UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de concentração: Bromatologia

Caracterização química de tomate roxo e estudo da metabolização de flavonoides *in vitro* e *in vivo*

Mayara Adja da Silva Souza

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo
2017

Mayara Adja da Silva Souza

Caracterização química de tomate roxo e estudo da metabolização de flavonoides *in vitro* e *in vivo*

Dissertação 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.

Área de concentração: Bromatologia

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo

2017

Mayara Adja da Silva Souza

Caracterização química de tomate roxo e estudo da metabolização de flavonoides *in vitro* e *in vivo*

Comissão julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

_____

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto (Orientadora / Presidente)

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017

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

S719c

Souza, Mayara Adja da Silva
Caracterização química de tomate roxo e estudo da metabolização de flavonoides in vitro e in vivo / Mayara Adja da Silva Souza. - São Paulo, 2017.
123 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto

1. antocianinas. 2. beta-caroteno. 3. tomate. 4. voláteis. 5. digestão in vitro . I. T. II. Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto, orientador.

AGRADECIMENTOS

"Nenhuma obrigação é mais urgente do que a de retornar agradecimentos."

Ambrose Bierce

A professora Neuza Hassimotto, pela primazia com que conduziu sua função de orientadora durante esta caminhada. Agradeço a oportunidade, ensinamentos, confiança, dedicação, solicitude e cordialidade.

As Agências financiadoras CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FoRC/CEPID (Food Research Center), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e à Universidade de São Paulo por tornar possível a execução deste trabalho.

Ao professor Lázaro Peres e seu aluno Jonata Freschi, da Esalq-USP em Piracicaba, pelo fornecimento dos tomatinhos e por todos os esclarecimentos prestados.

A professora Kátia Sivieri e suas alunas Fernanda Bianchi e Fernanda Freire pela receptividade e orientação durante o experimento realizado na FCF da Unesp em Araraquara.

Ao professor Eduardo Purgatto e seus alunos Eric Tobaruela e Bruna Lima pela imensa ajuda com as análises de compostos voláteis e por cada minuto de ensino envolvendo manipulação de *softwares*.

Aos professores Thomas Ong, Kátia Sivieri e Helena Godoy, membros da banca de qualificação, pelas sugestões, críticas e elogios, que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório ("sushibar"): Elisa Brasili, Luciane Teixeira, Mariana Souto, Ana Marla Duarte, Jéssica Ramos, Manuela Brito, Alessandra Nishioka, Sara Lima, Karina Gama e Aline Alves pelo companheirismo, pelas sugestões e pela troca de ideias, experiências e decepções. Em especial, ao Thiago Santos, que além da ajuda com as dificuldades técnico-científicas, contribuiu com o compartilhamento de dicas sobre tecnologia de carros e computadores, além das atrações culturais de São Paulo.

A todos os colegas de departamento, em especial Laís Moro, Victor Castro, Samira Prado, Janayra Teixeira, Jéssica Veridiana, Mayra Crystiane e Gabriela

Schmitz pela imensa ajuda nos momentos de dúvidas e pela excelente companhia nos encontros informais *out* laboratório.

Aos técnicos da Bruker, Diego Assis e Luiz Santos; ao professor Ernani Pinto e técnicos Felipe Dörr e Miriam Roldán pela grande ajuda com a identificação de compostos durante as análises de espectrômetria de massas.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e às técnicas do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos: Tânia Shiga, Luciene Lauer, Aline Santos e Lúcia Justino, pela grande ajuda com os experimentos.

Aos funcionários do Biotério FCF-IQ/USP, pela atenção, em especial à Flávia Ong pela paciência na orientação do manejo com os animais.

A minha colega de profissão e conterrânea, Kelly Souza, por sua incalculável ajuda na obtenção desse objetivo, desde nossas conversas em Natal até minha vinda para São Paulo.

Ao Yuji, *my beloved and best friend*, pelo companheirismo, apoio, conselhos, admiração, contribuição prestada durante essa caminhada e pela paciência em me ajudar a ser uma pessoa mais evoluída (além de ter sido quem mais desejou comer os tomatinhos).

Aos meus familiares potiguares-paulistanos pela confiança em mim depositada. Em especial ao meu tio Chagas e sua esposa Damiana pela acolhida nos primeiros meses de adaptação à São Paulo.

Aos meus pais, Mário e Maria José, por terem desde cedo me ensinado a priorizar a busca pelo conhecimento, e ao meu querido irmão, Myller, pelo apoio, admiração e excelente senso de humor (torço muito por seu sucesso!).

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para esta realização.

Thank you very much!

"Quem come do fruto do conhecimento, é sempre expulso de algum paraíso."

Melanie Klein

RESUMO

SOUZA, M. A. da S. **Caracterização química de tomate roxo e estudo da metabolização de flavonoides *in vitro* e *in vivo***. 2017. 123f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Tendo em vista a importância dos compostos bioativos (CBAs) para a promoção da saúde, foram desenvolvidos, a partir de cruzamentos do tomate cereja com espécies selvagens, os tomates laranja (rico em β-caroteno) e roxo (rico em antocianinas), por meio da técnica de introgressão de alelos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de compostos bioativos e voláteis dos tomates enriquecidos e avaliar a estabilidade e metabolização de flavonoides do tomate roxo durante digestão *in vitro* e em modelo animal. Os tomates foram caracterizados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais; capacidade antioxidante por DPPH e ORAC; ácidos orgânicos; açúcares solúveis; perfil de carotenoides por CLAE/DAD; flavonoides por CLAE/DAD e LC/ESI/MS/MS e compostos voláteis por CG/MS. Avaliou-se ainda a estabilidade dos flavonoides da casca do tomate roxo por simulação da digestão *in vitro*, utilizando o *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME), bem como a formação de AGCC por GC-MS, e excreção em ratos Wistar, com posterior identificação dos compostos fenólicos por LC/Q-TOF/MS. O tomate roxo apresentou aumento no conteúdo de fenólicos totais, capacidade antioxidante e vitamina C, com destaque para casca. A rutina foi o principal flavonol identificado em todos os frutos, e na casca do tomate roxo foi encontrado alto teor de petunidina (p-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo, além da superexpressão de outros flavonoides como a quercetina-3-*O*-rutinosídeo e kaempferol. Não houve alteração no perfil de flavonoides do fruto laranja. Este, por sua vez, apresentou acúmulo de β-caroteno, importante pró-vitamina A, ao passo que o tomate roxo também teve seus conteúdos de β-caroteno e licopeno aumentados. Os frutos apresentaram perfil de compostos voláteis diferentes entre si, o que foi relacionado à degradação dos diferentes CBAs característicos de cada um. O extrato fenólico da casca de tomate roxo, submetido à digestão *in vitro*, se manteve estável na primeira porção, relativo às condições estomacais. Contudo, o conteúdo de flavonoides apresentou redução significativa ($p<0,05$) nas porções que simulam as condições do duodeno e do colón, com a formação de catabólitos pela ação da microbiota intestinal e/ou pela degradação química espontânea. Foi observado o aparecimento de novos ácidos fenólicos não presentes inicialmente na matriz, dentre eles o ácido 3-*O*-metilgálico e o ácido homovanílico, supostamente derivados da degradação da petunidina e da quercetina, respectivamente. Houve aumento na produção total de AGCC, com excessão do butirato. Na urina dos animais foram detectados diversos outros compostos fenólicos derivados do metabolismo de fase II, dentre eles o ácido hipúrico e o 3-*O*-metilcatecol. Nas fezes foram identificados cerca de metade dos compostos presentes na fermentação *in vitro*. Dessa forma, o melhoramento convencional pode ser uma alternativa para o enriquecimento, com CBAs, de alimentos amplamente consumidos pela população, como o tomate. Além disso, durante a passagem pelo trato gastrointestinal, os flavonoides presentes na casca do tomate roxo sofrem intensa degradação pela microbiota intestinal, com formação de catabólitos com reconhecido potencial benefício à saúde.

Palavras-chave: antocianinas, β-caroteno, tomate, voláteis, digestão *in vitro*

ABSTRACT

SOUZA, M. A. da S. **Chemical characterization of purple tomato and *in vitro* and *in vivo* study of metabolism of flavonoids**. 2017. 123p. Dissertation (Master degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Considering the importance of bioactive compounds (BACs) for health promotion, the orange (β-carotene-rich) and purple (anthocyanin-rich) tomatoes were developed from cherry tomato interspecific crossing with wild species, using the technique of allele introgression. The objective of this work was to characterize the profile of bioactive and volatile compounds of enriched tomatoes, and to evaluate the stability and metabolism of purple tomato's flavonoids during *in vitro* and *in vivo* digestion. The tomatoes were characterized by its content of total phenolic compounds; antioxidant capacity (DPPH and ORAC); organic acids; soluble sugars; carotenoids (HPLC/DAD); flavonoids (HPLC/DAD and LC/ESI/MS/MS) and volatile compounds (GC/MS). The stability of the flavonoids from purple tomato peel was assessed by using the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME), as well as the formation of AGCC by GC-MS, and metabolism and excretion in Wistar rats, with subsequent identification of phenolic compounds by LC/Q-TOF/MS. The purple tomato showed an increase in the total phenolic content, antioxidant capacity and vitamin C, with highlight for the peel. The rutin was the main flavonol identified in all fruits, and it was found high content of petunidin (*p*-coumaryl)-rutinoside-hexoside in the purple tomato peel, in addition to overexpression of other flavonoids such as quercetin-3-*O*-rutinoside and kaempferol. There was no change in the flavonoid profile of the orange fruit. This one, in turn, presented accumulation of β-carotene, important pro-vitamin A, while the purple tomato also showed an increase in its β-carotene and lycopene contents. The fruits presented different volatile compounds profile among them, which was related to the degradation of the different BACs composition of each one. In the *in vitro* digestion, the phenolic extract of the purple tomato peel remained stable in the first portion, relative to the stomach conditions. However, the content of flavonoids presented a significant reduction ($p<0.05$) in the portions simulating the duodenum and colon, with the formation of catabolites by the action of intestinal microbiota and/or spontaneous chemical degradation. It was observed the appearance of new phenolic acids that was not initially present in the matrix, among them 3-*O*-methylgalic acid and homovanilic acid, supposedly derived from the degradation of petunidin and quercetin, respectively. There was an increase in the total production of SCFAs, with the exception of butyrate. In the urine of the animals several other phenolic compounds derived from phase II metabolism were detected, among them hippuric acid and 3-*O*-methylcatechol. About half of the compounds present in the *in vitro* fermentation were identified in the feces. Conventional breeding may be an alternative for the enrichment, with BACs, of foods that are widely consumed by the population, such as tomatoes. In addition, during the passage through the gastrointestinal tract, the flavonoids present in the purple tomato peel are severely degraded by the intestinal microbiota, with formation of catabolites with recognized potential health benefit.

Key words: anthocyanins, β-carotene, tomato, volatiles, *in vitro* digestion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos.....16

Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides.....17

Figura 3. Classificação dos flavonoides em subclasses. 17

Figura 4. Estrutura química das antocianidinas. 18

Figura 5. Potenciais posições para reações de biotransformação e clivagem do anel C dos flavonoides. 20

Figura 6. Estrutura química do licopeno e do β-caroteno. 22

Figura 7. Rota simplificada da biossíntese de carotenoides. 23

Figura 8. Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). 35

Figura 9. Frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 41

Figura 10. Conteúdo de fenólicos totais da casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 43

Figura 11. Capacidade antioxidante da casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides, avaliada pelos métodos DPPH e ORAC 43

Figura 12. Conteúdo de ácidos orgânicos na casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 44

Figura 13. Conteúdo de áçúcares na casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 45

Figura 14. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=450 nm) das cascas dos tomates vermelho (A), laranja (B) e roxo (C). 48

Figura 15. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=450 nm) das polpas dos tomates vermelho (A), laranja (B) e roxo (C). 48

Figura 16. Conteúdo de carotenoides na casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 49

Figura 17. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=270 nm) das cascas dos frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 50

Figura 18. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=270 nm) das polpas dos frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 51

Figura 19. Conteúdo dos principais flavonoides identificados na casca e polpa de tomates cereja obtidos por introgressão de alelos relacionados a biossíntese de antocianinas e carotenoides. 55

Figura 20. Scores plot (A) e heatmap (B) da Análise de Componentes Principais (PCA), mostrando a correlação entre voláteis de tomate vermelho (RT), tomate laranja (OT) e tomate roxo (PT). 61

Figura 21. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=270 nm) dos flavonoides e ácidos fenólicos durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 65

Figura 22. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=525 nm) dos flavonoides e ácidos fenólicos durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 65

Figura 23. Consumo de antocianinas totais (A) e quercetina-3-O-rutinosídeo (B) ao longo de 30 horas do processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 66

Figura 24. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=525 nm) dos flavonoides e ácidos fenólicos durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Reator 3 nos diferentes tempos de coleta. 67

Figura 25. Cromatogramas obtido por CLAE-DAD (λ=270 nm) de compostos detectados ao longo das 24 h de fermentação in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 69

Figura 26. Concentração de antocianinas ao longo de 30 horas do processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 71

Figura 27. Curva de concentração ao longo do tempo de ácidos fenólicos ao longo de 30 horas do processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 72

Figura 28. Concentração (mM) de acetato (A), propionato (B), butirato (C) e outros AGCC (D) do controle negativo (0h') e ao longo da fermentação in vitro (0h, 12h e 24h) da casca de tomate roxo, nos reatores que simulam o cólon ascendente (R3), transverso (R4) e descendente (R5). 74

Figura 29. Proposta de rota de degradação química ou pela microbiota intestinal da petunidina (p-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo em sistema de digestão in vitro e excreções fecal e urinária. 80

Figura 30. Proposta de rota de degradação química ou pela microbiota intestinal da quercetina 3-O-rutinosídeo em sistema de digestão in vitro e excreções fecal e urinária. 82

Figura 31. Proposta de rota de degradação química ou pela microbiota intestinal do ácido neoclorogênico em sistema de digestão in vitro e excreções fecal e urinária. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio alimentar basal (feed). 36

Tabela 2. Peso médio, proporção casca/polpa e teor de sólidos solúveis totais (SST) dos frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. 42

Tabela 3. Identificação de flavonoide e ácidos fenólicos de frutos de tomate vermelho, laranja e roxo, obtidos por introgressão de alelos. 53

Tabela 4. Compostos voláteis identificados por GC-MS de tomates vermelho, laranja e roxo e sua proporção relativa.....58

Tabela 5. Identificação de antocianinas formadas durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 68

Tabela 6. Tentativa de identificação de compostos formados durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. 70

Tabela 7. Identificação de metabólitos excretados na urina e fezes (0-24h) de ratos após o consumo do extrato de tomate roxo. 77

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

AAPH	*2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride*
AFT	*Anthocyanin fruit*
AG	Ácido gálico
AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
AM	Antocianinas Monoméricas
AMG	Ácido Metil Gálico
ATV	*Atroviolaceum*
CBAs	Compostos bioativos
CC	*Column chromatography*
CG	*Gas Chromatography*
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DP	Desvio Padrão
DPPH	*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*
ESALQ	Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
ESI-MS	*Electrospray Ionization - Multi-Stage*
FT	Fenólicos Totais
HP2	*High pigment-2*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
LC	*Liquid Chromatography*
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	*Mass Spectrometry*
ORAC	*Oxygen Radical Assay Capacity*
PAD	*Pulsed Amperometric Detector*
PAR	*Photosynthetically Active Radiation*
PCA	*Principal Component Analysis*
PVDF	*Polyvinylidene difluoride*
Q-TOF	*Quadrupole-Time of Flight*
RCF	*Relative Centrifugal Force*
SGLT-1	*Sodium-dependent glucose transporter-1*
SHIME	*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*
SPE	*Solid Phase Extraction*
SPME	*Solid Phase Micro Extration*
TGI	Trato Gastrointestinal
TR	Tempo de Retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1. COMPOSTOS BIOATIVOS 16
2.1.1. FLAVONOIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS 16
2.1.1.1. Biodisponibilidade de flavonoides 19
2.1.1.2. Compostos Fenólicos e Microbiota Intestinal 20
2.1.2. CAROTENOIDES 22
2.2. TOMATES OBTIDOS POR INTROGRESSÃO DE ALELOS 23
3. OBJETIVO 26
3.1. OBJETIVO GERAL 26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26
4. MATERIAL E MÉTODOS 27
4.1. MATERIAL 27
4.1.1. Amostragem 27
4.1.2. Preparo e Armazenamento das Amostras 27
4.2. MÉTODOS 27
4.2.1. Caracterização Química dos Tomates Vermelho, Laranja e Roxo 27
4.2.1.1. Extração 27
4.2.1.2. Determinação de Compostos Fenólicos Totais 28
4.2.1.3. Capacidade antioxidante 28
4.2.1.3.1. Método Oxygen radical assay capacity (ORAC) 28
4.2.1.3.2. Método DPPH 29
4.2.1.4. Determinação de antocianinas monoméricas 29
4.2.1.5. Determinação de Sólidos Solúveis Totais (SST) 30
4.2.1.6. Análise de Ácidos Orgânicos 30
4.2.1.7. Análise de Açúcares Solúveis 31
4.2.1.8. Identificação e Quantificação de Carotenoides 31
4.2.1.8.1. Extração 31
4.2.1.8.2. CLAE/DAD 32
4.2.1.9. Identificação e Quantificação de Flavonoides e Ácidos Fenólicos 32
4.2.1.9.1. Extração em fase sólida (SPE) 32
4.2.1.9.2. CLAE/DAD 33
4.2.1.9.3. LC-ESI-MS/MS 33
4.2.2. Análise de Compostos Voláteis por CG-MS 34
4.2.3. Estabilidade dos Flavonoides em Modelo de Digestão In Vitro 34
4.2.3.1. Extrato Fenólico 34
4.2.3.2. Simulação da digestão in vitro 35
4.2.3.3. Extração de flavonoides e ácidos fenólicos 37
4.2.3.4. CLAE/DAD 37
4.2.3.5. LC/Q-TOF/MS 38
4.2.3.6. Ácidos Graxos de Cadeia Curta 38
4.2.4. Excreção de Compostos Fenólicos em Modelo Animal 39

4.2.4.1. Animais 39
4.2.4.2. Ensaio biológico 39
4.2.4.3. Extração de Compostos Fenólicos e Identificação de Metabólitos em Material Fecal e Urina 40
4.2.5. Análise Estatística 40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO 41
5.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO 47
5.3. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO 49
5.4. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO 54
5.5. PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO 57
5.2. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E CATABÓLITOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE TOMATE ROXO EM MODELOS DE DIGESTÃO IN VITRO E ANIMAL 63
5.7.1. Simulação da Digestão in vitro 63
6. CONCLUSÕES 89
Referências 93

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é o vegetal mais consumido no mundo e desempenham um papel importante na dieta humana. Pertence à família *Solanaceae*, a qual contém diversas outras espécies de interesse comercial e/ou nutricional tais como batata, pimenta, berinjela, tabaco e a flor petúnia (SLIMESTAD; VERHEUL, 2009). O fruto de tomate contém compostos bioativos, incluindo carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico e flavonoides, os quais são conhecidos pela alta capacidade antioxidante (SHI; KAKUDA; YEUNG, 2004). Nos frutos maduros, o licopeno é o principal carotenoide, sendo responsável pela coloração vermelha característica. Os polifenóis estão presentes em baixas concentrações. Os ácidos hidroxicinâmicos, flavanonas e flavonóis são os principais compostos fenólicos presentes nesses frutos (MARTÍ; ROSELLÓ; CEBOLLA-CORNEJO, 2016).

Tendo em vista os potenciais efeitos favoráveis à saúde dos compostos bioativos, crescentes esforços têm sido empregados com o objetivo de produzir tomates com conteúdo superior de flavonoides e outros compostos (SLIMESTAD; FOSSEN; VERHEUL, 2008; RAIOLA et al., 2014; MARTÍ; ROSELLÓ; CEBOLLA-CORNEJO, 2016). Nesse contexto, técnicas de melhoramento de plantas têm sido amplamente aplicáveis ao tomate devido à disponibilidade de recursos genéticos (coleções de genótipos) atreladas às informações genômicas (TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012). Dentre essas técnicas, a engenharia genética e a introgressão de alelos, por melhoramento convencional, foram aplicadas para a obtenção de tomates ricos em flavonoides e carotenoides. A introgressão de alelos no tomate resultou em um genótipo que abriga os alelos *Anthocyanin fruit* (*Aft), atroviolaceum (atv)*, and *high pigment2 (hp2)*, os quais conferiram um efeito sinérgico, aumentando o acúmulo de antocianinas, principalmente a petunidina (*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo, gerando um fruto roxo (SESTARI et al., 2014). Além dos genes relacionados ao acúmulo de antocianinas, o alelo *Beta-carotene (B)*, presente nos parentes selvagens do tomate *S. cheesmaniae, S. galapagense*, *S. habrochaites* and *S. pennellii*, pode ser também introduzido no tomate, resultando em um fruto laranja rico em β-caroteno (MOHAN et al., 2016; SESTARI et al., 2014).

Uma vez ingeridos, os polifenois são considerados xenobióticos pelo organismo e, portanto, amplamente metabolizados e eliminados pela bile e urina. O primeiro passo no metabolismo de compostos fenólicos consiste na deglicosilação antes da absorção no intestino delgado. Os polifenois absorvidos são rapidamente biotransformados por enzimas de fase II em metabólitos conjugados (glucurônidos, sulfatos e/ou *O*-metilados) pelos enterócitos e hepatócitos. Estima-se que 5% a 10% dos polifenóis ingeridos são absorvidos no intestino delgado, enquanto que 90% a 95% atingem o cólon, onde são intensamente degradados pela microbiota, gerando uma grande diversidade de metabólitos fenólicos bioativos, que são posteriormente absorvidos (DUEÑAS et al., 2015).

Evidências indicam que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental no metabolismo de diversos compostos encontrados nos alimentos. A capacidade metabólica desse microbioma é aproximadamente 100 vezes maior que a do fígado humano, devido à grande diversidade de espécies bacterianas e ao grande número de genes que elas contêm. A biodisponibilidade e o impacto dos polifenóis na saúde do indivíduo dependem em grande parte da sua biotransformação pela microbiota. Em algumas situações, apenas o metabólito fenólico pode ser absorvido e exercer um impacto benéfico, podendo apresentar maior atividade ao nível fisiológico do que seus precursores alimentares (DUDA-CHODAK et al., 2015).

A petunidina é rara em alimentos e quando encontrada está em baixa quantidade. Dessa forma, o tomate roxo surge como uma das principais fontes alimentares desse composto. Na literatura, há pouca ou nenhuma informação sobre a absorção, metabolização e excreção desse tipo de antocianina. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de compostos bioativos e voláteis de tomates cereja enriquecidos com flavonoides e carotenoides, por meio de introgressão de alelos, e avaliar a estabilidade e metabolização de flavonoides de tomate roxo durante digestão *in vitro* e em modelo animal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. COMPOSTOS BIOATIVOS

2.1.1. Flavonoides e Ácidos Fenólicos

Nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Estudos indicam que a alta ingestão de produtos vegetais está associada à redução no risco de desenvolvimento de uma variedade de doenças crônicas, tais como a aterosclerose e o câncer (LIU, 2013). Estes efeitos têm sido parcialmente atribuídos aos compostos bioativos, particularmente polifenóis, tais como os flavonoides e ácidos fenólicos (LEE; KANG; CHO, 2007).

Em geral, os ácidos fenólicos são compostos fenólicos que possuem uma função orgânica de ácido carboxílico, sendo classificados em dois principais grupos: hidroxicinâmicos, com nove átmos de carbono, e hidroxibenzoicos, com sete átomos de carbono (**Figura 1**). Embora o esqueleto básico permaneça o mesmo, os números e as posições dos grupos hidroxila e metoxila ligados ao anel aromático resultam em uma ampla variedade de compostos. Os ácidos cafeico, *p*-coumárico e ferúlico, da classe hidroxicinâmicos, e os vanílico e protocatecuico, da classe hidroxibenzoicos, são os mais comumente encontrados em plantas (ROBBINS, 2003).

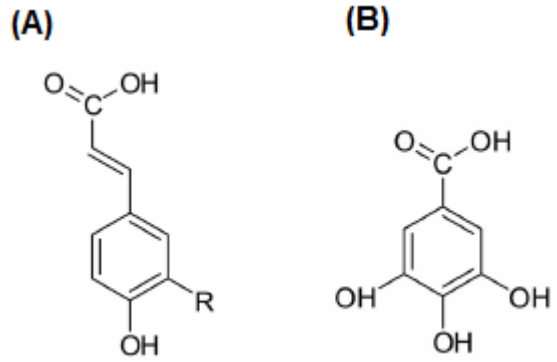


Figura 1. Estrutura básica dos ácidos hidroxicinâmicos (A) e hidroxibenzoicos (B). Fonte: adptado de Amarowicz et al. (2009).

Assim como os ácidos fenólicos, os flavonoides estão presentes em frutas, hortaliças, ervas e bebidas como o chá verde e o vinho e estão associados a uma ampla gama de efeitos na promoção à saúde. Tal característica é atribuída

principalmente às suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Além disso, os flavonoides possuem a capacidade de modular algumas enzimas e vias de sinalização celular (PANDEY; RIZVI, 2009)

Quimicamente, os flavonoides são caracterizados por apresentarem 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental (C6-C3-C6), constituídos por dois anéis aromáticos (anel A e B) unidos por uma cadeia de três átomos de carbono que pode ou não formar um terceiro anel (anel C) (**Figura 2**) (DI CARLO et al., 1999)

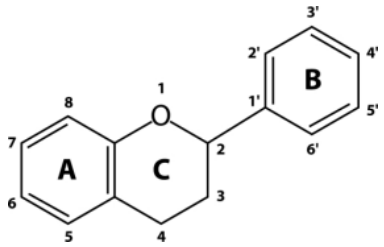


Figura 2. Estrutura básica dos flavonoides. Fonte: Stefek (2011)

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

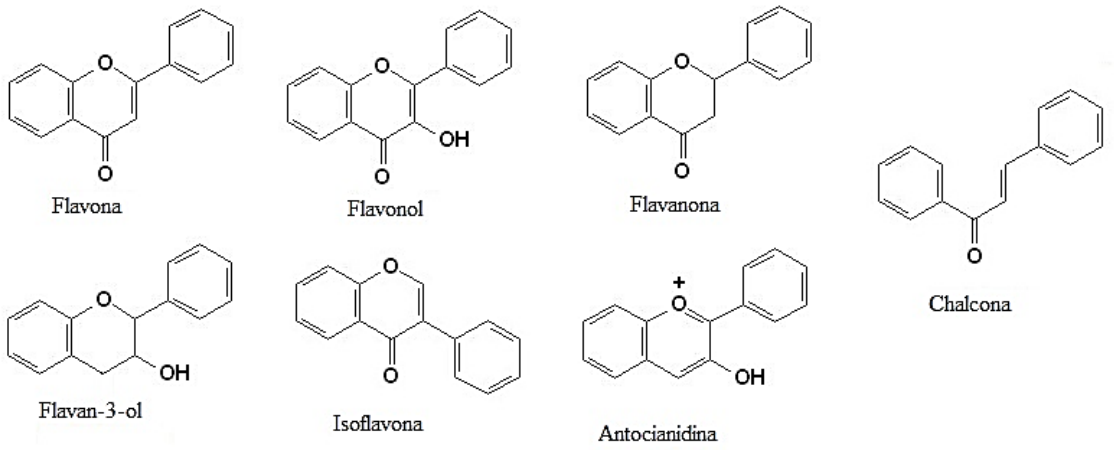


Figura 3. Classificação dos flavonoides em subclasses. Fonte: Pandey; Rizvi (2009).

Dentre os flavonoides, as antocianidinas correspondem ao maior grupo de pigmentos naturais e possuem alta solubilidade em água. Na planta, ocorrem geralmente na forma glicosilada, também denominada de antocianinas. As

antocianidinas são assim chamadas quando estão na forma de aglicona. Os tipos mais frequentes em frutas e hortaliças são a cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina, com uma distribuição na natureza de aproximadamente 50%, 12%, 12%, 12%, 7%, e 7%, respectivamente (**Figura 4**). As agliconas podem se conjugar a açúcares e a ácidos orgânicos para gerar uma ampla variedade de antocianinas de diferentes cores, desde o laranja e vermelho, até o azul e roxo. Como consequência, essas substâncias são facilmente visíveis em frutos e flores (DEL RIO et al., 2013).

O que distingue as antocianidinas são os padrões de metilação e hidroxilação no anel B e as diferentes cores. Quando este anel possui mais grupos hidroxila, a coloração é direcionada à extremidade azul do espectro visível, enquanto que os grupos metoxila, em maioria, direcionam a cor para a extremidade vermelha (HE; GIUSTI, 2010).

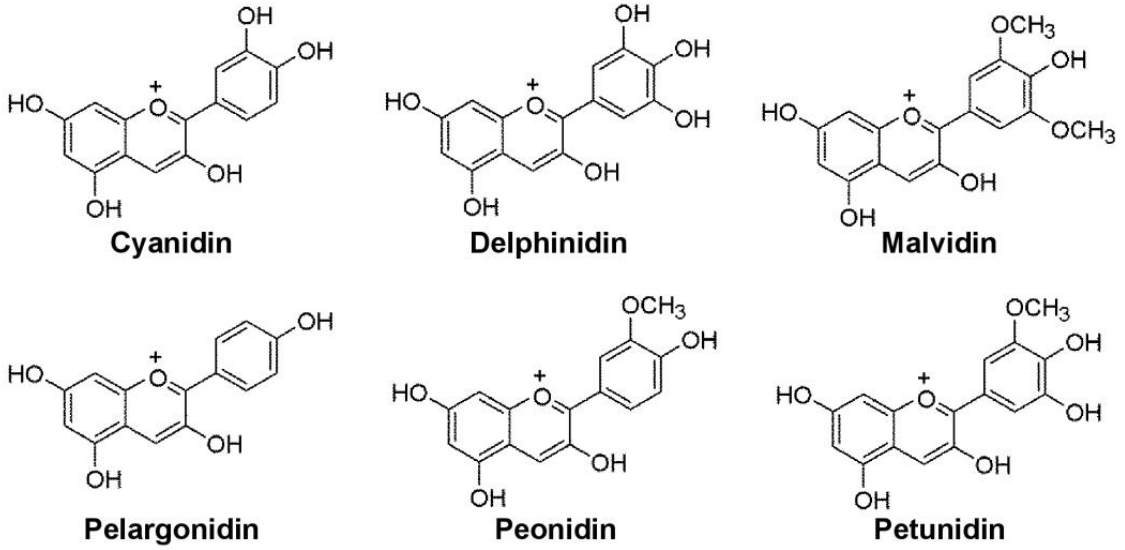


Figura 4. Estrutura química das antocianidinas. Fonte: Yuan et al. (2012).

Os principais açúcares geralmente conjugados às antocianidinas são a glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou os dissacarídeos constituídos por esses açúcares. Estes por sua vez, podem também estar ligados a ácidos alifáticos ou fenólicos (como os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e vanílico), constituindo uma antocianina acilada. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade em água e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados

com as antocianidinas. Todavia, enquanto a glicosilação aumenta a solubilidade, a acilação a diminui (TERCI, 2004).

2.1.1.1. Biodisponibilidade de flavonoides

Estudos demonstram o potencial dos flavonoides na saúde humana, incluindo efeitos quimiopreventivos, protetor contra doenças cardiovasculares, síndrome metabólica (MARTIN et al., 2011). Contudo, estes benefícios dependem da absorção e do metabolismo responsável pela distribuição dos flavonoides e de seus metabólitos bioativos aos tecidos sensíveis à sua ação (CHARRON et al., 2007).

Em algumas classes de flavonoides, a deglicosilação por glicosidases endógenas (p. ex. floridzina hidrolase) é necessária para que o composto seja absorvido, uma vez que a forma aglicona, por ser hidrofóbica, pode ser absorvida no intestino delgado por transporte passivo. Porém, alguns flavonoides conjugados à glicose podem também ser absorvidos através do transportador de glicose sódio dependente (SGLT1). Os glicosídeos que não são deglicosilados ou não apresentam afinidade pela SGLT1, tais como os rutinosídeos, são transportados em direção ao cólon, onde as bactérias intestinais têm a capacidade de hidrolisar a ligação glicosídica entre os açúcares e os flavonoides, liberando as agliconas. Contudo, devido à reduzida capacidade de absorção do cólon, apenas uma pequena quantidade destes compostos pode ser incorporada (MARÍN et al., 2015a).

As antocianinas, por exemplo, apresentam baixa biodisponibilidade, sendo esse processo dependente da estrutura química, e influenciado também pela natureza da aglicona (POJER et al., 2013). Tal característica está relacionada ainda à presença de glicosilações e acilações (CHARRON et al., 2009). Sabe-se também que as antocianinas aciladas são menos absorvidas do que as não-aciladas. Uma das hipóteses mais aceitas para tal fato é a de que as antocianinas aciladas possuem baixa afinidade pelos transportadores de íons orgânicos, como as bilitranslocases, expressas no epitélio gástrico (PRIOR; WU, 2006).

Uma vez absorvidos, flavonoides e ácidos fenólicos sofrerem extensivo metabolismo antes da entrada na circulação sistêmica. Os compostos são ligados à albumina e transportados até o fígado através da veia porta. As reações de biotransformação mais comuns envolvem reações de fase I (oxidação, redução,

hidrólise) e, principalmente, reações de fase II (conjugação com sulfato, glucuronato ou *O*-metilação) que ocorrem no epitélio intestinal e também no fígado (VISKUPIČOVÁ; ONDREJOVIČ; ŠTURDÍK, 2008).

A conjugação resulta no aumento da hidrofilicidade da molécula e é uma via importante no metabolismo de flavonoides. As principais transferases envolvidas neste processo são UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), que usam ácido UDP-glucurônico como co-substrato e transferem ácido glucurônico para substratos disponíveis; e as sulfotransferases (SULTs), que catalisam a transferência de um grupo sulfonato para um substrato. A conjugação leva a um aumento do peso molecular do composto original. Geralmente aumenta significativamente a hidrofilicidade para que o composto possa ser eliminado através da urina ou da bile, com exceção da metilação, que cria um metabólito menos ou igualmente polar (CERMAK, 2008; SINGH, 2010) (**Figura 5**).

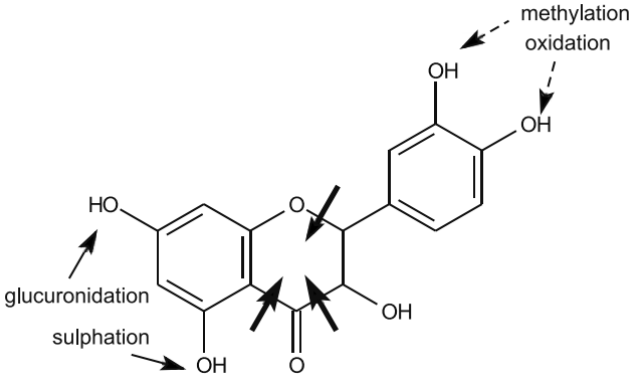


Figura 5. Potenciais posições para reações de biotransformação e clivagem do anel C dos flavonoides. Fonte: Viskupičová, Ondrejovič, Šturdík (2008).

Os polifenóis não absorvidos, bem como aqueles excretados juntamente com a bile no lúmen intestinal, seguem para o cólon onde passam por extensivo catabolismo resultante da ação da microbiota, produzindo uma variedade de compostos fenólicos mais simples (Marín et al., 2015).

2.1.1.2. Compostos Fenólicos e Microbiota Intestinal

Estudos em modelos humanos e animais encontram uma grande quantidade de catabólitos de compostos polifenóis, oriundo da ação da microbiota intestinal, circulantes, entre eles os ácidos fenólicos simples (FORESTER; WATERHOUSE, 2009). Isso demonstra que as bactérias do cólon desempenham

um importante papel no metabolismo dos flavonoides, uma vez que são capazes de metabolizar essas substâncias, produzindo uma série de ácidos fenólicos, que podem ser absorvidos e apresentar atividade biológica (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

A baixa biodisponibilidade de alguns polifenóis favorece as interações com a microbiota intestinal. Essa interação ocorre de forma bidirecional, na qual os polifenóis modulam a composição da microbiota e, reciprocamente, os microrganismos convertem os polifenóis em seus metabólitos, os quais podem exercer diferentes efeitos. A microbiota intestinal é, portanto, peça-chave para explicar os efeitos variáveis dos polifenóis na saúde humana (TOMÁS-BARBERÁN; SELMA; ESPÍN, 2016).

As bactérias intestinais podem hidrolisar glicosídeos, glucuronídeos, sulfatos, amidas, ésteres e lactonas através da ação de enzimas como α-rhamnosidase, β-glucuronidase, β-glucosidase, sulfatase e esterases. Outras reações catalisadas por enzimas microbianas intestinais são a clivagem de anéis aromáticos, reduções, descarboxilação, desmetilação, isomerização, desidroxilação, dentre outras (HERVERT-HERNÁNDEZ; GOÑI, 2011)

O catabolismo bacteriano das antocianinas, por exemplo, envolve a clivagem de ligações 3-glicosídicas pelas β-glucosidase bacterianas, o que provoca instabilidade da antocianidina a pH neutro e rápida ruptura do anel heterocíclico. Os principais produtos estáveis de degradação são os ácidos fenólicos correspondentes (derivados do anel B do esqueleto antocianínico) e os derivados do floroglucinol (derivados do anel A) (DUDA-CHODAK et al., 2015). Estes ácidos fenólicos podem ser absorvidos pelos colonócitos e também sofrem metabolização de fase II.

Os catabólitos microbianos tais como os ácidos fenólicos di-hidroxilados (ácido 3,4-dihidroxifenilpropiônico, ácido 3-hidroxifenilpropiônico e ácido 3,4-dihidroxifenilacético) têm apresentado potencial efeito terapêutico no tratamento de doenças imunoinflamatórias, como a aterosclerose, bem como na modulação da resposta inflamatória a antígenos bacterianos, o que pode ter implicações no caso de doenças inflamatórias ou auto-imunes crônicas, como as doenças inflamatórias intestinais (CARDONA et al., 2013).

2.1.2. Carotenoides

Carotenoides são pigmentos naturais, lipossolúveis, sintetizados por plantas, algas e bactérias, responsáveis pelas colorações amarela, laranja e vermelha em vários frutos e vegetais. Podem ser classificados em dois grupos principais com base nos grupos funcionais: as xantofilas, contendo oxigênio como grupo funcional, incluindo luteína e zeaxantina; e os carotenos, que contêm apenas uma cadeia hidrocarbonada sem qualquer grupo funcional, como o α-caroteno, β-caroteno e licopeno (**Figura 6**) (SAINI; NILE; PARK, 2015).

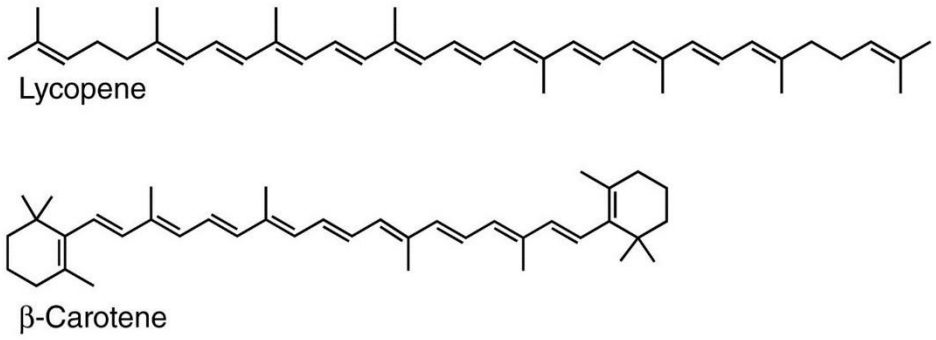


Figura 6. Estrutura química do licopeno e do β-caroteno. Adaptado de Sporn; Liby, (2013).

Além dos flavonoides e ácidos fenólicos, os carotenoides também são importantes compostos antioxidantes presentes em tomates. Os dois principais carotenoides encontrados no tomate são o licopeno, o qual confere a cor vermelha ao fruto, e o β-caroteno. O licopeno apresenta capacidade antioxidante, estando relacionado com a diminuição na incidência de alguns tipos de câncer, em especial o de próstata. Por outro lado, o β-caroteno possui especial interesse devido à sua atividade provitamina A (FRUSCIANTE et al., 2007).

Os carotenoides compreendem uma classe de isoprenoides, constituída por uma cadeia longa de 40 carbonos conjugados por ligações duplas. São sintetizados a partir dos geranilgeranil difosfatos, que são condensados em fitoeno pela fitoeno sintase. O fitoeno é então convertido em todo-trans-licopeno pela fitoeno dessaturase. O todo-trans-licopeno pode ser convertido em α-caroteno, β-caroteno e outras xantofilas através de reações de ciclização e oxigenações pela enzima licopeno β-ciclase (**Figura 7**) (GAO et al., 2016).

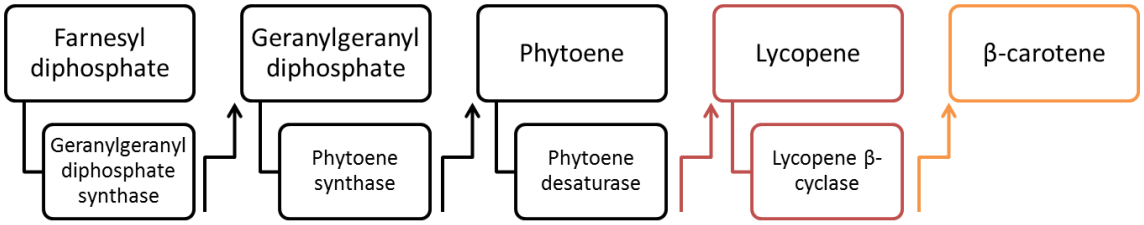


Figura 7. Rota simplificada da biossíntese de carotenoides.

