

WILTON SOARES CARDOSO

**VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS DE MILHO QUANTO À COMPOSIÇÃO DE
CAROTENÓIDES NOS GRÃOS VISANDO A BIOFORTIFICAÇÃO**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C268v
2007

Cardoso, Wilton Soares, 1979-
Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição
de carotenóides nos grãos visando a biofortificação /
Wilton Soares Cardoso. – Viçosa, MG, 2007.
xiii, 52f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.
Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 45-51.

1. Milho - Melhoramento genético. 2. Carotenóides.
3. Vitamina A. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 633.152

WILTON SOARES CARDOSO

**VARIABILIDADE DE GENÓTIPOS DE MILHO QUANTO À COMPOSIÇÃO DE
CAROTENÓIDES NOS GRÃOS VISANDO A BIOFORTIFICAÇÃO**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 20 de dezembro de 2007.

**Pesq. Maria Cristina Dias Paes
(Co-Orientadora)**

**Prof. João Carlos Cardoso Galvão
(Co-Orientador)**

Pesq. Flávio Dessaune Tardin

Prof. Múcio Silva Reis

**Prof. Aluizio Borém de Oliveira
(Orientador)**

Aos meus pais, José Cardoso (*in memoriam*) e Maria Rivalda, pelo apoio, pelas orações e pela abdicação.

Aos meus irmãos Wldenes, Wellington e Filipe e meu afilhado Enzo pelo incentivo e pela confiança.

A minha Flávia, pela motivação, amor, compreensão e pelo carinho em todos os momentos.

Dedico e ofereço

**“ Quem tentar pegar estrelas pode não agarrar nenhuma, mas
nunca enfiará a mão na lama.”**

Leo Burnett (1891-1971)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção, força, saúde e presença em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais e aos meus irmãos pelo amor e incentivo.

A Flávia, minha fonte de amor, carinho e incentivo.

Ao Prof. Aluizio Borém pelos valiosos ensinamentos, pela orientação, amizade e confiança.

À Pesquisadora Maria Cristina pela oportunidade, disponibilidade, ensinamentos, incentivo e pelos conselhos sempre pertinentes.

Ao Prof. João Galvão pelos ensinamentos sobre a cultura do milho e pela co-orientação.

Ao Prof. Múcio Reis e ao Pesquisador Flávio Tardin pela disponibilidade de participarem da banca examinadora e pelas importantes considerações.

Aos amigos Fabiano, Cleyson, Farone, Augusto, Leandro, Hilton, Emanuel e Ronize que me acompanham pela vida.

Aos novos amigos da Embrapa de Sete Lagoas, Carlinhos, Sara, Ana Flávia, Renata, Ney, Edvaldão, Edvaldinho, Elisa, Jéssica, Ramon, Paulo, Diógenes, Willians, Marcelo, Flávio e Lívia.

À Universidade Federal de Viçosa por meio do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realizar o curso.

À Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade de realizar os experimentos nos seus laboratórios e campos experimentais.

À HARVESTPLUS pela concessão da bolsa e pelo financiamento da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Desnutrição e hipovitaminose A.....	3
2.2. Vitamina A.....	4
2.3. O milho.....	5
2.4. Valor nutricional do milho.....	7
2.5. Carotenóides.....	8
2.6. Aspectos nutricionais dos carotenóides.....	12
2.7. Biofortificação do milho.....	13
2.8. Diversidade genética e análise multivariada.....	15
2.9. Técnicas de agrupamentos.....	16
2.9.1. Distância Euclidiana Média.....	17
2.9.2. Método hierárquico da variância mínima de Ward.....	17
2.9.3. Método de otimização de Tocher.....	18
2.10. Componentes Principais.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Genótipos analisados quanto ao perfil de carotenóides nos grãos...	21
3.2. Preparo das amostras.....	23

3.3. Análise de carotenóides.....	23
3.4. Análise estatística dos dados.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Análises dos carotenóides totais e suas frações.....	24
4.2. Correlação entre as variáveis.....	31
4.3. Vitamina A dos genótipos analisados.....	32
4.4. Análises multivariada.....	34
4.5. Seleção de genótipos para o programa de biofortificação.....	39
5. CONCLUSÃO.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE QUADROS

	Página
1- Genótipos analisados para teor e perfil de carotenóides. Distribuição destes nas classes de origem: linhagens elite, variedades e híbridos comerciais e acessos do Banco Ativo de Germoplasma.....	22
2- Valores da proporção (%) de monohidroxilados sobre a proporção de carotenos e da proporção (%) de xantofilas sobre a proporção de monohidroxilados para os 134 genótipos analisados.....	30
3- Correlações de Pearson entre as características estudadas.....	32
4- Agrupamento dos genótipos estudados, segundo Tocher.....	35
5- Perfil dos grupos formados pelo agrupamento de Tocher.....	36
6- Genótipos promissores para programas de melhoramento, baseado no teor de carotenóides totais, teor de carotenos e proporção de caroteno.....	39
7- Ideótipos promissores para o programa de melhoramento, baseado nos melhores índices para mono/carotenos e xantofilas/mono para aumento do teor de pró-vitamina A.....	40
8- Materiais promissores para o programa de melhoramento.....	43

LISTA DE TABELAS

	Página
1- Resultado das análises de carotenóides dos 134 genótipos.....	26
2- Autovalores (λ_i) e coeficientes de ponderação (autovetores) dos Componentes Principais (CPs).....	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Estrutura química de alguns carotenóides.....	9
2- Parte inicial da via biossintética dos carotenóides com a formação do fitoeno.....	10
3- Via biossintética dos carotenóides com a geração de carotenóides cíclicos e as xantofilas.....	11
4- Ilustração da via biossintética para produção de monohidroxilados e xantofilas.....	29
5- Gráfico de barras horizontais. Teor de vitamina A dos genótipos analisados.....	33
6- Dispersão gráfica dos genótipos com base nos Componentes Principais.....	38
7- Dendrograma ilustrativo da dissimilaridade genética entre os genótipos de milho, estabelecido pelo método de Ward.....	42

RESUMO

CARDOSO, Wilton Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007. **Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenóides nos grãos visando a biofortificação.** Orientador: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Orientadores: Maria Cristina Dias Paes e João Carlos Cardoso Galvão.

A deficiência de vitamina A é a principal causa de cegueira no mundo, atingindo aproximadamente 21% de todas as crianças, com maior número de afetados, em partes da Ásia e da África. A biofortificação do milho com carotenóides pró-vitamina A, através do melhoramento genético, é uma alternativa para diminuir essa deficiência, principalmente nos países mais pobres. O grão de milho, que é um dos principais alimentos nas áreas pobres e mais atingidas pela hipovitaminose A, produz carotenóides com variabilidade de teor e perfil, o que possibilita o melhoramento. Os carotenóides são compostos lipossolúveis encontrados nas plantas, microorganismos e alguns animais, e dos 600 tipos existentes, cerca de 50 carotenóides possuem atividade pró-vitamina A. Desses, o β -caroteno é o que apresenta a maior atividade, sendo o principal alvo para o melhoramento. O objetivo desse trabalho foi à caracterização de 134 genótipos quanto ao teor e perfil de carotenóides, todos provenientes dos campos experimentais e do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG, sendo composto por variedades e híbridos comerciais provenientes de ensaio nacional, linhagens elites desenvolvidas para o programa de biofortificação e outros acessos escolhidos devido à coloração amarelo-laranja do endosperma. As análises foram realizadas em duplicata, por método espectrofotométrico, para quantificar o conteúdo de carotenóides totais, carotenos, monohidroxilados e xantofilas. As variações para as seguintes características analisadas foram: carotenóides totais (9,46 a 42,84 $\mu\text{g/g}$), carotenos (0,88 a 4,93 $\mu\text{g/g}$), xantofilas monohidroxiladas (1,13 a 7,22 $\mu\text{g/g}$) e xantofilas diidroxiladas (5,55 a 34,11 $\mu\text{g/g}$). A média de carotenóides totais foi de 22,34 $\mu\text{g/g}$ destacando-se a linhagem 541332 (42,84 $\mu\text{g/g}$). Para os carotenos a média foi de 2,66 $\mu\text{g/g}$ sendo a maior concentração encontrada para o BRS 1001 (4,93 $\mu\text{g/g}$); os materiais analisados apresentaram teores médios de

monohidroxiados e xantofilas de 3,88 e 16,93 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, com destaque para duas linhagens elite, a 540755 com 7,22 $\mu\text{g/g}$ de monohidroxiados e a 541312-1 com 34,11 $\mu\text{g/g}$ de xantofilas. Considerando os resultados, em comparação com os valores normais para o grão de milho e outros reportados por diversos autores, verifica-se que o germoplasma da Embrapa possui variabilidade e potencial para geração de grãos biofortificados, principalmente para total de carotenóides pró-vitamina A, podendo ser utilizado em programas de melhoramento que visem o aumento da concentração desta característica. Por análise multivariada, os genótipos foram agrupados pelo método de Tocher em 18 grupos, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana média, confirmando que embora haja muitas semelhanças genéticas entre os materiais, há bastante variabilidade no germoplasma estudado. Para seleção de genótipos destinados ao melhoramento, foram escolhidos os materiais de maior conteúdo de carotenóides totais e carotenos e aqueles de grupos divergentes mostrados no agrupamento de Tocher. Além disso, foi criado para cada genótipo, pela divisão de suas proporções de monohidroxiados sobre carotenos e de xantofilas sobre os monohidroxiados, dois índices, que indicavam tendência variada de genótipos em produzirem monohidroxiados e xantofilas. Assim, quatro ideótipos foram estabelecidos levando em consideração os menores índices, maior conteúdo de carotenóides totais e também maior proporção de carotenos. Estes quatro ideótipos foram incorporados aos 134 genótipos para geração de um dendrograma, por meio de análise de agrupamento pelo Método de Ward. No dendrograma foram identificados genótipos no mesmo grupo dos ideótipos, sendo selecionados como materiais promissores para o programa de biofortificação. Ao final, dentre o germoplasma estudado, 20 linhagens elite foram identificadas para o melhoramento visando o aumento no teor de pró-vitamina A no grão de milho.

ABSTRACT

CARDOSO, Wilton Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2007. **Variability of maize genotypes for grain-carotenoid composition aiming biofortification.** Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-Advisers: Maria Cristina Dias Paes and João Carlos Cardoso Galvão.

Vitamin A deficiency is the leading cause of blindness in the world, reaching approximately 21% of all the mal nourished children, with the largest number of affected kids in parts of Asia and Africa. Biofortification of the maize with provitamin A carotenoids, through breeding, is an alternative to diminish this deficiency, mainly in poor countries. The maize grain is one of main staple food in poor areas reached by hipovitaminose A. Maize possess carotenoids with variability in content and profile, what makes breeding a possibility. Carotenoids are liposoluble compounds found in plants, microorganisms and some animals, and of the 600 existing types, about 50 carotenoids possess provitamin A activity. Of these substances, the β -carotene, is the main target for genetic improvement. The objective of this work was the characterization of 134 maize genotypes for carotenoids content and profile. All seeds came from the experimental fields and the Active Gene Bank of Embrapa Milho and Sorgo, at Sete Lagoas, MG, Brazil. The genotypes were commercial hybrids and varieties from national trials, inbred lines developed by the Embrapa biofortification breeding program and other accesses chosen due its yellow-orange endosperm color. The analyses were carried out in duplicates by spectrophotometric method to quantify the content of total carotenoids, carotenes, monohidroxylados and xanthophylls. The variations for the following traits: total carotenoids (9.46 to 42.84 $\mu\text{g/g}$), carotenes (0.88 to 4.93 $\mu\text{g/g}$), xanthophylls monohidroxylated (1.13 to 7.22 $\mu\text{g/g}$) and xanthophylls diidroxylated (5.55 to 34.11 $\mu\text{g/g}$). The average total carotenoid was 22.34 $\mu\text{g/g}$ and the inbred line 541332 averaged 42.84 $\mu\text{g/g}$. Carotene average was of 2.66 $\mu\text{g/g}$, being the largest concentration found for BRS 1001 (4.93 $\mu\text{g/g}$); the materials analyzed averaged monohidroxylated and xanthophylls levels of 3.88 and 16.93 $\mu\text{g/g}$, respectively, with prominence for two elite inbreds, 540755 with 7.22 $\mu\text{g/g}$ of monohidroxylated and 541312-1 with 34.11 $\mu\text{g/g}$ of xanthophylls. Comparing these results to ordinary averages it can be observed that the

Embrapa germplasma has good variability and high potential for development of biofortified lines, mainly for total of carotenoids provitamin A. By multivariate analysis, the genotypes were grouped by the Tocher method in 18 groups, having as dissimilarity measure the average Euclidian distance. However, there are great genetic similarities among the entries. For selection of genotypes for genetic improvement, the materials were chosen for greater content of total carotenoids and carotenes and those of divergent groups shown in the Tocher grouping. In addition, for each genotype was established using the ratio monohydroxylated/carotenes and xanthophylls/monohydroxylated, two indices, to indicate tendencies to produce monohydroxylados and xanthophylls. Thus, four ideotypes were established taking in consideration the lower indices, higher contents of total carotenoids and also higher proportion of carotenes. These four ideotypes were included with the 134 genotypes for generation of a dendrogram, by the clustering method Ward. In the dendrogram was identified genotypes clustered with the ideotypes, which were selected as promising entries a biofortification breeding program. Finally, 20 elite inbred lines were also identified for breeding for provitamin A content.

1. INTRODUÇÃO

A deficiência de vitamina A é a principal causa de cegueira no mundo, atingindo aproximadamente 21% de todas as crianças, e com o maior número de afetados nos continentes asiático e africano (WHO, 2002). A biofortificação de alimentos básicos com substâncias com atividade pró-vitamina A, onde o problema é endêmico, através do melhoramento genético de plantas, é apontada como uma estratégia na diminuição desta deficiência, principalmente nos países mais pobres (HARVESTPLUS, 2007).

Cerca de 50 carotenóides possuem atividade pró-vitamina A, destes, β -caroteno é o que apresenta maior atividade provitamínica, embora α -caroteno, β -criptoxantina e zeinoxantina apresentam também atividade provitamínica (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Por esta razão, a biofortificação de espécies agrícolas por meio do melhoramento genético para aumento de substâncias pró-vitamina A é alvo dos cientistas (NUTTI, 2006; HARVESTPLUS, 2007).

No Brasil, teve início em 2004, o primeiro programa de melhoramento genético de plantas com o objetivo de biofortificação, sendo o milho eleito como planta alvo (NUTTI, 2006), por ser considerada uma espécie carotenogênica, ou seja, produtor de carotenos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Nos milhos normais, as concentrações de carotenóides totais variam de 0,15 a 33,11 $\mu\text{g/g}$, distribuídos no endosperma do grão (KURILICH & JUVIK, 1999). As principais classes de carotenóides são as xantofilas (luteína, β -criptoxantina e zeaxantina) e os carotenos (β -caroteno, α -caroteno e zeinoxantina), estando as primeiras em maior proporção no milho (90%). O β -caroteno encontra-se em pequena concentração, aproximadamente 5% do total de carotenóides no grão. Entretanto, a variabilidade para o perfil de carotenóides e suas concentrações já foi observada para variedades e demais genótipos de milho, o que sugere a possibilidade de melhoramento para aumento do teor de carotenos (JANICK-BUCKNER *et. al.*, 1999; GOODWIN, 1980).

Para garantir a eficiência de um programa de melhoramento, torna-se necessário o conhecimento detalhado da constituição e diversidade genética das espécies (BORÉM & MIRANDA, 2005), pois, sem o conhecimento da variabilidade e da sua interação com o ambiente, é bastante difícil a obtenção de

genótipos superiores. E para o sucesso do programa de melhoramento para concentração de nutrientes, a seleção dos genitores é fator primordial, sendo a identificação dos mesmos dependentes da precisão do processo de obtenção das amostras e das análises realizadas.

Assim, pretende-se, com este trabalho, caracterizar genótipos (variedades e híbridos comerciais, linhagens elites e acessos do Banco Ativo de Germoplasma) de milho da Embrapa Milho e Sorgo para o perfil de carotenóides no grão e identificar genótipos com características que possam ser utilizados em programas de melhoramento para alto teor de pró-vitamina A.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desnutrição e hipovitaminose A

A desnutrição energético-protéica, as anemias, a hipovitaminose A e o bócio são apontadas como as deficiências nutricionais de maior importância epidemiológica nos países em desenvolvimento (BATISTA FILHO & RISSIN, 1993). Desde 1990, uma série de análises confirma que 50 a 70% de todas as mortes de crianças, nos países em desenvolvimento, são causadas direta ou indiretamente pela fome e a desnutrição (BRICE *et al.* 2003).

A deficiência da vitamina A, denominada hipovitaminose A, é definida como baixas concentrações de retinol no plasma, que resulta na diminuição da visão em crianças e adultos em muitas partes do mundo, tornando a causa principal da cegueira adquirida na infância (WHO, 2002). Crianças abaixo dos cinco anos de idade e mulheres em idade reprodutiva estão no grupo de maior risco desta deficiência e de suas consequências adversas à saúde. No mundo, aproximadamente 21% de todas as crianças sofrem da deficiência da vitamina A, com a maior prevalência da deficiência, e com os maiores números afetados, em partes da Ásia, variando de 30% a 48%, e na África, com variações de 28% a 35% (WHO, 2002).

Até o final da década de 70, a maior atenção à carência de vitamina A era concentrada nas manifestações oculares da síndrome xerofáltica, considerada a principal causa de cegueira evitável na infância (DINIZ, 2001). No entanto, a partir dos anos 80, tem sido demonstrada uma estreita relação entre a deficiência de vitamina A e o aumento da morbimortalidade por doenças infecciosas em crianças (SOMMER, 1995). A falta de vitamina A tem como consequência a redução da capacidade do sistema imunológico das crianças contra infecções (BEATON *et al.*, 1993).

No Brasil, os estudos de prevalência têm demonstrado que a hipovitaminose A é considerada um problema de saúde pública na região Nordeste. Levantamentos realizados nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia, no período de 1987 a 1997, mostraram prevalência entre 16% e 55% de níveis inadequados de retinol sérico em pré-escolares (SANTOS *et*

al.,1983; MCAULIFFE *et al.*, 1991; FLORES *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 1996). Nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, sinais clínicos oculares, como mancha de *Bitot* e cicatrizes corneais, foram diagnosticadas em crianças na idade pré-escolar, sobretudo, durante a entressafra, período que compreende os meses de setembro a dezembro, quando ocorre a mais severa estiagem no semi-árido, comprometendo, sobremaneira, a produção, a oferta e o consumo de alimentos (SANTOS *et al.*, 1983; DINIZ & SANTOS, 2000). Tal deficiência constitui ainda problema endêmico em grandes espaços das regiões Norte, Nordeste e Sudeste (SANTOS *et al.*, 1983; MCAULIFFE *et al.*, 1991; FLORES *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 1996). Em outras regiões, fora do eixo tradicional de miséria do país, têm sido encontradas cifras de prevalência indicativas da hipovitaminose A como um preocupante problema de saúde pública, a exemplo do Rio de Janeiro (RAMALHO *et al.*, 1998; RAMALHO *et al.*, 2000) e em algumas localidades de São Paulo (GONÇALVES *et al.*, 1995). Nessas áreas, níveis de retinol abaixo do limite da normalidade chegam a 15% da população (BRASIL, 2000).

