

Diogo Filipe Loureiro dos Santos Almeida

Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Diogo Filipe Loureiro dos Santos Almeida

Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2017

Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais

Diogo Filipe Loureiro dos Santos Almeida

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professora Doutora Ana Cristina Vinha

Co- Orientador: Professora Doutora Carla Sousa e Silva

Resumo

As preferências dos consumidores estão diretamente relacionadas com as diferentes cores que os produtos apresentam. Uma alimentação variada, colorida e equilibrada garante a ingestão de todos os nutrientes essenciais, bem como de não-nutrientes, onde estão incluídos os pigmentos naturais sintetizados pelas plantas. É do conhecimento geral que, para se conseguir e manter uma boa saúde, é necessário ingerir diferentes tipos de alimentos de origem vegetal, ricos em não-nutrientes sintetizados pelas diferentes vias metabólicas.

A síntese de pigmentos naturais depende não só dos fatores intrínsecos de cada planta (p. ex. espécie ou família), como também de fatores extrínsecos (p. ex. condições edafo-climáticas). Nos diferentes pigmentos naturais incluem-se as clorofilas, os carotenos, os flavonoides e as betalaínas, os quais estão relacionados com importantes atividades biológicas.

Os seus efeitos benéficos estão associados às suas propriedades antioxidantes, proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, assim como atividade anti-inflamatória e preventiva de doenças crónicas não transmissíveis.

Com base na importância do consumo de compostos bioativos para a saúde humana, este trabalho de revisão pretende descrever as vias metabólicas precursoras dos pigmentos naturais e associá-las às propriedades e efeitos biológicos que estes pigmentos podem exercer na promoção da saúde.

Palavras-chave: Pigmentos naturais, Biossíntese, Vias metabólicas, Compostos bioativos.

Abstract

The consumer preferences are directly related to the different colors that the products present. A varied, colorful and balanced diet is the guarantee of ingestion of all necessary essential nutrients, as well as non-nutrients, which include the natural pigments synthesized by plants. It is well known that in order to achieve and maintain good health it is necessary to eat different types of food of plant origin, rich in non-nutrients synthesized by different metabolic pathways.

The synthesis of natural pigments depends not only on the intrinsic factors of each plant (eg. species or family), but also on extrinsic factors (eg. soil and climatic conditions). Among the different natural pigments are chlorophylls, carotenes, flavonoids and betalains, which are related to important biological activities.

The beneficial effects are related to its antioxidant properties, protection against oxidative damage to cellular components, anti-inflammatory and preventive effects of non-transmissible chronic diseases.

Based on the importance of the use of bioactive compounds for human health, this review aims at describing the metabolic pathways precursors of natural pigments and associates them with properties and the biological effects that these pigments can exert on health promotion

Keywords: Natural pigments, Biosynthesis, Metabolic pathways, Bioactive compounds.

Agradecimentos

Quero agradecer a todos aqueles que estiveram presentes nesta minha jornada académica.

Aos meus pais, aos meus amigos, aos meus colegas de trabalho, à Universidade Fernando Pessoa, aos seus professores e funcionários o meu muito obrigado.

Um especial agradecimento para a Professora Doutora Ana Cristina Vinha, pela paciência e indispensável ajuda na elaboração deste trabalho de conclusão de curso.

Índice Geral

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de figuras	v
Abreviaturas	vi
I. INTRODUÇÃO	1
II. HISTÓRIA DAS CORES	3
III. METABOLISMO VEGETAL	7
3.1. Metabolismo primário	8
3.2. Metabolismo secundário	9
3.3. Importância económica e farmacológica	12
IV. PIGMENTOS NATURAIS	14
4.1. Clorofilas	15
4.1.1. Propriedades biológicas das clorofilas	19
4.2. Polifenóis	20
4.2.1. Benefícios dos polifenóis	26
4.3. Betalaínas	27
4.3.1. Propriedades funcionais das betalaínas	30
4.4. Carotenoides	31
4.4.1. Propriedades biológicas dos carotenoides	37
Conclusões	39
Bibliografia	40

Índice de figuras

Figura 1. Vias metabólicas com possibilidade de competição pelo intermediário e regulação via <i>feedback</i> ou pelo controlo da expressão genética.	7
Figura 2. Metabolitos primários produzidos pelas plantas.	8
Figura 3. Origem de alguns metabolitos secundários (alcaloides, terpenos e fenilpropanoides) provenientes do metabolismo primário da planta.	11
Figura 4. Estrutura química das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> .	16
Figura 5. Representação da via metabólica da síntese de clorofila <i>a</i> .	17
Figura 6. Compostos fenólicos comuns presentes nas plantas.	20
Figura 7. Biossíntese de compostos fenólicos pelas vias das pentoses fosfato, chiquimato e fenilpropanoide.	21
Figura 8. Estrutura geral dos flavonoides (<i>flavilium</i>).	22
Figura 9. Biossíntese dos flavonoides.	23
Figura 10. Estrutura do catião flavílico (A) e da estrutura da antocianidina cianidina (B).	24
Figura 11. Possíveis transformações estruturais das antocianinas em função do pH.	25
Figura 12. Estrutura química do ácido betalâmico.	27
Figura 13. Estruturas químicas das betalaínas. A) betacianinas e B) betaxantinas.	28
Figura 14. Esquema completo da via biossintética das betalaínas, com todas as reações descritas na bibliografia até o momento. AA - ácido ascórbico; Cit P450 - citocromo P450; DAA - ácido dehidroascórbico.	29
Figura 15. Estruturas genéricas dos carotenoides.	32
Figura 16. Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides.	34
Figura 17. Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados.	35
Figura 18. Formação de xantofilas a partir do α -caroteno.	36
Figura 19. Formação de xantofilas a partir de β -caroteno.	36

Abreviaturas

AA - Ácido ascórbico

acetil-CoA - Acetil coenzima A

ATP - Adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)

CC - *cis*-chalcona

Cit P450 - Citocromo P450

CoA - Coenzima A

DAA - Ácido dehidroascórbico (do inglês *dehydroascorbic acid*)

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein*)

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NRC - Conselho Nacional de Pesquisa (do inglês *national research council*)

ROS- Radicais livres de oxigénio (do inglês *reactive oxygen species*)

I. INTRODUÇÃO

O estudo dos compostos químicos sintetizados pelas plantas tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos e os seus usos como agentes terapêuticos datam de milhares de anos (Fowler, 2006). Atualmente, a maior parte dos fármacos usados pela indústria farmacêutica, bem como outros compostos naturais provenientes das plantas, apresentam diversas aplicações, tanto na área farmacêutica e cosmética, como também nas áreas das indústrias alimentar e química (Brewer, 2011; Gyawali e Ibrahim, 2014).

Entre os muitos compostos químicos extraídos das plantas, incluem-se os pigmentos naturais, metabolitos secundários sintetizados pelas plantas, sobre os quais o tema fulcral desta dissertação incide.

De facto, as cores sempre foram importantes na vida quotidiana e são um assunto comum e unificador para diferentes áreas científicas. Segundo Melo *et al.* (2006) a proveniência das cores, a sua perceção e os seus usos merece o estudo por parte de uma panóplia de áreas, tais como astronomia, medicina, química, artes plásticas, entre outras. As cores estão intimamente ligadas a vários aspetos da vida e são capazes de influenciar as decisões do dia-a-dia, principalmente as que envolvem os alimentos. O instinto facilita o consumo de alimentos coloridos, nomeadamente, as frutas e os produtos hortícolas (Downham e Collins, 2000; Pinheiro *et al.*, 2009). Neste sentido, os pigmentos naturais no reino vegetal servem primariamente para conferir tonalidades apelativas ou repulsivas aos predadores, incluindo o Homem.

A palavra “pigmento” teve origem no latim e servia para denominar uma cor no sentido da matéria corante. O significado moderno da palavra pigmento (em inglês, *pigment*) apareceu no século XX, a qual significa uma substância constituída por pequenas partículas, com propriedades corantes, protetoras e magnéticas. Esta definição tanto se aplica aos pigmentos de origem mineral, como dióxido de titânio, como aos compostos de origem orgânica (Ullmam, 1985).

O rol de cores obtido pela Natureza é muito vasto, o qual inclui tons vermelhos, azuis e amarelos, predominantes nas partes aéreas das plantas, como os tons escuros (castanho

e negro) predominantes nas raízes das mesmas (Melo *et al.*, 2006). Embora as tonalidades castanhas e negras sejam menos atrativas aos predadores, são igualmente predominantes na natureza, e são sintetizadas pelas melaninas. Por exemplo, a eumelanina, polímero complexo constituído por difenóis e outras moléculas químicas, é a responsável pela tonalidade preta das plantas (Moura, 2003).

As cores mais atrativas presentes nas plantas derivam maioritariamente dos polifenóis, os quais constituem um grupo muito diversificado de compostos químicos responsáveis pelas cores branca, amarela, vermelha e azul de muitas plantas e frutos (Dai e Mumper, 2010; Keerthi *et al.*, 2014). Outros compostos igualmente importantes para a pigmentação dos vegetais incluem os carotenoides, as clorofilas e as betalaínas.

Face ao exposto, a realização deste trabalho teve como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica acerca das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais, sendo esta dissertação de índole teórica, isenta de qualquer tipo de trabalho prático experimental. Em termos metodológicos, e tendo por base os objetivos delineados, procedeu-se à pesquisa de artigos científicos e outras publicações relevantes, num período compreendido entre os meses de maio de 2015 e novembro de 2016, utilizando como fontes de pesquisa científicas o PubMed, o ScienceDirect e a b-On e como motores de busca o Google Académico e o AltaVista Search. A escolha destas bases de dados para a realização da pesquisa bibliográfica prendeu-se com o facto de serem aquelas que, em regra, compilam o maior número de artigos científicos recentemente publicados na área das ciências da saúde. As palavras-chave utilizadas na pesquisa foram: pigmentos naturais (do inglês *natural pigments*); plantas (do inglês *plants*); vias metabólicas (do inglês *metabolic pathways*); polifenóis (do inglês *polyphenols*); carotenoides (do inglês *carotenoids*); betalaínas (do inglês *betalains*); clorofilas (do inglês *chlorophylls*).

Os critérios usados na seleção dos artigos científicos incluem o interesse para o tema, limitando-se a pesquisa a artigos e estudos escritos em inglês, português e espanhol, com data de publicação dos últimos 10 anos (este limite temporal pode ser alargado se o conteúdo dos estudos for relevante ou se tiver evidências experimentais acerca do tema importantes para a escrita desta tese).

II. HISTÓRIA DAS CORES

As cores são um fenómeno primordial e omnipresente. Devido ao facto de existir uma necessidade de catalogar tudo o que nos rodeia, houve um interesse acrescido sobre as cores, nomeadamente acerca da forma como estas são sintetizadas pelos organismos vivos e, conseqüentemente, do modo como podem ser extraídas ou produzidas. Atualmente é do conhecimento geral que a perceção da cor depende de três fatores principais: a luz, a fisionomia do olho e o cérebro (Shapley e Hawken, 2011).

De facto, a cor é uma perceção visual resultante da ação de um feixe de fotões sobre as células da retina, que transmitem impressões para o sistema nervoso através da informação pré-processada do nervo ótico. Atualmente, as cores são elementos presentes na vida quotidiana, apresentando-se em diversas formas, seja nas peças de vestuário, nos ambientes, nas artes, na alimentação e no reino vegetal e animal. Alguns registros históricos indicam que as cores começaram a ser utilizadas pelos primeiros ancestrais para atrair a caça, passando ao longo dos anos a ter maior papel nas culturas e religiões, como na Índia e China, cuja aplicação está relacionada com as diferentes forma de energias, ou no Ocidente, onde as religiões utilizaram as colorações das roupas para diferenciar hierarquias cristãs (Goethe, 1993).

Aristóteles foi o estudioso mais antigo a falar sobre a teoria das cores, incluindo-as nas propriedades dos objetos. Posteriormente, Leonardo da Vinci contestou esta teoria, afirmando que as cores derivavam das propriedades da luz. Porém, foi o físico inglês Isaac Newton que validou experimentalmente os conceitos sobre a luz e sobre as cores (Goethe, 1993).

No entanto, independentemente da cor, da sua forma ou composição, é fundamental referir que as primeiras cores a merecerem destaque foram todas aquelas que constituíam o reino vegetal. Por exemplo, as civilizações antigas já extraíam as substâncias coradas da natureza para colorir os alimentos de forma a melhorar a sua aparência. Os egípcios adicionavam extratos naturais e vinho para melhorar a aparência dos seus produtos. Muitas substâncias de origem animal, vegetal ou mineral utilizadas

como especiarias e condimentos, eram também usadas para colorir os alimentos. Nefertiti, rainha egípcia da XVIII dinastia, bem como todas as mulheres egípcias maquilhavam-se com pigmentos naturais que, para além de realçar a beleza do rosto, serviam de proteção contra picadas dos insetos. Em caixas de madeira, guardavam frascos de alabastro contendo *khol* para delinear os olhos (Goethe, 1993).

A aplicação de pigmentos naturais, como a hena em tatuagens, a cartamina e o índigo na confeção de roupas, era prática comum. Foi também identificada a utilização de antraquinona, pigmentos indigóides e flavonoides nos têxteis, no quarto século a.C. pelos egípcios (Orska-Gawrys *et al.*, 2003). A utilização de extrato de cartamina para colorir o embrulho das múmias, há 4600 anos atrás, encontra-se documentada.

Durante o Renascimento, os corantes naturais foram muito utilizados no tingimento dos têxteis. O corante azul índigo, originário da planta *Indigofera tinctoria* e da *Isatis tinctoria*, é um dos mais antigos pigmentos utilizados pelo homem e economicamente muito importante. Estas plantas contêm um glicosídeo do 3-hidroxiindol que, quando extraído, hidrolisado, oxidado e dimerizado, resulta no pigmento azul índigo. O azul índigo é utilizado por várias indústrias têxteis, sendo já sintetizado pela Bayer em 1878 (Pinto, 1995; Schiozer e Barata, 2007).

Em 1492, com a descoberta das Américas, surgiram novas fontes de corantes naturais, nomeadamente, através dos indígenas, para quem a pintura corporal tem um grande significado. O urucum (*Bixa orellana*), do qual é extraída a bixina, era um dos pigmentos utilizado, esfregando-se as sementes vermelhas no corpo. O urucum ainda é atualmente utilizado para colorir a manteiga, a margarina, os queijos, os doces, entre outros alimentos. Algumas tribos utilizavam mistura de jenipapo, proveniente de um iridóide, a genipina (*Genipa americana*) mascada, carvão e água. A coloração do jenipapo é incolor em si, mas produz cor preta depois de reagir com proteínas da pele (Pinto, 1995; Schiozer e Barata, 2007).

