

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA
VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Efeito Antitumoral de Extratos das Macroalgas Antárticas *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmaretia anceps* e *Iridaea cordata* sobre a linhagem celular tumoral HCT - 116

Rafaele Frassini

Caxias do Sul

2018

RAFAELE FRASSINI

Efeito Antitumoral de Extratos das Macroalgas Antárticas *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmaretia anceps* e *Iridaea cordata* sobre a linhagem celular tumoral HCT - 116

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

Orientadores: Pr^a Dr^a Mariana Roesch Ely
Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques

Caxias do Sul

2018

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

F843e Frassini, Rafeale

Efeito antitumoral de extratos das macroalgas antárticas
Cystosphaera jacquinotti, *Desmaretia anceps* e *Iridaea cordata* sobre a
linhagem celular tumoral HCT-116 / Rafeale Frassini. – 2018.

130 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Mariana Roesch Ely, João Antonio Pêgas Henriques.

I. Cólon (Anatomia) - Câncer. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Alga. 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)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

RAFAELE FRASSINI

Efeito Antitumoral de Extratos das Macroalgas Antárticas *Cystosphaera jacquinotii*,
Desmaretia anceps e *Iridaea cordata* sobre a linhagem celular tumoral HCT - 116

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção do título
de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely

Co-orientador: Prof. Dr. João Antonio Pegas Henriques

TESE APROVADA EM 28 DE SETEMBRO DE 2019.

Orientador: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely

Co-orientador: Profa. Dr. João Antonio Pegas Henriques

Prof. Dr. Ricardo Coutinho

Prof. Dra. Maria Lúcia Scroferneker

Profa. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Aos meus pais, Carlos e Maria Angélica, e aos meus avós,
Antônio e Glória, por todo amor e compreensão.

“No final, nós vamos conservar somente o que amamos,
vamos amar somente o que entendemos e entenderemos
somente o que nos foi ensinado.”

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e oportunidades infinitas de crescimento e aprendizado.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, especialmente:

À Prof^a. Dra. Mariana Roesch Ely e ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques pela orientação, apoio, compreensão, confiança e exemplo.

Ao Prof. Dr. Aldo José Dilon e ao Prof. Dr. Sérgio Laguna Echeverrigaray por toda a ajuda e colaborações.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo por todo apoio ao projeto e por oportunizar a realização da pesquisa de campo na Antártica.

Ao Prof. Dr. Sidnei Moura, ao Prof. Dr. Cláudio Martins Pereira de Pereira e a Prof^a. Dr^a Miriam de Barcelos Falkenberg por todo auxílio e empenho para a realização desta pesquisa.

A Prof^a Dr^a Nair S. Yokoya, a Prof^a Dr^a Mutue T. Fujii, a Dr^a Aline Paternostro Martins e Prof^a Dr^a Franciane M. Pellizari por gentilmente cederem as algas antárticas para a realização deste projeto e pelo auxílio na Taxonomia.

Ao Dr. Leonardo Zanbotti Vilella e ao Prof. Dr. Tiago Barcellos pelo auxílio na caracterização químicas das algas.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela cooperação e disponibilidade em ajudar sempre.

A Universidade de Caxias do Sul e a CAPES pelo auxílio financeiro e pela bolsa.

A todos os meus colegas de colegas de laboratório, especialmente: Caroline Menti, Francine Girardello e Sandra Pavin pela amizade, companheirismo e conhecimentos.

Às minhas amigas: Débora Menegol, Daniela Pasquali e Geane Bertotti pelo carinho, amizade incondicional, apoio e motivação constantes.

Ao meu namorado Diego Paim Vergamini, pelo apoio, compreensão e companheirismo.

À minha família, em especial, minha avó Glória, meu avô Antônio e aos meus pais, Carlos e Maria Angélica, pela confiança, apoio, amor, dedicação e, principalmente, por acreditarem em mim sempre.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Considerações Gerais Sobre Câncer e Câncer Colorretal.....	18
2.2. Bases Moleculares e Patogênese do Câncer Colorretal	22
2.3. Descrição Geral do Continente Antártico	31
2.4. Importância Ecológica e Composição Química das Macroalgas.....	34
2.5. Extração de Compostos Bioativos de Macroalgas.....	36
2.6. Atividade Antitumoral de Extratos e Compostos de Macroalgas.....	42
2.7. Capacidade Antioxidante de Compostos de Macroalgas e sua Relação com a Atividade Anticâncer	45
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Capítulo I	49
4.2. Capítulo II.....	63
5. DISCUSSÃO GERAL.....	92
6. CONCLUSÕES.....	99

7. PERSPECTIVAS	101
ANEXOS	128

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição, por sexo, dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2018 (INCA, 2018)..... 20
- Figura 2.** Sequência da evolução adenoma-carcinoma (Adaptado de Bhalla *et al.*, 2018)..... 23
- Figura 3.** Esquema da via extrínseca e intrínseca de indução de apoptose em células humanas (Adaptado de: Salvesen & Walsh, 2014). 29
- Figura 4.** Localização e limites da região Antártica. FPA representa a posição média da Zona da Frente Polar Antártica; 1- Ilhas Orkney do Sul, 2- Ilhas Windmill, 3- Monte Submarino Almirantado e 4 - Estação Antártica Comandante Ferraz (Brasil). Fonte: *Landsat Image Mosaic of Antarctica (LIMA) - U.S. Geological Survey* (<http://lima.usgs.gov/>). Adaptado de: Centro Polar e Climático da UFRGS..... 32
- Figura 5.** Esquema geral para a obtenção de extratos (Adaptado de Yunes, 1997). 37
- Figura 6.** Resumo das técnicas de isolamento e caracterização de compostos bioativos (adaptado de Sidharan *et al.*, 2011). 41

4.1. Capítulo I

- Figure 1.** Cytotoxic profile of antarctic seaweed *I. cordata* (ICH and ICC) extracts against HCT 116 cell line after 24, 48 and 72h of exposure (*p<0.05 compared to control in time corresponding analysis).....61
- Figure 2.** Citotoxic profile of antarctic seaweed *D. anceps* (DAH, DAC and DAM) extracts against HCT 116 cell line after 24, 48 and 72h of exposure (*p<0.05 compared to control in time corresponding analysis).62

4.2. CAPÍTULO II

Figure 1. Cytotoxic effects of DACM extract against HCT 116 cell line in 24, 48 and 72h. Decrease in cell viability was reduced in lower concentrations ($< 50\mu\text{g.mL}^{-1}$) for longer incubation time (48 and 72h).....74

Figure 2. Flow cytometry analysis of Cell Cycle parameters: HCT 116 cells were treated for 24h with DMSO 0.5% (control negative) and with the DACM extract at the IC_{50} ($37.77\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) concentration and twice the IC_{50} ($75.4\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) (* $p<0.05$ compared to control).76

Figure 3. Annexin-V/PI staining expressed in mean and standard deviation after 24 treatment with the DACM extract at the concentration of IC_{50} ($37.77\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) and twice ($75.4\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) (* $p<0.05$ compared to control).78

Supplementary Material

Figure 1. ^1H NMR spectrum of fractions of the chloroform extract of the antarctic seaweed *D. anceps*90

Figure 2. Representative analysis of flow cytometry data after Annexin V/Propidium Iodide staining. HCT 116 cells were treated for 24h with DMSO 0.5% (Control) and with the DACM extract at the IC_{50} ($37.77\mu\text{g/mL}$) concentration and twice the IC_{50} ($75.4\ \mu\text{g/mL}$). Annexin-V only staining early apoptotic events (Q1-UL quadrant), Annexin V and PI staining indicated the late phase of apoptosis (Q1-UR quadrant), only PI staining indicated necrosis (Q1-LR) and Annexin-V and PI not stained (Q1-LL) indicated viable cells. Quadrant figures were representative at least three independent experiments.91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de espécies de macroalgas antárticas.	36
Tabela 2. Vantagens e limitações dos processos Maceração Dinâmica e Ultrassom....	38
Tabela 3. Macroalgas e efeitos de extratos e compostos em linhagem de câncer de mama e colorretal.	42

4.1. CAPÍTULO I

Table 1. IC ₅₀ (µg/mL) extracts of antartic seaweeds against HCT 116 cancer cell line.....	59
Table 2. Major compound presents in the hexanic and chloroformic extracts of <i>I. cordata</i> by GC-MS.	60

4.2. CAPÍTULO 2

Table 1. Major compounds expressed as a peak area (%) of chloroform extract of <i>D. anceps</i>	71
Table 2. GC-MS Major compounds expressed as a peak area (%) of fractions of chloroform extract fractions of <i>D. anceps</i>	72
Table 3. IC ₅₀ (µg/mL) of Fractions of Chloroform Extract of <i>D. acenps</i> against HCT 116 cancer cell line.....	75

Supplementary Material

Table 1. Yield of fractions of DACM extract.....	88
--	----

ESTRUTURA DA TESE

A presente tese está estruturada da seguinte maneira: introdução geral, objetivos (geral e específicos), revisão de literatura, resultados, discussão geral, conclusões e perspectivas.

A introdução refere-se a dados gerais sobre o câncer de colorretal e a importância da busca de compostos de origem natural extraídos de macroalgas como alternativa para o possível desenvolvimento de novos fármacos.

Os resultados foram apresentados na forma de artigos e divididos em Capítulos 1 e 2. O Capítulo 1 abordou citotoxicidade de extratos, obtidos pela técnica de ultrassom utilizando-se as macroalgas antárticas *C. jacquinotii*, *I. cordata* e *D. anceps*, contra a linhagem celular de câncer colorretal HCT 116. Este trabalho também apresentou a caracterização química destas algas a partir das técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a Massas (GC-MS), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando-se padrões, além da determinação do percentual total de lipídios. Este artigo foi submetido para publicação à revista *Advances in Biological Chemistry*.

O Capítulo 2 se refere à caracterização química por GC-MS e a citotoxicidade do extrato clorofórmico, obtido pela técnica de maceração, da macroalga *D. anceps* contra a linhagem celular HCT 116. Além disso, avaliou-se o efeito causado no ciclo celular e mecanismos de morte celular, após exposição da linhagem HCT 116 ao extrato. Este trabalho também abordou o fracionamento do extrato clorofórmico, caracterização química e citotoxicidade das frações. Este artigo será submetido à revista *Food Chemistry*.

A discussão geral aborda os resultados nos dois capítulos, correlacionando-os com as contribuições e importância deste estudo para a identificação de compostos com

atividade antitumoral. Por fim, são apresentadas as conclusões gerais da tese e suas perspectivas.

RESUMO

O câncer colorretal é o terceiro mais prevalente no mundo, estando associado a elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Apesar dos avanços na área de diagnóstico nas últimas décadas, os índices de mortalidade permanecem elevados, devido à resistência celular tumoral às drogas convencionais. Devido a estes fatores, a busca de novos compostos com atividade antitumoral é de extrema importância. As macroalgas antárticas são adaptadas a um ambiente extremo, apresentando uma diversidade de metabólitos e, por isso, sendo consideradas fontes promissoras de compostos com atividade anticâncer. Neste trabalho, a linhagem celular tumoral HCT 116 foi exposta a concentrações crescentes de extratos obtidos a partir das macroalgas antárticas *Iridaea cordata*, *Cystosphaera jacquinotii* e *Desmarestia anceps* por ultrassom. Para a macroalga *D. anceps*, foi realizada também a extração por maceração dinâmica, utilizando-se o extrato clorofórmico. Este extrato foi fracionado e a citotoxicidade do extrato e das frações contra a linhagem HCT 116 foi avaliada. Os extratos e frações foram caracterizados quimicamente. A via de indução de morte e o efeito causado no ciclo celular da linhagem HCT 116, após exposição ao extrato DACM na concentração do IC₅₀ e o dobro deste valor, foram analisados por citometria de fluxo. Os extratos hexânico e clorofórmico da macroalga *I. cordata* e hexânico, clorofórmico e metanólico de *D. anceps*, obtidos por ultrassom, mostraram-se citotóxicos contra a linhagem celular tumoral HCT 116. O extrato clorofórmico de *D. anceps*, preparado utilizando-se a técnica de maceração dinâmica (DACM) apresentou citotoxicidade contra a linhagem

HCT 116. Com exceção da fração 1, as demais induziram a redução da viabilidade celular da linhagem HCT 116. Verificou-se também que o extrato DACM causou a redução do número de células na fase G1 do ciclo celular e o aumento do percentual de células multinucleadas. Com o emprego de Anexina V/PI, verificou-se que o mecanismo de morte celular induzido, após exposição das células tumorais HCT 116 ao extrato DACM por 24 horas, foi o de apoptose. Estes dados sugerem que os extratos hexânico e clorofórmico de *I. cordata* e os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico de *D. anceps* sejam candidatos a posteriores estudos para a identificação de compostos com atividade antitumoral. Este foi o primeiro estudo a reportar a atividade anticâncer de extratos e frações da macroalga parda *D. anceps*, bem como o mecanismo de morte e efeito causado no ciclo celular da linhagem HCT 116, após exposição ao extrato, sugerindo que esta alga seja promissora candidata a futuros estudos para a identificação e isolamento de moléculas com atividade antitumoral.

Palavras-chaves: atividade anticâncer, câncer colorretal, macroalgas antárticas

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most prevalent in the world, with high mortality rates. Despite advances in the diagnostic area in recent decades, mortality rates remain high due to tumor cell resistance to conventional drugs. Therefore, the search for new compounds with antitumor activity is extremely important. Antarctic macroalgae are adapted to a hostile environment and are considered promising sources of compounds with anticancer activity. In this work, the tumor cell line HCT 116 was exposed to increasing concentrations of extracts obtained from the antarctic seaweeds *Iridaea cordata*, *Cystosphaera jacquinotii* and *Desmarestia anceps* by ultrasound technique. For the macroalgae *D. anceps*, extraction was also carried out by the maceration technique, using the chloroform extract. This extract was fractionated and the cytotoxicity of the extract and fractions against the HCT 116 cell line was evaluated. The extracts and fractions were also characterized chemically. The death induction pathway and the effect on the cell cycle of the HCT 116 cell line were analyzed after exposure to the DACM extract at IC₅₀ and double concentration rate. The hexanic and chloroform extracts of the *I. cordata* seaweed and the hexane, chloroform and methanolic extracts of *D. anceps* obtained by the ultrasound technique inhibited the growth of the tumor cell line HCT 116 in a dose-dependent manner. The chloroform extract of *D. anceps* obtained by the maceration technique (DACM) showed cytotoxicity against the HCT 116 cell line in a dose-dependent manner. Fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and nuclear magnetic resonance (¹H NMR). With the exception of fraction 1, all fractions revealed cytotoxic effects against HCT 116 cell line. The DACM extract was also caused a reduction in the number of

cells in the G1 phase of the cell cycle and the increase population of multinucleated cells. The mechanism of induced cell death after exposure of the HCT 116 tumor cells to the DACM extract for 24 hours was related to the apoptotic process. These data suggest that the hexanic and chloroform extracts of *I. cordata* and the hexane, chloroform and methanolic extracts of *D. anceps* obtained by the ultrasound and the chloroform extract of *D. anceps* obtained by maceration are candidates for further studies for the identification of compounds with antitumor activity. This was the first study to report the anticancer activity of extracts and fractions of *D. anceps* brown seaweed, as well as the mechanism of death and effect caused in the cell cycle of the HCT 116 strain after exposure to the extract, suggesting that this alga is a promising candidate to future studies for the identification and isolation of molecules with antitumor activity.

Keywords: anticancer activity, colorectal cancer, antartic seaweeds

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais prevalente no mundo e a quarta maior causa de morte, segundo estudo conduzido pela GLOBOCAN (2012), coordenado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*Internacional Agency for Research on Cancer - IARC*).

No Brasil, a prevalência dos diferentes tipos de câncer varia conforme a região, sendo Sul e Sudeste as que concentram maior número de casos de câncer de cólon e reto. O CCR é uma doença multifatorial, porém a sua elevada incidência nestas regiões brasileiras pode estar correlacionada com a adoção de um estilo de vida ocidental, em que fatores como obesidade, tabagismo, sedentarismo, alto consumo de carne vermelha, alimentos processados e baixa ingestão de vegetais são predominantes, semelhante ao que ocorre nos países desenvolvidos.

Apesar dos avanços das intervenções terapêuticas nas últimas décadas, os índices de mortalidade causados pelo CCR permanecem em torno de 40% em países desenvolvidos e 55% nos países em desenvolvimento, principalmente devido a metástases no fígado em estágios mais avançados da doença. A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do CCR é um fator de grande relevância na busca da diminuição da incidência, quanto da morbidade e mortalidade causadas pelo CCR. Assim, a identificação de marcadores e dos mecanismos que inibem a apoptose e estimulam a proliferação celular de células transformadas é de fundamental importância para reduzir a prevalência desta doença.

Com base neste problema e devido à resistência celular às drogas antineoplásicas, pesquisas de novos compostos naturais com propriedades anticâncer e efeitos colaterais reduzidos, como os extraídos de macroalgas, são importantes no sentido de fornecer alternativas para o tratamento desta enfermidade. Estudos tem reportado o potencial anticâncer, anti-inflamatório, anticoagulante, antioxidante, antitumoral de uma série compostos extraídos de macroalgas.

As algas desenvolveram estratégias de defesa por meio da produção de compostos associados ao metabolismo secundário, devido a sua adaptação a um ambiente competitivo. As macroalgas antárticas estão expostas a um ambiente extremo, que apresenta forte radiação solar durante o verão, baixa luminosidade e redução da atividade fotossintética no inverno. Por terem se adaptado a um ambiente tão hostil, estas algas podem ser consideradas fonte promissora de novos compostos com atividade anticâncer.

Estudos reportaram o perfil de ácidos graxos, esteróides e compostos halogenados presentes nas algas antárticas. Há escassos estudos, entretanto, relacionados ao potencial farmacológico destas espécies. Embora um progresso considerável tenha sido atingido nos últimos anos, o conhecimento sobre a flora ficológica antártica permanece fragmentado. Desta maneira, um número maior de pesquisas são necessárias a fim de elucidar a lacuna existente entre a relação composição química e atividade biológica destas algas.

O presente estudo faz parte da interação entre o ProAntar (Programa Antártico Brasileiro) e RedeAlgas (Rede Nacional em Biotecnologia de Macroalgas Marinhas), englobando diversos grupos de pesquisa no Brasil, com o objetivo de produzir e divulgar conhecimento sobre a diversidade, distribuição e potencial biotecnológico das algas antárticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações Gerais Sobre Câncer e Câncer Colorretal

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças e surge da transformação de células normais em células tumorais em um processo de múltiplos estágios que, geralmente,

progredir de uma lesão pré-cancerosa para um tumor maligno, que pode invadir tecidos adjacentes e se espalhar para outros órgãos do corpo (OMS, 2018).

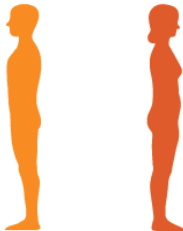
As alterações celulares associadas ao câncer são o resultado da interação entre os fatores genéticos de uma pessoa e a exposição a agentes externos (fatores ambientais). De uma maneira geral, os fatores genéticos estão associados à herança familiar, mutações em oncogenes e em genes que controlam o ciclo celular e as vias apoptóticas. Já os fatores ambientais estão associados com exposição a radiação, poluição, tabagismo, álcool, obesidade, sedentarismo e infecções virais por hepatites B e C e papiloma vírus humano. Estima-se que 30 a 50% dos casos de câncer podem ser prevenidos evitando-se a exposição a fatores de risco e implementando-se estratégias de prevenção (INCA, 2018; OMS, 2018).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 8,8 milhões de óbitos em 2015. Aproximadamente 70% destas mortes ocorrem em países de baixa e média renda, o que representa um entrave econômico para os mesmos. A frequência do câncer vem aumentando, devido ao envelhecimento da população, nos países em desenvolvimento como o Brasil (OMS, 2018).

Estima-se, para o Brasil, a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para o ano de 2018. A distribuição da incidência varia conforme a região brasileira, sendo que Sul e Sudeste, mais desenvolvidas economicamente, concentram 70% dos casos. Nestas regiões, predominam os cânceres de próstata, mama feminina, pulmão e intestino, semelhante ao que ocorre nos países desenvolvidos. Este dado pode estar correlacionado com o estilo de vida destas regiões, como por exemplo, o consumo de bebidas alcoólicas, a baixa ingestão de frutas e vegetais, o alto consumo de carnes vermelhas e de alimentos processados, a obesidade, o tabagismo e sedentarismo (INCA, 2018).

O câncer de cólon e reto possui relevância epidemiológica a nível mundial, representando 1,4 milhão de casos novos e quase 700 mil óbitos em 2012. A incidência desta doença tem

aumentado nos últimos anos. No Brasil, as estimativas para 2018-2019 são de 17.380 novos casos em homens e 18.890 em mulheres, correspondendo, respectivamente, a um risco estimado 16,83 e 17,90 a cada 100 mil habitantes. Esta neoplasia é a terceira mais frequente em homens e a segunda em mulheres (Fig. 1). Além do estilo de vida, outros fatores de risco também estão associados ao desenvolvimento do CCR, tais como idade acima de 50 anos, presença pólipos, distúrbios intestinais inflamatórios crônicos e diabetes tipo 2 (Huxley *et al.*, 2009; INCA, 2018).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição, por sexo, dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2018 (INCA, 2018).

Quando diagnosticado nos estágios iniciais (I, II e III), o CCR tem 80% de chances de cura, porém em estágios mais avançados da doença (IV), os percentuais são de apenas 13%. Em 60% dos casos em estágio avançado, ocorrem metástases no fígado. Nestes casos, os tratamentos mais indicados são quimioterapia, radioterapia e ressecção do fígado. Ressecção hepática é a terapia mais eficaz com 29 a 48% de chances de cura, porém, em 9 a 13% dos casos, ocorrem recidivas (Oki, 2018).

A incidência e mortalidade por CCR em adultos com idade entre 50 e 75 anos podem ser reduzidas através de exames de triagem, como exame de sangue oculto nas fezes (*fecal occult blood test* - FOBT), sigmoidoscopia flexível ou colonoscopia. Estes exames podem detectar câncer em estágio inicial e pólipos adenomatosos pré-cancerosos na região do intestino (Calonge *et al.*, 2008).

Há três principais fatores que estão relacionados à diminuição das taxas de mortes por CCR em uma população definida, entre eles, podem-se citar mudanças na exposição aos fatores de risco, programas de triagem e diagnóstico precoce e desenvolvimento de terapias adequadas com efeitos colaterais reduzidos. Nos Estados Unidos, a redução do número de casos da doença nas últimas décadas deve-se ao investimento em programas de prevenção e diagnóstico precoce (Edwards *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2014).

No Brasil, apesar do Sistema de Saúde Unificado (Sistema Único de Saúde – SUS) do governo federal possuir uma rede de unidades básicas de saúde, que oferecem serviços abrangentes de atenção primária, o país não possui uma política nacional ou programa governamental de prevenção e controle do CCR. Sendo, portanto, a detecção precoce do CCR, negligenciada (Paim *et al.*, 2011; Perin *et al.*, 2015). Desde 2002, o INCA (Instituto Nacional do Câncer) recomenda a pesquisa de sangue oculto nas fezes anualmente para pessoas assintomáticas com 50 anos ou mais e colonoscopia no caso de um teste de triagem positivo. No entanto, muito poucos dados sobre as taxas de rastreamento de CRC estão disponíveis (Perez *et al.*, 2008; Coy, 2013; Schmidt *et al.*, 2011; Perin *et al.*, 2015).

Mesmo com avanços no diagnóstico e tratamento, os índices de mortalidade permanecem altos, de modo que a sobrevivência média global por mais de cinco anos, após diagnóstico, é relatada em cerca de 55% nos países desenvolvidos e 40% nos países em desenvolvimento (American Cancer Society, 2014). Deste modo, é necessário um número maior de estudos, tanto epidemiológicos, quanto na busca de novas alternativas de tratamento, a fim de reduzir a magnitude desta doença.

2.2. Bases Moleculares e Patogênese do Câncer Colorretal

O CCR origina-se da transformação do epitélio glandular intestinal, sendo que inicialmente, originam-se lesões benignas, os pólipos adenomatosos, que evoluem para lesões malignas conhecidas como adenocarcinomas, que se caracterizam por apresentar alterações denominadas criptas aberrantes. Estas alterações causam a expansão da zona proliferativa de células na cripta colônica, passando a incluir células localizadas ou próximas da superfície epitelial, que acabam por originar um pólipo visível (adenoma). Com o decorrer do tempo, as células do adenoma tornam-se mais displásicas e menos especializadas e passam a adquirir o fenótipo de um carcinoma com a capacidade de ultrapassar a barreira da lâmina própria e atingir a mucosa (Hill *et al.*, 1978; Zarchy & Ershoff, 1996; Bodger, 2000; Vijan *et al.*, 2004; Nguyen & Duong, 2018).