Várias ações governamentais têm sido instituídas para reduzir esses números, como o fornecimento de suplementos de vitaminas e minerais, além da fortificação de alimentos com vitamina A, por meio de processamentos pós-colheita. Entretanto, há limitações para esses tipos de programas, devido ao fato da hipovitaminose A estar concentrada em regiões pobres ou em desenvolvimento, sendo possível que tanto os suplementos, quanto os alimentos fortificados, não alcancem a maior parte da população necessitada, devido a sistemas de saúde não funcionais e insuficiente infra-estrutura “de mercado” (APROVEITANDO, 2004).

2.2. Vitamina A

Vitamina A é a expressão genérica usada para descrever o retinol e todos os carotenóides dietéticos que têm atividade biológica de transretinol (GOMES *et al.*, 2005). As formas metabolicamente ativas incluem os correspondentes aldeídos (retinal) e ácido (ácido retinóico) do retinol (IOM, 2001). Sendo um nutriente essencial à manutenção das funções fisiológicas normais do organismo. Dentre suas diversas funções, destacam-se aquelas ligadas ao crescimento, à

reprodução, ao desenvolvimento fetal, à função imunológica e à integridade do globo ocular (SOMMER, 1995; DIMENSTEIN, 1999), sendo, portanto, um micronutriente essencial para a saúde. Por sua ação sobre o desenvolvimento embrionário e na diferenciação normal de tecidos epiteliais, a vitamina A torna-se fundamental em períodos de crescimento e desenvolvimento, como na gestação e na lactação (AZAIS-BRAESCO & PASCAL, 2000).

Nos alimentos de origem animal, como carne, leite e derivados, a vitamina A é encontrada como retinol, e nos vegetais como o milho (amarelo-alaranjado), frutas, brócolis e batata doce ela é presente como carotenóides pró-vitamina A (SOUZA & VILAS BOAS, 2002; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

2.3. O milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie da família das *Gramineae/Poaceae* (MAGALHÃES *et al.*, 2002), originária das Américas, provavelmente do México, tendo sido domesticada nos últimos oito mil anos. Os povos primitivos que habitavam a América Central conseguiram domesticar o milho e ao mesmo tempo, por seleção, produzir um grande número de raças (SALVADOR, 1997; FANCELLI, 1982).

O milho faz parte da revolução verde, sendo uma das culturas que mais cresceu em produtividade e expansão agrícola no mundo nas últimas décadas, em grande parte devido ao melhoramento genético (CONWAY, 2003).

Nos dias atuais, o milho é a espécie mais plantada no mundo e a segunda mais consumida, perdendo apenas para o trigo (ABIMILHO, 2006). O consumo de milho é muito expressivo na África e na América Latina. Dos trinta e três países com mais alto consumo de milho, dezesseis estão na África, onde o consumo de milho responde por pelo menos 25% do total de calorias da dieta, podendo chegar a mais de 50%, em países como a Zâmbia e Malawi. Na América Latina e em países como México e a Guatemala, 40% do total de calorias diárias são provenientes do milho (MCCANN, 2001). No Brasil, a população da região Nordeste apresenta um consumo anual de aproximadamente 10,9 kg *per capita* de produtos a base de milho, sendo 40% maior que a média nacional, 7,7 kg (IBGE, 2005). A aquisição de derivados do milho *per capita* anual nos domicílios localizados na zona rural é ainda mais expressiva. A zona rural da região Sudeste

(31,2 kg/pessoa/ano) é a maior consumidora de milho e derivados (IBGE, 2003), seguida pela zona rural da região Nordeste (19,6 kg/pessoa/ano). Entretanto, somente cerca de 20% do milho consumido nas zonas rurais na região Nordeste é de produção própria, o restante é obtido de forma monetária (IBGE, 2003). Esses dados confirmam que o milho é uma das mais importantes fontes alimentares da região Nordeste e também nas zonas rurais do Brasil.

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, sendo consumido desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Na realidade, o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que no Brasil este percentual varia de 60 a 80%, dependendo da estimativa e do ano analisado (DUARTE, 2001).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, e produziu em 2006, cerca de 41 mil toneladas de milho (CONAB, 2006). Desse total, apenas cerca de 1,6% da produção foi destinada ao consumo humano direto, cerca de 10% para indústria e o restante utilizado na alimentação animal (ABIMILHO, 2006).

Os derivados do milho são basicamente produzidos pela indústria de moagem, dividindo-se em moagem úmida e a seco (LIMA, 1982). Os produtos da moagem úmida apresentam alto valor agregado, e geralmente, são destinados ao reprocessamento por parte de outras indústrias (LOPES, 1997). Por outro lado, a moagem a seco é a que mais consome milho em grão, mas gera produtos de baixo valor comercial, geralmente destinados ao consumo humano. Em 2006, mais de 70% do milho utilizado pela indústria foi processado por moagem a seco, caracterizando este processo como o mais importante na produção de derivados do milho (ABIMILHO, 2006).

A moagem a seco do milho integral produz o fubá comum e o farelo (composto pelo pericarpo e a ponta dos grãos). Na moagem do milho degerminado, além do gérmen e da casca previamente separados, obtêm-se em ordem decrescente de granulometria, a canjica, a canjiquinha, os grits, o fubá grosso, o fubá fino (fubá degerminado) e o creme de milho (LIMA, 1982). Estes produtos derivados do milho e outros como as farinhas de milho, flocos de milho e xerém, obtidos do grão degerminado, são bastante apreciados na culinária brasileira, tendo participação efetiva como componente básico na dieta alimentar

das camadas mais pobres da população (MELO-FILHO & RICHETTI, 1997). Dentre esses, o fubá de canjica é o mais consumido no Brasil, representando cerca de 42% de consumo total dos produtos derivados de milho (IBGE, 2003).

2.4. Valor nutricional do milho

O grão de milho apresenta grande variabilidade na estrutura e forma, dividindo-se em sete grupos genéticos: tunicata (grão coberto), everta (pipoca), indurata (duro), indentata (dentado), amilácea (farináceo), sacarata (doce) e cerácea (ceroso) (FANCELLI, 1982).

Esse cereal é um alimento essencialmente energético, uma vez que seus grãos são constituídos basicamente de carboidratos, principalmente amido. No entanto, o milho possui uma importante concentração de proteínas, cerca de 10% (FUFA *et al.*, 2003) e também é um dos cereais com maior teor de óleo, cerca de 4,2% (WEBER, 1983). O grão de milho é composto por endosperma (82,3%), embrião (gérmen) (11,5%), pericarpo (5,3%) e ponta (0,8%). Nessas partes são encontradas as proteínas, que em média representam 8,5% do endosperma, 18,5% do embrião, 5,0% do pericarpo e 9,1% da ponta (TOSELLO, 1987). As proteínas do milho são consideradas de baixo valor biológico, devido aos baixos teores de aminoácidos essenciais, lisina e triptofano (BRESSANI, 1991). A descoberta do mutante *opaco-2* (MERTZ *et al.* 1964), e de outros genes mutantes para proteínas de alta qualidade nutricional, com maior quantidade de lisina e triptofano, despertou inicialmente um acentuado entusiasmo entre pesquisadores no mundo todo. Essa atividade, entretanto, declinou-se à medida que o milho *opaco-2* não teve aceitação no mercado, em virtude de sua inferioridade agrônômica; especificamente, associada à baixa produtividade e ao aspecto farináceo dos grãos (ALEXANDER, 1988; MERTZ, 1994). Hoje, com o avanço nas pesquisas, mutantes modificados, conhecidos como milho QPM (Quality Protein Maize), já possuem boa produtividade e melhores características agrônômicas (RODRIGUES, 2000).

O milho possui cerca de 2,4 a 13,8% de lipídios, dependendo do tipo de milho. A fração lipídica deste cereal é composta principalmente por triglicérides, fosfolipídios, fitoesteróis, tocoferóis (vitamina E) e carotenóides (WHITE & JOHNSON, 2003). O óleo do milho se encontra basicamente no gérmen e é

constituído principalmente por ácidos graxos insaturados, como oléico (25%) e linoléico (59,7%) (DUNLAP *et al.*, 1995). Outros nutrientes importantes no milho são as fibras e os minerais, principalmente o fósforo, o potássio e o cálcio (WHITE & JOHNSON, 2003).

O milho, apesar da pequena concentração de carotenóides, é considerado uma espécie carotenogênica, ou seja, fonte de carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Os principais carotenóides encontrados no grão são classificados como xantofilas (luteína, β -criptoxantina e zeaxantina) e os carotenos (β -caroteno, o α -caroteno e o β -zeacaroteno) podendo variar entre variedades e genótipos (KURILICH & JUVIK, 1999). As xantofilas, luteína e zeaxantina, encontram-se em maior concentração no grão (90%) enquanto o β -caroteno perfaz a menor concentração (5%) (CABUELA, 1971). A distribuição dos carotenóides no grão seco, no milho indentato, é 74 a 86% no endosperma vítreo, 9 a 23 % no endosperma farináceo, 2 a 4% no germe e 1% no farelo; sendo o endosperma vítreo presente em maior proporção (46-54%) que o farináceo (28 a 36%) (BLESSIN *et al.*, 1963). A quantidade de carotenóides totais no grão de milho normal varia de 0,15 a 33,11 $\mu\text{g/g}$ (KURILICH & JUVIK, 1999). Os carotenóides estão presentes nos amiloplastos do endosperma, sendo a maior quantidade de xantofilas e pequenas quantidades de β -caroteno (JANICK-BUCKNER *et al.*, 1999).

2.5. Carotenóides

Os carotenóides são uma família de mais de 600 compostos lipossolúveis encontrados nas plantas, sendo um dos principais compostos responsáveis pelas cores de folha e frutos (BRITTON *et al.*, 2004). Dentre algumas funções dos carotenóides na plantas, destacam-se aquelas relacionadas ao mecanismo de fotossíntese das plantas (absorvem luz e transferem energia para clorofila), ou como antioxidantes naturais (inativam o oxigênio singlete gerado por excesso de luz), atração visual (para polinização e dispersão) e suas relações com a germinação (produção de ácido abscísico (ABA) que controla a dormência) (HOWITT & POGSON, 2006; BRITTON, 2005). Também são encontrados em tecidos não fotossintéticos como raízes, flores, frutos, sementes e pólen (BUCKNER *et al.*, 1990). O grão de milho contém carotenóides em seu

endosperma, no entanto, sua função nesta fração ainda não foi esclarecida (GOODWIN, 1980).

Os carotenóides são divididos em dois grupos: os hidrocarbonos, chamados de carotenos e os que têm oxigênio na molécula, chamados de xantofilas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Do total de carotenóides existentes (Figura 1), somente 50 possuem atividade provitamínica A. Dentre esses compostos, os mais encontrados na plantas e plasma sangüíneo são α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina, sendo o primeiro o mais ativo quanto à atividade provitamina A, pois é formado por duas moléculas de retinol ligadas. O α -caroteno e a β -criptoxantina possuem somente uma molécula de retinol ligada à outra molécula, a qual não se relaciona à atividade de pró-vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; BRITTON *et al.*, 2004).

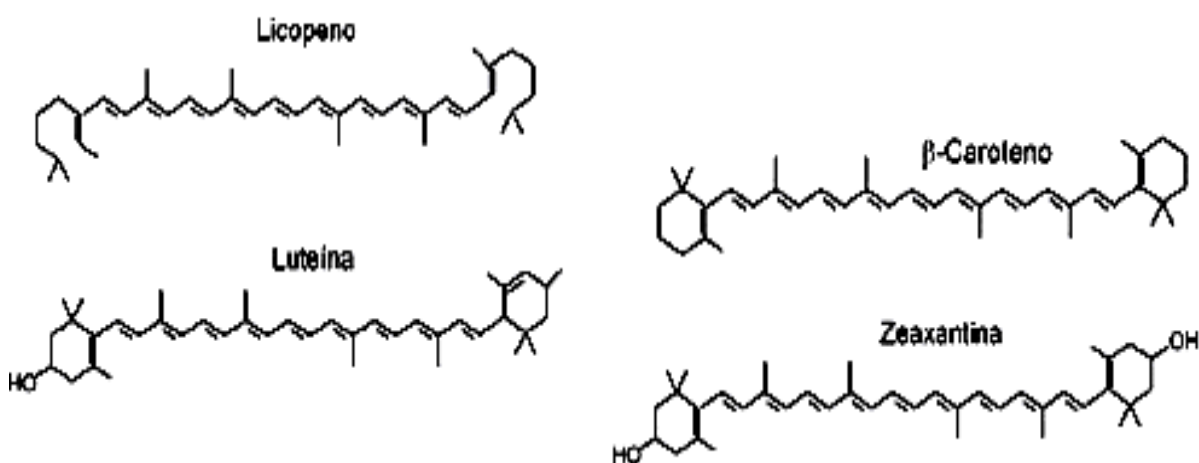


Figura 1: Estrutura química de alguns carotenóides.

Os carotenóides são produzidos por plantas, microorganismos e alguns animais (BRITTON, 2005). São metabólitos secundários, formados por isoprenóides (C5), derivados da via do melavonato (ácido mevalônico). São polímeros C40 em conformação linear, com potencial para um vasto número de isômeros geométricos, podendo apresentar finais cíclicos, moléculas de oxigênio e mudanças no nível de hidrogênio. (AMBROSIO *et al.*, 2006).

A biossíntese dos carotenóides começa pela via do isoprenóide, melavonato dependente ou melavonato independente, gerando uma unidade de isopreno C5, o isopentenil pirofosfato (IPP) (Figura 2). O IPP é condensado com o

isomero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para gerar uma unidade C10 geranyl pirofosfato (GPP), que é alongado para C15 farbesil pirofosfato (FPP). As maiorias dos carotenóides são sintetizados a partir do FPP por geranyl-geranyl pirofosfato sintase (CstE), que geral o geranyl geranyl pirofosfato, resultando no primeiro carotenóide (C40) o fitoeno (CHENG, 2006).

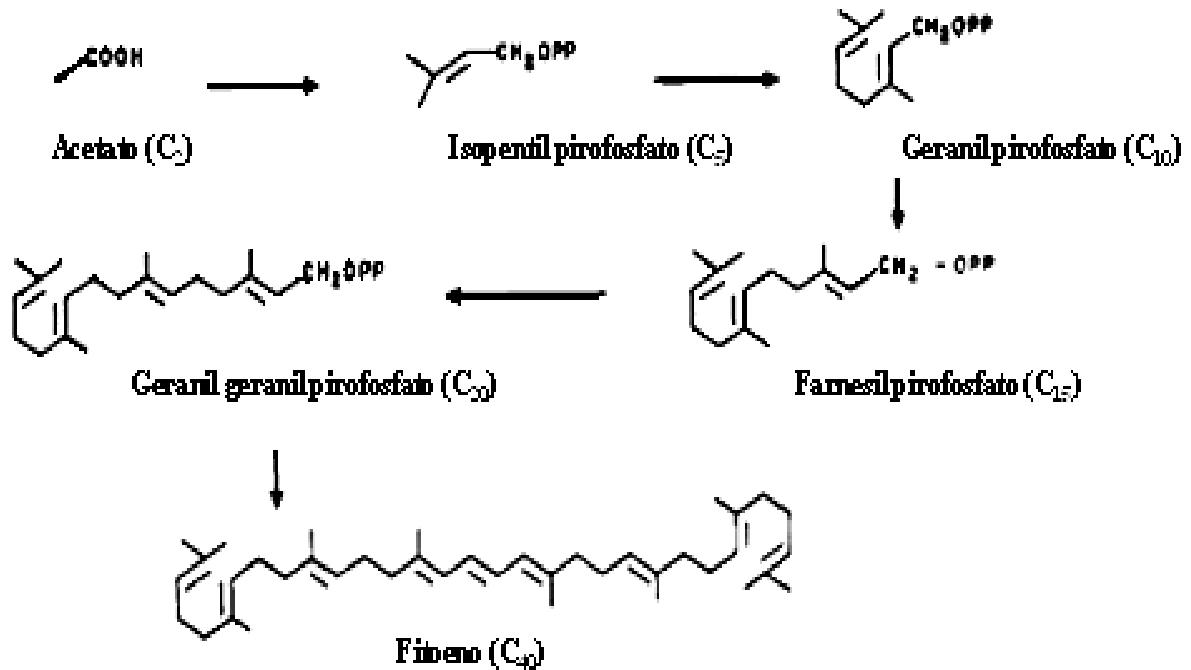


Figura 2: Parte inicial da via biossintética dos carotenóides com a formação do fitoeno.

Do fitoeno, depois de alguns passos metabólicos, é gerado o licopeno, o primeiro carotenóide colorido. A partir do licopeno são produzidos os carotenóides com anéis cíclicos (Figura 3), seguindo até a formação dos carotenóides hidroxilados, as xantofilas.