Mais tarde, entre os anos de 1501 e 1850, na sequência da colonização, verificou-se uma intensa exploração económica do paubrasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) e do seu corante vermelho, denominado brasileína, para tingir algodão na indústria têxtil europeia (Hellmann, 2006).

Os pigmentos orgânicos naturais de extratos de plantas como o açafrão e o índigo, ou de animais como a cochonilha, são também conhecidos há bastante tempo. Até meados do século XIX, os pigmentos orgânicos naturais eram os mais importantes, quer na indústria dos alimentos e cosméticos, quer na indústria têxtil. Em 1850, com a síntese do primeiro corante sintético, a mauveína, por William Henry Perkin, renasce a indústria dos pigmentos orgânicos, existindo na mesma altura o recrudescimento das agroindústrias tradicionais como a do índigo, na Índia (Netto, 2009).

Com a síntese da malva, a prática de colorir alimentos tomou um impulso muito expressivo, não sendo inicialmente a toxicologia dos corantes tida em consideração. Contudo, desde 1971, que o efeito cancerígeno das diversas substâncias no organismo humano começou a ser estudado (Nazaré, 2001). As dúvidas crescentes referentes à segurança de vários corantes artificiais estimularam a sua substituição por corantes naturais.

Com o avanço das técnicas analíticas, os estudos toxicológicos e as pesquisas farmacológicas permitiram identificar as propriedades tóxicas dos corantes sintéticos, sendo que alguns destes foram proibidos (Oliveira, 2001). Atualmente, apenas nove corantes artificiais são permitidos em medicamentos, alimentos e cosméticos nos EUA, dos quais dois têm uso restrito. Por outro lado, existem vinte e um tipos de corantes naturais (dos quais cinco têm uso restrito), autorizados para as mesmas aplicações. Estes corantes naturais são de fontes diversas, desde frutas e vegetais a extratos de casca de uva (FDA, 1998).

Os estudos toxicológicos do século XXI estimularam a utilização de corantes naturais, melhorando-se o desempenho destes nas diversas aplicações das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Adicionalmente, devido aos problemas toxicológicos relacionados com o uso de corantes sintéticos, os produtos considerados naturais passaram a ser preferenciais por parte dos consumidores (Moreira, 2003; Oliveira, 2001).

Atualmente, os corantes naturais utilizados pela indústria são, na sua maioria, extraídos por métodos tradicionais a partir de material vegetal. Contudo, o rendimento e a

qualidade a nível da composição química dos pigmentos são afetados por fatores sazonais, ambientais e de variação genotípica da espécie. Neste sentido, existe um grande interesse no desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que permitam garantir a uniformidade, os altos rendimentos e a segurança do produto (Ovando-Chacón e Waliszewski, 2005).

De referir que a utilização de plantas geneticamente modificadas como fonte de pigmentos com aplicações industriais não tem sido aceite pelos consumidores, que preferem os produtos de origem natural aos modificados geneticamente (Julsing *et al.*, 2007).

III. METABOLISMO VEGETAL

O conjunto de reações químicas que ocorrem constantemente nas células designa-se por metabolismo. O metabolismo fisiológico é indispensável para a degradação e síntese de compostos químicos fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do organismo (animal e vegetal). A presença de enzimas específicas é indispensável para o decurso das reações químicas, de forma a garantir o processo catalítico das mesmas e as vias metabólicas, constituídas por uma série de reações químicas, em que o produto final de uma reação serve de reagente à seguinte (Moyna e Menéndez, 2001). Os produtos intermediários formados nessas reações são reencaminhados para outras vias metabólicas, estabelecendo-se uma rede de reações químicas que ativam e inibem a atividade ou expressão de genes que, por sua vez, codificam as enzimas responsáveis pela manutenção dessas vias, no sentido de obter a síntese de metabolitos primários (Figura 1) (De Sousa, 2010).

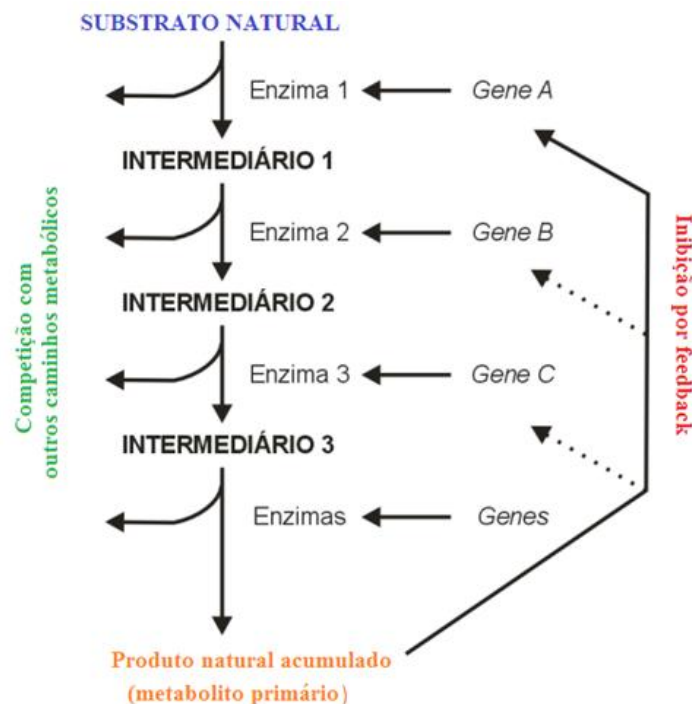


Figura 1. Vias metabólicas com possibilidade de competição pelo intermediário e regulação via *feedback* ou pelo controlo da expressão genética (Adaptado de Moyna e Menéndez, 2001).

O metabolismo das plantas não é exceção. No interior da planta ocorrem diferentes processos bioquímicos de extraordinária complexidade. Esses processos constituem, em conjunto, o metabolismo vegetal. Este metabolismo tanto inclui reações simples, como reações complexas, como por exemplo, o fabrico de alimento mediante a presença da luz (fotossíntese). É o metabolismo geral da planta que permite o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, possibilitando assim a perpetuação das espécies (Schaaf *et al.*, 1995).

3.1. Metabolismo primário

Todos os seres vivos, animais e vegetais, possuem um metabolismo geral comum designado metabolismo primário. O metabolismo primário tem como objetivo a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies (De Sousa, 2010; Santos, 2001). Ao metabolismo primário das plantas estão associados todos os processos fotossintéticos que originam a formação de ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs, α -aminoácidos, hidratos de carbono, ácido gordos, proteínas e ácidos nucleicos, todos envolvidos nos processos vitais da planta (Figura 2) (Schaaf *et al.*, 1995).

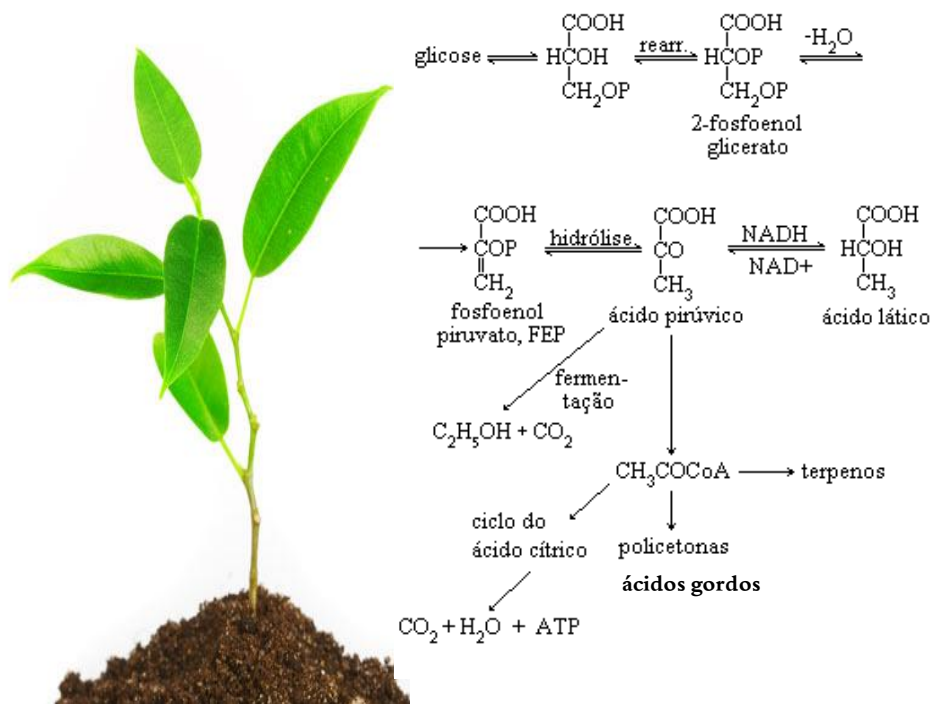


Figura 2. Metabolitos primários produzidos pelas plantas.

Segundo a teoria evolucionista, o metabolismo primário é muito semelhante em todas as plantas, uma vez que todos os seres vivos derivam de um precursor comum, do qual conservam algumas características (Santos, 2001). O metabolismo primário compromete os processos químicos que cada planta deve levar a cabo diariamente para desenvolver-se, sobreviver e reproduzir-se, nomeadamente a fotossíntese, a glicólise, o ciclo do ácido cítrico, a síntese de aminoácidos, as transaminações, a síntese de proteínas, enzimas e coenzimas, a síntese de materiais estruturais, a duplicação do material genético, a reprodução celular (crescimento), a absorção de nutrientes, entre outros. Segundo Groenigen *et al.* (2015) os metabolitos primários caracterizam-se por exercerem uma função metabólica direta; serem compostos essenciais como intermediários nas vias catabólica e anabólica da planta; serem compostos comuns em todas as plantas; quimicamente incluírem-se nas classes dos hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos ou clorofilas.

Assim, através do estudo do metabolismo das plantas, depreende-se que estas são capazes de produzir inúmeros compostos orgânicos, os quais são divididos em metabolitos primários e secundários, dependendo da via metabólica responsável pela sua síntese (Groenigen *et al.*, 2015). Kabera *et al.* (2014) referiram que os metabolitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, enquanto os metabolitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não possuem relação com o crescimento e desenvolvimento da planta. No entanto, é fundamental realçar que os metabolitos primários são os grandes precursores dos metabolitos secundários, onde se inserem os pigmentos naturais, tema desta dissertação.

3.2. Metabolismo secundário

Os metabolitos secundários têm origem no processo de conversão da energia luminosa em energia química, permitindo que a planta responda aos diferentes fatores ambientais, quer físicos, quer biológicos, permitindo comunicar e interagir com diferentes organismos, atraindo-os ou repelindo-os, sustentando-os ou destruindo-os (Castro *et al.*, 2005; Maraschin e Vepoorte, 1999).

Os seres humanos têm usado as plantas para fins medicinais devido ao vasto rol de compostos químicos sintetizados pelas mesmas (Petrovska, 2012). Muitos registos

científicos publicados até à data evidenciam o uso desses compostos em aplicações farmacêuticas (Kabera *et al.*, 2014; Maffei *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2010; Savithramma *et al.*, 2011) e, por esse motivo, nos últimos 20 a 30 anos, o estudo dos metabolitos secundários vegetais tem evoluído cada vez mais (Okada *et al.*, 2010). O recurso a diferentes técnicas analíticas, tais como cromatografia, eletroforese, técnicas de isótopos e enzimologia conseguiram elucidar sobre as estruturas químicas exatas destes compostos, possibilitando o esclarecimento das vias biossintéticas vegetais (Balunas e Kinghorn, 2005).

Através destas vias metabólicas foi possível identificar os metabolitos secundários, os quais, mediante a sua natureza química, pertencem a classes diferentes. Cada família de plantas, género ou espécie produz uma panóplia de compostos químicos, muitas das vezes usados como marcadores taxonómicos na classificação botânica da planta (Thrane, 2001). Embora muitos dados científicos afirmem que os metabolitos secundários não desempenham um papel crucial para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das células vivas, eles são fundamentais na defesa e proteção da planta contra qualquer dano ecológico (Samuni-Blank *et al.*, 2012). Portanto, estes compostos são geralmente sintetizados pelas plantas de acordo com as suas necessidades específicas, que incluem as condições ambientais, as interações com outras plantas e a proteção contra predadores (Savithramma *et al.*, 2011). No entanto, na vida humana, estes compostos podem ser utilizados como medicamentos (princípios ativos ou excipientes), aromatizantes ou corantes. Pelos motivos supracitados, torna-se imperativo averiguar a relação existente entre o metabolismo primário e secundário das plantas, no sentido de compreender a origem da síntese dos metabolitos secundários. Na maioria da literatura publicada até à data, afirma-se que os metabolitos secundários extraídos das plantas são subdivididos em três classes principais: terpenoides, alcalóides e compostos fenólicos (Figura 3), os quais apresentam atividade farmacológica interessante (Pal *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016; Savithramma *et al.*, 2011).

