

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Ricardo Tedesco

Estratégias de Biofortificação do Tomate com Carotenoides

Curitibanos

2023

Ricardo Tedesco

Estratégias de Biofortificação do Tomate com Carotenoides

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitiba, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia

Orientador: Prof. Ivan Sestari, *Ph.D.*

Curitiba

2023

Tedesco, Ricardo
Estratégias de biofortificação do tomate com carotenoides /
Ricardo Tedesco ; orientador, Ivan Sestari, 2023.
38 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Graduação em
Agronomia, Curitibanos, 2023.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Biofortificação. 3. Carotenoides. 4. Tomate.
I. Sestari, Ivan. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Agronomia. III. Título.

RICARDO TEDESCO

Estratégias de Biofortificação do Tomate com Carotenoides

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitiba, 12 de junho de 2023.



Documento assinado digitalmente
DJALMA EUGENIO SCHMITT
Data: 26/06/2023 07:57:22-0300
CPF: ***.180.539-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Djalma Eugênio Schmitt
Subcoordenador do Curso

Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente
Ivan Sestari
Data: 25/06/2023 19:12:14-0300
CPF: ***.813.270-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Ivan Sestari
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Viviane Glaser
Data: 25/06/2023 20:37:29-0300
CPF: ***.715.429-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof^a. Dr^a. Viviane Glaser
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
YURI PSCHIEDT
Data: 24/06/2023 09:18:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eng. Agr. Yuri Pscheidt
Membro da banca examinadora
Japan Tobacco Internacional

RESUMO

O tomate é amplamente consumido no mundo em função do sabor e do conteúdo de carotenoides. Os carotenoides são hidrocarbonetos essenciais para a saúde humana como potentes antioxidantes e alguns como precursores da vitamina A. Doenças associadas à deficiência de vitamina A, como a xerofthalmia, ou decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio, como câncer e aterosclerose, podem ser evitadas ou ter ocorrência reduzida a partir da ingestão de vegetais ricos em carotenoides. A biofortificação do tomate com carotenoides é uma das estratégias para combater problemas de saúde via base alimentar da população mais pobre e para atender à crescente demanda por tomates mais nutritivos, ricos em compostos bioativos. O presente trabalho buscou revisar o atual estado da arte envolvendo estratégias de biofortificação do tomate com carotenoides. O melhoramento clássico via seleção, cruzamento, retrocruzamento, entre outros, utiliza variabilidade genética e alelos mutantes para modificar o teor, o perfil e a estabilidade de carotenoides no tomate. Algumas mutações em tomateiro, como *Beta carotene* e *tangerine*, que afetam a via de biossíntese de carotenoides, podem ser utilizadas para modificar o padrão de acúmulo destes compostos no tomate. Mutações que amplificam o sinal luminoso, como *high pigment 1* e *high pigment 2*, incrementam carotenoides pelo maior desenvolvimento dos cloroplastos, que se tornam cromoplastos durante o amadurecimento. Abordagens biotecnológicas de edição gênica, como uso de RNA de interferência para silenciamento de genes negativos ao acúmulo de carotenoides, podem ser utilizadas em programas de biofortificação e levam à resultados mais céleres. A baixa aceitação de produtos transgênicos pelos consumidores e a barreira legal para liberação de organismos geneticamente modificados limitam o desenvolvimento de cultivares via biotecnologia. O tomate biofortificado com carotenoides é uma maneira viável de prevenir e combater algumas doenças decorrentes da má nutrição, contudo, requer mais atenção dos programas de melhoramento e a superação de barreiras legais e sociais.

Palavras-chave: Biofortificação, Tomate, Carotenoides, Melhoramento, Engenharia genética.

ABSTRACT

Tomatoes are widely consumed worldwide due to their taste and carotenoid content. Carotenoids are hydrocarbons essential for human health, acting as potent antioxidants and some serving as precursors to vitamin A. Diseases associated with vitamin A deficiency, such as xerophthalmia, or those resulting from the action of reactive oxygen species, such as cancer and atherosclerosis, can be prevented or reduced by consuming vegetables rich in carotenoids. Biofortification of tomatoes with carotenoids is one of the strategies to address health problems through the food base of the poorer population and to meet the growing demand for more nutritious tomatoes, rich in bioactive compounds. This study aimed to review the current state of the art regarding biofortification strategies of tomatoes with carotenoids. Classic breeding methods, such as selection, crossbreeding, backcrossing, among others, utilize genetic variability and mutant alleles to modify the content, profile, and stability of carotenoids in tomatoes. Certain mutations in tomato plants, such as *Beta carotene* and *tangerine*, which affect the carotenoid biosynthesis pathway, can be employed to alter the pattern of carotenoid accumulation in tomatoes. Mutations that enhance light signaling, such as *high pigment 1* and *high pigment 2*, increase carotenoids through the greater development of chloroplasts, which transition into chromoplasts during ripening. Biotechnological approaches to gene editing, such as the use of RNA interference to silence genes that negatively affect carotenoid accumulation, can be utilized in biofortification programs and lead to faster results. The low acceptance of genetically modified products by consumers and the legal barrier to the release of genetically modified organisms limit the development of cultivars through biotechnology. Biofortified tomatoes with carotenoids offer a viable way to prevent and combat some diseases resulting from malnutrition; however, they require more attention from breeding programs and overcoming legal and social barriers.

Keywords: Biofortification, Tomato, Carotenoids, Breeding, Genetic engineering.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	OBJETIVOS.....	8
1.1.1	Objetivo Geral	8
1.1.2	Objetivos específicos.....	8
1.2	JUSTIFICATIVA.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	A IMPORTÂNCIA DO TOMATE	10
2.2	CAROTENOIDES	10
2.2.1	A rota biossintética de carotenoides	11
2.2.2	Os plastídios e sua relação com os carotenoides.....	13
2.2.3	Carotenoides e a saúde humana.....	15
2.3	BIOFORTIFICAÇÃO	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
4.1	MELHORAMENTO GENÉTICO CONVENCIONAL NA BIOFORTIFICAÇÃO	21
4.1.1	Variabilidade genética	21
4.1.2	Mutações que afetam a carotenogênese.....	22
4.1.3	Mutações que afetam a sinalização luminosa	23
4.1.4	Piramidação de alelos.....	25
4.2	MODIFICAÇÃO GENÉTICA NA BIOFORTIFICAÇÃO	25
4.3	PERSPECTIVAS FUTURAS	28
5	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta pertencente à família *Solanaceae*, considerada uma das hortaliças mais cultivadas no mundo, cujo fruto é apreciado e amplamente consumido na forma *in natura* ou processada (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). A produção brasileira de tomate no ano de 2021 foi de 3.679.160 toneladas, configurando o Brasil como décimo maior produtor mundial (IBGE, 2022). O consumo de tomate está relacionado com o sabor e seu valor nutricional, com destaque para o conteúdo de carotenoides (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

Os carotenoides são micronutrientes importantes para a saúde humana e tornam o tomate um alimento funcional. Compostos como o β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina atuam como precursores da vitamina A no organismo humano (provitamina A), a qual desempenha papel fundamental no funcionamento do aparato visual, tecido epitelial e mucosas (QUEIROZ *et al.*, 2013). A síndrome xerofáltica é uma doença que afeta os olhos, levando à problemas de cegueira noturna até ceratomalácia, causada pela deficiência de vitamina A (DVA) (DINIZ; SANTOS, 2000). Outros sintomas relacionados à DVA são tosse, diarreia, litíase urinária, perda de integridade e defesa de mucosas, oriundos de problemas na formação e manutenção do tecido epitelial e de mucosas (HUANG *et al.*, 2018). No Brasil, a DVA é considerada um problema de saúde pública nas regiões Nordeste, Norte e em alguns lugares do Sudeste, além de afetar mais gravemente a população mais pobre (SANTOS *et al.*, 1996).

Outro fator importante é o potencial antioxidante dos carotenoides, que os torna importantes agentes sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas altamente reativas geradas pelo organismo humano (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os cânceres de próstata, pulmão, estômago, fígado e mama tem causa relacionada à ação das ERO na molécula de DNA (WARIS; AHSAN, 2006). Doenças cardiovasculares, como a arterial coronariana, e problemas neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer e de Parkinson, estão associadas a interações das ERO com membranas celulares, enzimas ou ácidos nucleicos (CHEN; GUO; KONG, 2012).

Os problemas de saúde mencionados podem ser evitados ou ter riscos de ocorrência reduzidos a partir do consumo de vegetais ricos em carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Com isso, a biofortificação do tomate com carotenoides surge como uma opção de combate aos problemas de saúde em questão (MENG *et al.*, 2022; MORELLI; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2023). O arroz dourado é um exemplo de biofortificação, onde genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de carotenoides

foram introduzidos no arroz e promovem um acúmulo elevado de β -caroteno no grão (SHWETHA *et al.*, 2020). A batata doce alaranjada é outro exemplo onde os programas de melhoramento desenvolveram cultivares com elevado teor de β -caroteno para combater problemas de DVA em alguns países da África (NEELA; FANTA, 2019).

O desenvolvimento de cultivares de tomate biofortificadas permite o acesso da população a um alimento rico em carotenoides, acessível e de custo relativamente baixo, atendendo à demanda crescente por tomates ricos em compostos bioativos (MENG *et al.*, 2022; SOUZA; VILAS BOAS, 2002). O enriquecimento nutricional do tomate com carotenoides específicos pode ser conduzido mediante manipulação de genes que codifiquem enzimas atuantes na biossíntese dos diferentes carotenoides, permitindo o direcionamento do acúmulo de isômeros com maior potencial antioxidante ou com ação provitamina A (CARVALHO *et al.*, 2011; ISAACSON *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2015; RONEN *et al.*, 2000). Entretanto, os entraves legais, a baixa aceitação dos alimentos transgênicos pela população e a possibilidade das cultivares não alcançarem produtividades tão elevadas mostram-se como dificuldades para o desenvolvimento e produção do tomate biofortificado (ILAHY *et al.*, 2017; MORELLI; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2022; ZHENG; GIULIANO; AL-BABILI, 2020).

