**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Obtenção e uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro
(*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) afetando a composição de
carotenoides: uma ferramenta para o estudo da nutraceutica**

Stevan Ricardo Bordignon

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2015**

Stevan Ricardo Bordignon
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Obtenção e uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) afetando a composição de carotenoides: uma ferramenta para o estudo da nutracêutica

Orientador:
Prof. Dr. **LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Bordignon, Stevan Ricardo

Obtenção e uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) afetando a composição de carotenoides: uma ferramenta para o estudo da nutracêutica / Stevan Ricardo Bordignon. - - Piracicaba, 2015.
59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Tomate 2. Micro-Tom 3. Carotenoide 4. Cor 5. Colorimetria 6. Licopeno I. Título

CDD 635.642
B729o

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A minha família

Pelo exemplo de vida, amor, apoio e confiança.

Dedico

A minha avó Dolores,

Pelas palavras certas nas horas mais incertas.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Maria e meu irmão Felipe pelo convívio familiar, amizade, alicerce e ajuda ao longo da vida, sempre me incentivando a não desistir de completar cada passo de minha jornada. Em especial a minha mãe, por sempre me puxar a orelha quando era preciso, e que sempre me amou incondicionalmente, sempre luto, à minha maneira, para ser seu orgulho. A minha avó Dolores, por sempre buscar o bem comum.

Aos meus familiares e amigos que me incentivaram e me apoiaram na minha trajetória até aqui.

A minha namorada, amiga e companheira Carla, que sempre esteve ao meu lado com muito carinho e compreensão, te amo muito!

À ESALQ por ser por tanto tempo minha segunda casa e sempre nunca perderá a importância que tem em minha vida. A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres pela oportunidade de trabalho e confiança em mim depositada.

Aos professores do programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ, Beatriz Appezzato-da-Glória, Daniel Scherer de Moura pelo conhecimento e postura profissionais transmitidas. Ao Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge e sua equipe por auxiliar em análises deste trabalho.

Em especial, agradeço à Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimoto, por todo seu apoio infraestrutural, ideológico, disposição e não menos importante simpatia. Estendo também, à sua técnica, Lucia Helena Justino da Silva, pela amizade, ajuda e bom humor, que muito me inspirou com sua história de vida, e com a sinceridade em tudo que faz.

Aos que me acolheram em seu lar paulistano, Eric, Victor, os tenho em grande consideração. Não me esquecendo da Samira, Bruna, Gabriela, Mariana, Ana Marla e Elias.

A Solizete pela ajuda com prazos e burocracias necessárias, trabalhando para ajudar a todos. Ao Vitti pela organização da Casa de Vegetação. A Cássia, que

sempre encontrou meios para me auxiliar e aconselhar da melhor forma possível, meu MUITO OBRIGADO.

A todos com quem trabalhei no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal: Ivan, Lucas, Lilian, Agustín, Cássia, Alice, Frederico, Mariana, Maísa, Ariadne, Marcela, João Pedro, Eloísa, Gabriel (Zorro), Jonata, Mateus e Guilherme (conhecido como Ninfim). Ao Geraldo, Éder, João, Airton, Antoine pela troca de idéias, experiências e cafés. Ressaltando a amizade de Ninfim, Marcela, Eloisa, Maísa, Mateus, João e Fred, vou sentir saudades de vê-los todo dia, de manhã... de bom humor... Oh! Que alegria contagiante! Todos vocês ajudaram de alguma forma na minha formação e na realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Gustavo, Rafael, Thiago, Guilherme, Felipe, Lucas, Tomaz, Mateus e Otávio (Bigato), por dividir um teto, uma pia cheia de louça, as contas, as histórias da Dona Elza, a Dona Mônica, o doguinho Negão, a pizza sequinha e crocante, a TV... enfim, por sermos uma família muito estranha.

MUITO OBRIGADO!

“O pessimista se queixa do vento;
O otimista espera que ele mude;
O realista ajusta as velas”.

William George Ward

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Engenharia metabólica e nutracêutica	17
2.2	Carotenoides.....	18
2.3	Genética do Valor Nutricional do Tomateiro	20
2.4	Micro-Tom como modelo genético e fisiológico	21
3	OBJETIVO	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Material vegetal.....	25
4.2	Obtenção dos genótipos	26
4.3	Condições de cultivo	27
4.4	Peso e teor de sólidos solúveis.....	27
4.5	Acidez titulável	27
4.6	Colorimetria.....	28
4.7	Extração de carotenoides	28
4.8	Quantificação de carotenoides.....	29
4.9	Teste de biodisponibilidade.....	29
4.10	Análises estatísticas.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Obtenção de genótipos	33
5.2	Quantificação de carotenoides.....	34
5.3	Colorimetria.....	35
5.4	Peso, teor de sólidos solúveis e acidez	41
5.5	Teste de biodisponibilidade.....	42
6	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXO.....	57

RESUMO

Obtenção e uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro (*solanum lycopersicum* L. cv micro-tom) afetando a composição de carotenoides: uma ferramenta para o estudo da nutraceutica

A incidência de doenças crônicas atinge índices epidêmicos, sendo responsável por mais de 60% da mortalidade mundial. Medidas preventivas são adotadas e, entre elas, uma alimentação balanceada. Nesta inclui-se o consumo de frutos e vegetais, especialmente os de coloração vermelha e laranja, ricos em carotenoides, fitonutrientes que muitas vezes assumem papel de antioxidantes, prevenindo a incidência destas doenças. No presente trabalho foram obtidas linhagens quase isogênicas (NILs) de tomateiro contendo os alelos *at*, *B*, *Del*, *gf*, *og*, *r*, *t* e *y*, os quais afetam a composição de carotenoides. Tais linhagens constituem uma importante ferramenta para estudos de nutraceutica, como os testes de biodisponibilidade de diferentes tipos de carotenoides no plasma sanguíneo, após ingestão, o que foi testado no presente trabalho através do emprego de HPLC e ratos da linhagem Wistar. Além disso, frente às diferentes ofertas de cores e composições metabólicas de tomates disponíveis no mercado, as NILs permitiram o ajuste de parâmetros de colorimetria como um método rápido para identificar os principais mutantes da via de biossíntese de carotenoides presentes em linhagens comerciais. Ressalta-se que, muitas vezes as cores podem enganar e não trazer vantagens nutricionais, como é o caso do consumo de linhagens comerciais contendo a mutação *yellow flesh* (*r*). Por fim, as NILs foram utilizadas para verificar se as mutações alterando a composição de carotenoides possuíam alguma penalidade em termos de produtividade ou outros parâmetros de qualidade de fruto (Teor de Sólidos Solúveis, acidez). Os resultados mostraram-se de aplicabilidade e geraram um banco de dados passível de expansão, para novos mutantes que alterem a cor do tomate e fazendo uso de outros *backgrounds*. Tais dados podem ser usados tanto para programas de melhoramento visando a qualidade nutricional, quanto para o comércio atacado, beneficiando o consumidor final.

Palavras-chave: Tomate; Micro-Tom; Carotenoide; Cor; Colorimetria; Licopeno

ABSTRACT

Obtainment and application of tomato (*solanum lycopersicum* L. cv micro-tom) near isogenic lines affecting carotenoid content: a nutraceutical study tool

The incidence of chronic disease reaches epidemic levels, accounting for over 60% of global mortality. Preventive measures are adopted, and among them, a balanced diet. This includes the fruits and vegetables consumption, especially the red and orange ones, rich in carotenoids, phytonutrients which often assumes the role of antioxidants preventing these diseases incidence. In this study, tomato near isogenic lines (NILS) containing the alleles *B*, *Del*, *gf*, *og*, *r*, *t* and *y*, were obtained, affecting the carotenoid fruit content. Such lines are an important tool for nutraceutical studies, like different carotenoids bioavailability tests in blood plasma after ingestion, which was tested in this work by HPLC employment and Wistar rats. Moreover, in the face of different colors and metabolic contents offerings of tomatoes available at the market, NILs allowed the adjustment of colorimetric parameters as a fast way to identify carotenoids biosynthetic pathway key mutants present in commercial strains. It is highlighted that many times colors can mislead and not bring nutritional benefits, like the consumption of commercial strains containing the mutation *yellow flesh* (*r*). At the end, NILs were used to verify if the carotenoid content mutations had some penalty in terms of productivity or other fruit quality parameters (Soluble Solids Content, acidity). The results showed relevant and generated a database capable of expansion to new fruit color tomato mutants even in other genetic backgrounds. Such data can be used both for nutritional quality breeding programs, both for the wholesale trade, benefiting the end user.

Keywords: Tomato; Micro-Tom; Carotenoid; Color; Colorimetry; Lycopene

1 INTRODUÇÃO

No Período Paleolítico (2,5 milhões – 10000 a.C.) os hominídeos praticavam uma dieta baseada em caça e coleta, com escassez de alimentos. Com o advento da agricultura na Revolução Neolítica, os humanos foram capazes de deixar a vida nômade. Desde então, e principalmente após a Revolução Industrial, a dieta humana sofreu uma cascata de alterações, sendo modificada para um tipo diferente daquele para o qual o seu metabolismo evoluiu durante o Paleolítico. A incompatibilidade entre o tipo de dieta atual e o metabolismo humano pode ser uma das causas de muitas doenças crônicas, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, os quais estão associados com obesidade e síndromes metabólicas (MARTIN et al., 2013).

A incidência de doenças crônicas alcança índices epidêmicos, sendo responsáveis por mais de 60% da mortalidade mundial, atingindo pessoas de todas as idades, nacionalidades e classes sociais (DAAR; RAO, 2007). Com isso, aumenta-se a necessidade de evitar que esse índice cresça. Visando tal feito, medidas de saúde são adotadas globalmente, como o combate ao tabagismo, incentivo a prática de atividades físicas e alimentação balanceada.

