

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DAS CIÊNCIAS DA
VIDA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARINA DELLA GIUSTINA

EFEITO DE EXTRATOS DA MACROALGA ANTÁRTICA *Palmaria*
***decipiens* SOBRE A LINHAGEM CELULAR TUMORAL DE CÂNCER**
COLORRETAL HCT-116 E NÃO TUMORAL HaCaT

CAXIAS DO SUL

2021

MARINA DELLA GIUSTINA

**EFEITO DE EXTRATOS DA MACROALGA ANTÁRTICA *Palmaria
decipiens* SOBRE A LINHAGEM CELULAR TUMORAL DE CÂNCER
COLORRETAL HCT-116 E NÃO TUMORAL HaCaT**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Roesch Ely
Co-orientador: Prof. Dr. João Antônio P. Henriques

CAXIAS DO SUL

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

D357e Della Giustina, Marina

Efeito de extratos da macroalga antártica *Palmaria decipiens* sobre a linhagem celular tumoral de câncer colorretal HCT-116 e não tumoral HaCaT [recurso eletrônico] / Marina Della Giustina. – 2021.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: Mariana Roesch Ely.

Coorientação: João Antônio Pêgas Henriques.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Cólon (Anatomia) - Câncer. 2. Algas. 3. Antioxidantes. 4. Biotecnologia. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Henriques, João Antônio Pêgas, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 616.348-006

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

**“EFEITO DE EXTRATOS DA MACROALGA ANTÁRTICA *Palmaria
decipiens* SOBRE A LINHAGEM CELULAR TUMORAL DE CÂNCER
COLORRETAL HCT-116 E NÃO TUMORAL HaCaT”**

Marina Della Giustina

Dissertação de mestrado submetido à Banca Examinadora designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Mestrado da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde e ao Meio Ambiente.
Linha de Pesquisa: Toxicidade e Danos Oxidativos

Caxias do Sul, 19 de novembro de 2021.

Profª Drª Mariana Roesch Ely (Orientadora)
Universidade de Caxias do Sul

Profª Drª Patrícia Dalla Santa
Centro Universitário da Serra Gaúcha

Profª Drª Miriam de Barcellos Falkenberg
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof Dr Sérgio Echeverrigaray
Universidade de Caxias do Sul

Aos meus pais, Idanira e Sergio,
minha irmã Rafaela, e ao meu companheiro,
Maurício, por todo apoio, suporte e incentivo
à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir vivenciar tantas experiências inovadoras, reforçando minhas escolhas profissionais e pessoais.

Agradeço também a todos que de alguma forma, contribuíram com a realização desta incrível etapa da minha vida:

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Mariana Roesch Ely. Deixo o meu muito obrigada pelo acolhimento no laboratório e orientação dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, por todo o conhecimento, pelas aulas e suporte ao laboratório.

Ao prof. Dr. Sidnei Moura, Prof. Dr. Sérgio Laguna Echevenrigaray e aos colegas Tainara Guizolfi e Fernando Scariot, pelo suporte em seus laboratórios.

À Universidade de Caxias do Sul e a CAPES, pela estrutura e financiamento da pesquisa.

À Vanessa Osaki e à Prof^a Dr^a Franciane M. Pellizari, pela disponibilidade, colaboração e experiência de trabalho com algas marinhas.

Aos os colegas de bancada e da iniciação científica pelas trocas, suporte e conhecimento, especialmente à Rafaele Frassini pela troca de experiências e conhecimentos compartilhados, minha profunda gratidão.

Agradeço especialmente a minha família, por todo o amor, incentivo e apoio incondicional dado a mim nesta trajetória. Vocês são as minhas maiores referências profissionais e pessoais, sempre me orientando a agir com ética e responsabilidade. Ao meu namorado Maurício, agradeço cada conselho, paciência e apoio que me foi dado ao longo deste período.

RESUMO

O câncer colorretal é a terceira neoplasia mais frequente no mundo, sendo uma importante causa de mortalidade. As macroalgas da Antártica são organismos produtores de substâncias com potenciais atividades terapêuticas em virtude das condições ambientais os quais estão expostos. A atividade antitumoral destes organismos já vem sendo investigada, evidenciando resultados citotóxicos promissores frente a linhagens celulares de câncer colorretal HCT-116. Até o momento, não há relatos que indiquem o potencial antitumoral de extratos da macroalga *Palmaria decipiens* contra tumores colorretais. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de macroalgas da Antártica *Palmaria decipiens* sobre a linhagem celular tumoral de câncer colorretal HCT-116 e linhagem não tumoral HaCaT. Os extratos foram obtidos por maceração, onde as amostras permaneceram em contato com o solvente e os compostos fenólicos presentes foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência. A ação antioxidante dos extratos foi determinada pelo método de inibição do radical DPPH. A citotoxicidade e viabilidade celular foram determinadas pelo ensaio MTT, e a morfologia celular foi avaliada por coloração de Giemsa. Os eventos de apoptose ou necrose celular foram identificados por coloração com laranja de acridina / brometo de etídeo (LA / BE) e citometria de fluxo. Foram obtidos três extratos a partir da macroalga *P. decipiens*: MET (metanol), CLO (clorofórmio) e HEX (hexano). A quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos identificou a presença de três compostos principais: ácido gálico, quercetina e canferol. O extrato MET foi o que apresentou resultados significantes de inibição da proliferação celular no tempo de 72 h de tratamento na linhagem HCT-116. Entretanto, os extratos não mostraram ação dose-resposta em células da linhagem HaCaT. O extrato MET apresentou potencial atividade antioxidante. O tratamento de 72 horas com extrato MET alterou morfológicamente a linhagem celular tumoral de câncer colorretal HCT-116, bem como afetou a proliferação celular. A exposição das células HCT-116 ao extrato MET de *P. decipiens* por 72h indicou a presença de eventos necróticos, frente ao teste de microscopia de fluorescência (LA / BE), citometria de fluxo (anexina-V / PI), ROS e MMP. O ensaio do ciclo celular não apresentou evidências significantes. Os resultados indicam que o extrato da macroalga antártica *P. decipiens* interfere nos mecanismos de ação das células tumorais de câncer colorretal, atuando como potencial agente antiproliferativo e antioxidante.

Palavras-chave: Macroalgas Antárticas, Atividade Antitumoral, Câncer Colorretal, Atividade Antioxidante

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third most frequent neoplasm in the world, being an important cause of mortality. Antarctica macroalgae are substances-producing organisms with potential therapeutic activities due to the environmental conditions to which they are exposed. The antitumor activity of these organisms has already been investigated, showing promising cytotoxic results against HCT-116 colorectal cancer cell lines. So far, there are no reports indicating the antitumor potential of extracts of the macroalga *Palmaria decipiens* against colorectal tumors. This study aimed to evaluate the effect of macroalgae extract from Antarctica *Palmaria decipiens* on colorectal cancer tumor cell line HCT-116 and non-tumor cell line HaCaT. The extracts were obtained by maceration, where the samples remained in contact with the solvent and the phenolic compounds present were identified by high performance liquid chromatography. The antioxidant action of the extracts was determined by the DPPH radical inhibition method. Cytotoxicity and cell viability were determined by the MTT assay, and cell morphology was assessed by Giemsa staining. Apoptosis or cell necrosis events were identified by staining with acridine orange / ethidium bromide (LA / BE) and flow cytometry. Three extracts were obtained from the macroalgae *P. decipiens*: MET (methanol), CLO (chloroform) and HEX (hexane). The quantification of phenolic compounds presents in the extracts identified the presence of three main compounds: gallic acid, quercetin and kaempferol. The MET extract was the one that showed significant results of cell proliferation inhibition within 72 h of treatment in the HCT-116 lineage. However, the extracts did not show dose-response action on HaCaT cells. The MET extract showed potential antioxidant activity. The 72-hour treatment with MET extract morphologically altered the colorectal cancer tumor cell line HCT-116, as well as affected cell proliferation. Exposure of HCT-116 cells to MET extract of *P. decipiens* for 72h indicated the presence of necrotic events, compared to fluorescence microscopy (LA / BE), flow cytometry (annexin-V / PI), ROS and MMP tests. The cell cycle assay did not show significant evidence. The results indicate that the extract of the Antarctic macroalgae *P. decipiens* interferes in the mechanisms of action of colorectal cancer tumor cells, acting as a potential antiproliferative and antioxidant agent.

Keywords: Antarctic seaweeds, antitumor activity, colorectal cancer, antioxidant activity

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1. Representação das diferenças entre tumores	16
Figura 2. Etapas envolvidas no processo de carcinogênese	17
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma	18
Figura 4. Disposição geográfica do continente antártico	22
Figura 5. Morfologia da macroalga <i>Palmaria decipiens</i>	23
Figura 6. Mapa da Ilha King George e a área de Potter Cove indicando maior população de algas <i>Palmaria decipiens</i>	27

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1. Estrutura química dos compostos fenólicos obtidos nos extratos de <i>P. decipiens</i> ..	42
Figure 2. Cell viability (%) of the HCT-116 colorectal cancer tumor line, exposed to three different extracts ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of the alga <i>P. decipiens</i> (HEX, CLO and MET).	43
Figure 3. Cell viability (%) of the HaCaT non-tumor cell line, exposed to three different extracts ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of the alga <i>P. decipiens</i> (HEX, CLO and MET).	45
Figure 4. Morphological changes of the HCT-116 cell line after 72 hours of treatment with the <i>P. decipiens</i> MET extract	46
Figure 5. Typical morphological changes in HCT-116 cells after seaweeds extracts treatment stained with AO/EB	46
Figure 6. <i>In vitro</i> wound healing assay changes of the HCT-116 cell line after treatment with the <i>P. decipiens</i> MET extract	48
Figure 7. Migration (μm) of HCT-116 cells after different time exposure to MET of <i>P. decipiens</i>	49
Figure 8. Annexin V/Propidium Iodide stain. (A) Control, HTC-116 cells without <i>P. decipiens</i> extract, incubated for 72h; (B) IC_{50} MET, HCT-116 cells exposed to MET extract of <i>P. decipiens</i> , incubated for 72h; (C) Percentage of cell population per sample	50
Figure 9 . Cytometric evaluation. (A) Intracellular ROS in HCT-116 cells after exposure of <i>P. decipiens</i> MET extract at IC_{50} concentration. (B) Cell membrane integrity of HCT-116 cells after treatment with MET extract of <i>P. decipiens</i> at IC_{50} concentration by cytometry	51
Figure 10. Percentage of cell cycle distribution of HCT-116 cells after treatment with methanolic extract of <i>P. decipiens</i> in the IC 50 contraction compared to control.	52

LISTA TABELAS

LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1. Compostos presentes em diferentes espécies de algas marinhas	26
Tabela 2. Macroalgas e efeitos de extratos e compostos em linhagens tumorais	29

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Major phenolic compound presents in the <i>P. decipiens</i> extracts by HPLC	41
Table 2. IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) of <i>P. decipiens</i> extracts against HCT-116 cell line.....	43
Table 3. IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) extracts of <i>P. decipiens</i> seaweeds against HaCaT cell line	44
Table 4. Antioxidant Activity (%) of MET extract	42
Table 5. Evaluation (µm) of migration of HCT-116 cells after exposure to MET of <i>P. decipiens</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Antioxidant Activity
AO /EB	Acridine Orange / Ethydio Bromide
CCR	Câncer Colorretal
CIMP	Fenótipo Metilador de Ilhas CpG
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLO	<i>P. decipiens</i> – clorofórmio
CRC	Colorectal Cancer
DCNT's	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DM	Diabetes Melitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium–high glucose
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FBS	Fetal Bovine Serum
HEX	<i>P. decipiens</i> – hexano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MET	<i>P. decipiens</i> – metanol
MMP	Mithochondrial Membrane Potencial
MMR	Mismatch Repair
MSI	Instabilidade de Microsatélite
MTT	Diphenyl Tetrazolium Bromide
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROS	Reactive Oxigen Species
WCRF	World Cancer Research Fund

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CONCEITOS PRELIMINARES SOBRE O CÂNCER EM GERAL: FOCO EM CÂNCER COLORRETAL	15
2.2	PATOGÊNESE MOLECULAR DO CÂNCER COLORRETAL	19
2.3	POTENCIAL DE ALGAS PLURICELULARES DA ANTÁRTICA.....	21
2.4	COMPOSTOS BIOATIVOS E EFEITO ANTITUMORAL DAS ALGAS.....	24
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	CAPÍTULO 1	32
5	DISCUSSÃO GERAL	59
6	CONCLUSÕES GERAIS	63
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo complexo, multifásico e que depende de fatores internos e externos para culminar no surgimento de células capazes de se multiplicar independentemente, formando metástases e invadindo tecidos. Apesar das particularidades de cada neoplasia, algumas características são comuns, como, por exemplo, as alterações genéticas e epigenéticas que originam clones celulares e adquirem vantagens para se proliferar, sobreviver, destruir e invadir tecidos. As instabilidades genéticas podem ser adquiridas mediante fatores ambientais, substâncias químicas, radiação, vírus, bem como através de defeitos genéticos ou epigenéticos (FILHO, 2011; KUMAR, 2013; AGUDELO, 2017).

Dentre todos os tipos de cânceres existentes, o câncer colorretal se destaca por sua relevância epidemiológica e associação ao estilo de vida e fatores alimentares da população. Estima-se que em 2020 tenha surgido em torno de 40.990 novos casos no Brasil, encontrando-se predominantemente nas regiões Sul e Sudeste. Apesar dos avanços terapêuticos nas últimas décadas, o câncer colorretal é a terceira neoplasia mais frequente no mundo, os índices de mortalidade permanecem em torno de 40% em países desenvolvidos e 55% nos países em desenvolvimento (SIMÕES, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2020).

Com base neste problema, somado à resistência celular às drogas antineoplásicas, pesquisas de novos compostos com propriedades antitumorais e efeitos colaterais reduzidos, como extratos de macroalgas, são importantes para fornecer alternativas para o tratamento do câncer colorretal (KUMAR, 2013; AGUDELO, 2017). Estudos com macroalgas da Antártica indicam que estes organismos concentram substâncias com potenciais atividades biológicas, como ações antivirais, anti-inflamatória, antifitofágica, antimicrobiana e citotóxicas, além de anticrustante e algicida (SEVAK et al., 2012; MARTINS et al., 2014; MOLES et al., 2014; NÚNEZ-PONZ&AVILA, 2014; MARINHO et al., 2017; SILVA FILHO, 2018).

A macroalga vermelha *Palmaria decipiens* se destaca por sua abundância no continente Antártico, suas particularidades vem sendo alvo de pesquisas para compreender os mecanismos de sobrevivência desenvolvidos pela espécie. A atividade antitumoral já vem sendo investigada em outras macroalgas, como *Iridea cordata*, *Cystosphaera jacquinotii* e *Desmarestia anceps*, evidenciando resultados citotóxicos bastante promissores contra linhagem tumoral de câncer colorretal HCT-116 (FRASSINI et al, 2019). No entanto, até o momento, não há relatos da atividade antitumoral de extratos da macroalga *Palmaria decipiens* contra tumores colorretais. Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do extrato

da macroalga Antártica *Palmaria decipiens* sobre a linhagem tumoral de câncer colorretal HCT-116 e não tumoral HaCaT, bem como identificar potenciais propriedades antitumorais e antioxidantes presentes neste organismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONCEITOS PRELIMINARES SOBRE O CÂNCER EM GERAL: FOCO EM CÂNCER COLORRETAL

O câncer é uma desordem genética causada por alterações na expressão ou função de genes-chave que regulam processos celulares fundamentais. O acúmulo de mutações origina as características do câncer, como a autossuficiência nos sinais de crescimento, ausência de resposta aos sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular, potencial replicativo, desenvolvimento de angiogênese, capacidade de invadir tecidos, disseminação para locais distantes e reprogramação de vias metabólicas (HANAHAN & WEINGERG, 2011; KUMAR, 2013).

As células tumorais são diferenciadas e, acabam por perder funções específicas das células de origem, podendo adquirir outras funções não existentes nas células normais (FILHO, 2011). As características das células tumorais variam conforme suas particularidades, em processos avançados é possível identificar que as células cancerosas são mais volumosas que as normais, especialmente pelo aumento do núcleo, podendo também haver células bi ou multinucleadas. Ademais, anomalias cromossômicas são comuns, além de alterações no citoplasma, volume e forma das células (JUNQUEIRA, 2012).

Em células saudáveis, quanto mais avançado é o estado de diferenciação celular, mais baixa é a sua taxa de duplicação. Já nas neoplasias, o que predomina é uma proliferação celular, ocorrendo o aumento da multiplicação e perda da diferenciação celular, tornando-as atípicas. Quando isso ocorre, as células neoplásicas sofrem alterações em seus mecanismos regulatórios de multiplicação, adquirindo autonomia de crescimento e não respondendo aos estímulos fisiológicos (FILHO, 2011; AGUDELO, 2017).

Comumente conhecidos como tumores, as neoplasias possuem duas grandes categorias, os benignos e os malignos, conforme apresentado na Figura 1. As neoplasias benignas não oferecem risco ao paciente e geralmente não são letais, costumam apresentar características localizadas, de cunho tratável e cirurgicamente removível (FILHO, 2011). Já as neoplasias malignas, referidas também como câncer, têm a tendência a invadir e destruir estruturas adjacentes e disseminar-se a locais distantes, além disso, possuem crescimento rápido podendo levar o indivíduo rapidamente à morte (KUMAR, 2013). As neoplasias, tanto benigna quanto malignas, possuem dois componentes básicos, o parênquima e o estroma. O

parênquima determina o comportamento biológico, enquanto o estroma dá suporte para o crescimento da neoplasia (PEREZ, 2014). Características neoplásicas podem indicar quando são benignas ou malignas, sendo as principais a diferenciação e anaplasia, velocidade de crescimento, invasão local e metástase (Figura 1) (KUMAR, 2013). O estroma é constituído de tecido conectivo, vasos sanguíneos e células inflamatórias.