Considerando a vasta literatura disponível, relatando formas de alteração do perfil, teor e estabilidade de carotenoides no tomate, as vantagens e as dificuldades no desenvolvimento de cultivares biofortificadas, o presente trabalho buscou revisar o atual estado da arte referente às estratégias e abordagens passíveis de uso para a biofortificação do tomate com carotenoides.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Apresentar o atual estado da arte sobre a biofortificação do tomate com carotenoides.

1.1.2 Objetivos específicos

- Compilar informações sobre a utilização da variabilidade genética na biofortificação do tomate com carotenoides.
- Compilar informações referentes à modificação genética em tomateiro para biofortificação com carotenoides.

- Discutir as perspectivas futuras sobre o tema.

1.2 JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por frutas e hortaliças enriquecidos nutricionalmente é uma realidade no Brasil e no mundo, abrindo nichos de mercado para consumidores mais atentos à alimentação saudável. Tal cenário estimula pesquisas de melhoramento genético para a geração de materiais que atendam a demanda dos consumidores.

Um dos alimentos mais consumidos no mundo e com valor nutricional elevado é o tomate, com destaque para o conteúdo elevado de carotenoides. As propriedades do tomate trazem foco para programas de biofortificação com carotenoides.

Devido à escassez de trabalhos, especificamente abordando as diversas estratégias de biofortificação do tomate com carotenoides, o presente trabalho buscou compilar informações referentes ao atual estado da arte sobre o tema.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A IMPORTÂNCIA DO TOMATE

O tomate é considerado uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas do mundo, presente na mesa do consumidor na forma *in natura* ou processada na forma de molhos, extrato, *ketchup*, desidratado, entre outros (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). O Brasil é o décimo maior produtor mundial de tomates, totalizando 3.679.160 toneladas cultivadas em 54.343 hectares em 2021 (IBGE, 2022). A produção brasileira é dividida em tomate tutorado, com grande participação da agricultura familiar, visando o comércio *in natura*, e o tomate rasteiro, para processamento industrial (RUBIN *et al.*, 2019).

O grande consumo do tomate no mundo se dá pelo sabor amplamente apreciado, pela diversidade de aplicações na culinária e pelo valor nutricional (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). Fonte de diversos micronutrientes essenciais, o tomate destaca-se pelo conteúdo elevado de carotenoides, tornando-o um alimento funcional, ou seja, que contenha intrinsecamente algum composto que favoreça o bem-estar e a saúde ou reduza os riscos de ocorrência de alguma doença (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

2.2 CAROTENOIDES

Os carotenoides são hidrocarbonetos de 40 carbonos, classificados como tetraterpenos, sintetizados em tecidos vegetais fotossintetizantes e não fotossintetizantes. São divididos em dois grupos, os carotenos, compostos apenas por carbono e hidrogênio, e as xantofilas, contendo grupos oxigenados. Apresentam grande número de duplas ligações (insaturações) dispostas em estruturas lineares e ou cíclicas (BRITTON; LIAAEN-JANSEN; PFANDER, 2004).

Com isso, os carotenoides desempenham diversas funções em plantas, relacionadas com suas propriedades antioxidantes, de interação com a luz, de formação de compostos em vias metabólicas e da pigmentação de alguns tecidos não fotossintetizantes (LIU *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante está relacionada com a capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio (ERO), intimamente ligada com o número de duplas ligações conjugadas em carotenoide (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). As ERO são átomos ou moléculas altamente reativas oriundas de vários processos metabólicos com potencial de ocasionar peroxidação de lipídeos de membranas celulares, inativação de enzimas e danos em ácidos

nucléicos. O desbalanço entre a geração de ERO e o sistema antioxidante é denominado estresse oxidativo (STORY *et al.*, 2010). O acúmulo de carotenoides em membranas de plastídios, como a dos tilacóides em cloroplastos, é um dos mecanismos que garante a integridade estrutural das membranas pelo sequestro das ERO (SUN *et al.*, 2018). O oxigênio singlete é uma ERO oriundo da redução do oxigênio, ocorrendo principalmente no centro de reação do aparato fotossintético. Os carotenoides presentes no centro de reação são essenciais para a proteção do aparato a partir do *quenching* do oxigênio singlete (RAMEL *et al.*, 2012).

2.2.1 A rota biossintética de carotenoides

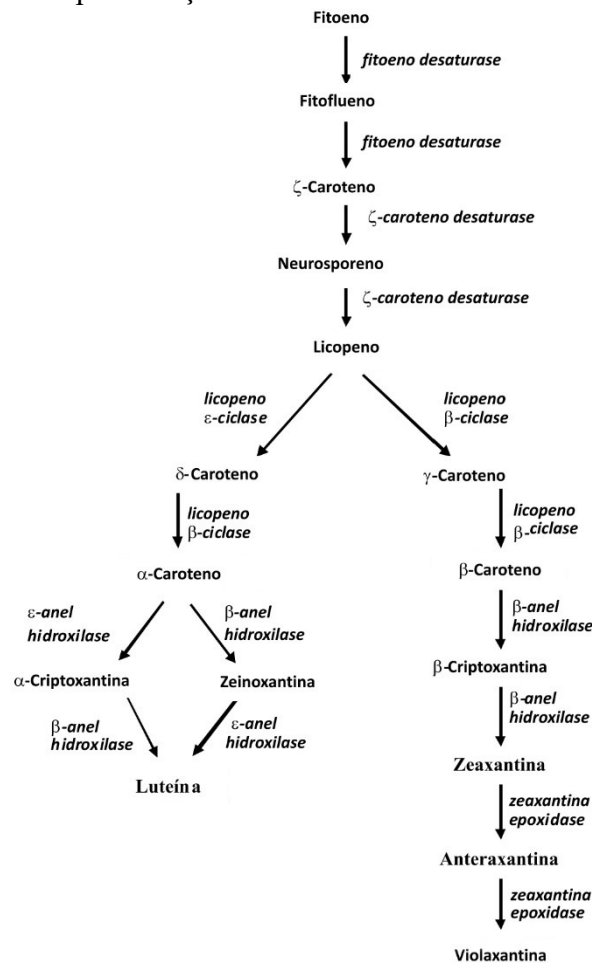
A via de biossíntese de carotenoides ocorre nos plastídios, seguindo a via do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) para formação dos precursores (NISAR *et al.*, 2015). A via tem início na síntese de 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) a partir do piruvato e do gliceraldeído 3-fosfato (G3P), catalisada pela enzima DXP sintase (DXS). Em seguida, a enzima DXP redutoisomerase (DXR) converte o DXP em 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). A enzima MEP citidililtransferase (MCT) transforma o MEP em 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME). Ocorre então a fosforilação do CDP-ME pela ação da enzima CDP-ME quinase (CMK), resultando em CDP-ME 2-fosfato (CDP-MEP). Adiante na via, o composto 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) é sintetizado pela enzima ME-cPP sintase (MDS) a partir do CDP-MEP. Ocorre, então, a síntese de 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato (HMBPP) e sua posterior redução, pela ação das enzimas HMBPP sintase (HDS) e redutase (HDR), respectivamente, formando tanto isopentenil difosfato (IPP) quanto dimetilalilo difosfato (DMAPP) (RUIZ-SOLA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2012).

A via segue com a condensação de três moléculas de IPP e uma de DMAPP para formação do precursor direto dos carotenoides, o geranylgeranyl difosfato (GGPP), reação catalisada pela enzima GGPP sintase (GGDS). Utilizando como substrato duas moléculas de GGPP, a enzima fitoeno sintase (PSY) forma o primeiro carotenoide (C₄₀), o fitoeno. A enzima fitoeno desaturase (PDS) converte, então, o fitoeno em fitoflueno em duas etapas, conforme mostrado na Figura 1. A subsequente isomerização do fitoflueno resulta em ζ-caroteno, catalisada pela enzima 15-cis-ζ-caroteno isomerase (Z-ISO). Também em duas etapas, a enzima ζ-caroteno desaturase (ZDS) converte o ζ-caroteno em tetra-*cis*-licopeno, também chamado de prolicopeno. Em seguida, a isomerização do prolicopeno resulta em *trans*-licopeno, fruto da ação da enzima carotenoide *cis-trans* isomerase (CRTISO) (NISAR *et al.*, 2015).

Os carotenoides são sintetizados em uma rota de via única de reações até a formação do *trans*-licopeno, o qual pode seguir para dois caminhos diferentes. Tais vias são catalisadas por enzimas do tipo ciclase, as quais transformam cadeias lineares de carbono das extremidades do *trans*-licopeno em anéis cíclicos de carbono (RUIZ-SOLA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2012). Um dos caminhos segue pela ação da enzima licopeno- ϵ -ciclase (LCY-e), gerando o δ -caroteno, que pode ser convertido posteriormente em α -caroteno pela ação da enzima licopeno- β -ciclase (LCY-b). O outro caminho se dá pela ação direta da licopeno- β -ciclase, resultando em γ -caroteno e em β -caroteno após uma segunda ação da enzima (NISAR *et al.*, 2015).