A alimentação balanceada proposta tem grande semelhança com a dieta paleolítica, onde os caçadores-coletores consumiam carnes magras de animais selvagens e peixes, juntamente com relevante consumo de vegetais folhosos e frutas (MARTIN et al., 2013). Tendo como exemplo o documento norte-americano *Dietary Guidelines for Americans* (U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2010), recomenda-se aumentar o consumo e a diversidade de frutas e vegetais, especialmente os de coloração vermelha e laranja. Tais pigmentações também dizem respeito aos carotenoides que, além de conferirem cor aos órgãos vegetais, desempenham papel de fitonutriente. Desse modo, quando ingeridos, os carotenoides podem apresentar caráter antioxidante, combatendo e/ou prevenindo a formação de radicais livres, os principais determinantes de patologias crônicas e envelhecimento precoce (DE WAART et al., 2001; HOZAWA et al., 2007; AGARWAL; RAO, 2000).

O fruto do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é um dos vegetais mais consumidos no mundo (CROZIER, 1997). O tomate goza o privilégio de ser largamente empregado tanto em alimentação balanceada, em forma de fruto fresco e molhos, quanto em *fast food*, consumido principalmente como ketchup, um alimento ultraprocessado. O fruto apresenta elevados teores de vitamina C, licopeno e β -caroteno entre outros carotenoides, em menores concentrações. Em decorrência de poucos alimentos serem fontes de licopeno na dieta humana, é reforçada a importância do consumo do tomate no fornecimento deste e outros fitonutrientes.

Um mercado em crescimento é o uso de tomates “coloridos” no segmento *gourmet*. A diversidade de cores que o fruto pode apresentar, como o amarelo, laranja e roxo chama atenção do consumidor que a associa a opções para enriquecer sua alimentação. Entretanto, com a mudança da cor, tanto pode se estar ganhando novos fitonutrientes, quanto deixando de escolher frutos mais vantajosos para a saúde. Neste trabalho, foram criadas oito linhagens quase isogênicas (NILs)

em tomateiro *cv.* Micro-Tom contendo variações alélicas que alteram a cor e o valor nutricional tanto positivamente quanto negativamente.

Tais linhagens se mostraram úteis para o cumprimento de três objetivos principais: i) O estudo do impacto de cada variação alélica em parâmetros de qualidade de frutos (Peso, Brix e acidez); ii) O ajuste de um método colorimétrico simples e rápido para se inferir o tipo de mutação utilizada em linhagens comerciais e seu impacto no valor nutricional destas; iii) O estudo do impacto de cada variação alélica utilizada em programas de melhoramento na biodisponibilidade de carotenoides no plasma sanguíneo após ingestão. Esse último objetivo é aqui apresentado como um estudo preliminar utilizando HPLC e ratos da linhagem Wistar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia metabólica e nutracêutica

A engenharia metabólica, termo cunhado por Bailey (1991), consiste em “melhoramento da produção, formação, ou propriedades celulares através da modificação de reações bioquímicas específicas ou da introdução de novas reações com o uso da tecnologia de DNA recombinante” (DUDAREVA; DELLAPENNA, 2013). Essa ciência sofre grande demanda e urgência, pois enfrenta questões que o acelerado aumento da população mundial acarreta, como a demanda por alimentos e energia frente ao esgotamento dos combustíveis fósseis e à potencial queda de produtividade causada pelas mudanças climáticas (DUDAREVA; DELLAPENNA, 2013). Para todas as finalidades, a base para a engenharia metabólica são as ômicas, pois sem o conhecimento de genes de interesse, dos fatores de transcrição, mapeamento de QTLs, das interações enzimáticas e proteicas, entre outras descobertas, essa ciência não é desenvolvida.

Segundo Martin (2013), fitonutrientes são compostos não essenciais provindos de alimentos vegetais que desempenham funções benéficas na prevenção e tratamento de doenças. O consumo diário desse grupo é muito importante para a prevenção e tratamento de doenças crônicas. Porém, como a autora ressalta, são necessários cada vez maiores avanços na pesquisa básica dos fitonutrientes, para que sustentem o *design* de alimentos saudáveis, biofortificados, tanto para países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento. É o que ocorre ao redor do mundo, para diversas culturas, como o arroz (KIEKENS et al., 2015), milho (OWENS et al., 2014), mandioca (BERNI et al., 2014), tomate (DE LA GARZA et al., 2007), entre outros.

Um dos maiores exemplos de alimento biofortificado para medicina preventiva foi o arroz Golden Rice que, através da transformação genética com genes de outros organismos, promove a biossíntese de β -caroteno no endosperma, resultando no acúmulo de 2 μg de provitamina A por grama de cereal (YE et al., 2000). O primeiro passo estava dado, pois mesmo tendo sucesso na biofortificação, a concentração do carotenoide ainda era abaixo do necessário (levando em consideração a porção diária) para que remediasse as patologias causadas pela falta de vitamina A. Foi então que Paine et al. (2005) chegaram ao Golden Rice 2 (GR2) com o uso da fitoeno sintase do milho, mais eficiente e gergalo para a excelência do sistema de seu predecessor, que resultou na concentração de até 37 μg de carotenoides (preferencialmente β -caroteno) por grama, ou seja, uma concentração 23 vezes maior que o Golden Rice. Já foi comprovada a eficácia do GR2 no combate às doenças causadas pela escassez de vitamina A, sendo considerada a primeira cultura especificamente desenvolvida para remediar a malnutrição, atingindo remotas populações rurais que não têm acesso a programas de suplementação (HEFFERON, 2015).

Outro modelo de biofortificação ocorreu em Butelli et al. (2008), que fez uso do tomate, um fruto largamente consumido no mundo durante todo o ano, quando criaram transgênicos com os genes *Delila* (*Del*) e *Rosea1* (*Ros1*) de *Antirrhinum majus* (boca-de-leão), integrantes da via de biossíntese de antocianinas. A

expressão desses genes guiadas por um promotor específico de fruto (E8) resultou em frutos com altas concentrações destes compostos na polpa e na casca, em valores semelhantes a amoras e mirtilos. Nesse mesmo trabalho, os pesquisadores avaliaram o efeito desse alimento em ratos propensos a desenvolver câncer e relataram um aumento de 30% na expectativa de vida. Atualmente esses tomates passam pelo processo de aprovação nos EUA, fazem parte de uma pesquisa com cardíacos no Reino Unido e espera-se que tenham uma linha de molhos (HEFFERON, 2015). O tomateiro é capaz de produzir antocianinas nos seus tecidos vegetativos, o que não ocorre naturalmente nos frutos, que acumulam certos tipos de flavonoides e flavonóis, intermediários na síntese de antocianinas (GONZALI et al., 2009). Espécies selvagens próximas ao tomateiro cultivado apresentam acúmulo de antocianinas nos frutos, especificamente na casca e de modo dependente de uma resposta a estresse luminoso. Fazendo uso dos alelos *Aft* de *Solanum chilense* e *atv* de *S. cheesmaniae*, além de uma mutação, *hp2*, que intensifica a resposta à luz, Sestari et al. (2014) criaram tomates roxos não transgênicos. A piramidação dos três alelos aumentou a concentração de antocianinas a níveis bem superiores aos anteriormente conseguidos por Mes et al. (2008) e Sapir et al. (2008). Além disso, Sestari et al. (2014) tomaram vantagem do uso de linhagens quase isogênicas (NILs) em um mesmo *background* genético (cv. Micro-Tom), o que facilitou os estudos comparativos e a escolha da melhor combinação alélica a ser piramidada para aumentar o teor de antocianinas. .

Deste modo, a engenharia metabólica é uma ferramenta muito útil para a nutracêutica (ciência que estuda a relação entre alimentação e saúde), oferecendo meios para desenvolvimento de estudos sobre os fitonutrientes. Especificamente falando, o processo de introgressão e criação de NILs, empregado em Sestari et al. (2014) e neste trabalho, oferece cinco significantes oportunidades, segundo Martin (2013):

1. Avaliar o efeito de diferentes fitonutrientes consumidos em uma matriz alimentar comum no início e progressão de doenças.
2. Estudar mecanismos de ação de fitonutrientes específicos sob determinadas condições fisiológicas livres de complicações advindas de diferenças na matriz alimentar.
3. Estudar interações sinérgicas entre diferentes fitonutrientes no início e progressão de doenças específicas através de cruzamento de linhagens da mesma cultura enriquecidas com fitonutrientes diferentes.
4. Estudar o impacto da matriz na eficácia de qualquer fitonutriente na saúde, comparando o consumo desses com certo alimento, purificado ou em outro contexto alimentar.
5. Usar esses mesmos alimentos, com propriedades benéficas em ensaios pré-clínicos, em estudos com humanos.

2.2 Carotenoides

Principais metabólitos secundários no fruto do tomateiro, os carotenoides são hidrocarbonetos pertencentes ao grupo de isoprenoides e são constituídos por 40 carbonos, ou seja, oito unidades de isoprenos (C₅). São característicos por garantirem as cores amarela, laranja ou vermelha aos vegetais e desempenham papéis essenciais na fotossíntese – captação de luz e fotoproteção (RONEN, 1999).

A cadeia dos carotenoides apresenta até quinze duplas ligações, responsáveis por suas propriedades fotoquímicas. As insaturações permitem a isomeria *cis-trans* das moléculas; sendo que em plantas superiores ocorre a predominância dos isômeros *trans* (ISAACSON, 2002).

