UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (*Solanum Lycopersicum* L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS

Afonso Pinho da Silva Maia

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador:
Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo
2015

AFONSO PINHO DA SILVA MAIA

Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (*Solanum Lycopersicum* L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS

Versão corrigida

Tese apresentada ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de MESTRE em Ciências dos Alimentos.

Área de Concentração:
Bromatologia

Orientador: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Maia, Afonso Pinho da Silva

M217a Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (Solanum Lycopersicum L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS / Afonso Pinho da Silva Maia. -- São Paulo, 2015.

101p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Bioquímica dos alimentos I. T. II. Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto, orientador.

641 CDD

Afonso Pinho da Silva Maia

Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (*Solanum Lycopersicum* L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS

Versão corrigida

Comissão julgadora
da
dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
orientadora/presidente

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho - 1º examinador

Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia 2º examinador

São Paulo, 11 de março de 2015

Dedico este trabalho

aos meus queridos pais, Mário e Sandra, e à minha amada irmã, Bruna.

Família símbolo de união, força e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmã, sem minha família me apoiando em todos os momentos que passei nessa jornada não teria dado um único passo a diante. Foi mais suave a minha caminhada tendo-os ao meu lado.

Aos meus familiares, especialmente às minhas avós, que sempre me desejaram o melhor e sempre me recebiam de braços abertos a cada visita à minha cidade natal; e a meu primo Hugo agradeço por não deixar me sentir mais um em alguns milhões em São Paulo e pelo abrigo sempre que precisei.

Aos meus amigos/irmãos de Resende, vocês sempre participaram da minha vida de forma especial. Obrigado por me fazer lembrar os momentos bons e nunca me esquecer das minhas origens, de quem eu sou.

A todos os profissionais que estiveram envolvidos no meu processo de educação, em especial aos meus professores de graduação. Sem o conhecimento dividido por vocês, hoje não estaria tão perto de ser semelhante ao profissional que sempre me cativaram a ser.

Aos meus amigos de graduação saibam que a pessoa que me torno a partir deste momento conta, e sempre contou, com a ajuda e lembrança de vocês.

Agradeço imensamente ao Prof. Tit. Dr. Franco Maria Lajolo por, primeiramente, ter lido um simples email que mudaria minha vida e consequentemente ter enxergado em mim um potencial a ser lapidado e me encaminhado à minha orientadora.

À Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto eu agradeço profundamente à oportunidade me dada a fazer um sonho se tornar realidade. A atenção e a paciência que teve em me ensinar e dividir todo seu conhecimento científico, profissional e pessoal. Obrigado por me orientar a sempre procurar acertar, mesmo que tenhamos as maiores dificuldades pelo caminho.

Aos professores do departamento Dra. Beatriz Cordenunsi, Dr. João Paulo Fabi, Dr. Eduardo Purgatto e Dr. João Roberto Oliveira, agradeço as oportunidades em que tive de observá-los e poder absorver aquilo que de melhor tinham a me oferecer. Aos queridos técnicos; Márcia Moraes, Tânia Shiga, Elias Araújo, Aline Santos e Lúcia Justino agradeço desde os abraços molhados aos puxões de orelha. A todos os funcionários da secretaria do departamento,

obrigado por me ajudarem auxiliando em todos os problemas e dúvidas que tive durante esse período.

À minha família de laboratório divido minha vitória. Amigos, desde o momento em que cheguei ao laboratório considero todos vocês como meus irmãos. Agradeço a todos por sempre terem me escutado, por terem gargalhado comigo mesmo quando não podíamos, agradeço por sempre ter alguém para almoçar ao meu lado, agradeço pelos conhecimentos divididos, pelas piadas contadas, pelas muitas caronas, agradeço por terem se importado comigo. Serei eternamente agradecido: pelos carinhos/mimos das minhas menininhas Talita Nascimento, Juliana Nunes e Renata Shitakubo; pelas caronas, abrigo e, por que não, birritas do Victor Castro-Alves, Eric Tobaruela e Samira Prado; as ajudas de Ana Sansone e a parceria de Marcelo Sansone; e as conversas sobre todos os assuntos imagináveis com Florence Castelan, Lorenzo Saraiva, Maria Fernanda Nobre, Gabriela Schmitz, Bruna Lima, Deborah DeFusco, Vanessa Bonato, Fernanda Peroni e Roberta Guedini. Saibam que estão todos no meu coração, guardo todos os momentos com muito carinho e amor. Muito obrigado por terem feito tudo parecer mais fácil, por terem me incentivado a conquistar e acreditar no que parecia distante e impossível.

Agradeço em especial às minhas colegas do grupo dos flavonoides, Manuela Brito, Luciane Teixeira, Ana Marla Duarte, Mariana Souto, Regina Stanquevis, Sara de Lima e Daniela Chaves. Sem o apoio de vocês sorrir todos os dias seria bem mais difícil. Obrigado pelas ajudas profissionais e pessoais.

Agradeço à Universidade de São Paulo por toda infraestrutura a mim ofertada para que me tornasse um profissional, e até mesmo, um “atleta” melhor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade de São Paulo pela oportunidade e apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, tenham me ajudado em algum momento que precisei.

E finalmente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por terem me guiado no caminho da paz e da sabedoria e me protegido de todos os perigos.

*“O único verdadeiro fracasso é o de não haver tentado.
E o sucesso se mede pela forma como lidamos com as decepções.
É o que sempre devemos fazer.
Viemos aqui, e tentamos.
Cada um a sua maneira.
É nossa culpa achar que somos muito velhos para mudar?
Com medo da decepção para começarmos novamente?
Nós nos levantamos de manhã,
e fazemos o melhor que podemos.
Nada mais importa.”*

Trecho de *O Excêntrico Hotel Marigold*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de quadros	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 FLAVONOIDES	20
2.1.1 Características estruturais	20
2.1.2 Biossíntese	24
2.1.3 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos	26
2.2 PROPRIEDADES DOS FLAVONOIDES	29
2.2.1 Atividade antioxidante	29
2.2.2 Atividade anti-inflamatória	31
2.3 TOMATE ROXO	36
3. OBJETIVO	39
4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO TOMATE ROXO	40
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.1 MATERIAL	40
4.1.1.1. Amostra	40
4.1.1.2. Preparo da amostra	40
4.1.2 MÉTODOS	40
4.1.2.1. Extração de compostos fenólicos	40
4.1.2.2. Determinação de fenólicos totais	41
4.1.2.3. Capacidade antioxidante	41
4.1.2.3.1. Método <i>Oxygen radical assay capacity</i> (ORAC)	41

4.1.2.3.2. Método DPPH	42
4.1.2.4. Extração de flavonoides	42
4.1.2.5. Extração de fase sólida	43
4.1.2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência - DAD	43
4.1.2.7. LC-ESI-MS/MS	44
4.1.2.8. Determinação de ácido ascórbico	45
4.1.2.9. Análise estatística	45
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO FENÓLICO DE TOMATE ROXO	66
5.1 MÉTODOS	66
5.1.1 Preparo do extrato aquoso	66
5.1.2 Delineamento experimental	66
5.1.2.1. Estudo de inflamação	67
5.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	68
5.1.4 Determinação da concentração de citocinas no exsudato peritoneal	68
5.1.5 Estudo de absorção	69
5.1.6 Extração de flavonoides do fígado de camundongo	70
5.1.7 Análise estatística	70
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.2.1 Influxo leucocitário	71
5.2.2 Expressão gênica de mRNA de COX-2	73
5.2.3 Concentração de citocinas no exsudato peritoneal	74
5.2.4 Absorção dos compostos fenólicos do tomate roxo	80
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXO	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AsA	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'- azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto
ABG	<i>Aubergine</i>
AFT	<i>Anthocyanin fruit</i>
AG	Ácido gálico
ATV	<i>atroviolaceum</i>
CAT	Catalase
CHI	Chalcona isomerase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Ciclo-oxigenase
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical α,α -difeníl- β -picrilhidrazina
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione S-transferase
ICAM-1	<i>Intercellular cell adhesion molecule - 1</i> / Molécula de adesão intracelular-1
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible oxide nitric synthase</i> / Óxido nítrico sintetase indutível
LOO•	Radical peroxil
LOX	Lipo-oxigenase

LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> / Proteína quimiotática de monócito-1
mKC	<i>murine keratinocyte-derived chemokine</i> / Quimiocina específica para neutrófico
NF-κB	Fator de transcrição kappa B
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORAC	<i>Oxygen radical assay capacity</i>
PGE-2	Prostaglandina E 2
SGLT-1	<i>Sodium-dependent glucose transporter – 1</i> / Transportador de glicose sódio-dependente
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema único de saúde
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule -1</i> / Molécula de adesão de célula vascular-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura básica dos flavonoides.	20
Figura 2	Classificação dos flavonoides em subclasses.	22
Figura 3	Estrutura básica das principais antocianidinas encontradas nos alimentos vegetais.	23
Figura 4	Rota biossintética dos flavonoides.	25
Figura 5	Via da absorção dos flavonoides.	29
Figura 6	Reação redox entre um flavonoide e um grupamento peroxil.	30
Figura 7	Relação entre o processo inflamatório crônico e o desenvolvimento de doenças crônicas.	33
Figura 8	Possível papel dos flavonoides nas vias de sinalização da cascata inflamatória induzida por LPS/AGS.	35
Figura 9	Piramidação de genes para obtenção do tomate roxo.	37
Figura 10	Rota biossintética das antocianinas no tomate.	38
Figura 11	Cromatograma obtido por CLAE-DAD (270 nm) dos flavonoides presentes na casca (A) e polpa (B) do tomate roxo.	50
Figura 12	Principais compostos fenólicos encontrados no tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> .	51
Figura 13	Espectro de massas (MS^2) de flavonoides encontrados na casca do tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> obtidos por LC-ESI -MS/MS, em modo positivo.	54
Figura 14	Espectro de massas (MS^2) de flavonoides encontrados na casca do tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> obtidos por LC-ESI -MS/MS, em modo negativo.	57
Figura 15	Cromatograma obtido por CLAE-DAD (270 nm) dos flavonoides presentes na casca (A) e polpa (B) do tomate vermelho (MT).	58

Figura 16	Espectro de massas (MS^2) de flavonoides encontrados na casca do tomate vermelho (MT) obtidos por LC-ESI -MS/MS, em modo positivo.	61
Figura 17	Espectro de massas (MS^2) de flavonoides encontrados na casca do tomate vermelho (MT) obtidos por LC-ESI -MS/MS, em modo positivo.	63
Figura 18	Comparação entre tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> (A) e tomate vermelho- MT (B).	64
Figura 19	Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> no influxo leucocitário em modelo de peritonite induzida por LPS.	72
Figura 20	Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> na expressão de mRNA de COX-2 em modelo de peritonite induzida por LPS.	73
Figura 21	Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> na concentração de citocinas pró-inflamatórias no exsudato em modelo de peritonite induzida por LPS.	75
Figura 22	Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> na concentração de MCP-1 e mKC no exsudato em modelo de peritonite induzida por LPS.	76
Figura 23	Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> na concentração das citocinas anti-inflamatórias no exsudato em modelo de peritonite induzida por LPS.	77
Figura 24	Espectro de massas (MS^2) de flavonoides encontrados no fígado dos animais tratados com extrato fenólico de tomate roxo obtidos por LC-ESI -MS/MS, em modo positivo.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante, avaliada pelos métodos DPPH e ORAC, de tomate roxo, obtido por piramidação dos genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> , e de tomate vermelho-Micro Tom (MT)	46
Tabela 2	Conteúdo de ácido ascórbico de tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> e de tomate vermelho-MT.	48
Tabela 3	Conteúdo dos flavonoides e ácidos fenólicos do tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> .	49
Tabela 4	Composição de compostos fenólicos da casca do tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> identificados por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo.	52
Tabela 5	Composição de compostos fenólicos da polpa do tomate roxo obtido por piramidação do genes <i>Aft</i> , <i>Abg</i> e <i>atv</i> detectados por LC-ESI-MS/MS, em modo negativo.	55
Tabela 6	Conteúdo dos flavonoides e ácidos fenólicos do tomate vermelho (MT).	59
Tabela 7	Composição de compostos fenólicos da casca do tomate vermelho (MT) identificados por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo.	60
Tabela 8	Composição de compostos fenólicos da polpa do tomate vermelho (MT) identificados por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo.	62
Tabela 9	Flavonoides encontrados no fígado dos animais tratados com extrato fenólico de tomate roxo obtidos por LC-ESI -MS/MS, em modo positivo.	80

RESUMO

MAIA, A.P.S. **Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (*Solanum Lycopersicum* L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS.** 2015. 101p. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Visando a produção de um alimento que possua elevados teores de compostos bioativos, a piramidação de genes é uma técnica capaz de estimular o acúmulo e a expressão de novas classes de flavonoides em tecidos vegetais, como por exemplo, o tomate roxo, rico em antocianinas. As antocianinas podem atenuar o processo inflamatório através da modulação da cascata de sinalização e da expressão de enzimas, sendo este um dos possíveis mecanismos de ação que leva a promoção da saúde, atribuído a esta classe de compostos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação anti-inflamatória do extrato de tomate roxo, obtido por piramidação dos genes *Anthocyanin Fruit (Aft)*, *Aubergine (Abg)* e *atroviolaceum (atv)*, em camundongos submetidos ao modelo de peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS). O fruto tomate vermelho - Micro Tom (MT) e o transformado foram caracterizados quanto ao seu perfil de compostos fenólicos. A casca do tomate roxo, rica em antocianinas, apresentou conteúdo de fenólicos totais dez vezes maior quando comparado à casca do MT, apresentando também maiores quantidades de ácido ascórbico e capacidade antioxidante avaliado nos métodos DPPH e ORAC; em relação à polpa e casca do tomate vermelho e a polpa do tomate roxo. Os principais flavonoides identificados na casca do tomate roxo, por CLAE-DAD, foram: as antocianidinas petunidina (86,5 mg/100 g b.u.), delphinidina (6,85 mg/100 g b.u.), principalmente na forma acilada, e o flavonol rutina (106,26 mg/100 g b.u.). A propriedade anti-inflamatória dos compostos fenólicos foi avaliada através de um modelo de peritonite, em camundongos, induzida por LPS. O extrato aquoso do tomate roxo, rico em antocianinas (2 e 4 mg petunidina eq./100 g peso corpóreo) foi administrado, por via oral, 30 minutos antes do estímulo inflamatório. No exsudato peritoneal, coletado após 3h do estímulo, foi observada, no grupo que recebeu 4 mg quando comparado ao grupo estimulado com LPS, uma redução significativa ($p < 0,05$) de cerca de 37% no número de leucócitos totais e de 64% na expressão gênica de mRNA de COX-2 e na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e MCP-1), assim como um aumento significativo da citocina anti-inflamatória IL-10. Em estudo de absorção, os metabólitos: delphinidina aglicona (m/z 303) e malvidina aglicona (m/z 331) foram detectados, por cromatografia líquida – ESI-MS/MS, nas amostras de fígado dos animais eutanasiados após 30 minutos de administração do extrato do tomate roxo. Portanto, os resultados demonstram que as antocianinas presentes no tomate roxo, por meio dos metabólitos encontrados no fígado dos animais, apresentam atividade anti-inflamatória através do controle do influxo leucocitário, da modulação da expressão gênica de COX-2 e da produção citocinas.