A partir do α -caroteno, a ação da enzima β -hidroxilase (β -OHase) dá origem à zeinoxantina, que é convertida, posteriormente, à luteína após a atuação da enzima ϵ -hidroxilase (ϵ -OHase). Partindo do β -caroteno, a molécula β -criptoxantina é formada pela ação da enzima β -OHase, resultando na zeaxantina após uma segunda atuação da enzima em questão. Com a atividade da enzima zeaxantina epoxidase (ZEP), a zeaxantina é convertida para anteraxantina (uma ação da enzima) e, posteriormente, para violaxantina (duas ações da enzima). A violaxantina pode ser convertida, então, para neoxantina pela ação da enzima neoxantina sintase (NXS) (NISAR *et al.*, 2015).

Figura 1 – Representação da via de biossíntese de carotenoides.



Fonte: adaptado de Rodriguez-Amaya; Kimura; Amaya-Farfan, (2008).

2.2.2 Os plastídios e sua relação com os carotenoides

Plastídios são organelas membranosas encontradas em células vegetais com diferentes funções, ocorrendo em plantas na forma de proplastídios, amiloplastos, etioplastos, cloroplastos e cromoplastos. Os proplastídios são estruturas não diferenciadas, formadores de outros plastídios, encontrados em tecidos meristemáticos e de reprodução, entretanto, não tem capacidade de síntese de carotenoides (SUN *et al.*, 2018).

Os amiloplastos são responsáveis pelo acúmulo de reservas, com destaque para o amido, além da atuação no gravitropismo. Apresentam baixos teores de carotenoides devido à baixa capacidade de síntese, restritos ao acúmulo de algumas xantofilas. Os etioplastos são formas intermediárias dos cloroplastos encontrados em tecidos crescidos no escuro, os quais também apresentam baixo teor de carotenoides (SUN *et al.*, 2018).

Os cloroplastos são plastídios fotossintetizantes, responsáveis pelo acúmulo de clorofila e outros pigmentos que, junto de estruturas especializadas, participam da captação da radiação eletromagnética e transformação da energia luminosa em química. Apresentam alta síntese de carotenoides para composição da membrana dos tilacoides, onde atuarão como pigmentos protetores do aparato fotossintético (NISAR *et al.*, 2015). A formação dos cloroplastos depende das respostas das plantas à luz (fotorresposta), as quais compreendem uma cadeia de reações estimuladas pela percepção de comprimentos de onda específicos pelos fotorreceptores, culminando em uma resposta fisiológica. Os fotorreceptores são moléculas responsáveis pela percepção da luz em plantas (CHRISTIE, 2017).

A pigmentação de algumas flores e frutos é causada pelo acúmulo de carotenoides nos cromoplastos, gerando benefícios ecológicos (RONEN *et al.*, 2000). Estes plastídios são originários da conversão de cloroplastos em cromoplastos durante o amadurecimento do tomate (EGEA *et al.*, 2010). Em alguns casos, os cromoplastos podem ser originados a partir dos proplastídios e dos amiloplastos, como em raízes de cenouras e flores de açafreão, respectivamente (SUN *et al.*, 2018).

No estágio *breaker*, durante o amadurecimento do tomate, algumas mudanças nos cloroplastos dão origem aos cromoplastos. Inicialmente, os grânulos de amido nos cloroplastos, oriundos da atividade fotossintética, são degradados para a formação de açúcares menores. Simultaneamente, novas membranas são formadas derivadas do envelope membranoso interno, as quais auxiliam na agregação de carotenoides em estruturas compactas (PESARESI *et al.*, 2014).

A mudança gradativa na coloração verde do tomate para vermelha ocorre devido à degradação da clorofila aliada à síntese de carotenoides, com predominância do isômero vermelho do licopeno (SADALI *et al.*, 2019). Podemos observar uma sincronia entre a degradação da clorofila e a síntese de carotenoides a nível celular, entretanto, o processo não apresenta tal sincronia a nível tecidual, o que pode ser observado no estágio *breaker* com regiões do tomate mais avermelhadas ou esverdeadas que outras (EGEA *et al.*, 2011).

Os plastoglóbulos são uma das estruturas encontradas em plastídios, responsáveis por transportar e armazenar carotenoides. Em cloroplastos, os plastoglóbulos transportam os carotenoides sintetizados no envelope membranoso até o complexo de membranas dos tilacoides, sítio de ação dos compostos (EGEA *et al.*, 2010). Durante a transição, os plastoglóbulos aumentam em número e tamanho, formando estruturas de sequestro de carotenoides (PESARESI *et al.*, 2014). Em etapas posteriores, o conjunto de membranas dos tilacoides sofre degradação (EGEA *et al.*, 2010).

A conversão de cloroplastos em cromoplastos é um fator importante no acúmulo de carotenoides, visto que a capacidade de síntese e armazenamento dos compostos depende de condições estruturais do plastídio, como tamanho e número. Tais condições são mudanças que ocorrem em cloroplastos e são mantidas após a conversão, mostrando que um maior número e tamanho de cloroplastos resultam em cromoplastos maiores e em maior número (EGEA *et al.*, 2010; MUSTILLI *et al.*, 1999). As alterações estruturais mencionadas são, em parte, de origem genética estimulada pela luz (fotorresposta), mostrando que a manipulação da transdução do sinal luminoso pode aumentar o acúmulo de carotenoides no tomate (ALVES *et al.*, 2020). Mustilli *et al.* (1999) mostraram um incremento no teor de carotenoides em mutantes de tomateiro que amplificam o sinal luminoso e, conseqüentemente, o número e o tamanho de cloroplastos.

A estabilidade dos carotenoides em plastídios possui relação direta com seu acúmulo, visto que a degradação em vias metabólicas reduz sua concentração. Algumas estruturas encontradas em plastídios são responsáveis por sequestrar estes compostos, impedindo, em grande parte, sua degradação (TORRES-MONTILLA; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2021).

Em cromoplastos, os plastoglóbulos mantêm a estabilidade dos carotenoides, além do número e tamanho aumentarem, incrementando seu potencial de sequestro. Pesquisas mostraram que, durante a formação do cromoplasto, o complexo membranoso dos tilacoides sofre degradação enzimática, formando remanescentes estruturais utilizados, em parte, para formação de novos plastoglóbulos (TORRES-MONTILLA; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2021). Powell *et al.* (2012) mostraram que, em mutantes de tomateiro que aumentam o número de tilacoides por *granum* (conjunto empilhado de tilacoides), o teor de carotenoides em frutos maduros sofreu incremento significativo, reforçando a importância da capacidade de sequestro destes compostos em frutos.

2.2.3 Carotenoides e a saúde humana

De modo geral, animais não possuem a capacidade de biossíntese de carotenoides, o que torna a ingestão destes compostos essencial para as funções do organismo (FRASER; BRAMLEY, 2004). Os carotenoides mais comuns são o β -caroteno, de cor laranja, e o licopeno, de coloração vermelha, encontrados em grandes quantidades na cenoura e no tomate, respectivamente. Entretanto, carotenoides como α -caroteno, luteína, β -criptoxantina e zeaxantina são encontrados em diversos vegetais e também desempenham papel importante no

sistema antioxidante e alguns na ação provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

O retinol (vitamina A) é essencial para os seres humanos para a integridade epitelial, funcionamento do sistema imunológico e manutenção do aparato visual (QUEIROZ *et al.*, 2013). As fontes de vitamina A podem ser de origem animal, como fígado, ovos e peixes, ou vegetal, como frutas e hortaliças ricas em β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina. Esses carotenoides apresentam ação provitamina A, ou seja, são convertidos enzimaticamente a retinol pelo organismo. O β -caroteno pode ser clivado e gerar duas moléculas de retinol, enquanto outros carotenoides precursores da vitamina A produzem apenas uma (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). De modo geral, vegetais ricos em tais compostos são fontes de menor custo do nutriente e, portanto, mais acessíveis ao consumidor de baixa renda (SOUZA; VILAS BOAS, 2002).

Uma das principais causas da deficiência de vitamina A (DVA) está relacionada à ingestão inadequada do composto ou de provitamina A, podendo levar à quadros graves de saúde, sobretudo em crianças (MILAGRES; NUNES; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007). No Brasil, a DVA é um problema de saúde pública nas regiões Nordeste, Norte e em algumas localidades da região Sudeste. A camada mais pobre da população é, em grande parte, a mais afetada, devido à falta de alimentação balanceada e de qualidade (SANTOS *et al.*, 1996).

Um dos problemas associados à DVA envolve sintomas no aparato visual (síndrome xeroftálmica), iniciando com quadros de cegueira noturna, podendo evoluir para a redução na produção de muco e secando algumas estruturas da córnea (xerose corneal). Em casos mais graves há a formação de úlceras de córnea e degradação do estroma da córnea, denominada ceratomalácia (DINIZ; SANTOS, 2000). A DVA apresenta maior risco em puérperas, visto que a demanda por vitamina A aumenta, e recém-nascidos, pois o leite materno pode tornar-se carente de níveis adequados do composto (RAMALHO *et al.*, 2006). Na maioria dos casos uma alimentação capaz de suprir as exigências em vitamina A pode reverter os sintomas da DVA, contudo, em casos mais graves os danos podem ser irreversíveis (MILAGRES; NUNES; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007).

A vitamina A atua como promotor e componente de mucosas, sendo que, sob deficiência, pode resultar na falta de defesa mecânica da mucosa oral e problemas na integridade do muco intestinal. O tecido epitelial pode ser prejudicado em casos de DVA, levando à sintomas de diarreia, tosse, opacidade corneal e litíase urinária (HUANG *et al.*, 2018).