Os carotenoides são lipofílicos e atualmente já foram isolados e caracterizados cerca de 600, dos quais aproximadamente 10% cumprem função notável na nutrição animal por sua atividade como provitamina A (YEUM; RUSSELL, 2002). Por atuarem como antioxidantes, garantem às células animais proteção química contra os efeitos danosos do stress oxidativo, ajudando na prevenção de cânceres e doenças crônicas, como as cardíacas (JEZ; NOEL, 2000). O licopeno e o β -caroteno, os carotenoides mais comuns no tomate, sendo os principais benfeitores ao ser humano, atuam contra a oxidação do colesterol LDL, diminuindo o risco de acidente vascular cerebral. Esses carotenoides inibem a apoptose e o ciclo celular, interferindo na regulação da dinâmica celular, sendo isso benéfico contra alguns tipos de câncer. Além disso, também ajustam a produção de mediadores inflamatórios (AGARWAL, 2000; MARTIN, 2013).

Nas plantas, os carotenoides são produzidos nos plastídeos pela via biossintética dos isoprenoides (Figura 1). O primeiro passo é realizado pela enzima FITOENO SINTASE (PSY) ao condensar duas moléculas de geranilgeranil difosfato, um isoprenoide de 20 carbonos, em fitoeno (C_{40}) (JEZ; NOEL, 2000). Quatro duplas ligações são introduzidas na molécula de fitoeno pelas enzimas FITOENO DESATURASE (PDS) e ζ -CAROTENO DESATURASE (ZDS). Os compostos intermediários nessa etapa da via contêm isomeria de posição, sendo isômeros *cis*, onde duas enzimas específicas, a ζ -CAROTENO ISOMERASE (ZISO) e a CAROTENOIDE *cis-trans* ISOMERASE (CRTISO), são responsáveis pela produção e isomerização do tetra-*cis*-licopeno (prolicopeno) em *trans*-licopeno, respectivamente. A partir do licopeno, a via pode tomar dois rumos, sofrendo efeito das licopeno ciclases (Lcy). No tomateiro, existem duas classes de Lcy-b, que gera íons anéis tipo β ; e a Lcy-e que gera íons anéis tipo ϵ (MOISE et al., 2014). Quando o licopeno sofre ação da Lcy-e origina o δ -caroteno que pela ação de uma Lcy-b resulta em α -caroteno, precursor da luteína. Paralelamente, o primeiro licopeno a passar pela Lcy-b acarreta no γ -caroteno, que com o subsequente produz o β -caroteno, precursor das xantofilas (KACHANOVSKY, 2012; MOISE et al., 2014). O uso da engenharia metabólica e suas ferramentas permitem a exploração do potencial combinatório interespecífico para a seletividade de substratos e produtos em vias metabólicas, inclusive na escolha da própria via (JEZ; NOEL, 2000).

Figura 1 – Via biossintética de carotenoides. Em verde, as enzimas participantes do ciclo, em azul as mutações em aumento da atividade e em vermelho as de inibição da atividade

2.3 Genética do Valor Nutricional do Tomateiro

A gama de cores que o fruto do tomateiro pode apresentar se deve, em grande parte, a mutações em enzimas da via biossintética dos carotenoides, que faz com que a composição nutricional seja específica para cada genótipo (PARAN; VAN DER KNAAP, 2007). Enquanto o fruto amadurece, os cloroplastos são convertidos em cromoplastos, dando lugar à coloração vermelha, no caso dos frutos que acumulam licopeno (PARAN; VAN DER KNAAP, 2007). Atualmente em tomateiro são conhecidos alguns mutantes em perdas de função e também em aumento de atividade das enzimas da carotenogênese (Figura 1 e Tabela 1).

O locus *yellow flesh* (*R*) é responsável por codificar a enzima FITOENO SINTASE 1, a qual é específica de frutos (PSY1). O alelo *r* garante à planta homozigota um fruto amarelo resultado de baixas concentrações de carotenoides amarelos como a luteína e da presença de flavonoides encontrados na casca (PARAN; VAN DER KNAAP, 2007). Fray e Grierson (1993) descreveram a mutação *r* como sendo o resultado da geração de uma proteína truncada incapaz de converter o geranilgeranil difosfato em fitoeno. No entanto, hoje não se sabe ao

certo, e foi proposto que a mutação causa um decréscimo na expressão de PSY1 por uma alteração no elemento transcricional tipo *cis* ou fator epigenético (MOISE et al., 2014).

A mutação *tangerine* (*t*) abole a expressão do gene responsável pela enzima CAROTENOIDE *cis-trans* ISOMERASE (CRTISO), sendo incapaz da isomerização do tetra-*cis*-licopeno em *trans*-licopeno, levando ao seu acúmulo junto a outros carotenoides, conferindo à linhagem frutos laranja brilhante (ISAACSON et al., 2002). Estudos comprovaram a existência de um mecanismo epistático entre *tangerine* e *yellow flesh* o qual, na falta da enzima do primeiro, acarreta no acúmulo de compostos *cis* e promove a suprarregulação da expressão de PSY1 (KACHANOVSKY, 2012; MOISE et al., 2014).

Ao contrário das anteriores, a mutação do *Delta carotene* (*Del*) é dominante e promove a expressão do gene que codifica a enzima LICOPENO ϵ -CICLASE (*Lcy-e*), favorecendo a conversão do *trans*-licopeno em δ -caroteno (RONEN, 1999). Variações no nível de expressão do *Lcy-e* são correlacionadas com alterações no fluxo de carbono para carotenoides contendo tanto β - quanto ϵ -anéis. Sendo assim, essa enzima é o maior alvo para programas de biofortificação de culturas em provitamina A (HARJES et al., 2008; MOISE et al., 2014).

A enzima tipo *Lcy-b*, *CycB* é responsável por dois fenótipos contrastantes no fruto, especificamente. Quando presente o alelo dominante *Beta* (*B*), há conversão de quase todo o licopeno em β -caroteno, resultando em um fruto laranja, contendo de 5 a 10 vezes mais β -caroteno que o normal. O contrário ocorre na presença dos alelos recessivos *old-gold* (*og*) e *crimson* (*og^c*), que causam mau funcionamento no catalisador e promovem o acúmulo de licopeno acima dos níveis esperados e baixas concentrações de β -caroteno, resultando em um tomate vermelho intenso (RONEN et al., 2000; PARAN; VAN DER KNAAP, 2007).

Há três outras mutações, utilizadas no presente trabalho, que não fazem parte da via de biossíntese de carotenoides diretamente, embora provoquem intensa alteração na coloração do fruto e de suas qualidades organolépticas. O mutante *green flesh* (*gf*) é responsável por inibir a degradação de clorofila, levando a frutos com traços de coloração marrom devido ao acúmulo conjunto de carotenoides e clorofilas; esse gene é homólogo ao STAY-GREEN (SGR) de arroz e ao *chlorophyll retainer* (*cl*) de pimenta (BARRY et al., 2008). A segunda mutação produz um fruto róseo, o que se deve à falta de pigmentação (flavonoides) na epiderme deste órgão, deixando a epiderme semitransparente. Esse efeito decorre do mutante *colorless fruit epidermis* (*y*), que afeta o gene regulatório *SIMYB12* (ADATO et al., 2009). O último mutante abordado é o *apricot* (*at*), ainda não bem caracterizado. Essa mutação está envolvida com outras vias além da carotenogênese, como a do ácido ascórbico e do fenilpropanoide, que leva ao aumento da produção de narigenina chalcona (MCQUINN et al., 2010).

2.4 Micro-Tom como modelo genético e fisiológico

Atualmente, a planta mais utilizada como modelo genético é *Arabidopsis thaliana*. Muito se conhece sobre sua genética e desenvolvimento e ainda há muito a ser explorado. Porém, esse conhecimento não pode ser generalizado integralmente

para todas as outras espécies vegetais, principalmente quando se trata de seu fruto seco, que não pode ser considerado modelo de estudo de frutos carnosos (MEISSNER et al., 1997). Além da falta de frutos climatéricos e carnosos, a ausência de folhas compostas e tricomas multicelulares em *Arabidopsis* evidencia a necessidade de modelos vegetais alternativos para o estudo desses e outros eventos do desenvolvimento (CAMPOS et al., 2010).

O tomateiro, além de ser uma espécie cosmopolita, presente nas mesas ao redor do mundo, possui conveniências que preenchem as desvantagens do emprego de *Arabidopsis* e garante seu uso como espécie modelo em genética clássica e molecular. Sendo uma espécie diplóide simples e autógama, *Solanum lycopersicum* integra um vasto germoplasma com espécies selvagens intercruzáveis. Além disso, o tomateiro é uma espécie de fácil cultivo em casa de vegetação ou fitotrons, sendo passível de cultivo de células e tecidos *in vitro*, técnicas também empregadas, entre outras coisas, para sua transformação genética.

Micro-Tom é uma cultivar de pequeno porte desenvolvida para fins ornamentais que, posteriormente, foi reconhecida e atualmente é utilizada como modelo genético. O emprego desta possibilita agilidade na descoberta e seleção de mutações devido ao porte diminuto – sendo permissível o cultivo em alta densidade, admitindo utilização simplificada de infraestrutura; e ao rápido ciclo de vida, o que leva aproximadamente dois anos para a introgressão de mutações e consequente obtenção de linhagens quase isogênicas (CAMPOS et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). Uma vez que estas linhagens sejam obtidas, elas podem integrar pesquisas em ambientes controlados com grande número de repetições.

Um exemplo da aplicabilidade das linhagens quase isogênicas, o qual extrapola o cunho da fisiologia e bioquímica vegetal, são os denominados “alimentos isogênicos” (*isogenic foods*), uma ferramenta para estudos nutracêuticos. Os frutos de uma linhagem se diferenciam dos de outra isolinha o mínimo possível além dos fitonutrientes característicos e objetos do estudo (MARTIN et al., 2011), ou seja, uma mesma matriz alimentar para diferentes fitonutrientes. Esse fato garante a diminuição na complexidade da relação entre dieta e saúde, e a melhor avaliação do efeito de um fitonutriente sobre doenças (MARTIN et al., 2011). Cabe ressaltar que esse nível de controle não pode ser substituído pelo uso de dietas com fitonutrientes purificados, já que a matriz alimentar é um fator crucial na atuação do composto ingerido (MARTIN, 2013).

