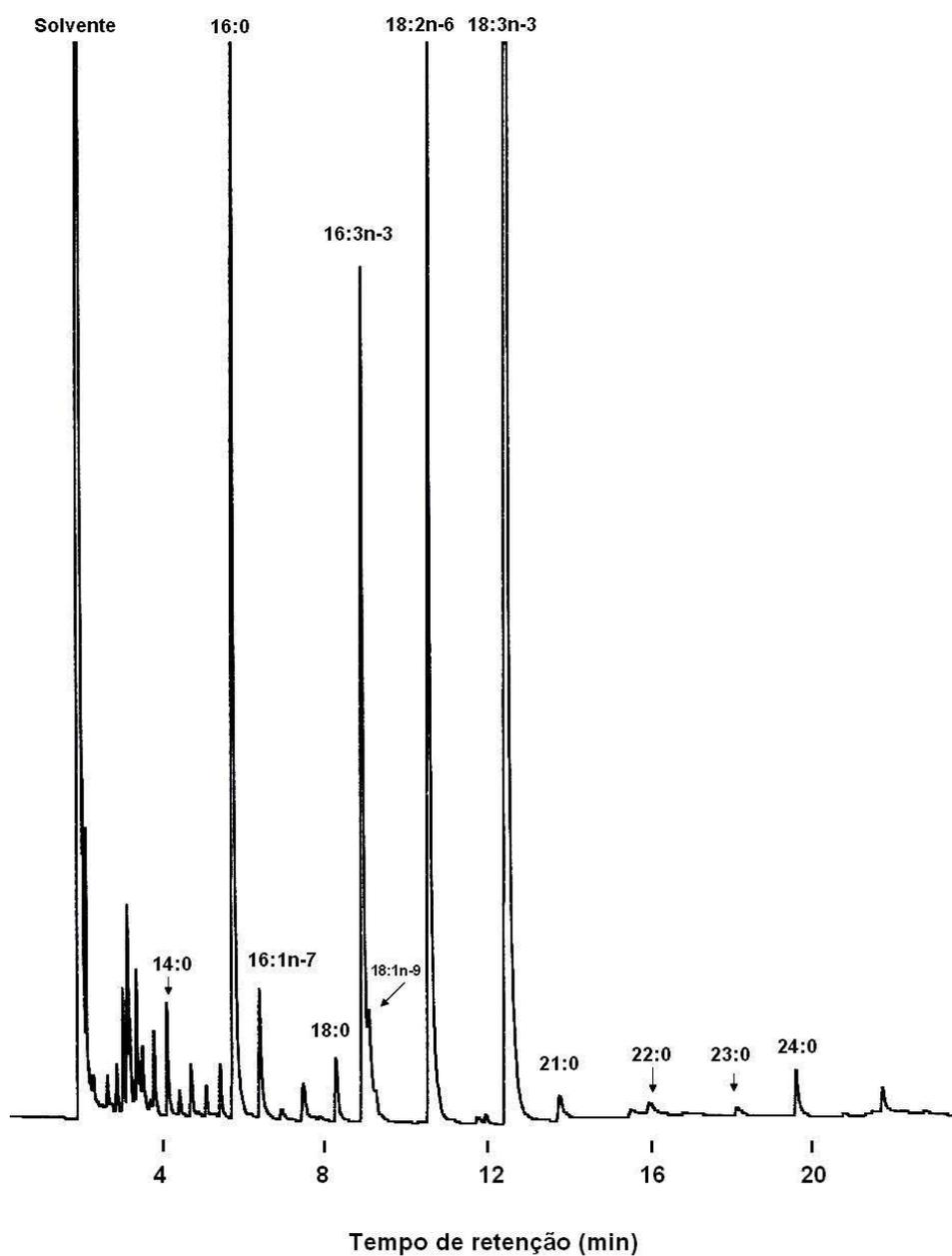
B - Silva, (2000). (Coluna DB-WAX 20M - 30m x 0,247mm x 0,25µm; 200°C/isotérmica).

C - Maia, (1992). (Coluna DB-WAX 20M - 50m x 0,22mm x 0,25µm; 200 °C/42 min).

D - Stránsky, *et al.* (1997). Coluna DB-WAX 20M - 30m x 0,247mm x 0,25µm; 200°C/isotérmica).

E – Thompson, (1996). (Coluna Carbowax 20M - 60m x 0,25mm x 0,25µm; 200°C/isotérmica).

Anexo 2. Cromatograma dos ésteres metílicos de uma amostra de folhas de cenoura desidratadas. Análise efetuada a temperatura de 150 °C com elevação a 2 °C/min até a temperatura de 185 °C, com elevação a uma taxa de 10 °C/min até atingir 225 °C, permanecendo nesta temperatura. A presença do heneicosanoato de metila (21:0) se deve à adição do padrão à amostra.



Anexo 3. Trabalhos apresentados e publicados em anais de eventos.

Aguiar, A. C., Almeida, V. V., Martin, C. A., Matsushita, M., Souza, N. E. & Visentainer, J. V. Avaliação quantitativa de ácidos graxos em folhas de cenoura frescas e submetidas à secagem. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (2006). Curitiba, PR.

Almeida, V. V., Martin, C. A., Bonafé, E. G., Silva, F. B., Matsushita, M., Souza, N. E., Visentainer, J. V. Avaliação da concentração de ácidos graxos em folhas de cenoura obtidas na feira do produtor do município de Maringá (PR). In: II CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE CASCAVEL E II SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL (2006). Cascavel, PR.

Bonafé, E. G., Tanamati, A. A. C., Matsushita, M., Souza, N. E., Zara, R. F., Almeida, V. V., & Visentainer, J. V. Quantificação de ácidos graxos ômega-3 em folhas de cenoura (*Daucus carota* L.). In: XVI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (2007). Maringá, PR.

Almeida, V. V., Bonafé, E. G., Matsushita, M., Muniz, E. C., Souza, N. E., & Visentainer, J.V. Processo de desidratação de folhas de cenoura utilizando Metodologia de Superfície de Resposta, visando o aproveitamento de ácidos graxos ômega-3 para a alimentação humana. IN: 7º SLACA - SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (2007). Campinas, SP.