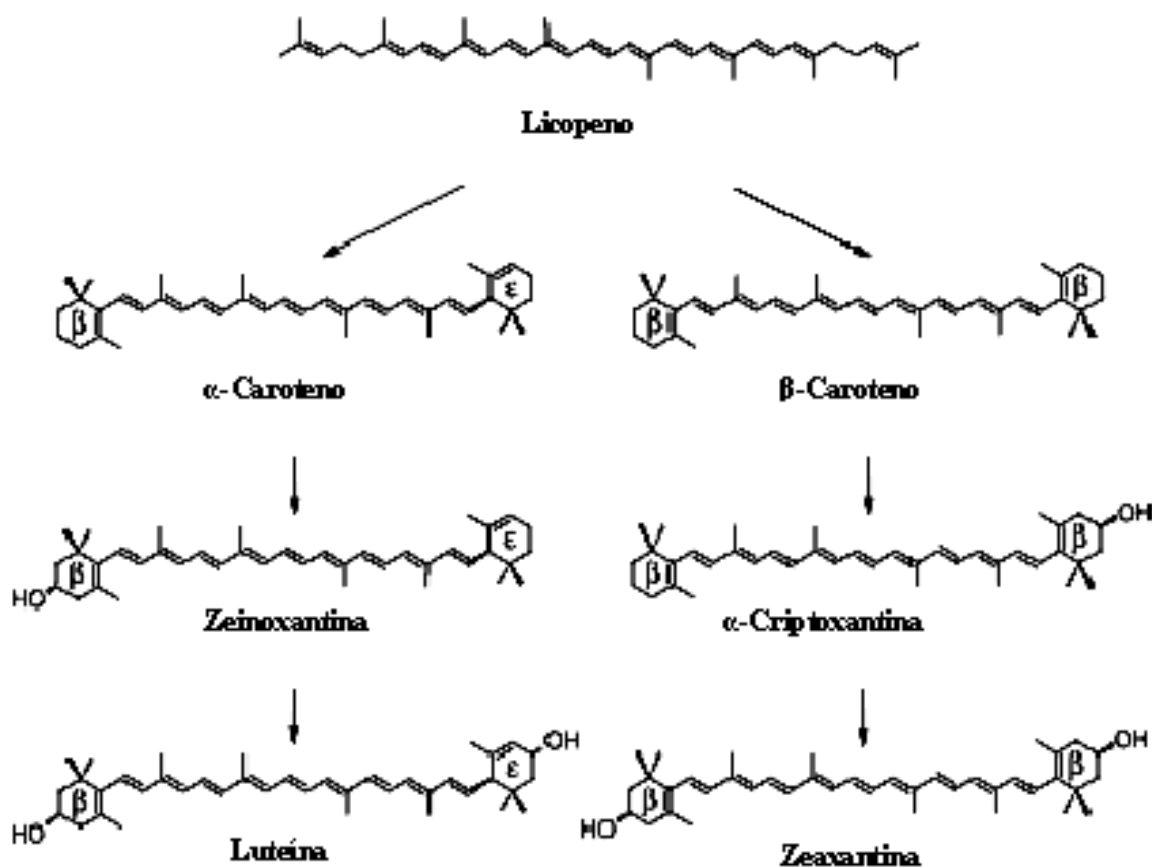


Figura 3: Via biossintética dos carotenóides com a geração de carotenóides cíclicos e as xantofilas.

Os carotenóides são em grande parte, moléculas hidrofóbicas e, conseqüentemente, interagem com a parte lipofílica da célula. O sistema de ligações duplas alternadas com simples é uma das principais características dos carotenóides, formando a parte central da molécula, uma cadeia de polieno (AMBROSIO *et al.*, 2006).

Os carotenóides podem ser clivados por oxidação química ou biológica, sendo gerados na degradação outros compostos de importância bioquímica para plantas e microorganismos, como ácido abscísico, bixina e a crocetina (BRITTON, 2005).

Todas as principais funções dos carotenóides estão ligadas ao sistema de duplas ligações conjugadas: primeiramente, temos o cromóforo, pois este sistema absorve luz em comprimento de onda visível, e por modificação de orbitais, favorece uma intensa variedade de cores, como laranja, amarelo e vermelho. Outra função é a ativação das clorofilas. Durante a absorção de luz, os

carotenóides passam para um estado mais energético, ativando a clorofila para a fotossíntese (BRITTON, 2005). Em adição, devido à facilidade de absorver energia mais prontamente, são favorecidos com ganho de energia de outros compostos, evitando a formação de oxigênio singlete, que é altamente reativo e destrutivo para as células (BRITTON, 2005; PALOZZA e KRINSKY, 1992).

A cadeia de polieno dos carotenóides é a parte mais importante da molécula, visto que é altamente reativa, por ser um sistema rico em elétrons, susceptível ao ataque por reagentes eletrofílicos, sendo responsável pelo poder oxidante dos carotenóides. Este poder de oxidação traz benefícios, como a interação com oxigênio singlete e as propriedades antioxidantes (PALOZZA & KRINSKY, 1992; KRINSKY, 1989). No entanto, este poder de oxidação é o principal responsável pela degradação dos carotenóides por oxigênio ou outros radicais livres. *In vivo*, os carotenóides são estabilizados por proteínas e por outras moléculas circunvizinhas, no entanto, eles estão sujeitos a danos oxidativos se forem expostos a espécies oxidativas ou radicais livres, sendo a descoloração, resultante da destruição do cromóforo, o indicativo usual para as avarias nos carotenóides (BRITTON, 2005). A mesma cadeia é causa da sua instabilidade, tornando um desafio a preservação de carotenóides durante processamento e estocagem (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004).

Entre os fatores que interferem na degradação de carotenóides estão sua estrutura, a quantidade de oxigênio disponível, a atividade de água, o grau de luminosidade, a temperatura, o pH e a presença de antioxidantes, prooxidantes, ácidos graxos e sulfitos. A quantidade de carotenóides mantidas nos alimentos é muito importante, pois favorecem sua disponibilidade, assim, exclusão de oxigênio, proteção contra luz e baixa temperatura diminuem a decomposição de carotenóides durante estocagem (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004).

2.6. Aspectos nutricionais dos carotenóides

Carotenóides, mesmo possuindo ou não atividade próvitamínica A, têm-se mostrado úteis à saúde humana, uma vez que fortalecem o sistema imune e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer e as doenças cardiovasculares, além da prevenção da catarata e da degeneração macular (KRINSKY, 1993; ASTROG, 1997; BURRI, 1997; OLSO, 1999). A ação dos

carotenóides contra as doenças tem sido atribuída à propriedade antioxidante dos mesmos, especificamente, à capacidade para ligar ao oxigênio singlete e interagir com radicais livres (BRITTON, 2005; PALOZZA & KRINSKY, 1992).

Luteína e zeaxantina são consideradas substâncias protetoras contra algumas doenças dos olhos. Esses dois nutrientes antioxidantes podem servir como a única fonte de proteção contra certas doenças dos olhos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001, MOELLER *et al.*, 2000). Estudos mostram que a suplementação com alimentos ricos em luteína e zeaxantina tem a capacidade de aumentar a concentração e a densidade do pigmento macular diminuindo a degeneração macular relacionada com a idade (HAMMOND *et al.*, 1997), que afeta cerca de 10% das pessoas acima de 60 anos (BIOLOGIA, 2006). Estes dois compostos são encontrados em níveis aproximadamente 50% maiores em olhos normais do que em olhos portadores de degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (LANDRUM *et al.*, 1997A). A luteína e zeaxantina concentram-se nos axônios dos fotorreceptores e interneurônios da camada plexiforme interna da mácula. Os possíveis efeitos protetores dos carotenóides são a absorção dos comprimentos de onda associados ao dano fotoquímico da retina sensorial e a remoção dos radicais livres e formas reativas de oxigênio geradas pela atividade metabólica (LANDRUM *et al.*, 1997B).

Em estudos biológicos tem sido demonstrado que o β -caroteno, além de possuir elevada atividade próvitamínica A, é inversamente relacionado com o nível de risco de câncer (DE STEFANI *et al.*, 2000; DE LUCA & ROSS, 1996). O consumo de β -caroteno tem ainda significativo efeito na redução de risco de degeneração macular relacionado com a idade (AREDS, 2001).

O efeito protetor dos carotenóides, em especial do β -caroteno, demonstrado em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, tem sido atribuído mais a uma ação do próprio pigmento do que dos retinóides produzidos a partir do seu metabolismo endógeno (NAVES & MORENO, 2000).

2.7. Biofortificação do milho

A biofortificação é o aumento no conteúdo de vitaminas e minerais nos alimentos, através de melhoramento convencional ou da engenharia genética (HARVEST PLUS, 2007). Esta tecnologia tem como vantagem o fato de poder ser

distribuída aos beneficiários por meio das sementes de espécies agrônômicas utilizadas pela população, permitindo que alimentos ricos em micronutrientes sejam cultivados em propriedades familiares e se incorporem no sistema de produção e no mercado de comunidades (APROVEITANDO, 2004).

A biofortificação é embasada em princípios científicos sólidos, pois levantamentos preliminares confirmam a existência de variabilidade genética, elevada herdabilidade e estabilidade ambiental, além da manutenção de alto rendimento para os produtos com características de alto teor de nutrientes (APROVEITANDO, 2004).

No Brasil, teve início em 2004, o primeiro programa de melhoramento genético de plantas com o objetivo de biofortificação, sendo o milho eleito como uma das plantas alvo do programa da HarvestPlus (NUTTI, 2006).

HarvestPlus é um programa de desafio mundial do Grupo Consultivo Internacional de Pesquisa em Agricultura (CGIAR). É coordenado pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e pelo Instituto Internacional de Pesquisas de Política Alimentar (IFPRI). HarvestPlus busca reduzir a desnutrição de micronutrientes da população mais carente pelo aumento dos teores desse nutrientes nas espécies agrícolas de maior consumo, através do melhoramento (HARVESTPLUS, 2007). Dentro das culturas agrícolas escolhidas para o aumento dos nutrientes como Ferro, o Zinco e a vitamina A, estão o milho, o trigo, o arroz, o feijão, a batata doce e a mandioca (HARVESTPLUS, 2007).

Alguns produtos biofortificados já foram disponibilizados, tendo como exemplos, o arroz “Golden Rice” (WELCH & GRAHAM, 2004) e as mandiocas “dourada” e “gema de ovo”, lançadas recentemente pela Embrapa (INFORMATIVO, 2005). Os programas de biofortificação do milho no mundo têm focado no aumento do teor de carotenóides para disponibilizar na dieta uma maior quantidade de compostos pró-vitamina A, principalmente β -caroteno, e também o aumento dos teores dos minerais ferro e zinco (HARVEST PLUS, 2007).

As pesquisas e o desenvolvimento de linhagens de milho biofortificadas com alto teor de carotenóides estão sendo direcionados às regiões tropicais, especialmente, variedades adaptadas para o plantio em semi-árido. Isto se deve ao fato de que nessas regiões, incluindo a região Nordeste do Brasil, há maior prevalência de hipovitaminose A e o consumo humano de milho e derivados é maior do que em outras regiões. Outro fato relevante é a transferência de

tecnologia, uma vez que as linhagens biofortificadas adaptadas para regiões tropicais do Brasil, podem ser utilizadas em outros continentes, como o Africano, região do planeta mais atingida por deficiências nutricionais com condições edafoclimáticas semelhantes ao do Nordeste brasileiro e onde o milho é muito consumido.

O milho de alta qualidade protéica (QPM) tem sido priorizado como plataforma para biofortificação, pois sua qualidade protéica é superior à do milho comum, sendo vantajoso para a nutrição humana (BATISTA FILHO & RISSIN, 1993), principalmente porque a deficiência energético-protéica influencia negativamente a conversão de compostos pró-vitamina A, refletindo diretamente em outras enfermidades nutricionais (PARVIN & SIVAKUMAR, 2000).

O efeito da variabilidade nos teores de carotenóides no grão de milho tem sido demonstrado tanto para quantidade e perfil de carotenóides, assim como o efeito materno para os níveis de carotenóides (EGESEL *et al.*, 2003; EGESEL *et al.*, 2004; KURILICH & JUVIK, 1999). Tendo sido reportado carotenóides totais no grão de milho normal de 0,15 a 33,11 $\mu\text{g/g}$ (KURILICH & JUVIK, 1999). Em outro estudo, variações na concentração de carotenos no milho foram observadas com média variando de 0,9 a 4,1 $\mu\text{g/g}$, e xantofilas de 18,6 a 48 $\mu\text{g/g}$, distribuídos no endosperma do grão (BLENSIN *et al.*, 1963). Em regiões temperadas já foram desenvolvidas algumas variedades com teores 60 $\mu\text{g/g}$ e 15 $\mu\text{g/g}$ de carotenóides totais e β -caroteno, respectivamente (STEVENS *et al.*, 2006). Este teor para β -caroteno é 8,5 vezes maior que aquele previamente relatado para as variedades tradicionais, cuja concentração média de β -caroteno é de 1,6 $\mu\text{g/g}$. No Brasil, algumas linhagens desenvolvidas pela Embrapa Milho e Sorgo, incluindo o milho de alta qualidade protéica, já foram avaliadas para a composição desses compostos, tendo sido observados valores médios de 37,2 $\mu\text{g/g}$ de carotenóides totais e 4,3 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno (PAES *et al.*, 2006).

2.8. Diversidade genética e análise multivariada

Pode-se definir diversidade genética como a amplitude da variação genética existente para uma determinada espécie. Para garantir a eficiência de um programa de melhoramento, é necessário um conhecimento detalhado da constituição e diversidade genética das espécies, pois, sem o conhecimento da

variabilidade e da sua interação com o ambiente, é bastante difícil a obtenção de genótipos superiores (MILACH, 1998).

No caso do milho, acredita-se que a espécie possua aproximadamente 250 raças (PATERNIANI & CAMPOS, 1999). Sabendo que dentro de cada raça podem ser identificadas distintas variedades, conclui-se que a espécie *Zea mays* L. possui grande variabilidade, que se deve principalmente a processos de seleção e hibridação (WELLHAUSEN *et al.*, 1952).

A divergência genética, além de assegurar o melhoramento numa população, possibilita a exploração da heterose ou vigor híbrido que é definido como a expressão genética dos efeitos benéficos da hibridação. Estudos têm revelado que quanto maiores os contrastes genéticos entre os genitores escolhidos para as hibridações, maiores chances de aparecerem efeitos heteróticos nos descendentes (RONZELLI JÚNIOR, 1996).

Uma forma de se estimar a divergência genética é por meio da associação de técnicas multivariadas, que envolve diversas técnicas analíticas, como métodos de agrupamento, componentes principais e variáveis canônicas, dentre outras (CRUZ, 1990).

Tais alternativas têm como finalidade básica diminuir o número de variáveis e, por conseguinte, a simplificação na obtenção das distâncias multivariadas. Sua eficiência depende da quantidade de variações que essas novas variáveis explicam, em relação às variações existentes nos caracteres originais (VASCONCELOS, 1995). As análises rudimentares e exploratórias de dados como os procedimentos gráficos auxiliam, em geral, o entendimento da complexa natureza da análise multivariada. Encontrar nos dados uma estrutura natural de agrupamento é uma importante técnica exploratória.

2.9. Técnicas de agrupamentos

As técnicas de agrupamento objetivam agrupar distintos indivíduos em classes, de forma que os mais semelhantes permaneçam na mesma classe. De forma geral, o número de classes não é conhecido inicialmente (MANLY, 1994).

Os métodos de aglomeração envolvem duas etapas. A primeira relaciona-se com a estimativa de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre os

indivíduos ou itens a serem agrupados. A segunda envolve a adoção de uma técnica de agrupamento para a formação dos grupos.

Para realização de tais técnicas, é necessária a escolha de uma medida que quantifique a semelhança entre dois indivíduos. Tais medidas são denominadas coeficientes de similaridade, os quais podem ser divididos em duas categorias: medidas de similaridade e medidas de dissimilaridade. No caso das primeiras, quanto maiores os valores observados, mais parecidos são os indivíduos; já para as medidas de dissimilaridade, quanto maiores os valores, menos parecidos são os indivíduos.

Tendo o presente trabalho utilizado como medida de dissimilaridade a distância Euclidiana média e como técnica de agrupamento os métodos hierárquico de Ward e de otimização de Tocher, apenas estes foram contemplados na revisão.

2.9.1. Distância Euclidiana Média

A Distância Euclidiana entre dois objetos quaisquer é obtida por analogia ao Teorema de Pitágoras, para um espaço multidimensional, sendo equivalente ao comprimento da hipotenusa do triângulo retângulo projetado.

Sejam $\mathbf{X}_1^t = (\mathbf{X}_{11}\mathbf{X}_{12}\dots\mathbf{X}_{1p})$ e $\mathbf{X}_2^t = (\mathbf{X}_{21}\mathbf{X}_{22}\dots\mathbf{X}_{2p})$ observações entre dois objetos (indivíduos). Então, a distância euclidiana entre eles é dada por:

$$d(\mathbf{X}_1, \mathbf{X}_2) = [(X_{11} - X_{21})^2 + (X_{12} - X_{22})^2 + \dots + (X_{1p} - X_{2p})^2]^{1/2} = [(X_1 - X_2)^2(X_1 - X_2)]^{1/2}$$

A distância Euclidiana média é o somatório das distâncias entre dois objetos, dividida pelo número de objetos ou indivíduos:

$$d_{h,i} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (X_{ij} - X_{ij})^2}{p}}$$

2.9.2. Método hierárquico da variância mínima de Ward

Os agrupamentos hierárquicos são realizados por sucessivas fusões ou por sucessivas divisões.

Os métodos hierárquicos aglomerativos iniciam com tantos grupos quanto aos objetos, ou seja, cada objeto forma um agrupamento. Inicialmente, os objetos

mais similares são agrupados e fundidos formando um único grupo. Eventualmente o processo é repetido, e com o decréscimo da similaridade, todos os subgrupos são fundidos, formando um grupo com todos os objetos. Os métodos hierárquicos divisivos trabalham na direção oposta. Um único subgrupo inicial existe com todos os objetos e estes são subdivididos em dois subgrupos de tal forma que exista o máximo de semelhança entre os objetos dos mesmos subgrupos e a máxima dissimilaridade entre elementos de subgrupos distintos. Estes subgrupos são posteriormente subdivididos em outros subgrupos dissimilares. O processo é repetido até que haja tantos subgrupos quantos objetos.

Como exemplo, temos os métodos hierárquicos aglomerativos (“Linkage Methods”) como os métodos de ligação simples (mínima distância ou vizinho mais próximo), ligação completa (máxima distância ou vizinho mais distante), ligação média (distância média) e o método de Ward.

O método hierárquico da variância mínima de Ward foi utilizado originalmente para variáveis quantitativas, mas passou posteriormente a ser utilizado também para variáveis qualitativas. O método minimiza a soma de quadrados dentro dos grupos e maximiza a soma entre grupos. A estratégia de Ward é um algoritmo que procura partições dos grupos próximos àqueles ótimos, sendo que a estratégia não conduz necessariamente à partição ótima, mas, em muitos casos a aproximação será considerada satisfatória na prática.

2.9.3. Método de otimização de Tocher

Os métodos de otimização possuem como princípio a formação de grupos de modo a promover a homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Para tal, é realizada a partição do conjunto de indivíduos em subgrupos mutuamente exclusivos por meio da maximização ou minimização de alguma medida pré-definida.

Entre os métodos de otimização, um dos mais empregados na área de genética e melhoramento é o método de otimização de Tocher (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Segundo Tocher, este método deve ser estabelecido pelo critério de que os valores das distâncias intragrupos sejam inferiores a quaisquer distâncias intergrupos.

Por este método, é identificado o par de genótipos que apresenta o menor valor de distância (d_{ii}) na matriz de dissimilaridade, que formará o grupo inicial. Em seguida, é avaliada a possibilidade de inclusão de outros genótipos nesse grupo inicial. A entrada de um genótipo num grupo aumenta o valor médio da distância intra-grupo. A inclusão ou não deste genótipo no grupo será permitida se o acréscimo no valor da distância média intragrupo não ultrapassar um valor máximo permitido, que pode ser arbitrariamente estabelecido ou corresponder ao valor máximo da medida de dissimilaridade (d_{ii}), obtido no conjunto de menores distâncias envolvendo cada par de indivíduos.