Palavras-chave: antocianinas, tomate roxo, petunidina, atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

MAIA, A.P.S. Anti-inflammatory activity of phenolic extract of purple tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in mouse model of peritonitis induced by LPS. 2015. 101p. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Aiming to produce a food having high contents of bioactive compounds, the gene pyramiding is a technique capable of stimulating the expression and accumulation of new classes of flavonoids in plant tissues, such as purple tomato, rich in anthocyanins. Anthocyanins may attenuate the inflammatory process by modulating the signaling cascade and expression of enzymes, which is one of the possible mechanisms of action that leads to health promotion, assigned to this class of compounds. The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory action of the purple tomato paste, obtained by pyramiding of genes Fruit Anthocyanin (Aft), Aubergine (Abg) and atrovioleaceum (atv) in mice submitted to peritonitis model induced by lipopolysaccharide (LPS). The tomato fruit - Micro Tom (MT) and the transformed were characterized according to their profile of phenolic compounds. The purple tomato peel, rich in anthocyanins, phenolics content presented ten times higher compared to the shell of the MT, and also provides increased amounts of ascorbic acid and antioxidant activity in the DPPH rated and the ORAC methods; than the pulp and peel the tomato pulp and purple tomatoes. The main flavonoids identified in tomato peel purple, by HPLC-DAD were: petunidin the anthocyanidins (86.5 mg / 100 g wb), delphinidin (6.85 mg / 100 g wb), especially in the acylated form, and flavonol rutin (106.26 mg / 100 g bu). The anti-inflammatory properties of the phenolic compounds was evaluated through a model of peritonitis in mice induced by LPS. The extract of purple tomato, rich in anthocyanins (2 and 4 petunidin mg eq. / 100 g body weight) was administered orally 30 minutes before the inflammatory stimulus. In the peritoneal exudate collected after 3 h of stimulation was observed in the group receiving 4 mg as compared to the LPS stimulated group, a significant reduction ($p < 0.05$) of about 37% in the number of total leukocytes and 64 % mRNA gene expression of COX-2 and production of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 and MCP-1), as well as a significant increase of the anti-inflammatory cytokine IL-10. In a study of absorption, the metabolites: aglycone delphinidin (m / z 303) and malvidin aglycone (m / z 331) were detected by HPLC - ESI-MS / MS, in liver samples from animals euthanized 30 minutes after administration the purple tomato extract. Therefore, the results show that anthocyanins present in the purple tomato, through the metabolites found in animal liver, exhibit anti-inflammatory activity by controlling the leukocyte influx, the modulation of gene expression of COX-2 and production cytokines.

Keywords: anthocyanins, purple tomatoes, petunidin, anti-inflammatory activity.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A realidade mundial revela que grande parte da população sofre de algum tipo de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2008, cerca de 63% das 57 milhões de mortes ocorridas no mundo foram decorrentes das DCNT, caracterizando-se uma importante questão de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (OMS, 2011; OLIVEIRA et al., 2009).

O Brasil que passa por uma significativa transição demográfica, nutricional e epidemiológica, desde os anos 60, segue a tendência mundial. De acordo com estudos atuais as DCNT são responsáveis por 74% das causas de mortes e por 75% dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde (SUS), além de atingirem prioritariamente os estratos mais pobres e grupos vulneráveis da população (OMS, 2011; BRASIL, 2011).

Uma maior oferta dietética de alimentos vegetais juntamente com escolhas de vida saudáveis e práticas regulares de exercícios físicos pode auxiliar na redução do risco de desenvolvimento das DCNT, tais como o câncer, a diabetes, a hipertensão arterial sistêmica e a hipercolesterolemia. A recomendação da OMS para ingestão diária de frutas, verduras e legumes é de 400 g fracionados em 5 porções, já que em suas projeções recentes é demonstrado que uma dieta inadequada no que se diz respeito ao consumo de vegetais é um dos fatores primordiais para o desenvolvimento de doenças em todo mundo (BRASIL, 2010).

Os vegetais possuem, além de nutrientes, compostos bioativos que podem atuar auxiliando na promoção à saúde através de diversos mecanismos, tais como antioxidantes, ação antiproliferativa e anti-inflamatória. Entre estes compostos os flavonoides despertam o interesse de diversos estudos que visam investigar o seu papel no organismo humano (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009).

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes no mundo, sua produção mundial em 2011 foi de cerca de 159 milhões de toneladas (FAO, 2014) (MES et al., 2008).

O vegetal é reconhecido pelo seu alto teor de licopeno, um carotenoide vermelho com diversos efeitos benéficos relacionados à saúde. Além disso, o

fruto contém teores significativos de compostos fenólicos, tais como os flavonoides e ácidos fenólicos, sendo comumente encontrados na forma de glicosídeos de quercetina, campferol e naringenina (SLIMESTAD & VERHUEL, 2009; GONZALI et al., 2009).

Entretanto, é possível obter-se frutos com teores significativos de outros compostos bioativos, tais como as antocianinas, através de processos de cruzamentos interespecíficos, ou piramidação, de algumas cultivares selvagens de tomate, originando frutos que possuem genes que aumentam a expressão do flavonoide, tais como o gene *Anthocyanin Fruit (Aft)*, *Aubergine (Abg)* e *atroviolaceum (atv)* (MES et al., 2008).

Portanto, tendo em vista que os alimentos vegetais contêm, além dos nutrientes básicos, compostos bioativos, destacando os flavonoides, que podem contribuir para a manutenção e promoção da saúde e, conseqüentemente, auxiliar na prevenção de DCNT e que o melhoramento convencional de plantas, através da piramidação de genes, pode ser uma ferramenta para o enriquecimento de alimentos largamente consumidos pela população, aumentando assim suas propriedades funcionais, o presente estudo avaliou as características físico-químicas do tomate roxo obtido por piramidação e a atividade anti-inflamatória do seu extrato fenólico em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FLAVONOIDES

2.1.1. Características estruturais

Estudos outorgam que os benefícios desempenhados pelos compostos bioativos estão relacionados com propriedades biológicas promotoras de saúde, tais como a ação anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e antioxidante, destacando-se as vitaminas A, E e C, bem como os compostos fenólicos (GARCÍA-TIRADO et al., 2012).

Os compostos fenólicos são moléculas amplamente distribuídas entre os vegetais, tais como frutas, hortaliças e cereais, cujas funções nas plantas são de pigmentação, fotoproteção e defesa contra agentes externos. Estes compostos constituem um grande grupo de moléculas que contribuem por uma parte considerável da dieta humana. Dentro deste grande grupo estão os ácidos fenólicos, os estilbenos, os taninos e os flavonoides (DORNAS et al., 2007).

Os flavonoides são compostos polifenólicos caracterizados por apresentarem 15 carbonos no seu núcleo fundamental, constituídos por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono que pode ou não formar um terceiro anel ($C_6-C_3-C_6$) (Figura 1) (DORNAS et al., 2007).

Figura 1: Estrutura básica dos flavonoides. Fonte: DORNAS et al., 2007.

As principais subclasses dos flavonoides podem ser diferenciadas com base na oxidação do anel pirano central e também pela posição do anel B em flavonols, flavonas, flavanol ou flavan-3-ol, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas (Figura 2) (CROZIER et al., 2009).

Os flavonoides são encontrados na forma aglicona ou conjugado à molécula de carboidrato (forma glicosilada). Em decorrência da glicosilação os flavonoides apresentam menor reatividade e maior solubilidade em água (SANTOS, 2009). Por mais que todos os grupos hidroxila possam ser glicosilados, as posições 3, 5 e 7 são as mais comumente encontradas, uma vez que correspondem às hidroxilas mais ácidas (CROZZIER et al., 2009).

A ingestão diária de flavonoides começou a ser debatida na década de 60 em vários países, variando de 3mg/dia na Finlândia a 65mg/dia no Japão (ARABBI et al., 2004). Já em 1976, nos Estados Unidos foi considerada uma ingestão diária de aproximadamente 1g, sendo que 160-175 mg seriam de flavonas, flavonona e flavonols, entretanto estes valores não podem ser considerados fidedignos, pois utilizaram técnicas hoje avaliadas como imprecisas e inadequadas. Atualmente, a ingestão diária de flavonoides totais, estimada para adultos americanos e espanhóis, é de 189,7 mg/dia (principalmente flavan-3-ol) e 313,26 mg/dia (principalmente procianidina), respectivamente (CHUN et al., 2007, ZAMORA-ROS et al., 2010). Com base em uma análise sobre o consumo de flavonols e flavonas em hortaliças e bebidas na população holandesa, realizado no período de 1987-1988, este foi estimado em 23mg/dia (ROSS & KASUM, 2002).

No Brasil, a ingestão média diária de flavonoides pela população foi estimada entre 60 a 106 mg/dia, quando considerada a divisão por sexo esta foi de 79 mg/dia para mulheres e 86 mg/dia para homens, sendo a maior parte glicosídeos de quercetina (ARABBI et al., 2004).

Flavonol

quercetina, kaempferol, miricetina

Cor: amarelo

Alimentos: couve, cebola e brócolis

Flavan-3-ol

catequina, epicatequina, galocatequina

Cor: incolor

Alimentos: chá verde, cacau e maçã

Flavona

apigenina, luteolina, diomestina

Cor: incolor

Alimentos: salsa, aipo, tomilho

Flavanona

naringenina, hesperidina

Cor: incolor ou amarelo

Alimentos: cítricos

Antocianidina

cianidina, malvidina, petunidina

Cor: azul

Alimentos: uva, morango e berinjela

Isoflavona

genisteína, daidzeína

Cor: incolor

Alimentos: soja, feijões e legumes

Chalcona

floretina

Cor: incolor

Alimentos: frutas

Figura 2. Classificação dos flavonoides em subclasses.

As antocianinas correspondem ao maior grupo de pigmentos naturais e possuem alta solubilidade em água. Até o momento, foram identificados mais de 635 tipos de antocianinas na natureza, sendo responsáveis pela pigmentação de vegetais, frutas e flores nas tonalidades de azul, roxo e vermelho. Nas plantas, apresentam função protetora contra os raios UV e atrativa para os animais dispersores de sementes e polinizadores (HE e GIUSTI, 2010).

As antocianinas podem ser encontradas na forma aglicona, nomeada antocianidina, ou na forma glicosilada. Em sua forma aglicona, as antocianidinas apresentam coloração acentuada quando em pH ácido e absorção máxima no espectro visível entre 465 e 550 nm. As antocianidinas mais comumente encontradas em frutas e hortaliças são: cianidina, peonidina, pelargonidina, petunidina, delphinidina e malvidina (Figura 3) (JAGNATH & CROZIER, 2010).

Figura 3. Estrutura básica das principais antocianidinas encontradas nos alimentos vegetais.

Antocianidinas	R1	R2	R3
<i>Cianidina</i>	OH	OH	H
<i>Peonidina</i>	OCH ₃	OH	H
<i>Delphinidina</i>	OH	OH	OH
<i>Malvidina</i>	OCH ₃	OH	OCH ₃
<i>Petunidina</i>	OCH ₃	OH	OH
<i>Pelargonidina</i>	H	OH	H

Diferentes tipos de açúcares podem ser conjugados às antocianidinas, sendo os principais, a glicose e ramnose, além disso, são encontrados glicosilados à galactose, arabinose, xilose, entre outros, podendo também, ser encontradas aciladas a ácidos orgânicos (TALL et al., 2003).

As antocianinas possuem efeitos no organismo humano. Em decorrência de sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-proliferativa, diversos estudos apontam que o consumo dietético de antocianinas presentes nos alimentos pode exercer efeitos positivos no controle a diversas DCNT, como o diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (BASSOLINO et al. 2013).

2.1.2. Biossíntese

Os flavonoides são produtos do metabolismo secundário dos vegetais, decorrente das vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato, a síntese dos flavonoides pode ser dividida de acordo com a interação de duas vias metabólicas distintas, a formação do anel aromático B se dá por uma unidade de um fenilpropanóide, sintetizado a partir do ácido p-cumárico, enquanto o anel A é um produto da condensação de três unidades de acetato (Figura 4) (CROZIER, et al 2009, SCHREIBEIR et al., 2011).

Através da união dos produtos da via do ácido chiquímico e acetato-malonato é formada a chalcona, principal precursor dos flavonoides. A junção do ácido chiquímico com uma molécula de fosfoenolpiruvato forma o ácido corísmico, responsável pela formação de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, que por sua vez, através da enzima fenilalanina amônio liase (PAL), responsável por retirar uma amônia da fenilalanina, forma o ácido cinâmico, que ao ser transformado em ácido *para*-cumárico, este por sua vez é alongado com três moléculas de malonil-CoA. O fechamento da estrutura, catalisada pela chalcona sintase (CHS), dá origem a chalcona (KARAM et al., 2013).

Figura 4. Rota biossintética dos flavonoides. PAL: fenilalanina amônio liase, CHS: chalcona sintetase.

2.1.3. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

O termo biodisponibilidade inicialmente era utilizado na área da farmacologia com a finalidade de estimar a quantidade que uma substância ativa era absorvida e alcançava seu sítio de ação. No decorrer da década de 1980 novas definições foram propostas, e gradativamente utilizada referindo-se à nutrição. Em 1984, O'Dell definiu biodisponibilidade como “a proporção do nutriente nos alimentos que é absorvida e utilizada nos processos de transporte, assimilação e conversão à forma biologicamente ativa” (COZZOLINO, 2011).

A ingestão diária de compostos fenólicos é de cerca de 1g/dia, sendo que 1/3 é correspondente à ingestão de flavonoides. Diversos fatores parecem influenciar na biodisponibilidade dos flavonoides, como a matriz alimentar, processamento ou interação com outros nutrientes, porém o fator de maior importância é a estrutura química apresentada pelo flavonoide (GEORGIEV et al., 2014).

As formas glicosiladas dos flavonoides são as mais comumente encontradas nos alimentos vegetais, geralmente conjugados aos açúcares glicose e ramnose. Em algumas classes de flavonoides, a deglicosilação é necessária para que o composto seja absorvido pela borda em escova das vilosidades intestinais, uma vez que somente a forma aglicona e os conjugados à glicose podem ser absorvidos no intestino delgado (KUMAR e PANDEY, 2013).

A Figura 5 esquematiza a via de absorção dos compostos fenólicos no organismo humano.

De acordo com recentes estudos, o metabolismo dos flavonoides pode ser iniciado já na cavidade oral, através de proteínas e enzimas presentes na saliva, como a β -glicosidase proveniente de bactérias e células epiteliais. Porém, a importância do papel da cavidade oral ainda é difícil de mensurar, uma vez que os alimentos tem um tempo curto de permanência no local. Uma vez no estômago, os flavonoides em sua forma aglicona são absorvidos por transporte passivo, enquanto os glicosilados podem ser absorvidos pela ação bilitranslocase expressa no epitélio estomacal (FERNANDES, et al., 2014).

Já na borda em escova do intestino delgado os glicosídeos podem ser absorvidos através de mecanismos que podem envolver transporte de membrana, associado ao transportador de glicose sódio-dependente (SGLT-1),

ou sofrem hidrólise pela ação da enzima lactase florizina hidrolase (LPH) liberando então as agliconas para serem absorvidas. Os glicosídeos resistentes às enzimas do intestino delgado, principalmente os ligados à ramnose, seguem para o cólon. (HRIBAR & ULRICH, 2014).

A microbiota colônica desempenha papel primordial na absorção dos flavonoides. Os glicosídeos que alcançam o cólon sofrem a ação de enzimas provenientes da microbiota local, como a β -glucoronidase, sofrem degradação e são absorvidos na forma de seus metabólitos (aglicona / ácidos fenólicos), via sistema porta-hepática (THILAKARATHNA & RUPASINGHE, 2013).

No enterócitos e/ou hepatócitos, os flavonoides e seus metabólitos (ácidos fenólicos) absorvidos podem sofrer o processo de conjugação. Tal processo pode ser por meio de metilação, sulfatação e/ou glucuronidação (conjugação ao ácido glucurônico), reações comuns aos xenobióticos a fim de aumentar sua hidrofilicidade e, por consequência, facilitando sua excreção (CROZIER et al., 2009).

Na corrente sanguínea os flavonoides são ligados às proteínas de transporte, como a albumina. Essa característica é fundamental no transporte plasmático, já que ao ligar-se à proteína, o flavonoide é distribuído por todo sistema. Entretanto, o modo no qual funciona o mecanismo de interação entre flavonoide-proteína ainda não é totalmente esclarecido (BOLLI et al., 2010).

A excreção pode ser realizada por meio da bile ou pelo sistema urinário. No rim, os flavonoides também podem sofrer conjugação e serem excretados pela urina. Já a excreção biliar pode contribuir pela reabsorção intestinal devido à ação enzimática bacteriana, alterando a meia vida dos flavonoides (BOHN, 2014).

Usualmente é atribuída às antocianinas uma baixa biodisponibilidade, sabe-se que cerca de 1% dos compostos absorvidos são encontrados na corrente sanguínea. Todavia, a maior parte dos estudos sobre a absorção de antocianinas envolvia apenas os compostos conjugados como metabólitos no sangue. Entretanto, os estudos mais recentes sugerem que os metabólitos das antocianinas possivelmente provenientes da fermentação microbiana, dentre eles os ácidos fenólicos (ácido protocatecuico, ferúlico, vanílico), podem ser encontrados no sangue (FERRARS et al. 2014).

