



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DO EFEITO NA SAÚDE DOS PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS**

Trabalho submetido por
Margarida da Cunha Antunes Gomes de Matos
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DO EFEITO NA SAÚDE DOS PIGMENTOS
FOTOSSINTÉTICOS**

Trabalho submetido por
Margarida da Cunha Antunes Gomes de Matos
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Margarida Moncada

novembro de 2016

Dedicatória

Dedico esta monografia aos meus pais, por todo o apoio e motivação.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais por me terem dado a possibilidade de frequentar o mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, por acreditarem em mim e por todo o apoio e carinho que me deram durante este percurso académico.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Margarida Moncada por toda a simpatia, dedicação e disponibilidade que me foi oferecida durante o decorrer desta monografia.

Agradeço ao meu irmão, pelo apoio dado mutuamente ao partilharmos juntos esta vida académica, por todas as parvoíces, brincadeiras e companhia.

Às minhas queridas amigas de faculdade, agradeço todo o vosso companheirismo, apoio e amizade.

Agradeço ao Tiago pela persistência e motivação, por toda a ajuda, amizade, amor e carinho. Obrigada por seres o meu pilar!

Por fim, agradeço a todos os meus amigos de Torres, colegas de curso e família, por fazerem parte desta aventura e nunca me deixarem desistir.

A todos, um grande obrigado!

Resumo

Na presente monografia realizou-se uma revisão bibliográfica com o objetivo de estudar o efeito das diferentes classes de pigmentos fotossintéticos, como as clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, em diversas patologias. Estudou-se a capacidade antioxidante destes pigmentos, assim como as suas ações na angiogênese, obesidade, osteoporose, cancro, diabetes e na doença de Alzheimer.

Além dos seus efeitos no processo de fotossíntese, os pigmentos fotossintéticos têm demonstrado diversos benefícios em variadas áreas da saúde, sendo alvo de investigação por parte da indústria alimentar, cosmética e farmacológica.

No decorrer desta monografia são abordadas as características estruturais e respetiva biodisponibilidade das clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, assim como as suas funções e mecanismos de atuação em diversas patologias crónicas.

Verificou-se que os pigmentos fotossintéticos têm efeito como agentes antioxidantes, anti-angiogénicos e anti-inflamatórios. Têm funções anticancerígenas ao atuarem como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica, como tratamento do cancro. Apresentam propriedades neuroprotetoras, têm potencial hipoglicemiante e podem ser usados na obesidade, existindo atualmente no mercado um suplemento de fucoxantina com esse propósito, o Xanthigen®. Finalmente, podem ser usados como tratamento de prevenção de doenças ósseas como a osteoporose.

Deste modo, os pigmentos fotossintéticos são uma fonte de compostos bioativos que podem eventualmente ser uma arma no combate a certas patologias crónicas.

Palavras-chave: pigmentos fotossintéticos; doenças crónicas; efeito na saúde; compostos bioativos.

Abstract

The present dissertation conducted a literature review in order to study the effect of different classes of photosynthetic pigments such as chlorophylls, carotenoids and phycobiliproteins in various pathologies. The antioxidant capability of these pigments was studied, as well as their actions on angiogenesis, obesity, osteoporosis, cancer, diabetes and Alzheimer's disease.

In addition to its effects on the process of photosynthesis, photosynthetic pigments have shown several benefits on varied health areas, being the target of investigation by the food, cosmetics and pharmaceutical industries.

In the course of this work, the structure characteristics and respective bioavailability of chlorophylls, carotenoids and phycobiliproteins are addressed, as well as their functions and action mechanisms in several chronic pathologies.

It was found that photosynthetic pigments are effective as antioxidant, anti-angiogenic and anti-inflammatory agents. They have anticancer functions by acting as photosensitizers on photodynamic therapy, as a treatment for cancer. They exhibit neuroprotective properties, hypoglycaemic potential, and could be used in obesity, where currently exists in the market a fucoxanthin supplement for obesity purposes, Xanthigen®. Finally, they can be used as a preventive treatment for bone diseases as osteoporosis.

Thus, photosynthetic pigments are a source of bioactive compounds that could eventually be used as a weapon for fighting certain chronic diseases.

Keywords: photosynthetic pigments; chronic diseases; effect on health; bioactive compounds.

Índice de Conteúdos

| | |
|---|----|
| Resumo | 1 |
| Abstract..... | 3 |
| Índice de Conteúdos..... | 5 |
| Índice de Figuras..... | 7 |
| Índice de Tabelas | 9 |
| Lista de abreviaturas | 11 |
| Capítulo 1 – Introdução | 13 |
| 1.1 – Enquadramento Global | 13 |
| 1.2 – Objetivos e Pertinência da Monografia..... | 14 |
| 1.3 – Metodologia de Pesquisa | 14 |
| 1.4 – Organização da monografia | 14 |
| Capítulo 2 – Pigmentos Fotossintéticos..... | 15 |
| 2.1 – Características gerais | 15 |
| 2.2 – Clorofilas..... | 16 |
| 2.2.1 – Bioacessibilidade e Biodisponibilidade das Clorofilas..... | 19 |
| 2.3 – Carotenoides | 21 |
| 2.3.1 – Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos carotenoides | 23 |
| 2.3.2 – Carotenoides como precursores da Vitamina A..... | 24 |
| 2.4 – Ficobiliproteínas | 26 |
| Capítulo 3 – Efeitos na saúde..... | 29 |
| 3.1 – Propriedades Antioxidantes | 29 |
| 3.1.1 – Clorofilas..... | 31 |
| 3.1.2 – Carotenoides | 32 |
| 3.1.3 – Ficobiliproteínas | 35 |
| 3.2 – Propriedades Anticancerígenas e Anti-Tumorais | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.2.1 – Terapia Fotodinâmica | 37 |
| 3.2.2 – Efeito Anticancerígeno dos Carotenoides..... | 42 |
| 3.3 – Propriedades Anti-Angiogénicas | 44 |
| 3.4 – Obesidade..... | 47 |
| 3.5 – Diabetes..... | 50 |
| 3.6 – Efeito Anti-inflamatório..... | 53 |
| 3.7 – Efeito Neuroprotetor | 55 |
| 3.8 – Osteoporose..... | 59 |
| Conclusão..... | 61 |
| Bibliografia | 63 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura química da Clorofila <i>a</i> (a) e estrutura em 3D (b) usando o programa de <i>software Visual Molecular Dynamics 1.9.1</i> (adaptado de García-Sánchez et al., 2016). | 17 |
| Figura 2 – Estrutura das Clorofilas (adaptado de Loughlin, Lin, & Chen, 2013) | 18 |
| Figura 3 – Estrutura da maioria dos carotenoides encontrados no plasma humano. A, Licopeno; B, β -caroteno; C, α -caroteno; D, β -criptoxantina; E, luteína; F, zeaxantina (adaptado de Nagao, 2014). | 22 |
| Figura 4 – Transformação fisiológica do β -caroteno em metabolitos do retinol (adaptado de Kelly & von Lintig, 2015). | 24 |
| Figura 5 – Possível mecanismo de absorção intestinal e efeitos terapêuticos da Ficoeritrina (adaptado de Yabuta et al., 2010). | 27 |
| Figura 6 – Efeito da aplicação tópica de fucoxantina na formação de rugas provocadas por exposição ao UV-B. Fotografias do dorso dos ratos sem pelo (A-C) e fotografias do dorso dos ratos sem pelo após exposição ao UV-B (D-F). Ratos não expostos ao UV-B sem qualquer tratamento (A,D). Ratos controle expostos ao UV-B tratados com veículo (B,E). Ratos expostos ao UV-B tratados com fucoxantina 0.001% (C-F) (adaptado de Urikura et al., 2011). | 33 |
| Figura 7 – Fotografias microscópicas do córtex renal. a) Grupo controle. b) Grupo tratado com HgCl_2 . c) Ficobiliproteínas 50mg.Kg^{-1} + HgCl_2 . d) Ficobiliproteínas 100mg.Kg^{-1} + HgCl_2 . O tecido renal foi corado com Hematoxilina-eosina. O tratamento com HgCl_2 provoca atrofia celular, um núcleo hiper Cromático e edema (setas na figura b). As alterações histológicas melhoraram nos grupos tratados com ficobiliproteínas (setas c e d) (adaptado de Cano-Europa et al., 2010). | 36 |
| Figura 8 – Princípios da Terapia Fotodinâmica (adaptado de Agostinis et al., 2011)... | 38 |
| Figura 9 – Estrutura química da HEPa (adaptado de Zhang et al., 2016). | 39 |
| Figura 10 – Fotografias digitais representativas dos tumores em tempos diferentes após tratamento (adaptado de Zhang et al., 2016). | 40 |
| Figura 11 – Apoptose induzida pela neoxantina e fucoxantina em células PC-3. Alterações morfológicas observadas por microscopia de contraste de fase (a-c) e microscopia de fluorescência (d-f). As células PC-3 foram incubadas durante 48h com | |

| | |
|--|----|
| THF (<i>a e d</i>), 20mM de neoxantina (<i>b e e</i>), e 20mM de fucoxantina (<i>c e f</i>) (adaptado de Eiichi Kotake-Nara et al., 2005). | 42 |
| Figura 12 – Estrutura química da Fucoxantina e do Fucoxantíol (adaptado de Sugawara et al., 2006). | 45 |
| Figura 13 – Estrutura química dos carotenoides: (A) Sufoxantina; (B) Sifoneína; (C) Fucoxantina (adaptado de Ganesan et al., 2011). | 46 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – A fucoxantina diminui a atividade da AChE no hipocampo e córtex dos ratos tratados com escopolamina (adaptado de Lin et al., 2016)..... | 56 |
|---|----|

Lista de abreviaturas

AChE – Acetilcolinesterase (*Acetylcholinesterase*)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)

CCS – Clorofilina cúprica-sódica

ChAT – Colina acetiltransferase (*Choline acetyltransferase*)

COX-2 – Ciclooxigenase-2

DLI – Intervalo fármaco-luz (*Drug light interval*)

ELA – Esclerose lateral amiotrófica

HDL – Lipoproteína de alta densidade (*High density lipoprotein*)

hIAPP – Polipéptido amiloide dos ilhéus pancreáticos humanos (*human Islet Amyloid Polypeptide*)

HUVECs – Células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (*Human umbilical vein endothelial cells*)

IAPP – Polipéptido amiloide dos ilhéus pancreáticos (*Islet amyloid polypeptide*)

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein*)

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteínas quinase ativada por mitogénio (*Mitogen activated protein kinases*)

mARN – Ácido ribonucleico mensageiro

MTX – Metotrexato

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAS – Local aniônico periférico (*Peripheral anionic site*)

PDT – Terapia fotodinâmica (*Photodynamic therapy*)

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PPAR γ – Recetor γ ativado pelos proliferadores peroxissomais (*Peroxisome proliferator-activated receptor- γ*)

PS – Fotossensibilizador (*Photosensitizer*)

RT-PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SNC – Sistema nervoso central

TAB – Tecido adiposo branco

TAC – Tecido adiposo castanho

THF – Tetrahidrofurano

UCP-1 – Proteína de desacoplamento 1 ou termogenina (*Uncoupling protein 1 or thermogenin*)

UV – Ultravioleta

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very low density lipoprotein*)

Capítulo 1 – Introdução

1.1 – Enquadramento Global

Os pigmentos fotossintéticos são compostos químicos, naturais ou sintéticos, que absorvem luz em determinados comprimentos de onda na região do visível. A luz captada é absorvida pelo cromóforo, e a restante é refletida ou refratada, sendo perceptível pelo olho humano e interpretada pelo nosso cérebro como cor (Hari, Patel, & Martin, 1994).

Estão distribuídos ubiquitariamente pelo meio ambiente, estando presentes nos seres vivos e tendo como principal função assegurar o processo de fotossíntese (Pangestuti & Kim, 2011).

No entanto, estes compostos naturais têm inúmeras propriedades que têm captado a atenção de diversas áreas da ciência (Del Giudice et al., 2016).

Não só têm um papel relevante na fotossíntese, como apresentam potentes propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-angiogénicas e anti-inflamatórias, podendo eventualmente ser uma arma no combate ao cancro, no tratamento da diabetes e da obesidade, exibindo também fortes capacidades de proteção contra doenças neurodegenerativas (Pangestuti & Kim, 2011).

Ao longo dos anos, têm sido diversos os estudos referentes aos pigmentos fotossintéticos incidindo na área da saúde.

Doenças de carácter crónico, como é o caso do cancro cujas comorbilidades são várias, levam a uma diminuição da qualidade de vida do doente, assim como a um elevado encargo económico por parte do estado e do próprio utente (Luengo-Fernandez, Leal, Gray, & Sullivan, 2013).

Surgindo a necessidade de encontrar alternativas para estas patologias, existem diversos estudos realizados a diferentes classes de pigmentos fotossintéticos que revelam distintas propriedades terapêuticas/medicinais que vão muito além do tão conhecido papel destas moléculas na fotossíntese.

1.2 – Objetivos e Pertinência da Monografia

A presente monografia tem como principais objetivos dar a conhecer as propriedades dos pigmentos fotossintéticos na área da saúde, nomeadamente em doenças neoplásicas, na diabetes, na obesidade e em doenças neurodegenerativas, o seu papel como antioxidante natural e fotoprotetor, a sua relevância na angiogénese e o seu carácter anti-inflamatório.

1.3 – Metodologia de Pesquisa

Esta monografia aborda uma revisão bibliográfica atual baseada em artigos científicos. Foi utilizado como método de pesquisa o motor de busca *PubMed* para acesso a artigos de investigação científica nos quais este tema incide.

Foi dada preferência a artigos mais recentes. No entanto, artigos mais antigos foram usados de forma a elucidar algumas características previamente descobertas.

Para a gestão de citações e referências bibliográficas foi utilizado o *software Mendeley Desktop*® versão 1.16.3.

1.4 – Organização da monografia

Esta monografia está organizada em três capítulos. O primeiro capítulo é de carácter introdutório com incidência no objetivo e pertinência do estudo dos pigmentos fotossintéticos. O segundo capítulo foca-se nas características destes pigmentos e respetiva biodisponibilidade no organismo humano. O terceiro e último capítulo refere-se aos estudos feitos na área da saúde que comprovam o efeito destes pigmentos em diversas patologias seguindo-se da conclusão e perspetivas futuras.

Capítulo 2 – Pigmentos Fotossintéticos

2.1 – Características gerais

Pigmento fotossintético é a designação dada a uma substância química, sintetizada por organismos vivos, capaz de absorver luz na região do visível através de uma estrutura denominada cromóforo (Hari et al., 1994).

Estes podem ter origem natural ou sintética, sendo os de origem natural produzidos por seres vivos, como plantas, algas ou cianobactérias, e os de origem sintética, laboratorialmente (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

De acordo com a sua estrutura estes podem ser derivados do tetrapirrol, como é o caso das clorofilas e das ficobiliproteínas, ou derivados dos isoprenóides, os carotenoides (Hari et al., 1994; Teale & Dale, 1970).

Estudos epidemiológicos revelaram que o consumo destes pigmentos tem efeitos benéficos na saúde, o que faz com que seja de extrema importância conhecer a estrutura e a biodisponibilidade dos pigmentos fotossintéticos no organismo humano (Granado-Lorencio et al., 2007; Sy et al., 2012)

No presente capítulo irei abordar as diferentes características estruturais e respetiva biodisponibilidade, das três principais classes de pigmentos fotossintéticos presentes nos organismos vivos: as clorofilas, os carotenoides e as ficobiliproteínas.

2.2 – Clorofilas

As clorofilas são pigmentos indispensáveis à fotossíntese, um processo fundamental para a diversidade da vida na Terra (Schliep, Cavigliasso, Quinnell, Stranger, & Larkum, 2013).

A primeira molécula de clorofila descoberta, foi isolada por dois químicos franceses em 1817 (Delepine, 1951). Desde então, diversas formas de clorofila foram reveladas, estando até há bem pouco tempo apenas relatados quatro tipos, designados alfabeticamente por ordem de descoberta: clorofila *a*, *b*, *c* e *d*. Recentemente foi descoberto um novo tipo de clorofila, a clorofila *f* (M. Chen et al., 2010).

Estão distribuídas exclusivamente em organismos fotossintéticos aeróbicos, maioritariamente em plantas mais evoluídas, estando também presentes em algas e cianobactérias (Schliep et al., 2013).

As moléculas de clorofila, à exceção da *c*, são estruturalmente semelhantes, apresentando um núcleo tetrapirrólico (ou anel de porfirina), com um átomo de magnésio em posição central, ligado a uma cadeia de fitol (Gerola et al., 2011). Estes compostos exibem diferentes espectros de absorção relacionados com pequenas modificações nas suas estruturas (M. Chen, Li, Birch, & Willows, 2012).