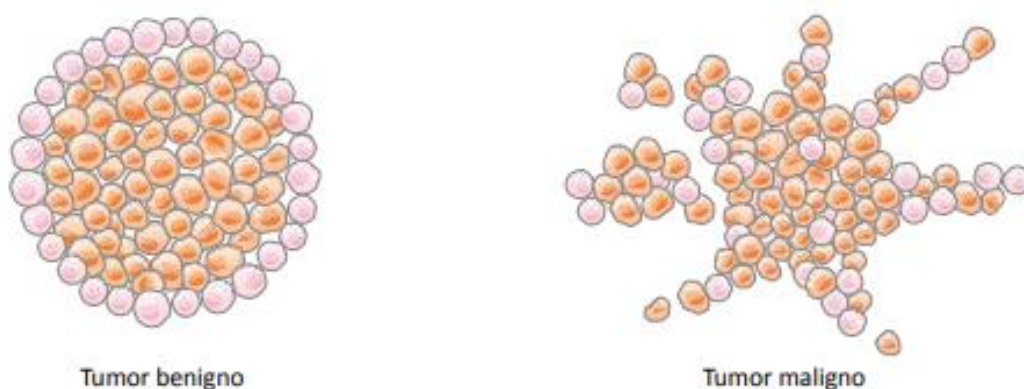


Figura 1. Representação das diferenças entre tumores. A) Tumor benigno: células mutadas (rosa) envolvendo um grupo de células normais (laranja); B) Tumor maligno: células mutadas (rosa) misturando-se com células normais (laranja). (Fonte: INCA, 2011).

A multiplicação de células cancerígenas ocorre fora do controle normal do organismo, variando a velocidade de crescimento, podendo evoluir lentamente e, em dado momento, passando a crescer rapidamente (PEREZ, 2014). Devido à sua menor aderência e modificação de citoesqueleto, as células cancerosas possuem motilidade, podendo deslocar-se e infiltrar-se em tecidos vizinhos. Além disso, estas células induzem à formação de novos vasos sanguíneos, necessários para o seu desenvolvimento (FILHO, 2011; JUNQUEIRA, 2012).

A carcinogênese é um processo complexo, multifásico e que depende de fatores genéticos que culminam no surgimento de células que possuem a capacidade de se multiplicar independentemente, invadir tecidos e formar metástases (FILHO, 2011). Apesar das particularidades de cada neoplasia, algumas características são comuns, como, por exemplo, as alterações genéticas e epigenéticas originam clones celulares que adquirem vantagens de se proliferar, sobreviver, destruir e invadir tecidos (Figura 2) (KUMAR, 2013). O dano genético pode ser causado por agentes ambientais, substâncias químicas, radiação, vírus ou hereditariedade (AGUDELO, 2017).

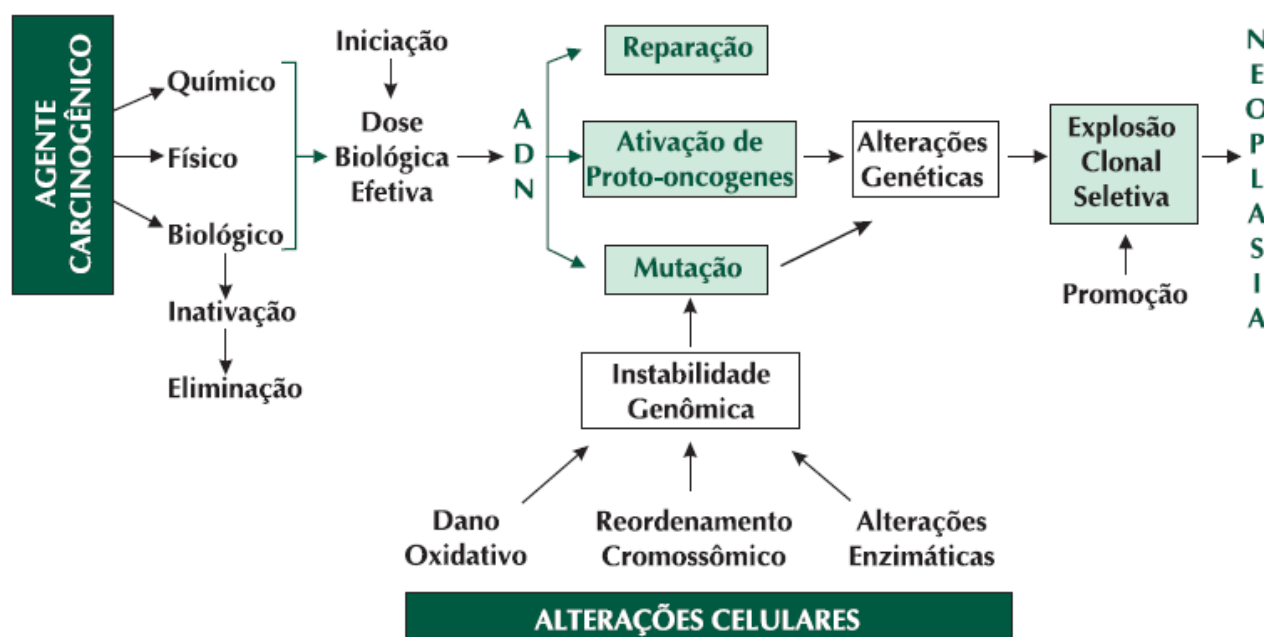




Figura 2. Etapas envolvidas no processo de carcinogênese. (Fonte: INCA, 2011).

A incidência e a mortalidade causada pelo câncer vêm aumentando no mundo. Isso se deve, em parte, pelo envelhecimento e crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY et al., 2018). De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, o câncer foi considerado uma das principais causas de morte antes dos 70 anos em 91 de 172 países. A mais recente estimativa mundial aponta que ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer no mundo e 9,6 milhões de óbitos. O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão) (VILLANUEVA-PAJARO, 2020).

O Câncer Colorretal (CRC) é a terceira neoplasia mais frequente no mundo. No Brasil estima-se que, para cada ano do triênio de 2020-2022, sejam reportados 20.520 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 novos casos em mulheres (Figura 3). Esses indicadores correspondem a um risco estimado de 19,63 novos casos a cada 100 mil homens e 19,03 novos casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2019). Embora a mortalidade por câncer de cólon tenha diminuído em 51% em relação a 1976, esta condição continua sendo uma importante causa de mortalidade e corresponde à terceira causa de morte por câncer em homens e a segunda em mulheres (INCA, 2019).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%
			Mulheres				

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. (Fonte: INCA, 2019).

A sobrevida para pacientes com câncer colorretal que apresentam metástase hepática é 10% menor, quando comparado a pacientes com a mesma enfermidade que realizaram ressecção oncológica e alcançaram margens negativas para malignidade (DÁVILA, 2017). O fígado é o seu principal local de metástase, pois a drenagem venosa do cólon flui diretamente para este órgão. No momento do diagnóstico, 25% dos pacientes com câncer colorretal têm metástases hepáticas e, um terço dos que não possuem, desenvolvem nos próximos três anos (DÁVILA, 2017).

Sabe-se que até 20% de todos os cânceres podem estar relacionados com sobrepeso e obesidade, incluindo-se nestes o carcinoma do endométrio, adenocarcinoma esofágico, carcinoma renal, leucemia, mieloma múltiplo, carcinoma pancreático, linfoma não-Hodgkin, carcinoma do ovário, da mama pós-menopausa e carcinoma colorretal (AGUDELO, 2017). As taxas de incidência de carcinoma colorretal variam consideravelmente em todo o mundo, sendo as mais elevadas observadas na Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte e as mais baixas na África e Ásia Central e do Sul (SIMÕES, 2017).

A associação entre a obesidade e o carcinoma colorretal tem sido alvo de um interesse crescente nos últimos anos, a importância da compreensão desta associação tem relevância no rastreio, na prevenção e no tratamento destes tumores. Em 2001, a *International Agency for Research into Cancer* (IARC) reconheceu o carcinoma colorretal como sendo uma das neoplasias malignas associadas à obesidade, e em 2007 o relatório do *World Cancer Research Fund* (WCRF) concluiu haver evidência suficiente para considerar a gordura corporal como fator de risco para o carcinoma colorretal. Neste relatório também foi sugerido que a associação entre o Índice de Massa Corporal e o risco neoplásico poderia diferir entre o carcinoma do cólon e reto e consoante de gênero (SIMÕES, 2017).

Estudos apresentam evidências epidemiológicas de que concentrações elevadas de insulina, de peptídeo C, assim como a diabetes melitus tipo 2 (DM tipo 2) e a carga glicêmica dietética, estão associadas com um risco aumentado de carcinoma colorretal (MILEK et al., 2019; OVERBEEK et al., 2019; VILLANUEVA-PAJARO, 2020). Outros trabalhos atribuem importância à associação entre o tecido adiposo e às adipocinas por ele produzidas, denominadas leptina e adiponectina como fator de risco para o desenvolvimento do CRC. Os adipócitos e pré-adipócitos por si têm-se mostrado capazes de promover a proliferação de várias linhagens celulares tumorais no carcinoma do cólon, numa via em parte regulada pela leptina, mas não completamente dependente desta (KAAKS, 2000; MICHAUD, 2005). Este risco é, na maioria dos estudos, maior para o gênero masculino, e para o carcinoma do cólon comparativamente ao reto (OVERBEEK et al., 2019).

Pessoas com mais de 50 anos têm um risco aumentado em 5% de desenvolver câncer colorretal, um risco que se eleva para 10 ou 15% em pessoas com histórico de pólipos, doença inflamatória intestinal ou história familiar de câncer colorretal. Sabe-se que a progressão das lesões malignas decorre da interação entre os diferentes fatores de risco, como o ambiental, alimentar, familiar e hereditário, que se tornam relevantes durante os diferentes estágios da carcinogênese colorretal (AGUDELO, 2017).

2.2 PATOGÊNESE MOLECULAR DO CÂNCER COLORRETAL

Segundo o modelo genético descrito por Fearon e Vogelstein, a evolução do câncer colorretal segue a sequência adenoma-adenocarcinoma, que é impulsionada pelo acúmulo progressivo de uma série de mutações (YAMANE, 2014). Os eventos envolvem etapas de oncogenes e genes supressores de tumor, sendo que o pólipo adenomatoso é o principal precursor do câncer colorretal. Desde então houve avanços consideráveis na compreensão da carcinogênese colorretal, diferentes instabilidades genômicas e epigenômicas foram descritas. Acredita-se que instabilidade de microssatélites (MSI), fenótipo de metilação e hipometilação global de DNA são responsáveis por 85% dos casos de câncer colorretal (YIU, 2016).

Possivelmente quase todos os CRCs se desenvolvam a partir de adenomas preexistentes. Este processo é caracterizado por alteração genética e epigenética, transformando células normais em células cancerosas. As alterações epigenéticas incluem metilação de DNA, modificações de histonas e regulação gênica pós-transcricional por meio de RNAs não

codificantes e são parte da função e atividade celular normal. O distúrbio desses mecanismos epigenéticos pode levar à formação de câncer. (KANG, 2011; YIU, 2016).

A metilação do DNA geralmente atua para suprimir a transcrição do gene. No CRC, a metilação aberrante do DNA está envolvida em muitos genes, por exemplo, genes de reparo de incompatibilidade de DNA, genes da via de sinalização WNT e genes reguladores de ciclos celulares. Um subgrupo de câncer colorretal com extensos genes metilados é conhecido como CIMP + (YIU, 2016).

No entanto, os carcinomas CIMP + não surgem de adenomas convencionais, como adenoma tubular, adenoma túbulo-viloso e adenoma viloso, mas se desenvolvem de adenomas sésseis ou serrilhados tradicionais. As investigações têm se concentrado na detecção de marcadores moleculares de KRAS, TP53, APC mutantes e marcadores de instabilidade de microssatélites (MSI) (KANG, 2011; LECH, 2016; SIMON, 2016).

As tentativas de identificar marcadores moleculares a partir de testes genéticos, são úteis para personalizar a quimioterapia com base em biomarcadores específicos. Os principais marcadores identificados ao longo dos últimos anos, continuam a ser examinados para melhorar as perspectivas futuras em prol do paciente. A instabilidade de microssatélites (*Microsatellite Instability* - MSI) é causada pela interrupção dos genes de reparo do DNA, podendo resultar em replicação desigual de sequências repetitivas de DNA em regiões curtas e não codificantes (microssatélites) e maior suscetibilidade a mutações genéticas adicionais. A mutação no gene supressor de tumor p53 ocorre em 50% -70% de todos os CRC e está associada a piores resultados, incluindo sobrevida livre de doença e sobrevida geral (LECH, 2016; SIMON, 2016)

Os estudos demonstram em um melhor entendimento do CRC e auxiliam no desenvolvimento de novos esquemas de tratamento, especialmente em estágios avançados da doença. Os novos fatores preditivos, imagens moleculares ou mesmo testes de genoma comerciais facilitam cada vez mais o teste do genoma tumoral e auxiliam na seleção de terapias direcionadas. A terapia com anticorpos específicos é necessária em pacientes com CRC avançado (LECH, 2016).

O fato de cada subtipo molecular de CRCs ter sua própria lesão precursora indica que as vias moleculares são determinadas em um estágio evolutivo inicial e já estão totalmente estabelecidas dentro das lesões precursoras. A possibilidade de fornecimento de um diagnóstico de tecido preciso, para disponibilizar informações de prognóstico e descobertas adicionais relevantes para o manejo do paciente, são essenciais para determinar estratégias de

prevenção, prognóstico do paciente e impacto (KANG, 2011; YAMANE, 2014; THANIKACHALAM, 2019)

2.3 POTENCIAL DE ALGAS PLURICELULARES DA ANTÁRTICA

O Continente Antártico possui papel essencial nos sistemas naturais globais, sendo o principal regulador térmico do planeta, controlando as circulações atmosféricas e oceânicas, intervindo diretamente nas condições climáticas e de vida da Terra. O continente detém as maiores reservas de gelo (90%) e de água doce (70%) do planeta, sem calcular os recursos minerais e energéticos presentes neste espaço. Este ambiente é protegido por um tratado o qual resguarda esta reserva natural, impedindo que esta região torne-se parte exclusiva de qualquer país, preservando a paz e sua biodiversidade natural. Atualmente a Antártica é compreendida como todas as regiões que estão ao sul do paralelo 60° Sul (MARINHA DO BRASIL, 2018; SILVA FILHO, 2018).

O continente conta com cerca de 14 milhões de km², porém, durante o período do inverno, em função do congelamento dos mares e do acúmulo de neve precipitada, seu território alcança quase 18 milhões de km² (Figura 4). A separação dos demais continentes faz desta a mais isolada região do planeta, porém está presente no local uma das mais abundantes comunidades biológicas do planeta (MARINHA DO BRASIL, 2018).

Por conta de todas as características físicas do local, os organismos habitantes possuem particularidades únicas, sendo adaptáveis a ambientes de vida extrema. A variação de temperaturas encontra-se entre -16 °C e -89 °C e nas ilhas próximas à península, variam entre 5 °C e -25°C. Este é um ambiente seco, em que a velocidade média anual do vento é de 20 m/s. As estações do ano, inverno e verão, são quem determina o fotoperíodo do local, sendo 5h de claridade no inverno e 20h de claridade no verão. Devido à localização do continente, que está situada sob uma falha na camada de ozônio, os níveis de radiação ultravioleta são altamente elevados (SILVA FILHO, 2018).

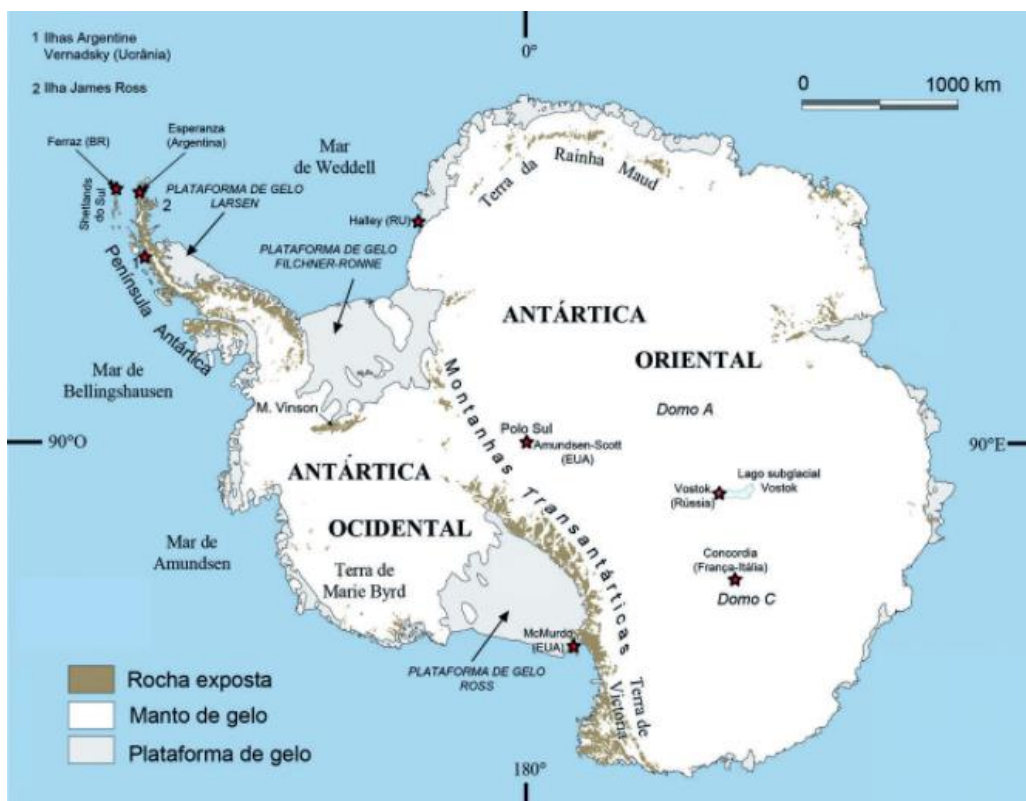


Figura 4. Disposição geográfica do continente antártico. (Fonte: Divulgação/Nasa/NSIDC).

O metabolismo primário das plantas tem como objetivo a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies, entre os quais estão proteínas, carboidratos, ácidos graxos, polissacarídeos e a clorofila, produzidos por meio da fotossíntese. Por outro lado, os "metabólitos secundários" são compostos químicos sintetizados em concentrações variáveis, de acordo com necessidades específicas do organismo, podendo ser utilizados como mecanismos de defesa. Estes estão distribuídos em diferentes grupos como: óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, esteróides, fenóis, flavonóides, glicosídeos, pectinas, quinonas, saponinas, taninos e terpenos, entre outros (PAUMIER et al. 2018; VERDECÍA, 2021).