Figura 5. Via da absorção dos flavonoides. SGLT-1: transporte de glicose sódio dependente-1. LPH: enzima lactase florizina hidrolase. (Adaptado de THILAKARATHNA & RUPASINGHE, 2013 e HRIBAR & ULRICH, 2014).

2.2. PROPRIEDADES DOS FLAVONOIDES

Estudos epidemiológicos apontam que o consumo de frutas e hortaliças assume efeito positivo na redução do risco de desenvolvimento de diversas doenças, como por exemplo, o câncer e doenças cardiovasculares. Este efeito protetor constatado é usualmente atribuído a uma diversidade de constituintes vegetais, como os compostos bioativos, dentre eles, os flavonoides; destacando-se a ação antioxidante e anti-inflamatória, porém, há escassez de informações que fundamentem tais mecanismos de ação no organismo humano (HOLDT & KRAAN, 2011).

2.2.1. Atividade antioxidante

A função das células depende do metabolismo oxidativo haja vista que os processos envolvidos possuem um papel fundamental no esquema de fluxo de elétrons e, por conseguinte, na obtenção de energia na forma de ATP (ROBARDS et al., 2002). Como seguimento a este processo metabólico se dá a produção de radicais livres, espécies que possuem um ou mais elétrons não pareados, e outras espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) que podem provocar danos oxidativos à macromoléculas, tais como o DNA ou lipídeos,. A formação intensa das EROs podem conduzir a saturação das enzimas antioxidantes endógenas tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), levando a injúria e possível morte celular (ABRAHIM et al., 2012).

Os compostos antioxidantes são elementos que, em pequena concentração, quando relacionados a um substrato oxidável pode inibir ou retardar a oxidação deste. Os antioxidantes dividem-se em primários, ou interruptor de cadeia, e secundários, ou preventivos (VEIGA, 2008). Os antioxidantes primários são caracterizados por compostos que podem agir diminuindo ou inibindo a fase inicial da reação em cadeia da oxidação lipídica ao reagir com radicais lipofílicos, ou inibindo a fase de propagação ao reagir com radicais peroxila ou alcoxila. Já os secundários, como o sulfito e fosfito, são aqueles que diminuem a velocidade da oxidação (ROBARDS et al., 2002).

Dentre os elementos naturais que possuem potencial antioxidante encontram-se os flavonoides. Estes compostos apresentam capacidade de capturar e neutralizar espécies oxidantes como radical superóxido, radical hidroxila e radical peróxido (SAHREEN et al., 2010).

Suas características físico-químicas lhes atribuem capacidade antioxidante. O átomo de hidrogênio do grupamento hidroxila presente na estrutura dos flavonoides pode ser doado ao radical livre, neutralizando-o (Figura 6). (ROSS e KASUM, 2002; HASSIMOTO, 2005).

Figura 6. Reação redox entre um flavonoide e um grupamento peroxil.

A participação dos flavonoides de maneira direta nos processos de oxirredução acarreta na conservação das enzimas antioxidantes endógenas e, conseqüentemente, incrementando o sistema antioxidante do organismo ao deixá-las livres para participar de processos posteriores. Além disso, os flavonoides podem se complexar a íons metálicos, tal como ferro, formando quelatos. (KUMARAPPAN , THILAGAM & MANDAL, 2012).

Deste modo, os flavonoides podem ser capazes de agir na neutralização dos radicais livres, reduzindo os danos sobre o DNA e outras macromoléculas, e através do controle de ERO/ERN auxiliam na expressão de genes que atuam nas vias sinalização celular (FERNADEZ-PANCHÓN et al., 2008; KUMARAPPAN, THILAGAM & MANDAL, 2012).

Estudos clínicos em humanos e em animais apontam que o consumo de alimentos ricos ou a forma isolada de compostos fenólicos podem aumentar a proteção antioxidante do organismo, também, de maneira indireta, através da

modulação das enzimas antioxidantes (KRAJKA-KUZNIAK et al., 2008; SARVESTANI et al., 2013; QUIRANTES-PINÉ et al., 2013).

Por exemplo, ao induzir a expressão da enzima glutathione S-transferase (GST), os flavonoides podem mitigar o estresse oxidativo ao preservar as células de possíveis danos causados pelos radicais livres, em especial o peróxido de hidrogênio (ROSS e KASUM, 2002).

Logo, acredita-se que o aumento do suporte ao sistema antioxidante pela modulação da expressão de enzimas antioxidantes ou, diretamente, pela neutralização de EROs, acarretaria em diminuição a danos em macromoléculas, e por consequência o risco de desenvolvimento de condições que favoreçam o surgimento de DCNT (DENIS et al., 2013).

2.2.2. Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório pode ser definido como o conjunto de modificações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas decorrentes de estímulos adversos ao organismo. Na fase aguda, cujo início se dá rapidamente após a agressão, há aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, com recrutamento de leucócitos no foco da lesão e liberação de mediadores inflamatórios. A passagem para a fase crônica é configurada pelo desenvolvimento da resposta humoral específica e da resposta imune celular (SILVA & MACEDO, 2011).

Em ambas as fases, os mediadores inflamatórios atuam localmente ou sistemicamente, ativando outras células relacionadas com o processo inflamatório, aumentando a resposta inicial ao agente danoso. A maneira pelo qual tais mediadores pró-inflamatórios conduzem à manifestação das DCNT aparenta englobar a diminuição da atividade insulínica, mobilização de gorduras, disfunção endotelial e estresse oxidativo (LAHOZA & MOSTAZAA, 2007).

Dentre os principais mediadores da inflamação, destacam-se as citocinas, os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), a histamina, o fator de ativação plaquetária, a bradicinina, o óxido nítrico e os neuropeptídeos (CALDER, 2009; COUTINHO et al., 2009; SILVA, 2012).

O ácido araquidônico é liberado pelos fosfolipídios das membranas celulares por meio de estímulos físicos/mecânicos, químicos ou através de outros mediadores, pela via de ativação da enzima fosfolipase A. Em sua forma livre, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas: pelas ciclo-oxigenases (COX), na forma COX-1 e COX-2, sendo que a isoforma COX-2 está estritamente relacionada à inflamação, iniciando a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (prostanoides); e pelas lipo-oxigenases (LOX), originando a síntese de leucotrienos (MARKWORTH & CAMERON-SMITH, 2012).

O óxido nítrico (NO), sintetizado pelas células endoteliais do tecido lesionado, apresenta potente atividade vasodilatadora, ocasionando uma maior permeabilidade vascular. Além disso, tem ação regulatória no recrutamento de leucócitos e função citotóxica contra micro-organismos. É produzido pela NO sintase (NOS), enzima que apresenta três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS) a relacionada às reações inflamatórias (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

As citocinas são liberadas de forma a controlar a ação das células imunes e inflamatórias. Dentre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1), que são liberadas por macrófagos ativados. Tais citocinas contribuem para a aderência leucocitária ao endotélio, aumento da síntese de prostaciclina e iniciam uma cascata de citocinas secundárias (quimiocinas). Já as citocinas secundárias atraem e ativam as células inflamatórias móveis, tais como o linfócito T (COUTINHO et al., 2009).

Diversos mediadores inflamatórios vêm sendo utilizados na prática clínica e em estudos associados à patogênese das DCNT como marcadores específicos do processo inflamatório, destacando-se as moléculas de adesão solúveis (E-selectina, P-selectina, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1)), e as citocinas TNF- α e as interleucinas (IL-1-beta, -6, -8, -10) (GERALDO & ALFENAS, 2008).

Estudos recentes demonstram que os flavonoides podem agir de forma anti-inflamatória, inibindo de maneira eficaz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e a interleucina6 (IL-6) (XIE et al., 2012).

Diversos estudos apontam que o consumo de flavonoides pode estar associado com a prevenção das DCNT, dentre elas, as doenças inflamatórias, como por exemplo, a aterosclerose (PALAFOX-CARLOS et al., 2011). A relação entre o processo inflamatório crônico e o desenvolvimento de doenças crônicas está exemplificada na Figura 7.

Figura 7. Relação entre o processo inflamatório crônico e o desenvolvimento de doenças crônicas (Adaptado de GERALDO & ALFENAS, 2008).
 TNF-α = fator de necrose tumoral α; IL = interleucina; ICAM-1 = molécula de adesão intracelular-1; VCAM-1 = molécula de adesão de célula vascular-1; MCP-1 = proteína quimiotática de monócito-1.

Segundo pesquisas recentes, algumas antocianinas têm demonstrado inibir o crescimento de células cancerosas, diminuir os níveis hiperglicêmicos e promover os efeitos antiobesidade. Além disso, as antocianinas possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Tais compostos tem demonstrado ação modulatória no processo de inflamação, dependente de COX-2, tanto em modelos experimentais *in vitro* quanto *in vivo* (HASSIMOTTO et al., 2012; LU et al., 2012; HWANG et al., 2011; BACHOUAL et al., 2011; ISHIMOTO et al., 2011; ROSILLO et al., 2012; HASSIMOTTO et al., 2013).

A atividade anti-inflamatória dos flavonoides consiste em modular células relacionadas com a inflamação (coibindo a proliferação de linfócitos T),

diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1, IL-6, IL-8), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂, COX e LOX, além de regularem a iNOS, enzima formadora de NO (COUTINHO et al., 2009; TSAO et al., 2012).

Outro fator relacionado à ação anti-inflamatória dos flavonoides seria a regulação da cascata de inflamação por meio de bloqueio da via de sinalização NF- κ B. A presença de agentes inflamatórios, tais como ácidos graxos saturados (AGS) e o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, induz a via de sinalização do fator nuclear *kappa* B, enquanto a presença de TNF- α induz tanto a via da proteína ativadora-1 (AP-1) quanto do NF- κ B. Ambas as vias resultam na ativação de genes que iniciam a produção de citocinas e enzimas pró-inflamatórias. Sugere-se que os flavonoides atuem bloqueando a fosforilação do I κ B α e AP-1 e consequentemente controlando a inflamação, conforme demonstrado na Figura 8 (QUILLIOT et al., 2005).

Assim, os flavonoides estão intimamente ligados ao processo de regulação dos sistemas oxidativos e inflamatórios através da estimulação do complexo enzimático e no controle da expressão de citocinas pró-inflamatórias. (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009) e a modulação destes processos poderia ser um dos mecanismos para a ação protetora à saúde, principalmente da redução do risco de desenvolvimentos de DCNT.

Figura 8. Possível papel dos flavonoides nas vias de sinalização da cascata inflamatória induzida por LPS/AGS.

LPS: lipolissacarídeo; AGS: ácido graxo saturado; TRL4: receptor do tipo Toll-4; IκBα: inibidor de κB; NF-κB: fator nuclear *kappa* B; TNF-α: fator de necrose tumoral α; TNFR: receptor de fator de necrose tumoral α; AP-1: proteína-1 ativadora; COX: ciclo-oxigenase; LOX: lipo-oxigenase; iNOS: óxido nítrico sintetase indutível; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8 .

2.3. TOMATE ROXO

O tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) é um dos vegetais mais consumidos no Brasil e no mundo. Segundo dados recentes, a produção brasileira do fruto em 2012 atingiu 3,8 milhões de toneladas, sendo os maiores produtores a China, EUA e Turquia. (FAO, 2014). O fruto do tomateiro é caracterizado por sua cor avermelhada, é rico em carotenoides, como o licopeno, mas também apresentam outros compostos bioativos, como os flavonoides (SLIMESTAD e VERHEUL, 2009)

Pertencente à família das solanáceas (berinjela, pimenta e batata-inglesa), o tomateiro é capaz de produzir frutos de diversas colorações, do verde ao amarelo, sendo o vermelho o mais reconhecido e apreciado. Todavia existem algumas espécies de tomateiros capazes de produzir tomates arroxeados, como por exemplo, o gênero *Solanum chilense* Dunal (GONZALI et al. 2009; JONES et al., 2003).

Entretanto, em alguns frutos denominados como “pretos” ou “roxos” tal coloração é decorrente de mutações que acarretam a degradação da clorofila e dos carotenoides, e neste caso, tal coloração não está relacionada com a produção pigmentos, tais como as antocianinas (MES et al., 2008; GONZALI et al., 2009).

A crescente importância dos compostos bioativos nos alimentos despertou o interesse dos pesquisadores sobre os mecanismos envolvidos na produção de flavonoides no tomate. Logo, foram realizados experimentos envolvendo duas linhas distintas: o melhoramento genético convencional (piramidação), onde cruzamentos interespecíficos entre gêneros da mesma espécie são cruzados com a finalidade de acumular uma característica desejada; e a transgenia, processo no qual ocorre inserção de genes de outra espécie a fim de que se obtenha um vegetal com características da espécie doadora (GONZALI et al., 2009; SCHREIBER et al., 2011).

Os primeiros genes estudados na obtenção do tomate roxo, através da piramidação, foram: *Anthocyanin Fruit (Aft)*, *Aubergine (Abg)* e *atroviolaceum (atv)*. O gene dominante *Aft*, identificado na espécie *S. chilense* é responsável pela pigmentação, principalmente da casca, quando o fruto é exposto à alta incidência de luz, semelhante ao gene *Abg*, obtido através da espécie *Solanum*

lycopersicoides Dunal. Já o gene recessivo *atv*, oriundo do *Solanum cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, é capaz de pigmentar toda a planta, em especial, os tecidos vegetativos (GONZALI et al. 2009; MES et al., 2008).

A piramidação de genes, ou cruzamentos interespecíficos, é um dos principais meios de obtenção do tomate roxo. Este processo consiste em cruzamento de tomates que possuam os genes interesse, resultando em um fruto com acumulação das características desejadas. A Figura 9 mostra um hipotético esquema de piramidação.

Figura 9. Piramidação de genes para obtenção do tomate roxo. Cada triângulo representa um tomate com gene interesse. Os tomates são cruzados para acúmulo das características desejadas, obtendo-se, no final do processo, o tomate roxo.

Certas enzimas podem estar relacionadas à expressão de antocianinas no tomate. O conhecimento da biossíntese dos flavonoides no tomate foi primordial na tentativa de identificar as enzimas de transcrição que auxiliam na produção de antocianinas. Apesar de obscuro, especula-se que alguma mutação genética no ancestral do tomate tenha ocasionado a não-expressão da enzima chalcona isomerase (CHI), o que explicaria o acúmulo de naringenina chalcona na casca do tomate (Figura 10) (POVERO et al., 2011; GONZALI et al. 2009).

Há duas classes de genes envolvidos na biossíntese de antocianinas: (1) os que codificam as enzimas que participam nas diversas etapas do processo (genes estruturais) e (2) os que regulam a expressão dos genes estruturais (genes reguladores). Assim sendo, a manipulação genética leva a uma

regulação dos genes responsáveis pela expressão de enzimas essenciais na produção de antocianinas. Os genes inseridos no processo de obtenção do tomate roxo piramidado atuam como genes reguladores acarretando na expressão das enzimas responsáveis pela produção de antocianinas (LI et al., 2011; GONZALI et al., 2009).

Figura 10. Rota biossintética das antocianinas no tomate roxo obtido por

piramidação dos genes *Aft*, *Abg* e *atv*. Nome dos compostos em *itálico* e nome das enzimas envolvidas em **negrito**. ANS, antocianidina sintase; CHI, chalcona isomerase; CHS, chalcona sintase; DFR, dihidroflavonol 4-redutase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; PAL, fenilalanina amônio liase.

3. OBJETIVO

Em virtude do crescente interesse sobre a relação entre os flavonoides e seus benefícios à saúde humana o presente trabalho teve como:

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação anti-inflamatória do extrato de tomate roxo, rico em antocianinas, obtido por melhoramento genético, em camundongos submetidos ao modelo de peritonite induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS).

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os compostos fenólicos do tomate roxo e do tomate vermelho MicroTom (MT);
- Avaliar a ação anti-inflamatória do extrato fenólico do tomate roxo (MT piramidado) em processo inflamatório induzido por LPS em camundongo;
- Correlacionar a absorção dos compostos fenólicos presentes no tomate roxo com a atividade anti-inflamatória.

4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO TOMATE ROXO

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. MATERIAL

4.1.1.1. Amostra

O tomate vermelho (*Solanum lycopersicon* cv Micro Tom) e o tomate roxo, MT piramidado com os genes *Aubergine* (*Abg*), *Anthocyan fruit* (*Aft*), *atroviolaceum* (*atv*), foram fornecidos pelo Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALq). O tomateiro foi mantido em estufa com irrigação automática (quatro vezes por dia), a temperatura média de 28 °C, fotoperíodo de 11,5 h/13 h (inverno/verão) e 250-350 mmol m⁻² s⁻¹ PAR irradiância (radiação natural reduzida com um malha refletora). Para os ensaios, foram obtidos cerca de 550 g de tomate roxo e 550 g de tomate vermelho, colhidos em novembro de 2013.

4.1.1.2. Preparo da amostra

Os tomates foram primeiramente higienizados em água corrente, cada fruto foi manualmente fracionado em polpa e casca, com auxílio de uma faca, e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. A proporção casca/polpa foi de 1/4. A casca e polpa do tomate roxo e vermelho foram trituradas em almofariz e pistilo juntamente com nitrogênio líquido. As frações foram mantidas em ultra-freezer à temperatura de -70°C até análise.

4.1.2. MÉTODOS

4.1.2.1. Extração de compostos fenólicos

Quantidades de aproximadamente 0,5 g de amostra foram homogeneizadas por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em metanol 70% (tomate MT) ou metanol/água/ácido acético (70:30:5 v/v) (tomate MT piramidado) O extrato assim obtido foi posteriormente mantido sob agitação a 300 rpm/30 min/4°C e

filtrado, obtendo-se assim o extrato fenólico. Este extrato foi utilizado para as análises de fenólicos totais e capacidade antioxidante. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.1.2.2. Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Swain e Hillis (1959), utilizando o reagente de Folin-ciocalteu e ácido gálico (AG) como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453) no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos como mg AG/g.

4.1.2.3. Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada pelas metodologias *Oxygen radical assay capacity* (ORAC) segundo protocolo descrito por DAVALOS et al. (2004) e pelo método sequestro do radical α,α -difênil- β -picrilhidrazina (DPPH) proposto por BRAND -WILLIAMS et al. (1995).

4.1.2.3.1. Método *Oxygen radical assay capacity* (ORAC)

No método ORAC todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,1. Foram utilizadas: solução de fluoresceína 40 nM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 2,2'-azobis 153 mM (2-amidinopropano) dihidrocloreto AAPH (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).

Aliquotas de 25 μ L de tampão (branco), ou 25 μ L de solução Trolox (curva de calibração) ou 25 μ L de extrato, devidamente diluída quando necessário, foram distribuídas em placa de 96 poços seguidas da adição automática de 150 μ L de solução de fluoresceína e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 25 μ L de AAPH seguido de agitação por 10 segundos. O decaimento da intensidade de fluorescência (485 nm_{ex} / 525 nm_{em}) foi realizado a cada 1 minuto durante 60 minutos de reação. A determinação de fluorescência foi realizada utilizando-se leitor de microplaca multidetecção Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

A capacidade antioxidante foi obtida através do cálculo da área abaixo da curva de uma amostra subtraindo-se da área correspondente à do branco e utilizando-se curva padrão de trolox, efetuada a cada ensaio, nas concentrações de 12,5 a 100 µM. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/g. A análise foi realizada em triplicata.

4.1.2.3.2. Método DPPH

Para o método DPPH, foi preparada uma solução metanólica de DPPH (0,05 mM) de modo que apresentasse absorvância aproximada de 0,4 em comprimento de onda a 517 nm. As leituras foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm, no qual cada cavidade foi preenchida com 200 µL da solução de DPPH, 40 µL de metanol como branco, ou o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox para a curva de calibração ou extratos das amostras, devidamente diluídos, quando necessário. A leitura de absorvância foi realizada a 517 nm, após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz, utilizando-se espectrofotômetro Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

A curva de calibração foi preparada com uma solução de Trolox em diferentes concentrações (20 - 70µM) e suas respectivas porcentagens de descoramento. Os cálculos utilizaram a seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoramento do DPPH} = \frac{A(\text{Branco}) - A(\text{Amostra})}{A(\text{Branco})} \times 100$$

onde, A (Branco) refere-se à absorvância do branco (metanol) A (Amostra) refere-se à absorvância da amostra. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/g amostra.

4.1.2.4. Extração de flavonoides

Quantidades de aproximadamente 1,5g para casca e 5g para polpa do tomate foram homogeneizadas por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em 100 mL de metanol 70% (tomate MT) ou metanol/água/ácido acético (70:30:5 v/v) (tomate MT piramidado),

filtradas à vácuo em funil de buchner, utilizando papel de filtro de qualitativo de 80g/m². O sedimento foi recuperado e realizado mais duas reextrações com 50 mL de metanol ou metanol acidificado. Os extratos assim obtidos foram agrupados obtendo-se e concentrados em rotaevaporador (Rotavapor® 120, Büchi, Flawil, Suíça) à temperatura de 40 °C até a remoção do metanol para a etapa de separação em fase sólida. As extrações foram realizadas em duplicata.

4.1.2.5. Extração de fase sólida

A amostra livre de metanol foi passada em coluna de 1 g de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Germany), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionada pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água destilada. Após aplicação do extrato, a coluna foi lavada com 20 mL de água e a eluição dos flavonoides foi feita com 50 mL de metanol acidificado com ácido clorídrico 0,1% (PRICE et al., 1999). O fluxo através da coluna foi controlado por meio de manifold (Visiprep 24 DL Supelco, Bellefonte, PA).

Os eluatos assim obtidos foram secos completamente em rotaevaporador a 40°C sob vácuo e ressuspensos em 1 mL de metanol (grau HPLC) ou metanol:ácido acético (95:5 v/v) para as amostras contendo antocianina, filtrados com membrana de PDVF para análise por CLAE-DAD e LC-ESI-MS/MS.

4.1.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – DAD

A quantificação e a identificação parcial dos flavonoides foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência. O cromatógrafo utilizado foi o da marca Agilent (modelo Infinity 1120), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software próprio da Agilent. A coluna utilizada foi a Prodigy 5 μ ODS₃ (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min, 25 °C, e a eluição sendo realizada com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5 % em água e B:acetonitrila adicionado de 0,5% ácido fórmico. O gradiente de concentração dos solventes consistiu em 8% de B no início, 10% em 5 min, 17% em 10 min, 25% em 15 min, 50% a 25 min, de 90% em 30 min, 50% em 32 minutos, 8% em 35 minutos (tempo de corrida, 35 min). A corrida foi

monitorada nos comprimentos de onda de 270 e 525 nm. A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção e similaridade com espectro de absorção de padrões comerciais e os espectros contidos na biblioteca do próprio equipamento, previamente inseridos no método. Para quantificação foram utilizados os padrões dos flavonoides petunidina, delphinidina e rutina e do ácido fenólico ácido clorogênico (derivados do ácido hidróxicinâmico) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, EUA). Os resultados foram expressos como mg de aglicona por 100 g de peso fresco.

4.1.2.7. LC-ESI-MS/MS

A identificação de flavonoides e outros compostos fenólicos foi conduzido em aparelho de cromatografia líquida modelo Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo íon trap, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha) (LC-MS, do inglês LiquidChromatography – Mass Spectrometry) e interface de ionização por electrospray (ESI, do inglês Electron spray Ionization). As condições de separação foram as mesmas utilizadas para a CLAE/DAD, descrito no item 4.1.1.5. Após a passagem pelo DAD, o fluxo foi alterado para 0,2 mL/min para a passagem no espectrômetro de massas. O ESI foi mantido em modo positivo para antocianinas e modo negativo para os demais flavonoides e ácidos fenólicos. O detector de massas foi programado para realizar full scan entre m/z 100-1000. A energia de ionização para o modo negativo foi de 3000 V e para o modo positivo de 3500 V.

A identidade dos compostos foi realizada pela comparação do espectro de massas obtido com o de padrões comerciais e/ou dados de literatura. Para a confirmação da identidade, comparou-se com o tempo de retenção de padrões comerciais.

4.1.2.8. Determinação de ácido ascórbico

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado após extração com ácido metafosfórico 0,3% e adicionado de ditioneitol (DTT) para a redução do ácido dehidroascórbico (PASTERNAK et al. 2005). A quantificação foi realizada por CLAE (Hewlett-Packard 1100, Agilent), em coluna μ Bondpack C18 (300mm x 3.9 mm i.d., Waters, Milford, MA). A fase móvel foi constituída de tampão KCl 2 mM, pH 2,5 com fluxo de 1,5 mL/min e a detecção realizada em 262 nm. O ácido ascórbico foi identificado a partir do tempo de retenção e identidade de espectro. O ácido dehidroascórbico foi calculado pela diferença entre o conteúdo de ácido ascórbico total (extrato tratado com DTT) e o conteúdo de ácido ascórbico reduzido (sem DTT).

4.1.2.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para verificação da normalidade da distribuição dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade das variâncias o teste de Levene (LEVENE, 1960). Para análise dos dados foi realizada Análise de Variância simples (One way ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software®, La Jolla, CA, EUA) sendo estabelecido $p < 0,05$ para significância estatística.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações, polpa e casca, do tomate roxo piramidado e tomate vermelho-MT foram analisadas quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante, avaliada pelos métodos DPPH e ORAC (Tabela 01).

Tabela 01. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e ORAC de tomate roxo, obtido por piramidação dos genes *Aft*, *Abg* e *atv*, e de tomate vermelho-Micro Tom.

		Fenólicos totais ¹	DPPH ²	ORAC ²
Tomate roxo	casca	38,16 ^A ± 0,68	13,27 ^A ± 0,29	128,12 ^A ± 5,80
	polpa	1,71 ^C ± 0,06	2,18 ^C ± 0,09	13,55 ^C ± 0,24
Tomate vermelho	casca	3,85 ^B ± 0,21	4,37 ^B ± 0,31	29,99 ^B ± 1,64
	polpa	1,65 ^C ± 0,05	2,84 ^C ± 0,21	11,18 ^C ± 0,84

¹ Expresso como mg AG eq./g, ² Expresso como µmol Trolox eq./g. Resultados expressos como média ± DP, ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc*. ^{A/B} (p < 0,05) quando comparados com os valores correspondentes da casca do tomate vermelho e roxo. ^{C/D} (p < 0,05) quando comparados com os valores correspondentes da polpa do tomate vermelho e roxo.

Em relação ao conteúdo de fenólicos totais, o maior concentração foi apresentado na casca do tomate roxo, 38,16 mg AG eq./g, teor dez vezes maior (p < 0,05) quando comparado com a casca do tomate vermelho, 3,85 mg AG eq./g. Já em relação à polpa, os valores apresentados são estatisticamente iguais em ambos os tomates.

O mesmo padrão é destacado quando observados os resultados de capacidade antioxidante da casca do tomate roxo, onde os valores de 13,27 µmol Trolox eq/g e 128,12 µmol Trolox eq/g avaliados pelos métodos DPPH e ORAC

respectivamente, foram significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparado à capacidade antioxidante da casca do tomate vermelho. Novamente, não se observou diferença significativa para a capacidade antioxidante da polpa do tomate vermelho e tomate roxo.

Considerando que a proporção de casca/polpa do tomate roxo piramidado é de 1/4, os valores da Tabela 01 ajustados para ORAC ($42,19 \mu\text{mol Trolox eq./g}$) e fenólicos totais ($10,82 \text{ mg AG eq./g}$) foram inferiores e superiores, respectivamente, quando comparados aos resultados encontrados por Li et al. (2011), nos quais os valores descritos para uma variedade diferente de tomate roxo foram de $6,59 \text{ mg AG eq./g}$ para fenólicos totais e $323,23 \mu\text{mol Trolox eq./g}$ para ORAC, valores representados em base seca .

Em relação ao conteúdo de ácido ascórbico (AsA), a casca e a polpa do tomate roxo apresentaram valores superiores quando comparado ao do tomate vermelho ($p < 0,05$) (Tabela 02). Por conseguinte, a piramidação dos genes pode ter, também, ocasionado acúmulo de ácido ascórbico no tomate roxo.

Tabela 02. Conteúdo de ácido ascórbico de tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* e de tomate vermelho-Micro Tom.

		ácido ascórbico reduzido	ácido ascórbico oxidado	Total
Tomate roxo	casca	12,51 ± 0,31	2,60 ± 0,16	15,11 ^{A#} ± 0,02
	polpa	10,41 ± 0,23	1,50 ± 0,04	11,91 ^{D#} ± 0,24
Tomate vermelho	casca	6,25 ± 0,28	1,74 ± 0,10	7,99 ^{B*} ± 0,29
	polpa	6,3 ± 0,15	0,56 ± 0,003	6,86 ^{C*} ± 0,16

Valores expressos como mg/100g. Resultados expressos como média ± DP, ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc*. ^{A/B}(p < 0,05) quando comparados com os valores correspondentes da casca do tomate vermelho e roxo. ^{C/D}(p < 0,05) quando comparados com os valores correspondentes da polpa do tomate vermelho e roxo. [#](p < 0,05) quando comparados com os valores correspondentes da casca e polpa do tomate roxo. ^{*}(p < 0,05) quando comparados com os valores correspondentes da casca e polpa do tomate vermelho.

Os valores de AsA total apresentado pelo tomate roxo e vermelho-, estão abaixo dos valores apresentados pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – Unicamp, para tomate comercial, que foi de 21,2 mg/100g; e 34,3 mg/100g apresentados pela e Tabela de Composição Nutricional de Hortaliças – EMBRAPA. A inferioridade dos valores apresentados pelo tomate MT poderia ser explicada pela diferença na escolha da amostra, uma vez que, as variedades utilizadas como amostras para confecção das tabelas são de uma cultivar diferente da MT.

No que concerne aos flavonoides presentes no tomate roxo, os principais flavonoides identificados na casca, por CLAE-DAD, foram as antocianidinas petunidina, delphinidina e o flavonol quercetina. Já os compostos detectados na polpa foram a quercetina e derivado do ácido hidroxicinâmico, não sendo foi possível quantificar o conteúdo de antocianidinas na polpa (Tabela 03).

Tabela 03. Conteúdo dos flavonoides e ácidos fenólicos do tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv*.

	petunidina	delfinidina	quercetina	ácido hidroxicinâmico
casca	86,5 ± 4,91	6,85 ± 0,5	106,25 ^A ± 10,08	ND
polpa	Tr	ND	1,22 ^B ± 0,08	1,86 ± 0,07

Resultados expresso como mg/100g, média ± DP, ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc*. ^{A/B}($p < 0,05$) quando comparados com os valores correspondentes da casca e polpa do tomate roxo. Tr: traço, nd: não identificado.

Nota-se que o flavonoide mais abundante é a quercetina, representando mais de 50% do conteúdo total dos flavonoides da casca. Entretanto, a concentração de antocianidinas na casca é sensivelmente superior ao da polpa.

Os cromatogramas com os perfis dos flavonoides da casca e polpa do tomate roxo piramidado estão apresentados na Figura 11.

Na casca foram encontrados dois derivados de delfinidina, um derivado de petunidina e um derivado de quercetina, enquanto na polpa foram encontrados um derivado de petunidina, um derivado de quercetina e um derivado do ácido hidroxicinâmico.

Figura 11. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (270 nm) dos flavonoides presentes na casca (A) e polpa (B) do tomate roxo. Picos: 1A – Delfinidina, 1B- Petunidina, 2 - Petunidina, 3 – Quercetina, 4 – Ácido hidroxicinâmico, 5 e 6 – Ácido cafeico, 7 – ácido feruloilquínico, 8 – Malvidina.

A composição de antocianinas da casca de tomate roxo foi caracterizada pela presença de três agliconas, entre elas a petunidina (m/z 317), delfinidina (m/z 303) e malvidina (m/z 331), além de um flavonol, a quercetina (m/z 303) (Figura 12). As antocianinas se apresentaram principalmente na forma acilada e ácidos fenólicos (Tabela 04).

Figura 12. Principais compostos fenólicos encontrados no tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv*.

Petunidina
(*m/z* 317)

Delphinidina
(*m/z* 303)

Malvidina
(*m/z* 331)

**Quercetina 3-
O-rutinosídeo**
(*m/z* 601)

Ácido cafeico
(*m/z* 179)

Tabela 04. Composição de compostos fenólicos da casca do tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* identificados por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo.

