

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção



Dissertação

**Macroalgas de Shetland do Sul – Antártica: Perfil de
ácidos graxos e potencial citotoxicidade em linhagens
celulares de tumor de mama**

Bruna Silveira Pacheco

Pelotas, 27 de Fevereiro de 2015

Bruna Silveira Pacheco

Macroalgas de Shetland do Sul – Antártica: Perfil de ácidos graxos e potencial citotoxicidade em linhagens celulares de tumor de mama

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Bioquímica).

Orientador: Claudio Martin Pereira de Pereira

Co-orientador: Tiago Veiras Collares

Pelotas, 27 de Fevereiro de 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P116m Pacheco, Bruna Silveira

Macroalgas de Shetland do Sul - Antártica : perfil de ácidos graxos e potencial citotoxicidade em linhagens celulares de tumor de mama / Bruna Silveira Pacheco ; Claudio Martin Pereira de Pereira, orientador ; Tiago Veiras Collares, coorientador. — Pelotas, 2015.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Antártica. 2. Macroalgas. 3. Ácidos graxos poli-insaturados. 4. Câncer de mama. I. Pereira, Claudio Martin Pereira de, orient. II. Collares, Tiago Veiras, coorient. III. Título.

CDD : 589.3

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Macroalgas de Shetland do Sul – Antártica: Perfil de Ácidos Graxos e potencial citotoxicidade em linhagens celulares de tumor de mama

elaborada por
Bruna Silveira Pacheco

Como requisito à obtenção do título de **Mestre em Ciências**
(Área do conhecimento: **Bioquímica e Bioprospecção**)

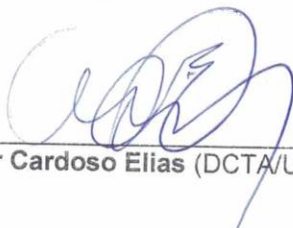
Banca Examinadora



Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira (PPGBBio/CCQFA) – PRESIDENTE



Profa. Dra. Izabel Cristina Custodio de Souza (PPGBBio/CCQFA)



Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias (DCTA/UFPel)

Pelotas, 2015

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida e por me permitir chegar até aqui com mente e alma tranquilas.

Aos meus pais, Victor e Márcia, pelo incentivo e amor incondicionais, sempre presentes em todos os momentos de minha vida. Com certeza, sem o carinho e apoio de vocês, nada disso seria possível.

Ao meu irmão, Vinícius, por estar sempre ao meu lado com uma palavra amiga e me fazendo sorrir, tornando meus dias mais alegres.

Ao meu noivo, Rodrigo, pelo companheirismo ao longo desta caminhada, pelo apoio e incentivo em todos os momentos e pela compreensão durante os períodos de ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio M. P. Pereira, pelo apoio e confiança ao longo destes anos de trabalho. Obrigada pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Continuaremos na caminhada durante o doutorado.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Tiago Collares e seu grupo de pesquisa, GPO, pela carinhosa acolhida às “gurias das algas”.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo, coordenador do projeto de Monitoramento Antártico / PROANTAR, pela oportunidade e confiança em me permitir participar desse grande projeto.

À Profa. Dra. Franciane Pellizzari e aos amigos Helena, César, Michelle e Erik pela amizade e parceria ao longo de nossa permanência a bordo do “Tio Max”.

À minha grande amiga Camilinha, obrigada pelo companheirismo e amizade tanto no laboratório, quanto em nossos momentos de lazer.

À amiga Rosi, por toda a ajuda e companheirismo durante a realização desse trabalho, inclusive aos finais de semana. Obrigada pelos momentos de risadas e descontração.

À Eduarda Schultze, por toda a ajuda e ensinamentos, fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

Aos amigos do Laboratório de Lipidômica e Bio-Orgânica, Carol, Marina, Marco, Carapina, Giulia, Bruninho, Silvana e Vanderléia pelo agradável convívio, troca de experiências e momentos de lazer.

Aos professores do curso por compartilharem seus conhecimentos.

A todos os colegas do Mestrado pela boa convivência durante as disciplinas.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Wilson Cunico, e ao Christian M. Geisler, secretário do curso, pela atenção e presteza.

Aos professres Dra. Izabel Cristina Custodio de Souza e Dr. Moacir Elias Cardoso pela disponibilidade e colaboração em avaliar esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos, muito obrigada!

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.”