As clorofilas apresentam duas absorções distintas, deixando um intervalo no espectro de absorção conhecido como a janela verde, responsável pela cor verde característica destas moléculas (M. Chen, 2014).

A clorofila *a* é a mais abundante do grupo, estando presente em quase todos os organismos fotossintéticos, incluindo plantas evoluídas, algas e cianobactérias (Barber, Morris, & Büchel, 2000; Björn, Papageorgiou, Blankenship, & Govindjee, 2009). Na Figura 1 está representada a estrutura química da clorofila *a* (García-Sánchez et al., 2016). Esta clorofila apresenta uma absorção máxima na região do vermelho de 665nm (banda Q_y), e na região do azul de 436nm (banda de Soret) (M. Chen, 2014).

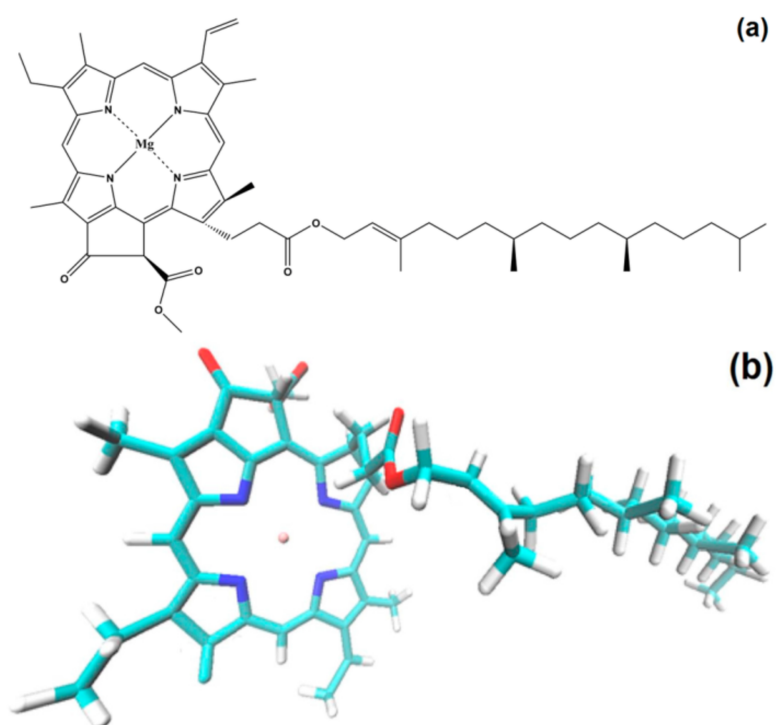


Figura 1 – Estrutura química da Clorofila *a* (a) e estrutura em 3D (b) usando o programa de *software Visual Molecular Dynamics 1.9.1* (adaptado de García-Sánchez et al., 2016).

A clorofila *b* está presente predominantemente em plantas evoluídas, ao contrário das clorofilas *c* e *d* que se encontram maioritariamente em algas castanhas e vermelhas e em espécies de diatomáceas. Na Figura 2 estão representadas as estruturas das clorofilas (Dougherty, Strain, Svec, Uphaus, & Katz, 1970; Larkum & Kühl, 2005; Loughlin, Lin, & Chen, 2013; Mohr et al., 2010; Sakuraba, Yokono, Akimoto, Tanaka, & Tanaka, 2010).

As substituições do grupo formilo nas cadeias laterais da clorofila *a*, resultam em propriedades de absorção de luz diferentes na clorofila *b*, *d* e *f*. A presença de clorofilas com propriedades espectrais diferentes permite a absorção de luz a comprimentos de onda variados o que aumenta a captação de luz nos organismos fotossintéticos. A composição dos pigmentos nestes organismos reflete as propriedades espectrais da superfície terrestre (M. Chen, 2014).

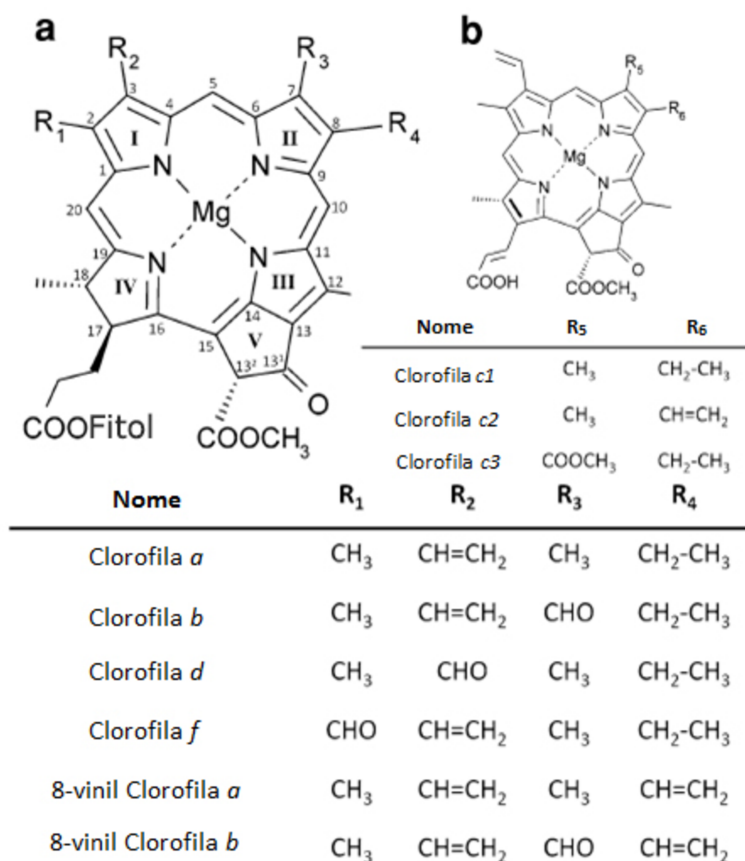


Figura 2 – Estrutura das Clorofilas (adaptado de Loughlin, Lin, & Chen, 2013).

A mais recentemente descoberta, clorofila *f*, foi isolada em estromatólitos de Shark Bay na costa oeste da Austrália (M. Chen et al., 2010) e, também, numa espécie de cianobactérias (KC1) no lago Biwa, no Japão (Akutsu et al., 2011).

A clorofila *f* apresenta uma capacidade de absorção a um comprimento de onda mais abrangente (706nm) comparativamente com a clorofila *a*. À semelhança da clorofila *f*, a clorofila *d* também apresenta capacidade de absorção em comprimentos de onda mais longos (696nm), permitindo a absorção de luz na região do infravermelho (Airs et al., 2014).

2.2.1 – Bioacessibilidade e Biodisponibilidade das Clorofilas

Existem poucos estudos relativos à biodisponibilidade das clorofilas, embora sejam os pigmentos em maior abundância na natureza. Isto deve-se ao facto de, tradicionalmente, pensar-se que as clorofilas não são absorvidas pelo organismo humano (Gandul-Rojas, Gallardo-Guerrero, & Mínguez-Mosquera, 2009).

No entanto, estudos que demonstram a capacidade das clorofilas na prevenção do cancro mostram de facto que estes pigmentos são absorvidos e que são fisiologicamente ativos (Gandul-Rojas et al., 2009).

Entende-se por bioacessibilidade a quantidade de clorofila ingerida capaz de passar da matriz alimentar para as micelas, de forma a ser absorvida pelo trato intestinal (Reboul et al., 2006; Stahl et al., 2002).

Biodisponibilidade é a quantidade de clorofila que tem que ser absorvida pelo intestino para exercer o seu efeito ou, simplesmente, ser metabolizada ou armazenada pelo organismo (Hedrán, Diaz, & Svanberg, 2002).

Devido à similaridade entre o carácter lipofílico dos pigmentos de clorofila com os carotenoides, pensa-se que as clorofilas têm uma bioacessibilidade e biodisponibilidade semelhante à destes (Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, & Mínguez-Mosquera, 2008).

As clorofilas são suscetíveis a modificações durante o processo de digestão, devido principalmente a modificações químicas e enzimáticas, e à sua sensibilidade a extremos de temperatura e pH (Gallardo-Guerrero et al., 2008; Koca, Karadeniz, & Burdurlu, 2007). As principais partes afetadas da estrutura da clorofila são: o quelato, a ligação éster da cadeia de fitol, o anel isocíclico e a porfirina (Gallardo-Guerrero et al., 2008).

A presença simultânea de fatores que predisõem à sensibilidade por parte destes pigmentos, como é o caso de ácidos fracos, enzimas, oxigénio e temperatura elevada, podem levar à formação de derivados ou produtos da degradação da clorofila (Koca et al., 2007).

Pensa-se que o mecanismo de absorção das clorofilas não seja muito diferente doutros compostos xenobióticos (Gallardo-Guerrero et al., 2008).

Numa primeira fase, ocorre a libertação das clorofilas da matriz alimentar, ficando expostas às condições ácidas da digestão gástrica ocorrendo a sua degradação e, conseqüentemente, a formação de derivados da clorofila. Seguidamente, ocorre a solubilização ou micelização dos derivados lipofílicos, sendo captados pelas células epiteliais intestinais e secretados para a circulação (Mario G. Ferruzzi & Blakeslee, 2007; Gandul-Rojas et al., 2009).

Para a absorção de clorofilas naturais (lipofílicas) pelo processo de micelização, é necessário que sejam ingeridas com alimentos ricos em lípidos, para facilitar a secreção para o lúmen intestinal (Mario G. Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

No caso dos derivados hidrofílicos da clorofila, não necessitam ser ingeridos com alimentos ricos em lípidos, o que sugere que a absorção destes compostos é apenas limitada à libertação pela matriz alimentar, às condições ácidas gastrointestinais e à secreção por parte das células intestinais (Mario G. Ferruzzi & Blakeslee, 2007).

Embora os estudos referentes à biodisponibilidade da clorofila sejam escassos, existem estudos acerca de derivados hidrofílicos da clorofila que comprovam que estes pigmentos são realmente absorvidos no organismo humano (Egner et al., 2000).

Num estudo desenvolvido na República Popular da China, um grupo de indivíduos ingeriu 300mg por dia de Clorofilina Cúprica-Sódica (CCS), um derivado hidrofílico de clorofila. Após quatro meses foi detetada CCS no soro destes indivíduos, o que comprova que estes compostos são biodisponíveis, embora de forma limitada, uma vez que não se obteve resposta plasmática com estes compostos (Egner et al., 2000).

2.3 – Carotenoides

Os carotenoides foram caracterizados pela primeira vez em 1907 por Willstatter, que os classificou em dois grupos: os carotenos, compostos por hidrocarbonetos como o β -caroteno e o licopeno, e as xantofilas que são essencialmente produtos da oxidação dos carotenos, como a luteína, a zeaxantina, cantaxantina e β -criptoxantano (Batista, Raymundo, Sousa, & Empis, 2006; Hammond & Renzi, 2013).

Para além do seu papel na fotossíntese e no *stress* oxidativo, estes pigmentos naturais têm vindo a desempenhar um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro, cataratas e degeneração macular (Britton, 1995; Del Giudice et al., 2016).

Os carotenoides estão distribuídos pela maioria dos seres vivos, estando presentes em plantas, frutos, algas e cianobactérias. Estes compostos também se encontram em animais. No entanto não podem ser sintetizados por estes, necessitando ser absorvidos através da dieta para que possam exercer a sua atividade fisiológica (Delgado-Vargas et al., 2000; Sy et al., 2012).

Existem mais de 700 carotenoides diferentes identificados na natureza, dos quais apenas 40 são consumidos na dieta humana e foram identificados no sangue e tecidos (Sy et al., 2012).

As propriedades fisiológicas dos carotenoides são determinadas pelas características físicas e químicas da sua estrutura molecular. Variações a esta estrutura podem significar diferenças a nível da biodisponibilidade do composto no organismo, acesso a tecidos-alvo e conseqüentemente atividades biológicas diferentes (Britton, 1995).

Estes compostos são tetraterpenos, estruturas de 40 átomos de carbono com um sistema conjugado de ligações duplas (Stahl & Sies, 2003). Esta estrutura pode ser alterada adicionando grupos funcionais com átomos de oxigénio, hidrogénio e por reações de ciclização num ou ambos os extremos da molécula (Britton, 1995). Na Figura 3, estão representadas as estruturas da maioria dos carotenoides encontrados no plasma humano (Nagao, 2014).

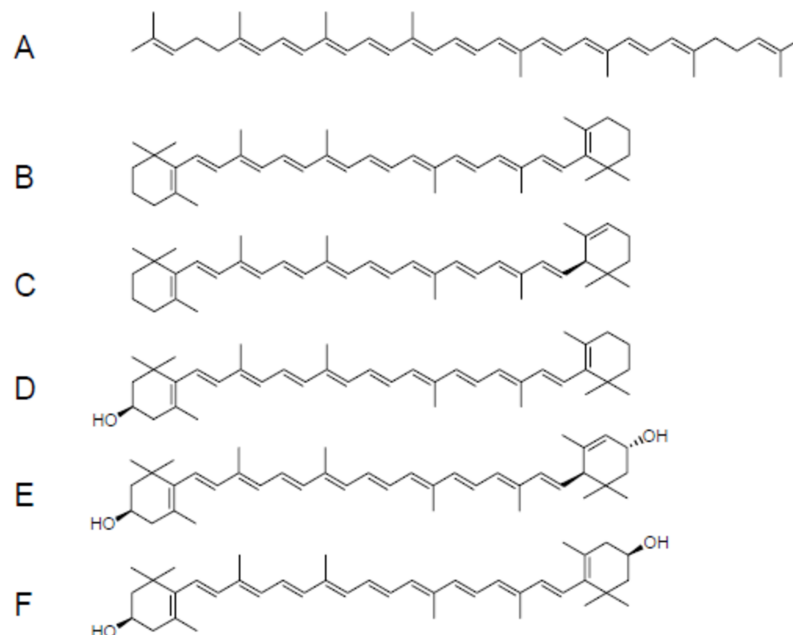


Figura 3 – Estrutura da maioria dos carotenoides encontrados no plasma humano. A, Licopeno; B, β-caroteno; C, α-caroteno; D, β-criptoxantina; E, luteína; F, zeaxantina (adaptado de Nagao, 2014).

O sistema conjugado de ligações duplas é responsável pelas propriedades de absorção de luz, e conseqüentemente pela cor do carotenoide, e também pela sua atividade antioxidante (Britton, 1995; Stahl & Sies, 2003).

Este sistema também é responsável pela suscetibilidade destes compostos à isomerização o que pode afetar as suas propriedades químicas e biológicas, a sua biodisponibilidade e capacidade antioxidante (Marx, Stuparic, Schieber, & Carle, 2003; Phan-Thi, Durand, Prost, Prost, & Waché, 2016; Rao & Rao, 2007).

2.3.1 – Bioacessibilidade e biodisponibilidade dos carotenoides

Os carotenoides, à semelhança das clorofilas, são compostos hidrofóbicos com biodisponibilidade limitada devido à sua dificuldade em se dispersarem no trato digestivo (Nagao, Kotake-Nara, & Hase, 2013).

Para que sejam biodisponíveis, estes pigmentos têm que se solubilizar no fluido digestivo passando por diversos processos até à absorção intestinal (Kotake-Nara & Nagao, 2012).

Em primeiro lugar os carotenoides têm que se libertar da matriz alimentar, processo que é facilitado por processamento alimentar, cozedura e mastigação (Kotake-Nara & Nagao, 2012; Nagao et al., 2013).

Devido à sua lipofilicidade, estes compostos requerem a micelização, após a sua libertação da matriz alimentar para que possam ser captados pelas células epiteliais do intestino (Kotake-Nara & Nagao, 2012).

O processo de micelização consiste na incorporação do composto em micelas, agregados moleculares constituídos por matéria gorda como: fosfolípidos, colesterol, sais biliares, ácidos gordos e monoacilgliceróis, que tornam o carotenoide acessível à captação pelas células intestinais (Kotake-Nara & Nagao, 2012).

Após a captação, os carotenoides são incorporados em quilomicras e transportados para o fígado, onde são armazenados e seguidamente distribuídos para outros tecidos (Ferreira et al., 2000; Sy et al., 2012).

2.3.2 – Carotenoides como precursores da Vitamina A

Em países em desenvolvimento, a carência em vitamina A continua a ser um problema grave de saúde pública, principalmente em crianças e em mulheres grávidas ou a amamentar (Borel et al., 2013).