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo criar uma coleção de linhagens quase isogênicas carregando mutações que alteram a coloração do fruto de tomateiro, especialmente na via de carotenogênese bem como propor o uso de tais linhagens para estudos de nutraceutica e na assistência a programas de melhoramento visando a qualidade nutricional. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Término da introgressão de todos os mutantes no mesmo *background* genético (cultivar Micro-Tom);
- Mensuração dos níveis de carotenoides nos frutos das principais linhagens;
- Caracterizar o impacto da mutações em parâmetros de produtividade utilizando as linhagens quase isogênicas
- Mensuração colorimétrica em diferentes regiões do fruto como um método de caracterização rápida da presença de cada mutação;
- Testar a biodisponibilidade dos isômeros de licopeno em roedores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Os genótipos utilizados nesse trabalho foram introgrididos na cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Mutações no *background* genético Micro-Tom utilizadas neste trabalho

Genótipo	Cromossomo	Descrição Fenotípica/Função gênica	Referência
<i>apricot (at)</i>	5	Corola pálida e polpa do fruto amarelada. Função gênica desconhecida.	JENKINS, J A et al. (1955)
<i>Beta carotene (B)</i>	6	Aumento de β -caroteno nos frutos. Aumento de atividade da β -ciclase (CycB, Solyc06g074240)	RONEN, G et al. (2000)
<i>colorless fruit epidermis (y)</i>	1	Níveis reduzidos de flavonoides na epiderme do fruto. Aumento de atividade do fator de transcrição SIMYB12 (Solyc01g079620)	ADATO, A et al. (2009)
<i>Delta carotene (Del)</i>	12	Aumento de δ -caroteno nos frutos. Aumento de atividade da ϵ -ciclase (Lyc-e, Solyc12g008980)	RONEN, G et al. (1999)
<i>green flesh (gf)</i>	8	Retenção de clorofila na placenta do fruto maduro. Perda de função de proteína do tipo STAY-GREEN (SGR, Solyc08g080090)	BARRY, C S et al. (2008)
<i>old gold (og)</i>	6	Aumento de licopeno nos frutos. Perda de função da β -ciclase (CycB, Solyc06g074240)	RONEN, G et al. (2000)
<i>tangerine (t)</i>	10	Acúmulo de ζ -caroteno e tetra- <i>cis</i> -licopeno nos frutos. Perda da função da carotenoide isomerase (CrtISO, Solyc10g081650)	ISAACSON, T et al. (2002)
<i>yellow flesh (r)</i>	3	Ausência de carotenoides, deixando evidente os flavonoides da casca. Perda de função da fitoeno sintase (PSY1, Solyc03g031860)	FRAY, R & GRIERSON, D (1993)

4.2 Obtenção dos genótipos

A introgressão dos genes de interesse em cultivar MT consiste em cruzamentos e retrocruzamentos. Ao longo do processo, é retirado o pólen de plantas que apresentam o fenótipo para ser usado para polinizar flores emasculadas de MT (Figura 2). O primeiro cruzamento ocorre entre o parental portador do gene de interesse e a cultivar MT, produzindo sementes F_1 . Após ocorrer autofecundação dessa geração e obtenção da prole F_2 , dá-se a primeira seleção tanto para o porte miniatura, característico de MT, quanto para a característica em introgressão. No decorrer do procedimento, são feitos retrocruzamentos com MT ao culminar do sexto retrocruzamento (BC_6), mantendo a alternância com autofecundações, garantindo a visualização e seleção de mutações recessivas. A geração BC_6F_2 é considerada isolinha de MT, pois apresenta aproximadamente 99,22% do *background* genético dessa cultivar (calculado por STAM, C. et al., 1981), permitindo a redução de ruídos em experimentos comparando o efeito dos genes introgrididos.

Figura 2 – Processo de introgressão da mutação *yellow flesh* na cultivar MT. A primeira coluna corresponde ao tempo aproximado, em meses, para atingir cada geração (segunda coluna). MT foi utilizado como receptor de pólen em todos os cruzamentos. A geração BC_6F_2 é considerada quase isogênica à MT. Na última coluna é demonstrada a proporção teórica do genoma de MT a cada retrocruzamento. Adaptado de SESTARI, I et al. (2014)

Os genótipos MT-*gf*, MT-*at*, MT-*og* e MT-*r* foram introgrididos ao longo do trabalho e os outros materiais já se encontravam previamente introgrididos. Todas as plantas e frutos utilizados nos experimentos provêm de gerações BC₆F_n, ou seja, descendentes da geração BC₆F₂ por uma ou mais autofecundações (F_n).

4.3 Condições de cultivo

As plantas utilizadas foram cultivadas na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ – USP) em Piracicaba – SP, Brasil. Esta provê de sistema de irrigação automático, temperatura média anual de 28°C, fotoperíodo de 11h/ 13h (inverno/ verão) e exposição de 250-350 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A germinação das sementes foi realizada com cerca de 25 sementes em vaso plástico de 350 mL contendo mistura preparada para semeadura, a qual consiste de substrato comercial Basaplant[®] (Base Agro, Artur Nogueira – SP, Brasil) e vermiculita expandida média em proporção 1:1, suplementado com 1 g L⁻¹ de NPK 10:10:10 e 4 g L⁻¹ de calcário. Com o desenvolvimento das plântulas (15 dias após semeadura), estas foram transplantadas individualmente para vasos com 250 mL de capacidade, contendo a mistura 1:1 de substrato comercial e vermiculita, porém adubado com 8 g L⁻¹ de NPK 10:10:10 e 4 g L⁻¹ de calcário. Nos períodos de início do florescimento e frutificação, foi realizada adubação foliar com fertilizante comercial Peters professional[®] 20-20-20 (The Scotts Company, Marysville, OH, Estados Unidos da América) 2 g L⁻¹; além de adubação de cobertura de 0,5 g de NPK 10:10:10 por vaso.

4.4 Peso e teor de sólidos solúveis

Os frutos foram pesados em balança analítica. A mensuração de sólidos solúveis foi realizada em refratômetro digital ATAGO PR-101 α (brix 0-45%, com correção automática de temperatura), a partir do suco de frutos maduros. A média de Brix do genótipo foi obtida de 15 frutos, sendo cada qual uma repetição.

4.5 Acidez titulável

Foram utilizados sucos de tomates maduros para determinação da acidez. O procedimento seguiu as especificações descritas por Sadler e Murphy (2010), com auxílio de balança analítica e pHmetro (Lab1000, mPA 210, Brasil) previamente calibrado com soluções de pH 4 e 7. Constituíram quatro repetições por genótipo, nas quais 5 g do suco integraram cada uma. Utilizou-se solução 0,1N de NaOH no processo. O cálculo da acidez se deu pela fórmula:

$$Acidez = \frac{V \times fs \times fa \times 100}{p \times c}$$

na qual:

V= volume gasto de NaOH para titulação (mL)

fs= fator de correção da solução de NaOH (padronização)

fa= fator de correção do ácido cítrico (0,064)

p= peso da amostra (g)

c= fator de correção do NaOH (10 para NaOH 0,1M)

4.6 Colorimetria

Os parâmetros de cor dos genótipos foram mensurados com um colorímetro Minolta CR-400 com iluminante D65 (Konica Minolta, New Jersey), no espaço de cor CIE 1976 ($L^*a^*b^*$). Foram analisadas as regiões do epicarpo, polpa (envolvendo o meso e endocarpo, placenta e sementes) e a área externa de 20 frutos totalmente maduros com mesma idade para cada genótipo.

Os parâmetros coletados são: i) L^* , que corresponde diretamente à luminosidade, variando de preto=0 a branco=100. Esse parâmetro mede a participação da luz na composição da cor; ii) a^* e b^* que indicam as coordenadas para da cor, onde valores negativos de a^* referem-se à verde e positivos à vermelho. Valores negativos de b^* ao azul, e positivos ao amarelo (MCGUIRE, 1992). As coordenadas a^* e b^* são base para o cálculo de duas características das cores, a saturação (em inglês, *Chroma*) e o matiz (*hue*, em inglês). A saturação é a pureza ou intensidade da cor, sendo calculada por $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$. O matiz ou tom caracteriza a cor propriamente dita, sendo calculado por arco-tangente de a^*/b^* , expressa em graus, os quais 0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde e 270° = azul (MCGUIRE, 1992; MIKULIC-PETKOVSEK et al. 2015).

4.7 Extração de carotenoides

Para realizar a extração dos carotenoides dos frutos, foi adaptado protocolo descrito em literatura (RODRIGUEZ et al., 1976; ALMEIDA; PENTEADO, 1988; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005 e OLIVEIRA, 2009). Seu processo consiste em utilizar aproximadamente 0,2 g de amostra liofilizada e triturada, em tubo de ensaio junto à 8 mL de acetona fria homogeneizadas com auxílio de agitador mecânico (Turrax) por cerca de 1 minuto. A solução é filtrada a vácuo em filtro de papel e o processo é repetido mais duas vezes ou até que o filtrado fique incolor. A solução filtrada é transferida para um balão de separação de 500 mL e são adicionados, delicadamente, 10 mL de éter de petróleo. Lava-se com porção generosa de água destilada (± 40 mL) adicionada pela parede do funil de separação a fim de se evitar a formação de emulsão. Após separação das fases, recolher a porção aquosa (inferior) em erlenmeyer. O éter de petróleo é lavado mais três vezes com água e, após cada lavagem, a fase aquosa contendo água e acetona é recolhida e

descartada. A fase orgânica é recolhida em erlenmeyer de 125 mL e filtrada com auxílio de funil de separação simples. Este contendo algodão com aproximadamente 2 g de sulfato de sódio anidro para completa remoção da água. A solução é então transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL adaptável a rota-evaporador no qual é evaporada sob vácuo à temperatura de 30°C até resíduo. O resíduo é totalmente evaporado com nitrogênio. A solução de carotenoides totais é resuspensa em 1 mL de MTBE (éter-metil-terc-butílico) grau HPLC e recolhida com seringa e filtrada com filtro de seringa 0,45 µm e armazenada em vial âmbar à temperatura -20°C até a leitura cromatográfica.