Cerca de 75% dos adenomas colorretais são considerados esporádicos, significando ausência de características de hereditariedade ou de doenças predisponentes (Zarchy & Ershoff, 1996; Zandoná *et al.*, 2011). A progressão de adenoma para CCR é lenta e, geralmente, envolve vários anos e um número considerável de alterações genéticas. O CCR é classificado em dois grandes grupos: o CCR esporádico, que corresponde a 85 % do total das neoplasias malignas colorretais e o CCR hereditário, que representa aproximadamente 15 % do total. O CCR hereditário pode ser classificado em Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e CCR hereditário sem polipose (*hereditary non-polyposis colon cancer* - HNPCC ou síndrome de *Lynch* (Santos *et al.*, 2000; Zandoná *et al.*, 2011).

O processo de carcinogênese está relacionado com instabilidade cromossômica, mutações e instabilidade de microsátélites (*microsatellite instability* – MSI) e envolve principalmente os genes APC, KRAS; p53, genes do Reparo de Erros de Mal Emparelhamento (MMR, *Mismatch Repair*), COX – 2 e deleções no cromossomo 18q (Bahlla *et al.*, 2018) (Fig. 2).

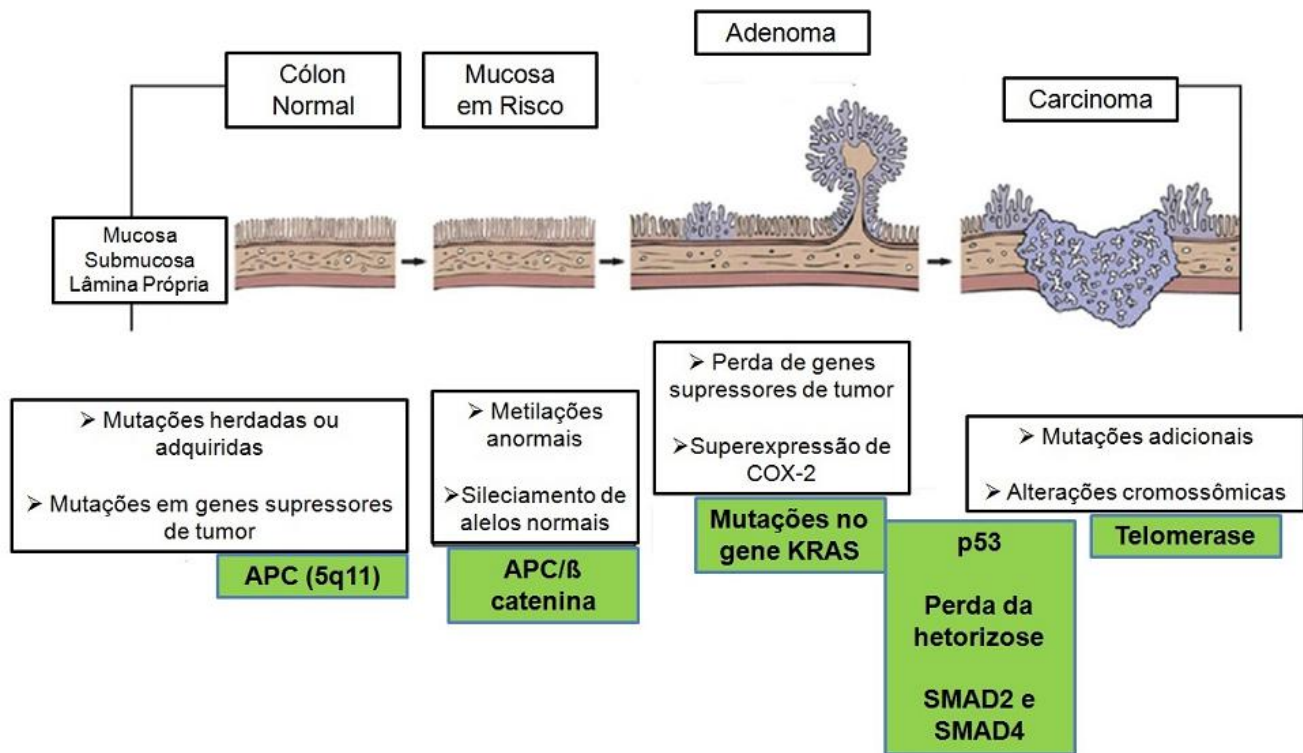


Figura 2. Sequência da evolução adenoma-carcinoma (Adaptado de Bhalla *et al.*, 2018).

A instabilidade cromossômica é caracterizada por alterações no número e estrutura dos cromossomos. Essas alterações incluem o aumento ou redução de segmentos, rearranjo cromossômico e perda da heterozigose. Estas alterações afetam a expressão de genes associados ao processo de tumorigênese ou que regulam pontos específicos do ciclo celular, ativando vias essenciais à proliferação do CCR (Markowitz & Bertagnolli, 2009; Pino & Chung, 2010; Tsang *et al.*, 2014; Nguyen & Duong, 2018).

O processo de patogênese em carcinomas esporádicos está relacionado a mutações no gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). O APC é um gene supressor de tumor, localizado no braço longo do cromossomo 5. Mutações em ambos os genes, uma germinativa e outra somática (perda da heterozigose), são necessárias para desencadear a carcinogênese. Deleções no braço longo do cromossomo 5 também estão relacionadas ao desenvolvimento de carcinoma esporádico (Santos *et al.*, 2000).

O gene APC é um ponto-chave na regulação do ciclo celular e atua na via de sinalização WNT/ β -catenina. A proteína APC tem um papel importante na regulação da proliferação celular inibindo a progressão das células da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Esta proteína interage com outras, dentre elas, as cateninas, especialmente a β -catenina. As cateninas (alfa, beta e gama) são uma família de proteínas citoplasmáticas com função de adesão intercelular, fazendo parte, juntamente com a placoglobina, dos complexos de junção aderente e dos desmossomos. A proteína APC se liga à β -catenina por um sítio específico e permite a ligação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), promovendo assim a degradação da β -catenina. Um bloqueio desta degradação, com inibição da GSK3, é realizado pelo fator de crescimento WNT e causa o aumento dos níveis de β -catenina, que se torna livre para interagir com duas outras proteínas. Formando, então, um complexo com a alfa-catenina, que se liga ao domínio citoplasmático da E-caderina, proteína transmembrana, cuja porção extracelular se liga a uma proteína semelhante numa célula vizinha e forma uma adesão intercelular (Peinado *et al.*, 1992; Rubinfeld *et al.*, 1992; Browne *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2000; Stanczak *et al.*, 2011).

O complexo das cateninas medeia, então, a interação entre a E-caderina e o citoesqueleto, que é essencial para a duplicação celular. A β -catenina também pode funcionar como um fator ativador de transcrição do DNA, complexando-se com o fator Tcf, formando um complexo molecular ativador de transcrição de DNA e iniciando a transcrição de genes que promovem a proliferação celular ou inibem a apoptose. A síntese da proteína APC truncada gera uma sinalização contínua por WNT. A proteína APC retira o excesso de β -catenina, modulando o nível desta no citoplasma e afetando a estrutura celular e vias de transdução de sinais relacionadas à proliferação celular, controlando deste modo a replicação celular (Miller & Moon, 1993; Munemitsu *et al.*, 1995; Morin *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2000; Stanczak *et al.*, 2011).

O gene KRAS é um proto-oncogene, que ao ser ativado, estimula a proliferação celular neoplásica. Mutações no gene KRAS geram a diminuição na interação da proteína p21 com a

proteína ativadora da GTPase (GAP), ficando a proteína p21 permanentemente ligada com GTP, no estado ativo. A proteína p21 realiza a fosforilação de um resíduo de serina da proteína raf-1, que ativa uma cascata de quinases, promovendo a transcrição como o c-myc. A permanente ativação da p21 mutada, gera a sinalização contínua para o núcleo e a estimulação para a proliferação celular (Barbacid, 1987; Bos, 1995; Vigil *et al.*, 2010; Bahlla *et al.*, 2018). A alta frequência de deleções em alelos na região 18q sugere a presença de genes supressores tumorais (DCC, SMAD2 e SMAD4). A proteína codificada pelo gene DCC desempenha uma função essencial no processo de adesão célula-célula, e, desse modo, modula o crescimento e a diferenciação celular na cripta colônica normal. Deste modo, mutações no gene DCC podem estar associadas à carcinogênese colorretal através do comprometimento do funcionamento adequado dos mecanismos de adesão célula-célula, levando ao surgimento de padrões anormais de diferenciação celular observados no CCR, podendo ocasionar o surgimento de metástases pela perda de contatos celulares (Nigam *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1997; Alazzouzi *et al.*, 2005; Nguyen & Duong, 2018).

Os genes SMAD1 e SMAD2 estão localizados na região 18q, em que há maior número de deleções relacionadas ao CCR. No entanto, verificou-se que a frequência de mutações somáticas SMAD4 e SMAD2 é baixa no CRC, sugerindo que outros genes desta região cromossômica possam estar envolvidos no desenvolvimento deste carcinoma (Bahlla *et al.*, 2018).

O p53 é um gene supressor tumoral clássico, agindo na regulação do desenvolvimento e crescimento celular. Quando o DNA sofre algum tipo de dano, a proteína p53 se liga então pelo seu domínio C-terminal a região danificada do DNA e bloqueia o ciclo celular na fase G1, impedindo a progressão do ciclo celular até que o dano tenha sido reparado. Mutações no gene p53 estão associadas com um pior prognóstico ao paciente com CCR, estando associadas a um número maior de mortes (Li *et al.*, 2015).

Os genes do complexo MMR, por sua vez, são responsáveis no organismo por uma via de reparo do DNA que corrige os erros de mal emparelhamento durante a replicação do DNA.

Alterações nestes genes deixam o DNA em um estado de hipermutabilidade, apresentando um maior número de mutações, pois os erros da DNA polimerase não são corrigidos, como consequência causam um fenótipo de instabilidade de microssatélites, que são sequências altamente repetitivas de DNA e muito sujeitas a sofrerem erros durante a replicação pela DNA polimerase (Grady et al., 2008; Hudler, 2012). A instabilidade de microssatélites é prevalente em 10 a 15% dos casos de carcinoma esporádico. Mutações em genes que promovem o reparo do DNA estão associadas ao desenvolvimento do fenótipo HNPCC em 80 a 90% dos casos. Em 80% dos pacientes há associação com os genes MLH1 e MSH6 (Parsons *et al.*, 1995; Boland & Goel, 2010).

O gene da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) inibe a diferenciação celular no epitélio intestinal e diminui as taxas de apoptose. COX-2 não é expressa em condições normais, mas é induzida por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento ou promotores de tumor. Os níveis da proteína COX-2 são muito baixos no epitélio colônico normal, mas apresentam-se elevados em CCR e pólipos (Santos *et al.*, 2000).

A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese molecular do CCR é um fator de grande relevância na busca da diminuição da incidência, quanto da morbidade e mortalidade causadas pelo CCR. Assim, a identificação de marcadores e dos mecanismos que inibem a apoptose e estimulam a proliferação celular de células transformadas é de fundamental importância para reduzir a prevalência desta doença.

A proliferação celular excessiva pode ocasionar o desenvolvimento de células cancerosas, que acumulam mutações. A apoptose ou morte celular programada desempenha um papel oposto na população de células. Alterações no balanço entre proliferação e morte celular estão associadas ao desenvolvimento do câncer (Forones *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2014).

A morte celular pode ser desencadeada por diferentes vias de sinalização, destacando-se, de maneira geral, necrose e apoptose, que podem ser diferenciadas morfológica e bioquimicamente. A necrose é caracterizada morfológica pelo aumento do tamanho da célula,

rompimento da membrana plasmática com perda do conteúdo citoplasmático, agregação da cromatina e resposta inflamatória local. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características que incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (Grivicich *et al.*, 2007; Cummings *et al.*, 2014).

A necrose ocorre quando há um dano celular irreparável. Esta forma de morte celular envolve diferentes vias que convergem para a ativação da interação de receptores proteína quinase 3 (RIP3). RIP3 é ativada após o recrutamento de vários receptores de superfície celular (DRs), receptores *Toll-like* (TLRs) e o receptor de células T (TCR). Além disso, o dano ao DNA pode induzir diretamente a formação de uma ativação RIP, independentemente da ligação do receptor da superfície celular (Green & Llambi, 2015).

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção e desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante na eliminação de células excedentes ou defeituosas e manutenção da homeostase corporal. A apoptose é um mecanismo eficiente e controlado por uma série de fatores que desencadeiam uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (Pistritto *et al.*, 2016).

Em humanos, a proteína Bax se associa à Bcl-2 induzindo a liberação da APAF-1 (protease associada a apoptose - 1), ativando a caspase 9, induzindo a apoptose. As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteínas proteases. Este grupo de proteínas sinaliza para a apoptose e cliva substratos com resíduos de asparato, levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis, dentre elas a caspase 3, participam da apoptose (Nicholson & Thornberry, 1997; Hengartner, 2000; Boatright *et al.*, 2003; Pistritto *et al.*, 2016).

A família Bcl-2 pertence a um grupo de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participa ativamente da regulação da mesma. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Entre as proteínas mais estudadas desta família estão a Bax e a Bcl-2. A Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (Bronner *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 2000; Hengartner, 2000; Petros *et al.*; 2004; Pistritto *et al.*, 2016).

A maioria dos cânceres apresenta mutações no gene que expressa a proteína p53 ou defeitos na sua regulação. A proteína p53 participa da regulação do ponto de checagem G1, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose. Danos no DNA promovem a superexpressão e, conseqüentemente, a ativação da p53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Se o reparo for realizado, a célula avança para a fase S. Quando os danos ao DNA não são passíveis de reparo, ocorre a ativação de apoptose. Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem de G1, possibilitando que células danificadas progridam para a fase S sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose (Argawal *et al.*, 1998; Sherr, 2000; Li *et al.*, 2015).

Diversos fatores podem desencadear a apoptose, como por exemplo, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e aumento de espécies reativas de oxigênio. A ativação de apoptose pode ser feita por duas vias, a intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes estímulos convergem principalmente para a mitocôndria. Inúmeros

estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular induzindo a permeabilização mitocondrial, com externalização da proteína citocromo c do espaço intermembrana para o citosol, e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Tal fato resulta na ativação dos receptores de morte específicos. Quando estes receptores reconhecem um ligante específico, os seus domínios interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1, as quais tem a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (Grivicich *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2014). As vias extrínseca e intrínseca de apoptose estão representadas na Figura 3.

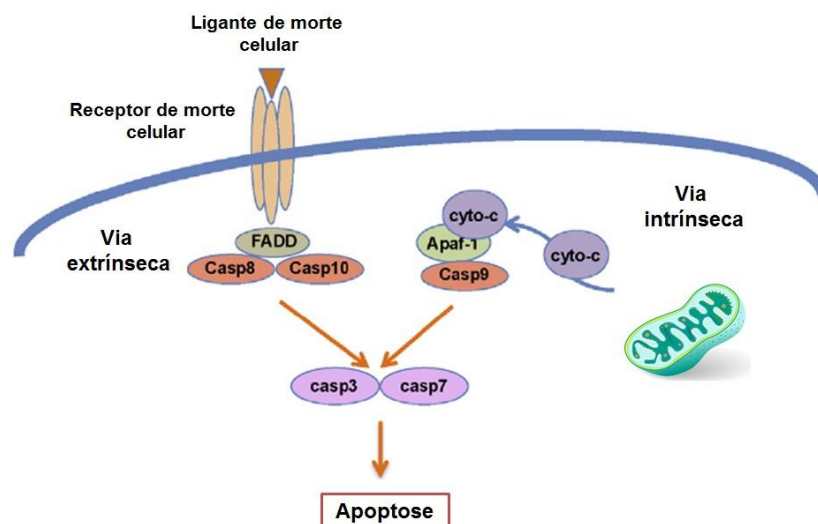


Figura 2. Esquema da via extrínseca e intrínseca de indução de apoptose em células humanas (Adaptado de: Salvesen & Walsh, 2014).

A identificação e caracterização das vias de morte celular tem implicações para a Farmacologia e Toxicologia. Cada tipo de morte celular, necrose e apoptose, é mediada por múltiplas vias sinalização, que servem como alvos potenciais para a toxicidade celular. A

compreensão de como um composto pode ativar diferentes vias de morte celular é essencial para determinar a citotoxicidade, efeitos agudos, subagudos e crônicos de drogas. Terapias farmacêuticas destinadas a ativar vias de citotoxicidade em células tumorais devem ser eficazes contra múltiplos tipos de câncer, mantendo a seletividade para minimizar destruição do tecido normal (Cummings *et al.*, 2004, Radogna *et al.*, 2014).

Durante a última década, avanços significativos foram feitos na descoberta e validação de novas drogas no tratamento contra o câncer. No entanto, inevitavelmente, a resistência celular a estas terapias leva a falhas no tratamento. Embora a maioria dos medicamentos contra o câncer existentes sejam anti-mitóticos, eles não agem em alterações específicas responsáveis pela tumorigênese. Além disso, sabe-se que a seletividade desses agentes resulta, em grande parte, do aumento da sensibilidade à apoptose (Penna *et al.*, 2017).

A principal limitação da quimioterapia provou ser a resistência à apoptose, devido a características intrínsecas ao tumor, como por exemplo, o acúmulo de mutações. Alterações no mecanismo apoptótico são responsáveis não só pelo desenvolvimento e progressão tumoral, mas também pela resistência tumoral a terapias. Na prática clínica, a apoptose tornou-se alvo potencial para uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à quimioterapia. Portanto, uma melhor compreensão das vias de sinalização apoptóticas podem melhorar a eficiência da terapia do câncer. A elucidação de mecanismos moleculares da apoptose abrem perspectivas de modulação desses processos (Grivicich *et al.*, 2007; Safa *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014).

Desta maneira, devido a resistência celular tumoral às terapias convencionais, a busca por novos compostos, principalmente os de origem natural, com propriedades anticâncer, com maior especificidade e efeitos colaterais reduzidos, como os extraídos de algas, tornou-se fundamental no sentido de fornecer alternativas para o tratamento desta enfermidade.

Atualmente, os metabólitos secundários de origem marinha tem sido extensivamente investigados devido ao fato de frequentemente exibirem propriedades antitumorais (Tarhouni-Jabber *et al.*, 2017). Vários compostos extraídos de algas marinhas são capazes de induzir a apoptose por diferentes vias e mecanismos moleculares. Dentre os compostos mais promissores destacam-se fucoindan (polissacarídeo sulfatado) e fucoxantina (carotenoide), ambos presentes em algas pardas (Moussavou *et al.*, 2014).

Park *et al.*, 2017 verificaram que fucoindan induziu apoptose e parada do ciclo celular no ponto de checagem G1 em células de câncer colorretal HCT 116. Este estudo sugeriu também que o mecanismo de morte celular induzido por fucoindan independente de p53. Segundo Rwigemera *et al.*, 2015, fucoxantina e seu metabólito fucoxantonol reduziram a viabilidade celular das linhagens MCF 7 e MDA MB com efeito dose dependente. O mecanismo morte celular identificado foi apoptose.

Apesar do aumento do número de estudos sobre o efeito citotóxico de compostos extraídos de algas na última década, o mecanismo de ação destes em linhagens de câncer colorretal não foi completamente elucidado, necessitando de um número maior de pesquisas a fim de se estabelecer a relação composto/mechanismo de ação, essencial para o desenvolvimento de novos fármacos com propriedade antitumoral (Rwigemera *et al.*, 2015).

2.3. Descrição Geral do Continente Antártico

O nome do continente origina-se da palavra grega *Antartikos*, que significa anti-ártico (o oposto de Ártico). A Antártica é uma massa continental isolada pela Corrente Circumpolar Antártica e que possui o ambiente com condições mais rigorosas do Planeta (ambiente polar). O

continente antártico está localizado no extremo sul do globo e está quase totalmente circunscrito no Círculo Polar Antártico ($66^{\circ} 33'S$) (Fig. 4).

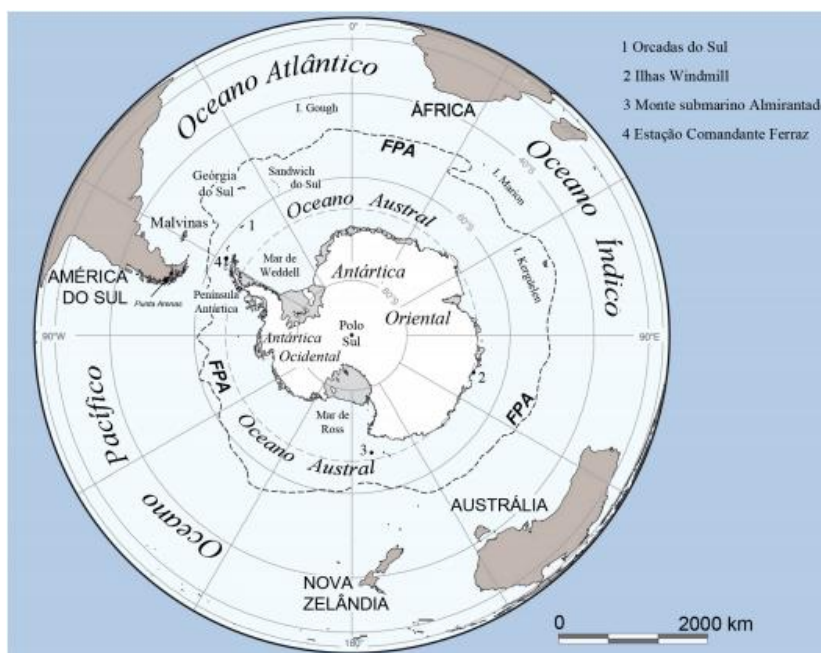


Figura 3. Localização e limites da região Antártica. FPA representa a posição média da Zona da Frente Polar Antártica; 1- Ilhas Orkney do Sul, 2- Ilhas Windmill, 3- Monte Submarino Almirantado e 4 - Estação Antártica Comandante Ferraz (Brasil). Fonte: *Landsat Image Mosaic of Antarctica* (LIMA) - U.S. Geological Survey (<http://lima.usgs.gov/>). Adaptado de: Centro Polar e Climático da UFRGS.

A Antártica é referenciada como o continente dos extremos, o mais frio (com variações de temperatura entre 0 a -70°C), o mais ventoso, o mais seco e possui a maior média de altitudes (2300m). Estima-se o continente antártico detenha 90% da água potável do planeta (Olson, 2002).

A região antártica é dividida ecologicamente em três sub-regiões, cada uma oferece condições e oportunidades limitadas de vida. O continente polar é a zona mais interna, coberta por gelo, de alta latitude, podendo chegar até 4250m de altitude e possui as condições climáticas mais rigorosas; a zona marítima, mais ampla, onde se localiza a península antártica e a zona periantártica, formada por um grupo de ilhas, que ocupam uma vasta extensão oceânica ao norte e é mais quente que as outras zonas (Beyer & Bölter, 2002).

Os organismos que habitam as regiões costeiras antárticas, como as macroalgas, por exemplo, estão adaptados a viver em condições extremas de temperatura, escuridão prolongada no inverno, radiação UV intensa no verão, bem como a presença de gelo, degelo e salinidade (Wiencke & Clayton, 2002; Wiencke, 2011). Entre as adaptações que estes organismos possuem para sobreviver neste hábitat destaca-se a produção de substâncias provenientes do metabolismo secundário e que podem ser de interesse humano. Devido às condições extremas da Antártica, a localização geográfica e as características oceanográficas, há uma diversidade característica de espécies, sendo muito alto o número de espécies endêmicas (podendo chegar a 33%), ao mesmo tempo em que se encontram táxons oriundos de outras regiões continentais, como América do Sul, Nova Zelândia, Austrália e África do Sul (Martín *et al.*, 2014).

A flora ficológica antártica apresenta uma menor riqueza de espécies quando comparada com as de ambientes tropicais e temperados. A baixa diversidade é atribuída principalmente às condições ambientais que limitam o número de táxons capazes de se adaptar a esta região. Winkcle & Clayton (2002) identificaram 75 espécies do táxon Rodophyta, 27 espécies do táxon Phaophyceae e 17 do táxon Chlorophyta. Neste estudo, o percentual de endemismo foi, respectivamente, 32%, 44% e 18%.

Aproximadamente 90% das espécies de macroalgas conhecidas localizam - se na região oeste do continente, incluindo a Península Antártica, ilhas Shetlands do Sul e ilhas Orkey do Sul, sendo que a riqueza diminui drasticamente no sentido leste, onde se localizam as elevadas latitudes (Wienckle *et al.*, 2009). As macroalgas utilizadas no presente estudo foram coletadas na Ilha de Greenwich (*I. cordata*) (Anexo I), Ilha de Snow (*D. anceps*) (Anexo II) e Ilha Rei George (Ponta Demay) (*C. jacquinotii*) (Anexo III).