A vitamina A, ou retinol, pode ser consumida em alimentos de origem animal sob a forma de retinoides ou consumida na forma de pró-vitamina A em carotenoides com origem em alimentos à base de plantas (Borel et al., 2013).

Como foi referido anteriormente, os seres humanos não conseguem sintetizar carotenoides. No entanto, conseguem metabolizar alguns deles em vitamina A. Os carotenoides com maior capacidade de se metabolizarem em retinol são: β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina (Borel et al., 2013). Na Figura 4 está esquematizada a transformação fisiológica do β -caroteno em metabolitos do retinol (Kelly & von Lintig, 2015).

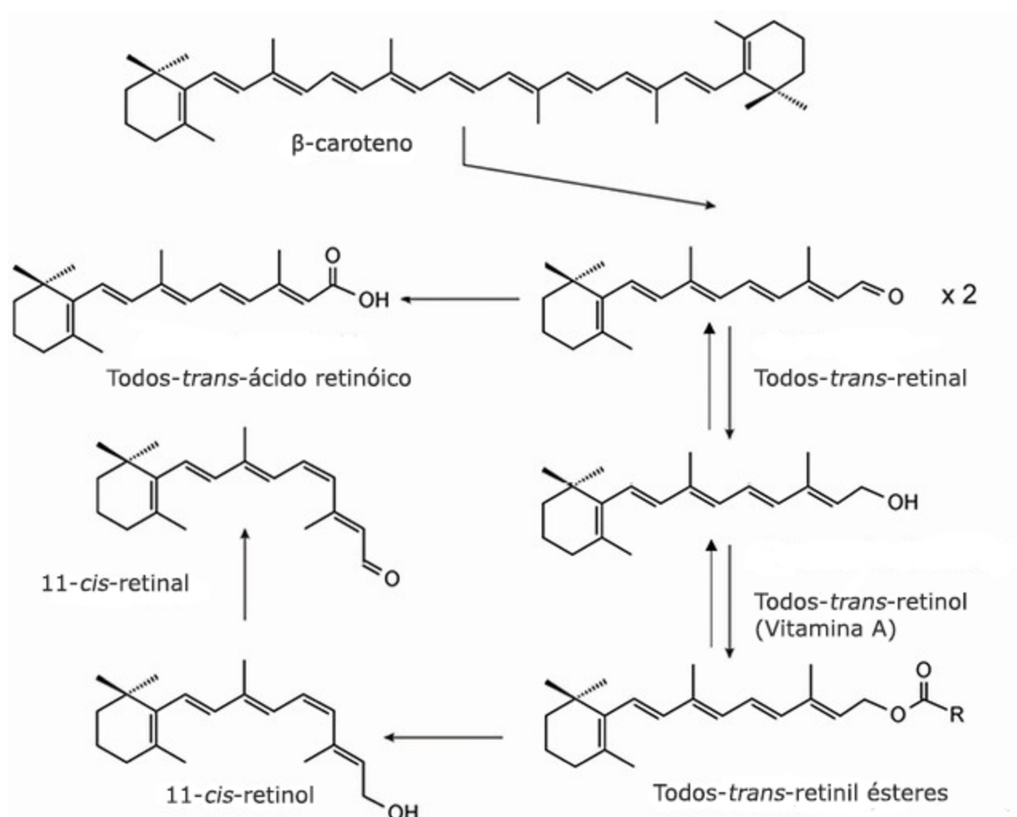


Figura 4 – Transformação fisiológica do β -caroteno em metabolitos do retinol (adaptado de Kelly & von Lintig, 2015).

Estes compostos são por vezes a única fonte de vitamina A presente em países em desenvolvimento, onde o acesso a produtos alimentares de origem animal é limitado (Courraud, Berger, Cristol, & Avallone, 2013).

Atualmente as estratégias para aumentar o consumo de vitamina A incidem no cultivo de alimentos com concentrações elevadas de carotenoides precursores do retinol, ou através da modificação genética de alimentos cultivados já existentes, como é o caso do Arroz dourado (Beyer et al., 2002; Borel et al., 2013).

O arroz dourado é um arroz geneticamente modificado para produzir β -caroteno no endosperma, parte comestível do arroz, como fonte de vitamina A (Beyer et al., 2002; Tang, Qin, Dolnikowski, Russell, & Grusak, 2009).

O retinol é fundamental para diversos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, reprodução, manutenção da visão e do sistema imunitário, sendo também essencial na prevenção de doenças infecciosas em crianças e indivíduos com o sistema imunitário comprometido. Desta forma, torna-se vital a produção de carotenoides precursores da vitamina A, como forma de combate à deficiência em retinol em países subdesenvolvidos (Ross, Chen, & Ma, 2011; Tang et al., 2009).

2.4 – Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são complexos de proteína-pigmento fluorescentes e hidrossolúveis, com capacidade fotossintética. Encontram-se presentes em cianobactérias e em algas eucarióticas do género *Rhodophyta* e *Cryptophyta* (Johnson, Kumar, & Das, 2014).

Estes pigmentos são constituídos estruturalmente por cromóforos tetrapirrólicos de cadeia aberta, denominados ficobilinas, e organizados em complexos moleculares os ficobilissomas (Teale & Dale, 1970; Thomas & Passaquet, 1999).

De acordo com as suas propriedades espectrais e pela composição dos pigmentos, as ficobiliproteínas podem dividir-se em quatro grupos: as ficocianinas, as ficoeritrinas, as aloficocianinas e as ficoeritrocianinas (Zhao et al., 2015). Cada classe de ficobiliproteína apresenta um cromóforo de ficobilina diferente, responsável pela cor do pigmento (Sun, Wang, Chen, & Gong, 2003).

A insegurança normalmente associada aos corantes sintéticos tem levado a um aumento da utilização das ficobiliproteínas como corantes naturais em alimentos e bebidas, graças ao carácter não tóxico destes pigmentos (Jespersen, Strømdahl, Olsen, & Skibsted, 2005; Rasmussen & Morrissey, 2007).

Atualmente estes pigmentos têm sido comercializados, não só na indústria alimentar como corantes naturais, mas também, devido às suas propriedades fluorescentes, em métodos de diagnóstico e investigação biomédica, nomeadamente em técnicas de citometria de fluxo, imunoensaios, e microscopia de fluorescência (Glazer, 1994; Sonani, Rastogi, Patel, & Madamwar, 2016).

Para além das suas aplicações na área da biotecnologia, diversos estudos demonstraram que estes compostos têm propriedades farmacológicas, incluindo atividade anticancerígena, proteção hepática, ação anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora, entre outras (Benedetti et al., 2004; Liu, Xu, Cheng, Lin, & Zhang, 2000; Rimbau, Camins, Romay, González, & Pallàs, 1999; Romay et al., 1998; Sathyasaikumar et al., 2007; Sonani et al., 2016).

Relativamente à biodisponibilidade das ficobiliproteínas no organismo, pensa-se que quando estes compostos são ingeridos oralmente, os pigmentos são digeridos durante o processo de digestão gastrointestinal e libertam os cromóforos de ficobilina, que por sua vez são absorvidos pela mucosa intestinal e exercem o efeito terapêutico. Na Figura 5 está representado um possível mecanismo de absorção intestinal da ficoeritrina (Yabuta, Fujimura, Kwak, Enomoto, & Watanabe, 2010).



Figura 5 – Possível mecanismo de absorção intestinal e efeitos terapêuticos da Ficoeritrina (adaptado de Yabuta et al., 2010).

Capítulo 3 – Efeitos na saúde

3.1 – Propriedades Antioxidantes

O organismo humano está continuamente exposto ao oxigénio que, embora seja essencial para a vida, participa na destruição de tecidos ou na inibição total ou parcial dos mecanismos vitais (Kehrer, 1993; Valko, Izakovic, Mazur, Rhodes, & Telser, 2004).

As espécies reativas ao oxigénio são produtos do metabolismo celular normal, com capacidade de interagir e danificar compostos celulares como é o caso do ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, hidratos de carbono e lípidos (Stahl & Sies, 2003; Valko et al., 2004).

As células têm um sistema de defesa antioxidante de forma a contrariar os danos causados pelas espécies reativas de oxigénio. No entanto, os danos irreversíveis provocados ao ADN, proteínas, ou outras estruturas celulares, podem conduzir ao desenvolvimento de doenças como o cancro, atrofias musculares em patologias neurodegenerativas como é o caso da esclerose lateral amiotrófica (ELA), aterosclerose, entre outras (Fulle et al., 2004; Manea et al., 2015; Muller et al., 2007; Valko et al., 2004).

Para além dos danos causados na saúde, as espécies reativas de oxigénio, como é o caso dos radicais hidroxilo, peróxido de hidrogénio e o anião superóxido, provocam oxidação lipídica que leva à deterioração de certos alimentos (Formanek et al., 2001; Je, Park, & Kim, 2005; Maillard, Soum, Boivin, & Berset, 1996; Pangestuti & Kim, 2011).

De forma a contrariar a deterioração tanto nutricional como visual dos alimentos, antioxidantes sintéticos têm sido utilizados vastamente pela indústria alimentar (Pinho, Ferreira, Oliveira, & Ferreira, 2000). No entanto, o seu uso é desaconselhado em diversos estudos, devido à insegurança destes compostos (Reddy, Urooj, & Kumar, 2005).

Os antioxidantes naturais têm sido uma aposta por parte da indústria alimentar e farmacêutica como substitutos dos antioxidantes sintéticos, não só pela baixa toxicidade

mas também por acrescentarem um valor nutricional ao alimento (Caleja, Barros, Antonio, Oliveira, & Ferreira, 2017; Estévez, Ramírez, Ventanas, & Cava, 2007).

3.1.1 – Clorofilas

As clorofilas têm propriedades antioxidantes ou pro-oxidantes dependendo da exposição à luz (Levent, 2011).

Quando expostas à radiação estes pigmentos exibem um papel foto-oxidante em óleos e gorduras, que pode ser explicado pela transferência de energia de uma molécula de clorofila, no estado excitado, para oxigénio, de modo a formar espécies reativas de oxigénio (Mario G. Ferruzzi & Blakeslee, 2007; Lanfer-Marquez, Barros, & Sinnecker, 2005).

No entanto, no escuro, revelam uma função protetora contra a auto-oxidação de óleos vegetais (Endo, Usuki, & Kaneda, 1985a). Esta propriedade antioxidante deve-se a um mecanismo de doação de eletrões capaz de quebrar as reações em cadeia dos radicais livres (Endo, Usuki, & Kaneda, 1985b).

O anel de porfirina, assim como a presença ou ausência do ião metálico nas clorofilas, são essenciais para a atividade antioxidante (Cahyana, Shuto, & Kinoshita, 1993).

Os derivados sintéticos da clorofila com ião metálico, especialmente os derivados da CCS apresentam uma maior capacidade antioxidante relativamente à clorofila *a* e *b*, e derivados não metálicos (M.G. Ferruzzi, Böhm, Courtney, & Schwartz, 2002; Lanfer-Marquez et al., 2005).

Entre as clorofilas naturais, os derivados da clorofila *b* apresentam uma atividade antioxidante superior aos derivados da clorofila *a* (Lanfer-Marquez et al., 2005). Esta atividade pensa-se estar associada à presença de um grupo aldeído (-CHO) nas clorofilas *b* em detrimento de um grupo metilo, o que provoca um poder antioxidante maior (Lanfer-Marquez et al., 2005).

Desta forma, torna-se importante conhecer a natureza dos derivados da clorofila em frutos e vegetais, de modo a conhecermos as propriedades antioxidantes destes alimentos (M.G. Ferruzzi et al., 2002).

3.1.2 – Carotenoides

Os carotenoides são antioxidantes eficazes na captação de singletos de oxigénio ($^1\text{O}_2$) e de radicais peróxido, desempenhando um papel fundamental na proteção das plantas contra a foto-oxidação (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989; Müller, Fröhlich, & Böhm, 2011; Stahl & Sies, 2003).

Os singletos de oxigénio fornecem energia para os carotenoides de forma a gerarem moléculas de oxigénio no estado fundamental e um tripleto de caroteno excitado. Esta energia é dissipada para o meio envolvente enquanto o carotenoide passa para o estado fundamental. Durante este processo a molécula de carotenoide permanece intacta e poderá ser utilizada novamente para passar o $^1\text{O}_2$ para o estado estacionário (Conn, Schalch, & Truscott, 1991; Di Mascio et al., 1989; Stahl & Sies, 2003).

O número de ligações duplas nos carotenoides está diretamente relacionado com a capacidade destes pigmentos em reduzir os singletos de oxigénio para o seu estado menos excitado (Di Mascio et al., 1989; Stahl & Sies, 2003).

Para além da capacidade dos carotenoides na captação de $^1\text{O}_2$, estes compostos também reagem com radicais peróxido, que estão intimamente envolvidos na deterioração de compartimentos lipofílicos. Deste modo, pensa-se que os carotenoides exercem propriedades protetoras contra o dano oxidativo em membranas celulares e em lipoproteínas (Sies, Helmut; Stahl, 1995).

O β -caroteno é utilizado na prática clínica, para melhorar os sintomas da protoporfíria eritropoiética. Pensa-se que as lesões da pele associadas a esta patologia são causadas pela formação de singletos de oxigénio. Este carotenoide, ao inibir a formação do singlete de oxigénio previne as lesões da pele (Mathews-Roth, 1993).

Outra aplicação dos carotenoides na prática clínica é a sua potencial ação como fotoprotetor (Heo & Jeon, 2009; Moliné et al., 2010; Urikura, Sugawara, & Hirata, 2011). A radiação ultravioleta (UV) provoca a formação de espécies reativas de oxigénio no organismo, que por sua vez, provocam envelhecimento da pele, eritemas solares, e em casos extremos, cancro (Moliné et al., 2010).

Um estudo realizado em ratos expostos a radiação UV-B demonstrou o efeito fotoprotetor da fucoxantina (carotenoide encontrado em algas castanhas), analisando diversos parâmetros do envelhecimento pós exposição solar (Urikura et al., 2011).

Neste estudo, após exposição contínua ao UV-B durante 10 semanas, observou-se a formação de rugas no dorso dos ratos, à exceção dos ratos controlo (não expostos). Observou-se também que, o tratamento tópico com fucoxantina prévio à exposição solar, preveniu o aparecimento de rugas no dorso, em comparação com os ratos tratados com veículo, como pode ser observado na Figura 6 (Urikura et al., 2011).

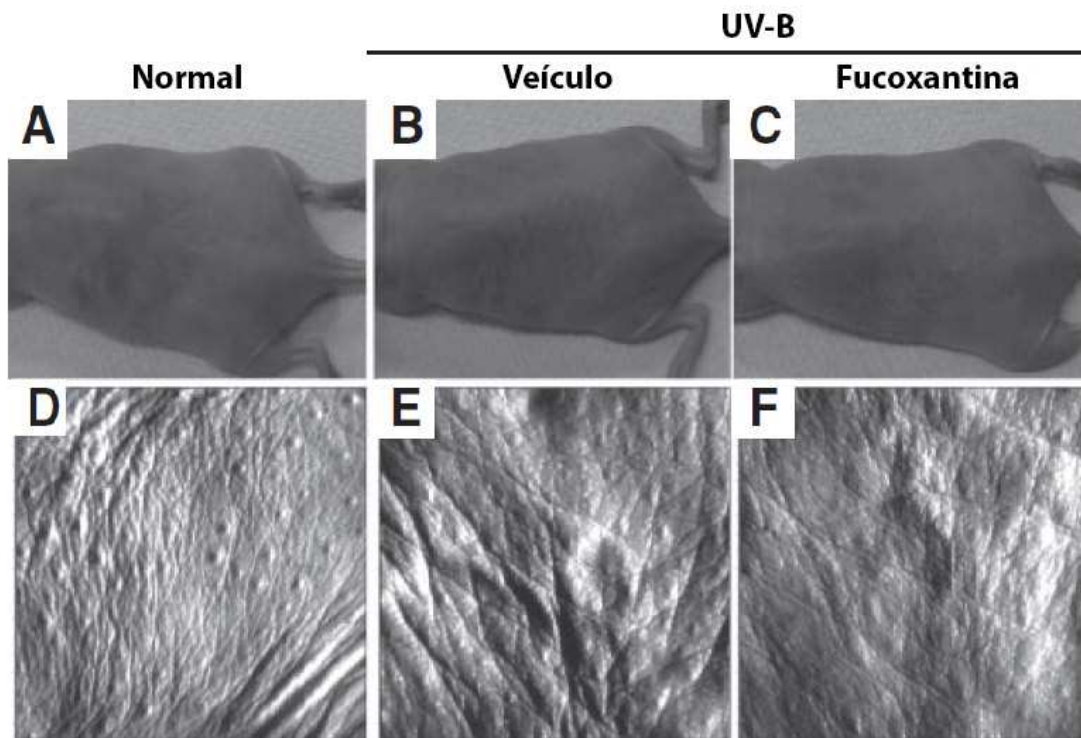


Figura 6 – Efeito da aplicação tópica de fucoxantina na formação de rugas provocadas por exposição ao UV-B. Fotografias do dorso dos ratos sem pelo (A-C) e fotografias do dorso dos ratos sem pelo após exposição ao UV-B (D-F). Ratos não expostos ao UV-B sem qualquer tratamento (A,D). Ratos controlo expostos ao UV-B tratados com veículo (B,E). Ratos expostos ao UV-B tratados com fucoxantina 0.001% (C-F) (adaptado de Urikura et al., 2011).