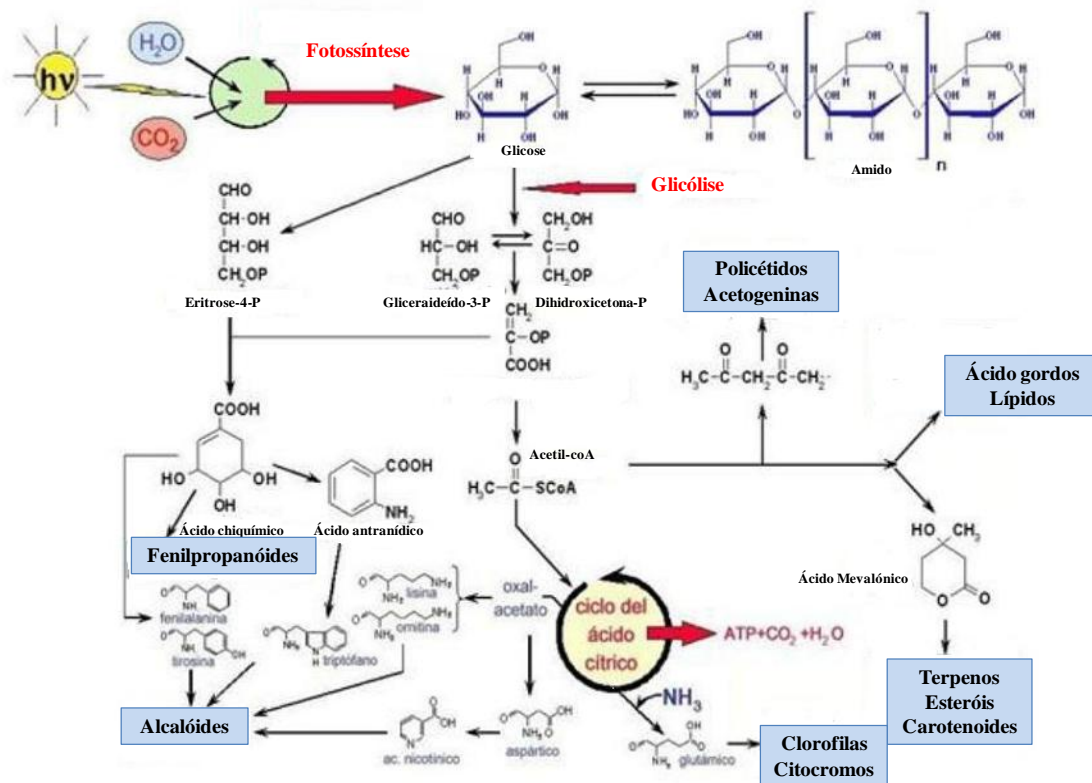


Figura 3. Origem de alguns metabolitos secundários (alcalóides, terpenos e fenilpropanoides) provenientes do metabolismo primário da planta (Adaptado de Gárcia e Carril, 2009).

Pela análise da Figura 3, constata-se que as vias de biossíntese da planta são responsáveis pela formação de metabolitos primários e secundários. As reações biossintéticas consomem energia, sendo esta obtida a partir da glicólise e do ciclo do ácido cítrico. A oxidação da glicose, dos ácidos gordos e dos aminoácidos resulta na formação de adenosina trifosfato (ATP), que é uma molécula de elevada energia formada a partir do catabolismo dos compostos primários (Petrovska, 2012). Considerando que o catabolismo envolve a oxidação de moléculas primárias e que a biossíntese ou anabolismo envolve reações de redução, o ATP é “reciclado” em reações anabólicas, as quais utilizam moléculas intermediárias nas vias biossintéticas, como por exemplo, o fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) como agente redutor ou dador de hidrogénio. Este catalisador é uma das muitas coenzimas necessárias ao metabolismo, sendo a mais comum a coenzima A (CoA) (Michal e Schomburg, 2013).

As vias mais comuns para a biossíntese dos metabolitos secundários são realizadas através das pentoses para os glicídios, do ácido chiquímico para os fenóis, taninos e alcalóides aromáticos, do acetato-malonato para fenóis e alcalóides e do ácido mevalónico para os terpenos, esteróides e alcaloides (Dewick, 2002). De acordo com a Figura 3, os compostos químicos resultantes dos processos da fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs são utilizados para a síntese de intermediários biossintéticos, sendo que os metabolitos secundários com maior importância provêm da acetil coenzima A (acetil-CoA) e dos ácidos chiquímico e mevalónico (García e Carril, 2009).

Sendo os metabolitos secundários substâncias ativas com atividade farmacológica reconhecida, estes apresentam valor comercial, tanto para a indústria farmacêutica, como para a indústria alimentar, agrônoma, cosmética, entre outras (Simões *et al.*, 2010).

3.3. Importância económica e farmacológica

A importância a nível económica do metabolismo secundário reside em três grandes áreas: fitoterapia, nutracêutica e aplicações industriais na área da saúde pública. A atual facilidade em isolar genes que codificam enzimas chave do metabolismo secundário permitirá no futuro próximo com a ajuda da biotecnologia potencializar estas áreas de aplicação (Briskin, 2000).

A presença de vários princípios ativos presentes nos extratos vegetais resultantes das vias metabólicas vegetais, bem como de alguns metabolitos secundários com funções complementares na defesa contra pragas, permitem diminuir a resistência exercida pelos organismos patogénicos a alguns fármacos. Por outro lado, os metabolitos secundários são reconhecidos pela sua atividade citotóxica e, quando utilizados em doses adequadas, podem ser usados como agentes antimicrobianos naturais. Segundo Briskin (2000) estes compostos atuam no mecanismo neurotóxico, potenciando o seu uso como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos. O mesmo autor defende que estes metabolitos secundários apresentam funções semelhantes aos metabolitos endógenos animais, tais como, recetores

hormonais ou neurotransmissores, podendo ser úteis na terapia de doenças do sistema nervoso central e do sistema endócrino (Briskin, 2000).

Enquanto o metabolismo primário vegetal apresenta maior importância para a nutrição humana, o metabolismo secundário é de maior relevância para a nutracêutica. Esta área emergente combina a alimentação com a prevenção de doenças, através da ingestão de alimentos funcionais, os quais integram um rol de metabolitos secundários (Vainstein *et al.*, 2001).

Outra aplicação industrial associada aos metabolitos secundários é a função pigmentante. Atualmente quase todos os corantes são derivados de petróleo, como a anilina e outros compostos aromáticos. Contudo, o petróleo, para além de ser poluente, é escasso, o que inviabiliza o seu uso. Como alternativa, dever-se-ão utilizar em maior escala os pigmentos naturais resultantes do metabolito secundário das plantas, seja na indústria farmacêutica, cosmética ou alimentar (Vainstein *et al.*, 2001).

Face ao exposto, o capítulo seguinte incidirá nos pigmentos naturais sintetizados pelas plantas, tema fulcral desta dissertação, não descurando as vias metabólicas associadas aos mesmos.

IV. PIGMENTOS NATURAIS

Desde que se conhecem relatos históricos sobre os nossos antecedentes que o interesse pela luz e pelas cores sempre foi manifestado, impulsionando cada vez mais o conhecimento científico pela área. Ao longo dos tempos foram utilizadas, pelas diferentes civilizações, diversas substâncias pigmentantes extraídas das plantas e dos animais. Entende-se por pigmentos, substâncias orgânicas que determinam a cor dos tecidos animais e vegetais. Segundo Gomes *et al.* (2006), um pigmento é considerado natural quando é submetido apenas a processos de natureza física, tais como maceração ou esmagamento.

De facto, a cor sempre fascinou o homem. O fenómeno da cor pode ter diferentes origens, desde a dispersão à absorção da luz, promovendo a ocorrência de muitos fenómenos promotores das cores presentes na natureza. Para os químicos, o que dá cor são as moléculas, a que outros chamam pigmentos ou corantes (Melo *et al.*, 2006).

São muitas as tonalidades presentes nas plantas, sendo que as mesmas estão relacionadas com diferentes compostos químicos sintetizados pelas mesmas. Por exemplo, os polifenóis constituem um grupo muito diversificado de compostos que dão origem às cores branca, amarela, vermelha e azul de muitas plantas e frutos (Melo *et al.*, 2006). Outro grupo importante é o dos carotenoides, grupo de compostos químicos responsáveis pelo intervalo de cores compreendido entre o amarelo e o vermelho, como o amarelo dos estigmas da planta do açafrão (*Crocus sativu*), onde a crocetina é o cromóforo responsável por essa tonalidade. Os tons verdes também são frequentes. Normalmente associados ao processo de fotossíntese da planta, as clorofilas são igualmente importantes na caracterização da flora mundial.

Nos subcapítulos seguintes serão abordados com maior detalhe o processo de síntese destes compostos e a sua relevância na coloração das plantas.

4.1. Clorofilas

As clorofilas são os pigmentos naturais presentes nos cloroplastos das folhas e noutros tecidos vegetais (Von Elbe, 2000). No século XIX, Pelletier e Caventou (1818), propuseram o nome “clorofila” para caracterizar a substância verde extraída das folhas das plantas. A fotossíntese é o processo pelo qual o vegetal transforma a energia luminosa em energia química e é dependente dos pigmentos, moléculas orgânicas que captam a luz. De acordo com Silva *et al.* (2013), os pigmentos fotossintéticos que se encontram nas plantas são as clorofilas a e b, de cor verde intensa e verde- amarelada, respetivamente, e os carotenoides que incluem os carotenos, de cor laranja, e as xantofilas, com cor amarela. As clorofilas localizam-se nos cloroplastos, sendo neste organelo onde ocorre a fotossíntese, isto é, onde acontecem as duas reações importantes: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, no estroma do cloroplasto. Estes organelos também contêm outros pigmentos chamados acessórios, como os carotenoides (carotenos e xantofilas) (Streit *et al.*, 2005).

A clorofila é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada, constituída por quatro anéis pirrol. Estes anéis numeram-se de 1 a 4 ou de “a” a “d”, de acordo com o sistema de numeração de Fisher (Schoefs, 2002). De uma maneira geral, todas as clorofilas são formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio (Mg) (Figura 4). As clorofilas a e b encontram-se na natureza numa proporção de 3:1, respetivamente, e diferem nos substituintes do carbono C-3. Na clorofila a, o anel de porfirina contém um grupo metilo (-CH₃) no C-3, enquanto a clorofila b contém um grupo aldeído (-CHO) nessa posição. A estabilidade da clorofila b deve-se ao efeito atraidor de eletrões de seu grupo aldeído no C-3 (Von Elbe, 2000). A clorofila b é sintetizada a partir da oxidação do grupo metilo da clorofila a a grupo aldeído. A clorofila b pode ser convertida em clorofila a através de uma enzima chamada clorofila a oxigenase, que catalisa a conversão do grupo metilo em grupo aldeído (Xu *et al.*, 2001). A clorofila a é o pigmento utilizado no primeiro passo do processo fotossintético, a fotoquímica, enquanto que os restantes pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os locais reativos, sendo designados de pigmentos acessórios. Ainda segundo Xu *et al.* (2001), a presença e a abundância dos pigmentos fotossintéticos variam de acordo com a espécie vegetal.

Os principais pigmentos acessórios incluem outros tipos de clorofilas, tais como a clorofila *b*, presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; a clorofila *c*, em feofitas e diatomáceas; e a clorofila *d* em algas vermelhas (Taiz e Zieger, 2004).

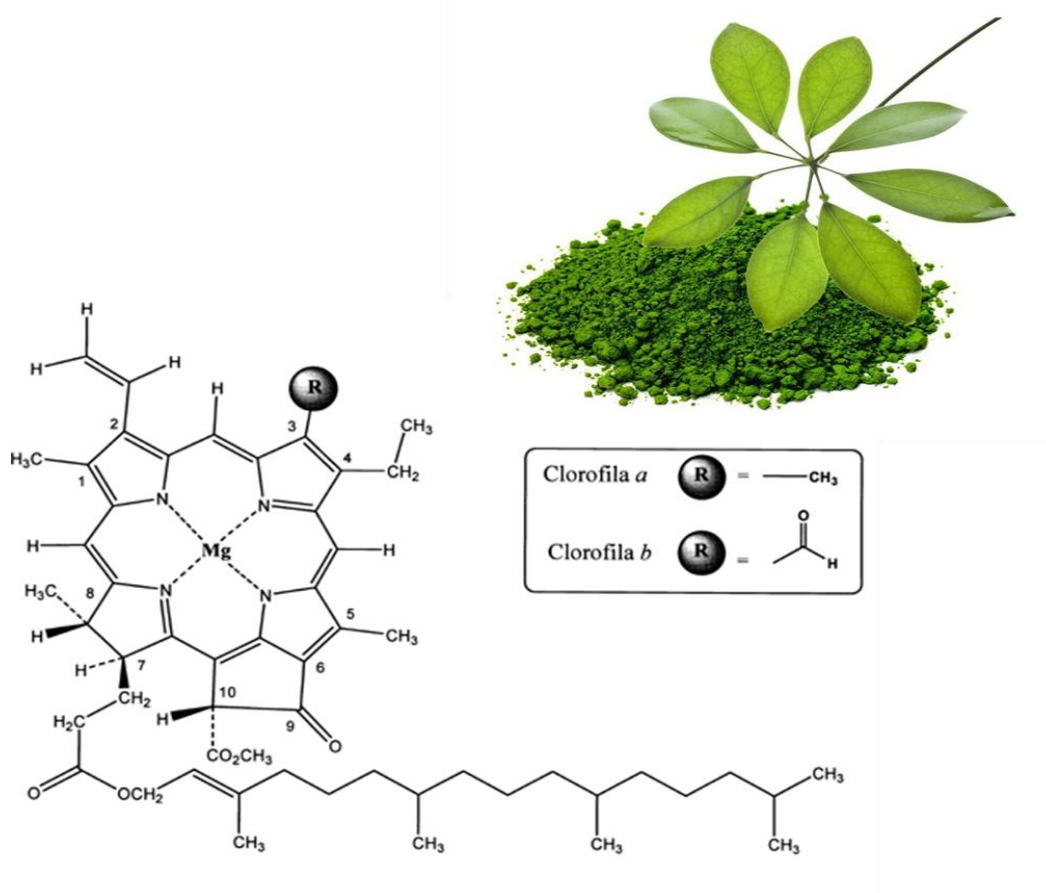


Figura 4. Estrutura química das clorofilas *a* e *b* (Adaptado do site <http://reasonandscience.heavenforum.org/t1546-the-biosynthesis-pathway-of-chlorophyll-essential-for-advanced-life-is-irreducible-complex>).

Vale ressaltar que todos os tipos de clorofilas são verdes, mas existem variações nas suas estruturas que fazem com que o espectro de absorção seja um pouco diferente se comparadas umas com as outras. Isso permite que as clorofilas se completem para aumentarem o alcance de absorção do espectro do visível.

A nível do processo biológico, a biossíntese das clorofilas é complexa, incluindo 17 reações químicas altamente específicas, das quais as oito últimas são catalisadas por enzimas específicas desta via metabólica (Figura 5).