As condições extremas e o isolamento da Antártica tem dificultado a Taxonomia e a pesquisa no continente. O conhecimento da flora marinha tem aumento nos últimos anos, porém, a ação humana tem modificado este ecossistema, até então inalterado (Martín *et al.*, 2014).

2.4. Importância Ecológica e Composição Química das Macroalgas

As macroalgas são organismos pluricelulares, eucariontes e autotróficos. São três os principais grupos de macroalgas: Clorophyta (algas verdes), Rodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyceae (algas pardas ou marrons). Estes grupos diferenciam-se principalmente quanto ao tipo de clorofila e pigmentos associados a ela e o tipo substância de reserva (Vidotti & Rollenberg, 2004; Marinho-Soriano *et al.*, 2012).

Estes organismos habitam oceanos, águas doces, solos, rochas e superfície de outros vegetais. Nos sistemas aquáticos as algas incorporam energia solar em biomassa, produzem o oxigênio que é dissolvido na água e usado pelos demais organismos aquáticos, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos e servem como alimento para animais herbívoros e onívoros. As algas verdes são responsáveis pela maior parte do oxigênio molecular disponível no planeta. Além disso, as macroalgas assimilam nitrogênio, incorporando-o em moléculas vitais como aminoácidos e ácidos nucleicos. Estes organismos desempenham um papel ecológico fundamental na manutenção da vida na Terra (Wiencke, 2011).

As macroalgas tem sido utilizadas há milênios como fontes alimentares de povos orientais. Seu interesse nutricional está baseado nos altos índices de fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas e minerais. Além da alimentação, os metabólitos destas algas são empregados na indústria têxtil, combustíveis, plásticos, tintas, cosméticos, vernizes, e como fonte de polissacarídeos (carragenanas, ágar e alginato). Mais de 15.000 metabólitos primários e secundários com diferentes aplicações já foram identificados. Na última década, as algas têm sido investigadas quanto a suas atividades biológicas (Cardozo *et al.*, 2007; Harnedy & FitzGerald, 2011).

Recentemente, houve uma crescente preocupação em relação à influência da dieta na saúde e bem estar. Como resultado, intensificaram-se pesquisas em busca de compostos naturais

biofuncionais. Devido a grande biodiversidade existente nos oceanos, os organismos marinhos, incluindo as macroalgas, são uma valiosa fonte de minerais, assim como reservatório de novos compostos biologicamente ativos (Harnedy & FitzGerald, 2011; Eggersdorfer & Wyss, 2018).

Os metabólitos secundários sintetizados por um organismo são resultado de suas adaptações ao ambiente e pressões de seleção. As macroalgas são organismos bentônicos e, desta forma, expostos a condições extremas de temperatura, radiação UV, salinidade, choque mecânico, herbivoria, entre outros. Devido à presença de sulfatos e halogênios no ambiente marinho, as macroalgas desenvolveram mecanismos para utilizar estes compostos e, como resultado, acabaram por biosintetizar substâncias sulfatas e halogenadas (Antunes *et al.*, 2011).

Há escassos estudos relatando a composição química de algas antárticas. Dembittsky & Tolstikov (2003) relataram a presença de compostos halogenados e alcanos em algas pardas antárticas (*Adenocystis utricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquintii*, *Desmarestia antarctica*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia menziesii*, *Halopteris obovata*, *Himantothalus gradifolius* e *Phaeurus antarcticus*). Dentre os compostos citados, destacam-se CH₂ClI, CH₂I₂, CHBrCl₂, CHBr₂Cl, CH₂Br₂, CHBr₃ and 1,2-C₂H₄Br₂.

As macroalgas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, esteroides, terpenos, carotenóides, polissacarídeos sulfatados, hidroquinonas sesquiterpênicas, acetogeninas, micosporinas, fenóis simples, polifenóis, ficocolóides (ágar, carragenanas e alginato), compostos halogenados e lectinas (Cardozo *et al.*, 2007).

O Estudo de Ankisetty *et al.*, 2004 reportou a caracterização química das algas antárticas *Delisea pulchra* (Greville) Montagne, *Plocamium cartilagineum* Dixon 1967, *Myriogramme smithii* (J. D. Hooker and Harvey) Kylin 1924, *Desmarestia menziesii* J. Agardh 1848 e *Cystosphaera jacquintii* (Montagne) Skottsberg 1907 (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química de espécies de macroalgas antárticas.

Espécie	Grupo Taxonômico	Compostos
<i>Delisea pulchra</i>	Rodophyta	Compostos halogenados
<i>Plocamium cartilagineum</i>	Rodophyta	Monoterpenos
<i>Myriogramme smithii</i>	Rodophyta	p-hydroxybenzaldehyde e p-methoxyphenol
<i>Desmarestia menziesii</i>	Phaophyceae	menzoquinona e hidroquinona
<i>Cystosphaera jacquintii</i>	Phaophyceae	cystosphaerol e phaeophytin

2.5. Extração de Compostos Bioativos de Macroalgas

Os produtos naturais, purificados ou na forma de extratos, constituem um ilimitado recurso para a descoberta de novas drogas, devido à incomparável diversidade química. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 80% da população mundial confia na medicina tradicional para os primeiros cuidados em saúde. O uso da medicina tradicional pelos povos asiáticos representa uma longa história de interação destes com o meio ambiente (Costa *et al.*, 2006; Duraipandiyar *et al.*, 2006; Moussavou *et al.*, 2014).

As macroalgas são importantes comercialmente em várias regiões do globo, especialmente em países orientais como China, Japão e Coreia. As algas constituem um recurso alimentar valioso, pois contém poucas calorias e são ricas em vitaminas, minerais, proteínas, polissacarídeos, esteróis e fibras. Há relatos que as algas sejam utilizadas como remédio na cultura popular oriental desde 3000 a.C. Chineses e japoneses utilizam popularmente as algas pardas no tratamento de hipertireoidismo e outras desordens glandulares e doenças cardiovasculares (de Almeida *et al.*, 2011). Tendo por base o conhecimento popular, nas últimas décadas, as algas tem sido investigadas quanto a suas atividades biológicas. Porém, poucos estudos relataram a composição química e atividade biológica da ficoflora da Antártica (Dembittsky & Tolstikov, 2003; Ankisetty *et al.*, 2004). Entretanto, testes clínicos, *in vivo* e *in vitro*, são necessários para confirmar a eficácia dos compostos naturais (Sasidharan *et al.*, 2011).

Diversos fatores podem influenciar na obtenção de compostos bioativos, tais como a metodologia de extração, natureza da matriz vegetal, tamanho das partículas da biomassa, solvente utilizado, tempo e temperatura de extração. O processo convencional consiste na extração sólido-líquido utilizando solventes orgânicos (Andreo & Jorge, 2006; Vardanega *et al.*, 2014).

Quando não se conhece a natureza dos compostos bioativos presentes na biomassa em estudo, um dos métodos tradicionalmente utilizados é a maceração por esgotamento do solvente com polaridades decrescentes, conforme ilustrado na Figura 5 (Cechinel & Yunes, 1997; Brusotti *et al.*, 2013).

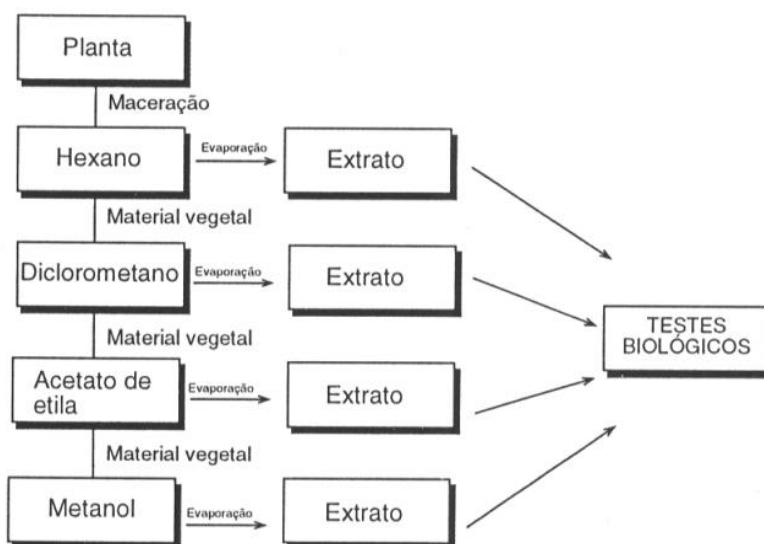


Figura 4. Esquema geral para a obtenção de extratos (Adaptado de Cechinel & Yunes, 1997).

A extração é a primeira e crucial etapa do processo de identificação de novos compostos bioativos. Diversas técnicas são propostas para a extração de compostos, dentre elas, a depleção, que utiliza vários solventes em polaridade crescente e extrações enriquecidas em um metabólito secundário específico, quando se conhece previamente a composição química da espécie. As técnicas de extração são bastante variadas e podem ser classificadas em convencionais, como a

maceração, infusão, decocção e ebulição sob refluxo, *soxhlet*, ou modernas, como micro-ondas, ultrassom, fluido supercrítico e extração por pressurização líquida (Brusotti *et al.*, 2013).

No presente estudo, duas técnicas de extração foram utilizadas, maceração e ultrassom. A técnica de maceração consiste no contato do solvente com a biomassa triturada por um tempo determinado, sob agitação contínua ou ocasional. A extração assistida por ultrassom tem recebido destaque, pois permite a obtenção de elevadas taxas de extração em menores tempos. A cavitação gerada pelo ultrassom é conhecida por produzir diversos efeitos na matriz vegetal, tais como a circulação do líquido (agitação do solvente) no sistema e a geração de turbulência que pode auxiliar no aumento da transferência de massa. As cavitações acústicas produzidas por esta técnica facilitam a penetração do solvente nas paredes celulares da matriz vegetal, permitindo que o conteúdo intracelular seja liberado de forma eficiente. A agitação do solvente aumentará a área de contato entre o solvente e os compostos alvos, permitindo a maior penetração do solvente na matriz da amostra (Khan *et al.*, 2010; Shirsath *et al.*, 2012; Corbin *et al.*, 2015). A Tabela 2 sumariza as vantagens e desvantagens de cada uma destas técnicas.

Tabela 2. Vantagens e limitações dos processos Maceração Dinâmica e Ultrassom.

Processo	Vantagens	Limitações
Maceração Dinâmica	Não causa a saturação do solvente Controle de Temperatura Não leva à degradação da biomassa Processo simples e baixo custo	Tempo longo de extração
Ultrassom	Efeito em células vegetativas, esporos ou enzimas Tempo reduzido Utiliza pouco solvente	Aumento da transferência de calor

(Fonte: Adaptado de: Fellows, 2009 In: Lima, 2014)

A técnica de ultrassom possui tempo de extração reduzido e é muito eficiente, pois ocasiona o rompimento da célula vegetal. Porém, pode ocasionar a aumento da transferência de calor e há uma limitação do volume de solvente utilizado (aproximadamente 100mL), sendo necessárias várias extrações quando se utiliza uma grande quantidade de biomassa. A maceração

não leva ao esgotamento do solvente, permite utilizar grande quantidade de biomassa em uma única extração, porém o tempo de extração é longo (Sasidharan *et al.*, 2011).

Cada técnica de extração possui inerentes vantagens e desvantagens, tendo como objetivo a obtenção da extração completa dos compostos de interesse e evitar a sua modificação química. A eficiência da extração é influenciada por vários fatores, como tipo e concentração de solvente, relação sólido-solvente, tempo, temperatura, pH, etc (Cújic *et al.*, 2016).

O perfil químico de extratos brutos não é uma tarefa fácil de ser realizada devido à diversidade de compostos. Múltiplas técnicas cromatográficas devem ser utilizadas para confirmar a estrutura de compostos bioativos. Para a separação dos compostos, deve-se levar em consideração que os extratos possuem vários tipos de estruturas com diferentes polaridades. Há diferentes técnicas de separação, dentre elas a cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC - *Thin layer chromatography*), coluna cromatográfica, cromatografia a vácuo, cromatografia *sephadex* e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) (Sasidharan *et al.*, 2011).

O avanço tecnológico das técnicas analíticas, principalmente as hifenadas, proporcionou um papel importante na elucidação de composições químicas complexas, com elevados níveis de sensibilidade e seletividade. O desenvolvimento de novas tecnologias possibilitou o estudo do extrato vegetal bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso de técnicas hifenadas (Rodrigues *et al.*, 2014)..

O termo técnicas hifenadas refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta analítica mais eficiente e rápida que as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos à base de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia (Rodrigues *et al.*, 2014).

As técnicas a serem acopladas deverão gerar informações diferentes, devem ser ortogonais. Como exemplos típicos de acoplamento pode-se citar a CLAE e a cromatografia gasosa (CG) com técnicas espectrométricas como espectrofotômetro de UV-Vis-*Diodo Array* (Ultravioleta-Visível-DAD), espectrômetro de massas (MS e MS-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detectores. A quantidade de informações obtidas é muito grande, sendo necessário o uso de *softwares* para tratamento dos dados. As técnicas hífenadas são vantajosas, pois necessitam de pequenas quantidades de amostra (Sasidharan *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014).

A técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-MS) é considerada uma ferramenta valiosa para avaliar misturas complexas, como extratos. GC-MS combina cromatografia de alta *performance* com um detector universal para produzir excelente sensibilidade para análise de compostos termoestáveis e voláteis. A técnica de GC-MS sob condições de impacto de elétrons é o método mais aplicado em laboratórios de pesquisa, uma vez que os espectros obtidos são documentados em bibliotecas. A quantificação é possível com o uso de padrão interno (Fiehn *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2014).

O HPLC é amplamente utilizado para obtenção de perfis cromatográficos de produtos naturais, identificação de compostos utilizando-se padrões, análises quantitativas e para fins de controle de qualidade. Este método pode ser acoplado a detectores como o UV (ultravioleta), por exemplo, detector de dispersão de luz evaporativa (*Evaporative Light Scattering Detector* - ELSD), detector de captura de elétrons (*Electron Capture Detector* - ECD) ou detectores de sistemas hífenizados, como o UV-DAD (UV - diodo array), espectrometria de massas (MS - *Mass Spectrometry*), ressonância magnética nuclear (RMN). O HPLC acoplado ao detector UV-DAD é capaz de identificar vários comprimentos de onda simultaneamente permitindo a análise qualitativa e quantitativa de picos em um cromatograma. Já o detector UV/Vis (ultravioleta/visível) é capaz de

variar o comprimento de onda de detecção, mas apenas uma leitura é feita a cada tempo (Brusotti *et al.*, 2014).

A purificação do composto de interesse é um processo de separação ou extração deste de outros compostos ou contaminantes. Cada composto possui um pico característico sob condições cromatográficas específicas. A Figura 6 ilustra as etapas para o isolamento de compostos bioativos (Sasidharan *et al.*, 2011).

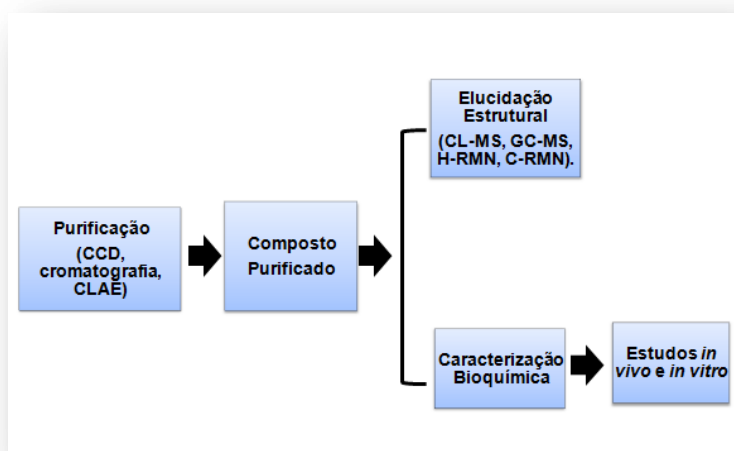


Figura 5. Resumo das técnicas de isolamento e caracterização de compostos bioativos (adaptado de Sidharan *et al.*, 2011).

A fim de identificar classes de compostos bioativos, simultaneamente com a caracterização química procede-se o fracionamento bioguiado. Esta técnica envolve o fracionamento (separação) repetitivo e avaliação concomitante da atividade biológica de interesse até o isolamento do composto. Bioensaios *in vitro* são mais rápidos e requerem quantidades muito pequenas de compostos. Mesmo que não sejam relevantes para as condições clínicas, são específicos, sensíveis e amplamente utilizados. Além disso, a maioria deles utiliza microplacas e podem ser realizados em plena ou semi-automação (Brusotti *et al.*, 2014).

2.6. Atividade Antitumoral de Extratos e Compostos de Macroalgas

As macroalgas marinhas são amplamente utilizadas como alimentos funcionais e para fins medicinais pelos povos asiáticos. Nas últimas décadas, estes organismos vem sendo investigados quanto as suas atividades biológicas, destacando-se a anticâncer. Sabe-se que a dieta pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento do CCR, ou pode contribuir para a sua prevenção, quando balanceada. A identificação de componentes alimentares que previnem o processo de tumorigênese pode contribuir para a identificação de agentes bioativos efetivos contra o carcinoma de cólon e reto. Vários estudos reportaram o potencial anticâncer de compostos de macroalgas contra linhagens de CCR (Tabela 3).

Tabela 3. Macroalgas e efeitos de extratos e compostos em linhagem de câncer de mama e colorretal.

Espécie algal	Classificação	Câncer	Câncer	Outros Tipos	Composto	IC ₅₀	Fonte
		Colorretal	de Mama	de Câncer			
<i>Fucoxanthin</i> sp.	Parda	+	+	-	Fucooidan	5-20 µg/mL	Kim <i>et al.</i> , 2010
<i>Strypodium</i> sp.	Parda	+	-	+	Meroditerpenoides	11.2 e 14 µM	Pereira <i>et al.</i> , 2011
<i>Sargassum muticum</i>	Parda	-	+	-	Polifenol	0,2 µg/mL	Namvar <i>et al.</i> , 2013
<i>Ulva fasciata</i>	Verde	-	-	+	Flavonoides	200 µg/mL	Ruy <i>et al.</i> , 2013
<i>Laminaria</i> sp.	Parda	+	-	-	Laminarina		Park <i>et al.</i> , 2012; 2013
<i>Laurencia</i> sp.	Vermelha	+	-	-	Dactylone	45,4 µmol/L	Federov <i>et al.</i> , 2007
<i>Ishige okamurae</i> e <i>Phoma herbarum</i>	Vermelhas	-	-	+	Extrato etanólico		Kim <i>et al.</i> , 2009
<i>Lihotamnion</i> sp.	Vermelha	+	-	-	<i>cellfood</i> *		Aslam <i>et al.</i> , 2009
<i>Porphyra dentata</i>	Vermelha	-	+	-	Fração (esteróis)	48,3 µg/mL	Kazlowska <i>et al.</i> , 2013
<i>Cymopolia barbata</i>	Verde	-	+	-	inibidores CYP1	19.82 µM and 55.65 µM	Badal <i>et al.</i> , 2013
<i>Lophocladia</i> sp.	Vermelha	-	+	-	Lophocladines	3.1 µM and 64.6 µM	Gross, 2006
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Parda	-	+	-	Fucooidan		Pavia <i>et al.</i> , 1996
<i>Gracilaria termistipitata</i>	Vermelha	-	-	+	Extratos metanólicos	309.05 e 506.08 µg/mL	Ji <i>et al.</i> , 2012
<i>Enteromorpha intestinalis</i> e <i>Rhizoclonium riparium</i>	Verdes				Extratos metanólicos		Paul <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus</i> sp.	Parda	-	-	+	Gliotoxin		Nguyen <i>et al.</i> , 2014
<i>Undaria pinnatifida</i>	Parda	-	-	+	Fucooidan		Yang <i>et al.</i> , 2013

+ efeito reportado; - efeito não reportado; IC₅₀ = 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).

A inibição de apoptose em células de câncer colorretal gera como consequência um aumento no crescimento do tumor, promove a progressão da neoplasia e confere resistência a agentes anticancerígenos citotóxicos.. Assim, compostos bioativos que induzem a apoptose em células cancerígenas tem potencial uso como agentes preventivos e terapêuticos. Evidências sugerem que compostos bioativos extraídos de algas podem produzir efeitos anticancerígenos por meio de múltiplos mecanismos de ação, incluindo a inibição da multiplicação, invasão e metástase (Moussavou *et al.*, 2014).

Estudos tem avaliado o potencial anticâncer de polissacarídeos sulfatados (fucoidan), um grupo complexo de macromoléculas, extraídos de algas. Estudos confirmam que polissacarídeos sulfatados exercem potentes atividades biológicas, tais como anticoagulante, antioxidante, antiproliferativa, anti-inflamatória e antiviral, em comparação com polissacarídeos não sulfatados (Dreyfuss *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2011; Pujol *et al.*, 2012, Di *et al.*, 2017).

Kim *et al.* (2010) verificaram que baixas concentrações de fucoidan (5-20 µg/mL) induzem apoptose em linhagens de CCR HT-29 e HCT-116 com efeito dose-dependente. No entanto, fucoidan mostrou-se mais promissor contra a linhagem HT 29 do que contra a HTC116. Segundo Hyun *et al.* (2009) fucoidan foi capaz de induzir apoptose em células de câncer de cólon humano, HCT-15, na concentração de 100 µg/mL. O conjunto dessas observações mostrou que a eficácia deste composto varia de acordo com o tipo de linhagem estudada.

A atividade anticâncer de algas também foi verificada em linhagens de tumores não relacionadas ao intestino. Compostos obtidos a partir da alga marrom *Dictyopteris delicatula* apresentaram atividade antitumoral *in vitro*. Neste trabalho, extratos com diferentes concentrações de açúcares e grupos fosfato tiveram suas atividades testadas em células HeLa. Porém, o mecanismo detalhado de ação destes extratos ainda precisa ser determinado (Magalhães *et al.*, 2011).

Fan *et al.* (2012) isolaram da macroalga *Gracilaria lemaneiformis* um polissacarídeo ácido (GLSPs) que inibiu o crescimento tumoral, promoveu a proliferação das células do baço e fagocitose dos macrófagos, e aumentou o nível de IL-2 e células T CD8⁺ no sangue que nutria o tumor em camundongos. Este polissacarídeo mostrou atividade antitumoral e imunomodulatória, podendo fornecer um potencial material para a medicina clínica.

Fucoxantina, carotenoide presente principalmente em algas pardas, teve sua atividade antitumoral descrita contra várias linhagens tumorais, dentre elas, neuroblastoma (DOTO), carcinoma de cólon humano (WiDr), adenocarcinoma gástrico (MGC-803) e carcinoma hepático humano (HepG2). Em células de neuroblastoma, fucoxantina e seu metabólito fucoxantíno, induziram parada no ciclo celular no ponto de checagem G1 e morte celular por apoptose (Okuzumi *et al.*, 1990; Das *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2011; Satomi, 2017).

Gambato *et al.* (2013) verificaram a atividade anticâncer de um extrato enriquecido em florotaninos da alga antártica *H. grandifolius* contra as linhagens tumorais de melanoma (A 375), pulmão (A 549), laringe (Hep 2) e colo de útero (Hela). O extrato causou a diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente e tempo-dependente e mostrou-se seletivo para as linhagens tumorais quando comparado com a célula não tumoral Hek 293 (embrionária de rins).

Martins *et al.* (2018) reportaram a citotoxicidade do extrato da macroalga *I. cordata*, contra a linhagem de carcinoma epidermoide A-431. O extrato foi obtido pela técnica de *soxhlet* utilizando o solvente acetato de etila. Estes trabalhos evidenciaram que as macroalgas antárticas *H. grandifolius* e *I. cordata* tem potencial atividade antitumoral.

O potencial antiproliferativo de extratos provenientes de macroalgas tem sido investigado nas últimas décadas, porém a relação estrutura/atividade biológica não está completamente elucidada, sendo necessário um número maior de estudos. A natureza química destes compostos varia conforme a espécie, sazonalidade e técnicas de extração, o que influencia na atividade dos extratos (Martins *et al.*, 2018).

2.7. Capacidade Antioxidante de Compostos de Macrolagas e sua Relação com a Atividade Anticâncer

Embora seja essencial à vida, o oxigênio molecular é o principal produtor de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ($O_2 \cdot^-$), radical hidroxila ($OH \cdot^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas moléculas reagem com membranas biológicas, DNA, proteínas e outros constituintes celulares promovendo sua degradação, além de estarem relacionados ao processo de envelhecimento e a ocorrência de diversas patologias como aterosclerose, câncer, malária, doenças neurodegenerativas e artrite (Heo *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2013; Pinteus *et al.*, 2017).

Antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, poderiam atrasar ou inibir as taxas de oxidação (Sies, 1993). Os organismos aeróbicos desenvolveram diversos mecanismos fisiológicos de defesa contra efeitos das EROs. Nas células de organismos fotossintetizantes, estes mecanismos são mais proeminentes, uma vez que as membranas tilacóides contém lipídios insaturados em sua composição majoritária, sendo alvos primários de efeitos deletérios oxidativos (Foyer, 1994).

Como resultado da aclimação a um ambiente adverso, as algas desenvolveram mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos complexos, que atuam de forma sincronizada para mitigar alterações na osmoralidade, desequilíbrio iônico e produção de EROs (Contreras *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Flores-Molina *et al.*, 2013). Diversas pesquisas mostraram a capacidade antioxidante *in vitro* de compostos de algas, atribuída à presença de compostos como carotenóides, polissacarídeos, polifenóis e florotaninos, que neutralizam as EROS,

já que sua afinidade com esses compostos oxidativos é elevada (Heo *et al.*, 2005; Gambato *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018; Jaballi *et al.*, 2019).

Em estudo realizado por Hoseinifar *et al.* (2018), foi demonstrado que peixes da espécie *Danio rerio* (zebrafish) alimentados com a espécie algal *Gracilaria gracilis* em pó, por oito semanas, apresentaram maior expressão gênica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, o que favorece os mecanismos de defesa antioxidantes do animal. Também foram avaliados três parâmetros imunológicos, IgG, proteínas totais e atividade da enzima fosfatase alcalina, que estão relacionados à atividade hidrolítica da mucosa que recobre a pele do zebrafish. Verificou-se que houve aumento da atividade enzimática da fosfatase alcalina, que possui atividade antimicrobiana, sugerindo um incremento na resposta imune desta espécie.

Os antioxidantes possuem a capacidade de potencializar os efeitos dos fármacos antineoplásicos, podendo diminuir a dose administrada sem prejudicar os efeitos terapêuticos, resultando na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia. A administração de antineoplásicos associada a suplementação com compostos antioxidantes é importante, pois os primeiros parecem conseguir controlar a proliferação tumoral sem causar toxicidade (Halliwell *et al.*, 1999; Rohenkohl. *et al.*, 2011).

Ikeguchi *et al.*, 2011 demonstraram que pacientes com câncer colorretal submetidos à quimioterapia e que receberam 4,05g de fucoidan/dia tiveram o tempo de tratamento prolongado em relação aos pacientes que não receberam esta suplementação. O polissacarídeo fucoidan reduziu a toxicidade do quimioterápico permitindo um tratamento mais eficaz.

Diversos estudos sugerem uma estreita relação entre a atividade anticâncer de compostos de algas, como os polifenóis, e seu potencial antioxidante. Devido a adaptação das algas antárticas a um ambiente extremo, estas desenvolveram um eficiente mecanismo antioxidante. Tendo em vista a carência de estudos utilizando-se macroalgas da Antártica, estas representam uma fonte potencial para a obtenção e caracterização química de novos extratos com atividades antitumoral,

antioxidante e antiproliferativa (Yoshie *et al.*, 2002; Huovinen & Gómez, 2013; Moussavou *et al.*, 2014; Alghazeer *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a atividade antitumoral de extratos das macroalgas antárticas *Cystosphaera jacquinotii* (Montagne) Skottsberg, *Desmaretia anceps* Montagne e *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent contra a linhagem celular tumoral HCT – 116.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar quimicamente os extratos, obtidos por ultrassom e maceração, e as frações determinando os compostos voláteis majoritários, o percentual total de lipídeos e o perfil de carotenoides das macroalgas *C. jacquinotti*, *D. anceps* e *I. cordata*;
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico dos extratos e frações das macroalgas estudadas pela determinação da viabilidade celular da linhagem de câncer colorretal;
- ✓ Avaliar o mecanismo de morte celular e regulação do ciclo celular da linhagem de câncer colorretal tratada com o extrato clorofórmico da macroalga *D. anceps*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Capítulo I

Neste capítulo é apresentado o artigo intitulado “Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Antarctic Macroalgae Against Colorectal Cancer Cell Line HCT 116”, submetido para publicação na revista *Advances in Biological Chemistry*. Este artigo avaliou o citotoxicidade de extratos das macroalgas antárticas *Iridaea cordata*, *Cystosphaera jacquinotii* e *Desmarestia anceps* contra a linhagem celular de câncer colorretal HCT 116. O trabalho também abordou a caracterização química dos extratos. A formatação está de acordo com as normas do periódico.

Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Antarctic Macroalgae Extracts Against Colorectal Cancer

Rafaele Frassini¹, Yeslei Paulino da Silva¹, Sidnei Moura², Leonardo Zambotti Villela³, Aline Paternostro Martins³, Pio Colepicolo³, Mutue Toyota Fujii⁴, Nair S. Yokoya⁴, Cláudio Martin Pereira de Pereira⁵, Vagner Reinaldo Zingalli Bueno Pereira⁶, João Antonio Pêgas Henriques¹, Mariana Roesch-Ely^{1,*}

1. Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, University of Caxias do Sul, RS, Brazil;
2. Laboratory of Biosynthetic and Natural Products of Caxias do Sul, RS, Brazil;
3. Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Algae, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
4. Phycological Research, Institute of Botany, São Paulo, SP, Brazil
5. Laboratory of Lipidomics and Biorganic - LLipidomicaBio, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil
6. General Hospital - University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

*Corresponding author: Mariana Roesch-Ely, Prof. Mariana Roesch-Ely, Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, BL 57, Caxias do Sul, Brazil. Tel: +55 54 3218 2100, Fax: +55 54 3218 26 64, e-mail: mrely@ucs.br

Experimental Study

Abstract

Background/Aim: Antarctic seaweeds are considered a promising source of compounds with anticancer activity. Colorectal cancer (RC) is one of the most incident cancers with high mortality rates worldwide. This work aimed to characterize chemically extracts of the Antarctic macroalgae *Iridaea cordata*, *Cystosphaera jacquinotii* and *Desmarestia anceps* and to evaluate the cytotoxic effects against HCT 116 cell line. Materials and Methods: The extracts were obtained by depletion using a ultrasound probe and were identified by HPLC and GC-MS. Cell viability was determined by MTT assay. Results: Hexanic and chloroform extracts of the *I. cordata* and the hexanic, chloroform and methanolic extracts of *D. anceps* were able to inhibit growth of colorectal cancer cells in the three different

incubation times (24, 48 and 72h). Carotenoid analysis by HPLC identified β -carotene in all species, while zeaxanthin was present in the spectrum of *I. cordata* and *C. jacquinotii*. Fucoxanthin and violaxanthin were confirmed in the brown seaweeds *C. jacquinotii* and *D. anceps*. Conclusion: Extrates of macroalgae *I. Cordata* and *D. anceps* may be a source of therapeutic agents against CRC.

Keywords: Antarctic seaweeds, antitumor activity, colorectal cancer

Introduction

Colorectal cancer (CRC) prevalence is one of the major public health problems worldwide due to its high incidence and mortality. CRC is the third most common cancer in among men, and second in women, accounting for about 1.4 million new cases and almost 700 thousands deaths in 2012 (1). Most recent estimate of Brazilian National Cancer Institute (2) for 2018/2019 is that CRC will affect 17380 men and 18890 women respectively, consisting of the third and second causes of cancer deaths respectively. CRC incidence distribution varies across Brazil's regions. A high incidence is reported in the most developed economically and industrialized regions, such as Southeast and South. These may be correlated with a western way of life as obesity, smoking, sedentary lifestyle, high consumption of red meat and processed foods, low vegetable intake, and aging of the population, similar to developed countries (2,3). Regardless the advances in therapeutic interventions over the last decades, mortality rates caused by CRC remains around 40%, mainly due to liver metastases in advanced stages of the disease (4). Therefore, research on new natural compounds with anticancer properties and reduced side effects have become important in providing alternatives for the CRC treatment (5).

The oceans cover more than 70% of the earth's surface and contain an extraordinary diversity of life, with an enormous resource for potential therapeutic agents. Some algae are adapted to a hostile environment, developing secondary metabolites as a defense and adaptation strategies. The anticancer potential activity of many compounds extracted from macroalgae, which provides important chemical scaffolds for the discovery of new drugs for the management of CRC has been recently reported (6,7). Among the thousands of macroalgae species, Antarctic seaweeds survive in one of the most hostile environment in the planet, being exposed to solar radiation in the summer, low luminosity and photosynthetic activity in the winter, ice melting and herbivory. Because they have adapted to the polar environment, these algae may be considered a promising source of new bioactive compounds, including those with anticancer activity (7). Therefore, the objective of this study was to chemically characterize different extracts obtained from Antarctic seaweeds and to evaluate the antitumor activity of these extracts in order to isolate new molecules with potential anticancer activity in the future.

Materials and Methods

Seaweed Sample and Preparation of Extracts: The red seaweed *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent and brown seaweeds *Cystosphaera jacquinotii* (Montagne) Skottsberg and *Desmaretia anceps* Montagne were collected during the Brazilian Antarctic Operation XXXIII. Species identification and the classification were performed according to specimen morphology (8) and deposited in the Herbarium of Botanical Institute of São Paulo (SP), Brazil. The extracts were obtained by depletion, in which 10g of each algal sample was sequentially soaked with 50 mL of hexane, chloroform and methanol, using ultrasound probe for 30 minutes, filtered and lyophilized.

Cell Culture and Cytotoxic Assay: HCT 116 (colorectal cancer cell line) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC - CCL247), Manassas, VA, USA. Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS. Cells were maintained in a humidified atmosphere at 37 °C, in 5 % CO₂. Cytotoxic analysis was assessed by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) method according to established protocols (9).

Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC-MS): The extracts were analyzed by GC-MS coupled with mass spectrometry (QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a 30 m fused silica capillary column (HP-5MS with 0.25 µm film, Agilent). A sample (1 µL) was injected at temperature of 220°C and with split of 1:10. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ with the following temperature ramp: initial temperature of 60 °C with a of 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.

Carotenoids Analysis: The analysis of the carotenoids profile of the macroalgae was determined as described in literature (10). Briefly, chromatographic separations were carried out by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC, Shimadzu system) equipped with two LC-10AD pumps, a SIL-10ADVP automatic sample injector, a DGU-14A degasser, and a SPD-M10AVP photodiode-array detector). Chromatographic separations were carried out on a C₃₀ column (Ultracarb, 250 x 4.6 mm, 5 mm, Phenomenex) at 1.0 mL min⁻¹ at room temperature, using as mobile phase: (A) MeOH:H₂O:NH₄Ac buffer 1 mol L⁻¹ (pH 4.6) (90:8:2) and (B) MeOH:MTBE:NH₄Ac buffer 1 mol

L⁻¹ (pH 4.6) (30:68:2). The gradient elution was performed as follows: a linear increase from 5 to 10% of solvent B (0-15 min); maintaining 10% B for 10 min; a linear gradient (10 min) to 15% B followed by another linear gradient (5 min) to 40% B and then an increase to 45% of solvent B in 2 min, an isocratic elution for 20 min and an increase to 100% B in 1 min and maintaining 100% B for 5 min, for a total run time of 68 min. The injection volume of standards and samples were 50 µL and all ultraviolet-visible spectra were recorded from 200 to 800 nm. Fourteen standards were used. The lyophilized powder of seaweeds were weighed, dissolved in methanol:acetone (1:1, v/v) and sonicated for 15 min. The extracts were then centrifuged and filtered through a 0.45 µm membrane (Millex HN nylon, 13 mm, Millipore). Aliquots (50 µL) of each extract (3 mg.mL⁻¹) were injected into the HPLC system.

Statistical Analysis: The results were expressed as the means ± SD. Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 and GaphPad Prism version 5.0. Normality tests (Shapiro-Wilk), Student's t-test for independent samples, and one-way analysis of variance ANOVA, with Tukey's post hoc multiple comparisons test were performed. The significance of difference was considered to include values of $p < 0.05$.

Results

Antitumor Activity: Nine extracts were obtained: ICH (*I. cordata* - hexane), ICC (*I. cordata* - chloroform), ICM (*I. cordata* - methanol); CJH (*C. jacquinotii* - hexane), CJC (*C. jacquinotii* - chloroform), CJM (*C. jacquinotii* - methanol); DAH (*D. anceps* - hexane), DAC (*D. anceps* - chloroform), DAM (*D. anceps* - methanol). The cytotoxic activity of extracts was tested against human cancer colon carcinoma (HCT 116 cell line) by MTT assay. The maximum concentration tested varied according to the solubility of each extract (Table 1).

The extracts obtained from *C. jacquinotii* (CJH, CJC and CJM) and methanolic extract of *I. cordata* (ICM) were not cytotoxic against HCT 116 within the conditions tested. The hexane (ICH) and chloroformic (ICC) extracts of *I. cordata* and all extracts of *D. anceps* (DAH, DAC and DAM) inhibited the growth of the colorectal cancer cell line with dose-dependent manner ($p < 0,05$), but not time dependent ($p > 0,05$). Figures 1 and 2 shows the cytotoxic profile of Antarctic seaweeds extracts.

GC-MS Analysis: Analysis of the extracts by GC-MS was performed only for those who inhibited the growth of the HCT 116 cell line. One major compound was identified in the hexane extract and two in the chloroform extract. Both bioactive extracts of *I. coradata* (ICH and ICC) showed the compound cholest-5-en-3β-ol (ephicolesterol). The

chloroform extract presented two peaks of another major compound, known as octadecanoic acid. In the extracts of *D. anceps*, a greater number of compounds were identified (Table I). Among them, hexadecanoic acid, identified in all extracts, fucosterol present in two extracts (DAH and DAC), and phytol (DAH) had biological activities reported.

Carotenoids Profile: Two peaks were identified in the chromatogram of the red algae *I. cordata*: zeaxanthin and β -carotene. For brown seaweed *D. anceps*, four peaks were identified: fucoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin and β -carotene. For brown algae *C. jacquinotii*, three peaks were identified: fucoxanthin, violaxanthin and β -carotene.

Discussion

Colorectal carcinoma has become a worldwide public health problem due to its high incidence and mortality. This type of cancer is the third most prevalent and represents the largest cause of non-smoking cancer deaths. The increase in incidence in recent years in developing countries such as Brazil has been observed (11).

Despite advances in diagnosis and treatment, mortality rates remain high due to the lack of government investments to create programs for the early detection of disease in developing countries, such as Brazil, and intrinsic characteristics such as tumor resistance to conventional chemotherapy and side effects. Due to these factors, the search for new compounds with anticancer activity is of extreme importance (12).

Natural compounds play a very important role in the discovery of new drugs with antitumor activity. In the last three decades, the discovery of secondary metabolites with biological activity from macroalgae has grown substantially, however, of approximately 25,000 species of algae described, only 15 are used biotechnologically on a large scale (13). Antarctic algae are adapted to the most adverse conditions on the planet, such as the polar environment, may be a promising source of compounds with anticancer activity.

The present study analyzed the cytotoxicity of extracts of Antarctic macroalgae *I. cordata*, *D. anceps* and *C. jacquinotti* and found that hexanic and chloroform extracts of *I. cordata* and hexane, chloroform and methanolic extracts of *D. anceps* seaweeds were cytotoxic against the HCT 116 cell line after 24, 48 and 72h exposition in a dose-dependent manner ($p < 0,05$). All extracts of *C. jacquinotti* and methanolic extract of *I. cordata* were not cytotoxic under the experimental conditions tested. Studies with antarctic algae, *C. jacquinotii*, *I. cordata*, *H. grandifolius* and *P. endiviifolia* showed the antitumor activity. *C. jacquinotii* extracts (hexane, chloroform, acethyl acetate and ethanolic) had low cytotoxicity against the A-431 cell line, with an inhibitory rate lower than 50% ($500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The acethyl

acetate extract of *I. cordata* had cytotoxic effect against the human epidermoid carcinoma cell line (A-431), inhibiting cell growth in 91.1% and 95.6%, respectively, after 24 and 48h of exposure in the concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (14). Cytotoxicity of sulfated polysaccharides, SP1 and SP2, purified of *I. cordata* displayed significant antitumor activity at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against HeLa cells (68.4% and 30.1%) and PC-3 cells (59.8% and 56.4%) (15). The chemical composition of the extracts varies according to the extraction methodology and the intrinsic characteristics of each organism, as well as the seasonality. Evaluating the cytotoxicity of extracts is important as it is the initial step for the selection of new compounds with anticancer activity (15, 16). The present study was the first to evaluate the cytotoxicity of *D. anceps* extracts.

GC-MS analysis shown the presence of cholest-5-en-3 β -ol (epicholesterol) and octadecanoic acid in *I. cordata* extracts. Epicholesterol is an epimeric form of cholesterol present in membranes cell and is related to cell permeability and membrane movement (17). Octadecanoic acid or stearic acid is a fatty acid, a unique long-chain saturated fatty acid (SFA), the only one that is not correlated with the risk of cardiovascular diseases, being a candidate for use in the food industry (18). In the spectrum of *D. anceps*, peaks corresponding to compounds with described biological activity were identified, such as hexadecanoic acid, phytol and fucosterol. Hexadecanoic acid is a saturated fatty acid with anti-inflammatory activity (19). Phytol, open chain diterpene, with antimycobacterium activity (20). Fucosterol, a sterol typically found in brown algae and has been attributed to it several biological activities, such as anti-inflammatory, anti-oxidant, hepatoprotective and anticancer (against HL 60 cell line) (21).

HPLC- carotenoids analysis allowed to identify the presence of four compounds β -carotene, fucoxanthin, zeaxanthin and violaxanthin. Carotenoids have many functions in the human body, including antioxidant activity (β -carotene), retinal protective effect against solar radiation damage (zeaxanthin) and reduction of serum triglyceride levels (astaxanthin) (22). Fucoxanthin is a colored marine carotenoid present in microalgae and brown algae. Many studies have reported the anticancer activity of fucoxanthin and its derivative fucoxanthinol against several types of tumor cell lines, including colorectal carcinoma (23, 24). Also, fucoxanthin is related to decrease of risk factors for cardiac diseases, such as obesity, diabetes, high blood pressure, chronic inflammation, plasma and hepatic triglyceride, and cholesterol concentrations and antioxidant activity. Fucoxanthin, violaxanthin and β -carotene had photoprotective effect (24, 25).

Many studies have reported on the anticancer activity of extracts and compounds isolated from macroalgae against colorectal cancer strains, but the biological structure/ activity relationship needs to be elucidated (23). The present study suggests that the hexanic and chloroform extracts of *I. cordata* and the hexanic, chloroform and

methanolic extracts of *D. anceps* are promising candidates for investigations, including the development of drugs to combat colorectal cancer.

Conclusions

The hexanic and chloroform extracts of the red seaweed *I. cordata* and the hexanic, chloroform and methanolic extracts of brown seaweed *D. anceps* inhibited the growth of the HCT 116 cell line, suggesting that these algae are a promising source of bioactive compounds with anticancer properties. Further studies to elucidate the bioactive compounds present in these extracts are required.

Acknowledgments

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

Conflicts of Interest: The Authors declare no conflicts of interest regarding this study.

References

- 1 International Agency of Cancer Research: Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018 (2018). Geneva, World Health Organization. Available: <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>.
- 2 Estimate 2018: Incidence of Cancer in Brazil (2017) Rio de Janeiro, 2017, Brazilian National Cancer Institute. Available: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>.
- 3 Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L., Woodward, M. (2009) The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int. J. Cancer* 125, 1, 171-80.

- 4 Cancer Facts & Figures (2014). Atlanta, American Cancer Society. Available: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2014/cancer-facts-and-figures-2014.pdf>.
- 5 Coghlin, C., Murray, G.I. (2015) Biomarkers of colorectal cancer: Recent advances and future challenges. *Proteomics Clin. Appl.* 9, 1-2, 64-71.
- 6 Ngo, D.H., Vo, T.S., Ngo, D.N., Wijesekara, I, Kim, S.K. (2012) Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 378–383.
- 7 Gutierrez-Rodriguez, A.G., Juarez-Portilla, C., Olivares-Banuelos, T., Zepeda, R.C. (2018) Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discov. Today.* 23 ,2, 434-447.
- 8 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.
- 9 Machado, F.S., Munari, F.M., Scariot, F.J., Echeverrigaray, S., Aguzzoli, C., Pich, C.T., Kato, M.J., Yamaguchi, L., Moura, S., Henriques, J.A.P., Roesch-Ely, M (2018) Ongumine Induces Apoptosis in Colorectal Cancer HCT 116 Cells Independent from Bax, p21 and p53 Status. *Anticancer Res.* 38, 11, 6231-6236.
- 10 Guaratini, T., Cardozo, K.H.M., Pinto, E., Colepicolo, P. (2009) Comparison of diode array and electrochemical detection in the C₃₀ reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 9, 1609-1616.
- 11 Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61, 2, 69-90.
- 12 Perin, D.M., Saraiya, M., Thompson, T.D., de Moura, L., Simoes, E.J., Parra, D.C., Brownson, R.C. (2015) Providers' knowledge, attitudes, and practices related to colorectal cancer control in Brazil. *Prev. Med.*, 81, 373-379.

- 13 Raja, R., Hemeaiswarya, S., Kumar, N.A., Shidhar, S., Rengasamy, R. (2008) A perspective on the biotechnological potential of algae. *Crit. Rev. Microbiol.* 34, 77-88.
- 14 Martins, R.M., Nedel, F., Guimarães, V.B.S., da Silva, A.F., Colepicolo, P., Pereira, C.M.P., Lund, R.G. (2018) Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial and anticancer potential. *Front. Microbiol.*, 9, 412.
- 15 Kim, H.J., Kim, W.J., Koo, B., Kim, D., Lee, J.H., Nugroho, W.S.K.(2016) Anticancer Activity of Sulfated Polysaccharides Isolated from the Antarctic Red Seaweed *Iridaea cordata*. *Ocean Polar Res.* 38, 2, 129–137.
- 16 Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Shakir, C., Seghal Kiran, G. (2009) Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. *Phyton.*, 78, 161–166.
- 17 Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M. (2003) Effects of Epicholesterol on the Phosphatidylcholine Bilayer: A Molecular Simulation Study Dietary Stearic Acid and Risk of Cardiovascular Disease: Intake, Sources, Digestion, and Absorption. *Biophys J.*, 84, 3, 1818–1826.
- 18 Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Lawrence, J. (2002) Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease MPH for the Nutrition Committee. American Heart Association, 106, 2747-2757.
- 19 Aparna, V., Dileep, K.V., Mandal, P.K., Karthe, P., Sadasivan, C., Haridas, M. (2012) Antinflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chem Biol Drug Des.*,80, 434–439.
- 20 Cantrell, C.L., Franzblau, S.G., Fischer, N. H. (2001) Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.*, 67, 8, 685-94.
- 21 Abdul, Q.A., Choi, R.J., Jungc, H.A., Choia, J.S. (2016) Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *J Sci Food Agric.*, 96, 6, 1856-66.
- 22 Eggersdorfer, M., Wyss, A. (2018) Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys.*, 652, 18-26.

23 Takahashi, K., Hosokawa, M., Kasajima, H., Hatanaka, K., Kudo, K., Shimoyama, N., Miyashita, K. (2015) Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues. *Oncol Lett.*, 10, 3, 1463-1467.

24 D’Orazio, N., Gemello, E., Gamm, M.A. (2012) Fucoxantin: A Treasure from the Sea. *Mar Drugs.*, 10, 3, 604-616.

25 Satomi, Y. (2017) Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. *Anticancer Res.*, 37,4, 1557-1562.

Tables

Table 1. IC₅₀ (µg/mL) extracts of antarctic seaweeds against HCT 116 cancer cell line.

Seaweed	Extract	IC ₅₀ (Mean ± SD)		
		24h	48h	72h
<i>C. Jacquinotii</i>	Hexane	> 200	> 200	> 200
	Chloroform	> 140	> 140	> 140
	Methanol	> 240	> 240	> 240
<i>I. cordata</i>	Hexane	70.46 ± 1.84	82,5 ± 1.91	61,06 ± 1.79
	Chloroform	115.9 ± 2.1	172.4 ± 2.4	164,5 ± 2.2
	Methanol	> 600	> 600	> 600
<i>D. anceps</i>	Hexane	242.6 ± 2.4	315.2 ± 2.5	284 ± 2.45
	Chloroform	125.9 ± 2.1	45.83 ± 1.7	27.12 ± 1.43
	Methanol	87.73 ± 1.94	38.69 ± 1.58	34,03 ± 1.53

Table 2. Major compound presents in the hexanic and chloroformic extracts of *I. cordata* by GC-MS

Seaweed	Extract	Peak n°	RT (min)	Component Name	Molecular Formula	SI*
<i>I. cordata</i>	Hexane	1	78.408	Cholest-5-en-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O	90
		1	60.783	Cholest-5-en-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O	90
	Chloroform	2	66.000	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	91
		3	78.358	Cholest-5-en-3 β -ol	C ₂₇ H ₄₆ O	90
		1	44.958	n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	94
<i>D. anceps</i>	Hexane	2	49.617	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	89
		3	60.775	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	90
		4	79.817	Alfa-tocopherol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	91
		5	89.575	Fucosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	92
		1	12.175	Phosphoric acid	C ₆ H ₁₅ PO ₄	96
	Chloroform	2	38.133	9-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	90
		3	45.000	n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	95
		4	50.417	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	91
		5	51.192	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	93
		7	60.775	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	88
Methanol	8	65.992	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	91	
	9	89.475	Fucosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	90	
	10	93.125	(3 β)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-yl acetate	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	78	
		1	16.308	2-Phenoxyethanol	C ₈ H ₁₀ O ₂	92
		2	44.917	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	89
		3	60.767	Hexadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	91

*SI = Similarity Index

Figures

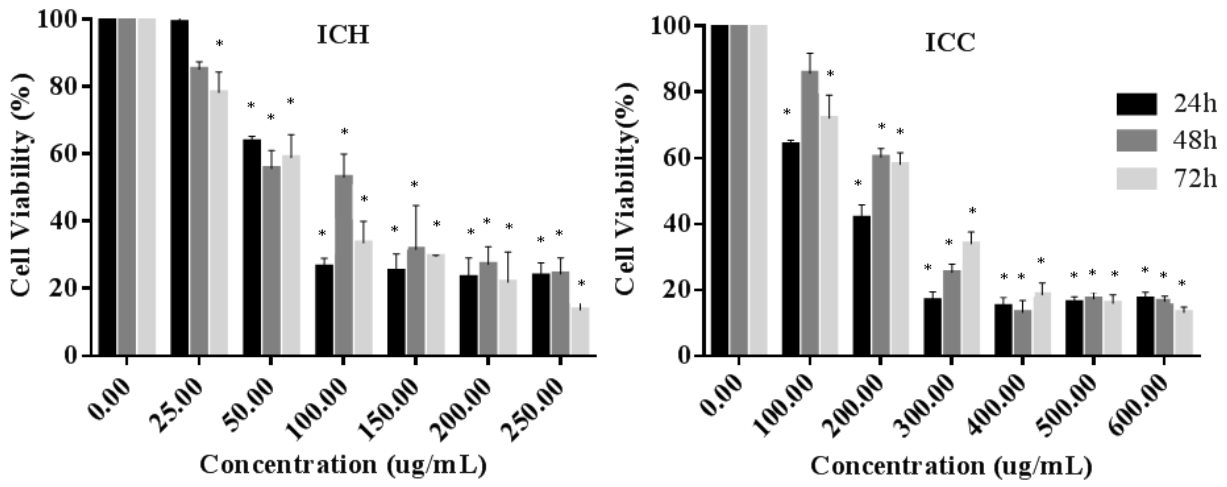


Figure 1. Cytotoxic profile of antarctic seaweed *I. cordata* (ICH and ICC) extracts against HCT 116 cell line after 24, 48 and 72h of exposure (*p<0.05 compared to control in time corresponding analysis).

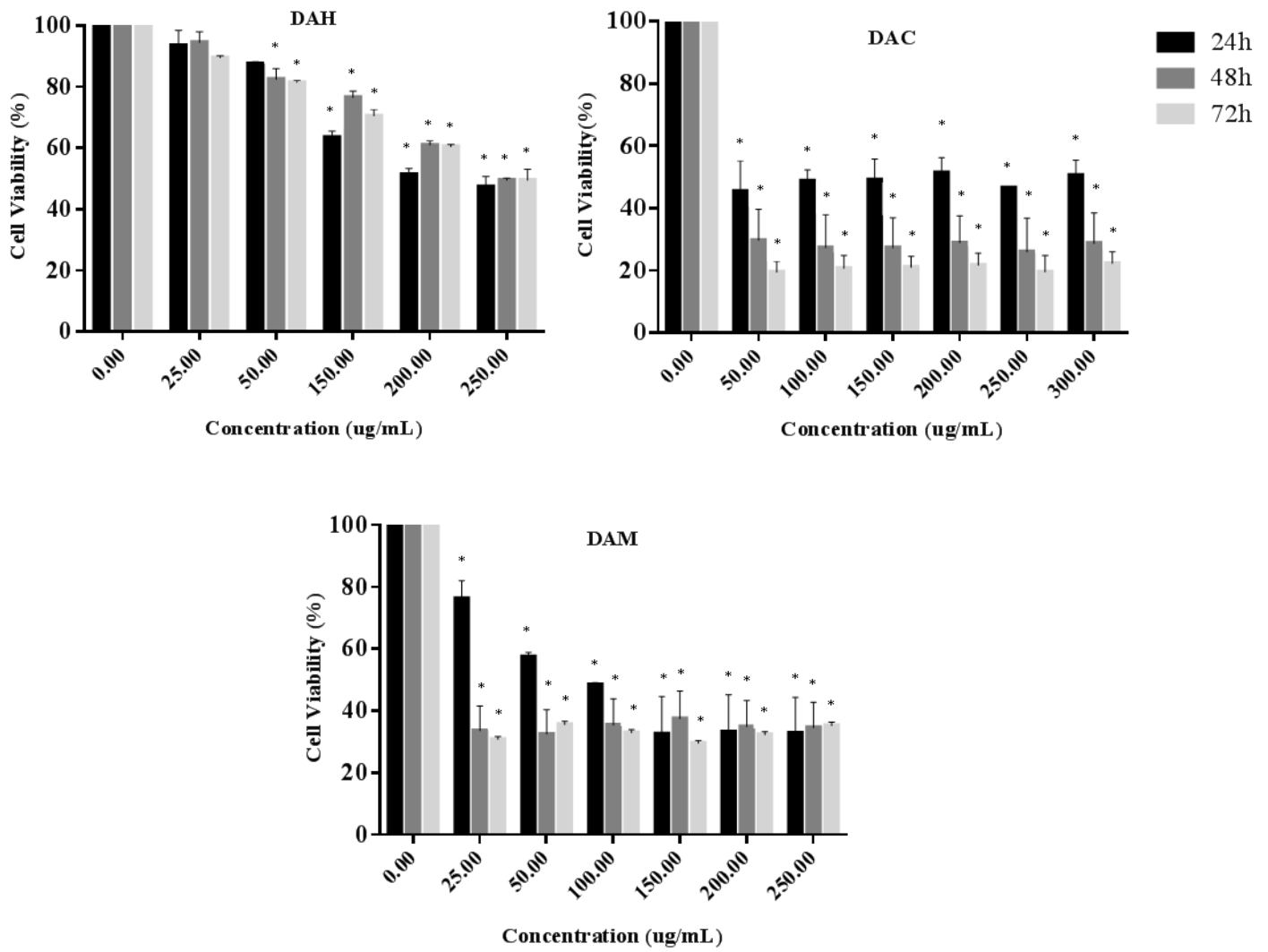


Figure 2. Cytotoxic profile of antarctic seaweed *D. anceps* (DAH, DAC and DAM) extracts against HCT 116 cell line after 24, 48 and 72h of exposure (* $p < 0.05$ compared to control in time corresponding analysis).

4.2. Capítulo II

Neste capítulo é apresentado o artigo “*Desmarestia anceps* Montagne Extracts Against Colorectal Cancer: Cytotoxic activity of Fractions and Proapoptotic Effects”, que será submetido ao periódico *Food Chemistry*. Este artigo avaliou a citotoxicidade do extrato clorofórmico e frações obtidos da macroalga antártica *Desmarestia anceps*. A caracterização química do extratos e frações foi realizada pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). Avaliou-se também o mecanismo de morte e o efeito no ciclo celular, após exposição da linhagem de câncer colorretal HCT 116 a diferentes concentrações do extrato.

***Desmarestia anceps* Montagne Against Colorectal Cancer Cells: Cytotoxic Activity and Proapoptotic Effects**

Rafaele FRASSINI^a, Daniela STEFFENS^a, Sidnei MOURA^b, Aline Paternostro MARTINS^c, Pio COLEPICOLO^c, Mutue Toyota FUJII^d, Nair S. YOKOYA^d, Cláudio Martin Pereira de PEREIRA^e, Ana Cláudia PHILLIPUS^f, Miriam de Barcellos FALKENBERG^f, João Antonio Pêgas HENRIQUES^a, Mariana ROESCH-ELY^{a,*}

1. Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, University of Caxias do Sul, RS, Brazil;
2. Laboratory of Biosynthetic and Natural Products of Caxias do Sul, RS, Brazil
3. Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Algae, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
4. Nucleus Research Phycology, Institute of Botany, São Paulo, SP, Brazil
5. Laboratory of Lipidomics and Biorganic - LLipidomicaBio, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil
6. Study Group on Natural and Synthetic Products (GEPRONAS) – Federal University Of Santa Catarina, SC, Brazil

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

Abstract: Impairment of apoptosis promotes abnormal cellular proliferation and accumulation of genetic alterations. Identifying bioactive compounds extracted from seaweeds that induce apoptosis in cancer cells may be explored as new agents for cancer chemoprevention and/or chemotherapy. The aim of this study was to characterize chemically the extract and its fractions of Antarctic seaweed *Desmarestia anceps* and to evaluate mechanisms of cell death induced after treatment with chloroform extract. A total of 48 compounds were identified. The results indicate that chloroform extract and its fractions presented cytotoxic activity against HCT 116 cell line in a dose dependent-manner. Chloroform extract promoted an increase of multinucleated cells and reduced cell viability by apoptosis mechanism. This study was the first to explore cytotoxic potential of seaweed *D. anceps* against HCT 116 cell line, suggesting that these macroalgae may be a promising candidate for the isolation of molecules with anticancer activity.

Keywords: Antarctic seaweeds, antitumor activity, apoptosis, proapoptotic effect, colorectal cancer

1. Introduction

Anticancer chemotherapeutic drugs are currently being developed to inhibit the growth of tumor cells, but chemotherapy frequently fails due to the development of drug resistance and apoptosis inhibition. Apoptosis is a regulated cell death program that plays an essential role in the development and maintenance of tissue homeostasis by eliminating unnecessary or mutated cells. As regulation of apoptosis relies on multiple cell signaling mechanisms, cancer cells can use a number of different strategies to suppress a protective apoptotic response. Phosphatidylserine exposure on the cellular surface occurring at the initial or early apoptosis stages promotes membrane blebbing, nuclear fragmentation, decreased cellular volume and a formation of apoptotic bodies (Kerr, Wyllie and Currie, 1972; Plati, Bucura and Khosravi-Fara, 2011; Pietkiewicz, Schmidt & Lavrik, 2015). It can be further defined as cell death accompanied by the activation of caspase proteases (Galluzzi et al. 2012). Impairment of this mechanism generates abnormal cellular proliferation and the accumulation of genetic alterations, ultimately resulting in tumorigenesis, and can provide drug resistance to cancer cells (Pistritto, Trisciuglio, Ceci, Garufi & D'Orazi, 2016).

Identifying the type of programmed cell death after treatment may contribute to therapy. Therefore, a better understanding the cell death signaling pathways may improve the efficacy of cancer therapy and bypass resistance (Gimenez-Bonafe, Tortosa & Perez-Tomas, 2009; Plati et al., 2011; Pistritto et al, 2016). Bioactive compounds that induce apoptosis in cancer cells can be used as agents for cancer chemoprevention and/or chemotherapy (Kim, Park, Lee & Park, 2010). Accumulating evidence suggests that bioactive compounds extracted from algae produce anticancer effects through multiple mechanisms of action, including inhibition of cancer cell growth, invasion, and metastasis, and also through the induction of apoptosis (Farooqi, Butt and Razzaq, 2010; Moussavou et al., 2014).

In this context, the aim of this study was to evaluate mechanisms of cell death induced after treatment of colorectal cancer cell line HCT 116 with chloroform crude extract of *Desmarestia anceps*. In this study, the extract was fractioned and the chemical characterization of the crude extract and its fractions were further investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified eagle's medium-high glucose (DMEM), trypsin-EDTA, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), Heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hexane, chloroform, acetone 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 Sample

The brown seaweed *Desmarestia anceps* Montagne (Phaeophyceae) was collected during the Brazilian Antarctic Operation XXXIII in the Snow Land (62°44'07''S e 61°13'45''W in January 2015). Macroalgae fixed to the substrate were collected from the intertidal region during periods of low tide. The seaweeds was washed with seawater to remove epiphytes, frozen at -20 °C and posteriorly lyophilized for biochemical analyzes. Species identification was performed according to specimen morphology and the classification system proposed by Wynne (2017) and

herbarium specimens were deposited in the Herbarium of Botanical Institute of São Paulo, SP, Brazil.

2.3. Preparation of Extract

The extract were obtained by maceration using 200g of dry powder of *D. anceps* was mixed with 2L of chloroform for 24h. The extracts from three consecutive extractions were pooled and filtered using filter paper (Whatmann No.1). After filtration, *D. anceps* chloroform extract (DACM) was concentrated to dryness under vacuum at 40°C (Büchi R- 300 Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). The crude extract was kept in dark and dry conditions at –20°C until biological testing.

2.4. Liquid Vacuum Chromatography (LCV)

DACM extract was fractionated by Liquid Vacuum Chromatography (LCV) with gradients of increasing polarity using the solvents n-hexane, ethyl acetate and methanol. Each fraction (100 mL) was collected in a separate flask and concentrated in a rotatory evaporator. The extracts were verified by ¹H MNR (Bruker - Fourier 300) were obtained for comparison of the chemical profile.

2.5. Gas Chromatography Coupled With Mass Spectrometry (GC-MS)

The extracts were analyzed by GC-MS (QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) with a 30 m fused silica capillary column (HP-5MS with 0.25 µm film, Agilent). A sample (1 µL) was injected at temperature of 220 °C and with split of 1:10. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹ with the following temperature ramp: initial temperature of 60 °C with an increase of 5

°C per min up to 260 °C, which was maintained for 10 min. The spectrum of the unknown component was compared with the spectrum of the known components stored in the NIST library.

2.6. Cell Culture and Cytotoxic Assay

HCT 116 (colorectal cancer cell line) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC - CCL247), Manassas, VA, USA. Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS and maintained in a humidified atmosphere at 37 °C, in 5 % CO₂ and 95 % air. The cytotoxicity study was performed when the cells reached 70-80 % confluence. Cytotoxicity was assessed by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) method. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^4 cells/cm³. After 24 h incubation, the cells were treated with increasing concentrations of DACM extract for 24, 48 and 72 h. The fractions were treated for 24h. DMSO 0.5% was added to medium 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 and IC₅₀ was calculated by GaphPad Prism version 5.0.

2.7. Cell Cycle Assays and Apoptosis Detection through Annexin V and Propidium Iodide by Flow Cytometry

HCT 116 cell line (5×10^5 /well) was seeded into 6 well plates culture flasks with DMEM supplemented culture medium. CRC cells were treated with IC₅₀ concentration ($37.77 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and double ($75.44 \mu\text{g.mL}^{-1}$) of DACM extract for 24h. The negative control was treated with DMSO 0.5%. For Annexin V assay, the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (APOAF, Sigma, USA) was used, according to manufacturer's instruction. For cell cycle analysis, cells were trypsinized

and collected for centrifugation (1800 rpm for 5 min) in PBS 1X. Cell pellets were fixed in ice-cold 70% ethanol and stored overnight at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. After, cells were resuspended in Triton X-100 (1% in PBS) and incubated with RNase and Propidium Iodide in the dark for 30 min at room temperature. Cells were analyzed by flow cytometry using a BD FACSAria III flow cytometer equipped with lasers 488 and 633nm (Becton & Dickinson LTDA). Data were collected by FACSDiva software (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo (TreeStar, Inc).

2.8. Statistical Analysis

The results were expressed as the means \pm SD. Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 and GaphPad Prism version 5.0. Normality tests (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk), One-way Analysis of Variance ANOVA, with Tukey's post hoc multiple comparisons test were performed. The significance of difference was considered to include values of $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Yield and Analysis of Fractions by ^1H NMR

DACM extract was obtained and fractionated by VLC as mentioned in item 2.4. The fractions yields (%) and ^1H NMR spectrum are shown in Table 1 and Figure 1, respectively, of Supplementary Material. Fractions 3 and 4, 9 and 10, 11 and 12 were grouped by similarity of spectra, totaling 10 fractions.

3.2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

To examine the chemical profile of DACM extract, the analysis of chloroform extract and fraction was carried out using GC-MS analysis of crude chloroform extract and fractions shown in Tables 1 and 2, respectively. The major compounds were expressed as peak area percentage. The Fraction 1 was not chemically characterized.

Table 1. Major compounds expressed as a peak area (%) of chloroform extract of *D. anceps*.

Entry	RT (min)	Identified compound	Molecular Formula	% peak area	SI
1	34.680	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1 α ,2 β ,5 α)	C ₁₀ H ₁₈	0.34	60
2	37.087	Fucosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	2.40	95
3	37.612	6,10-methano-19-norandrost-4-ene-3,17-dione, 6-methoxy-	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	5.93	96
4	37.732	Androst-5,15-dien-3ol acetate	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	7.48	83
5	42.933	Quinoline, 3-(methylthio)	C ₁₀ H ₉ NS	1.07	58
6	41.996	Stigmasta 4,24 (28)-dien-3-one	C ₂₉ H ₄₆ O	1.47	91

*RT: Retention Time *SI = Similarity Index

Table 2. GC-MS Major compounds expressed as a peak area (%) of fractions of chloroform extract fractions of *D. anceps*.

Fraction	Entry	RT (min)	Identified compound	Molecular Formula	Peak area %	SI
2	1	34.673	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl	C ₁₀ H ₁₈	14.45	60
	2	37.445	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	2.08	90
	3	39.354	Hexanedioic acid, ethyl ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	8.32	95
	4	46.287	Vitamin E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	16.46	98
3/4	1	36.117	n-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	34.10	98
	2	37.643	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	13.30	95
5	1	36.849	Fucosterol	C ₂₉ H ₄₈ O	13.79	93
	2	36.901	5-androsten-17.alpha.-ethynyl-3.beta.,17.beta.-diol	C ₂₅ H ₃₆ O ₄	22.81	94
6	1	8.112	2-pentene, 5-bromo-2,3-dimethyl-	C ₇ H ₁₃ Br	4.91	64
	2	11.839	2-cyclopenten-1-one, 3-methyl-	C ₆ H ₈ O	6.39	94
	3	21.858	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	2.10	83
	4	27.453	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	2.60	90
	5	32.363	Octadecane, 1-iodo-	C ₁₈ H ₃₇ I	2.69	90
	6	35.712	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	4.19	95
7	1	32.362	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	4.52	83
	2	34.672	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl	C ₁₀ H ₁₈	20.06	46
	3	35.003	1,2-dihexylcyclopropene	C ₁₅ H ₂₈	4.31	53
	4	35.226	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	7.81	53
	5	35.712	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	8.66	53
8	1	34.672	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-	C ₁₀ H ₁₈	4.21	60
	2	35.341	6-methyl-6-(5-methyl-furan-2-yl)-hept-3-en-2-one	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	22.86	43
	3	35.712	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	6.74	95
	4	39.930	7-pentadecyne	C ₁₅ H ₂₈	6.77	64
	5	40.022	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	14.08	72
9/10	1	35.226	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	2.09	64
	2	37.626	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	1.76	83
	3	37.935	Hexacosane	C ₂₆ H ₅₄	1.45	83
	4	39.038	Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	3.41	72
	5	40.535	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	3.62	68
11/12	1	27.453	2-bromo dodecane	C ₁₂ H ₂₅ Br	1.49	78
	2	32.363	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	1.86	86
	3	36.100	n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.63	62
	4	37.449	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	1.18	72
	5	37.632	Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	2.44	91
	6	39.078	Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	0.38	83
	7	40.027	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	8.05	76
	8	40.273	9-(2',2'-dimethylpropanoilhydrazono)-3,6-dichloro-2,7-bis-[2-(diethylamino)-ethoxy]fluorene	C ₃₀ H ₄₂ Cl ₂ N ₄ O ₃	2.24	91
13	1	27.454	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	2.40	83
	2	32.364	Pentadecane, 2,6,10-trimethyl-	C ₁₈ H ₃₈	3.56	86
	3	35.713	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	11.10	99
	4	39.040	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	1.17	72
	5	40.028	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	19.84	58

*RT: Retention Time *SI = Similarity Index

Altogether, considering DACM extract and fractions, 48 compounds were identified. The literature reports the biological activity of some of these compounds. The DACM extract spectra revealed seven

major compounds, among them is the fucosterol in which seven peaks were identified. In F5, two peaks corresponded to fucosterol. In F3/4, two peaks were identified as n-hexadecanoic acid. This compound was also found in the fractions F2, F8, F11/12 and F13. Fucosterol is a sterol commonly seen in algae and has been attributed to several biological activities such as antiinflammatory, antioxidant, hepatoprotective and anticancer, the last against HL 60 cell line (Ji, Ji and Yue, 2014; Abdul, Choi, Jungc & Choia, 2016). Khanavi, Gheidarloo, Sadati, Ardekani¹, Nabavi, Tavajohi & Ostad, (2012) isolated fucosterol from brown alga *Sargassum angustifolium* and showed an anticancer activity against HT29 colorectal and T47D breast cancer lines.

Bicyclo [3.1.1] heptane, 2,6,6-trimethyl (pinane) is a compound from the terpene class and was identified by Santana et al. (2012) as a constituent of the essential oil of *S. terebinthifolius*, showing cytotoxic properties against human melanoma (A2058), breast adenocarcinoma (MCF7), leukemia (HL-60) and cervical carcinoma (HeLa) cell lines. Boyom et al. (2011) identified the presence of alpha-pinene in the essential oil composition of *Cleistopholis patens* and *Uvariastrum pierreanum*, both showing antimalarial effect. Maruthupandian & Mohan (2005) identified the presence of acid n-hexadecanoic with biological activities such as antioxidant, nematocide, antiinflammatory, hypocholesterolemic, cannabinoid. Members of the vitamin E family are hydrophobic fat-soluble compounds found in a variety of food sources such as corn oil, peanuts, vegetable oils, fruits and vegetables consumed through diet. The health benefit of consuming vitamin E, which was present in present in F2, through diet or supplementation are believed to be for its antioxidant properties. Vitamin E protects cells from cell damage caused by free radicals that damage cell membranes through lipid oxidation, leading to DNA damage and cancer development (Cardenas & Ghosh, 2013).

The compound 3-methyl-2-cyclopenten-1-one and oleic acid, observed in fractions 3/4 and 6, respectively, were found in plant extracts of *Foeniculum vulgare* and showed antimicrobial activity (Esquivel-Ferriño, Favela-Hernández, Garza-González, Waksman, Ríos, & Camacho-

Corona , 2012). Phytol, the open chain diterpene, presented antimycobacterium activity (Cantrell, Franzblau and Fisher, 2001) was identified in F2, F7, F9/10, F11/12.

3.3. Cytotoxic Assay

The DACM crude extract and its fractions were tested against HCT 116 cell line and were able to inhibit the growth of cells in different times of incubation (24, 48 and 72h) (Figure 1).

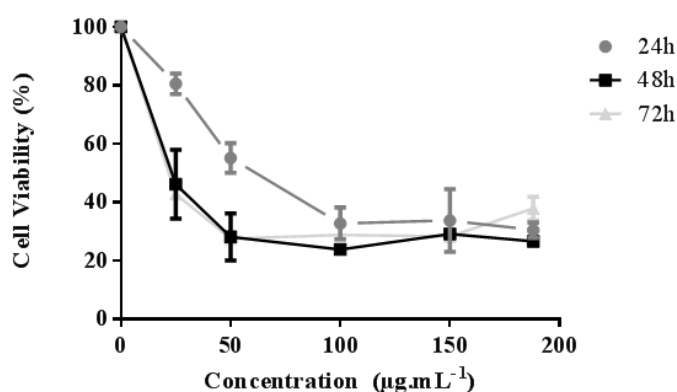


Figure 1. Cytotoxic effects of DACM extract against HCT 116 cell line in 24, 48 and 72h. Decrease in cell viability was reduced in lower concentrations ($< 50\mu\text{g.mL}^{-1}$) for longer incubation time (48 and 72h).

Results indicate that early incubation times (24h) are already presenting cytotoxic activity and further experiments revealed no difference in cell proliferation rates. IC_{50} varied according incubation time, $37.77 \pm 1.57 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for 24h, $25.99 \pm 1.41 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for 48h and $30.48 \pm 1.48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for 72h. The cell viability show to be concentration dependent ($p < 0.05$), but not time dependent ($p > 0.05$). All fractions were cytotoxic against colorectal cancer cell line in a dose-dependent manner ($p < 0.05$), with the exception of Fraction 1 ($IC_{50} > 350 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The general IC_{50} values were higher in the fractions with higher polarity (F11/12 and F13), decreased in fractions with intermediate polarity (F5 to F10) (Table 3).