Estes resultados indicam que a fucoxantina tópica contribui para a prevenção do envelhecimento causado pela exposição ao UV-B. Desta forma, pensa-se que a fucoxantina tem capacidade antioxidante, uma vez que previne os danos causados após exposição UV, que por sua vez são causados pela produção de espécies reativas de oxigénio quando expostas a este tipo de radiação (Urikura et al., 2011).

3.1.3 – Ficobiliproteínas

A ficocianina extraída de *Spirulina platensis* tem efeitos antioxidantes tanto *in vitro* como *in vivo*, apresentando um bom potencial na prevenção de doenças causadas por *stress* oxidativo (Bhat & Madyastha, 2000).

Ao ser ingerida, a ficocianina é metabolizada em ficocianobilina (cromóforo da ficocianina), que inibe a formação de radicais superóxido pelo complexo NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) oxidase (McCarty, 2007; Riss et al., 2007; Terry, Maines, & Lagarias, 1993).

Um estudo realizado em *Caenorhabditis elegans* demonstrou a eficácia da ficoeritrina como agente antioxidante ao regredir o envelhecimento de *C.elegans* (Sonani, Singh, Kumar, Thakar, & Madamwar, 2014).

Neste estudo, foi demonstrado também um potencial antioxidante superior e mais alargado por parte da ficoeritrina em comparação com a ficocianina e aloficocianina (Sonani et al., 2014).

Outro estudo demonstrou a eficácia antioxidante da ficoeritrina em ratos com falência renal aguda provocada por intoxicação com HgCl₂, ao prevenir o *stress* oxidativo (Cano-Europa et al., 2010).

Neste estudo, as ficoeritrinas de *Pseudanabaena tenuis* diminuíram o *stress* oxidativo e consequentemente o dano celular causado por HgCl₂, ao aumentarem a atividade da catalase, estabilizando assim o ambiente oxidação-redução (Cano-Europa et al., 2010).

Como pode ser observado na Figura 7, as ficobiliproteínas ricas em ficoeritrina, melhoram as alterações histológicas provocadas por intoxicação com cloreto de mercúrio, revelando assim as propriedades destes pigmentos como antioxidantes e protetores celulares (Cano-Europa et al., 2010).

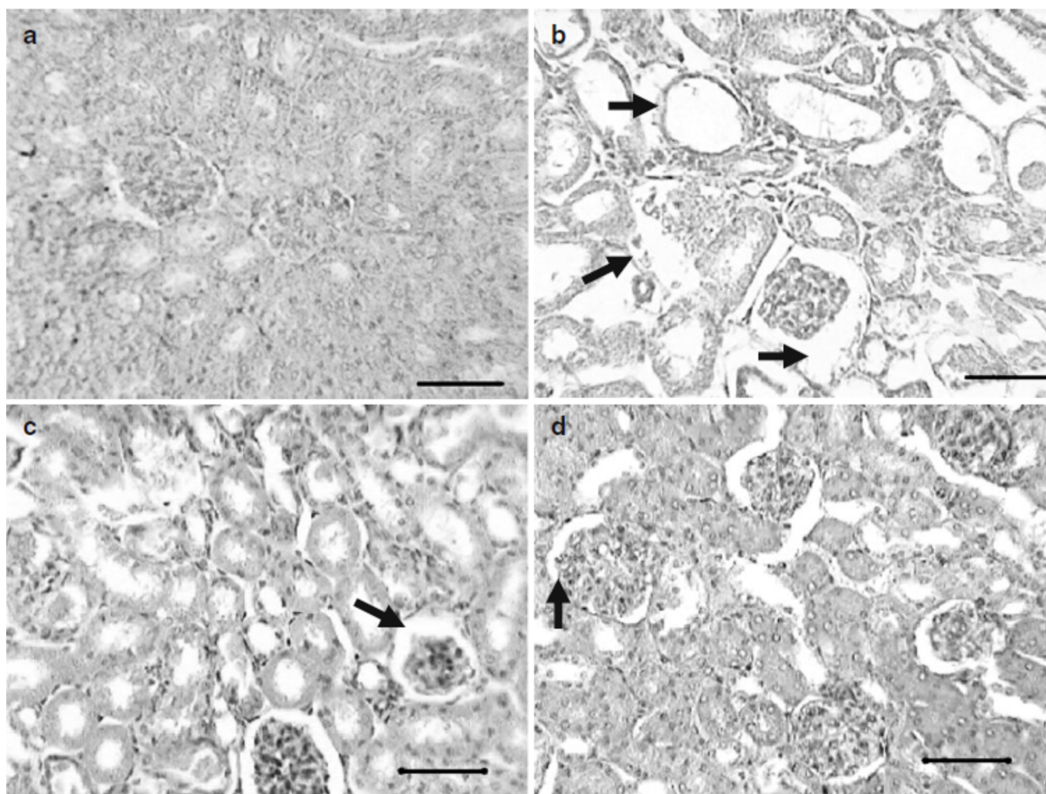


Figura 7 – Fotografias microscópicas do córtex renal. a) Grupo controle. b) Grupo tratado com HgCl_2 . c) Ficobiliproteínas $50\text{mg.Kg}^{-1} + \text{HgCl}_2$. d) Ficobiliproteínas $100\text{mg.Kg}^{-1} + \text{HgCl}_2$. O tecido renal foi corado com Hematoxilina-eosina. O tratamento com HgCl_2 provoca atrofia celular, um núcleo hiper Cromático e edema (setas na figura b). As alterações histológicas melhoraram nos grupos tratados com ficobiliproteínas (setas c e d) (adaptado de Cano-Europa et al., 2010).

3.2 – Propriedades Anticancerígenas e Anti-Tumorais

O cancro é um grave problema de saúde pública em países desenvolvidos. Está associado aos hábitos de vida e ao envelhecimento da população, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no Mundo (Tsilidis et al., 2016; Urruticoechea et al., 2010).

O tratamento do cancro tem evoluído ao longo dos anos melhorando a qualidade e esperança de vida dos doentes. No entanto, muitos destes tratamentos estão associados a toxicidade que pode levar a diversas comorbilidades (Shanholtz, 2001).

As terapêuticas convencionais contra o cancro, tais como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, têm ação citotóxica nas células adjacentes às células cancerígenas devido à falta de seletividade destas terapias nos tecidos-alvo. Em consequência, existe a necessidade de encontrar novas terapêuticas que sejam seletivas para os tecidos cancerígenos (Sharman, Allen, & van Lier, 1999).

3.2.1 – Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) consiste num tratamento aprovado clinicamente, com capacidade de exercer atividade anticancerígena seletiva em células malignas, usando fármacos que são ativados direta ou indiretamente pela luz (Agostinis et al., 2011; Babii et al., 2016).

A PDT envolve o uso de um composto sensível à luz, ou fotossensibilizador (PS), capaz de absorver luz num comprimento de onda apropriado ao processo terapêutico (650-850nm) (Dąbrowski & Arnaut, 2015).

Num primeiro passo, o PS é administrado no organismo, sendo inativo no escuro. Seguidamente, após a administração do fotossensibilizador, é necessário aguardar um período de tempo, designado de “intervalo fármaco-luz” (DLI) para que este chegue e se acumule no tecido-alvo (Dąbrowski & Arnaut, 2015).

Após o DLI, o tecido-alvo é irradiado, e o fármaco absorve fótons ficando eletronicamente excitado. De seguida, pode ocorrer a transferência de um eletrão para formar aniões superóxido, peróxido de hidrogénio ou radicais hidroxilo, ou transferência da energia do fármaco excitado para uma molécula de oxigénio, para formar $^1\text{O}_2$ altamente citotóxico (Dąbrowski & Arnaut, 2015; García-Díaz et al., 2012). Na Figura 8 está exemplificado o processo de terapêutica fotodinâmica num tumor da boca (Agostinis et al., 2011).

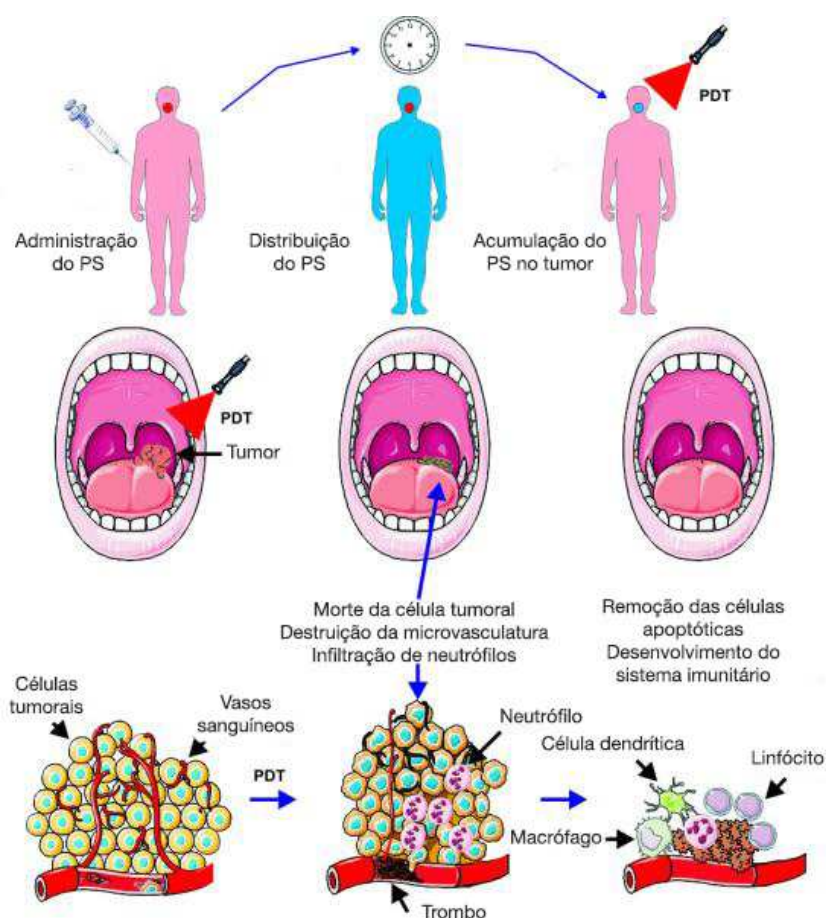


Figura 8 – Princípios da Terapia Fotodinâmica (adaptado de Agostinis et al., 2011).

A PDT é uma terapêutica anticancerígena eficaz graças à produção de *stress* oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigénio. Este processo desencadeia 3 mecanismos principais que permitem a destruição de células cancerígenas: 1) morte celular por apoptose e ou necrose induzida pelo *stress* oxidativo dentro das células, 2) dano vascular que leva a hipoxia do tecido canceroso, e 3) reação inflamatória que

provoca a ativação da resposta imune das células cancerígenas que levam à destruição do cancro (Dąbrowski & Arnaut, 2015; García-Díaz et al., 2012).

Estes mecanismos são essenciais para provocar o máximo de dano nas células cancerígenas. Dependem do tipo e dose de fotossensibilizador usado, do tipo de tecido a ser tratado e de condições do tratamento (tempo entre a administração do PS e exposição à luz, quantidade de luz exposta e concentração de oxigênio nas células cancerígenas) (Agostinis et al., 2011; García-Díaz et al., 2012).

A viabilidade da terapia fotodinâmica está dependente da qualidade do PS. Recentemente foram sintetizados diversos fotossensibilizadores. No entanto apenas alguns são utilizados atualmente na prática clínica, como é o caso do Photofrin®. Este composto foi o primeiro a ser aprovado clinicamente para o tratamento de diversos tipos de cancro. Contudo, este fotossensibilizador tem fraca absorção na região do visível e está associado a fotossensibilidade cutânea (Zhang et al., 2016).

De forma a contrariar os efeitos adversos do Photofrin®, têm sido estudados derivados da clorofila *a* com potencial fotossensibilizador na PDT (Zhang et al., 2016).

Um estudo realizado por Zhang et al. (2016), demonstrou a atividade anti-tumoral de um derivado da clorofila *a*, HEPa (estrutura química na Figura 9). Neste estudo, utilizaram-se células do carcinoma do ducto biliar humano (QBC-939) e modelos de rato BABL/c sem pelo, portadores de QBC-939 (Zhang et al., 2016).

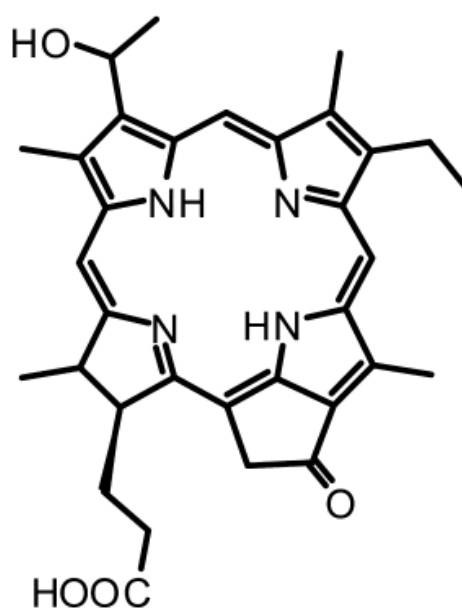


Figura 9 – Estrutura química da HEPa (adaptado de Zhang et al., 2016).

A eficácia *in vivo* da PDT, usando HEPa, foi avaliada estimando a taxa de inibição de crescimento do tumor. Os ratos com tumores, sem tratamento com terapia fotodinâmica, foram usados como controle. Como pode ser observado na Figura 10 os ratos tratados com PDT tiveram uma supressão significativa no crescimento do tecido tumoral. No grupo controle os tumores continuaram a crescer, sem a ocorrência de necrose. No grupo tratado com HEPa, o crescimento do tumor foi significativamente suprimido: 1 dia após a irradiação com HEPa, observou-se a formação de edema no local do tumor; 3 dias após a irradiação verificou-se a formação de cicatriz; passados 14 dias após a irradiação a cicatriz do tumor caiu e formou-se pele nova saudável no local do tumor (Zhang et al., 2016).



Figura 10 – Fotografias digitais representativas dos tumores em tempos diferentes após tratamento (adaptado de Zhang et al., 2016).

Para permitir uma penetração profunda e uma maior especificidade nos tecidos tumorais, é necessário um fotossensibilizador com um espectro de absorção com comprimentos de onda longos (Huang, 2005).

No espectro de absorção UV-visível, a HEPa apresentou bandas nas regiões 416nm, 506nm, 536nm, 563nm, 600nm e 659nm (Zhang et al., 2016). O fotossensibilizador Photofrin® apresenta uma menor absorção na região com comprimento de onda mais longo (luz vermelha > 630nm) em comparação com a HEPa (Wainwright, 2008; Zhang et al., 2016).

A HEPa demonstrou baixa toxicidade no escuro e alta fototoxicidade *in vitro* contra as células QBC-939. Para além disso, apresentou uma *clearance* rápida e grande seletividade para os tecidos tumorais, 6 horas após a administração (Zhang et al., 2016).

Deste modo, considera-se a HEPa uma potencial candidata para a terapia fotodinâmica, devido à sua elevada seletividade para com os tecidos tumorais, *clearance* rápida, alta fototoxicidade nas células QBC-939, e capacidade de absorção a 659nm (Zhang et al., 2016).

Um estudo *in vitro* realizado por Gomaa et al. (2012) avaliou a eficácia de um derivado da clorofila (CHL) como PS no tratamento do cancro da mama, usando modelos de células tumorais MCF-7. Este estudo avaliou também a segurança a nível genético desse fotossensibilizador na PDT em comparação com o metotrexato (MTX), estimando o potencial genotóxico e mutagénico nos linfócitos normais do sangue periférico (Gomaa, Ali, El-Tayeb, & Abdel-kader, 2012).