Além da atividade provitamina A os carotenoides atuam no sistema antioxidante do organismo, sequestrando ERO gerados pelo metabolismo. Assim como em plantas, peroxidação

lipídica, inativação de enzimas e danos aos ácidos nucleicos podem ocorrer a partir do estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As ERO atuam de diferentes maneiras no organismo humano, como na modificação da estrutura do DNA, aumentando os riscos do desenvolvimento de cânceres de mama, próstata, pulmão, estômago e fígado (WARIS; AHSAN, 2006). Algumas doenças cardiovasculares podem ser causadas pela ação das ERO através do espessamento e enrijecimento da parede arterial, como a doença arterial coronariana, uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo Ocidental (BAKAN; AKBULUT; INANÇ, 2014; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004). Além disso, o estresse oxidativo também está relacionado com problemas neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (CHEN; GUO; KONG, 2012).

Outro papel importante dos carotenoides, mais especificamente da luteína e zeaxantina, é a prevenção da catarata e da degeneração macular relacionada à idade, ambas doenças que afetam o aparato visual (BAKAN; AKBULUT; INANÇ, 2014).

Os problemas associados à deficiência de vitamina A e ao estresse oxidativo mostram a importância dos carotenoides na saúde humana e a necessidade de uma alimentação capaz de fornecer as quantidades necessárias destes compostos ao organismo. A inserção de alimentos ricos em carotenoides configura uma das alternativas para a prevenção e ou reversão das doenças em questão (MENG *et al.*, 2022; RAO; RAO, 2007).

2.3 BIOFORTIFICAÇÃO

Biofortificação consiste na introdução ou incremento de nutriente(s) de interesse em algum alimento cultivado via práticas agronômicas (SHWETHA *et al.*, 2020). A biofortificação de alimentos base da dieta é uma estratégia para contornar os problemas oriundos da carência nutricional. Os países com maior índice de pobreza tendem a sofrer mais pela desnutrição, bem como basear sua alimentação em produtos vegetais, principalmente grãos com alto teor de amido. Contudo, tais alimentos contêm teores de nutrientes abaixo do mínimo necessário, não suprimindo de modo adequado a demanda das pessoas (MORELLI; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2023). Algumas abordagens envolvendo adição de nutrientes em alimentos processados auxiliam na solução do problema, mas encontram grande dificuldade em alcançar as regiões rurais. A possibilidade de cultivo de plantas base da alimentação enriquecidas com compostos essenciais permite o alcance das pessoas em zonas rurais (HIRSCHI, 2009; ZHENG; GIULIANO; AL-BABILI, 2020).

Com base no panorama de carência nutricional, a deficiência de vitamina A (DVA) é um problema que afeta, sobretudo, os países em desenvolvimento (BRASIL, 2007; MILAGRES; NUNES; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007). As discussões sobre DVA não são novas, mas ganham cada vez mais espaço por representar um problema de saúde pública em algumas regiões do Brasil para a camada mais pobre da população (REIS *et al.*, 2021; SOUZA; VILAS BOAS, 2002).

Considerando que a DVA pode ser contornada através da alimentação, muito embora casos mais graves possam necessitar de outras ações ou já ter causado danos irreversíveis, a biofortificação surge como uma estratégia de enfrentamento ao problema (BRASIL, 2007). Além da DVA, cada vez mais estudos relevam a atuação das ERO livres na promoção de efeitos deletérios à saúde humana, intimamente correlacionados ao câncer, problemas neurodegenerativos e doenças cardiovasculares (BAKAN; AKBULUT; INANÇ, 2014; MARTELLI; NUNES, 2014; SIES; STAHL, 1995; STORY *et al.*, 2010; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004).

Tais panoramas de saúde abrem espaço para os carotenoides, compostos antioxidantes encontrados em diversos alimentos, além de alguns destes atuarem como precursores da vitamina A no organismo humano. Dentre os alimentos inseridos na dieta cotidiana dos brasileiros capazes de fornecer teores substanciais de carotenoides, o tomate destaca-se como um dos principais (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Alguns países, como as Filipinas, apresentam o arroz (*Oryza sativa* L.) como base na alimentação, o que motivou trabalhos de biofortificação com β -caroteno para suprir a carência de vitamina A da população destes locais. O resultado foi o arroz transgênico carregando genes que codificam enzimas da carotenogênese, denominado arroz dourado (*golden rice*) devido à pigmentação alaranjada do grão por β -caroteno (SHWETHA *et al.*, 2020).

De modo semelhante, a alimentação de vários países, tanto desenvolvidos como em desenvolvimento, apresentam raízes e tubérculos na base alimentar, como a batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) (NEELA; FANTA, 2019). Batatas doce com polpa alaranjada foram encontradas e identificadas como ricas em β -caroteno, sendo prontamente utilizadas em programas de melhoramento genético para geração de cultivares biofortificadas (NESTEL *et al.*, 2006). Os efeitos benéficos do alto teor de provitamina A são visualizados em estudos com as populações de Uganda, Moçambique, Quênia e Nigéria (NEELA; FANTA, 2019).

Estes e outros exemplos, bem como trabalhos com tomateiro relatando formas de incrementar carotenoides no fruto, indicam que a biofortificação do tomate é uma possível

estratégia para atender parte da demanda por frutas e hortaliças mais nutritivas (MENG *et al.*, 2022; MORELLI; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2023; SHWETHA *et al.*, 2020).

Além disso, ao longo das últimas décadas, os melhoristas selecionaram características agronômicas em tomateiro buscando, entre outras, produtividade e vida pós-colheita. Contudo, um dos efeitos negativos do processo foi a redução da qualidade nutricional, como menores teores de nutrientes e compostos voláteis, consequências que dão maior importância aos programas de biofortificação, buscando melhorar características nutricionais e sensoriais (FLORES *et al.*, 2016; GOFF; KLEE, 2006; POWELL *et al.*, 2012).

Outro foco importante da biofortificação é o acúmulo de isômeros de maior interesse, visto que a variação na estrutura molecular dos carotenoides influencia sua atividade provitamina A, seu potencial antioxidante e sua biodisponibilidade (BRITTON; LIAAEN-JANSEN; PFANDER, 2004; LIMA *et al.*, 2012; SHI; LE MAGUER, 2000). A ação da enzima licopeno- β -ciclase produz uma estrutura cíclica denominada anel- β , que confere atividade provitamina A ao isômero. O anel- β perde a atividade quando sofre substituição por grupos oxigenados devido à ação da enzima β -hidroxilase (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006; RUIZ-SOLA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2012). Portanto, o foco na biofortificação para o combate à DVA deve considerar o acúmulo de carotenoides específicos, sobretudo o β -caroteno por apresentar dois anéis- β (PIXLEY *et al.*, 2012; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Além disso, os carotenoides na face *cis* são mais biodisponíveis do que na face *trans* (acúmulo majoritário em tomate), resultado da diferença na propensão à formação de estruturas cristalizadas que reduzem a biodisponibilidade, mostrando outro ponto de interesse aos programas de melhoramento (LIMA *et al.*, 2012; UNLU *et al.*, 2007).

O foco no sequestro de espécies reativas de oxigênio implica no acúmulo de isômeros específicos com maior potencial antioxidante. O licopeno apresenta capacidade de *quenching* do oxigênio singlete superior aos demais carotenoides, além do potencial de sequestro de ERO também ser elevado (SHI; LE MAGUER, 2000). Entretanto, a partir do acúmulo de isômeros variados o potencial antioxidante também é elevado, mostrando uma lógica alternativa ao acúmulo de moléculas específicas (ORSI *et al.*, 2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi elaborado a partir da compilação de informações obtidas em trabalhos científicos, como artigos, trabalhos de conclusão de curso, dissertações, teses, livros, documentos e circulares técnicas. As informações buscadas para elaboração desta revisão bibliográfica englobaram aspectos gerais sobre os carotenoides (conceito, importância, biossíntese e regulação), estratégias de biofortificação do tomate com carotenoides (melhoramento genético convencional e modificação genética) e perspectivas futuras sobre o tema.

A busca dos trabalhos científicos foi realizada sob dois métodos distintos, o primeiro a partir da ferramenta *Google Scholar*, utilizando as palavras-chave “*carotenoid*”, “*biofortification*”, “*tomato mutant*”, “*genetic engineering*”, “*vitamin A*”, “*oxidative stress*” e combinações entre si. O segundo método consiste em buscar artigos relevantes na lista de referências de artigos que abordam temas centrais do presente trabalho,

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MELHORAMENTO GENÉTICO CONVENCIONAL NA BIOFORTIFICAÇÃO

4.1.1 Variabilidade genética

A variabilidade genética é um recurso valioso para os programas de melhoramento, permitindo a seleção de características de interesse em indivíduos e posterior utilização. Alguns trabalhos buscaram quantificar e classificar a variabilidade genética de genótipos de tomateiro para fins de melhoramento (FLORES *et al.*, 2016; KHAVITHA *et al.*, 2013).

Características de qualidade nutricional foram avaliadas em 16 variedades de tomateiro populares do leste da Espanha, buscando fornecer informações para o cultivo local ou melhoramento genético. Algumas variedades apresentaram teores elevados de licopeno ou de β -caroteno, com destaque para um acesso que apresentou ambos em níveis elevados, potencial fonte de material para biofortificação (CORTÉS-OLMOS *et al.*, 2014).

Com um total de 54 genótipos de tomateiro, uma pesquisa na Índia buscou avaliar parâmetros de qualidade nutricional de cultivares comerciais, híbridos comerciais, tomateiros tipo cereja, acessos de bancos de germoplasma (incluindo espécies de tomateiros selvagens) e híbridos de variedades não comerciais. Dentre os resultados, teores elevados de carotenoides foram encontrados em diversos genótipos diferentes, com ampla variabilidade, além de conteúdos elevados de licopeno em tomateiros tipo cereja, também apresentando altos teores de β -caroteno em genótipos de coloração alaranjada (KAVITHA *et al.*, 2013).

Analisando 53 acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) para avaliação da variabilidade genética, Flores *et al.* (2016) observaram, em pesquisa na Espanha, além de outras características, uma grande divergência entre os acessos em relação ao conteúdo de carotenoides. Os resultados mostraram variações em termos quantitativos e qualitativos, com mudanças no conteúdo e perfil de carotenoides, representando uma fonte de material para programas de melhoramento e cultivo a campo (FLORES *et al.*, 2016).

A partir de 28 acessos de genótipos de tomateiro tradicionalmente cultivados na região do mediterrâneo sob restrição hídrica, uma pesquisa na Itália realizou análise do conteúdo de carotenoides mostrou grande diversidade em perfil e composição, com genótipos alcançando até três vezes mais carotenoides totais em relação a outros. Tais perspectivas possibilitam a

seleção de genótipos mais ricos nutricionalmente e com características de resistência à seca (SIRACUSA *et al.*, 2018).

Em pesquisa com híbridos de tomate salada indeterminados do Programa de Melhoramento Genético de Tomateiro da Universidade Federal de Uberlândia, avaliou-se o conteúdo de licopeno e β -caroteno em frutos. Os valores encontrados mostraram diferença significativa para ambas as moléculas em relação à cultivar comercial utilizada como parâmetro (BITENCOURT *et al.*, 2019).

A Embrapa Hortaliças desenvolveu uma das primeiras cultivares nacionais de tomateiro com alto teor de licopeno no fruto, denominada BRS San Vito. O material em questão é um híbrido (F1) gerado a partir do cruzamento de duas variedades selecionadas pela no programa de melhoramento (CARVALHO *et al.*, 2006). Outra cultivar da Embrapa com foco semelhante é a BRS Tospodoro, desenvolvida a partir da seleção de acessos, capaz de acumular teor elevado de licopeno no fruto (GIORDANO *et al.*, 2010). Na linha de tomates tipo cereja, a Embrapa desenvolveu o híbrido BRS Zamir, com foco também no licopeno. Quando comparamos alguns materiais da Embrapa, considerando tipos iguais e anos de lançamento semelhantes, podemos observar que as produtividades de materiais ricos em licopeno são relativamente menores, permitindo reflexões sobre a adesão dos produtores à estas cultivares (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2014).

4.1.2 Mutações que afetam a carotenogênese

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) apresenta uma série de alelos que alteram o fenótipo da planta, desde mutações hormonais, na biossíntese de compostos, no padrão de crescimento e desenvolvimento, entre outros (CARVALHO *et al.*, 2011). Alguns destes mutantes afetam diretamente a biossíntese de carotenoides, levando a diferenças no acúmulo e no perfil destes compostos em frutos (RONEN *et al.*, 2000). Considerando as propriedades observadas de tais alelos, podemos utilizar seus efeitos em tomates visando a biofortificação. A partir de uma série de retrocruzamentos podemos introgridir o alelo desejado em um determinado *background* genético (BORDIGNON, 2015).

Dentre os mutantes em questão, o alelo recessivo *tangerine* (*t*) leva à perda de função da enzima carotenoide *cis-trans* isomerase (CRTISO), responsável pela conversão do tetra-*cis*-licopeno (prolicopeno) em *trans*-licopeno. Os frutos apresentam acúmulo elevado de prolicopeno em detrimento de *trans*-licopeno, levando a tomates de coloração alaranjada ao invés de vermelha. O prolicopeno acumulado apresenta maior biodisponibilidade e potencial

antioxidante que os isômeros *trans*, aumentando significativamente o valor nutricional do fruto (ISAACSON *et al.*, 2002). Além do aumento de prolicopeno, carotenoides como fitoflueno, ζ -caroteno e neurosporeno, sintetizados a montante de tetra-*cis*-licopeno, sofreram incremento significativo, ampliando a diversidade de acúmulo no fruto (ORSI *et al.*, 2021).

O alelo dominante *Beta carotene* (*B*) afeta a biossíntese de carotenoides a partir do aumento da atividade da enzima licopeno- β -ciclase (LCY-b) específica de cromoplasto. Em tomateiros sem o alelo mutado, o β -caroteno compõe de cinco a 10% do total de carotenoides no fruto, já os que o carregam podem alcançar de 45 a 50%. A biossíntese é afetada pela enzima em questão, que converte quase todo o licopeno do fruto em β -caroteno, resultando em um fruto com coloração alaranjada (RONEN *et al.*, 2000). Sestari *et al.* (2014) relatou que o mutante *B* apresentou três vezes mais β -caroteno quando comparado ao controle em um mesmo *background* genético.

Além de *Beta carotene*, outro alelo afeta a enzima licopeno- β -ciclase, neste caso conferindo perda de função, chamado *old gold* (*og*). Seu efeito promove um acúmulo massivo de licopeno no fruto, visto que ambos os caminhos sequenciais da rota metabólica do licopeno dependem da atuação da licopeno- β -ciclase, conferindo coloração vermelho escuro aos frutos (NISAR *et al.*, 2015; RONEN *et al.*, 2000).

Semelhante ao *B*, o alelo *Delta carotene* (*Del*) promove o aumento da atividade da enzima licopeno- ϵ -ciclase, resultando em frutos alaranjados devido aos teores elevados de δ -caroteno em detrimento do licopeno (RONEN *et al.*, 1999). O potencial antioxidante da cultivar Micro-Tom carregando o alelo *Del* foi elevado em relação ao controle (ORSI *et al.*, 2021).

O fenótipo de *high pigment 3* (*hp3*) é causado pela mutação no gene que codifica a enzima zeaxantina epoxidase (ZEP). O fenótipo observado em *hp3* mostrou um acúmulo maior de carotenoides, sobretudo licopeno, e um aumento no tamanho dos plastídios, o que permite maior acúmulo destes compostos. A baixa atividade da ZEP reduz a quantidade de violaxantina e neoxantina nos tecidos, que são precursores do ácido abscísico (ABA); os níveis reduzidos de ABA no mutante *hp3* estimulam o desenvolvimento dos cloroplastos, permitindo uma maior síntese e acúmulo de carotenoides após a conversão para cromoplastos (GALPAZ *et al.*, 2008).

4.1.3 Mutações que afetam a sinalização luminosa

O mutante *high pigment 1* (*hp1*) afeta o gene UV-DAMAGED DNA-BINDING PROTEIN 1 (DDB1), prejudicando a síntese de um repressor da fotomorfogênese (LIEBERMAN *et al.*, 2004). O fenótipo da planta carregando o alelo apresenta coloração verde

intensa em folhas, caule e frutos imaturos, além da pigmentação acentuada em frutos maduros devido ao acúmulo elevado de carotenoides (AZARI *et al.*, 2010). A mutação afeta a transdução do sinal luminoso, aumentando o número de plastídios por célula, consequentemente ampliando a síntese e acúmulo de carotenoides (LIU *et al.*, 2015).

O alelo recessivo *high pigment 2* (*hp2*) apresenta um fenótipo causado pela resposta exagerada ao sinal luminoso, resultando em tomateiros com maior acúmulo de clorofila em folhas e caule, antocianinas em hipocótilos e clorofila, carotenoides e ácido ascórbico em frutos. O teor de clorofila elevado em tomateiros carregando o alelo *hp2* resulta em um fenótipo verde escuro aos tecidos fotossintetizantes (BINO *et al.*, 2005). A mutação afeta o gene responsável pela síntese de um repressor da fotomorfogênese em tomateiro, caracterizado como gene homólogo ao DE-ETIOLATED1 (DET1) em *Arabidopsis*. O gene funcional regula a transdução do sinal luminoso do fitocromo, um fotorreceptor que percebe os comprimentos de luz vermelho e vermelho extremo, tornando o mutante hiperresponsivo à luz (MUSTILLI *et al.*, 1999). A síntese prejudicada do repressor regula positivamente as respostas do tomateiro ao sinal luminoso, incluindo a síntese de clorofila e a conformação estrutural dos cloroplastos. Pesquisas revelaram mudanças significativas no conteúdo de clorofila em frutos verdes em *hp2*, com aumento de 2,9 vezes o valor observado em relação ao controle. Somado a isso, o conteúdo de carotenoides em frutos maduros foi maior em *hp2*, resultado do aumento do tamanho e número dos cloroplastos no mutante. Análises mais apuradas mostraram que o mutante *hp2* não acumula apenas mais clorofila, mas sim apresenta uma regulação positiva afetando todo o complexo coletor de luz, composto de clorofila a, clorofila b e carotenoides (BINO *et al.*, 2005; EGEE *et al.*, 2010). Além das mudanças em cloroplastos, outro fator que favorece o acúmulo de carotenoides em mutantes *hp2* está relacionado com a enzima fitoeno sintase (PSY) (SCHOFIELD; PALIYATH, 2005). A atividade da PSY é regulada pelo sinal luminoso percebido pelo fotorreceptor fitocromo, portanto, o caráter de hiperresponsividade do mutante *hp2* à luz resulta na regulação positiva da atividade da PSY e, consequentemente, em um maior conteúdo de carotenoides em frutos (KOLOTILIN *et al.*, 2007).

Algumas cultivares biofortificadas, chamadas *high-lycopene tomato* (HLT), tem sido cultivadas em países como a Tunísia para atender à demanda por tomates de alta qualidade nutricional. Os programas de melhoramento que originaram as cultivares HLT utilizaram como base os alelos *high pigment*, capazes de ampliar o acúmulo de licopeno e de outros compostos nutricionais importantes no tomate (ILAHY *et al.*, 2016). Entretanto, a produtividade das cultivares HLT nem sempre superam as demais no mercado, demarcando uma barreira para a utilização dos materiais (ILAHY *et al.*, 2017).