2.10. Componentes Principais

A análise de componentes principais está relacionada com a explicação da estrutura de covariância por meio de poucas combinações lineares das variáveis originais em estudo. Os objetivos dessa análise são: i) redução da dimensão original; e ii) facilitação da interpretação das análises realizadas. Em geral, a explicação de toda a variabilidade do sistema determinado por p variáveis só pode ser efetuada por p componentes principais. No entanto, uma grande parte dessa variabilidade pode ser explicada por um número r menor de componentes, $r \leq p$.

O programa GENES (CRUZ, 2005) realiza a análise de componentes principais a partir de dados padronizados ou não. Para a realização da análise, geralmente feita com dados padronizados, considera-se que x_{ij} é a média padronizada do j -ésimo caráter ($j = 1, 2, \dots, v$) avaliado no i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, g$) e R a matriz de covariâncias ou de correlação entre esses caracteres (ou matriz de correlação fenotípica entre os caracteres baseada nos dados originais). A técnica dos componentes principais consiste em transformar o conjunto de v variáveis ($x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{iv}$) em um novo conjunto ($y_{i1}, y_{i2}, \dots, y_{iv}$), que são funções lineares dos x_i 's e independentes entre si.

As seguintes propriedades são verificadas:

Se y_{i1} é um componente principal, então:

$$y_{i1} = a_1 x_{i1} + a_2 x_{i2} + \dots + a_v x_{iv}$$

Se y_{i2} é outro componente principal, então:

$$y_{i2} = b_1x_{i1} + b_2x_{i2} + \dots + b_vx_{iv}$$

Entre todos os componentes, y_{i1} apresenta a maior variância, y_{i2} a segunda maior e assim sucessivamente.

O cálculo dos componentes principais foram feitos a partir dos dados originais ou padronizados. Na padronização utilizou-se a transformação

$$\mathbf{x}_i = \mathbf{X}_i / \mathbf{S}_x$$

Sendo \mathbf{S}_x o desvio-padrão da variável X.

Os componentes principais são uma técnica de análise intermediária e, portanto, não se constituem em um método final e conclusivo. Esse tipo de análise se presta fundamentalmente como um passo intermediário em grandes investigações científicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Genótipos analisados quanto ao perfil de carotenóides nos grãos

Foi avaliado o perfil de carotenóides de grãos dos 134 genótipos desenvolvidos no programa de melhoramento genéticos de milho da Embrapa Milho e Sorgo (Quadro 1 e anexo 1).

Os grãos de cada genótipo, com exceção dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do milho, foram obtidos na safra 2005/2006, sendo o plantio de cada acesso realizado em área isoladas para proteção contra presença de grãos de pólen provenientes de outros acessos, nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, localizado a 12 km do município de Sete Lagoas, sob as coordenadas 19° 28' sul e 44°15' 8" oeste, e a altitude 732 metros ao nível do mar. Todos os procedimentos de manejo da cultura foram realizados conforme recomendações técnicas da cultura milho da região, a exemplo da adubação, controle de pragas, doenças e plantas invasoras.

Os grãos de milho dos acessos foram obtidos diretamente no BAG do milho da Embrapa Milho e Sorgo, já prontos para serem moídos. Os mesmos foram selecionados pela maior intensidade da coloração amarelo-laranja dos grãos dentro da coleção núcleo do Banco.

3.2. Preparo das amostras

Todas as amostras de grãos previamente identificadas foram moídas em micro moinho, tipo ciclone MA 020 (MARCONI, Piracicaba - SP), acondicionadas em frascos de vidro com tampa, envoltos em papel alumínio e armazenados no freezer a -20°C no Laboratório de Qualidade de Grãos e Forragens, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, onde foram realizadas as análises químicas. Todos os cuidados foram tomados para proteção das amostras contra luz e choque térmico, tanto antes, como após a moagem.

Quadro 1. Genótipos analisados para teor e perfil de carotenóides. Distribuição destes nas classes de origem: linhagens elite, variedades e híbridos comerciais, acessos do BAG de milho.

<p>99 linhagens elite selecionadas individualmente pela coloração amarelo-laranja do grão para serem analisadas quanto ao teor e perfil de carotenóides.</p>	<p>540740-1 540764 540938 540972 541018 541034 541233-2 541332 541335 540685-1 540700-1 540707-1 540721-1 540723-1 540727-1 540736 540754 540755 540757 570759 540760-1 540763-1 540780-1 540800-1 540807 540808-1 540811 540814-1 540815 540817 540818-2 540819 540826-1 540838-1 540843-1 540845-2 540847 540848-1 540874-2 540878-1 540880-2 540886 540890 540893-2 540899-2 540903-2 540941-2 540942-2 540948-2 540962-1 540985 540986-1 540987 540992 540995-2 540998 541016-2 541028-1 541031 541032 541034-2 541051-1 541052-1 541055-1 541057-1 541069-2 541070-2 541072-2 541093-1 541099 541112-1 54114-1 541116-1 541117-2 541119-2 541120-1 541133-1 541157 541228-1 541234-1 541249-2 541270-2 541272-1 541274-1 541275-1 541276-1 541278-1 541307-1 541311 541312-1 541316-1 541323-1 541325-1 541330-2 541335-1 541337-1 541338-1 541339-1 541343-2</p>
<p>24 acessos pertencente à coleção núcleo do banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo, selecionados pela coloração amarelo-laranja do endosperma.</p>	<p>CATETO SAO SIMAO CATETO SETE LAGOAS WP2 AMARELO DENT CMS01 MEZCLA AMARILLA AMARELO DE PE A2 COMPOSTO RACIAL DENT. AMARELO I MAYA XV MG II CATETO BR 400 SUPERDOCE CATETO COLOMBIA AZTECA IPA GIN I CATETO NORTISTA SANTA INES PIRA 006 SP 009 CMS AMARILLO DEL BAJIO PIRAPOCA AMARELO PA 105 CMS 03 AMARILO CRISTALINO BA 130 PIRANAO UF 1 SC 014 RS 572 BA I CATETO (Rib. Preto) 4496</p>
<p>2 híbridos comerciais de coloração laranja de destaque agrônômico.</p>	<p>BRS 2020 BRS 1001</p>
<p>9 variedades comerciais provenientes do ensaio nacional de 2006.</p>	<p>Missões UFVM 100 BR 473 cIII Fundacep 35 BR São Francisco BRS Caatingueiro CMS 101 CMS 102 CMS 104</p>

3.3. Análise de carotenóides

A quantificação do teor de carotenóides totais, carotenos e xantofilas (monohidroxilados e diidroxilados) foram realizadas por método espectrofotométrico, de acordo com protocolo de RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA (2004), em duplicata para todas as amostras. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Cary 50 Conc UV-Visible (VARIAN, Austrália).

3.4. Análise estatística dos dados

Os resultados das análises químicas para os teores de teor de carotenóides totais, carotenos, monohidroxilados e xantofilas (diidroxilados), expressos em $\mu\text{g/g}$ (em base fresca), foram avaliados por análise multivariada através de técnicas de agrupamento pelo método de otimização de Tocher, utilizando como medida de dissimilaridade a distância Euclidiana Média. Os resultados também foram analisados por meio dos componentes principais sendo exposto em dispersão gráfica, seguindo a formação de grupos identificados pelo agrupamento de Tocher. O método hierárquico de Ward para agrupamento também foi utilizado para compor as discussões sobre os melhores genótipos para o programa de biofortificação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises dos carotenóides totais e suas frações.

O resultado das análises de carotenóides dos 134 genótipos está apresentado na Tabela 1. Conforme pode-se observar, as variações para as seguintes características analisadas foram: carotenóides totais (9,46 a 42,84 µg/g) e média 22,34 µg/g; carotenos (0,88 a 4,93 µg/g) e média 2,55 µg/g; xantofilas monohidroxiladas (1,13 a 7,22) com média 3,86 µg/g e xantofilas diidroxiladas (5,55 a 34,11) com média 16,88 µg/g.

Destes resultados pode-se destacar a linhagem 541332 a que apresentou o maior conteúdo de carotenóides totais (42,84 µg/g) seguido da linhagem 541312-1 (42,51µg/g). Estes valores são bastante elevados se comparados com os valores médios das variedades brasileiras comerciais.

Em relação aos componentes analisados, observou-se médias superiores para os seguintes genótipos:

- Carotenos: BRS 1001 com a concentração de 4,93 µg/g;
- Monohidroxilados: a linhagem 540755 com 7,22 µg/g; e
- Xantofilas: 541312-1 com a concentração de 34,11 µg/g.

DAOOD *et al.* (2003) relataram, em análises de cultivares húngaros, quanto variação no conteúdo de carotenóides totais, de 7,54 a 28,5 µg/g. KURILICH & JUVIK (1999) encontraram os valores variando de 0,15 a 33,11 µg/g em germoplasma norte-americano. Dentro das classes dos materiais estudados nesse trabalho, os que apresentaram os maiores conteúdos de carotenóides totais, provêm das linhagens elites selecionadas para biofortificação, no entanto, nos cultivares comerciais e nos acessos, os valores obtidos estão dentro da amplitude obtida por KURILICH & JUVIK (1999). Evidenciando o resultado positivo conseguido pelo melhoramento e a seleção pela cor. Em outro trabalho, BURT *et al.* (2006) encontraram conteúdos de carotenóides totais em linhagens obtidas para biofortificação variando de 43,6 a 88,3 µg/g.

O conteúdo médio de caroteno foi de 2,55 µg/g, sendo a proporção média de 11%. No entanto, os maiores valores de carotenos não foram obtidas das

linhagens, mas de um híbrido simples comercial, o BRS 1001, seguido pelo BR 400 superdoce.

Os resultados médios para carotenos são semelhantes aqueles já reportados por outros pesquisadores. A Embrapa Milho e Sorgo em 2006 identificou uma linhagem elite com valor de 4,3 $\mu\text{g/g}$ (PAES *et al.*, 2006). MENKIR *et al.* (2006) encontraram, na avaliação de matérias para biofortificação, variação de 0,11 a 4,75 $\mu\text{g/g}$ para β -caroteno. Embora haja diferença entre os métodos empregados, às substâncias quantificadas, a fração carotenos e constituída basicamente de β -caroteno, permitindo o paralelo entre os resultados dos estudos.

Para a fração de xantofilas monohidroxiladas (monohidroxilados) que também possuem atividade pró-vitamina A e por isso são importantes, apresentou a média de 3,86 $\mu\text{g/g}$ (17,86 % de proporção média). Altos valores de monohidroxilados são desejáveis para melhorar a quantidade de vitamina A no milho, assim, um valor de 7,22 $\mu\text{g/g}$, pode ser entendido como um aumento de carotenóides pró-vitamina A em 100%. O aumento em carotenos, acompanhado de um aumento de monohidroxilados, proporcionaria maior concentração de vitamina A no grão.

Alguns trabalhos avaliaram os conteúdos de carotenos e, separadamente, o total de carotenóides provitamina A (carotenos + monohidroxilados), indicando ser o material promissor. MENKIR *et al.* (2006) relatou o desenvolvimento de híbridos com boa produtividade que apresentavam 7 $\mu\text{g/g}$ de provitamina A. As análises realizadas nesse trabalho permitiram identificar muitas linhagens com conteúdo superior a 7 $\mu\text{g/g}$ de pró-vitamina A (carotenos + monohidroxilados), e em alguns casos chegando a 11,3 $\mu\text{g/g}$.

Tabela 1. Resultado das análises dos 134 genótipos.

GENÓTIPOS	Carotenóides Totais * µg/g	Carotenos * µg/g	Carotenos como % de Carotenóides Totais	Xantofilas monohidroxiladas * µg/g	Monohidroxilados como % de Carotenóides Totais	Xantofilas Diidroxiladas * µg/g	Diidroxilados como % de Carotenóides Totais (%)
540736	21,83±0,50	2,77 ±0,10	12,70	3,41±0,05	15,63	15,64±0,65	71,67
540754	22,03±0,37	2,50±0,16	11,36	4,22±0,03	19,16	15,31±0,50	69,48
540755	28,29±**	2,71±**	9,59	7,22±**	25,51	18,36±**	64,90
540757	26,50±1,32	3,18±0,22	12,01	4,99±0,19	18,82	18,33±0,91	69,17
570759	32,06±**	2,16±**	6,74	5,77±**	17,99	24,13±**	75,27
540764	28,68±5,30	3,37±0,17	11,74	4,87±0,05	16,99	20,44±5,08	71,27
540807	24,01±0,10	3,11±0,07	12,95	4,85±0,00	20,20	16,05±0,04	66,85
540811	17,65±0,52	2,66±0,13	15,08	4,61±0,07	26,11	10,38±0,46	58,82
540815	27,12±0,04	2,49±0,07	9,19	5,44±0,01	20,06	19,18±0,03	70,74
540817	16,71±0,20	1,99±0,07	11,91	3,32±0,15	19,86	11,40±0,28	68,23
540819	15,89± 0,20	1,52±0,04	9,54	2,13±0,01	13,40	12,25±0,23	77,06
540847	16,08±0,71	2,34±0,19	14,54	4,97±0,24	30,90	8,77±0,29	54,56
540886	12,67± 0,60	1,21±0,05	9,53	1,44±0,04	11,33	10,03±0,50	79,14
540890	16,42±1,72	2,73±0,02	16,64	3,39±0,07	20,65	10,30±1,80	62,72
540938	28,45±1,30	2,17±0,18	8,87	3,60±0,65	14,77	21,86±1,60	76,37
540972	19,03±2,82	1,81±0,27	9,52	4,40±0,54	23,13	12,81±2,01	67,35
540985	21,93±1,11	2,59±0,32	11,79	2,65±0,11	12,06	16,70±0,90	76,15
540987	16,90±1,02	2,28±0,21	13,46	3,92±0,01	23,17	10,71±0,80	63,36
540992	20,34±0,78	3,27±0,13	16,10	6,59±0,01	32,38	10,48±0,67	51,52
540998	16,99±0,40	2,03±0,04	11,93	3,78±0,07	22,26	11,18±0,37	65,81
541018	22,27±1,10	1,98±0,04	8,91	3,68±0,03	16,53	16,61±1,10	74,56
541031	17,45±0,45	2,48±0,01	14,23	4,12±0,12	23,62	10,85±0,32	62,15
541032	21,55±1,02	2,47±0,02	11,44	5,13±0,30	23,81	13,96±0,74	64,76
541034	18,89±1,35	2,12±0,28	11,18	2,74±0,41	14,51	14,03±0,66	74,31
541099	33,45±0,86	3,41±0,05	10,20	5,35±0,38	16,00	24,69±0,43	73,80
541157	18,84±0,78	2,82±0,19	14,94	4,52±0,06	23,99	11,50±0,53±	61,06
541311	24,45±1,17	2,56±0,03	10,47	3,72±0,26	15,22	18,17±0,87	74,31
541332	42,84±1,86	4,11±0,01	9,60	5,70±0,06	13,31	33,02±1,80	77,09
541335	37,00±0,42	3,28±0,01	8,86	5,87±0,11	15,85	27,86±0,51	75,29
540685-1	26,60±1,23	2,89±0,20	10,85	3,58±0,12	13,47	20,13±1,52	75,68
540700-1	21,31±0,15	2,22±0,29	10,40	4,87±0,02	22,83	14,23±0,46	66,77
540707-1	26,24±0,92	3,19±0,57	13,84	4,53±0,15	17,35	18,53±0,21	68,81
540721-1	19,44±0,17	2,97±0,30	15,27	5,83±0,39	30,01	10,64±0,52	54,72
540723-1	17,19±0,25	1,60±0,14	9,31	2,76±0,15	16,05	12,83±0,54	74,64
540727-1	38,97±0,49	4,35±0,35	11,17	6,95±0,80	17,84	27,66±0,66	70,99
540740-1	15,32±1,47	2,95±0,43	19,30	4,01±0,22	26,21	8,35±0,82	54,49
540760-1	18,29±0,84	1,40±0,19	7,66	2,50±0,16	13,69	14,39±0,48	78,65
540763-1	23,95±0,51	3,51±0,75	11,01	5,41±0,20	16,94	15,02±0,99	72,06
540780-1	32,67±2,04	3,54±0,05	10,85	6,67±0,36	20,43	22,45±1,73	68,73
540800-1	18,23±0,89	2,30±0,04	12,59	3,38±0,09	18,54	12,56±0,95	68,87
540808-1	23,42±0,19	2,84±0,05	12,14	4,30±0,29	18,36	16,28±0,44	69,50
540814-1	25,29±2,75	1,77±0,41	6,99	3,59±0,16	14,21	19,93±2,19	78,80
540818-2	20,88±0,35	2,46±0,00	11,76	3,44±0,26	16,49	14,98±0,09	71,74
540826-1	32,30±**	3,92±**	12,15	5,90±**	18,28	22,47±**	69,57
540838-1	20,56±0,56	2,57±0,20	12,51	4,57±0,22	22,22	13,42±0,13	65,27
540843-1	17,05±0,09	2,34±0,09	13,75	4,49±0,16	26,33	10,21±0,16	59,92
540845-2	10,83±0,39	1,06±0,00	9,83	3,05±0,05	28,21	6,71±0,33	61,96
540848-1	19,49±**	2,26±**	11,61	5,32±**	27,30	11,90±**	61,09
540874-2	26,19±0,67	3,75±0,09	14,31	5,44±0,12	20,79	17,00±0,64	64,90
540878-1	21,77±0,59	3,87±0,12	17,79	3,95±0,38	18,16	13,94±0,86	64,05
540880-2	20,46±1,26	2,69±0,02	13,15	2,74±0,05	13,41	15,02±1,34	73,45
540893-2	26,58±0,36	2,79±0,06	10,49	3,94±0,14	14,83	19,85±0,56	74,68
540899-2	24,84±0,03	2,58±0,13	10,41	4,11±0,18	16,54	18,14±0,34	73,05

* O valor é a média de duas replicatas ± erro padrão, expresso em base fresca. ** Amostra insuficiente para replicata, dado correspondente a uma única análise.

Continuação Tabela 1. Resultado das análises dos 134 genótipos.