Os resultados deste estudo comprovaram que o derivado da clorofila tem uma maior eficácia na destruição das células tumorais em comparação com o MTX, sendo necessário 138% menor concentração do derivado da clorofila para atingir 50% de morte da célula tumoral. Para além disso, não apresenta qualquer toxicidade para as células adjacentes saudáveis e tem segurança genética, sendo não mutagénico e não genotóxico (Gomaa et al., 2012).

3.2.2 – Efeito Anticancerígeno dos Carotenoides

Um estudo realizado por E. Kotake-Nara et al. (2005) demonstrou a atividade apoptótica da fucoxantina e da neoxantina em células cancerígenas da próstata humana PC-3 (Kotake-Nara, Asai, & Nagao, 2005).

As células PC-3 foram expostas aos carotenoides neoxantina e fucoxantina durante 48h. Após este tempo, verificaram-se alterações morfológicas nas células, tais como: redução do volume celular, condensação da cromatina, arredondamento da célula, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Figura 11). As células incubadas com o veículo Tetrahydrofurano (THF) foram usadas como controle (Kotake-Nara et al., 2005).

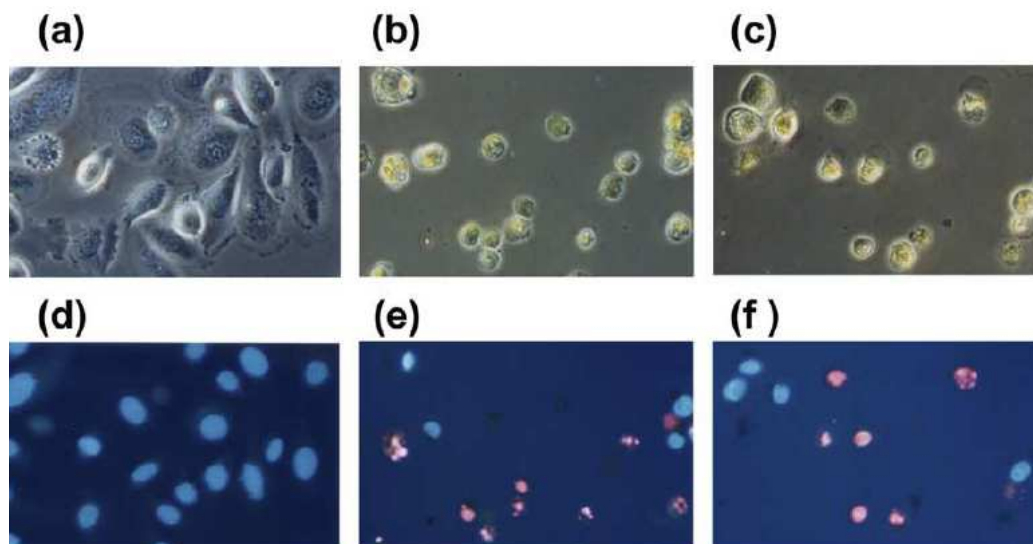


Figura 11 – Apoptose induzida pela neoxantina e fucoxantina em células PC-3. Alterações morfológicas observadas por microscopia de contraste de fase (a-c) e microscopia de fluorescência (d-f). As células PC-3 foram incubadas durante 48h com THF (a e d), 20mM de neoxantina (b e e), e 20mM de fucoxantina (c e f) (adaptado de Eiichi Kotake-Nara et al., 2005).

Outro estudo, executado por Ganesan et al. (2011), verificou a capacidade da sifonaxantina, um carotenoide encontrado em algas marinhas, em induzir a apoptose em células da leucemia humana (HL-60).

Neste estudo, avaliaram-se os efeitos apoptóticos da sifonaxantina através do ensaio de viabilidade celular, ensaio TUNEL¹ e atividade da caspase-3. Os efeitos da sifonaxantina foram comparados com outros carotenoides (Ganesan et al., 2011).

A caspase-3 pertence à família de proteases de cisteína “caspases”, cuja ativação tem um papel fundamental na cascata apoptótica. O processo de apoptose pode ser iniciado através da clivagem da caspase-3, que resulta na fragmentação do ADN, formação de corpos apoptóticos e eventualmente na fagocitose (Elmore, 2007).

Verificou-se que a sifonaxantina inibe fortemente a viabilidade das células HL-60 em comparação com os outros carotenoides em estudo. Comprovou-se também que a sifonaxantina induz a apoptose das células HL-60 através da ativação da caspase-3 e que, estes efeitos apoptóticos estão relacionados com o aumento da expressão de GADD45 α ² e DR5³, e uma diminuição da expressão de Bcl-2⁴ (Ganesan et al., 2011).

Os resultados obtidos neste estudo, confirmam o potencial da sifonaxantina na prevenção e/ou tratamento de células cancerígenas (Ganesan et al., 2011).

¹ Ensaio TUNEL – é utilizado habitualmente para detetar a fragmentação do ADN em cascatas de sinalização apoptóticas (Lozano et al., 2009).

² A GADD45 α é uma proteína nuclear que participa na regulação da reparação do ADN, ciclo celular, proliferação celular, e apoptose (Sánchez et al., 2010).

³ O DR5 é um recetor da superfície celular que atua como mediador no processo de apoptose (Chaudhary et al., 1997).

⁴ O Bcl-2 pertence a uma família de proteínas reguladoras da apoptose com capacidade de induzir ou inibir a apoptose (Hardwick & Soane, 2013).

3.3 – Propriedades Anti-Angiogénicas

A angiogénese é o processo pelo qual se formam novos vasos sanguíneos a partir de uma rede sanguínea pré-existente (Carmeliet, 2003). Este processo pode ser fisiológico ocorrendo na reprodução, desenvolvimento e na cicatrização de feridas, ou patológico, estando envolvido na aterosclerose, metástases tumorais e na artrite reumatoide (Folkman, 2007; Folkman & Shing, 1992).

Algumas patologias como o cancro, aterosclerose e a retinopatia diabética, são agravadas com a angiogénese. Deste modo, a prevenção da angiogénese em condições patológicas pode prevenir o desenvolvimento de doenças (Ganesan et al., 2010).

Alguns carotenoides como a fucoxantina e sifonaxantina apresentam características anti-angiogénicas que podem ser usadas como uma nova abordagem na terapia do cancro e outras doenças relacionadas com a angiogénese (Ganesan et al., 2010; Sugawara, Matsubara, Akagi, Mori, & Hirata, 2006).

O efeito anti-angiogénico da fucoxantina foi observado por Sugawara et al. (2006) ao suprimir eficazmente a proliferação das células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVECs), e a formação de estruturas celulares semelhantes a tubos. Verificou-se também que a fucoxantina atua na inibição da angiogénese em corpos embrioides derivados de células estaminais embrionárias (Sugawara et al., 2006).

Neste estudo, analisou-se o efeito da fucoxantina e do seu derivado fucoxantíol num modelo *ex vivo* de anel aórtico de rato, verificando-se a eficácia inibitória destes dois pigmentos na formação de capilares (Sugawara et al., 2006). A Figura 12 ilustra a estrutura química da fucoxantina e do fucoxantíol (Sugawara et al., 2006).

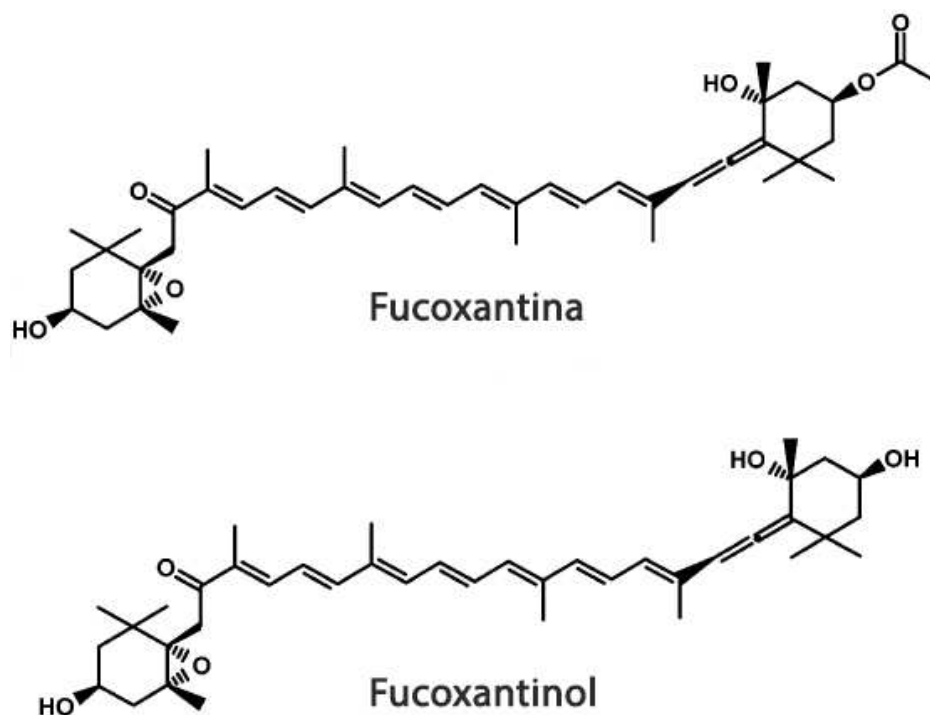


Figura 12 – Estrutura química da Fucoxantina e do Fucoxantíol (adaptado de Sugawara et al., 2006).

Um estudo realizado por Ganesan et al. (2010) demonstrou o efeito anti-angiogénico da sifonaxantina extraída de *Codium fragile* (Ganesan et al., 2010).

Neste estudo foram feitos ensaios em sistemas-modelo de culturas celulares em HUVECs e, ensaios *ex vivo* em anel aórtico de rato (Ganesan et al., 2010).

Verificou-se que a sifonaxantina exibe atividade anti-angiogénica ao suprimir a formação de tubos de HUVECs e ao inibir a proliferação de células endoteliais. Para além disso, a sifonaxantina, à semelhança da fucoxantina, também apresenta atividade inibitória na formação de capilares no modelo *ex vivo* do anel aórtico de rato (Ganesan et al., 2010). Na Figura 13 estão representadas as estruturas dos carotenoides: sifonaxantina, sifoneína e fucoxantina (Ganesan et al., 2011).

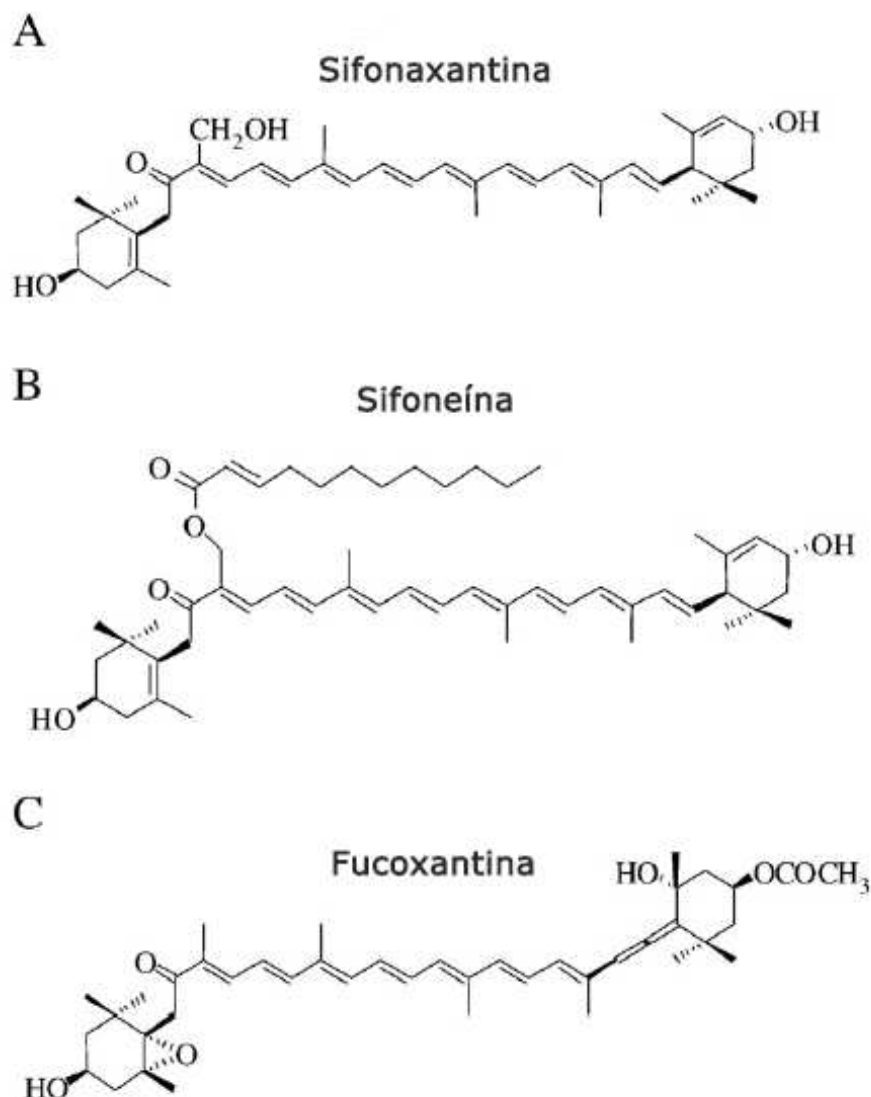


Figura 13 – Estrutura química dos carotenoides: (A) Sufoxantina; (B) Sifoneína; (C) Fucoxantina (adaptado de Ganesan et al., 2011).

As semelhanças estruturais entre a sifonaxantina e a fucoxantina, grupo Hidroxilo na posição 3 e 3', podem estar na origem da sua atividade anti-angiogénica (Ganesan et al., 2010).

Os estudos mencionados anteriormente demonstram a atividade anti-angiogénica dos carotenoides sifonaxantina e fucoxantina em culturas celulares e modelos *ex vivo* mostrando a potencialidade destes compostos no combate a doenças associadas à angiogénese (Ganesan et al., 2010; Sugawara et al., 2006).

3.4 – Obesidade

Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia global, tendo a prevalência desta patologia duplicado desde a década de 80. A OMS estima que aproximadamente 13% da população mundial é obesa, estando previsto um enorme impacto a nível de saúde pública devido às comorbilidades que advêm desta patologia (Saltiel, 2016).

A obesidade pode ser causada por acumulação excessiva de tecido adiposo que está associada a um risco aumentado de desenvolver doenças como a diabetes *mellitus*, hipertensão e doenças cardiovasculares (P. G. Kopelman, 2000; Visscher & Seidell, 2001).

O tecido adiposo, para além de exercer um papel fundamental na homeostase, ao armazenar energia na forma de lípidos, tem funções importantes na secreção de hormonas que regulam a resposta imunológica, a sensibilidade à insulina e a quantidade de alimentos que ingerimos (Frühbeck, Gómez-Ambrosi, Muruzábal, & Burrell, 2001; Gregoire, 2001; Spiegelman & Flier, 1996).

A regulação da diferenciação do tecido adiposo tem vindo a ser estudada para a prevenção de doenças derivadas da obesidade, uma vez que o desenvolvimento da massa adiposa está intimamente relacionado com a diferenciação de adipócitos (Gregoire, 2001).

Na obesidade, o aumento do tecido adiposo pode estar relacionado com uma hipertrofia nas células adiposas e pelo recrutamento de novos adipócitos por células precursoras. Deste modo, uma potencial estratégia para o tratamento da obesidade pode passar pelo controlo da adipogénese (Wang et al., 2008).

A adipogénese é o processo pelo qual os adipócitos atingem a maturidade e se tornam funcionais, passando de pré-adipócitos semelhantes a fibroblastos para células diferenciadas que armazenam lípidos, os adipócitos (Ali, Hochfeld, Myburgh, & Pepper, 2013; Lefterova & Lazar, 2009).

Os pré-adipócitos das linhas celulares 3T3-L1, têm sido usados vastamente em estudos *in vitro* uma vez que mimetizam a formação de células adiposas *in vivo* e, deste

modo, ajudam a entender os mecanismos moleculares que regulam a adipogênese (Gregoire, 2001).

A fucoxantina e o seu metabolito fucoxantíol foram isolados de *Undaria pinnatifida* por Maeda et al. (2006) onde foram investigados os efeitos destes carotenoides na diferenciação de 3T3-L1 pré-adipócitos em adipócitos. As células de 3T3-L1 são linhas celulares derivadas de ratos para a investigação de tecido adiposo (Green & Kehinde, 1975). Estes autores verificaram que a fucoxantina inibe a acumulação lipídica intracelular durante a diferenciação de adipócitos em células 3T3-L1 (Maeda et al., 2006).

Observaram também que o fucoxantíol tem um efeito supressor na acumulação lipídica e que diminui a atividade de um indicador da diferenciação de adipócitos, o glicerol-3-fosfato-desidrogenase (Maeda et al., 2006).

As células tratadas com fucoxantina e fucoxantíol diminuíram ainda o número de recetor γ ativado pelos proliferadores peroxissomais (PPAR γ) que regulam a expressão de genes que atuam na adipogênese (Maeda et al., 2006).

Observou-se que o fucoxantíol tem um efeito inibitório superior à fucoxantina na diferenciação de adipócitos de células 3T3-L1. Deste modo, uma alimentação que contenha fucoxantina poderá prevenir a obesidade através da inibição da diferenciação de adipócitos (Maeda et al., 2006).

A fucoxantina demonstrou ter um efeito redutor da obesidade num estudo realizado por Maeda et al. (2005), ao aumentar a expressão de proteína de desacoplamento 1 ou termogenina (UCP-1) em tecido adiposo branco (TAB) (Maeda, Hosokawa, Sashima, Funayama, & Miyashita, 2005).

Esta proteína tem um efeito importante na termogénese, que evita a acumulação de gordura em tecido adiposo castanho (TAC). Nos adultos humanos a maioria da gordura acumula-se em TAB existindo pouco TAC. No entanto, pensa-se que tecidos que expressam UCP-1, nomeadamente o TAB, tenham a capacidade de reduzir a massa adiposa abdominal (Dalgaard & Pedersen, 2001).

Neste estudo, Maeda et al. (2005) verificaram que ratos diabéticos/obesos KK-A^y alimentados por *Undaria pinnatifida*, contendo fucoxantina, apresentavam uma

redução significativa de tecido adiposo branco, onde se verificou uma expressão notável de UCP-1. A UCP-1 é responsável pela redução de TAB devido à dissipação de energia provocada pela produção de calor em tecido adiposo branco (Maeda et al., 2005).

Um estudo realizado ao suplemento alimentar Xanthigen®, constituído por fucoxantina e ácido puníco, analisou o efeito deste suplemento em mulheres obesas não diabéticas, onde se verificou que este composto contribui para a perda de peso e para a redução da gordura corporal hepática. Observou-se uma melhoria nos testes de função hepática, assim como um aumento do gasto energético em repouso (Abidov, Ramazanov, Seifulla, & Grachev, 2010).

De acordo com os estudos anteriormente mencionados, a fucoxantina apresenta propriedades redutoras de massa gorda, através da indução da expressão de UCP-1 em tecido adiposo branco, pela supressão da diferenciação de adipócitos ao inibir a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase e pela diminuição da expressão de PPAR γ , responsável pela adipogénese (Maeda et al., 2006, 2005; Saltiel, 2016).

Para além disso, o suplemento alimentar Xanthigen® disponível no mercado mostrou ter resultados favoráveis na redução da gordura abdominal, o que sustenta a opinião de que a fucoxantina possa ser usada no combate à obesidade (Abidov et al., 2010).

3.5 – Diabetes

O número de casos de diabetes tem aumentado globalmente, estando associado a uma maior prevalência da obesidade e a estilos de vida pouco saudáveis (Forouhi & Wareham, 2014). Esta patologia está classificada em dois tipos: tipo 1 e tipo 2. A diabetes tipo 1 corresponde a uma perda total ou parcial da secreção de insulina (Van Belle, Coppieters, & Von Herrath, 2011). A diabetes tipo 2 é caracterizada por uma insuficiência na secreção de insulina e/ou pela resistência à mesma (Inzucchi & Sherwin, 2005).

Ambos os tipos de diabetes podem conduzir a complicações microvasculares, como a retinopatia, nefropatia e neuropatia, e a complicações macrovasculares, tais como doença vascular periférica, isquemia cardíaca e enfarte do miocárdio (Forouhi & Wareham, 2014).

A hiperlipidemia, provocada pela carência de insulina, é responsável pelo desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares na diabetes. Nesta patologia é habitual ocorrer uma elevação dos valores de colesterol e triglicéridos que estão associados a um risco aumentado de desenvolver aterosclerose e doenças cardiovasculares (Goldberg, 2001).

Atualmente tem-se investido na investigação de agentes anti-hiperglicémicos e anti-hiperlipidêmicos de origem vegetal, uma vez que podem ser uma alternativa aos tratamentos utilizados presentemente na diabetes (Patar, Bhan, & Syiem, 2016).

Um estudo realizado por Patar et al. (2016) analisou o efeito de um derivado da clorofila, a clorofilina, na hiperglicemia e hiperlipidemia induzida por estreptozotocina em ratos. A estreptozotocina é um antibiótico de largo espectro com propriedades diabéticas sendo esta atividade desempenhada através da destruição seletiva das células pancreáticas beta, induzindo diabetes *mellitus* (Rossini, Like, Chick, Appel, & Cahill, 1977).

Neste estudo compararam o efeito da clorofilina com fármacos hipoglicemiantes como a metformina, glibenclamida e insulina. Verificaram que uma dose de 50mg/kg de clorofilina é eficiente para diminuir a glucose no sangue, sendo esta dose considerada ótima. Observaram que o tratamento com o derivado da clorofila durante 28 dias

reduziu significativamente o colesterol total, triglicéridos, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) com um aumento considerável da lipoproteína de alta densidade (HDL) (Patar et al., 2016).

Estes autores verificaram que a clorofilina tem um efeito anti-hiperglicemiante e anti-hiperlipidêmico, demonstrando o potencial deste composto no tratamento da diabetes, na prevenção da aterosclerose e doenças cardiovasculares em ratos diabéticos (Patar et al., 2016).

A deposição amiloide é comum na diabetes *mellitus* tipo 2, uma vez que a formação de fibrilhas amiloides está relacionada com a perda de células beta pancreáticas produtoras de insulina. Nesta patologia a apoptose das células beta pode ser desencadeada por diversos estímulos tais como: espécies reativas de oxigênio, ácidos gordos livres, citocinas e a formação de fibrilhas de polipéptido amiloide dos ilhéus pancreáticos (IAPP) (Li et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio são as principais responsáveis pela citotoxicidade induzida pelo polipéptido amiloide dos ilhéus pancreáticos humanos (hIAPP) em células beta pancreáticas, em consequência da ativação de proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK). As MAPK estão envolvidas em diversos processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. O *stress* oxidativo, causado por excesso de espécies reativas de oxigênio, tem a capacidade de modular as cascatas de sinalização das MAPK, estando a ativação desta implicada na progressão da doença de diabetes (L. Chang & Karin, 2001; Evans, Goldfine, Maddux, & Grodsky, 2002; Raman, Chen, & Cobb, 2007).

Desta forma, a prevenção da perda de células beta pancreáticas induzida pelo hIAPP pode diminuir a progressão da diabetes tipo 2 (Li et al., 2009).

Li et al. (2009) verificaram o efeito *in vitro* da ficocianina extraída de *Spirulina* na citotoxicidade induzida por hIAPP. Neste estudo utilizaram células beta do insulinoma de rato (INS-1E) para avaliar os efeitos protetores da ficocianina na apoptose celular causada por hIAPP. Observaram que a ficocianina protegia as células INS-1E através da redução do *stress* oxidativo e da regulação das vias de sinalização de MAPK (Li et al., 2009).

Estes resultados sustentam a aplicabilidade dos pigmentos fotossintéticos como a ficocianina e a clorofilina no tratamento da diabetes (Li et al., 2009; Patar et al., 2016).

3.6 – Efeito Anti-inflamatório

A inflamação crónica está associada a doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla e no complexo de demência associado à síndrome de imunodeficiência adquirida humana (SIDA). Para além disso, algumas hipóteses sugerem que a origem do cancro ocorre em locais de inflamação crónica, na medida em que o tecido lesado provoca a inflamação, que por sua vez aumenta a proliferação de tecido cancerígeno (Y. S. Kim & Joh, 2006).

Os pigmentos fotossintéticos interferem no processo inflamatório, através da modulação da função dos macrófagos. Estes são a fonte de diversos mediadores pró-inflamatórios como o óxido nítrico, prostaglandina E₂ (PGE₂), citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigénio (Block, Zecca, & Hong, 2007).

As algas têm a capacidade de gerar mediadores anti-inflamatórios devido à exposição solar e a altas concentrações de oxigénio, o que faz com que tenham o potencial para se protegerem de fatores externos tais como a poluição e a radiação UV. Desta forma, as algas podem ser consideradas como fonte de agentes antioxidantes e anti-inflamatórios (Heo et al., 2010).

Heo et al. (2010) extraíram fucoxantina da alga marinha, *Myagropsis myagroides*, com o intuito de avaliar o efeito anti-inflamatório deste carotenoide no lipopolissacarídeo (LPS) estimulado por macrófagos RAW 264.7.

O óxido nítrico é um mediador inflamatório fundamental em diversos processos fisiológicos tendo um papel importante como vasodilatador, neurotransmissor e imunoprotetor (Nakagawa & Yokozawa, 2002). No entanto, a produção de óxido nítrico é aumentada em condições patológicas pelo óxido nítrico sintase induzível o que contribui para citotoxicidade que pode originar dano tecidular (H. K. Kim, Cheon, Kim, Kim, & Kim, 1999).

A prostaglandina E₂ produzida pela ciclooxigenase-2 (COX-2) em locais de inflamação é um importante mediador inflamatório cuja produção está intimamente relacionada com a produção de óxido nítrico. Desta forma, ao inibir o óxido nítrico diretamente, ou indiretamente pela inibição da COX-2 ou PGE₂, previne-se a ocorrência

ou desenvolvimento de doenças inflamatórias (Ahmad, Chen, Gordon, Laskin, & Laskin, 2002; Y.-C. Chang et al., 2006).

Neste estudo, observaram que a fucoxantina inibia significativamente a produção de óxido nítrico e ligeiramente a produção de PGE₂. Para além disso, a análise em reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) demonstrou o efeito supressor da fucoxantina na expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mARN) do óxido nítrico sintase induzível e da COX-2. Deste modo, a fucoxantina pode ser considerada como um potencial agente terapêutico na prevenção de doenças inflamatórias (Heo et al., 2010).

3.7 – Efeito Neuroprotetor

A neuroprotecção é o processo pelo qual certos mecanismos e estratégias são empregues de forma a proteger as células neuronais de fatores como o dano, apoptose e degeneração do sistema nervoso central (SNC) (Pangestuti & Kim, 2011; Vajda, 2002).

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa, sendo a forma mais comum de demência, caracterizada pela perda progressiva de diversas funções cognitivas, como a memória, concentração e linguagem (Bolognesi, Matera, Minarini, Rosini, & Melchiorre, 2009). Embora a etiologia desta doença ainda não seja conhecida, pensa-se que alguns fatores como a deposição amiloide, disfunção do sistema colinérgico e *stress* oxidativo estejam relacionados com o desenvolvimento da mesma (R. Anand, Gill, & Mahdi, 2014).

Lin et al. (2016), verificaram pela primeira vez o efeito protetor da fucoxantina contra os danos cognitivos induzidos por escopolamina em ratos.

A escopolamina é um fármaco anticolinérgico que induz dano cognitivo, associado a uma redução da neurotransmissão colinérgica, a um aumento da inflamação e do *stress* oxidativo no cérebro (Ghumatkar, Patil, Jain, Tambe, & Sathaye, 2015; Kwon et al., 2010).

Diversos estudos verificaram que altas doses de escopolamina prejudicam a memória a curto prazo em animais e humanos (Araujo, Studzinski, & Milgram, 2005; Min et al., 2015; Singh, Konar, Kumar, Srivas, & Thakur, 2015). Desta forma, este fármaco tem sido usado como modelo experimental na doença de Alzheimer de forma a avaliar o efeito de fármacos anti-amnésicos (M. D. Kopelman & Corn, 1988).

No estudo de Lin et al. (2016) avaliaram-se primeiramente os efeitos da fucoxantina nos danos cognitivos induzidos pela escopolamina em ratos. Seguidamente, verificou-se se a fucoxantina poderia inibir diretamente a acetilcolinesterase (AChE) *in vitro*, e os processos moleculares envolvidos neste processo.

Observaram que a fucoxantina revertia significativamente o aumento da atividade de AChE, induzida pela escopolamina (Tabela 1), e aumentava a atividade da

colina acetiltransferase (ChAT) e a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Lin et al., 2016).

O BDNF é uma proteína pertencente à família das neurofinas, com um papel fundamental no SNC na formação e armazenamento de memória, facilitando a transmissão sináptica e a plasticidade neuronal. Em doentes de Alzheimer a expressão de BDNF é significativamente reduzida, assim como em modelos de animais submetidos a tratamento com escopolamina (J. Chen et al., 2016).

A quantidade de acetilcolina presente no cérebro é regulada pela ação das enzimas AChE e ChAT. A AChE é responsável pela hidrólise da acetilcolina em ácido acético e colina. Deste modo, inibidores da AChE prolongam a atividade da acetilcolina nas sinapses, promovendo a neurotransmissão colinérgica (P. Anand & Singh, 2013).

Neste estudo, verificaram que a fucoxantina inibe a AChE diretamente, de uma forma não-competitiva *in vitro*, possivelmente através da interação com o local aniônico periférico (PAS) da AChE (Lin et al., 2016).

Tabela 1 – A fucoxantina diminui a atividade da AChE no hipocampo e córtex dos ratos tratados com escopolamina (adaptado de Lin et al., 2016)

| Região Cerebral | Atividade da AChE | | | | | |
|-----------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Controlo | Escopolamina 3mg/kg <i>i.p.</i> | | | | |
| | | Veículo | Fucoxantina (mg/kg) | | | Donepezilo (mg/kg) |
| | | | 50 | 100 | 200 | 3 |
| Hipocampo | 60.3 ± 2.7 | 80.2 ± 2.3 ^{##} | 76.2 ± 4.0 | 68.1 ± 3.2 ^{**} | 67.6 ± 4.3 ^{**} | 62.4 ± 2.6 ^{**} |
| Córtex | 52.1 ± 2.8 | 71.2 ± 1.3 ^{##} | 60.5 ± 3.0 ^{**} | 62.4 ± 2.9 ^{**} | 57.4 ± 3.2 ^{**} | 61.6 ± 1.4 ^{**} |

Os resultados, expressos em média ± SEM (n=8), são nanomoles de acetilcolina degradada/miligramma de proteína/hora
^{##} p<0.01 versus o grupo de controlo, ^{**}p<0.01 versus o grupo tratado com escopolamina (ANOVA e teste de Tukey)

Através destes resultados, é possível antever o potencial da fucoxantina no tratamento do Alzheimer ao atuar na inibição da AChE e ao aumentar a expressão de BDNF (Lin et al., 2016).

Outro estudo realizado com fucoxantina testou o efeito deste carotenoide no *stress* oxidativo e inflamação em placas amiloides β 42 induzido por células da microglia BV2 (Pangestuti, Vo, Ngo, & Kim, 2013).

As células da microglia são células com funções semelhantes aos macrófagos, responsáveis pela defesa imunitária no SNC, ficando ativas em resposta a estímulos ou danos imunológicos. Aquando da ativação da microglia, estas células sofrem funções de fagocitose, apresentação antigénica e secreção de mediadores neurotóxicos (Ransohoff & Perry, 2009).

As placas amiloides β estão associadas à doença de Alzheimer através da toxicidade direta nos neurónios e pela ativação da microglia, que por sua vez vai potenciar as lesões neuronais (Block et al., 2007).

Pangestuti et al. (2013) verificaram que a fucoxantina atenua a secreção pró-inflamatória em células BV2, exibe efeitos supressores na fosforilação da MAPK, inibe a oxidação do ADN em células BV2 induzida por radicais livres e, reduz eficazmente a formação de espécies reativas de oxigénio.

Os resultados deste estudo provam a eficácia da fucoxantina como neuroprotetor, ao atuar como regulador da inflamação e *stress* oxidativo nas células BV2, protegendo deste modo as células neuronais de mediadores tóxicos libertados pela microglia (Pangestuti et al., 2013).

3.8 – Osteoporose

A osteoporose é uma doença óssea sistémica, caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração estrutural, que conseqüentemente levam a um risco aumentado de fratura. A maioria dos casos de osteoporose ocorre em mulheres na pós-menopausa, onde a diminuição dos níveis de estrogénio leva à perda de massa óssea e aumenta o risco de fratura. O diagnóstico prévio desta patologia em doentes de risco e a otimização do tratamento pode evitar a ocorrência de fraturas e prevenir a osteoporose (Kling, Clarke, & Sandhu, 2014).