Outro alelo de destaque é o *Uniform ripening* (*U*), que confere ao fruto verde do tomateiro um gradiente de clorofila, com tonalidade mais escura na região proximal e mais clara na região distal, formando o fenótipo denominado de “ombro verde”. O alelo recessivo (*u*) é utilizado comercialmente para facilitar a identificação de ponto de maturação, devido ao fenótipo de coloração verde clara uniforme em todo o fruto, no entanto, apresenta teores de açúcares reduzidos no fruto, além de um conteúdo menor de carotenoides em relação ao alelo selvagem (POWELL *et al.*, 2012). O fenótipo de *U* é resultado da expressão do gene GOLDEN2-LIKE (GLK2), o qual regula a intensidade e padrão de distribuição da clorofila no fruto verde, cuja expressão é quase oito vezes maior na região proximal do fruto em relação à região distal (POWELL *et al.*, 2012). Pesquisas mostraram que o alelo selvagem gera um maior número de cloroplastos por célula e de tilacoides por *granum*, o que aumenta o conteúdo e a estabilidade de carotenoides em frutos maduros (NGUYEN *et al.*, 2014; POWELL *et al.*, 2012).

4.1.4 Piramidação de alelos

A piramidação de alelos consiste no acúmulo de genes em um mesmo *background* genético (BORGES, 2016). Kuzyomenskii (2008) verificou o efeito da combinação entre os alelos *Beta carotene* e *high pigment 2*, encontrando um teor de β -caroteno no duplo mutante maior em relação aos parentais, mostrando atuação sinérgica entre os genes. De modo semelhante, Pscheidt (2020) mostrou um efeito positivo na combinação dos alelos *Beta carotene* e *tangerine* com *high pigment 2*, com melhorias significativas em parâmetros de qualidade nutricional em frutos.

A piramidação de alelos foi utilizada para a geração de um quádruplo mutante, denominado “*xantomato*” (nome em referência ao acúmulo elevado de xantofilas), oriundo da união dos alelos *high pigment 2*, *high pigment 3*, *Beta carotene* e *green stripe* (*gs*). O efeito do alelo *gs* não é plenamente conhecido, mas aumenta a síntese ou a atividade de enzimas da carotenogênese. A partir do direcionamento do carbono para formação de β -caroteno e zeaxantina e uma intensificação do processo mediada pelos alelos *hp2* e *gs*, o resultado foi um fruto rico em zeaxantina (KARNIEL *et al.*, 2020).

4.2 MODIFICAÇÃO GENÉTICA NA BIOFORTIFICAÇÃO

Com o advento da biotecnologia a biofortificação ganhou uma nova abordagem, a produção de organismo geneticamente modificados (OGM). A modificação genética consiste em alterar o material genético de organismos de um modo que não ocorreria naturalmente por cruzamento ou recombinação gênica, sendo uma opção sólida para a biofortificação de carotenoides em plantas sem variabilidade natural em relação ao acúmulo destes compostos, permitindo o desenvolvimento de tecidos ricos via manipulação genética (SHWETHA *et al.*, 2020). No entanto, a possibilidade de uso em tomate não é limitada pela questão anterior, visto que as opções de uso da abordagem biotecnológica são amplas, garantindo um aporte ainda maior de carotenoides no fruto (LI *et al.*, 2018).

A modificação genética permite a geração de materiais biofortificados com maior celeridade quando comparada ao melhoramento clássico (ZHENG; GIULIANO; AL-BABILI, 2020). Contudo, algumas barreiras dificultam a geração de materiais geneticamente modificados, como a regulação para atender à legislação vigente, o ferramental tecnológico necessário e a barreira social, advinda da baixa aceitação de alimentos transgênicos pelos consumidores (MORELLI; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2022). No dia 21 de julho de 2021, o órgão de biossegurança das Filipinas aprovou o cultivo comercial do arroz dourado (transgênico), desenvolvido há mais de 20 anos, o que mostra a dificuldade de superação da barreira legal (RÜEGG, 2022). Culturas biofortificadas podem não responder positivamente em relação aos parâmetros agrônômicos esperados pelos produtores, como a produtividade, o que pode desestimular a produção de eventuais cultivares, como o caso dos materiais HLT (não transgênicos) (ILAHY *et al.*, 2017; ZHENG; GIULIANO; AL-BABILI, 2020).

Alguns trabalhos foram conduzidos promovendo modificações em tomateiro e obtiveram incrementos em parâmetros quantitativos e qualitativos de carotenoides. Considerando as técnicas utilizadas e os genes manipulados, tais trabalhos mostram estratégias passíveis de adoção em programas de biofortificação (DAVULURI *et al.*, 2005; FRASER *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2018; LUO *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2012).

Uma das abordagens é o uso de RNA de interferência (RNAi), que permite o silenciamento de genes que afetem negativamente o acúmulo de carotenoides (FRANÇA *et al.*, 2010). O silenciamento do gene STAY-GREEN (SGR), cujo produto gênico promove a repressão da fitoeno sintase e, conseqüentemente, redução da síntese de carotenoides, promoveu um aumento no licopeno e β -caroteno de quatro e nove vezes, respectivamente (LUO *et al.*, 2013).

Também utilizando o silenciamento por RNAi, o gene NCED1, responsável pela produção da enzima 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenase 1, foi inibido e resultou em tomates

com acúmulo elevado de licopeno e β -caroteno, apresentando coloração vermelha intensa; o fenótipo observado ocorre devido à regulação positiva das enzimas iniciais da via dos carotenoides (SUN *et al.*, 2012). Intensificação do conteúdo semelhante à observada por Davuliri *et al.* (2005), que promoveu o silenciamento do gene DET1 (defeituoso no mutante *hp2*) e observou mudanças significativas em parâmetros nutricionais.

Outra abordagem promove a inserção de genes via *Agrobacterium tumefaciens* no genoma do tomateiro (ECK; KEEN; TIAHJADI, 2019). D'Ambrosio *et al.* (2004) mostraram que a superexpressão do gene que codifica a enzima licopeno- β -ciclase amplifica a conversão de licopeno em β -caroteno, enriquecendo os frutos em provitamina A. Fraser *et al.* (2007) mostraram o efeito da superexpressão do gene PSY1, responsável pela síntese da enzima fitoeno sintase, onde o tomateiro transgênico apresentou um conteúdo maior de licopeno, além de um aumento em todas as isoformas de carotenoides avaliadas. Ronen *et al.* (2000) registraram um maior conteúdo de licopeno em tomate transgênico com mutação no gene responsável pela síntese da enzima licopeno- β -ciclase.

O gene FIBRILLIN (FIB) encontrado no genoma da pimenteira codificada uma lipoproteína chamada fibrilina, estruturas de armazenamento de carotenoides e estabilidade plastidial. A superexpressão de FIB em tomateiro foi promovida via transgenia, visto que a planta não apresenta formação de fibrilinas, resultando em um acúmulo elevado de licopeno e β -caroteno oriundo de modificações na capacidade de armazenamento do cromoplasto (SIMKIN *et al.*, 2007).

A superexpressão do gene codificador da enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS) em tomateiro transgênico levou à efeitos no acúmulo de carotenoides no fruto. A enzima em questão participa da produção de precursores do fitoeno, onde o aumento na expressão do gene levou ao incremento de carbono direcionado para a carotenogênese (ENFISSI *et al.*, 2005).

Além das abordagens mais antigas de manipulação genética, a tecnologia CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) tem ganhado cada vez mais destaque e aplicações em variadas áreas do conhecimento devido à grande utilidade e precisão na edição gênica (ZHENG; KUIJER; AL-BABILI, 2021). A tecnologia permite a clivagem direcionada de DNA a partir de nucleases, induzindo uma mutação localizada ou a possibilidade de inserção de sequências de DNA de interesse (CARNEIRO; CARNEIRO, 2020; REEM; ECK, 2019).

Semelhante a Lou *et al.* (2013), o trabalho de Li *et al.* (2018) buscou editar cinco genes que afetam a carotenogênese, como o SISGR1 e os genes que codificam as enzimas licopeno- β -ciclase e licopeno- ϵ -ciclase. Os resultados mostraram que a edição dos genes em questão

amplificou o acúmulo de licopeno nos frutos, confirmando que a edição de genes de pontos específicos da carotenogênese pode modificar o padrão de síntese e acúmulo de carotenoides através do interrompimento do fluxo de carbono pela via e concentração em pontos específicos.

4.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

A geração de alimentos biofortificados com carotenoides mostra-se uma frente importante no combate à problemas de deficiência de vitamina A e relacionadas ao efeito de ERO (SHWETHA *et al.*, 2020). Contudo, os questionamentos seguintes envolvem a produção e chegada dos alimentos até os consumidores, quais serão os incentivos e os indicadores que movimentarão o mercado para a produção de alimentos biofortificados. A introdução de tais alimentos em escolas via programas públicos de aquisição de alimentos pode ser uma das vias para resolver tais problemas, até mesmo distribuir sementes aos pequenos produtores para incentivar o cultivo (COSTA; SANTOS, 2022; DUARTE, 2021). Algumas escolas brasileiras, além de utilizarem alimentos biofortificados na merenda escolar, reduzindo problemas de insegurança alimentar, também promoveram o cultivo dos mesmos nas dependências das escolas, integrando os alunos no processo e obtendo resultados promissores na aceitação dos alimentos pelos alunos (SILVA, 2015; SIQUIEROLI *et al.*, 2018).

As pesquisas sobre biofortificação com carotenoides tem foco no aumento da biossíntese e armazenamento e redução da degradação em vias metabólicas, mas outras abordagens são necessárias, como avaliação de efeitos fora do alvo, como efeitos metabólicos e hormonais, além da avaliação da ingestão e biodisponibilidade de carotenoides a partir dos alimentos biofortificados (MORELLI; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2022).