As formas de vida presentes neste ambiente expressam variações de forma, tamanho, linhagens, metabolismo e estrutura celular. As macroalgas crescem fixando-se em rochas e em habitats litorâneos. Habitualmente crescem em águas costeiras rasas, bem como em áreas de mar profundo até uma profundidade de 180m, sendo comumente encontradas em uma variedade de habitats aquáticos. Estes organismos são categorizados com base em seu conteúdo pigmentoso, características morfológicas e anatômicas em três classes: algas vermelhas (*Rhodophyceae*), algas marrons (*Phaeophyceae*) e algas verdes (*Chlorophyceae*). Estas espécies são majoritariamente fotossintéticas, as quais produzem oxigênio e estão

comumente presentes no ambiente aquático (SILVA FILHO, 2018; ISMAIL, 2019; KHALID, 2018).

Há uma diversidade de espécies de macroalgas presentes no continente Antártico, proporcionou a elas um aumento na capacidade adaptativa ao meio, favorecendo o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra as ações físicas do meio ambiente, como tempos prolongados de escuridão, maior índice de radiação UV, baixas temperaturas, entre outros. A quantidade ilimitada de nutrientes presentes no meio favorece o desenvolvimento desses organismos e a biomassa gerada desempenha um papel fundamental, pois contribui para a produção de quantidades significativas de carbono e como fonte de alimento para uma variedade de espécies da fauna marinha (GOMEZ et al, 2009; SILVA FILHO, 2018).

Dentre a flora ficológica, a espécie *Palmaria decipiens* destaca-se pela abundância. A Ordem *Palmariales*, é um dos grupos mais relevantes em termos de algas, estes organismos são caracterizados por possuírem um talo de até 70 cm de comprimento, de cor avermelhada a púrpura e com uma superfície brilhante e escorregadia (Figura 5). Trata-se de uma espécie cujo período de crescimento ocorre principalmente no final do inverno e início da primavera, ou seja, de outubro a dezembro. O seu intervalo de crescimento coincide com o período de maior incidência de luz, na primavera, sendo esta considerada uma característica de adaptação da alga às sazonalidades da Antártica. O local onde há maior presença da *P. decipiens* é na Ilha Macquarie, onde as temperaturas da água variam de 5 a 8°C, coincidindo com a temperatura máxima de crescimento das algas desta espécie (RICKER, 1987; BECKER et al, 2011).



Figura 5. Macroalga *Palmaria decipiens*. (Fonte: Becker, 2011).

As algas deste grupo se estabeleceram recentemente como uma fonte potencial de compostos com valor nutricional agregado e potenciais atividades terapêuticas. Comumente encontradas na França, Irlanda, Canadá e Islândia, espécies da Ordem *Palmariales* são habitualmente cultivadas para alimentação humana, sendo a espécie *Palmaria palmata* a mais comum. Tal alimento é fornecido a população agregando importante valor nutricional aos consumidores do produto, sendo fonte de fibras, vitaminas, minerais, lipídeos e proteínas. Sabe-se que em média são colhidas e consumidas cerca de 103 toneladas do alimento seco. Estudos evidenciaram que há diversos compostos nestes organismos, e que os mesmos podem ser utilizados como novos alimentos funcionais por proporcionarem benefícios à saúde. Neste contexto, torna-se visível a importância da investigação das propriedades nutricionais, fisiológicas e ecológicas que a espécie *P. decipiens* pode fornecer (BECKER et al, 2011; KHALID, 2018).

2.4 COMPOSTOS BIOATIVOS E EFEITO ANTITUMORAL DAS ALGAS

Embora a vida terrestre seja extraordinariamente diversa, uma maior biodiversidade é encontrada nos oceanos. Cobrindo mais de 70% da superfície terrestre, os oceanos abrigam uma extraordinária diversidade de formas de vida, com grandes potencialidades biológicas (MARTINS, 2018). A exposição destes organismos às adversidades presentes no continente antártico, como radiação ultravioleta, baixas temperaturas e variações de metais pesados, desencadearam mecanismos de produção gradual e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), além disso, como mecanismos de defesa os organismos marinhos produzem compostos bioativos fitoquímicos, como flavonoides, esteroides, taninos, carotenoides, entre outros (BAKER, 2019).

As algas são a base da cadeia alimentar marinha, proporcionando diversos nutrientes, como proteínas, vitaminas, aminoácidos, minerais e polissacarídeos, aos organismos que os consomem (SANTOS, 2017). São organismos primitivos, predominantemente aquáticos e autotróficos, com alta capacidade de sintetizar clorofila e carotenoides, possuem relevante importância para o equilíbrio da atmosfera terrestre ao fornecer oxigênio para o ambiente (JIBRIL et al, 2016). Os principais minerais identificados são iodo, magnésio, ferro, zinco e cálcio, assim como lipídios, fibras e vitaminas também são encontrados (GUTIERREZ-RODRIGUEZ, 2018). Entretanto, dependendo das condições sazonais e da área geográfica,

podem existir diferenças no conteúdo bioquímicos, como proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais das macroalgas (KHALID, 2018).

As macroalgas vermelhas são um grupo de organismos eucarióticos primitivos que apresentam variações em sua morfologia e distribuição (DENG, 2020). A cor vermelha das *Rhodophyceae* ocorre devido a predominância dos pigmentos ficoeritrina e ficocianina sobre os demais pigmentos, como clorofila, caroteno e xantofilas. Além disso, as algas vermelhas presentes na Antártica contêm concentração abundante de metabólitos secundários e seus derivados halogenados (KHALID, 2018).

Estas algas são fontes de folato, cujo o termo geral inclui ácido fólico e conjugados de poliglutamil. Os folatos apresentam uma diversidade de compostos que se alteram de acordo com o estresse oxidativo e o número de resíduos de glutamato conjugado com o mesmo. Essas vitaminas são cofatores essenciais para a síntese de purinas e pirimidinas, além de participarem da produção de metionina de homocisteína (QUIRÓS, 2004).

Os polissacarídeos são compostos naturais cuja abundância nas algas marinhas varia de 4% a 76% do peso seco. Estes são encontrados no espaço intracelular e nas paredes das células fibrilares das macroalgas, sendo responsáveis pelo alto nível de minerais e oligoelementos de superfície celular, devido à retenção de substâncias marinhas inorgânicas (GUTIERREZ-RODRIGUEZ, 2018). As *Rhodophytas* sintetizam polissacarídeos sulfatados, podendo conter fucose, como o fucoidanos ou galactanos que são compostos de galactose ou unidades de galactose modificadas. Certas algas vermelhas, possuem polissacarídeo específicos de acordo com a sua espécie como ágar, carragena, xilana e floridéia (KHALID, 2018).

As algas vermelhas não possuem um perfil carotenoide único, podendo ser classificados em três tipos diferentes de acordo com seus constituintes carotenoides. O tipo zeaxantina contém as espécies unicelulares mais simples, como *Cyanidioschyzon merolae*, que sintetiza apenas β -caroteno e zeaxantina, semelhante a cianobactérias. As algas vermelhas do tipo de ciclo de xantofila acumulam β -caroteno, zeaxantina e outras xantofilas oxigenadas, mas muito raramente luteína. A maioria das algas vermelhas, incluindo a ordem macrofítica mais primitiva *Bangiiales*, pertencem ao tipo luteína que sintetizam luteína, juntamente com β -caroteno e suas xantofilas derivadas (DENG, 2020). Alguns dos compostos presentes em diferentes espécies de algas marinhas estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos presentes em diferentes espécies de algas marinhas.

Alga	Composto	Referência
<i>Undaria pinnatifida</i>	Fucoxantina	<i>Yan et al, 1999</i>
<i>Porphyra sp.</i>	Ficoeritrobilina	<i>Yabuta et al, 2010</i>
<i>Phaeophyceae</i>	Fucoidanos sulfatados	<i>Chevolot et al, 1999</i>
<i>Rhodophyceae</i>	Galactanos sulfatados	<i>Kolender et al, 1997</i>
<i>Codium fragile</i>	Xiloarabinogalactanos	<i>Jurd et al, 1995</i>
<i>Codium cylindricum</i>	Galactano sulfatado	<i>Matsubara, 2004</i>
<i>Sargassum thunbergii</i>	Florotaninos	<i>Bae, 2011</i>
<i>Saccharina japônica</i>	Fuciudanos	<i>Shibata et al, 2002</i>
<i>Eisenia bicyclis</i>	Floroglucinol	<i>Shibata et al, 2002</i>
<i>Taonamaria atomaria</i>	Stypoldione	<i>Mayer, 2000</i>
<i>Schizymenia dubyi</i>	Glucuronogalactan sulfatado	<i>Bourgougnon et al, 1996</i>
<i>Lobophora variegata</i>	Fucanos	<i>Park et al, 2011</i>
<i>Ecklonia cava</i>	Florotanino 6,6'-bieckol	<i>Yang, 2009</i>

Fonte: Adaptado de Khalid, 2018.

Palmaria decipiens (Palmariales, Florideophyceae) é uma macroalga vermelha presente na Antártica que aparece em maior abundância. Sua morfologia é semelhante à espécie *Palmaria palmata*, porém seus potenciais podem ser distintos, exigindo estudos complementares. Mudanças sazonais na quantidade e nas proporções de ficobiliproteínas em *P. decipiens* refletem um alta potencial dos processos de aclimação às mudanças ambientais em condições de luz (LUDER, 2001). Temperaturas entre 0 e 10 ° C são ideais para estimular crescimento e desenvolvimento desta espécie (SANTOS, 2017). Estudos de Kloëser et al. (1993, 1996) indicaram alta prevalência da macroalga *P. decipiens* em áreas intertidais de Potter Cove na Ilha King George. Podendo ser encontradas em profundidades que atingem 30 m, em substrato rígido, estas algas localizam-se diretamente abaixo da base da geleira no lado oeste da baía (Figura 6). Nessas áreas, a espécie *P. decipiens* pode formar povoamentos densos, especialmente após a ruptura da comunidade através da limpeza do gelo e exclusão subsequente de espécies competidoras (KLOËSER et al. 1993 e 1996; BECKER, 2011).

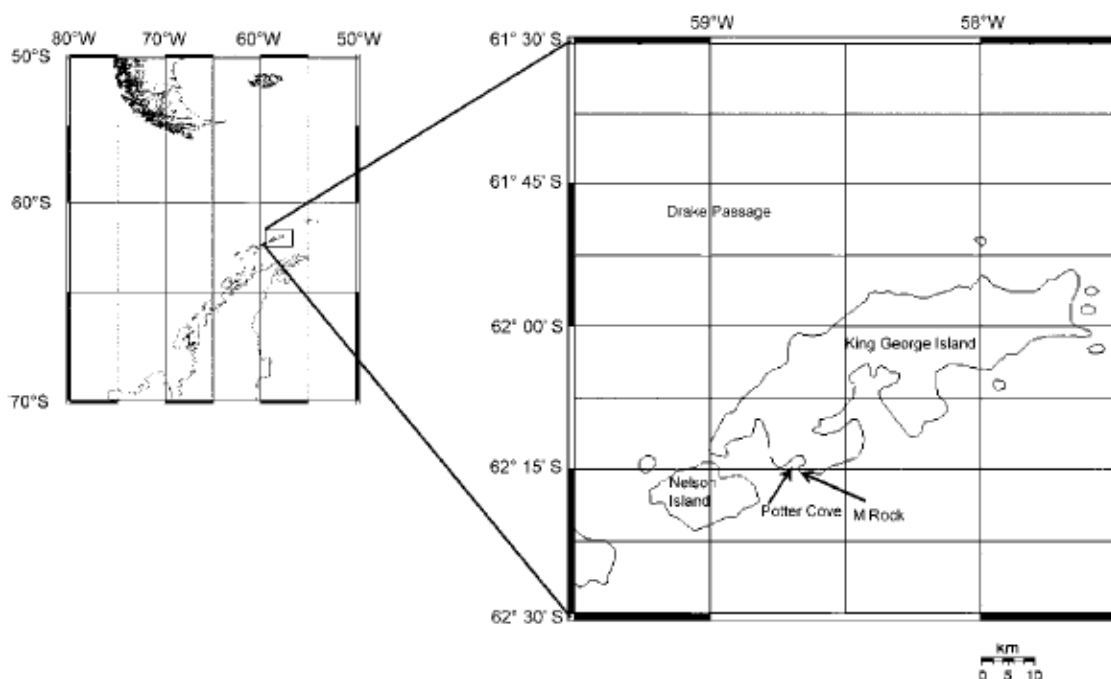


Figura 6. Mapa da Ilha King George e a área de Potter Cove indicando maior população de algas *Palmaria decipiens* (Fonte: Adaptado de Becker, 2011).

Banskota et al (2014) reportou atividade anti-inflamatória significativa na espécie *Palmaria palmata*, podendo estar associada a alta da concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e sua relação ômega 6 / ômega 3 favoravelmente baixa (BANSKOTA et al, 2014). Ainda, resultados significantes quanto a sua atividade hipolipemiante alterando favoravelmente os perfis lipídicos em modelos animais também foram reportados (ALLSOPP, 2016). Esta macroalga vermelha comestível, também é encontrada nas águas costeiras do Atlântico Norte. Seu conteúdo lipídico é considerado baixo (0,3-3,8% do peso seco) e erroneamente desvalorizado, já que são facilmente assimilados pelo corpo humano e possuem um alto teor de ácido eicosapentaenóico (EPA), importante na prevenção de doenças não transmissíveis (DCNT). Tal espécie foi associada com potenciais propriedades bioativas, como antitumoral, anti-inflamatório, antimicrobiano e antiviral (LOPES, 2019).

A escolha do solvente pode interferir na determinação de antioxidantes presentes nas macroalgas, pois a polaridade dos compostos pode favorecer ou não a extração dos constituintes do organismo. Estudos têm relatado que constituintes hidrofílicos são utilizados para a extração de compostos antioxidantes em espécies de algas marinhas. (YUAN et al., 2005; SARIKURKCU et al, 2009; O'SULLIVAN et al, 2011). Solventes polares, como água, metanol ou etanol, apresentaram maior potencial de captura de radicais livres (ALVAREZ-

GÓMEZ, 2016). Há uma diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante total de extratos obtidos de macroalgas (MIRANDA-DELGADO, 2018). O método de varredura do radical livre estável DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) é considerado fácil, altamente sensível, rápido e econômico, foi desenvolvido por Blois (1958) para determinar a atividade antioxidante de substâncias utilizando um radical livre estável (OLIVEIRA, 2015).

A extração de diferentes compostos ativos presentes na biomassa de macroalgas não é seletiva, variado conforme técnicas utilizadas. Os fatores que influenciam a composição e a atividade dos extratos de algas dependem da espécie, das condições ambientais, da estação do ano, da idade, da localização geográfica e das tecnologias de processamento (KADAM et al. 2013; ALLSOPP, 2016).

Devido ao aumento da incidência de câncer, o uso de novas moléculas como quimioterápicos é necessária para prevenir ou suprimir a progressão de cânceres invasivos. As algas marinhas são amplamente utilizadas como alimentos funcionais e ervas medicinais há séculos, os compostos bioativos presentes nestes organismos incentivam as pesquisas com algas marrons, verdes e vermelhas quanto às suas atividades antitumorais (MOUSSAVOU, 2014).

Nas últimas décadas, as macroalgas vêm sendo investigadas quanto as suas atividades biológicas, destacando-se a anticâncer. Sabe-se que a dieta pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal, ou pode contribuir para a sua prevenção, quando balanceada (SANTOS, 2017). A identificação de componentes alimentares que previnem o processo de carcinogênese pode contribuir para a identificação de agentes bioativos efetivos contra o carcinoma de cólon e reto. Vários estudos reportaram o potencial anticâncer de compostos de macroalgas contra linhagens tumorais de carcinomas, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Macroalgas e efeitos de extratos e compostos em linhagens tumorais.

Alga	Natureza	Câncer colorretal	Câncer de mama	Outros cânceres	Elemento terapêutico	IC50	Referência
<i>Fucus</i> sp.	Marrom	+	+	-	Fucoidan	5 - 20 µg/mL	<i>Kim et al, 2010</i>
<i>Styodidium</i> sp.	Marrom	+	-	+	Meroditerpenoides	12,2 µM e 14 µM	<i>Pereira et al, 2011</i>
<i>Sargassum muticum</i>	Marrom	-	+	-	Polifenol	0,2 µg/mL	<i>Namvar et al, 2013</i>
<i>Ulva fasciata</i>	Verde	-	-	+	Flavonoides	200 µg/mL	<i>Ruy et al, 2013</i>
<i>Laminaria</i> sp.	Marrom	+	-	-	Laminarina		<i>Park et al, 2012;2013</i>
<i>Laurencia</i> sp.	Vermelha	+	-	-	Dactylone	45,4 µmol/L	<i>Federov et al, 2007</i>
<i>Ishige okamurae</i> e <i>Phoma herbarum</i>	Vermelha	-	-	+	Extratos etanólicos		<i>Kim et al, 2009</i>
<i>Lithothamnion</i> sp.	Vermelha	+	-	-	Cellfood*		<i>Aslam et al, 2009</i>
<i>Porphyra dentata</i>	Vermelha	-	+	-	Frações esteróis	48,3 µg/mL 19,82 µM e	<i>Kaslovska et al, 2013</i>
<i>Cymopolia barbata</i>	Verde	-	+	-	Inibidores CYP1	55,65 µM	<i>Badal et al, 2013</i>
<i>Lophocladia</i> sp.	Vermelha	-	+	-	Lophocladines	3,1 µM e 64,6 µM	<i>Gross, 2006</i>
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Marrom	-	+	-	Fucoidan		<i>Pavia et al, 1996</i>
<i>Gracilaria termistipitata</i>	Vermelha	-	-	+	Extratos metanólicos		<i>Ji et al, 2012</i>
<i>Enteromorpha intestinalis</i> e <i>Rizoclonium riparium</i>	Verde	-	-	+	Extratos metanólicos	309,5 µg/mL e 506,08 µg/mL	<i>Paul et al, 2013</i>
<i>Undaria pinnatifida</i>	Marrom	-	-	+	Fucoidan		<i>Yang et al, 2013</i>

Fonte: Adaptado de Moussavou et al, 2014

O câncer ainda é um grande problema de saúde pública em todo o mundo e carece de tratamentos totalmente eficazes. Estudos têm apontado que as terapias convencionais não são totalmente eficazes no tratamento desta doença, sendo então necessárias as buscas por terapias alternativas (KHALID, 2018). Estudos com produtos de origem natural apresentam compostos que possuem estruturas complexas contra uma série de atividades biológicas. Além disso, os compostos derivados de algas marinhas visam moléculas importantes que regulam os processos de carcinogênese (GUTIERREZ-RODRIGUEZ, 2018).