O processo que desencadeia a osteoporose resulta num desequilíbrio entre a reabsorção de osso e a formação de osso. No ciclo de vida normal dos ossos, os osteoclastos aderem à massa óssea e removem-na por acidificação e digestão proteolítica. Seguidamente, os osteoblastos inserem-se no local removido pelos osteoclastos e começam o processo de formação de massa óssea nova, através da secreção do osteoide que eventualmente é mineralizado em osso. A diminuição da massa óssea acontece quando os osteoclastos destroem a matriz óssea mais rapidamente que a formação desta pelos osteoblastos (Manolagas, 1998).

Das, Ren, Hashimoto, & Kanazawa (2010) investigaram os efeitos da fucoxantina na diferenciação de osteoclastos, usando macrófagos da linha celular RAW264.7 capazes de se diferenciar em células semelhantes a osteoclastos, quando estimuladas pelo recetor ativador do fator nuclear κ B ligante. Foi avaliada a citotoxicidade da fucoxantina nas células semelhantes a osteoclastos diferenciadas das células RAW264.7 e nas células semelhantes a osteoblastos da linha celular MC3T3-E1.

Estes autores verificaram que a diferenciação das células RAW264.7 foi inibida eficazmente pela fucoxantina, sem qualquer toxicidade celular. Este carotenoide induziu a apoptose das células semelhantes a osteoclastos através da ativação da caspase-3. No entanto, a fucoxantina não diminuiu a viabilidade celular das células semelhantes a osteoblastos da linha celular MC3T3-E1, o que significa que a fucoxantina tem uma atividade apoptótica superior nos osteoclastos comparativamente aos osteoblastos (Das et al., 2010).

Através dos resultados deste estudo, constatou-se que a fucoxantina inibe a osteoclastogênese ao induzir a apoptose em células semelhantes a osteoclastos, sem qualquer toxicidade para as células semelhantes a osteoblastos, o que significa que não interfere com a formação de osso. Deste modo, a fucoxantina pode ser futuramente utilizada na prevenção de doenças ósseas, como a osteoporose (Das et al., 2010).

Conclusão

Embora, atualmente a esperança média de vida esteja a aumentar, está igualmente a aumentar a incidência de doenças crónicas e comorbilidades a elas associadas, surgindo a necessidade de encontrar alternativas às terapêuticas atuais.

Os pigmentos fotossintéticos são compostos bioativos com aplicação em diferentes áreas da saúde, tendo mostrado eficácia científica no melhoramento de certas patologias *in vitro*.

Nesta monografia estudaram-se os efeitos na saúde dos pigmentos fotossintéticos, e, verificou-se a sua atividade como antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório, neuroprotetor, anti-diabético, na prevenção e tratamento da obesidade e na prevenção da osteoporose.

Relativamente às propriedades antioxidantes destes compostos, observou-se que as clorofilas, os carotenoides e as ficobiliproteínas têm atividade antioxidante, revelando um bom potencial na prevenção de doenças causadas pelo *stress* oxidativo.

Na terapêutica do cancro, constatou-se que o derivado da clorofila (HEPa) apresenta boas propriedades como fotosensibilizador na terapia fotodinâmica, exibindo alta seletividade para com as células tumorais, para além de ter segurança a nível genético. Os carotenoides, fucoxantina, sifonaxantina e neoxantina, revelaram capacidade de induzir a apoptose em células cancerígenas.

No que respeita à angiogénese, os carotenoides, fucoxantina e sifonaxantina, apresentam características anti-angiogénicas, o que poderá ser útil em patologias associadas à mesma.

Na obesidade, a fucoxantina e o seu derivado fucoxantíol, revelaram propriedades distintas na redução da massa gorda abdominal, pela supressão da diferenciação de adipócitos. Futuramente, estes carotenoides poderão ser utilizados no tratamento da obesidade, já existindo atualmente um suplemento de fucoxantina no mercado.

Quanto à doença da diabetes, a clorofilina revelou ter efeito hipoglicemiante e anti-hiperlipidêmico, podendo ser usada no tratamento da diabetes, e como prevenção da aterosclerose e doenças cardiovasculares. A ficocianina, através da sua propriedade reguladora da MAPK e redução do *stress* oxidativo, protege as células INS-1E podendo prevenir a progressão da diabetes tipo 2.

Observou-se que a fucoxantina inibe a produção de mediadores inflamatórios, demonstrando potencial como agente terapêutico na prevenção de doenças inflamatórias.

Relativamente à proteção das células neuronais, verificou-se que a fucoxantina exibe propriedades neuroprotetoras ao inibir a AChE e ao aumentar a expressão de BDNF, podendo eventualmente ser usada no tratamento da doença de Alzheimer.

Em suma, a fucoxantina pode ser usada futuramente na prevenção de doenças ósseas, como a osteoporose, ao inibir a osteoclastogênese.

Dado o carácter promissor destas moléculas, deve apostar-se na investigação para se determinar quais os mecanismos de ação nos diversos tecidos-alvo, e com isso aumentar a sua eficiência. No futuro, e na sequência destas investigações, deverão ser determinadas as melhores formas de administração destes pigmentos, tendo em conta a biodisponibilidade dos mesmos.

- Abidov, M., Ramazanov, Z., Seifulla, R., & Grachev, S. (2010). The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *12*(1), 72–81. <http://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01132.x>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. ., Foster, T. ., Girotti, A. ., Gollnick, S. ., ... Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.*, *61*(4), 250–281. <http://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Ahmad, N., Chen, L. C., Gordon, M. A., Laskin, J. D., & Laskin, D. L. (2002). Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology*, *71*(6), 1005–1011. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050186>
- Airs, R. L., Temperton, B., Sambles, C., Farnham, G., Skill, S. C., & Llewellyn, C. A. (2014). Chlorophyll f and chlorophyll d are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation. *FEBS Letters*, *588*(20), 3770–3777. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.08.026>
- Akutsu, S., Fujinuma, D., Furukawa, H., Watanabe, T., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., ... Kobayashi, M. (2011). Pigment analysis of a chlorophyll f -containing cyanobacterium strain KC1 isolated from Lake Biwa. *Photomedicine and Photobiology*, *33*, 35–40.
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology*, *92*(6–7), 229–236. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.06.001>
- Anand, P., & Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, *36*(4), 375–399. <http://doi.org/10.1007/s12272-013-0036-3>

- Anand, R., Gill, K. D., & Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76, 27–50. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.004>
- Araujo, J. A., Studzinski, C. M., & Milgram, N. W. (2005). Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(3), 411–422. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.12.008>
- Babii, O., Afonin, S., Garmanchuk, L. V., Nikulina, V. V., Nikolaienko, T. V., Storozhuk, O. V., ... Komarov, I. V. (2016). Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic Cancer Therapy. *Angewandte Chemie*, 128(18), 5583–5586. <http://doi.org/10.1002/ange.201600506>
- Barber, J., Morris, E., & Büchel, C. (2000). Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins, CP43 and CP47. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1459(2–3), 239–247. [http://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00158-4](http://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00158-4)
- Batista, A. P., Raymundo, A., Sousa, I., & Empis, J. (2006). Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 44–52. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.02.009>
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., & Canestrari, F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences*, 75(19), 2353–2362. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.06.004>
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R., & Potrykus, I. (2002). Golden Rice: introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 506S–510S. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880581>

- Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. (2000). C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275(1), 20–25. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3270>
- Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship, R. E., & Govindjee. (2009). A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynthesis Research*, 99(2), 85–98. <http://doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(1), 57–69. <http://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Bolognesi, M. L., Matera, R., Minarini, A., Rosini, M., & Melchiorre, C. (2009). Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(3), 303–308. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.619>
- Borel, P., Lietz, G., Goncalves, A., Szabo de Edelenyi, F., Lecompte, S., Curtis, P., ... Reboul, E. (2013). CD36 and SR-BI Are Involved in Cellular Uptake of Provitamin A Carotenoids by Caco-2 and HEK Cells, and Some of Their Genetic Variants Are Associated with Plasma Concentrations of These Micronutrients in Humans. *The Journal of Nutrition*, 143(4), 448–456. <http://doi.org/10.3945/jn.112.172734>
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551–1558.
- Cahyana, A. H., Shuto, Y., & Kinoshita, Y. (1993). Antioxidative Activity of Porphyrin Derivatives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(4), 680–681.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342–346. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.075>

- Cano-Europa, E., Ortiz-Butrón, R., Gallardo-Casas, C. A., Blas-Valdivia, V., Pineda-Reynoso, M., Olvera-Ramírez, R., & Franco-Colin, M. (2010). Phycobiliproteins from *Pseudanabaena tenuis* rich in c-phycoerythrin protect against HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. *Journal of Applied Phycology*, 22(4), 495–501. <http://doi.org/10.1007/s10811-009-9484-z>
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653–660. <http://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37–40. <http://doi.org/10.1038/35065000>
- Chang, Y.-C., Li, P.-C., Chen, B.-C., Chang, M.-S., Wang, J.-L., Chiu, W.-T., & Lin, C.-H. (2006). Lipoteichoic acid-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E₂, protein kinase A, p38 MAPK, and nuclear factor-kappaB pathways. *Cellular Signalling*, 18(8), 1235–1243. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.10.005>
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., & Hood, L. (1997). Death Receptor 5, a New Member of the TNFR Family, and DR4 Induce FADD-Dependent Apoptosis and Activate the NF-κB Pathway. *Immunity*, 7(6), 821–830. [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80400-8](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80400-8)
- Chen, J., Li, C. R., Yang, H., Liu, J., Zhang, T., Jiao, S. S., ... Xu, Z. Q. (2016). proBDNF Attenuates Hippocampal Neurogenesis and Induces Learning and Memory Deficits in Aged Mice. *Neurotoxicity Research*, 29(1), 47–53. <http://doi.org/10.1007/s12640-015-9568-2>
- Chen, M. (2014). Chlorophyll modifications and their spectral extension in oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 317–340. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-162943>
- Chen, M., Li, Y., Birch, D., & Willows, R. D. (2012). A cyanobacterium that contains chlorophyll f - a red-absorbing photopigment. *FEBS Letters*, 586(19), 3249–3254. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.045>

- Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z.-L., Neilan, B. A., & Scheer, H. (2010). A red-shifted chlorophyll. *Science*, 329(5997), 1318–1319. <http://doi.org/10.1126/science.1191127>
- Conn, P. F., Schalch, W., & Truscott, T. G. (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 11(1), 41–47. [http://doi.org/10.1016/1011-1344\(91\)80266-K](http://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80266-K)
- Courraud, J., Berger, J., Cristol, J. P., & Avallone, S. (2013). Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 136(2), 871–877. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.076>
- Dąbrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(10), 1765–1780. <http://doi.org/10.1039/C5PP00132C>
- Dalgaard, L. T., & Pedersen, O. (2001). Uncoupling proteins: Functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia*, 44(8), 946–965. <http://doi.org/10.1007/s001250100596>
- Das, S. K., Ren, R., Hashimoto, T., & Kanazawa, K. (2010). Fucoxanthin induces apoptosis in osteoclast-like cells differentiated from RAW264.7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6090–6095. <http://doi.org/10.1021/jf100303k>
- Del Giudice, R., Petruk, G., Raiola, A., Barone, A., Monti, D. M., & Rigano, M. M. (2016). Carotenoids in fresh and processed tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits protect cells from oxidative stress injury. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <http://doi.org/10.1002/jsfa.7910>
- Delepine, M. (1951). Joseph Pelletier and Joseph Caventou. *Journal of Chemical Education*, 28(9), 454–461. <http://doi.org/10.1021/ed028p454>

- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289. <http://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274(2), 532–538. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90467-0](http://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90467-0)
- Dougherty, R. C., Strain, H. H., Svec, W. A., Uphaus, R. A., & Katz, J. J. (1970). The structure, properties, and distribution of chlorophyll c. *Journal of the American Chemical Society*, 92(9), 2826–2833.
- Egner, P. A., Stansbury, K. H., Snyder, E. P., Rogers, M. E., Hintz, P. A., & Kensler, T. W. (2000). Identification and characterization of chlorin e4 ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. *Chemical Research in Toxicology*, 13(9), 900–906. <http://doi.org/10.1021/tx000069k>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <http://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Endo, Y., Usuki, R., & Kaneda, T. (1985a). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(9), 1375–1378. <http://doi.org/10.1007/BF02545962>
- Endo, Y., Usuki, R., & Kaneda, T. (1985b). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(9), 1387–1390. <http://doi.org/10.1007/BF02545965>
- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 58–65. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.010>

- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23(5), 599–622. <http://doi.org/10.1210/er.2001-0039>
- Ferreira, A. L. A., Yeum, K. J., Liu, C., Smith, D., Krinsky, N. I., Wang, X. D., & Russell, R. M. (2000). Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1256–1260.
- Ferruzzi, M. G., & Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.12.003>
- Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D., & Schwartz, S. J. (2002). Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *Journal of Food Science*, 67(7), 2589–2595. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08782.x>
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(4), 273–286. <http://doi.org/10.1038/nrd2115>
- Folkman, J., & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 10931–10934.
- Formanek, Z., Kerry, J. P., Higgins, F. M., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Farkas, J. (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: Effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Science*, 58(4), 337–341. [http://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00149-2](http://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00149-2)
- Forouhi, N. G., & Wareham, N. J. (2014). Epidemiology of diabetes. *Medicine*, 42(12), 698–702. <http://doi.org/10.1383/medc.2006.34.2.57>
- Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J., & Burrell, M. A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism.*, 280(6), E827–E847.

- Fulle, S., Protasi, F., Di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., ... Fanò, G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Experimental Gerontology*, 39(1), 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2003.09.012>
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2008). Digestive stability, micelialization, and uptake by Caco-2 human intestinal cell of chlorophyll derivatives from different preparations of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8379–8386. <http://doi.org/10.1021/jf8013684>
- Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2009). Influence of the chlorophyll pigment structure on its transfer from an oily food matrix to intestinal epithelium cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5306–5314. <http://doi.org/10.1021/jf900426h>
- Ganesan, P., Matsubara, K., Ohkubo, T., Tanaka, Y., Noda, K., Sugawara, T., & Hirata, T. (2010). Anti-angiogenic effect of siphonaxanthin from green alga, *Codium fragile*. *Phytomedicine*, 17(14), 1140–1144. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.05.005>
- Ganesan, P., Noda, K., Manabe, Y., Ohkubo, T., Tanaka, Y., Maoka, T., ... Hirata, T. (2011). Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810(5), 497–503. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.02.008>
- García-Díaz, M., Kawakubo, M., Mroz, P., Sagristà, M. L., Mora, M., Nonell, S., & Hamblin, M. R. (2012). Cellular and vascular effects of the photodynamic agent temocene are modulated by the delivery vehicle. *Journal of Controlled Release*, 162(2), 355–363. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.025>
- García-Sánchez, M. A., Serratos, I. N., Sosa, R., Tapia-Esquivel, T., González-García, F., Rojas-González, F., ... Arrieta, A. (2016). Chlorophyll a Covalently Bonded to Organo-Modified Translucent Silica Xerogels: Optimizing Fluorescence and Maximum Loading. *Molecules*, 21(8), 961. <http://doi.org/10.3390/molecules21070961>

- Gerola, A. P., Tsubone, T. M., Santana, A., De Oliveira, H. P. M., Hioka, N., & Caetano, W. (2011). Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(22), 7364–7373. <http://doi.org/10.1021/jp201278b>
- Ghumatkar, P. J., Patil, S. P., Jain, P. D., Tambe, R. M., & Sathaye, S. (2015). Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *135*, 182–191. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.06.005>
- Glazer, A. N. (1994). Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, *6*(2), 105–112. <http://doi.org/10.1007/BF02186064>
- Goldberg, I. J. (2001). Diabetic Dyslipidemia: Causes and Consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(3), 965–971. <http://doi.org/10.1210/jc.86.3.965>
- Gomaa, I., Ali, S. E., El-Tayeb, T. A., & Abdel-kader, M. H. (2012). Chlorophyll derivative mediated PDT versus methotrexate: An in vitro study using MCF-7 cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *9*(4), 362–368. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2012.04.001>
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco-Navarro, I., & Blázquez-García, S. (2007). Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(15), 6387–6394. <http://doi.org/10.1021/jf070301t>
- Green, H., & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, *5*(1), 19–27. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90087-2](http://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90087-2)
- Gregoire, F. M. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *226*(11), 997–1002.