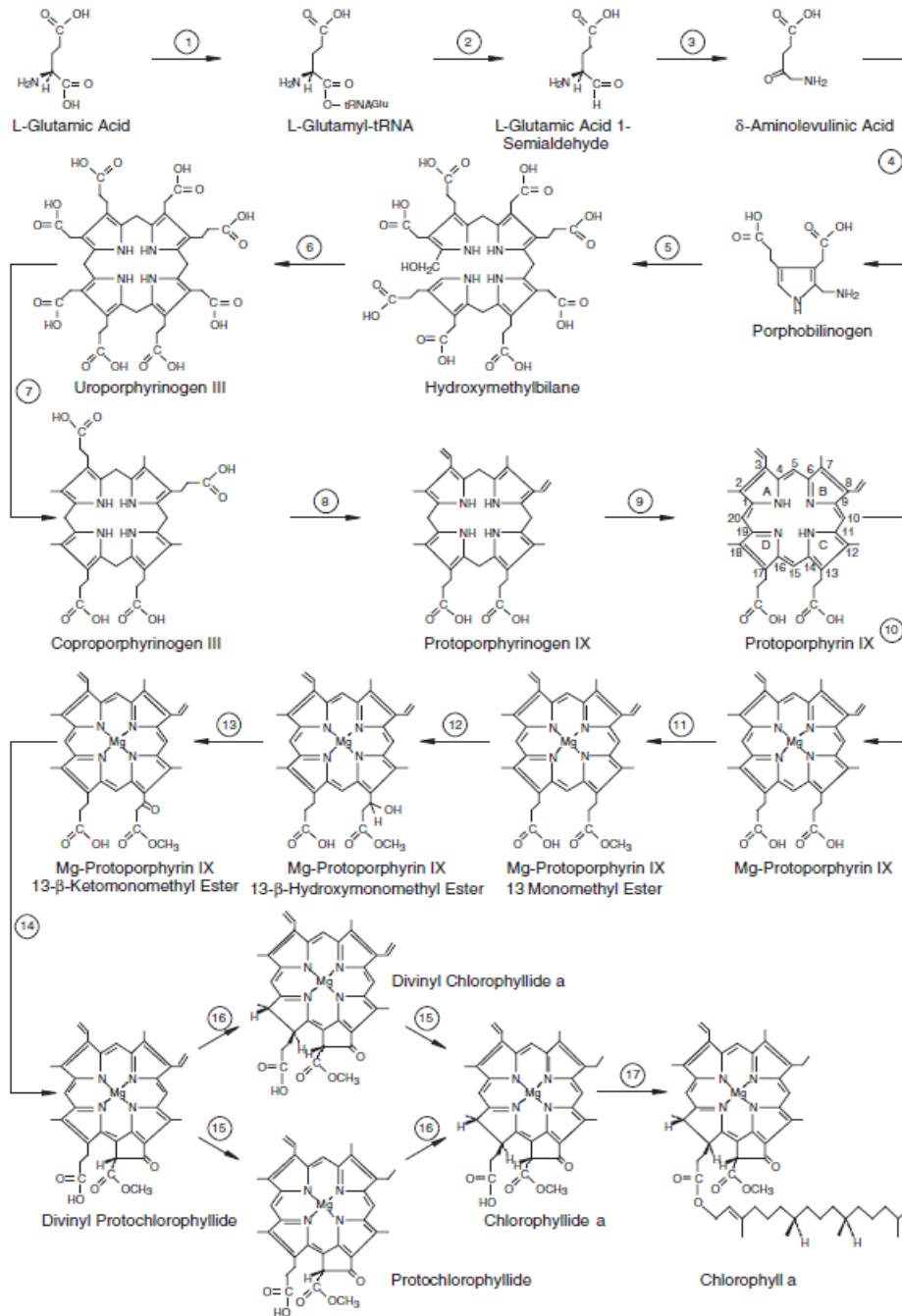


Figura 5. Representação da via metabólica da síntese de clorofila *a* (Adaptado do site <http://reasonandscience.heavenforum.org/t1546-the-biosynthesis-pathway-of-chlorophyll-essential-for-advanced-life-is-irreducible-complex>).

Embora seja do conhecimento geral que as clorofilas predominantes sejam a *a* e a *b*, é importante referir que a clorofila *b* se converte em clorofila *a* pela ação catalítica da clorofila *a* oxigenase, a qual catalisa a conversão do grupo metilo em grupo aldeído (Xu *et al.*, 2001)

O fitol é um álcool isoprenoide monoinsaturado constituído por 20 carbonos. O grupo fitol é responsável pela característica lipossolúvel das clorofilas. A perda do grupo fitol influencia a ação catalítica da enzima clorofilase, bem como as condições de acidez do meio. De facto, após síntese das clorofilas, estas podem alterar-se quimicamente por diversos fatores, como por exemplo, pela ação térmica, em que o magnésio se torna facilmente substituído pelo catião hidrogénio, formando feofitinas, compostos de cor verde escura e pouco atrativos nas plantas. Apesar dos tecidos vegetais serem ácidos, as clorofilas são bastante estáveis, dado estarem ligadas a macromoléculas (proteínas e lípidos), conferindo uma função protetora à planta. Por outro lado, o magnésio também influencia o tamanho do cromóforo. Assim, quando ocorre a perda do mesmo, a cor da planta modifica. Por sua vez, os iões magnésio presentes nestes pigmentos são facilmente substituídos por metais divalentes, formando complexos com cobre que apresentam cor verde brilhante, o que faz com que plantas sejam mais apelativas. Segundo Barroso (1998), os feoforbídeo *a* e a feofítina *a* são dois produtos da degradação da clorofila *a*, podendo interferir na quantificação desta última, uma vez que absorvem luz e fluorescem na mesma região do espectro, estando diretamente relacionados com a concentração de clorofila *a* presente nas plantas. A degradação oxidativa dos lípidos, vitaminas, proteínas e pigmentos naturais resulta na perda das tonalidades características da planta, incidindo nas clorofilas (Egea *et al.*, 2010; Pathirana *et al.*, 2013). Assim, as clorofilas são degradadas a produtos incolores, expondo, dessa forma, outros pigmentos, nomeadamente os carotenoides. A senescência tem sido definida como um processo regulado geneticamente, o qual leva à morte de células, órgãos ou de todos os organismos. Em plantas, a senescência é acompanhada por mudanças morfológicas e/ou alterações nas propriedades bioquímicas e biofísicas do metabolismo. A senescência nas folhas, em particular, pode envolver a degradação de proteínas, clorofilas, ácidos nucleicos e membranas, seguida pelo transporte de alguns dos produtos de degradação para outros tecidos da planta. Em frutas e legumes, a perda das clorofilas está associada a mudanças estruturais que libertam ácidos e enzimas degradativas dos vegetais (como a celulase) (Ayala-Zavala *et al.*, 2011). Vários estudos

relataram uma perda de cerca de 95% de clorofila *a* durante a senescência de folhas, sendo os carotenoides os seus substitutos sucessores (Alkema e Seager, 1982; Guedes *et al.*, 2011).

4.1.1. Propriedades biológicas das clorofilas

Os pigmentos naturais estão relacionados com atividades biológicas importantes. Os seus efeitos benéficos relativos à promoção da saúde estão associados às suas atividades antioxidantes, à prevenção de processos oxidativos (stresse oxidativo), aos efeitos anti-inflamatórios e à prevenção das doenças crónicas não transmissíveis (Chew e Park, 2004).

Segundo a Organização científica NRC (Conselho Nacional de Pesquisa) já foram identificadas mais de 12000 substâncias naturais presentes nas plantas, incluindo-se aqui alimentos vegetais, com atividade biológica comprovada, nomeadamente, antibiótica, hormonal, antioxidante, quimiopreventiva e imunológica (National Research Council, 1996).

Estudos relacionados com as atividades antioxidantes e quimiopreventivas das clorofilas foram impulsionados na década de 80. Sato *et al.* (1986) e Sakata *et al.* (1990) confirmaram atividade antioxidante da clorofila e dos derivados da clorofilina cúprica. A clorofilina cúprica é um derivado sintético da clorofila, comumente utilizado em alguns países como aditivo alimentar, conferindo coloração verde aos produtos. Mais recentemente, Ferruzzi *et al.* (2001, 2002) estudaram a capacidade absorptiva destes pigmentos em células intestinais humanas da linhagem Caco-2 e comprovaram que o teor de clorofilina cúprica nas células intestinais humanas Caco-2 aumentava, sugerindo haver transporte ativo e passivo através dessas células. Também alguns estudos atribuem atividade antineoplásica à clorofila e ao seu derivado sintético, a clorofilina cúprica (Chenormorsky *et al.*, 1999; Dashwood, 1997; Odin, 1997).

Segundo Lanfer-Marquez (2003), o fitol, integrante da molécula de clorofila, assume efeitos biológicos importantes, tais como atividade termogénica em mamíferos e atividade inibidora sobre efeitos teratogénicos do retinol.

4.2. Polifenóis

O termo “polifenóis” foi introduzido há algumas décadas, visando a substituição do termo “taninos vegetais”, o qual incluía os compostos fenólicos hidrossolúveis com peso molecular relativamente pequeno (JinDai e Mumper, 2010). Assim, o termo polifenóis usa-se atualmente para designar compostos que vão desde simples ácidos fenólicos a taninos condensados altamente polimerizados (White *et al.*, 2010).

Esta classe de fitoquímicos, comumente designados como compostos fenólicos, encontra-se amplamente difundida no reino vegetal, distribuída por toda a planta de forma heterogénea (Lin *et al.*, 2016). Estes compostos são metabolitos secundários vegetais produzidos pelo ácido chiquímico e pela via das pentoses fosfato (Randhir *et al.*, 2004), quimicamente caracterizados pela presença de pelo menos um anel benzénico ligado a um ou mais grupos hidróxilo (Figura 6).

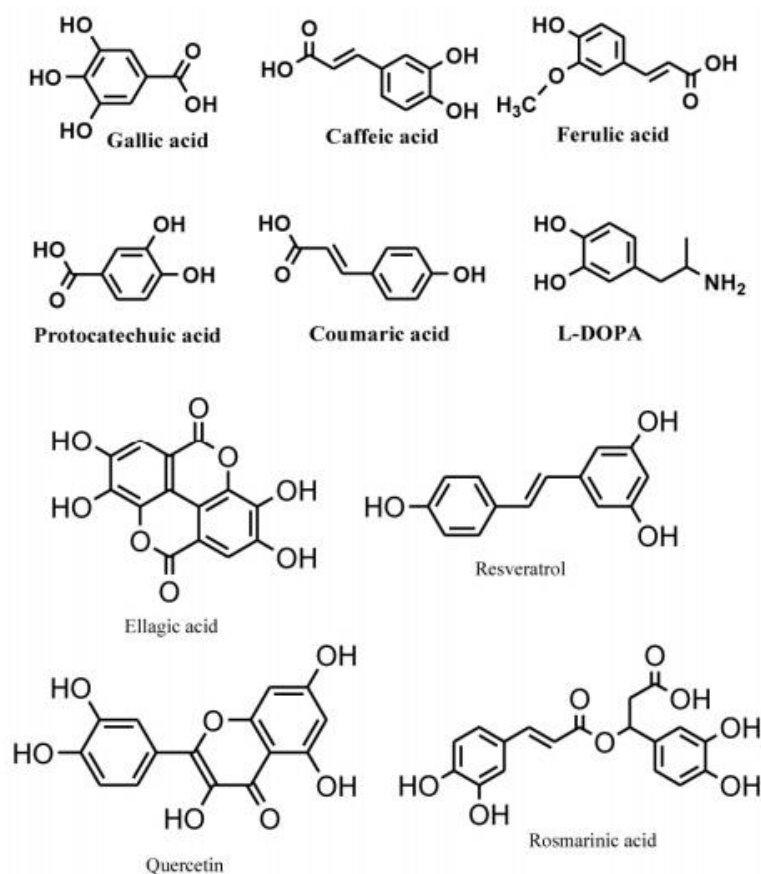


Figura 6. Compostos fenólicos comuns presentes nas plantas (Adaptado de Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014)

Na síntese dos compostos fenólicos, a primeira etapa inicia-se com a glicose e com a via da pentose fosfato, ocorrendo a transformação irreversível da glucose-6-fosfato em ribulose-5-fosfato pela enzima glucose-6-fosfato desidrogenase. Por um lado, a conversão em ribulose-5-fosfato produz fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e, por outro, a via das pentoses fosfato, juntamente com o fosfoenolpiruvato sintetizado pela glicólise, origina eritrose-4-fosfato, composto precursor dos compostos fenólicos, através da via fenilpropanoide. Este composto é, então, canalizado para a via do ácido chiquímico para produzir fenilalanina (Figura 7).

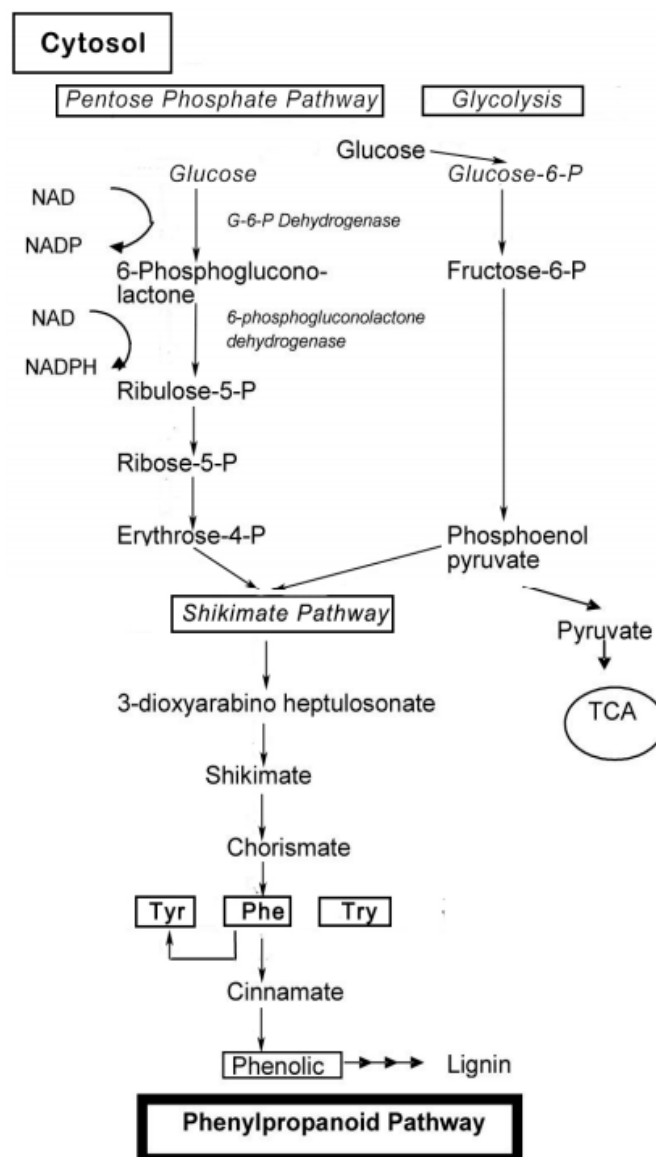


Figura 7. Biossíntese de compostos fenólicos pelas vias das pentoses fosfato, chiquímato e fenilpropanoide (Adaptado de Lin *et al.*, 2010).

Os fenólicos são os metabolitos secundários mais relevantes encontrados nas plantas, e a sua distribuição é feita aleatoriamente através do processo metabólico acima representado. Estas substâncias fenólicas, ou polifenóis, contêm numerosas variedades de compostos incluindo os ácidos fenólicos, flavonoides simples, flavonoides complexos e antocianinas coloridas (Babbar *et al.*, 2014). Estes compostos estão geralmente relacionados com as respostas de defesa da planta. Contudo, estes metabolitos secundários desempenham um papel importante noutros processos, como por exemplo, na ajuda da polinização, como agentes de coloração para camuflagem e de defesa contra herbívoros e no exercício de atividades antibacterianas e antifúngicas contra predadores naturais (Acamovic e Brooker, 2005; Alasalvar *et al.*, 2001; Edreva *et al.*, 2008; Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014).

De todos os compostos fenólicos, os flavonoides são os que apresentam maior expressão na pigmentação das plantas. Quimicamente são compostos que possuem uma estrutura geral com 15 carbonos e dois anéis aromáticos (Figura 8), os quais estão divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel pirano central. Até ao ano de 2008, foram identificadas mais de 8000 variedades de flavonoides (Tapas *et al.*, 2008). Deve-se a estas substâncias a maior parte das cores vermelha, azul e violeta das plantas, para além da coloração branca e amarela (Campos *et al.*, 2005).

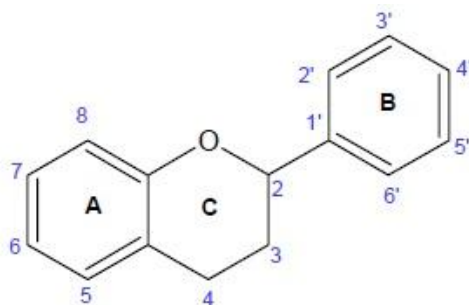


Figura 8. Estrutura geral dos flavonoides (*flavilium*) (<http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2010/10/flavonoide.jpg>).

Os pigmentos mais comuns desta classe de compostos existentes nos vegetais são os que apresentam uma estrutura da fenilbenzopirona, concretamente as flavonas e os flavonóis, dos quais já foram identificados aproximadamente 300 compostos. A

biossíntese destes polifenóis dá-se via ácido chiquimato, um importante intermediário na biossíntese de compostos aromáticos em plantas, dando origem ao ácido cinâmico e seus derivados. A condensação de um dos derivados do ácido cinâmico com três unidades de malonil-CoA origina um composto com 15 átomos de carbonos, que constitui o precursor inicial de todas as classes de flavonoides (Figura 9) (Dewik, 2010).

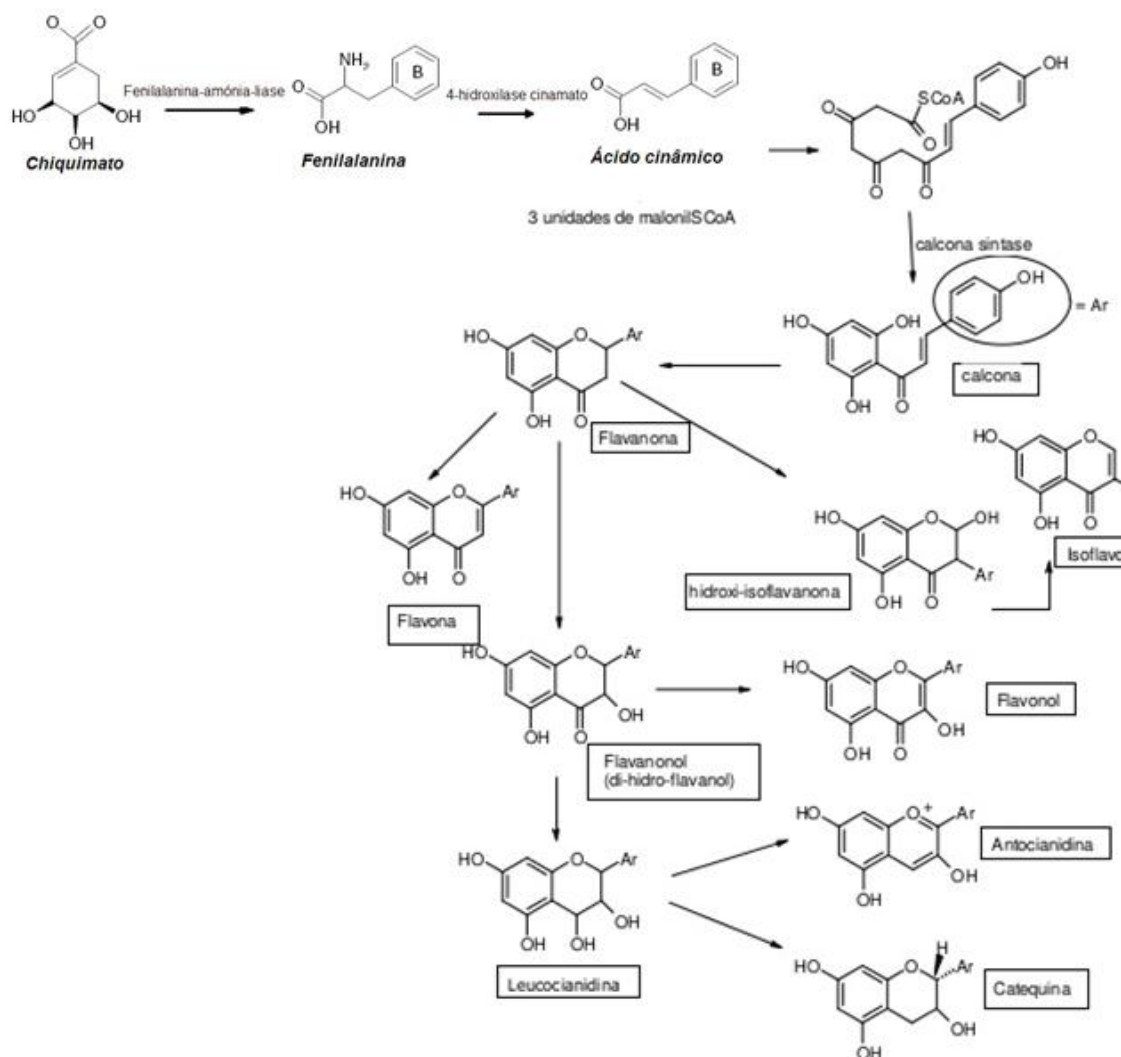


Figura 9. Biossíntese dos flavonoides (Adaptado de Araújo, 2009).

A classificação do tipo de flavonoide presente em determinado extrato de planta baseia-se nas suas propriedades de solubilidade e reações de coloração. As duas classes de flavonoides consideradas como mais importantes são os flavonóis e as antocianidinas (Dewik, 2010).

As antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o catião flavílico (2-fenilbenzopirílium) (Figura 10A). Na Figura 10B apresenta-se um exemplo da estrutura química de antocianidina, conhecida como cianidina. Os pigmentos geralmente encontram-se na forma de antocianinas, que derivam das antocianidinas. As antocianidinas não possuem grupos glicosídeos e a maioria apresenta grupos hidróxilos nas posições 3, 5 e 7 (Dewik, 2010).

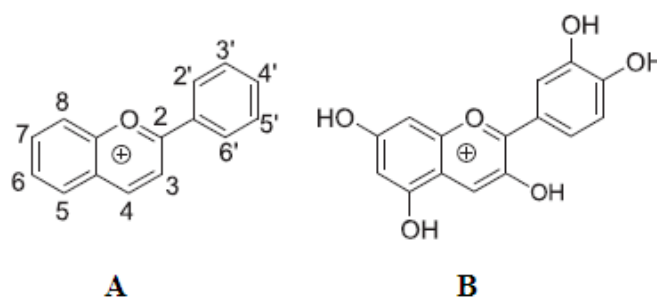


Figura 10. Estrutura do catião flavílico (A) e da estrutura da antocianidina (B) (Dewik, 2010).

O termo “antocianina” deriva do grego (*anthos* = flores; *kianos* = azul), proposto por Marquart em 1853 para designar os pigmentos azuis das flores. Posteriormente, verificou-se que a cor azul e outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes deviam-se aos pigmentos quimicamente similares aos que deram origem ao “flor azul”. Contrariamente aos outros flavonoides, as antocianinas são capazes de absorver a luz na região do espectro visível, conferindo uma infinidade de cores, entre o laranja, vermelho, púrpura e azul, dependendo do pH do meio em que se encontram. De modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma catião flavílico (AH^+). Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor, tornando-se praticamente incolores a pH aproximadamente 6, devido à presença predominante da espécie pseudobasecarbinol. Para valores de pH superiores a 6, quer a estrutura pseudobasecarbinol, quer a anidrobases quinoidal (A) podem formar a espécie *cis*-chalcona (CC) por ruptura do anel heterocíclico, o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível. A formação da *cis*-chalcona a partir da

anidrobases quinoidais pode ocorrer por dois caminhos diferentes: de forma direta, por aumento brusco de pH, ou com a formação das espécies anidrobases ionizadas (A^-), possivelmente resultante do aumento gradual de base entre os valores de pH 6,5 e 9. Quando da ionização das antocianinas, formam-se estruturas de anidrobases que apresentam cor azul. Em meio extremamente alcalino, observa-se o equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas *cis* e *trans*, apresentando coloração amarelada (Março e Poppi, 2008) (Figura 11).

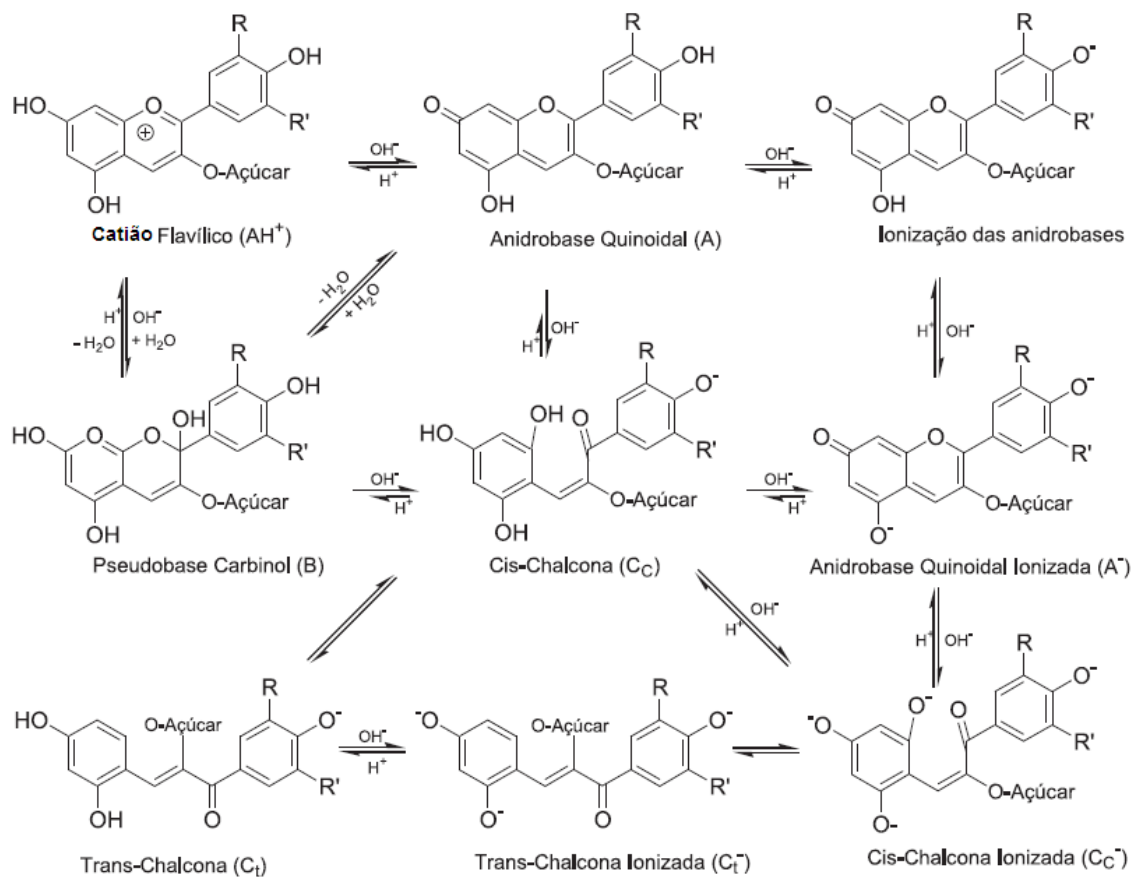


Figura 11. Possíveis transformações estruturais das antocianinas em função do pH (Março e Poppi, 2008).

Assim, a biossíntese destes compostos é fundamental para garantir a heterogeneidade de colorações existentes no ecossistema.

4.2.1. Benefícios dos polifenóis

Os polifenóis desempenham um papel muito importante em diversos mecanismos relacionados com a defesa das plantas. O seu espectro de ação estende-se a bactérias e fungos, inibindo o seu crescimento, a animais herbívoros, diminuindo a digestibilidade das forragens e ainda à proteção das plantas das radiações solares (Lin *et al.*, 2010; Moussa-Ayoub *et al.*, 2011). No entanto, nos últimos anos estes compostos têm despertado maior interesse pela comunidade científica devido aos seus efeitos benéficos, nomeadamente para a saúde do ser humano. Para além de serem compostos antioxidantes, podem apresentar propriedades anticarcinogénicas e anti-mutagénicas (Makhafola *et al.*, 2016).

Os ácidos fenólicos têm sido descritos como supressores da formação e desenvolvimento de várias neoplasias, nomeadamente, da pele, dos pulmões, do fígado, do esófago e do estômago (Moussa-Ayoub *et al.*, 2011). Muitos estudos têm evidenciado os benefícios dos compostos fenólicos, reportando-os como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes, antiproliferativos e anti-envelhecimento (Moo-Huchin *et al.*, 2015; Sales *et al.*, 2012; Shukitt-Hale *et al.*, 2008). Segundo Lin *et al.* (2016), estes compostos ajudam na prevenção do desenvolvimento da diabetes e, a longo prazo, neuropatias, nefropatias e retinopatias.

Muitos estudos têm associado o aumento do consumo de frutas e vegetais, ricos em compostos fenólicos, com a redução do risco de doenças cardiovasculares (Helena *et al.*, 2015; Kar *et al.*, 2009; Nöthlings *et al.*, 2008). Além disso, os compostos fenólicos encontrados em plantas, vegetais, frutas e bagas, ajudam na diminuição do risco de síndrome metabólica e de complicações relevantes inerentes à diabetes tipo II (Dembinska-Kiec *et al.*, 2008). Estes efeitos são atribuídos, em geral, à potencial capacidade dos compostos fenólicos em reduzir, neutralizar ou reparar os danos celulares resultantes do stresse oxidativo e do processo inflamatório decorrentes das doenças crónicas supracitadas.

4.3. Betalaínas

As betalaínas sempre receberam menor atenção do que as outras classes de pigmentos naturais, devido à sua restrita ocorrência no reino vegetal. Encontram-se na maioria das famílias da ordem Caryophyllales, exceto nas famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae, e em alguns gêneros de fungos *Basidiomicetos* (Gonçalves *et al.*, 2015; Sakuta, 2013). Entretanto, devido à descoberta recente da sua atividade antioxidante, fluorescência e consequentes propriedades biológicas, as betalaínas têm sido alvo de maior interesse por parte da comunidade científica (Gonçalves *et al.*, 2012).

A nível da sua caracterização química, as betalaínas são consideradas alcaloides azotados, de natureza hidrossolúvel, habitualmente localizados nos vacúolos das plantas (Gonçalves *et al.*, 2015). Estes compostos resultam do acoplamento de um cromóforo, o ácido betalâmico (Figura 12), com aminoácidos/aminas (betaxantinas amarelas) ou derivados de ciclo-Dopa (betacianinas vermelho-violeta) (Figura 13).

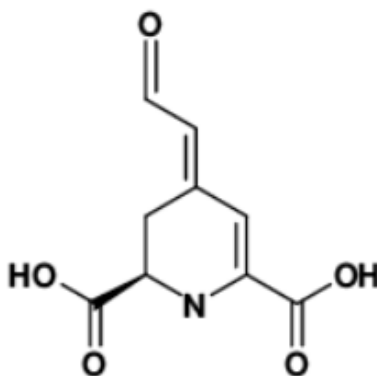


Figura 12. Estrutura química do ácido betalâmico (Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2015).

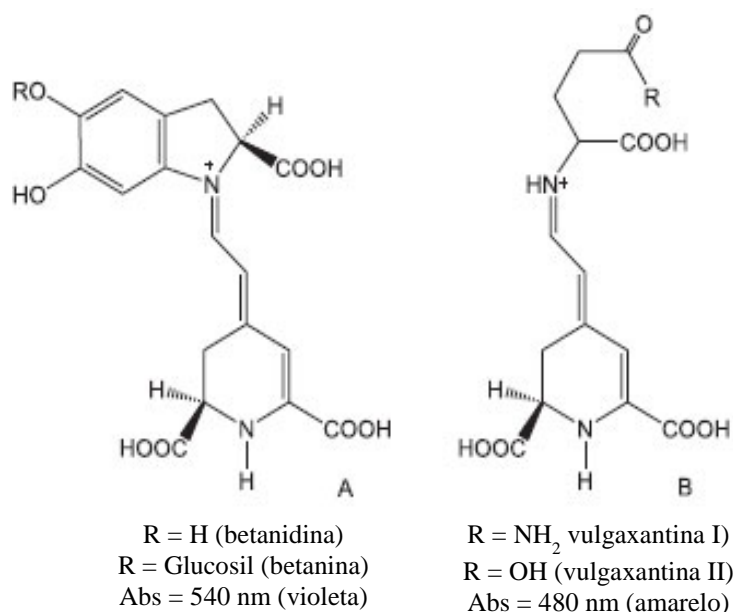


Figura 13. Estruturas químicas das betalaínas. A) betacianinas e B) betaxantinas
(Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2015).

Tal como os flavonoides, também estes compostos são pigmentos naturais, cujas cores são muito idênticas às produzidas pelas antocianidinas, podendo pigmentar as plantas de amarelo e vermelho. Tal facto permite que esta classe de compostos possa ser usada como aditivos alimentares e corantes em cosméticos e produtos farmacêuticos, mais concretamente, a betanina de tonalidade vermelha (E162) (Esatbeyoglu *et al.*, 2015). De todos os compostos que se inserem nesta classe de metabolitos secundários, a indicaxantina e a betanina são as mais conhecidas nestes dois grupos (Azeredo *et al.*, 2009). Devido a possíveis glicosilações e acilações, as betalaínas exibem uma grande diversidade estrutural, sendo que a betanina (betanidina-5-*O*-β-glucósido) é a betacianina mais comum presente no reino vegetal. No entanto, até à data, já foram descritos cerca de 50 tipos de betacianinas (vermelhas) e 20 tipos de betaxantinas (amarelas). As beterrabas contêm ambos os pigmentos, cerca de 75-95% de betacianina (betanina) e aproximadamente 95% de betaxantina (vulgaxantina I) (Terci, 2004).

A nível da sua síntese metabólica, as betalaínas são metabolitos secundários derivados do aminoácido L-tirosina. Os estudos com moléculas marcadas radioativamente demonstraram que a sua incorporação nas unidades estruturais permitiram prever a

O facto destes pigmentos naturais serem tão restritos a determinadas espécies vegetais condiciona o desenvolvimento de outros pigmentos naturais nas mesmas. De facto, a existência de betalaínas numa determinada planta, elimina a possibilidade da presença de compostos antociânicos na mesma (Sakuta, 2013). Até à data, não existe muita informação sobre a síntese das betalaínas, nem tão pouco sobre a razão pela qual estes compostos nunca existem em simultâneo com as antocianinas. Porém, segundo Brockington *et al.* (2011), existe a hipótese da via regulatória ser comum e das antocianinas atuarem como inibidoras da biossíntese de betalaínas e vice-versa.

Sabe-se também que as betalaínas apresentam grande estabilidade química em soluções de pH 4 a 5 e são razoavelmente estáveis em pH 5 a 7, apresentando instabilidade química à luz e ao ar, sendo também afetadas pela presença de água (Dias *et al.*, 2003). Por esses motivos, a instabilidade da cor das betalaínas representa um obstáculo para o seu uso industrial. Há autores que defendem que as cores predominantes das plantas resultam de classes de pigmentos do tipo clorofilas, carotenoides e flavonoides, não dando particular ênfase à contribuição de outros pigmentos oriundos das betalaínas e das melaninas (Schiozer e Barata, 2007). No entanto, as betalinas são os pigmentos responsáveis pela pigmentação vermelho-escura da beterraba (*Beta vulgaris*) e do vermelho-rubro da flor *Amaranthus* (Herbach *et al.*, 2006).

4.3.1. Propriedades funcionais das betalaínas

As betalaínas possuem estabilidade química e vários estudos referenciam-nas como compostos antioxidantes associados à proteção contra doenças degenerativas (Alimia *et al.*, 2011; Moussa-Ayoub *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns estudos sobre biodisponibilidade sugerem que as betalaínas (betanina e indicaxantia) protegem o organismo humano contra as modificações oxidativas das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Outros autores avaliaram as concentrações de vitamina E, β -caroteno e betalaínas incorporadas nas partículas de LDL após a ingestão de 500 g da fruta *cactus pear* (*Opuntia ficus-indica*) em oito voluntários saudáveis, verificando que após a ingestão, as concentrações de vitamina E e de β -caroteno na partícula de LDL não modificaram significativamente, contudo, a concentração de betalaínas era maior nas partículas de LDL, tornando-se mais resistente ao *stress* oxidativo (Tesoriere *et al.* 2004).

Também foi sugerida a atividade antineoplásica para estes compostos, pois segundo Lila (2004) a beterraba vermelha, principal fonte de betalaínas, não apresenta hepatotoxicidade ou mutagenicidade e as raízes da mesma apresentam um efeito inibitório no desenvolvimento do cancro da pele e dos pulmões. Outro estudo realizado por Stintzing e Carle (2004), relacionou a estrutura de várias betaxantinas e betacianinas com a atividade sobre radicais livres, verificando uma relação positiva entre o efeito antioxidante e a estrutura química das betalaínas. Enquanto as betaxantinas, com maior número de grupos hidróxilo e imino, favorecem a eliminação de radicais livres, a acilação das betacianinas aumenta o potencial antioxidante. Outras propriedades funcionais das betalaínas incluem atividades antivirais e antimicrobianas (Lila, 2004).

Apesar das atividades biológicas reconhecidas, mais estudos são sugeridos, uma vez que a nível de saúde pública, ainda não foram atribuídos valores seguros para a dose a ingerir destes compostos, não existindo legislação acerca do assunto (Downham e Collins, 2000).

4.4. Carotenoides

Como já foi referido anteriormente, as cores predominantes das plantas devem-se essencialmente a algumas classes de pigmentos naturais sintetizados pelas plantas, sendo as mais representativas as clorofilas, flavonoides e carotenoides.

Os carotenoides têm sido frequentemente utilizados como corantes naturais, tanto na indústria alimentar, como na indústria farmacêutica. São conhecidos pela sua cor e pelas suas propriedades biológicas, nomeadamente antioxidante, e por serem precursores da vitamina A ou retinol (Paiva e Russel, 1999). Das várias classes de pigmentos na natureza, os carotenoides estão entre os mais importantes, especialmente devido às suas variadas funções.

Quimicamente, estes compostos são pigmentos lipossolúveis encontrados principalmente em plantas, frutas, flores, algas e bactérias fotossintéticas, podendo igualmente ocorrer em algumas bactérias não-fotossintéticas, leveduras e bolores (Rao e Rao, 2007).

Os carotenoides são uma família de compostos pigmentados sintetizados por plantas e microrganismos, mas não por animais. A nível do metabolismo vegetal, estes compostos contribuem para o processo da fotossíntese e proteção contra a radiação solar (Schiozer e Barata, 2007).

Até à data, já foram identificados na natureza cerca de 600 carotenoides. No entanto, apenas 40 desses compostos integram os alimentos comumente utilizados na alimentação e, dentro destes, aproximadamente 20 carotenoides, incluindo o α -caroteno, o β -caroteno, a luteína e a criptoxantina, foram detetados no sangue e em tecidos humanos (Darvin *et al.*, 2011; Gerster, 1997; Zastrow *et al.*, 2009).

A estrutura química básica acíclica dos carotenoides, apresentada na Figura 15, apresenta 40 carbonos (C40), podendo, no entanto, ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação.

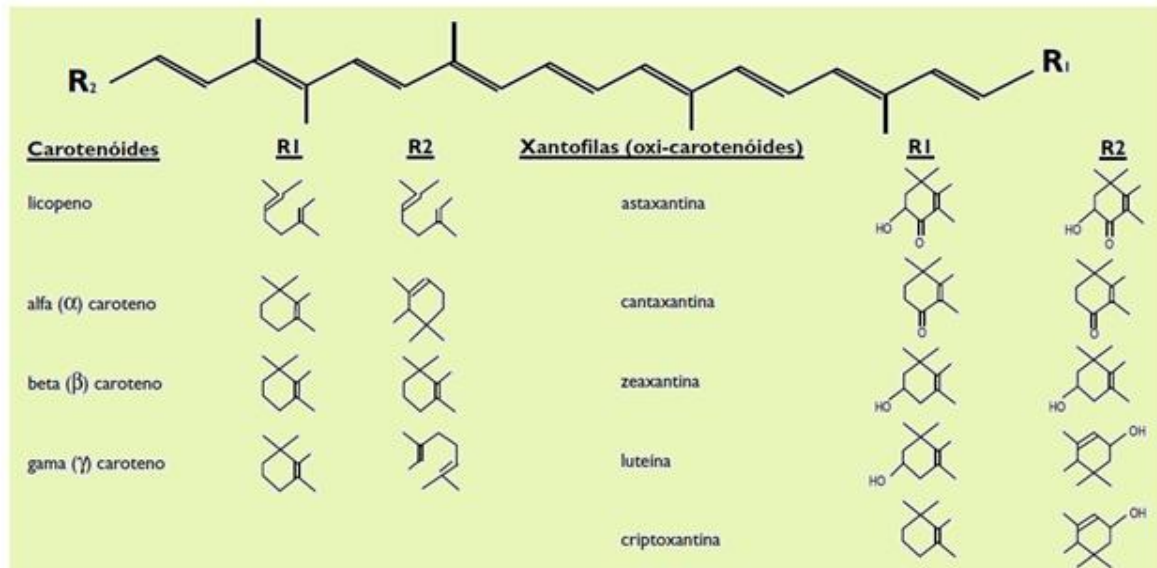


Figura 15. Estruturas genéricas dos carotenoides (Retirado de http://insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/198.pdf).

Os carotenoides, cuja estrutura apresenta apenas átomos de carbono e hidrogénio, são chamados carotenos e os carotenoides oxidados designam-se por xantofilas. Estas últimas apresentam grupos substituintes com oxigénio, como o grupo hidróxilo, o grupo cetónico e o grupo epóxido (Morais, 2006).

Os carotenoides podem ser de cadeia linear, como o licopeno, ou de cadeia cíclica numa das extremidade (γ -caroteno, citranaxantina) ou em ambas as extremidades (β -caroteno, β -criptoxantina, luteína). Sempre que as estruturas do anel terminal estão presentes, podem formar grupos OH ou C=O, dando origem a hidróxi e ceto carotenoides, respetivamente. Devido à elevada insaturação, fatores como o calor, a luz e os ácidos favorecem a isomerização dos carotenoides *trans* (forma mais estável na natureza) para a forma *cis*, originando uma pequena perda de cor e atividade pró-vitamínica (Morais, 2006).

A nível da biossíntese destes compostos, poder-se-á dizer que os carotenoides são compostos tetraterpénicos e a sua biossíntese apresenta um padrão idêntico a todos os terpenoides. De uma forma geral, o primeiro precursor específico na biossíntese dos terpenoides é o ácido mevalónico constituído por 6 carbonos (C6) que, após uma série de reações, forma geranyl difosfato (C10), farnesil difosfato (C15) e geranyl-geranyl difosfato (C20). A dimerização de duas moléculas de geranyl-geranyl difosfato resulta na síntese do fitoeno, primeiro composto com quarenta carbonos (C40), desprovido de cor. De seguida seguem-se uma série de insaturações a partir do fitoeno para formar fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno e, finalmente, o licopeno, conforme Figura 16 (Valduga *et al.*, 2009).