Table 3. IC₅₀ (µg/mL) of Fractions of Chloroform Extract of *acenps* against HCT 116 cancer cell line

Fractions	IC ₅₀
1	> 350
2	43.85 ± 1.64
3/4	39.86 ± 1.60
5	24.52 ± 1.38
6	18.82 ± 1,27
7	22.63 ± 1,35
8	14.62 ± 1.16
9/10	22.63 ± 1,35
11/12	308.8 ± 2.49
13	218.3 ± 2.33

Several studies have reported that compounds extracted from seaweed may be effective anticancer agents (Moussavou et al., 2014, Sanjeewa, Lee, Suck, Won-Suck & You-Jin, 2017; Jin, Qiu, Shao & Zheng, 2018). Anticancer activity of extracts of different antarctic seaweeds, *C. jacquinotii*, *I. cordata*, *H. grandifolius*, and *P. Endiviifolia*, were observed from our research group (Gambato et al., 2014; Martins et al., 2018; Pacheco et al., 2018). The anticancer potential of several macroalgae species has been demonstrated against colorectal cancer cells lines such as HT 29 e HCT 116 (Kim et al., 2010; Park, Kim and Nam, 2013; Lopes-Costa, Abreu, Gargiulo, Rocha & Ramos, 2017), Caco-2, WiDr, HCT116, and DLD-1 (Nwosu, Morris, Lund, Stewart, Ross & McDougall, 2011; Takahashi et al., 2015).

Seaweeds are used as functional food and medicinal herbs, and have a long history of applications in Asian countries. Since, crude extracts or partially purified or isolated compounds from many species of brown, green, and red algae have been tested for their antitumor activities. These studies have indicated that marine algae constitute a promising source of novel compounds with potential as human therapeutic agents. In particular, macroalgae have been considered as a potential source of new bioactive compounds (Moussavou et al., 2014).

In this study, many compounds were identified in the chloroform extract and fractions of the Antarctic macroalgae *D. anceps* by GC-MS. Among them, fucosterol has been investigated for its

anticancer properties (Jiang et al., 2018). Therefore, other unidentified compounds that may act in isolate or through synergism mechanism may be involved in the anticancer potential of *D. anceps*. Recently, in our studies, we identified a series of steroids in Antarctic macroalgae using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (Pereira et al., 2016). The chemical composition of extract may vary according to extraction technique and methodology.

This was the first study to demonstrate the anticancer activity of chloroform extract and fractions of macroalgae *D. anceps* against colorectal cancer HCT 116 cell line. In this way, *D. anceps* was shown to be a promising source of compounds with anticancer activity and target for new studies.

3.4. Flow Cytometry: Annexin-V and Cell Cycle Assays

The effect on cell cycle of HCT 116 of the DACM extract in early incubation time (24h) was evaluated in two concentrations, the IC_{50} ($37.77 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and twice the value ($75.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in comparison with the control (DMSO 0.5%) (Figure 2).

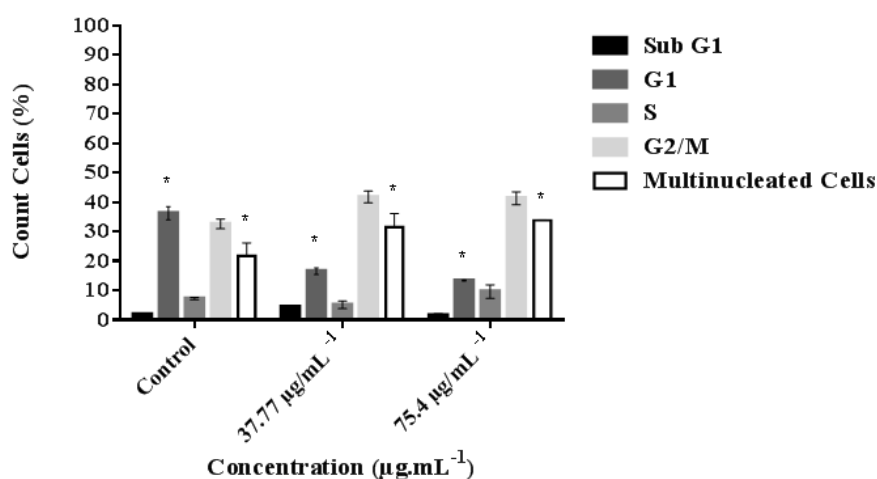


Figure 2. Flow cytometry analysis of Cell Cycle parameters: HCT 116 cells were treated for 24h with DMSO 0.5% (control negative) and with the DACM extract at the IC_{50} ($37.7.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) concentration and twice the IC_{50} ($75.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (* $p < 0.05$ compared to control).

There was a significant decrease in G1 cells with increased extract concentration ($p < 0,05$), a small but not significant increase in G2/M cells was also observed ($p > 0,05$). Moreover, multinucleated cells were increased with enhanced extract concentration ($p < 0,05$). The cells are progressed to phase M and acquiring extra copies of the genome without making cytokinesis, what can be proven to be the checkpoint failure in phase M. Increased ploidy may be causing genetic instability, which may be responsible for the cell being referred for apoptosis. Tumors are complex systems that include heterogeneous cancer cells with markedly different sizes and genomic contents (Li, Rycaja, Chena & Tanga, 2015). The bulk of cancer cells within the majority of solid tumors (~90%) are aneuploidy. Such cells have an alteration (often gain) of chromosome number that is not a multiple of the diploid ($2n$) component. Cancer stem cells are often much smaller than the bulk of cells, whereas polyploid cells are larger than bulk cells by virtue of their increased ploidy ($>4n$). Not surprisingly, cultures of established solid tumor-derived cell lines are also heterogeneous (Mirzayans, Andrais and Murray, 2018). Similar results were found and described by Lu et al. (2016). In this study, reversine, a small molecule that was originally identified to induce dedifferentiation of murine myoblasts into multipotent progenitor cells, demonstrated anticancer activity and generated an increase in the number of multinucleated cells, suggesting that tumor cells can escape from mitosis without cell division.

Giant multinucleated cell formation is a cell phenotype due to verification failure at cell cycle checkpoints, mainly in DNA structure verification and mitotic spindle assembly. Failure to interrupt the cycle to phase M leads to an attempt at aberrant chromosomal segregation, which triggers the activation of the apoptotic mechanism. Due to damage to the mitotic spindle, cells are able to escape the M-phase without segregation of sister chromatids and cytokinesis, a process known as “mitotic slippage”. Cells stop at G1 because they activate a p53-mediated checkpoint. In the presence of p53, p21 activates polyploidy, which generates cell death to prevent late mitosis and aneuploidy errors (Castedo, Perfettini, Roumier, Andreau, Medema & Kroemer, 2004).

The mechanism of cell death, including initial apoptosis, late apoptosis or necrosis, was analyzed after exposure HCT 116 cell line to DACM extract for 24h (Figure 3; Figure 2 - Supplementary Material).

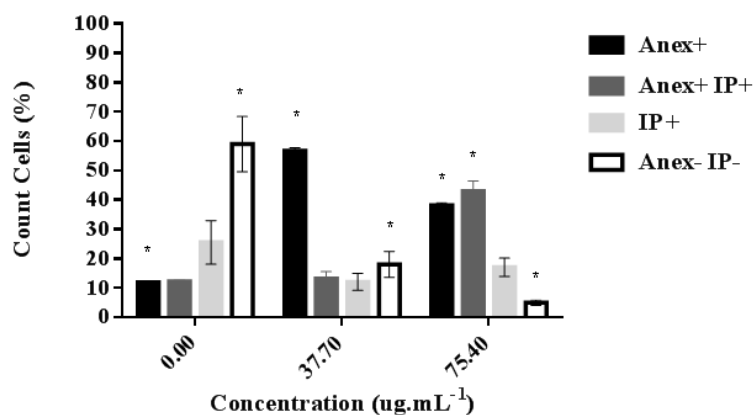


Figure 3. Annexin-V/PI staining expressed in mean and standard deviation after 24 treatment with the DACM extract at the concentration of IC₅₀ (37.77 µg.mL⁻¹) and twice (75.4 µg.mL⁻¹) (*p<0.05 compared to control).

In the treatment with the IC₅₀ concentration the percentage of cells in early apoptosis presents a significant difference in relation to the control (p<0.05). The percentage of cells in initial apoptosis increases after exposure to the lowest concentration of the extract and the number of cells is reduced using a higher concentration. With increasing concentration, the number of cells in late apoptosis increased (p<0.05). Late apoptosis results increased after high extract concentration exposure. There was a reduction in the number of cells in necrosis (p <0,05). The percentage of viable cells decreased considerably (p <0,05). Therefore, the DACM extract inhibits the growth of colorectal cancer in a dose-dependent manner through the induction of apoptosis. Figure 8 represents the results of triplicate after flow cytometry.

The mechanism of cell death was evaluated by several studies using different compounds and extracts from algae in a wide variety of cell models. Laminarin from brown seaweed *Laminaria digitata* induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells (5mg.mL⁻¹) in a dose-dependent manner (Park, Kim, Kim & Nam, 2012). The ethanolic extract of algae *Undaria pinnatifida* induced the

reduction of cell viability of the HCT 116 cell line (2% of cell extract reduces in 80% cell viability) by apoptotic mechanism (Nishibori, Itoh, Kashiwagi, Arimochi & Morita, 2012). Fucoindan, sulfated polysaccharides purified from the brown alga *Fucus vesiculosus*, induced apoptosis in the HT 29 adenocarcinoma line (5-20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Kim et al., 2010). Fucoxanthin, a carotenoid present in brown seaweeds, has shown to suppress the level of Bcl-2 protein and induce apoptosis in human colon cancer cells Caco-2, HT-29 and DLD-1. After exposure at concentration 15.2 μM , fucoxanthin inhibited, respectively, the viability of the cells in 14,8%, 50,8% and 29,4%. In addition, fucoxanthinol, fucoxanthin metabolite, also had a stronger anti-proliferative effect than fucoxanthin on Caco-2 human colon cancer cells (Hosokawa, Kudo, Maeda, Kohno, Tanaka & Miyashita, 2004; Konishi, Hosokawa, Sashima, Kobayashi & Miyashita, 2005).

Most reports studying cytotoxic effects of macroalgae present a range of IC_{50} from 5 $\mu\text{g/mL}$ to 869 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Various therapeutic compounds from seaweed are able to induce apoptosis through different pathways and molecular mechanisms. Recent cancer preventive studies have been focused on designing anticancer drugs from natural sources because of fewer side effects as compared to synthetic anticancer drugs (Moussavou et al., 2014; Sanjeeva et al., 2017, Narayani, Saravanan, Ravindran, Ramasamy & Chitra, 2019).

The inhibition of apoptosis in colorectal cancer cells enhances tumor growth, promotes neoplastic progression, and confers resistance to cytotoxic anticancer agents. Thus, bioactive compounds that induce apoptosis in cancer cells can be used as agents for cancer chemoprevention and/or chemotherapy (Sanjeeva et al, 2017).

Conclusion

This study was the first to demonstrate the reduction of the cellular viability of colorectal cancer cells through the induction of apoptosis after treatment with chloroform extract of the brown

Antarctic macroalga *D. anceps*, suggesting that this macroalgae is a promising candidate for the isolation of molecules with anticancer activity. However, more studies are necessary in order to elucidate the mechanism of action of macroalgae and the pathways of induction of apoptosis. Some isolated compounds such as fucoidan and fucosterol have been investigated with promising antitumor activity. Fractionation by bioassay-guided is a interesting tool to separate, isolate and purify natural compounds with anticancer activity.

Funding

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

Conflicts of Interest: The Authors declare no conflicts of interest regarding this study.

References

Abdul, Q. A., Choi, R. J., Jung, H. A. & Choia, J. S. (2016). Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1856–1866.

Boyom, F. F., Ngouana, V., Kemgne, E. A. M., Zollo, P. H. A. Menut, C., Bessiere, J. M., Gut, J., Rosenthal, P. J. (2011). Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. *Parasitology Research*, 108, 1211–1217.

Cantrell C. L., Franzblau S. G. & Fisher N. H. (2001). Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Medica*, 67, 685-695.

Cardenas, E. & Gosh, R. (2013). Vitamin E: a dark horse at the crossroad of cancer management. *Biochemical Pharmacology*, 86, 845–852.

Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825–37.

Esquivel-Ferriño, P. C., Favela-Hernández, J. M. J., Garza-González, E., Waksman, N., Ríos, M. Y., & Camacho-Corona, M. R. Antimycobacterial Activity of Constituents from *Foeniculum vulgare* var. Dulce Grown in Mexico. (2012). *Molecules*, 17, 8471-8482.

Farooqi, A.A., Butt, G. & Razzaq, Z. (2012). Algae extracts and methyl jasmonate anti-cancer activities in prostate cancer: Choreographers of “the dance macabre”. *Cancer Cell International*, 12, 50.

Gambato, G., Baroni, E. G., Garcia, C. S. C., Frassini, R., Frozza, C. O. S., Moura, S. Et al. (2014). Brown algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) suppresses proliferation and promotes apoptosis-mediated cell death in tumor cells. *Advances in Biological Chemistry*, 4, 98-108.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen. P., Nuñez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, 19, 107–120, 2012.

Gimenez-Bonafe, P., Tortosa, A. & Perez-Tomas, R. (2009). Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Current Cancer Drug Targets*, 9, 320–340, 2009.

Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T. & Miyashita, K. (2004). Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the

PPARgamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1675:113–119.

Ji, Y. B., Ji, C. F. & Yue, L. (2014). Study on human promyelocytic leukemia HL-60 cells apoptosis induced by fucosterol. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24, 845–851.

Jin, Y., Qiu, S., Shao, N. & Zheng, J. (2018). Fucoxanthin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically promotes apoptosis of human cervical cancer cells by targeting PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway. *Medical Science Monitor*, 24, 11–18.

Jiang, H., Li, J., Chen, A., Li, Y.; Xia, M., Guo, P., Yao, S., Chen, S. (2018). Fucosterol exhibits selective antitumor anticancer activity against HeLa human cervical cell line by inducing mitochondrial mediated apoptosis, cell cycle migration inhibition and downregulation of m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *Oncol Letters*, 15(3): 3458–3463.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239–257.

Khanavi, M., Gheidarloo, R., Sadati, N., Ardekani¹, M.R.S., Nabavi, S. M. B., Tavajohi, S. & Ostad, S. N. (2012). Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of

marine algae against breast and colon carcinoma cell line. *Pharmacognozy Magazine*, 8, 60-64.

Kim E.J., Park S.Y., Lee J.Y. & Park J.H. (2010). Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterology*, 10, 96.

Konishi, I., Hosokawa, M., Sashima, T., Kobayashi, H. & Miyashita, K. (2006). Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142, 53–59.

Lopes-Costa, E., Abreu, M., Gargiulo, D., Rocha, E. & Ramos, A. A. (2017). Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 80, 776-787.

Li, Q., Rycaja, K., Chena, X. & Tanga, D. G. (2015). Cancer stem cells and cell size: A causal link? *Seminars in Cancer Biology*, 35, 191–199.

Lu, Y. C., Lee, Y. R., Liao, J. D., Lin, C. Y., Chen, Y. Y., Chen, P. T. & Tseng, Y. S. (2016). Reversine induced multinucleated cells, cell apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer cells. *Plos One*, 11, 7.

Martins, R.M., Nedel, F., Guimarães, V.B.S., da Silva, A.F., Colepicolo, P., Pereira, C.M.P. and Lund, R.G. (2018) Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial and anticancer potential. *Frontiers in Microbiology*, 9, 412.

Maruthupandian, A. & Mohan, V. R. (2011). GC-MS analysis of some bioactive constituents of *Pterocarpus marsupium* Roxb. *Chemical Technology*, 3, 1652-1657.

Mirzayans, R., Andrais, B. & Murray, D. (2018). Roles of polyploid/multinucleated giant cancer cells in metastasis and disease relapse following anticancer treatment. *Cancers (Basel)*, 10, 4.

Moussavou, G., Kwak, D. H., Obiang-Obonou, B. W., Maranguy, C. A. O., Dinzouna-Boutamba, S. D, Lee, D. H., et al. (2014). Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers. *Marine Drugs*, 12, 4898-4911.

Narayani, S. S., Saravanan, S., Ravindran, J., Ramasamy, M. S. & Chitra, J. (2019). In vitro anticancer activity of fucoidan extracted from *Sargassum cinereum* against Caco-2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 618-628.

Nishibori, N., Itoh, M., Kashiwagi, M., Arimochi, H. & Morita, K. (2012). In vitro cytotoxic effect of ethanol extract prepared from *Sporophyll* of *Undaria pinnatifida* on human colorectal cancer cells. *Phytotherapy Research*, 26, 191-196.

Nwosu, F., Morris, J., Lund, V. A., Stewart, D., Ross, H.A., McDougall, G. J. (2011). Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*, 126, 1006-1012.

Pacheco, B. S., dos Santos, M. A. Z., Schultze, E., Martins, R. M., Lund, R. G., Seixas, F. K., Colepicolo, P., Collares, T., Paula, F. R., Pereira, C. M. P. (2018). Cytotoxic activity of fatty acids from Antarctic macroalgae on the growth of human breast cancer cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6.

Park H. K., Kim J. & Nam T.J. (2013) Induction of apoptosis and regulation of ErbB signaling by laminarin in HT-29 human colon cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 32, 291–295.

Park H.K., Kim I.H., Kim J. & Nam T.J. Induction of apoptosis by laminarin, regulating the insulin-like growth factor-IR signaling pathways in HT-29 human colon cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 30, 734-738.

Pereira, C. M. P., Nunes C E P., Zambotti-Vilela, L., Streit, N M.; Dias, D.; Pinto, E., et al. (2016). Extraction of sterols in brown macroalgae from Antarctica and their identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2, 751-757.

Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., & Lavrik, I. N. (2015). Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of imaging flow cytometry with classical annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods*, 423.

Plati, J., Bucura, O. & Khosravi-Fara, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology (Camb)*, 3 4, 279–296.

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8, 4, 603-19.

Sanjeewa, K. K., Lee, A., Suck, J., Won-Suck, K. & You-Jin, J. (2017). The potential of brown-algae polysaccharides for the development of anticancer agents: An update on anticancer effects reported for fucoidan and laminaran. *Carbohydrate Polymers*, 177, 451-459.

Santana, J. S., Sartorelli, P., Guadagnin, R. C., Matsuo, A.L., Figueiredo, C. R., Soares, M. G., da Silva, A. M., Lago, J. H. (2012). Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves - chemical composition and in vitro cytotoxicity evaluation. *Pharmaceutical Biology*, 50, 1248-53, 2012.

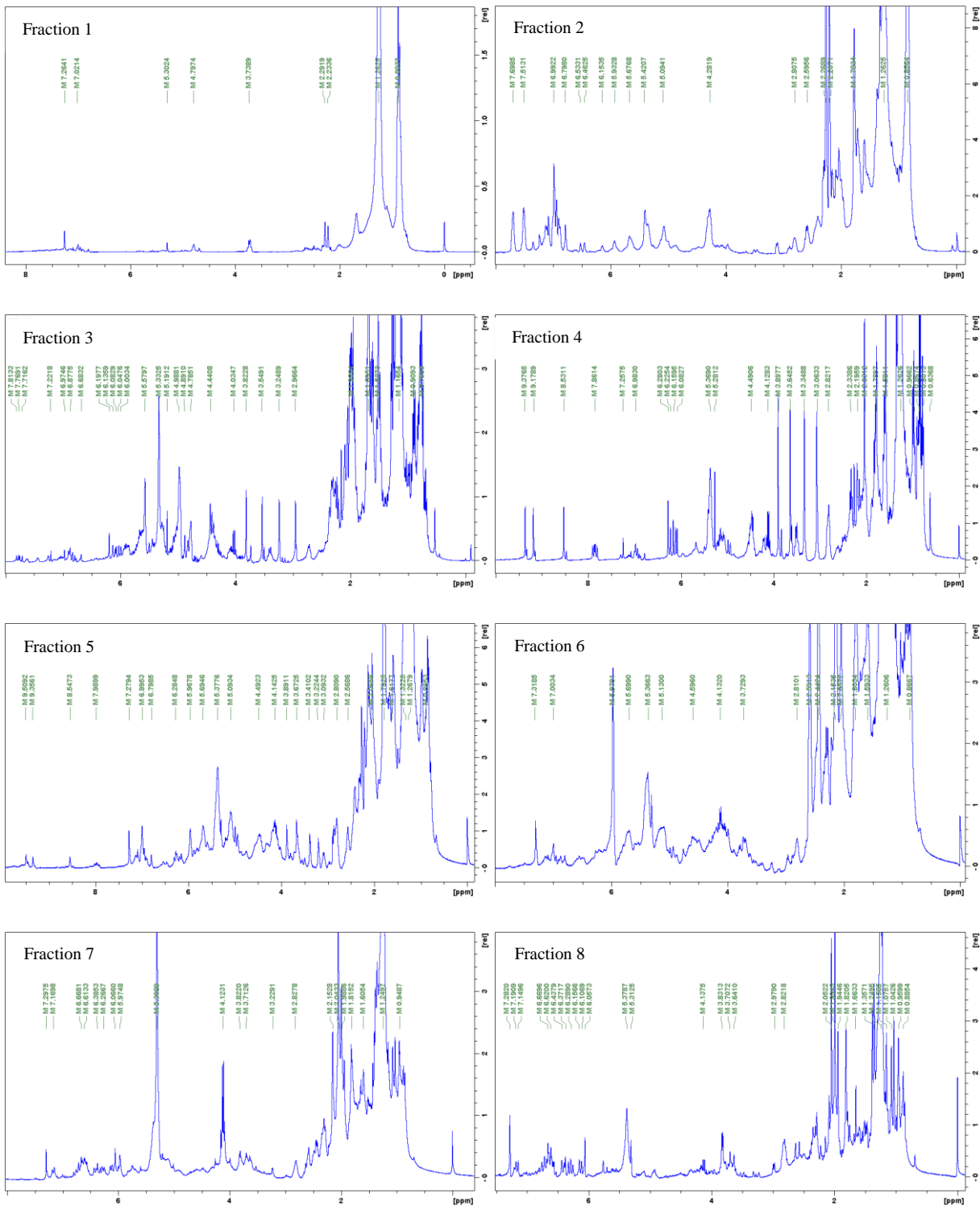
Takahashi, K., Hosokawa, M., Kasajima, H., Hatanaka, K., Kudo, K., Shimoyama, N., Miyashita, K. (2015). Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues. *Oncology Letters*, 10, 3, 1463-1467.

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.

Supplementary Material

Table 1. Yield of fractions of DACM extract.

Fractions	Solvents	Yield (mg)	Yield (%)
1	Hexane	39	10,8
2	Hexane:Ethyl acetate (9:1)	78.6	21,77
3	Hexane:Ethyl acetate (8:2)	106,2	29,42
4	Hexane:Ethyl acetate (7:3)	114.9	31,83
5	Hexane:Ethyl acetate (6:4)	68.4	18,95
6	Hexane:Ethyl acetate (1:1)	81	22,44
7	Hexane:Ethyl acetate (4:6)	86	23,82
8	Hexane:Ethyl acetate (3:7)	125.3	34,72
9	Hexane:Ethyl acetate (2:8)	73.8	20,44
10	Hexane:Ethyl acetate (1:9)	34.5	9,55
11	Ethyl acetate	22.2	6,15
12	Ethyl acetate:Methanol (1:1)	209.3	57,99
13	Methanol	89.7	24,85



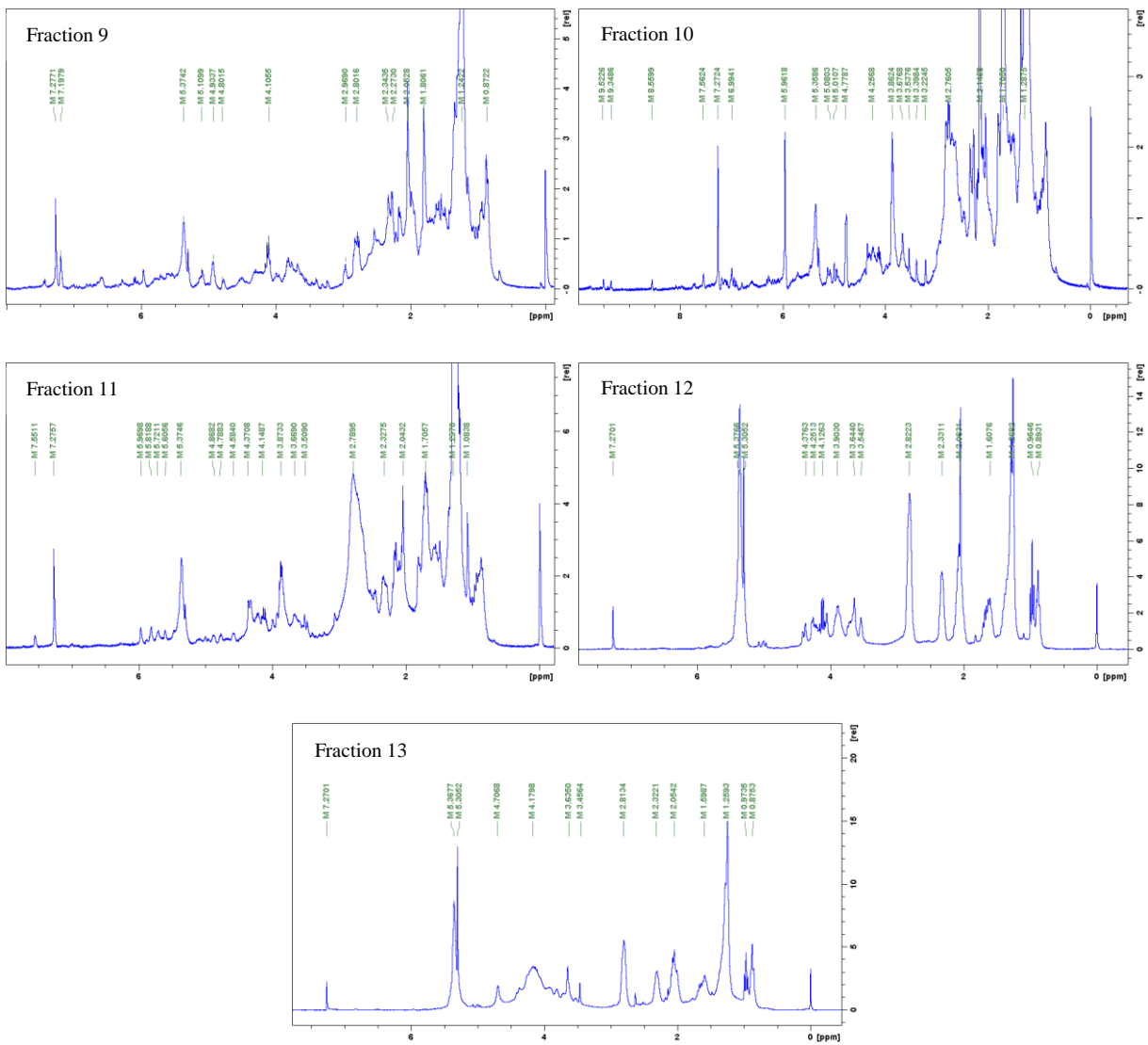


Figure 1. ^1H NMR spectrum of fractions of the chloroform extract of the antarctic seaweed *D. anceps*

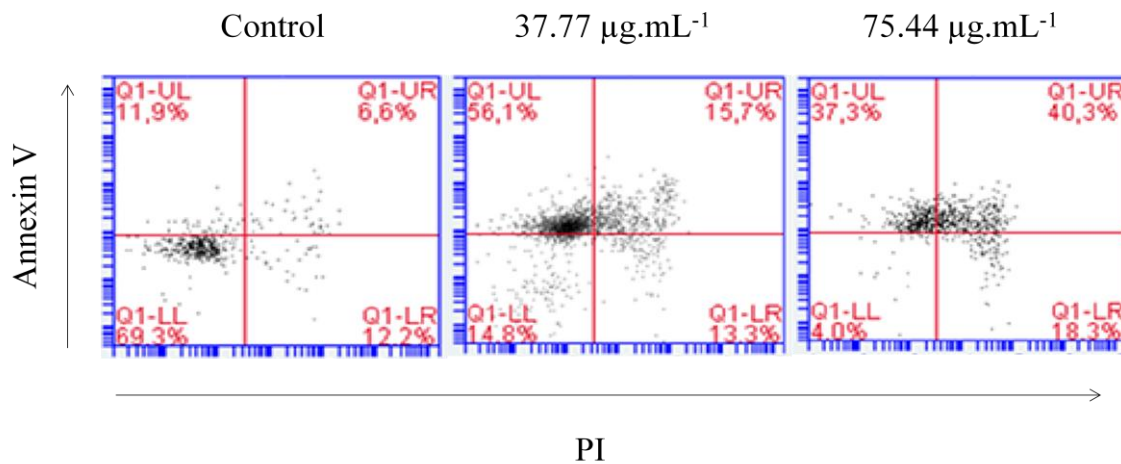


Figure 2. Representative analysis of flow cytometry data after Annexin V/Propidium Iodide staining. HCT 116 cells were treated for 24h with DMSO 0.5% (control) and with the DACM extract at the IC_{50} ($37.77 \mu\text{g.mL}^{-1}$) concentration and twice the IC_{50} ($75.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Annexin-V only staining early apoptotic events (Q1-UL quadrant), Annexin V and PI staining indicated the late phase of apoptosis (Q1-UR quadrant), only PI staining indicated necrosis (Q1-LR) and Annexin-V and PI not stained (Q1-LL) indicated viable cells. Quadrant figures were representative at least three independent experiments.

5. DISCUSSÃO GERAL

O carcinoma colorretal tornou-se um problema de saúde pública mundial devido a sua elevada incidência e mortalidade. Este tipo de câncer é o terceiro mais prevalente e representa a maior causa de mortes por câncer não relacionadas ao tabagismo. Os países desenvolvidos apresentam um maior número de casos, porém constatou-se nos últimos anos o aumento da incidência em países em desenvolvimento como o Brasil (Jemal *et al.*, 2011; Mahmoud *et al.*, 2015).

No Brasil, o CCR configura a terceira neoplasia mais frequente em homens e a segunda em mulheres, apresentando um risco estimado 16,83 e 17,90 a cada 100 mil habitantes. A incidência varia entre as regiões, sendo o CCR mais prevalente no sul e sudeste do país, regiões estas mais desenvolvidas economicamente e com estilo de vida ocidental relacionado ao sedentarismo, elevado consumo de alimentos processados e de carne vermelha e baixa ingestão de vegetais. Além do estilo de vida, outros fatores de risco também estão associados ao desenvolvimento do CCR, tais como idade acima de 50 anos, presença de pólipos, distúrbios intestinais inflamatórios crônicos e diabetes tipo 2 (INCA, 2018).

Apesar dos avanços em diagnóstico e tratamento, os índices de mortalidade continuam altos devido à falta de investimentos governamentais para a criação de programas para a detecção precoce da doença em países em desenvolvimento, como o Brasil, e as características intrínsecas ao tumor, como a resistência aos quimioterápicos convencionais e efeitos colaterais. Devido a estes fatores, a pesquisa por novos compostos com atividade anticâncer, bem como a elucidação dos mecanismos moleculares de ação dos mesmos são de extrema importância (Paim *et al.*, 2011; Perin *et al.*, 2015).

Os compostos naturais desempenham um papel muito importante na descoberta de novas drogas com atividade antitumoral. Comparados com novos compostos químicos sintetizados, os compostos naturais apresentam melhor absorção no organismo e baixa toxicidade (Luo, *et al.*, 2014). O ambiente marinho apresenta elevada diversidade de espécies capaz de produzir uma enorme variedade de estruturas químicas com potencial elevado para descoberta de novos fármacos. Nas últimas três décadas, a descoberta de metabólitos com atividade biológica a partir de macroalgas cresceu substancialmente, porém, de aproximadamente 25.000 espécies de algas descritas, apenas 15 são utilizadas biotecnologicamente em larga escala (Raja *et al.*, 2008; Stein *et al.*, 2010).

As macroalgas são organismos bentônicos e, devido a esse fator, estão expostas a um ambiente hostil, com elevadas pressões de seleção. Assim, as algas podem ser consideradas fonte de novos compostos com diversas atividades biológicas, dentre elas, a antitumoral (Machado *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2018). As algas antárticas são adaptadas às condições mais adversas do planeta, como por exemplo, o ambiente polar. Devido aos escassos estudos utilizando estas espécies, o presente trabalho avaliou a potencial atividade antitumoral de três espécies da flora ficológica antártica, *C. jacquinotii*, *I. cordata* e *D. anceps*, contra a linhagem de câncer colorretal humano HCT 116.

Os resultados no Capítulo I (Fig. 2) mostraram que três extratos da macroalga parda *D. anceps* foram citotóxicos contra a linhagem HCT 116 de modo dose dependente ($p < 0,05$). Os extratos clorofórmico e metanólico induziram efeito tempo dependente, porém o metanólico não apresentou este efeito. Os extratos da alga parda *C. jacquinotii* e o extrato metanólico da macroalga vermelha *I. cordata* não apresentaram citotoxicidade contra a linhagem HCT 116 nas condições experimentais testadas. Os

extratos hexânico e clorofórmico de *I. cordata* foram citotóxicos contra a linhagem HCT 116 de maneira dose dependente ($p < 0,05$), porém não tempo dependente ($p > 0,05$).

Na análise química dos extratos bioativos pela técnica de CG-MS (Tabela 3, Capítulo I) foi identificado um composto majoritário no extrato hexânico da alga *I. cordata* e três no extrato clorofórmico. Nos extratos de *D. anceps*, cinco compostos majoritários foram identificados no extrato hexânico, dez no clorofórmico e três no metanólico. Dentre os compostos identificados nos extratos analisados, destacam-se a presença do composto ephicolesterol, forma epimérica do colesterol, o qual está relacionado à permeabilidade da membrana plasmática; ácido octadecanóico, o único ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa que não está relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares; phytol, diterpeno com propriedade antimicrobiana; ácido hexadecanóico, ácido graxo saturado com propriedade anti-inflamatória e fucosterol, esterol típico de algas com propriedades anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora e anticâncer (Cantrell et al., 2001; Ro'g & Pasenkiewicz-Gierula, 2003; Kris-Etherton et al., 2005; Ji et al., 2014; Abdul et al., 2015).

Dando continuidade à caracterização química dos compostos, procedeu-se a avaliação do perfil de carotenoides para as três espécies algais. No espectro da alga *I. cordata* foram identificados os carotenoides zeaxantina e β -caroteno. Na análise do espectro da alga *C. jacquinotii* foram identificados picos correspondentes a fucoxantina, violaxantina, zeaxantina e β -caroteno. Já para a alga *D. anceps*, verificou-se a presença de fucoxantina, violaxantina e β -caroteno. Dentre estes compostos, fucoxantina e seu derivado, o fucoxantanol, já foram descritos por apresentarem atividade antitumoral, inclusive contra células de carcinoma colorretal. O composto β -caroteno é um potente

antioxidante estudado (Yamamoto *et al.*, 2011; Lopes-Costa *et al.*, 2017; Terasaki *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2018; Eggersdorfer & Wyssb, 2018).

Vários estudos relataram a atividade anticâncer de extratos e compostos isolados de macroalgas contra linhagens de câncer colorretal, porém a relação estrutura/atividade biológica precisa ser elucidada (Kim *et al.*, 2010; Gambato *et al.*, 2013; Satomi, 2017; Martins *et al.*, 2018). O presente estudo sugere que os extratos hexânico e clorofórmico de *I. cordata* e os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico de *D. anceps* sejam promissores candidatos para investigações, incluindo o desenvolvimento de drogas no combate ao câncer colorretal.

Com base nos dados obtidos, no Capítulo II, realizou-se o fracionamento bioguiado do extrato clorofórmico da macroalga parda *D. anceps*. Optou-se pela técnica de maceração, pois permite a obtenção de maior quantidade de biomassa algal em uma única extração.

Inicialmente, analisou-se a citotoxicidade do extrato clorofórmico e foi verificado que este inibiu o crescimento da linhagem HCT 116 com efeito dose dependente ($p < 0,05$). A citotoxicidade do extrato, nas condições testadas, não está correlacionada com os três tempos avaliados (24, 48 e 72h) (Fig. 1, Capítulo II). Realizou-se o fracionamento deste extrato pela técnica de CLV e foram obtidas 13 frações, agrupadas conforme o perfil de compostos obtido pela técnica ^1H RMN. Com exceção da fração 1, as demais apresentaram citotoxicidade contra a linhagem HCT 116. É importante salientar que as frações mais polares evidenciaram IC_{50} mais elevado (Tabela 3, Capítulo II).

A caracterização química, obtida pela técnica de GC-MS (Tabela 1, Capítulo II), indicou a presença de seis compostos majoritários no extrato DACM, destacando-se o fucosterol, o qual também foi identificado na fração 5. Na análise química das frações

também destaca-se a presença do ácido n-hexadecanóico, o qual foi identificado nas frações 2, 3/4, 8, 11/12 e 13 (Tabela 2, Capítulo II). Este composto também foi identificado nos três extratos de *D. anceps* obtidos pela técnica de ultrassom e o fucosterol, em dois extratos (hexânico e clorofórmico), conforme descrito no Capítulo I. O fucosterol já foi descrito por apresentar atividade antitumoral e o ácido hexadecanóico, atividade anti-inflamatória (Maruthupandian & Mohan, 2005; Khanavi *et al.*, 2012).

No Capítulo II, avaliou-se também, o efeito no ciclo celular e o mecanismo de morte celular induzido pela exposição da linhagem HCT 116 ao extrato DACM pela técnica de citometria de fluxo utilizando-se Anexina-V. No ciclo celular, verificou-se diminuição do número de células na fase G1 ($p < 0,05$) e aumento do número do percentual de células polinucleadas ($p < 0,05$ com o aumento da concentração. Houve aumento, porém não significativo em relação ao controle de células na fase M (Fig. 2, Capítulo II) . Estes dados sugerem que as células podem evadir o mecanismo de mitose, sem realizar a citocinese, levando a poliploidia, que pode estar relacionada ao desenvolvimento de tumores (Lu *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram obtidos por Lu *et al.*, 2016, após tratamento das células de carcinoma de pulmão (A 549 e H1299) utilizando reversina, uma molécula pequena, que foi originalmente identificada para induzir a desdiferenciação de mioblastos em células progenitoras multipotentes. O aumento do número de cópias do genoma pode induzir a morte celular por apoptose.

Verificou-se maior percentual de células em apoptose inicial ($p < 0,05$), quando as células foram tratadas na concentração do IC_{50} ($37.77\mu\text{g/mL}$) e maior número de células em apoptose tardia ($p < 0,05$), quando expostas a concentração maior do extrato DACM ($75.4\ \mu\text{g/mL}$). Não foi verificada diferença significativa no percentual de necrose para ambas as concentrações quando comparadas ao controle ($p > 0,05$). Sugere-

se que, o extrato DACM induziu apoptose em células HCT 116, com aumento de células poliploides.

Avaliar a indução de morte celular e o efeito causado no ciclo celular por extratos e compostos isolados com potencial aplicação na indústria farmacêutica é importante para contribuir com o entendimento do mecanismo de ação destes e, assim, estabelecer futuras metodologias terapêuticas. Além disso, estes mecanismos contribuem possivelmente para a compreensão dos fatores relacionados a resistência tumoral (Gimenez-Bonafé *et al.*, 2009; Plati *et al.*, 2011; Pistritto *et al.*, 2016).

A natureza é uma fonte inestimável de potenciais agentes terapêuticos. Compostos naturais derivados de algas apresentam uma variedade considerável de propriedades biológicas, incluindo a ação antitumoral com indução de apoptose (Kim *et al.*, 2010; Gambato *et al.*, 2013; Moussavou *et al.*, 2014). Estratégias farmacoterapêuticas personalizadas baseadas na expressão e função de reguladores de morte celular específicos para cada tipo de câncer podem se tornar uma opção para sensibilizar as células tumorais aos agentes terapêuticos utilizados isoladamente ou como uma combinação de compostos para alvos específicos (Radogna *et al.*, 2014).

Ainda que estudos relacionados a biologia molecular do câncer tenham evoluído consideravelmente nas últimas décadas, os resultados para o tratamento da maioria dos cânceres, incluindo o CCR, não apresentaram a mesma progressão. A redução das mortes por câncer ainda está atrelada à detecção precoce e medidas preventivas. O desafio em investigar tratamentos eficazes contra o câncer incentivou o desenvolvimento de novos fármacos a partir de fontes naturais, como as macroalgas. O meio ambiente marinho ocupa 70% da superfície terrestre e possui a maior biodiversidade do planeta, caracterizando-se como uma grande fronteira na pesquisa

médica e farmacêutica voltado ao câncer (Castellanos *et al.*, 2010; Senthilkumar *et al.*, 2013; Collins *et al.*, 2016) .

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que os extratos das algas *I. cordata* e *D. anceps* são citotóxicos contra a linhagem de câncer colorretal HCT 116 de modo dose-dependente. A composição química dos extratos varia de acordo com as técnicas de extração empregadas. A identificação dos componentes de um extrato é muito importante, principalmente quando há carência de estudos na área, pois direciona trabalhos posteriores, permitindo a análise detalhada de compostos de interesse.

Este trabalho permitiu obter, especificamente, as seguintes conclusões:

- ✓ Os extratos hexânico e clorofórmico da macroalga vermelha *I. cordata* e os extratos hexânico clorofórmico e metanólico da macroalga parda *D. anceps*, obtidos por ultrassom, são citotóxicos contra a linhagem celular HCT 116 de modo dose-dependente.
- ✓ Os extratos apresentaram compostos com atividade antitumoral descrita.
- ✓ Os extratos da alga *C. jacquinotti* não foram citotóxicos contra a linhagem HCT 116, apesar de terem sido identificados por HPLC compostos já descritos que apresentam atividade antitumoral.
- ✓ Nas frações obtidas do extrato DACM identificou-se um maior número de classes de compostos comparado ao extrato total.
- ✓ O extrato clorofórmico, obtido por maceração, da macroalga *D. anceps* e suas frações apresentaram citotoxicidade contra a linhagem HCT 116 de modo dose-dependente.
- ✓ Tratamentos de células da linhagem HCT 116 com o extrato DACM induzem o aumento do número de células na fase G1 do ciclo celular e aumento do percentual de células multinucleadas.

- ✓ O mecanismo de morte celular induzido, após exposição da linhagem HCT 116 ao DACM mostrou forte relação ao mecanismo de morte induzido por apoptose.

7. PERSPECTIVAS

Este estudo tem como perspectivas de trabalhos futuros:

- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos e frações contra linhagens não tumorais;
- ✓ Isolar os compostos relacionados com a citotoxicidade contra a linhagem HCT 116 pelo fracionamento bioguiado.
- ✓ Identificar a estrutura molecular dos compostos isolados através das pelas técnicas de GC-MS, CLAE e RMN.
- ✓ Analisar a expressão de marcadores moleculares apoptóticos a fim de elucidar a via de indução, intrínica ou extrínica, de morte celular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul, Q. A.; Choi, R. J.; Jungc, H. A.; Choia, J. S. Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 96: 1856–1866, 2016.

Agarwal, M. L.; Taylor, W. R.; Chernov, M. V.; Chernova, O. B.; Stark, G. R. The p53 network. *Journal of Biological Chemistry*. 273:1-4, 1998.

Alazzouzi, H.; Alhopuro, P.; Salovaara, R.; Sammalkorpi, H.; Järvinen, H.; Mecklin, J.P.; Hemminki, A.; Schwartz, S.; Aaltonen, L. A.; Arango D. SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 11: 2606-2611, 2005.

Alghazeer, A.; Howell, N. K.; El-Naili, M. B. Awayn, N. Anticancer and antioxidant activities of some algae from western libyan coast. *Natural Science*. 10 (7): 232-246, 2018.

American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2014. Disponível on line em:< <https://www.cancer.org>> Acesso em: 10 de mar. 2018.

Andreo, D.; Jorge, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 24(2): 319-336, 2006.

Ankisetty, S.; Nandiraju, S.; Win, H.; Park, Y. C.; Amsler, C. D.; McClintock, J. B.; Baker, J. A.; Diyabalanage, T. K.; Pasaribu, A.; Singh, M. P.; Maiese, W. M.; Walsh, R. D.; Zaworotko, M. J.; Baker, B. J. Chemical Investigation of Predator-Deterred Macroalgae from the Antarctic Peninsula. *Journal of Natural Products*. 67: 1295-1302, 2004.

Antunes, E. M.; Afolayan, A. F.; Chiwakata, M. T.; Fakee, J.; Knott, M. G.; Whibley, C. E.; Hendricks, D. T.; Bolton, J. J.; Beukes, D. R. Identification and in vitro anti-esophageal cancer activity of a series of halogenated monoterpenes isolated from the South African seaweeds *Plocamium suhrii* and *Plocamium cornutum*. *Phytochemistry*. 72: 769–772, 2011.

Barbacid M. Ras genes. *Annual Review of Biochemistry*. 56:779-827, 1987.

Beyer, L. & Bölter, M. *Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscape* (2002). Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany. 388p.

Bhalla, A.; Zulfiqar, M.; Bluth, M. H. Molecular Diagnostics in Colorectal Carcinoma. *Clinics in Laboratory and Medicine*. 38(2): 311–342, 2018.

Boatright, K. M. Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15: 725-731, 2003.

Bodger, K. Colorectal cancer. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. 34:197-201, 2000.

Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 138: 2073-2087, 2010.

Bos, J.L. p21 ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. *European Journal of Cancer*. 31A:1051-4, 1995.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) [Internet]. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 10 de janeiro de 2018.

Bronner, M.O.; Culin, C.; Reed, J. C.; Furth, E. E. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal tumor progression model. *The American Journal of Pathology*. 146:20-26, 1995.

Browne, S.J.; Willians, A.C.; Hague, A.; Butt, A.J.; Paraskeva, C. Loss of APC protein expressed by human colonic epithelial cells and the appearance of a low-molecular-weight form is associated with apoptosis in vitro. *International Journal of Cancer*. 59:56-64, 1994.

Brusotti, G.; Cesaria, I.; Dentamaroa, A.; Caccialanza, G.; Massolinia, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 87: 218– 228, 2014.

Calonge, N.; Petitti, D. B.; DeWitt, T. G.; Dietrich, A. J.; Gregory, K. D.; Harris, R.; Isham, G.; LeFevre, M. L.; Leipzig, R. M.; Loveland-Cherry, C.; Marion, L. N.; Melnyk, B.; Moyer, V. A.; Ockene, J. K.; Sawaya, G. F.; Yawn, B. P. Screening for colorectal cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of Internal Medicine*. 149(9): 627-637, 2008.

Castellanos, A.; Vicente-Dueñas, C.; Campos-Sánchez, E.; Cruz, J.J.; García-Criado, F.J.; García-Cenador, M.B.; Lazo, P.A.; Pérez-Losada, J.; Sánchez-García, I. Cancer as a reprogramming-like disease: Implications in tumor development and treatment. *Semin. Cancer Biology*. 20: 93–97, 2010.

Cantrell C. L.; Franzblau, S. G.; Fisher, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Medica*. 67: 685-695, 2001.

Cardozo, K. H. M.; Guaratini, T.; Barros, M. P.; F.; Tonon, A. P.; Lopes, N. P.; Campos, S. Metabolites from algae with economical impacts. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146:68-70, 2007.

Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*. 21(1): 99-105, 1997.

Contreras, L.; Mella, D.; Moenne, A.; Correa, J.A. Differential responses to copper⁵¹⁹ induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aquatic Toxicology*. 94, 94–102, 2009.

Corbin, C.; Fidel, T.; Lecler, E. A; Barakzoy, E.; Sagot, N.; Falguières, A.; Renouard, S.; Blondeau, J. P.; Ferroud, C.; Doussot, J.; Lainé, E.; Hano, C. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 26: 176-185, 2015.

Costa, L. S.; Fidelis, G. P.; Cordeiro, S. L.; Oliveira, R. M.; Sabry, D. A.; Câmara, R. B. G; Nobre, L. T. D. B.; Costa, M. S. S. P.; Almeida-Lima, J; Farias, E. H. C.; Leite, E. L.; Rocha, H. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 64(1):21-8, 2010.

Coy, C.S.R. Colorectal cancer prevention in Brazil—where are we? *Journal of Coloproctology*. 33, 111–112, 2013

Cujic', N.; Šavikin, K.; Jankovic', T.; Pljevljakušić', D.; Zdunic', G.; Ibric', S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*. 194: 135–142, 2016.

Cummings, B. S.; Wills, L. P.; Schnellmann, R. G. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Current Protocols in Pharmacology*. 2004.

Das, S. K.; Hashimoto, T.; Shimizu, K.; Yoshida, T.; Sakai, T.; Sowa, Y.; Komoto, A.; Kanazawa, K. Fucoxanthin induces cellcycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/CIP1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1726(3): 328-335, 2005. Das, S. K.; Hashimoto, T.; Kanazawa, K. Growth

inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. *Biochimica et Biophysica. Acta.* 1780(4): 743-749, 2008.

De Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L. Câncer a agentes antineoplásicos ciclo celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quimica Nova.* 28 (1):118-125, 2005.

De Almeida, C. L.; Falcão, H. S.; Lima, G. R. M.; Montenegro, C. A.; Lira, N. S.; Athayde-Filho, P. F.; Rodrigues, L. C.; De Souza, M F. V.; Barbosa-Filho, J. M.; Batista, L. M. Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*. *International Journal of Molecular Sciences.* 12(7): 4550-4573, 2011.

Di, T.; Chen, G.; Sun, Y.; Ou, S.; Zeng X.,Ye, H. Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. *Journal of Funtional Foods.* 28: 64–75, 2017.

Dembittsky, V. M.; Tolstikov, G. A. Natural halogenated alkanes, cycloalkanes and their derivatives. *Chemistry for Sustainable Development.* 11: 803810, 2003.

Dreyfuss, J. L.; Regatieri, C. V.; Lima, M. A.; Eparedes-Gamero, E. J.; Brito, A. S.; Chavante, S. F.; Belfort Jr, R.; Farah, M. E.; Nader, H. B. A heparin mimetic isolated from a marine shrimp suppresses neovascularization. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 8: 1828–1837, 2010.

Duraipandiyan, V.; Ayyanar, M.; Ignacimuthu, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 6: 35-41, 2006.

Edwards, B. K.; Ward, E.; Kohler, B. A.; Ehemann, C.; Zaubler, A. G.; Anderson, R. N.; Jemal, A.; Schymura, M. J.; Lansdorp-Vogelaar, I.; Seeff, L. C.; van Ballegooijen, M.; Goede, S. L.; Ries, L. A. G. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 116:544-573, 2010.

Eggersdorfer, M.; Wyss, A. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 652:18-26, 2018.

Fan, Y.; Wang, W.; Song, W.; Chen, H.; Teng, A.; Liu, A. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. *Carbohydrate Polymers*. 88(4):1313-1318, 2012.

Fellows, P. J. Food processing technology: Principles and Practice. *Cambridge: Woodhead Publishing Ltda*. Third Edition. 912 p., 2009.

Fiehn, O.; Kopka, J.; Trethewey, R. N.; Willmitzer, L. Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 72: 3573-3580, 2000.

Flores-Molina, M. R.; Thomas, D.; Lovazzano, C.; Núñez, A.; Zapata, J.; Kumar, M.; Correa, J. A.; Contreras-Porcía, L. Desiccation stress in intertidal seaweeds: effects on morphology, antioxidant responses and photosynthetic performance. *Aquatic Botany*. 113:90-99, 2014.

Forones, N. K.; Carvalho, A. P. S.; Giannotti-Filho, O.; Lourenço, L. G.; Oshima, C. T. F. Cell proliferation and apoptosis in gastric cancer and intestinal metaplasia. *Arquivos de Gastroenterologia*. 42(1):31-34, 2005.

Foyer, C. H.; Descourvieres, P.; Kunert, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*. 17: 507-523, 1994.

Gambato, G., Baroni, É. G., Garcia, C. S., Frassini, R., Frozza, C. O., Moura, S., Colepicolo, P.; Pereira, C. P.; Henriques, J. A. P.; Ely, M. R. Brown algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) suppresses proliferation and promotes apoptosis-mediated cell death in tumor cells. *Advances in Biological Chemistry*. 4: 98–108, 2014.

Gerald, I. E.; Vousden, K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 411: 342-8, 2001.

Gimenez-Bonafe, P.; Tortosa, A.; Perez-Tomas, R. (2009). Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Current Cancer Drug Targets*. 9: 320–340, 2009.

Glauser, D.; Guillarme, E.; Grata, J.; Boccard, A.; Thiocone, P.A. Optimized liquid chromatography–mass spectrometry approach for the isolation of minor stress biomarkers in plant extracts and their identification by capillary nuclear magnetic resonance. *Journal of Chromatography*. 1180: 90–98, 2008.

GLOBOCAN. Internacional Agency for Research on Cancer – IARC. Disponível on line em: < <http://globocan.iarc.fr/> > Acesso em: 10 de maio 2018.

Green, D. R. & Llambi, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 7:a006080, 2015.

Grivicich, I.; Regner, A.; da Rocha, A. B. Apoptosis: Programmed cell death. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 53(3):335-343, 2007.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 280(1): 1–8, 1999.

Hardeny, P. A.; FitzGerald, R. J. Bioactive proteins, peptides and aminoacids from macroalgae. *Phycological Society of America*. 47:218-232, 2011.

Hassan, M.; Watari, H.; AbuAlmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*. 2014.

Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776, 2000.

Heo, S. J.; Park, E. J.; Lee, K.W.; Jeon, Y. J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 96(14): 1613-1623, 2005.

Hill, M.J.; Morson, B.C.; Bussey, H.J. A etiology of adenoma-carcinoma sequence in large-bowel. *The Lancet*. 1:245-7, 1978.

Hoseinifar, S. H.; Yousefia, S.; Capillob, G.; Paknejada, H.; Khalilic, M.; Tabarraeie, A.; Van Doand, H.; Spanòb, N.; Faggiob, C. Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis* powder. *Fish and Shellfish Immunology*. 83: 232–237, 2018.

Hudler P. Genetic aspects of gastric cancer instability. *Scientific World Journal*. 761909, 2012.

Huovinem, P. & Gomez, I. Photosynthetic characteristics and UV stress tolerance of Antarctic seaweeds along the depth gradient. *Polar Biology*. 36: 1319–1332, 2013.

Huxley, R. R.; Ansary-Moghaddam, A.; Clifton, P.; Czernichow, S.; Parr, C. L.; Woodward, M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal

cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer*. 125(1):171-80, 2009.

Hyun, J. H.; Kim, S. C.; Kang, J. I.; Kim, M. K.; Boo, H. J.; Kwon, J. M.; Koh, Y. S.; Hyun, J. W.; Park, D. B.; Yoo, E. S.; Kang, H. K. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 32(10): 1760-4, 2009.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas e incidências do câncer no Brasil (2012) Disponível on line em:<www.inca.gov.br/estimativa> Acesso em: 10 de maio 2018.

Ikeguchi, M.; Yamamoto, M.; Arai, Y.; Maeta, Y.; Ashida, K.; Katano, K.; Miki, Y.; Kimura, T. Fucoidan reduces the toxicities of chemotherapy for patients with unresectable advanced or recurrent colorectal cancer. *Oncology Letters*. 2: 319-322, 2011.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61: 69–90, 2011.

Ji, Y. B.; Ji, C. F.; Yue, L. Study on human promyelocytic leukemia HL-60 cells apoptosis induced by fucosterol. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 24: 845–851, 2014.

Jin, Y.; Qiu, S.; Shao, N.; Zheng, J. Fucoxanthin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically promotes apoptosis of human cervical cancer cells by targeting PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Medical Science Monitor*. 24: 11–18, 2018.

Khan, M. K.; Abert-Vian, M.; Fabiano-Tixer, A. S.; Dangles, O.; Chemat, F. Ultrasond-assisted extraction of polyphenols (flavonone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 119(2): 851-858, 2010.

Khanavi, M.; Gheidarloo, R.; Sadati, N.; Ardekani, M. R. S.; Nabavi, S. M. B.; Tavajohi, S.; Ostad, S. N. Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of marine algae against breast and colon carcinoma cell line. *Pharmacognozy Magazine*. 8(29): 60-64, 2012.

Kim, E.J.; Park, S.Y.; Lee, J.Y.; Park, J.H. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterology*. 10: 96, 2010.

Kris-Etherton, P. M.; Griel, A. E.; Psota, T. L.; Gebauer, S. K.; Zhang, J.; Etherton, T. D. Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: Intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids*. 40: 1193–1200, 2005.

Kumar, M.; Gupta, V.; Trivedi, N.; Kumari, P.; Bijo, A.J.; Reddy, C.R.K.; Jha, B. Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Environ. Exp. Bot* . 72: 194–201, 2011.

Li, X. L.; Zhou, J.; Chen, Z. R.; Chng, W. J. P53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*. 21: 84-93, 2015.

Lima, M. V. (2014). Processos de extração de amburosídeo da casca do caule de cumaru (*Amburana cearensis*). *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Brasil.

Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Wilson, I. D. Directly coupled HPLC–NMR and HPLC–NMR–MS in pharmaceutical research and development. *Journal of Chromatography*. 748: 233–258, 2000.

Lopes-Costa, E.; Abreu, M.; Gargiulo, D.; Rocha, E.; Ramos, A. A. Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 80: 776-787, 2017.

Lu, Y. C.; Lee, Y. R.; Liao, J. D.; Lin, C. Y.; Chen, Y. Y.; Chen, P. T; Tseng, Y. S. Reversine induced multinucleated cells, cell apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer cells. *Plos One*. 11(7): e0158587, 2016.

Luo, F.; Gu, J.; Chen, L.; Xu, X. Systems pharmacology strategies for anticancer drug discovery based on natural products. *Molecular BioSystems*.10: 1912-1917, 2014.

Machado, F. L. S.; Kaiser, C. R.; Costa, S. S.; Gestinari, L. M.; Soares, A. R. Revista Brasileira de Farmacognosia. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(3): 441-452, 2010.

Magalhães, K. D.; Costa, L. S.; Fidelis, G. P.; Oliveira, R. M.; Nobre, L. T. D. B.; Danta-Santos, N.; Camara, R. B. G.; Albuquerque, I. R. L.; Cordeiro, S. L.; Sabri, D. A.; Costa, M. S. S.; Alves, L. G.; Rocha, H. A. O. Anticoagulant, antioxidant and antitumor activities of heterofucans from the seaweed *Dictyopteris delicatula*. *International Journal of Molecular Sciences*. 12:3352-3365, 2011.

Mahmoud, A. M.; Ehab, M. A.; El-Derby, A. M.; Abdella, E. M. Protective Effects of *Turbinaria ornata* and *Padina pavonia* against Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis through Modulation of PPAR Gamma, NF-κB and Oxidative Stress. *Phytotherapy Research*. 29(5):737-48, 2015.

Markowitz, S.D.; Bertagnolli, M.M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 361:2449–2460, 2009.

Marinho-Soriano, E.; Pinto, E.; Yokaya, N. S.; Colepicolo, P.; Teixeira, V. L.; Yoneshigue-Valentin, Y. New insights on algal products and bioprospection in Brazil. pharmaceutical, cosmetic and public health applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 22(4), 2012.

Martín, R. P. M. (2014). Identificación y cuantificación del ADN nuclear de algas antárticas. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Produtos Naturais, Biologia Vegetal e Edafologia. Faculdade de Farmácia, Universidade de Barcelona.

Martins, R.M., Nedel, F., Guimarães, V.B.S., da Silva, A.F., Colepicolo, P., Pereira, C.M.P. and Lund, R.G. Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial and anticancer potential. *Frontiers in Microbiology*, 9: 412, 2018.

Maruthupandian, A.; Mohan, V. R. GC-MS analysis of some bioactive constituents of *Pterocarpus marsupium* Roxb. *Chemistry and Chemical Technology*. 3(3): 1652-1657, 2005.

Miller, J.R.; Moon, R.T. Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes & Development*. 10:2527-39, 1996.

Morin, P.J.; Sparks, A.B.; Korinek, V.; Barker, N.; Clevers, H.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Activation of beta-catenin- Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 275:1787-90, 1997.

Moussavou, G.; Kwak, D. H.; Obiang-Obonou, B. W.; Maranguy, C. A. O.; Dinzouna-Boutamba, S. D; Lee, D. H.; Pissibanganga, O. G. M.; Ko, K.; Seo, J. I.; Choo, U. Y. K. Anticancer Effects of Different Seaweeds on Human Colon and Breast Cancers. *Marine Drugs*. 12: 4898-4911, 2014.

Munemitsu, S.; Albert, I.; Souza, B.; Rubinfeld, B.; Polakis, P. Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:3046-50, 1995.

Murphy, K. M.; Ranganathan, V.; Farnsworth, M. L.; Kavallaris, M.; Lock, R. B. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death & Differentiation*. 7:102-111, 2000.

Murray, P. M.; Moane, S.; Collins, C.; Beletskaya, T.; Thomas, O. P.; Duarte, A. W. F.; Nobre, F. S.; Owoyemi, I. O.; Pagnocca, F. C.; Sette, L. D.; McHugh, E.; Causse, E.; Pérez-López, P.; Feijoo, G.; Moreira, M. T.; Rubiolo, J.; Leirós, M.; Botana, L. M.; Pinteus, S.; Alves, C.; Horta, A.; Pedrosa, R.; Jeffryes, C.; Agathos, S. N.; Allewaert, C.; Verween, A.; Vyverman, W.; Laptev, I.; Sineoky, S.; Bisio, A.; Manconi, R.; Ledda, F.; Marchi, M.; Pronzato, R.; Walsh, D. J. Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. *New Biotechnology*. 30(6): 839-850, 2013.

Nguyen, H.T.; Duong, H.Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology Letters*. 16(1):9-18, 2018.

Nicholson D. W.; Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*. 22:229-306, 1997.

Nigam, A.K.; Savage, F.J.; Boulos, P.B.; Stamp, G.W. , Liu, D.; Pignatelli, M. Loss of cell-cell and cellmatrix adhesion molecules in colorectal câncer. *British Journal of Cancer*. 68:507-14, 1993.

Oki, E.; Ando, K.; Nakanishi, R.; Sugiyama, N.; Nakashima, Y.; Kubo, N.; Kudou, K.; Saeki, H.; | Nozoe, T.; Emi, Y.; Maehara, Y. Recent advances in treatment for colorectal liver metastasis. *Annals of Gastroenterical Surgery*. 2:167–175, 2018.

Okuzumi, J.; Nishino, H.; Murakoshi, M.; Iwashima, A.; Tanaka, Y.; Yamane, T.; Fujita, Y.; Takahashi, T. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-Myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Letters*. 5(1): 75-81, 1990.

Olson, J. Antarctica: a review of recent medical research. *Trends in Pharmacological Sciences*. 23(10), 2002.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível on line em:<
<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 22 de maio 2018.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Traditional medicine. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> . Acesso em: 30 de maio de 2018.

Paim, J.; Travassos, C.; Almeida, C.; Bahia, L.; Macinko, J. The Brazilian health system: history, advances, and challenges. *The Lancet*. 377(9779):1778–1797, 2011.

Park, H. Y.; Park, S.; Jeong, J.; Yoon, D.; Han, M. H.; Lee, D.; Choi, G.; Yim, M.; Lee, J. M.; Kim, D.; Kim, G.; Choi, I.; Kim, S.; Kim, H.; Cha, H.; Choi, Y. H. Induction of p53-independent apoptosis and G1 cell cycle arrest by fucoidan in HCT116 human colorectal carcinoma cells. *Marine Drugs*. 15:154, 2017.

Parsons, R.; Myeroff, L. L.; Liu, B.; Wilison, J. K. V.; Markowitz, S. D.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II recept gene in colorectal cancer. *Cancer Research*.1;55(23):5548-50, 1995.

Peinado, M.A.; Malkhosyan, S.; Velazquez, A.; Perucho, M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:10065-9, 1992.

Penna, L. S.; Henriques, J. A. P.; Bonatto, D. Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacology & Therapeutics*. 173:67-82, 2017.

Perez, R.O.; Proscurshim, I.; Julião, G.; Pícolo, M.; Gama-Rodrigues, J.; Habr-Gama, A. Instalação e resultados preliminares de programa de rastreamento populacional de câncer colorretal em município brasileiro. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. 21 (1), 12–15, 2008.

Perin, D. M.; Saraiya, M.; Thompson, T. D.; de Moura, L.; Simoes, E. J.; Parra, D. C.; Brownson, R. C. Providers' knowledge, attitudes, and practices related to colorectal cancer control in Brazil. *Preventive Medicine*. 81:373-9, 2015.

Petros, A. M.; Olejniczak, E. T.; Fesik, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1644:83-94, 2004.

Pino, M.S.; Chung, D.C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*.138:.2059–2072, 2010.

Pinteus, S.; Silva, J.; Alves, C.; Horta, A.; Fino, N.; Rodrigues, A. N.; Mendes, S.; Pedrosa, R. Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). *Food Chemistry*. 1(218): 591-599, 2017.

Plaza, M.; Santoyo, S.; Jaime, L.; Garcia-Blairsy, Reina, G.; Herrero, M.; Senorans, F. J.; Ibanez, E. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51(2):450-455, 2010.

Plati, J.; Bucura, O.; Khosravi-Fara, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology (Camb)*. 3(4): 279–296, 2011.

Pistritto, G.; Trisciuglio, D.; Ceci, C.; Garufi, A.; D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 8(4): 603-19, 2016.

Pujol, C. A.; Ray, S.; Ray, B.; Damonte, E. B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51(4): 412-416, 2012.

Radogna, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochemical Pharmacology*. 94: 1-11, 2015.

Raja, R.; Hemeaiswarya, S.; Kumar, N. A.; Shidhar, S.; Rengasamy, R. A. Perspective on the biotechnological potential of algae. *Critical Reviews in Microbiology*. 34: 77-88, 2008.

Rodrigues, M. V.; Rehder, V. L. G.; Sartoratto, A.; Boaventura Júnior, S.; Santos, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. *MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais*. 7, 2014.

Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M. Effects of Epicholesterol on the Phosphatidylcholine Bilayer: A Molecular Simulation Study Dietary Stearic Acid and Risk of Cardiovascular Disease: Intake, Sources, Digestion, and Absorption. *Biophysical Journal*. 84: 1818–1826, 2003.

Rohenkohl, C. C.; Carniel, A. P.; Colpo, E. Antioxidant consumption during chemotherapy treatment. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*. 24(2): 107-112, 2011.

Rubinfeld, B.; Souza, B.; Albert, I.; Müller, O.; Chamberlain, S.H.; Masiarz, F.R.; Munemitsu, S.; Polakis, P. Association of the APC gene product with β -catenin. *Science*. 262:1731-4, 1993.

Rwigemera, A.; Mamelona, J.; Martin, L.J. Comparative effects between fucoxanthinol and its precursor fucoxanthin on viability and apoptosis of breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Anticancer Research*. 35(1): 207-19, 2015.

Safa, A. R.; Pollok, K. E. Targeting the anti-apoptotic protein c-FLIP for cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 3(2):1639–71, 2011.

Salvesen, G. S.; Walsh, C. M. Functions of Caspase 8: the Identified and the Mysterious. *Seminars Immunology*. 26(3): 246–252, 2014.

Santos, F.P.S.; Cotti, G.C.C.; Sebastianes, F.M.; Habr-Gama, A.; Seid, V.E.; Martino, R.B. Genética do câncer colorretal. *Revista de Medicina (São Paulo)*. 79(2/4): 45-64, 2000.

Satomi, Y. Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid. *Anticancer Research*. 37: 1557-1562, 2017.

Sasidharan, S.; Chen, Y.; Saravanan, D.; Sundram, K. M.; Latha, L. Y. Extraction isolation and characterization of bioactive compounds from plant's extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 8(1):1-10, 2011.

Senthilkumar, K.; Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Kim, S.-K. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 60: 366–374, 2013.

Schmidt, M.I.; Duncan, B.B.; Menezes, A.M.; Monteiro, C.A.; Barreto, S.M.; Chor, D.; Menezes, P.R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *The Lancet*. 377 (9781):1949–1961, 2011.

Sherr, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*. 60:3689-3698, 2000.

Shi, Y.; Hata, A.; Lo, R. S.; Massagué, J.; Pavletich, N. P. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature*. 388: 87-93, 1997.

Shirsath, S. R.; Sonawane, S. H.; Gogate, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – a review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 53: 10-23, 2012.

Sies, 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215: 213-219, 1993.

Souza, D. L.; Jerez-Roig, J.; Cabral, F. J.; de Lima, J. R.; Rotalira, M. K.; Costa, J. A. Colorectal cancer mortality in Brazil: predictions until the year 2025 and cancer control implications. *Diseases of the Colon & Rectum*. 57(9):1082-9, 2014.

Stanczak, A.; Stec, R.; Bodnar, L.; Olszewski, W.; Cichowicz, M.; Kozłowski, W.; Szczylik, C.; Pietrucha, T. Wieczorek M and Lamparska Pzybysz M: Prognostic significance of Wnt 1, β catenin and E cadherin expression in advanced colorectal carcinoma. *Pathology & Oncology Research*. 17: 955-963, 2011.

Stein, E. M.; Andregueti, D. X.; Rocha, C. S.; Fujii, M. T.; Baptista, M. S.; Colepicolo, P.; Indig, G. L. Search for cytotoxic agents in multiple Laurencia complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean with emphasis on the Brazilian State of Espírito Santo *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21(2): 239-243, 2011.

Tang, K. D.; Ling, M. T. Targeting drug-resistant prostate cancer with dual PI3K/mTOR inhibition. *Current Medicinal Chemistry*. 21(26):3048–56, 2014.

Tarhouni-Jabberi, S.; Zakraoui, O.; Ioannou, E.; Riahi-Chebbi, I.; Haoues, M.; Roussis, V.; Kharrat, R.; Essafi-Benkhadir, K. Mertensene, a Halogenated Monoterpene, Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Caspase Dependent Apoptosis of Human Colon Adenocarcinoma HT29 Cell Line through the Modulation of ERK-1/-2, AKT and NF- κ B Signaling. *Marine Drugs*. 15(7), 2017.

Terasaki, M.; Kavagoe, C.; Ito, A.; Kumon, H.; Narayan, B.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Spatial and seasonal variations in the biofunctional lipid substances (fucoxanthin and fucosterol) of the laboratory-grown edible Japanese seaweed (*Sargassum horneri* Turner) cultured in the open sea. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24(7): 1475-1482, 2017.

Tsang, A.H.; Cheng, K.H.; Wong, A.S.; Ng, S.S.; Ma, B.B.; Chan, C.M.; Tsui, N.B.; Chan, L.W.; Yung, B.Y.; Wong, S.C. Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. *World Journal of Gastroenterology*. 20:3847–3857, 2014.

Vardanega, R.; Santos, D. T.; Meireles, A. A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacognosy Reviews*. 8(16): 88-95, 2014.

Vidotti, E. C.; Rollenberg, M. C.E. Algas: da Economia dos Ambientes Aquáticos à Biorremediação e Química Analítica. *Química Nova*. 27(1): 139-145, 2004.

Vigil, D.; Cherfils, J.; Rossman, K. L.; Der, C. J. Ras superfamily GEFs and GAPs: Validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*. 10: 842-857, 2010.

Vijan, S.; Inadomi, J.; Hayward, R.A.; Hofer T.P.; Fendrick, A.M. Projections of demand and capacity for colonoscopy related to increasing rates of colorectal cancer screening in the United States. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 20(5):507-15, 2004.

U.S. Geological Survey - Landsat Image Mosaic of Antarctica (LIMA) – Disponível em: <http://lima.usgs.gov/>. In: <https://www.centropolar.com/>. Acesso em: <15 de maio de 2018>.

Wang, L.; Li, X. X.; Chen, Z. H. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 44:211–214, 2009.

Wiencke, C. & Clayton, M.N. (2002). *Biology of Antarctic Seaweeds*. A.R.G Gantner Verlag KG, Liechtenstein.

Wiencke, C.; Gómez, I.; Dunton, K. Phenology and seasonal physiology performance of polar seaweeds. *Botanica Marina*. 52: 585-592, 2009.

Wiencke, C. (2011). *Biology of polar benthic algae*. De Gruyter. Berlín, New York.

Yamamoto, K.; Ishikawa, C.; Katano, H.; Yasumoto, T.; Mori, N. Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer Letters*. 28;300(2): 225-34, 2011.

Yoshie, Y., Wang, W., Hsieh, Y.P. and Suzuki, T. Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*. 88, 21-24, 2002.

Yu, R. X.; Hu, X. M.; Xu, S.Q.; Jiang, Z. J.; Yang, W. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway. *European Journal of Pharmacology*. 657(1-3): 10-19, 2011.

Zandoná, B.; Carvalho, L. P; Schimedt,J.; Koppe, D. C.; Koshimizu, R. T; Mallman, A. F. M. Prevalence of colorectal adenomas in patients with family history of colorectal cancer. *Revista Brasileira Coloproctologia*. 31(2): 147-154, 2011.

Zarchy, T.M.; Ershoff, D. Risk of colorectal cancer in families of patients with adenomatous polyps. *The New England Journal of Medicine*. 334(20):1339-40, 1996.

ANEXOS

Anexo I

Macroalga antártica *I. cordata* incrustada na rochas no ambiente antártico (A) e vista geral do talo (B)



Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil - PhD. Mutue Toyota Fujii e PhD Nair S. Yokoya

Anexo II

Macroalga antártica *D. anceps* no ambiente antártico.



Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil - PhD. Mutue Toyota Fujii e PhD Nair S. Yokoya.

Anexo III

Macroalga antártica *C. jacquinotii* no ambiente antártico (A) e detalhe do talo (B).



Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brasil - PhD. Mutue Toyota Fujii e PhD Nair S. Yokoya.