4.8 Quantificação de carotenoides

A análise quantitativa foi realizada em equipamento HPLC modelo Infinity 1100 equipado com bomba quaternária e injetor automático acoplado a um detector *photo-diode array*. A separação foi realizada em coluna C30 YMC (5 µm, 250 x 4,6 mm i.d.) com gradiente de solvente A (MeOH:MTBE:H₂O:Acetato de amônio (1M), 88:5:5:2) e solvente B (MeOH:MTBE:Acetato de amônio (1M), 28:70:2) em tempos e proporções descritas na Tabela 2, sempre ao fluxo de 1mL/min. A identificação dos carotenoides foi realizada através do tempo de retenção e espectro UV/Vis, comparando-se com os resultados obtidos por Ferruzzi et al. (2001).

Tabela 2 – Condições para a separação dos carotenoides

Adaptado de FERRUZZI et al. (2001).

Tempo (min)	% Solvente A	% Solvente B
0	100	0
40	15	85
50	0	100

Este processo foi realizado no *Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos*, orientado pela Prof.^a Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP), São Paulo – SP.

4.9 Teste de biodisponibilidade

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar machos, adulto jovem, com peso aproximado de 200 g, com livre acesso à água e ração, mantidos em gaiolas em condições de 22 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram fornecidos pelo *Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo*. Eles foram

randomicamente divididos em três grupos, descritos abaixo, onde receberam extratos aquosos contendo os frutos do genótipo correspondente – MT ou MT-og mais óleo de soja (1:1) para proporcionar a absorção, uma vez que os carotenoides são lipossolúveis; por meio de gavagem (Tabela 3).

Tabela 3 – Delineamento experimental do ensaio com animais

Grupo	Gavagem*	Número de animais
1	2 mL de extrato de MT	28
2	2 mL de extrato de MT-og	28
3	2 mL de água	4

* 2 mL do extrato de tomate corresponde a 5 mg de carotenoides totais /100 g de peso corpóreo

Os animais foram anestesiados para coleta de sangue nos tempos: 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h após administração do extrato. Todos os ratos do grupo 3 foram eutanasiados 30 minutos após a administração de água. Para os tempos de coleta 2h e 12h teve 5 repetições, enquanto os tempos restantes tiveram *n* igual a 6.

Para a eutanásia, os roedores receberam, via intraperitoneal, uma solução de Ketamina:Xilasina nas concentrações 100 e 20 mg/Kg de peso corpóreo, respectivamente. Devidamente anestesiados, foi feita a coleta de 4 mL de sangue, por punção cardíaca, com auxílio de seringa e colocada em tubo contendo EDTA como anticoagulante. Nesse processo, o animal vai a óbito por hipovolemia.

Todo o procedimento com os animais foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este foi aprovado e integra o protocolo CEUA número 472, presente nesta dissertação como Anexo I.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 15 min à 4°C para separação do plasma. Este, em torno de 2 mL por animal, foi armazenado em tubos eppendorf marrons à -80°C até o momento da extração dos carotenoides.

As extrações e quantificações seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente nos itens 4.7 e 4.8, respectivamente deste documento. Apenas adaptado-se o volume inicial do material extraído para 2 mL de plasma sanguíneo.

Tais processos também ocorreram no *Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos*, supervisionado pela Prof.^a Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP), São Paulo – SP.

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software R-project. Inicialmente, os testes de homogeneidade de variâncias de Bartlett e Levene's; e de normalidade dos erros de Shapiro-Wilk e Lilliefors, foram aplicados às variáveis para a validação das pressuposições da análise da variância (ANOVA). Quando elas não foram aceitas, os dados foram transformados de acordo com a metodologia de Box-Cox.

Quando todos os pressupostos foram aceitos, as variáveis foram submetidas à ANOVA em nível de significância de 5%, seguindo o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + t_j + \varepsilon_{ij}$$

sendo:

Y_{ij} = valor observado na parcela que recebeu o i -ésimo tratamento, na j -ésima repetição;

μ = constante inerente a toda população;

t_j = efeito do j -ésimo tratamento;

ε_{ij} = efeito dos fatores não controlados do i -ésimo tratamento na j -ésima repetição

Quando o teste F da ANOVA mostrou que houveram diferenças significativas entre os tratamentos, as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção de genótipos

A introgressão tende à obtenção de uma linhagem quase isogênica, em que qualquer alteração fenotípica observada no genótipo provém de uma mutação monogênica. Utilizando-se dessas linhagens, caracteres podem ser estudados e comparações podem ser feitas com relação à ação do gene ou do efeito de seu alelo, diminuindo consideravelmente a interferência e ruído advindos de diferenças de *backgrounds* genéticos difusos (SMITH; RITCHIE, 1983). A introgressão dos alelos utilizados nesse trabalho permitiu um estudo mais confiável, se comparado o uso de materiais em *backgrounds* diferentes. A observação da Figura 3 torna evidente que a principal alteração presente nas linhagens é a cor, devido à presença de compostos específicos, não sendo observadas outras variações morfológicas, algo esperado para linhagens quase isogênicas.

Figura 3 – Alterações fenotípicas no fruto resultantes da introgressão dos alelos *og*, *B* e *r* na cultivar MT. Escala = 1 cm

Ao analisar os frutos na Figura 3, é impossível a distinção visual dos genótipos MT (controle) e MT-*og*, fato este que não ocorre quando são comparadas as polpas

de MT-*B* e MT-*r* que são laranja e amarela, respectivamente. Entretanto, quando confrontados externamente, esses últimos são muito semelhantes à olho nu, remetendo novamente ao problema encontrado no primeiro caso, MT e MT-*og*. Tal fato, evidencia a necessidade de outros meios para distinguir esses genótipos, os quais possuem mutações que costumam ser utilizadas em linhagens comerciais que não são distinguíveis entre si quanto à identificação visual, mas cujo impacto na composição de nutrientes, como se verá adiante, varia drasticamente.

5.2 Quantificação de carotenoides

Analisando a mensuração dos carotenoides nos frutos das linhagens apresentadas na Figura 3, observa-se que, como já descrito (RONEN et al., 2000; FRAY; GRIERSON, 1993), o mutante *B* acumula mais β -caroteno que MT e *og* e que, de modo inverso, o mutante *og* possui mais licopeno que *B* e próprio controle MT, sendo que uma parte considerável de licopeno está na forma *cis*. Desse modo, pode-se dizer que há pelo menos três alelos para o gene *CycB* (Solyc06g074240) de tomateiro, cujos efeitos no acúmulo de licopeno varia de níveis mínimos em *B*, intermediários no tipo selvagem (MT) e máximos em *og*. (Figura 4). Esses resultados comprovam que a introgressão dos genes de interesse ocorreu com sucesso e que tais materiais podem integrar estudos valiosos acerca do consumo desses frutos e seu impacto na alimentação.

Figura 4 – Concentração dos carotenoides β -caroteno, *cis* e *trans*-licopeno dos genótipos *B*, *og*, *r*, e da cultivar MT. A quantificação de *cis*-licopeno considera três isômeros *cis* não diferenciados. Teste de Tukey analisada a variância entre os genótipos para cada carotenoide, significância de 5%, n=4 leituras em HPLC

Embora os frutos inteiros das linhagens MT-*B* e MT-*r* sejam parecidos visualmente (Figura 3), esses são díspares no acúmulo de compostos, já que os frutos de MT-*r* praticamente não acumulam nenhum tipo de carotenoide (Figura 4). Esses resultados são esperados, já que a mutação *r* é uma perda de função do gene *PSY1* (Solyc03g031860), o qual atua no início da via biossintética de carotenoides. Desse modo, a coloração amarelada de frutos MT-*r* (Figura 3) deve ser atribuída à presença de flavonoides, como a rutina e narigenina, que possuem

valores aproximados em tomates vermelhos, como descrito por Georgé et al. (2011), mas que normalmente possuem a cor mascarada pela presença de carotenoides. Esses resultados evidenciam a vantagem da escolha do alelo *B*, e não *r*, para um programa de melhoramento genético visando a obtenção de linhagens gourmet de frutos coloridos, sem perda do valor nutricional. .

5.3 Colorimetria

Muito utilizada na horticultura (D'SOUZA et al.; 1992; BERNO et al., 2014; MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2015; REIG et al., 2015; SAHOO et al., 2015), a colorimetria é uma ferramenta de fácil manipulação, não necessariamente invasiva e que oferece resultados consistentes. Baseado em trabalhos que utilizaram a colorimetria para relacionar com o teor de licopeno (ARIAS et al., 2000), fenotipagem (ECARNOT et al., 2013) e comparar cultivos (BARRETT et al., 2007; PIEPER; BARRETT, 2009; JARQUÍN-ENRÍQUEZ et al., 2013); esta foi empregada para avaliar sua utilidade na diferenciação fenotípica dos alelos aqui estudados, em três regiões dos frutos. A fim de complementar o estudo, foram analisadas conjuntamente mais cinco mutantes que alteram a coloração dos frutos (Figura 5).