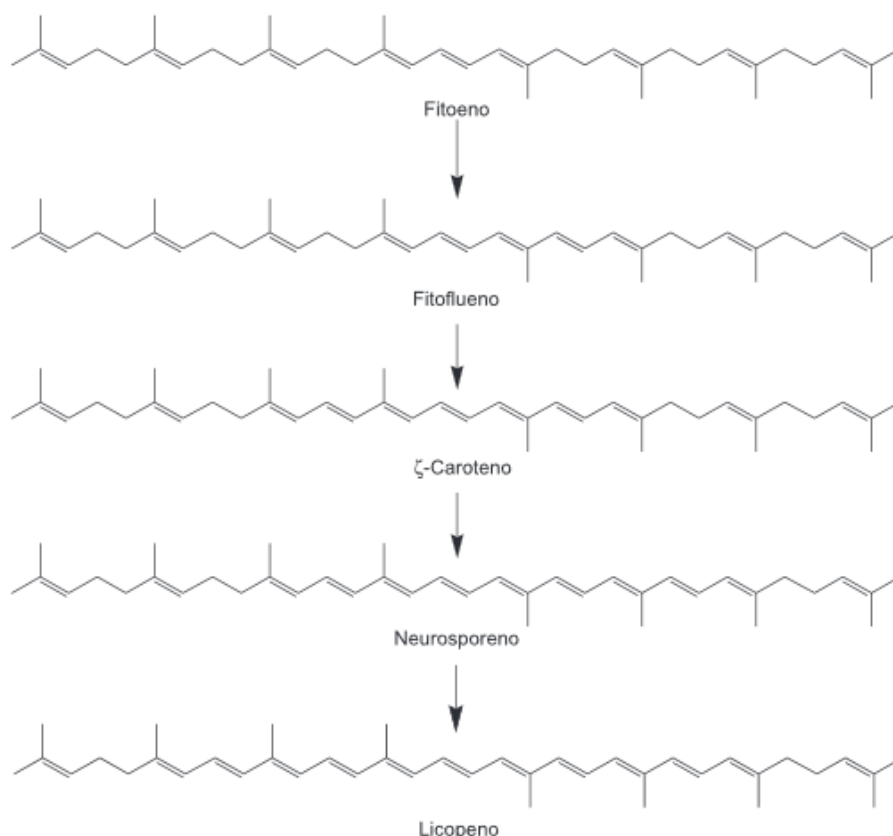


Figura 16. Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides (Retirado de Valduga *et al.*, 2009).

A ciclização dos carotenos pode ocorrer a partir do neurosporeno ou do licopeno (Figura 17). O neurosporeno sofre ciclização numa das extremidades, formando o anel β -ionona para formar o β -zeacaroteno ou o anel α do α -caroteno. Estes dois carotenos são transformados em γ -caroteno e δ -caroteno, respetivamente, através da introdução de uma dupla ligação, estendendo a cadeia de ligações duplas conjugadas. O licopeno pode também ser ciclizado numa das extremidades, originando o γ -caroteno e o δ -caroteno. Os carotenos são a classe que tem maior expressão na cor das plantas, devido a serem cristais de tonalidade vermelha, apolares e solúveis em solventes orgânicos apolares. O α -caroteno possui dois anéis β -ionona, enquanto o γ -caroteno apenas possui um anel β -ionona (Valduga *et al.*, 2009).

Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em β -caroteno e α -caroteno, respetivamente (Goodwin, 1981).

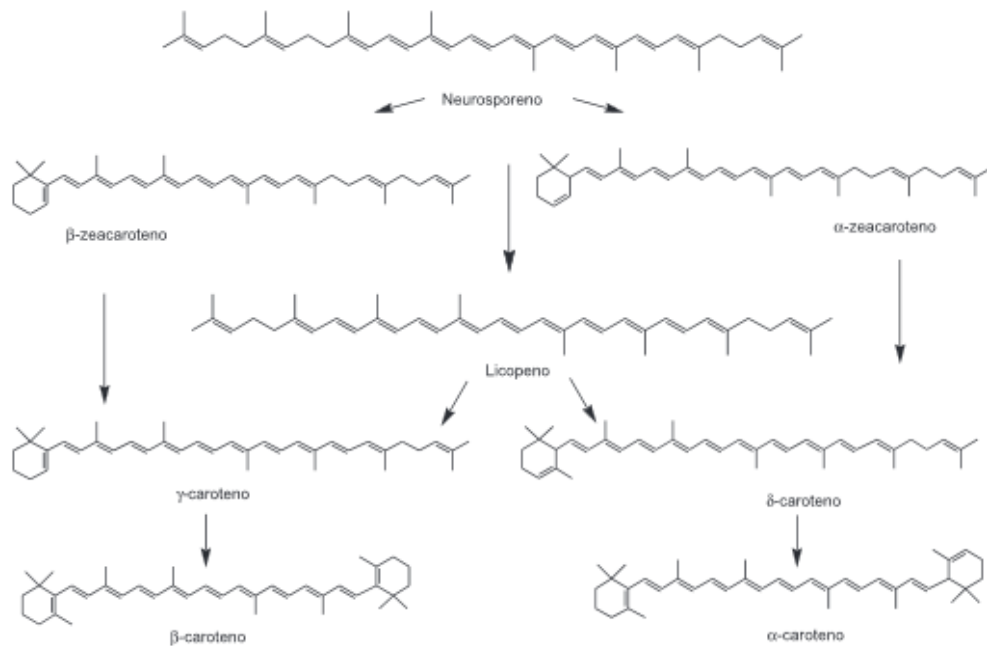


Figura 17. Ciclização dos carotenos acíclicos insaturados (Retirado de Valduga *et al.*, 2009).

Após a formação dos carotenos cíclicos, ocorre a introdução de grupos substituintes, como o grupo hidróxilo, produzindo-se as xantofilas a partir do α -caroteno e β -caroteno (Figuras 18 e 19) (Olivier e Palou, 2000).

Os principais derivados da degradação de carotenoides são os epoxicarotenoides, apocarotenoides e compostos voláteis que, apesar de terem uma atividade pró-vitamina A muito reduzida, ainda podem ser aproveitados como corantes alimentares, no caso de alguns apocarotenoides, ou como aromatizantes naturais, no caso dos compostos voláteis (Uenojo *et al.*, 2007).

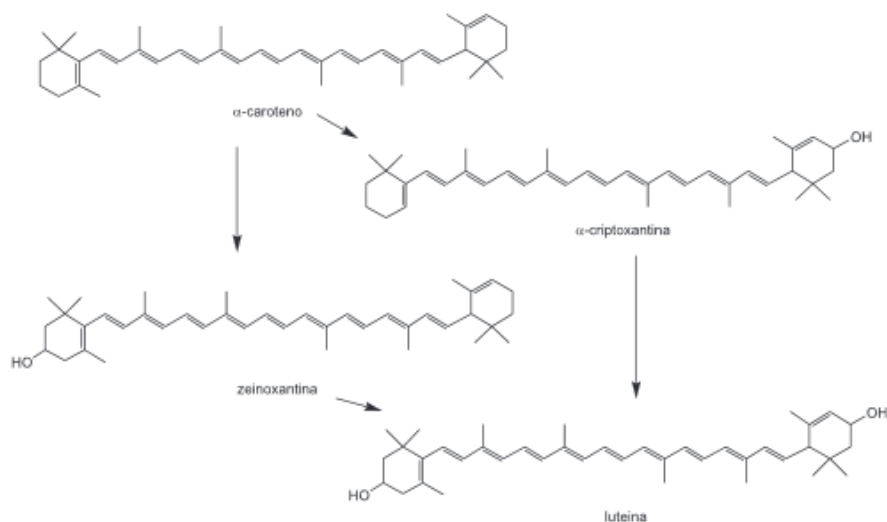


Figura 18. Formação de xantofilas a partir do α -caroteno (Retirado de Valduga *et al.*, 2009).

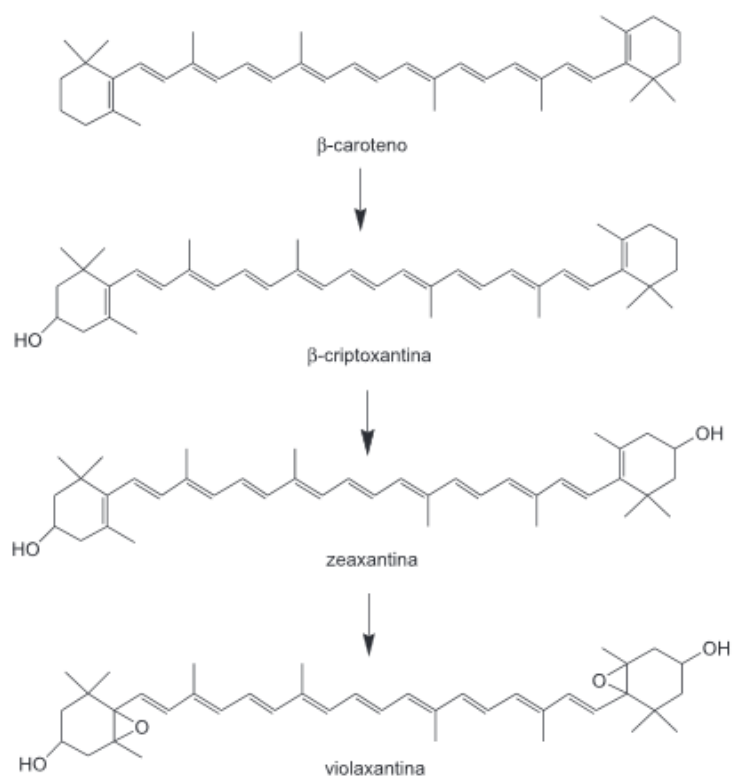


Figura 19. Formação de xantofilas a partir de β -caroteno (Retirado de Valduga *et al.*, 2009).

4.4.1. Propriedades biológicas dos carotenoides

Os carotenoides são substâncias bioativas com efeitos benéficos para a saúde humana, sendo a atividade pró-vitamina A a mais conhecida (Gazzoni, 2011). A vitamina A é um nutriente e essencial para o nosso metabolismo, participando no metabolismo da visão, no crescimento e diferenciação dos tecidos, na função imunológica, na reprodução e no desenvolvimento embrionário (Mezzomo e Ferreira, 2016).

Os compostos com função de pró-vitamina A têm um papel fundamental na manutenção, crescimento e diferenciação epitelial. O β -caroteno é considerado um protetor solar e o consumo de suplementos orais deste composto pode ser benéfico quando da exposição prolongada ao sol (Alemzadeh e Feehan, 2004; Kelly *et al.*, 2007). Outro carotenoide com função fotoprotetora é o licopeno que, quando administrado a indivíduos saudáveis a partir de diferentes fontes (tomate, cenoura e cápsulas de licopeno contendo β -caroteno), aumenta a proteção da pele contra os raios UV e previne o eritema (Stahl *et al.*, 2005).

Os carotenoides também apresentam ação antioxidante. Sendo estes compostos hidrofóbicos, espera-se que a sua ação antioxidante ocorra em ambiente lipofílico, como nas membranas celulares ou lipoproteínas. As reações antioxidantes nas membranas podem ocorrer tanto na presença de carotenoides apolares (carotenos), como polares (xantofilas). A capacidade antioxidante destas duas classes de carotenoides depende da sua localização na membrana. Assim, o β -caroteno e licopeno são capazes de sequestrar os ROS (Radicais livres de oxigênio) na porção hidrofóbica; já as xantofilas são mais eficientes na região polar, hidrofílica (Tapiero *et al.*, 2004). A eficácia dos carotenoides como antioxidantes está relacionada com o número de ligações duplas da sua estrutura, sendo o licopeno o mais eficiente. A capacidade antioxidante dos carotenoides apresenta um papel fundamental na prevenção de doenças associadas ao *stress* oxidativo, tais como cancro, cataratas, arteriosclerose e envelhecimento precoce (Jaswir *et al.*, 2011).

Os estudos referem algumas associações entre os carotenoides e a prevenção de doenças, nomeadamente, algumas doenças crónicas não transmissíveis associadas ao sistema imune e alguns tipos de cancro. Assim, a ação protetora dos carotenoides pode

estar relacionada com atividades imunomoduladoras, em que estes compostos estão envolvidos na atividade das imunoglobulinas e da linfoblastogênese, na produção de citocinas e ainda na atividade citotóxica de linfócitos (Chew e Park, 2004).

A degeneração macular, uma doença mais frequente em indivíduos com mais de 65 anos e que pode resultar em cegueira irreversível, apresenta múltiplos fatores de risco, entre eles, o *stress* oxidativo. Para prevenir danos oxidativos iniciados pela luz, o pigmento macular (luteína e zeaxantina) pode proteger a retina da degeneração relacionada com a idade. Teoricamente, quanto mais densa a mácula, menor o risco da sua degeneração (Leung, 2008). As concentrações plasmáticas reduzidas de luteína e zeaxantina ou a sua ingestão insuficiente estão relacionadas com a menor densidade da mácula ocular, o que aumenta o risco do desenvolvimento da degeneração macular. Neste sentido, os estudos em humanos sugerem que a ingestão de carotenoides pode aumentar a quantidade de luteína e zeaxantina na retina e, conseqüentemente, a proteção contra a degeneração macular (Leung, 2008).

Conclusões

Existem diversos estudos que atestam a importância da população ingerir alimentos que contenham compostos bioativos, num contexto de alimentação saudável. O consumo regular de frutas e legumes diminui o risco de determinadas patologias, tais como o cancro, as doenças cardiovasculares, as doenças vasculares aterotrombóticas, as cataratas e outros distúrbios funcionais. Neste âmbito, pretendeu-se reunir nesta dissertação evidências científicas relativas às propriedades bioativas dos pigmentos naturais, tais como clorofilas, carotenos, flavonoides e betalaínas, responsáveis pela cor de frutas e legumes, dando ênfase ao estudo das vias metabólicas relativas à sua biossíntese.

Estas evidências científicas são decorrentes de estudos realizados *in vitro*, pelo que será necessário confirmar os efeitos fisiológicos e farmacológicos dos pigmentos naturais no organismo humano, devendo-se estudar os fatores que influenciam a sua biodisponibilidade, absorção e distribuição nos tecidos e órgãos, assim como as transformações estruturais que podem sofrer, decorrentes de alterações de pH, entre outros.

A abrangente ação dos metabolitos secundários dos vegetais, responsáveis pela ação pigmentante, leva à necessidade de conhecer melhor estes compostos, de modo a compreender o seu modo de ação. Isto pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que permitam solucionar problemas atuais, mediante as características nutracêuticas destes pigmentos naturais, que também apresentam importantes vantagens para a indústria farmacêutica e cosmética.