Os programas de melhoramento dispõem de diversos mecanismos para a biofortificação do tomate, contudo, alguns caracteres agrônômicos, como a produtividade e a resistência a doenças e pragas ainda são muito demandadas, o que retira um pouco o foco do aspecto nutritivo do tomate (ILAHY *et al.*, 2017; SHWETHA *et al.*, 2020). A produtividade é um componente muito buscado pelos produtores, muitas vezes em detrimento de questões qualitativas do tomate, o que tende a reduzir o cultivo de tomates de qualidade nutricional elevada e aumentar as cultivares mais produtivas, as quais não são biofortificadas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2014; ILAHY *et al.*, 2017).

As abordagens biotecnológicas são de grande utilidade pela celeridade e versatilidade no processo, o que traz eficiência aos programas de melhoramento (ZHENG; GIULIANO; AL-BABILI, 2020). Entretanto, avanços no âmbito regulatório relacionados à modificação genética

necessitam de atenção, buscando adequação à legislação vigente para utilização comercial e, portanto, alcance ao consumidor (MORELLI; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, 2022). Outra barreira importante a ser superada é a aceitação do consumidor aos produtos com alteração genética, vistos com receio por grande parte da população (ZHENG; GIULIANO; AL-BABILI, 2020).

A tecnologia CRISPR parece auxiliar no processo de aceitação e regulação, visto que permite a edição gênica sem necessariamente a introdução de transgenes, mas também requer uma evolução no ferramental tecnológico disponível (ZHENG; KUIJER; AL-BABILI, 2021).

5 CONCLUSÃO

A biofortificação do tomate com carotenoides é uma estratégia viável para a prevenção e combate de doenças relacionadas às ERO e à deficiência de vitamina A, sobretudo para a população mais pobre. Mais pesquisas envolvendo o uso de estratégias de melhoramento clássico e modificação genética visando a biofortificação do tomate com carotenoides são necessárias para o avanço no desenvolvimento de novas cultivares.

As barreiras sociais que englobam a baixa aceitação de produtos transgênicos pelos consumidores precisam ser superadas para estimular programas de biofortificação do tomate e, posteriormente, permitir o acesso da população ao produto.

REFERÊNCIAS

- ALVES, F. R. R. *et al.* Beyond the limits of photoperception: constitutively active PHYTOCHROME B2 overexpression as a means of improving fruit nutritional quality in tomato. **Plant Biotechnology Journal**, São Paulo, v.18, n.10, p.2027–2041, 18 fev. 2020. <https://doi.org/10.1111/pbi.13362>.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.19, n.2, p.233-243, mar. 2006. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000200010>.
- BAKAN, E.; AKBULUT, Z. T.; INANÇ, A. L. Carotenoids in foods and their effects on human health. **Akademik Gıda**, [S. l.], v.12, n.2, p.61-68, 2014.
- BARBOZA, D. A. P.; MERLO, A. A.; PAZINATO, M. S. Plano orientador “grupos cromóforos e sua relação com a cor”: produto educacional para uma abordagem experimental investigativa da química orgânica no ensino médio. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v.13, n.3, p.650-660, 2021. <https://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20210036>.
- BINO, R. J. *et al.* The light-hyperresponsive *high pigment-2^{dg}* mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. **The New Phytologist**, [S. l.], v.166, n.2, p.427-438, maio 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01362.x>.
- BITENCOURT, B. M. *et al.* Avaliação de teores de betacaroteno e licopeno em híbridos de tomate tipo salada indeterminado. In: **Simpósio de Ciências Agrárias e Ambientais – 2019 – Monte Carmelo – MG**, 2019. Disponível em: <https://www.doity.com.br/anais/sicaa2019/trabalho/115435>>. Acesso em: 20 abr. 2023.
- BORDIGNON, S. R. **Obtenção e uso de linhagens quase isogênicas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) afetando a composição de carotenoides: uma ferramenta para o estudo da nutracêutica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- BORGES, R. A. K. **Piramidação gênica para resistência horizontal a nematoides via silenciamento gênico**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cadernos de atenção básica: carências de micronutrientes**. Brasília :Ministério da Saúde, 2007. 60 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (ed.). **Carotenoids**. Basileia: Birkhäuser Verlag, 2004. 649 p. 10.1007/978-3-0348-7836-4.
- CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P. **Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação no melhoramento do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, dez. 2020. 21 p. – (Documentos, 257).

CARVALHO, J. L. de; PAGLIUCA, L. G.. Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente. **Hortifruti Brasil**, ano 6, n.58, p.6-16, jun. 2007. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/tomate-um-mercado-que-nao-para-de-crescer.aspx>. Acesso em: 09 set. 2022.

CARVALHO, P. G. B. *et al.* Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, [S. l.], v.24, n.4, p.397-404, dez. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362006000400001>.

CARVALHO, R. F. *et al.* Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: ‘Micro-Tom’ as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, [S. l.], v.7, n.18, 29 jun. 2011. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-18>.

CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, [S. l.], v.7, n.5, p.376-385, fev. 2012. 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.05.009.

CHRISTIE, J.. Sinais da luz solar. In: TAIZ, Lincoln *et al* (org.). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Cap. 16. P. 447-476.

CORTÉS-OLMOS, C. *et al.* The role of traditional varieties of tomato as sources of functional compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v.94, n.14, p.2888-2904, 27 fev. 2014. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6629>.

COSTA, Z. L. C. M.; SANTOS, S. C. L. Biofortificação de alimentos e sua relação com a segurança alimentar e nutricional: prós e contras. **Research, Society and Development**, v.11, n.8, 2022. <https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i8.31320>.

D’AMBROSIO, C. *et al.* Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene β -cyclase (tlcy-b) cDNA. **Plant Science**, [S. l.], v.166, n.1, p.207-214, jan. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.09.015>.

DAVULURI, G. R. *et al.* Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v.23, n.7, p.890-895, jul. 2005. <https://doi.org/10.1038/nbt1108>.

DINIZ, A. S.; SANTOS, L. M. P. Hipovitaminose A e xeroftalmia. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.76, n.3, p.S311-S322, dez. 2000.

DUARTE, V. L. **Alimentos biofortificados na merenda escolar**: relato sobre o projeto Cooperar e Crescer. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Cachoeira do Sul, 2021.

ECK, J. V.; KEEN, P.; TIAHJADI, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v.1864, p.225-234, 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_16.

EGEA, I. *et al.* Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse

recording on intact live tissue. **Annals of Botany**, [S. l.], v.108, n.2, p.291-297, ago. 2011. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr140>.

EGEA, I. *et al.* Chromoplast differentiation: current status and perspectives. **Plant and Cell Physiology**, v.51, n.10, p.1601–1611, out. 2010. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq136>.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Cultivares da Embrapa Hortaliças (1981-2013)**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 182 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105302/1/Portifolio27-dez.pdf>. Acesso em: 12 maio 2023.

ENFISSI, E. M. A. *et al.* Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v.3, n.1, p.17-27, jan. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00091.x>.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S. l.], v.43, n.1, p.61-68, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.

FLORES, P. *et al.* Genotypic variability of carotenoids in traditional tomato cultivars. **Food Research Internacional**, [S. l.], v.100, n.3, p.510-516, out. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.014>.

FRANÇA, N. R. *et al.* Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v.50, n.6, p.695-709, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000600008>.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, [S. l.], v.43, n.3, p.228-265, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002>.

FRASER, P. D. *et al.* Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. **The Plant Cell**, [S. l.], v.19, n.10, p.3194-3211, out. 2007. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049817>.

GALPAZ, N. *et al.* Abscisic acid deficiency in the tomato mutant *high-pigment 3* leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. **The Plant Journal**, [S. l.], v.53, n.5, p.717-730, 06 nov. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03362.x>.

GIORDANO, L. B. *et al.* ‘BRS Tospodoro’: a high lycopene processing tomato cultivar adapted to organic cropping systems and with multiple resistance to pathogens. **Horticultura Brasileira**, [S. l.], v.28, n.2, p.241-245, jun. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000200019>.

GOFF, S. A.; KLEE, H. J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value?. **Science**, New York, v.311, n.5762, p.815-819, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1112614>.

- GOMES, F. S. Carotenoides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.5, p.537-548, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732007000500009>.
- HIRSCHI, K. D. Nutrient biofortification of food crops. **Annual Review of Nutrition**, [S. l.], v.29, p.401-424, 2009.
- HUANG, Z. *et al.* Role of vitamin A in the immune system. **Journal of Clinical Medicine**, v.7, n.9, set. 2018. <https://doi.org/10.3390/jcm7090258>.
- ILAHY, R. *et al.* A focus on high-lycopene tomato cultivars: horticultural performance and functional quality. **Acta Horticulturae**, [S. l.], v.1159, p.57-64, 2017. 10.17660/ActaHortic.2017.1159.9.
- ILAHY, R. *et al.* Fractionate analysis of phytochemical composition and antioxidant activity in advanced breeding lines of high-lycopene tomato. **Food & Function**, [S.l.], v.7, p.574-583, 2016. <https://doi.org/10.1039/C5FO00553A>.
- ISAACSON, T. *et al.* Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, [S. l.], v.14, p.333-342, fev. 2002.
- KARNIEL, U. *et al.* Development of zeaxanthin-rich tomato fruit through genetic manipulations of carotenoid biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v.18, n.11, p.2292-2303, 2020. <https://doi.org/10.1111/pbi.13387>.
- KAVITHA, P. *et al.* Genotypic variability for antioxidant and quality parameters among tomato cultivars, hybrids, cherry tomatoes and wild species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v.94, n.5, p.993-999, 22 ago. 2013. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6359>.
- KOLOTILIN, I. *et al.* Transcriptional profiling of high pigment-2dg tomato mutant links early fruit plastid biogenesis with its overproduction of phytonutrients. **Plant Physiology**, [S. l.], v.145, n.2, p.389-401, 2007. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102962>.
- KUZYOMENSKII, A. V. Effects of intergenic interaction of high pigmentation *hp-2^{dg}* gene (*high pigment-2* dark green gene) with *B* (*Beta carotene*) gene in tomato. **Cytology and Genetics**, [S. l.], v.42, n. 5, p.314-322, 2008. <https://doi.org/10.3103/S0095452708050046>.
- LIEBERMAN, M. *et al.* The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the *high pigment-1* mutant phenotype. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v.108, n.8, p.1574-1581, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1584-1>.
- LI, X. *et al.* Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v.9, 26 abr. 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00559>.
- LIMA, J. P. *et al.* Atividade e biodisponibilidade dos carotenoides no organismo. **Revista Ciências em Saúde**, [S. l.], v.2, n.1, jan. 2012. <https://doi.org/10.21876/rcsfmit.v2i1.75>.