Figura 5 – Alterações fenotípicas no fruto resultantes da introgressão dos alelos *Del*, *t*, *at*, *y* e *gf* na cultivar MT. Escala = 1 cm.

Das três características colorimétricas, o matiz (hue) é a que trata da cor em si, cabendo às outras duas, luminosidade e saturação (chroma), modular esse aspecto, alternando tonalidades à mesma cor, sendo possível estimar numericamente a infinidade de cores que o olhos humanos é capaz de identificar. Integra-se assim, um sistema padronizado que permite comparações mais fidelizadas e menos relativas, que podem variar entre observadores.

A presença do gene *y* em homozigose caracteriza-se pela baixa concentração de flavonoides na epiderme do fruto, tornando-a próxima de transparente (ADATO et al., 2009). Tal fato torna a aparência rósea do fruto de fácil identificação. O matiz e a saturação corroboram para tal, pois quando envolvem o epicarpo (Figuras 6 e 8), é clara a singularização desta linhagem; o que não ocorre quando a região analisada não é afetada pelo gene, como se pode observar na Figura 7, que designa a polpa do fruto. Ocorre o inverso quando se trata da isolinha MT-*gf*, onde a placenta do fruto apresenta traços de clorofila. Nessa linhagem, a identificação é possível somente quando é analisada a saturação da região interna (Figura 7), pois as externas são muito semelhantes às outras linhagens vermelhas, ocorrendo também, interferência dos flavonoides presentes na epiderme.

Figura 6 – Valores médios de características colorimétricas em frutos intactos, isolinhas de MT. (A) Luminosidade (L^*), (B) Saturação ou Chroma, e (C) Matiz ou hue. Barras representam o desvio padrão da média, $n=20$ frutos

A linhagem MT-*Del* é a única que mostrou isolamento total em todas as regiões. É possível observar que sua cor é intermediária entre o vermelho e laranja, sendo notada mais facilmente quando se visualiza as representações gráficas da Figura 9. Portanto, a identificação desse fenótipo é facilitada por não haver necessidade de cálculo do matiz e da saturação. Contrariamente, é inviável, fazendo uso desta metodologia, a singularização de frutos MT-*at* perante frutos da cultivar base e MT-*og*. Segundo a literatura, sua polpa é amarelada ou laranja (JENKINS et al., 1955; MCQUINN et al., 2010), dado que não foi apoiado pelos resultados gerados. Faz-se então necessário a comparação do estágio floral, pois o fenótipo característico desse gene exibe corola pálida em relação às flores de MT.

Paralelamente, evidenciam-se as semelhanças que ocorrem entre as isolinhas MT-*B*, -*t* e -*r*, principalmente quando se trata da participação do epicarpo (Figuras 6 e 8) e, novamente, a necessidade de avaliação de outra região que não o englobe. Avaliando a polpa do fruto (Figura 7), a linhagem MT-*r* apresenta média díspar de matiz (96,6°), determinante para sua individualização, enquanto MT-*B* e -*t* apresentam valores consideravelmente menores, 74,8° e 76,2° respectivamente. Infelizmente, estas duas são de difícil particularização por esse método, apresentando valores de matiz e saturação muito próximos em todas as áreas analisadas. Tais fatos são facilmente observados na figura 9, novamente, dispensando uso de matiz e saturação.

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade destes parâmetros para cultivares comerciais que possivelmente portem os genes já avaliados, foram adquiridos tomates gourmet no mercado local, sob o rótulo de YELLOW BERRY (YB). As linhagens MT-*B*, -*r* e -*t* foram utilizadas como controle, por possuírem cor semelhante ao produto comercial YB. Com os dados gerados (Figura 10), é observada maior proximidade de valores a^* e b^* com a linhagem MT-*r*. Desse modo, provavelmente a cultivar YB estaria portando o alelo *yellow flesh* (*r*) em homozigose, comprovado também pelo matiz. A diferença estatística entre MT-*r* e YB se deve a possível diferença de *backgrounds* genéticos, evidenciando a necessidade de ampliação destes dados para novas cultivares e a influência que a matriz tem na composição da linhagem. De qualquer forma, uma implicação importante do estudo aqui apresentado é a constatação de que mutações diminuindo o valor nutricional, como *yellow flesh* (Figura 4), podem estar sendo utilizadas em programas de melhoramento de tomate gourmet e que isso pode ser facilmente detectado em produtos comerciais pelo emprego da colorimetria. É importante ressaltar que o emprego de métodos de identificação de mutações baseadas em polimorfismo de DNA (marcadores CAPs ou SCAR) ou análise de expressão gênica (RT-PCR), além de serem mais caros e demorados, não seriam viáveis para a mutação *yellow flesh*, já que essa não apresenta polimorfismo de DNA, por ser provavelmente um epialelo (Joseph Hirschberg, The Hebrew University of Jerusalem, informação pessoal), e o estágio em que os frutos são vendidos não corresponde ao estágio de expressão do gene *PSY1*.

Figura 7 – Valores médios de características colorimétricas da região interna dos frutos, isolinhas de MT. (A) Luminosidade (L^*), (B) Saturação ou Chroma, e (C) Matiz ou hue. Barras representam o desvio padrão da média, $n=20$ frutos

Figura 8 – Valores médios de características colorimétricas do epicarpo dos frutos, isolinhas de MT. (A) Luminosidade (L^*), (B) Saturação ou Chroma, e (C) Matiz ou hue. Barras representam o desvio padrão da média, $n=20$ frutos

Figura 9 – Valores médios das coordenadas a^* e b^* de frutos das isolinhas de MT. Regiões (A) Externa, (B) epicarpo, e (C) polpa. Barras representam o desvio padrão da média, $n=20$ frutos

Figura 10 – Valores médios de características colorimétricas da região interna dos frutos, isolinhas de MT e do produto comercial YELLOW BERRY (YB). (A) Coordenadas a^* e b^* , (B) Luminosidade (L^*), (C) Saturação ou Chroma, e (D) Matiz ou hue. Barras representam o desvio padrão da média, $n=20$ frutos

5.4 Peso, teor de sólidos solúveis e acidez

O sabor do fruto é um fator determinante para sua escolha pelo consumidor e em consequência pelo produtor. O gosto, juntamente com o aroma, são fatores determinantes para o sabor do fruto. Gosto é essencialmente o balanço entre a doçura e acidez. A doçura pode ser quantificada pelo teor de sólidos solúveis (grau Brix), enquanto a acidez pode ser determinada pela concentração dos ácidos orgânicos. A quantificação de sólidos solúveis por refratômetro abrange açúcares, ácidos orgânicos, pectinas solúveis, ácido ascórbico, antocianinas e outros compostos fenólicos (KADER, 2008).

Apesar de Micro-Tom não ser uma cultivar comercial, a presença de NILs nessa cultivar fornece uma oportunidade única de se verificar o impacto das mutações em parâmetros de produtividade e qualidade de frutos, o que pode direcionar as decisões dos melhoristas quanto ao seu uso em programas para obtenção de tomate gourmet. Mesmo que diferentes estatisticamente (Figura 11), as linhagens não apresentam profundas disparidades, o que faria sua depreciação tanto comercial quanto à nível de pesquisa. O único a apresentar um teor Brix relevantemente maior foi MT-*Del*, o que pode ser atribuído ao seu fruto menor (Figura 11A, Figura 5), já que Brix e produtividade costumam ser inversamente proporcionais (TANKSLEY et al., 1996; FULTON et al., 1997). O menor fruto de MT-*Del* pode ser devido a um efeito pleiotrópico dessa mutação, já que o gene *DELTA*

(Solyc12g008980) não se expressa somente no fruto (http://bar.utoronto.ca/efp_tomato/cgi-bin/efpWeb.cgi); ou de genes ligados a essa mutação que foram mantidos durante o processo de introgressão (*linkage drag*). Tanto os valores para Sólidos Solúveis quanto para Acidez Titulável estão dentro do esperado para a cultivar Micro-Tom (ECARNOT et al., 2013) e para valores comerciais (SADLER e MURPHY, 2010).

Figura 11 – Características agrônômicas de frutos das isolinhas de MT. (A) Peso médio, (B) Teor de Sólidos Solúveis (°Brix), e (C) Acidez Total Titulável (%) dos frutos. Teste de Tukey, significância de 5%, n=20 frutos

5.5 Teste de biodisponibilidade

A fim de avaliar a absorção do *trans*- e *cis*-licopeno, foi realizado o teste de biodisponibilidade com os genótipos MT e MT-og, pois apresentaram perfis metabólicos que diferiam substancialmente quanto ao isômero *cis*, principalmente (Figura 4). Este teste foi proposto para avaliação da absorção deste isômero consumido *in natura*, pois é muito comum estudos utilizando fontes purificadas ou produtos processados, como molhos, sucos, ketchup e extratos (AGARWAL et al., 2001; ROSS et al., 2011; COOPERSTONE et al., 2015). A realização de estudos utilizando produtos processados pode comprometer a validade dos resultados, pois a matriz em que o nutriente está presente afeta em muito o desempenho que o

composto apresenta quando ingerido (MARTIN, 2013; BURTON-FREEMAN; SESSO, 2014). Além disso, o licopeno apresenta mudança de isomeria através da temperatura (GUPTA et al., 2011), quando o suco de tomate é cozido por 1 hora com 10% de óleo de milho incide a isomerização *trans* pra *cis*, aumentando a concentração deste isômero para 30% do total de licopeno, frente à cerca de 5% do tomate fresco (AGARWAL et al., 2001). O processo de cozimento e processamento do molho desdobra também na quebra das membranas, liberando o conteúdo celular, facilitando a absorção (VAN HET HOF et al., 2000; BURTON-FREEMAN; SESSO, 2014). É de conhecimento que a forma *cis* é a mais biodisponível, de melhor absorção pelos animais (BOILEAU et al., 1999; BURTON-FREEMAN; SESSO, 2014). A importância desse experimento está na possível absorção de isômeros *cis* sem a necessidade de aquecimento, isto é, um tomate de mesa rico na forma mais biodisponível; ou se há a necessidade do aquecimento, afetando outros compostos da matriz que favoreçam a absorção.