Pico	RT (min)	Íon molecular	MS ² (m/z)	Composto proposto
1A	16,8	933	771/479/317	petunidina- (<i>p</i> -coumaroil)-rutinosídeo- hexosídeo
1B	16,8	919	757/465/303	delfinidina 3-O- (<i>p</i> -coumaroil)-rutinosídeo-5-O- glicosídeo
2B	18,4	933	771/479/317/301	petunidina- (<i>p</i> -coumaroil)-rutinosídeo- hexosídeo
2C	18,8	963	801/625/479/317/301	petunidina 3-O-(cafeoil)- rutinosídeo-5-O-glicosídeo
3	19,9	611	465/303	*quercetina-3-O-rutinosídeo
8	20,0	947	785/493/331	malvidina 3-O- (<i>p</i> -coumaroil)-rutinosídeo-5-O- glicosídeo

*Identidade confirmada pela co-eluição com padrão comercial.

A Figura 13 apresenta os compostos fenólicos da casca do tomate roxo juntamente com seus fragmentos identificados em LC-ESI-MS/MS.

A antocianidina predominante na casca (pico 2B) foi identificada como petunidina-(*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo, apresentando íon molecular a m/z 933 e fragmentos MS² 771 [M-162]⁺, 479 [H-454]⁺ e 317 [H-454-162]⁺. Neste caso, a perda do fragmento 162 u e 454 u, respectivamente, corresponde a uma unidade de hexose e uma unidade de coumaroil-rutinosídeo (146 u + 308 u), e o fragmento a m/z 317 é característico da aglicona petunidina. O mesmo padrão de fragmentação foi observado para o pico 1A (Figura 12 A e C, respectivamente), provavelmente um isômero.

O segundo composto majoritário encontrado na casca (pico 3) foi identificado como quercetina 3-rutinosídeo, apresentando íon molecular a m/z 611 e fragmento MS² a m/z 465 e m/z 303 (Figura 12 E). Neste caso a perda do fragmento 146 u e 162 u corresponde a um resíduo de ramnose e hexose, respectivamente. Este flavonol teve sua identidade confirmada pela co-eluição com o padrão comercial.

Os compostos identificados como pico 1A e 1B se apresentaram co-eluídos. O mesmo ocorrendo para os compostos 3 e 8.

Figura 13. Espectro de massas (MS^2) de Flavonoides encontrados na casca do tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* obtidos por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo. Sendo: petunidina- (p-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo (A) delfinidina 3-O-(p-coumaroil)-rutinosídeo-5-O-glicosídeo (B), petunidina- (p-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo (C), petunidina 3-O-(cafeoil)-rutinosídeo-5-O-glicosídeo (D), quercetina-3-O-rutinosídeo (E) e malvidina 3-O-(p-coumaroil)-rutinosídeo-5-O-glicosídeo (F).

Os compostos identificados na polpa através de CL-MS foram derivados do ácido cafeico (m/z 179/529/734), ácido feruloilquínico (m/z 367).

Tabela 05. Composição de compostos fenólicos da polpa do tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* detectados por LC-ESI-MS/MS, em modo negativo.

Pico	RT (min)	Íon molecular	Fragmentos dos íons negativos (m/z)	Composto proposto
4	7	683	341/179	ácido cafeico (dímero)
5A	11,4	179	-	ácido cafeico
5B	12,1	771	609/301	quercetina-3-O- rutinosídeo- hexosídeo
6	15,6	529	367/179	ácido cafeico- hexosídeo
7	17,2	367	161	ácido feruloilquínico
3	19,9	609	301/179	*quercetina-3-O- rutinosídeo

*Identidade confirmada pela co-eluição com padrão comercial.

A Figura 14 apresenta os compostos fenólicos da polpa do tomate roxo juntamente com seus fragmentos identificados em LC-ESI-MS/MS.

O composto majoritário encontrado na polpa (pico 4) foi identificado como um dímero de ácido cafeico-hexosídeo, apresentando íon molecular a m/z 683 e fragmento MS² a m/z 341 [M-341]⁻ e m/z 179 (Figura 14 A), correspondendo a fragmento 162 u e 179 u, respectivamente, corresponde a uma unidade de hexose e uma unidade de íon de ácido cafeico, respectivamente. Sendo os derivados caracterizados com íon de ácido cafeico (pico 5) (Figura 14 B) e um ácido cafeico glicosilado (pico 6) (Figura 14 D).

Assim como na casca, o segundo composto majoritário encontrado na polpa (pico 3) foi identificado como quercetina 3-O-rutinosídeo, apresentando íon molecular a m/z 609 e fragmento MS^2 a m/z 301 e m/z 179 (Figura 14 E).

Os compostos identificados como pico 5A e 5B se apresentaram co-eluídos.

Figura 14. Espectro de massas (MS^2) de Flavonoides encontrados na polpa do tomate roxo obtidos por LC-ESI-MS/MS, em modo negativo. Sendo: ácido cafeico dímero (A), ácido cafeico (B), quercetina-3-O-rutinosídeo-hexosídeo (C), ácido cafeico-hexosídeo (D), ácido feruloilquínico (E) e quercetina-3-O-rutinosídeo (F).

A Figura 15 apresenta os cromatogramas obtidos da casca e polpa do tomate MT.

Figura 15. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (270 nm) dos flavonoides presentes na casca (A) e polpa (B) do tomate vermelho. Picos: 1 – Quercetina dihexose, 2 - Quercetina, 3 – Luteolina, 4 – Naringenina-glicosídeo, 5 Naringenina-glicosídeo-ramnosídeo, 6 – Ácido cafeico, 7 – Naringenina chalcona, 8 – Ácido feruloilquínico.

No tomate vermelho MT, os principais flavonoides identificados na casca, por CLAE-DAD, foram os flavonols quercetina e luteolina. Já os compostos apresentados na polpa foram quercetina e derivado do ácido hidroxicinâmico (Tabela 06).

Tabela 06. Conteúdo dos flavonoides e ácidos fenólicos do tomate vermelho MT.

	luteolina	naringenina	quercetina	ácido hidroxicinâmico
casca	5,62 ± 0,19	10,48 ± 0,41	73,3 ^A ± 2,26	ND
polpa	Tr	Tr	0,57 ^B ± 0,05	0,79 ± 0,83

Resultados expresso como mg/100g, média ± DP, ANOVA e Teste de Tukey como *post-hoc*. ^{A/B}($p < 0,05$) quando comparados com os valores correspondentes da casca e polpa do tomate roxo. Tr: traço, nd: não identificado.

Assim como no tomate roxo piramidado, a quercetina foi o flavonoide mais abundante no tomate MT.

A Figura 16 apresenta os espectros de massas dos flavonoides da casca do tomate vermelho identificados em CL-MS.

Os flavonoides predominantes na casca do tomate vermelho foram identificada como: naringenina chalcona, com íon molecular a m/z 273, miricetina aglicona, com íon molecular a m/z 319 e glicosídeos de luteolina e naringenina (Tabela 07).

Sendo que o luteolina-glicosídeo-ramnosídeo apresentou íon molecular a m/z 595 e fragmentos MS^2 287 $[M-146-162]^+$. Neste caso, a perda do fragmento 146 u e 162 u, respectivamente, corresponde a uma unidade de ramnose e uma unidade de hexose.

Já a naringenina-O-hexosídeo, apresentou íon molecular a m/z 435 e fragmentos MS^2 273 $[M-162]^+$. Representando nesse caso, a perda do fragmento 162 u correspondendo a uma unidade de hexose.

O segundo composto majoritário encontrado na casca, assim como no tomate roxo, também foi identificado como quercetina 3-rutinosídeo, apresentando íon molecular a m/z 611 e fragmento MS^2 a m/z 465 e m/z 303. Sendo a perda do fragmento 146 u e 162 u corresponde a um resíduo de ramnose e hexose, respectivamente.

Tabela 07. Composição de compostos fenólicos da casca do tomate vermelho detectados por LC-MS em modo positivo.

Pico	RT (min)	Íon molecular	MS^2 (m/z)	Composto proposto
1	12	771	465/303	Quercetina dihexose
2	15,9	273	-	Naringenina chalcona
3	19,9	611	465/303	Quercetina 3-rutinosídeo
4	22,8	595	449/287	Luteolina-glicosídeo-ramnosídeo
5	25,4	435	273	Naringenina-hexosídeo
9	40,1	579	417/273	Naringenina-hexosídeo-ramnosídeo

Figura 16. Espectro de massas (MS^2) de flavonoides encontrados na casca do tomate vermelho obtidos por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo. Sendo: Quercetina dihexose (A), Quercetina 3-rutinosídeo (B), Naringenina chalcona (C), Luteolina-glicosídeo-ramnosídeo (D), Naringenina-hexosídeo-ramnosídeo (E) e Naringenina-hexosídeo (F).

Tabela 08. Composição de compostos fenólicos da polpa do tomate vermelho detectados por LC-MS em modo positivo.

Pico	RT (min)	Íon molecular	MS ² (m/z)	Composto proposto
6	11,4	181	-	Ácido cafeico
7	15,9	273	-	Naringenina chalcona
8	17,3	369	163	Ácido feruloilquínico
2	19,9	611	465/303	Quercetina 3-rutinosídeo

Em relação à polpa do tomate vermelho, os principais compostos fenólicos identificados foi o ácido cafeico (m/z 181), sendo os compostos que se diferenciaram da casca do tomate vermelho. Também foram identificados na polpa naringenina chalcona e o glicosídeo de luteolina (Tabela 08).

Os mesmos compostos identificados no tomate roxo, sendo um derivado de ácido feruloilquínico e um de quercetina, foram encontrados no MT.

Figura 17. Espectro de massas (MS^2) de flavonoides encontrados na polpa do tomate vermelho obtidos por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo. Sendo: ácido cafeico (A), ácido feruloilquínico (B), naringenina chalcona (C) e quercetina-3-O-rutinosídeo (D).

A Figura 18 mostra o comparativo entre os dois tipos de tomate analisados. Nota-se uma maior concentração de antocianinas na casca em relação ao tomate vermelho.

Figura 18. Comparação entre tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* (A) e tomate vermelho- MT (B).

De acordo com os resultados obtidos, o gene *atv* não se mostrou eficiente em acumular antocianinas na polpa, visto que só foi detectado em quantidade traços. Entretanto, estudo anterior, como o de Sestari et al. (2014), demonstrou que uma variante de tomate piramidado somente com os genes *Aft/Abg* apresentou menor teor de antocianinas total em relação ao tomate piramidados com os três genes, logo, a adição do gene *atv* parece também contribuir para o aumento do conteúdo de antocianinas. Também neste estudo, o perfil fenólico encontrado foi semelhante, tanto para o tomate roxo piramidado, quanto para o MT.

O aumento da concentração das antocianinas, principalmente na casca, corrobora com a não detecção de naringenina no tomate roxo, uma vez que na rota biossintética desta classe nos fruto do tomateiro a flavonona serve como substrato para a produção das antocianinas, como demonstrado na Figura 10.

Estudos que envolvem a manipulação genética para obtenção de tomate roxo, embora escassos, apontam que a inserção de genes no fruto provoca

acúmulo de antocianidinas, principalmente na casca. Dentre as antocianinas comumente encontradas estão: petunidina, delphinidina e malvidina (JONES et al., 2003; MES et al., 2008; WILLITS et al., 2005; GONZALI et al., 2009; SCHREIBER et al., 2011; LI et al., 2011).

O total de antocianinas presentes no tomate roxo piramidado, considerando a proporção casca/polpa, é de 23,34 mg/100g de fruto, sendo a petunidina 3-O-(*p*-coumaroyl)-rutinosídeo-5-O-glicosídeo a principal fonte. O tomate roxo apresenta valores inferiores de antocianinas totais quando comparados com outros frutos, como, por exemplo, o mirtilo que apresenta 28,2 mg/100g (NICOUE et al., 2007). Porém, o tomate roxo pode ser considerado como uma potencial fonte de petunidina, pois possui teores semelhantes ao do mirtilo (29 mg/100g) (Phenol-Database). Segundo He e Giusti (2010), a petunidina corresponde a cerca de 5% do total de antocianinas ingeridas uma vez que não é comumente encontrada nos alimentos vegetais, porém podem ser encontradas em na uva, no vinho e na *cranberry* (Phenol-Database).

Entretanto, ponderando que o consumo de tomate é maior quando comparado ao de frutas sazonais, a produção em escala comercial de um alimento frequentemente consumido que apresente características que possam trazer benefícios à saúde é uma estratégia atraente quando pretendido um aumento no consumo de compostos bioativos.

Logo, pode-se inferir que a inserção dos genes *Aft*, *Abg* e *atv* no processo de obtenção do tomate roxo foi responsável por aumentar o conteúdo de antocianinas, principalmente na casca, quando comparado com o tomate vermelho-MT.

5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO FENÓLICO DE TOMATE ROXO

5.1. MÉTODOS

5.1.1. Preparação do extrato aquoso

A amostra (cerca de 5 g, respeitando a proporção de 3 partes de polpa para 1 de casca) foi extraído três vezes com 100 mL de metanol : água : ácido acético (70:30:5, v:v:v) com auxílio de um Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça). O extrato foi filtrado sob pressão reduzida através de papel de filtro (Whatman número 06), sendo o extrato metanólico obtido concentrado, sob vácuo, utilizando um evaporador rotativo (Rotavapor RE 120, Buchi, Flawil, Suécia) e ressuspendido em 50 mL com água destilada. Na etapa seguinte, 25 mL do extrato foram passados em coluna de 10g de poliamida (CC-6, acherey - Nagel, Alemanha) em uma seringa de 60 mL, previamente condicionado com 50 mL de metanol e 100 mL de água destilada. As impurezas foram lavadas com água destilada e os flavonoides remanescentes foram eluidos com 120 mL de metanol acidificado com ácido clorídrico a 0,1%. O eluato resultante foi evaporado até secar, sob pressão reduzida, a 40°C e dissolvido em água destilada (EA), antes de administração aos animais.

5.1.2. Delineamento experimental

Foram utilizados camundongos Balb C machos, de peso compreendido entre 18 e 20 gramas (6 semanas de idade), obtidos do Biotério da FCF. Os camundongos foram mantidos sob condições padronizadas, em salas com temperatura entre 23 a 25°C e ciclo de claro escuro de 12 h, com alimentação e água *ad libitum*. Protocolo nº 430 na Comissão de Ética do Uso de Animais, FCF-USP.

5.1.2.1. Estudo de inflamação

Para estudo de inflamação, os animais (n=10/grupo) foram mantidos em jejum por 6 h e submetidos aos tratamentos abaixo:

Grupo 2mg (G2): Os animais receberam 200 µL de EA (concentração 2 mg petunidina eq./100 g peso corpóreo), por via oral 30 min antes da injeção intraperitoneal de 500 µL de LPS (0,2 µg).

Grupo 4mg (G4): Os animais receberam 200 µL de EA (concentração 4 mg petunidina eq./100 g peso corpóreo), por via oral 30 min antes da injeção intraperitoneal de 500 µL de LPS (0,2 µg).

Grupo Salina (GS): Os animais receberam 200 µL solução salina por via oral 30 min antes da injeção intraperitoneal de 500 µL de LPS (0,2 µg).

Grupo Salina controle (GSC): Os animais receberam 200 µL de solução salina por via oral 30 min antes da injeção intraperitoneal de 500 µL de salina.

Grupo Controle (GC): Os animais receberam 200 µL de dexametasona (40 µg/20 g de peso corpóreo) por via oral 30 min antes da injeção intraperitoneal de 500 µL de LPS (0,2 µg).

Três horas após a injeção de LPS, os animais foram submetidos à eutanásia pela exposição a CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 2 mL de salina estéril. Após a coleta do exsudato e homogeneização do líquido de lavagem, uma alíquota foi diluída em solução de Turk (1:20; v/v), para a contagem do número total de leucócitos, em câmara de Neubauer e microscopia de luz.

Duas outras alíquotas de 1x10⁶ células foram centrifugadas a 800 g/6 min/22 °C. O precipitado de leucócitos foi usado na análise de expressão de COX-2 por Real Time-PCR. O sobrenadante foi acondicionado em ultrafreezer -70°C e será utilizado para a quantificação de citocinas.