Henry Poincaré

PARTE I

Resumo

PACHECO, Bruna Silveira. **Macroalgas de Shetland do Sul – Antártica: Perfil de ácidos graxos e potencial citotoxicidade em linhagens celulares de tumor de mama.** 2015. 76f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Macroalgas são produtoras de uma grande variedade de compostos com potencial atividade biológica, dentre os quais destacam-se os ácidos graxos. O continente antártico apresenta grandes agregações de macroalgas, porém, em pequena variedade de espécies quando comparada à regiões tropicais. Apesar disso, a caracterização química destas algas ainda é pouco estudada, bem como as suas implicações biológicas. Neste estudo, o perfil de ácidos graxos de quatro macroalgas da Antártica coletadas em ilhas do Arquipélago Shetland do Sul foram analisados utilizando-se Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama e sua potencial citotoxicidade em linhagens celulares de câncer de mama foi avaliada. Do extrato lipídico, um total de 23 ácidos graxos foram identificados, entre estes 9 saturados, 5 monoinsaturados e 9 poli-insaturados. Dentre os nossos resultados, destacam-se os significativos valores de ácidos graxos poli-insaturados, com valores que variaram entre 61,04 e 70,79 % do total de ácidos graxos. Com relação à avaliação da citotoxicidade, nossos resultados demonstraram que ácidos graxos induzem à inibição do crescimento nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 com concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após 48 horas de tratamento. Dentre as macroalgas estudadas, acreditamos que *Adenocystis utricularis* e *Sarcothalia papillosa* foram as espécies que apresentaram potencial citotoxicidade em linhagens tumorais de mama.

Palavras-chave: Antártica, Macroalgas, *Adenocystis utricularis*, *Sarcothalia papillosa*, *Curdiea racovitzae*, *Georgiella confluens*, Ácidos graxos poli-insaturados,, Câncer de mama

Abstract

PACHECO, Bruna Silveira. **Macroalgas de Shetland do Sul – Antártica: Perfil de ácidos graxos e potencial citotoxicidade em linhagens celulares de tumor de mama.** 2015. 76f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Macroalgae are important source of compounds with biological activities, such as fatty acids. The Antarctic continent has large aggregations of macroalgae, however, in a little variety compared to tropical regions. Nevertheless, Antarctic macroalgae are poorly studied, specially with regard to its bioactivities. In this study, the fatty acid profile of four Antarctic macroalgae collected from in South Shetland Islands were analyzed by gas chromatography flame ionization detector and their potential cytotoxicity against breast cancer cell lines was evaluated. A total of 23 fatty acids were detected, of which 9 were saturated, 5 were monounsaturated and 9 were polyunsaturated fatty acids. The most notable result found in this study was the vast identification of PUFA, with values ranging from 61.04% to 70.79%. Furthermore, fatty acids of some macroalgae induce the growth inhibition in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells with concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ after 48 hours of treatment. The mechanism of cell death was assessed, demonstrating a possible death by apoptosis. We found that both the *Adenocystis utricularis* and *Sarcothalia papillosa* macroalgae have fatty acids that deserve to more studies about the potential cytotoxicity of these compounds.

Keywords: Antarctic macroalgae, poly-unsaturated fatty acid (PUFA), *Adenocystis utricularis*, *Sarcothalia papillosa*, *Curdiea racovitzae*, *Georgiella confluens*, Breast cancer

Lista de Figuras

Figura 1. Número acumulativo de produtos naturais identificados nos diferentes filos de macroalgas entre os anos de 1965 e 2012.....	19
Figura 2. Continente Antártico, Arquipélago Shetland do Sul.....	20
Figura 3. Macroalga <i>Adenocystis utricularis</i>	23
Figura 4. Macroalga <i>Sarcothalia papillosa</i>	24
Figura 5. Macroalga <i>Curdiea racovitzae</i>	25
Figura 6. Macroalga <i>Georgiella confluens</i>	26
Figura 7. Ácido docosahexaenoico (22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)); Nomenclatura de ácidos graxos indicando a numeração a partir do carbono ômega.....	27
Figura 8. Comparação entre as vias de síntese de ácidos graxos em mamíferos e algas.....	29
Figura 9. Esquema geral dos componentes de um cromatógrafo gasoso	30

Lista de Tabelas

Tabela 1. Compostos com atividade antitumoral derivados de produtos naturais marinhos em fase de estudo clínico.	33
--	----