O teste de biodisponibilidade ocorreu conforme planejado, principalmente nos processos de gavagem e coleta do material sanguíneo dos animais. Porém, com relação à extração e quantificação dos carotenoides, obtiveram-se resultados nulos. Esse desfecho evidencia a necessidade de adaptação ou mudança de metodologia.

6 CONCLUSÕES

As introgressões foram feitas com sucesso, salvo a condição da linhagem *Delta carotene*, que possivelmente necessita de um refinamento maior em seu *background* genético. Esse processo é simples e não depende de outros procedimentos além dos quais já foram realizados.

As informações colorimétricas aqui coletadas compõem uma base de dados que descreve variações fenotípicas nos frutos de tomateiro que podem ser úteis em processos de melhoramento genético. Em outra escala, podem ser utilizadas no comércio por produtores e compradores, beneficiando também os consumidores. Deseja-se que novos dados sejam incorporados, especialmente fazendo uso de outras cultivares como *background*, para mutações não necessariamente da via de biossíntese de carotenoides, mas que alterem a cor do tomate. Infelizmente nem todas as linhagens puderam ser singularizadas por esse método, mas considerando-se outras características, pode-se abrir mão de processos demorados e dispendiosos para este fim.

O teste de biodisponibilidade mostrou resultados insatisfatórios, porém, devido a sua relevância, aconselha-se a revisão de metodologia para responder com sucesso a pergunta proposta.

A coleção de linhagem isogênicas aqui apresentada e caracterizada, além de ser passível de ser ampliada, pode se converter em ferramenta útil em estudos posteriores tanto de biodisponibilidade de nutrientes, quanto de direcionamento de programas de melhoramento visando o enriquecimento de fitonutrientes em frutos.

REFERÊNCIAS

- ADATO, A.; MANDEL, T.; MINTZ-ORON, S.; VENGHER, I.; LEVY, D.; YATIV, M.; DOMINGUEZ, E.; WANG, Z.; DE VOS, R. C. H.; JETTER, R.; SCHREIBER, L.; HEREDIA, A.; ROGACHEV, I.; AHARONI, A. Fruit-Surface Flavonoid Accumulation in Tomato Is Controlled by a SIMYB12-Regulated Transcriptional Network. **Plos Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 12, e1000777, Dec 2009.
- AGARWAL, A.; SHEN, H.; AGARWAL, S.; RAO, A. V. Lycopene Content of Tomato Products: Its Stability, Bioavailability and In Vivo Antioxidant Properties. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 4, n. 1, p. 9-15, 2001.
- AGARWAL, S.; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 163, n. 6, p. 739-744, Sept. 2000.
- ALMEIDA, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenoids and Pro-Vitamin A Value of White Fleshed Brazilian Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.). **Journal of Food Composition and Analysis**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 341-352, 1988.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PAMPLONA, L.C.; COIMBRA, S.; BARTH, O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 18, n. 1, p. 105-111, Feb 2005.
- ARIAS, R.; LEE, T.C.; LOGENDRA, L.; JANES, H. Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a* b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1697-1702, May 2000.
- BAILEY, J.E. Toward a Science of Metabolic Engineering. **Science**, Cambridge, v. 252, n. 5013, p. 1668-1675, Jun 1991.
- BARRETT, D.M.; WEAKLEY, C.; DIAZ, J.V.; WATNIK, M. Qualitative and nutritional differences in processing tomatoes grown under commercial organic and conventional production systems. **Journal of Food Science**, Malden, v. 72, n. 9, p. C441-C451, Nov 2007.
- BARRY, C.S.; MCQUINN, R.P.; CHUNG, M.Y.; BESUDEN, A.; GIOVANNONI, J.J. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. **Plant Physiology**, Oxford, v. 147, n. 1, p. 179-187, May 2008.

BERNI, P.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; DE MOURA, F. F.; FAILLA, M. L. Impact of Genotype and Cooking Style on the Content, Retention, and Bioaccessibility of beta-Carotene in Biofortified Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Conventionally Bred in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 28, p. 6677-6686, Jul 2014.

BERNO, N. D.; TEZOTTO-ULIANA, J. V.; DOS SANTOS DIAS, C. T.; KLUGE, R. A. Storage temperature and type of cut affect the biochemical and physiological characteristics of fresh-cut purple onions. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 93, p. 91-96, Jul 2014.

BOILEAU, A. C.; MERCHEN, N. R.; WASSON, K.; ATKINSON, C. A.; ERDMAN, J. W. Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 129, n. 6, p. 1176-1181, Jun 1999.

BURTON-FREEMAN, B. M.; SESSO, H. D. Whole Food versus Supplement: Comparing the Clinical Evidence of Tomato Intake and Lycopene Supplementation on Cardiovascular Risk Factors. **Advances in Nutrition**, Bethesda, v. 5, n. 5, p. 457-485, Sep 2014.

BUTELLI, E.; TITTA, L.; GIORGIO, M.; MOCK, H. P.; MATROS, A.; PETEREK, S.; SCHIJLEN, E. G. W. M.; HALL, R. D.; BOVY, A. G.; LUO, J.; MARTIN, C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotechnology**, London, v. 26, n. 11, p. 1301-1308, 2008.

CAMPOS, M. L.; CARVALHO, R. F.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. P. Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 267-70, Mar 2010.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; PINO, L.E.; CRESTANA, S.L.; ZSOGON, A.; LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, p. 14, Jun 2011.

COOPERSTONE, J.L.; RALSTON, R.A.; RIEDL, K.M.; HAUF, T.C.; SCHWEIGERT, R.M.; KING, S.A.; TIMMERS, C.D.; FRANCIS, D.M.; LESINSKI, G.B.; CLINTON, S.K.; SCHWARTZ, S.J. Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as cis-isomers from tangerine compared to red tomato juice, a randomized, cross-over clinical trial. **Molecular Nutrition & Food Research**, Bognor Regis, v. 59, n. 4, p. 658-669, Apr 2015.

CROZIER, A.; LEAN, M.E.J.; MCDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 3, p. 590-595, Mar 1997.

DAAR, A.S.; SINGER, P.A.; PERSAD, D.L.; PRAMMING, S.K.; MATTHEWS, D. R.; BEAGLEHOLE, R.; BERNSTEIN, A.; BORYSIEWICZ, L.K.; COLAGIURI, S.; GANGULY, N.; GLASS, R.I.; FINEGOOD, D.T.; KOPLAN, J.; NABEL, E.G.; SARNA, G.; SARRAFZADEGAN, N.; SMITH, R.; YACH, D.; BELL, J. Grand challenges in chronic non-communicable diseases. **Nature**, London, v. 450, n. 7169, p. 494-496, Nov 2007.

DE LA GARZA, R.I.D.; GREGORY, J.F.; HANSON, A.D. Folate biofortification of tomato fruit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 10, p. 4218-4222, Mar 2007. ISSN 0027-8424.

DE WAART, F.G.; SEHOUTEN, E.G.; STALENHOF, A.F H.; KOK, F.J. Serum carotenoids, alpha-tocopherol and mortality risk in a prospective study among Dutch elderly. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 136-143, Feb 2001.

DSOUZA, M.C.; SINGHA, S.; INGLE, M. Lycopene Concentration Of Tomato Fruit Can Be Estimated From Chromaticity Values. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 465-466, May 1992.

DUDAREVA, N.; DELLAPENNA, D. Plant metabolic engineering: future prospects and challenges. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 24, n. 2, p. 226-228, Apr 2013.

ECARNOT, M.; BACZYK, P.; TESSAROTTO, L.; CHERVIN, C. Rapid phenotyping of the tomato fruit model, Micro-Tom, with a portable VIS-NIR spectrometer. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 70, p. 159-163, Sept 2013.

FERRUZZI, M.G.; NGUYEN, M.L. SANDER, L.C.; ROCK, C.L.; SCHWARTZ, S.J. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of Chromatography B**, Oxford, v. 760, n. 2, p. 289-299, Sept. 5 2001.

FRAY, R.G.; GRIERSON, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 22, n. 4, p. 589-602, 1993.

FULTON, T.M.; BECKBUNN, T.; EMMATTY, D.; ESHED, Y.; LOPEZ, J.; PETIARD, V. UHLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, n. 5-6, p. 881-894, Oct 1997.

GEORGE, S; TOURNIAIRE, F.; GAUTIER, H.; GOUPY, P.; ROCK, E.; CARIS-VEYRAT, C. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 124, n. 4, p. 1603-1611, Feb 2011.

GONZALI, S.; MAZZUCATO, A.; PERATA, P. Purple as a tomato: towards high anthocyanin tomatoes. **Trends in Plant Science**, London, v. 14, n. 5, p. 237-241, May 2009. ISSN 1360-1385.

GUPTA, R.; KOPEC, R.E.; SCHWARTZ, S.J.; BALASUBRAMANIAM, V.M. Combined Pressure-Temperature Effects on Carotenoid Retention and Bioaccessibility in Tomato Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 14, p. 7808-7817, Jul 2011.

HARJES, C.E.; ROCHEFORD, T.R.; BAI, L.; BRUTNELL, T.P.; KANDIANIS, C.B.; SOWINSKI, S.G.; STAPLETON, A.E.; VALLABHANENI, R.; WILLIAMS, M.; WURTZEL, E.T.; YAN, J.; BUCKLER, E.S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. **Science**, Cambridge, v. 319, n. 5861, p. 330-333, Jan 18 2008. ISSN 0036-8075.