GENÓTIPOS	Carotenóides Totais * µg/g	Carotenos * µg/g	Carotenos como % de Carotenóides Totais	Xantofilas monohidroxiladas * µg/g	Monohidroxilados como % de Carotenóides Totais	Xantofilas Diidroxiladas * µg/g	Diidroxilados como % de Carotenóides Totais (%)
540903-2	26,10±0,14	2,92±0,04	11,17	3,72±0,57	14,24	19,46±0,75	74,59
540941-2	27,11±1,32	2,05±0,01	7,57	4,22±0,02	15,58	20,83±1,34	76,84
540942-2	20,24±**	1,23±**	6,06	2,69±**	13,27	16,33±**	80,67
540948-2	24,68±1,49	3,41±0,00	13,81	6,19±0,25	25,10	15,07±1,74	61,08
540962-1	22,34±0,84	2,18±0,12	9,74	3,53±0,09	15,81	16,63±1,05	74,45
540986-1	24,09±1,61	2,86±0,01	11,85	5,18±0,22	21,50	16,06±1,82	66,65
540995-2	16,33±0,70	2,69±0,05	16,49	4,26±0,24	26,10	9,37±0,41	57,41
541016-2	25,81±0,31	3,63±0,06	14,06	2,57±0,01	9,97	19,61±0,36	75,97
541028-1	15,82±0,12	2,53±0,41	16,02	3,70±0,61	23,39	9,59±1,13	60,59
541034-2	18,13±0,28	2,64±0,06	14,55	4,14±0,16	22,83	11,35±0,50	62,61
541051-1	35,15±1,68	3,83±0,25	10,90	4,49±0,22	12,77	26,83±1,70	76,34
541052-1	38,86±0,74	4,13±0,15	10,63	4,53±0,07	11,65	30,20±0,82	77,72
541055-1	39,37±1,91	3,92±0,15	9,96	5,20±0,35	13,21	30,25±1,41	76,83
541057-1	27,37±1,56	1,73±0,15	6,33	2,84±0,23	10,36	22,80±1,18	83,31
541069-2	27,13±0,85	4,19±0,02	15,44	4,81±0,10	17,75	18,13±0,73	66,81
541070-2	25,29±1,83	3,69±0,03	14,57	5,87±0,09	23,21	15,74±1,96	62,22
541072-2	26,53±0,18	3,63±0,04	13,69	4,80±0,07	18,09	18,10±0,20	68,23
541093-1	29,37±1,06	4,29±0,11	14,60	5,30±0,36	18,04	19,79±0,81	67,36
541112-1	20,33±0,52	3,14±0,12	15,43	2,80±0,18	13,77	14,39±0,22	70,81
541116-1	16,85±0,30	2,12±0,15	12,56	2,57±0,04	15,22	12,17±0,19	72,22
541117-2	24,59±1,48	3,13±0,00	12,72	3,96±0,10	16,10	17,50±1,37	71,18
541119-2	22,12±0,07	1,79±0,04	8,09	3,88±0,11	17,53	16,45±0,08	74,38
541120-1	24,56±0,88	3,43±0,12	13,95	4,60±0,17	18,73	16,53±0,59	67,31
541133-1	20,39±1,18	2,80±0,00	13,73	4,69±0,13	23,01	12,90±1,05	63,27
54114-1	21,46±2,13	3,21±0,12	14,94	3,51±0,05	16,35	14,74±2,06	68,71
541228-1	27,79±2,14	3,65±0,39	13,12	3,80±0,37	13,66	20,34±1,38	73,22
541233-2	21,22±0,73	2,10±0,13	9,89	2,61±0,17	12,31	16,51±0,42	77,80
541234-1	29,75±0,59	3,42±0,07	11,49	4,50±0,26	15,11	21,83±0,26	73,39
541249-2	25,48±0,63	3,23±0,04	12,67	4,85±0,10	19,01	17,41±0,48	68,32
541270-2	21,52±1,07	1,70±0,01	7,91	2,78±0,10	12,90	17,04±0,97	79,19
541272-1	19,77±0,43	2,06±0,36	10,43	2,65±0,14	13,38	15,07±0,07	76,19
541274-1	19,92±0,26	2,13±0,03	10,69	3,06±0,03	15,36	14,73±0,26	73,95
541275-1	22,40±1,25	1,83±0,02	8,17	3,61±0,24	16,12	16,96±1,03	75,71
541276-1	22,20±0,03	1,67±0,10	7,52	3,29±0,36	14,81	17,24±0,49	77,67
541278-1	24,23±0,17	1,86±0,10	7,68	5,53±0,26	22,81	16,84±0,19	69,51
541307-1	23,13±0,31	2,68±0,04	11,60	3,52±0,16	15,21	16,93±0,11	73,19
541312-1	42,51±0,55	3,44±0,05	8,10	4,96±0,19	11,66	34,11±0,31	80,24
541316-1	25,91±0,24	2,94±0,03	11,36	4,97±0,18	19,18	17,99±0,02	69,45
541323-1	25,11±0,72	3,42±0,09	13,61	5,67±0,18	22,57	16,02±0,62	63,82
541325-1	20,22±0,33	2,39±0,02	11,82	3,93±0,12	19,43	13,90±0,47	68,75
541330-2	15,92±0,37	3,00±0,39	18,81	2,01±0,02	12,61	10,92±0,78	68,58
541335-1	31,36±0,19	2,36±0,05	7,52	4,46±0,72	14,21	24,54±0,86	78,27
541337-1	28,03±0,88	3,47±0,07	12,38	5,31±0,02	18,95	19,25±0,92	68,68
541338-1	37,44±1,11	3,14±0,09	8,38	4,83±0,22	12,89	29,48±0,80	78,73
541339-1	37,35±1,10	3,62±0,28	9,70	4,65±0,38	12,45	29,07±0,44	77,84
541343-2	29,81±1,19	4,22±0,12	14,15	4,63±0,13	15,53	20,96±0,94	70,32
AMARELO DE PE A2	13,74±0,15	2,14±0,27	15,60	3,34±0,55	24,31	8,25±0,97	60,08
AZTECA IPA	11,09±0,23	1,13±0,12	10,23	1,57±0,11	14,15	4,19±0,15	75,62
BA 130	19,34±1,26	2,81±0,13	14,53	4,64±0,17	24,01	11,89±0,96	61,46
BA I Cateto (Rib. Preto) 4496	16,36±0,05	1,99±0,02	12,15	3,28±0,03	20,06	11,09±0,03	67,79
BR 400 SUPERDOCE	26,17±0,96	4,54±0,15	17,34	6,01±0,51	22,94	15,63±1,60	59,72
BR 473 cIII	22,97±0,89	1,79±0,17	7,80	1,70±0,10	7,39	19,48±0,61	84,80
BR São Francisco	20,47±0,63	1,22±0,00	5,95	1,25±0,04	6,11	18,00±0,60	87,95

* O valor é a média de duas replicatas ± erro padrão, expresso em base fresca. ** Amostra insuficiente para replicata, dado correspondente a uma única análise.

Continuação **Tabela 1**. Resultado das análises dos 134 genótipos.

GENÓTIPOS	Carotenóides Totais * µg/g	Carotenos * µg/g	Carotenos como % de Carotenóides Totais	Xantofilas monohidroxiadas * µg/g	Monohidroxiados como % de Carotenóides Totais	Xantofilas Diidroxiadas * µg/g	Diidroxiados como % de Carotenóides Totais (%)
BRS 1001	30,95±0,78	4,93±0,12	15,91	4,45±0,09	14,39	21,57±0,80	69,69
BRS 2020	23,05±0,04	2,22±0,07	9,65	1,91±0,01	8,27	18,92±0,04	82,08
BRS Caatingueiro	23,33±0,19	1,17±0,05	5,02	1,30±0,02	5,59	20,85±0,16	89,39
CATETO COLOMBIA	14,10±0,09	1,72±0,04	12,22	2,79±0,08	19,79	9,59±0,03	68,00
CATETO SAO SIMAO	9,88±0,99	1,42±0,15	14,42	2,80±0,21	28,38	5,65±0,64	57,20
CATETO Sete lagoas	9,58±1,31	1,19±0,27	12,45	2,21±0,12	23,08	6,17±1,69	64,47
CMS 03 Amarelo cristalino	12,12±0,28	1,25±0,01	10,29	2,78±0,05	22,97	8,09±0,24	66,74
CMS 101	20,30±0,23	1,01±0,03	4,97	1,13±0,06	5,56	18,16±0,20	89,47
CMS 102	19,13±0,79	1,05±0,01	5,47	1,20±0,03	6,30	16,88±0,75	88,23
CMS 104	24,32±0,80	1,36±0,00	5,58	1,30±0,01	5,34	21,66±0,81	89,08
CMS Amarelo Del Bajio	13,15±0,93	2,20±0,23	16,73	4,11±0,71	31,23	6,84±0,46	52,03
CMS01 Mezcla Amarilla	11,91±0,46	2,01±0,14	16,88	3,42±0,14	28,73	6,48±0,18	54,38
Composto Racial Dent. Amarelol	14,79±1,01	2,22±0,36	15,02	3,58±0,39	24,18	8,99±1,20	60,80
Fundacep 35	19,05±0,04	1,33±0,00	6,98	1,33±0,01	6,97	16,39±0,04	86,05
GIN I Cateto Nortista	18,14±0,17	2,12±0,03	11,70	3,60±0,02	19,84	12,42±0,22	68,46
MAYA XV	15,46±0,40	2,17±0,14	14,05	2,49±0,06	16,11	10,80±0,48	69,84
MG II CATETO	16,46±0,71	2,14±0,03	12,99	2,49±0,27	15,16	11,83±1,01	71,85
Missões	19,08±0,15	1,21±0,01	6,35	1,47±0,05	7,68	16,40±0,09	85,97
PA 105	15,27±0,43	2,16±0,09	14,18	3,49±0,08	22,83	9,62±0,27	62,99
PIRA 006	24,68±0,10	3,30±0,14	13,38	4,81±0,37	19,51	16,56±0,40	67,12
PIRANAO UF 1	19,85±1,96	2,30±0,05	11,57	3,42±0,10	17,22	14,14±1,81	71,21
PIRAPOCA AMARELO	14,56±1,06	2,14±0,02	14,67	2,99±0,20	20,52	9,44±0,95	64,81
RS 572	17,83±1,00	1,82±0,03	10,18	3,30±0,04	18,51	12,71±1,00	71,31
SANTA INES	14,05±1,04	2,06±0,07	14,68	3,60±0,78	25,60	8,39±0,19	59,72
SC 014	21,70±1,86	2,06±0,23	9,50	3,50±0,35	16,13	16,14±1,28	74,37
SP 009	9,73±0,36	1,65±0,23	16,92	2,53±0,01	25,99	5,55±0,14	57,09
UFVM 100	18,30±0,11	1,22±0,07	6,66	1,35±0,04	7,38	15,73±0,22	85,96
WP2 AMARELO DENT	9,46±0,97	0,88±0,02	9,30	1,54±0,26	16,25	7,04±1,25	74,44
Média Geral ± Erro Padrão Médio	22,34 ± 0,59	2,55 ± 0,08	11,65 ± 0,27	3,86 ± 0,12	17,89 ± 0,50	15,93 ± 0,50	70,45 ± 0,70
Mínimo – Máximo	9,46-42,84	0,88-4,93	4,97-19,3	1,13-7,22	5,34-32,38	5,55-34,11	51,52-89,47

* O valor é a média de duas replicatas ± erro padrão, expresso em base fresca. ** Amostra insuficiente para replicata, dado correspondente a uma única análise.

De acordo com os resultados encontrados de outros autores pode-se considerar que o germoplasma da Embrapa possui grande potencial, pois seu material mostrou-se superior no conteúdo de carotenóides pró-vitamina A (carotenos + monohidroxiados) e também elevado teor de carotenóides totais. No entanto, algumas linhagens norte-americanas já alcançaram 15 µg/g de β-caroteno (STEVENS *et al.*, 2006), objetivo pretendido no Programa HarvestPlus.

Com base nos dados obtidos e estudando as vias enzimáticas da biossíntese dos carotenóides (Figura 2), foram criados dois índices que podem auxiliar na seleção de genótipos para o melhoramento. O índice Monohidroxiados/Carotenos e o Xantofilas/Monohidroxiados (Quadro 2), que podem ser resumidamente explicado da seguinte maneira: quando se divide a proporção (%) de monohidroxiados pela proporção (%) de carotenos obtêm-se um valor, que significa a produção de monohidroxiados para um dado conteúdo

de carotenos (de carotenos para monohidroxiados, observado na via biossintética). Repetindo a divisão da proporção (%) de xantofilas sobre a proporção (%) de monohidroxiados obtem-se outro valor, que significa a produção de xantofilas para um dado conteúdo de monohidroxiados (o mesmo observado na via biossintética).

A Figura 4 é um exemplo ilustrativo com os índices da linhagem 541112-1, onde a tendência em produzir monohidroxiados é 0,89 (índice monohidroxiados/xantofilas) sobre o conteúdo de carotenos e a tendência em produzir xantofilas é de 5,14 sobre o conteúdo de monohidroxiados. Esses valores podem representar a tendência enzimática e genética, para a biossíntese das frações dos carotenóides. Como os genótipos apresentam diferentes índices isto pode auxiliar a seleção de genótipos para maior conteúdo de provitamina A.

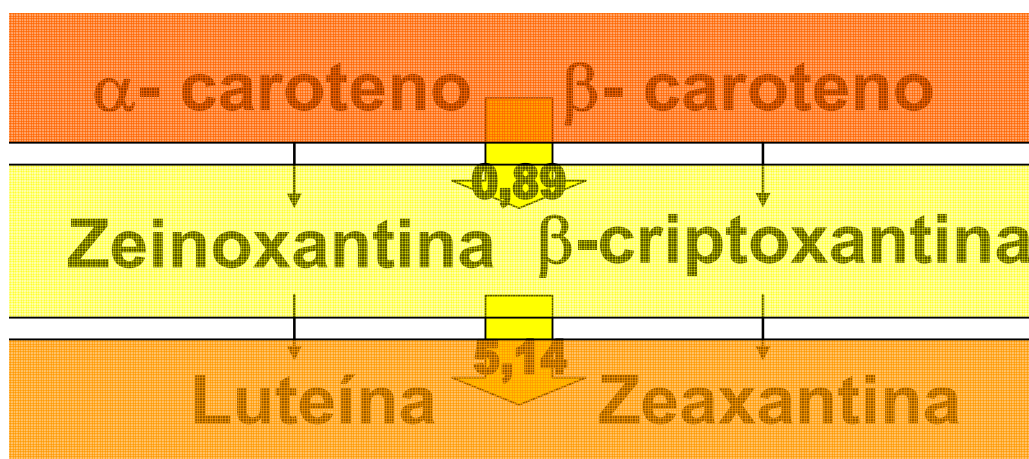


Figura 4. Ilustração da via biossintética para produção de monohidroxiados e xantofilas.

Estes índices representam uma forma direta da utilização da proporção das frações dos carotenóides, no entanto, possibilitam a discriminação de genótipos, mesmo aqueles com proporções iguais de carotenos e, ou monohidroxiados e, ou xantofilas. Quanto menores os índices, mais desejável.

Quadro 2. Valores da proporção (%) de monohidroxilados sobre a proporção de carotenos e da proporção (%) de xantofilas sobre a proporção de carotenos para os 134 genótipos analisados.

Genótipos	Mono/ Caroteno	Xanto/ Mono	Genótipos	Mono/ Caroteno	Xanto/ /Mono	Genótipos	Mono/ Caroteno	Xanto/ /Mono
540736	1.23	4.59	540838-1	1.78	2.94	541330-2	0.67	5.44
540754	1.69	3.63	540843-1	1.91	2.28	541335-1	1.89	5.51
540755	2.66	2.54	540845-2	2.87	2.20	541337-1	1.53	3.62
540757	1.57	3.68	540848-1	2.35	2.24	541338-1	1.54	6.11
540759	2.67	4.18	540874-2	1.45	3.12	541339-1	1.28	6.25
540764	1.45	4.20	540878-1	1.02	3.53	541343-2	1.10	4.53
540807	1.56	3.31	540880-2	1.02	5.48	541270-2	1.63	6.14
540811	1.73	2.25	540893-2	1.41	5.04	541272-1	1.28	5.69
540815	2.18	3.53	540899-2	1.59	4.42	541274-1	1.44	4.81
540817	1.67	3.43	540903-2	1.27	5.24	BR 400 SUPERDOCE	1.32	2.60
540819	1.40	5.75	540941-2	2.06	4.93	BR 473 cIII	0.95	11.47
540847	2.13	1.77	540942-2	2.19	6.08	BR São Francisco	1.03	14.41
540886	1.19	6.98	540948-2	1.82	2.43	BRS 1001	0.90	4.84
540890	1.24	3.04	540962-1	1.62	4.71	BRS 2020	0.86	9.92
540938	1.67	5.17	540986-1	1.81	3.10	BRS Caatingueiro	1.11	15.99
540972	2.43	2.91	540995-2	1.58	2.20	CATETO COLOMBIA	1.62	3.44
540985	1.02	6.31	541016-2	0.71	7.62	CATETO SAO SIMAO	1.97	2.02
540987	1.72	2.73	541028-1	1.46	2.59	CATETO Sete Lagoas	1.85	2.79
540992	2.01	1.59	541034-2	1.57	2.74	CMS 03 AMARILO CRISTALINO	2.23	2.91
540998	1.87	2.96	541051-1	1.17	5.98	CMS 101	1.12	16.09
541018	1.86	4.51	541052-1	1.10	6.67	CMS 102	1.15	14.01
541031	1.66	2.63	541055-1	1.33	5.82	CMS 104	0.96	16.67
541032	2.08	2.72	541057-1	1.64	8.04	CMS AMARILLO DEL BAJIO	1.87	1.67
541034	1.30	5.12	541069-2	1.15	3.76	CMS01 MEZCLA AMARILLA	1.70	1.89
541099	1.57	4.61	541070-2	1.59	2.68	COMPOSTO RACIAL DENT. AMARELO	1.61	2.51
541157	1.61	2.55	541072-2	1.32	3.77	Fundacep 35	1.00	12.34
541311	1.45	4.88	541093-1	1.24	3.73	GIN I CATETO NORTISTA	1.70	3.45
541332	1.39	5.79	541112-1	0.89	5.14	MAYA XV	1.15	4.34
541335	1.79	4.75	541116-1	1.21	4.74	MG II CATETO	1.17	4.74
540685-1	1.24	5.62	541117-2	1.27	4.42	Missões	1.21	11.20
540700-1	2.20	2.92	541119-2	2.17	4.24	PA 105	1.61	2.76
540707-1	1.25	3.97	541120-1	1.34	3.59	PIRA 006	1.46	3.44
540721-1	1.96	1.82	541133-1	1.68	2.75	PIRANAO UF 1	1.49	4.14
540723-1	1.72	4.65	54114-1	1.09	4.20	PIRAPOCA AMARELO	1.40	3.16
540727-1	1.60	3.98	541228-1	1.04	5.36	RS 572	1.82	3.85
540740-1	1.36	2.08	541233-2	1.24	6.32	SANTA INES	1.74	2.33
540760-1	1.79	5.75	541234-1	1.31	4.86	SC 014	1.70	4.61
540763-1	1.54	4.25	541249-2	1.50	3.59	SP 009	1.54	2.20
540780-1	1.88	3.36	541278-1	2.97	3.05	UFVM 100	1.11	11.65
540800-1	1.47	3.71	541307-1	1.31	4.81	WP2 AMARELO DENT	1.75	4.58
540808-1	1.51	3.79	541312-1	1.44	6.88	AMARELO DE PE A2	1.56	2.47
540814-1	2.03	5.54	541316-1	1.69	3.62	AZTECA IPA	1.38	5.35
540818-2	1.40	4.35	541323-1	1.66	2.83	BA 130	1.65	2.56
540826-1	1.51	3.81	541325-1	1.64	3.54	BA I CATETO (Rib. Preto) 4496	1.65	3.38
541276-1	1.97	5.24	541275-1	1.97	4.70			

As linhagens 540992 e a 541112-1 apresentaram os mesmos teores de carotenóides totais e proporção de carotenos (20,33; 3,29 e 17%), no entanto, a razão monohidroxiados/carotenos é de 2,01 e 0,89, respectivamente e a razão de xantofilas/monohidroxiados é de 1,59 e 5,14, respectivamente. O valor do índice pode indicar que um genótipo possui capacidade maior ou menor de produzir monohidroxiados e xantofila que outro. Na observação dos dois índices simultaneamente, pode-se perceber que a linhagem 541112-1, apesar de “menor tendência” de produzir monohidroxiados (0,89 contra 2,01 da outra), tem a maior tendência (5,14) em produzir xantofilas, que a 540992 (1,59). Para a biofortificação de genótipos com alto teor de provitamina A, os monohidroxiados também são importantes, e no final o melhor seria a seleção da linhagem 540992, que apesar de apresentar maior teor de monohidroxiados, concentra menor teor de xantofilas. A característica de menor produção de xantofilas é melhor quando se deseja manter carotenóides provitamina A em maior proporção.