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido araquidônico
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
DHA	Ácido docosahexaenoico (<i>Docosahexaenoic acid</i>)
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
EPA	Ácido eicosapentaenoico (<i>Eicosapentaenoic acid</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
<i>n</i> -3	Ômega-3
<i>n</i> -6	Ômega-6
OMS	Organização Mundial da Saúde
PN	Produto Natural
PNMs	Produtos Naturais Marinhos
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
Objetivo Geral	17
Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
Macroalgas	18
Considerações Gerais	18
Antártica.....	19
Macroalgas da Antártica	21
Caracterização e Classificação das espécies <i>Adenocystis utricularis</i> , <i>Sarcothalia papillosa</i> , <i>Curdiea racovitzae</i> e <i>Georgiella confluens</i>	22
Macroalga <i>Adenocystis utricularis</i> (Bory de Saint-Vincent) Skottsberg.....	22
Macroalga <i>Sarcothalia papillosa</i> (Bory de Saint-Vincent) Leister.233.1.3.1.3	
Macroalga <i>Curdiea racovitzae</i> Hariot.....	24
3.1.3.1.4 Macroalga <i>Georgiella confluens</i> (Reinsch) Kylin	25
Ácidos Graxos.....	26
Biossíntese de Ácidos Graxos	28
Identificação de ácidos graxos.....	29
Câncer	31
Ácidos Graxos e Câncer	33
4 ARTIGO CIENTÍFICO	36
5 CONCLUSÃO.....	65
6 REFERÊNCIAS.....	66

PARTE II

1 INTRODUÇÃO

O continente Antártico é caracterizado por uma baixa biodiversidade, devido à sua isolamento geográfica e condições abióticas extremas. Macroalgas são organismos capazes de adaptarem-se a estas condições. Apenas 130 espécies de macroalgas foram identificadas na Antártica (WULFF et al., 2009), as quais estão em maior quantidade distribuídas na Península Antártica (WIENCKE e AMSLER, 2011). Algas são um grupo polifilético de organismos fotossintéticos, dividido em três principais filos: Ocrophyta, Chlorophyta e Rhodophyta. Através de sua capacidade de adaptação, algas podem apresentar uma grande variedade de compostos que não são produzidos por outros organismos, como florotaninos e alguns polissacarídeos específicos (BROWN et al., 2014). Moléculas obtidas de algas vem sendo largamente estudadas, destacando-se os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega-3 (*n*-3 AGPI). Além disso, outras substâncias com potencial econômico podem ser sintetizados por algas, como esteroides, carotenoides, polissacarídeos, lecitinas, aminoácidos tipo micosporina, compostos halogenados (CARDOZO et al., 2007). Apesar da grande variedade de compostos que podem ser encontrados em macroalgas da Antártica, elas ainda são pouco estudadas, principalmente no que diz respeito à seus constituintes e respectiva atividade biológica.

Nesse contexto, os produtos naturais marinhos (PNMs) representam uma importante fonte de novas moléculas. Atualmente, mais de 22000 moléculas oriundas do ambiente marinho já foram reportadas na literatura (PETIT e BIARD, 2013). Estudos mostram que PNM's podem apresentar uma grande variedade de atividades biológicas, como antibacteriana, antidiabética, antifúngica, anti-inflamatória, antiprotzoária, antituberculósica, antiviral e anticâncer (FROZZA et al., 2013; BEGNINI et al., 2014; GAMBATO et al., 2014).

Destas, a atividade anticâncer vem sendo amplamente estudada, uma vez que o câncer é uma das maiores causas de morte em todo o mundo. Em 2012, aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer foram reportadas (WHO, 2015). Além disso, mais de 20 milhões de novos casos são esperados até o ano de 2025 (FERLAY et al., 2015). O câncer de mama, tumor maligno com início nas células mamárias, é o tipo de câncer mais prevalente em mulheres em todo o mundo. O tratamento do câncer de mama inclui procedimentos cirúrgicos, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia. Na busca por novas alternativas para o tratamento do câncer, PNM's, em especial as algas,

são promissoras fontes de pesquisa para o desenvolvimento de novas moléculas (ASTORG, 2004; GERBER, 2012; MURRAY, 2014). O efeito dos *n*-3 e *n*-6 AGPIs contra o câncer de mama já foi evidenciado em estudos *in vitro* e *in vivo*, e múltiplos mecanismos de atuação já foram propostos, entre eles: supressão da transformação neoplásica, inibição do crescimento celular, aumento da apoptose e inibição da produção de eicosanoides derivados de *n*-6 (ROSE e CONNOLLY, 1999; TERRY et al., 2004). Além disso, ácidos graxos podem também potencializar a eficácia da radioterapia e também de diversos fármacos (HARDMAN, 2004). Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo a determinação do perfil ácido graxo de macroalgas Antárticas e avaliação da potencial citotoxicidade destes compostos em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil de ácidos graxos e a atividade citotóxica destes compostos em células tumorais de mama de quatro espécies de macroalgas marinhas originárias da Antártica.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o perfil de ácidos graxos das macroalgas *Adenocystis utricularis*, *Sarcothalia papillosa*, *Curdiea racovitzae* e *Georgiella confluens* com a utilização de Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama;
- 2) Identificar a variação no perfil de ácidos graxos de macroalgas marinhas oriundas da Antártica;
- 3) Avaliar o efeito dos ácidos graxos em correlação com a viabilidade celular em linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MD-231) e não tumorais (CHO).

3 REVISÃO DE LITERATURA

Macroalgas

1) Considerações Gerais

Algas constituem um grupo polifilético, ou seja, organismos que não compartilham de origem comum, porém, possuem algumas características comuns. São organismos fotossintéticos presentes nos mais variados *habitats*, na forma microalgas unicelulares e macrófitas multicelulares, eucariontes ou procariotes. Desta forma, podem desenvolverem-se em ambientes extremos, frios ou quentes, mares, águas doces e solos úmidos. Sua importância dentro do ecossistema dá-se pelo fato de esses organismos atuarem como base da cadeia alimentar aquática (HARWOOD et al., 2009). De acordo com sua estrutura celular, as algas podem ser divididas em dois grupos, as procarióticas, representadas pelas cianobactérias (algas azuis), e as eucarióticas, onde enquadram-se as demais algas. Algas eucarióticas são classificadas de acordo com sua constituição de pigmentos, onde os maiores filos são Chlorophyta (algas verdes; contêm os pigmentos clorofilas a e b, carotenos e xantofilas), Ochrophyta (algas pardas; contêm os pigmentos fucoxantina, clorofilas a e c e carotenóides) e Rhodophyta (algas vermelhas; ficoeritrina, clorofilas a e d e carotenóides) (VIDOTTI et al., 2004; LEAL et al., 2013).

Devido à alta capacidade de adaptação das algas aos mais variados ambientes, estes organismos possuem capacidade de produzirem uma grande variedade de compostos não comuns em plantas terrestres, como florotaninos e alguns polissacarídeos (BROWN et al., 2014). Biomassa algal é altamente utilizada em diversos seguimentos, como indústria alimentícia, farmacêutica, cosméticos e biotecnológica, bem como na suplementação animal (MARINHO-SORIANO et al., 2011). Nos últimos 35 anos, com o avanço de técnicas espectrais, cerca de 13.000 novos compostos de algas foram identificados quanto à sua estrutura química (MARINHO-SORIANO et al., 2011).

Macroalgas são consideradas um importante grupo para o desenvolvimento de novos fármacos. Um total de 3129 produtos naturais (**Figura 1**) marinhos derivados de algas foram descobertos entre os anos de 1965 e 2012, sendo a maioria deles, derivados de macroalgas do filo Rodophyta (1658 produtos naturais

(PN) ou 53 % do total), seguidos pelo filo Ochrophyta (1213 PNs; 39% do total) e Chlorophyta (258 PNs; 8% do total) (LEAL et al., 2013).