- Hammond, B. R., & Renzi, L. M. (2013). Carotenoids. *Advances in Nutrition*, 4(4), 474–476. <http://doi.org/10.3945/an.113.004028>.
- Hardwick, J. M., & Soane, L. (2013). Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008722>
- Hari, R. K., Patel, T. R., & Martin, A. M. (1994). An overview of pigment production in biological systems: Functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Reviews International*, 10(1), 49–70. <http://doi.org/10.1080/87559129409540985>
- Hedrén, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(5), 425–430. <http://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601329>
- Heo, S.-J., & Jeon, Y.-J. (2009). Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95(2), 101–107. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.011>
- Heo, S.-J., Yoon, W.-J., Kim, K.-N., Ahn, G.-N., Kang, S.-M., Kang, D.-H., ... Jeon, Y.-J. (2010). Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2045–2051. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.003>
- Huang, Z. (2005). A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(3), 283–293. <http://doi.org/10.1177/153303460500400308>
- Inzucchi, S. E., & Sherwin, R. S. (2005). The prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 34(1), 199–219. <http://doi.org/10.1016/j.ecl.2004.11.008>

- Je, J.-Y., Park, P.-J., & Kim, S.-K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38(1), 45–50. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.005>
- Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., & Skibsted, L. H. (2005). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3), 261–266. <http://doi.org/10.1007/s00217-004-1062-7>
- Johnson, E. M., Kumar, K., & Das, D. (2014). Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc* sp. *Bioresource Technology*, 166, 541–547. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.097>
- Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1), 21–48. <http://doi.org/10.3109/10408449309104073>
- Kelly, M., & von Lintig, J. (2015). STRA6: role in cellular retinol uptake and efflux. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 4(4), 229–242. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.12>
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y., & Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 58(5), 759–765. [http://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00160-4](http://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00160-4)
- Kim, Y. S., & Joh, T. H. (2006). Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 38(4), 333–347. <http://doi.org/10.1038/emm.2006.40>
- Kling, J. M., Clarke, B. L., & Sandhu, N. P. (2014). Osteoporosis Prevention, Screening, and Treatment: A Review. *Journal of Women's Health*, 23(7), 563–572. <http://doi.org/10.1089/jwh.2013.4611>
- Koca, N., Karadeniz, F., & Burdurlu, H. S. (2007). Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chemistry*, 100(2), 609–615. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.079>

- Kopelman, M. D., & Corn, T. H. (1988). Cholinergic “blockade” as a model for cholinergic depletion: A comparison of the memory deficits with those of alzheimer-type dementia and the alcoholic korsakoff syndrome. *Brain*, *111*(5), 1079–1110. <http://doi.org/10.1093/brain/111.5.1079>
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, *404*(6778), 635–643. <http://doi.org/10.1038/35007508>
- Kotake-Nara, E., Asai, A., & Nagao, A. (2005). Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letters*, *220*(1), 75–84. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.07.048>
- Kotake-Nara, E., & Nagao, A. (2012). Effects of Mixed Micellar Lipids on Carotenoid Uptake by Human Intestinal Caco-2 Cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *76*(5), 875–882. <http://doi.org/10.1271/bbb.110777>
- Kwon, S.-H., Lee, H.-K., Kim, J.-A., Hong, S.-I., Kim, H.-C., Jo, T.-H., ... Jang, C.-G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, *649*(1–3), 210–217. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.001>
- Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M. C., & Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, *38*(8–9), 885–891. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.012>
- Larkum, A. W. D., & Kühn, M. (2005). Chlorophyll d: The puzzle resolved. *Trends in Plant Science*, *10*(8), 355–357. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.06.005>
- Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *20*(3), 107–114. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.005>
- Levent, İ. A. (2011). Chlorophyll: Structural Properties , Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Akademik Gıda Academic Food Journal*, *9*(2), 26–32.

- Li, X.-L., Xu, G., Chen, T., Wong, Y.-S., Zhao, H.-L., Fan, R.-R., ... Chan, J. C. N. (2009). Phycocyanin protects INS-1E pancreatic beta cells against human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis through attenuating oxidative stress and modulating JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(7), 1526–1535. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.01.002>
- Lin, J., Huang, L., Yu, J., Xiang, S., Wang, J., Zhang, J., ... Wang, Q. (2016). Fucoxanthin, a marine carotenoid, reverses scopolamine-induced cognitive impairments in mice and inhibits acetylcholinesterase in vitro. *Marine Drugs*, 14(4), 1–17. <http://doi.org/10.3390/md14040067>
- Liu, Y., Xu, L., Cheng, N., Lin, L., & Zhang, C. (2000). Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *Journal of Applied Phycology*, 12(2), 125–130. <http://doi.org/10.1023/A:1008132210772>
- Loughlin, P., Lin, Y., & Chen, M. (2013). Chlorophyll d and *Acaryochloris marina*: Current status. *Photosynthesis Research*, 116(2–3), 277–293. <http://doi.org/10.1007/s11120-013-9829-y>
- Lozano, G. M., Bejarano, I., Espino, J., González, D., Ortiz, Á., García, J. F., ... Pariente, J. A. (2009). Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(6), 615–621. <http://doi.org/10.1262/jrd.20250>
- Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., & Sullivan, R. (2013). Economic burden of cancer across the European Union: A population-based cost analysis. *The Lancet Oncology*, 14(12), 1165–1174. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70442-X](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70442-X)
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., & Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(2), 392–397. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.002>

- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Takahashi, N., Kawada, T., & Miyashita, K. (2006). Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, *18*(1), 147–152. <http://doi.org/10.3892/ijmm.18.1.147>
- Maillard, M.-N., Soum, M.-H., Boivin, P., & Berset, C. (1996). Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. *LWT - Food Science and Technology*, *29*(3), 238–244. <http://doi.org/10.1006/fstl.1996.0035>
- Manea, A., Manea, S.-A., Gan, A. M., Constantin, A., Fenyó, I. M., Raicu, M., ... Simionescu, M. (2015). Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *461*(1), 172–179. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.021>
- Manolagas, S. C. (1998). Cellular and molecular mechanisms of osteoporosis. *Aging Clinical and Experimental Research*, *10*(3), 182–190. <http://doi.org/10.1007/BF03339652>
- Marx, M., Stuparic, M., Schieber, A., & Carle, R. (2003). Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chemistry*, *83*(4), 609–617. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00255-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00255-3)
- Mathews-Roth, M. M. (1993). Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *691*, 127–138. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb26164.x>
- McCarty, M. F. (2007). Clinical potential of Spirulina as a source of phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food*, *10*(4), 566–570. <http://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>
- Min, A. Y., Doo, C. N., Son, E. J., Sung, N. Y., Lee, K. J., Sok, D. E., & Kim, M. R. (2015). N-palmitoyl serotonin alleviates scopolamine-induced memory impairment via regulation of cholinergic and antioxidant systems, and expression of BDNF and p-CREB in mice. *Chemico-Biological Interactions*, *242*, 153–162. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.016>

- Mohr, R., Voss, B., Schliep, M., Kurz, T., Maldener, I., Adams, D. G., ... Hess, W. R. (2010). A new chlorophyll d -containing cyanobacterium: evidence for niche adaptation in the genus *Acaryochloris*. *The ISME Journal*, 4(11), 1456–1469. <http://doi.org/10.1038/ismej.2010.67>
- Moliné, M., Flores, M. R., Libkind, D., Diéguez, M. D. C., Fariás, M. E., & van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(8), 1145–1151. <http://doi.org/10.1039/c0pp00009d>
- Muller, F. L., Song, W., Jang, Y. C., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(3), R1159–R1168. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00767.2006>
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139–148. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>
- Nagao, A. (2014). Bioavailability of dietary carotenoids: Intestinal absorption and metabolism. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 48(4), 385–391. <http://doi.org/10.6090/jarq.48.385>
- Nagao, A., Kotake-Nara, E., & Hase, M. (2013). Effects of fats and oils on the bioaccessibility of carotenoids and vitamin E in vegetables. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(5), 1055–1060. <http://doi.org/10.1271/bbb.130025>
- Nakagawa, T., & Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1745–1750. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00169-2](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00169-2)
- Pangestuti, R., & Kim, S.-K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 255–266. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>

- Pangestuti, R., Vo, T.-S., Ngo, D.-H., & Kim, S.-K. (2013). Fucoxanthin ameliorates inflammation and oxidative responses in microglia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(16), 3876–3883. <http://doi.org/10.1021/jf400015k>
- Patar, A. K., Bhan, S., & Syiem, D. (2016). Effect of chlorophyllin, a semi-synthetic chlorophyll molecule on hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin induced diabetic mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *8*(8), 293–296.
- Phan-Thi, H., Durand, P., Prost, M., Prost, E., & Waché, Y. (2016). Effect of heat-processing on the antioxidant and prooxidant activities of β -carotene from natural and synthetic origins on red blood cells. *Food Chemistry*, *190*, 1137–1144. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.088>
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, M. A. (2000). Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver pates. *Food Chemistry*, *68*(3), 353–357. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00205-8](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00205-8)
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, *26*(22), 3100–3112. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annual Review of Immunology*, *27*, 119–145. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, *55*(3), 207–216. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2007). Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, *52*, 237–292. [http://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52005-4](http://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52005-4)
- Reboul, E., Richelle, M., Perrot, E., Desmoulins-Malezet, C., Pirisi, V., & Borel, P. (2006). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(23), 8749–8755. <http://doi.org/10.1021/jf061818s>

- Reddy, V., Urooj, A., & Kumar, A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chemistry*, *90*(1–2), 317–321. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.038>
- Rimbau, V., Camins, a, Romay, C., González, R., & Pallàs, M. (1999). Protective effects of C-phycoyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, *276*(2), 75–78. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00792-2](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00792-2)
- Riss, J., Décordé, K., Sutra, T., Delage, M., Baccou, J.-C., Jouy, N., ... Rouanet, J.-M. (2007). Phycobiliprotein C-phycoyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7962–7967. <http://doi.org/10.1021/jf070529g>
- Romay, C., Armesto, J., Remirez, D., González, R., Ledon, N., & García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, *47*(1), 36–41. <http://doi.org/10.1007/s000110050256>
- Ross, A. C., Chen, Q., & Ma, Y. (2011). Vitamin A and retinoic acid in the regulation of B-cell development and antibody production. *Vitamins and Hormones*, *86*, 103–126. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386960-9.00005-8>
- Rossini, A. A., Like, A. A., Chick, W. L., Appel, M. C., & Cahill, G. F. (1977). Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(6), 2485–2489. <http://doi.org/10.1073/pnas.74.6.2485>
- Sakuraba, Y., Yokono, M., Akimoto, S., Tanaka, R., & Tanaka, A. (2010). Deregulated chlorophyll b synthesis reduces the energy transfer rate between photosynthetic pigments and induces photodamage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *51*(6), 1055–1065. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcq050>

- Saltiel, A. R. (2016). New therapeutic approaches for the treatment of obesity. *Science Translational Medicine*, 8(323). <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad1811>
- Sánchez, R., Pantoja-Uceda, D., Prieto, J., Diercks, T., Marcaida, M. J., Montoya, G., ... Blanco, F. J. (2010). Solution structure of human growth arrest and DNA damage 45alpha (Gadd45alpha) and its interactions with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Aurora A kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22196–22201. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.069344>
- Sathyasaikumar, K. V., Swapna, I., Reddy, P. V. B., Murthy, C. R. K., Roy, K. R., Dutta Gupta, A., ... Reddanna, P. (2007). Co-administration of C-Phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 252(1), 67–75. <http://doi.org/10.1016/j.jns.2006.10.014>
- Schliep, M., Cavigliasso, G., Quinnell, R. G., Stranger, R., & Larkum, A. W. D. (2013). Formyl group modification of chlorophyll a: A major evolutionary mechanism in oxygenic photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 36(3), 521–527. <http://doi.org/10.1111/pce.12000>
- Shanholtz, C. (2001). Acute life-threatening toxicity of cancer treatment. *Critical Care Clinics*, 17(3), 483–502. [http://doi.org/10.1016/S0749-0704\(05\)70196-2](http://doi.org/10.1016/S0749-0704(05)70196-2)
- Sharman, W. M., Allen, C. M., & van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, 4(11), 507–517. [http://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01412-9](http://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01412-9)
- Sies, Helmut; Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1315S–1321S.
- Singh, P., Konar, A., Kumar, A., Srivas, S., & Thakur, M. K. (2015). Hippocampal chromatin-modifying enzymes are pivotal for scopolamine-induced synaptic plasticity gene expression changes and memory impairment. *Journal of Neurochemistry*, 134(4), 642–651. <http://doi.org/10.1111/jnc.13171>

- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R., & Madamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 100–109. <http://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.100>
- Sonani, R. R., Singh, N. K., Kumar, J., Thakar, D., & Madamwar, D. (2014). Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochemistry*, 49(10), 1757–1766. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.022>
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (1996). Adipogenesis and obesity: Rounding out the big picture. *Cell*, 87(3), 377–389. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81359-8](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81359-8)
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351. [http://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](http://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Stahl, W., Van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., ... Astley, S. B. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1–3), 39–100. [http://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00016-X](http://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00016-X)
- Sugawara, T., Matsubara, K., Akagi, R., Mori, M., & Hirata, T. (2006). Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9805–9810. <http://doi.org/10.1021/jf062204q>
- Sun, L., Wang, S., Chen, L., & Gong, X. (2003). Promising fluorescent probes from phycobiliproteins. *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, 9(2), 177–188. <http://doi.org/10.1109/JSTQE.2003.812499>
- Sy, C., Gleize, B., Dangles, O., Landrier, J.-F., Veyrat, C. C., & Borel, P. (2012). Effects of physicochemical properties of carotenoids on their bioaccessibility, intestinal cell uptake, and blood and tissue concentrations. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(9), 1385–1397. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201200041>
- Tang, G., Qin, J., Dolnikowski, G. G., Russell, R. M., & Grusak, M. A. (2009). Golden Rice is an effective source of vitamin A. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6), 1776–1783. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27119>

- Teale, F. W. J., & Dale, R. E. (1970). Isolation and spectral characterization of phycobiliproteins. *The Biochemical Journal*, *116*(2), 161–169.
- Terry, M. J., Maines, M. D., & Lagarias, J. C. (1993). Inactivation of phytochrome- and phycobiliprotein-chromophore precursors by rat liver biliverdin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(35), 26099–26106.
- Thomas, J.-C., & Passaquet, C. (1999). Characterization of a phycoerythrin without α -subunits from a unicellular red alga. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(4), 2472–2482.
- Tsilidis, K. K., Papadimitriou, N., Capothanassi, D., Bamia, C., Benetou, V., Jenab, M., ... Trichopoulou, A. (2016). Burden of Cancer in a Large Consortium of Prospective Cohorts in Europe. *Journal of the National Cancer Institute*, *108*(10), 1–7. <http://doi.org/10.1093/jnci/djw127>
- Urikura, I., Sugawara, T., & Hirata, T. (2011). Protective effect of Fucoxanthin against UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *75*(4), 757–760. <http://doi.org/10.1271/bbb.110040>
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., & Capella, G. (2010). Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, *16*(1), 3–10. <http://doi.org/10.2174/138161210789941847>
- Vajda, F. J. E. (2002). Neuroprotection and neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, *9*(1), 4–8. <http://doi.org/10.1054/jocn.2001.1027>
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *266*(1–2), 37–56. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15646026>
- Van Belle, T., Coppieters, K. T., & Von Herrath, M. G. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiological Reviews*, *91*(1), 79–118. <http://doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>.

- Visscher, T. L., & Seidell, J. C. (2001). The Public Health Impact of Obesity. *Annual Review of Public Health*, 22(1), 355–375. <http://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.22.1.355>
- Wainwright, M. (2008). Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(3), 280–291. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18393787>
- Wang, T., Wang, Y., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Sato, Y., Mori, N., & Yamashita, H. (2008). Evodiamine Improves Diet-Induced Obesity in a Uncoupling Protein-1-Independent Manner: Involvement of Antiadipogenic Mechanism and Extracellularly Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Endocrinology*, 149(1), 358–366. <http://doi.org/10.1210/en.2007-0467>
- Yabuta, Y., Fujimura, H., Kwak, C. S., Enomoto, T., & Watanabe, F. (2010). Antioxidant Activity of the Phycoerythrobilin Compound Formed from a Dried Korean Purple Laver (*Porphyra* sp.) during in Vitro Digestion. *Food Science and Technology Research*, 16(4), 347–352. <http://doi.org/10.3136/fstr.16.347>
- Zhang, X.-H., Zhang, L.-J., Sun, J.-J., Yan, Y.-J., Zhang, L.-X., Chen, N., & Chen, Z.-L. (2016). Photodynamic efficiency of a chlorophyll-a derivative in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 265–272. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.007>
- Zhao, M., Sun, L., Sun, S., Gong, X., Fu, X., & Chen, M. (2015). Phycoerythrins in phycobilisomes from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73(1), 58–64. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.004>