Para a contagem de células diferenciais, uma alíquota foi concentrada em cytospin (Tharmac) e corada com hematoxilina e eosina. A contagem diferencial foi realizada através da contagem de pelo menos 100 células, que foram classificadas como polimorfonucleares ou mononucleares, com base em critérios morfológicos convencionais em microscópio óptico.

5.1.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As células (3×10^6) foram lavadas uma vez com solução salina estéril e então misturadas a 500 μ L de reagente Trizol (Invitrogen, Rockville, MD, EUA) e o RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando um sistema Improm-II de Transcrição Reversa (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e conduzidos a um termociclador Gene Amp (PCR System 2400, Applied Biosystems). A PCR foi realizada por desnaturação a 94°C durante 60 s, emparelhamento a 57°C (COX-2) e 60°C (GADPH) durante 1 min e, por extensão, a 72°C durante 60 s.

Foram utilizados para a amplificação do cDNA trinta ciclos adicionais para COX-2 e 25 ciclos para a GADPH. Os pares de iniciadores usados para análise foram: 5'-TTTGTTGAGTCGTTCCGGACGGA-3' e 5'-CGGTATTGAGGAGAAGAGATGGGATT-3' para os iniciadores sense e anti-sense do gene da COX-2, respectivamente, 5'-TGGAATCCTGTGGCGTCCGTGAAAC-3' e 5'TAAAACGCGGCTCGGTAACGGTCCG-3' para os iniciadores com sense e anti-sense do gene GADPH, respectivamente, utilizado como um controle interno.

5.1.4. Determinação da concentração de citocinas do exsudato peritoneal

As concentrações das citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, MCP-1, MKC e TNF- α) foram quantificadas por meio do *kit* Milliplex (Millipore Ltd., Bedford, EUA). O *kit* constitui-se em imunoensaio e na tecnologia LuminexTM MAGPlex no qual anticorpos de captura específicos para cada analito estão fixados à microesferas (*beads*) através de ligações covalentes não reversíveis. Estas microesferas são coradas com proporções diferentes de dois fluoróforos, atribuindo códigos de cores distintos. Após que o analito se agrega aos anticorpos de captura situados na superfície das microesferas, a fixação final é feita por meio de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) conjugada ao anticorpo de detecção. Então, o equipamento Luminex 200 move as esferas em fila única por meio de feixes de dois lasers diferentes em citômetro de fluxo.

O primeiro feixe de laser detecta e classifica a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal transmitido por cada microesfera.

5.1.5. Estudo de absorção

Já para o estudo de absorção, o seguinte modelo de estudo foi realizado para avaliar a absorção dos compostos fenólicos presentes no tomate roxo.

Os animais foram mantidos em jejum por 6 h e submetidos aos tratamentos abaixo:

Grupo 0: os animais (n=5) foram imediatamente eutanasiados após receberem 200 µL de solução salina por via oral.

Grupo 30 minutos: os animais (n=8) foram eutanasiados 30 minutos após receberem 200 µL de EA (concentração 4 mg petunidina eq./100 g peso corpóreo) por via oral.

Grupo 1 hora: os animais (n=8) foram eutanasiados 1 hora após receberem 200 µL de EA (concentração 4 mg petunidina eq./100 g peso corpóreo) por via oral.

Grupo 3 horas: os animais (n=8) foram eutanasiados 3 horas após receberem 200 µL de EA (concentração 4 mg petunidina eq./100 g peso corpóreo) por via oral.

Foram coletadas amostras de sangue e fígado de todos os animais. O sangue foi coletado em microtubos contendo EDTA através de punção submandibular causando a eutanásia dos animais por hipovolemia. Os microtubos foram armazenados em gelo até posterior processamento. Após eutanásia, os animais foram fixados em uma superfície de isopor onde tiveram a cavidade torácica aberta com auxílio de tesoura cirúrgica para retirada do fígado, sendo este lavado em solução salina estéril, pesado em papel alumínio previamente identificado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

5.1.6. Extração de flavonoides do fígado de camundongo

O fígado de cada animal foi homogeneizado por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em 100 mL de metanol/água/ácido acético (70:30:5 v/v), centrifugadas em 500 rpm/1 min/22 °C.

O sedimento foi recuperado e realizado mais duas reextrações com 50 mL de metanol ou metanol acidificado. Os extratos assim obtidos foram agrupados obtendo-se e concentrados em rotaevaporador (Rotavapor® 120, Büchi, Flawil, Suíça) à temperatura de 40 °C até a remoção do metanol para a etapa de separação em fase sólida, semelhantes ao item 4.1.2.5. As condições de análise por CLAE-DAD e LS-MS/MS foram as mesmas dos itens 4.1.2.6. e 4.1.2.7., respectivamente.

5.1.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para verificação da normalidade da distribuição dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade das variâncias o teste de Levene (LEVENE, 1960). Para análise dos dados foi realizada Análise de Variância simples (One way ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias. As análises foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0* (*Graph Pad Software*®, La Jolla, CA, EUA). Sendo estabelecido $p < 0,05$ para significância estatística.

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1. Influxo leucocitário

De acordo com os resultados obtidos na caracterização do tomate roxo, foi proposto um estudo de atividade anti-inflamatória do extrato fenólico, utilizando um modelo de peritonite, em camundongos, induzida pelo LPS; sendo o extrato fenólico administrado, por via oral, nas concentrações de 2 e 4 mg petunidina eq./100 g peso corpóreo.

A Figura 19 apresenta o comportamento do influxo leucocitário na cavidade peritoneal dos animais tratados.

A administração intraperitoneal de LPS resultou em um incremento na permeabilidade vascular dos capilares, ocasionando em acréscimo de 65% neutrófilos no infiltrado celular, já que o influxo leucocitário no grupo salina (com estímulo de LPS-GS) apresentou média $115,63 \pm 10,84 \times 10^5$ células/mL e o grupo salina controle (sem estímulo de LPS-GSC) $69,38 \pm 9,8 \times 10^5$ células/mL.

Observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 37% no número de leucócitos totais no exsudato peritoneal no grupo que recebeu 4 mg (G4) quando comparado ao grupo estimulado com LPS (GS). O mesmo efeito não foi observado para o grupo de 2 mg (G2).

Em relação ao grupo tratado com dexametasona (controle anti-inflamatório-GC) não houve diferença estatística, quando comparado ao grupo estímulo LPS. Porém ao comparar o grupo tratado com 4 mg do extrato aquoso de tomate com o grupo dexametasona observa-se uma diferença de 17%, não significativa, no influxo leucocitário.

Na contagem diferencial de células (poliformonuclear e mononucleares) o grupo 4 mg apresentou queda nas células PMN. Quando comparado a quantidade de células PMN do grupo 4mg ($27,32 \pm 5,83 \times 10^5$ células/mL) com o grupo salina com estímulo ($63,84 \pm 9,37 \times 10^5$ células/mL) observa-se uma redução significativa ($p < 0,05$) de 57%. Já ao relacioná-lo ao grupo salina sem estímulo ($24,03 \pm 3,1 \times 10^5$ células/mL) não se observa diferença estatística. Para células mononucleares foi notada redução significativa de 20% entre o grupo salina controle em relação ao grupo 4 mg.

Figura 19. Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* no influxo leucocitário em modelo de peritonite induzida por LPS. Grupos: GSC: salina + salina (salina sem estímulo), GS salina + LPS (salina com estímulo), Grupo 2 e 4 mg petunidina equivalente/100 g de peso corporal) e GC dexametasona (4 mg/100 g de peso corporal). # ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo com estímulo com LPS (GS) ($n=10$ animais/grupo). * ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo sem estímulo com LPS (GSC) ($n=10$ animais/grupo).

5.2.2. Expressão gênica de mRNA de COX-2

A Figura 20 apresenta a expressão gênica da enzima COX-2 dos grupos tratados com extrato fenólico de tomate roxo.

Figura 20. Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* na expressão de mRNA de COX-2 em modelo de peritonite induzida por LPS. Grupos: GSC: salina + salina (salina sem estímulo), GS salina + LPS (salina com estímulo), Grupo 2 e 4 mg petunidina equivalente/100 g de peso corporal) e GC dexametasona (4 mg/100 g de peso corporal). # ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo com estímulo com LPS (GS) ($n=10$ animais/grupo). * ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo sem estímulo com LPS (GSC) ($n=5$ animais/grupo).

Em relação à expressão gênica de RNA mensageiro da enzima COX-2, o grupo 4 mg apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) de 64% na expressão gênica de COX-2 quando comparado ao grupo salina (salina + LPS) e redução de 10% em relação ao grupo controle (dexametasona). Enquanto o grupo 2 mg apresentou redução não significativa de 35% em comparação ao grupo salina.

O mesmo padrão foi observado em estudo realizado por Li et al. (2014), onde extrato de framboesa também apresentou redução significativa na expressão gênica de COX-2 tanto em modelo de colite de inflamação quanto em modelo de macrófagos ativados (RAW 264.7). Esta diminuição pode ser explicada pelo eventual controle das antocianinas na cascata de sinalização do NF- κ B, por

meio do bloqueio da fosforilação e ativação das proteínas envolvidas, tais como IKK, I κ B α e JNK, no processo de liberação do fator de transcrição.

5.2.3. Concentração de citocinas no exsudato peritoneal

A concentração das citocinas pró-inflamatórias no exsudato peritoneal dos animais tratados estão apresentadas na Figura 21.

Observa-se que a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , sigla em inglês) no exsudato peritoneal do grupo 4 mg apresentou uma concentração de $5,7 \pm 3,5$ pg/mL da citocina, sendo então oito vezes menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina ($50,8 \pm 21,5$ pg/mL) e 7% menor do que o grupo controle ($6,1 \pm 6,9$ pg/mL).

Para interleucina-1 β (IL-1 β) o do grupo tratado com 4 mg de extrato fenólico apresentou diminuição de 52% na concentração no exsudato peritoneal ao compará-lo ao grupo salina. A IL-1 β está intimamente ligada ao processo inflamatório uma vez que ativa a produção de COX-2, NO (através da ativação da iNOS), moléculas de adesão e PGE₂ (DINARELLO, 2007).

Já para IL-2 nota-se que o G4 apresentou ($2,7 \pm 0,55$ pg/mL) concentração 33% menor da citocina em relação ao grupo salina ($4,1 \pm 1,46$ pg/mL). A IL-2 é produzida por linfócitos T CD4+ e atua na ativação de células do sistema imune como as células *natural killer* (NK).

A interleucina IL-6 também apresentou o mesmo comportamento, apresentando decréscimo significativo ($p < 0,05$) de 87% ao comparar com o grupo salina positivo. Esta citocina é um dos principais mediadores do processo inflamatório, pois pode controlar a síntese de proteínas de fase aguda (proteína C reativa) e da ativação de neutrófilos (diferenciação de linfócitos T citotóxicos e maturação de macrófagos) (HEINRICH et al., 2003).

Igualmente as citocinas anteriores, IL-12 e IL-17, também apresentaram diminuição na concentração no lavado peritoneal do grupo 4 mg de 28 e 50%, respectivamente, em relação ao grupo salina. Ambas citocinas apresentam papel pró-inflamatório, por exemplo, a IL-17 ocasiona incremento da produção de IL-6 e IL-8, para a IL-17; enquanto o estímulo para produção de IFN- γ e TNF- α nas células NK e linfócitos T, pode ser proveniente da ação da IL-12 (VENKATESHA et al. 2015).

Figura 21. Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação dos genes *Aft*, *Abg* e *atv* na concentração de citocinas pró-inflamatórias no exsudato em modelo de peritonite induzida por LPS. Grupos: GSC: salina + salina (salina sem estímulo), GS: salina + LPS (salina com estímulo), Grupo 2 e 4 mg (petunidina equivalente/100 g de peso corporal) e GC: dexametasona (4 mg/100 g de peso corporal). # ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo com estímulo com LPS (GS) ($n=10$ animais/grupo). * ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo sem estímulo com LPS (GSC) ($n=10$ animais/grupo).

A Figura 22 apresenta as concentrações de proteína quimiotática para monócito -1 (MCP-1) e da quimiocina específica para neutrófilo (mKC) nos grupos.

Ambos os valores obtidos para as concentrações da MCP-1 e da mKC apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) no grupo 4 mg de extrato em comparação ao grupo salina, destacando-se redução de 62% para mKC.

Figura 22. Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* na concentração de MCP-1 e mKC no exsudato em modelo de peritonite induzida por LPS. Grupos: GSC: salina + salina (salina sem estímulo), GS: salina + LPS (salina com estímulo), Grupo 2 e 4 mg petunidina equivalente/100 g de peso corporal) e GC: dexametasona (4 mg/100 g de peso corporal). # ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo com estímulo com LPS (GS) ($n=10$ animais/grupo). * ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo sem estímulo com LPS (GSC) ($n=10$ animais/grupo).

MCP-1 é responsável pela migração de linfócitos T e monócitos presentes no sangue e pela diferenciação de macrófagos em células espumosas (CARDOSO et al, 2011). Já a mKC contribui para o aumento do estado inflamatório, pois está relacionada com migração de leucócitos (ZERFAOUI, et al., 2009).

A Figura 23 apresenta o efeito dos tratamentos nas concentrações das citocinas anti-inflamatórias analisadas no exsudato peritoneal dos animais.

Figura 23. Efeito do extrato fenólico de tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv* na concentração das citocinas anti-inflamatórias no exsudato em modelo de peritonite induzida por LPS. Grupos: GSC: salina + salina (salina sem estímulo), GS: salina + LPS (salina com estímulo), Grupo 2 e 4 mg petunidina equivalente/100 g de peso corporal) e GC: dexametasona (4 mg/100 g de peso corporal). # ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo com estímulo com LPS (GS) ($n=10$ animais/grupo). * ($p < 0,05$) diferente quando comparado com o grupo sem estímulo com LPS (GSC) ($n=10$ animais/grupo).

A concentração de IL-4 apresentada pelo grupo 4 mg foi de $1,1 \pm 0,64$ pg/mL, 15% menor em relação ao grupo salina positivo ($1,3 \pm 0,39$ pg/mL), entretanto, foi 24% maior do que o grupo controle (dexametasona).

Entretanto, para a IL-10, importante citocina anti-inflamatória, a concentração no grupo 4 mg apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) de seis e vinte e três vezes ao compararmos com o grupo salina e grupo controle, respectivamente.

A IL-4 é conhecida pelo seu papel anti-inflamatório por regular negativamente a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8; além de estimular o peristaltismo (OLIVEIRA et al, 2011). Por outro lado, a IL-10 está relacionada ao bloqueio da produção de IFN- γ pelas células NK, aumento da proliferação de mastócitos e diminuição na produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 em macrófagos e monócitos ativados (MITTAL & ROCHE, 2015).

Muito é estudado em relação ao papel das antocianinas, e seus metabólitos, no controle do processo inflamatório. Sabe-se que esta classe dos

flavonoides pode atuar exercendo controle da via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B, controlando assim, a expressão das citocinas inflamatórias, do mesmo modo que eleva a síntese de mediadores anti-inflamatórios (SPECIALE et al., 2014; KAKKAR & BAIS, 2014). Mykkänen et al. (2014), em estudo sobre atividade anti-inflamatória do mirtilo, observou que em camundongos (C57BL) submetidos a uma dieta rica do fruto as concentrações séricas de IL-1 β , IL-6, MCP-1 e TNF- α diminuíram após três meses de consumo.

No presente estudo, a diminuição na expressão gênica de COX-2 observada pode estar diretamente associada com a diminuição das concentrações de citocinas com ação pró-inflamatória, em especial a IL-1 β e TNF- α . Uma vez que essa diminuição está intimamente relacionada com supressão da via de sinalização do NF- κ B.

Considerando as funções exercidas pela IL-10 no processo inflamatório, o aumento observado na concentração desta citocina no grupo de 4 mg estaria modulando negativamente a ativação do NF- κ B, corroborando com a diminuição de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Assim como a redução dos níveis de mKC e MCP-1 está fortemente relacionada com a diminuição no influxo de células polimorfonucleares (neutrófilo) e mononucleares (monócito) na cavidade peritoneal dos animais tratados com 4 mg petunidina eq/100 g peso corpóreo.

Sendo assim, ao considerarmos as citocinas analisadas, observa-se que, de modo geral, houve uma diminuição na concentração de todas as citocinas consideradas pró-inflamatórias, destacando-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), assim como aumento na citocina IL-10, considerada como anti-inflamatória, no grupo que recebeu 4 mg de extrato fenólico. O mesmo padrão de comportamento não foi observado no grupo tratado com 2 mg de extrato, podendo-se inferir que esta dosagem não apresentou atividade sobre a síntese de citocinas. O grupo salina controle (sem estímulo de LPS) demonstrou não aumentar a concentração de nenhuma das citocinas analisadas.

Em vista disso, ao ponderarmos que as citocinas pró-inflamatórias, NO e aminas vasoativas, produzidas por células do sistema imune (mastócito e macrófago), células endoteliais, bem como os leucócitos migrados, são responsáveis pelo recrutamento de células da circulação sanguínea para locais de inflamação, pode-se inferir que a diminuição desses fatores quimiotáticos

através da ação dos flavonoides presentes no extrato de tomate roxo pode ter auxiliado no decréscimo no influxo leucocitário no grupo 4 mg.

Estudos realizados para avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos fenólicos ricos em antocianinas de diversos vegetais também observaram uma diminuição semelhante no recrutamento leucocitário e consequentemente na resposta inflamatória. Hassimotto et al. (2013), observou uma redução significativa do influxo peritoneal de leucócitos em camundongos tratados com extrato de amora silvestre. Desta forma, as antocianinas podem então atuar suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-8, mediadores inflamatórios, NO e PGE₂, do mesmo modo que diminuir a expressão dos genes iNOS e COX-2, através do bloqueio da cascata de ativação do via de sinalização NF- κ B. (KARLSEN et al., 2007; KHAN et al., 2012; ROSILLO et al., 2012; ISHIMOTO et al., 2011, HWANG et al., 2011; TALL et al., 2004; MIN et al, 2010).

Então, ao suprimir a ativação via LPS da cascata de sinalização do NF- κ B, as antocianinas presentes no tomate roxo, e seus metabólitos, exercem papel primordial no que se diz respeito aos mecanismos regulatórios da resposta inflamatória. Uma vez que podem modular a expressão gênica de diversos fatores pró-inflamatórios, tais como as citocinas/quimiocinas, receptores de membrana e moléculas de adesão. Ou seja, as antocianinas podem diminuir a expressão de iNOS e COX-2 acarretando em decréscimo nas concentrações de NO e citocinas, que por sua vez ocasiona em menor adesão e influxo de leucócitos, controlando assim, a resposta inflamatória.

Portanto, o extrato fenólico de tomate roxo parece ser responsável pela redução do (1) influxo leucocitário na cavidade peritoneal, (2) concentração das citocinas e (3) expressão gênica de COX-2, quando estimulado com LPS.

5.2.4. Absorção dos compostos fenólicos do tomate roxo

Consideração o perfil do extrato fenólico do tomate roxo piramidado e sua atividade biológica observada foi proposto um estudo de absorção dos compostos visando correlacioná-los a atividade anti-inflamatória.

Os principais metabólitos identificados por LC-ESI-MS/MS no fígado dos animais tratados estão descritos na Tabela 09 e os respectivos espectros de massas apresentados na Figura 24.

Tabela 09. Composição dos metabólitos presentes no fígado dos animais eutanasiados após 30 minutos de administração do extrato fenólico do tomate roxo obtido por piramidação do genes *Aft*, *Abg* e *atv*. Detectados por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo.

RT (min)	Íon molecular	Fragmentos dos íons negativos (m/z)	Composto proposto
15,6	303	-	Delfinidina aglicona
16,7	481	303	Delfinidina glucurodinada
16,9	332	272	Malvidina

Os metabólitos detectados por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo, no fígado dos animais eutanasiados após 30 minutos de administração do extrato fenólico do tomate (4 mg) foram: as antocianidinas delfinidina m/z 303 e uma malvidina m/z 332 com fragmento MS^2 272 $[M-60]^+$. Neste caso, a perda do fragmento 60 u, corresponde a perda de dois grupos metila. Também foi detectada delfinidina glucurodinada, apresentando íon molecular a m/z 481 e fragmento MS^2 a m/z 303 $[M-178]^+$, correspondendo a perda de um ácido glucurônico.

Não foram detectados metabólitos nas amostras de fígado dos animais eutanasiados após 3 horas de administração oral do extrato fenólico. Do mesmo que não foi possível detectar metabólitos nas amostras de plasma de nenhum dos tratamentos realizados.

Figura 24. Espectro de massas (MS²) dos metabólitos encontrados no fígado dos animais eutanasiados após 30 minutos de administração via oral do extrato fenólico de tomate roxo obtidos por LC-ESI-MS/MS, em modo positivo.

As formas agliconas de delphinidina e malvidina detectadas no organismo dos animais tratados podem ser provenientes dos compostos presentes no extrato do tomate roxo oferecido. Já a forma glucuronidada de delphinidina encontrada é condizente com o processo que compostos, tais como os flavonoides, sofrem nos hepatócitos/enterócitos a fim de estabilizar e distribuir as moléculas. Em estudo de biodisponibilidade realizado por Milbury et al. (2010), os metabólitos de *cranberry* identificados no sangue e urina de humanos portadores de doença coronariana após ingestão de uma dose de suco poderiam influenciar a transdução de sinal e modulação de genes envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio.

Sabe-se que antocianinas aciladas são menos absorvidas do que as não aciladas. Uma das hipóteses mais aceitas para tal fato é de que as antocianinas aciladas possuem baixa afinidade com transportadores de íons, como a bilitranslocase (PRIOR & WU, 2006).

Estudos sugerem que as formas não aciladas são absorvidas em uma porção maior do trato gastrointestinal (TG) diferentemente das aciladas que por serem absorvidas em uma fração menor do TG apresentam tempo de transferência menor, acarretando em redução na meia-vida no plasma (NOVOTNY et al., 2012).

A presença de acilação na estrutura das antocianinas também influencia a sua eliminação do organismo. Enquanto as estruturas aciladas são rapidamente eliminadas do organismo; as não aciladas, por apresentarem maior afinidade com os transportadores permanecem maior tempo no organismo.

Em estudo realizado por Charron et al. (2009) as antocianinas aciladas presentes em suco de cenoura roxa foram menos absorvidas do que as não aciladas, sendo a sua concentração plasmática 4 vezes menor. Enquanto Wu et al. (2004) aponta que em porcos tratados com extrato de amora, a recuperação urinária das antocianinas aciladas foi menor quando comparadas às não aciladas.

Todavia, a absorção das antocianinas presentes no suco de laranja vermelha não apresentou diferença entre as diferentes estruturações das moléculas, como demonstra os resultados obtidos por Felgindes et al. (2006).

Logo, o fato de não ter sido encontrados rutina e petunidina e/ou metabólitos nas amostras pode ser explicada pela presença de acilações em

suas estruturas, uma vez que a relação estrutura/metabolismo parece ser determinante para aumentar ou diminuir a absorção dos flavonoides.

Tendo em vista o conhecimento a respeito do metabolismo das antocianinas, sabe-se que apenas uma pequena quantidade é considerada biodisponível no organismo humano, pois apresenta rápida metabolização e excreção. Portanto, tendo em vista da complexidade do metabolismo das antocianinas, esta classe de flavonoides e seus metabólitos encontrados no fígado dos animais tratados com extrato fenólico, parece ser o fator responsável pelo controle da resposta inflamatória do presente estudo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados alcançados nas diferentes etapas no presente estudo auxiliam no entendimento das questões acerca da atividade anti-inflamatória dos flavonoides presentes no tomate roxo. Destarte, foi possível formular hipóteses que auxiliem o entendimento da manipulação genética para obtenção de alimentos ricos em compostos bioativos, bem como os mecanismos que envolvem os processos inflamatórios com base nas seguintes constatações:

- A piramidação dos genes *Aft*, *Abg* e *atv* para a obtenção do tomate roxo acarretou em sensível acréscimo no conteúdo de antocianinas, majoritariamente na casca, quando comparados aos valores apresentados pelo tomate vermelho-MT. Tal característica é determinada pela inserção de genes específicos, via piramidação, no tomate que aumentam a expressão de enzimas envolvidas na biossíntese do pigmento.

- O extrato fenólico obtido do tomate roxo tem atividade anti-inflamatória, uma vez que diminuiu o influxo leucocitário (PMN e mononuclear) no exsudato peritoneal, a concentração de citocinas pró-inflamatórias e expressão gênica de COX-2, nos animais tratados com extrato de 4 mg (petunidina eq./100 g peso corpóreo) em modelo de peritonite em camundongo induzido pelo LPS. Desse modo, a mitigação do processo inflamatório pode estar relacionada ao fato de que as antocianinas, provenientes do cruzamento genético acarreta em um fenótipo diferente de tomate roxo, que por meio dos seus metabólitos, podem atuar no controle da cascata de sinalização do NF- κ B e, conseqüentemente, do processo inflamatório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHIM, N.N.; KANTHIMANTHI, M.S. & ABDUL-AZIZ, A. Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.12, p. 1-11, 2012.

Anthocyanin fruit (Aft) Tomato. **Journal of Heredity**. n.94 v. 6, p. 449–456, 2003.
ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal Agriculture Food Chemistry**. Columbus, v.52, n.5, p.1124-1131, 2004.

BACHOUAL, R.; TALMOUDI, W.; BOUSSETTA, T.; BRAUT, F.; EL-BENNA, J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p. 1224–1228, 2011.

BASSOLINO, L.; ZHANG, Y.; SCHOONBEEK, H.; KIFERLE, C.; PERATA, P.; MARTIN, C. Accumulation of anthocyanins in tomato skin extends shelf life. **New Phytologist**. v. 200, p. 650–655, 2013.

BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition reviews**. v.72(7). p.429-452. 2014.

BOLLI, A.; MARINO, M.; RIMBACH, G.; FANALI, G.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Flavonoid binding to human serum albumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 398. p. 444–449. 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**. v.28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Menos de 20% dos brasileiros consomem frutas e hortaliças e praticam exercícios. 2010. Disponível em <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em 3 de jan. 2013.

_____. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. 2011. Disponível em <<http://www.portal.saude.gov.br>>. Acesso em 3 de jan. 2013.

BUTELLI, E.; TITTA, L.; GIORGIO, M.; MOCK, H.P.; MATROS, A.; PETERK, S. et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature biotechnology**. v. 26, n. 11, 2008.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. **Biochimie**. v. 91, n. 6, p. 791–795, 2009.

CARDOSO, L.M.; LEITE, J.P.V.; PELUZIO, M.C.G. **Revista Colombiana de Ciencia Químico- Farmacéutica**. v. 40 (1), p.116-138, 2011.

CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**. v.50, n. 2, p. 304-312, 2006.

CHARRON, C.S.; KURILICH, A.C.; CLEVIDENCE, B.A.; SIMON, P.W.; HARRISON, D.J.; BRITZ, S.J.; BAER, D.J.; NOVOTNY, J.A. Bioavailability of Anthocyanins from Purple Carrot Juice: Effects of Acylation and Plant Matrix. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 57, p.1226–1230. 2009.

CHUN, O.K.; CHUNG, S.J.; SONG, W.O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. **Adults Journal of Nutrition**.137, 1244-1252, 2007.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4 ed. São Paulo: Ed. Manole, 2011.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Products Report**. v.26, p.1001–1043, 2009.

DENIS, M.C.; FURTOS, A.; DUDONNÉ, S.; MONTAUDIS, A.; GAROFALO, C.; DESJARDINS, Y.; DELVIN, E.; LEVY, E. Apple Peel Polyphenols and Their Beneficial Actions on Oxidative Stress and Inflammation. **PLOS ONE**. n.1, v. 8, 2013.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **Europe journal of immunology**. v.37. p. 34-45. 2007.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo.

Revista de Ciência Farmacêuticas Básica Aplicada., v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

FAO, Food and Agriculture Organization. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em 26 de fevereiro de 2014.

FELGINES, C; TALAVÉRA, S.; TEXIER, O.; BESSON, C.; FOGLIANO V.; LAMAISSON, J.L.; LA FAUCI, L.; GALVANO, G.; RÉMÉSY, C.; GALVANO, F. Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats. **British Journal of Nutrition**. v. 95, p. 898–904. 2006.

FERNANDES, I.; FARIA, A.; CALHAU, C.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**. v. 7. p. 54–66. 2014.

FERNANDEZ-PANCHÓN, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** . v. 48, p. 649-671, 2008.

FERRARS, R.M.; CZANK, C.; ZHANG, Q.; BOTTING, N.P.; KROON, P.A.; CASSIDY, A.; KAY, C.D. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. **British Journal of Pharmacology**. p. 3268–3282. 2014. FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assay. **Methods of Enzimology**, New York, v.105, p.93-104, 1984.

FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Europe Heart Journal**. v.33, p.829–837 837a–837d, 2012.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Resolution**., v.58, n.9, p.537-52, 2009.

GARCÍA-TIRADO, J.; RIEGER-REYES, C.; SAZ-PEIRÓ, P. Efecto de los flavonoides en la prevención del cáncer de pulmón: revisión sistemática. **Medicina Clínica**. Barcelona, v.139, n.8, p.358–363, 2012.

GEORGIEV, V., ANANGA, A., & TSOLOVA, V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. **Nutrients**. v.6(1). p.391–415. 2014.

GERALDO, J.M.; ALFENAS, R.C.G. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**. v.52, n.6, p.951-967, 2008.

GONÇALVES, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C**. São Paulo, 2008. 88p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GONZALI, S.; MAZZUCATO, A.; PERATA, P. Purple as a tomato: towards high anthocyanin Tomatoes. **Trends in Plant Science**. v.14, n.5, 2009.

HASSIMOTTO N.M.A.; PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 56, p. 11727-11733, 2008.

HASSIMOTTO, N.M.A. **Atividade antioxidante de alimentos vegetais. Estrutura e estudo de biodisponibilidade de antocianinas de amora silvestre (*Morus* sp.)**. São Paulo, 2005. 176p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

HASSIMOTTO, N.M.A., LAJOLO, F.M. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries. **Journal of Science Food Agriculture**. v. 91, p. 523–531, 2011.

HASSIMOTTO, N.M.A., MOREIRA, V.; NASCIMENTO, N.G.; SOUTO, P.C.M.C; TEIXEIRA, C.; LAJOLO, F.M. Inhibition of Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice by Oral Administration of Anthocyanin Mixture from Wild Mulberry and Cyanidin-3-Glucoside. **BioMed Research International**. vol. 2013, Article ID 146716, 10 pages, 2013.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Reviews Food Science Technology**. v.1, p.163–187, 2010.
HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H.M.; MÜLLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical Journal**. v. 374(Pt 1). p. 1-20. 2003.

HODLT, S.L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**. v.23, p.543–597, 2011.

HRIBAR, U. & ULRICH, N.P. The Metabolism of Anthocyanins. **Current Drug Metabolism**. v.15. p.3-13. 2014.

HWANG, Y.P.; CHOI, J.H.; YUN, H.J.; HAN, E.H.; KIM, H.G.; KIM, J.Y.; PARK, B.H.; KHANAL, T.; CHOI, J.M.; CHUNG, Y.C.; JEONG, H.G. Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. **Food and Chemical Toxicology**. v.49, p. 93–99, 2011.

ISHIMOTO, H.; SHIBATA, M.; MYOJIN, Y.; ITO, H.; SUGIMOTO, Y.; TAI, A.; HATANO, T. In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 21, p. 5901–5904, 2011.

JAGNATH, I. B., CROZIER, A. Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. **Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology**, ed. Willey. 2010.

JONES, C. M.; MES, P.; MYERS, J. R. Characterization and Inheritance of the KAKKAR, S., & BAIS, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacology**, v.2014. p.1-9. 2014.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**. Campinas, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

KARLSEN, A.; RETTERSTØL, L.; LAAKE, P.; PAUR, I.; KJØLSRUD-BØHN, S.; SANDVIK, L.; BLOMHOFF, R. Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor- κ B Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-Inflammatory Mediators in Healthy Adults. **The Journal of Nutrition**. v. 137, p. 1951–1954, 2007.

KRAJKA-KUZNIAK, V., KACZMAREK, J. E. BAER-DUBOWSKA, W. Effect of naturally occurring phenolic acids on the expression of glutathione S-transferase isozymes in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.3, p.1097-102. 2008.

KUMAR, S. & PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**. 2013.

KUMARAPPAN, C. T., THILAGAM, E., & MANDAL, S. C. Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v.19(3), p.349–355. 2012.

LAHOZA, C. & MOSTAZAA, J.M. Atherosclerosis as a systemic disease. **Revista Espanola de Cardiologia**. v. 60, p.184-195, 2007.

LI, H.; DENG, Z.; LIU, R.; YOUNG, C.; ZHU, H.; LOEWEN, S. TSAO, R. Characterization of Phytochemicals and Antioxidant Activities of a Purple Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 11803–11811, 2011.

LI, L.; WANG, L.; WU, Z.; YAO, L.; WU, Y.; HUANG, L.; LIU, K.; ZHOU, X; GOU, D. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. **Nature - Scientific Reports**. v.4:6234. 2014.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. n.193, p. 265–275. 1951.

LU, C.; LI, Y.; LI, L.; LIANG, L.; SHEN, Y. Anti-inflammatory activities of fractions from *Geranium nepalense* and related polyphenols. **Drug Discoveries & Therapeutics**. v. 6, n.4, p.194-197, 2012.

MENEZES, E.W.; SANTOS, N.C.; GIUNTINI, E.B.; DAN, M.C.T.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Brazilian flavonoid database: Application of quality evaluation system. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.24, n.4–5, p.629–636, 2011.

MES, P.J.; BOCHES, P.; MYERS, J.R. Characterization of Tomatoes Expressing Anthocyanin in the Fruit. **Journal of the American Society of Horticultural Science**. v.133, n.2, p. 262–269, 2008.

MIN, S; RYO, S.; KIM, D. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. **International Immunopharmacology**. V. 10, p. 959–966. 2010.

MITTAL, S.K.; ROCHE, P.A. Suppression of antigen presentation by IL-10. **Current opinion in immunology**. v.34. p. 22-27. 2015.

NICOUE; E. E., SAVARD; S., BELKACEMI, K. Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55 (14), p. 5626–5635, 2007.

NOVOTNY, J.A.; CLEVIDENCE, B.A.; KURILICH, A.C. Anthocyanin kinetics are dependent on anthocyanin structure. **British Journal of Nutrition**. v. 107, p. 504–509. 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. 95, 351-358, 1979.

OLIVEIRA, C.M.B., SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO. R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 61: p.255-265. 2011.

OLIVEIRA, L.P.M.; ASSIS, A.M.O.; SILVA, M.C.M.; SANTANA, M.L.P.; SANTOS, N.S.; PINHEIRO, S.M.C.; BARRETO, M.L.; SOUZA, C.O. Fatores associados a excesso de peso e concentração de gordura abdominal em adultos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**; Rio de Janeiro, v.25, n.3, p.570-582, 2009.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Noncommunicable Diseases Country Profiles. 2011. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em 15 de março de 2014.

PALAFOX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J.F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**. v. 76, n. 1, p.6-15, 2011.

POVERO, G.; GONZALI, S.; BASSOLINO, L.; MAZZUCATO, A.; PIERDOMENICO, P. Transcriptional analysis in high-anthocyanin tomatoes reveals synergistic effect of Aft and atv genes. **Journal of Plant Physiology**. v.168, p. 270–279, 2011.

PRIOR, R.L. & WU, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. **Free Radical Research**. v. 40(10). p. 1014–1028. 2006.

PRIOR, R.L.; HOANG, H; GU, L; WU, X; BACCHIOCCA, M; HOWARD, L; HAMPSCH-WOODILL, M; HUANG, D; OU, B; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 3273-3279, 2003.

QUILLIOT, D.; WALTERS, E.; BONTE, J.P.; FRUCHART, J.C.; DURIEZ, P.; ZIEGLER, O. Diabetes mellitus worsens antioxidant status in patients with

chronic pancreatitis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 5, p. 1117-1125, 2005.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**. v.127, p.183-198, 2002.

ROSILLO, M.A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; CÁRDENO, A.; APARICIO-SOTO, M.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; VILLEGAS, I.; LASTRA C.A. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. **Pharmacological Research**. v. 66, p. 235–242, 2012.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. **Annual Review Nutrition**. v. 22:p. 19–34, 2002.

RUBIÓ, L.; MACIA, A.; MOTILVA, M.J. Impact of various factors on pharmacokinetics of bioactive polyphenols: an overview. **Current Drug Metabolism**. V.15. P.62-76. 2014.

SAHREEN, S.; KHAN, M.R.; KHAN, R.A. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. **Food Chemistry**. v. 122, n. 4, p. 1205–1211, 2010.

SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S.K. Roles of flavonoids in plants. **Int Journal of Pharmaceutical Science Technological**. v.6, n.1, p.12-35, 2011.

SANTOS, N.C. **Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TBCA - USP): dados de flavonoides**. São Paulo, 2009. 178p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SARVESTANI N.N.; KHODAGHOLI F.; ANSARI N.; FARIMANI M.M. Involvement of p-CREB and phase II detoxifying enzyme system in neuroprotection mediated by the flavonoid calycopterin isolated from *Dracocephalum kotschy*. **Phytomedicine**. 2013.

SCHREIBER, G.; REUVENI, M.; EVENOR, D.; OREN-SHAMIR, M.; OVADIA, R.; SAPIR-MIR, M.; BOOTBOOL-MAN, A.; NAHON, S.; SHLOMO, H.; CHEN, L.; LEVIN, I. ANTHOCYANIN1 from *Solanum chilense* is more efficient in accumulating anthocyanin metabolites than its *Solanum lycopersicum* counterpart in association with the ANTHOCYANIN FRUIT phenotype of tomato. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 124 p. 295–307, 2012.

SILVA, C.S.E.S. **Plantas utilizadas como chás com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes**. Lisboa, 2012. 56p. Dissertação de Mestrado – Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

SILVA, F.O.C.; MACEDO, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de cineantropom. desempenho humano**. Florianópolis, v. 13, n. 4, p. 320-328, 2011.

SLIMESTAD, R., VERHEUL, M.J. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Journal of the Science Food Agriculture**. v. 89: p. 1255–1270, 2009.

SPECIALE, A., CIMINO, F., SAIJA, A., CANALI, R., & VIRGILI, F. Bioavailability and molecular activities of anthocyanins as modulators of endothelial function. **Genes & Nutrition**, v.9(4), p.404. 2014.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. 4ª Edição. Campinas. São Paulo, 2011.

Tabela de Composição Nutricional das Hortaliças. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). 2004.

TALL, J. M.; SEERAM, N. P.; ZHAO, C.; NAIR, M. G.; MEYER, R. A.; RAJA, S. Tart cherry anthocyanins suppress inflammation-induced pain behavior in rat. **Behavioural Brain Research**. v. 153, p. 181–188, 2004.

THILAKARATHNA, S. H., & RUPASINGHE, H. P. V. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. **Nutrients**. v.5(9). p.3367–3387. 2013.

VEIGA, A.A.S. Isolamento e quantificação de flavonóides e abordagem das atividades antioxidante e antimicrobiana de *jatropha Gossypifolia* l. Belém, 2008. 67p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Pará.

VENKATESHA, S.H.; DUDICS, S.; ACHARYA , B.; MOUDGIL, K.D. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. **International journal of molecular science**. v.16(1). p. 887-906. 2014.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods of Enzimology**, New York, v.77, p.325-333, 1981.

WILLITS, M. G.; KRAMER, C. M.; PRATA, R. T. N.; DE LUCA, V.; POTTER, B. G.; STEFFENS, J. C.; GRASER, G. Utilization of the Genetic Resources of Wild Species To Create a Nontransgenic High Flavonoid Tomato. **of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 1231–1236, 2005.

WU, X.; PITTMAN, H.E.; PRIOR, R.L. Pelargonidin Is Absorbed and Metabolized Differently than Cyanidin after Marionberry Consumption in Pigs. **The journal of nutrition**. p. 2603-2610. 2014.

XIE, C.; KANG, J.; LI, Z.; SCHAUSS, A.G.; BADGER, T.M.; NAGARAJAN, S.; WU, T.; WUA, X. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.23, n.9, p.1184–1191, 2012.

ZAMORA-ROS, R.; ANDRES-LACUEVA, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; GONZÁLEZ, C.A. Estimation of Dietary Sources and Flavonoid Intake in a Spanish Adult Population (EPIC-Spain). **Journal American Diet Association**. v.110, p. 390-398, 2010.

ZERFAOUI, M.; NAURA, A.S.; ERRAMI, Y.; HANS, REZK, B.M.; ELSEGEINY, J.P.W.; KIM, H.; LORD, K.; KIM, J.G.; BOULARES; A.H. Effects of PARP-1 deficiency on airway inflammatory cell recruitment in response to LPS or TNF: differential effects on CXCR2 ligands and Duffy antigen receptor for chemokines. **Journal of Leukocyte Biology**. v.86. p.1385-1392. 2009.

ANEXO I - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO II – 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 89.2013-P430

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 **“Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (*Solanum Lycopersicum* L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS”** (Protocolo CEUA/FCF/430), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Afonso Pinho da Silva Maia**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 16 de setembro de 2013.

São Paulo, 15 de outubro de 2013.

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

ANEXO III - Ficha do aluno

30/01/2015

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 8480578/1 - Afonso Pinho da Silva Maia

Email: afo.maia@usp.br
Data de Nascimento: 14/05/1988
Cédula de Identidade: RG - 21.967.495-9 - RJ
Local de Nascimento: Estado do Rio de Janeiro
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Nutrição - Centro Universitário de Volta Redonda - Rio de Janeiro - Brasil - 2011

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 06/02/2013
Início da Contagem de Prazo: 06/02/2013
Data Limite para o Depósito: 06/08/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - 06/02/2013 até o presente.
E-Mail: aymoto@yahoo.com
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/02/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/04/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 06/02/2013
Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2014

Impresso em: 30/01/15 00:11:11

30/01/2015

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 8480578/1 - Afonso Pinho da Silva Maia

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5722-2/2	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	06/03/2013	26/03/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5897-2/1	Nutrigenômica do Câncer	08/04/2013	14/04/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5900-2/1	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	11/06/2013	01/07/2013	30	2	100	A	N	Concluída
MAE5755-6/5	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	29/11/2013	120	8	100	C	N	Concluída
EDM5791-5/11	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	29/11/2013	120	8	100	A	N	Concluída
QBQ5747-6/5	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/08/2013	02/09/2013	15	0	0	-	N	Matrícula cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0413 Química de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2014	30/06/2014	-	3	0	-	-	-
RIM5756-2/1	Imunidade Inata e Receptores de Reconhecimento Padrão: Toll-like, Nod-like e Inflamassomas (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	07/04/2014	13/04/2014	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 21/07/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2014

ANEXO IV - Currículo Lattes**Afonso Pinho da Silva Maia**

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Afonso Pinho da Silva Maia
Nascimento 14/05/1988 - Volta Redonda/RJ - Brasil
CPF 119.003.727-03

Formação acadêmica/titulação

2013 Mestrado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Atividade anti-inflamatória de extrato fenólico de tomate roxo (*Solanum Lycopersicum* L.) em camundongo em modelo de peritonite induzido pelo LPS
Orientador: Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

2007 - 2011 Graduação em Nutrição.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil
Título: Uso de Prebióticos na Absorção de Ferro em Cirurgia Bariátrica
Orientador: Alden dos Santos Neves

Formação complementar

2012 - 2012 Curso de curta duração em Contagem de carboidratos.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em Mini-curso: Estratégias da Nutrição Esportiva.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Suplementos e Fitoterápicos em Estética.
Instituto de Pesquisas Ensino e Gestão em Saúde, IGPS, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Nutrição e Adolescência.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Nutrição e Fitoterapia.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Aspectos Nutricionais do Envelhecimento.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Interpretação de Exames Laboratoriais e Semiologia.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em Nutrição Funcional Aplicado à Prática Clínica.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Qualidade em Alimentação.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Qualidade em Alimentação e Segurança Alimentar.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Mini-curso: Utilização Integral dos Alimentos.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Mini-curso: Alimentos Dietéticos e Lights.
Centro Universitário de Volta Redonda, UniFOA, Volta Redonda, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaborador ,
Carga horária: 4, Regime: Parcial

2. Centro Universitário de Volta Redonda - UniFOA

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga
horária: 6, Regime: Parcial

2010 - 2010 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga
horária: 6, Regime: Parcial

2009 - 2009 Vínculo: Monitor-Nutrição e Dietética , Enquadramento
funcional: Monitor , Carga horária: 4, Regime: Parcial

2009 - 2009 Vínculo: Monitor-Nutrição e Metabolismo , Enquadramento
funcional: Monitor , Carga horária: 2, Regime: Parcial

2009 - 2009 Vínculo: Monitor-Nutrição e Metabolismo , Enquadramento
funcional: Monitor , Carga horária: 2, Regime: Parcial

2008 - 2008 Vínculo: Monitor - Fisiologia Geral , Enquadramento funcional:
Monitor , Carga horária: 4, Regime: Parcial

3. Prefeitura Municipal de Volta Redonda - PMVR

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga
horária: 6, Regime: Parcial

2010 - 2010 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga
horária: 6, Regime: Parcial

4. Prefeitura Municipal de Pinheiral - PMP

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga
horária: 6, Regime: Parcial

5. SAMA - SAMA

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga
horária: 16, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa
Projetos de pesquisa **2010 - 2010** Perfil Antropométrico e Estimativa do
Consumo de Antioxidantes pelos Adolescentes Escolares de Volta Redonda
- RJ

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Graduação (3);
 Integrantes: Afonso Pinho da Silva Maia; Margareth Lopes Galvao Saron (Responsável)

2010 - Atual Efeito dos ácidos graxos poliinsaturados em biomarcadores e estado de depressão de idosos com síndrome metabólica genotipados para os polimorfismos C677T e A1298C no gene MTHFR

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Graduação (5); Mestrado acadêmico (1);
 Integrantes: Afonso Pinho da Silva Maia; Ana Paula Alves Avelino (Responsável)

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **MAIA, A. P. S.**, Neves,A.S.

Uso de Prebióticos na Absorção de Ferro em Cirurgia Bariátrica. Cadernos UniFOA (Impresso). , v.ESP, p.51 - 59, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **MAIA, A. P. S.**, Neves,A.S.

USO DE PREBIÓTICOS NA ABSORÇÃO DE FERRO EM CIRURGIA BARIÁTRICA In: Ganepão, 2013, São Paulo.

Revista Brasileira de Medicina. São Paulo: RBM, 2013. v.70. p.1 - 152

2. **MAIA, A. P. S.**

ESTADO NUTRICIONAL E A IMAGEM CORPORAL DOS ADOLESCENTES DE UMA ESCOLA PÚBLICA In: III Congresso Internacional de Especialidades Pediátricas, 2010, Curitiba.

III Congresso Internacional de Especialidades Pediátricas. , 2010.

3. **MAIA, A. P. S.**

ESTADO NUTRICIONAL E PRÁTICA DE ATIVIDADE FÍSICA DOS ADOLESCENTES DE UMA ESCOLA PÚBLICA In: III Congresso Internacional de Especialidades Pediátricas, 2010, Curitiba.

III Congresso Internacional de Especialidades Pediátricas. , 2010.

4. **MAIA, A. P. S.**, SARON, M. L. G.

Perfil Antropométrico dos Adolescentes Escolares no Município de Volta Redonda - RJ In: IV Colóquio Técnico-Científico do Unifoa, 2010, Volta Redonda.

Cadernos UniFOA (Online). Volta Redonda: FOA, 2010. p.123 - 123

Demais produções bibliográficas

1. **MAIA, A. P. S.**

Importância do Nutricionista em Unidades de Alimentação e Nutrição Hospitalares. Artigo. , 2010. (Outra produção bibliográfica)

2. **MAIA, A. P. S.**, ARAUJO, D. R., LIMA, F. M., FLORENTINO, B. C.

Implicações Nutricionais do Uso Abusivo de Antiácidos por Idosos. Artigo. , 2009. (Outra produção bibliográfica)

3. **MAIA, A. P. S.**, ARAUJO, D. R.

Aspectos Fisiológicos do Trato Gastrointestinal de Portadores de Bulimia Nervosa. Artigo. , 2008. (Outra produção bibliográfica)