Algo importante nestes índices é a possibilidade de ligação deles ao nível enzimático e também ao genético, pois podem indicar a maior ou menor presença de enzimas ou inibidores ou ativadores na via para produção de monohidroxiados e ou xantofilas, o que estaria ligado à constituição genética de cada genótipo, considerando fatores ambientais uniformes.

Estes índices serão utilizados mais adiante na caracterização dos genótipos dentro dos grupos e também para auxiliar na seleção de materiais para a biofortificação.

4.2. Correlação entre as variáveis

O Quadro 3 apresenta o resultado das análises de correlações de Pearson para as várias características analisadas.

A análise indica forte correlação de todas as frações (carotenos, monohidroxiados e xantofilas) com carotenóides totais. Os carotenos mostram uma correlação positiva também com as frações monohidroxiados e xantofilas, essa relação está dentro da expectativa, pois pela via, os carotenos são transformados em monohidroxiados e xantofilas. A correlação entre monohidroxiados e xantofilas é levemente positiva.

Quadro 3. Correlações de Pearson entre as características estudadas.

Variáveis	Correlação
Carotenóides Totais x Carotenos	0,6784
Carotenóides Totais x Monohidroxiados	0,5652
Carotenóides Totais x Xantofilas	0,9628
Carotenos x Monohidroxiados	0,7191
Carotenos x Xantofilas	0,4930
Monohidroxiados x Xantofilas	0,3350
Carotenos x Razão % Monohidroxiados/%Carotenos	-0,2831
Carotenos x Razão % Xantofilas/%Monohidroxiados	-0,3296
Monohidroxiados x Razão % Monohidroxiados/%Carotenos	0,4186
Monohidroxiados x Razão % Xantofilas/%Monohidroxiados	-0,6027
Xantofilas x Razão % Monohidroxiados/%Carotenos	-0,2056
Xantofilas x Razão % Xantofilas/%Monohidroxiados	0,3890
%Monohidroxiados/%Carotenos x %Xantofilas/%Monohidroxiados	-0,4899

Todos os resultados são significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

As outras correlações das características (Quadro 3) estão de acordo com o esperado, explicados pelos passos da via de biossíntese dos carotenóides.

As correlações dos carotenos com os índices criados mostraram resultados negativos, ou seja, diminuindo o valor dos índices, obtêm-se materiais com maior teor de carotenos.

A correlação entre os índices mostrou-se negativa, o que demonstra que os materiais analisados apresentaram uma característica interessante, pois o aumento na produção de monohidroxiados (aumento do valor do índice, não desejável a priori) reduz a capacidade de produzir xantofilas (diminuição do valor do índice, desejável). O contrário também foi verdadeiro.

4.3. Vitamina A dos genótipos analisados

Para se estimar o conteúdo de vitamina A, foi considerado que toda a fração caroteno encontrado nos genótipos analisados referia-se a β -caroteno e, os monohidroxiados como sendo a β -criptoxantina. Assim, cada 1 μg de β -

caroteno é convertido em 1/12 de RAE (Atividade Equivalente de Retinol) e cada 1 µg de β-criptoxantina é convertida em 1/24 de RAE (Atividade Equivalente de Retinol).

Foram escolhidos os 10 maiores e os 10 menores conteúdos de RAE (vitamina A) em 100g do material para compor o gráfico de barras abaixo (Figura 5).

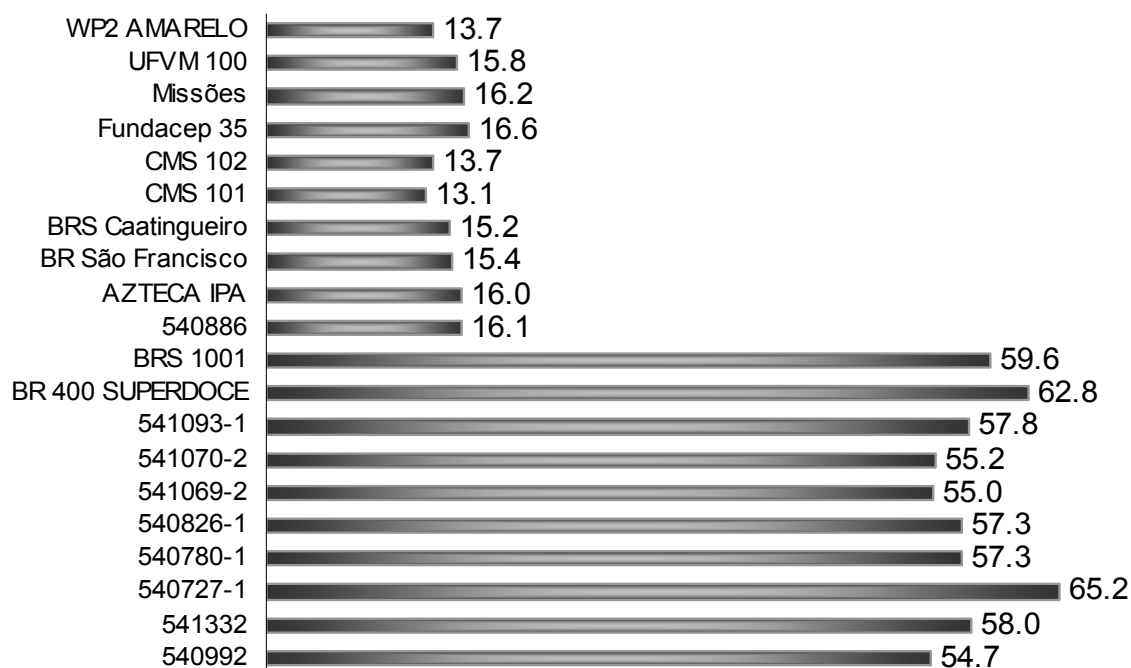


Figura 5: Demonstrativo do teor de vitamina A dos genótipos analisados. Os dez maiores e os dez menores conteúdos. Os valores estão calculados em RAE/100g de milho. 1 RAE = 12µg de β-caroteno e 24µg de carotenóides pró-vitamínicos.

Os genótipos de maior teor de vitamina A apresentaram uma média de 58,3 RAE/100g, valor quase 5 vezes maior que o de outros genótipos, evidenciando grande variabilidade para esta característica.

Conforme os resultados encontrados, as linhagens constituem a maioria dos genótipos com alto teor de vitamina A, o que já demonstra o ganho para essa característica obtido com a seleção. Apenas um material comercial BRS 1001 e o acesso BR 400 superdoce apresentaram alto teor de equivalente retinol.

Para os genótipos com baixo teor de equivalente retinol, destacam-se sete variedades comerciais. O que confirma a necessidade de melhoramento para produção de novos materiais, pois as cultivares comerciais disponíveis possui

pouco valor nutricional em relação à vitamina A, comparado com as linhagens elite analisadas.

4.4. Análises multivariada

Para avaliar a divergência genética entre os 134 genótipos, foram realizadas análises multivariada. Para tanto, utilizou-se os dados de carotenóides totais, carotenos, xantofilas monohidroxiladas e xantofilas dihidroxiladas, padronizados, para compor a matriz de distância ou dissimilaridade, utilizando-se a distância euclidiana média.

A matriz de distância foi utilizada para o agrupamento dos genótipos calculada pelo método de Tocher. No Quadro 4, encontra-se o agrupamento obtido por este método.

Observa-se a formação de 18 grupos, sendo o maior deles com 55 componentes, e nove grupos com apenas um genótipo, indicando que embora haja muitos genótipos semelhantes para a composição de carotenóides no grão de milho, há bastante variabilidade para essa característica no germoplasma estudado.

Para caracterizar cada grupo e facilitar a seleção de materiais foi elaborado o perfil de cada um deles. O Quadro 5 descreve o perfil de carotenóides totais, carotenos, monohidroxilados e xantofilas, com o número de componentes dentro do grupo, a média, amplitude de variação e as proporções (%) de carotenos, monohidroxilados e xantofilas em relação a carotenóides totais dentro do grupo. Foi ainda utilizado o índice criado para detalhar as diferenças entre os genótipos em relação à razão da proporção (%) monohidroxilados sobre a proporção (%) de carotenos e a razão da proporção (%) de xantofilas sobre a proporção (%) de monohidroxilados.

Quadro 4. Agrupamento dos genótipos estudados, segundo Tocher.

Grupos	Nº de Componente	Componentes
1	55	540736; 540754; 540811; 540817; 540890; 540938; 540972; 540985; 540987; 540998; 541018; 541031; 541034; 541157; 541311; 540700-1; 540723-1; 540763-1; 540800-1; 540808-1; 540818-2; 540838-1; 540843-1; 540880-2; 540962-1; 540995-2; 541028-1; 541034-2; 541112-1; 541116-1; 541119-2; 541133-1; 54114-1; 541233-2; 541270-2; 541272-1; 541274-1; 541275-1; 541276-1; 541307-1; 541325-1; AMARELO DE PE A2; BA 130; BA I CATETO (Rib. Preto) 4496; CATETO COLOMBIA; COMPOSTO RACIAL DENT. AMARELO I; GIN I CATETO NORTISTA; MAYA XV; MG II CATETO; PA 105; PIRANAO UF 1; PIRAPOCA AMARELO; RS 572; SANTA INES; SC 014
2	13	540819; 540760-1; 540942-2; BR 473 cIII; BR São Francisco; BRS 2020; BRS Caatingueiro; CMS 101; CMS 102; CMS 104; Fundacep 35; Missões; UFVM 100.
3	26	540757; 540764; 540807; 540815; 540685-1; 540707-1; 540874-2; 540893-2; 540899-2; 540903-2; 540948-2; 540986-1; 541069-2; 541070-2; 541072-2; 541093-1; 541117-2; 541120-1; 541228-1; 541234-1; 541249-2; 541316-1; 541323-1; 541337-1; 541343-2; PIRA 006
4	9	540886; 540845-2; AZTECA IPA; CATETO SAO SIMAO; CATETO SETE LAGOAS; CMS 03; AMARILO CRISTALINO; CMS01 MEZCLA AMARILLA; SP 009; WP2 AMARELO DENT
5	5	540847; 540992; 541032; 540721-1; 540848-1
6	9	541099; 541332; 541335; 541051-1; 541052-1; 541055-1; 541312-1; 541338-1; 541339-1
7	4	540814-1; 540941-2; 541057-1; 541335-1
8	2	540780-1; 540826-1
9	2	540740-1; CMS AMARILLO DEL BAJIO
10	1	541330-2
11	1	540878-1
12	1	541278-1
13	1	541016-2
14	1	BR 400 Superdoce
15	1	540755
16	1	540759
17	1	BRS 1001
18	1	540727-1

Quadro 5: Perfil dos grupos formados pelo agrupamento de Tocher.

Grupos - Nº de Genótipos	Médias (Máximo-Mínimo) Expresso em base úmida				(%) Proporção (sobre carotenóides totais)			Índice Mono/Caroten	Índice Xanto/Mono
	Carotenóides Totais (µg/g)	Carotenos (µg/g)	Mono. (µg/g)	Xantofilas (µg/g)	Caroteno (máx - mín)	Mono (máx - mín)	Xantofila (máx - mín)	Valores Médios	Valores Médios
1-55	19.17 (24.45 - 13.74)	2.30 (3.21-1.60)	3.56 (4.87- 2.49)	13.31 (18.54- 8.25)	17 - 8	26 - 12	79 - 57	1,57	3,88
2-13	20.34 (24.32- 15.89)	1.36 (2.22-1.01)	1.64 (2.69-1.13)	17.34 (21.66-12.25)	10 - 5	14 - 5	89 - 77	1,22	11,64
3-26	26.44 (29.81- 24.01)	3.35 (4.29-2.49)	4.81 (6.19-3.58)	18.27 (21.83-15.07)	15 - 9	25 - 13	76 - 61	1,45	3,90
4-9	10.81 (12.67-9.46)	1.31 (2.01-0.88)	2.37 (3.42-1.44)	7.12 (10.03-5.55)	17 - 9	29 - 11	79 - 54	1,83	3,43
5-5	19.38 (21.55- 16.08)	2.66 (3.27-2.26)	5.57 (6.59-4.97)	11.15 (13.96-8.77)	16 - 11	32 - 24	65 - 52	2,11	2,03
6-9	38.22 (42.84- 33.45)	3.65 (4.13-3.14)	5.06 (5.86-4.49)	29.50 (34.11-24.69)	11 - 8	16 - 12	80 - 74	1,40	5,87
7-4	27.78 (31.36- 25.29)	1.98 (2.36-1.73)	3.78 (4.46-2.84)	22.03 (24.54-19.93)	8 - 6	16 - 10	83 - 77	1,90	6,01
8-2	32.48 (32.67- 32.30)	3.73 (3.92-3.54)	6.29 (6.67-5.90)	22.46 (22.47-22.45)	12 - 11	20 - 18	70 - 69	1,69	3,59
9-2	14.23 (15.31- 13.15)	2.58 (2.95-2.20)	4.06 (4.11-4.01)	7.59 (8.34-6.84)	19 - 17	31 - 26	54 - 52	1,61	1,87
10-1	15.92	3.00	2.01	10.92	19	13	69	0,67	5,44
11-1	21.77	3.87	3.95	13.94	18	18	64	1,02	3,53
12-1	24.23	1.86	5.53	16.84	8	23	70	2,97	3,05
13-1	25.81	3.63	2.57	19.61	14	10	76	0,71	7,62
14-1	26.17	4.54	6.01	15.63	17	23	70	1,32	2,62
15-1	28.29	2.71	7.22	18.36	10	26	65	2,66	2,54
16-1	32.06	2.16	5.77	24.13	7	18	75	2,67	4,18
17-1	30.95	4.93	4.45	21.57	16	14	70	0,90	4,84
18-1	38.97	4.35	6.95	27.66	11	18	71	1,60	3,98

Mono= monohidroxiados

Os grupos gerados pelo método de Tocher facilitam a seleção de material divergente, principalmente as linhagens elite, para compor o melhoramento para geração de híbridos, uma vez que permite a seleção de genótipos pertencentes a grupos heteróticos distintos a serem indicados para cruzamento. A combinação complementar do perfil de carotenóides, através de hibridização, aumenta significativamente o nível desses nutrientes (MENKIR *et al.* 2006).

MENKIR *et al.* (2006) utilizou linhagens elites selecionadas como relativamente alto teor de carotenóides pró-vitamina A (2,95 a 5,95 µg/g) e baixo teor (0,83 a 2,20 µg/g) para geração de híbridos, avaliando o perfil de carotenóides e rendimentos agronômicos. Foram gerados 5 híbridos de boa produtividade de grãos contendo próximo de 7 µg/g de pró-vitamina A.

Assim, aproveitando o agrupamento Tocher (Quadro 4), com auxílio do Quadro 5, podem-se selecionar genótipos para geração de híbridos. O grupo 3 pode ser cruzado com o genótipo do grupo 14 para o melhoramento, assim, tem-se genótipos de grupos distintos com teor e perfil de carotenóides desejável, ou seja, alto teor de carotenóides totais e/ou alto teor de carotenos e/ou alta proporção de carotenos.

O uso dos Componentes Principais, também foi utilizado para avaliar a dispersão do germoplasma estudado. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados dessa análise, bem como os coeficientes de ponderação (autovetores) associados às características avaliadas, determinados pelo programa GENES.

Tabela 2. Autovalores (λ_i) correspondentes às percentagens de variação explicadas pelos Componentes Principais (CPs) e coeficientes de ponderação (autovetores) das 04 características, carotenóides totais, carotenos, monohidroxilados e xantofilas, em relação aos 134 genótipos.

CP _s	AUTOVALORES		CT	AUTOVETORES(a _s)		
	λ_i	Acumulado(%)		Caroteno	Mono.	Xantof.
CP ₁	2.89	72.3611	0.5605	0.497	0.443	0.4925
CP ₂	0,84	93.4547	-0.323	0.3937	0.6248	-0.5918
CP ₃	0,26	99.9999	-0.1026	0.7672	-0.626	-0.0945
CP ₄	0,000001	100.0	-0.7557	0,0962	0.1465	0.6311

CT= Carotenóides Totais; Mono=Monohidroxilados; Xantof.=xantofilas.

A ordem das variáveis de maior peso é carotenóides totais, carotenos, monohidroxilados e xantofilas. Com base nos dados da Tabela 2, pode-se notar que os dois primeiros Componentes Principais explicam cerca de 93% da variação total, tornando-se possível à transposição dos genótipos do espaço tetradimensional (4 variáveis avaliadas) para bidimensional com reduzida distorção provocada pelas distâncias entre os genótipos, como apresentado na Figura 6. Nesta figura, pode-se verificar a dispersão dos genótipos. As cores representam os grupos formados pelo método de agrupamento de Tocher. Alguns

genótipos estão identificados no gráfico, para fins de ilustração. A lista de genótipos enumerados está no anexo 1.

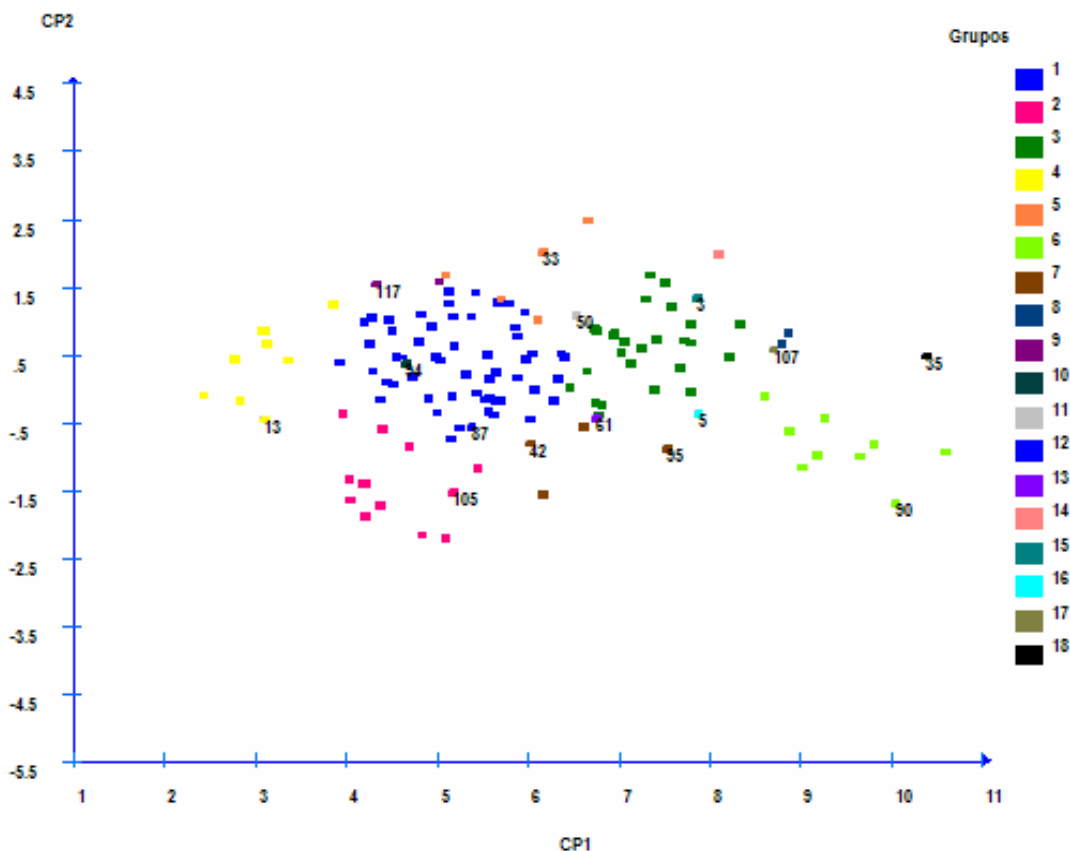


Figura 6. Dispersão gráfica de genótipos de milho avaliados quanto aos teores de carotenóides no grão, com base nos dois primeiros Componentes Principais. Vide anexo 1 para identificação dos genótipos colocados no gráfico.

A dispersão dos genótipos permite concluir que o agrupamento Tocher, representado pelas cores, foi bem estabelecido para alguns materiais, visto que estes estão visualmente separados dos demais, como exemplo, os grupos verde e amarelo. Outros genótipos mostraram-se misturados a outros grupos, não sendo possível fazer uma distinção pela visualização no gráfico.

Todos os procedimentos estatísticos utilizados permitem identificar a existência de variabilidade genética do material estudado, agrupando-os de modo que seja possível separar mais facilmente acessos promissores para fins de melhoramento. Tanto o método de agrupamento de Tocher como os Componentes Principais mostram-se úteis para a identificação de genótipos para programas de melhoramento. No entanto, no próximo item o processo de caracterização é adicionalmente detalhado.

4.5. Seleção de genótipos para o programa de biofortificação

De acordo com Guimarães (2007, comunicação pessoal) ¹o programa de alto teor de precursores de vitamina A deve consistir em:

- Análise do maior número possível de linhagens;
- Formação de variedades sintéticas e híbridos com as melhores linhagens para o conteúdo de carotenóides pró-vitamina A;
- Melhorar as populações via seleção recorrente para pró-Vitamina A e performance agrônômica;
- Avaliar capacidade combinatória de linhagens elites;
- Avaliar interação GXA.

A seleção dos possíveis genótipos para serem utilizados em programa de biofortificação começa pela análise da Tabela 1, onde pode-se selecionar os materiais desejáveis, ou seja, os de maiores teores de carotenóides totais e/ou materiais com alto teor de carotenos e ainda materiais com alta proporção de carotenos. O perfil desses genótipos identificados como mais promissores para biofortificação são apresentados no Quadro 6.

Quadro 6. Genótipos promissores para programas de melhoramento, baseado no teor de carotenóides totais, teor de carotenos e proporção de caroteno.

Genótipos	Carotenóides Totais (ug/g)*	Carotenos (ug/g)*	Monohidroxiados (ug/g)*	Xantofilas (ug/g)*	Proporção Carotenos/ Carotenóides totais
541330-2	15.92	3.00	2.01	10.92	19 %
541312-1	42.51	3.44	4.96	34.11	8%
540740-1	15.31	2.95	4.01	8.34	19%
541332	42.84	4.11	5.70	33.02	10%
540727-1	38.97	4.35	6.95	27.66	11%
540780-1	32.67	3.54	6.67	22.45	11%
540826-1	32.30	3.92	5.90	22.47	12%
541093-1	29.37	4.29	5.30	19.79	15%
BR 400 Superdoce	26.17	4.54	6.01	15.63	17%
BRS 1001	30.95	4.93	4.45	21.57	16%

*Expresso em base fresca

Esses genótipos podem ser avaliados quanto à sua capacidade combinatória para geração de variedades sintéticas e seleção recorrente para maiores teores de pró-vitamina A.

¹ Paulo Evaristo Oliveira Guimarães, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Brasil, 2007. Melhorista responsável pela geração de genótipos de milho com alto teor de carotenóides pró-vitamina.

Pode-se adicionar a esses genótipos, duas outras linhagens (541343-2 e 541069-2) do grupo 3 do agrupamento de Tocher (Quadro 4), para realização de hibridação com materiais contrastantes, no caso o grupo 14 (BR 400 Superdoce, já selecionado acima). Essas duas linhagens apresentaram as maiores proporções de carotenos entre as linhagens analisadas do grupo 3 (Quadro 4).

Outra proposta para seleção de genótipos foi a escolha dos menores índices de monohidroxiados/carotenos e xantofilas/monohidroxiados, que apresentaria a possibilidades de geração de materiais futuros com maior conteúdo de pró-vitamina A, devido à incorporação genética destes valores nos genótipos com alto conteúdo de carotenos e carotenóides totais. Baseado nesses índices, no conteúdo de carotenóides totais e também nas proporções mais altas encontradas de carotenos e monohidroxiados, incorporadas em um mesmo genótipo, simultaneamente, foi criado os quatro genótipos hipotéticos (ideótipos) (Quadro 7). Para criá-los foi utilizado como base de carotenóides totais a média das linhagens elites (24,07) e também o genótipo de maior conteúdo (42,84).

Quadro 7. Ideótipos promissores para o programa de melhoramento, baseado nos melhores índices para mono/carotenos e xantofilas/mono para aumento do teor de pró-vitamina A.

Genótipo	Carotenóides Totais (ug/g)*	Caroteno (ug/g)*	Monohidroxiado (ug/g)*	Xantofilas (ug/g)*	Características importantes
1	24.07	8.80	5.90	9.37	Índice 0,67(Mo/Ca) e 1,59(Xan/Mo)
2	42.84	15.66	10.49	16.56	Alto teor de CT e índice 0,67(Mo/Ca) e 1,59(Xan/Mo)
3	42.84	8.26	11.23	23.36	Alto teor de CT e índice 1,36(Mo/Ca) e 2,08(Xan/Mo)
4	42.84	8.14	11.14	23.56	Alto teor de CT e proporção de 19% carotenos e 325 de monohidroxiados
541330-2	15.92	3.00	2.01	10.92	Índice de 0,67 (Mo/Ca)
540992	20.34	3.27	6.59	10.48	Índice de 1,59(Xan/Mo)
541332	42.84	4.11	5.70	33.02	Alto teor CT
540740-1	15.31	2.95	4.01	8.34	Alta proporção de Ca simultânea com mais proporção alta de Mo.

CT= carotenóides totais., Ca = carotenos, Mo = monohidroxiados, Mo/Ca razão da % de monohidroxiados sobre % de carotenos, Xan/Mo razão da % de xantofilas sobre % de monohidroxiados.

Os índices utilizados foram 0,67 para monohidroxiados/carotenos e 1,59 xantofilas/monohidroxiados (linhagens 541331-2 e 540992, respectivamente) e também os melhores índices encontrados no mesmo genótipo, no caso 1,36 e 2,08, encontrado na linhagem 540740-1. O resultado está descrito no Quadro 7, juntamente com as linhagens utilizadas.

Como essas quatro linhagens foram selecionadas para se criar os genótipos hipotéticos, sugere-se que estas fossem estudados quanto à capacidade de combinação destes genótipos. Observa-se que estes materiais, com exceção da linhagem 540992, já haviam sido selecionados anteriormente pelo perfil de carotenóides totais ou carotenos. Outra maneira utilizada com os ideótipos seria sua análise com os 134 genótipos estudados, em uma análise multivariada com agrupamento. Assim, seria possível identificar novos genótipos com as menores distâncias dos ideótipos, que seriam selecionados para o uso nos programas de melhoramento.

Utilizando-se o programa GENES foi gerada a matriz da distância euclidiana média dos 138 genótipos (134 + 4), com os resultados padronizados das 4 variáveis analisadas. Pela matriz de distância foi realizado o agrupamento pelo método de Ward, apresentado na Figura 6.

No dendrograma apresentado (Figura 6), considerando as mudanças discrepantes de níveis, pode-se estabelecer quatro grupos principais.

Desconsiderando os outros grupos, pode-se focar no grupo que contém os quatro ideótipos para carotenóides provitamina A. Numa análise intragrupo percebe-se que os quatro ideótipos estão bem próximos entre si, no entanto, seu grupo possui outros 14 componentes que, apesar de não tão próximos, são considerados do mesmo grupo, ou seja, possuem similaridades.

Os outros 14 componentes do agrupamento juntos aos ideótipos criados são formados somente por linhagens. A seguir listadas: 541332, 541312-1, 541338-1, 541339-1, 541052-1, 541055-1, 570759, 541335-1, 540780-1, 540826-1, 541099, 541051-1 e 541335. Subtraindo as linhagens anteriormente escolhidas, mais nove linhagens elite podem ser selecionadas pelo seu elevado potencial para o melhoramento.

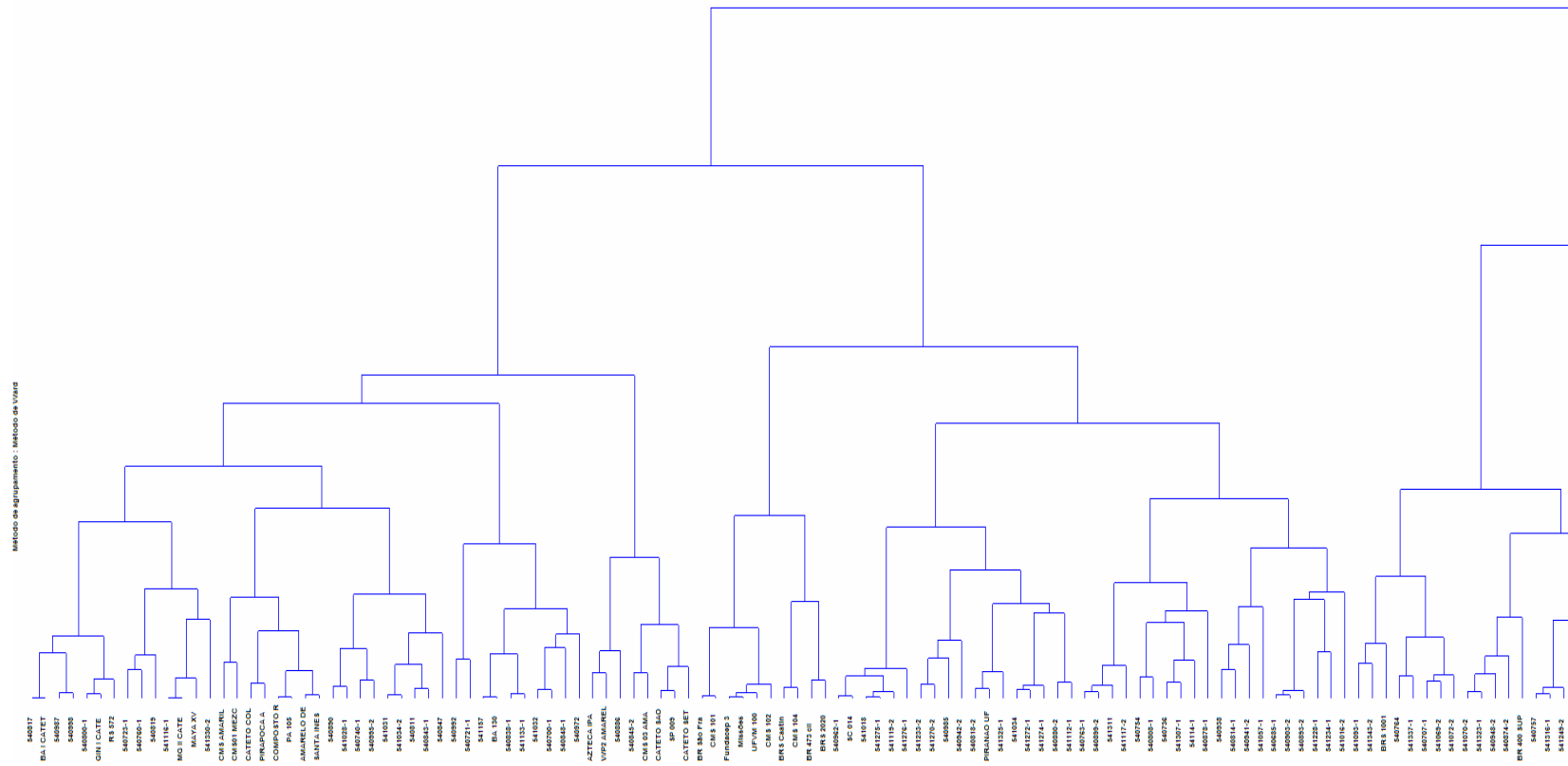


Figura 7. Dendrograma ilustrativo da dissimilaridade genética entre 138 genótipos de milho, estabelecido pelo método de Ward, com base em 4 características, utilizando a distância euclidiana média.

Assim, ao final, pode-se selecionar 20 linhagens elites (Quadro 8) para o melhoramento visando aumento do teor de provitamina A.

Estes genótipos foram selecionados de diversas formas:

- por apresentarem superioridades (maiores valores) nas características mais importantes avaliadas (Tabela 1);
- para compor o melhoramento por hibridização, com o cruzamento de genótipos de grupos distintos com características desejáveis, de acordo com agrupamento Tocher (Quadro 4 e 5);
- utilizados para formação dos ideótipos (Quadro 7), e;
- genótipos agrupados pelo Método de Ward nos mesmo grupo dos ideótipos (Figura 6), o que sugere uma proximidade genética entre ambos.

Quadro 8. Materiais promissores para o programa de melhoramento.

Genótipos	Características dos genótipos selecionados
541330-2	Material de alto teor de carotenóides, carotenos e ou alta proporção de carotenos.
541312-1	
540740-1	
541332	
540727-1	
540780-1	
540826-1	
541093-1	
541343-2	Linhagens elite para hibridização, com alta proporção de carotenos.
541069-2	
540992	Uma das linhagens utilizadas para geração dos ideótipos.
541335-1	Material agrupado no mesmo grupo dos ideótipos, pelo método de Ward.
570759	
541055-1	
541052-1	
541339-1	
541099	
541335	
541051-1	
541338-1	

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- ❖ A variabilidade existente para perfil de carotenóides no germoplasma estudado evidencia seu potencial para o melhoramento genético visando a biofortificação;
- ❖ O germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo possui grande potencial, principalmente, no total de carotenóides pró-vitamina A;
- ❖ Foram identificadas 20 linhagens elites para o melhoramento visando aumento do teor de pró-vitamina A.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO (2006). Brasil: estimativa de consumo por segmento. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatistica4.htm>. Acesso em: 10 de outubro de 2006.

ALEXANDER, D. E. (1988). Breeding special nutritional and industrial types. In G.F. Sprague & J.W. Dudley (Ed.). **Corn and corn improvement**. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. p. 869-880.

AMBROSIO, C. L. B., CAMPOS F. A. C. S., FARO Z. P. (2006). Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Rev. Nutr.**, vol.19, no.2 p.233-243.

APROVEITANDO a tecnologia agrícola para combater as deficiências de micronutrientes (2004) In: **Desenvolvendo produtos agrícolas mais nutritivos**, Washington: Harvest Plus, 4p. Folder.

AREDS, (2001). Age-related eye disease Study Research Group. A randomized, placebo-control, clinical trial of high-dose supplementation with vit. C and E, beta caroteno, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss. **Archives of Ophthalmology**, 119: 1417-1436.

ASTROG, P. (1997). Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends in Food Science and Technology**, 81:406-413.

AZAIS-BRAESCO, V.; PASCAL, G. (2000). Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71(5 Suppl):S1325-33.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. (1993). Deficiências nutricionais: ações específicas do setor saúde para o seu controle. **Caderno de Saúde Pública Rio de Janeiro**. 9:130-135.

BEATON, G.; MARTORELL, R.; EDMONSTON, B.; MCCABE, G.; ROSS, A. C. E HARVEY, B. (1993). Effectiveness of vitamin a supplementation in the control of young child morbidity and mortality in developing countries. Genebra. Discursão sobre política de Nutrição n. 13, **State of the Art Series, ACC/SCN**.

BIOLOGIA MOLECULAR & BIOINFORMÁTICA NOTÍCIAS, (2006). Genes determinam cegueira entre idosos. http://www.biomol.net/noticias/2006_03_01_arquivo.html Acessado em: 10 de novembro de 2006.

BLESSIN, C. W.; BRECHER, J. D.; DIMLER, R.,J. (1963). Carotenoids of corn and sorghum. V. Distribution of xanthophylls and carotenes of yellow dent corn. **Cereal Chemistry**, 40:582-586.