Bibliografia

Acamovic, T. e Brooker, J. D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proc. Nutr Soc.*, 64, pp. 403-412.

Alasalvar, C. *et al.* (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp. 1410-1416.

Alemzadeh, R e Feehan, T. (2004). Variable effects of beta-carotene therapy in a child with erythropoietic protoporphyria. *Eur. J. Pediatr.*, 163, pp. 547-549.

Araújo, M. E. M. (2009). Química dos Produtos Naturais.). **Em linha]. Disponível em:** < <https://pt.slideshare.net/BCPianist/qpn-flavonoides-0910> >. [Consultado em 16 de outubro de 2016].

Ayala-Zavala, J. F. *et al.* (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Res. Int.*, 44, pp. 1866-1874.

Azeredo, M. (2009). Original article Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 44, pp. 2365-2376.

Babbar, N. *et al.* (2014). Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *J. Food Sci. Technol.*, 51, pp. 2568-2575.

Balunas, M. J., Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.*, 78 (5), pp. 431-441.

Barroso, G. F. (1998). BMLP - Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura. Programa de Monitoramento Ambiental. Protocolo para Análise de clorofila a e feopigmentos pelo método fluorímetro TD- 700. Vitória, Espírito Santo.

Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 10(4), pp. 221-247.

Brockington, S. *et al.* (2011). Complex pigment evolution in the *Caryophyllales*. *New Phytol.*, 190(4), pp. 854-864.

Campos, M.G. (2005); Flavonóides. In: Proença da Cunha, A. (Coor.). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa.

Castro, P. R. *et al.* (2005). Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática. Piracicaba: Agronômica Ceres.

Chernomorsky, S. *et al.* (1999). Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratog., Carcinog., Mutagen.*, 19, pp.313-322.

Chew, B. P. e Park, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.*, 134, pp. 257S-261S.

da Silva, A. R. *et al.* (2013). Extração de pigmentos fotossintéticos em folhas das espécies de café (*coffea arábica*), acálifa (*acalypha hispida*) e urucum (*bixa orellana*) por meio de cromatografia em papel. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 25 a 28 de novembro de 2013, Salvador - BA.

Darvin, M. E. *et al.* (2011). The role of carotenoids in human skin. *Molecules*, 16, pp. 10491-10506.

Dashwood, R. (1997). The importance of using pure chemicals in (anti)-mutagenicity studies, chlorophyllin as a case in point. *Mutat. Res.*, 381, pp. 283-286.

de Souza, M. A. A. (2010). Essencial e avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis* L. sob diferentes condições de cultivo. Tese submetida como requisito parcial para

obtenção do grau de Doutor em Química, no Programa de Pós Graduação em Química, Área de Concentração em Química Agrária. Seropédica, R J.: Instituto de Ciências Exatas.

Dembinska-Kiec, A. *et al.* (2008). Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Br. J. Nutr.*, 99, pp. 109-117.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products*. NewYork: Jonh Wiley & Sons Ltd.

Dias, M. V. *et al.* (2003). Corantes naturais como indicadores de pH. *Química Nova*, 17, pp. 27-31.

Downham, A. e Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 35, pp. 5-22.

Egea, I. *et al.* (2010). 1-Methylcyclopropene affects the antioxidant system of apricots (*Prunus armeniaca* L. cv. Búlida) during storage at low temperature. *J. Sci. Food and Agri.*, 90 (4), pp. 545-555.

Esatbeyoglu, T *et al.*(2015). Betanin - a food colorant with biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, 59(1), pp. 36-47.

FDA - U.S. Food and Drug Administration Food Color Facts (1998). **Em linha**. **Disponível em:** < <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/colorfac.html> >. [Consultado em 16 de outubro de 2016].

Ferruzzi, M. G. *et al.* (2001). Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and Caco-2 human cell model. *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp. 2082-2089.

Fowler, M. W. (2006). Plants, medicines and man. *J. Sci. Food Agric.*, 86(12), pp. 1797-1804.

Gandía-Herrero, F. e García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Sci.*, 18(6), pp. 334-343.

García, A. Á. e Pérez-Urria, E. C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal.*, 2 (3), pp. 119-145.

Gerster, H. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.*, 16, pp. 109-126.

Goethe, J. W. (1993). *Doutrina das cores*. São Paulo: Nova Alexandria.

Gonçalves, L. *et al.* (2012). A comparative study of the purification of betanin. *Food Chem.*, 131(1), pp. 231-238.

Gonçalves, L. *et al.* (2015). Betalains: From the colors of beetroots to the fluorescence of flowers. *Rev Virtual Quim.*, 7(1), pp. 292-309.

Goodwin, T. W. (1981). *The Biochemistry of the carotenoids: Biosynthesis*. Londres: Chapman and Hall.

Guedes, A. C. *et al.* (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Mar. Drugs*, 9, pp. 625-644.

Helena, S. A. *et al.* (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds. *Food Chem.*, 173, pp. 501-513.

Herbach, K. M. *et al.* (2006). Betalain stability and degradation: structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.*, 71(4), pp.41-50.

Jaswir, I. *et al.* (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), pp. 7119-7131.

Jin Dai, J. e Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, pp. 7313-7352.

Julsing, M. K. *et al.* (2007). The engineering of medicinal plants: prospects and limitations of medicinal plant biotechnology. In: Kayser, O. e Quax, W. J.. *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications*. New York: Wiley-Vch Verlag.

Justin, N. K. *et al.* (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Phar. Pharmacol.*, 2, pp. 377-392.

Kar, P. *et al.* (2009). Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: A double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet. Med.*, 26, pp. 526-531.

Keerthi. M. *et al.* (2014). Review on polyphenols as nature's gift. *World J. Phar. Pharmaceutical Sci.*3(4), pp. 445-455.

Kelly, S. C. *et al.* (2007). Erythropoietic Protoporphyria (Erythrohepatic Protoporphyria). *Pediatr. Dermatol.*, 24(3), pp. E5-E9.

Lancher, W. (2000). *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima.

Lanfer-Marquez, U. M. (2007). O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Braz. J. Pharmac. Sci.*, 39(3), pp. 227-242.

Leung, IY-F. (2008). Macular pigment: New clinical methods of detection and the role of carotenoids in age-related macular degeneration. *Optometry*, 79, pp. 266-272.

Lila, M. A. (2004). Plant pigments and human health. In: Davis, S. *Plant pigments and their manipulation*. Oxford: CRC Press/Blackwell Publ.

Lin, D. *et al.* (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 Diabetes. *Molecules*, 21, pp. 1374-1392.

Lin, D. R. *et al.* (2010). Initial screening studies on potential of high phenolic-linked plantclonal systems for nitrate removal in cold latitudes. *J. Soils Sediment.*, 10, pp. 923-932.

Maffei, M. E. *et al.* (2011). Plant Volatiles: Production, Function and Pharmacology. *Natural Product Reports*, 28 (8), pp. 1359-1380.

Makhafola, T. J. *et al.* (2016). The correlation between antimutagenic activity and total phenolic content of extracts of 31 plant species with high antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, pp. 490-503.

Maraschin, M. e Verpoorte, R. (1999). Engenharia do metabolismo secundário: otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 2(10), pp. 24-28.

Março, P. H. e Poppi, R. J. (2008). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Quim. Nova*, 31(5), pp. 1218-1223.

Melo, J. S. *et al.* (2006). As moléculas da cor na arte e na natureza . *Química*, 101, pp. 44-55.

Mezzomo, N. e Ferreira, S. R. S. (2016). Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A Review. *J. Chem.*, 33, pp. 1-16.

Michal, G. e Schomburg, D. (2013). *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Wiley.

Moo-Huchin, V. M. *et al.* (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem.*, 166, pp. 17-22.

Morais, L. F. (2006). *Carotenoides: Características Biológicas e Químicas*. Trabalho para a obtenção de grau de especialista. Brasília: Universidade de Brasília.

Moreira, P. F. (2003). *Estudo da dinâmica de equilíbrio ácido-base de antocianinas*. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, São Paulo: Universidade de São Paulo.

Moura, J.C.V.P. (2003). Química. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 89, pp. 75-80.

Moussa-Ayoub, T. *et al.* (2011). Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulose preparation. *Food Chem.*, pp. 1177-1184.

Moyna, P. e Menéndez, P. (2001). Biotransformação de produtos naturais. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M. e Azevedo, J. L. (2001). *Biotechnology na agricultura e na agroindústria*. *Agropecuária*, pp. 201-226.

National Research Council. (1996). *Committee on Comparative Toxicity of Naturally Occurring Carcinogens. Carcinogens and anticarcinogens in the human diet, a comparison of naturally occurring and synthetic substances*. Washington: National Academy Press.

Nazaré R. F. R. (2003). Potencialidade de plantas amazônicas produtoras de corantes naturais. **Em linha**. **Disponível em:** <<http://www.uesb.br/sbcn/amazonia.html>>. [**Consultado em** 16 de outubro de 2016].

Netto, R. C. M. (2012). *Dossiê corantes. Food ingredients Brasil*. **Em linha**. **Disponível em:** <<http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>>. [**Consultado em** 12 de outubro de 2016].

Nöthlings, U. *et al.* (2008). Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population. *J. Nutr.*, 138, pp. 775-781.

Odin, A. P. (1997). Antimutagenicity of the porphyrins and nonenzyme porphyrin-containing proteins. *Mutat. Res.*, 387, pp. 55-68.

Okada, T. *et al.* (2010). Metabolomics of Medicinal Plants: the Importance of Multivariate Analysis of Analytical Chemistry Data. *Current Computer-Aided Drug Design*, 6 (3), pp. 179-196.

Oliveira, P. A. (2001). *Estudo da estabilidade e estabilização das antocianinas do bagaço de uva seibel 2*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas: Universidade Estadual de Campinas.

Olivier, J. e Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr.*, 881, pp. 543-555.

Orska-Gawrys, J. *et al.* (2003). Identification of natural dyes in archeological Coptic textiles by liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatogr.*, 898, pp. 239-248.

Ovando-Chacón, S. L. e Waliszewski, K. N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad Y Ciencia*, 21(42), pp. 113-122.

Paiva, S. e Russell, R. (1999). Beta carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am. Coll. Nutr.*, 18, pp. 426-433.

Pal, A. *et al.* (2014). Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review. *Open Access Library Journal*, 1, pp. 752-769.

Petrovska, B. B. (2012). Historical Review of Medicinal Plants Usage. *Pharmacog. Rev.*, 6 (11), pp. 1-5.

Pinto, A.C. (1995). O Brasil dos Viajantes e dos Exploradores e a Química de Produtos Naturais Brasileira. *Química Nova*, 18(6), pp. 608-615.

Prabath Pathirana, U. A. *et al.* (2013). Changes in lipid oxidation stability and antioxidant properties of avocado in response to 1-MCP and low oxygen treatment under low-temperature storage. *Int. Food Res. J.*, 20(3), pp. 1065-1075.

Rabin Gyawali, R. e Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, pp. 412-428.

Randhir, R. *et al.* (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.*, 39, 637-646.

Renato, B. *et al.* (2016). Chemical Diversity and Biological Properties of Secondary Metabolites from Sea Hares of *Aplysia* Genus. *Mar.*, 14, pp. 39-72.

Robert Shapley, Michael J. e Hawken. (2011). Color in the Cortex: single- and double-opponent cells. *Vision Research*, 51, pp. 701-717.

Sakata, K. *et al.* (1990). Chlorophyllone-A, a new pheophorbide-A related compound isolated from *Ruditapes philippinarum* as an antioxidative compound. *Tetrahedron Lett.*, 31(8), pp. 1165-1168.

Sakuta, M. (2013). Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *Plant Biotechnol. Rep.*, 8(1), pp. 37-48.

Sales, P. M. *et al.* (2012). Amylase Inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 15, pp. 141-183.

Samuni-Blank, M. *et al.* (2012). Intraspecific directed deterrence by the mustard oil bomb in a desert plant. *Current Biol.*, 22 (13), pp. 1218-1220.

Santos, R. I. (2001). *Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários*. In: Simões, C. M. O *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC.

Sato, M. *et al.* (1986). Effect of sodium copper Chlorophyllin on lipid-peroxidation. IX. On the antioxidative components in commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Chem. Pharm. Bull.*, 34(6), pp.2428-2434.

Savithramma, N. *et al.* (2011). Screening of medicinal plants for secondary metabolites. *Middle-East J. Sci. Res.*, 8, pp. 579-584.

Schaaf, J. *et al.* (1995). Primary metabolism in plant defense. *Plant Physiol.*, 108, pp. 949-960.

Schiozer, A. L. e Barata, L. E. S. (2007). Stability of natural pigments and dyes. *Revista Fitos*, 102, pp. 6-24.

Shukitt-Hale, B. *et al.* (2008). Berry fruit supplementation and the aging brain. *J. Agric. Food Chem.*, 56, pp. 636-641.

Stahl, W. e Sies, H. (2007). Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol. Biotechnol.*, 37, pp. 26-30.

Stintzing, F. C. e Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, pp.19-38.

Streit, M. N. *et al.* (2005). As Clorofilas. *Ciência Rural*, 35(3), pp.748-755.

Tapas, A. R. *et al.* (2008); Flavonoids as Nutraceutical: A Review. *Tropical J. Pharmac. Res.*, 7 (3), pp. 1089-1099.

Tapiero, H. *et al.* (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, pp. 100-110.

Terci, D. B. L. (2004). *Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas*. Tese de Doutorado. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.

Tesoriere, L. *et al.* (2004). Supplementation with Cactus Pear (*Opuntia fi cus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80, pp. 391-395.

Thrane, U. (2001). Development in the Taxonomy of Fusarium Species Based on Secondary Metabolites. In *Fusarium: Paul E. Nelson memorial symposium*, edited by B. A. Summerell. St.Paul, Minnesota: *APS Press*, pp. 29-49.

Ullmann's. (1985-1995). *Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: VCH.

Valduga, E. *et al.* (2009). Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quim. Nova*, 32(9), pp. 2429-2436.

van Groenigen, J. W. *et al.* (2015). The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil*, 1, pp. 235-256.

Velderrain-Rodríguez, G. R. *et al.* (2014). Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food Funct.*, 5, pp. 189-197.

White, B. L. *et al.* (2010). Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 58, pp. 7572-7579.

Xu, H. *et al.* (2001). Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), pp. 14168-14173.

Zastrow, L. *et al.* (2009). The missing link Light-induced (280–1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 22, pp. 31-44.