Conforme descrito por Khalid et al. (2018), existe uma variedade de compostos fitoquímicos com atividade anticâncer associadas a algas marinhas demonstrando efeito protetor contra a cânceres de mama, pele e intestino (KHALID et al, 2018). Segundo relatos

de Moussavou (2014), compostos extraídos de algas que induzem apoptose em células cancerosas podem ser usados como agentes para a quimioprevenção e/ou quimioterapia do câncer, produzindo efeitos anticâncer por meio de vários mecanismos de ação, incluindo a inibição do crescimento, invasão e metástase das células cancerosas, e por meio da indução de apoptose nas células cancerosas (MOUSSAVOU, 2014). Alves et al. (2016) avaliou a atividade antiproliferativa de quatro algas marinhas em células Hep-G2, identificando inibição de atividade proliferativa celular em até 80% (ALVES et al., 2016).

Visando avaliar as potenciais atividades terapêuticas presentes nas macroalgas da Antártica, em especial na espécie *P. decipiens*, estudos relacionados têm demonstrado o alto potencial citotóxico dos compostos isolados de algas em diferentes linhagens de células tumorais. Frassini et al. (2019) avaliou o potencial citotóxico de macroalgas na linhagem HCT-116, identificando efeito citotóxico nos extratos hexânico e clorofórmio de *I. cordata*, e nos extratos hexano, clorofórmio e metanólicos de *D. anceps* (FRASSINI, et al., 2019). Estudos de Martins et al. (2018) demonstraram alto potencial citotóxico do extrato de *I. Cordata* nas linhagens de câncer testadas, corroborando com as demais pesquisas (MARTINS et al., 2018). A abundância da espécie *P. decipiens* no continente antártico, associado as propriedades identificadas em outras espécies presentes na mesma localidade, bem como a escassez de estudos relacionando este organismo a cânceres colorreriais, fazem este estudo significativo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de extratos da macroalga antártica *P. decipiens* sobre a linhagem celular tumoral de câncer colorretal HCT-116 e não tumoral HaCaT.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar quimicamente os extratos de *P. decipiens*.
- Determinar a atividade antioxidante de extratos celulares de *P. decipiens*.
- Avaliar o efeito citotóxico e morfológico de extratos celulares de *P. decipiens* sobre as linhagens celulares HCT-116 e HaCaT.
- Determinar os mecanismos de morte celular, ROS e MMP induzidos por extratos de *P. decipiens* sobre modelos celulares humanos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CAPÍTULO 1

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico. O artigo intitulado “Effect of extracts of the Antarctic macroalgae *Palmaria decipiens* on colorectal tumor and non-tumor cell lines” será submetido à revista “Advances in Biological Chemistry”. A formatação está de acordo com as normas do periódico.

Effect of extracts of the Antarctic macroalgae *Palmaria decipiens* (Rhodophyta, Palmariales) on colorectal tumor and non-tumor cell lines

Marina Della Giustina¹, Rafael Frassini¹, Sidnei Moura², Fernando Joel Scariot³, Sérgio Echeverrigaray³, Vanessa Sayuri Osaki⁴, Franciane M. Pellizari⁴, Pio Colepicolo⁵, João Antonio Pêgas Henriques¹, Mariana Roesch-Ely^{1,*}

1. Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, University of Caxias do Sul, RS, Brazil
2. Laboratory of Biosynthetic and Natural Products, University of Caxias do Sul, RS, Brazil
3. Laboratory of Applied Microbiology, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil
4. Laboratory of Phytology and Quality of Marine Water, Paraná State University, Paranaguá Campus, PR, Brazil
5. Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Algae, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author: Mariana Roesch-Ely, Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil. Phone: +55-54-3218-2100, Fax: +55-54-218-2664. E-mail address: mrely@ucs.br.

Abstract: Carcinogenesis is a complex process that results in the appearance of cells capable of independently multiplying, forming metastases and invading tissues. Colorectal cancer is the third most frequent neoplasm in the world, being an important cause of mortality. Antarctica macroalgae are substances-producing organisms with important biological activities, in which antitumor activity has already been investigated, showing very promising cytotoxic results. However, there are no reports so far showing antitumor activity of extracts of the macroalgae *Palmaria decipiens* against colorectal tumors. This study aims to evaluate the effect of macroalgae extract from Antarctica *P. decipiens* on tumor cell line HCT-116 and non-tumor cell line HaCaT. The extracts were obtained by maceration, where the samples remained in contact with the solvent and the phenolic compounds present were identified by high performance liquid chromatography. The antioxidant action of the extracts was determined by the DPPH radical inhibition method. Cytotoxicity and cell viability were determined by the MTT assay, and cell morphology was assessed by Giemsa staining. Apoptosis or cell necrosis events were identified by staining with acridine orange / ethidium bromide (LA / BE) and flow cytometry. Three extracts were obtained from the macroalgae *P. decipiens*: MET (methanol), CLO (chloroform) and HEX (hexane). The quantification of phenolic compounds presents in the extracts identified the presence of three main compounds: gallic acid, quercetin and kaempferol. The MET extract was the one that showed significant results of cell proliferation inhibition within 72 h of treatment in the HCT-116 lineage. However, the extracts did not show dose-response action on HaCaT cells. The MET extract showed potential antioxidant activity. The 72-hour treatment with MET extract morphologically altered the colorectal cancer tumor cell line HCT 116, as well as affected cell proliferation. Exposure of HCT-116 cells to MET extract of *P. decipiens* for 72h indicated the presence of necrotic events, compared to fluorescence microscopy (LA / BE), flow cytometry (annexin-V / PI), ROS and MMP tests. The cell cycle assay did not show significant evidence. The results indicate that the extract of the Antarctic macroalgae *P. decipiens* interferes in the mechanisms of action of colorectal cancer tumor cells, acting as a potential antiproliferative and antioxidant agent.

Keywords: Antarctic seaweeds, antitumor activity, colorectal cancer, antioxidant activity

1. Introduction

Carcinogenesis is a complex, multiphasic process that depends on genetic phenomena that culminate in the emergence of neoplastic cells. Despite cellular particularities, some characteristics are common, such as genetic and epigenetic alterations, proliferative advantages of survival, destruction and invasion of tissues. Genetic damage can be acquired through environmental factors, chemical substances, radiation, viruses or genetic or epigenetic factors¹⁻³.

Among all types of existing cancers, colorectal cancer stands out for its epidemiological relevance and association with the population's lifestyle and dietary factors. It is estimated that in 2020 around 40,990 new cases emerged in Brazil, predominantly in the South and Southeast regions. Despite therapeutic advances in recent decades, colorectal cancer is the third most frequent neoplasm in the world, mortality rates remain around 40% in developed countries and 55% in developing countries⁴⁻⁶.

From the bioactive compounds identified in marine algae, their functional potential can be evaluated, as well as their potential for use as therapeutic agents⁷. Studies show that there are a variety of phytochemicals with anticancer activity associated with marine algae, these compounds can be used as agents for the prevention or chemotherapy of cancer, producing anticancer effects through various mechanisms of action, including growth inhibition, invasion and metastasis, and through the induction of apoptosis in cancer cells⁷⁻⁹.

Antarctic macroalgae are organisms that produce substances with important biological activities, such as antiviral, anti-inflammatory, anti-phytophagic, antimicrobial and cytotoxic actions, in addition to antifreeze and algacide¹⁰⁻¹⁶.

The red macroalgae *Palmaria decipiens* stands out for its abundance in the Antarctic continent, its particularities have been the subject of research to understand the survival mechanisms developed by the species. The antitumor activity has already been investigated in other macroalgae, such as *I. cordata*, *C. jacquinotii* and *D. anceps*, showing very promising cytotoxic results against colorectal cancer tumor lineage HCT-116¹⁷. However, so far, there are no reports of antitumor activity of extracts of the macroalgae *Palmaria decipiens* against colorectal tumors. This study aims to evaluate the effect of the extract of the macroalgae Antarctica *Palmaria decipiens* on the tumor lineage of colorectal cancer HCT-116 and non-tumor cancer HaCaT, as well as to identify potential anti-tumor and antioxidant properties present in this organism.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified eagle's medium–high glucose (DMEM), trypsin-EDTA, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), inactivated by heat fetal bovine serum (FBS), Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, standard phenolic compounds and DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DPPH reagent (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl) was prepared daily. Hexane, chloroform and methanol ultrapure were obtained from Merck (Brazil). All other chemicals were ultra-pure grade and obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Seaweed Sample and Preparation of Extracts

The red alga *Palmaria decipiens* (Reinsch) R.W.Ricker 1987, was collected in Whalers Bay (62°59'S and 60°34'W) during the Brazilian Antarctic Operation XXXIII in September 2016.

Seaweeds fixed to the substrate were collected from the intertidal region during periods of low tide. The seaweeds were washed with seawater to remove epiphytes, frozen at -20°C and posteriorly lyophilized for biochemical analyzes. Species identification was performed according to its morphology and the classification system proposed by Wynne (2017), and herbarium specimens were deposited in the Herbarium of Botanical Institute of São Paulo (SP), Brazil.

The extracts were obtained by macerating the dry powder of *P. decipiens* immersed in hexane, chloroform and methanol, individually, in the proportion of 1:10, remaining in contact with the solvent for 24 hours, through the exhaustion process. Extracts from three consecutive baths were collected and filtered through filter paper (Whatmann n° 1). After filtration, the extracts were combined and concentrated to dryness under vacuum at 40°C. Crude extracts were kept in the dark and dried at -20 °C until biological testing¹⁸.

2.3. Phenolic compounds by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The analysis were performed on HPLC equipment, HP model 1100, column Lichrospher RP18 (5 μ m) equipped with 210nm UV detector and quaternary pump system. The reverse phase analysis consisted of: solvent A - Milli-Q water with 1% phosphoric acid and solvent B - Acetonitrile. The pumping system of the mobile phase was gradient, with 90% of the solvent A from 0 to 5min, 60% from A from 5 to 40min and 90% from A from 45 to 50min. The standard flow was maintained at 0.5 mL / min according to Morelli (2010)¹⁹. The samples were solubilized in water Milli-Q (5g / L) and filtered through Nylon membranes of 0.45 μ m pore diameter. The compounds phenolic were identified according to their order of elution and by comparison of their time of retention with those of your pure standards. Quantification was performed using external standardization, correlating the area (mAU * s) of the compound peak to the standard curve performed. The use of standards was as described in the literature (gallic acid, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, rutin, ferulic acid, naringin, hesperidin, myricetin, resveratrol, quercetin, apigenin and kampferol). The result was expressed in μ g / mL of extract.

2.4. Cell Culture and Cytotoxic Assay

HCT-116 (human colorectal cancer cell line) and HaCaT (human keratinocyte cell line) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC - CCL247), Manassas, VA, USA. Cells were cultured in DMEM supplemented with 10 % heat-inactivated FBS. Cells were maintained in a humidified atmosphere at 37 °C, in 5 % CO₂, and 95 % air. The cytotoxicity study was performed when the cells reached 70-80 % confluence.

Cytotoxic analysis was assessed by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) method. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 5x10⁴ cells/cm³. After 24 h incubation, the cells were treated with increasing concentrations of extracts for 72 h. Ethanol 3,5 % (v/v) and DMSO 0,5% (v/v) was used as a negative control. MTT solution (0.4 mg/mL) was added after treatment and incubated for 2 h, followed by dimethyl sulfoxide²⁰. The optical density (OD) was measured at 570 nm. IC₅₀ was calculated by GaphPad Prism version 5.0.

2.5. Radical DPPH Scavenging Activity

The test to verify the antioxidant properties of the macroalgae were performed using the inhibition of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl), described by Kim et al (2005)²¹ and adapted from Bernardi et al (2016)²². A 1500 µl aliquot of the DPPH solution (Sigma, 0.01 g in ethanol PA) was added to 1200 µl of Tris-HCl (15g of Trisma Base in 100 ml of ultrapure water, pH = 7) and 1000 µl of sample. The control blank was prepared with 80% methanol. After homogenizing the solution, the samples were left to stand for 20 minutes, protected from light, for later reading on a UV-visible spectrophotometer (Hiatachi U-1800) at a wavelength of 517 nm. The percentage of Antioxidant Activity (AA) was calculated by the algebraic expression: % inhibition = {[abs. final mean of the control - abs. final sample mean] / abs. final control mean} x 100.

2.6. Cellular Morphology Test by Giemsa Staining

HCT-116 cells were seeded in round coverslips in 24-well plates at 5×10^4 cells/cm³. After cell binding, the medium was removed, and three concentrations of the selected extracts were added to the wells for 72 h: IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅. For Giemsa staining, the treatment medium was removed, the cells were washed, gently with PBS and fixed with methanol for 5 minutes. Subsequently, they received staining with 10% Giemsa for 10 minutes. The coverslips were washed with distilled water and samples were analyzed under light inverted microscopy (Nikon Eclipse Ts2) staining protocol²³.

2.7. Apoptosis/Necrosis Test using dual Acridine Orange / Ethidium Bromide staining

HCT-116 cells were seeded in a 6-well plate and treated with concentrations of IC₅₀ from the selected extracts. After 72 h, the cells were washed with PBS, detached from the wells with trypsin and resuspended in 50 µL of PBS. The cells were stained with 100 µg / mL of acridine orange and 100 µg / mL of ethidium bromide and visualized on an Olympus BX43 fluorescent microscope. Acridine orange penetrates in normal cells and early apoptosis events with intact cell membranes and shows green fluorescence. Ethidium bromide only entered cells with membrane damage, such as late apoptotic and necrotic cells, emitting orange-red fluorescence. Negative controls were treated with ethanol and DMSO²⁴.

2.8. *In vitro* wound healing assay

HCT-116 cells were seeded in round coverslips on 24-well plates at 5×10^4 cells/cm³. After 24 h of incubation at 37°C, the monolayers were scratched, creating a cell-free slit, using a sterile micropipette tip at an angle of about 90 degrees to keep the slit width limited. To determine the proper slot size, three different sizes of micropipette tips (1000, 200 and 10 μ l) were used. The medium was removed and the wells were washed twice with serum free medium (500 μ l) to remove cells in the supernatant. After this process, the selected extract at the concentration of IC₅₀ was added to the wells and incubated for 72h.

The groove area was photographed using an inverted microscope (Nikon Eclipse Ts2) before adding the drug (time 0), as well as after 24, 48 and 72 h of treatment, using an objective that allows visualization of both edges of the wound with 40 \times magnification. Images were saved as *.tif files. with the same field during image acquisition. Reference points were made by drawing a straight line, with an ultra-fine tipped marker pen, on the outer bottom of the plate wells. The reference mark was placed outside the capture imaging field but within the microscope field of view. Two areas of the cleft, above and below the guideline, were measured in each well between 0 and 72 h of treatment using Image J software (Software 1.48q, Rayne Rasband National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Slot closure (%) was quantified using the percent change in the normalized measurement area divided by the original open area according to: % slot closure = $[A(0) - A(t)/A(0)] \times 100$ where the area at time zero (0) and the area after the incubation time (t) were used to calculate the percentage of slot closure²⁵.

2.9. Apoptosis/Necrosis, ROS, cell membrane integrity and cell cycle analysis by flow cytometry

Induced apoptosis was assayed by the Human Annexin V-FITC/PI apoptosis Kit (Sigma-Aldrich, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. The fraction of the cell population in different quadrants was measured using quadrant statistics with the FlowJo 10.0 software (LLC, Ashland, Ore). Reactive Oxygen Species (ROS) generation was analyzed by flow cytometry using DCFH-DA. Cells were treated with PSC-hex for 72 h, suspended in PBS and incubated with 10 μ M DCFH-DA at 37 °C for 30 min. Fluorescence generation due to the hydrolysis of DCFH-DA to dichlorodihydrofluorescein (DCFH) by non-specific

cellular sterases, and the subsequent oxidation of DCFH by peroxides was measured by means of flow cytometry (BD FACScalibur, San Jose, California). The uptake of the cationic fluorescent dye 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)) (2 μ L of 2 μ mol/L stock solution in dimethyl sulfoxide [DMSO]) was used for the evaluation of mitochondrial membrane potential²⁶. Cell treatment was performed as in ROS experiments. Untreated controls and treated cells were harvested and washed twice with PBS. The cell pellets were then re-suspended in 2 mL of fresh incubation medium containing DiOC6 and incubated at 37 °C in a thermostatic bath for 30 min. HTC-116 cells were separated by centrifugation, washed twice with PBS, and analyzed by flow cytometry using FL1 channel (488/533 nm) (BD FACScalibur, San Jose, California).

For the analysis of cell cycle phase distribution, HCT-116 cells were plated at $1,5 \times 10^5$ cells/mL in 6-well plates and left incubating for 24 h. The cells were treated with the concentrations of IC₅₀ of the selected extracts, previously determined by the MTT assay. The positive control groups were treated with the same amount of DMSO and ethanol solution used for the treatment. The negative control was treated with ethanol and DMSO. Cells were harvested following 72 h incubation with the extract and further processed for either cell cycle analysis or apoptosis detection. For cell cycle analysis, cells were fixed in 70% ethanol for 10 min at room temperature. After centrifugation cells were incubated with PI (5 μ g/mL) and RNase A in PBS (100 μ g/mL) for 30 min on ice. Cellular DNA content for cell cycle distribution analysis and presence of sub-G1 peak, suggestive of apoptosis induction and measurement of phosphatidylserine externalization were analyzed using FL1 channel (488/533 nm) and FL3 channel (488/670 nm) (BD FACScalibur, San Jose, California), plotting at least 10,000 events per sample. Three to six independent experiments were performed in duplicate and the results were expressed as mean values \pm standard deviation (SD). P values < 0.05 were considered as statistically significant.

2.10. Statistical Analysis

The results were expressed as means \pm SD. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences - SPSS version 20.0. Normality tests (Shapiro-Wilk) and one-way ANOVA analysis of variance were performed, with Tukey's multiple post-hoc comparisons test. The significance of the statistical difference was considered for values of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Chemical characterization of extracts through HPLC

Chemical characterization is fundamental for understanding the antioxidant and antitumor activity of macroalgae. In this way, three extracts were obtained from the macroalgae *Palmaria decipiens*: MET (Methanol), CLO (Chloroform) and HEX (Hexane).

The chemical quantification of phenolic compounds presents in *P. decipiens* extracts obtained previously identified the presence of three main compounds: gallic acid, quercetin and kaempferol. (Table 1).

Table 1. Major phenolic compound presents in the *P. decipiens* extracts by HPLC.

Seaweeds	Extract	RT (min)*	Concentration (µg/mL)	Component Name	Molecular Formula
<i>P. decipiens</i>	Hexane	42.36	56.56	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
	Chloroform	42.36	2580.92	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
		36.55	102.47	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
	Methanol	5.44	261.64	Gallic Acid	C ₇ H ₆ O ₅
		42.36	95.52	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆

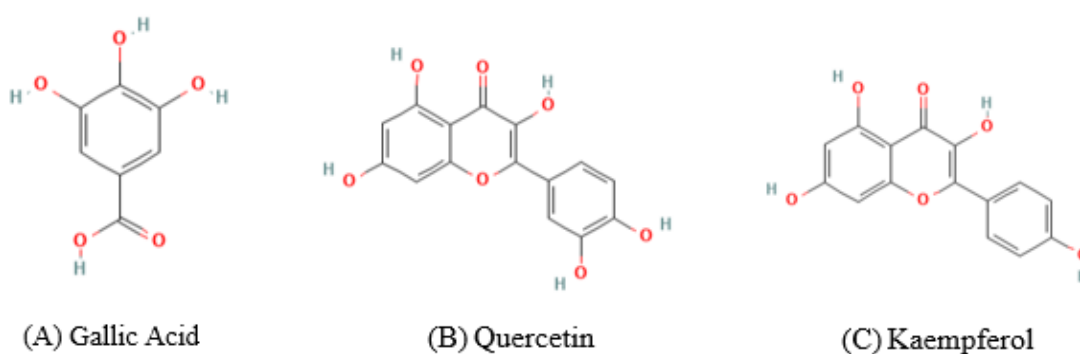


Figura 1. Chemical structure of phenolic compounds obtained from *P. decipiens* extracts. (A) Gallic Acid (CID: 370). (B) Quercetin (CID: 5280343). (C) Kaempferol (CID: 5280863).

Phenolic compounds are widely used in pharmaceuticals and other consumer products, as they have several biological properties in combating free radicals, antioxidant activity, acting as metal chelators, modulating the activity of some enzymes, and for their

antimutagenic actions²⁷⁻²⁸. These compounds may have antimicrobial activity due to the fact that they are weak organic acids, and also due to their partially lipophilic nature that allows them to pass through the lipid bilayer of the cell membrane, disrupting the cell structure and acidifying the cytoplasm, and proteins can also be denatured²⁹.

Bernardi et al. (2016), reported a high content of phenolic compounds in two species of Antarctic macroalgae *P. rosulatum* and *U. hookeriana*, in the study this result in association with the antioxidant potential found, is related to the environmental adversities to which these species are exposed²².

Studies have shown that gallic acid has significant biological properties, directly affecting the proliferation and replication of tumor cells, acting as antimutagenic, antitumor and antioxidant agents, suggesting that this compound can be considered effective in combating cancer cells²⁹⁻³¹.

That quercetin can be considered an inhibitor of the development of different types of cancer, since this flavonoid can affect cell proliferation, cell cycle regulation and usually participate in multiple signaling pathways that are often interrupted at initiation, tumor proliferation and propagation, acting as an anti-angiogenic, antioxidant and anti-inflammatory agent^{29, 32,33}. Kaempferol is a flavonoid and has been reported to have significant biological properties such as anti-inflammatory, antioxidant and antimutagenic, reducing the risk of cancer and other diseases^{28,34,35}.

Cardozo et al. (2011) quantified phenolic compounds in three species of red macroalgae, *G. birdiae*, *G. domingensis* and *G. tenuistipitata*, and reported that there was greater detection efficiency of the compounds in the use of methanol solvent, when compared to other solvents at different concentrations³⁶.

3.2. Antitumor Activity

The cytotoxic activity of the extracts was tested in human colorectal cancer cells (HCT-116 cell line) using the MTT assay. The concentrations used in this assay ranged from 100 to 750 $\mu\text{g} / \text{mL}$, determined from the initial concentration of the extract, and exposed for periods of 24, 48 and 72 h, respectively. The results obtained indicated greater significance of the IC₅₀ (130.30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of the MET extract in cells exposed for 72 h, as shown in Table 3.

Table 2. IC₅₀ (μg.mL⁻¹) of *P. decipiens* extracts against HCT-116 cell line.

Extract	IC ₅₀ (Mean ± SD)		
	24h	48h	72h
Hexane - HEX	1119.0±3.05	383.6±2.58	259.6±2.41
Chloroform - CLO	576.6± 2.76	238.5± 2.38	141.4± 2.015
Methanol - MET	521.2± 2.71	242.5± 2.38	130.3± 2.11

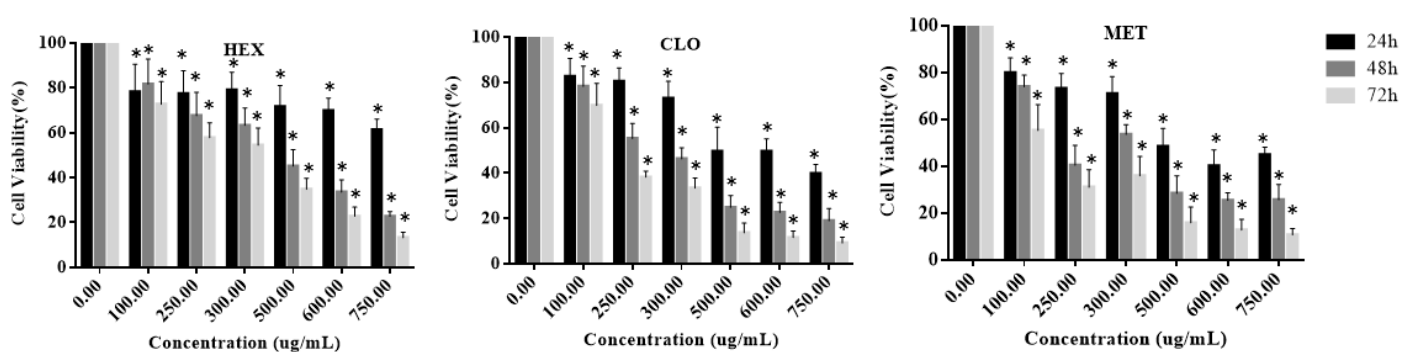


Figure 2. Cell viability (%) of the HCT-116 colorectal cancer tumor line, exposed to three different extracts (μg.mL⁻¹) of the alga *P. decipiens* (HEX, CLO and MET). Anova followed by Tukey's test expresses values as means ± SD and statistical analyzes (* p < 0.05 compared to control in the corresponding analysis of time).

All extracts used in the study reduced cell viability for 24, 48 and 72 h. However, the MET extract provided a decrease in cell population survival as a function of the IC₅₀ concentration of the extract, and the lower cell viability observed at 72 h. Studies indicate that the use of the dose-response assay to define the effects and assess the cytotoxicity of extracts on human cancer cells is essential to assess the biological potential of macroalgae⁷.

The cytotoxic activity of *P. decipiens* extracts was also tested on non-tumor cells (HaCaT cell line) through the MTT assay. The concentrations used in this assay ranged from 1000 to 5000 μg / mL, determined by the maximum concentration of the initial solution of the macroalgae extract *P. decipiens*, exposed for periods of 24, 48 and 72 h. The results obtained indicated that there was no dose-response activity against cell death at the concentrations evaluated (Figure 2). The IC₅₀ of the extracts presented in the non-tumor cell line are higher, indicating selectivity for the tumoral cells HCT-116. The IC₅₀ of the MET extract in the HaCaT strain is almost 12x greater than in the HCT-116 strain as shown in Table 4.

Table 3. IC₅₀ (µg.mL⁻¹) extracts of *P. decipiens* seaweeds against HaCaT cell line.

Extract	IC ₅₀ (Mean ± SD)		
	24h	48h	72h
Hexane (HEX)	2177.0 ± 3.34	1592.0 ± 3.20	1348.0 ± 3.13
Chloroform (CLO)	1798.0 ± 3.26	1224.0 ± 3.09	1339.0 ± 3.13
Methanol (MET)	3075.0 ± 3.49	1764.0 ± 3.25	1457.0 ± 3.18

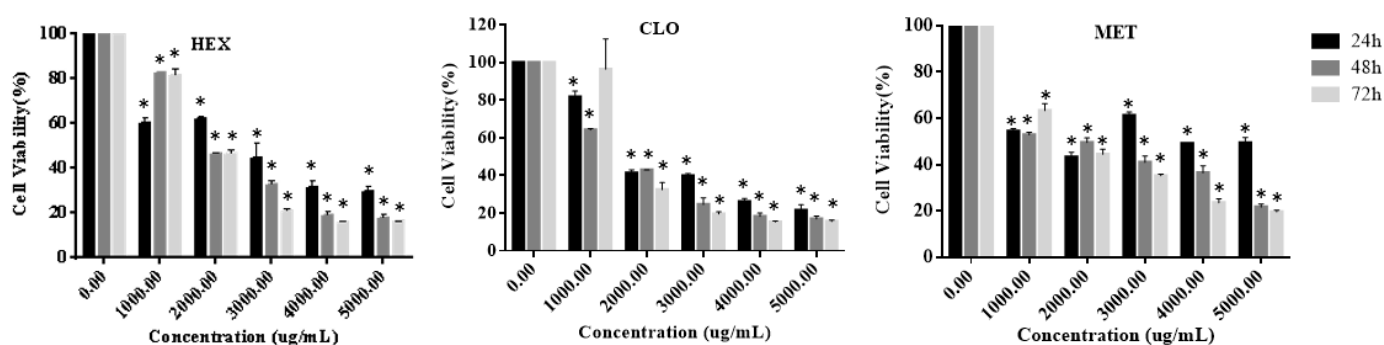


Figure 3 - Cell viability (%) of the HaCaT non-tumor cell line, exposed to three different extracts (µg.mL⁻¹) of the alga *P. decipiens* (HEX, CLO and MET). Anova followed by Tukey's test expresses values as means ± SD and statistical analyzes (* p < 0.05 compared to control in the corresponding analysis of time).

Martins (2018), reported that the ethyl acetate extract of the macroalgae *I. cordata* proved to be cytotoxic against the tested cancer cell line. In this same study the authors reported that the tested algae extracts were not cytotoxic against the non-cancerous cell line³⁷.

Frassini et al. (2019) evaluated the cytotoxic potential of macroalgae in the HCT-116 lineage, identifying a cytotoxic effect on the hexane (IC₅₀=61.06 ± 1.79 µg/ml) and chloroform (IC₅₀=115.9 ± 2.1 µg/ml) extracts of *I. cordata*, and on the hexane (IC₅₀=242.6 ± 2.4 µg/ml), chloroform (IC₅₀=27.12 ± 1.43 µg/ml) and methanol (IC₅₀=34.03 ± 1.53 µg/ml) extracts of *D. anceps*¹⁷.

Paul (2013) observed the cytotoxic potential of the methanol extract obtained from the green alga *E. intestinalis* in cell lines HeLa (IC₅₀= 309.048 ± 3.083 µg/ml) and T 293 (IC₅₀=651.183 ± 1.198 µg/ml), indicating inhibition of cell growth in parallel with the increase in the concentration of extracts³⁸.

Due to the extreme climatic conditions of the original habitat of these macroalgae, the organisms develop unique defense mechanisms to survive in these environments. Alves et al. (2016) indicates that marine organisms develop secondary metabolites with therapeutic potential, as a form of protection against environmental adversities⁷.

3.3. DPPH analysis

The mean values of the antioxidant activity of the MET extract, obtained by the DPPH method at the three extract concentrations, are shown in Table 2. The percentages of DPPH radical reduction varied from $28.66 \pm 1.34\%$ in the macroalgae *P. decipiens*. The dilution of the extract at a concentration of 1.25 mg mL^{-1} showed the most satisfactory results.

Table 4. Antioxidant Activity (%) of MET extract.

Sample	Concentration (mg.mL^{-1}) / Mean \pm SD		
	0.6	1.25	2.5
<i>P. decipiens</i> (MET)	28.66 ± 0.57	31 ± 0	29.66 ± 1.15

This result suggests that the levels of antioxidant activity may be associated with the geographic location of the analyzed species and not necessarily with the order or taxonomic group to which the species belongs. Studies indicate that the antioxidant potential may be a strategy for the body's adaptation to the high ultraviolet radiation to which they are exposed in the algae habitat²².

Mamani et al. (2020) evaluated the antioxidant activity of the macroalgae *Solieria filiformis*, indicating that the methanol extract presented antioxidant potential ($84.65 \pm 1.56\%$) through the DPPH method. The study cites that this antioxidant activity of macroalgae may be related to their content of phenolic compounds³⁹.

3.4. Cellular Morphology and Apoptotic cell identification

To assess whether the extract undergoes morphological changes, the cells were treated for 72 hours, stained with Giemsa solution and observed under an inverted microscope. As shown in Figure 3, treatment with MET extract changed the morphology and number of adhered cells. Cells clustered into colonies after exposure to the extract at the IC_{50}

concentration. On the other hand, cells in the control group showed regular appearance and intense growth, characteristic of the morphology of the cell line.

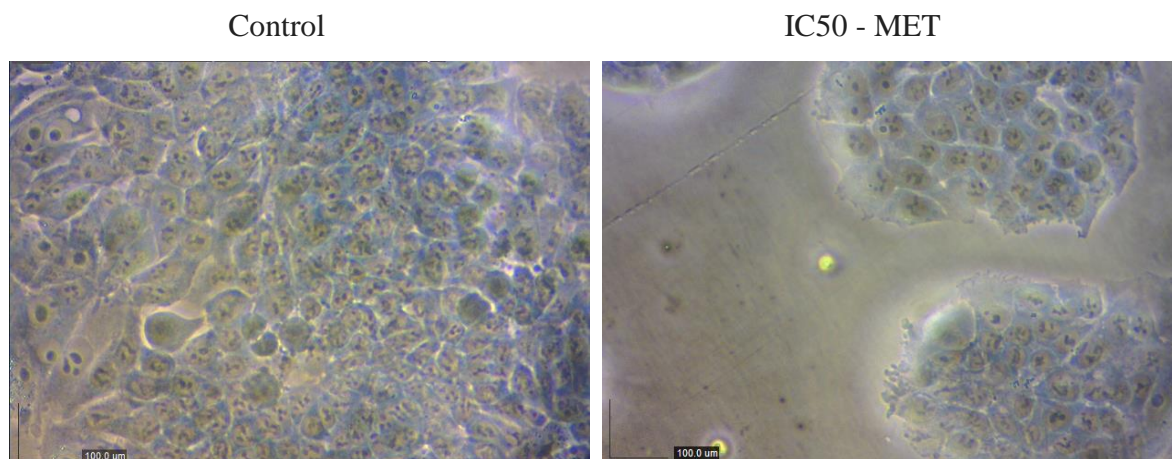


Figure 4. Morphological changes of the HCT-116 cell line after 72 hours of treatment with the *P. decipiens* MET extract.

The results evidenced by Giemsa staining suggest there were changes in the morphology of cells exposed to the MET extract. To confirm this result, tests were performed with double staining AO / EB, Cell Migration, Annexin-PI, ROS, cell membrane integrity and cell cycle, by flow cytometry.

Figure 4 and Figure 5 represent the evolution of these events. Acridine orange (AO) penetrates only normal cells and early apoptosis events, emitting green fluorescence. Ethidium bromide targets cells with severe membrane damage, such as cells undergoing late apoptosis and necrosis, emitting reddish-orange fluorescence.

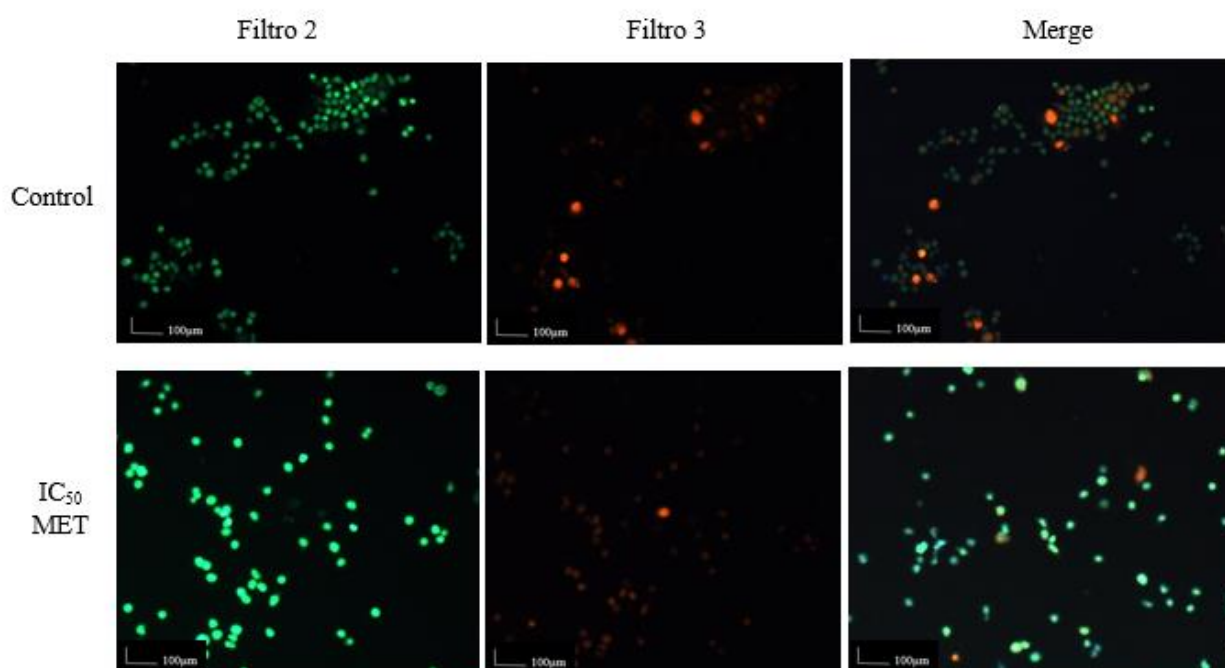


Figure 5. Typical morphological changes in HCT-116 cells after seaweeds extracts treatment stained with AO/EB. The images were taken under fluorescence microscopy at 100X.

For the evaluation of the migration test, cells were treated for 72 h and photographed every 24 h in an adapted microscope. As seen in Figure 5, treatment with IC₅₀ MET extract of the alga *P. decipiens* influenced cell proliferation and migration.

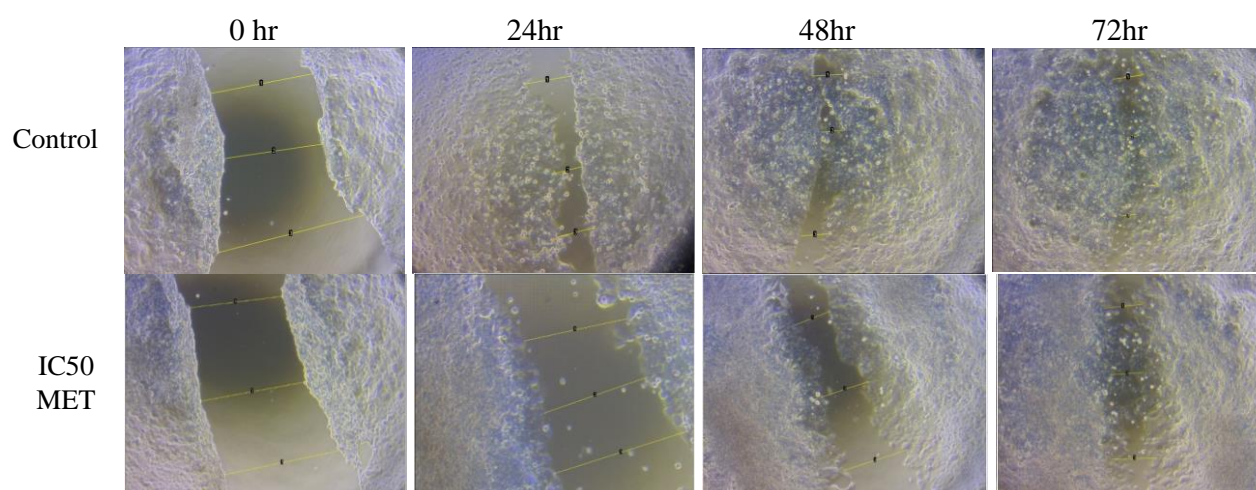


Figure 6. *In vitro* wound healing assay changes of the HCT-116 cell line after treatment with the *P. decipiens* MET extract.

Length averages between the migration test margins are shown in Figure 6. Groove closure was decelerated in HCT-116 cells exposed to MET extract compared to control. The

percentage of closure of the groove corroborates other information, being 89.69% of closure in the control and only 58.77% of closure in cells exposed to the MET extract of *P. decipiens*, indicating inhibition of proliferation and delay in cell migration.

Al Monla et al (2020) observed reduced migration of HCT-116 cells exposed to methanolic extract obtained from *C. sinuosa*, indicating a significant reduction in groove closure rates in a dose- and time-dependent manner⁴⁰.

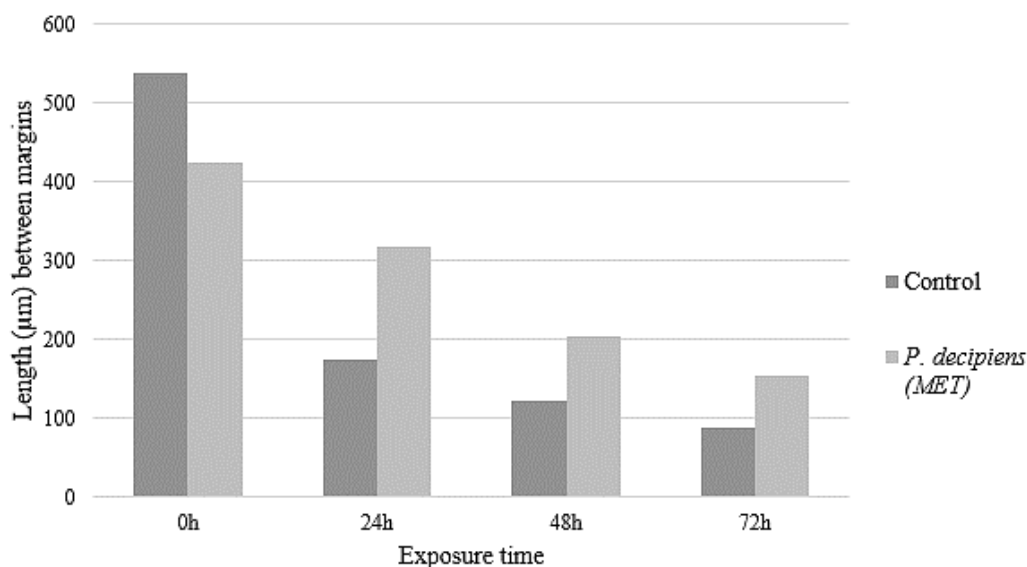


Figure 7. Migration (μm) of HCT-116 cells after different time exposure to MET of *P. decipiens*.

Flow cytometry results indicated that at the IC_{50} concentration of the MET extract, the cells had already undergone a process of necrosis in more than 40% of the cells exposed to the treatment (Figure 6). The percentage of cells stained only with Annexin-V and double stained with Annexin-V and PI, which indicates necrosis events, as expressed in each quadrant. The penetration of propidium iodide shows damage to the membrane and its ability to intercalate with DNA. The exposure time of HCT-116 cells for 72 h to the MET extract may be associated with the result obtained. This technique allows the quantification of viable cells in the sample, as well as cells in apoptosis and early and late necrosis⁴¹.

Characterized by a variety of morphological changes, apoptosis is a sequential order of cell death that occurs regularly to ensure a homeostatic balance between the rate of cell formation and cell death⁴². One of the first events is the alteration of the plasma membrane, with translocation of phosphatidylserine (PS) found inside the cytoplasmic membrane to the extracellular surface of the membrane, promoting signaling to macrophages to phagocytose the injured cell⁴³.

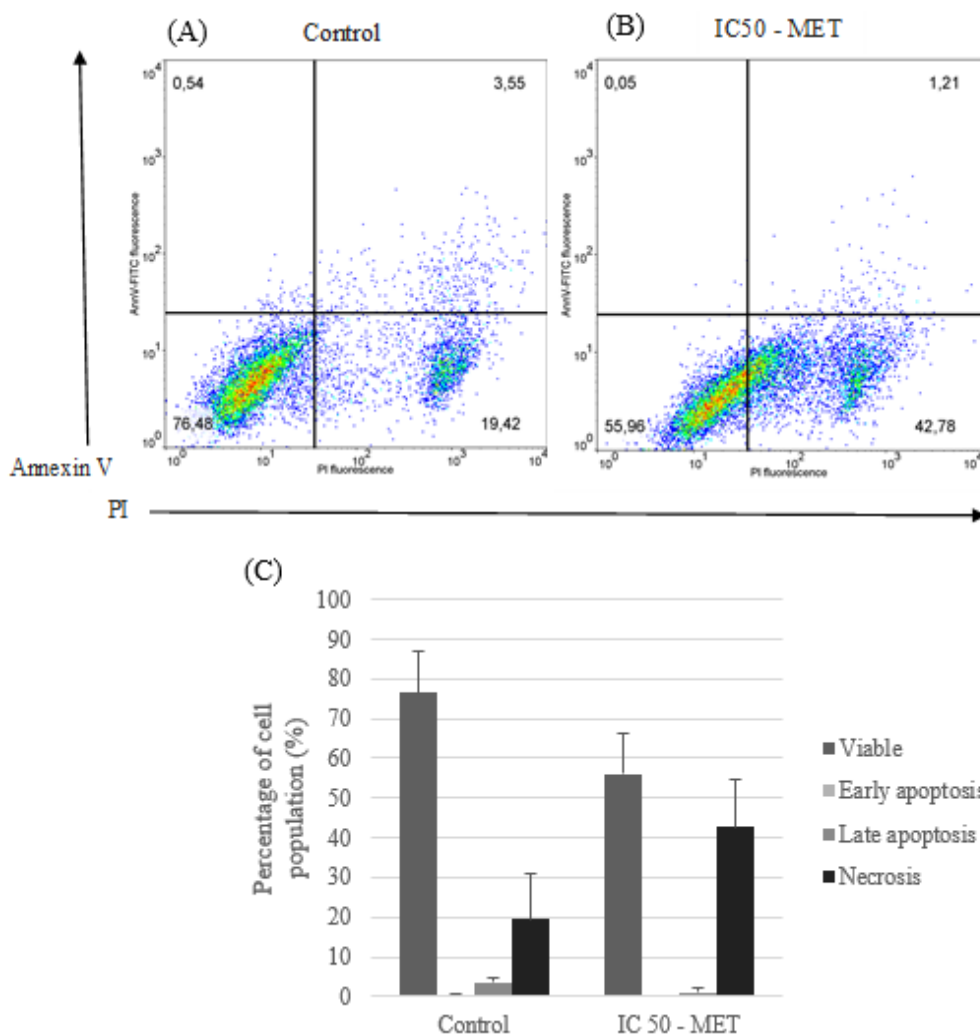


Figure 8. Annexin V/Propidium Iodide stain. (A) Control, HTC-116 cells without *P. decipiens* extract, incubated for 72h; (B) IC₅₀ MET, HCT-116 cells exposed to MET extract of *P. decipiens*, incubated for 72h; (C) Percentage of cell population per sample. Results expressed as mean \pm SD of three to six independent experiments performed in duplicate. * Statistically significant values ($p < 0.05$) different when compared to white.

The analysis of Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) and Cell Membrane Integrity was evaluated using the flow cytometry technique (Figure 7). ROS was performed with HCT 116 cells incubated for 72 h in the presence of MET extract of *P. decipiens* at the concentration of IC₅₀, and showed that there was increased fluorescence, which indicates accumulation of ROS. This result indicates a direct relationship between mitochondrial dysfunction and necrotic events observed in previous analyses.

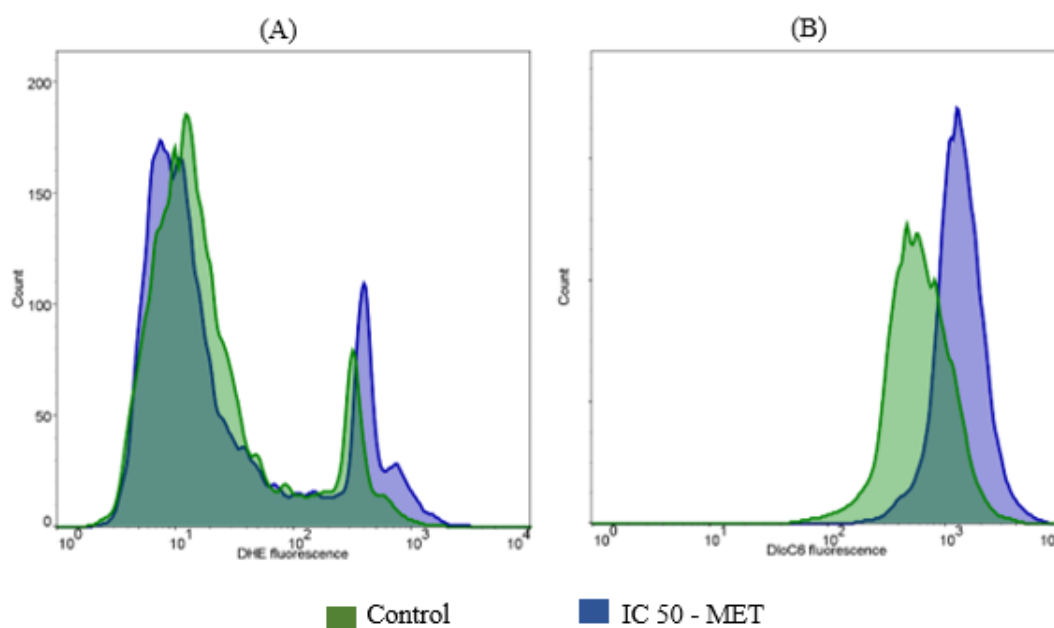


Figure 9. Cytometric evaluation. (A) Intracellular ROS in HCT-116 cells after exposure of *P. decipiens* MET extract at IC₅₀ concentration. (B) Cell membrane integrity of HCT-116 cells after treatment with MET extract of *P. decipiens* at IC₅₀ concentration by cytometry. Results are mean \pm SD from three to six independent experiments performed in duplicate.

The biochemical pathways of metabolism produce reactive oxygen species (ROS) as intermediaries between free radicals. Due to their abundance in the body these species are no longer able to neutralize or detoxify, impacting oxidative stress⁴⁴. Deficiency in cellular oxidative repairs such as protein denaturation, lipid peroxidation and/or DNA conjugation is related to a series of diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, among others. Antioxidants are compounds that interrupt the cellular oxidation process by eliminating radicals and, therefore, preventing diseases⁴⁵⁻⁴⁶.

Al Monla et al (2020) identified a significant increase in the level of ROS in a concentration-dependent manner used in the treatment, the fluorescence intensity in treated cells was significantly increased compared to the respective untreated HCT-116 cells⁴⁰.

Cell membrane integrity was assessed using the flow cytometry technique, where cells were treated with MET extract of *P. decipiens* at IC₅₀ concentration and incubated for 72 h (Figure 7). The observed results indicate that there was a loss of cell membrane integrity, inducing cell death. These events may be associated with the time of exposure of cells to the MET extract of the macroalgae *P. decipiens*. The effects of ROS on mitochondria induce a sequence of events that include hyperpolarization of the mitochondrial membrane, oxidative explosion, followed by potential membrane breakdown and mitochondrial fragmentation⁴⁷.

The analysis to evaluate the effect of MET extract of the macroalgae *P. decipiens* on the cell cycle of HCT 116 was also performed by flow cytometry. The results shown in Figure 10 indicate that there were no changes in the cell cycle.

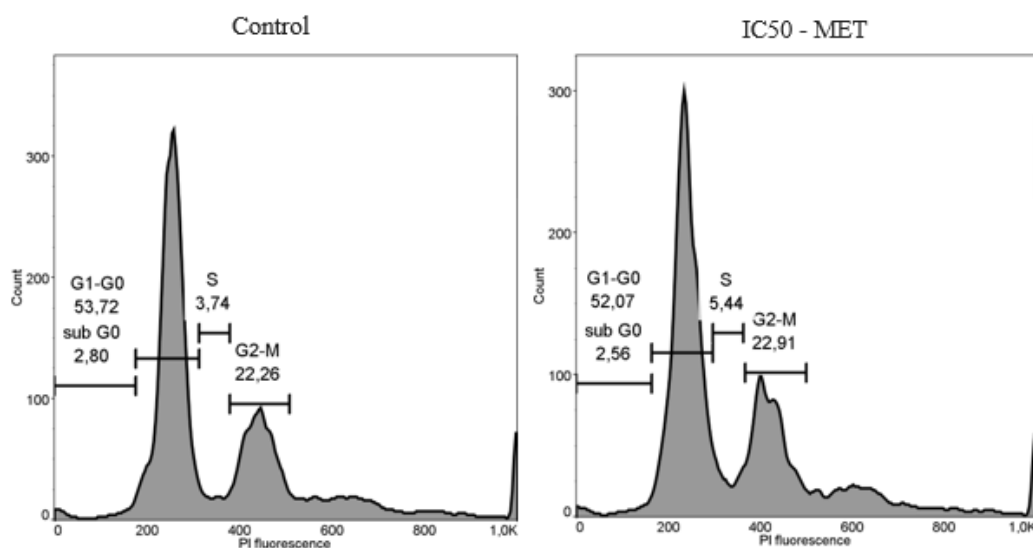


Figure 10. Percentage of cell cycle distribution of HCT-116 cells after treatment with methanolic extract of *P. decipiens* in the IC₅₀ contraction compared to control. The results of cell cycle distribution analysis by flow cytometry were analyzed by ModFit. D) The percentages of cell populations from different phases of the cell cycle are shown in the graph. Results are the mean \pm SD of three to six independent experiments performed in duplicate. * Statistically significant values ($p < 0.05$) different when compared to bank.

Unlike other studies that observed arrest induction in certain phases of the cell cycle, the results obtained do not indicate evidence of changes in cells exposed to MET of *P. decipiens* extract for 72h. Al-Ghamdi et al (2023) found that there was a significant arrest induction in HCT-116 colorectal cancer cells exposed to treatment with epigallocatechin Gallate and quercetin in phase G1 compared to untreated control cells²⁹.

4. Conclusions

As observed in the results, three extracts were prepared using different solvents from the Antarctic macroalgae *P. decipiens*. The evaluation of phenolic compounds identified the presence of gallic acid, quercetin and kaempferol present in the analyzed extracts.

The cytotoxicity of the extracts was analyzed against HCT-116 colorectal cancer tumor cells, with the MET extract showing the most significant results. Cytotoxicity was evaluated in HaCaT non-tumor cells, but none of the tested extracts showed such activity.

The MET extract of *P. decipiens* was able to inhibit the growth and migration of the cell line HCT-116, as well as influenced the morphology of these cells. The evaluated cell death mechanisms indicated that the MET extract promoted necrosis in HCT-116 cells. The MET extract showed antioxidant activity.

These results are in agreement with other findings in the literature, indicating that the antarctic macroalgae *P. decipiens* may have potential antioxidant and antiproliferative properties on the colorectal cancer cell line HCT-116.

Acknowledgments

The authors thank Brazilian Research Funding Program (CAPES), University of Caxias do Sul (UCS), Brazilian Algae Research Group (RedeAlgas), Antarctic Brazilian Program (PROANTAR) for financial support for the development of this work.

References

- [1] FILHO, G. B. B. Patologia. 8. d. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- [2] KUMAR V, ABBAS AK, ASTER JC. Robbins & Conran. Pathologic Basis of Diseases. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2014.
- [3] AGUDELO, L; ISAZA-RESTREPO. A; FIGUEROA, C; MONROY, A; PADRÓN, J; VILLAVECES, M. Experiencia em el manejo de câncer colorrectal em Méderi-Hospital Universitario Mayor, 2012-2014. RevColomb Cir. 2017;32:262-68.
- [4] SIMÕES, M. L; BARBOSA, L. E. Obesidade: impacto no Carcinoma Colorretal. Revista Portuguesa de Cirurgia (2017) (42):17-32.
- [5] AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: American Cancer Society, 2019.
- [6] INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. (2020). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA.
- [7] ALVES, C; PINTEUS, S; HORTA, A; PEDROSA, R. (2016). High cytotoxicity and anti-proliferative activity of algae extracts on an in vitro model of human hepatocellular carcinoma. Springer Plus 5:1339.
- [8] MOUSSAVOU, G. et al. (2014). Anticancer Effects of Different Seaweeds on Human Colon and Breast Cancers. Mar. Drugs. 12, 4898-4911;
- [9] KHALID, S., Abbas, M., Saeed, F., Ul Ain, HB, & Suleria, HAR (2018). Potencial terapêutico de compostos bioativos de algas marinhas. Em S. Maiti. Biomateriais de algas marinhas (pp. 1-19).
- [10] SEVAK, H.P., AMSLER, C.D., MCCLINTOCK, J.B., AUMACK, C.F., PETERS, K.J. & BAKER, B. J. (2012). Algicidal activity and potencial antifouling defenses in macroalgae

from the western Antarctica Peninsula including probable synergistic effects of multiple compounds. *Botanica Marina* 55: 311-315.

[11] MARTINS, R.M., NEDEL, F., FUJII, M.T., PEREIRA, C.M.P., LUND, R.G. & COLEPICOLO, P. (2014). Antimicrobial and cytotoxic activities of seaweeds extracts from Antarctica. XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

[12] MOLES, J., TORRENT, A., ALCARAZ, M.J., RUHL, R. & AVILA, C. (2014). Anti-inflammatory activity in selected Antarctic benthic organisms. *Frontiers in Marine Science* 1:5.

[13] NUÑEZ-PONS, L. & AVILA, C. (2014). Deterrent activities in the crude lipophilic fractions of Antarctic benthic organisms: chemical defenses against keystone predators. *Polar Research* 33: 21624-21636;

[14] MARINHO, S. S. R., RAMOS, C. J. B., LEITE, J. P. G., TEIXEIRA, V. L., PAIXÃO, I. C. N. P., DAL BELO, C. A., PEREIRA, A. B. & PINTO, A. M. V. (2017). Antiviral activity of 7-keto-stigmasterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispa* against stequine herpes virus 1. *Journal of Applied Phycology* 29(1): 555–62.

[15] SANTOS, M.A.Z; COLEPICOLO, P; PUPO, D; FUJII, M.T; PEREIRA, C.M.P; MESKO, M.F. (2017). Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids. *J Appl Phycol.* 29:759–767.

[16] SILVA FILHO, I.J. (2018). Estudo químico bioguiado da macroalga marinha da Antártica *Desmarestia menziesii* (Phaeophyceae) para isolamento de substâncias com atividades biológicas. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em biodiversidade vegetal e meio ambiente. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo.

[17] FRASSINI, R. et al. (2019). Chemical characterization and cytotoxic activity of antarctic macroalgae extracts against colorectal cancer. *Advances in Biological Chemistry*, 9.

- [18] ASPÉ, E. & FERNÁNDEZ, K. (2011). The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Industrial Crops and Products*. Volume 34, 1, 838-844.
- [19] Morelli, L.L.L. (2010). Avaliação de compostos fenólicos majoritários em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (máximo). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 133p.
- [20] GARCIA, C. S.C. et al. (2016). Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 88, n. 1, pp. 281-292.
- [21] KIM, Y. K., Q. Guo & L. Packer. (2002). Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172: 149–156.
- [22] BERNARDI, J. et al. (2016). Preliminary data of antioxidant activity of green seaweeds (Ulvophyceae) from the Southwestern Atlantic and Antarctic Maritime islands. *Hidrobiológica*. 26(2): 233-239.
- [23] NERSESYAN, A; KUNDI, M; ATEFIE, K; SCHULTE-HERMANN, R. AND KNASMULLER, S. (2006). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1835-1840.
- [24] CURY-BOAVENTURA, M ; GORJAO, R ; DELIMA, T ; NEWSHOLME, P ; CURI, R. (2006). Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. *LIFE SCIENCES*, v. 78, n.13, p. 1448-1456,
- [25] ALMEIDA, V.M. et al. (2019). Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura in vitro. *J Bras Patol Med Lab*. 55(6): 606-619.
- [26] ARANDA, A. et al. (2013). Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol In Vitro*. 2013 Mar;27(2):954-63.

- [27] PALACIOS, I. et al. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678.
- [28] SANTOS, R.A. et al. (2021). Analysis of phenolic compounds from cowpea (*Vigna unguiculata*) by HPLC-DAD-MS/MS. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24.
- [29] AL-GHAMDIA, M.A. et al. (2023). Enhancement of Annexin V in response to combination of epigallocatechin gallate and quercetin as a potent arrest the cell cycle of colorectal cancer. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 83, e248746.
- [30] GICHNER, T., Pospíšil, F., Velemínský, J., Volkeová, V., & Volke, J. (1987). Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiologica*, 32(1), 55-62.
- [31] LOCATELLI, C., FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., & CRECZYNSKI-PASA, T. B. (2013). Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 233-239.
- [32] HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- [33] HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4.
- [34] RHO, H. S. et al. (2011). Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*, 16(4), 3338-3344.
- [35] MERCADER-ROS, M. et al. (2013). Biological activities of kaempferol: Effect of cyclodextrins complexation on the properties of kaempferol. New York: Nova Science. pp. 1-31.
- [36] CARDOZO, K. H. M. et al. (2011). Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, v. 21, n. 2, pp. 202-208.

- [37] MARTINS, R. et al. (2018). Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential.” *Frontiers in microbiology* vol. 9 412. 8 Mar.
- [38] PAUL, S. & KUNDU, R. (2013). Antiproliferative activity of methanolic extracts from two green algae, *Enteromorpha intestinalis* and *Rizoclonium riparium* on HeLa cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 21:72.
- [39] MAMANI, J. et al. (2020). Antioxidant activity and total phenolic content in *Caulerpa filiformis* (Chlorophyta) from Sechura Bay and Paracas Bay, Peru. *Rev. peru biol.*, Lima, v. 27, n. 1, p. 61-66.
- [40] AL MONLA, R. et al. (2020). The Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Brown Algae *Colpomenia sinuosa* are Mediated by the Generation of Reactive Oxygen Species. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(8), 1993.
- [41] ADAN, A., ALIZADA, G., KIRAZ, Y., BARAN, Y., & NALBANT, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176.
- [42] OBENG, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz. J. Biol.*, vol. 81, no. 4 pp.1133-1143.
- [43] DUENSING, T. D., & WATSON, S. R. (2018). Assessment of Apoptosis (Programmed Cell Death) by Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- [44] SANTOS-SÁNCHEZ, N. F., SALAS-CORONADO, R., VILLANUEVA-CAÑONGO, C., & HERNÁNDEZ-CARLOS, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In *Antioxidants* (pp. 1-29).
- [45] GUTIERREZ-RODRIGUEZ, A. G.; JUAREZ-PORTILLA, C.; OLIVARES-BANUELOS, T.; ZEPEDA, R. C. (2018). Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discovery Today*. 23(2):434-447.

[46] ISMAIL, G.A. et al. (2019). In vitro potential activity of some seaweeds as antioxidants and inhibitors of diabetic enzymes. *Food Sci. Technol, Campinas*, v. 40, n. 3, p. 681-691.

[47] SCARIOT, F. J; JAHN, L.M; MAIANTI, J.P; DELAMARE, A.P.L; ECHEVERRIGARAY, S. (2016). The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. *Apoptosis* 21:866–872.

5 DISCUSSÃO GERAL

As algas vermelhas podem contar com grande quantidade de compostos fenólicos, sua composição e aplicabilidade vem sendo estudada devido à reação desses componentes com diversas proteínas (GÓMEZ-GUZMÁN, 2018; ISMAIL, 2020). Sua importante ação na proteção de espécies contra agentes oxidantes, como os raios ultravioleta e a poluição vem sendo relatada. Esses compostos são utilizados como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios e antiulcerogênicos, além de antioxidantes (SANTANA et al., 2012; OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2013; SANTOS, 2021).

Estudos relatam que a quercetina pode ser considerada um inibidor do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, uma vez que este composto pode afetar a proliferação celular, a regulação do ciclo celular e geralmente participar de múltiplas vias de sinalização que muitas vezes são interrompidas no início, proliferação e propagação tumoral, atuando como um agente anti-angiogênico (HANAHAN & WEINBERG 2000 e 2011; AL-GHAMDI et al, 2023). A aplicabilidade do canferol foi relatada como tendo propriedades biológicas significativas, como antiinflamatório, antioxidante e antimutagênico, reduzindo o risco de câncer e outras doenças (RHO et al., 2011; MERCADER-ROS et al., 2013; SANTOS, 2021).

Os compostos fenólicos são amplamente utilizados em fármacos e outros produtos de consumo, pois apresentam diversas propriedades biológicas no combate aos radicais livres e atividade antioxidante, modulando a atividade de algumas enzimas, e por suas ações antimutagênicas (PALACIOS et al., 2011; SANTOS, 2021). Esses compostos podem ter atividade antimicrobiana devido ao fato de serem ácidos orgânicos fracos, e também devido à sua natureza parcialmente lipofílica que lhes permite passar pela bicamada lipídica da membrana celular, rompendo a estrutura celular e acidificando o citoplasma, desnaturando as proteínas (AL-GHAMDI et al, 2023).

Estudos têm demonstrado que o ácido gálico possui propriedades biológicas significativas, afetando diretamente a proliferação e replicação das células tumorais, atuando como agentes antimutagênicos, antitumorais e antioxidantes, sugerindo que este composto pode ser considerado eficaz no combate às células cancerígenas (GICHNER et al., 1987; LOCATELLI et al., 2013; AL-GHAMDI et al., 2023).

Os compostos fenólicos variam de ácidos simples a compostos polifenólicos mais complexos, e desempenham um papel vital contra o estresse externo. São ótimos antioxidantes, atuam como quelantes de metais e radicais livres, inibindo lipídios e

eliminadores de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GÓMEZ-GUZMÁN, 2018; ISMAIL, 2020). Além disso, desempenham um papel importante no combate à tumores por meio da inibição de células tumorais através de um processos que alteram a ativação do carcinógeno, ou suas variações na divisão celular durante a mitose, na fase de telófase. Compostos fenólicos diminuem a quantidade de proteína celular e o índice mitótico, enquanto alguns flavonoides podem modificar a produção de hormônios e inibir a aromatase para conter o progresso das células malignas (DELLAI, 2013; ISMAIL, 2020).

Em concordância com os resultados observados no estudo, sugere-se que o potencial de atividade antioxidante pode estar associado à localização geográfica de maior ocorrência da espécie *P. decipens* analisada e não necessariamente à ordem ou grupo taxonômico a que a espécie pertence. Estudos indicam que o potencial antioxidante pode ser uma estratégia para a adaptação do organismo à alta radiação ultravioleta a que está exposto no habitat das algas (BERNARDI et al, 2016).

Alves et al (2016) relatou que os extratos metanólicos das algas vermelhas *Asparagopsis armata* e *Sphaerococcus* apresentaram alta citotoxicidade em células HepG-2, induzindo a diminuição da viabilidade celular em mais de 80%. Dentre todas as algas testadas no estudo, *Asparagopsis armata*, *Fucus spiralis*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius* apresentaram o maior potencial citotóxico e ação antiproliferativa. Os autores ainda relatam que o uso do ensaio dose-resposta é essencial para definir os efeitos e avaliar a citotoxicidade dos extratos de macroalgas em células cancerígenas humanas com potencial biológico (ALVES, 2016).

Martins (2018), relatou que o extrato de acetato de etila da macroalga *I. cordata* provou ser citotóxico contra a linhagem de células cancerosas testadas. Nesse mesmo estudo, os autores relataram que os extratos de algas testados não foram citotóxicos contra a linhagem de células não cancerosas. (MARTINS, 2018). Frassini et al. (2019) avaliaram o potencial citotóxico de macroalgas na linhagem HCT-116, identificando efeito citotóxico nos extratos hexano ($IC_{50} = 61,06 \pm 1,79$) e clorofórmio ($IC_{50} = 115,9 \pm 2,1$) de *I. cordata*, e no hexano ($IC_{50} = 242,6 \pm 2,4$), extratos de clorofórmio ($IC_{50} = 27,12 \pm 1,43$) e metanol ($IC_{50} = 34,03 \pm 1,53$) de *D. anceps* (FRASSINI, et al., 2019).

As algas se estabeleceram como uma fonte potencial de compostos bioativos com valor nutricional e potenciais atividades terapêuticas (MAYER, 2017; KHALID, 2018). A versatilidade das atividades biológicas expressas por macroalgas da Antártica já foi

comprovada por meio de estudos científicos, incluindo sua atividade antitumoral (MARTINS, 2018).

Há décadas, pesquisadores de diferentes partes do mundo estudam o potencial da atividade antitumoral em algas marinhas. Devido às condições climáticas extremas do habitat original dessas macroalgas, os organismos desenvolvem mecanismos de defesa únicos para sobreviver nesses ambientes. Um estudo indica que organismos marinhos desenvolvem metabólitos secundários com potencial terapêutico, como forma de proteção contra adversidades ambientais (ALVES et al, 2018).

A migração celular é essencial para muitos processos biológicos, como reparo e regeneração tecidual. Entretanto, a regulação aberrante desse processo impulsiona a progressão de muitas doenças, incluindo a invasão e metástase do câncer (ALMEIDA, 2019). Al Monla et al (2020) observaram migração reduzida de células HCT-116 expostas ao extrato metanólico obtido de *C. sinuosa*, indicando uma redução significativa nas taxas de fechamento do sulco de maneira dependente da dose e do tempo (AL MONLA, 2020). A penetração do iodeto de propídio, no ensaio de AO/BE, revela danos à membrana e sua capacidade de intercalar com o DNA. Essa técnica permite a quantificação de células viáveis na amostra, bem como células em apoptose e necrose precoce e tardia (ADAN, 2016).

As vias bioquímicas do metabolismo produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) como intermediários entre os radicais livres. Devido à abundância no organismo essas espécies não são mais capazes de neutralizar ou desintoxicar, impactando o estresse oxidativo (SANTOS-SÁNCHEZ et al., 2019). A deficiência em reparos oxidativos celulares como desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e / ou conjugação de DNA está relacionada a uma série de doenças. Os antioxidantes são compostos que interrompem o processo de oxidação celular por meio da eliminação de radicais e, portanto, da prevenção de doenças (ISMAIL, 2019). Os efeitos das ROS nas mitocôndrias induzem uma sequência de eventos que incluem hiperpolarização da membrana mitocondrial, explosão oxidativa, seguida de potencial quebra da membrana e fragmentação mitocondrial (SCARIOT, 2016).

A progressão ao longo do ciclo celular é regulada cuidadosamente para evitar a proliferação ou condições adversas no processo de mitose. Danos no DNA causam parada do ciclo celular em G1, S ou G2 para prevenir a replicação de DNA danificado ou prevenir aberrantes de mitose (SRIVASTAVA & SINGH, 2004; ALQARNI, 2017). A desregulação do o ciclo celular é uma característica fundamental das células tumorais, direcionar o ciclo celular das células cancerosas é uma importante abordagem na terapia do câncer (AL-

GHAMDIA, 2023). A abundância de *P. decipiens* no continente antártico é fator motivador para a identificação de potenciais propriedades presentes nesta espécie, bem como a escassez de estudos relacionando este organismo a cânceres colorreriais. Esforços contínuos estão sendo feitos para buscar e desenvolver novas abordagens para tratar o câncer de forma mais eficaz (ALVES et al., 2016).

6 CONCLUSÕES GERAIS

- Os compostos fenólicos ácido gálico, quercetina e canferol foram identificados no extrato da macroalga *P. decipiens*.
- Os extratos clorofórmico e hexânico da alga *Palmaria decipiens* não se mostraram efetivos contra a linhagem celular HCT-116 e HaCaT;
- O extrato metanólico da alga *Palmaria decipiens* foi capaz de inibir o crescimento das células HCT-116;
- O extrato metanólico da alga *Palmaria decipiens* apresentou alterações morfológicas na linhagem após 72h de exposição ao tratamento;
- O extrato metanólico apresentou atividade antioxidante;
- O extrato metanólico da alga *Palmaria decipiens* induziu eventos necróticos na linhagem após 72h de exposição ao tratamento;

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- O fracionamento dos extratos brutos é necessário para chegar a um valor de IC_{50} menor, para que sejam potencializados os efeitos citotóxicos;
- A caracterização química por técnicas complementares é essencial para determinar a presença de outros compostos;
- O isolamento dos compostos e testes dos compostos isolados permitirá estudar com mais detalhes os mecanismos moleculares de ação contra a linhagem HCT-116;
- Avaliar a atividade antitumoral e bacteriana do extrato metanólico para poder determinar a aplicabilidade do mesmo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, A., ALIZADA, G., KIRAZ, Y., BARAN, Y., & NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. (2016). doi:10.3109/07388551.2015.1128876.

AGUDELO, L; ISAZA-RESTREPO. A; FIGUEROA, C; MONROY, A; PADRÓN, J; VILLAVECES, M. Experiencia em el manejo de câncer colorrectal em Méderi-Hospital Universitario Mayor, 2012-2014. *RevColomb Cir.* 2017;32:262-68.

AL-GHAMDIA, M.A. et al. Enhancement of Annexin V in response to combination of epigallocatechin gallate and quercetin as a potent arrest the cell cycle of colorectal cancer. *Brazilian Journal of Biology*, 2023, vol. 83, e248746. Doi: 10.1590/1519-6984.248746

ALLSOPP, P. et al. The effect of consuming *Palmaria palmata*-enriched bread on inflammatory markers, antioxidant status, lipid profile and thyroid function in a randomised placebo-controlled intervention trial in healthy adults. *Eur J Nutr.* 2016 Aug;55(5):1951-62. doi: 10.1007/s00394-015-1011-1.

ALMEIDA, V.M. et al. Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura in vitro. *J Bras Patol Med Lab.* 2019; 55(6): 606-619.

ALQARNI, A., ALAMOUDI, A., AJABNOOR, G., AL-ABD, A., NIEDWIECKI, A., RATH, M. and HARAKEH, S., 2017. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by a novel phytochemical mixture against breast cancer cell lines. *Cancer Research*, vol. 77, no. 13, suppl., pp. 4208

ALVAREZ-GÓMEZ, F; KORBEE, N; FIGUEROA, F. L. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias marinas*, 42(4), 271-288. 2016. <https://doi.org/10.7773/cm.v42i4.2677>

ALVES, C; PINTEUS, S; HORTA, A; PEDROSA, R. High cytotoxicity and anti-proliferative activity of algae extracts on an in vitro model of human hepatocellular carcinoma. *Springer Plus* (2016) 5:1339. DOI 10.1186/s40064-016-2938-2.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer facts & figures 2019*. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

BANSKOTA A.H. et al. Polar lipids from the marine macroalga *Palmaria palmata* inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264. 7 macrophage cells. *Phytochemistry* 101:101–108, 2014.

BECKER, S., QUARTINO, M. L., CAMPANA, G. L., BUCOLO, P., WIENCKE, C., & BISCHOF, K. The biology of an Antarctic rhodophyte, *Palmaria decipiens*: recent advances. *Antarctic Science*, 23(5), 1–12. 2011.

BERNARDI, J. et al. Preliminary data of antioxidant activity of green seaweeds (Ulvophyceae) from the Southwestern Atlantic and Antarctic Maritime islands. *Hidrobiológica*. 26(2):233-239. (2016).

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

DÁVILA, D; PALACIOS, O; NARANJO, C. Metástasis hepáticas en el cáncer colorrectal: estrategias terapéuticas y recomendaciones actuales. *Rev Colomb Cir*. 2017;32 :304-18.

DELLAI A., LAAJILI S., LE MORVAN B V., ROBERT J., BOURAOUI A. Antiproliferative activity and phenolics of the Mediterranean seaweed *Laurencia obusta*. *Ind. Crop. Prod*. 2013; 47 : 252–255. doi: 10.1016 / j.indcrop.2013.03.014.

DENG, YY. et al. Functional Characterization of Lycopene Cyclases Illustrates the Metabolic Pathway towards Lutein in Red Algal Seaweeds. *J Agric Food Chem*. 2020 Feb 5;68(5):1354-1363. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06918.

FILHO, G. B. B. Patologia. 8. d. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FRASSINI, R. et al. Chemical characterization and cytotoxic activity of antarctic macroalgae extracts against colorectal cancer. *Advances in Biological Chemistry*, 9. 2019. DOI: 10.4236/abc.2019.95013

GICHNER, T., Pospíšil, F., Velemínský, J., Volkeová, V., & Volke, J. (1987). Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay. *Folia Microbiologica*, 32(1), 55-62. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02877259>

GÓMEZ, I., WULFF, A., ROLEDA, M. Y., HUOVINEN, P., KARSTEN, U., QUARTINO, M. L. & WIENCKE, C. Light and temperature demands of marine benthic microalgae and seaweeds in polar regions. *Botanica Marina*, 52(6), 593–608. 2009.

GÓMEZ-GUZMÁN M., RODRÍGUEZ-NOGALES A., ALGIERI F., GÁLVEZ J. Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular-associated disorder. *Mar. Drugs*. 2018; 16 : 250. doi: 10.3390 / md16080250.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, A. G.; JUAREZ-PORTILLA, C.; OLIVARES-BANUELOS, T.; ZEPEDA, R. C., Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discovery Today*. 23(2):434-447, 2018.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Disponível online em:< <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>> Acesso em: 29 de agosto 2021.

Instituto Nacional de Câncer (BR). A situação do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

ISMAIL, G.A. et al . In vitro potential activity of some seaweeds as antioxidants and inhibitors of diabetic enzymes. Food Sci. Technol, Campinas , v. 40, n. 3, p. 681-691, Sept. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/fst.15619>.

ISMAIL MM, ALOTAIBI BS, EL-SHEEKH MM. Usos terapêuticos de macroalgas vermelhas. Moléculas . 2020; 25 (19): 4411. Doi: 10.3390 / moléculas25194411

JIBRIL, M.S. et al. Importance of Some Algal Species as a Source of Food and Supplement. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 5(5):186-193-186, 2016. doi: 10.20546/ijcmas.2016.505.020.

JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 364p. ISBN 978-85-277-1045-9. 2012.

KAAKS R, TONIOLO P, AKHMEDKHANOV A, et al. Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. J Natl Cancer Inst 2000;92(19)1592-600.

KANG, G.H. Four Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Precursor Lesions. Arch Pathol Lab Med (2011) 135 (6): 698–703. Doi: 10.1043/2010-0523-RA.1

KHALID, S., Abbas, M., Saeed, F., Ul Ain, HB, & Suleria, HAR (2018). Potencial terapêutico de compostos bioativos de algas marinhas. Em S. Maiti. Biomateriais de algas marinhas (pp. 1-19). <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74060> .

KLOËSER, H. et al. Distribution of macroalgae and macroalgal communities in gradients of physical conditions in Potter Cove, King George Island, Antarctica. *Hydrobiologia*, 333, 1–17, 1996.

KLOËSER, H. et al. Seasonal variation of algal growth conditions in sheltered Antarctic bays: the example of Potter Cove (King George Island, South Shetlands). *Journal of Marine Systems*, 4, 289–301, 1993.

KUMAR V, ABBAS AK, ASTER JC. Robbins & Contran. *Pathologic Basis of Diseases*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.

LECH, Gustaw et al. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World journal of gastroenterology* vol. 22,5 (2016): 1745-55. doi: 10.3748 / wjg.v22.i5.1745

LOCATELLI, C., FILIPPIN-MONTEIRO, F. B., & CRECZYNSKI-PASA, T. B. (2013). Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 233-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.056>

LOPES, D. et al. A New Look for the Red Macroalga *Palmaria palmata*: A Seafood with Polar Lipids Rich in EPA and with Antioxidant Properties. *Mar. Drugs* 2019, 17, 533; doi:10.3390/md17090533

LUDER, U.H; KNOETZEL, J; WIENCKEA, C. Two forms of phycobilisomes in the Antarctic red macroalga *Palmaria decipiens* (Palmariales, Florideophyceae). *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 112: 572–581. 2001.

Marinha do Brasil. Programa antártico brasileiro. Disponível no site: <https://www.marinha.mil.br/secirm/proantar>. Acesso em: 09/05/2019.

MARINHO, S. S. R., RAMOS, C. J. B., LEITE, J. P. G., TEIXEIRA, V. L., PAIXÃO, I. C. N. P., DAL BELO, C. A., PEREIRA, A. B. & PINTO, A. M. V. “Antiviral activity of 7-keto-

stigmasterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispa* against stequine herpes virus 1". *Journal of Applied Phycology* 29(1): 555–62. 2017.

MARTINS, R. et al. "Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential." *Frontiers in microbiology* vol. 9 412. 8 Mar. 2018, doi:10.3389/fmicb.2018.00412

MARTINS, R.M., NEDEL, F., FUJII, M.T., PEREIRA, C.M.P., LUND, R.G. & COLEPICCOLO, P. Antimicrobial and cytotoxic activities of seaweeds extracts from Antarctica. XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 17 a 20 de maio de 2014.

MAYER, A.M.S; Rodríguez, A.D; Taglialatela-Scafati, O; Fusetani, N. *Marine Pharmacology in 2012–2013: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action.* *Mar. Drugs* 2017, 15, 273; doi:10.3390/md15090273.

MERCADER-ROS, M. et al. Biological activities of kaempferol: Effect of cyclodextrins complexation on the properties of kaempferol. In G. Villers & Y. Fougere (Eds.), *Kaempferol: Chemistry, natural occurrences and health benefits*, pp. 1-31. 2013. New York: Nova Science.

MICHAUD, D.S; FUCHS, C.S; LIU, S; WILLETT, W.C; COLDITZ, G.A; GIOVANNUCCI, E. Dietary glycemic load, carbohydrate, sugar, and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(1)138-47.

MILEK, T; FORYSIŃSKI, K; MYRCHA, P. et al. Diabetes association of polyps and colon cancer. *Pol Przegl Chi.* 2019;91(4):9-12. DOI: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.2588>

MIRANDA-DELGADO, A. et al. Antioxidant and anti-cancer activities of brown and red seaweed extracts from Chilean coasts. *Latin american journal of aquatic research*, 46(2), 301-313. 2018. <https://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue2-fulltext-6>

MOLES, J., TORRENT, A., ALCARAZ, M.J., RUHL, R. & AVILA, C. Anti-inflammatory activity in selected Antarctic benthic organisms. *Frontiers in Marine Science* 1: 5; DOI 10.3389/mars.2014.

MOUSSAVOU, G. et al. Anticancer Effects of Different Seaweeds on Human Colon and Breast Cancers. *Mar. Drugs* 2014, 12, 4898-4911; doi:10.3390/md12094898

NUÑEZ-PONS, L. & AVILA, C. Deterrent activities in the crude lipophilic fractions of Antarctic benthic organisms: chemical defenses against keystone predators. *Polar Research* 33: 21624-21636; DOI 10.3402/polar.v33.21624. 2014.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2015, v. 17, n. 1, pp. 36-44. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível online em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 06 de maio 2019.

O'SULLIVAN, A.M. et al. Atividades antioxidantes in vitro e celulares de extratos de algas marinhas preparados a partir de cinco algas marrons colhidas na primavera na costa oeste da Irlanda. *Food Chem.* 126: 1064-1070. 2011.

OVERBEEK, J.A; KUIPER, J.G; HEIJDEN, A. VAN DER, et al. Sex- and sitespecific differences in colorectal cancer risk among people with type 2 diabetes. *Int J Colorectal Disease.* 2019;34(2):269-76. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00384-018-3191-7>

PALACIOS, I. et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.085>

PAUMIER, M. et al. 2018. "El contenido de metabolitos primarios de *Gliricidia sepium* en una zona del Valle del Cauto, Cuba". *REDEVET Revista Electrónica de Veterinaria* , 19 (4): 1-8.

PEREZ, E. Fundamento de Patologia. 1. Ed. São Paulo: Érica, 2014.

QUIRÓS, A.RB; RON, C.C; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J; LAGE-YUSTY, M.A. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 135–139

RICKER, R. W. Taxonomy and biogeography of Macquarie Island seaweeds. Marine algae. Australia. British Museum (Natural History). 1987.

RHO, H. S. et al. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*, 16(4), 3338-3344. 2011.. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16043338>

SANTANA, C. R. R. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of *encholirium spectabile* (Bromeliaceae). *International Journal of Sciences*, 1, 1-19. 2012.

SANTOS, M.A.Z; COLEPICOLO, P; PUPO, D; FUJII, M.T; PEREIRA, C.M.P; MESKO, M.F. Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids. *J Appl Phycol* (2017) 29:759–767. DOI 10.1007/s10811-016-1034-x

SANTOS, R.A. et al. Analysis of phenolic compounds from cowpea (*Vigna unguiculata*) by HPLC-DAD-MS/MS. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24, e2020077. 2021. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.07720>

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F., SALAS-CORONADO, R., VILLANUEVA-CAÑONGO, C., & HERNÁNDEZ-CARLOS, B. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In *Antioxidants* (pp. 1-29). (2019).

SARIKURKCU C, et al. Estudos sobre a atividade antioxidante do óleo essencial e diferentes extratos solventes de frutas *Vitex agnus castus* L. da Turquia. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2479-2483. 2009.

SCARIOT, F. J; JAHN, L.M; MAIANTI, J.P; DELAMARE, A.P.L; ECHEVERRIGARAY, S. The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. *Apoptosis* (2016) 21:866–872. DOI 10.1007/s10495-016-1251-4

SEVAK, H.P., AMSLER, C.D., MCCLINTOCK, J.B., AUMACK, C.F., PETERS, K.J. & BAKER, B. J. Algicidal activity and potencial antifouling defenses in macroalgae from the western Antarctica Peninsula including probable synergistic effects of multiple compounds. *Botanica Marina* 55: 311-315; 2012. DOI 10.1515/bot-2012.

SILVA FILHO, I.J. Estudo químico bioguiado da macroalga marinha da Antártica *Desmarestiamenziesii* (Phaeophyceae) para isolamento de substâncias com atividades biológicas. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Vegetal E Meio Ambiente. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2018.

SIMÕES, M. L; BARBOSA, L. E. Obesidade: impacto no Carcinoma Colorretal. *Revista Portuguesa de Cirurgia* (2017) (42):17-32.

SIMON, Karen. Colorectal cancer development and advances in screening. *Intervenções clínicas no envelhecimento* vol. 11 967-76. 19 de julho de 2016, doi: 10.2147 / CIA.S109285

SRIVASTAVA, S.K. and SINGH, S.V., 2004. Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor Kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic. *Cancer Cells*, vol. 25, no. 9, pp. 1701-1709. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh179>.

THANIKACHALAM K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrientes* . 2019; 11 (1): 164. Publicado em 14 de janeiro de 2019. doi: 10.3390 / nu11010164

VERDECIA, D.M. et al . Primary and secondary metabolites of six species of trees, shrubs and herbaceous legumes. *Cuban J. Agric. Sci.*, Mayabeque , v. 55, n. 1, p. 77-93, 2021 .

VILLANUEVA-PAJARO, Deivis Javier et al . Epidemiología de la interrelación cáncer colorrectal y diabetes mellitus tipo 2. Revisión sistemática. Rev. Fac. Nac. Salud Pública, Medellín, v. 38, n. 2, e337048, Aug. 2020 . <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfnsp.e337048>.

YAMANE, Letícia et al. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. World journal of gastroenterology vol. 20,10 (2014): 2634-40. doi: 10.3748 / wjg.v20.i10.2634

YIU, A.J; YIU, C.Y. Biomarkers in Colorectal Cancer. ANTICANCER RESEARCH 36: 1093-1102 (2016)

YUAN, Y.V. et al. Atividade antioxidante do extrato dulce (Palmaria palmata) avaliada in vitro Food Chem. 91: 485-494. 2005.

ANEXO

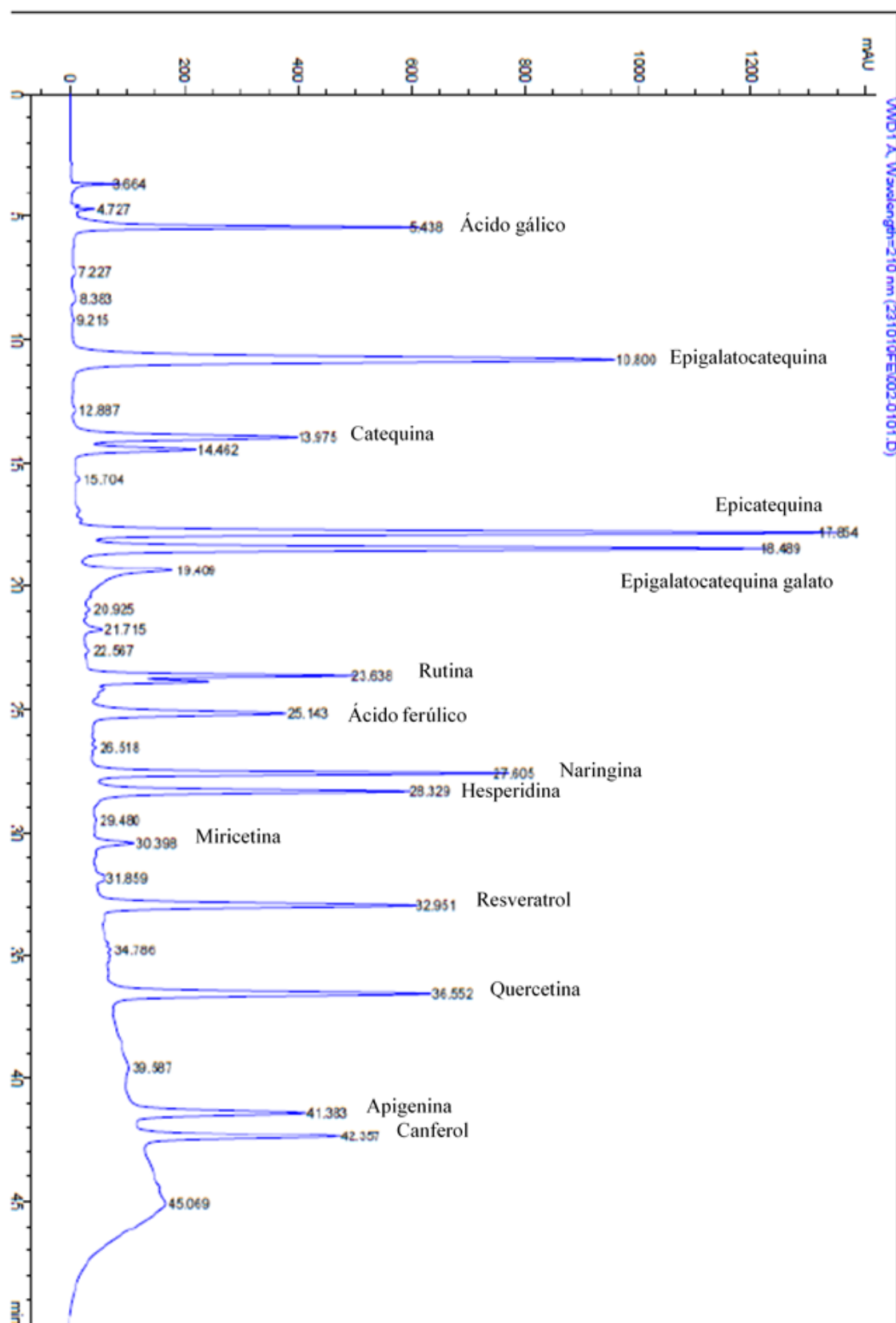


Figura 1. Perfil cromatográfico dos padrões (ácido gálico, epigalocatequina, catequina, epicatequina, epigalocatequina galato, rutina, ácido ferúlico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, quercetina, apigenina e canferol).