- LIU, L. *et al.* Regulation of carotenoid metabolism in tomato. **Molecular Plant**, Hangzhou, v.8, n.1, p.28-39, 05 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.006>.
- LUO, Z. *et al.* A STAY-GREEN protein SISGR1 regulates lycopene and β -carotene accumulation by interacting directly with SPSY1 during ripening processes in tomato. **New Phytologist**, [S. l.], v.198, n.2, p.442-452, 2013. <https://doi.org/10.1111/nph.12175>.
- MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, [S. l.], v.66, n.3, p.54-57, 2014. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000300017>.
- MENG, F. *et al.* Carotenoid biofortification in tomato products along whole agro-food chain from field to fork. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v.124, p.296-308, abr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.023>.
- MILAGRES, R. C. R. M.; NUNES, L. C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S. l.], v.12, n.5, p.1253-1266, out. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000500023>.
- MORELLI, L.; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Open avenues for carotenoid biofortification of plant tissues. **Plant Communications**, [S. l.], v.4, n.1, 09 jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100466>.
- MUSTILLI, A. C. *et al.* 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, fev. 1999. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.2.145>.
- NEELA, S.; FANTA, S. W. Review on nutritional composition of orange-fleshed sweet potato and its role in management of vitamin A deficiency. **Food Science & Nutrition**, [S. l.], v.7, n.6, p.1920-1945, abr. 2019. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1063>.
- NESTEL, P. *et al.* Biofortification of staple food crops. **The Journal of Nutrition**, [S. l.], v.136, n.4, p.1064-1067, abr. 2006. <https://doi.org/10.1093/jn/136.4.1064>.
- NGUYEN, C. V. *et al.* Tomato GOLDEN2-LIKE transcription factors reveal molecular gradients that function during fruit development and ripening. **The Plant Cell**, [S. l.], v.26, n.2, p.585–601, 2014. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118794>.
- NISAR, N. *et al.* Carotenoid metabolism in plants. **Molecular Plant**, [S. l.], v.8, n.1, p.68-82, jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>.
- ORSI, B. *et al.* Allelic variations in the tomato carotenoid pathway lead to pleiotropic effects on fruit ripening and nutritional quality. **Postharvest Biology and Technology**, [S. l.], v.181, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111632>.
- POWELL, A. L. T. *et al.* *Uniform ripening* encodes a *Golden 2-like* transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. **Science**, Washington, DC, v.336, n.6089, p.1711-1715, 29 jun. 2012. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222218>.

PRODUÇÃO de tomate. **IBGE**, 2022. Disponível em:

<<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/br&ved=2ahUKEwiS5a3ujLv-AhVdppUCHcMmAdMQFnoECAsQAQ&usg=AOvVaw3noqQQiJvHLCgP53CLhcTL>>.

Acesso em: 22 mar. 2023.

PESARESI, P. *et al.* Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v.5, n.124, abr. 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00124>.

PIXLEY, K. *et al.* Biofortification of maize with provitamin A carotenoids. In: TANUMIHARDJO, S. A. (ed.). **Carotenoids in human health**. Nutrition and Health, Humana Press: Totowa, 2012. Cap. 17. P. 271-292.

PSCHEIDT, Y. **Explorando combinações de alelos para intensificar o valor nutricional do tomate**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2020.

QUEIROZ, D. *et al.* Deficiência de vitamina A e fatores associados em crianças de áreas urbanas. **Revista de Saúde Pública**, [S. l.], v.47, n.2, p.248-256, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047002906>.

RAMALHO, R. A. *et al.* Associação entre deficiência de vitamina A e situação sócio demográfica de mães e recém-nascidos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S. l.], v.52, n.3, p.170-175, jun. 2006.

RAMEL, F. *et al.* Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. **PNAS**, [S. l.], v.109, n.14, p.5535-5540, abr. 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115982109>.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, [S. l.], v.53, n.3, p.207-216, mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>.

REEM, N. T.; ECK, J. V. Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tomato. *Methods in Molecular Biology*, Nova Iorque, v.1917, p.171-182, 05 jan. 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8991-1_13.

REIS, I. A. R. *et al.* Deficiência de vitamina A em crianças brasileiras: uma revisão sistemática da literatura. **Diversitas Journal**, Santana de Ipanema, v.6, n.1, p.634-661, 2021.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides**: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.

RONEN, G. *et al.* An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *Beta* and *old-gold* color mutations in tomato. **PNAS USA**, [S. l.], v.97, n.20, p.11102-11107, 19 set. 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.190177497>.

- RONEN, G. *et al.* Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. **The Plant Journal**, [S. l.], v.17, n.4, p.341-351, fev. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00381.x>.
- RUBIN, C. A. *et al.* **Tomate**: análise dos indicadores da produção e comercialização no mercado mundial, brasileiro e catarinense. Brasília: Conab, out. 2019. 22 p. – (Compêndio de Estudos Conab, v.21).
- RÜEGG, P. For the first time, farmers in the Philippines cultivated Golden Rice on a larger scale and harvested almost 70 tons. **Phys.org**, 28 nov. 2022. Disponível em: <<https://phys.org/news/2022-11-farmers-philippines-cultivated-golden-rice.html>>. Acesso em: 15 maio 2023.
- RUIZ-SOLA, M. A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. **The Arabidopsis Book**, [S. l.], v.10, p.158-164, 2012. <https://doi.org/10.1199/tab.0158>.
- SADALI, N. M. *et al.* Differentiation of chromoplast and other plastids in plants. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v.38, p.803-818, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02420-2>.
- SANTOS, L. M. P. *et al.* Situação nutricional e alimentar de pré-escolares no semi-árido da Bahia (Brasil): II – Hipovitaminose A. **Revista Saúde Pública**, Bahia, v.30, n.1, p.67-74, 1996. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101996000100009>.
- SCHOFIELD, A.; PALIYATH, G. Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v.43, n.12, p.1052-1060, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.10.006>.
- SESTARI, I. *et al.* 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**, [S. l.], v.175, p.111-120, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.010>.
- SHI, J.; LE MAGUER, M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v.40, n.1, 2000. <https://doi.org/10.1080/10408690091189275>.
- SHWETHA, H. S. *et al.* Biofortification of carotenoids in agricultural and horticultural crops. In: BENKEBLIA, N. (ed.). **Vitamins and minerals biofortification of edible plantas**. 1. Ed. Wiley-Blackwell, 2020. Cap. 7. p. 123-161.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, [S. l.], v.22, n.6, p.1315–1321, 1995. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1315S>.
- SILVA, C. C. O. **Aceitação de produtos agrícolas biofortificados na merenda escolar do município de Itaguaí – RJ**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SIMKIN, A. J. *et al.* Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. **Phytochemistry**, [S. l.], v.68, n.11, p.1545-1556, jul. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.03.014>.

SIQUIEROLI, A. C. S. *et al.* Vivenciando a biofortificação na alimentação escolar em Monte Carmelo – MG. **Cadernos de Agroecologia**, v.13, n.1, jul. 2018.

SIRACUSA, L. *et al.* Targeted secondary metabolic and physico-chemical traits analysis to assess genetic variability within a germplasm collection of “long storage” tomatoes. **Food Chemistry**, [S. l.], v.244, p.275-283, 01 abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.043>.

SOUZA, W. A.; VILAS BOAS, O. M. G. C. A deficiência de vitamina A no Brasil: um panorama. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [S. l.], v.12, n.3, p.173-179, 2002.

STORY, E. N. *et al.* An update on the health effects of tomato lycopene. **Annual Review of Food Science and Technology**, [S. l.], v.1, n.1, p.189-210, 2010. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124120>.

SUN, T. *et al.* Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. **Molecular Plant**, [S. l.], v.11, n.1, p.58-74, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.010>.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomed Pharmacother**, [S. l.], v.58, n.2, p.1-23, 04 fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.12.006>.

TORRES-MONTILLA, S.; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Making extra room for carotenoids in plant cells: new opportunities for biofortification. **Progress in Lipid Research**, [S. l.], v.84, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101128>.

UNLU, N. Z. *et al.* Carotenoid absorption in humans consuming tomato sauces obtained from tangerine or high- β -carotene varieties of tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v.55, n.4, p.1597-1603, 2007. <https://doi.org/10.1021/jf062337b>.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of Carcinogenesis**, [S. l.], v.5, n.14, maio 2006. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>.

ZHENG, X.; GIULIANO, G.; AL-BABILI, S. Carotenoid biofortification in crop plants: *citius, altius, fortius*. **Molecular and Cell Biology of Lipids**, [S. l.], v.1865, n.11, nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158664>.

ZHENG, X.; KUIJER, H. N. J.; AL-BABILI, S. Carotenoid biofortification of crops in the CRISPR era. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v.39, n.9, p.857-860, set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.12.003>.