2.2. TOMATES OBTIDOS POR INTROGRESSÃO DE ALELOS

Uma vez que alguns compostos bioativos não são comumente encontrados nos alimentos vegetais mais consumidos, o melhoramento de plantas surge como uma estratégia/recurso utilizado para que algumas características sejam incorporadas a uma espécie vegetal, implicando na produção e/ou acúmulo de determinados compostos (BUTELLI et al., 2008). A introgressão de alelos é um processo que consiste no melhoramento genético convencional, no qual cruzamentos interespecíficos entre espécies distintas, geneticamente compatíveis, de um mesmo gênero, são realizados com a finalidade de acumular as características desejadas (GONZALI; MAZZUCATO; PERATA, 2009).

Progressos significativos têm sido obtidos enriquecimentos de compostos bioativos em frutos de tomate, tanto por engenharia genética como por melhoramento convencional. A síntese de muitos dos compostos responsáveis pela qualidade nutricional do tomate resulta de atividades coordenadas que envolvem muitas das vias do metabolismo primário e secundário reguladas por sinais fisiológicos e ambientais (RAIOLA et al., 2014). Nesse contexto, o tomate é um bom candidato para a incorporação de características que aumentem a produção de flavonoides, ou mesmo incorporar algumas características como a síntese e acúmulo de antocianinas, por tratar-se de um fruto cultivado em todo o mundo, e com níveis de polifenóis considerados abaixo do ideal (BUTELLI et al., 2008).

O tomate pertence à família *Solanaceae,* a qual inclui mais de 3.000 espécies. Todavia, a seção *Lycopersicon* do gênero *Solanum* é composta por apenas 13 subespécies: o tomate comercial, *Solanum lycopersicum*, que é a única espécie domesticada e 12 espécies selvagens (como *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. Pennellii*, e *S. pimpinellifolium*) (RAIOLA et al., 2014).

A produção natural de antocianinas é restrita a algumas espécies selvagens do gênero *Solanum*. Assim, cruzamentos interespecíficos transferiram a capacidade de produzir pequenas quantidades de antocianinas na casca do tomate comum, principalmente aqueles relacionados aos alelos: *Anthocyanin fruit* (*Aft)*, *atroviolacea* (*atv)* e *high pigment-2 (hp2)*. O alelo dominante *Aft*, que induz uma pigmentação limitada após estimulação por alta intensidade de luz, foi introgredido em plantas de tomate domesticado por um cruzamento com o *S. chilense*. O alelo recessivo *atv*, resultante do cruzamento com o *S. cheesmaniae*, estimula a forte pigmentação com antocianinas em toda a planta, particularmente em tecidos vegetativos (GONZALI; MAZZUCATO; PERATA, 2009). O *hp2*, alelo defeituoso homólogo ao DET1 do gênero *Arabidopsis,* é responsável pela capacidade de resposta exagerada à luz (MUSTILLI et al., 1999).

Além dos alelos relacionados à produção de antocianinas, o alelo *Beta Carotene* (*B),* introgredido no tomate comum através de cruzamentos com o relativo selvagem *S. galapagense* confere ao fruto de tomate capacidade de síntese a acúmulo de β-caroteno (MOHAN et al., 2016; SESTARI et al., 2014).

Nesse contexto, o fruto de tomate roxo (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme)*, rico em antocianinas, e o fruto de tomate laranja, rico em β-caroteno, foram desenvolvidos pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) através da introgressão dos alelos descritos anteriormente em background da cultivar MicroTom (SESTARI et al., 2014).

Além da técnica de melhoramento genético convencional, a transgenia também é utilizada para a incorporação de características à planta. Assim, além do tomate roxo obtido por introgressão de alelos, foi desenvolvido, no Reino Unido, o tomate roxo transgênico, que expressa dois fatores de transcrição, oriundos da flor ornamental *snapdragon* (*Antirrhinum majus*). Os frutos foram capazes de acumular antocianinas em concentrações superiores aos níveis encontrados em amoras, framboesas e morangos (SU et al., 2016). A expressão dos dois transgenes resultou em frutos com intensa coloração roxa tanto na casca quanto na polpa. Nestes tomates foram identificados 6 derivados das antocianidinas delfinidina e petunidina, entre elas a delfinidina 3-(cafeoil)-rutinosídeo-5-glucosídeo, delfinidina 3-(*cis*-coumaroil)-rutinosideo-5-glucosídeo, delfinidina 3-(*trans*-coumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo, delfinidina 3-(feruloil)-rutinosídeo-5-

glucosídeo, petunidina 3-(*trans*-coumaroil)-rutinosídeo-5-glucosídeo e a petunidina 3-(feruloil)-rutinosídeo-5-glucosídeo (BUTELLI et al., 2008; SU et al., 2016).

Nessa perspectiva, o extrato fenólico de tomate roxo obtido pela introgressão de alelos apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de peritonite induzido por LPS em camundongos (MAIA, 2015), o que demonstra o potencial destas tecnologias na incorporação e enriquecimento de plantas. Todavia, até o presente momento nada se sabe sobre a biodisponibilidade e metabolismo da antocianina majoritária, a petunidina (*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo e demais compostos fenólicos presentes nesse fruto.

Diante do exposto, a hipótese do trabalho fundamenta-se na possibilidade de os flavonoides e ácidos fenólicos presentes no tomate roxo, principalmente a petunidina (*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo serem metabolizados pela microbiota intestinal a ácidos fenólicos mais simples.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de compostos bioativos e voláteis de tomates cereja enriquecidos por meio de introgressão de alelos, e avaliar a estabilidade e metabolização de flavonoides de tomate roxo durante digestão *in vitro* e em modelo animal.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de flavonoides, carotenoides e compostos voláteis dos tomates laranja e roxo, obtidos por introgressão de alelos e do tomate cereja parental;
- Avaliar a estabilidade e metabolização dos flavonoides e ácidos fenólicos da casca do tomate roxo em modelo de simulação da digestão *in vitro;*
- Identificar os metabólitos e catabólitos de compostos fenólicos presentes na urina e nas fezes de ratos após consumo do extrato de tomate roxo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Amostragem

Os tomates cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) vermelho, laranja [obtido por introgressão do alelo *β-carotene (B)*], e roxo [obtido por introgressão dos alelos *Anthocyan fruit (Aft), atroviolaceum (atv), e high pigment-2 (hp2)*], foram fornecidos pelo Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Escola Superior de Agricultura ¨Luiz de Queiroz¨, da Universidade de São Paulo (ESALq-USP). Os tomateiros foram mantidos em estufa com irrigação automática (quatro vezes por dia), a temperatura média de 28 °C, fotoperíodo de 11,5/13 horas (inverno/verão) e 250-350 mmol m-2 s-1 PAR irradiância (radiação natural reduzida com uma malha refletora). Para os ensaios, foram obtidos cerca de 200g de tomate roxo e 100g de cada um dos tipos de tomates vermelho e laranja, colhidos em dezembro de 2015.

4.1.2. Preparo e Armazenamento das Amostras

Os tomates foram higienizados em água corrente, e pesados em balança analítica para obtenção do peso médio de cada tipo (n=25). Cada fruto foi manualmente fracionado em polpa e casca, com auxílio de uma faca, e congelado imediatamente em nitrogênio líquido. As respectivas cascas e polpas foram pesadas para obtenção da proporção casca/polpa. As frações dos tomates foram trituradas em almofariz e pistilo juntamente com nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas em ultrafreezer à temperatura de -80°C até realização das análises.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Caracterização Química dos Tomates Vermelho, Laranja e Roxo

4.2.1.1. Extração

Amostras de casca (0,5 g) e polpa (1,5 g) foram homoaleloizadas utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em metanol 70%

(tomates vermelho e laranja) ou metanol/água/ácido acético (70:25:5 v/v) (tomate roxo). O extrato assim obtido foi posteriormente mantido sob agitação a 300 rpm/120 min/4°C e filtrado, obtendo-se assim o extrato fenólico, o qual foi utilizado para as análises de fenólicos totais, capacidade antioxidante e antocianinas monoméricas. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.2.1.2. Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o 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. A curva de calibração de ácido gálico (AG) foi utilizada para quantificação dos fenólicos totais. Os resultados foram expressos como mg AG eq./100g de base úmida (b.u.).

4.2.1.3. Capacidade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada pelos métodos *Oxygen Radical Assay Capacity* (ORAC) segundo protocolo descrito por Prior et al. (2003) e pelo método sequestro do radical α,α-difenil-βpicrilhidrazina (DPPH) proposto por Brand-Williams et al. (1995).

4.2.1.3.1. Método Oxygen radical assay capacity (ORAC)

Para análise de 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 25μL de tampão (branco), ou 25μL de solução Trolox (curva de calibração) ou 25μL de extrato, devidamente diluídas quando necessário, foram distribuídas em placa de 96 poços seguidas da adição automática de 150μL de solução de fluoresceína e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi iniciada pela adição de 25μL 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 leitura 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 b.u.. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.1.3.2. Método DPPH

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH (0,05 mM) de modo que apresentasse absorbância aproximada de 0,4 em comprimento de onda de 517 nm. As leituras foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 poços para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm, no qual cada poço foi preenchido 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 absorbância 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:

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

Onde, A(Branco) refere-se à absorbância do branco (metanol) A(Amostra) refere-se à absorbância da amostra. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/g de base úmida (b.u.).

4.2.1.4. Determinação de antocianinas monoméricas

O extrato obtido de acordo com o item 4.2.1.1, foi utilizado para determinação de antocianinas monoméricas, segundo o método de diferença de pH, proposto por Lee et al. (2005). Foram utilizadas duas soluções tampão: cloreto de potássio/ácido clorídrico de pH 1,0 (0,025M), e acetato de sódio/ácido clorídrico de pH 4,5 (0,4M). Os extratos foram diluídos em ambas as soluções

tampão, a concentração da amostra em pH 1,0 deve apresentar leitura entre 0,2 e 1,4 de absorbância. As leituras de absorbância foram realizadas a 520nm e 700nm, para as diluições no tampão de pH 1,0 e no de pH 4,5, em espectrofotômetro (Hewlett Packard, modelo 8453). A absorbância final foi calculada a partir da equação:

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

A concentração total de antocianinas monoméricas foi expressa em equivalente a cianidina-3-glucosídeo, segundo a fórmula:

$$AM\ (mg/100g) = A \times PM \times FD \times 100 / (\varepsilon \times 1)$$

onde:

AM = Antocianinas monoméricas

A = Absorbância

PM = Peso molecular

FD = Fator de diluição

ε = Absortividade molar

4.2.1.5. Determinação de Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os sucos extraídos dos tomates vermelho, laranja e roxo foram filtrados através de uma gase. Os SST, expressos em ° Brix, foram medidos utilizando um refratômetro manual Abbe (A. Krüss Optronic, Alemanha) calibrado com água ultrapura.

4.2.1.6. Análise de Ácidos Orgânicos

As amostras (0,5 g) previamente pulverizadas com nitrogênio líquido foram homogeneizadas com solução de ácido metafosfórico a 3% (m/v), em proporção 1:8. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm, e diluído 1 vez com ácido metafosfórico para análise. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Hewlett Packard Series 1100) utilizando coluna SUPELCOGEL C-610H (30 cm x 7.8 mm) e fase móvel em condição isocrática composta por composta por ácido fosfórico 0,1 % (w/v), com fluxo de 0,5 mL/minuto (PASTERNAK et al., 2005). A detecção foi realizada a 210 e 240 nm. A quantificação e identificação foram realizadas a partir das curvas de

calibração dos ácidos ascórbico, cítrico e málico. Os resultados foram expressos em mg/100 de amostra, em base úmida.

4.2.1.7. Análise de Açúcares Solúveis

Os açúcares solúveis (glicose, sacarose e frutose) foram analisados de acordo com CORDENUNSI; SHIGA; LAJOLO (2008). As amostras foram pesadas (100 mg) em tubos Eppendorf de 2 mL, e adicionadas de 0,5 mL de etanol 80% em água com posterior incubação a 80°C por 15 minutos. O procedimento foi repetido três vezes. Os sobrenadantes foram combinados em balão de 2 mL, e o volume completado com etanol 80%. Uma alíquota de 1 mL foi utilizada para total evaporação do etanol com sistema SpeedVac®. Os resíduos foram reconstituídos com 1 mL água deionizada, filtrados em membrana (0,45 mm) e analisados por CLAE-PAD (Dionex DX 500, Sunnyvalle, CA, USA), utilizando coluna Carbopac PA1 (250 x 4 mm, 5 mm de tamanho de partícula). A fase móvel foi constituída de 18 mM NaOH com fluxo constante (1,0 mL/min). Soluções de glicose, frutose, e sacarose a 1% (Sigma, Chemical CO, Saint Louis, MO, USA) foram utilizadas como referência. As analises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em gramas por 100 g de amostra em base fresca.

4.2.1.8. Identificação e Quantificação de Carotenoides

4.2.1.8.1. Extração

Os carotenoides foram extraídos de acordo com Sérino, Gomez, Costagliola e Gautier, (2009). As amostras de casca (50 mg) e polpa (100 mg) dos tomates foram pesadas em tubos de microcentrífuga de 2 mL âmbar. Foram adicionados 100 µL de NaCl saturado, 200 µL de diclorometano e 500 µL de mistura hexano:éter (1:1), com posterior agitação por 30 segundos em vórtex. Após centrifugação a 17949 RCF por 5 minutos a 4 °C, a fase orgânica superior foi coletada e transferida para um novo tubo âmbar. A adição da mistura hexano:éter (1:1) foi repetida três vezes, com combinação dos sobrenadantes no mesmo tubo. O volume total foi completamente seco em Speed-Vac. O conteúdo seco foi reconstituído em 200 µL de acetato de etila e filtrado com membrana de 0,45 µm para posterior análise. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg/100g bu.

4.2.1.8.2. CLAE/DAD

A identificação e quantificação de carotenoides foram realizadas em CLAE-DAD, modelo Infinity 1260 (Agilent Technologies, EUA) equipado com coluna YMC, C30, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm. A fase móvel foi composta por metanol/ MTBE/ água/ tampão de acetato de amônio (88/5/5/2, fase móvel A e 28/70/0/ 2, fase móvel B), com fluxo de 1,0 mL/min e coluna a 25 ° C. O gradiente foi de 100% A a 0 min; 15% A de 0 a 40 min; 100% B de 40 a 55 min, e 100% A de 55 a 65 min. Comprimentos de onda a 474, 450 e 328 nm. A identificação foi realizada comparando o tempo de retenção e a similaridade do espectro de absorção com o padrão comercial. A quantificação foi feita com base nas curvas padrão de licopeno e β-caroteno.

4.2.1.9. Identificação e Quantificação de Flavonoides e Ácidos Fenólicos

Amostras de casca (1,5 g) e polpa (5,0 g) dos tomates foram homogeneizadas por um minuto utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em 100 mL metanol/água/ácido acético (70:25:5 v/v), para o tomate roxo, ou 100 mL metanol/água (70:30), para os tomates vermelho e laranja, e filtradas à vácuo em funil de büchner. O sedimento foi recuperado e realizado mais duas re-extrações com 50 mL de metanol acidificado. Os extratos assim obtidos foram concentrados em rotaevaporador (Rotavapor® 120, Büchi, Flawil, Suíca) à temperatura de 40 °C até a remoção do metanol para a etapa de separação em fase sólida. As extrações foram realizadas em duplicata.

4.2.1.9.1. Extração em fase sólida (SPE)

A amostra livre de metanol foi passada em coluna de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Germany), preparada em seringa própria de 6 mL (CLAE Technology) e pré-condicionada com metanol e água destilada. Após aplicação do extrato, a coluna foi lavada com água e os compostos retidos eluídos com metanol acidificado com ácido clorídrico a 0,3%. Os eluatos assim obtidos foram completamente secos em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo, ressuspendidos em metanol acidificado com ácido acético (95:5 v/v) e filtrados com membrana de PVDF (0,45 µm) para análise por CLAE/DAD e LC-ESI-MS/MS.

4.2.1.9.2. CLAE/DAD

A identificação e a quantificação dos flavonoides foram realizadas de acordo com Teixeira et al. (2015) através de CLAE em cromatógrafo modelo Infinity 1260 (Agilent Technologies), equipado com injetor automático, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo software próprio da Agilent. A coluna utilizada foi a Prodigy 5μ ODS_3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min, temperatura de corrida 25 °C, e a eluição sendo realizada com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5 % em água e B: ácido fórmico 0,5 % em acetonitrila. O gradiente de concentração dos solventes consistiu em 10% de B no início, 10% em 5 min, 20% em 15 min, 25% em 25 min, 45% a 33 min, de 50% em 38 min, 90% em 43 minutos, 90% em 44 minutos e 10% em 45 min (tempo de corrida, 45 min). A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270, 328, 370 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 e rutina e do ácido fenólico ácido clorogênico (Sigma, Chemical Co., St. Louis, EUA).

4.2.1.9.3. LC-ESI-MS/MS

A identificação de flavonoides e ácidos fenólicos foi conduzida em aparelho de cromatografia líquida modelo Prominence (Shimadzu, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo *íon trap*, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha) e interface de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electron Spray Ionization*). As condições de separação foram as mesmas utilizadas para a CLAE/DAD, descritas no item anterior. O ESI foi mantido em modo positivo para análise de 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, se comparou com o tempo de retenção de padrões comerciais.

4.2.2. Análise de Compostos Voláteis por CG-MS

As análises dos compostos voláteis dos tomates foram realizadas utilizando o método de micro-extração em fase sólida (SPME, do ingês *Solid Phase Microextraction*), de acordo com o método descrito por Gomes (2016). Aproximadamente 3g de frutos inteiros, foram finamente fatiados e acrescidos de 7 mL de solução de NaCl a 30% (p/v) em vials de 15 mL, com tampa de septo de silicone, e congelados a -20 °C para análise posterior. O material foi descongelado a 40 ºC em banho-maria com agitação magnética constante na presença de uma fibra de SPME (CAR/DVB/PDMS 100µm, Supelco), a qual permaneceu em contato com os voláteis acumulados no *headspace* do vial por 50 minutos. Uma vez capturados, os compostos voláteis foram imediatamente dessorvidos da fibra pela exposição ao calor do injetor do cromatógrafo (200 °C) por 10 minutos. Foi utilizado o cromatógrafo GC–MS 5977 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) e coluna cromatográfica Supelcowax 10 (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme). O programa de temperatura utilizado foi: rampa de temperatura de 2 °C/min de 40 °C à 150 °C em modo *splitless*. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o detector seletivo de massas foi de 250 °C e a ionização foi feita por impacto de elétrons (70 eV) com a fonte de íons mantida a 220 °C. As análises foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os da biblioteca NIST (NIST98, versão 2.0, Gaithersburg, USA) e considerados apenas aqueles com índice de similaridade acima de 70%. A identificação também foi baseada na comparação do Índice Kovats (KI) de uma série de n-alcanos (C7-C30, Supelco) com os relatados na literatura.

4.2.3. Estabilidade dos Flavonoides em Modelo de Digestão In Vitro

4.2.3.1. Extrato Fenólico

A amostras (60g) da casca do tomate roxo foi homogeneizada utilizando Ultra-Turrax (Polytron-Kinematica GmbH, Kriens-Luzern, Suíça) em 1000 mL metanol/água/ácido acético (70:25:5 v/v/v), e filtrados à vácuo em funil de büchner. O extrato assim obtido foi concentrado em rotaevaporador (Rotavapor® 120, Büchi, Flawil, Suíca) à temperatura de 40 °C até a remoção do metanol.

A amostra livre de metanol foi passada em colunas de poliamida (CC 6, Macherey-Nagel, Alemanha), preparada em seringa própria de 60 mL (CLAE Technology) e pré-condicionada com metanol e água destilada. Após a aplicação, as colunas foram lavadas com água destilada e a eluição feita com metanol acidificado com ácido clorídrico 0,3%. Os eluatos foram completamente secos em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo e ressuspendidas em 10 mL de água destilada, obtendo-se assim o extrato para simulação da digestão *in vitro*. Foram quantificados fenólicos totais, petunidina e rutina.

4.2.3.2. Simulação da digestão in vitro

O extrato da casca do tomate roxo (item 3.2.2.2) foi submetido à incubação, por um período de 30 horas, no *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME®), o qual consiste em uma sucessão de cinco reatores conectados que representam as diferentes partes do trato gastrintestinal humano com seus respectivos valores de pH, tempo de residência e capacidade volumétrica (**Figura 8**). Os últimos 3 reatores foram inoculados com uma solução preparada a partir de 40 g de fezes de três doadores adultos voluntários que não haviam utilizado antibióticos por um período de 6 meses antes do início do experimento.

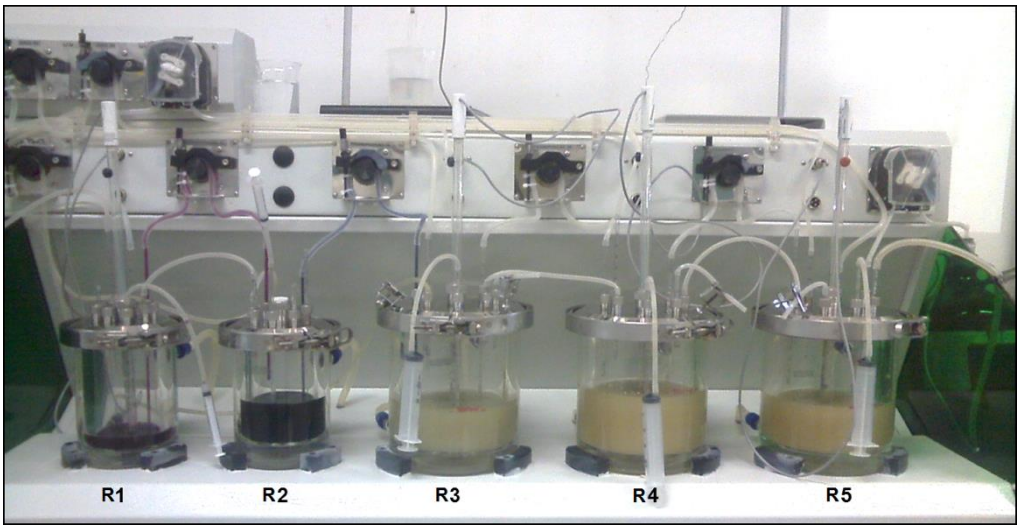


Figura 8. *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME®). Os reatores correspondem ao estômago (R1), duodeno (R2), cólon ascendente (R3), cólon transverso (R4) e cólon descendente (R5).

Anteriormente ao início da incubação, o inócuo fecal foi incorporado ao sistema, durante 2 semanas, na presença do meio basal (*feed)* (**Tabela 1**), com o objetivo de assegurar a manutenção e estabilização da microbiota conforme descrito por BIANCHI et al. (2014).

Tabela 1. Composição do meio alimentar basal (feed) dissolvido em água destilada.

Constituintes	Quantidades (g/l)
Amido	3,0
Pectina	2,0
Mucina (Suínos gástrica tipo III)	4,0
Xilana	1,0
Peptona	1,0
Triptona	1,0
Glicose	0,4
Extrato de levedura	3,0
L-cisteina	0,5

Fonte: PAYNE *et al*. (2003)

No início do processo de simulação digestória, os reatores R1 e R2 não apresentavam nenhum conteúdo, enquanto que os reatores R3, R4 e R5 possuíam volumes fixos de 500, 800 e 600 mL de *feed+*inóculo microbiano, respectivamente.

Inicialmente, o extrato concentrado (10 ml) foi diluído em 200 ml do *feed* livre de inóculo e adicionado ao R1, permanecendo sob pH ácido (2,2–2,4) e agitação magnética a 37 °C. Por um sistema de bombas, o conteúdo foi transferido para o R2 a uma taxa de vazão de 1,66 mL/min. Em R2 o conteúdo foi submetido ao ajuste de pH (~6,0) e ao contato com enzimas pancreáticas, permanecendo em agitação magnética por 2 horas, passando posteriormente por uma transferência automática e em sequência (1,66 ml/min) para os R3, R4 e R5, mantendo-se sempre o volume inicial do reator. Uma vez que todo o volume de R2 foi transferido, iniciou-se o tempo zero do processo de fermentação (24 h). O excedente em R5 foi descartado no efluente.

Os cinco reatores foram continuamente agitados por agitador magnético e mantidos a temperatura de 37 °C por meio de um banho-maria termostatizado e com sistema de circulação. O interior de cada um dos reatores foi mantido em anaerobiose pela injeção diária de N_2 durante 30 minutos. O pH adequado de cada porção do trato permaneceu ajustado automaticamente, controlado pela adição de NaOH 1M ou HCl 0,1M e HCl 1M para o reator referente ao estômago (R1).

Cada reator foi provido de oito portas: para entrada e saída do meio em estudo; amostragem da fase líquida e do espaço ocupado pelos gases; pH-eletrodo; pH-controle (entrada de ácido e base) e para entrada e saída de gás N_2. Bombas peristálticas foram utilizadas para transferir sucessivamente os conteúdos entre os recipientes. As bombas trabalharam de forma semi-contínua ou contínua, simulando o trato gastrintestinal.

Foram retiradas alíquotas do R1 e R2 ao final do tempo de permanência (2h e 4h, respectivamente), e dos três últimos reatores (R3, R4 e R5) nos tempos 0h, 3h, 6h, 9h, 12h e 24h após o início da transferência.

4.2.3.3. Extração de flavonoides e ácidos fenólicos

As amostras (500 µL) foram adicionadas de 1,5 mL de metanol acidificado (0,3% HCl) à tubos de microcentrífuga. Após agitação em vortex por 1 minuto, e centrifugação por 10 minutos a 10621 RCF, o sobrenadante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente; redissolvido em 300 µL de metanol acidificado (5% ácido acético) e filtrados com membrana de PVDF (0.45 µm) para análise por CLAE-DAD e LC-Q-TOF. A extração foi realizada em triplicata.

4.2.3.4. CLAE/DAD

A quantificação dos flavonoides presentes nas alíquotas dos reatores (item 3.2.2.4.1) foi realizada de acordo com Ribeiro et al. (2015) com o mesmo equipamento e coluna descritos anteriormente (item 4.2.1.9.2). A eluição foi realizada com gradiente de solvente constituído por água/ ácido fórmico/ acetonitrila (96:1:3, fase A e 58:1:51, fase B). O gradiente de concentração dos solventes consistiu em 10% de B no início, 25% em 10 min, 31% em 15 min, 40% em 20 min, 50% em 30 min, de 100% em 40 min, 10% em 45 minutos, 10% em 50 minutos (tempo de corrida, 50 min), com fluxo de 0,8 mL/min. A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270, 328, 370 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 e rutina e do ácido 3-*O*-

metilgálico (Sigma, Chemical Co., St. Louis, EUA). Os resultados foram expressos como mg de aglicona por 100 g em base úmida (b.u.).

4.2.3.5. LC/Q-TOF/MS

As condições de separação foram as mesmas utilizadas para a CLAE/DAD, descritas no item anterior. A identificação de antocianinas foi realizada em modo positivo e os demais flavonoides e ácidos fenólicos em modo negativo. 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, os espectros obtidos foram comparados com os disponíveis em bibliotecas de espectro-padrão de compostos orgânicos, como HMDB, MetaboBASE e Sumner Library.

4.2.3.6. Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Os AGCC presentes nas amostras dos reatores foram analisados de acordo com Menezes et al., (2010) por cromatografia gasosa (CG/MS) (Agilient Technologies 7890B GC System, USA) equipada com detector de ionização de chama (FID), injetor automático (Agilient Technologies GC Sampler 80, Switzerland), e coluna capilar CP7747 de silíca fundida WCTO (Varian, LakeForest, CA, USA), com os seguintes parâmetros: 250 °C de temperatura do injetor e do dector, rampa de 100 °C a 240 °C sob pressão constante (tempo de corrida = 30 min).

Alíquotas de 80 µL das amostras nos tempos 0h, 12h e 24h dos três reatores de fermentação microbiana, bem como do meio de cultura com inóculo fecal, foram adicionadas de 20 µL de ácido fórmico a 12%, 20 µL de ácido metil-valérico a 0,25% (padrão interno) e 80 µL de água ultrapura. As amostras foram filtradas com membrana de PVDF (0.22 µm) para análise por CG/MS.

A curva padrão foi construída com solução de AGCC (volatile Free Acid Mix, COD: CRM46975, Supelco, Bellefonte, PA, USA) em concentrações de 1 a 8 Mm, adicionada de ácido fórmico a 12% e ácido metil-valérico a 0,25% (padrão interno).

4.2.4. Excreção de Compostos Fenólicos em Modelo Animal

4.2.4.1. Animais

Para o ensaio foram utilizados ratos machos (Rattus novergicus, var. albinus) da linhagem Wistar (n=6), heterogênicos, recém-desmamados (20 dias), obtidos a partir de colônias mantidas no biotério de produção do ICB da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF-USP) sob o protocolo 32.2017/P541.

4.2.4.2. Ensaio biológico

Durante 3 semanas, os animais foram mantidos no biotério em gaiolas comuns fornecidos de água e ração *ad libitum*. Ainda, os animais permaneceram durante 1 hora na gaiola metabólica, em dois dias diferentes anteriores ao ensaio, para adaptação, recebendo ração padrão na forma triturada e água *ad libitum*. A ração foi oferecida na forma triturada devido às particularidades da gaiola metabólica e do comedouro externo tipo cesta, não sendo possível utilização de ração na forma de pellets.

Os animais foram mantidos em temperatura média de 22 ± 2°C, umidade relativa de 55 ± 10%, com ciclos alternados de claro/escuro de 12 h (das 7 às 19 h, claro e das 19 às 7 h, escuro). Quando atingiram cerca de 200g, na noite anterior ao experimento, os animais foram mantidos em jejum de 6 h sendo transferidos para gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável onde permaneceram por 24 h com ração e a água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 2 grupos de tratamento, sendo que 8 animais (Grupo 1) receberam, por gavagem, dose única do extrato de tomate roxo na concentração de 5mg/100g de peso corporal (máximo de 1 mL/100 g peso corpóreo) e 3 animais (Grupo Controle) receberam por gavagem água.

As urinas foram coletadas nos tempos 0-4h, 4-12h e ao final das 24 horas, com auxílio de coletor específico. As fezes foram coletadas ao final das 24 horas (com auxílio de outro coletor para este fim). As amostras foram acondicionadas em tubos tipo Falcon e armazenadas em freezer a –80 °C até o momento das análises. A eutanásia foi realizada por overdose de anestésicos (xilazina e quetamina), em

uma concentração 3 vezes superior à dose anestésica (10 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente), ou seja, 30 mg/kg e 300 mg/kg, respectivamente.

4.2.4.3. Extração de Compostos Fenólicos e Identificação de Metabólitos em Material Fecal e Urina

As amostras de urina foram acidificadas com 20 µL de ácido fórmico 50% no momento da coleta. A extração (pool) foi realizada conforme descrito no item 4.2.3.1. As análises para a identificação dos metabólitos e catabólitos foram feitas por CLAE/DAD (item 4.2.3.4) e LC/Q-TOF/MS (item 4.2.3.5).

As amostras (pool) de fezes foram trituradas em nitrogênio líquido e mantidas em dessacador na presença de ácido sulfúrico para redução da umidade, nele permanecendo por 72 h, protegidas da luminosidade. Os compostos fenólicos foram extraídos a partir de 1 grama de amostra seca com adição de 30 mL de metanol/água/ácido acético (70/25/5, v/v/v), sob agitação a 300 rpm/60 min/4°C. Os extratos fenólicos obtidos foram filtrados e reduzidos em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo. O conteúdo resultante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente; ressuspendido em metanol acidificado com ácido acético (95:5 v/v) e filtrados com membrana de PVDF (0,22 µm) para análise por CLAE/DAD e LC/Q-TOF/MS.

4.2.5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para os testes de diferença entre as médias foi utilizada ANOVA *one-way* e Teste de Tukey como post-hoc. Foi considerado um valor de $p<0,05$ como indicador de significância estatística. As análises multivariadas foram geradas a partir dos dados adquiridos pela deconvolução automática dos picos no *software* MassHunter v. B.06.00 (Agilent Technologies, Inc). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada a partir das áreas dos picos após a normalização pela mediana, e os dados resultantes foram transformados em log e centralizados pela média, com auxílio da plataforma *online* MetaboAnalyst 3.0 (XIA; WISHART, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO

Frutos do tomateiro, variedade cereja, foram introgredidos com alelos de regulação da biossíntese de antocianinas (alelos *Aft, hp2 e aft*) e de regulação da produção de β-caroteno (alelo *B*). Como observado, a introgressão com os alelos *Aft, hp2 e aft* resultou em acúmulo de antocianinas na casca do tomate alterando a cor vermelha, característica do tomate e conferido pelo licopeno (**Figura 9A**), para um roxo intenso, caracterizando a cor do tomate triplo mutante (**Figura 9C**). Este acúmulo foi maior na casca e em menor intensidade na polpa. Por outro lado, a introgressão com o alelo *B* (**Figura 9B**) resultou em acúmulo de β-caroteno, alterando a coloração vermelha inicial, tornando-o completamente laranja tanto na casca quanto na polpa. A ausência da cor vermelha é esperada uma vez que o licopeno é o intermediário da síntese de β-caroteno.

Figura 9. Frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. Tomate vermelho (A); tomate laranja, obtido por introgressão do alelo B (B); e tomate roxo obtido por introgressão dos alelos Aft, atv e hp2 (C).

Em relação ao peso médio (**Tabela 2**), o fruto do tomate laranja apresentou-se menor quando comparado ao seu *background* e o tomate roxo. Esse aspecto foi refletido na menor proporção entre casca e polpa. Por outro lado, a introgressão dos alelos *Aft, atv, hp2* não resultou em alteração significativa ($p > 0,05$) no peso médio do fruto do tomate roxo, em comparação com o seu

background. Os frutos com introgressão de alelos apresentaram ainda maior teor de sólidos solúveis totais.

Tabela 2. Peso médio, proporção casca/polpa e teor de sólidos solúveis totais (SST) dos frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides.

Tomate	Peso médio (g)	Proporção casca/polpa	SST (°Brix)
Vermelho	6,85 ± 2,28^{A}	1/4,5	6,7 ± 0,2^{A}
Laranja	4,36 ± 0,92^{B}	1/3,5	7,6 ± 0,1^{B}
Roxo	7,40 ± 1,33^{A}	1/5	9,1 ± 0,1^{C}

Valores expressos como média ± DP. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A introgressão dos alelos responsáveis pelo acúmulo de antocianinas resultou na maior concentração de fenólicos totais (FT) na casca do tomate roxo, sendo 2,5 vezes superior à casca do *background* vermelho (410,17 ± 9,20 mg AG eq./100g b.u. e 159,22 ± 4,84 mg AG eq./100g b.u., respectivamente) e 3,5 vezes maior em comparação à casca do fruto laranja (116,51 ± 5,73 mg AG eq./100g b.u.) (**Figura 10**). Em relação à polpa, o conteúdo de FT do tomate roxo (81,28 ± 3,42 mg AG eq./100g b.u.) apresentou-se cerca de 1,5 vezes maior do que as polpas dos demais tomates (48,50 ± 0,72 mg AG eq./100g b.u. e 58,86 ± 1,14 mg AG eq./100g b.u., respectivamente para o vermelho e laranja), mas inferior quando comparado à casca.

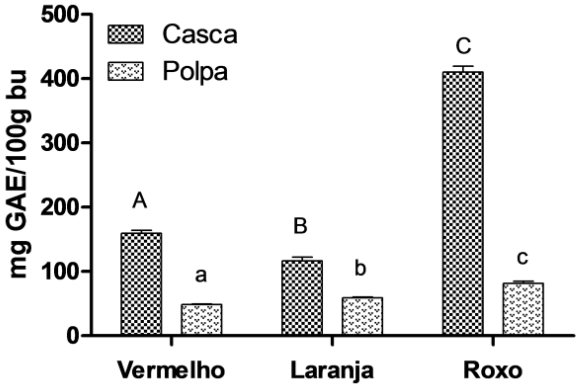


Figura 10. Conteúdo de fenólicos totais da casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. Controle (Vermelho), fruto com introgressão do B (Laranja), fruto com introgressão dos alelos Aft, atv e hp2 (Roxo). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas quando comparados entre as cascas e letras minúsculas quando comparados entre as polpas dos três tomates.

A casca do tomate roxo apresentou ainda 71,58 ± 3,70 mg cianidina-3-glicosídeo eq./ 100g b.u. de antocianinas monoméricas.

Na avaliação da capacidade antioxidante, a casca do tomate roxo destacou-se em relação aos frutos laranja e vermelho (**Figura 11**), padrão semelhante ao conteúdo de FT, tanto para a casca quanto para a polpa, podendo ser evidenciado pela correlação de *Pearson,* a qual mostrou uma forte associação positiva entre os valores de FT e DPPH e ORAC, tanto para a casca (R^2=0,99 e R^2=0,98, respectivamente), quanto para as polpas (R^2=0,89 e R^2=0,79, respectivamente).

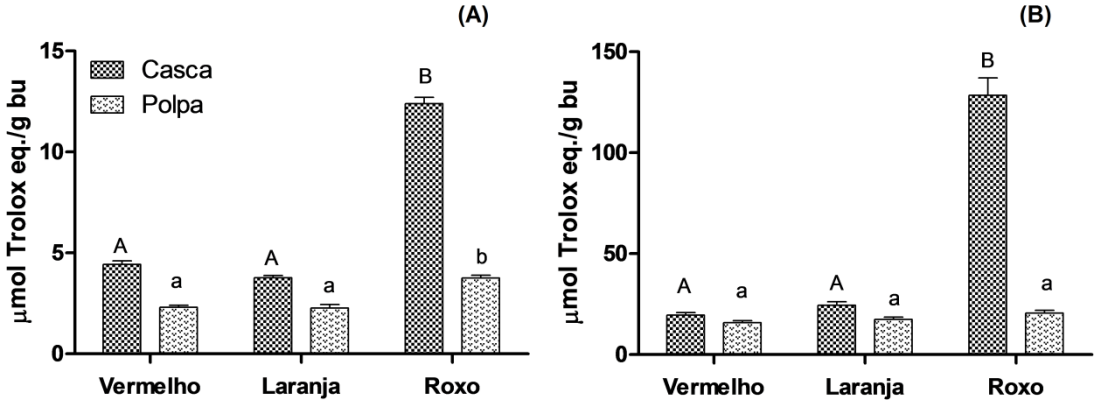


Figura 11. Capacidade antioxidante da casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides, avaliada pelos métodos DPPH (A) e ORAC (B). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas quando comparados entre as cascas e letras minúsculas quando comparados entre as polpas dos três tomates.

Quanto ao conteúdo de ácido ascórbico total (**Figura 12**), a casca do tomate roxo apresentou aumento significativo na concentração ($p<0,05$) quando comparado ao tomate vermelho e ao laranja (11,47 ± 0,49 mg/100g b.u., 5,56 ± 0,31 mg/100g b.u., 5,99 ± 0,34 mg/100g b.u., respectivamente). A elevação também foi observada para a polpa do tomate roxo, entretanto, no tomate laranja, apenas a polpa apresentou aumento no acúmulo de vitamina C.

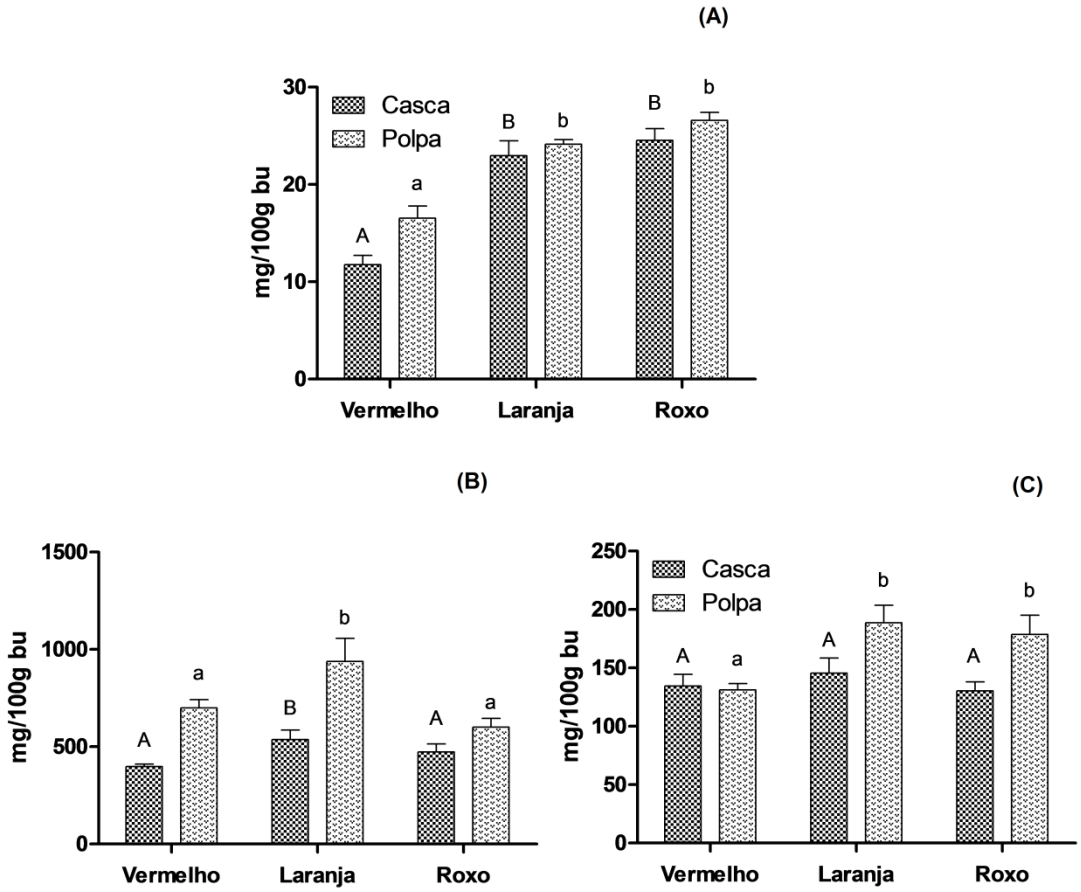


Figura 12. Conteúdo de ácidos orgânicos na casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. Ácido ascórbico (A), ácido cítrico (B) e ácido málico (C). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas quando comparados entre as cascas e letras minúsculas quando comparados entre as polpas dos três tomates.

A mutação no fruto amarelo resultou também em uma modificação no perfil de açúcares redutores (glicose e frutose), sendo observado um aumento dos mesmos. No entanto, a mutação no fruto roxo não parece ter afetado sua composição de açúcares solúveis (**Figura 13**).

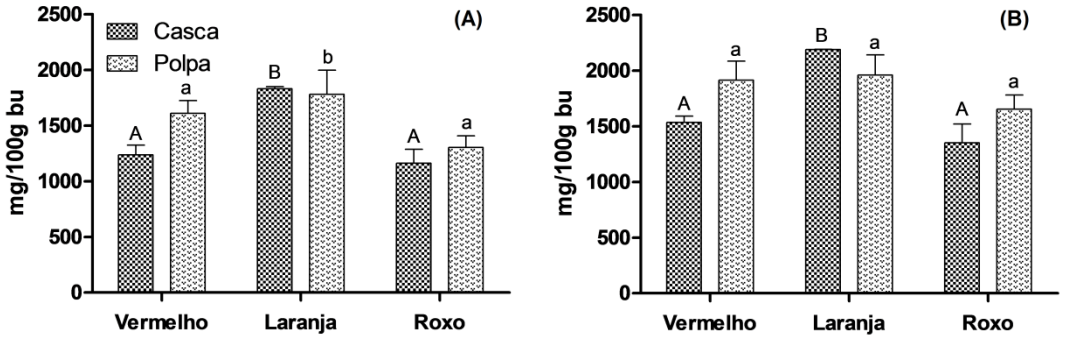


Figura 13. Conteúdo de áçúcares na casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. Glicose (A) e frutose (B). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas quando comparados entre as cascas e letras minúsculas quando comparados entre as polpas dos três tomates.

A expressão simultânea dos alelos *Aft*, *atv* e *hp2*, com acúmulo de antocianinas, resultou em um expressivo aumento no conteúdo de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e vitamina C no tomate roxo, principalmente na casca. Esta característica é peculiar à maioria dos frutos, uma vez que os compostos fenólicos tendem a se acumular na epiderme dos vegetais devido ao seu papel na proteção contra a radiação ultravioleta, à ação atrativa para dispersores de sementes, e na defesa bioquímica contra patógenos (TOOR; SAVAGE, 2005).

Os conteúdos de FT encontrados para os três tipos de tomates foram similares aos encontrados para tomates com mutações semelhantes, porém com *background* em Micro-Tom (SESTARI et al., 2014). A elevação no conteúdo de compostos fenólicos, tanto na casca como na polpa do fruto roxo mutante, foi atribuída ao aumento no conteúdo de flavonol, das antocianinas e dos ácidos fenólicos. Quando comparado a outros frutos fontes em antocianinas, os teores de FT e a capacidade antioxidante da casca do tomate roxo é semelhante aos valores encontrados para mirtilo (436,60 mg AG eq./100g b.u. e 16,40 μmol Trolox eq./g b.u., respectivamente para FT e capacidade antioxidante (avaliado pelo método DPPH) (RODRIGUES et al., 2011).

Ainda, o teor de antocianinas monoméricas encontrados na casca do tomate roxo foi cerca de 3 vezes superior ao valor descrito para cerejas (SANCHEZ; BAEZA; CHIRIFE, 2015), outra importante fonte de antocianinas da dieta,

principalmente para países de clima temperado onde este cultivo é mais significativo.

Os flavonoides e os ácidos fenólicos são compostos positivamente relacionados à capacidade antioxidante (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2002). Contudo, quando se refere a capacidade antioxidante total de um fruto, vários outros compostos antioxidantes também contribuem para o seu valor, tais como o ácido ascórbico e os carotenoides. Sabe-se que a introgressão do alelo *hp2* no fruto roxo induz ao aumento de vitamina C em comparação ao *background*. Este acúmulo de ácido ascórbico também foi observado na introgressão do alelo *B* no fruto laranja (SESTARI et al., 2014). Assim, o aumento do valor da capacidade antioxidante pode ser devido ao somatório dos teores de fenólicos totais e vitamina C. Vale ressaltar que a contribuição dos carotenoides na capacidade antioxidante não está sendo avaliada neste caso, uma vez que o solvente utilizado para a extração não é adequando para a extração destes.

A diferença entre os teores de ácido ascórbico nos tecidos externos e internos dos frutos é desconhecida, mas tem sido atribuída ao fato de que a casca constitui a primeira barreira do fruto e a interfase com o meio ambiente, estando diretamente exposta à danos como a radiação e o vento. Dessa forma, requer um sistema antioxidante mais eficiente para lidar com os vários estresses, ambiental e biológico (LADO et al., 2015).

Juntamente com os ácidos orgânicos, e outros compostos, os açúcares solúveis são os principais elementos responsáveis pela determinação do sabor doce e amargo de muitas frutas e vegetais, especialmente tomates (LENUCCI et al., 2008). Não houve diferença ($p > 0,05$) nas quantidades de frutose e glicose, uma vez que os tomates modernos armazenam pouca sacarose e acumulam glicose e frutose em proporção aproximada de 1:1 (BECKLES, 2012). As concentrações de glicose e frutose apresentaram valores semelhantes aos relatados para híbridos de tomates *high pigment* HLY 02 (LENUCCI et al., 2008).

5.2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO

Além dos antioxidantes como os compostos fenólicos e o ácido ascórbico, os tomates são também ricos em carotenoides, como o licopeno e o β-caroteno. O licopeno é o composto responsável pela coloração vermelha característica dos tomates, enquanto o β-caroteno confere a cor laranja ao fruto. Ambos os compostos são conhecidos pela sua ação antioxidante (CHOI et al., 2014).

A introgressão do alelo *B*, que resultou no tomate laranja, aumentou o conteúdo de β-caroteno (2,75 ± 0,08 e 3,04 ± 0,29 mg/100g bu na casca e na polpa respectivamente) quando comparado com a polpa do fruto vermelho (0,48 ± 0,12 mg/100g bu) (**Figure 14**). Por outro lado, o licopeno não foi detectado no tomate laranja, uma vez que o alelo *B* potencializa a atividade da enzima licopeno β-ciclase, a qual converte o licopeno em β-caroteno (MOHAN et al., 2016).

Observou-se um aumento considerável na quantidade de licopeno e β-caroteno na casca e polpa do tomate roxo (**Figuras 14, 15 e 16**), o que pode ser atribuído, pelo menos em parte, à presença de mais cloroplastos (e mais cromoplastos), devido à introgressão do alelo *hp2* (SESTARI et al., 2014). Os conteúdos de β-caroteno foram 1,72 ± 0,14 e 1,65 ± 0,29 mg/100g bu na casca e na polpa, respectivamente. Já o teor de licopeno no tomate roxo foi de 32,20 ± 0,34 e 9,84 ± 1,27mg/100g bu respectivamente na casca e na polpa.

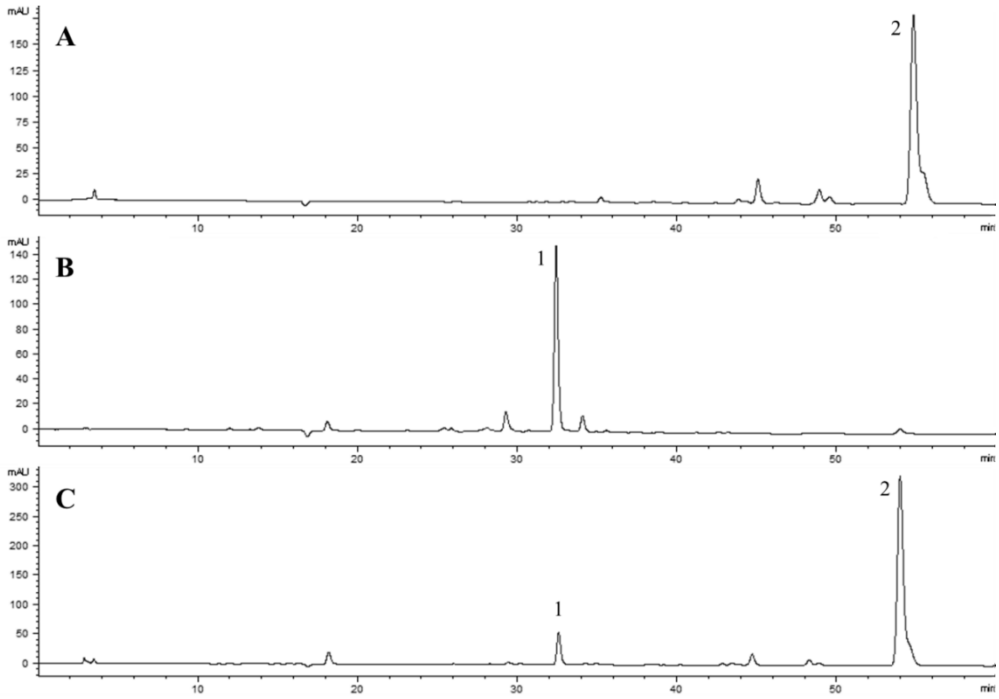


Figura 14. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=450 nm) das cascas dos tomates vermelho (A), laranja (B) e roxo (C). β-caroteno (1) e licopeno (2).

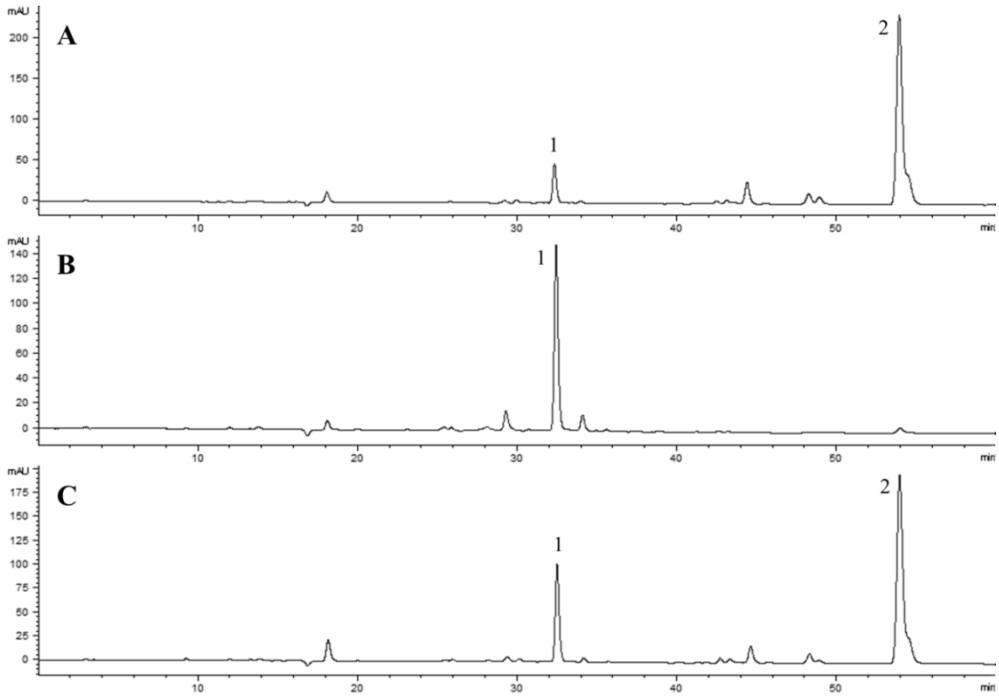


Figura 15. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=450 nm) das polpas dos tomates vermelho (A), laranja (B) e roxo (C). β-caroteno (1) e licopeno (2).

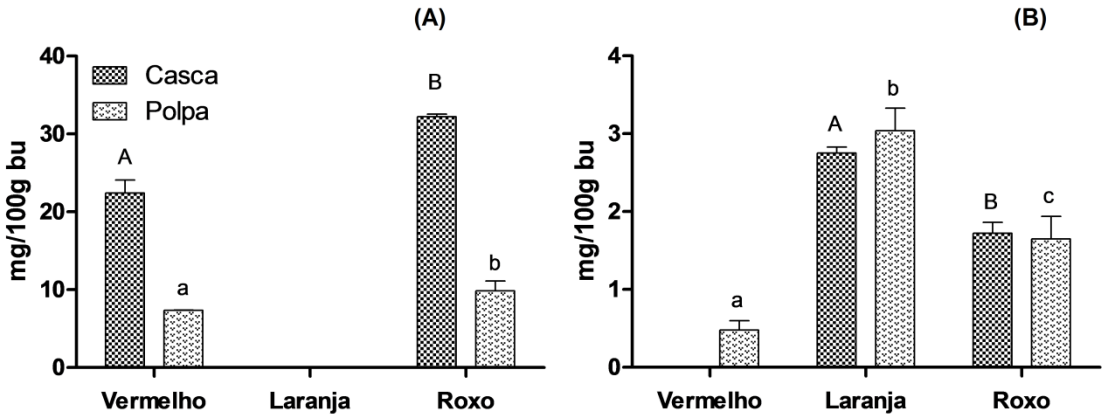


Figura 16. Conteúdo de carotenoides na casca e polpa de tomates cereja com introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. Licopeno (A) e β-caroteno (B). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas quando comparados entre as cascas e letras minúsculas quando comparados entre as polpas dos três tomates.

A distribuição de carotenoides no tomate não é regular. Normalmente o licopeno pode ser encontrado em maior concentração na casca em comparação com a polpa, enquanto que a concentração de β-caroteno é maior na polpa em comparação com a casca (MARTÍ et al., 2016).

Nos tomates vermelho e roxo, o teor de licopeno foi maior do que os relatados para tomates cerejas, os quais variam de 4,5 a 19,2 mg / 100 g bu (D 'EVOLI; LOMBARDI-BOCCIA; LUCARINI, 2013; MARTÍ et al., 2016). Da mesma forma, a quantidade de β-caroteno encontrada nos tomates roxo e laranja foi cerca de 1,5 e 2,5 vezes respectivamente superior à descrita para tomates cerejas ((D 'EVOLI; LOMBARDI-BOCCIA; LUCARINI, 2013). Além disso, o conteúdo de β-caroteno quantificado no tomate de laranja foi também superior ao relatado para um fruto com introgressão dos alelos *BB* (MES et al., 2008).

5.3. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO

As cascas e polpas dos três tipos de tomates apresentaram diferentes perfis cromatográficos, indicando a presença de compostos fenólicos distintos (**Figuras 17 e 18 e Tabela 3**).

Os flavonoides mais comumente encontrados nos diferentes tipos de tomates foram: quercetina-3-*O*-rutinosideo (rutina), kaempferol-3-*O*-rutinosideo, chalco naringenina e phloretina-*C*-diglicosídeo. Entre os ácidos fenólicos estão o ácido *p*-coumárico, ácido cafeico, ácido cafeico-hexosídeo, ácido neoclorogênico (ácido 3-*O*-cafeoilquinico), ácido dicafeoilquinico, ácido ferúlico, ácido ferúlico-hexosídeo, ácido feruloilquínico, ácido sinápico além do benzil alcool-hexose-pentosídeo (**Tabela 3**).

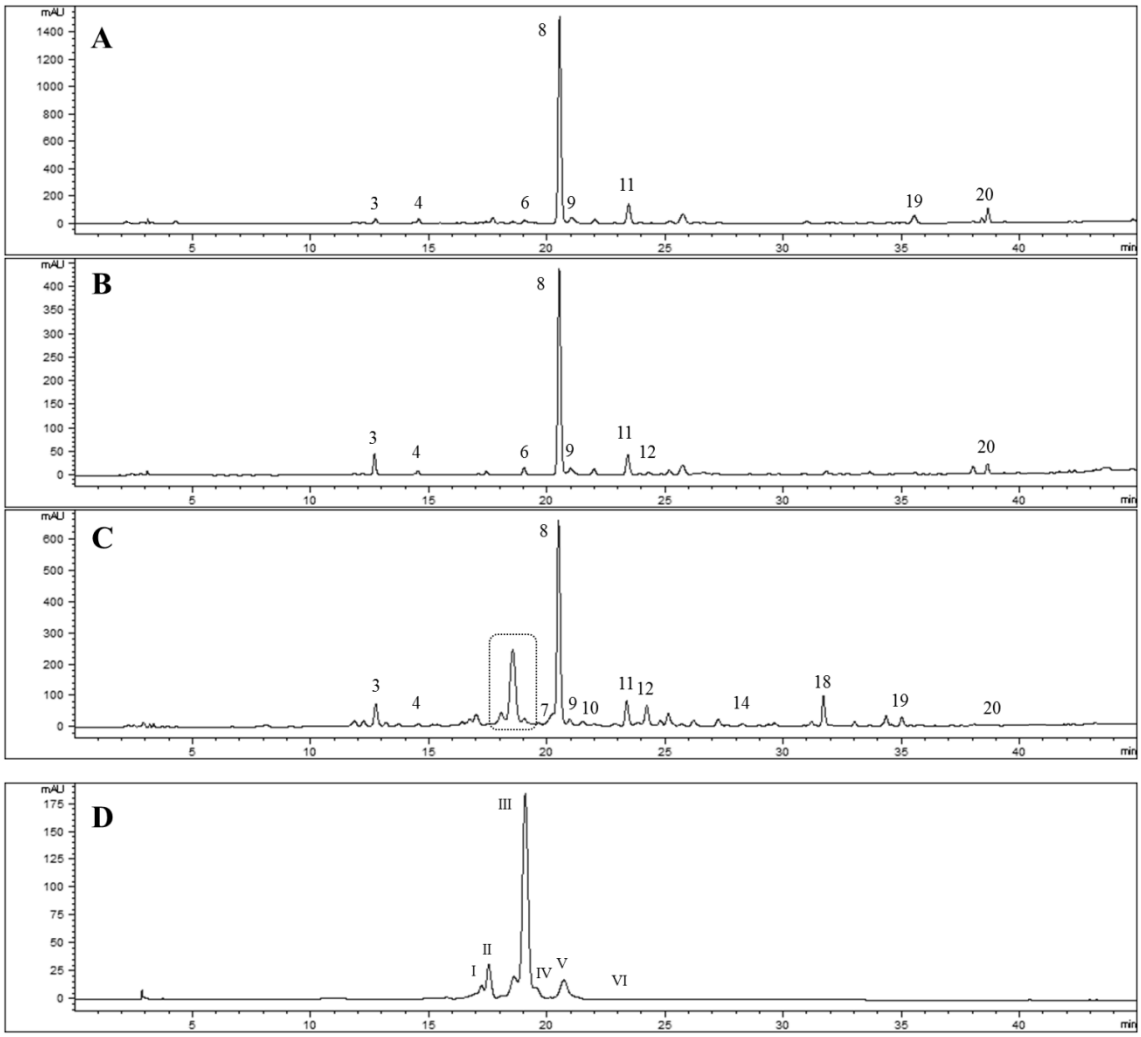


Figura 17. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=270 nm) das cascas dos frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. Tomate vermelho (A); tomate laranja, obtido por introgressão do alelo B (B); e tomate roxo, obtido por introgressão dos alelos Aft, atv e hp2 (C). Cromatograma em zoom (λ=525 nm) da casca do tomate roxo (D). As identificações dos picos enumerados estão apresentadas na **Tabela 3**.

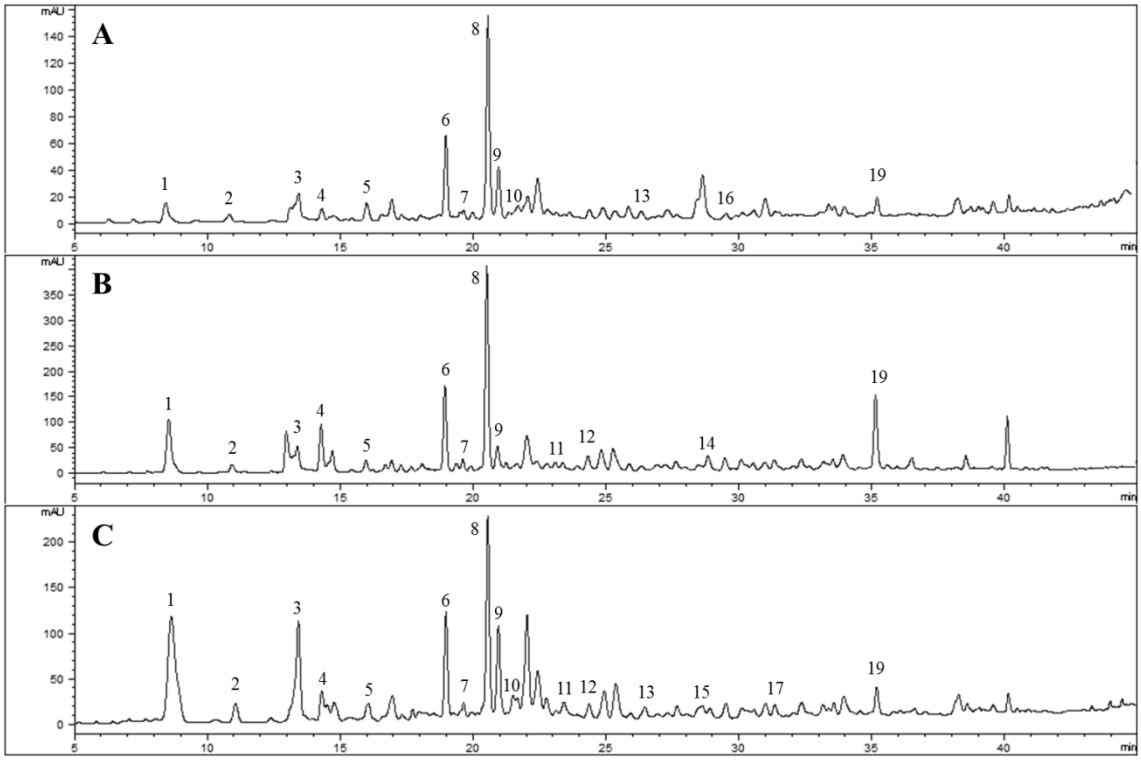


Figura 18. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=270 nm) das polpas dos frutos de tomate obtidos por introgressão de alelos relacionados à biossíntese de antocianinas e carotenoides. Tomate vermelho (A); tomate laranja, obtido por introgressão do alelo B (B); e tomate roxo, obtido por introgressão dos alelos Aft, atv e hp2 (C). As identificações dos picos enumerados estão apresentadas na **Tabela 3**.

Dentre os ácidos fenólicos, o ácido neoclorogênico, dois isômeros do ácido feruloilquínico, o ácido ferúlico-*O*-hexosídeo, um isômero do ácido feruloilquínico-*O*-hexosídeo e o ácido dicafeoilferuloilquínico, além dos flavonoides rutina e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, foram os compostos encontrados nas cascas e nas polpas dos três tipos de tomates.

A rutina (pico 8), apresentando íon molecular $[M-H]^-$ a *m/z* 609 e fragmento MS2 a *m/z* 301, característico da quercetina, foi o flavonoide majoritário presente na casca dos três frutos. Dentre os ácidos fenólicos, um derivado do ácido *p*-coumárico (pico 11), apresentando $[M-H]^-$ a *m/z* 351 e fragmentos MS2 a *m/z* 163 e a *m/z* 119, foi identificado como majoritário na casca do tomate vermelho, enquanto que o ácido neoclorogênico (pico 3), com $[M-H]^-$ a *m/z* 353 e fragmento MS2 a *m/z* 191 foi o majoritário na casca dos frutos roxo e laranja.

Já para a polpa, os compostos majoritários dos três tipos de tomate foram a rutina, e um dos isômeros do ácido feruloilquínico (pico 21), com $[M-H]^-$ a *m/z* 367

e fragmento MS2 a *m/z* 193 (**Figura 17** e **Tabela 3**). Os padrões de fragmentação dos principais flavonoides identificados estão apresentados na **Figura 18**.

A expressão simultânea dos alelos *Aft*, *atv* e *hp2* no tomate ocasionou ainda a indução da biossíntese de antocianinas na casca do fruto, tecido este que normalmente não produz esse tipo de flavonoide, que confere a cor roxa (**Figura 17**). As principais antocianidinas identificadas foram a petunidina (*m/z* 317), delfinidina (*m/z* 303), malvidina (*m/z* 331) e cianidina (*m/z* 287) (**Tabela 4**).

Sabe-se que os principais compostos fenólicos do tomate são ácidos hidroxicinâmicos, flavanonas, flavonóis e, em alguns casos, antocianinas. As principais antocianinas em tomate são derivadas de delfinidina, petunidina e malvidina. Além disso, glicosídeos de flavonoides tais como a rutina e kaempferol-3-rutinosídeo também estão presentes no fruto (MARTÍ; ROSELLÓ; CEBOLLA-CORNEJO, 2016).

Tabela 3. Espectro de massas de flavonoide e ácidos fenólicos de tomates vermelho, laranja e roxo, obtidos por introgressão de alelos.

Identified Compound	RT (min)	Peak number	Molecular ion (*m/z*)	MS/MS (*m/z*)
Negative mode				
Caffeic acid *O*-hexoside (isomer)	8.1	1	341	179/135
Caffeic acid *O*-hexoside (isomer)	11.4	2	341	179/135
Neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid)	13.3	3	353	191
Feruloylquinic acid (isomer)	14.1	4	367	193
Coumaroylquinic acid	16.1	5	337	191/163
Feruloylquinic acid (isomer)	18.9	6	367	193/161/135
Sinapoylquinic acid	19.8	7	387	191
Quercetin 3-*O*-rutinoside	20.4	8	609	301
Ferulic acid-*O*-hexoside	20.5	9	355	193
Phloretin *C*-diglycoside	20.9	10	597	477/417/387/357
p-Coumaric acid derivative	22.8	11	351	163/119
Kaempferol 3-*O*-rutinoside	23.3	12	593	285
Dicaffeoylquinic acid	26.5	13	515	353/173
Ferulic acid	28.0	14	193	-
Caffeic acid derivative	28.6	15	485	323/179
Feruloylquinic acid *O*-hexoside (isomer)	29.0	16	529	367
Ferulic acid derivative	31.4	17	517	355/193
Feruloylquinic acid *O*-hexoside (isomer)	31.6	18	529	367
Feruloylquinic acid *O*-hexoside (isomer)	35.7	19	529	367/179
Naringenin chalcone	39.2	20	271	151
Positive mode				
Petunidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside-hexoside	17.2	I	933	771/479/317
Delfinidin 3-*O*-(*p*-coumaroyl)-rutinoside-5-*O*-glicoside	17.5	II	919	757/465/303
Petunidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside-hexoside	19.0	III	933	771/479/317/301
Petunidin 3-*O*-(feruloyl)-rutinoside-5-*O*-glicoside	19.5	IV	963	801/625/479/317/301
Malvidin 3-*O*-(*p*-coumaroyl)-rutinoside-5-*O*-glicoside	20.6	V	947	785/493/331
Cyanidin 3-*O*-rutinoside	23.0	VI	595	449/287

Tentativa de identificação, tempo de retenção (TR), e percentual de ácidos fenólicos e flavonoides. *Em relação ao total encontrado para o respectivo flavonoide nas 6 amostras. Os demais percentuais representam a contribuição de cada ácido em relação ao total de ácidos presentes em cada compartimento. TV, tomate vermelho; TA, tomate laranja; TR, tomate roxo.

Todas as antocianinas identificadas na casca do tomate roxo, com exceção da cianidina-3-*O*-rutinosídeo, apresentaram-se na forma acilada, sendo a petunidina-(*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo a antocianina majoritária (**Figura 17** e **Tabela 4**), apresentando íon molecular $[M+H]^+$ 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-rutinosideo (146 u + 308 u), e o fragmento a *m/z* 317 é característico da aglicona petunidina.

A petunidina (*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo é a principal antocianina encontrada em alimentos roxos da família *Solanaceae*, como *huckleberry* (*Solanum scabrum*), batata roxa (*Solanum tuberosum*), *tomatillo* roxo (*Physallis ixocarpa*) e goji berry preto (*Lycium ruthenicum* Murray) (JONES; MES; MYERS, 2003; WU et al., 2016). Além destes frutos, esse tipo de antocianina foi também encontrado na batata-doce de polpa roxa (*Ipomoea batatas* L. Lam) (KUBOW et al., 2016) e em tomates roxos obtidos por transgenia (BUTELLI et al., 2008) e por introgressão dos alelos *Abg*, *Aft* e *atv* (MES et al., 2008), em tomates tipo salada. Um perfil semelhante de antocianinas do tomate roxo foi identificado também em frutos *Solanum nigrum* (WANG et al., 2017).

A introgressão dos alelos *Aft*, *atv* e *hp2* no tomate objetivou a produção e acúmulo de antocianinas, aumentando assim o possível potencial benéfico à saúde deste fruto. Adicionalmente, outros tipos de flavonoides tiveram também um aumento na concentração, como a rutina. Por outro lado, a introgressão do alelo *B*, com o objetivo de potencializar a produção de β-caroteno, não acarretou em alteração no perfil de flavonoides do fruto mutante, o mesmo sendo observado em estudos anteriores (SESTARI et al., 2014).

5.4. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO

Assim como observado para os teores de FT, a casca do tomate roxo apresentou o maior conteúdo de flavonoides, além da presença de antocianinas quando comparado aos demais frutos (**Figura 19**). O total de flavonoides (incluindo rutina, antocianinas, kaempeferol e ácidos hidroxicinâmicos) da casca

do tomate roxo (~298,28 mg/100 g b.u.) foi cerca de 7 e 3,5 vezes maior do que o valor encontrado para a casca do fruto laranja (~43,06 mg/100 g b.u.) e vermelho (~84,39 mg/100 g b.u.), respectivamente. Em relação à polpa, o mutante roxo exibiu uma concentração (~7,69 mg/100 g b.u.) aproximadamente 2 vezes superior quando comparado com o tomate vermelho (~3,79 mg/100 g b.u.). Entretanto, a polpa do mutante laranja obteve o maior valor (~12,21 mg/100 g b.u.) dentre os três tipos de frutos.

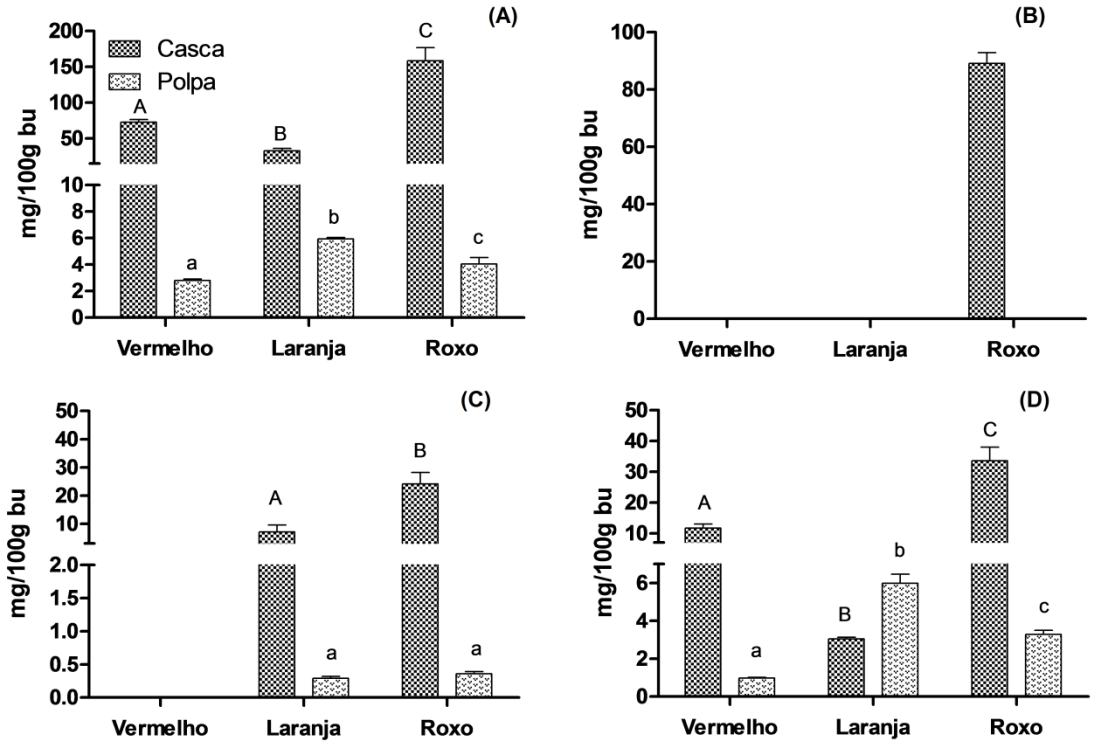


Figura 19. Conteúdo dos principais flavonoides identificados na casca e polpa de tomates cereja obtidos por introgressão de alelos relacionados a biossíntese de antocianinas e carotenoides. Rutina (A), petunidina total (B), kaempferol (C) e ácidos hidroxicinâmico totais (D). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas quando comparados entre as cascas e letras minúsculas quando comparados entre as polpas dos três tomates. Os compostos foram quantificados como aglicona equivalentes.

A introgressão de alelos que gerou o tomate roxo parece ter influenciado no teor de rutina, com elevação no seu teor, quando comparado ao *background* vermelho (158,66 ± 18,18 mg/100 g b.u. e 72,73 ± 3,90 mg/100 g b.u., respectivamente) (**Figura 19A**).

A casca do fruto roxo mostrou-se ainda com maior teor de ácidos hidroxicinâmicos (10 vezes superior), comparado ao *background* (33,54 ± 4,45

mg/100 g b.u. e 11,66 ± 1,37 mg/100 g b.u., respectivamente) (**Figura 19D**). Na casca do tomate vermelho foram encontrados apenas traços de kaempferol (**Figura 19C**), entretanto para o tomate roxo o valor deste flavonoide foi superior (~2 vezes) ao encontrado para a casca do mutante laranja (16,96 ± 6,97 mg/100 g b.u. e 7,11 ± 2,46 mg/100g b.u., respectivamente).

O total de antocianinas encontrada na casca do tomate roxo foi de 89,12 ± 3,76 mg petunidina eq./100g (**Figura 19B**). A antocianina majoritária, petunidina-(*p*-coumaroil)-rutinosideo-hexosídeo, contribuiu com 85,3 % deste valor. Considerando a proporção casca/polpa (1/5), a concentração de antocianinas no fruto inteiro foi de 17,82 mg/100g b.u., valor este semelhante ao do morango (21,2 ± 3,3 mg/100g b.u.), uma importante fonte de antocianinas da dieta (WU et al., 2006).

Aparentemente, a introgressão do alelo *B* resultou em uma redução do conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos e da rutina na casca do mutante laranja (**Figura 19**). Contudo, observou-se um aumento na síntese de kaempferol em comparação ao *background*. Em contrapartida, a polpa do fruto laranja apresentou as maiores concentrações de ácidos hidroxicinâmicos e rutina dentre as polpas dos outros frutos.

A rutina é o principal flavonol e um dos mais importantes flavonoides encontrados no tomate. As concentrações variam entre 4,0 a 5,0 mg/100 g b.u. O ácido clorogênico é o principal composto polifenol da família dos ácidos hidroxicinâmicos. Sua concentração varia entre 1,4 and 3,3 mg/100g b.u. Outros flavonoides como kaempferol e naringenina são encontrados em pequenas quantidades em tomates comerciais (MARTÍ; ROSELLÓ; CEBOLLA-CORNEJO, 2016; CAPANOGLU et al., 2012). Assim, considerando as proporções casca/polpa, os valores de rutina, ácidos hidroxicinâmicos e kaempferol, para cada tomate, foram superiores aos encontrados em diferentes tipos de tomates comerciais (BARROS et al., 2012).

5.5. PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS TOMATES VERMELHO, LARANJA E ROXO

Os cinquenta e dois compostos voláteis identificados nos três tipos de tomate estão numerados de acordo com a **Tabela 4**. Os voláteis mais abundantes encontrados em todas as amostras foram hexanal (10), 3-hexenal (15), cis-hept-2-enal (25), 6-metil-5-hepten-2-ona (27), 2-isobutiltiazole (30) e trans-4-oxohex-2-enal (41).

O perfil de compostos voláteis nos tomates laranja e roxo foi afetado pela introgressão de alelos em comparação com o fruto controle vermelho. Uma clara separação entre as amostras pode ser observada com base no *scores plot* e no *heatmap* (**Figura 20**). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para determinar quais compostos voláteis foram associados aos diferentes tipos de tomate. O componente principal 1 (PC1) e o PC2 representaram aproximadamente 90% da variabilidade total quando os compostos voláteis foram usados para caracterizar os tipos de tomate. Mais especificamente, o *scores plot* mostrou que os frutos roxo e laranja foram separados do tomate vermelho com base no PC1, e o PC2 separou o tomate laranja do roxo (**Figura 20A**).

De acordo com a semelhança dos perfis de compostos voláteis, o tomate laranja apresentou menor semelhança em comparação com os tipos roxo e vermelho. O dendrograma confirmou os resultados observados na PCA e forneceu uma visão mais detalhada das relações entre os três tipos de tomate (**Figura 20B**).

Tabela 4. Compostos voláteis identificados por GC-MS de tomates vermelho, laranja e roxo e sua proporção relativa.

Compound Number[1]	Compound Name	Experimental Kovats Index	Reference Kovats Index[2]	Odor description[3]	Relative Proportion[4]		
					red	orange	purple
1	Acetaldehyde	>1000	655	pungent, penetrating, ethereal	0.00	2.61	0.00
2	Methyl ethyl sulfide	>1000	859	ND	0.18	0.33	0.00
3	Isobutyraldehyde	>1000	850	characteristic sharp, pungent	0.16	0.14	0.00
4	Ethyl Acetate	>1000	902	pleasant ethereal fruity, brandy-like	0.14	0.29	0.10
5	3-Methylfuran	>1000	901	ND	1.12	0.36	0.61
6	3-Methylbutanal	>1000	920	choking, powerful, acrid, pungent, apple-like	0.65	0.37	0.00
7	2-Ethylfuran	>1000	950	smoky burnt	0.60	0.75	0.55
8	Pentanal	>1000	982	powerful, acrid, pungent	0.88	0.52	0.00
9	1-penten-3-one	>1000	1093	powerful, penetrating	3.68	2.99	3.15
10	Hexanal	1034	1034	fatty, green, grassy, powerful, penetrating characteristic fruity	119.78	74.59	62.17
11	Tiglic aldehyde	1048	1100	penetrating, powerful, green, ethereal	0.45	1.82	0.00
12	2-Thujene	1057	1010	spice	0.15	0.28	0.08
13	3-Methyl-2-butenal	1080	1189	almond	0.00	0.00	0.73
14	*Trans*-2-pentenal	1080	1096	pungent, green, apple, orange, tomato	1.21	0.64	0.00
15	3-Hexenal	1115	1126	natural green, fruity, apple-like	4.57	6.38	14.27
16	D-Limonene	1168	1183	pleasant, lemon-like	0.41	0.45	0.00
17	*Trans*-2-hexenal	1197	1198	sweet, fragrant, almond, fruity green, leafy, apple, plum, vegetable	3.53	5.37	3.90
18	3-Methyl-1-butanol	1212	1212	fusel oil, whiskey-characteristic, pungent	0.00	3.15	0.00
19	Phenylsuccinic acid	1241	ND	ND	0.09	0.10	0.00
20	2-Methyl-1-butanol	1241	1244	cooked, roasted	0.00	0.00	0.40
21	1-Pentanol	1255	1255	characteristic fusel-like sweet and pleasant	0.59	0.00	0.00
22	Octanal	1274	1274	fatty, citrus, honey	0.47	0.00	0.00
23	1-Octen-3-one	1287	1287	mushroom	1.22	0.00	0.58
24	2,2,6-Trimethylcyclohexanone	1292	1284	menthol-like camphorous	0.00	0.77	0.00
25	*Cis*-Hept-2-enal	1305	1318	pungent green somewhat fatty	8.57	3.02	4.09
26	1-Nitropentane	1315	1405	Penetrating, fruity	1.73	0.00	0.00

27	6-Methyl-5-hepten-2-one	1325	1325	strong, fatty, green, citrus-like	18.48	0.90	7.68
28	1-Hexanol	1354	1354	Green, fruity, apple skin, oily	0.73	1.13	0.44
29	2-Propylthiazole	1367	1372	green, vine, herbal	0.19	0.00	0.16
30	2-Isobutylthiazole	1389	1396	tomato leaf	43.51	4.71	4.83
31	*Trans*-2-Octenal	1408	1408	peculiar green-leafy	2.73	1.01	0.00
32	Acetic acid	1445	1445	strong, pungent, characteristic vinegar	0.00	0.42	0.00
33	1-Ethyl-5-methylcyclopentene	1448	ND	ND	0.00	1.04	0.00
34	*Trans*,*trans*-2,4-Heptadienal	1448	1447	fatty, green	1.55	0.00	0.00
35	6-Methyl-5-hepten-2-ol	1464	1464	fruity	1.08	0.00	0.52
36	1-Nitrohexane	1481	1502	ND	0.63	0.00	0.00
37	2-Ethylhexanol	1488	1488	mild, oily, sweet, slightly floral	1.49	1.58	1.04
38	Benzaldehyde	1495	1495	characteristic	0.51	3.24	1.06
39	2-(Methylthio)ethanol	1515	1516	powerful, meat-like	0.00	0.59	0.00
40	Cis-p-menth-2-en-1-ol	1524	1563	ND	0.00	0.76	0.00
41	*Trans*-4-Oxohex-2-enal	1578	1599	ND	7.31	7.12	5.81
42	*Beta*-Cyclocitral	1591	1590	camphoraceous	0.00	1.64	0.00
43	(Methylthio)acetic acid	1706	ND	ND	0.04	0.00	0.00
44	Citral	1711	1714	strong, lemon-like	2.66	0.00	1.45
45	Methyl salicylate	1743	1743	minty, spicy, sweet, wintergreen-like	0.40	0.00	1.96
46	Methyl 2-butoxybenzoate	1744	ND	ND	0.00	0.12	0.00
47	Geranylacetone	1839	1837	green and rosy floral	2.34	0.00	0.00
48	Benzyl alcohol	1863	1857	floral, fruit-like	0.00	2.01	0.00
49	2-phenylethanol	1894	1894	characteristic rose-like	1.23	3.49	0.08
50	*Beta*-ionone	1911	1911	characteristic violet-like	0.00	1.42	0.35
51	2-Ethylhexanoic acid	1945	1946	mild	4.17	4.36	2.68
52	*trans*-4,5-Epoxy-*trans*-2-decenal	1976	2045	metallic	1.73	0.00	0.63

[1]Numbers used in PCA analysis in place of compound name. [2]References available at the NCBI PubChem database, http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. [3]Burdock, G.A., & Fenaroli, G. (2010). [4]Relative proportion was calculated from the division of each area by the median of all areas. ND = not described.

O *flavor* do tomate resulta de uma interação complexa entre açúcares, ácidos e um grande conjunto de compostos voláteis, que estão expostos a uma grande variabilidade no perfil e níveis dependendo da cultivar (RAMBLA et al., 2014). O termo aroma, mais especificamente, refere-se a uma mistura múltipla de um grande número de compostos voláteis, cuja composição é específica para cada espécie. Os compostos aromáticos mais importantes no tomate incluem derivados de derivados de aminoácidos, lípidos, carotenoides, terpenoides (EL HADI et al., 2013). Mais de 400 compostos voláteis foram identificados no tomate, no entanto, o aroma de tomate fresco pode ser caracterizado por alguns compostos principais como cis-3-hexanal, cis-3-hexanol, hexanal, 1-penten-3-ona, 3-metilbutanal, cis-2-hexenal, 6-metil-5-hepten-2-ona, salicilato de metila, 2-isobutiltiazole e β-ionona (TIEMAN et al., 2012). A **Tabela 4** mostra a descrição do odor dos compostos voláteis identificados neste trabalho.

Os tomates comerciais geralmente são caracterizados pelo descritor de aroma "verde", "terroso" e "mofado", enquanto que poucas notas "frutadas/florais" são evidentes. Os voláteis "frutados/florais" foram relacionados à melhora na percepção de doçura, enquanto outros voláteis associados a notas "verdes" melhoraram a percepção de acidez (BALDWIN; GOODNER; PLOTTO, 2008).

Quatro principais *clusters* foram representados no *heatmap* para uma melhor compreensão (**Figura 20B**). Os *clusters* foram divididos de acordo com a abundância de compostos em cada amostra. Alguns compostos voláteis frequentemente descritos em tomates comerciais, como 1-nitropentano (26), trans,trans-2,4-heptadienal (34) e geranilacetona (47) (*cluster* IV) foram encontrados apenas no fruto controle vermelho, o que deve ter contribuído ainda mais para a separação entre as amostras.

Conforme observado na **Figura 20B**, compostos como 2-isobutiltiazole (30), 6-metil-5-hepten-2-ona (27) e geranilacetona (47) (*cluster* IV) estão presentes em níveis mais elevados em tomates vermelhos e roxos, o que lhes confere os principais descritores de aromas "folha de tomate" e "verde" para essas amostras. Os descritores de aromas "frutados" também se destacaram no tomate roxo principalmente devido ao alto nível de 3-hexenal (15).

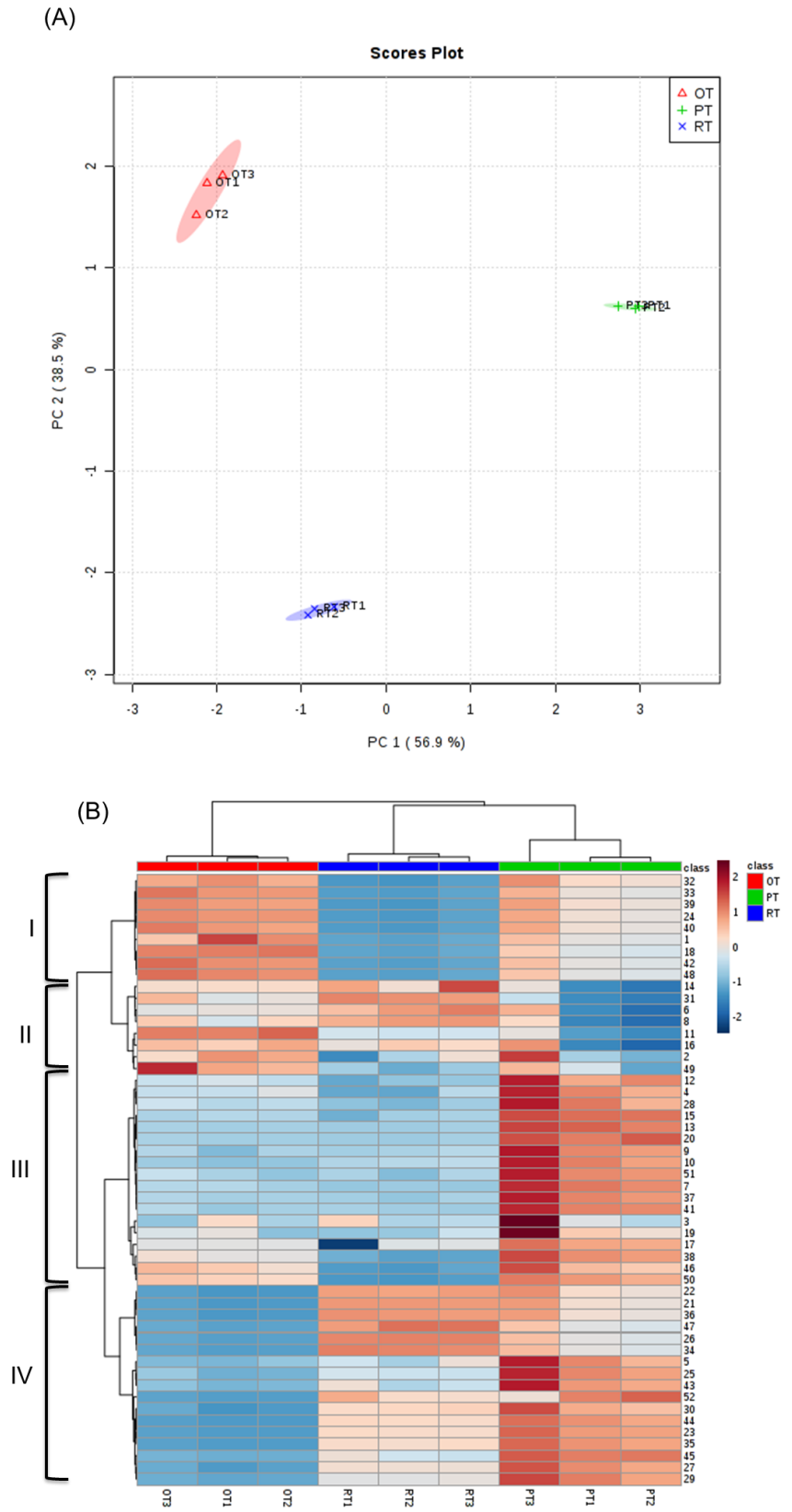


Figura 20. Scores plot (A) e heatmap (B) da Análise de Componentes Principais (PCA), mostrando a correlação entre voláteis de tomate vermelho (RT), tomate laranja (OT) e tomate roxo (PT). As regiões do heatmap em vermelho e azul indicam correlação negativa ou positiva entre os compostos, respectivamente.

A via de degradação de carotenoides é considerada uma das mais importantes para a formação de compostos aromáticos em frutos de tomate. Os tomates vermelho e roxo, os quais contêm licopeno, apresentaram perfil volátil muito específico, caracterizado pela presença de 6-metil-5-hepten-2-ona (27), 6-metil-5-hepten-2-ol (35), citral (44), que podem ser gerados por clivagem oxidativa de licopeno (LEWINSOHN et al., 2005). No entanto, a geranilacetona (47), também derivada da clivagem de licopeno, não foi detectada no fruto roxo. Por outro lado, a β-ionona (50) (*cluster* III), um volátil derivado do β-caroteno, ausente no fruto vermelho, foi encontrado nos frutos laranja e roxo, uma vez que o conteúdo de β-caroteno nessas amostras foi maior em comparação com o vermelho (**Tabela 4**).

A presença relativamente maior de trans-2-hexenal (17), β-ionona (50) (*cluster* III) e β-cyclocitral (42) (*cluster* I), no tomate laranja, resultou nos descritores de aroma "floral" e "frutado" como principais notas. Ainda, no fruto laranja não foram detectados compostos voláteis derivados da clivagem de licopeno, tais como citral (44), 6-metil-5-hepten-2-ol (35) e geranilacetona (47).

A β-ionona e o β-cyclocitral são gerados por clivagem direta do β-caroteno, o qual ocorre em frutos ricos em carotenoides. A β-ionona, embora menos produzida no fruto maduro, contribue para o *flavor* do tomate (RAMBLA et al., 2014). Outro importante volátil derivado de carotenoides, que contribui para o *flavor* do tomate, β-damascenona, não foi detectado em nenhuma amostra.

Alguns voláteis de cadeia ramificada derivados de aminoácidos foram encontrados como contribuintes importantes para o aroma de tomate. Os mais relevantes foram 2-isobutiltiazole (30), 3-metil-2-butenal (13), 2-metil-1-butanol (20), 3-metilbutanal (6), trans-2-metil-2-butenal (11) e 3-metil-1-butanol (18), composto volátil derivado de leucina e isoleucina (RAMBLA et al., 2014). No fruto roxo, 3-metilbutanal (6) e trans-2-metil-2-butenal (11) não foram detectados, enquanto que o nível de 2-isobutiltiazole (30) diminuiu em relação ao tomate vermelho.

Dentre os compostos voláteis fenólicos derivados do aminoácido fenilalanina, foram encontrados 2-feniletanol (49) e benzaldeído (38) em todas as amostras. O salicilato de metila (45), originário do ácido cinâmico, também

sintetizado a partir da fenilalanina (SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008), apresentou maior proporção no tomate roxo, o qual contém as maiores concentrações de ácidos fenólicos totais. A degradação do aminoácido metionina contribuiu para o aparecimento de metiltioetano (2), nos tomates vermelho e laranja, 2-(metiltio)etanol (39), no tomate de laranja e ácido (metiltio)acético (43), no fruto vermelho (SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008).

Os voláteis mais comuns derivados de ácidos graxos, em tomates, incluem 1-hexanol, trans-2-hexenal, cis-2-hexenal, 1-penten-3-ona, cis-3-hexenal, hexanal, cis-3-hexen-1-ol, 1-hexenol (RAMBLA et al., 2014). O hexanal é um dos compostos aromáticos derivados da via da lipoxigenase (LOX) e, juntamente com 1-hexenol, cis-3-hexen-1-ol e cis-3-hexenal compõem o grupo de voláteis derivados do ácido linolênico. O cis-3-hexen-1-ol pode ser derivado do cis-3-hexenal por meio da atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH). Da mesma forma, o 1-hexenol também pode ser derivado do hexanal via ADH (QIN et al., 2012). No entanto, o cis-3-hexen-1-ol e o 1-hexenol não foram detectados em níveis significativos em nenhum das amostras. Isso pode sugerir que o 3-hexenal (15) e o hexanal (10) não foram convertidos pela enzima. Por outro lado, o trans-2-hexenal (17) foi detectado em um nível elevado (*cluster* III) no tomate laranja, e o 3-hexenal (15) foi maior no tomate roxo. Além disso, a presença de trans-4-oxohex-2-enal (41) e 3-metil-2-butenal (13), também é indicativa de degradação lipídica (BELL et al., 2016).

5.2. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS E CATABÓLITOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE TOMATE ROXO EM MODELOS DE DIGESTÃO *IN VITRO* E ANIMAL.

5.7.1. Simulação da Digestão *in vitro*

Os efeitos benéficos do consumo de uma dieta rica em compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, na promoção à saúde, têm sido amplamente reconhecidos (CORREA-BETANZO et al., 2014; DUDA-CHODAK et al., 2015). Devido sua baixa biodisponibilidade, no decorrer da passagem pelo trato gastrintestinal (TGI), as antocianinas podem alcançar o cólon em quantidades significativas e

sofrerem a ação fermentativa da microbiota. O grande número de bactérias que habita o cólon forma um ecossistema altamente complexo, o qual desempenha um papel importante no metabolismo dos compostos encontrados nos alimentos, não absorvidos nas demais porções do TGI (DUDA-CHODAK et al., 2015). Os catabólitos microbianos então resultantes, juntamente com a porção absorvida, podem também contribuir para os efeitos benéficos associados à ingestão de antocianinas e outros compostos fenólicos (KAMILOGLU et al., 2015; LILA et al., 2016). Assim, a fim de avaliar a estabilidade dos flavonoides e ácidos fenólicos presentes na casca do tomate roxo, principalmente das antocianinas, durante a sua passagem através do TGI, o extrato fenólico da casca do fruto foi submetido à simulação da digestão *in vitro*.

O extrato apresentou conteúdo inicial de 97,94 ± 0,17 mg de rutina/10mL e 47,35 ± 0,04 mg petunidina eq./10mL. O perfil de flavonoides não se alterou durante a digestão gástrica e pancreática quando comparado ao extrato fenólico inicial (**Figuras 21 e 22**). Ainda, a digestão gástrica (R1) não teve efeito significativo sobre a concentração dos principais flavonoides presentes na casca do tomate roxo, nomeadamente antocianinas totais e rutina. No entanto, foi observada uma redução significativa nas concentrações destes compostos ao final da digestão pancreática (R2), de aproximadamente 31% e 20%, respectivamente (**Figura 23**).

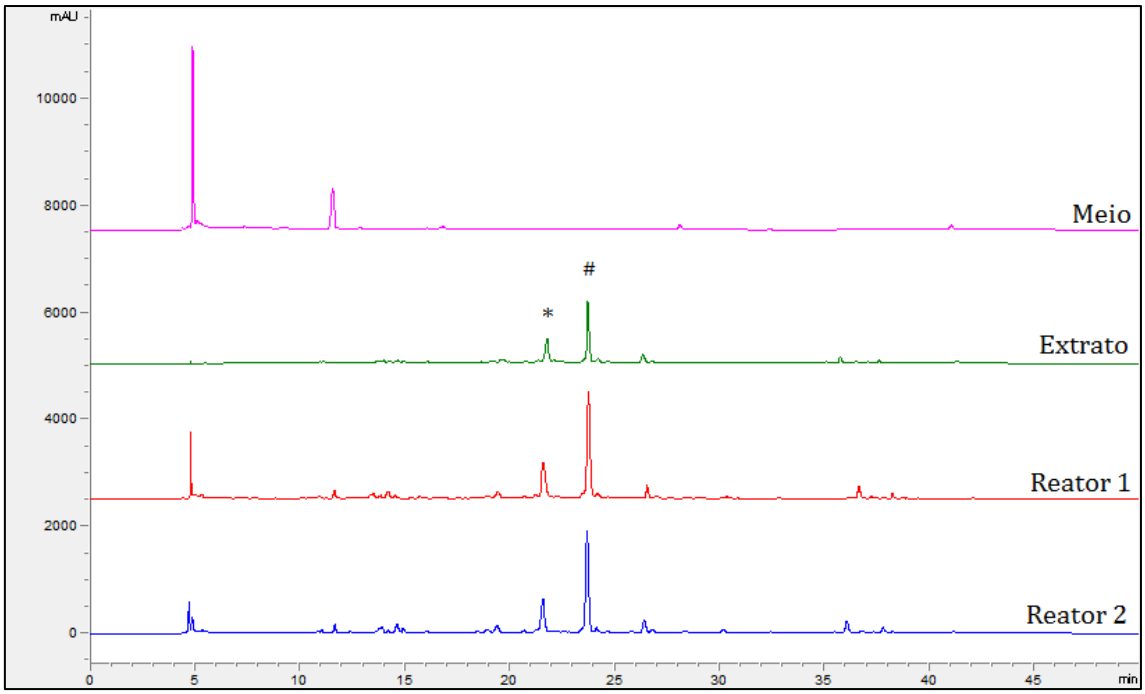


Figura 21. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=270 nm) dos flavonoides e ácidos fenólicos durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Extrato (E), Reator 1 (R1) e Reator 2 (R2). Petunidina (p-coumaroil)-rutinosideo-hexosideo (*)e Quercetina 3-O-rutinosideo (#).

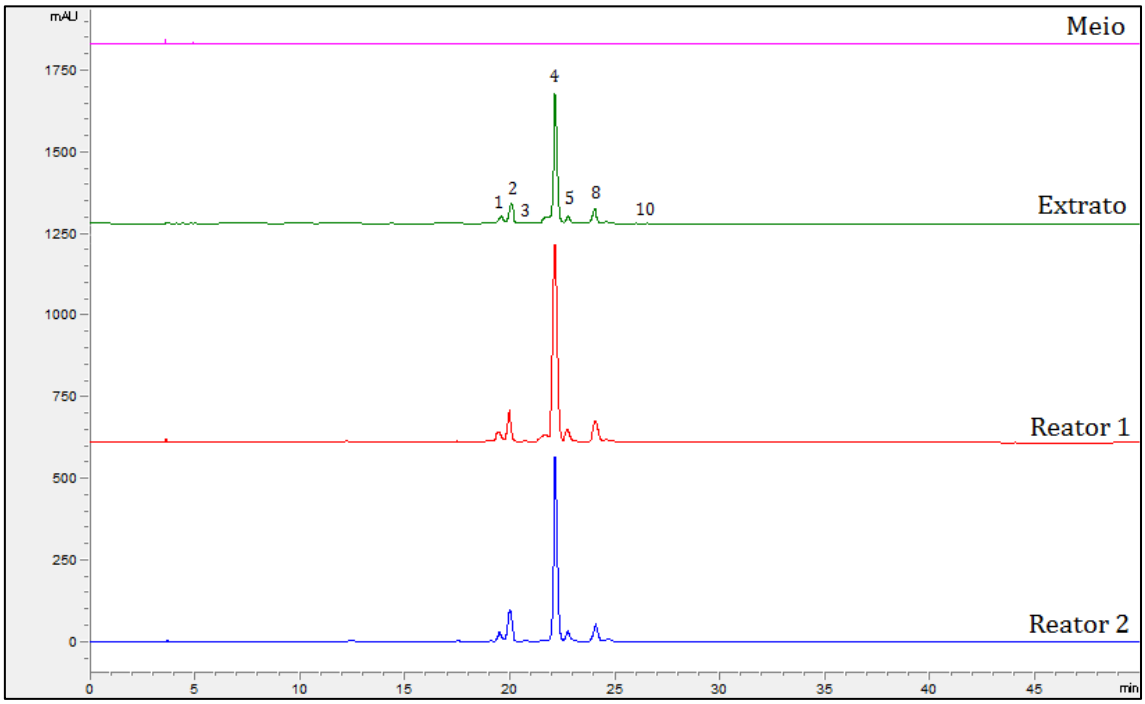


Figura 22. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=525 nm) dos flavonoides e ácidos fenólicos durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Extrato (E), Reator 1 (R1) e Reator 2 (R2). As identificações dos picos enumerados estão apresentadas na Tabela 5.

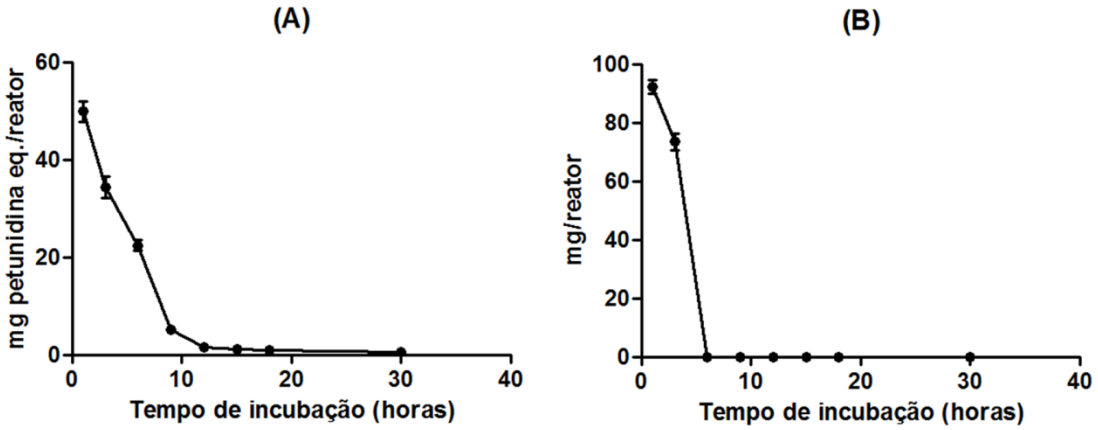


Figura 23. Consumo de antocianinas totais (A) e quercetina-3-O-rutinosídeo (B) ao longo de 30 horas do processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Os dois primeiros pontos do gráfico correspondem à coleta nos reatores R1 e R2 e os demais ao reator R3 em diferentes tempos de coleta.

Ainda, um rápido declínio na concentração das antocianinas (~55%) e rutina (~100%) ocorreu logo no início da fermentação em R3 (terceiro ponto no gráfico). Após 3h de fermentação (9h do tempo total de incubação, o qual inclui 2h de permanência em R1 e 4h em R2), as antocianinas foram extensivamente metabolizadas, desaparecendo quase completamente após 6h de fermentação. Diferentemente da rutina, foram encontrados traços de antocianinas até o término das 24h do processo fermentativo no reator que simula o cólon ascendente (R3).

Durante o período de 24 h do processo de fermentação (R3), o decréscimo na concentração do flavonol rutina e das antocianinas, principalmente da petunidina, foi acompanhado pelo aparecimento de outras formas de compostos com absorção em 525 nm (**Figura 24**) e 270 nm (**Figura 25**), não presentes no extrato inicial. Estes compostos também não foram encontrados no meio basal (com e sem inóculo fecal). A identificação dos compostos encontrados durante o processo de digestão *in vitro* está descrita nas **Tabelas 5 e 6**.

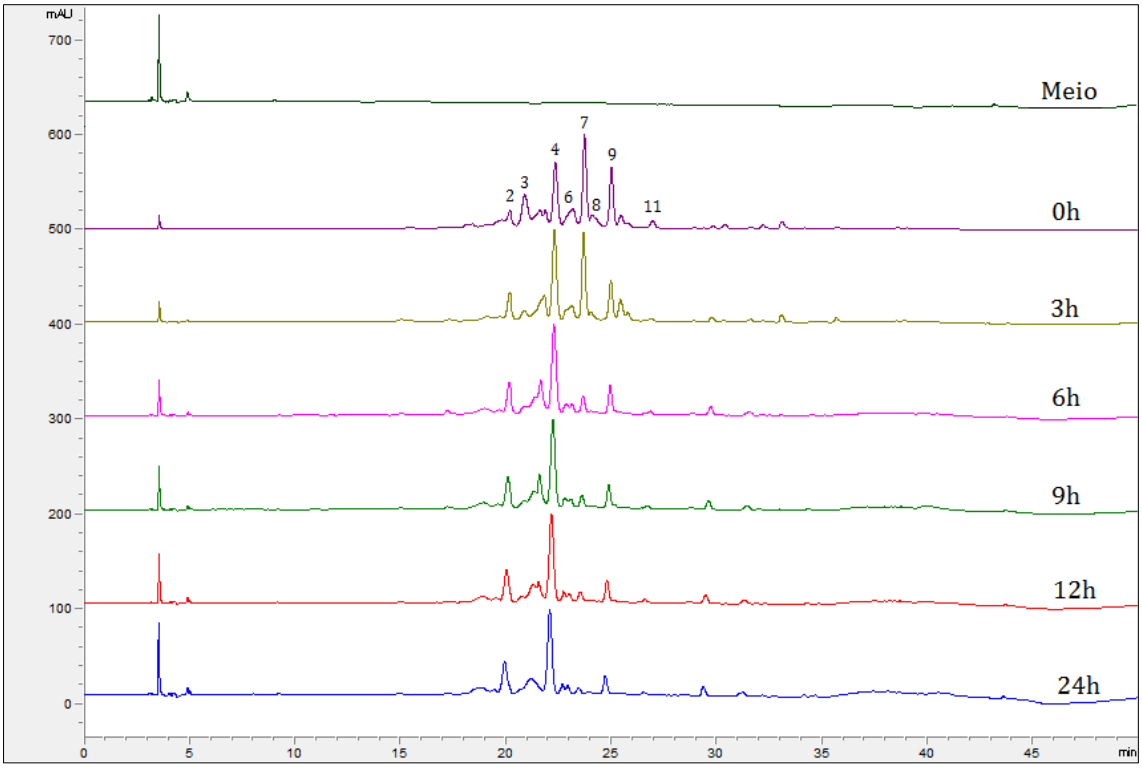


Figura 24. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=525 nm) dos flavonoides e ácidos fenólicos durante o processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Reator 3 nos diferentes tempos de coleta. As identificações dos picos enumerados estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Espectro de massas de metabólitos de antocianinas formadas durante o processo de digestão *in vitro* do extrato da casca do tomate roxo obtido por LC-qTOF-MS/MS.

Chemical Name	Peak number	RT	*m/z*	MS/MS	R1	R2	R3	R4	R5
Anthocyanins									
Petunidin (*p*-caffeoyl)-rutinoside-hexoside	1	19.60	949.2609	787.2025/479.1162/317.0651	x	x	-	-	-
Delphinidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside-hexoside	2	20.00	919.2476	757.1977/465.1006/303.0485	x	x	x	-	-
Petunidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside-hexoside (isomer)	3	20.50	935.2892	773.2342/479.1234/317.0684	x	x	x	-	-
Petunidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside-hexoside (isomer)	4	22.00	933.2723	771.2176/479.1231/317.0686	x	x	x	-	-
Petunidin (feruloyl)-rutinoside-hexoside	5	22.50	963.2790	801.2238/479.1185/317.0660	x	x	-	-	-
Delphinidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside	6	23.10	757.2009	303.0521	-	-	x	-	-
Petunidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside (isomer)	7	23.50	773.2328	317.0674	-	-	x	-	-
Malvidin 3-*O*-(*p*-coumaroyl)-rutinoside-5-*O*-glucoside	8	23.70	947.2821	785.2304/493.1347/331.0821	x	x	x	-	-
Petunidin (*p*-coumaroyl)-rutinoside (isomer)	9	24.70	771.2180	317.0675	-	-	x	-	-
Cyanidin 3-*O*-rutinoside	10	26.80	595.1679	449.1092/287.0560	x	x	-	-	-
Malvidin 3-*O*-(*p*-coumaroyl)-rutinoside	11	26.80	785.2353	331.0840	-	-	x	-	-

Modo positivo. RT, tempo de retenção, R1, reator 1, R2, reator 2, R3, reator 3, R4, reator4, R5, reator 5, "x", representa presença do composto no reator. Espectros de massas em Apêndice.

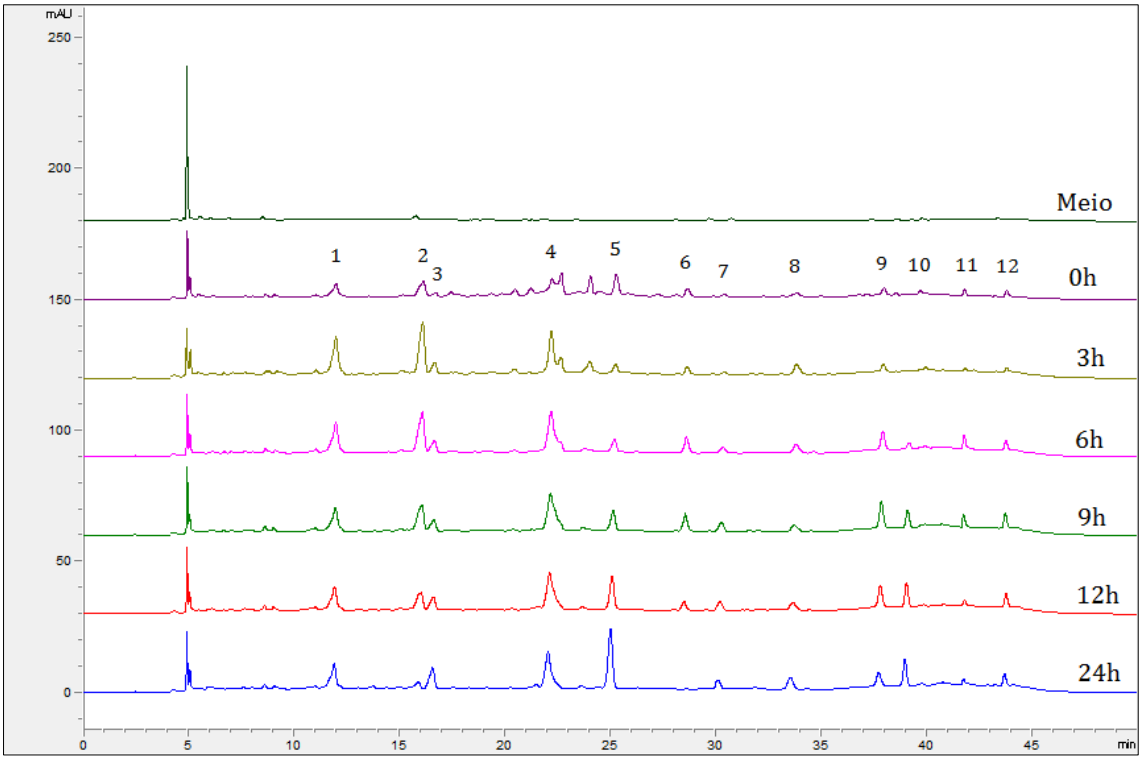


Figura 25. Cromatogramas obtido por CLAE-DAD (λ=270 nm) de compostos detectados ao longo das 24 h de fermentação in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Reator 3 nos diferentes tempos de coleta: 0h , 3h, 6h, 9h, 12h e 24h.

Tabela 6. Espectro de massas de metabólitos e catabólitos de flavonoides do extrato da casca do tomate roxo formados durante o processo de digestão *in vitro* em SHIME por LC-qTOF-MS/MS.

Chemical Name	Common Name	RT	[M - H]-	MS/MS	Parent Compound	R1	R2	R3	R4	R5
Benzoic Acids										
3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	Gallic acid	06.06	169.0209	125.0294	Delphinidin	-	x	x	-	-
3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic acid	3-*O*-Methylgallic acid	10.66	183.0334	168.0125 / 124.0224	Petunidin	-	x	x	-	-
3,4-Dihydroxybenzoic acid	Protocatechuic acid	10.80	153.0296	109.0387						
3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid	4-*O*-Methylgallic acid	13.73	183.0353	168.0345 / 124.0210	Petunidin	-	x	x	-	-
3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid	Syringic acid	23.71	197.0482	182.0229 / 167.0006	Malvidin	-	x	x	-	-
Phenylacetic Acids										
3,4-dihydroxyphenylacetic acid	Homoprotocatechuic acid	10.58	167.0386	123.0507	Quercetin	-	-	x	-	-
3-Hydroxyphenylacetic acid	Hydroxyphenylacetic acid	20.12	151.0449	107.0545	Quercetin	-	-	x	-	-
4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid	Homovanillic acid	20.49	181.0543	139.0441 / 122.0422	Quercetin	-	-	x	x	x
Phenylpropionic Acids										
3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid	Dihydrocaffeic acid	14.41	181.0558	137.0667	Quercetin/Phenolic Acids	-	-	x	-	-
3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid	Dihydro-3-coumaric acid	23.17	165.0607	121.0709	Quercetin/Phenolic Acids	-	-	x	-	-
3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid	Dihydroferulic acid	27.70	195.0800	121.0387	Phenolic Acids	-	-	x	x	-
Cinnamic Acids										
Caffeic acid *O*-hexoside		13.06	341.0889	179.0343 / 135.0418	-	x	x	-	-	-
3,4-Dihydroxycinnamic acid	Caffeic acid	17.13	179.0379	135.0449	Phenolic Acids	x	x	x	-	-
Ferulic acid *O*-hexoside		20.21	355.1058	193.0491 / 134.0330	-	x	x	-	-	-
trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid	Ferulic acid	24.66	193.0546	161.0238	Phenolic Acids	x	x	x	-	-
trans-3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid	Isoferulic acid	32.84	193.0518	161.0270	Phenolic Acids	x	x	x	-	-
Quinic Acids										
5-*O*-Caffeoylquinic acid	Neochlorogenic acid	13.93	353	191	-	x	x	-	-	-
Feruloylquinic acid (isomer)	-	15.69	367.1038	161.0236	-	x	x	-	-	-
Feruloylquinic acid (isomer)	-	19.41	367.1050	161.0275	-	x	x	-	-	-
Feruloylquinic acid (isomer)	-	21.61	367.1057	161.0242	-	x	x	-	-	-
Dicaffeoylquinic acid	-	26.40	515	353 / 173	-	x	x	-	-	-
Feruoylquinic acid *O*-hexoside (isomer)	-	32.68	529.1351	367.1048 / 161.0236	-	x	x	-	-	-
Feruoylquinic acid *O*-hexoside (isomer)	-	35.91	529.1371	367.1016 / 161.0243	-	x	x	-	-	-
Feruoylquinic acid *O*-hexoside (isomer)	-	37.05	529.1383	367.1062 / 161.0257	-	x	x	-	-	-
Flavonoids										
Quercetin 3-*O*-rutinoside	Rutin	23.54	609.1466	300.0279	-	x	x	x	x	-
Quercetin 3-*O*-glucoside	Isoquercetin	24.18	463.0897	301.0325 / 151.0029	Rutin	x	x	x	-	-
Kaempferol 3-*O*-rutinoside	-	26.41	593.1584	284.0310	-	x	x	-	-	-
Naringenin 7-*O*-glucoside	Prunin	28.70	433.1138	271.0595	-	x	x	-	-	-
Kaempferol 3-*O*-glucoside	-	28.79	447.0956	285.0409 / 151.0040	-	x	x	-	-	-
Quercetin	Quercetin	38.66	301.0361	179.0063 / 151.0019	Rutin	-	-	x	-	-
Naringenin chalcone	Naringenin	41.28	271.0612	151.0023 / 119.0496	-	x	x	-	-	-
Kaempferol	Kaempferol	42.00	285.0390	-	-	x	x	-	-	-

No R3, foram quantificadas (como equivalentes em petunidina) 4 das 12 antocianinas encontradas durante o processo fermentativo (**Figura 26**). Os picos nomeados como 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 e 11 foram identificados com as formas inicialmente presentes no extrato e os demais como intermediários do catabolismo. Os picos 2 e 4 apresentaram um perfil de decaimento gradual ao longo do processo fermentativo (**Figura 26 A e B**). Os picos 7 e 9 foram formados no início da fermentação (R3-0h) com posterior decaimento, indicando compostos intermediários do processo de degradação de antocianinas pela microbiota, uma vez que não estavam presentes nos reatores R1 e R2 (**Figura 26 C e D**).

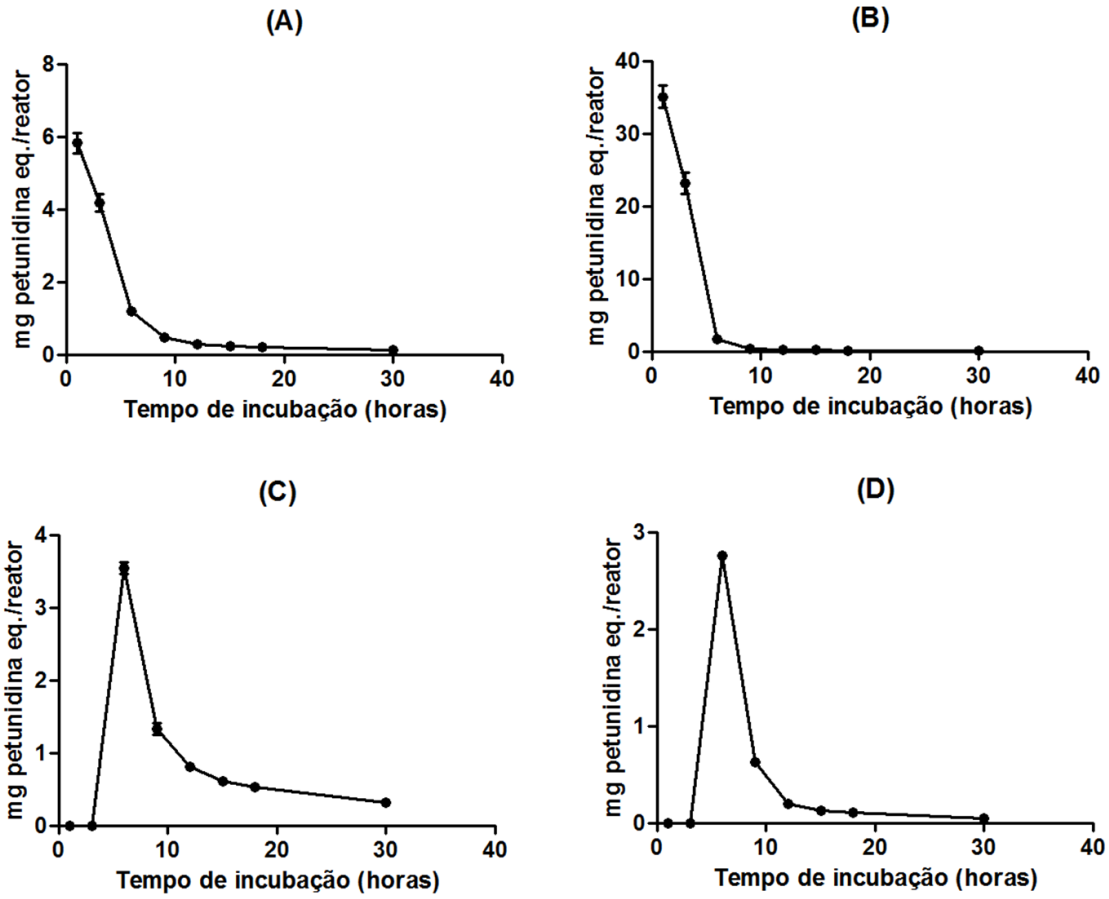


Figura 26. Concentração de antocianinas ao longo de 30 horas do processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Os dois primeiros pontos de cada gráfico correspondem aos reatores R1 e R2, e os demais ao reator R3 nos diferentes tempos de coleta. Delfinidina (p-coumaroil)-rutinosideo-hexosideo (m/z 919) (A), petunidina (p-coumaroil)-rutinosideo-hexosideo (m/z 933) (B), petunidina (p-coumaroil)-rutinosideo (m/z 773) (C) e petunidina (p-coumaroil)-rutinosideo (m/z 771) (D). Concentração expressa em petunidina equivalente.

Ainda no R3, foram quantificados, como equivalentes em ácido 3-*O*-metilgálico (AMG), 12 novos compostos formados durante o processo fermentativo

(**Figura 27**). Os picos numerados como 1, 2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram um aumento na concentração durante as 24 h de fermentação, atingindo $t_{máx}$ em torno de 3 h (picos 1, 2, 4 e 6) e em torno de 24 h (picos 3 e 5), com posterior decaimento. Os picos numerados como 7, 8, 9, 10, 11 e 12 também apresentaram aumento na concentração ao longo da fermentação, com $t_{máx}$ em torno de 12 h, não decaindo até o final das 24 horas. Somente o pico 10 apresentou contínuo aumento na concentração durante todo o processo de fermentação.

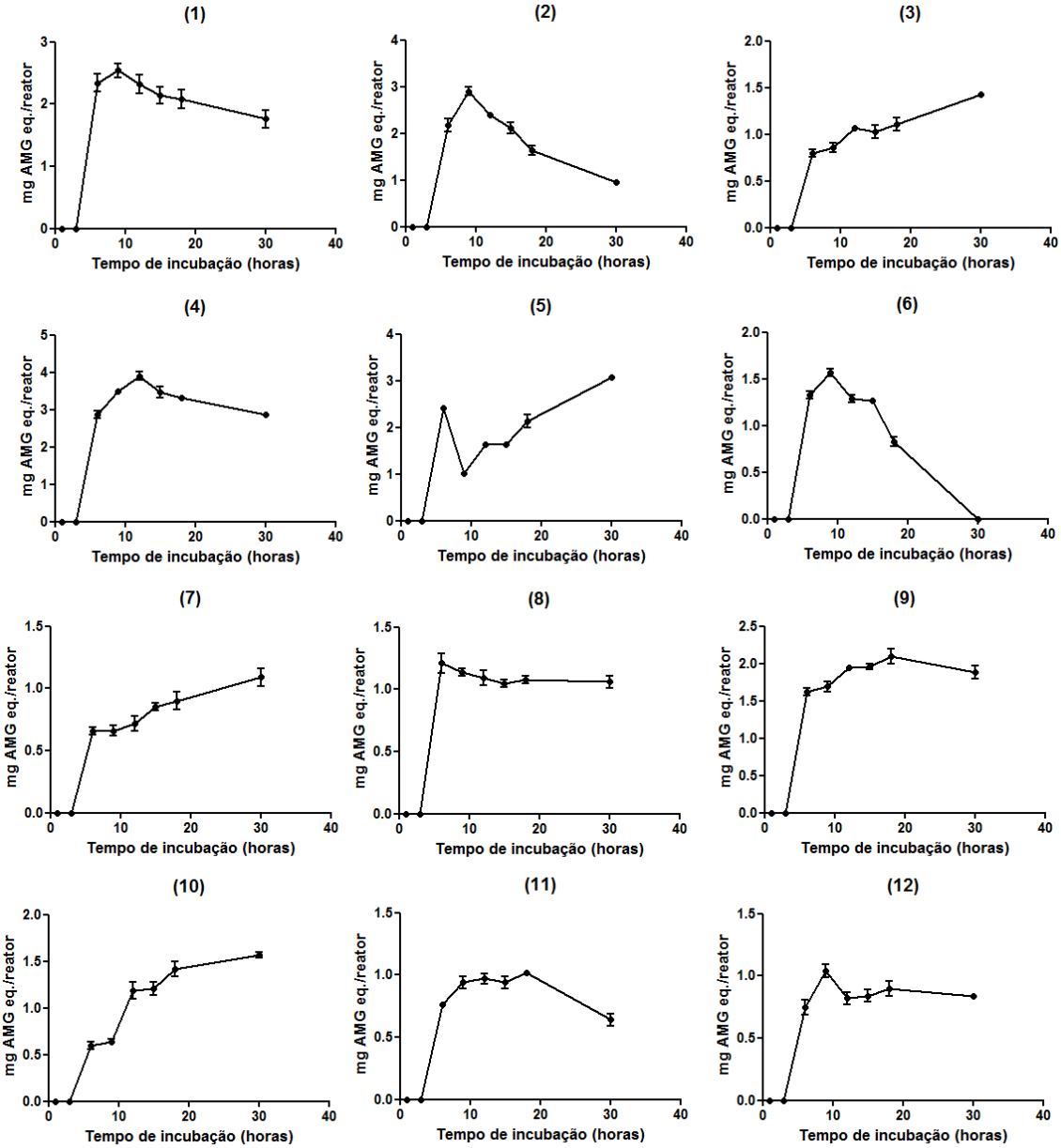


Figura 27. Curva de concentração ao longo do tempo de ácidos fenólicos ao longo de 30 horas do processo de digestão in vitro do extrato da casca do tomate roxo. Os dois primeiros pontos de cada gráfico correspondem aos reatores R1 e R2, e os demais ao reator R3 nos diferentes tempos de coleta. Concentração expressa em equivalente em ácido 3-O-metilgálico (AMG).

Dentre os 12 compostos derivados do metabolismo bacteriano encontrados no R3, quatro foram identificados por LC-Q-TOF, sendo o pico 1 compatível com um dos isômeros do ácido 3-*O*-metilgálico (*m/z* 183), principal catabólito da petunidina; o pico 2 compatível com o ácido diidrocafeico (*m/z* 181), catabólito da quercetina e ácidos fenólicos; o pico 4 compatível com o ácido homovanílico (*m/z* 181), catabólito da quercetina; e o pico 6 compatível com o ácido diidroferúlico (*m/z* 195), catabólito de ácidos fenólicos. O pico 3 apresentou fragmentação compatível com um derivado do ácido diidrocafeico. Os demais sete compostos não apresentaram ionização ou não foram indentificados.

Conforme observado, uma expressiva quantidade de ácido 3-*O*-metilgálico (pico 1) foi detectada nas amostras, atingindo a concentração máxima no tempo 3h, referente ao processo de fermentação, tempo este em que as antocianinas, majoritariamente a petunidina, foram extensivamente degradadas (**Figuras 23 e 27**).

De modo semelhante, dois dos principais ácidos resultantes da degradação da quercetina, o ácido dihidrocafeico (pico 2) e o ácido homovanílico (pico 4), atingiram concentração máxima nos tempos de 3h e 6h de fermentação, respectivamente. O ácido dihidroferúlico (pico 6), catabólito de ácidos fenólicos inicialmente presentes no extrato, atingiu sua concentração máxima também ao final das 3h do processo de fermentação microbiana (**Figura 22**).

5.7.1.1. Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Os principais AGCC encontrados nas amostras de fermentação foram o propiônico e o butírico. Outros AGCC encontrados foram isobutírico, isovalérico e valérico, os quais são conhecidos como ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada. O propionato apresentou as maiores proporções, seguido do butirato (**Figura 28**). Com excessão deste, houve aumento nas concentrações de todos os AGCC, quando comparados os processos fermentativos com e sem extrato de casca de tomate roxo. As concentrações de butirato foram maiores após 12h de fermentação. Já para o propionato não se observou essa diferença. O propionato e outros AGCC apresentaram maiores concentrações nos R4 e R5. As concentrações de butirato foram maiores nos R3 e R4, conforme também observado em outros estudos (CUEVA et al., 2015; SADEGHI EKBATAN et al., 2016).

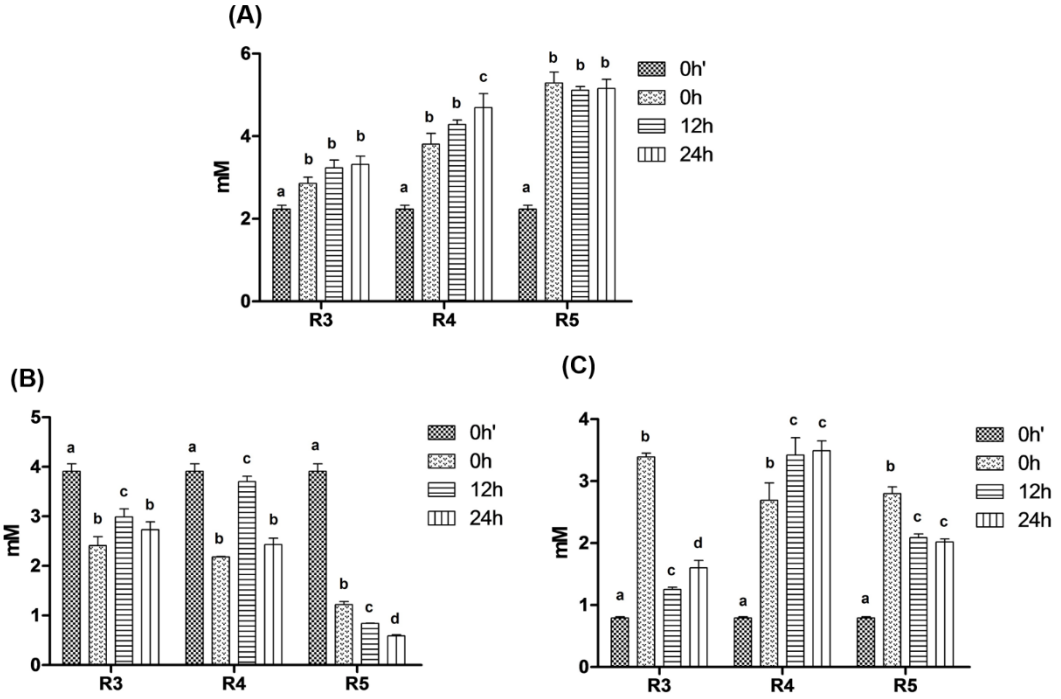


Figura 28. Concentração (mM) de propionato (A), butirato (B) e outros AGCC (C) do controle negativo (0h') e ao longo da fermentação in vitro (0h, 12h e 24h) da casca de tomate roxo, nos reatores que simulam o cólon ascendente (R3), transverso (R4) e descendente (R5). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparados entre os tempos 0h', 0h, 12h e 24h em um mesmo reator. Os dados estão apresentados como média ± desvio padão.

Os AGCC são ácidos orgânicos alifáticos saturados, contendo de um a seis carbonos, dentre os quais os ácidos acético (C2), propiônico (C3) e butírico (C4) são os mais abundantes. Os AGCC, particularmente o ácido butírico têm sido amplamente estudados devido ao envolvimento na manutenção da saúde. O ácido butírico é considerado essencial para manutenção das funções do cólon, uma vez que é a principal fonte de energia dos colonócitos (MOSELE et al., 2015). O aumento da produção intestinal de AGCC, tem sido associado à efeitos favoráveis à saúde intestinal, incluindo o crescimento de bactérias probióticas, bem como propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (SADEGHI EKBATAN et al., 2016). Os AGCC também atuam como moléculas de sinalização no eixo do intestino-cérebro, tendo um papel direto na regulação central do apetite e influenciando o metabolismo e a saciedade (GUERGOLETTO et al., 2016; ALQURASHI et al., 2017).

A literatura apresenta dados conflitantes em relação à formação de AGCC na presença de compostos fenólicos. Observou-se um aumento na produção de AGCC após a incubação *in vitro* de ácido clorogênico, rutina, ácido cafeico e quercetina (PARKAR; TROWER; STEVENSON, 2013). Ao contrário, proantocianidinas isoladas (BAZZOCCO et al., 2008) suprimiram a geração *in vitro* de AGCC. O extrato de chá preto aumentou apenas a concentração de acetato e propionato, sendo observada diminuição na quantidade de butirato após a incubação de extratos de chá preto e suco de uva (VAN DORSTEN et al., 2012). O aumento na produção dos três principais AGCC foi observado após a incubação de extrato de romã (BIALONSKA et al., 2010).

O aumento de AGCC observado após a fermentação *in vitro* de compostos fenólicos isolados, provavelmente está relacionado a uma maior taxa de fermentação das porções glicosídicas liberadas e/ou dos carboidratos remanescentes no meio de cultura (MOSELE et al., 2015).

Uma vez que muitos fatores, como a quantidade e a atividade de bactérias fermentadoras de carboidratos, a expressão e a atividade enzimática, bem como a disponibilidade de substrato, estão envolvidos na síntese de AGCC, os compostos fenólicos podem interagir com um ou mais desses fatores (MOSELE et al., 2015). Assim, devido aos resultados contraditorios encontrados na literatura, a estrapolação para o que ocorre *in vivo* deve ser feita com cuidado.

5.7.2. Excreção em Modelo Animal

Após a ingestão aguda do extrato de tomate roxo, foram identificados um total de 18 compostos fenólicos, na forma livre ou conjugada. Nenhuma antocianina ou flavonoide não antociânico foi detectado. Dentre os ácidos fenólicos e demais catabólitos encontrados na urina dos animais, no intervalo de 0 a 4 horas, 7 foram detectados na forma livre, 6 glucoronidados e 14 sulfatados (**Tabela 7**). No intervalo de 4 a 12 horas, foram detectados 8 ácidos fenólicos na forma livre, 1 glucoronidado e 6 sulfatados; no intervalo de 12 a 24 horas, foram encontrados 7 compostos na forma livre 1 glucoronidado e 5 sulfatados; e na amostra controle foram detectados 3 compostos na forma livre 1 glucoronidado e 5 sulfatados.

Alguns dos compostos encontrados podem ter sido formados tanto por ação da microbiota ou pela metabolização hepática, como os ácidos vanílico, homovanílico, ferúlico, 3-*O*-metilgálico e o 3-*O*-metilcatecol, os quais podem ser formados a partir da metilação dos ácidos protocatecuico, homoprotocatecuico, cafeico, gálico e do catecol, respectivamente (DEL RIO et al., 2013; DE FERRARS et al., 2014; ZAMORA-ROS et al., 2016). Contudo, tendo em vista que o ácido 3-*O*-metilgálico foi detectado no SHIME, presume-se que sua presença na urina provavelmente provém, em sua maior parte, da fermentação microbiana da petunidina do que da metilação hepática do ácido gálico, este último não encontrado no extrato, após digestão *in vitro* ou na urina e material fecal. Não foram detectadas antocianinas, agliconas ou formas conjugadas na urina.

Tabela 7. Espectro de massas de metabólitos de flavonoides e ácidos fenólicos excretados na urina e fezes (0-24h) de ratos após o consumo em dose única do extrato de tomate roxo.

Compound	RT	[M-H]- *(m/z)*	MS/MS *(m/z)*	Urine (0-4h)	Urine (4-12h)	Urine (12-24h)	Urine (Ctrl)	Feces (0-24h)	Feces (Ctrl)
Phenolic Acids									
Quinic Acid	5.3	191.0272	111.0154	x	x	x	x	-	-
Dihydrocaffeic acid	13.0	181.0735	137.0765	-	x	x	-	x	-
Hippuric acid	16.4	178.0576	134.0636	x	x	x	x	-	-
Caffeic acid	17.1	179.0585	135.0590	x	x	-	-	x	-
Dihydroferulic acid	17.4	195.0887	135.0583 / 123.0580	-	-	-	-	x	-
Dihydroisoferulic acid	22.4	195.0903	136.0664 / 121.0407	-	-	-	-	x	-
Coumaric acid (isomer)	23.2	163.0485	119.0545	x	x	x	-	-	-
Dihydro-3-coumaric acid	23.9	165.0638	121.0718	x	x	x	x	x	x
Ferulic acid	25.1	193.0573	178.0358 / 134.0410	x	x	x	-	x	x
Coumaric acid (isomer)	26.5	163.0492	119.0540	x	x	x	-	-	-
Conjugate metabolites									
3-*O*-Methylgallic acid *O*-sulfate	6.6	263.0289	183.0694 / 165.0633	x	-	-	-	-	-
Catechol *O*-glucuronide	8.2	285.0670	109.0383	x	-	-	-	-	-
Dihydrocaffeic acid *O*-glucuronide	8.8	357.0910	181.0585 / 137.0652	x	-	-	-	-	-
Protocatechuic acid *O*-sulfate	10.6	232.9833	153.0256	x	-	-	-	-	-
Dihydroferulic acid *O*-glucuronide	12.2	371.1055	193.0617 / 113.0315	x	-	-	-	-	-
Ferulic acid *O*-glucuronide	12.6	369.0933	193.0593 / 134.0394	x	x	-	-	-	-
Hydroxybenzoic acid *O*-sulfate	13.0	216.9889	137.0293	x	x	x	x	-	-
Dihydrocaffeic acid *O*-sulfate	13.3	261.0150	181.0598 / 137.0658	x	-	-	-	-	-
Vanillic acid *O*-sulfate	13.7	247.0002	167.0450	x	x	x	x	-	-
Caffeic acid *O*-glucuronide	14.2	355.0748	179.0428 / 135.0499	x	-	-	-	-	-
Caffeic acid *O*-sulfate	15.6	258.9986	179.0436	x	-	-	-	-	-
Pyrogallol *O*-sulfate	16.7	204.9878	125.0279	x	x	-	-	-	-
Catechol *O*-sulfate	16.8	188.9936	109.0359	x	x	x	x	-	-
Dihydroferulic acid *O*-sulfate	17.6	275.0278	195.0733 / 123.0490	x	-	-	-	-	-
Coumaric acid *O*-sulfate (isomer)	18.5	243.0035	163.0473 / 119.0533	x	-	-	-	x	-
3-Methylcatechol *O*-sulfate	19.6	203.0083	123.0491	x	x	x	x	-	-
Ferulic acid *O*-sulfate	19.9	273.0125	193.0577 / 134.0406	x	-	-	-	-	-
Dihydrocoumaric acid *O*-sulfate	20.4	245.0181	165.0633 / 121.0705	x	-	-	-	-	-
Coumaric acid *O*-sulfate (isomer)	22.1	242.0197	162.0643 / 119.0532	x	x	x	x	-	-
Benzoic acid *O*-glucuronide	29.4	297.1010	175.0320 / 121.0702	x	x	x	x	-	-

RT, tempo de retenção, Ctrl, controle. Cromatogramas em Apêndice.

Nas fezes foram encontrados 6 ácidos fenólicos livres: cafeico, diidro-3-cumárico, diidrocafeico, diidroferúlico, diidroisoferúlico e ferúlico, além do ácido cumárico na forma sulfatada, os quais foram também detectados na fermentação *in vitro*. Os ácidos cafeico e ferúlico, que podem ser formados por ação da microbiota, foram encontrados também no extrato. Não foram detectadas antocianinas nem outros flavonoides no material fecal. Na amostra controle foram detectados os ácidos ferúlico e diidro-3-cumárico.

Os principais catabólitos excretados na urina após a ingestão de extrato de tomate roxo foram os ácidos hipúrico, cumárico, ferúlico, diidrocumárico e o 3-*O*-metilcatecol. O ácido ferúlico foi o principal catabólito encontrado nas fezes. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados em estudos que investigaram a formação de compostos provenientes do metabolismo de frutos ricos em antocianinas (KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2014; MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2016).

A maior diversidade de compostos foi encontrada na urina, em comparação à fermentação *in vitro* e às fezes. Esta observação foi feita também por outros trabalhos (MOSELE; MACIÀ; MOTILVA, 2016).

Após a ingestão aguda e crônica de mirtilos silvestres, o ácido hipúrico foi o principal polifenol excretado na urina humana (FELICIANO et al., 2016; RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2016). Os ácidos hipúrico, 4-hidroxifenilacético, homovanílico e 4-hidroxibenzóico foram excretados em maior quantidade na urina ao longo de 24 h em ratos alimentados com cranberry, mirtilo ou framboesa preta liofilizada (KHANAL; HOWARD; PRIOR, 2014).

Com base nos compostos identificados na fermentação *in vitro*, urina e fezes dos animais, e dos dados descritos na literatura, foram propostas rotas de degradação para os principais compostos fenólicos encontrados no extrato de tomate roxo: a petunidina (*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo, a quercetina 3-*O*-rutinosídeo, e o ácido neoclorogênico.

A degradação da petunidina (*p*-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo (*m/z* 933), resultou inicialmente no aparecimento transitório da petunidina (*p*-coumaroil)-rutinosídeo (*m/z* 771), devido à perda da hexose, e possivelmente da petunidina hexosídeo-hexosídeo (*m/z* 641), devido à perda do grupo acila. Ainda,

tanto esta como a antocianina parental podem ter dado origem à petunidina hexosídeo (*m/z* 479), devido à perda de outra hexose ou da rutinose e do ácido, respectivamente. Uma deglicosilação subsequente podem ter resultado na liberação da aglicona petunidina (*m/z* 317), a qual não foi detectada devido à alta instabilidade química (HIDALGO et al., 2012; MARÍN et al., 2015a). A fissão do anel B dessa antocianidina resultou, presumidamente, na formação do ácido 3-*O*-metilgálico (*m/z* 183). Apesar de o floroglucinol (*m/z* 125) poder ser formado a partir da fissão do anel A das agliconas (FORESTER; WATERHOUSE, 2010; GARGOURI et al., 2013; FARIA; FERNANDES; MATEUS, 2014; MOSELE; MACIA; MOTILVA, 2015) não foi possível detectá-lo (**Figura 29**). De forma semelhante, foram metabolizados os glicosídeos de delfinidina e malvidina, resultando, respectivamente, nos ácidos gálico e siríngico (**Tabela 6**) (OZDAL et al., 2016; WU et al., 2016).

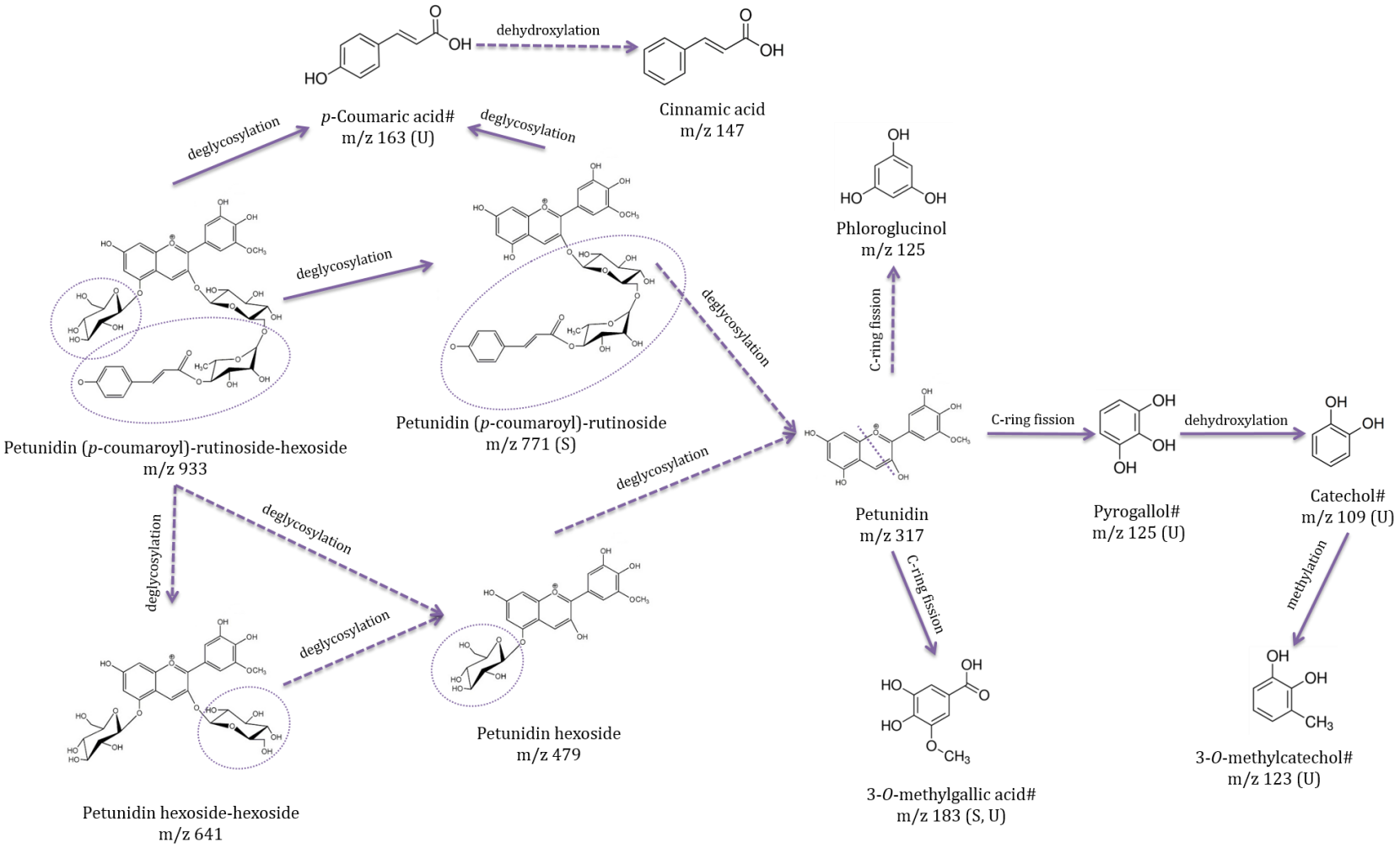


Figura 29. Proposta de rota de degradação química ou pela microbiota intestinal da petunidina (p-coumaroil)-rutinosídeo-hexosídeo em sistema de digestão in vitro e excreções fecal e urinária. Setas tracejadas representam compostos não detectados. (S, U, F) compostos detectados no SHIME, urina e fezes, respectivamente. Compostos detectados glucoronidados (*) e sulfatados (#).

A ação da microbiota intestinal sobre a quercetina 3-*O*-rutinosídeo resultou, inicialmente, no aparecimento da quercetina 3-*O*-glucosídeo (*m/z* 463) e da aglicona livre (*m/z* 301), por deglicosilações. Diversos ácidos fenólicos relacionados ao metabolismo bacteriano da quercetina foram identificados, dentre eles o ácido 3-(3-hidroxifenil)propiônico ou ácido dihidro-3-coumárico (*m/z* 165), este podendo dar origem ao ácido 4-hidroxifenilacético (*m/z* 151) e ao ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético ou homovanílico (*m/z* 181) (identificado pela biblioteca do Q-TOF); o ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propiônico ou ácido dihidrocafeico (*m/z* 181); o ácido 3,4-dihidroxifenilacético ou ácido homoprotocatecuico (*m/z* 167), o qual pode originar o ácido 3-hidroxifenilacético (*m/z* 151) (KONISHI, 2005; BRAUNE et al., 2009; DEL RIO et al., 2010; DUDA-CHODAK et al., 2015; MARÍN et al., 2015b; AMIĆ et al., 2017) (**Figura 30**). Contudo, alguns destes ácidos podem ser ainda derivados do metabolismo bacteriano de outros compostos fenólicos. O ácido *p*-hidroxifenilacético (*m/z* 151), por exemplo, pode ser derivado também do kaempferol (VISSIENNON et al., 2012).

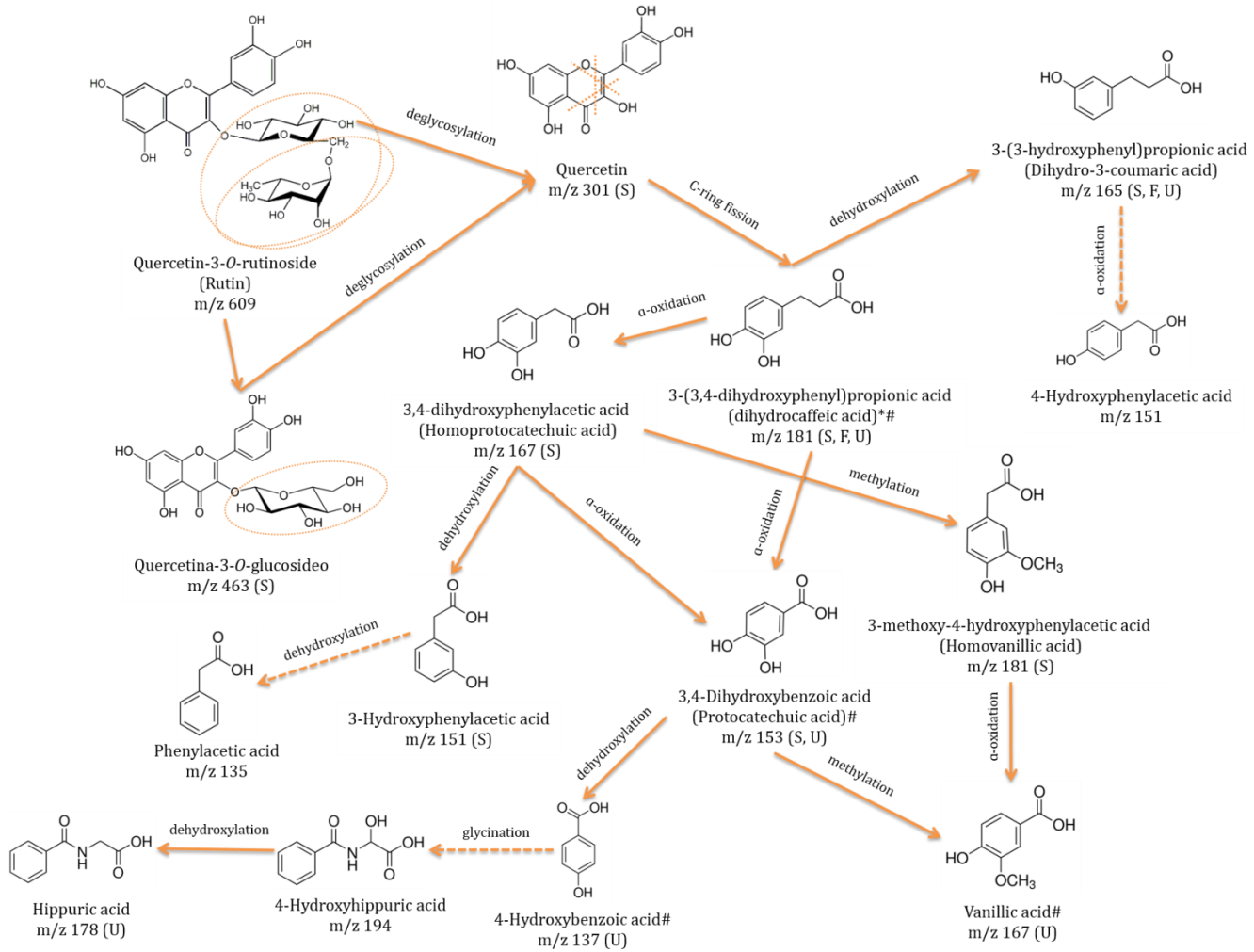


Figura 290. Proposta de rota de degradação química ou pela microbiota intestinal da quercetina 3-O-rutinosídeo em sistema de digestão in vitro e excreções fecal e urinária. Setas tracejadas representam compostos não detectados. (S, U, F) compostos detectados no SHIME, urina e fezes, respectivamente. Compostos detectados glucoronidados (*) e sulfatados (#).

A degradação do ácido *trans*-5-*O*-cafeoilquínico ou neoclorogênico (*m/z* 353), pode ter resultado no aparecimento do ácido quínico (*m/z* 191) (não detectado) e do ácido cafeico (*m/z* 179). Este, através de uma reação de metilação, pode ter dado origem ao ácido ferúlico (*m/z* 193), ou ao ácido dihidrocafeico (*m/z* 181), através da reação de hidrogenação. A hidrogenação do ácido ferúlico (*m/z* 193) pode ter resultado na formação do ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propiônico ou dihidroferúlico (*m/z* 195). Da descarboxilação do ácido dihidrocafeico (*m/z* 181) pode ter resultado ainda o ácido dihidro-3-coumárico (*m/z* 165) (BRAUNE et al., 2009; ZHAO et al., 2012; SADEGHI EKBATAN et al., 2016) (**Figura 31**).

O principal produto de degradação da naringenina, o ácido 3-(4-hidroxifenil)propiônico (*m/z* 165) (MARÍN et al., 2015b) não foi detectado nas amostras fermentadas, provavelmente devido à baixa quantidade inicial deste flavonoide no extrato. De igual modo, não foram detectados os produtos de degradação da cianidina-3-*O*-rutinosídeo.

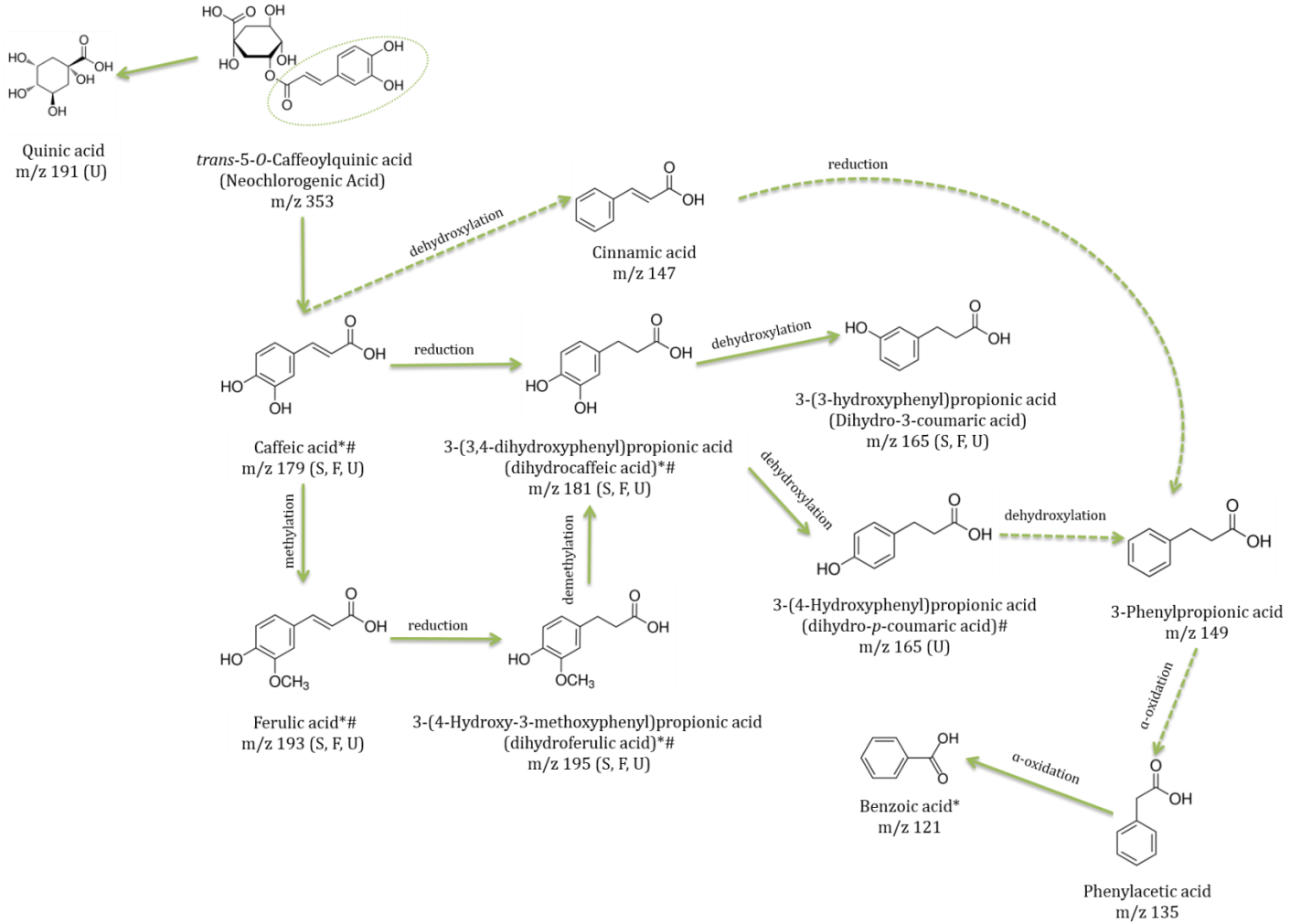


Figura 301. Proposta de rota de degradação química ou pela microbiota intestinal do ácido neoclorogênico em sistema de digestão in vitro e excreções fecal e urinária. Setas tracejadas representam compostos não detectados. (S, U, F) compostos detectados no SHIME, urina e fezes, respectivamente. Compostos detectados glucoronidados (*) e sulfatados (#).

As antocianinas são relativamente estáveis no pH ácido do estômago, mas podem sofrer alteração na estrutura com a formação de quinonas ou mesmo a degradação química em pH básico (EKICI et al., 2014), levando a formação de ácidos fenólicos (WILLIAMSON; MANACH, 2005; FORESTER; WATERHOUSE, 2009).

No processo fermentativo, a degradação mais rápida sofrida pela rutina, em contraste com as antocianinas aciladas, pode ser devido ao difícil acesso bacteriano às moléculas destas, devido à estrutura bioquímica, podendo esse achado refletir o que ocorre *in vivo* no cólon humano (HIDALGO et al., 2012).

Em nenhuma das amostras foram encontradas as respectivas agliconas das antocianinas. Isso pode ser devido a alta instabilidade das agliconas sob as condições fisiológicas e de pH neutro do intestino, uma vez que a clivagem da ligação glicosídica ocorre por ação hidrolítica das enzimas da microbiota intestinal, liberando transitoriamente as agliconas, as quais são rapidamente degradadas aos respectivos ácidos fenólicos a partir da fissão do anel B (HIDALGO et al., 2012).

Após a passagem pelas primeiras porções do TGI, quantidades substanciais de polifenóis podem chegar ao cólon, passando por posterior catabolismo da microbiota, a qual possui uma elevada capacidade catabólica. Além disso, a ação microbiana provoca maior degradação e transformação de polifenóis que contribuem para a sua absorção e subsequentes benefícios para a saúde (SADEGHI EKBATAN et al., 2016). O padrão de glicosilação da rutina e das antocianinas (com resíduos de rutinosídeo), não pode ser hidrolisado pelas glicosidases endógenas e nem ser transportado pela SGLT1, o que faz com que estes compostos se tornem indisponíveis para a absorção no intestino delgado (DEL RIO et al., 2013).

No processo de digestão *in vitro*, posteriormente às deglicosilações e às fissões dos anéis B, subsequentes reações de desmetilação, descarboxilação, metilação, hidrogenação, β-oxidação, etc, possibilitadas pelo metabolismo bacteriano, resultam na formação de diferentes ácidos fenólicos a partir dos substratos (compostos fenólicos inicialmente presentes no extrato) (MARÍN et al., 2015).

Algumas das bactérias que podem estar envolvidas no metabolismo humano das antocianinas incluem as dos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* e *Eggertheilla*. Algumas enzimas bacterianas

envolvidas são α-L-ramnosidase, β-D-glucosidase, catecol-*O*-metiltransferase, e arilo-sulfotransferase, e a enzima lactase florizina hidrolase humana poderia também participar (FORESTER; WATERHOUSE, 2008).

Simulações da digestão *in vitro* realizadas apenas com as porções gástrica e pancreática, mostraram que os flavonoides provenientes de maçãs (BOUAYED; HOFFMANN; BOHN, 2011) e as antocianinas de batata-doce roxa (KUBOW et al., 2016), também se mantiveram estáveis durante a digestão gástrica, sendo observada uma redução dos compostos apenas após a digestão pancreática, o que indica que as antocianinas são relativamente resistentes à digestão ácida do estômago (LIU et al., 2014).

Foi observado ainda que as antocianinas presentes em morangos (KOSINSKA-CAGNAZZO et al., 2015), repolho roxo (MCDOUGALL et al., 2007) e mirtilos (LIU et al., 2014) foram degradadas durante o processo digestivo (20%, 25% e 42% respectivamente), e este efeito foi atribuído à mudança de pH necessária à digestão pancreática. Além disso, as antocianinas em sua forma acilada apresentaram maior estabilidade quando comparas às não-aciladas (MCDOUGALL et al., 2007).

Diferenças na estabilidade dos diferentes tipos de antocianidinas também foram observadas, tendo sido descrita a seguinte ordem crescente de estabilidade: delfinidina, petunidina e malvidina. Essa característica pode ser explicada pelo número de grupos hidroxilas e metil das agliconas, sendo as metilações associadas à maior estabilidade em comparação com as hidroxilações (LIU et al., 2014).

Ao contrário do que foi encontrado nos estudos anteriormente citados, durante o processo de digestão do extrato de tomate roxo transgênico, em modelo estático, foi observada uma redução significativa dos compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, tanto após a etapa gástrica quanto pancreática. Os compostos fenólicos e as antocianinas foram reduzidos em 37% e 39%, respectivamente. Os ácidos clorogênico e *p*-coumárico e a rutina foram totalmente ou consideravelmente degradados, com o aparecimento concomitante de cerca de 9 compostos após a digestão. Em contrapartida, as três antocianinas majoritárias no tomate roxo transgênico: petunidina-3-*O*-cafeoil-rutinosideo-5-*O*-glucosideo, petunidina-3-*O*-(*p*-coumaroil)-rutinosideo-5-*O*-glucosideo e malvidina-3-*O*-(*p*-

coumaroil)-rutinosideo-5-*O*-glucosideo, tiveram suas concentrações reduzidas, sem o aparecimento de produtos de degradação (LI et al., 2014).

Simulações da digestão e fermentação *in vitro* de compostos fenólicos e antocianinas de mirtilos selvagens apresentaram uma redução de 49% e 15%, respectivamente, durante as duas primeiras etapas da digestão (gástrica e pancreática). Durante a fermentação, os flavonoides presentes no extrato foram degradados com subsequente formação dos ácidos siríngico, cinâmico, cafeico e protocatecuico. Apenas as antocianinas aciladas foram detectadas até o final do processo digestivo (24 horas) (CORREA-BETANZO et al., 2014). Por outro lado, a maior parte das antocianinas presentes em uvas desapareceu após 5h de fermentação, com o concomitante aparecimento dos ácidos gálico, siríngico e *p*-coumárico (HIDALGO et al., 2012). Ainda, a digestão *in vitro* do vinho tinto (CUEVA et al., 2015) e do suco de uva (DORSTEN et al., 2012), os quais possuem elevado teor de polifenois, principalmente flavan-3-ois, antocianinas e ácidos fenólicos, resultou na produção de catabólitos típicos dos compostos fenólicos presentes em uvas, tais como: ácidos gálico, protocatecuico, 3-*O*-metilgálico, 4-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxifenilpropiônico, vanílico, siríngico e salicílico. O ácido 3-*O*-metilgálico foi também encontrado como produto da fermentação microbiana de uvas, uma das raras fontes alimentares da petunidina (FORESTER et al., 2008).

A fermentação *in vitro* de compostos isolados como rutina, quercetina e ácidos fenólicos (clorogênico, cafeico e ferúlico) foi sucedida por uma rápida degradação nos primeiros 30 minutos, com o aparecimento crescente de catabólitos produzidos pela microbiota (PARKAR; TROWER; STEVENSON, 2013). O metabolismo bacteriano do ácido clorogênico causa a hidrólise da ligação éster entre os ácidos cafeico e quínico, com subsequente aparecimento do ácido 3-(3-hidroxifenil)propiônico. O ácido cafeico pode ainda ser *O*-metilado e biotransformado em ácido ferúlico (SADEGHI EKBATAN et al., 2016). Ao término do processo fermentativo foram detectados 13 compostos resultantes da degradação microbiana, uma vez que não estavam presentes nas porções referentes aos reatores de digestão gástrica e pancreática, todavia alguns desses compostos não foram atribuídos ao metabolismo bacteriano sobre a amostra com compostos fenólicos (SADEGHI EKBATAN et al., 2016).

O principal ácido fenólico formado a partir da fermentação *in vitro* da casca de tomate roxo foi o ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (ácido homovanílico). Este produto de fermentação deve ter sido obtido a partir da metilação do ácido 3,4-diidroxifenilacético durante o processo de fermentação da rutina. O ácido homovanilico também foi encontrado anteriormente em estudos *in vitro* (GAO et al., 2006; SERRA et al., 2012).

Diversos estudos têm mostrado a importância dos compostos fenólicos formados a partir do catabolismo da microbiota intestinal nos efeitos benéficos sistêmicos e locais. O ácido 3-*O*-metilgálico mostrou-se capaz de reduzir a proliferação celular em células Caco-2 em baixa concentração e de forma mais eficaz do que as antocianinas, podendo assim oferecer proteção contra o câncer de colón após sua formação (FORESTER; WATERHOUSE, 2010). Ainda, o ácido gálico também apresentou efeito anti-carcinogênico devido à capacidade de suprimir a viabilidade celular, proliferação, invasão e angiogênese nas linhagens celulares de glioma humano (PAOLINI et al., 2015). Os ácidos siríngico e vanílico mostraram efeito hepatoprotetor através da supressão da inflamação hepática em camundongos (ITOH et al., 2010).

6. CONCLUSÕES

A introgressão dos alelos reguladores da biossíntese de antocianinas (*Aft, atv, hp2*) resultou na expressão de antocianinas, principalmente na casca do fruto, mas também apresentou aumento significativo nos teores de vitamina C e de outros flavonoides, bem como na capacidade antioxidante, em comparação aos frutos laranja e o *background*. Assim, o tomate roxo pode ser uma fonte de antocianinas, com teores similares quando comparada a outros frutos fontes da dieta.

Durante a passagem pelo trato gastrointestinal, os flavonoides e ácidos fenólicos presentes na casca do tomate roxo, os quais não são efetivamente absorvidos no intestino, sofrem intensa degradação pela microbiota intestinal, dando origem a catabólitos com potencial benefício à saúde.

REFERÊNCIAS

ALQURASHI, R. M.; ALARIFI, S. N.; WALTON, G. E.; COSTABILE, A. F.; ROWLAND, I. R.; COMMANE, D. M. In vitro approaches to assess the effects of açai (Euterpe oleracea) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota. **Food Chemistry**, v. 234, p. 190–198, 2017.

AMAROWICZ, R.; CARLE, R.; DONGOWSKI, G.; DURAZZO, A.; GALENSA, R.; KAMMERER, D.; MAIANI, G.; PISKULA, M. K. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. SUPPL. 2, p. 151–183, 2009.

AMIĆ, A.; LUČIĆ, B.; STEPANIĆ, V.; MARKOVIĆ, Z.; MARKOVIĆ, S.; DIMITRIĆ MARKOVIĆ, J. M.; AMIĆ, D. Free radical scavenging potency of quercetin catecholic colonic metabolites: Thermodynamics of 2H+/2e− processes. **Food Chemistry**, v. 218, n. January, p. 144–151, 2017.

BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1085–1094, 2007.

BALDWIN, E. a.; GOODNER, K.; PLOTTO, a. Interaction of volatiles, sugars, and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, 2008.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; PINELA, J.; CARVALHO, A. M.; BUELGA, C. S.; FERREIRA, I. C. F. R. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Four Tomato (Lycopersicon esculentum L.) Farmers' Varieties in Northeastern Portugal Homegardens. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 229–234, 2012.

BAZZOCCO, S.; MATTILA, I.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C.; AURA, A. M. Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 8, p. 442–452, 2008.

BECKLES, D. M. Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (Solanum lycopersicum L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 63, n. 1, p. 129–140, 2012.

BELL, L.; SPADAFORA, N. D.; MÜLLER, C. T.; WAGSTAFF, C.; ROGERS, H. J. Use of TD-GC-TOF-MS to assess volatile composition during post-harvest storage in seven accessions of rocket salad (Eruca sativa). **Food Chemistry**, v. 194, p. 626–636, 2016.

BIALONSKA, D.; RAMNANI, P.; KASIMSETTY, S. G.; MUNTHA, K. R.; GIBSON, G. R.; FERREIRA, D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2–3, p. 175–182, 2010.

BIANCHI, F.; ROSSI, E. A.; SAKAMOTO, I. K.; ADORNO, M. A. T.; VAN DE WIELE, T.; SIVIERI, K. Beneficial effects of fermented vegetal beverages on human gastrointestinal microbial ecosystem in a simulator. **Food Research International**, v. 64, p. 43–52, 2014.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins

and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 14–21, 2011.

BRAUNE, A.; BUNZEL, M.; YONEKURA, R.; BLAUT, M. Conversion of dehydrodiferulic acids by human intestinal microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3356–3362, 2009.

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

CAPANOGLU, E.; BEEKWILDER, J.; MATROS, A.; BOYACIOGLU, D.; HALL, R. D.; MOCK, H. P. Correlation of Rutin Accumulation with 3-O-Glucosyl Transferase and Phenylalanine Ammonia-lyase Activities During the Ripening of Tomato Fruit. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 371–376, 2012.

CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013.

CERMAK, R. Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 17–35, 2008.

CHARRON, C. S.; CLEVIDENCE, B. a.; BRITZ, S. J.; NOVOTNY, J. a. Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (Brassica oleracea L. Var. capitata). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5354–5362, 2007.

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 of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1226–1230, 2009.

CHOI, S. H.; KIM, D. S.; KOZUKUE, N.; KIM, H. J.; NISHITANI, Y.; MIZUNO, M.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Protein, free amino acid, phenolic, β-carotene, and lycopene content, and antioxidative and cancer cell inhibitory effects of 12 greenhouse-grown commercial cherry tomato varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, n. 2, p. 115–127, 2014.

CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (Musa acuminata L.: cvs Mysore and Nanicão). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 26–31, 2008.

CORREA-BETANZO, J.; ALLEN-VERCOE, E.; MCDONALD, J.; SCHROETER, K.; CORREDIG, M.; PALIYATH, G. Stability and biological activity of wild blueberry (Vaccinium angustifolium) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 165, n. September, p. 522–531, 2014.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

CUEVA, C.; JIM??NEZ-GIR??N, a.; MU??OZ-GONZ??LEZ, I.; ESTEBAN-FERN??NDEZ,

a.; GIL-S??NCHEZ, I.; DUE??AS, M.; MART??N-??LVAREZ, P. J.; POZO-BAY??N, M. a.; BARTOLOM??, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Application of a new Dynamic Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of red wine in colonic metabolism. **Food Research International**, v. 72, p. 149–159, 2015.

D 'EVOLI, L.; LOMBARDI-BOCCIA, G.; LUCARINI, M. Influence of Heat Treatments on Carotenoid Content of Cherry Tomatoes. **Foods**, v. 2, p. 352–363, 2013.

DE 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**, v. 171, n. 13, p. 3268–3282, 2014.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–92, 2013.

DEL RIO, D.; STALMACH, A.; CALANI, L.; CROZIER, A. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. **Nutrients**, v. 2, n. 8, p. 820–833, 2010.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. a.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337–353, 1999.

DORSTEN, F. a Van; PETERS, S.; GROSS, G.; ROLDAN, V. G.; KLINKENBERG, M.; VOS, R. C. H. De; VAUGHAN, E.; VAN, J. P. M.; POSSEMIERS, S.; WIELE, T. Van De; JACOBS, D. M. Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent. 2012.

DUDA-CHODAK, A.; TARKO, T.; SATORA, P.; SROKA, P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. **European Journal of Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 325–341, 2015.

DUEÑAS, M.; CUEVA, C.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; SANTOS-BUELGA, C.; MORENO-ARRIBAS, M.; BARTOLOMÉ, B. Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. **Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 1–21, 2015.

EKICI, L.; SIMSEK, Z.; OZTURK, I.; SAGDIC, O.; YETIM, H. Effects of Temperature, Time, and pH on the Stability of Anthocyanin Extracts: Prediction of Total Anthocyanin Content Using Nonlinear Models. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 1328–1336, 2014.

EL HADI, M. A. M.; ZHANG, F. J.; WU, F. F.; ZHOU, C. H.; TAO, J. Advances in fruit aroma volatile research. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8200–8229, 2013.

FARIA, A.; FERNANDES, I.; MATEUS, N. Interplay between Anthocyanins and Gut Microbiota.pdf. 2014.

FELICIANO, R. P.; ISTAS, G.; HEISS, C.; RODRIGUEZ-MATEOS, A. Plasma and urinary phenolic profiles after acute and repetitive intake of wild blueberry. **Molecules**, v. 21, n. 9, 2016.

FORESTER, S. C.; WATERHOUSE, A. L. Identification of cabernet sauvignon

anthocyanin gut microflora metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9299–9304, 2008.

FORESTER, S. C.; WATERHOUSE, A. L. Metabolites Are Key to Understanding Health. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1824S–1831S, 2009.

FORESTER, S. C.; WATERHOUSE, A. L. Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5320–5327, 2010.

FRUSCIANTE, L.; CARLI, P.; ERCOLANO, M. R.; PERNICE, R.; DI MATTEO, A.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Antioxidant nutritional quality of tomato. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 5, p. 609–617, 2007.

GAO, K.; XU, A.; KRUL, C.; VENEMA, K.; LIU, Y.; NIU, Y.; LU, J.; BENSOUSSAN, L.; SEERAM, N. P.; HEBER, D.; HENNING, S. M. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. **J Nutr**, v. 136, n. 1, p. 52–57, 2006.

GAO, L.; ZHAO, W.; QU, H.; WANG, Q.; ZHAO, L. The yellow-fruited tomato 1 (yft1) mutant has altered fruit carotenoid accumulation and reduced ethylene production as a result of a genetic lesion in ETHYLENE INSENSITIVE2. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 4, p. 717–728, 2016.

GARGOURI, O. D.; GARGOURI, B.; TRABELSI, S. K.; BOUAZIZ, M.; ABDELHÉDI, R. Synthesis of 3-O-methylgallic acid a powerful antioxidant by electrochemical conversion of syringic acid. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3643–3649, 2013.

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

GOMES, B. L. **Ethylene and auxin: new insights into the hormonal regulation of tomato fruit ripening**. São Paulo, 2016. 84p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmaceuticas - Universidade de São Paulo.

GUERGOLETTO, K. B.; COSTABILE, A.; FLORES, G.; GARCIA, S.; GIBSON, G. R. In vitro fermentation of juçara pulp (Euterpe edulis) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 196, p. 251–258, 2016.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; GOÑI, I. Dietary polyphenols and human gut microbiota: A review. **Food Reviews International**, v. 27, n. 2, p. 154–169, 2011.

HIDALGO, M.; ORUNA-CONCHA, M. J.; WALTON, G. E.; KALLITHRAKA, S.; SPENCER, J. P. E.; GIBSON, G. R.; PASCUAL-TERESA, S. De. Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Micro fl ora and Their In fl uence on Gut Bacterial Growth. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 3882–3890, 2012.

ITOH, A.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; WATARI, A.; KOBAYASHI, M.; TAMESADA, M.; YAGI, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 6, p.

983–987, 2010.

JONES, C. M.; MES, P.; MYERS, J. R. Characterization and Inheritance of the Anthocyanin fruit (Aft) Tomato. **Journal of Heredity**, v. 94, n. 6, p. 449–456, 2003.

KAMILOGLU, S.; CAPANOGLU, E.; GROOTAERT, C.; VAN CAMP, J. Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells???A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 21555–21574, 2015.

KHANAL, R.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Urinary excretion of phenolic acids in rats fed cranberry, blueberry, or black raspberry powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 3987–3996, 2014.

KONISHI, Y. Transepithelial transport of microbial metabolites of quercetin in intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 601–607, 2005.

KOSI??SKA-CAGNAZZO, A.; DIERING, S.; PRIM, D.; ANDLAUER, W. Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in in vitro digestion/Caco-2 absorption model. **Food Chemistry**, v. 170, p. 288–294, 2015.

KUBOW, S.; ISKANDAR, M. M.; SABALLY, K.; AZADI, B.; SADEGHI EKBATAN, S.; KUMARATHASAN, P.; DAS, D. D.; PRAKASH, S.; BURGOS, G.; ZUM FELDE, T. Biotransformation of anthocyanins from two purple-fleshed sweet potato accessions in a dynamic gastrointestinal system. **Food Chemistry**, v. 192, p. 171–177, 2016.

LADO, J.; ALÓS, E.; RODRIGO, M. J.; ZACARÍAS, L. Light avoidance reduces ascorbic acid accumulation in the peel of Citrus fruit. **Plant Science**, v. 231, p. 138–147, 2015.

LEE, E. R.; KANG, G. H.; CHO, S. G. Effect of flavonoids on human health: old subjects but new challenges. **Recent patents on biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 139–150, 2007.

LEE, J.; EISELE, T.; GIUSTI, M. M.; HOFSOMMER, H.; KOSWIG, S.; KRUEGER, D. A; KUPINA, S.; MARTIN, S. K.; MARTINSEN, B. K.; MILLER, T. C.; PAQUETTE, F.; RYABKOVA, A; SKREDE, G.; TRENN, U.; WIGHTMAN, J. D. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. **Journal of AOAC International,** v. 88, n. 5, p. 1269–1278, 2005.

LENUCCI, M.S.; LEUCCI, M.R.; PIRO, G.; DALESSANDRO, G.. Variability in the content of soluble sugars and cell wall polysaccharides in red-ripe cherry and high-pigment tomato cultivars**. Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1837–1844, 2008.

LEWINSOHN, E.; SITRIT, Y.; BAR, E.; AZULAY, Y.; MEIR, A.; ZAMIR, D.; TADMOR, Y. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3142–3148, 2005.

LILA, M. A.; BURTON-FREEMAN, B.; GRACE, M.; KALT, W. Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 375–393, 2016.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of**

Food Science, v. 78, n. SUPPL.1, 2013.

LIU, Y.; ZHANG, D.; WU, Y.; WANG, D.; WEI, Y.; WU, J.; JI, B. Stability and absorption of anthocyanins from blueberries subjected to a simulated digestion process. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 65, n. 4, p. 440–448, 2014.

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.** São Paulo, 2015. 101 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BRAND-WILLIANS, W.; CUVELICI, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebenswittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

MARÍN, L.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, n. February, 2015a.

MARÍN, L.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015b.

MARTÍ, R.; ROSELLÓ, S.; CEBOLLA-CORNEJO, J. Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. **Cancers**, v. 8, n. 6, p. 1–28, 2016.

MARTIN, C.; BUTELLI, E.; PETRONI, K.; TONELLI, C. How can research on plants contribute to promoting human health? **The Plant cell**, v. 23, n. 5, p. 1685–1699, 2011.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; PROVAN, G.; CHESSON, A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (Lycopersicum esculentum). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 3, p. 323–330, 2002.

MCDOUGALL, G. J.; FYFFE, S.; DOBSON, P.; STEWART, D. Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1285–1294, 2007.

MENEZES, E. W.; DAN, M. C. T.; CARDENETTE, G. H. L.; GO??I, I.; BELLO-P??REZ, L. A.; LAJOLO, F. M. In Vitro Colonic Fermentation and Glycemic Response of Different Kinds of Unripe Banana Flour. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 379–385, 2010.

MES, P. J.; BOCHES, P.; MYERS, J. R.; DURST, R. Characterization of Tomatoes Expressing Anthocyanin in the Fruit. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 133, n. 2, p. 262–269, 2008.

MOHAN, V.; PANDEY, A.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Neofunctionalization of chromoplast specific lycopene beta cyclase gene (CYC-B) in tomato clade. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–22, 2016.

MOSELE, J. I.; GOSALBES, M. J.; MACI??, A.; RUBIO, L.; VELAZQUEZ-CASTELLANOS, J. F.; JIMENEZ HERNANDEZ, N.; MOYA, A.; LATORRE, A.; MOTILVA, M. J. Effect of daily intake of pomegranate juice on fecal microbiota and feces metabolites from healthy volunteers. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 10, p.

1942–1953, 2015.

MOSELE, J. I.; MACIO, A.; MOTILVA, M. J. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17429–17468, 2015.

MOSELE, J. I.; MACIÀ, A.; MOTILVA, M.-J. Understanding of human metabolic pathways of different sub-classes of phenols from Arbutus unedo fruit after an acute intake. **Food Funct.**, v. 7, n. 3, p. 1700–1710, 2016.

MUSTILLI, A. C.; FENZI, F.; CILIENTO, R.; ALFANO, F.; BOWLER, C. Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. **The Plant cell**, v. 11, n. 2, p. 145–157, 1999.

OZDAL, T.; SELA, D. a.; XIAO, J.; BOYACIOGLU, D.; CHEN, F.; CAPANOGLU, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–36, 2016.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n. 5, p. 270–8, 2009.

PAOLINI, A.; CURTI, V.; PASI, F.; MAZZINI, G.; NANO, R.; CAPELLI, E. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 4, p. 1491–1497, 2015.

PARKAR, S. G.; TROWER, T. M.; STEVENSON, D. E. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. **Anaerobe**, v. 23, p. 12–19, 2013.

PASTERNAK, T.; POTTERS, G.; CAUBERGS, R.; JANSEN, M. a K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 1991–2001, 2005.

POJER, E.; MATTIVI, F.; JOHNSON, D.; STOCKLEY, C. S. The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483–508, 2013.

PRIOR, R. L.; WU, X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. **Free Radic Res**, v. 40, n. 10, p. 1014–1028, 2006.

QIN, G.; WANG, Y.; CAO, B.; WANG, W.; TIAN, S. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. **Plant Journal**, v. 70, n. 2, p. 243–255, 2012.

RAIOLA, A.; RIGANO, M. M.; CALAFIORE, R.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A. Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

RAMBLA, J. L.; TIKUNOV, Y. M.; MONFORTE, A. J.; BOVY, A. G.; GRANELL, A. The expanded tomato fruit volatile landscape. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 16, p. 4613–4623, 2014.

RIBEIRO, L. F.; RIBANI, R. H.; FRANCISCO, T. M. G.; SOARES, A. A.; PONTAROLO, R.;

HAMINIUK, C. W. I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (Vitis vinifera and Vitis labrusca) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1007, p. 72–80, 2015.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **J Agric Food Chem.** v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

VISKUPIČOVÁ, J.; ONDREJOVIČ, M.; ŠTURDÍK, E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 47, n. 4, p. 151-162, 2008.

RODRIGUES, E.; POERNER, N.; ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; MENDES, C. R.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 4, p. 911–917, 2011.

RODRIGUEZ-MATEOS, A.; FELICIANO, R. P.; CIFUENTES-GOMEZ, T.; SPENCER, J. P. E. Bioavailability of wild blueberry (poly)phenols at different levels of intake. **Journal of Berry Research**, v. 6, n. 2, p. 137–148, 2016.

SADEGHI EKBATAN, S.; SLENO, L.; SABALLY, K.; KHAIRALLAH, J.; AZADI, B.; RODES, L.; PRAKASH, S.; DONNELLY, D. J.; KUBOW, S. Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. **Food Chemistry**, v. 204, p. 453–462, 2016.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, n. August, p. 735–750, 2015.

SANCHEZ, V.; BAEZA, R.; CHIRIFE, J. Comparison of monomeric anthocyanins and colour stability of fresh, concentrate and freeze-dried encapsulated cherry juice stored at 38°C. **Journal of Berry Research**, v. 5, n. 4, p. 243–251, 2015.

SERINO, S.; GOMEZ, L.; COSTAGLIOLA, G. U. Y.; GAUTIER, H. HPLC assay of tomato carotenoids: Validation of a rapid microextraction technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8753–8760, 2009.

SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 712–732, 2008.

SERRA, A.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; REGUANT, J.; ORTEGA, N.; MOTILVA, M. J. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 383–393, 2012.

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

SHI, J.; KAKUDA, Y.; YEUNG, D. Antioxidative properties of lycopene and other carotenoids from tomatoes: synergistic effects. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 21, n. 1–4, p. 203–10, 2004.

SINGH, R. **Relationship Between Flavonoid Structure And Phase-II Metabolism**. Houston, 2010. 401p. Tese de Doutorado - College of Pharmacy - The

University of Houston.

SLIMESTADA, R.; VERHEULB, M. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (lycopersicon esculentum mill.) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 8, p. 1255–1270, 2009.

SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VERHEUL, M.J. The flavonoids of tomatoes. **J Agric Food Chem.** v. 56, n. 7, p. 2436-2441, 2008.

SPORN, M. B.; LIBY, K. T. Is lycopene an effective agent for preventing prostate cancer? **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 5, p. 384–386, 2013.

STEFEK, M. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. **Interdisciplinary toxicology**, v. 4, n. 2, p. 69–77, 2011.

SU, X.; XU, J.; RHODES, D.; SHEN, Y.; SONG, W.; KATZ, B.; TOMICH, J.; WANG, W. Identification and quantification of anthocyanins in transgenic purple tomato. **Food Chemistry**, v. 202, p. 184–188, 2016.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of Prunus domestica I.: the quantitative analysis of phenolic constituent. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TERCI, D. B. L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. Campinas, 2004, 224p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas.

TIEMAN, D.; BLISS, P.; MCINTYRE, L. M.; BLANDON-UBEDA, A.; BIES, D.; ODABASI, A. Z.; RODRÍGUEZ, G. R.; VAN DER KNAAP, E.; TAYLOR, M. G.; GOULET, C.; MAGEROY, M. H.; SNYDER, D. J.; COLQUHOUN, T.; MOSKOWITZ, H.; CLARK, D. G.; SIMS, C.; BARTOSHUK, L.; KLEE, H. J. The chemical interactions underlying tomato flavor preferences. **Current Biology**, v. 22, n. 11, p. 1035–1039, 2012.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; SELMA, M. V.; ESPÍN, J. C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 6, p. 471–476, 2016.

TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, p. 635–641, 2012.

TOOR, R. K.; SAVAGE, G. P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. **Food Research International**, v. 38, n. 5, p. 487–494, 2005.

VAN DORSTEN, F. a; PETERS, S.; GROSS, G.; ROLDAN, V. G.; KLINKENBERG, M.; VOS, R. C. H. De; VAUGHAN, E.; VAN, J. P. M.; POSSEMIERS, S.; WIELE, T. Van De; JACOBS, D. M. Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11331–11342, 2012.

VISSIENNON, C.; NIEBER, K.; KELBER, O.; BUTTERWECK, V. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin - are they prodrugs? **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 7, p. 733–740, 2012.

VISKUPIČOVÁ, J.; ONDREJOVIČ, M.; ŠTURDÍK, E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 47, n. 4, p. 151-162, 2008.

WANG, S.; CHU, Z.; REN, M.; JIA, R.; ZHAO, C.; FEI, D.; SU, H.; FAN, X.; ZHANG, X.; LI, Y.; WANG, Y.; DING, X. Identification of anthocyanin composition and functional analysis of an anthocyanin activator in solanum nigrum fruits. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 1–14, 2017.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 243S–255S, 2005.

WU, T.; LV, H.; WANG, F.; WANG, Y. Characterization of Polyphenols from Lycium ruthenicum Fruit by UPLC-Q-TOF/MSE and Their Antioxidant Activity in Caco-2 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 2280–2288, 2016.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4069–4075, 2006.

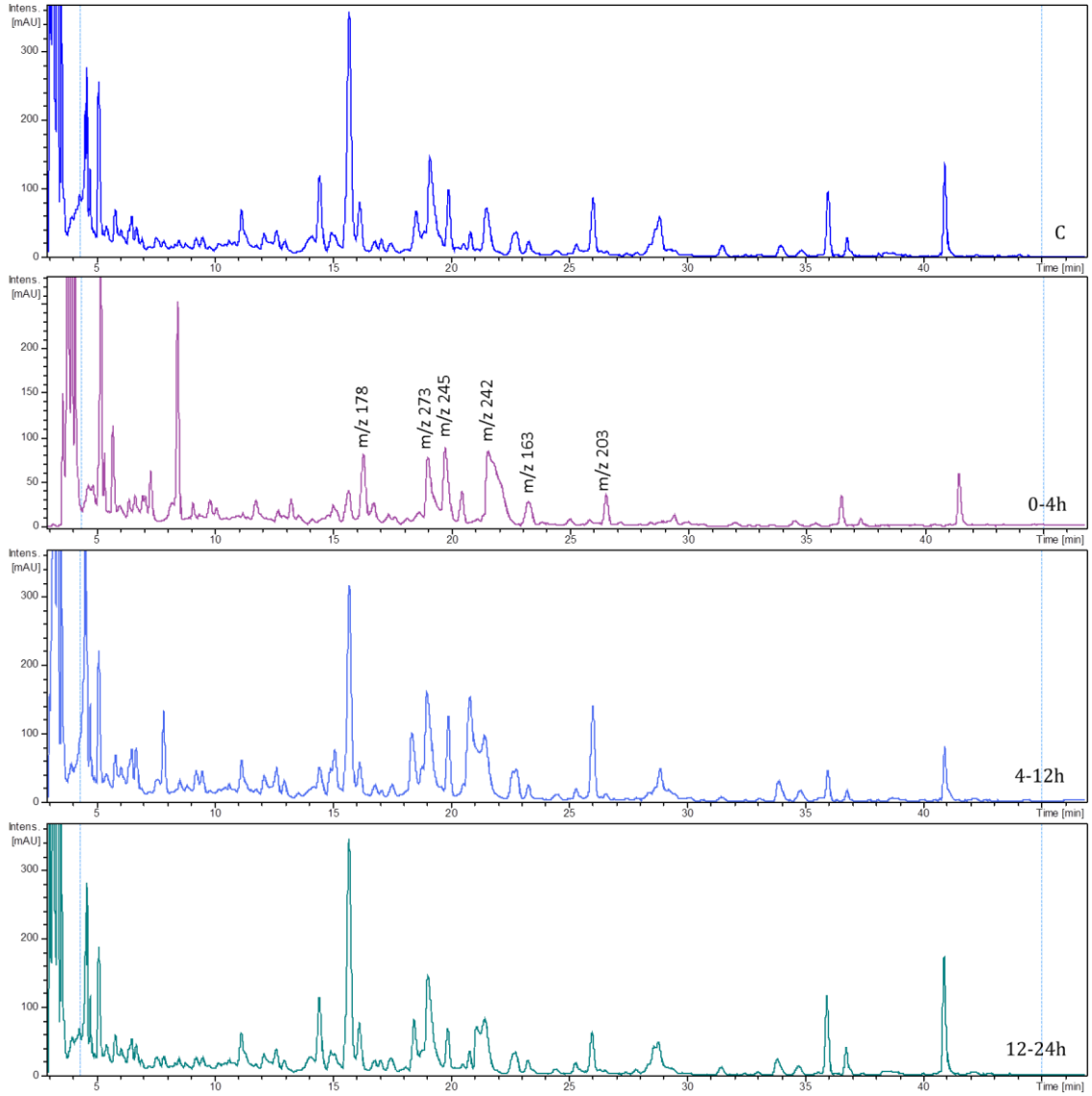
XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current protocols in bioinformatics / editoral board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]**, v. 55, n. September, p. 14.10.1-14.10.91, 2016.

YUAN, B.; IMAI, M.; KIKUCHI, H.; FUKUSHIMA, S.; HAZAMA, S.; AKAIKE, T.; YOSHINO, Y.; OHYAMA, K. Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds , Alone or in Combination with , Anticancer Drugs Against Cancer Cells : Potential Future Application of the Combinatory Therapy. **Apoptosis**, p. 8–10, 2012.

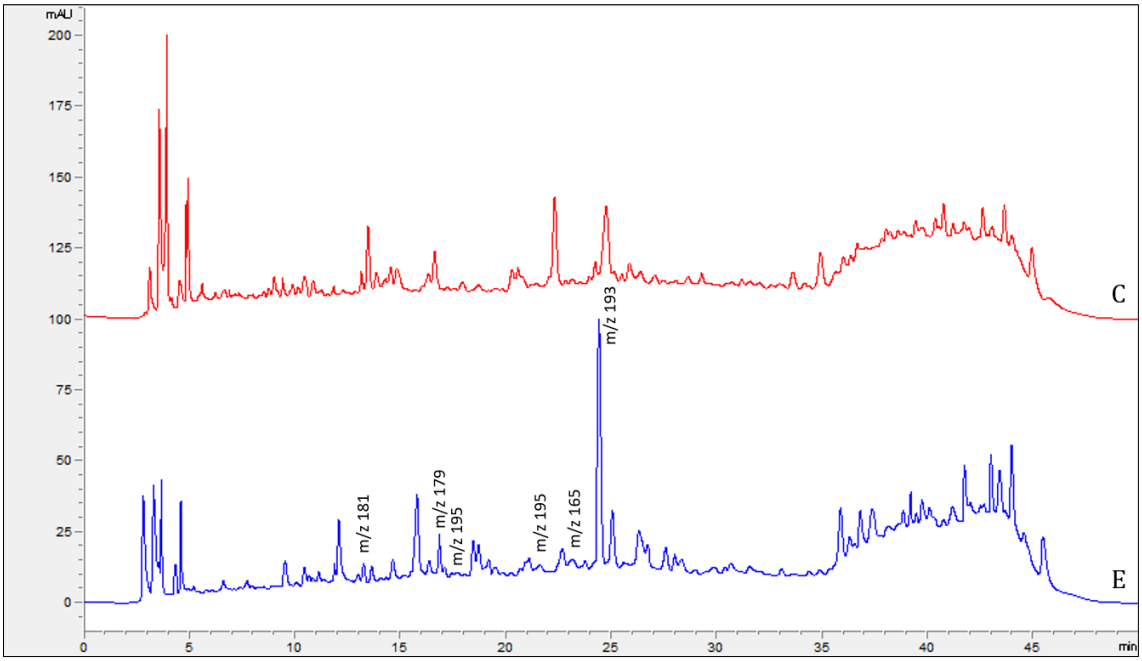
ZAMORA-ROS, R.; ACHAINTRE, D.; ROTHWELL, J. A.; RINALDI, S.; ASSI, N.; FERRARI, P.; LEITZMANN, M.; BOUTRON-RUAULT, M.-C.; FAGHERAZZI, G.; AUFFRET, A.; KÜHN, T.; KATZKE, V.; BOEING, H.; TRICHOPOULOU, A.; NASKA, A.; VASILOPOULOU, E.; PALLI, D.; GRIONI, S.; MATTIELLO, A.; TUMINO, R.; RICCERI, F.; SLIMANI, N.; ROMIEU, I.; SCALBERT, A. Urinary excretions of 34 dietary polyphenols and their associations with lifestyle factors in the EPIC cohort study. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26905, 2016.

ZHAO, Y.; WANG, J.; BALLEVRE, O.; LUO, H.; ZHANG, W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. **Hypertension Research**, v. 35, n. 4, p. 370–374, 2012.

APÊNDICES



Apêndice A. Cromatogramas obtidos por LC/QTOF/MS (λ=270 nm) dos ácidos fenólicos detectados na urina dos ratos sem e com ingestão do extrato da casca do tomate roxo. Controle (C), urina nos diferentes tempos de coleta (0-4h, 4-12h e 12-24h). As identificações dos picos estão descritas na **Tabela 7**.



Apêndice B. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (λ=270 nm) dos ácidos fenólicos nas fezes dos ratos sem e com ingestão do extrato da casca do tomate roxo. Controle (C), Experimento (E). As identificações dos picos estão descritas na **Tabela 7**.

ANEXOS

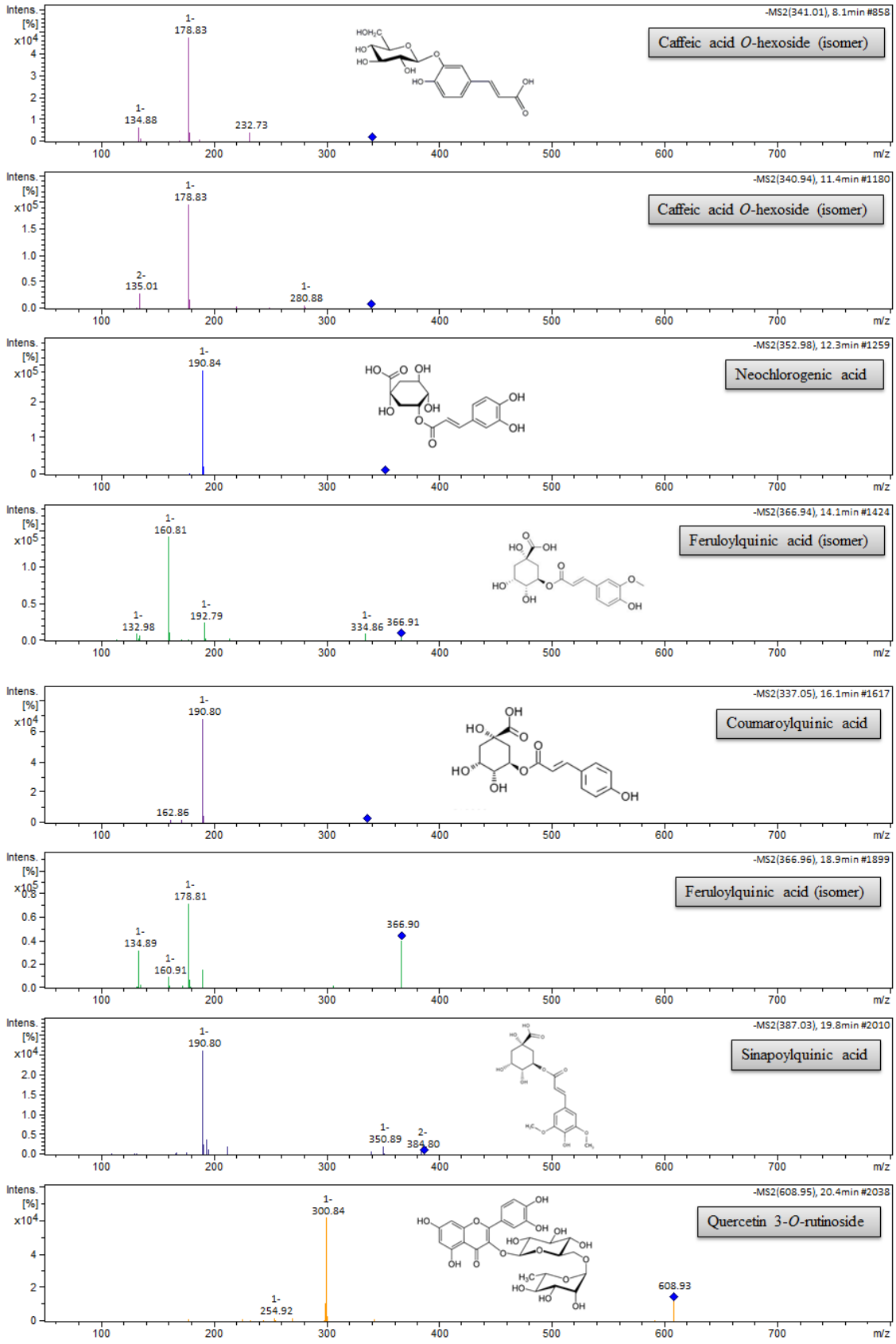
Anexo I – Informações para os membros de bancas julgadoras de mestrado/doutorado.

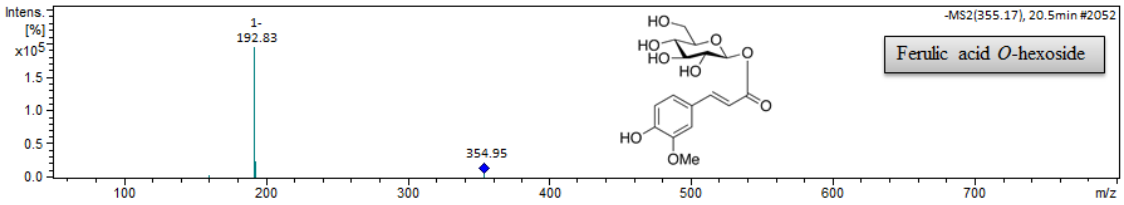
Anexo II – Parecer da comissão de ética no uso de animais.

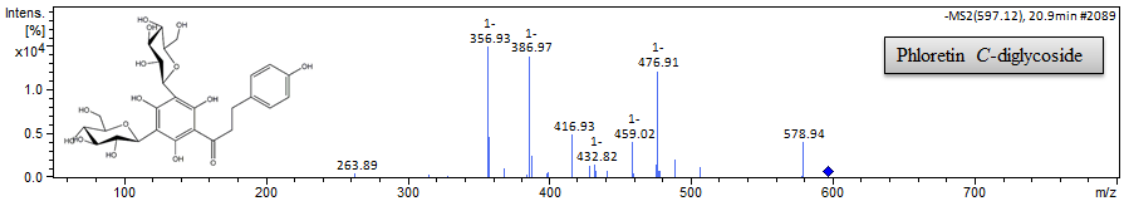
Anexo III – Ficha do aluno.

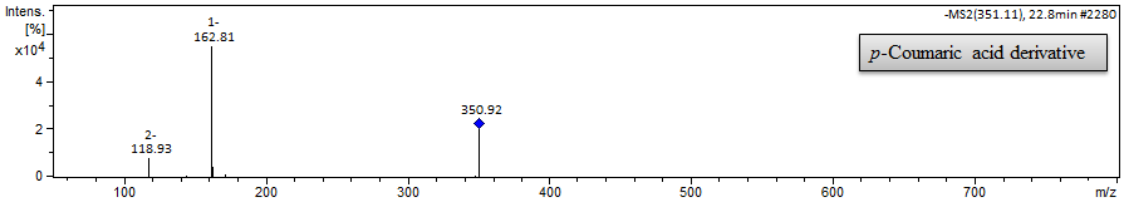
Anexo IV – Currículo lattes.

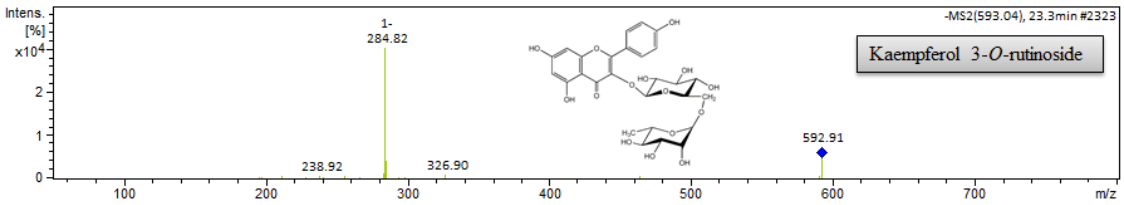
Apêndice C. Espectro de massas de flavonoide e ácidos fenólicos de tomates vermelho, laranja e roxo

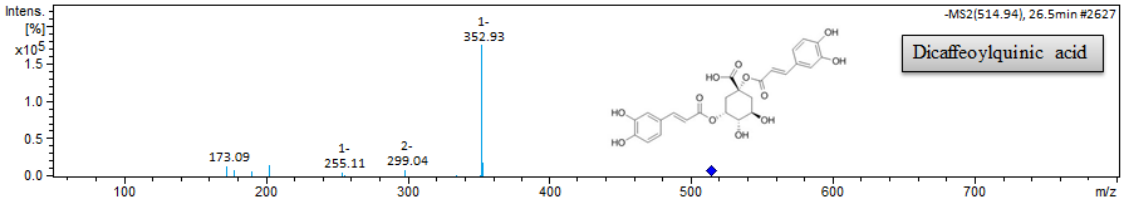


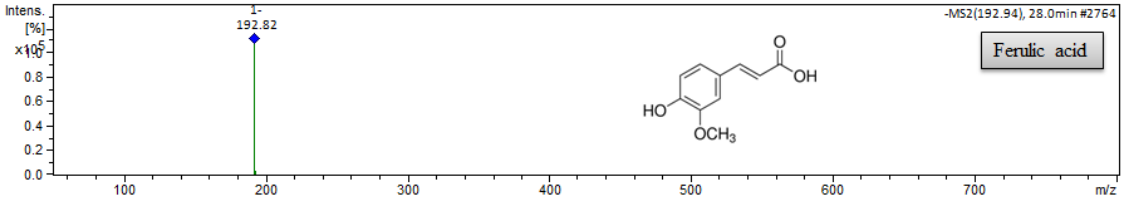

-MS2(355.17), 20.5min #2052
Ferulic acid O-hexoside
1-
192.83
354.95
HO
HO
HO
HO
O
O
HO
OMe
Intens.
[%]
x10^5
m/z

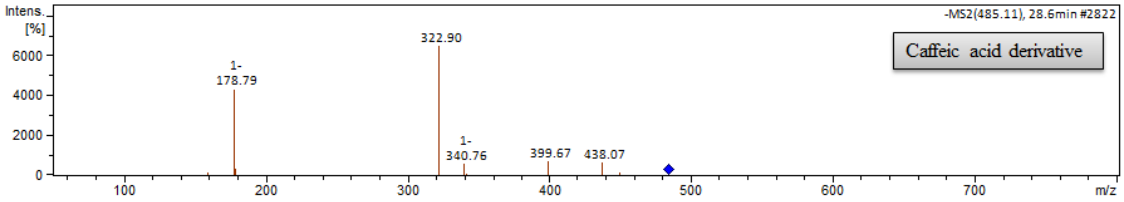

-MS2(597.12), 20.9min #2089
Phloretin C-diglycoside
1-
356.93
1-
386.97
1-
476.91
416.93
1-
459.02
1-
432.82
578.94
263.89
Intens.
[%]
x10^4
m/z

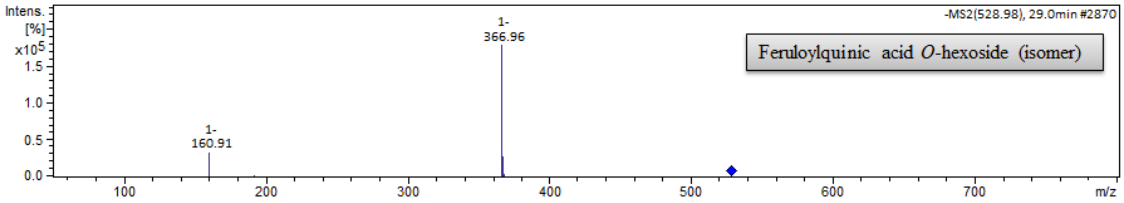

-MS2(351.11), 22.8min #2280
p-Coumaric acid derivative
1-
162.81
350.92
2-
118.93
Intens.
[%]
x10^4
m/z

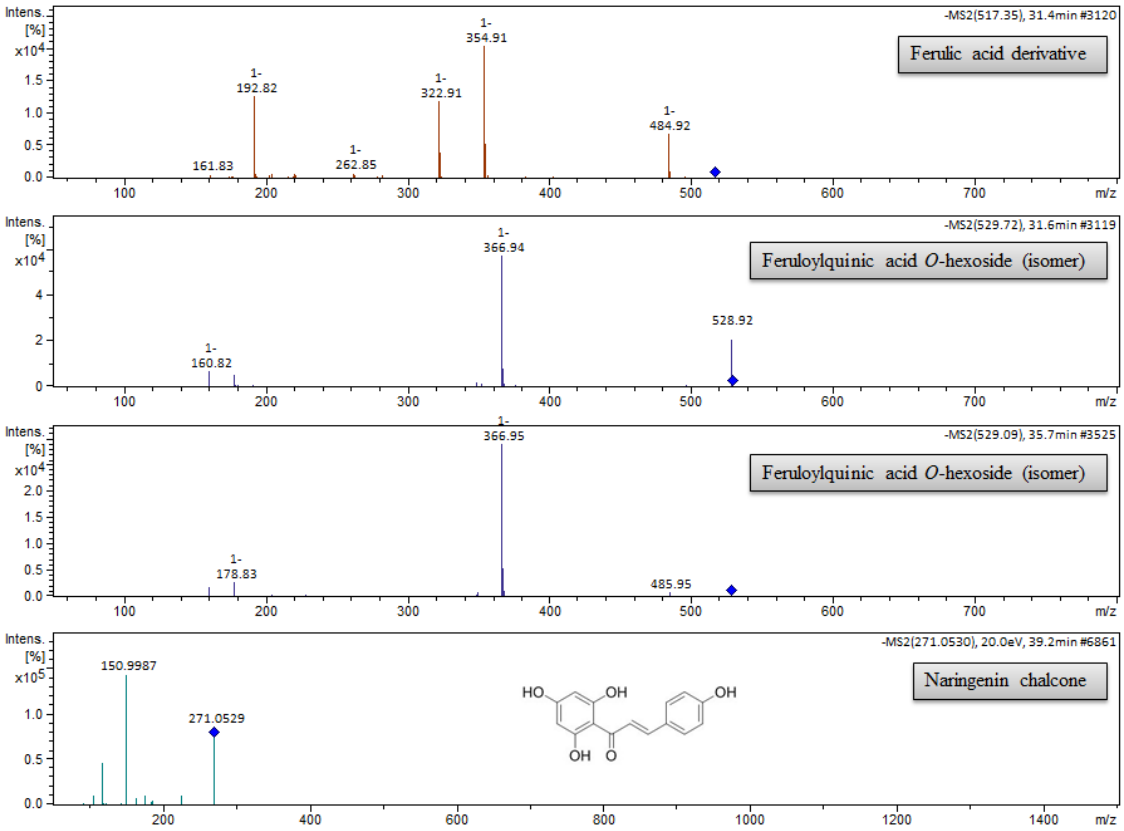

-MS2(593.04), 23.3min #2323
Kaempferol 3-O-rutinoside
1-
284.82
592.91
238.92
326.90
Intens.
[%]
x10^4
m/z


-MS2(514.94), 26.5min #2627
Dicaffeoylquinic acid
1-
352.93
173.09
1-
255.11
2-
299.04
Intens.
[%]
x10^5
m/z

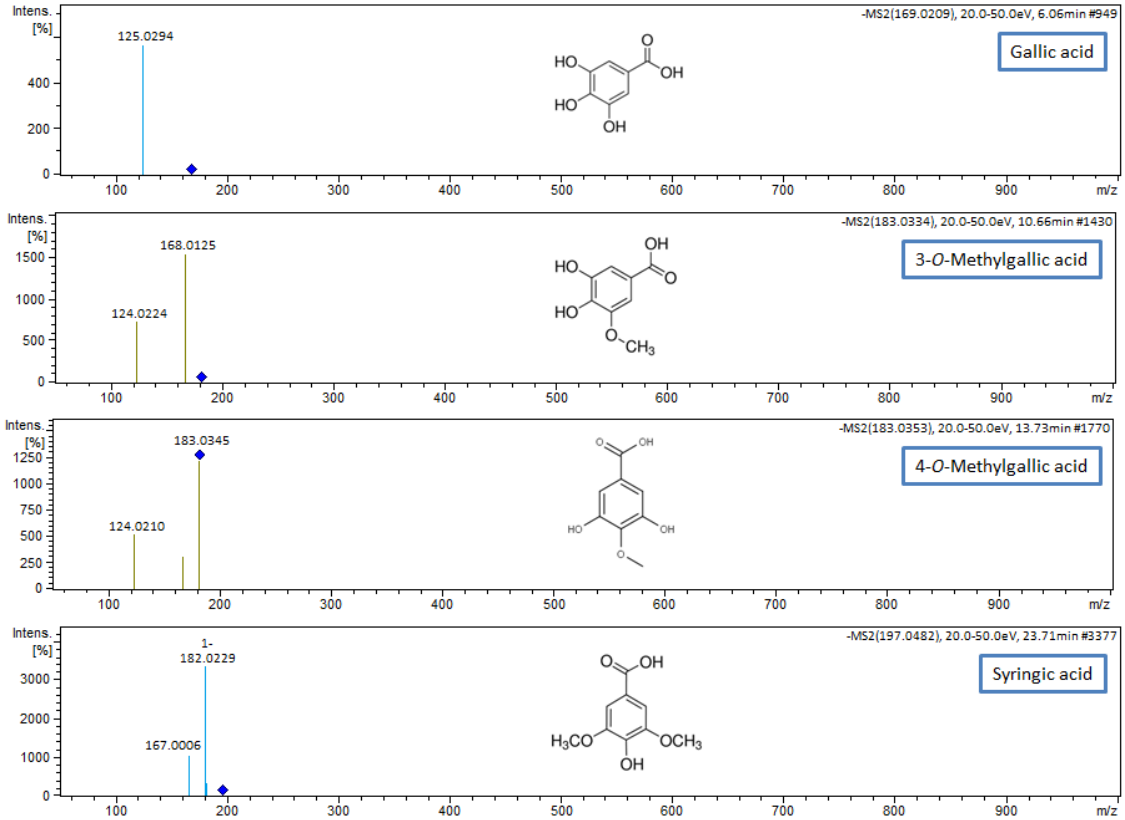

-MS2(192.94), 28.0min #2764
Ferulic acid
1-
192.82
HO
OH
O
OCH3
Intens.
[%]
x10^5
m/z

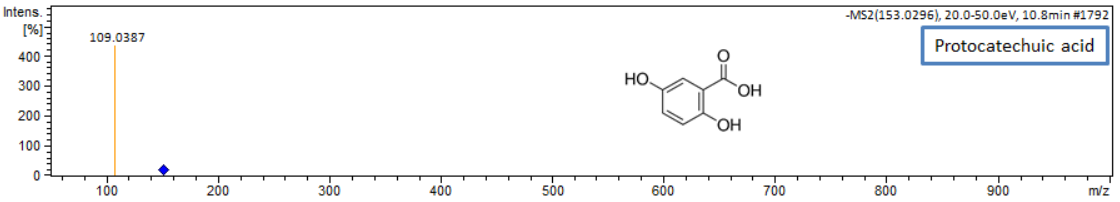

-MS2(485.11), 28.6min #2822
Caffeic acid derivative
322.90
1-
178.79
1-
340.76
399.67
438.07
Intens.
[%]
m/z

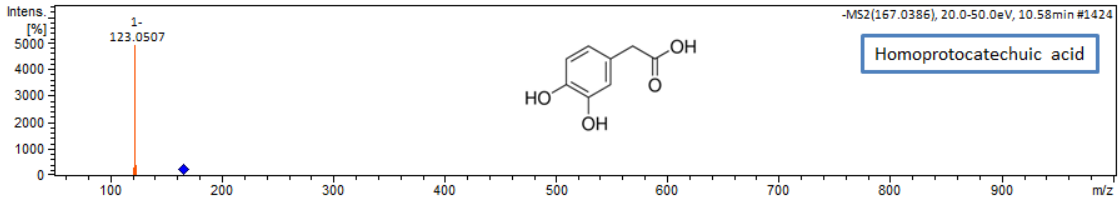

-MS2(528.98), 29.0min #2870
Feruloylquinic acid O-hexoside (isomer)
1-
366.96
1-
160.91
Intens.
[%]
x10^5
m/z

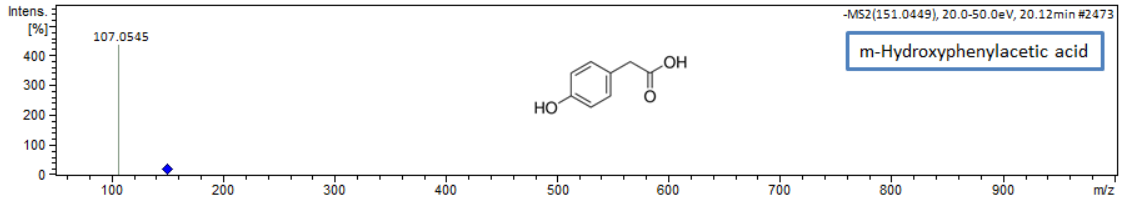


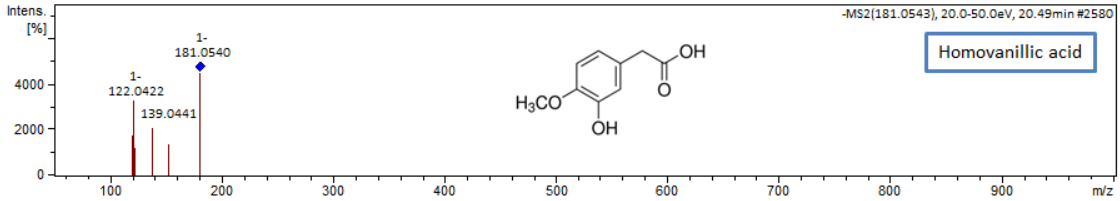
Apêndice D. Espectro de massas de metabólitos e catabólitos de flavonoides formados durante o processo de digestão *in vitro.*

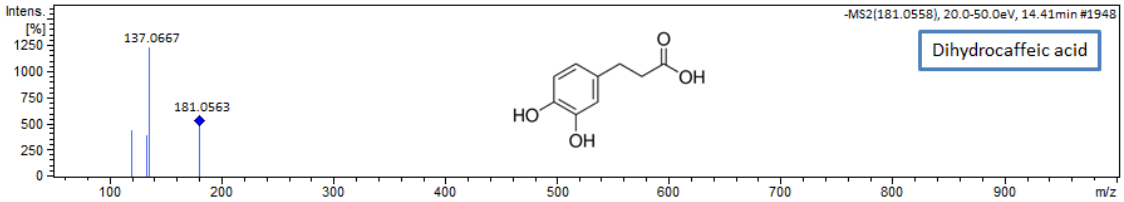


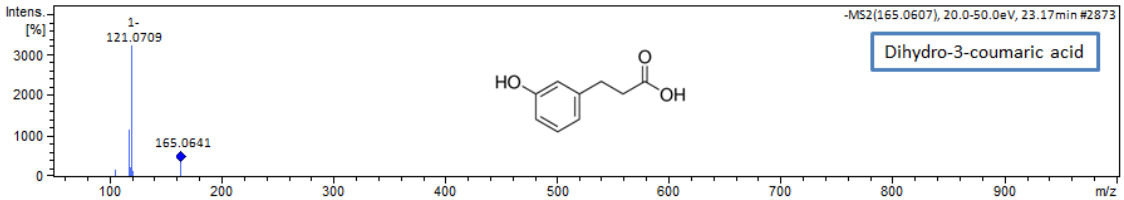

-MS2(153.0296), 20.0-50.0eV, 10.8min #1792
Protocatechuic acid
Intens. [%]
109.0387
m/z

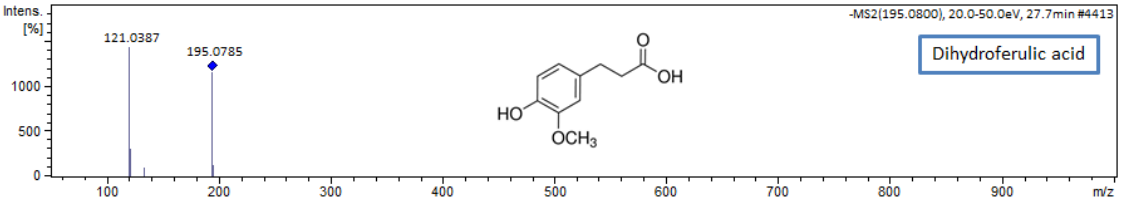

-MS2(167.0386), 20.0-50.0eV, 10.58min #1424
Homoprotocatechuic acid
Intens. [%]
1-
123.0507
m/z

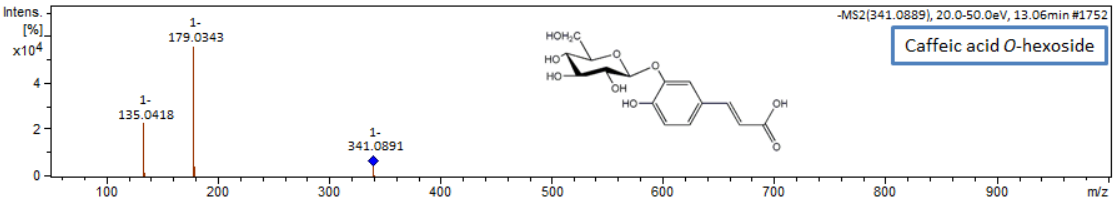

-MS2(151.0449), 20.0-50.0eV, 20.12min #2473
m-Hydroxyphenylacetic acid
Intens. [%]
107.0545
m/z

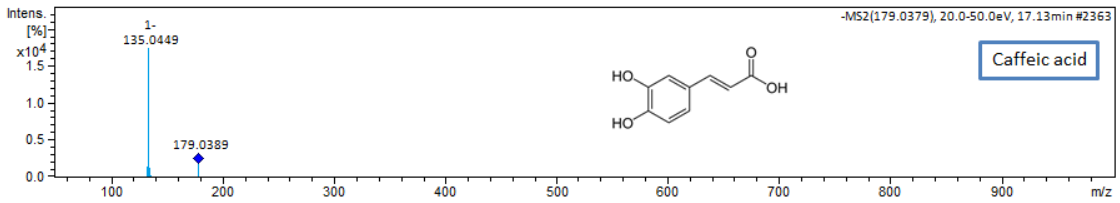

-MS2(181.0543), 20.0-50.0eV, 20.49min #2580
Homovanillic acid
Intens. [%]
1-
181.0540
1-
122.0422
139.0441
m/z

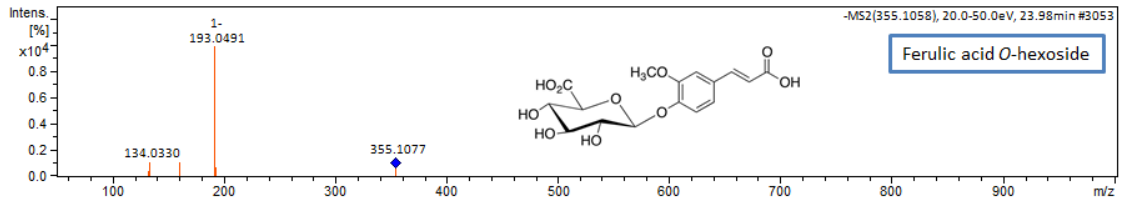

-MS2(181.0558), 20.0-50.0eV, 14.41min #1948
Dihydrocaffeic acid
Intens. [%]
137.0667
181.0563
m/z

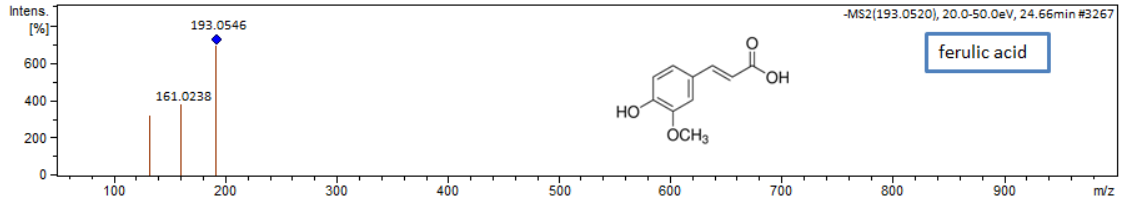

-MS2(165.0607), 20.0-50.0eV, 23.17min #2873
Dihydro-3-coumaric acid
Intens. [%]
1-
121.0709
165.0641
m/z

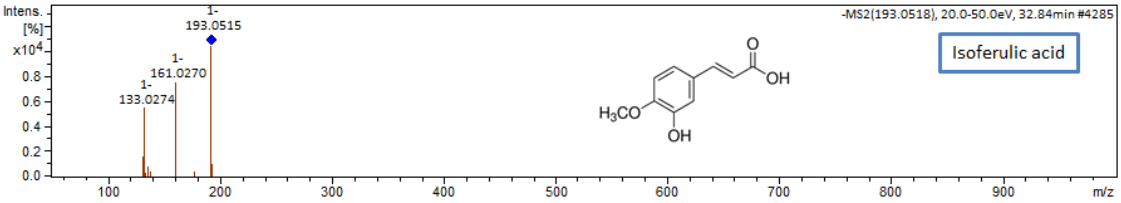

-MS2(195.0800), 20.0-50.0eV, 27.7min #4413
Dihydroferulic acid
Intens. [%]
121.0387
195.0785
m/z

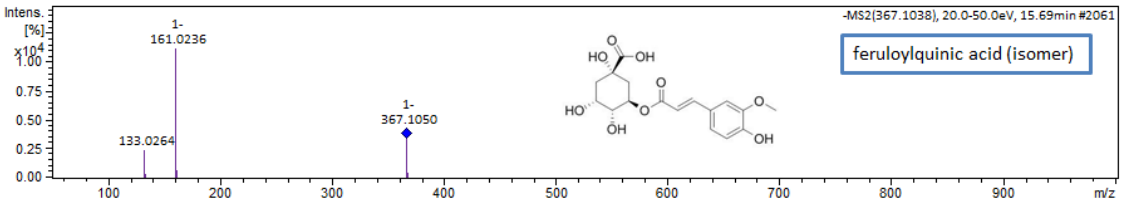

-MS2(341.0889), 20.0-50.0eV, 13.06min #1752
Caffeic acid O-hexoside
1-179.0343
1-135.0418
1-341.0891

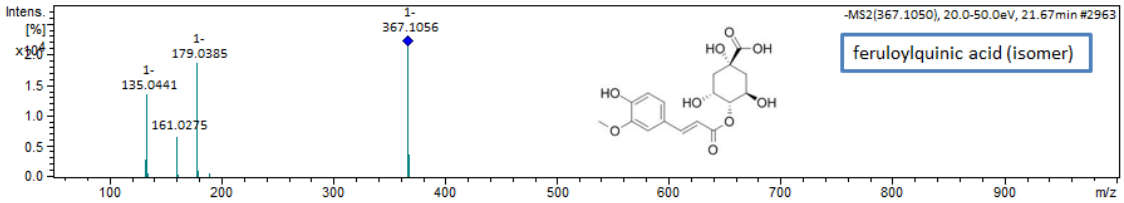

-MS2(179.0379), 20.0-50.0eV, 17.13min #2363
Caffeic acid
1-135.0449
179.0389

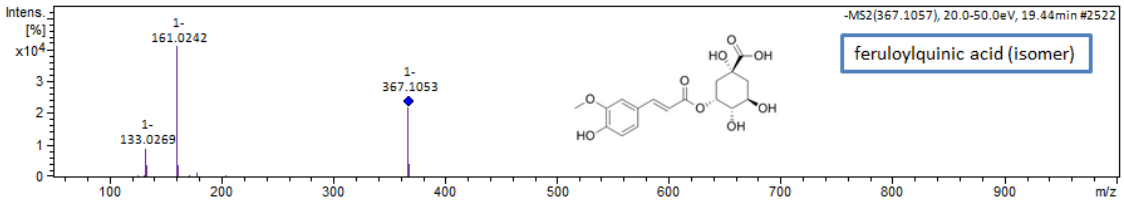

-MS2(355.1058), 20.0-50.0eV, 23.98min #3053
Ferulic acid O-hexoside
1-193.0491
134.0330
355.1077

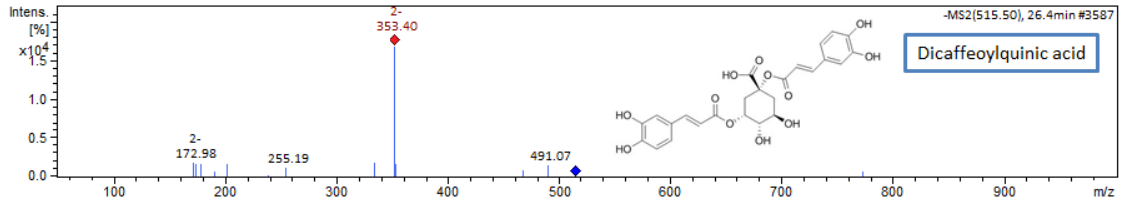

-MS2(193.0520), 20.0-50.0eV, 24.66min #3267
ferulic acid
193.0546
161.0238

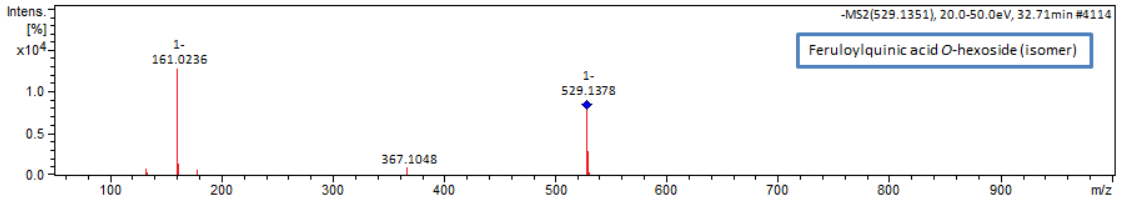

-MS2(193.0518), 20.0-50.0eV, 32.84min #4285
Isoferulic acid
1-193.0515
1-161.0270
1-133.0274

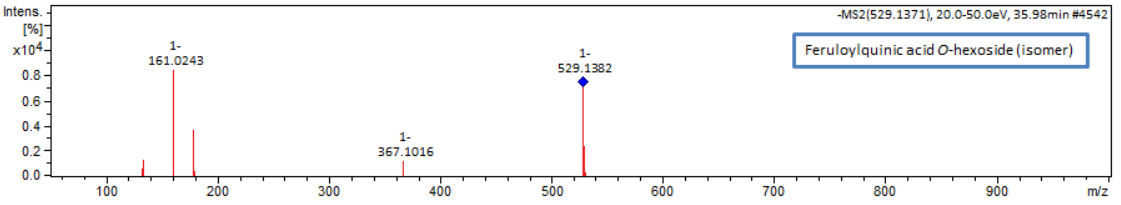

-MS2(367.1038), 20.0-50.0eV, 15.69min #2061
feruloylquinic acid (isomer)
1-161.0236
1-367.1050
133.0264

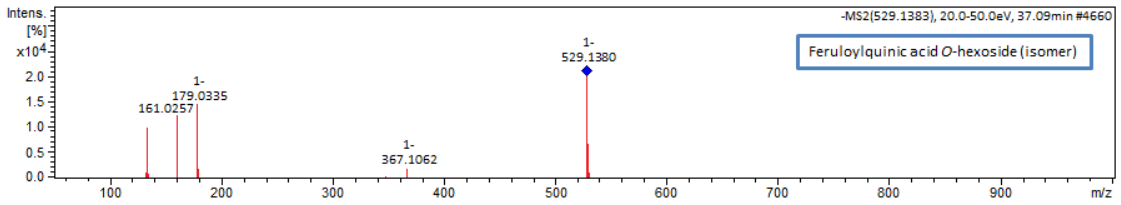

-MS2(367.1050), 20.0-50.0eV, 21.67min #2963
feruloylquinic acid (isomer)
1-367.1056
1-179.0385
1-135.0441
161.0275

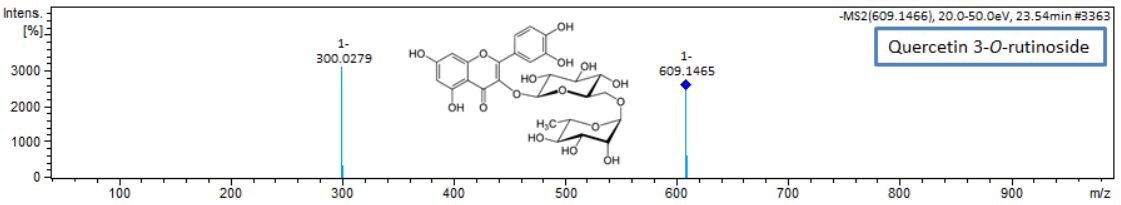

-MS2(367.1057), 20.0-50.0eV, 19.44min #2522
feruloylquinic acid (isomer)
1-161.0242
1-367.1053
1-133.0269

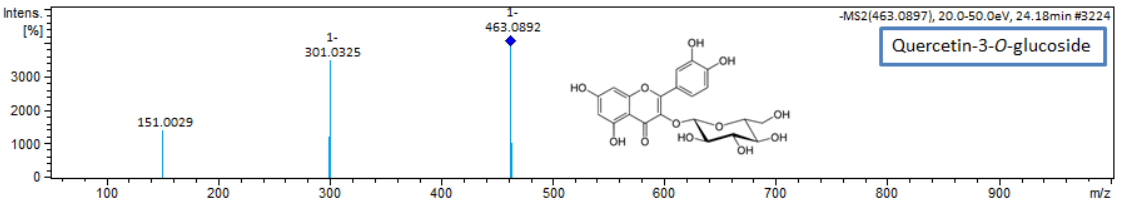

-MS2(515.50), 26.4min #3587
Dicaffeoylquinic acid
2-
353.40
2-
172.98
255.19
491.07
Intens.
[%]
x10^4
m/z

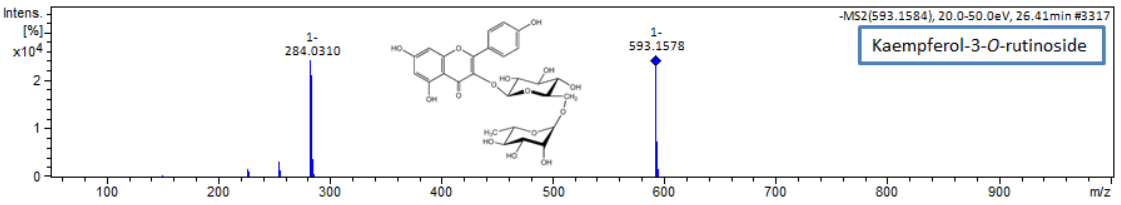

-MS2(529.1351), 20.0-50.0eV, 32.71min #4114
Feruloylquinic acid O-hexoside (isomer)
1-
161.0236
1-
529.1378
367.1048
Intens.
[%]
x10^4
m/z

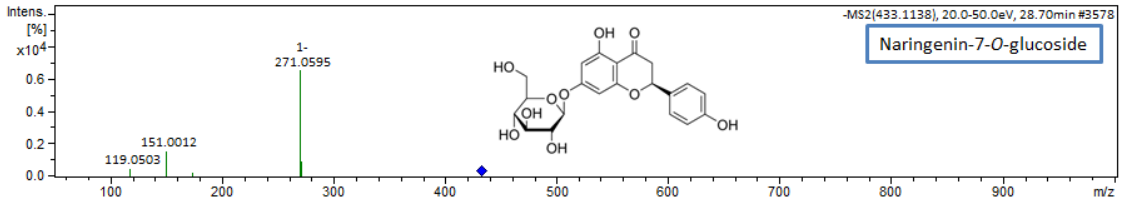

-MS2(529.1371), 20.0-50.0eV, 35.98min #4542
Feruloylquinic acid O-hexoside (isomer)
1-
161.0243
1-
529.1382
1-
367.1016
Intens.
[%]
x10^4
m/z

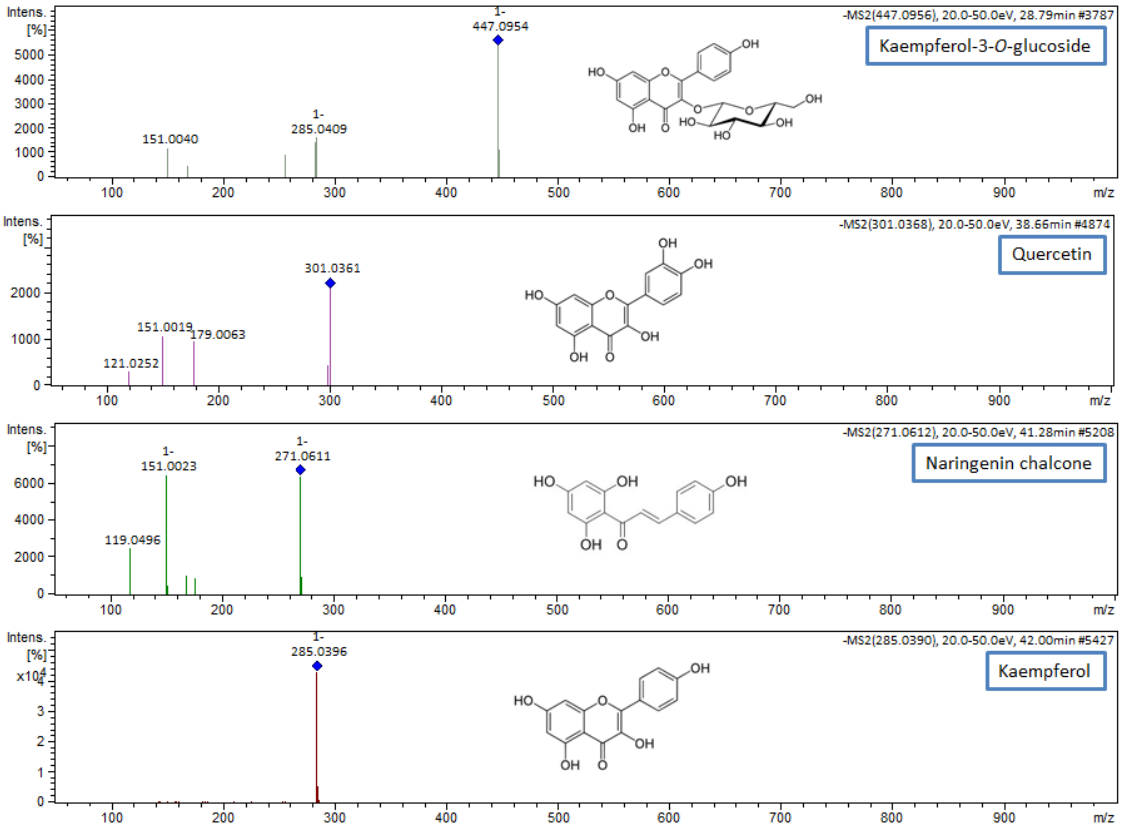

-MS2(529.1383), 20.0-50.0eV, 37.09min #4660
Feruloylquinic acid O-hexoside (isomer)
1-
529.1380
1-
179.0335
161.0257
1-
367.1062
Intens.
[%]
x10^4
m/z

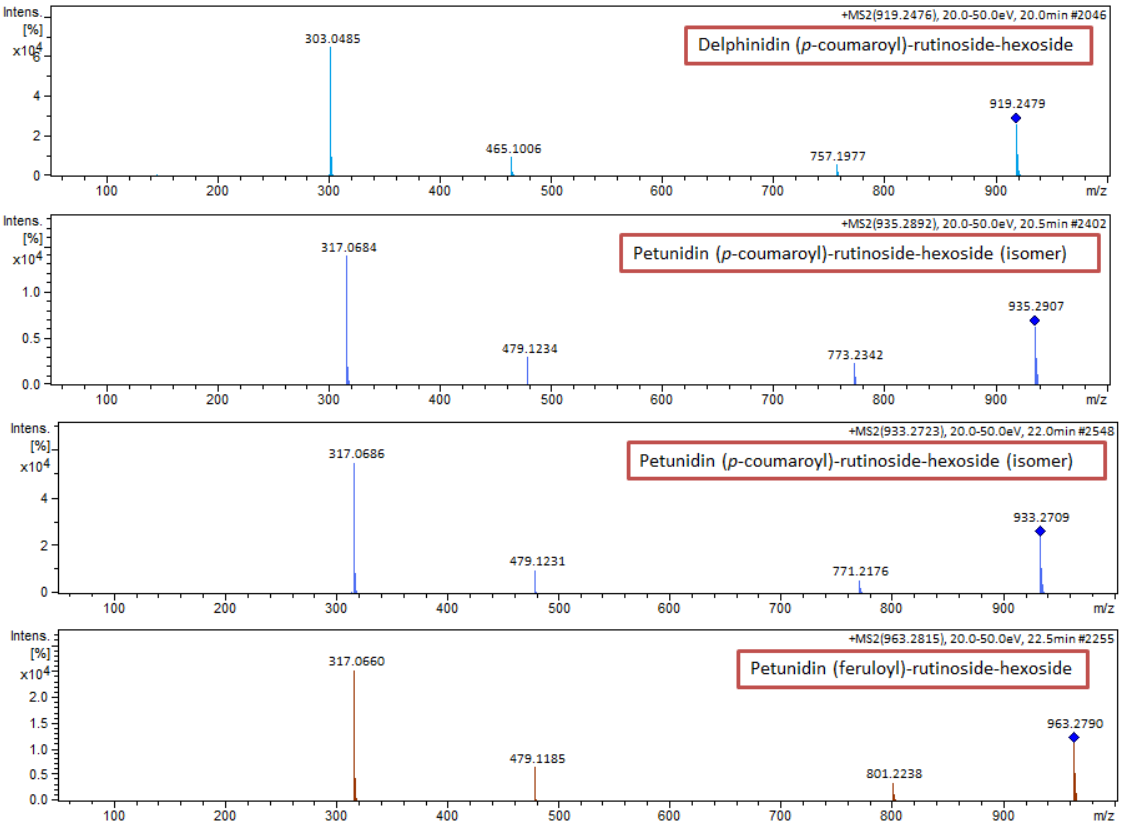

-MS2(609.1466), 20.0-50.0eV, 23.54min #3363
Quercetin 3-O-rutinoside
1-
300.0279
1-
609.1465
Intens.
[%]
m/z

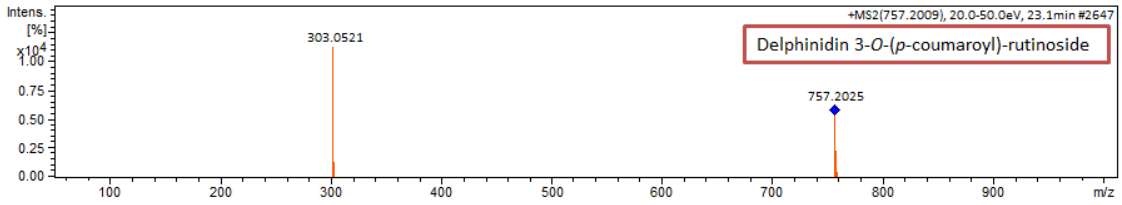

-MS2(463.0897), 20.0-50.0eV, 24.18min #3224
Quercetin-3-O-glucoside
1-
463.0892
1-
301.0325
151.0029
Intens.
[%]
m/z

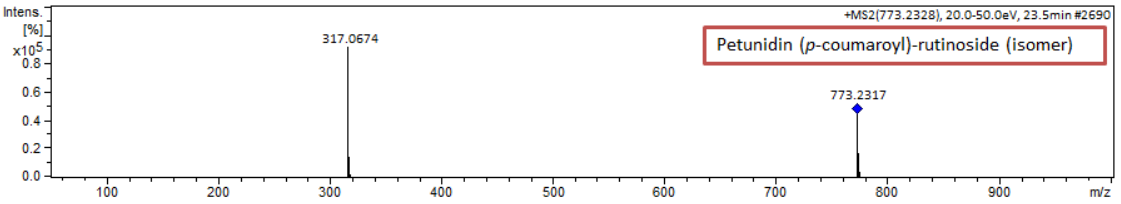

-MS2(593.1584), 20.0-50.0eV, 26.41min #3317
Kaempferol-3-O-rutinoside
1-
284.0310
1-
593.1578
Intens.
[%]
x10^4
m/z

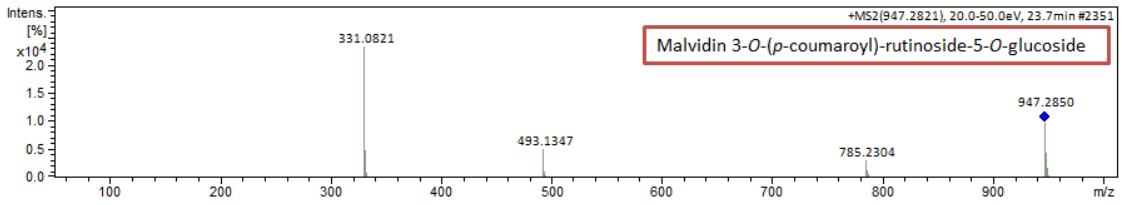

-MS2(433.1138), 20.0-50.0eV, 28.70min #3578
Naringenin-7-O-glucoside
1-
271.0595
151.0012
119.0503
Intens.
[%]
x10^4
m/z

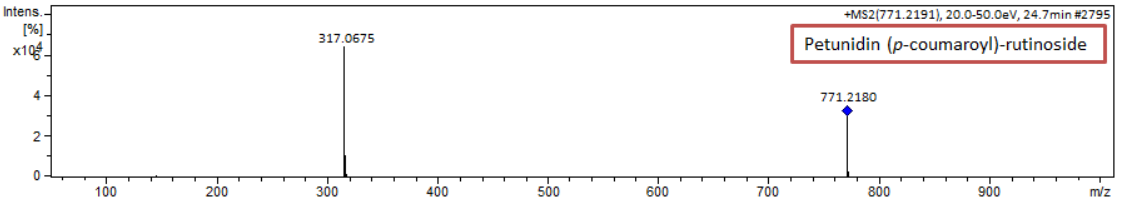

-MS2(447.0956), 20.0-50.0eV, 28.79min #3787
Kaempferol-3-O-glucoside
1-
447.0954
1-
285.0409
151.0040
-MS2(301.0368), 20.0-50.0eV, 38.66min #4874
Quercetin
301.0361
151.0019
179.0063
121.0252
-MS2(271.0612), 20.0-50.0eV, 41.28min #5208
Naringenin chalcone
1-
271.0611
1-
151.0023
119.0496
-MS2(285.0390), 20.0-50.0eV, 42.00min #5427
Kaempferol
1-
285.0396
Intens.
[%]
m/z

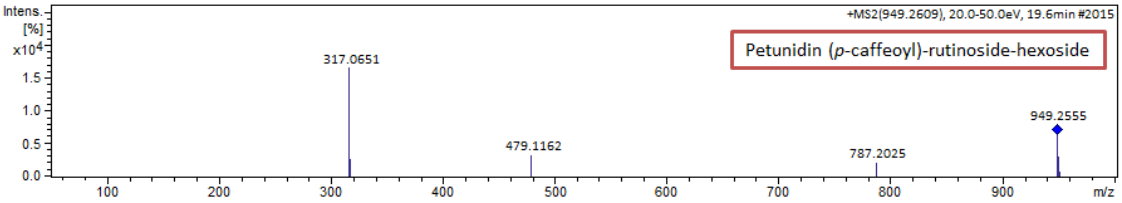

+MS2(919.2476), 20.0-50.0eV, 20.0min #2046
Delphinidin (p-coumaroyl)-rutinoside-hexoside
303.0485
465.1006
757.1977
919.2479
+MS2(935.2892), 20.0-50.0eV, 20.5min #2402
Petunidin (p-coumaroyl)-rutinoside-hexoside (isomer)
317.0684
479.1234
773.2342
935.2907
+MS2(933.2723), 20.0-50.0eV, 22.0min #2548
Petunidin (p-coumaroyl)-rutinoside-hexoside (isomer)
317.0686
479.1231
771.2176
933.2709
+MS2(963.2815), 20.0-50.0eV, 22.5min #2255
Petunidin (feruloyl)-rutinoside-hexoside
317.0660
479.1185
801.2238
963.2790
Intens.
[%]
m/z

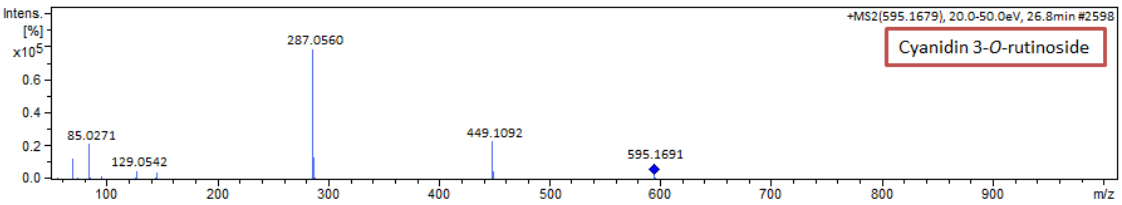

+MS2(757.2009), 20.0-50.0eV, 23.1min #2647
Delphinidin 3-O-(p-coumaroyl)-rutinoside
303.0521
757.2025

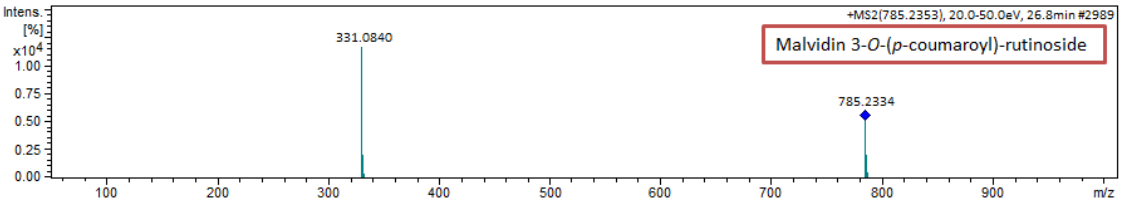

+MS2(773.2328), 20.0-50.0eV, 23.5min #2690
Petunidin (p-coumaroyl)-rutinoside (isomer)
317.0674
773.2317


+MS2(947.2821), 20.0-50.0eV, 23.7min #2351
Malvidin 3-O-(p-coumaroyl)-rutinoside-5-O-glucoside
331.0821
947.2850
493.1347
785.2304

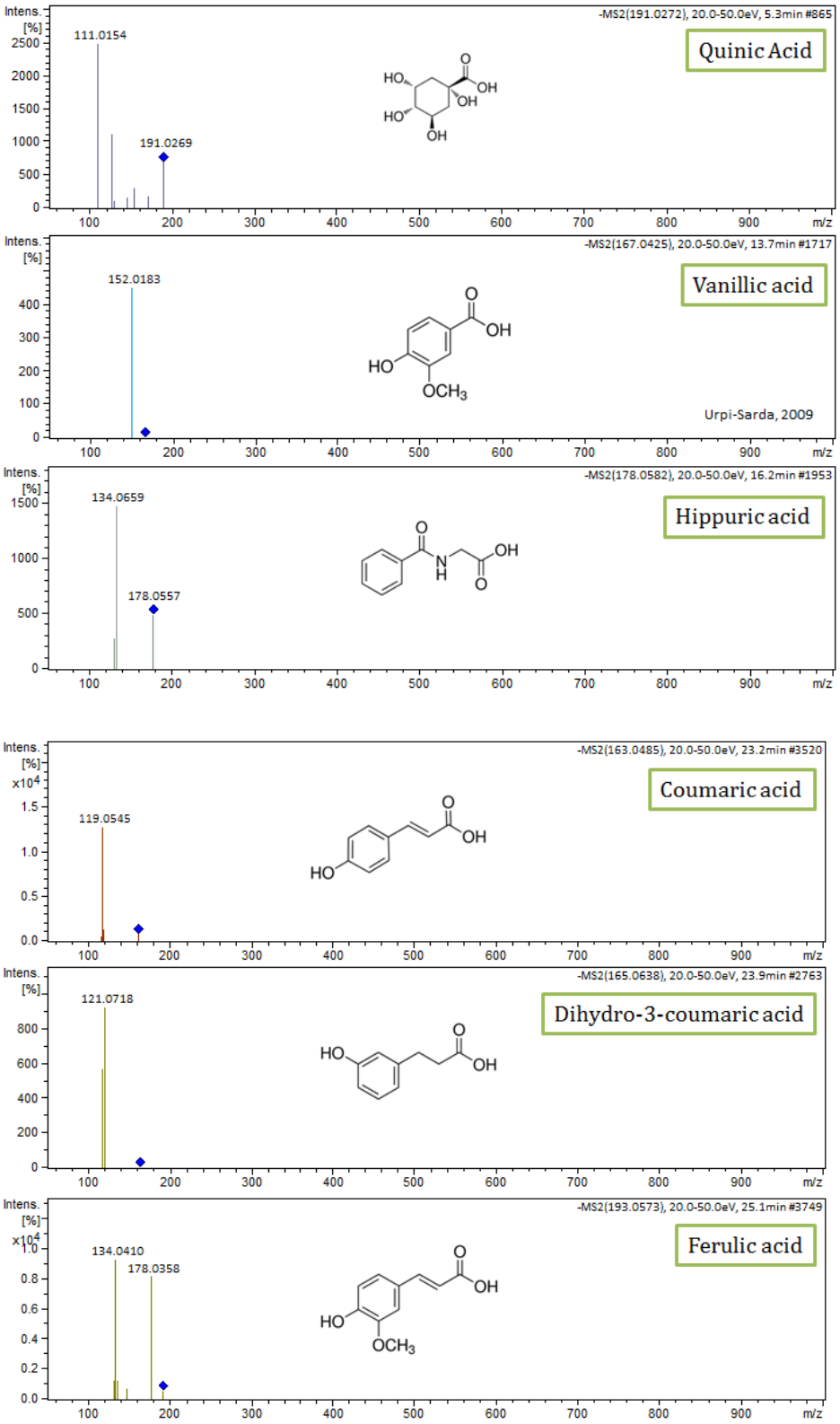

+MS2(771.2191), 20.0-50.0eV, 24.7min #2795
Petunidin (p-coumaroyl)-rutinoside
317.0675
771.2180

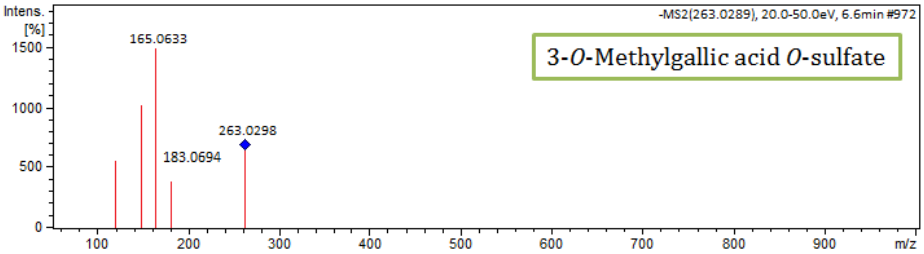

+MS2(949.2609), 20.0-50.0eV, 19.6min #2015
Petunidin (p-caffeoyl)-rutinoside-hexoside
317.0651
949.2555
479.1162
787.2025

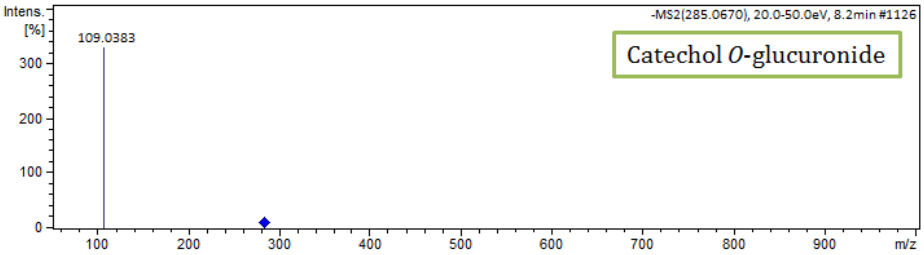

+MS2(595.1679), 20.0-50.0eV, 26.8min #2598
Cyanidin 3-O-rutinoside
287.0560
85.0271
129.0542
449.1092
595.1691

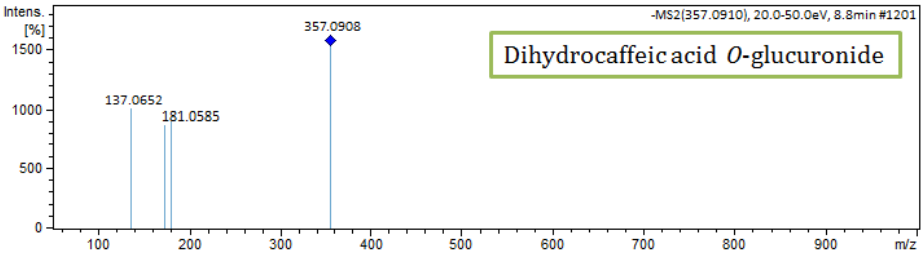

+MS2(785.2353), 20.0-50.0eV, 26.8min #2989
Malvidin 3-O-(p-coumaroyl)-rutinoside
331.0840
785.2334

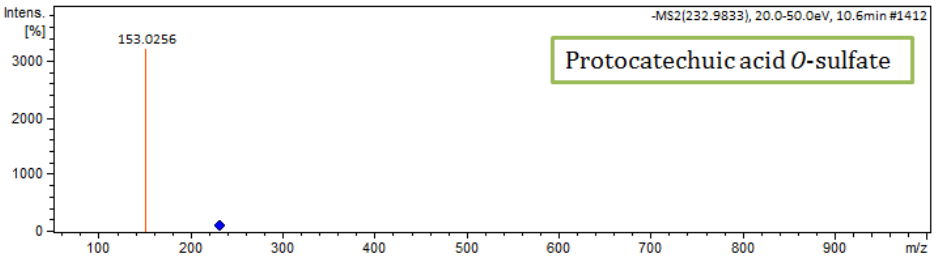
Apêndice E. Espectro de massas de metabólitos de flavonoides e ácidos fenólicos na urina de ratos após o consumo em dose única do extrato de tomate roxo.

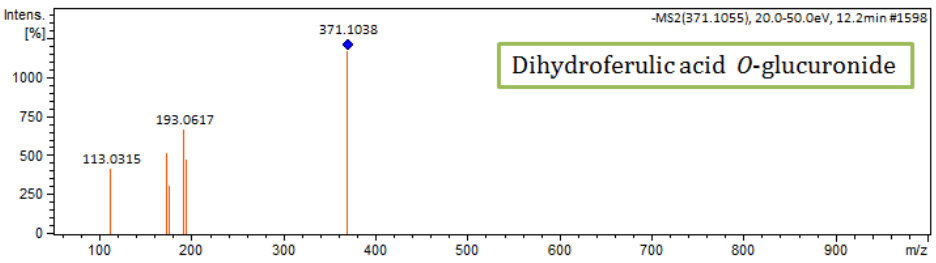


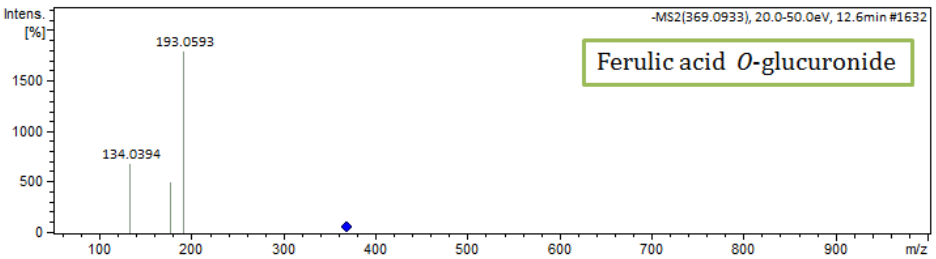

-MS2(263.0289), 20.0-50.0eV, 6.6min #972
3-O-Methylgallic acid O-sulfate
165.0633
263.0298
183.0694
Intens. [%]
m/z

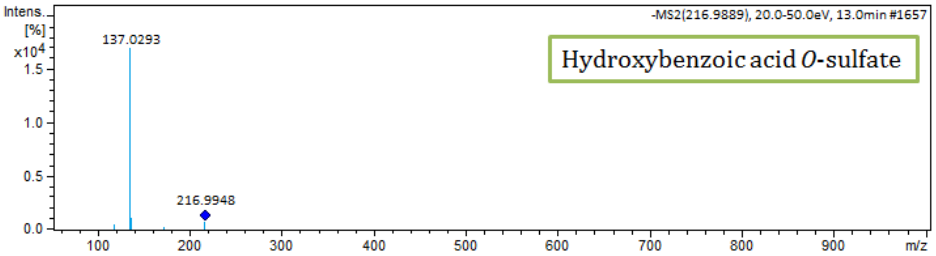

-MS2(285.0670), 20.0-50.0eV, 8.2min #1126
Catechol O-glucuronide
109.0383
Intens. [%]
m/z

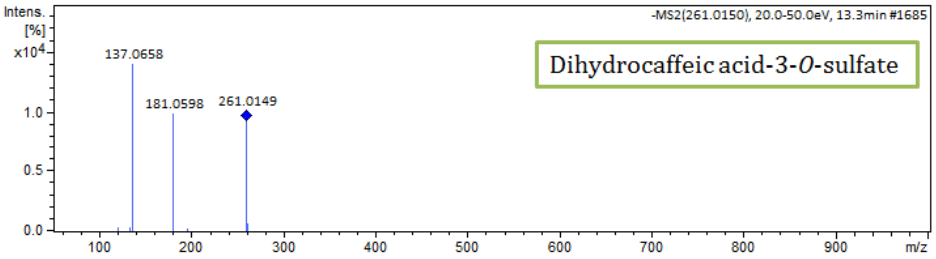

-MS2(357.0910), 20.0-50.0eV, 8.8min #1201
Dihydrocaffeic acid O-glucuronide
357.0908
137.0652
181.0585
Intens. [%]
m/z

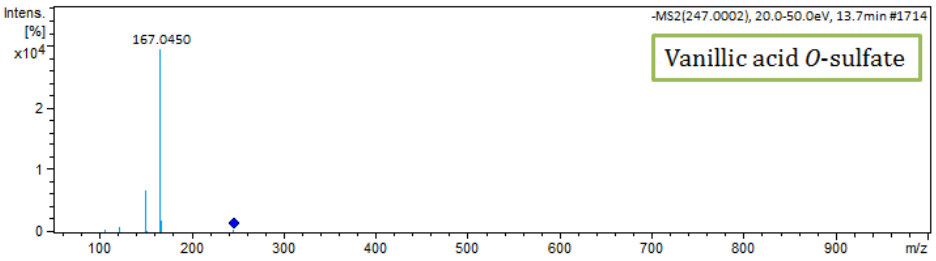

-MS2(232.9833), 20.0-50.0eV, 10.6min #1412
Protocatechuic acid O-sulfate
153.0256
Intens. [%]
m/z

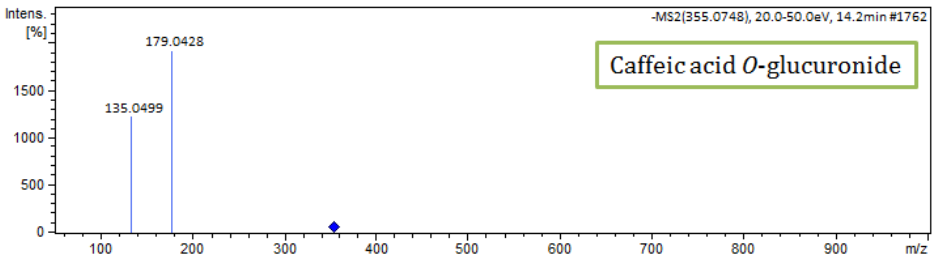

-MS2(371.1055), 20.0-50.0eV, 12.2min #1598
Dihydroferulic acid O-glucuronide
371.1038
193.0617
113.0315
Intens. [%]
m/z

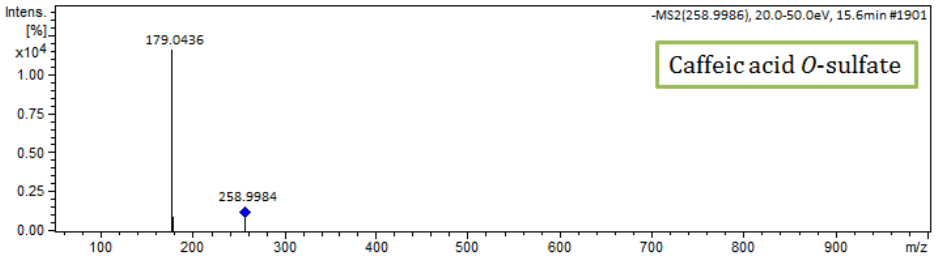

-MS2(369.0933), 20.0-50.0eV, 12.6min #1632
Ferulic acid O-glucuronide
193.0593
134.0394
Intens. [%]
m/z

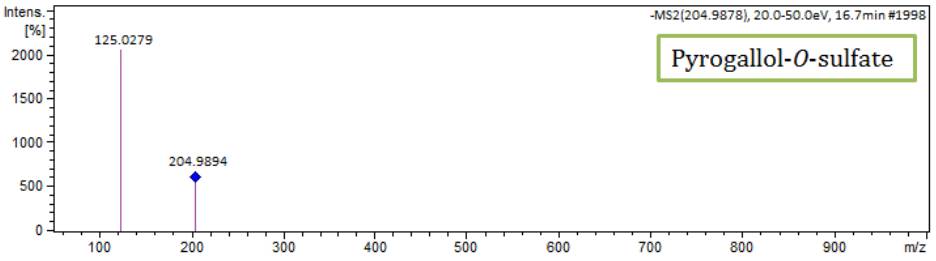

-MS2(216.9889), 20.0-50.0eV, 13.0min #1657
Hydroxybenzoic acid O-sulfate
137.0293
216.9948

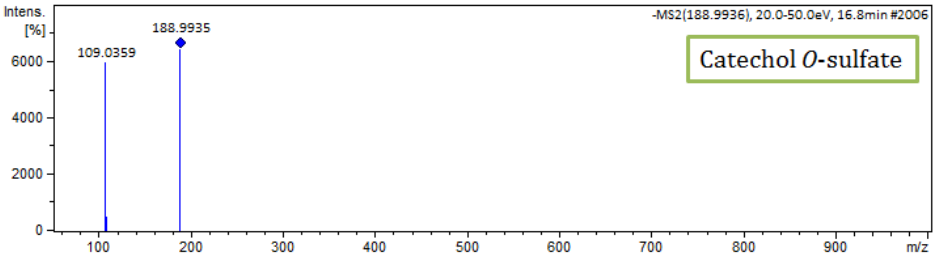

-MS2(261.0150), 20.0-50.0eV, 13.3min #1685
Dihydrocaffeic acid-3-O-sulfate
137.0658
181.0598
261.0149

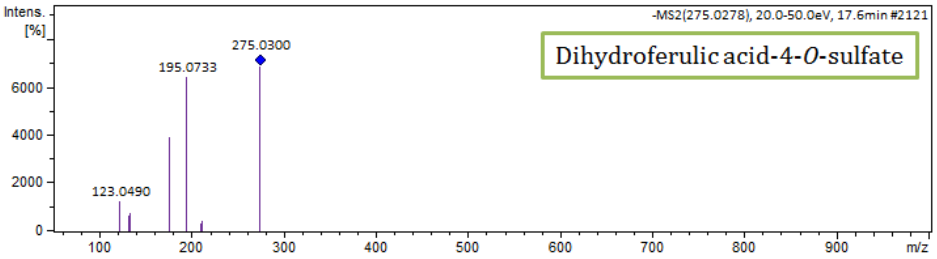

-MS2(247.0002), 20.0-50.0eV, 13.7min #1714
Vanillic acid O-sulfate
167.0450

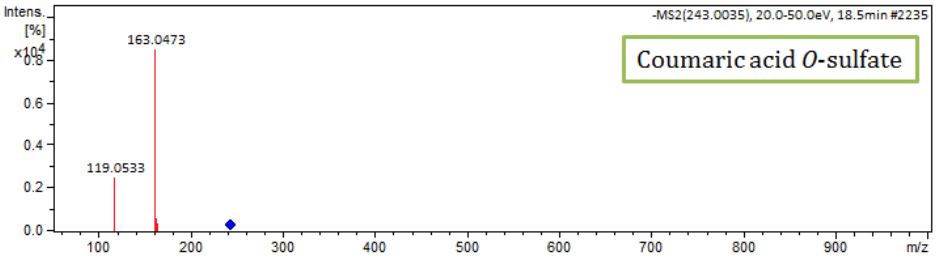

-MS2(355.0748), 20.0-50.0eV, 14.2min #1762
Caffeic acid O-glucuronide
179.0428
135.0499

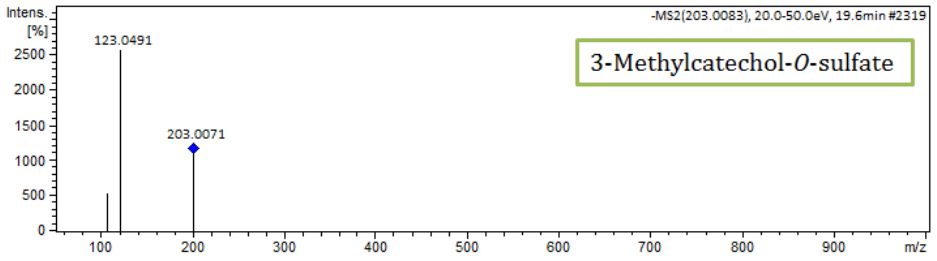

-MS2(258.9986), 20.0-50.0eV, 15.6min #1901
Caffeic acid O-sulfate
179.0436
258.9984

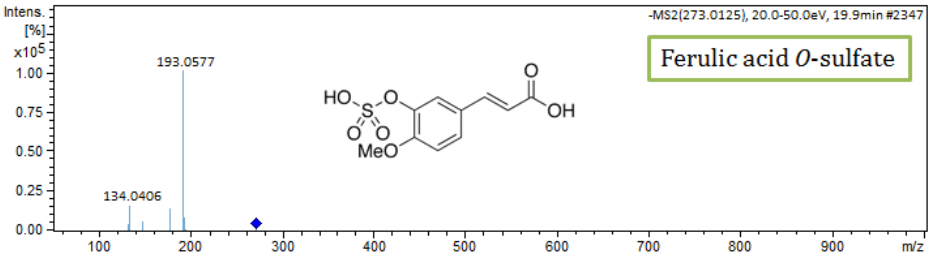

-MS2(204.9878), 20.0-50.0eV, 16.7min #1998
Pyrogallol-O-sulfate
125.0279
204.9894

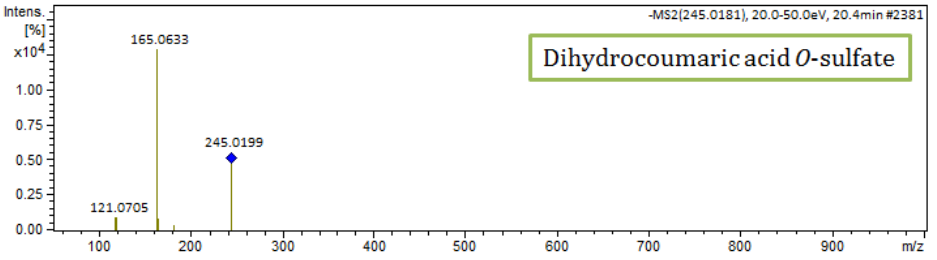

-MS2(188.9936), 20.0-50.0eV, 16.8min #2006
Catechol O-sulfate
188.9935
109.0359

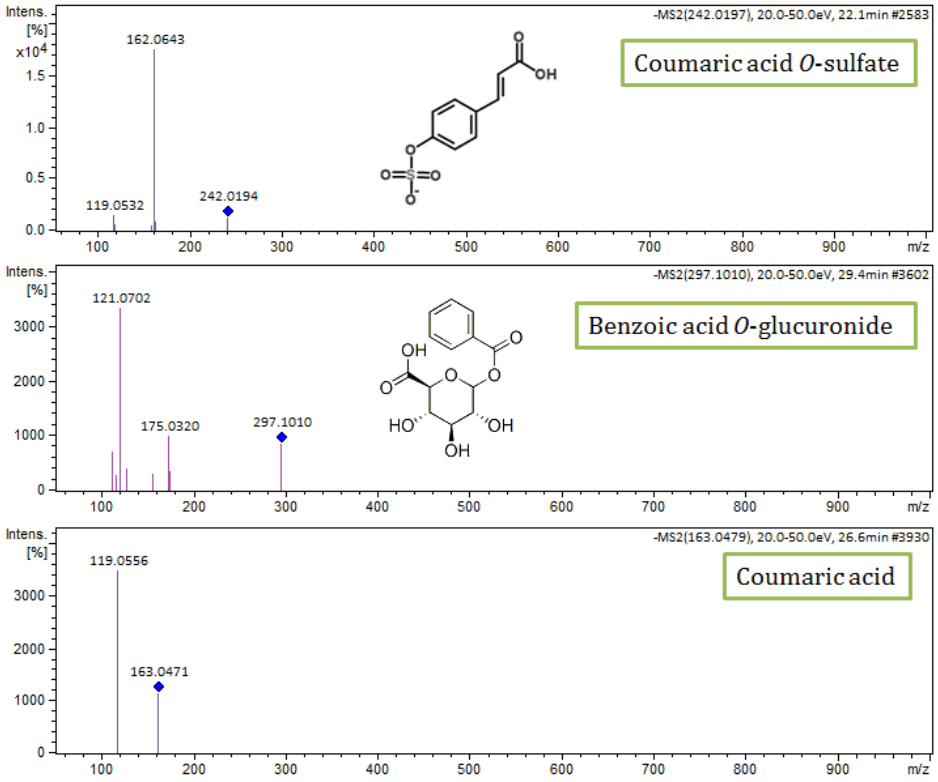

-MS2(275.0278), 20.0-50.0eV, 17.6min #2121
Dihydroferulic acid-4-O-sulfate
275.0300
195.0733
123.0490


-MS2(243.0035), 20.0-50.0eV, 18.5min #2235
Coumaric acid O-sulfate
163.0473
119.0533

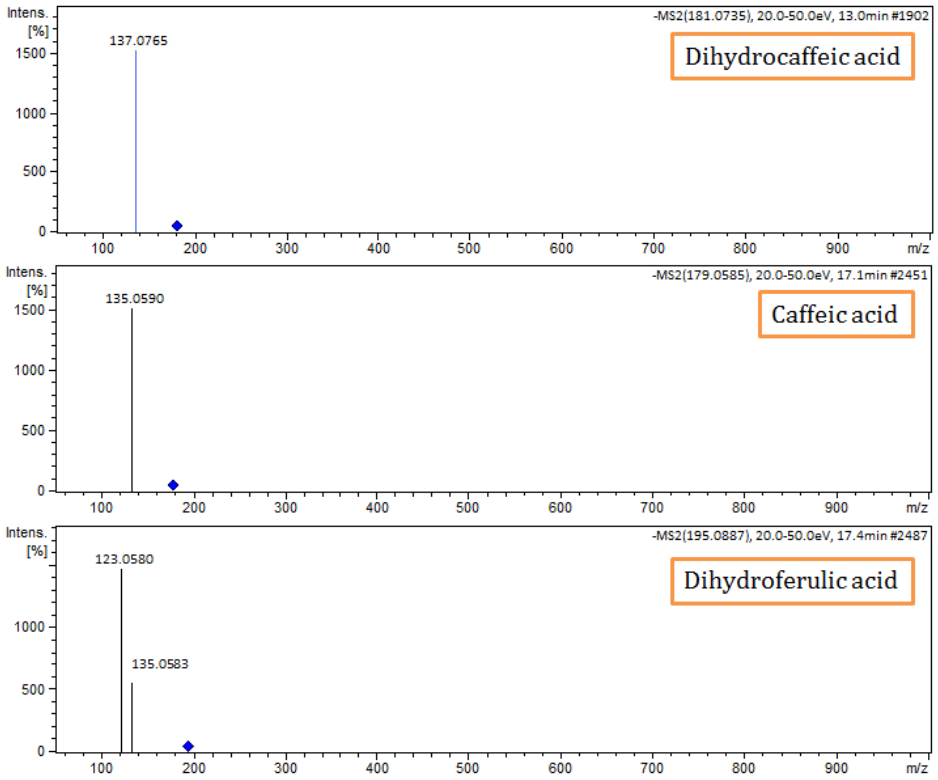

-MS2(203.0083), 20.0-50.0eV, 19.6min #2319
3-Methylcatechol-O-sulfate
123.0491
203.0071

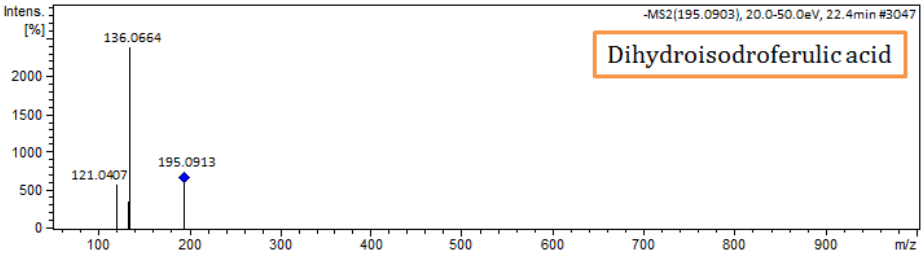

-MS2(273.0125), 20.0-50.0eV, 19.9min #2347
Ferulic acid O-sulfate
193.0577
134.0406
HO
S
O
O
O
MeO
O
OH

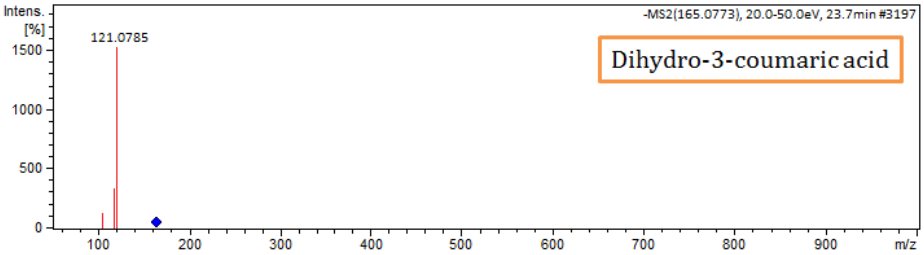

-MS2(245.0181), 20.0-50.0eV, 20.4min #2381
Dihydrocoumaric acid O-sulfate
165.0633
245.0199
121.0705

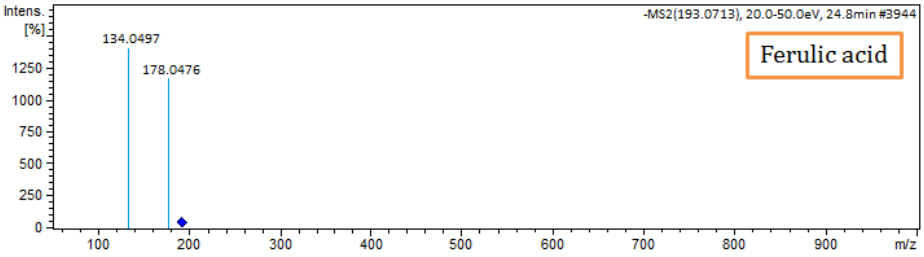


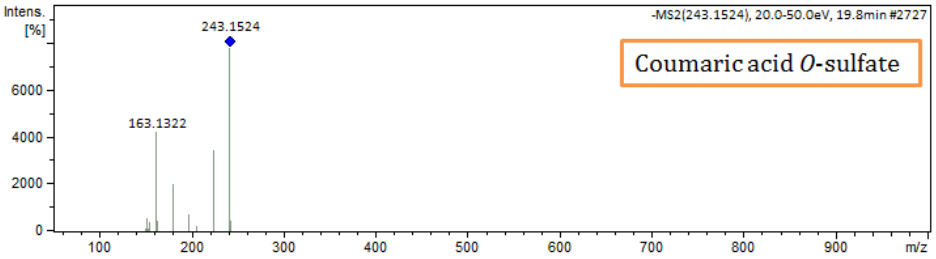
Apêndice F. Espectro de massas de metabólitos de flavonoides e ácidos fenólicos nas fezes de ratos após o consumo em dose única do extrato de tomate roxo.




-MS2(195.0903), 20.0-50.0eV, 22.4min #3047
Dihydroisodroferulic acid
Intens. [%]
136.0664
121.0407
195.0913
m/z


-MS2(165.0773), 20.0-50.0eV, 23.7min #3197
Dihydro-3-coumaric acid
Intens. [%]
121.0785
m/z


-MS2(193.0713), 20.0-50.0eV, 24.8min #3944
Ferulic acid
Intens. [%]
134.0497
178.0476
m/z


-MS2(243.1524), 20.0-50.0eV, 19.8min #2727
Coumaric acid O-sulfate
Intens. [%]
243.1524
163.1322
m/z

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, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

CEUA/FCF 32.**2017-P541**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Excreção de antocianinas de tomate roxo**, registrada com o nº **541**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Mayara Adja da Silva Souza**, sob orientação do(a) **Neuza Mariko Aymoto Hassimoto** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **05 de maio de 2017**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/05/2017 a 31/12/2017
Espécie/linhagem/raça	*Rattus novergicus / Wistar*
Número de animais	11
Peso/Idade	45-50g; 21 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério - USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 24 de maio de 2017.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

FICHA DO ALUNO

9131 - 9565038/1 - Mayara Adja da Silva Souza

Email:	mayara.adja@usp.br
Data de Nascimento:	14/12/1991
Cédula de Identidade:	RG - 3.062.831 - RN
Local de Nascimento:	
Nacionalidade:	
Graduação:	Nutricionista - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte - Brasil - 2015

Curso:	Mestrado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	16/09/2015
Início da Contagem de Prazo:	16/09/2015
Data Limite para o Depósito:	16/03/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - 16/09/2015 até o presente. Email: aymoto@yahoo.com
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 15/09/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 21/10/2016
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:	Primeira Matrícula em 16/09/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 21/11/2017 19:21:05

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

FICHA DO ALUNO

9131 - 9565038/1 - Mayara Adja da Silva Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMB5821-2/3	Biofísica de Membranas Básica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/11/2015	25/11/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5712-6/2	Fisiologia da Nutrição I	07/03/2016	17/04/2016	90	6	75	A	N	Concluída
FBF5805-2/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
IMT5108-1/4	Inglês para Apresentações em Conferências Internacionais e Redação de Artigos na Área de Medicina Tropical e Saúde Internacional (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo)	03/08/2016	25/10/2016	60	4	100	A	N	Concluída
HNT5739-3/1	Experimento com Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/08/2016	12/10/2016	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMF5885-1/2	Da Administração ao Sítio de Ação: Princípios de ADME e Farmacocinética (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/08/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5899-3/1	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	01/03/2017	11/04/2017	90	6	100	A	N	Concluída
IMT5107-1/5	Ética em Pesquisa (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo)	14/03/2017	03/04/2017	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/2	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	30/05/2017	12/06/2017	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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 17/07/2017

Impresso em: 21/11/2017 19:21:05

Mayara Adja da Silva Souza

Endereço para acessar este CV: **http://lattes.cnpq.br/5717878253869709**

Resumo informado pelo autor

Mestranda na área de ciências dos alimentos, com ênfase em compostos bioativos (fenólicos), desde 2015.2, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Formada em Nutrição, pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2015.1). Realizou graduação sanduíche através do Programa Ciência sem Fronteiras na Universidade Católica Portuguesa - Porto, Portugal (2012.2 - 2013.1). Linhas de pesquisa experienciadas: Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição, com ênfase em vitaminas lipossolúveis no leite materno. Cursou técnico em Controle Ambiental, pelo Instituto Federal do Rio Grande do Norte (2009.2). **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Mayara Adja da Silva Souza

Nome em citações bibliográficas

SOUZA, M. A. S.

Endereço

Endereço profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentação e Nutrição Experimental.
Avenida professor Lineu Prestes
Butantã
05508000 – São Paulo, SP – Brasil
Telefone: (11) 30913647

Formação acadêmica/titulação

2015 - 2017 Mestrado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Caracterização química de tomate roxo e estudo da metabolização de flavonoides *in vitro e in vivo*
Orientador: Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2010 - 2015 Graduação em Nutrição.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil, com período sanduíche em Universidade Católica Portuguesa - Porto (Orientador: Mónica Coutinho

(Relações Internacionais))
Título: Estado Nutricional Materno em Vitamina E e Níveis de Alfa-Tocoferol no Leite Materno
Orientador: Prof. Ms. Karla Danielly da Silva Ribeiro

2006 - 2009 Ensino Profissional de nível técnico em Controle Ambiental.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, IFRN, Natal, Brasil

Atuação profissional

1. Casa de Saúde São Lucas Natal - CSSL

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 25, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiária em Nutrição (Produção e Clínica), com as seguintes funções: orientação e supervisão das técnicas de preparo de alimentos; controle do padrão de qualidade das refeições; acompanhamento da distribuição e aceitação das dietas; avaliação do estado nutricional dos pacientes em conjunto com a nutricionista; orientação de dietas dentro das normas da Dietoterapia; visita aos pacientes sempre que solicitado.

2. Uniself, SA - Sociedade de Restaurantes Públicos e Privados - UNISELF

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:
Estagiária em Nutrição (Alimentação Escolar), com as seguintes funções: acompanhamento do Sistema Integrado de Gestão (SIG): qualidade, segurança alimentar, saúde e segurança do trabalho, ambiente e responsabilidade social.

Projetos

Monitoria
2014 - 2015 Incentivando experiências interdisciplinares e propostas educacionais integradoras, dinâmicas e inovadoras na melhoria da qualidade do ensino em Nutrição Clínica (Dietoterapia II).
Descrição: Auxílio aos professores na seleção e correção de casos clínicos; assistência na elaboração de aulas, materiais didáticos e avaliações.
Situação: Concluído Natureza: Projeto de monitoria
Responsável: Lúcia Dantas Leite

2011 - 2011 Monitoria como instrumento de estratégias para melhorias na qualidade do ensino em Bioquímica aplicada para o curso de Nutrição.
Descrição: Auxílio aos professores na elaboração de aulas, materiais didáticos e avaliações; assistência aos alunos para resolução de exercícios.
Situação: Concluído Natureza: Projeto de monitoria
Responsável: João Felipe de Sousa Filho

Projeto de extensão
2012 - 2012 Projeto PNAE PAA como estratégia de desenvolvimento rural: articulação entre agricultores, técnicos e gestores.
Descrição: Contribuir para o desenvolvimento rural a partir de estratégias voltadas ao fortalecimento

e a consolidação da inserção da agricultura familiar em mercados institucionais (PAA e PNAE) no Território do Mato Grande/RN.
Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
Responsável: Cimone Rezende de Souza

Iniciação Científica
2013 - 2014 Avaliação dos níveis de alfa-tocoferol no soro de mães de prematuros.
Descrição: Avaliação do estado nutricional da vitamina E nos períodos do puerpério e aleitamento materno.
Situação: Concluído Natureza: Projeto de iniciação científica
Responsável: Roberto Dimenstein

Áreas de atuação

1. Nutrição

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produções

Produção bibliográfica
Artigos completos publicados em periódicos

1. GURGEL, CRISTIANE SANTOS SÂNZIO; PEREIRA, LARISA ALVES DE ARAÚJO; COSTA, ALDIANE DE ASSIS; **DA SILVA SOUZA, MAYARA ADJA**; DE BRITO, POLIANA ARAÚJO; DE MELO, LARISSE RAYANNE MIRANDA; DIMENSTEIN, ROBERTO
Effect of Routine Prenatal Supplementation on Vitamin a Concentrations in Maternal Serum and Breast Milk. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)., v.16, p.16 -, 2016.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. **16º Workshop Internacional - Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde – Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos: Avanços científicos, Perspectivas e Desafios.** São Paulo, 2017. (Workshop)

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, SBAN, São Paulo, 2017. (Congresso)
Enriquecimento de flavonoides e carotenoides em tomate através de melhoramento genético convencional: caracterização dos compostos bioativos
Metabolização de flavonoides de tomate roxo (solanum lycopersicum l.) em simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®).

3. **15º Evento da Série de Workshops Internacionais sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde: Microbioma, Probióticos e Saúde.** São Paulo, 2016. (Workshop)

4. **14º Evento da Série de Workshops Internacionais sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde: Neurociência, Cérebro e Nutrição.** São Paulo, 2015.

(Workshop)

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXV CIC – Congresso de Iniciação Científica da UFRN**, 2014. (Congresso)
Comparação entre os níveis de retinol sérico materno de mães que tiveram parto de filhos a termo e pré-termo.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XII Congresso de Nutrição e Alimentação da Associação Portuguesa dos Nutricionistas**, Lisboa, Portugal, 2013. (Congresso)
Análise comparativa entre as Normas Governamentais de Segurança Alimentar para Serviços de Alimentação em Portugal e no Brasil.

7. **IX Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, Porto, Portugal, 2012. (Congresso)

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII CIC – Congresso de Iniciação Científica da UFRN**, 2012. (Congresso)
Preparações lácteas recomendadas para crianças menores de 2 meses sem aleitamento materno: garantia do suporte adequado de vitamina A?.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII CIENTEC - Semana de Ciência, Tecnologia e Cultura da UFRN**, 2011. (Feira)
Importância da Disciplina QUÍMICA ORGÂNICA BIOLÓGICA BÁSICA (QUI0250) no aprendizado dos alunos do curso de nutrição da UFRN na disciplina BIOQUÍMICA XII (DBQ0012).