BORÉM A., MIRANDA G. V. (2005). Melhoramento de plantas- 4ª Edição – Viçosa: UFV. 525 p.

BRASIL (2000). Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília. 47p.

BRESSANI, R. (1991). **Protein quality of high lysine maize for humans**. American Association of Cereal Chemists, 36 (9):806-811.

BRITTON, G. (2005). Structure and properties os carotenoids in relation to function. **FASEB J.** 9, 1551-1558.

BRITTON, G.; LAAEN, J. S; PFANDER, H. (2004). **Carotenoids Handbook**-Basel: Birkauer Verlag. 562p.

BRYCE, J.; EI ARIFEEN, S.; PARKYO, G.; LANATA, C.; GWATIKIN, D.; HABICHT, J. P. (2003). Reducing child mortality: can public health deliver? **Lancet**, 362:159-64.

BUCKNER, B.; KELSON, T. L.; ROBERTSON, D. S. (1990). Cloning of the yl Locus of Maize, a Gene Involved in the Biosynthesis of Carotenoids. **The Plant Cell**, Vol. 2, 867-876.

BURRI, B. J. (1997). Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutrition Research**.17: 547-580.

BURT, A. J; SMID, M. P.; SHELP, B. J. e LEE, E. A. (2006) High carotenoid maize project: increased accumulation and modified chemical profiles. **Book of Poster Abstracts- 2006 International Plant Breeding Symposium, Honoring John Dudley**. Mexico City, 20-25 August, 2006.

CABUELA, I. (1971) Contribution to the study of carotenoids metabolism in the maize grain. in: Eucarpia. **Proceedings: European Association Resistance Plant Breeding**, 5th. Akademiai Kiado, Budapest . pp85-91.

CHENG, Q. (2006). Structural diversity and functional novelty of new carotenoid biosynthesis genes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 552–559.

CONAB (2006). **Indicadores da agropecuária**, setembro 2006 ANO XV - Nº 09: Disponive em:<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/indicadores/pubindica dores.pdf>. Acessado em 30/09/2006.

CONWAY, G. (2003). *Produção de alimentos no século XXI – Biotecnologia e meio ambiente*. Trad. Paciornik, C. M. Ed. Estação Liberdade.

CRUZ, C. D. (1990) *Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas*. Tese (Doutorado em agronomia) Piracicaba: ESALQ/USP, 188 p.

CRUZ, C. D. (2005) *Programa GENES: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 648p.

CRUZ, C.D, CARNEIRO, P.C.S. (2003) *Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético*. V.2. Viçosa: UFV, 585p.

DAOOD, H. G.; NAGY-GASZTONYI, M.; VÖRÖSVÁRY, G.; HOLLY, L.; HORVÁTH, L.; NYERGES, M. (2003) Analysis of carotenoids in some Hungarian maize landraces. *Tagung 2003 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs BAL Gumpenstein*, 25. - 27. Disponível

em:<http://www.gumpenstein.at/publikationen/saatzuechter2003/daood.pdf>
Acessado 19/12/2006.

DE LUCA, L. M.; ROSS, S. A. (1996). Beta-carotene increases lung cancer incidence in cigarette smokers. **Nutrition Reviews**, 54: 178-180.

DE STEFANI, E.; BOFFETTA, P.; BRENNAN, P. (2000). Dietary carotenoid and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. **European Journal of Cancer Prevention**, 9:329-334.

DIMENSTEIN, R. (1999). Estudo da transferência materno fetal de vitamina A e carotenóides sob condições adequadas e subadequadas do estado nutricional materno em vitamina A [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro.

DINIZ, A. S. (2001). Combate à deficiência de vitamina A: linhas de ação e perspectivas. **Revista Brasileira da Saúde Materno Infantil**, 1:31-6.

DINIZ, A. S.; SANTOS, L. M. P. (2000). Hipovitaminose A e xeroftalmia. **Jornal de Pediatria**, 77 Suppl:311-22.

DUARTE, J.O. (2001). Introdução e importância econômica do milho. In: Cultivo do Milho. CRUZ J.C., VERSIANI R.P., FERREIRA M.T.R. (Eds). Sete Lagoas, MG: Embrapa CNPMS. (Sistemas de Produção,1).

DUNLAP, F. G.; WHITE, P. J.; POLLAK, L. M. (1995). Fatty Acid composition of oil from exotic corn breeding materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 72:989-993.

EGESEL, C. O.; WONG, J. C.; LAMBERT, R. J.; ROCHEFORD, T. R. (2004). Gene Dosage Effects on Carotenoid Concentration in Maize Grain. **Maydica** 48:183-190.

EGESEL, C. O.; WONG, J. C.; LAMBERT, R. J.; ROCHEFORD, T. R., 2003. Combining Ability of Maize Inbreds for Carotenoids and Tocopherols. **Crop Sci.** 43:818-823.

FANCELLI, A. L. (1982). Parte A – Tecnologia de Produção In: FANCELLI A.L., LIMA U.A., 1982. Milho – Produção, Pré-processamento e transformação Agroindustrial – **série Extensão Agroindustrial** 5. Coordenadoria da Indústria e Comércio-Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do estado de São Paulo, São Paulo, 112p.

FLORES, H.; AZEVEDO, M. N. A.; CAMPOS, F. A. C. S.; LINS, M. H. C. B.; CAVALCANTI, A. A.; SALZANO, A. (1991). Serum vitamin A distribution curve for children aged 2-6 known to have adequate vitamin A status: a reference population. **American Journal Clinical Nutrition**, 54(4):707-11.

FUFA, H. G.; AKALU, A.; WONDIMU, S.; TAFFESSE, T.; GEBRE, K.; SCHLOSSER, H.; NOETZOLD, T. (2003). Assessment of protein nutritional quality and effects of traditional processes: a comparison between Ethiopian quality protein maize and five Ethiopian adapted normal maize cultivars. **Nahrung**, 47 (4): 269-273.

GOMES, M. M.; SAUNDERS, C.; ACCIOLY, E. (2005). Papel da vitamina A na prevenção do estresse oxidativo em recém-nascidos. **Revista Brasileira Saúde Materna e Infantil**. July/Sept, 5:275-282.

GONÇALVES, C. M. R.; AMAYA-FARFAN, J.; WIKE, B. C.; VENCOVSKY, R. (1995). Prevalência de hipovitaminose A em crianças da periferia do município de Campinas. **Caderno de Saúde Pública**, 11: 85-96.

GOODWIN, T. W. (1980). The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. 1: **Plants** (New York: Chapman and Hall).

HAMMOND, B. R. Jr.; JOHNSON, E. J.; RUSSELL, R. M.; KRINSKY, N. I.; YEUM, K. J.; EDWARDS, R. B. (1997). Dietary modification of human macular pigment density. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**; 38(9): 1795-801.

HARVESTPLUS - BREEDING CROPS FOR BETTER NUTRITION. (2007) – Disponível em: <http://www.harvestplus.org/about.html>. Acesso em: 25/10/2007.

HOWITT, C. A. e POGSON, B. J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues; **Plant, cell and environment**,29: 435-445.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2003) – POF - Pesquisa de Orçamento Familiar , 2002-2003.

INFORMATIVO dia a dia. Embrapa Mandioca e Fruticultura (2005) -Unidade lança duas mandiocas biotificadas.http://www.cnpmf.embrapa.br/informativos/dia_a_dia/diaadia_06_18.pdf. Acessado em: 07/05/2006.

IOM (Institute of Medicine) (2001). Vitamin A. **In: Food and Nutrition Board**. IOM (Institute of Medicine. Dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington (DC): National Academy Press, p. 82-161.

JANICK-BUCKNER, D.; HAMMOCK, J. D.; JOHNSON, J. M. e BUCKNER, B. (1999). Biomedical and ultrastructural analysis of y10 mutant of maize. **Journal of Heredity**, 90:507-513.

KRINSKY, N. I. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. **Annual Review of Nutrition**,13: 561-587.

KRINSKY, N. I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radic Biol Med.** ;7(6):617-35.

KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. (1999). Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47:1948-1995.

LANDRUM, J. T.; BONE, R. A., JOA, H.; KILBURN, M. D.; MOORE L. L.; SPRAGUE, K. E. (1997A). A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. **Exp Eye Res.** 65(1):57-62.

LANDRUM, J. T.; BONE, R. A.; KILBURN, M. D. (1997B). The macular pigment: a possible role in protection from age-related macular degeneration. **Adv Pharmacol.**;38: 537-56.

LIMA, U. A. (1982). Parte C – Industrialização do milho In: FANCELLI A.L., LIMA U.A., 1982. Milho – Produção, Pré-processamento e transformação Agroindustrial – **série Extensão Agroindustrial 5**. Coordenadoria da Indústria e Comércio-Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do estado de São Paulo, São Paulo, 112p.

LOPES, J. F. (1997). Moagem úmida do milho para produção de amido e subprodutos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimento**. São Paulo, v. 31, n. 1, p. 25-32.

MANLY, B.F.J. (1994). Multivariate statistical method. 2^oed. London: A primer 215 p.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. (2002). Fisiologia da planta de milho. (**EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 20**). Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS 23p.

MCAULIFFE, J.; SANTOS, L. M.; DINIZ, A. S.; BATISTA-FILHO, M.; BARBOSA, R. C. C. (1991). A deficiência de vitamina A, estratégias para seu controle: um guia para as Secretarias Municipais de saúde. Fortaleza: Project Hope, 29p.

McCANN, J. (2001). Maize and Grace: History, Corn, and Africa's New Landscapes, 1500–1999 **Boston University Society for Comparative Study of Society and History**.

MELO FILHO, G. A.; RICHETTI, A. (1997). Aspectos socio-econômicos da cultura do milho. Embrapa, Circular Técnica 5:13-21.

MENKIR, A.; WHITE, W.; MAZIYA-DIXON, B.; ROCHEFORD, T. (2006) Genetic potential for increasing pro-vitamin A content in tropical maize. **Book of Poster Abstracts- 2006 International Plant Breeding Symposium, Honoring John Dudley**. Mexico City, 20-25 August, 2006.

MERTZ, E. T. (1994). Thirty years of opaque-2 maize. In: **Quality protein maize 1964-1994**. B. A. Larkins & E. T. Mertz (Ed). USA: Purdue University Press. p. 1-9.

MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; NELSON, O. E. (1964). Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. **Science**, 145: 279-280.

MILACH, S. (1998). Marcadores Moleculares em Plantas. Porto Alegre: UFRGS, 141p.

MOELLER, S. M.; JACQUES, P. F.; BLUMBERG, J. B. (2000). The potential role of dietary xanthophylls in cararact and age-related macular degeneration. **Journal of the American College of Nutrition**,19: S522-527.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. (2000). Comunicações intercelulares com conexinas: importância na carcinogênese e papel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, 36(1):1-11.

NUTTI, M. R. (2006). Workshop -Trigos Biofortificados e Variedades de Trigo 2005-2006- Embrapa Agroindustria de Alimentos - Programa de Biofortificação de Produtos Agrícolas para Melhor Nutrição Humana - HarvestPlus ABITRIGO, São

Paulo, 6 de abril de 2006. Disponível em: http://www.abitrigo.com.br/ppt/Programa_harvestPlus.ppt. Acessado em: 25/10/2006.

OLSO, J. A. (1999). Carotenoids and human health. **Archives Latinoamericanos de Nutricion**, 49:7s-11s.

PAES, M. C. D.; GUIMARÃES, P. E. O.; SCHAFFERT, R. E. (2006). Perfil de carotenóides em linhagens elite de milho. **26º Congresso Nacional de milho e sorgo**. Inovando para sistemas integrados de produção, 27 a 31 de agosto de 2006. Belo Horizonte, MG. ABMS – 638p

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. (1992). Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. **Methods in Enzymology**, 213: 403-420.

PARVIN, S. G.; SIVAKUMAR, B. (2000). Nutritional status affects intestinal carotene cleavage activity and carotene conversion to vitamin A in rats. **Journal of Nutrition**, 130:573-577.

PATERNIANI, E., CAMPOS, M.S. (1999) Melhoramento do milho. In: Borém, A. (Editor). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV. p.429-485.

RAMALHO, R. A.; ANJOS, L. A.; FLORES, H. (1998). Hipovitaminose A em recém nascidos de duas maternidades públicas no Rio de Janeiro. **Caderno de Saúde Pública**; 14:821-827.

RAMALHO, R. A.; ANJOS, L. A.; FLORES, H. (2000). Estado nutricional de vitamina A e teste terapêutico em pré-escolares no Rio de Janeiro. **Revista de Nutrição PUCCamp**; 14:23-28.

RODRIGUES, M. C. (2000). Heterose e seus componentes em cruzamentos de populações de milho com alta qualidade protéica. Tese de Doutorado. Escola de Agronomia. Goiânia, Goiás. 232 p

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. (2004). **HarvestPlus Handbook for carotenoid analysis**. Washington DC, HarvestPlus 2004, HarvestPlus Technical Monograph series 2.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, **Washington, DC** 20005-5802, **USA**.

RONZELLI Júnior, P. (1996) Melhoramento genético de plantas. Curitiba: P.R.J. 219 p.

SALVADOR, J. R. (1997). Maize. Adaptation of an article originally published in The Encyclopedia of Mexico: History, Culture and Society 1997, Fitzroy Dearborn Publishers. **The Maize Page** Disponível em: <http://maize.agron.iastate.edu/maizearticle.html>. Acessado em: 20/10/2006.

SANTOS, L. M.; DRICOT, J. M.; ASCIUTTI, L. S.; DRICOT-D'ANS, C. (1983). Xerophthalmia in the state of Paraíba, Northeast of Brazil - clinical findings. **American Journal Clinical Nutrition**, 38(1):139-44.

SANTOS, L. M. P.; ASSIS, A. M. O.; MARTINS, M. C.; ARAÚJO, M. P. N.; MORRIS, S. S.; BARRETO, M. L. (1996). Situação nutricional e alimentar de pré-escolares no semi-árido da Bahia (Brasil): II – Hipovitaminose A. **Revista de Saúde Pública**, 30(1):67-74.

SOMMER, A. (1995). Vitamin A deficiency and its consequences: a field guide to detection and control. **Epidemiology**. 3rd ed. Geneva: WHO, 65p.

SOUZA, W. A.; VILAS BOAS, O. M. G. C. (2002). Vitamin A deficiency in Brazil: an overview. **Rev Panam Salud Publica**, vol.12, no.3, p.173-179.

STEVENS, R.; PAUL, C.; ISLAM, S.; WONG, J.; HARJES, C.; BUCKLER, E.; ROCHEFORD, T. (2006). Genetic Approaches to Enhance Provitamins A and Total Carotenoids in Maize Grain **48th ANNUAL MAIZE GENETICS**. Conference asilomar conference grounds pacific grove california, 9 - 12 MARCH 2006 Disponível em: <http://shrimp1.zool.iastate.edu/mm2006/Program.pdf> Acessado em 23/11/2006.

TOSELLO, G. A. (1987). Milhos especiais e seu valor nutritivo, In: **Melhoramento e produção do milho**. Ed. Viegas, G.P.; Paterniane, E.. Campinas: Fundação Cargill, 2ed., v.1, p.375-409.

VASCONCELOS, M.J.L (1995). Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD. Tese (Mestrado em agroquímica) – Minas Gerais: UFV, 54 p.

WEBER, E. J. (1983). Variation in corn (*Zea mays* L.) for fatty acid compositions of triglycerides and phospholipids. **Biochemical Genetics**, 21:1-13.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, 55:353-364.

WELLHAUSEN, E. J., ROBERTS, L.M., HERNANDEZ, X.E. (1952) In: Mangelsdorf, P.C. Races of Maize in Mexico. Cambridge: The Bussey Institute, Harvard University.

WHITE, P. J.; JOHNSON, L. A. (Eds)(2003), Corn Chemistry and Technology By American association of Cereal Chemists, Inc, Published 1987. Book, Second Edition 2005. AACC Press.

WHO (2002) – The world health report: Childhood and maternal undernutrition, Cap. 04. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/chapter4/en/index3.html>. Acesso em 27 de abril de 2006

ANEXO 1

Lista dos genótipos enumerados.

Nº - Genótipos	Nº - Genótipos	Nº - Genótipos
1	540736	50 540878-1
2	540754	51 540880-2
3	540755	52 540893-2
4	540757	53 540899-2
5	570759	54 540903-2
6	540764	55 540941-2
7	540807	56 540942-2
8	540811	57 540948-2
9	540815	58 540962-1
10	540817	59 540986-1
11	540819	60 540995-2
12	540847	61 541016-2
13	540886	62 541028-1
14	540890	63 541034-2
15	540938	64 541051-1
16	540972	65 541052-1
17	540985	66 541055-1
18	540987	67 541057-1
19	540992	68 541069-2
20	540998	69 541070-2
21	541018	70 541072-2
22	541031	71 541093-1
23	541032	72 541112-1
24	541034	73 541116-1
25	541099	74 541117-2
26	541157	75 541119-2
27	541311	76 541120-1
28	541332	77 541133-1
29	541335	78 54114-1
30	540685-1	79 541228-1
31	540700-1	80 541233-2
32	540707-1	81 541234-1
33	540721-1	82 541249-2
34	540723-1	83 541270-2
35	540727-1	84 541272-1
36	540740-1	85 541274-1
37	540760-1	86 541275-1
38	540763-1	87 541276-1
39	540780-1	88 541278-1
40	540800-1	89 541307-1
41	540808-1	90 541312-1
42	540814-1	91 541316-1
43	540818-2	92 541323-1
44	540826-1	93 541325-1
45	540838-1	94 541330-2
46	540843-1	95 541335-1
47	540845-2	96 541337-1
48	540848-1	97 541338-1
49	540874-2	98 541339-1
		99 541343-2
		100 AMARELO DE PE A2
		101 AZTECA IPA
		102 BA 130
		103 BA I CATETO (Rib. Preto) 4496
		104 BR 400 SUPERDOCE
		105 BR 473 cIII
		106 BR São Francisco
		107 BRS 1001
		108 BRS 2020
		109 BRS Caatingueiro
		110 CATETO COLOMBIA
		111 CATETO SAO SIMAO
		112 CATETO SETE LAGOAS
		113 CMS 03 AMARILO CRISTALINO
		114 CMS 101
		115 CMS 102
		116 CMS 104
		117 CMS AMARILLO DEL BAJIO
		118 CMS01 MEZCLA AMARILLA
		119 COMPOSTO RACIAL DENT. AMARELO I
		120 Fundacep 35
		121 GIN I CATETO NORTISTA
		122 MAYA XV
		123 MG II CATETO
		124 Missões
		125 PA 105
		126 PIRA 006
		127 PIRANAO UF 1
		128 PIRAPOCA AMARELO
		129 RS 572
		130 SANTA INES
		131 SC 014
		132 SP 009
		133 UFVM 100
		134 WP2 AMARELO DENT