HEFFERON, K.L. Nutritionally Enhanced Food Crops; Progress and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 2, p. 3895-3914, Feb 2015.

HOZAWA, A.; JACOBS, D.R. JR.; STEFFES, M.W.; GROSS, M.D.; STEFFEN, L. M. LEE, D.H. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 53, n. 3, p. 447-455, Mar 2007.

ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, n. 2, p. 333-342, 2002.

JARQUÍN-ENRÍQUEZ, L.; MERCADO-SILVA, E.M.; MALDONADO, J.L.; LOPEZ-BALTAZAR, J. Lycopene content and color index of tomatoes are affected by the greenhouse cover. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 155, n. 0, p. 43-48, 5/29/2013.

JENKINS, J.A.; MACKINNEY, G. CAROTENOIDS OF THE APRICOT TOMATO AND ITS HYBRIDS WITH YELLOW AND TANGERINE. **Genetics**, Bethesda, v. 40, n. 5, p. 715-720, 1955.

JEZ, J.M.; NOEL, J.P.A. Kaleidoscope of carotenoids. **Nature Biotechnology**, London, v. 18, n. 8, p. 825-826, Aug 2000.

KACHANOVSKY, D.E.; FILLER, S.; ISAACSON, T.; HIRSCHBERG, J. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of phytoene synthase 1 expression by cis-carotenoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 46, p. 19021-19026, Nov 2012.

KADER, A.A. Flavor quality of fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 11, p. 1863-1868, Aug 2008.

KIEKENS, F.; BLANCQUAERT, D.; DEVISSCHER, L.; VAN DAELE, J.; STOVE, V. V.; DELANGHE, J.R.; VAN DER STRAETEN, D.; LAMBERT, W.E.; STOVE, C.P. Folates from metabolically engineered rice: A long-term study in rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, Bognor Regis, v. 59, n. 3, p. 490-500, Mar 2015.

MARTIN, C. The interface between plant metabolic engineering and human health. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 24, n. 2, p. 344-353, Apr 2013.

_____.; BUTELLI, E.; PETRONI, K.; TONELLI, C. How Can Research on Plants Contribute to Promoting Human Health? **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 5, p. 1685-1699, May 2011.

_____.; ZHANG, Y.; TONELLI, C.; PETRONI, K. Plants, Diet, and Health. In: Merchant, S. S. (Ed.). **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.64, 2013. p.19-46. (Annual Review of Plant Biology, **64**.).

MCGUIRE, R.G. Reporting of Objective Color Measurements. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 12, p. 1254-1255, Dec 1992.

MCQUINN, R.P.; GIOVANNONI, J.J.; ROSE, J.; FERNIE, A.; ZAMIR, D.; ROHRMANN, J.; TOHGE, T. **apricot (at/at): A Novel Ripening Regulator Controlling Antioxidant Accumulation in Solanum lycopersicum (cv. Ailsa craig).** In: SOLANACEAE CONFERENCE, 7., 2010. Dundee, Scotland **Proceedings...**: Dundee, Scotland, 2010. 97p.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, Dec 1997.

MES, P.J.; BOCHES, P.; MYERS, J.R.; DURST, R. Characterization of tomatoes expressing anthocyanin in the fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Austin, v. 133, n. 2, p. 262-269, Mar 2008.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; RESCIC, J.; SCHMITZER, V.; STAMPAR, F.; SLATNAR, A.; KORON, D.; VEBERIC, R. Changes in fruit quality parameters of four Ribes species during ripening. **Food Chemistry**, Oxford, v. 173, p. 363-374, Apr 15 2015. ISSN 0308-8146.

MOISE, A.R.; AL-BABILI, S.; WURTZEL, E.T. Mechanistic Aspects of Carotenoid Biosynthesis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 1, p. 164-193, Jan 2014.

OLIVEIRA, K.C.L.S.; MORIYA, M.; AZEDO, R.A.B.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; TEIXEIRA, E.W.; ALVES, M.L.T.M.F.; MORETI, A.C.D.C. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1099-1102, 2009.

OWENS, B.F.; LIPKA, A.E.; MAGALLANES-LUNDBACK, M.; TIEDE, T.; DIEPENBROCK, C.H.; KANDIANIS, C.B.; KIM, E.; CEPELA, J.; MATEOS-HERNANDEZ, M.; BUELL, C.R.; BUCKLER, E.S.; DELLAPENNA, D.; GORE, M. A.; ROCHEFORD, T. A Foundation for Provitamin A Biofortification of Maize: Genome-Wide Association and Genomic Prediction Models of Carotenoid Levels. **Genetics**, Bethesda, v. 198, n. 4, p. 1699-1716, Dec 2014.

PAINE, J.A.; SHIPTON, C.A.; CHAGGAR, S.; HOWELLS, R.M.; KENNEDY, M.J.; VERNON, G.; WRIGHT, S.Y.; HINCHLIFFE, E.; ADAMS, J.L.; SILVERSTONE, A. L.; DRAKE, R. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased provitamin A content. **Nature Biotechnology**, London, v. 23, n. 4, p. 482-487, Apr 2005.

PARAN, I.; VAN DER KNAAP, E. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 14, p. 3841-3852, Nov 2007.

PIEPER, J.R.; BARRETT, D.M. Effects of organic and conventional production systems on quality and nutritional parameters of processing tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 89, n. 2, p. 177-194, Jan 30 2009.

REIG, G.; BLANCO, A.; MARIA CASTILLO, A.; GOGORCENA, Y.; ANGELES MORENO, M. Phenotypic diversity of Spanish apple (*Malus x domestica* Borkh) accessions grown at the vulnerable climatic conditions of the Ebro Valley, Spain. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 185, p. 200-210, Mar 30 2015.

RODRIGUEZ, D.B.; RAYMUNDO, L.C.; LEE, T.C.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C. O. Carotenoid Pigment Changes in Ripening *Momordica charantia* Fruits. **Annals of Botany**, Oxford, v. 40, n. 167, p. 615-624, 1976 1976.

RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 20, p. 11102-11107, Sept. 2000.

_____.; COHEN, M.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. **Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 341-351, Feb 1999.

ROSS, A. B.; VUONG, L. T.; RUCKLE, J.; SYNAL, H. A.; SCHULZE-KONIG, T.; WERTZ, K.; RUMBELI, R.; LIBERMAN, R. G.; SKIPPER, P. L.; TANNENBAUM, S. R.; BOURGEOIS, A.; GUY, P. A.; ENSLEN, M. Lycopene bioavailability and metabolism in humans: an accelerator mass spectrometry study. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 93, n. 6, p. 1263-1273, Jun 2011.

SADLER, G.; MURPHY, P. pH and Titratable Acidity. In: NIELSEN, S.S. (Ed.). **Food Analysis**. 4th. New York, USA. Springer US, 2010. cap. 13, p.219-238. (Food Analysis).

SAHOO, N. R.; PANDA, M. K.; BAL, L. M.; PAL, U. S.; SAHOO, D. Comparative study of MAP and shrink wrap packaging techniques for shelf life extension of fresh guava. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 182, p. 1-7, Jan 23 2015.

SAPIR, M.; OREN-SHAMIR, M.; OVADIA, R.; REUVENI, M.; EVENOR, D.; TADMOR, Y.; NAHON, S.; SHLOMO, H.; CHEN, L.; MEIR, A.; LEVIN, I. Molecular aspects of Anthocyanin fruit tomato in Relation to high pigment-I. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 292-303, May 2008.

SESTARI, I.; ZSÖGÖN, A.; REHDER, G.G.; TEIXEIRA, L.D.L.; HASSIMOTTO, N. M.A.; PURGATTO, E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Near-isogenic lines enhancing ascorbic acid, anthocyanin and carotenoid content in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) as a tool to produce nutrient-rich fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 175, n. 0, p. 111 - 120, 2014.

SMITH, J.W.M.; RITCHIE, D.B. A collection of near-isogenic lines of tomato: Research tool of the future? **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 1, p. 6, Mar 1983.

STAM, P.; ZEVEN, A.C. The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. **Euphytica**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 227-238, 1981.

TANKSLEY, S.D.; GRANDILLO, S.; FULTON, T.M.; ZAMIR, D.; ESHED, Y.; PETIARD, V.; LOPEZ, J.; BECKBUNN, T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L.pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, n. 2, p. 213-224, Feb 1996.

U.S. Department of Agriculture; U.S. Department of Health and Human Services. **Dietary Guidelines for Americans, 2010**. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, Dec. 2010.

UNLU, N.Z.; BOHN, T.; FRANCIS, D.; CLINTON, S.K.; SCHWARTZ, S.J. Carotenoid Absorption in Humans Consuming Tomato Sauces Obtained from Tangerine or High- β -Carotene Varieties of Tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 7, Jan 2007.

VAN HET HOF, K H.; DE BOER, B.C.J.; TIJBURG, L.B.M.; LUCIUS, B.R.H.M.; ZIJP, I.; WEST, C.E.; HAUTVAST, J.G.A.J.; WESTSTRATE, J.A. Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 5, p. 1189-1196, May 2000.

YE, X.D.; AL-BABILI, S.; KLOTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, Cambridge, v. 287, n. 5451, p. 303-305, Jan 14 2000.

YEUM, K. J.; RUSSELL, R.M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 483-504, 2002.

ANEXO

ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 65.2014-P472

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**O tomateiro micro-ton como um modelo para produção de "alimento isogênico" e seu uso no estudo de biodisponibilidade de carotenoides**" (Protocolo CEUA/FCF/472), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Stevan Ricardo Bordignon**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **04 de julho de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 7 de julho de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP