

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

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BIANCA TAVARES CANCI**

**EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATOS DAS MACROALGAS**  
**ANTÁRTICAS *Monostroma hariatii* E *Iridaea cordata* SOBRE A**  
**LINHAGEM CELULAR TUMORAL HCT - 116**

**CAXIAS DO SUL**

**2020**

**BIANCA TAVARES CANCI**

**EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATOS DAS MACROALGAS  
ANTÁRTICAS *Monostroma hariatii* E *Iridaea cordata* SOBRE A  
LINHAGEM CELULAR TUMORAL HCT - 116**

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

Orientadores: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mariana Roesch Ely  
Prof. Dr. João A. Pêgas Henriques

**CAXIAS DO SUL**

**2020**

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

C215e Canci, Bianca Tavares

Efeito citotóxico de extratos das macroalgas antárticas *Monostroma harti* e *Iridaea cordata* sobre a linhagem celular tumoral HCT - 116 [recurso eletrônico] / Bianca Tavares Canci. – 2020.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: Mariana Roesch Ely, João Antonio Pêgas Henriques.

Modo de acesso: World Wide Web

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

1. Neoplasias colorretais. 2. Cólon (Anatomia) - Câncer. 3. Algas. 4. Antioxidantes. 5. Biotecnologia. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Henriques, João Antonio Pêgas, orient. III. Título.

CDU 2. ed.: 616.348-006

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

**BIANCA TAVARES CANCI**

**EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATOS DAS MACROALGAS  
ANTÁRTICAS *Monostroma hariatii* E *Iridaea cordata* SOBRE A  
LINHAGEM CELULAR TUMORAL HCT - 116**

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

**Aprovado em:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca examinadora**

---

Profª Drª Mariana Roesch Ely  
Universidade de Caxias do Sul

---

Profª Drª Franciane Maria Pellizzari  
Universidade Estadual do Paraná

---

Profª Drª Juliana da Silva  
Universidade Luterana do Brasil

---

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva  
Universidade de Caxias do Sul

Aos meus pais, Hiolanda e Domingos (*in memoriam*) por terem me dado a vida, e ao meu amor, André, por todo apoio, suporte e incentivo à pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. 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 Pauline Rosales 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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Franciane M. Pellizzari, 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 Rafa que tanto contribuiu com a divulgação e expansão dos estudos com algas e à Márcia, pela introdução ao mundo da pesquisa.

Agradeço a ti, André! Meu melhor amigo, meu ombro, minha âncora, meu marido! Por sempre ter acreditado no meu potencial.

E por fim, tenho gratidão eterna à minha fonte inesgotável de fé, resiliência e paz: Deus! Que me permitiu ser gerada, criada e educada pela super mulher que é a minha mãe. Meu maior exemplo de vida, de luta e de caráter, que me ensinou a nunca desistir daquilo que eu acredito com propósito e amor.

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de neoplasia maligna mais prevalente na população mundial. Nas últimas décadas, o ambiente marinho tem despertado a curiosidade de pesquisadores devido à sua imensa biodiversidade e, as algas têm sido exploradas na pesquisa do câncer. Este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente extratos de duas espécies de algas marinhas antárticas e avaliar a atividade antioxidante e citotóxica destes extratos frente a linhagem celular HCT-116. Buscou-se também investigar mecanismos de morte celular programada nas células após exposição dos extratos com macroalgas. Os extratos foram obtidos por depleção, na qual as amostras permaneceram em contato com o solvente por 24 horas e foram identificadas por cromatografia à gás associada ao espectrômetro de massas (CG-EM). A ação antioxidante foi determinada pelo método de inibição do radical DPPH e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT. A morfologia celular foi determinada por coloração de Giemsa e a apoptose celular foi identificada por coloração com laranja de acridina / brometo de etídeo (LA / BE) e citometria de fluxo. Foram obtidos oito extratos: MHE / MHM / MHH / MHC (*M. hariatii* - etanol / metanol / hexano e clorofórmio), ICE / ICM / ICH / ICC (*I. cordata* - etanol / metanol / hexano / clorofórmio). Os extratos MHM, MHH e MHC não foram capazes de inibir a proliferação celular em 24 horas de tratamento, por outro lado, o MHE demonstrou ter atividade contra a linhagem celular ( $IC_{50} 577,44 \pm 95,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para a alga *I. cordata* somente os extratos ICH e ICC apresentaram citotoxicidade, sendo o ICC o mais sensível ( $IC_{50} 268,63 \pm 11,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Dois compostos principais foram identificados nos extratos de MHE e ICC: fitol e ácido palmítico, característicos das algas marinhas. O tratamento de 24 horas com extratos de MHE e ICC causou alterações morfológicas na linhagem celular nas concentrações testadas e a apoptose e necrose foram identificadas após a exposição das células com os extratos. Os testes em microscopia de fluorescência (LA / BE) e citometria de fluxo (anexina-V / PI) evidenciaram estes efeitos após exposição de 24 horas com os extratos de MHE e ICC. Os extratos das algas *M. hariatii* e *I. cordata* mostraram-se promissores e devem ser explorados em modelos antitumorais contra o CRC.

**Palavras-chave:** Algas Marinhas Antárticas, Atividade Antitumoral, Câncer Colorretal, Atividade Antioxidante

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most prevalent malignant neoplasm in the world population. In the last decades, the marine environment has aroused the curiosity of researchers due to its immense biodiversity. This work aimed to chemically characterize extracts from two species of Antarctic seaweed and to evaluate the antioxidant and cytotoxic activity of these extracts against the HCT-116 cell line. It was also investigated mechanisms of programmed cell death in cells after exposure of extracts with macroalgae. The extracts were obtained by depletion, in which the samples remained in contact with the solvent for 24 hours and were identified by gas chromatography associated with mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant action was determined by the DPPH radical inhibition method and cell viability was determined by the MTT assay. Cell morphology was determined by Giemsa stain and cell apoptosis was identified by staining with acridine orange / ethidium bromide (AO / EB) and flow cytometry. Eight extracts were obtained: MHE / MHM / MHH / MHC (*M. hariatii* - ethanol / methanol / hexane and chloroform), ICE / ICM / ICH / ICC (*I. cordata* - ethanol / methanol / hexane / chloroform). The MHM, MHH and MHC extracts were not able to inhibit cell proliferation in 24 hours of treatment, on the other hand, the MHE demonstrated to have activity against the cell line ( $IC_{50} 577.44 \pm 95.39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). For *I. cordata* only the ICH and ICC extracts showed cytotoxicity, with ICC being the most sensitive ( $IC_{50} 268.63 \pm 11.11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Two main compounds were identified in the extracts of MHE and ICC: phytol and palmitic acid, characteristics of seaweed. The 24-hour treatment with extracts of MHE and ICC caused morphological changes in the cell line at the tested concentrations. Apoptosis and necrosis were identified after exposure of the cells to the extracts. The tests in fluorescence microscopy (AO / EB) and flow cytometry (annexin-V / PI) showed these effects after 24 hours exposure with the extracts of MHE and ICC. *M. hariatii* and *I. cordata* seaweeds extracts revealed to be promising compounds and should be explored in antitumor models against CRC.

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



## LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Mutagênicos dietéticos e desenvolvimento do câncer.....	18
Figura 2 - Estrutura química de metabólitos com atividade antitumoral isolados a partir de algas marinhas.....	22
Figura 3 - <i>Monostroma hariatii</i> : morfologia em aspecto vesicular.....	24
Figura 4 - <i>Iridaea cordata</i> : vista geral do talo.....	24

### LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 - Cell viability (%) of the different extracts ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) of the seaweed <i>M. hariatii</i> (MHE and MHM) and <i>I. cordata</i> (ICH and ICC) against HCT-116 cancer cell line.....	39
Figure 2 - Dose-response activity of MHE and ICC extracts on the HCT-116 cell line ( $r^2 = 0.9$ ). The data are adjusted to the model, demonstrated by the $r^2$ value.....	41
Figure 3 - Morphological changes of the HCT-116 cell line after 24 h of treatment with the <i>M. hariatii</i> and <i>I. cordata</i> extracts.....	42
Figure 4 - Typical morphological changes in HCT-116 cells after seaweeds extracts treatment stained with AO/EB. The images were taken under fluorescence microscopy at 400X.....	43
Figure 5 - Flow cytometry data after Annexin V/Propidium Iodide staining. HCT-116 cells were incubated for 24 h in the presence of $\text{IC}_{25}$ and $\text{IC}_{50}$ doses of <i>M. hariatii</i> and <i>I. cordata</i> seaweeds extracts, or vehicle (ethanol or DMSO).....	44

## LISTA TABELAS

### LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Macroalgas e efeitos de extratos e compostos em linhagem de câncer de mama e colorretal .....	25
Tabela 2 – Atividade <i>in vitro</i> de macroalgas sobre tumores colorretais.....	27

### LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Collection Data of Antarctic Seaweeds.....	33
Table 2 - Major compound presents in the MHE and ICC extracts by GC-MS.....	37
Table 3 - Antioxidant Activity (%) of MHE and ICC extracts.....	38
Table 4 - IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> ) extracts of <i>M. hariatii</i> and <i>I. cordata</i> seaweeds against HCT-116 cell line.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Câncer Colorretal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
DCNT's	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
APC	Adenomatous Poyposis Coli
MMR	Mismatch Repair
CIN	Instabilidade de Microssatélite
CIMP	Fenótipo Metilador de Ilhas CpG
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectro de Massas
MTT	Diphenyl Tetrazolium Bromide
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
MHE	<i>M. harioitii</i> - ethanol
MHM	<i>M. harioitii</i> - methanol
ICH	<i>I. cordata</i> - hexane
ICC	<i>I. cordata</i> - chloroform
CRC	Colorectal Cancer
AO /EB	Acridine Orange / Ethidium Bromide
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose
FBS	Fetal Bovine Serum
AA	Antioxidant Activity
PNM	Produtos Naturais Marinhos

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
CARCINOGENESE E CÂNCER COLORRETAL	14
PATOGENESE MOLECULAR DO CÂNCER COLORRETAL	17
ALGAS MARINHAS E COMPOSTOS BIOATIVOS	20
O AMBIENTE ANTÁRTICO E A FLORA ALGAL	23
ATIVIDADE DE MACROALGAS CONTRA TUMORES COLORRETAIS	26
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
OBJETIVO GERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
CAPÍTULO 1	29
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>55</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os oceanos representam uma importante parcela de recursos naturais no planeta, cujos compostos já identificados deste ambiente são estudados em diversas esferas da ciência, como alimentação, agricultura e saúde, onde os produtos naturais marinhos (PNM) são explorados na pesquisa para o desenvolvimentos de novos compostos com atividades medicinais relevantes, como na pesquisa do câncer (Ambrosino *et al*, 2019; Liang *et al*, 2019), como por exemplo, Eribulina e Trabectedina, identificados a partir de organismos marinhos, já foram aprovados para a terapia antitumoral (Katz & Baltz, 2016).

O ambiente marinho tem sido um importante alvo de pesquisas relacionadas aos seus recursos naturais e isolamento de compostos bioativos e, dentre eles, as algas têm ganhado importante destaque. São organismos primitivos, geralmente aquáticos e fotossintéticos e, devido a esta última característica, têm a capacidade de produção de clorofila e carotenóides (Christaki *et al*, 2012). As algas são interessantes fontes de compostos que apresentam atividade biológica como proteínas, lipídeos, polissacarídeos, fibras, vitaminas do complexo B, compostos antioxidantes e fitoquímicos, sendo um alvo potencial para as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética (Rodrigues *et al*, 2015; Martínez-Hernández *et al*, 2017; Wells *et al*, 2017; Tamura *et al*, 2019). Estudos demonstram que as algas possuem propriedades que vão além da capacidade nutricional, apresentando características antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora, anticoagulante, antidiabética e antitumoral (Xu *et al*, 2017; Ścieszka & Klewicka, 2018).

Câncer é uma nomenclatura para um grande grupo de doenças cuja velocidade de crescimento e proliferação de células mutadas ocorre de forma exponencial com capacidade de invasão de tecidos adjacentes, denominada metástase (WHO, 2019). É uma das principais causas de morte a nível global, com uma incidência de mais de 18 milhões de casos no ano de 2018 e, no Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 não é otimista, com 625 mil novos casos previstos (INCA, 2020).

Segundo dados da World Health Organization (2018) o câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais prevalente na população global (1,8 milhões de casos), perdendo apenas para o câncer de pulmão e mama, ambos estimados em cerca de 2,09 milhões de casos. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020) estima os casos de câncer de cólon e reto dentre os predominantes nas regiões Sul e Sudeste. A doença possui importante relevância

epidemiológica, visto que é a terceira neoplasia maligna mais incidente e a quarta principal causa de mortalidade por câncer no mundo (Arnold *et al*, 2017; Dutra *et al*, 2017; Bray *et al*, 2018).

Dados epidemiológicos mostram que grande parte da carcinogênese humana está associada ao estilo de vida e aos hábitos alimentares, com 30% - 40% para diferentes tipos de tumor (Mehra *et al*, 2017; Nasir *et al*, 2019; Almeida *et al*, 2019). Devido ao avanço tecnológico e da pesquisa científica tem-se explorado o comportamento de diferentes nutrientes e compostos bioativos frente ao progresso e regressão de doenças crônicas. As pesquisas em genômica nutricional estudam como estes nutrientes e compostos modificam a estrutura e /ou a expressão gênica e, conseqüentemente, a capacidade dietética de alterar o genoma humano (Elsamanoudy *et al*, 2016; Nasir *et al*, 2019).

A nutrição é um conjunto de processos metabólicos dos quais todos os organismos vivos obtêm os nutrientes necessários para a manutenção dos processos fisiológicos celulares, bem como para a adequada replicação e reparo do DNA. Segundo o Fundo Mundial para Pesquisa do Câncer / Instituto Americano para Pesquisa do Câncer, cerca de um terço das neoplasias mais comumente diagnosticadas poderiam ser evitadas através de mudanças de hábitos de vida e alimentares em países desenvolvidos (WCRF, 2018; Fiolet *et al*, 2018).

Portanto, com base no exposto, o presente trabalho objetiva analisar a caracterização química e estudar o efeito antitumoral de extratos das macroalgas antárticas *Monostroma hariatii* e *Iridaea cordata* sobre a linhagem celular de câncer colorretal HCT – 116.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARCINOGENESE E CÂNCER COLORRETAL

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) atualmente são responsáveis pela maioria das mortes globais, e o câncer tem se mostrado como um grande obstáculo para a expectativa de vida populacional do século XXI. Para o ano de 2018 as estimativas apontaram 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer em todo o mundo (Bray *et al*, 2018).

Câncer é uma nomenclatura geral para definir um conjunto de mais de cem doenças, de causas multifatoriais, que se desenvolve quando algum dos mecanismos de controle de proliferação celular falha e estas se multiplicam com o conteúdo genético alterado, configurando uma mutação (OMS, 2019; Cancer Research UK, 2017). É um processo de múltiplos estágios, no qual de forma gradual e de origem unicelular, adquire fenótipo de malignidade através de uma série progressiva de alterações com capacidade de replicar células-filhas mutadas (Cooper & Hausman, 2007 ; Alexandrov & Stratton, 2013).

As células possuem mecanismos bioquímicos capazes de reparar lesões sofridas no DNA para dar sequência aos processos de divisão celular. Conforme a severidade e cronicidade destes danos, estes meios corretivos não são suficientes e a célula entra em apoptose, um mecanismo de morte programada caracterizada pela ruptura nuclear e fragmentação da célula com conseqüente degradação do próprio material genético (Robbins & Cotran, 2010; Guyton & Hall, 2011). Este é um processo complexo, que envolve uma série de vias de sinalização que podem ser de forma extrínseca, via receptores de membrana, ou de forma intrínseca, que ocorre pela ativação de uma família de proteases denominadas caspases, que atuam através de reações em cascata. Fatores como danos genéticos irreparáveis, estresse oxidativo e hipóxia são gatilhos que intensificam a sinalização desta via (Elmore, 2007; Pistritto *et al*, 2016, D'Arcy, 2019).

Desequilíbrios na regulação da morte celular têm relevante destaque para o desenvolvimento de doenças. O câncer é uma delas, visto o crescimento desordenado de células cujo material genético sofreu mutações, conseguindo passar pelos mecanismos de reparo (Elmore, 2007; Sakthivel & Hariharan, 2019).

O perfil nocivo destas células geralmente resulta do acúmulo de danos na estrutura do DNA ao longo do tempo com capacidade de invasão de tecidos adjacentes à sua origem, o que configura a malignidade do tumor (WCRF, 2018). Histologicamente, neoplasias colorretais podem receber três classificações - adenocarcinoma do tipo intestinal, adenocarcinoma mucinoso e carcinoma de células de anel de sinete - visto que múltiplos genes têm sido associados aos diferentes tipos morfológicos (Wei *et al*, 2016).

O CCR é o terceiro tipo de neoplasia maligna mais prevalente no mundo. Caracteriza-se como uma doença heterogênea, provocada por alterações genéticas, epigenéticas e ambientais culminando em alterações morfológicas epiteliais da mucosa intestinal o que dificulta as estratégias de tratamento, porém, quando diagnosticado precocemente, é passível de cura (Lee *et al*, 2016; Brychtová *et al*, 2017, INCA, 2020).

As últimas estimativas globais de diagnóstico e mortalidade por câncer divulgadas no ano de 2018, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) - GLOBOCAN, apontaram incidência de 18,1 milhões de casos e 9,6 milhões de óbitos. Para ambos os sexos, o CCR ficou em quarto lugar como a neoplasia mais diagnosticada e segunda principal causa de morte, sendo 1,8 milhões casos novos de CCR e 881.000 mortes, representando cerca de 1 em cada 10 casos (Bray *et al*, 2018). Nos Estados Unidos, a American Cancer Society (2019) estimou mais de 140 mil novos casos de tumores malignos de cólon e reto para ano de 2019. Projeções futuras não são otimistas. Estudos preveem que as mortes por câncer de cólon e reto aumentem substancialmente até a próxima década em quase todos os países. Estima-se que para 2035, o número total de mortes pode ter um aumento em mais de 60% quando comparados a 2013 (casos de câncer de cólon: 158.816 vs. 254.165; casos de câncer retal: 72.649 vs. 124.614), com mais de 2,2 milhões de diagnósticos (Arnold *et al*, 2017; Pilleron *et al*, 2019; Araghi *et al*, 2019)

Na esfera nacional, pesquisas epidemiológicas do INCA (2020) preveem a ocorrência de 20.520 casos novos de CCR em homens e 20.470 em mulheres por ano, entre 2020 e 2022, com prevalência nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país.

Para a maioria dos casos, não há fator de risco que, isoladamente, represente os casos de CCR (Brenner *et al*, 2014; Araghi *et al*, 2019). Aspectos como o alto consumo de alimentos ultraprocessados, carne vermelha, bebidas alcoólicas, obesidade, baixo consumo de grãos integrais, fibras, cálcio e folato, somado a inatividade física, têm sido relatados como potencializadores para a carcinogênese, especialmente para o CCR (Ronocucci &

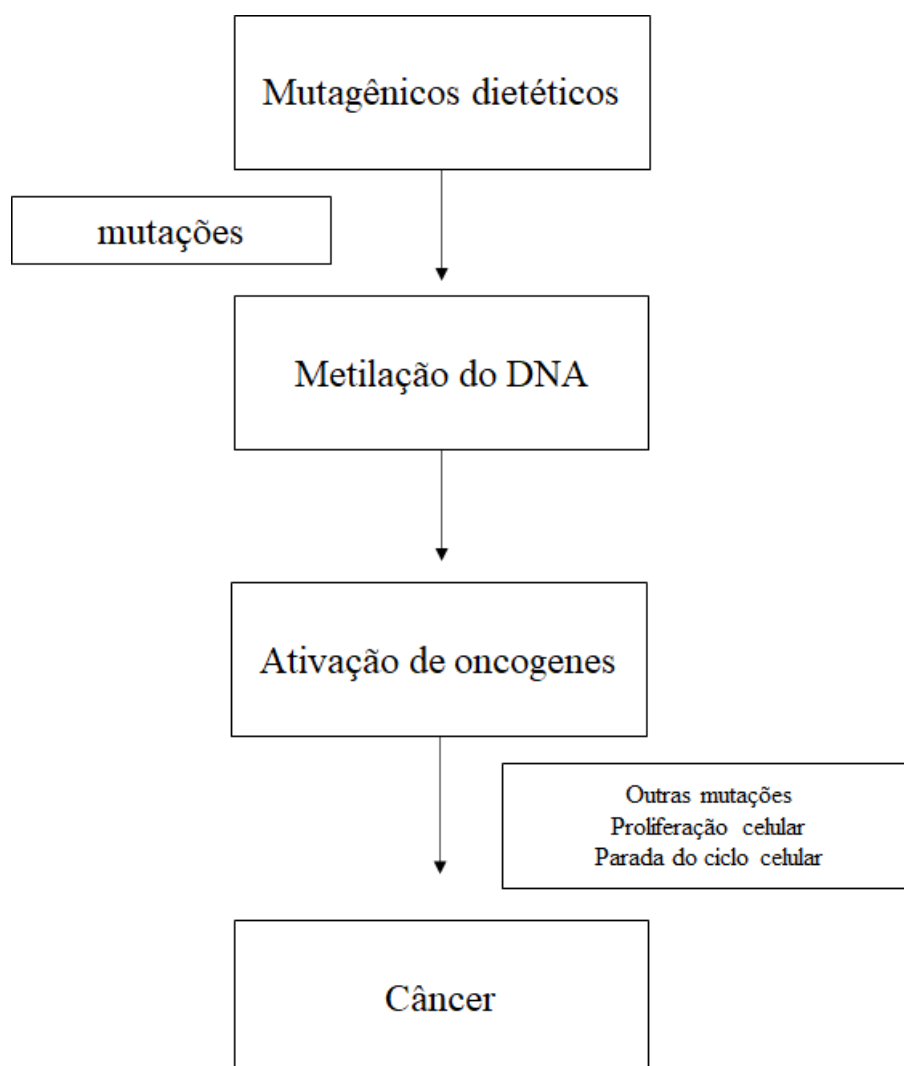


Mariani, 2015; Song *et al.*, 2015; Fiolet *et al.*, 2018; Petimar *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Neoplasia hereditária e doenças inflamatórias intestinais, com destaque para colite ulcerativa e doença de Chron, também são fatores que agravam este risco que geralmente está associado à extensão e tempo de duração da doença (Sairenji *et al.*, 2017; Huang & Merchea, 2017).

Métodos de rastreio e diagnóstico do CCR incluem sangue oculto nas fezes e a colonoscopia que, embora necessite de medidas preparatórias como esvaziamento intestinal e sedação do paciente, o exame é considerado padrão ouro por sua alta sensibilidade e especificidade, com possibilidade de identificação precoce e ressecção do tumor e/ou pólipos pré-cancerosos (Issa & Noureddine, 2017; Bray *et al.*, 2017). Estratégias profiláticas para o CCR são a prevenção primária, que atuam frente aos fatores de risco como dieta e o estilo de vida. A prevenção secundária visa o diagnóstico precoce de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas em indivíduos considerados de risco aumentado como consequência da hereditariedade e por doenças inflamatórias intestinais (Roncucci & Mariani 2015).

## 2.2 PATOGÊNESE MOLECULAR DO CÂNCER COLORRETAL

A patogênese molecular do CCR é complexa (Bray *et al.*, 2017). A doença surge através de alterações histológicas graduais, chamada sequência adenoma-carcinoma, acompanhadas de mutações genéticas em um oncogene específico ou gene supressor de tumor (Fodde, 2002; Ohuchi *et al.*, 2018). As diferentes mutações evoluem para um fenótipo celular proliferativo, através da atuação de oncogenes e genes supressores de tumor (Figura 1).



**Figura 1** - Mutagênicos dietéticos e desenvolvimento do câncer (Fonte: Adaptado de Nasir *et al*, 2019)

Mutações no oncogene KRAS, que induz o crescimento celular e previne a apoptose, no proto-oncogene BRAF, que atua na divisão e diferenciação celular e no gene TP53, frequentemente estão associadas à instabilidade cromossômica que leva ao aparecimento do fenótipo neoplásico (Bhalla *et al*, 2018; Genetics Home Reference, 2019). Alterações no gene APC (Adenomatous Polyposis Coli), que atua sobre a diferenciação e controle do ciclo celular, impedindo a progressão da fase G1 para fase de síntese de DNA, têm sido apontadas como os primeiros eventos que desencadeiam tanto a carcinogênese colorretal hereditária quanto a esporádica (Brenner *et al*, 2014; Bhalla *et al*, 2018; Cheng *et al*, 2019) e a perda da função APC, seja por inativação ou deleção cromossômica, desencadeia esta série de alterações moleculares e histológicas (Fodde, 2002; Zhong & Virshup, 2019).

Pacientes com CCR apresentam mutações em pelo menos uma das vias de sinalização do tipo Wntless (Wnt) (Bahrami *et al*, 2017). O gene APC também é regulador desta via mediado por  $\beta$ -catenina (Wnt/  $\beta$ -catenina) no trato gastrointestinal (Zhang & Shai, 2017). Falhas na atividade APC levam ao acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma que transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição de genes implicados na tumorigênese, proliferação celular e angiogênese, bem como à resistência terapêutica (Bhalla *et al*, 2018; Cheng *et al*, 2019, Song *et al*, 2019).

As abordagens medicamentosas para o CCR avançado envolvem quimioterapias combinadas. Mutações do tipo KRAS e BRAF e outras que não envolvem o sistema APC, provocadas por mutações no gene de reparo da via mismatch repair (MMR), com a consequente incapacidade de corrigir erros de DNA que ocorrem durante a divisão celular, configuram importantes mecanismos de resistência ao tratamento uma vez que este sistema é responsável por cerca de 80 a 85% dos cânceres de cólon esporádicos (Zhang & Shai, 2017; Ganesh *et al*, 2019; Boussios *et al*, 2019).

Instabilidade cromossômica (CIN), instabilidade de microssatélite (MSI) e fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP) são alterações moleculares identificadas no CCR que permitem o acúmulo de mutações. A instabilidade genômica, aberrações cromossômicas e promotores de hipermetilação do DNA contribuem de forma significativa para a expressão gênica desregulada e as consequentes mutações, assim como a resistência aos medicamentos (Hata *et al*, 2016 ; Schottenfeld, 2017 ; Brychtová *et al*, 2017; Rodriguez-Salas *et al*, 2017).

Devido ao fato de as células cancerígenas portarem mecanismos celulares complexos, a quimio resistência torna-se uma barreira à terapêutica oncológica. Este fator acaba por ser um impulso a novas pesquisas que visam a busca de alternativas adjuvantes ao tratamento convencional do mesmo modo que a prevenção do câncer (Kumar & Adki, 2018).

### 2.3 ALGAS MARINHAS E COMPOSTOS BIOATIVOS

Os oceanos representam uma extensa superfície do planeta com uma ampla diversidade biológica, compreendendo um ambiente extremamente competitivo, tanto interespecies como intra espécies (Alves *et al*, 2018). Nas últimas décadas, o ambiente marinho tem despertado interesse dos pesquisadores que estudam novos compostos com atuação em diversas doenças, por representar um importante e heterogêneo recurso natural (Talero *et al*, 2015; Gogineni & Hamann, 2018; Oh *et al*, 2019).

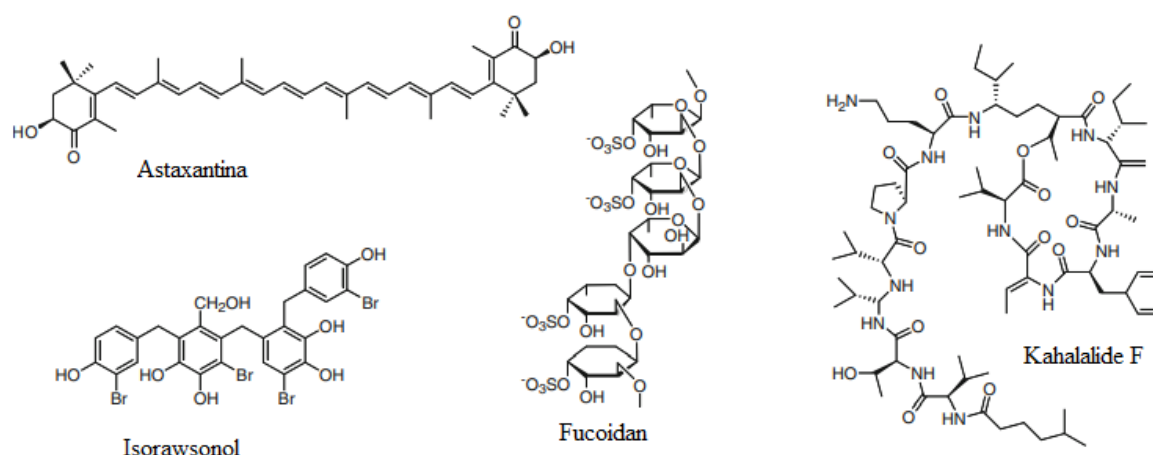
Dentre os inúmeros organismos vivos que habitam este ecossistema, as algas fazem parte da cultura alimentar de diversas populações, sendo mais comum na população oriental, especialmente no Japão, China e na República da Coreia (Seca & Pinto, 2018). De modo geral, sua composição química revela um significativo valor nutricional, sendo fontes alimentares de proteínas, polissacarídeos, ácido graxos poli-insaturados, vitaminas, minerais, fibras solúveis, fitoquímicos e compostos antioxidantes, além de terem baixo teor calórico (Rodrigues *et al*, 2015; Martínez-Hernández *et al*, 2017; Wells *et al*, 2017). De acordo com estudos epidemiológicos, sua inclusão na dieta asiática tem sido associada a uma menor incidência de doenças crônicas, como hiperlipidemia, doença coronariana, diabetes e câncer, quando comparado aos hábitos alimentares ocidentais (Bouga & Combet, 2014).

Podem ser classificadas conforme seu tamanho, em micro ou macroalgas, variando de 0,2 a 2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro até 60 m de comprimento, respectivamente (Christaki *et al*, 2012; Sathasivam *et al*, 2018). São organismos primitivos, predominantemente aquáticos e autotróficos, com alta capacidade de sintetizar clorofila e carotenóides e que possuem relevante importância para o equilíbrio da atmosfera terrestre ao fornecer oxigênio para o ambiente (Christaki *et al*, 2012; Jibril *et al*, 2016).

As macroalgas podem crescer tanto na superfície de áreas costeiras, quanto nas profundezas do oceano; recebem três classificações distintas quanto a presença de pigmentos específicos que podem ser: Clorófitas (algas verdes), Feófitas (algas marrons) e Rodófitas (algas vermelhas) (Christaki *et al*, 2012). Algas verdes, que são mais superficiais, têm capacidade de absorver grandes quantidades de energia solar, ao passo que as algas vermelhas e marrons, predominam regiões mais profundas onde a luz solar é limitada (Christaki *et al*, 2012).

As algas vivem em constante competição no ambiente em que habitam (Cardozo *et al*, 2007). Uma vez que são incapazes de se locomover voluntariamente para fugir de predadores, seus mecanismos de defesa, de controle de crescimento de espécies competidoras ou de sobrevivência em frequentes variações climáticas (salinidade, radiação UV e temperatura) envolvem diversos recursos bioquímicos adaptativos, como o metabolismo secundário, resultando na produção de substâncias biologicamente ativas que têm despertado um importante potencial farmacológico (Cabrita *et al*, 2010; Alves *et al*, 2018, Abd El-Hack *et al*, 2019; Gurpilhares *et al*, 2019). Os metabólitos secundários são biomoléculas produzidas amplamente na natureza que conferem ao organismo vantagens de sobrevivência como a proteção contra estressores ambientais e defesa metabólica, sendo amplamente utilizados como ingredientes ativos de drogas na medicina como antibióticos e drogas antitumorais (Breitling *et al*, 2013; Giordano *et al*, 2015). Metabólitos como terpenóides, incluindo carotenóides, polifenóis e alcaloides podem ser encontrados em algas marinhas (Plouguerné *et al*, 2014; Rocha *et al*, 2018).

Nas últimas décadas, análises químicas de algas mostraram que elas são ricas em carotenoides, compostos fenólicos e alcalóides e ensaios biológicos têm demonstrado que diversos desses metabólitos têm atividades farmacológicas promissoras tais como antibiótica, anticoagulante, antioxidante, hipotensiva, antitrombótica e citotóxica, inclusive na terapia contra o câncer, visto que diversos compostos com atividade antitumoral foram isolados de algas marinhas (Figura 2) como astaxantina, isorawsonol, fucoïdan e kahalalide F (Folmer *et al*, 2010; Stabili *et al*, 2014; Fernando *et al*, 2016; Rocha *et al*, 2018).



**Figura 2** – Estrutura química de metabólitos com atividade antitumoral isolados a partir de algas marinhas (Fonte: Adaptado de Folmer *et al*, 2010).

A pesquisa de novos agentes terapêuticos que apresentam atividade antiproliferativa têm sido focada em compostos de fontes naturais por apresentarem alternativas interessantes para o tratamento de vários tipos de câncer, visto que os efeitos colaterais são moderadamente baixos e, aqueles derivados de organismos marinhos estão sendo submetidos a ensaios clínicos com indicações para terapêutica oncológica (Delgado-Roche *et al*, 2018; Alves *et al*, 2018; Olivares-Bañuelos *et al*, 2019; Abd El-Hack *et al*, 2019).

Produtos de origem marinha possuem propriedades medicinais potenciais e são estudados como uma fonte de agentes anticâncer (Phull & Kim, 2019; Lefranc *et al*, 2019). Inúmeros compostos provenientes do mar já foram identificados e o isolamento de substâncias com ação antitumoral tem sido relatado em várias referências nos últimos anos em estudos por meio de estudos moleculares e celulares, especialmente das algas (Schumacher *et al*, 2011; Sharif *et al*, 2015, Rosa *et al*, 2020).

Agentes antitumorais derivados de algas marinhas podem ser vistos de duas maneiras: (1) na forma de alimento, quando ingeridas *in natura*, estudos indicam que podem fornecer alguma proteção contra o desenvolvimento de cânceres, no entanto, quando preparadas como um (2) extrato concentrado, há evidências de que as algas contêm moléculas com propriedades citotóxicas sobre diversas linhagens celulares tumorais, incluindo efeitos sobre o câncer colorretal (Kim & Karagozlu, 2011; Singh & Varshney,

2013; Murphy *et al*, 2014). O potencial antitumoral das algas marinhas junto à terapêutica do câncer tem sido explorado principalmente utilizando frações parcialmente purificadas ou extratos brutos (Murphy *et al*, 2014; Cheong *et al*, 2018; Hsu *et al*, 2019; Yan *et al*, 2019).

## 2.4 O AMBIENTE ANTÁRTICO E A FLORA ALGAL

Segundo Bernardi *et al* (2016), os organismos que vivem em regiões polares adquiriram formas altamente eficazes de extrair os elementos necessários para a sobrevivência nesses ambientes. A Antártida é um continente coberto de gelo cercado pelo Oceano Antártico localizado no extremo sul do planeta que sofre severas variações climáticas (Ruisi *et al*, 2007; Wiencke & Amsler, 2012). A amplitude térmica (0°C à -70°C) e a luminosidade - sofrendo alta radiação UV nos meses de verão em contrapartida à total escuridão no inverno - são os principais fatores adaptativos das algas (Holzinger, 2011; Quartino *et al*, 2013; Furbino *et al*, 2014; Gómez & Huovinen, 2020).

O primeiro registro a respeito da existência de algas nesta região foi através de pesquisas realizadas durante expedições marítimas no início do século XIX (Oliveira *et al*, 2009). A população de macroalgas antárticas é altamente específica desta região devido ao poder adaptativo das espécies; A flora algal é composta por mais de 100 espécies já descritas dentre as quais mais da metade são exclusivas do continente, sendo que 36% das rodófitas e 18% dos clorófitas são endêmicas (Godinho *et al*, 2013; Alvarado & Leiva, 2017; Alvarado *et al*, 2018).

Clorófitas monostromáticas são macroalgas marinhas de hábitat bastante heterogêneo, podendo ser encontradas em zonas temperadas, subtropicais e ambientes polares. A *Monostroma hariatii* (Gain), uma espécie do gênero *Monostroma*, possui coloração verde escura e sua morfologia é semelhante a um saco ou vesícula que pode chegar até 30 cm de comprimento (Bernardi & Pellizzari, 2013).



Figura 3 - *Monostroma hariotii*: morfologia em aspecto vesicular. (Fonte: Adaptado de Bernardi & Pellizzari, 2013.)

Algas do gênero *Iridaea* já foram catalogadas com mais de 35 espécies podendo ser encontradas no norte do Oceano Pacífico, na América do Sul, áreas temperadas e boreais (Hannach *et al*, 1986). *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent é uma alga rodófito antártica, com ocorrência abundante na zona sublitoral superior e sua reprodução e crescimento acontece nos meses de verão (Zacher *et al*, 2009; Kim *et al*, 2016). É uma espécie comum em localidades rasas, mas pode ser encontrada a uma profundidade de 30 metros (Wiencke & Amsler, 2012; Schoenrock *et al*, 2015).



**Figura 4** - *Iridaea cordata*: vista geral do talo (Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil - PhD. Mutue Toyota Fujii e PhD Nair S. Yokoya).

A população de macroalgas na região Antártica é abundante. Diversos estudos apontam que estes organismos têm atividade antitumoral *in vitro*, quando utilizados na forma de extrato, mostrando-se uma relevante fonte de ação antiproliferativa (Moussavou *et al*, 2014;



Gambato *et al*, 2013; Martins *et al*, 2018, Frassini *et al*, 2019). Os efeitos de extratos e compostos oriundos de macroalgas em linhagem de câncer de mama e colorretal estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Macroalgas e efeitos de extratos e compostos em linhagem de câncer de mama e colorretal

Alga	Natureza	Câncer colorretal	Câncer de mama	Outros cânceres	Composto ativo	IC <sub>50</sub>	Referência
<i>Fucus</i> sp.	Marrom	+	+	-	Fucoidan	5 - 20 µg.mL <sup>-1</sup>	Kim <i>et al</i> , 2010
<i>Styodidium</i> sp.	Marrom	+	-	+	Meroditerpenoides	12,2 µM e 14 µM	Pereira <i>et al</i> , 2011
<i>Sargassum muticum</i>	Marrom	-	+	-	Polifenol	0,2 µg.mL <sup>-1</sup>	Namvar <i>et al</i> , 2013
<i>Ulva fasciata</i>	Verde	-	-	+	Flavonoides	200 µg.mL <sup>-1</sup>	Ruy <i>et al</i> , 2013
<i>Laminaria</i> sp.	Marrom	+	-	-	Laminarina		Park <i>et al</i> , 2012;2013
<i>Laurencia</i> sp.	Vermelha	+	-	-	Dactylone	45,4 µmol.L <sup>-1</sup>	Federov <i>et al</i> , 2007
<i>Ishige okamurae</i> e <i>Phoma herbarum</i>	Vermelha	-	-	+	Extratos etanólicos		Kim <i>et al</i> , 2009
<i>Lithothamnion</i> sp.	Vermelha	+	-	-	Cellfood*		Aslam <i>et al</i> , 2009
<i>Porphyra dentata</i>	Vermelha	-	+	-	Frações esteróis	48,3 µg.mL <sup>-1</sup>	Kaslowska <i>et al</i> , 2013
<i>Cymopolia barbata</i>	Verde	-	+	-	Inibidores CYP1	19,82 µM e 55,65 µM	Badal <i>et al</i> , 2013
<i>Lophocladia</i> sp.	Vermelha	-	+	-	Lophocladines	3,1 µM e 64,6 µM	Gross, 2006
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Marrom	-	+	-	Fucoidan		Pavia <i>et al</i> , 1996
<i>Gracilaria termistipitata</i>	Vermelha	-	-	+	Extratos metanólicos		Ji <i>et al</i> , 2012
<i>Enteromorpha intestinalis</i> e <i>Rizoclonium riparium</i>	Verde	-	-	+	Extratos metanólicos	309,5 µg.mL <sup>-1</sup> e 506,08 µg.mL <sup>-1</sup>	Paul <i>et al</i> , 2013
<i>Aspergillus</i> sp.	Marrom	-	-	+	Gliotoxin		Nguyen <i>et al</i> , 2014

+: efeito reportado; -: efeito não reportado; IC<sub>50</sub> = metade da concentração inibitória máxima; Algas com dois valores de IC50 tiveram dois compostos testados; \*cellfood = todos os sais minerais e elementos traço extraídos de algas (adaptado de Moussavou *et al.*, 2014).

## 2.5 ATIVIDADE DE MACROALGAS CONTRA TUMORES COLORRETAIS

As propriedades farmacológicas provenientes de algas marinhas devem-se à presença de metabólitos diversos, a atividade antitumoral é uma delas (Rocha *et al*, 2018). Entretanto, estudos diretamente focados em tumores colorretais são escassos.

Em 2010, Go *et al*. Isolaram uma glicoproteína a partir da alga *Laminaria japonica*, denominada (LJGP). O composto apresentou atividade antiproliferativa induzindo a apoptose das células HT-29 por meio da indução da expressão de proteínas relacionadas à morte celular e parada de ciclo.

Efeitos de extratos brutos têm sido reportados na literatura. Namvar *et al* (2014) estudaram a atividade antitumoral do extrato metanólico de três espécies de macroalgas sobre cinco células de câncer humano, incluindo adenocarcinoma de cólon (HT-29). Eles evidenciaram que os extratos foram citotóxicos sobre todas as linhagens, além de terem sido seletivos para as células tumorais.

Há pouco tempo, um ensaio clínico (Tsai *et al*, 2017) foi conduzido em pacientes com câncer de cólon. Foi investigado o efeito de um suplemento oral de fucoidan, composto identificado e isolado de algas marinhas, administrado em conjunto com a quimioterapia. Os pacientes do grupo controle apresentaram uma taxa de controle da doença significativamente melhor em comparação com os pacientes do grupo placebo, entretanto, o papel do metabólito como adjuvante ao tratamento, ainda não é completamente esclarecido.

Estudos *in vitro* têm reportado que compostos presentes em algas marinhas sejam promissoras fontes de atividade antitumoral e, por se tratar de um elemento presente na cultura alimentar de diversas populações, tumores do aparelho digestivo, como os de cólon e reto, têm sido alvo de estudo (Peñalver *et al*, 2020). Frassini *et al* (2019) identificaram uma importante atividade citotóxica a partir de extratos brutos de algas antárticas (*C. jacquiniotii*, *I. cordata* e *D. anceps*) sobre células HCT-116. Os autores também identificaram a presença de carotenóides como astaxantina e fucoxantina nas amostras, compostos já reportados na literatura com atividade antitumoral.

Um estudo *in vitro* recente (Al Monla *et al*, 2020) reportou um relevante efeito citotóxico de extratos da alga marrom *Colpomenia sinuosa* sobre a linhagem HCT-116, por meio da regulação de proteínas ativadoras de caspases. Eles também identificaram que os

extratos foram capazes de provocar importantes alterações morfológicas, além de diminuir significativamente a migração celular, também de forma seletiva.

Os compostos isolados bem como os extratos oriundos de macroalgas têm se mostrado ativos contra a progressão de diversos tipos de tumores, especialmente tumores de cólon. Ainda não há na literatura um número significativo de evidências desta atividade de macroalgas antárticas sobre tumores colorretais. São organismos de difícil acesso e, por viverem em um habitat quase intocado pelo ser humano, preservam no seu metabolismo a produção de compostos que as protegem do meio ambiente e que podem ser explorados como recurso tecnológico para o estudo e desenvolvimento de terapias preventivas e/ou adjuvantes ao tratamento oncológico.

**Tabela 2** – Atividade *in vitro* de macroalgas sobre tumores colorretais.

<b>Alga</b>	<b>Natureza do estudo</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>Referência</b>
<i>L. japônica</i>	Composto isolado <i>In vitro</i> (HT-29)	IC <sub>50</sub> (100 µg.mL <sup>-1</sup> 24h)	<i>Go et al, 2010</i>
<i>G.corticata</i> <i>S. ilicifolium</i> <i>U.fasicata</i>	<i>Extrato bruto</i> <i>In vitro</i> (HT-29)	IC <sub>50</sub> (250 µg.mL <sup>-1</sup> 24h) IC <sub>50</sub> (300 µg.mL <sup>-1</sup> 24h) IC <sub>50</sub> (>400 µg.mL <sup>-1</sup> 24h)	<i>Namvar et al, 2014</i>
<i>C.Jacquintii</i> , <i>I. cordata</i> <i>D.anceps</i>	<i>Extrato bruto</i> <i>In vitro</i> (HCT-116)	IC <sub>50</sub> (70,4 µg.mL <sup>-1</sup> 24h) IC <sub>50</sub> (115,9 µg.mL <sup>-1</sup> 24h) IC <sub>50</sub> (87,7 µg.mL <sup>-1</sup> 24h)	<i>Frassini et al, 2019</i>
<i>C. sinuosa</i>	<i>Extrato bruto</i> <i>In vitro</i> (HCT-116) <i>In vitro</i> (HCT-116)	IC <sub>50</sub> (42 µg.mL <sup>-1</sup> 24h) IC <sub>50</sub> (379 µg.mL <sup>-1</sup> 24h)	<i>Al Monla et al, 2020</i>

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antitumoral de extratos das macroalgas antárticas *Monostroma hariatii* (Gain) e *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent contra a linhagem celular tumoral HCT – 116 e investigar a indução de morte celular programada em células expostas aos extratos das macroalgas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente os extratos por cromatografia a gás acoplada a espectro de massas (CG-MS);
- Verificar a ação antioxidante dos extratos das macroalgas pelo método DPPH;
- Avaliar o efeito citotóxico dos extratos das macroalgas *Monostroma hariatii* e *Iridaea cordata* pelo ensaio MTT sobre a linhagem HCT-116;
- Analisar as alterações morfológicas em células HCT-116 após exposição da linhagem HCT-116 as diferentes concentrações dos extratos;
- Avaliar a indução de processos apoptóticos em células HCT-116 após exposição às diferentes concentrações dos extratos;
- Quantificar células apoptóticas / necróticas expostas aos extratos das macroalgas pelo ensaio de citometria de fluxo;

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CAPÍTULO 1

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico. O artigo intitulado “*Monostroma (Gain) and Iridaea (Turner) Bory: Antioxidant profile and cytotoxic activity against colorectal cancer cells HCT-116 from extracts of Antarctic Seaweeds*” foi submetido à revista “Marine Chemistry”, sob o número de manuscrito: MARCHE-D-22-00047. A formatação está de acordo com as normas do periódico.

***Monostroma (Gain) and Iridaea (Turner) Bory: Antioxidant profile and cytotoxic activity against colorectal cancer cells HCT-116 from extracts of Antarctic Seaweeds.***

Bianca Tavares Canci<sup>1</sup>, Rafaele Frassini<sup>1</sup>, Aline Fávero<sup>1</sup>, Sidnei Moura<sup>2</sup>, Fernando Joel Scariot<sup>3</sup>, Sérgio Laguna Echevenrigaray<sup>3</sup>, Vanessa Sayuri Osaki<sup>4</sup>, Franciane Pellizzari<sup>4</sup>, Pio Colepicolo<sup>5</sup>, João Antonio Pêgas Henriques<sup>1</sup>, Mariana Roesch-Ely<sup>1,\*</sup>

1. Laboratory of Applied Toxicology and Bioproducts, 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 Phycology and Marine Water Quality, 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 Toxicologia Aplicada e Bioprodutos, 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](mailto:mrely@ucs.br).

**Abstract:**

**Background/Aim:** Colorectal cancer (CRC) is the third most prevalent in the world population. In the last decades, the marine environment has aroused research interest in its immense biodiversity and seaweed has been explored as a potential candidate for cancer research. This work aimed to characterize chemically extracts from two species of Antarctic seaweeds and to evaluate the antioxidant and cytotoxic activity in HCT-116 cell line. The extracts were obtained by depletion, in which the samples were eluted in solvent for 24 hours and were identified by gas chromatography associated with mass spectrometry (GC-MS). Cell viability was determined by the MTT assay. Cell morphology was determined by Giemsa stain. Cellular apoptosis was identified by acridine orange / ethidium bromide (AO / EB) staining and flow cytometry. The antioxidant potential was determined by the DPPH radical inhibition method. Four extracts were obtained: MHE / MHM (*Monostroma hariatii*) ICH / ICC (*Iridaea cordata*). The methanolic extract of *M. hariatii* was not able to inhibit the cell proliferation within 24 hours of treatment. On the other hand, the ethanolic extract has been shown to have activity against the cell line. Although both extracts of *I. cordata* (ICH and ICC) have a dose-response action against cell death. Two major compounds were identified in the MHE and ICC extracts: phytol and palmitic acid, characteristics of seaweed. The 24-hour treatment with MHE and ICC extracts caused morphological changes in the cell line at the tested concentrations. Apoptosis and necrosis were identified. The tests in fluorescence microscopy (OA / EB) and flow cytometry (annexin-V / PI) showed the effects after 24-hour exposure with the MHE and ICC extracts. The ethanolic extracts of the green seaweed *M. hariatii* and the chloroformic extract from the red seaweed *I. cordata* may be a source for compounds against the CRC.

**Keywords:** Antarctic zone, antitumor activity, seaweeds resources, antioxidants

## 1. Introduction

Cancer is referred to as a large group of diseases whose speed of growth and proliferation of mutated cells occurs exponentially with the ability to invade adjacent tissues (WHO, 2022). Colorectal cancer (CRC) is the third most prevalent malignant neoplasm in the global population after lung and breast cancer (INCA, 2020). Epidemiological data show that a large part of human carcinogenesis is associated with lifestyle and feeding habits, estimated at 30% to 40% for different types of tumor (Mehra et al, 2017; Nasir et al, 2019; Almeida et al 2019). Future projections are not optimistic and studies indicate a 60% increase for new cases, with more than 2.2 million diagnoses and 1.1 million deaths by 2030 (Arnold, et al, 2017). In Brazil, epidemiological research (INCA, 2020) predicts the occurrence of 20.520 new cases of CRC in men and 20.470 in women per year, between 2020 and 2022.

No isolated risk factor may induce cases of CRC (Brenner et al, 2014), although, aspects such as high consumption of ultra-processed foods, red meat, obesity, and physical inactivity, have been reported as enhancers for carcinogenesis, especially for CRC (Rinocucci L, Mariani F, 2015; Petimar et al, 2018; Silva et al, 2018; Lavalette et al, 2018).

In the last decades, the marine environment has aroused the interest of researchers studying new compounds that act in the prevention and treatment of several diseases, as it represents an important and heterogeneous natural resource (Talero et al, 2015; Gogineni, V, Hamann M, 2018; Oh et al, 2019). Among the countless living organisms that inhabit this ecosystem, edible seaweeds are part of the feeding culture of several populations (Pelizzari F, Reis R, 2011; Seca A, Pinto D, 2018). Biological tests have shown that several seaweed metabolites have promising pharmacological activities such as antioxidant, antibiotic, and cytotoxic, included in cancer therapy since several compounds with antitumor activity have been studied and isolated from seaweed (Folmer et al, 2010; Stabili et al, 2014; Fernando et al, 2016; Rocha et al, 2018; Frassini et al, 2019).

The antitumor potential of seaweed has been explored mainly using partially purified fractions or crude extracts (Murphy et al, 2014). Several studies suggest that these organisms have antitumor activity *in vitro*, when used in the form of extract, showing a promising source of cancer cells (Gambato et al, 2013; Mousavou et al, 2014; Martins et al, 2018; Frassini et al, 2019; Al Monla et al, 2020).



The bioactive potential of macroalgal extracts with antitumor activity has been studied across the globe, however, studies with polar organisms are scarce, after all, this type of research involves financial, logistical, and human resources that require a series of preparations for the entire process, from the collection, cleaning, storage to the arrival of the sample in the research laboratory that minimize the natural degradation process so that the sample is as complete as possible.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the antitumor activity of crude extracts from the Antarctic seaweeds *Monostroma hariatii* (Gan) and *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent, on the tumor cell line HCT-116, as well as its chemical characterization and antioxidant activity.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Reagents**

Dulbecco's modified eagle's medium–high glucose (DMEM), heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), trypsin–EDTA, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hexane, chloroform, ethanol, and methanol were obtained from Synth (Brazil). All other chemicals were of ultrapure grade and obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **2.2. Seaweed sampling and Preparation of Extracts**

The green seaweed *Monostroma hariatii* and the red seaweed *Iridaea cordata* (Table 1) were collected during the expeditions of the Program Brazilian Antarctic (SECIRM – Brazilian Navy) in the austral summer of 2015 and 2017, respectively. Further details from geographic location of species and sampling status are listed in Table 1.

**Table 1.** Antarctic sampling along the South Shetland Islands – SSI. Locations tested *Monostroma hariatii* (Chlorophyta) and *Iridaea cordata* (Rhodophyta).

Species	Date	Sampling Site	Geographic Position
<i>M. hariatii</i>	18/01/2017	Snow Island	64°28'0''S 57°12'0''W
<i>I. cordata</i>	13/01/2015	Greenwich Island	62°26'40''S 59°43'29,8''W

Seaweeds 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 specimen morphology, following Guiry and Guiry (2021 – AlgaeBase). Exsiccate specimens were deposited and reproductive features in the Herbarium of Botanical Institute of São Paulo (SP), Brazil.

The extracts were obtained by depletion, samples were eluted in methanol and ethanol, hexane and chloroform, in a 1:10 ratio, remaining in the solvent for 24 hours. The extracts from two consecutive baths, for each solvent, were collected and filtered using filter paper Whatmann n° 1. After filtration, the extracts were combined and concentrated to dryness under vacuum at 40 ° C. The crude extracts were kept in the dark and dried at -20 ° C until the further biochemical tests.

### **2.3. Chemical Characterization of Seaweeds Extracts using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS)**

The extracts were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a 30 cm fused silica capillary column (HP-5MS with 0.25 µm film, Agilent). A sample (1 µL) was injected at a temperature of 220°C with a split of 1:10. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> with the following temperature ramp: initial temperature of 60 °C with 5 °C per min ramp up to 260 °C, which was maintained for 10 min. Peak identification of crude algal extracts was

performed based on comparing the obtained mass spectra with those available in NIST 08 and Wiley9 libraries.

#### **2.4. Radical DPPH Scavenging Activity (2,2 -Diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging activity) of Seaweed Extracts from Antarctica.**

The tests to verify the antioxidant properties of the two species of sampled macroalgae were performed using the inhibition of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl), described by Kim et al (2002) and adapted from Bernardi et al (2016). A 1500  $\mu$ l aliquot of the DPPH solution (Sigma, 0.01 g in ethanol PA) was added to 1200  $\mu$ l of Tris-HCl (15g of Trisma Base in 100 ml of ultrapure water, pH = 7) and 1000  $\mu$ l of sample. A 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, where abs = absorbance spectrum.

#### **2.5. Cell Culture and Cytotoxic Assay using Antarctic Seaweed Extracts.**

HCT-116 (human colorectal cancer cell line) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC - CCL247), Manassas, VA, USA. Cells were cultured in DMEM culture medium supplemented with 10 % heat-inactivated FBS. Cells were maintained in a humidified atmosphere at 37 °C, in 5 % CO<sub>2</sub>, and 95 % air. The cytotoxicity study was performed when the cells reached 70-80 % confluence.

Cytotoxic analysis was assessed by the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) method. Cells were cultured in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells / cm<sup>3</sup>. After 24 hours incubation, the cells were treated with increasing concentrations of extracts for 24 hours. 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 sulfoxide. The optical density (OD) was measured at 570 nm. IC<sub>50</sub> was calculated by GraphPad Prism version 5.0.

## 2.6. Cellular Morphology Test by Giemsa Stain

HCT-116 cells were cultured in round coverslips in 24-well plates at  $5 \times 10^4$  cells /  $\text{cm}^3$ . After cell attachment to glass slides, the medium was removed and extracts were added to the wells for 24 hours at the  $\text{IC}_{50}$  dose and half of this concentration ( $\text{IC}_{25}$ ). For Giemsa staining, the treatment culture 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 analyzed under light microscopy.

## 2.7. Dual Apoptosis Test with Acridine Orange / Ethidium Bromide

HCT-116 cells were cultured in a 6-well plate and treated with concentrations of  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{IC}_{25}$  from the selected extracts. After 24 hours, the cells were washed with PBS, detached from the wells with trypsin and resuspended in 50  $\mu\text{L}$  of PBS. The cells were stained with 100  $\mu\text{g}$  /  $\text{mL}$  of acridine orange and 100  $\mu\text{g}$  /  $\text{mL}$  of ethidium bromide and visualized on an Olympus BX43 fluorescent microscope. Acridine orange penetrates in normal cells and early apoptosis events, with intact 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 DMSO.

## 2.8. Apoptotic Cell revealed by Annexin-V

HCT-116 cells ( $5 \times 10^5$  /  $\text{cm}^3$ ) were seeded in 6-well plates with supplemented culture medium. After 24 hours, the cells were treated with the concentrations of  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{IC}_{25}$  of the selected extracts. 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. For the cell death assay, cells were stained with propidium iodide using the Apoptosis Detection Kit V-FITC (APOAF, Sigma, USA), according to the manufacturer's instructions. For cell cycle distribution, trypsin-digested cells were collected by centrifugation (1800 rpm for 7 min) in PBS. The cell pellets were gently resuspended, fixed in cold 70% ethanol and stored overnight at  $-20^\circ \text{C}$ . Before analysis, cells were collected by

centrifugation to remove ethanol, gently resuspended in PBS and pelleted again. The cells were then resuspended in Triton X-100 added in PBS for permeabilization, followed by incubation with RNase A and propidium iodide in the dark for 30 min at room temperature. The cells were then analyzed by flow cytometry using a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson LTDA). Data was collected by CellQuest Pro Software (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo (TreeStar, Inc). The experimental procedures were performed in triplicate.

## **2.9. 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. Antarctic Seaweeds extracts and the GC-MS Analysis**

Two main compounds were identified in the extracts: phytol and palmitic acid. Phytol (3,7,11,15-tetramethyl hexadecenol) (PHY) is a chlorophyll-derived acyclic diterpenic alcohol, a characteristic pigment of seaweeds, which presents various pharmacological activities such as antioxidant, antimicrobial and anticancer, for example (Ponanna, 2013; De Alencar et al, 2018). The compound is already reported in the literature with cytotoxic and genotoxic activities, since its metabolites have been related to key receptors of transcription factors, cell proliferation and apoptosis, having activities in peroxisomal, mitochondrial and oxidative damage (Bobe et al, 2020; Shariare et al, 2021). *In vitro* studies demonstrate the cytotoxic activity of phytol in different cancer cells. In the meta-analysis study conducted by De Alencar et al (2018), this aspect is discussed. The authors verified, through experimental work, the association between phytol and

cytotoxicity, as well as the induction of apoptosis and cell necrosis. Kim et al (2015) studied phytol isolated from *Brassica oleracea* var. capitata in hepatocellular carcinoma cells (HepG2 and Huh7 cells). The authors found that the molecule was able to induce apoptosis in tumor cells through the activation of caspases, which did not occur in normal hepatocytes, showing, in this case, a selective activity on tumor cells. Although there is evidence of antitumor activity involving phytol and its metabolites as an apoptosis-inducing agent, these studies are limited to few in vitro studies and tests in animal models that are still controversial, besides the molecular mechanisms of these effects are also not fully elucidated (Islam et al, 2018; Bobe et al, 2019). The molecule remains under the scope of research because, depending on the dose and cell line studied, it may have effects both against and pro-tumor.

Seaweeds are able to produce compounds necessary for its growth, survival and proliferation, by primary metabolism, such as carbohydrates, proteins and lipids (Salehi et al, 2019). The lipid commonly found is palmitic acid, a long-chain saturated molecule, however, the fatty acid profile is diversified, according to the action of environmental and geographical factors on each species (Holdt & Kraan, 2011). In the extracts of our samples, palmitic acid was identified among the major compounds. The compounds identified by GC-MS are shown in **Table 2**.

**Table 2.** Major biochemical compounds from ethanolic and chloroform extracts from the green and the red seaweed, respectively, by GC-MS.

Sample	Peak n°	RT (min)*	Component Name	Molecular Formula	SI**
<i>M. hariatii</i>	1	33.101	Phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	90%
(MHE)	2	37.518	Palmitic Acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	96%
<i>I. cordata</i>	1	33.114	Phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	98%
(ICC)	2	37.423	Palmitic Acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	95%

\*Retention time \*\* SI - Similary Idex

The antioxidant activity of several species of seaweeds has been reported (Boonchum W, et al., 2011; Sabeena Farvin, K.H., Jacobsen, 2015; Olasehinde et al, 2019; Haq et al, 2019). The recent study by Zhong et al (2020), using eight species of seaweed from Australia,

showed an important phenolic content, especially in brown algae which showed potential antioxidant activity by the DPPH method, whereas green and red seaweed tested, did not show the same result significantly. Silva *et al* (2019) showed antioxidant activity in two fractions obtained from the brown seaweed extract *Bifurcaria bifurcata*, also by the DPPH method, with a high concentration of phenolic content in the sample.

There are no substantial studies that have specifically studied the antioxidant activity of Antarctic seaweed. In 2016, Bernardi *et al* analyzed three species of seaweed from the Maritime Antarctic, South Shetland Islands, including *M. hariotii*. All samples showed antioxidant potential, however, the extract obtained from *M. hariotti* was not significant. In our study, we found that the antioxidant potential of the ethanolic extract sample was higher than the chloroformic extract, in the three tested concentrations. It is important to emphasize that aspects such as conditions for collection, storage, transport, extraction method, time between collection and lyophilization and exposure to light can interfere with the concentration of compounds that have antioxidant activity and, thus, contribute to these differences in results.

The presence of phytochemicals with antioxidant action in seaweeds, results from the evolution of these organisms to protect species against environmental damage, such as solar radiation (Haq *et al*, 2019). Table 3 indicates the antioxidant potential from the scavenging activity of the DPPH radical, of *M. hariotii* and *I. cordata* macroalgae extracts.

**Table 3.** Antioxidant Activity (%) using DPPH method of MHE and ICC extracts

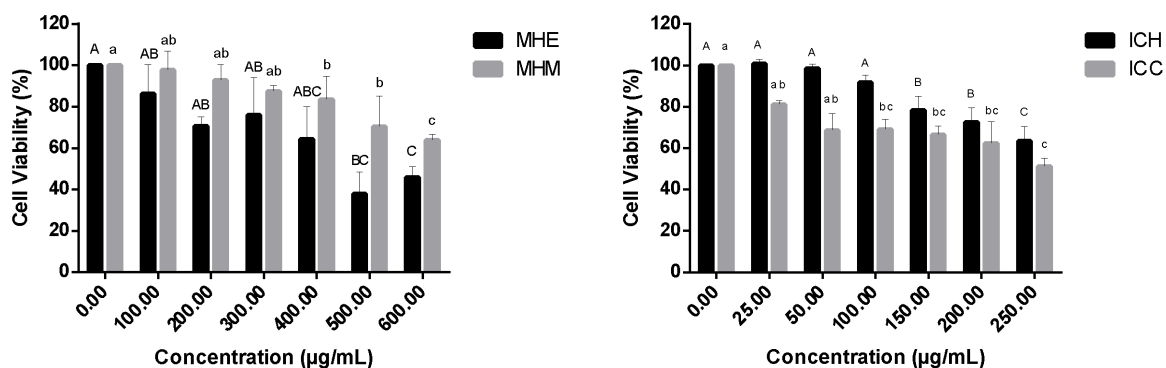
Sample	Concentration (mg.mL <sup>-1</sup> ) / Mean ± SD			
	5	2,5	1,25	0,6
<i>M. hariotii</i> (MHE)	49 ± 2	38 ± 1	20 ± 5	0
<i>I. cordata</i> (ICC)	26 ± 0,9	15 ± 0,5	1 ± 0	0

According to Bernardi *et al* (2016), organisms that live in polar regions have acquired highly effective ways of extracting the elements necessary for survival in these environments. They are organisms that, due to the extreme climatic conditions, developed potent secondary metabolites to guarantee the survival of the species (Alves *et al*, 2018; Abd El-Hack, 2019; Gurpilhares, 2019.)

Although environmental problems are reaching increasingly remote places, like global changes, metals, dioxins, and these organisms still do not suffer significant human interference, preserving their natural production of bioactive compounds that allow protection against environmental aggression.

### 3.2. Antitumor Activity

To evaluate antitumor activity, four extracts were obtained: MHE (*M. hariatii* - ethanol), MHM (*M. hariatii* - methanol), ICH (*I. cordata* - hexane) and ICC (*I. cordata* - chloroform). The cytotoxic activity of extracts was tested against HCT-116 cell line by MTT assay. The cell viability (%) of extracts is shown in Figure 1. Overall, seaweed *I. cordata* (ICH and ICC) induced cytotoxic effects using a lower concentration of extracts compared to *M. hariatii* (MHE and MHM), showing less resistance to extract exposition.



**Figure 1** – Tumor cell viability (%) of different extracts ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) from the Antarctic seaweeds *M. hariatii* (MHE and MHM) and *I. cordata* (ICH and ICC) against HCT-116 cell line. The covariance and analysis were expressed in means  $\pm$  SD. Different letters represent statistical significance between groups ( $p < 0.05$ ).

Among marine organisms, seaweeds stand out for being excellent sources of bioactive compounds with various biological activities, including antitumor activity (Kim & Karagozlu, 2011; Yan *et al*, 2019; Aziz *et al*, 2020; Prasedya *et al*, 2021). Since the 1970s, researchers have studied compounds of seaweeds with potential activity against the growth of tumor cells. The statistical tested extracts revealed that HCT-116 cells were resistant to



MHM, while MHE presented cytotoxic activity at the same concentration tested ( $p < 0.05$ ). Although both extracts of *I. cordata* (ICH and ICC) had a dose-response activity against cell death, the ICC extract was more efficient ( $p < 0.05$ ). Therefore, ICC extract was selected to perform further tests. The  $IC_{50}$  doses of the four extracts are listed in **Table 4**.

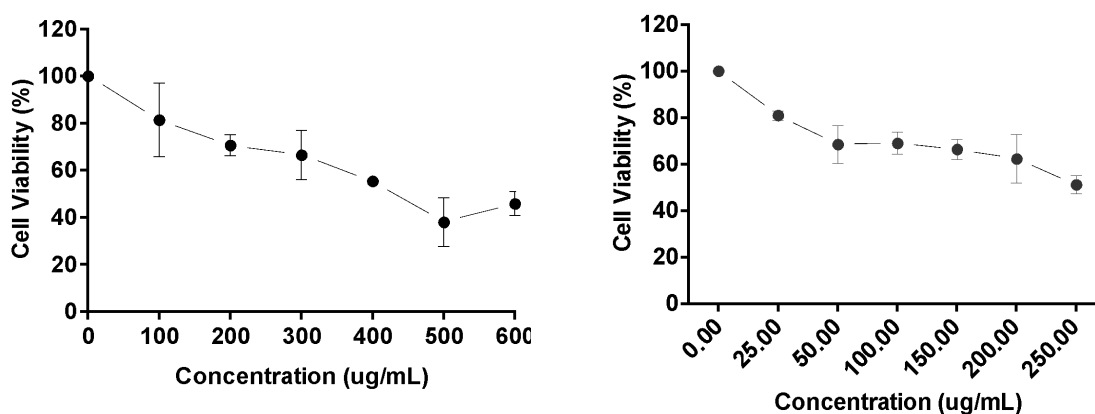
**Table 4.**  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) extracts of *M. hariatii* (Chlorophyta) and *I. cordata* (Rhodophyta) seaweeds against HCT-116 cell line.

Seaweed	Extract	$IC_{50}$ (Mean $\pm$ SD)
		24h
<i>M. hariatii</i>	Ethanol	577,4 $\pm$ 95
	Methanol	> 800
<i>I. cordata</i>	Hexane	> 300
	Chloroform	268 $\pm$ 11

Several studies have pointed to the antitumor and anti proliferative potential of seaweeds (Paul & Kundu, 2013; Moussavou et al, 2014; Haq et al, 2019).

The pharmacological properties from some target seaweeds are probably associated with the presence of different metabolites, synthesized by forcing abiotic parameters. Antitumor activity is one of them (Rocha et al, 2018). *In vitro* studies have reported that compounds present in seaweed are promising sources of antitumor activity and, because it is an element present in the food culture of several populations, tumors of the digestive system, such as colon and rectum, have been the target of recent studies (Frassini et al, 2019; Al monla et al, 2020; Peñalver et al, 2020).

Al Monla et al, (2020) reported an important cytotoxic effect of extracts of the brown algae *Colpomenia sinuosa* on the HT-29 and HCT-116 cell line, after 24 h of treatment ( $IC_{50}$  equal to  $379 \pm 1.19 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $42.57 \pm 1.64 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively). They also identified that the extracts were able to cause important morphological changes, in addition to significantly reducing cell migration, also selectively.

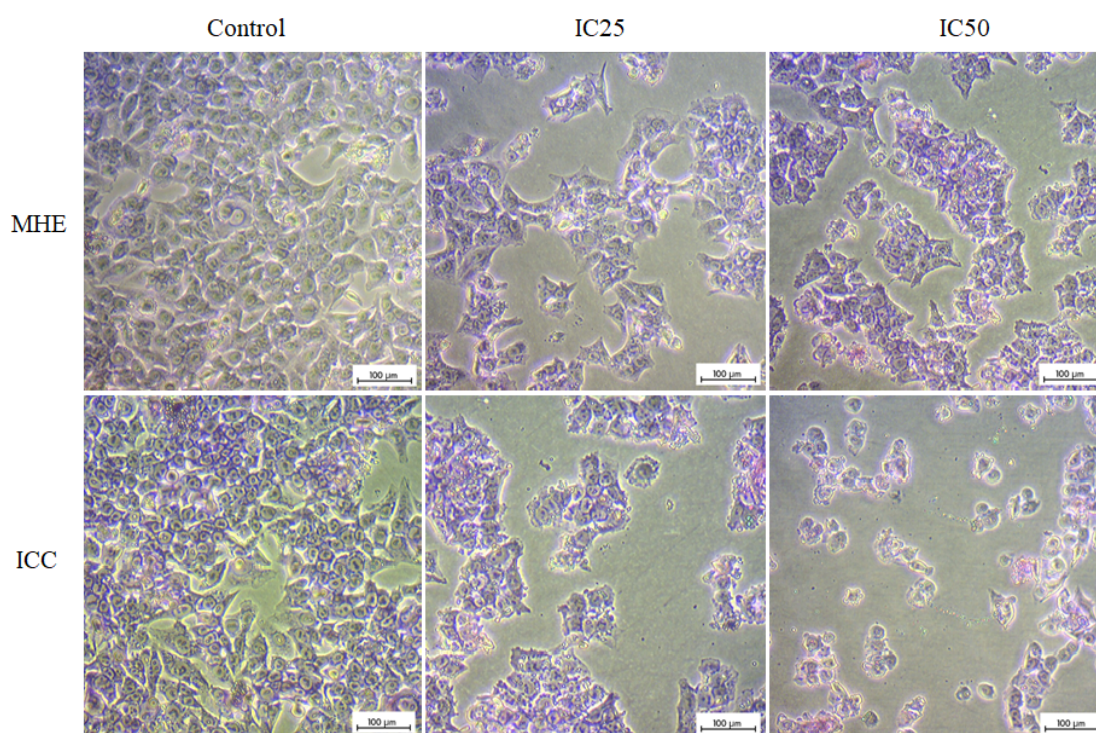


**Figure 2.** Dose-response activity of MHE (*M. harioitii* ethanolic extract) and ICC (*I. cordata* chloroformic extracts) against HCT-116 cell line, respectively, ( $r^2 = 0.9$ ). The data are adjusted to the model, demonstrated by the  $r^2$  value.

Frassini et al (2019), demonstrated the antitumor activity of two species of Antarctic seaweeds in colorectal cancer cells, one of which is *I. cordata*, also used in this study. The IC<sub>50</sub> found for the chloroform extract, in 24 h of treatment, was  $115.9 \pm 2.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Martins et al (2018) also showed antitumor potential of Antarctic seaweeds extracts, however, in skin cancer cells (cell line A-431) and the most representative macroalgae bioactivity was using *I. cordata* extracts.

### 3.3. Cellular Morphology and Apoptotic cell identification after using Antarctic seaweed extracts.

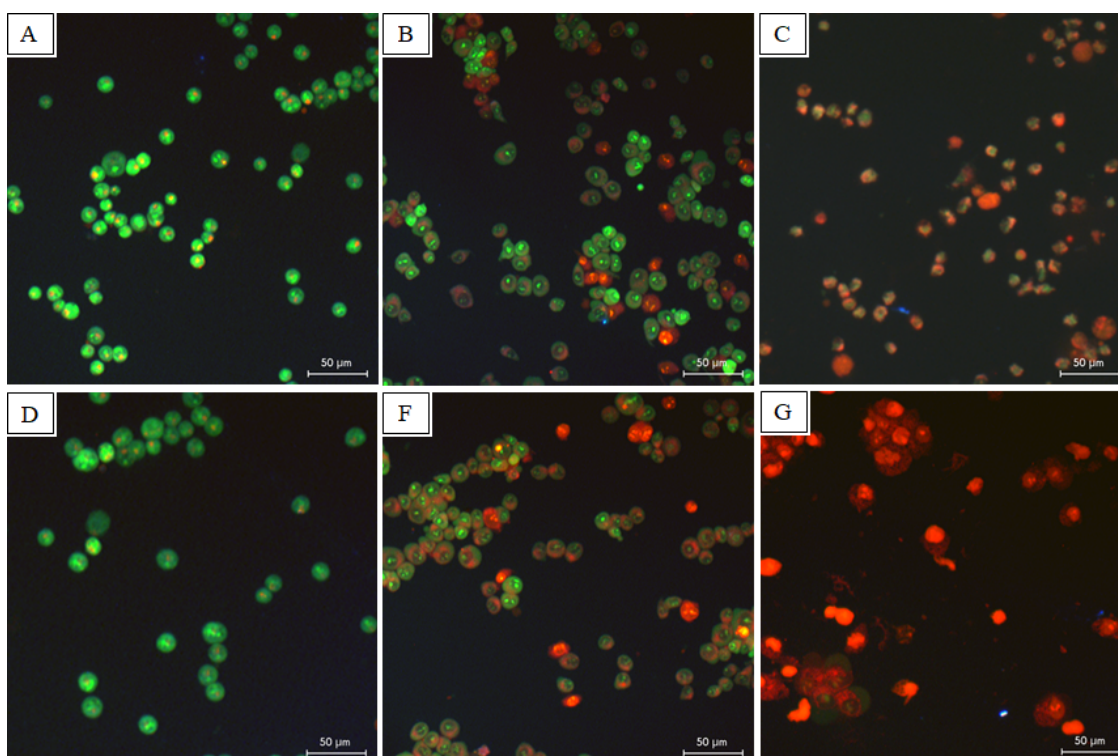
Aiming to assess the ability of the extracts to cause any morphological changes, the cells were treated for 24 hours, stained with Giemsa solution, and observed under a microscope. As shown in Figure 3, treatment with seaweed extracts changed the morphology and the number of cells adhered, especially the ICC. The analysis of the HCT-116 cell line after treatment using Giemsa staining revealed changes in the morphological structure that was dependent on the concentration of the extracts. The cells of the control group, treated with solvent, ethanol 3.5% (v / v) and DMSO 0.5% (v / v), showed a regular appearance and intense growth, characteristic of the strain.



**Figure 3.** Morphological cell changes of the HCT-116 after 24 hours of treatment with the *M. hariatii* (MHE) and *I. cordata* (ICC) extracts, respectively.

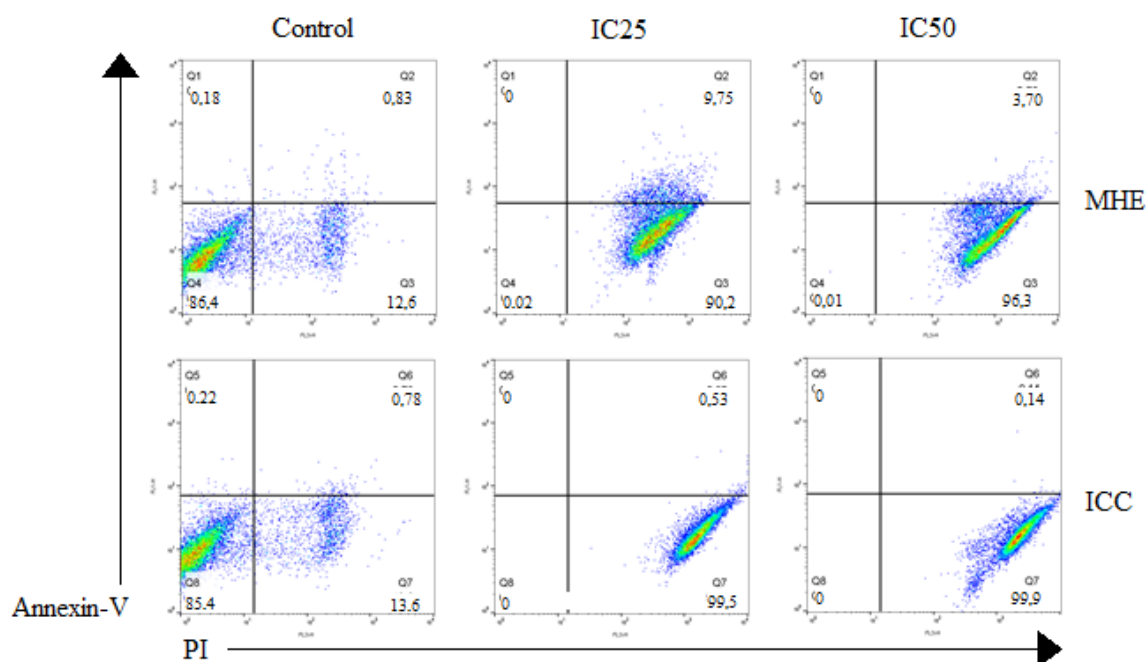
The morphological changes evidenced by the Giemsa staining showed morphological changes as cells were exposed to increase extract concentrations of macroalgae. In order to investigate whether induction of apoptosis occurred, further tests with AO / EB and flow cytometry annexin V-PI staining were performed.

Figure 4 and 5 demonstrate the evolution of these events. Acridine orange penetrates only in normal cells and in early apoptosis events, emitting green fluorescence. Ethidium bromide targets cells with severe membrane damage, such as late apoptotic and necrotic cells, emitting orange-red fluorescence. Concentrations of macroalgae extract at IC25 promoted induction of early apoptotic events with few necrotic cells (Figures 4B and 4F). With increase of extract concentrations, IC50, most cells were driven to necrotic processes (Figures 4C and 4G).



**Figure 4.** Typical morphological changes in HCT-116 cells after seaweeds extracts treatment stained with AO/EB. The images were taken under fluorescence microscopy at 400X. MHE (A, B, C) and ICC (D, F, G). A, D (control), B, F (IC<sub>25</sub>) and C, G (IC<sub>50</sub>)

After analysis by flow cytometry, it was observed that, at the IC<sub>25</sub> dose, the cells have already undergone a process of late apoptosis followed by necrosis for both species. More than 90% of the cells exposed to treatment with the different extracts were double stained. The penetration of Propidium Iodide shows severe membrane damage and its ability to intercalate with DNA (Atale et al, 2014). The double staining (Annexin-V + PI), shown in the bottom right, confirms that the cells were in the necrosis stage.



**Figure 5.** Flow cytometry data after Annexin V/Propidium Iodide (PI) staining. HCT-116 cells were incubated for 24 h in the presence of IC25 and IC50 doses of *M. hariatii* (MHE) and *I. cordata* (ICC) seaweed extracts. For control, the vehicle used was ethanol or DMSO. The percentage of cells in the early stages of apoptosis, stained only with Annexin-V (bottom left) and double stained with Annexin-V and PI, which indicates late apoptosis or necrosis (bottom right), are expressed in each quadrant.

The flow cytometry measurement technique allows quantifying beyond the viable cells existing in the sample. The method also measures cells in early, late apoptosis and necrosis (Adan et al, 2016). Apoptosis is characterized by a variety of morphological changes. 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 phagocytize the injured cell (Duensing, TD, Watson, SR, 2018).

Studies that specifically address the use of seaweed extracts on colorectal cancer cells are scarce. A recently published study, Al Molna et al (2020) revealed that the extract of the brown seaweed *C. sinuosa* caused important morphological changes in HCT-116 cells with an impact on cell size, shape, and volume. These authors also identified, per

analysis of the cell cycle, that the significant increase in cells in the subG1 phase, was suggestive of apoptosis, due to the deregulation caused in the cell cycle, which was later confirmed when they verified an increase in the expression of the p21 protein, cleavage of caspase 3 and decreased PARP-1 and Bcl2. An antiproliferative and pro-apoptotic effect was also found by Bernardini et al (2018), however, in osteosarcoma cells. They moderated, by means of fluorescence microscope with DAPI and Annexin-V / PI, that extract from the seaweed *Padina pavonica* induced DNA damage, altering the nuclear morphology. The induction of apoptosis in tumor cells with important morphological changes, caused by seaweed extracts, is reported in the literature (Mary et al, 2012; Namvar et al, 2014; Gomes et al, 2015), however, this type of evaluation in intestinal tumors is limited. Considering the epidemiological relevance of the CRC and the use of seaweed in the food culture of different populations, research such as this is important to explore new compounds and understand the mechanisms of action on colorectal tumor cells using different seaweed groups, from different global areas. Once the genetic predisposition for this type of neoplasia is strong, further studies are required to prove a possible preventive role for the consumption of seaweed against the CRC, as well as elucidating the mechanisms of action of the compounds in the search for alternative sources for development of new drugs with therapeutic action to CRC.

#### **4. Conclusions**

The ethanolic extract of *M. hariatii* and the chloroform extract of *I. cordata* were able to inhibit the growth of the HCT-116 cell line, causing morphological changes leading to apoptosis and cell necrotic events. Although, other extracts of these species of Antarctic seaweeds have shown no effect on this cell line specifically. There is need to further investigations regarding fractionation as well as the isolation of compounds present in these Rhodophyta and Chlorophyta species, in order to obtain more sensitive effects with the use of a lower concentration of treatment, which culminates in greater efficiency and use of these natural resources and less side effects.

Both extracts showed antioxidant activity in the concentration evaluated. Further studies are needed to isolate compounds and study their molecular mechanisms of cell death.

## **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 logistics and financial support for the development of this work.

## References

- WHO – World Health Organization (2021). What is cancer?  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (access in 23<sup>rd</sup> February 2022).
- INCA – Instituto Nacional de Cancer (2020). 2020 estimate: incidence of cancer in Brazil.
- Mehra, K.; Berkowitz, A.; Sanft, T. 2017. Diet, Physical Activity, and Body Weight in Cancer Survivorship *Med Clin North Am.* 101(6), 1151-1165. doi: 10.1016/j.mcna.2017.06.004.
- Nasir, A. et al. 2019. Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 7, 1-13. doi: 10.1080/10408398.2019.1571480.
- Almeida, C.V.de et al. 2019. Role of diet and gut microbiota on colorectal cancer immunomodulation. *World J Gastroenterol.* 25(2), 151-162. doi: 10.3748/wjg.v25.i2.151.
- Arnold, M et al. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 66, 683–691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912.
- Brenner, H. et al. (2014). Colorectal cancer. *Lancet.* 383(9927):1490-1502. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- Roncucci, L.; Mariani, F. 2015. Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? *Eur J Intern Med.* 26(10), 752-6. doi:10.1016/j.ejim.2015.08.019.
- Petimar, J. et al. 2018. Recommendation-based dietary indexes and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study and Health Professionals Follow-up Study. *Am J Clin Nutr.* 108(5), 1092-1103. doi: 10.1093/ajcn/nqy171.
- Silva, D.A.S. et al. (2018). Mortality and years of life lost by colorectal cancer attributable to physical inactivity in Brazil (1990-2015): Findings from the Global Burden of Disease Study. *PLoS One.* 13(2):e0190943. doi: 10.1371/journal.pone.0190943.
- Lavalette et al. Cancer-Specific and General Nutritional Scores and Cancer Risk: Results from the Prospective NutriNet-Santé Cohort. 2018. *Cancer Res August* 78(15), 4427-4435; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0155.
- Talero, E. et al. 2015. Bioactive Compounds Isolated from Microalgae in Chronic Inflammation and Cancer. *Mar. Drugs.* 13, 6152-6209; doi:10.3390/md13106152.
- Gogineni, V.; Hamann, M.T. 2018. Marine Natural Product Peptides with Therapeutic Potential: Chemistry, Biosynthesis, and Pharmacology. *Biochim Biophys Acta.* 1862(1), 81–196. doi:10.1016/j.bbagen.2017.08.014.
- Oh, Y. et al. 2019. Sea Squirt (*Halocynthia roretzi*) Hydrolysates Induce Apoptosis in Human Colon Cancer HT-29 Cells through Activation of Reactive Oxygen Species. *Nutr Cancer.* 9, 1-10. doi: 10.1080/01635581.2018.1540717.
- Pellizzari Franciane, Reis Renata Perpetuo. 2011. Seaweed cultivation on the Southern and Southeastern Brazilian Coast. *Rev. bras. farmacogn.* [Internet]. 21( 2 ), 305-312.
- Seca, A.M.L, Pinto, D.C.G.A. 2018. Overview on the Antihypertensive and Anti-Obesity Effects of Secondary Metabolites from Seaweeds. *Mar Drugs.* 16(7). pii: E237. doi: 10.3390/md16070237.



- Folmer, F. et al. 2010. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochem Ver.* 9:557–579. doi:10.1007/s11101-010-9200-2.
- Stabili, L. et al. 2014. Biotechnological potential of the seaweed *Cladophora rupestris* (Chlorophyta, Cladophorales) lipidic extract. *N Biotechnol.* 31(5), 436-44. doi: 10.1016/j.nbt.2014.05.002.
- Fernando, I.P.S. et al. 2016. Antioxidant Activity of Marine Algal Polyphenolic Compounds: A Mechanistic Approach. *J Med Food* 19(7), 1–14. doi: 10.1089/jmf.2016.3706.
- Rocha, D.H.A. et al. 2018. Seaweed Secondary Metabolites In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. *Mar Drugs.* 16(11). pii: E410. doi: 10.3390/md16110410.
- Frassini, R., et al. 2019. Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Antarctic Macroalgae Extracts against Colorectal Cancer. *Advances in Biological Chemistry*, 9, 167-177. <https://doi.org/10.4236/abc.2019.95013>.
- Murphy, C. et al. 2014. The potential of seaweed as a source of drugs for use in cancer chemotherapy. *J Appl Phycol.* 26(5), 2211-2264. ISSN: 0921-8971.
- Gambato, G. et al. 2013. Brown Algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis-Mediated Cell Death in Tumor Cells. *Adv Biol Chem.* 4, 98-108. doi: 10.4236/abc.2014.42014.
- Moussavou, G. et al. 2014. Anticancer Effects of Different Seaweeds on Human Colon and Breast Cancers. *Mar. Drugs.* 12, 4898-4911. doi:10.3390/md12094898.
- Martins, R.M. et al. 2018. Lund RG. Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential. *Front Microbiol.* 9:412. doi: 10.3389/fmicb.2018.00412.
- 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.* 25(8), 1993. Published 2020 Apr 24. doi:10.3390/molecules25081993.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on december 1<sup>st</sup>, 2021.
- Kim et al. 2002. Free radical scavending activity os red ginseng aqueous extracts. *Toxicolgy* 172, 149 – 156.
- 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. doi:10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2016v26n2/Bernardi.
- Ponnana, Byju. 2013. Phytol – the precursor of vitamins in *Chaetomorpha antinnina*. *Mapana Journal of Sciences.* 12. 57-65. 10.12723/mjs.25.6.
- De Alencar, et al. 2018. Phytol as an anticarcinogenic and antitumoral agent: An in vivo study in swiss mice with DMBA-Induced breast cancer. *IUBMB Life.* doi:10.1002/iub.1952.
- Bobe G, et al. Phytol and its metabolites phytanic and pristanic acids for risk of cancer: current evidence and future directions. *Eur J Cancer Prev.* 2020 Mar; 29(2), 191-200. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000534. PMID: 31436750; PMCID: PMC7012361.
- Shariare MH, et al. Liposomal drug delivery of *Corchorus olitorius* leaf extract containing phytol using design of experiment (DoE): In-vitro anticancer and in-vivo anti-inflammatory

- studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2021 Mar;199:111543. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111543. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33360927.
- Kim et al. 2015. Activation-9/3 and Inhibition of Epithelial Mesenchymal Transition are Critically Involved in Antitumor Effect of Phytol in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Phytother. Res.* 29, 1026–1031.
- Salehi B, et al. Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications. *Molecules*. 2019;24(22), 4182. Published 2019 Nov 18. doi:10.3390/molecules24224182.
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597. doi:10.1007/s10811-010-9632-5.
- Boonchum W, et al. Antioxidant activity of some seaweeds from the Gulf of Thailand. *nt J. Agric. Biol.* . 2011;13:95–99.
- Sabeena Farvin, K.H., Jacobsen, C. Antioxidant Activity of Seaweed Extracts: In Vitro Assays, Evaluation in 5 % Fish Oil-in-Water Emulsions and Characterization. *J Am Oil Chem Soc* 92, 571–587 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2624-5>.
- Olasehinde TA, et al. Phenolic composition, antioxidant activity, anticholinesterase potential and modulatory effects of aqueous extracts of some seaweeds on  $\beta$ -amyloid aggregation and disaggregation. *Pharm Biol.* 2019 Dec;57(1), 460-469. doi: 10.1080/13880209.2019.1634741. PMID: 31335235; PMCID: PMC6691876.
- Haq SH, et al. Antioxidant, Anticancer Activity and Phytochemical Analysis of Green Algae, Chaetomorpha Collected from the Arabian Gulf. *Sci Rep.* 2019 Dec 11;9(1), 18906. doi: 10.1038/s41598-019-55309-1.
- Zhong, B., Robinson, N. A., Warner, R. D., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2020). LC-ESI-QTOF-MS/MS Characterization of Seaweed Phenolics and Their Antioxidant Potential. *Marine Drugs*, 18(6), 331. doi:10.3390/md18060331.
- Silva, J., Alves, C., Freitas, R., Martins, A., Pinteus, S., Ribeiro, J. Pedrosa, R. (2019). Antioxidant and Neuroprotective Potential of the Brown Seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an in vitro Parkinson's Disease Model. *Marine Drugs*, 17(2), 85. doi:10.3390/md17020085.
- Alves, C. et al. (2018). From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. *Front Pharmacol.* 9, 777. doi:10.3389/fphar.2018.00777.
- Abd El-Hack, M.E. (2019). Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomed Pharmacother.* 111:42-50. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.069.
- Gurpilhares, D.B. (2019). Marine prebiotics: Polysaccharides and oligosaccharides obtained by using microbial enzymes. *Food Chem.* 280:175-186. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.023.
- Kim, S.K., & Karagozlu, M. Z. (2011). Marine Algae. *Advances in Food and Nutrition Research*, 225–233. doi:10.1016/b978-0-12-387669-0.00017-x.
- Yan MD, et al. The anti-tumor activity of brown seaweed oligo-fucoidan via lncRNA expression modulation in HepG2 cells. *Cytotechnology*. 2019 Feb;71(1), 363-374. doi: 10.1007/s10616-019-00293-7.

- Aziz E, et al. An overview on red algae bioactive compounds and their pharmaceutical applications. *J Complement Integr Med* 2020; 17(4), 20190203. doi: 10.1515/jcim-2019-0203.
- Prasedya ES, et al. The Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Effects of the Red Macroalgae *Gelidium latifolium* Extract against Melanoma Cells. *Molecules*. 2020; 26(21), 6568. doi: 10.3390/molecules26216568.
- 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(1), 72. doi:10.1186/2008-2231-21-72 .
- Peñalver R, et al (2020). Seaweeds as a Functional Ingredient for a Healthy Diet. *Mar Drugs*;18(6):301. Published 2020 Jun 5. doi:10.3390/md18060301.
- 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*. 25(8):1993. Published 2020 Apr 24. doi:10.3390/molecules25081993.
- Frassini, R., da Silva, Y.P., Moura, S., Villela, L.Z., Martins, A.P., Colepicolo, P., Fujii, M.T., Yokoya, N.S., de Pereira, C.M.P., Pereira, V.R.Z.B., Henriques, J.A.P. and Roesch-Ely, M. (2019) Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Antarctic Macroalgae Extracts against Colorectal Cancer. *Advances in Biological Chemistry*, 9, 167-177. <https://doi.org/10.4236/abc.2019.95013>.
- Martins RM, et al. Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential. *Front Microbiol*. 2018; 9, 412. doi:10.3389/fmicb.2018.00412.
- Atale, N., et al (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*, 255(1), 7–19. doi:10.1111/jmi.12133.
- Adan, A., et al (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876.
- Duensing, T. D., & Watson, S. R. (2018). Assessment of Apoptosis (Programmed Cell Death) by Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1). doi:10.1101/pdb.prot093807.
- Bernardini G, et al. Pro-Apoptotic Activity of French Polynesian *Padina pavonica* Extract on Human Osteosarcoma Cells. *Mar Drugs*. 2018;16(12):504. doi:10.3390/md16120504.
- Mary, J. S., et al (2012). Screening for in vitro Cytotoxic Activity of Seaweed, *Sargassum* sp. Against Hep-2 and MCF-7 Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(12), 6073–6076. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.12.6073>
- Namvar F, et al (2014). Antioxidant and anticancer activities of selected persian gulf algae. *Indian J Clin Biochem*.29(1), 13-20. doi:10.1007/s12291-013-0313-4.
- Gomes DL, et al. Methanolic extracts from brown seaweeds *Dictyota cilliolata* and *Dictyota menstrualis* induce apoptosis in human cervical adenocarcinoma HeLa cells. *Molecules*. 2015; 20(4), 6573-6591. doi:10.3390/molecules20046573.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

A busca científica por compostos que possuam atividade antiproliferativa tem encontrado nos recursos naturais uma riqueza biológica com potencial ação terapêutica. No câncer, isso pode significar prevenção e/ou redução dos efeitos colaterais que ocorrem durante o tratamento.

Os oceanos estão ganhando espaço neste campo (Lefranc *et al*, 2019). A caracterização, isolamento e estudo dos mecanismos moleculares de ação de compostos provenientes deste ecossistema tem sido objeto de pesquisa e as algas marinhas são os principais organismos estudados (Sharif *et al*, 2015).

Neste estudo, foi possível observar a atividade de oito extratos obtidos de duas espécies de algas antárticas sobre a linhagem celular de câncer colorretal HCT-116, quando expostas ao tratamento de 24 h. Os extratos utilizados apresentaram resultados diferentes: três extratos da alga *M. hariatii* (metanol, hexano e clorofórmio) não foram capazes de inibir a proliferação das células. Por outro lado, o extrato etanólico desta mesma espécie (MHE) ( $IC_{50} 577,44 \pm 95,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) demonstrou ter atividade contra a linhagem celular. Embora dois extratos da *I. cordata* (ICH e ICC) tenham apresentado ação dose-resposta frente à morte celular, o extrato de ICC foi o mais ativo ( $IC_{50} 268,63 \pm 11,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e apresentou resultados significativos. Estudos investigam o potencial antitumoral e antiproliferativo das algas marinhas e apresentam resultados promissores, mesmo com habitats muito diferentes desses organismos (Paul & Kundu, 2013; Moussavou, 2014; Haq, 2019). As algas antárticas, por serem de difícil acesso e requererem recursos especiais de pesquisa, ainda estão no início dos estudos *in vitro*. Segundo Bernardi *et al* (2016), organismos que vivem em regiões polares têm adquirido formas altamente eficazes de extrair os elementos necessários para a sobrevivência nesses ambientes. São organismos que, devido às condições climáticas extremas, desenvolveram metabólitos secundários potentes para garantir a sobrevivência da espécie (Abd El-Hack, 2019).

Gambato *et al* (2014) observaram que o extrato da alga antártica *Himantothallus grandifolius* foi altamente eficaz contra quatro linhagens de células tumorais e apresentou atividade seletiva, visto que o valor de  $IC_{50}$  encontrado para célula não tumoral, foi maior.

Em 2018, Martins *et al* mostraram alto potencial antitumoral de extratos de algas marinhas da Antártica, porém, em células de câncer de pele. O mais representativo nesse estudo foi da *I. cordata* ( $IC_{50}$  500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) que recentemente foi objeto de estudo em células de câncer colorretal. Frassini *et al* (2019) observaram a atividade citotóxica de dois extratos desta espécie sobre a linhagem HCT-116 ( $IC_{50}$  115,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 242  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os extratos obtidos com clorofórmio e hexano, respectivamente, em tratamento de 24 h).

A caracterização química busca identificar compostos majoritários presentes nas amostras, que pode variar conforme o solvente utilizado. Para a identificação química neste estudo, foram utilizados os extratos obtidos com etanol e clorofórmio das algas *M. harioitii* e *I. cordata*, respectivamente (MHE e ICC). Dois compostos principais foram identificados nos extratos, o fitol e o ácido palmítico. O fitol (3,7,11,15-tetrametil hexadecenol) (PHY) é um álcool diterpênico acíclico derivado da clorofila, um pigmento característico das algas marinhas, que apresenta diversas atividades farmacológicas como antioxidante, antimicrobiana e anticâncer, por exemplo (Ponnana, 2013). Estudos *in vitro* demonstram a atividade citotóxica do fitol em diferentes células cancerosas. No estudo de meta-análise conduzido por De Alencar *et al* (2018), esse aspecto é discutido. Os autores verificaram, por meio de trabalhos experimentais, a associação entre fitol e citotoxicidade, bem como a indução de apoptose e necrose celular. Pesquisas sugerem que o fitol pode ser um agente indutor de apoptose, no entanto, os mecanismos moleculares desses efeitos citotóxicos em células tumorais ainda não estão totalmente elucidados (Islam *et al*, 2018).

As algas marinhas são capazes de produzir compostos necessários ao seu crescimento, sobrevivência e proliferação, pelo metabolismo primário, que são carboidratos, proteínas e lipídios e secundário como alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos (Salehi *et al*, 2019). O lipídio comumente encontrado nestes organismos é o ácido palmítico, de cadeia longa, saturado, porém, o perfil dos ácidos graxos é diversificado, de acordo com a ação de fatores ambientais e geográficos sobre cada espécie (Holdt & Kraan, 2011). A existência de fitoquímicos com ação antioxidante em algas resulta da evolução desses organismos para proteger as espécies contra danos ambientais, como a radiação solar (Haq *et al*, 2019). Os extratos utilizados neste estudo mostraram atividade contra o radical DPPH, que pode ser pela presença do fitol, entretanto, análises químicas mais robustas e sensíveis para essa identificação, são necessárias.

Neste sentido, a avaliação de potencial morte celular pode auxiliar no entendimento de parâmetros moleculares das células estudadas. Apoptose, autofagia e necrose são mecanismos de morte que apresentam particularidades fisiológicas de ação e que podem ser facilmente detectadas pelo aspecto morfológica das células (Ouyang *et al*, 2013). A análise da linhagem HCT-116, após tratamento, pela coloração de Giemsa, revelou alterações na estrutura morfológica, sendo dependente da concentração dos extratos, sugerindo que eventos de indução de morte ocorreram nas células, o que foi confirmado pela coloração com LA / BE e por citometria de fluxo (Anexina-V / PI). A penetração do iodeto de propídio (PI) mostra graves danos à membrana por sua capacidade de intercalar com o DNA (Atale *et al*, 2014) A dupla coloração (Anexina-V + PI), confirma que as células estavam em estágio de necrose. Na dose de IC<sub>25</sub>, as células já haviam sofrido um processo de apoptose tardia seguida de necrose. Mais de 90% das células expostas ao tratamento com os diferentes extratos apresentaram coloração dupla.

A técnica de medição de citometria de fluxo permite quantificar além das células viáveis existentes na amostra. O método também permite medir células em apoptose e necrose precoce e tardia (Adan *et al*, 2016). A apoptose é caracterizada por uma variedade de alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem quando o dano ao material genético é irreparável (Ouyang *et al*, 2013). As marcas deixadas no núcleo celular incluem a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear acompanhadas pela redução do volume celular, enquanto a membrana ainda permanece intacta (Wong, 2011). No início desse processo, a translocação da fosfatidilserina, molécula marcada pela Anexina-V, encontrada no interior da membrana citoplasmática, para a superfície extracelular, permite a sinalização aos macrófagos para reconhecer e fagocitar precocemente a célula lesada (Duensing & Watson, 2018). Na carcinogênese, pode-se compreender a apoptose como uma faca de dois gumes: o mecanismo é alvo de estudos moleculares e visam obter tratamentos seletivos para as células tumorais, por outro lado, este mesmo mecanismo mostra-se alterado no câncer e isso faz com que a doença seja tão resistente à terapia medicamentosa (Cao & Tait, 2018). Wang *et al* (2017) trazem que nos últimos anos, estudos têm sugerido que moléculas relacionadas à apoptose estariam regulando uma nova forma de morte celular que era diferente da apoptose e mais semelhante à necrose, a necroptose, uma forma programada de morte celular que leva à necrose, exibindo características morfológicas semelhantes à necrose, incluindo a ruptura da membrana celular, edema e inchaço das organelas (Gong *et al*, 2019). Atualmente, aceita-se que terapias de indução de morte celular programada podem

ser eficazes contra células tumorais (Garg & Agostinis, 2017), por outro lado, as intensas alterações genéticas encontradas no câncer, desafiam a ciência na compreensão dessas dualidades.

O continente antártico é o ponto mais remoto do planeta e, somado à natureza marinha, representam um universo à parte para a comunidade científica uma vez que exigem recursos humanos, financeiros e tecnológicos de forma especializada para a exploração e identificação de organismos biológicos, bem como o desenvolvimento e aplicação de metodologias eficazes de pesquisa nas diversas áreas da ciência, incluindo as ciências biomédicas. Já é comprovado na literatura que compostos provenientes dos oceanos, principalmente de algas marinhas possuem atividades farmacológicas promissoras, incluindo na terapia oncológica, entretanto, estudos direcionados a tumores intestinais são escassos, mesmo sendo o terceiro mais prevalente na população mundial. A identificação e isolamento de compostos provenientes de produtos naturais, como algas marinhas, são de extrema importância dentro dessa corrida contra uma doença, na maioria dos casos mortal, que ao longo dos anos está se mostrando uma importante barreira para a expectativa e qualidade de vida humana.

Este estudo trata-se de um *screening* que objetiva identificar compostos e avaliar mecanismos de morte celular tumoral no câncer colorretal a partir de algas antárticas por serem organismos totalmente selvagens sem a intensa interferência humana para reprodução acelerada e utilização de pesticidas no cultivo, contudo, a adversidade geográfica é um ponto limitante para obtenção de amostras suficientes para conduzir processos robustos de pesquisa em curto intervalo de tempo, onde a multidisciplinaridade técnica é necessária. Uma vez que compostos sejam identificados e isolados, o desenvolvimento de moléculas em laboratório permite a investigação mais detalhada dos mecanismos moleculares tanto na célula tumoral quanto em não tumoral, para a identificação de seletividade, bem como o avanço clínico até a obtenção de fármacos específicos, minimizando efeitos colaterais da terapia farmacológica.

## 1. CONCLUSÕES GERAIS

- Os extratos etanólico da alga *M. hariatii* (MHE), hexânico e clorofórmico da alga *I. cordata* (ICH, ICC) foram capazes de inibir o crescimento das células HCT-116;
- Os extratos MHE e ICC apresentam atividade antioxidante nas concentrações testadas;
- Foi possível identificar 2 compostos presentes nos extratos através de cromatografia gasosa: fitol e ácido palmítico;
- O extrato metanólico da alga *M. hariatii* (MHM) não se mostrou efetivo contra a linhagem celular HCT-116;
- Os extratos MHE e ICC provocaram alterações morfológicas na linhagem após 24 h de exposição ao tratamento;
- Os extratos MHE e ICC levaram a eventos apoptóticos na linhagem após 24 h de exposição ao tratamento;



## 2. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar os efeitos dos extratos em células não tumorais para avaliar se o efeito citotóxico é seletivo para células tumorais;
- O fracionamento dos extratos brutos é fundamental para chegar a um valor de  $IC_{50}$  menor, para que se possa utilizar menos quantidade para se obter os efeitos citotóxicos;
- O isolamento dos compostos permitirá estudar com mais detalhes os mecanismos moleculares de ação contra a linhagem HCT-116;

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Hack, M.E. (2019). Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. **Biomed Pharmacother.** 111:42-50. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.069.
- 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. doi:10.3109/07388551.2015.1128876.
- 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.** 25(8):1993. Published 2020 Apr 24. doi:10.3390/molecules25081993
- Alexandrov, L.B.; Stratton, M.R. (2014). Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. **Curr Opin Genet Dev.** 24:52-60. doi: 10.1016/j.gde.2013.11.014.
- Almeida, C.V.de *et al.* (2019). Role of diet and gut microbiota on colorectal cancer immunomodulation. **World J Gastroenterol.** 25(2): 151-162. doi: 10.3748/wjg.v25.i2.151.
- Atale, N., *et al.* (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. **Journal of Microscopy**, 255(1), 7–19. doi:10.1111/jmi.12133.
- Alvarado, P. *et al.* (2018). Phylogeny and bioactivity of epiphytic Gram-positive bacteria isolated from three co-occurring antarctic macroalgae. **Antonie van Leeuwenhoek.** 111(9):1543–1555. doi:10.1007/s10482-018-1044-6.
- Alvarado, R.; Leiva, S. (2017). Agar-degrading bacteria isolated from Antarctic macroalgae. **Folia Microbiol (Praha).** 62(5):409-416. doi: 10.1007/s12223-017-0511-1.
- Alves, C. *et al.* (2018). From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. **Front Pharmacol.** 9:777. doi:10.3389/fphar.2018.00777.
- Ambrosino L, *et al.* (2019). Bioinformatics for Marine Products: An Overview of Resources, Bottlenecks, and Perspectives. **Mar Drugs**; 17(10):576. doi:10.3390/md17100576.
- American Cancer Society (2019). Key Statistics for Colorectal Cancer. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 19/03/2019.
- Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, *et al.* *Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035.* **Int J Cancer.** 2019;144(12):2992-3000. doi:10.1002/ijc.32055
- Arnold, M *et al.* (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut.** 66:683–691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912.
- Bahrami, A. *et al.* (2017). Therapeutic Potential of Targeting Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. **J Cell Biochem.** 118(8):1979-1983. doi: 10.1002/jcb.25903.
- 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. doi:10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2016v26n2/Bernardi.

- Bernardi, J.; Pelizzari, F. (2013). Morfologia comparada e mapeamento latitudinal de clorófitas monostromáticas (*ulotrichales*) do atlântico sul e península antártica. **Acta Bot. Venez.** 36 (2): 269-286. ISSN 0084-5906.
- Bhalla, A. *et al* (2018). Molecular Diagnostics in Colorectal Carcinoma: Advances and Applications for 2018. **Clin Lab Med.** 38(2):311-342. doi: 10.1016/j.cll.2018.02.008.
- Bouga, M.; Combet, E. (2015). Emergence of Seaweed and Seaweed-Containing Foods in the UK: Focus on Labeling, Iodine Content, Toxicity and Nutrition. **Foods.** 4(2):240-253. doi: 10.3390/foods4020240.
- Boussios, S. *et al.* (2019). The Developing Story of Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. **J. Pers. Med.** 9(1): 12. doi: 10.3390/jpm9010012 .
- Bray, C *et al.* (2017). Colorectal Cancer Screening. **WMJ.** 116(1):27-33. PMID: 29099566.
- Breitling, R. *et al.* (2013). Metabolomics for Secondary Metabolite Research. **Metabolites.** 3:1076-1083. doi:10.3390/metabo3041076.
- Brenner, H. *et al.* (2014). Colorectal cancer. **Lancet.** 383(9927):1490-1502. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- Brychtová, V. *et al.* (2017). Molecular Pathology of Colorectal Cancer, Microsatellite Instability - the Detection, the Relationship to the Pathophysiology and Prognosis. **Klin Onkol.** 30(Sup1):153-155. PMID: 28471193.
- Brychtová, V. *et al.* (2017). Molecular Pathology of Colorectal Cancer, Microsatellite Instability - the Detection, the Relationship to the Pathophysiology and Prognosis. **Klin Onkol.** 30:153-155. PMID: 28471193.
- Cabrita, M.T. *et al.* (2010). Halogenated Compounds from Marine Algae. **Mar. Drugs.** 8:2301-2317; doi:10.3390/md8082301.
- Cancer Research UK (2017). How cancer starts. United Kingdom: Cancer Research UK. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts>>. Acesso em: 13/02/2019.
- Cardozo, K.H.M. *et al.* (2007). Metabolites from algae with economical impact. **Comp. Biochem. Physiol. C.** 146:60–78.
- Cheng, X. *et al.* (2019). Therapeutic potential of targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in colorectal cancer. **Biomed Pharmacother.** 110:473-481. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.082.
- Cheong KL, *et al* (2018). Oligosaccharides Derived from Red Seaweed: Production, Properties, and Potential Health and Cosmetic Applications. **Molecules.** ;23(10):2451. Published 2018 Sep 25. doi:10.3390/molecules23102451
- Christaki, E. *et al.* (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae. **J Sci Food Agric.** 93(1):5-11. doi: 10.1002/jsfa.5902.
- Cooper & Hausmann – A Célula: uma abordagem molecular 3ª ed. (2007). Editora Artmed, Porto Alegre, 716 páginas.
- D'Arcy, M. (2019). Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. **Cell Biology International.** doi:10.1002/cbin.11137

- Delgado-Roche, L. *et al* (2019). Chemoprotective effects of *Ulva lactuca* (green seaweed) aqueous-ethanolic extract against subchronic exposure to benzo(a)pyrene by CYP1A1 inhibition in mice. **Phytother Res.** 1-10. doi: 10.1002/ptr.6289.
- Dutra, V.G.P; Parreira, V.A.G; Guimarães, R.M. (2017). Evolution of mortality for colorectal cancer in Brazil and regions, by sex, 1996-2015. **Arq Gastroenterol.** 55(1):61 doi:10.1590/S0004-2803.201800000-12.
- Duensing, T. D., & Watson, S. R. (2018). Assessment of Apoptosis (Programmed Cell Death) by Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), pdb.prot093807. doi:10.1101/pdb.prot093807.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.** 35(4):495-516. PMID: 17562483.
- Elsamanoudy, A.Z. *et al* (2016). The role of nutrition related genes and nutrigenetics in understanding the pathogenesis of cancer. **J Microsc Ultrastruct.** 4(3):115-122. doi: 10.1016/j.jmau.2016.02.002.
- Fernando, I.P.S. *et al.* (2016). Antioxidant Activity of Marine Algal Polyphenolic Compounds: A Mechanistic Approach. **J Med Food** 19(7):1–14. doi: 10.1089/jmf.2016.3706.
- Fiolet, T. *et al.* (2018). Consumption of ultra-processed foods and cancer risk results from NutriNet-Santé prospective cohort. **BMJ.** 360:k322. doi: 10.1136/bmj.k322.
- Fodde R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. **Eur J Cancer.** 38(7):867-871. PMID: 11978510.
- Folmer, F. *et al.* (2010). Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochem Ver.** 9:557–579. doi:10.1007/s11101-010-9200-2.
- Furbino, L.E. *et al.* (2014). Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic peninsula. **Microb Ecol.** 67(4):775-87. doi: 10.1007/s00248-014-0374-9.
- Gambato, G. *et al.* (2013). Brown Algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis-Mediated Cell Death in Tumor Cells. **Adv Biol Chem.** 4:98-108. doi: 10.4236/abc.2014.42014.
- Ganesh, S. *et al.* (2019). Direct Inhibition of  $\beta$ -catenin: A new strategy for colorectal cancer. **Oncoscience.** 6(1-2): 294–295. doi: 10.18632/oncoscience.477.
- Genetics Home Reference (2019). TP53 gene (tumor protein p53). Disponível em: < <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53#sourcesforpage> >. Acesso em: 19/02/2019.
- Giordano, D. *et al.* (2015). Marine Microbial Secondary Metabolites: Pathways, Evolution and Physiological Roles. **Adv Microb Physiol.** 66:357-428. doi:10.1016/bs.ampbs.2015.04.001.
- Go, H., Hwang, H.-J., & Nam, T.-J. (2010). A glycoprotein from *Laminaria japonica* induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 24(6), 1546–1553. doi:10.1016/j.tiv.2010.06.018.

- Godinho, V.M. *et al.* (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **ISME J.** 7(7): 1434–1451. doi: 10.1038/ismej.2013.77.
- Gogineni, V.; Hamann, M.T. (2018). Marine Natural Product Peptides with Therapeutic Potential: Chemistry, Biosynthesis, and Pharmacology. **Biochim Biophys Acta.** 1862(1): 81–196. doi:10.1016/j.bbagen.2017.08.014.
- Gómez I., Huovinen P. (2020) Antarctic Seaweeds: Biogeography, Adaptation, and Ecosystem Services. In: Gómez I., Huovinen P. (eds) Antarctic Seaweeds. **Springer, Cham.** [https://doi.org/10.1007/978-3-030-39448-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-39448-6_1)
- Gurpilhares, D.B. (2019). Marine prebiotics: Polysaccharides and oligosaccharides obtained by using microbial enzymes. **Food Chem.** 280:175-186. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.023.
- Hannach, G.; Waaland, J.R. (1986). Environment, distribution and production of iridaea. **Aquatic Botany.** 26:51-78. doi: 10.1016/0304-3770(86)90005-7.
- Hata, T. *et al.* (2016). Molecular subtypes of colorectal cancer. **Nihon Rinsho.** 74(11):1802-1806. PMID: 30550685.
- Hsu HY, Hwang PA (2019). Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. **Clin Transl Med;**8(1):15. Published 2019 May 1. doi:10.1186/s40169-019-0234-9
- Holzinger, A. (2011) Review of Biology of polar benthic algae. **Polar Research.** (30):1-7315. doi: 10.3402/polar.v30i0.7315.
- Huang, L.C., Merchea, A. (2017). Dysplasia and Cancer in Inflammatory Bowel Disease. **Surg Clin North Am.** 97(3):627-639. doi: 10.1016/j.suc.2017.01.010.
- INCA – Instituto Nacional de Cancer (2020). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.
- Issa, I. A.; Noureddine, M. (2017). Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. **World J Gastroenterol.** 23(28): 5086-5096. doi: 10.3748/wjg.v23.i28.5086.
- Jibril, M.S. *et al.* (2016). Importance of Some Algal Species as a Source of Food and Supplement. **Int J Curr Microbiol Appl Sci.** 5(5):186-193-186. doi: 10.20546/ijcmas.2016.505.020.
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,* 43(2-3), 155–176. doi:10.1007/s10295-015-1723-5
- Kim, E.J. *et al* (2010). Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. **BMC Gastroenterol.** 10, 96.
- Kim, S.K.; Karagozlu, M.Z. (2011). Marine algae: natural product source for gastrointestinal cancer treatment. **Adv Food Nutr Res.** 64:225-33. doi:10.1016/B978-0-12-387669-0.00017-X.
- Kim, Y. K., Q. Guo & L. Packer. 2002. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172: 149–156.

- Kumar, M.S.; Adki, K.M. (2018). Marine natural products for multi-targeted cancer treatment: A future insight. **Biomed Pharmacother.** 105:233-245. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.142.
- Lee, D.H. *et al.* (2016). Colorectal Cancer Epidemiology in the Nurses' Health Study. **Am J Public Health.** 106(9):1599-607. doi: 10.2105/AJPH.2016.303320.
- Lefranc, F. *et al.* (2018). Algae metabolites: from in vitro growth inhibitory effects to promising anticancer activity. **Nat Prod Rep.** doi: 10.1039/c8np00057c.
- Liang X, Luo D, Luesch H. (2019). Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. *Pharmacol Res*; 147:104373. doi:10.1016/j.phrs.2019.104373
- Martínez-Hernández, G.B. *et al.* (2017). Nutritional and bioactive compounds of commercialized algae powders used as food supplements. **Food Sci Technol Int.** 24(2):172-182. doi: 10.1177/1082013217740000.
- Martins, R.M. *et al.* (2018). Lund RG. Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential. **Front Microbiol.** 9:412. doi: 10.3389/fmicb.2018.00412.
- Mehra, K.; Berkowitz, A.; Sanft, T. (2017) Diet, Physical Activity, and Body Weight in Cancer Survivorship **Med Clin North Am.** 101(6):1151-1165. doi: 10.1016/j.mcna.2017.06.004.
- Moussavou, G. *et al.* (2014). Anticancer Effects of Different Seaweeds on Human Colon and Breast Cancers. **Mar. Drugs.** 12:4898-4911. doi:10.3390/md12094898.
- Murphy, C. *et al.* (2014). The potential of seaweed as a source of drugs for use in cancer chemotherapy. **J Appl Phycol.** 26(5):2211-2264. ISSN: 0921-8971.
- Nasir, A. *et al.* (2019). Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 7:1-13. doi: 10.1080/10408398.2019.1571480.
- Namvar F, *et al* (2014). Antioxidant and anticancer activities of selected persian gulf algae. **Indian J Clin Biochem.**29(1):13-20. doi:10.1007/s12291-013-0313-4
- Oh, Y. *et al.* (2019). Sea Squirt (*Halocynthia roretzi*) Hydrolysates Induce Apoptosis in Human Colon Cancer HT-29 Cells through Activation of Reactive Oxygen Species. **Nutr Cancer.** 9:1-10. doi: 10.1080/01635581.2018.1540717.
- Ohuchi M, Sakamoto Y, Tokunaga R, *et al.* Increased EZH2 expression during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. **Oncol Lett.** 2018;16(4):5275-5281. doi:10.3892/ol.2018.9240
- Olivares-Bañuelos, T. *et al.* (2019). Brown Seaweed *Egregia menziesii*'s Cytotoxic Activity against Brain Cancer Cell Lines. **Molecules.** 24(2). pii: E260. doi: 10.3390/molecules24020260.
- Oliveira, M.C. *et al.* (2009). The seaweed flora of Admiralty Bay, King George Island, Antarctic. **Polar Biology.** 32:1639–1647. doi: 10.1007/s00300-009-0663-9.
- Peñalver R, *et al* (2020). Seaweeds as a Functional Ingredient for a Healthy Diet. **Mar Drugs**;18(6):301. Published 2020 Jun 5. doi:10.3390/md18060301

- Petimar, J. *et al.* (2018). Recommendation-based dietary indexes and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study and Health Professionals Follow-up Study. **Am J Clin Nutr.** 108(5):1092-1103. doi: 10.1093/ajcn/nqy171.
- Plouguerné E, *et al* (2014). Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications. **Front Cell Infect Microbiol**; 4:174. Published 2014 Dec 17. doi:10.3389/fcimb.2014.00174.
- Phull, A.R.; Kim, S.J. (2018). Undaria pinnatifida a Rich Marine Reservoir of Nutritional and Pharmacological Potential: Insights into Growth Signaling and Apoptosis Mechanisms in Cancer. **Nutr Cancer.** 70(6):956-970. doi: 10.1080/01635581.2018.1490449.
- Pilleron, S. *et al.* (2019). Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. **Int J Cancer.** 144(1):49-58. doi: 10.1002/ijc.31664.
- Pistrutto, G. *et al.* (2016) Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging.** 8(4):603-19. doi: 10.18632/aging.100934.
- Quartino, M.L. *et al.* (2013). Evidence of macroalgal colonization on newly ice-free areas following glacial retreat in Potter Cove (South Shetland Islands), Antarctica. **PLoS One.** 8(3):e58223. doi: 10.1371/journal.pone.0058223.
- Rocha, D.H.A. *et al.* (2018). Seaweed Secondary Metabolites In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. **Mar Drugs.** 16(11). pii: E410. doi: 10.3390/md16110410.
- Rodrigues, D. *et al.* (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. **Food Chem.** 183:197-207. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.057.
- Rodriguez-Salas, N. *et al.* (2017). Clinical Relevance of Colorectal Cancer Molecular Subtypes. **Crit Rev Oncol Hematol.** 109:9-19. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.11.007.
- Roncucci, L.; Mariani, F. (2015). Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket? **Eur J Intern Med.** 26(10):752-6. doi: 10.1016/j.ejim.2015.08.019.
- Rosa et al (2020). Seaweed Secondary Metabolites with Beneficial Health Effects: An Overview of Successes in In Vivo Studies and Clinical Trials. **Mar Drugs.**; 18(1):8.. doi:10.3390/md18010008.
- Ruisi, S. *et al.* (2007). Fungi in Antarctica. **Rev Environ Sci Biotechnol.** 6:127–141. doi:10.1007/s11157-006-9107-y.
- Sairenji, T. *et al.* (2017). An Update on Inflammatory Bowel Disease. **Prim Care.** 44(4):673-692. doi: 10.1016/j.pop.2017.07.010.
- Sakthivel, K. M., & Hariharan, S. (2017). **Regulatory players of DNA damage repair mechanisms: Role in Cancer Chemoresistance. Biomedicine & Pharmacotherapy, 93,** 1238–1245. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.035
- Sathasivam, R. *et al.* (2018). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi J Biol Sci.** doi: 10.1016/j.sjbs.2017.11.003.
- Schoenrock, K.M. *et al.* (2015). Life history bias in endophyte infection of the Antarctic rhodophyte, *Iridaea cordata*. **Botanica Marina.** 58(1):1–8. doi: 10.1515/bot-2014-0085.

- Schottenfeld, D. (2017). An epidemiologic perspective on the stem cell hypothesis in human carcinogenesis. **Cancer Epidemiol.** 50:132-136. doi: 10.1016/j.canep.2017.09.001.
- Schumacher, M. *et al.* (2011). Gold from the sea: marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. **Biotechnol Adv.** 29(5):531-47. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.02.002.
- Ścieszka, S.; Klewicka, E. (2018). Algae in food: a general review. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 18:1-10. doi: 10.1080/10408398.2018.1496319.
- Seca, A.M.L, Pinto, D.C.G.A. (2018). Overview on the Antihypertensive and Anti-Obesity Effects of Secondary Metabolites from Seaweeds. **Mar Drugs.** 16(7). pii: E237. doi: 10.3390/md16070237.
- Sharif, N. *et al.* (2014). Prolific Anticancer Bioactivity of Algal Extracts (Review). **Cell,** (3):8 ISSN 2349-7211.
- Silva, D.A.S. *et al.* (2018). Mortality and years of life lost by colorectal cancer attributable to physical inactivity in Brazil (1990-2015): Findings from the Global Burden of Disease Study. **PLoS One.** 13(2):e0190943. doi: 10.1371/journal.pone.0190943.
- Singh, A.; Varshney, V. (2013). Effects of algal compounds on cancer cell line. **JEBAS.** 1(15). ISSN: 2320 – 8694.
- Song, M. *et al.* (2015). Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. **Gastroenterology.** 148(6): 1244–1260. doi:10.1053/j.gastro.2014.12.035.
- Stabili, L. *et al.* (2014). Biotechnological potential of the seaweed *Cladophora rupestris* (Chlorophyta, Cladophorales) lipidic extract. **N Biotechnol.** 31(5):436-44. doi: 10.1016/j.nbt.2014.05.002.
- Talero, E. *et al.* (2015). Bioactive Compounds Isolated from Microalgae in Chronic Inflammation and Cancer. **Mar. Drugs.** 13:6152-6209; doi:10.3390/md13106152.
- Tamura, S. *et al.* (2018). Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity enhances fucoxanthinol-induced apoptosis in colorectal cancer cells. **Food Sci Technol Int.** 24(2):172-182. doi: 10.1177/1082013217740000.
- Tsai HL *et al* (2017). Efficacy of Low-Molecular-Weight Fucoidan as a Supplemental Therapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. **Mar Drugs;** 15(4):122. Published 2017 Apr 21. doi:10.3390/md15040122
- WCRF – World Cancer Research Found (2018). Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a global perspective. Disponível em: <<https://www.wcrf.org/sites/default/files/Summary-third-expert-report.pdf>> Acesso em: 12/02/2019.
- Wei, Q. *et al.* (2016). Clinicopathologic and Molecular Features of Colorectal Adenocarcinoma with Signet-Ring Cell Component. **PLoS One.** 11(6):e0156659. doi: 10.1371/journal.pone.0156659.
- Wells, M. L. *et al.* (2016). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **J Appl Phycol.** 29:949–982. DOI 10.1007/s10811-016-0974-5.
- WHO – World Health Organization (2019). What is cancer? Disponível em <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> acesso em 12/02/2019.



Wiencke, C.; Amsler, C.D. (2012). Seaweeds and their communities in Polar Regions. In: (K. Bischof and C. Wiencke, eds) *Seaweed biology: novel insights into ecophysiology, ecology and utilization*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 265–291.

Wiencke, C.; C.D. Amsler. (2012). Seaweeds and their communities in Polar Regions. In: (K. Bischof and C. Wiencke, eds) *Seaweed biology: novel insights into ecophysiology, ecology and utilization*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 265–291.

Wynne, M.J (2017) A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: fourth revision. *Nova Hedwigia Beiheft*, 145, 7–202.

Xu, S.Y.; Huang, X.; Cheong, K.L. (2017). Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Mar Drugs*. 2017 Dec 13;15(12). doi: 10.3390/md15120388.

Yan MD, Lin HY, Hwang PA (2019). The anti-tumor activity of brown seaweed oligo-fucoidan via lncRNA expression modulation in HepG2 cells. **Cytotechnology**;71(1):363-374. doi:10.1007/s10616-019-00293-7

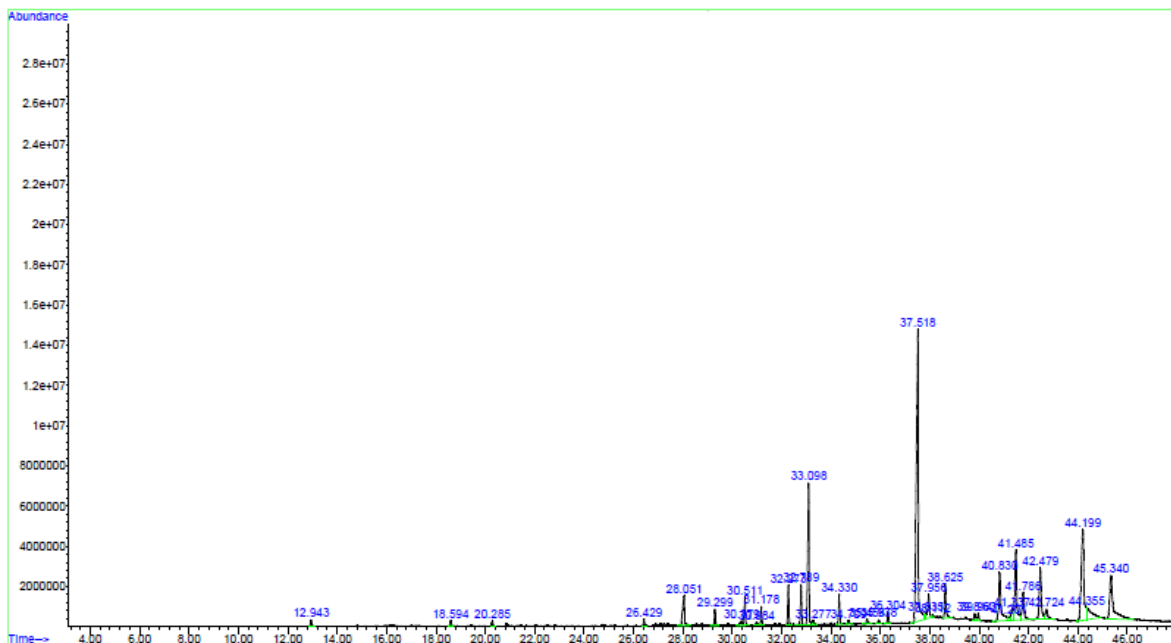
Zacher, K. *et al.* (2009). Responses of Antarctic *Iridaea cordata* (Rhodophyta) tetraspores exposed to ultraviolet radiation. **Phycological Research**. 57: 186–193. doi:10.1111/j.1440-1835.2009.00538.x.

Zhang, L.; Shay, J.W. (2017). Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. **J Natl Cancer Inst**. 109(8). doi: 10.1093/jnci/djw332.

Zhong, Z., & Virshup, D. M. (2019). Wnt signaling and drug resistance in cancer. **Molecular Pharmacology**, mol.119.117978. doi:10.1124/mol.119.117978

#### 4. ANEXOS

##### Espectros de massa (CG-ES) – extrato etanólico *M. hariatii* (MHE)



##### Espectros de massa (CG-ES) – extrato clorofórmico *I. cordata* (ICC)