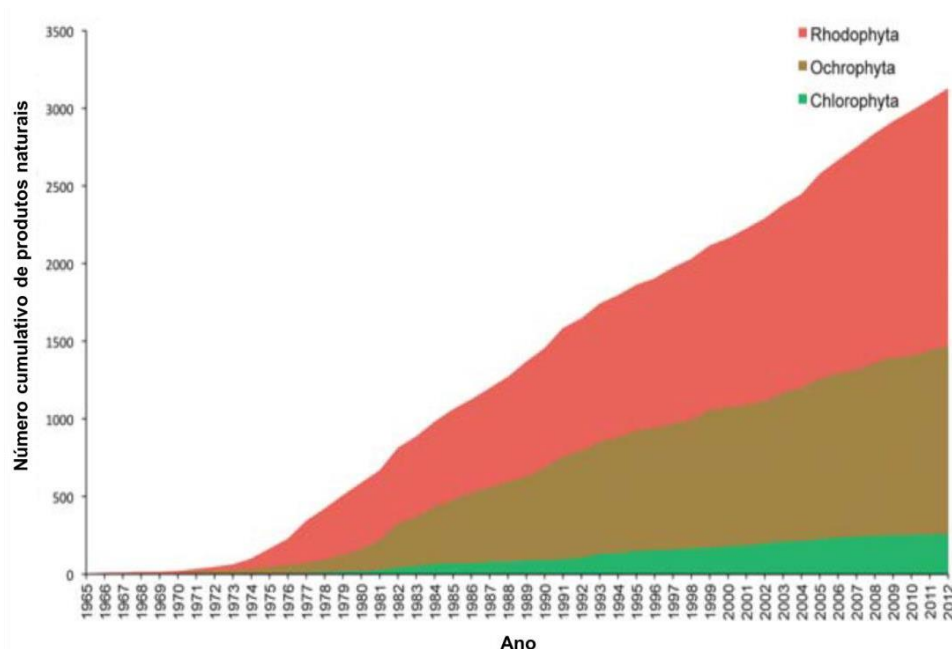


Figura 1. Número cumulativo de produtos naturais identificados nos diferentes filos de macroalgas entre os anos de 1965 e 2012.

Adaptado de: LEAL et al., 2013.

Dentre os compostos produzidos pelas algas, alguns destacam-se devido à sua grande aplicação e já conhecidas atividades, como os ácidos graxos. Sabe-se que algas são grandes produtoras de lipídeos de interesse comercial, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e -6, os quais apresentam importante papel na prevenção de doenças, como doenças cardíacas, neurológicas, autoimunes, inflamações e câncer (SIDDIQUI et al., 2007; BROWN et al. 2014). Algas de regiões frias, como a Antártica, apresentam uma produção elevada destes compostos, como resultado da adaptação a estes ambientes (GRAEVE et al., 2002).

2) Antártica

O continente antártico é o quinto maior em extensão, e o único onde inexistem divisões geopolíticas. Além disso, é o continente dos superlativos, ou seja, mais frio, mais seco, mais alto, mais ventoso, mais remoto, mais inexplorado e o mais preservado. A Antártica compreende um espaço territorial de aproximadamente

14 milhões Km², sendo 95 % deste território coberto por camadas de gelo que podem chegar à espessura de aproximadamente 2.000 metros (VIEIRA, 2006). Atualmente, é detentora de aproximadamente 90 % do gelo e 80 % da água doce do planeta. Com isso, as modificações climatológicas que ocorrem neste continente são refletidas nas circulações atmosférica e oceânica no Hemisfério Sul e na formação de água fria no fundo dos oceanos. O continente antártico está banhado pelos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico e está dividido em Antártica Oriental e Antártica Ocidental, a qual é constituída principalmente por arquipélagos, como o Shetland do Sul, constituído por 10 ilhas (**Figura 2**) (CANDE et al., 2000).

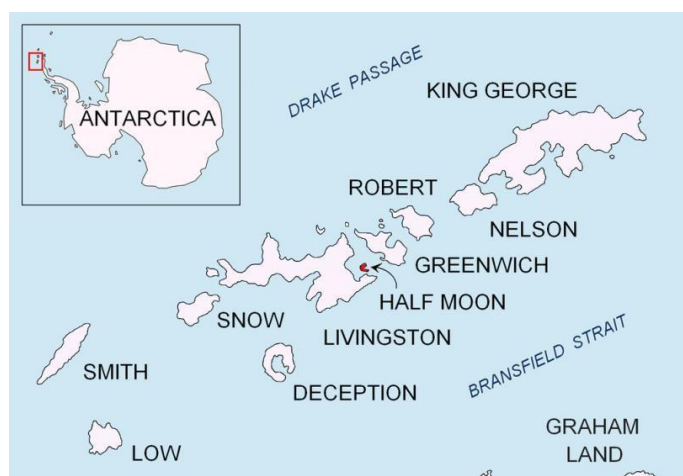


Figura 2. Continente Antártico, Arquipélago Shetland do Sul.

Fonte: www.snipview.com

Devido a estas condições extremas, os organismos que desenvolveram-se na Antártica tiveram que adaptar-se às condições extremas e houve o surgimento de novas espécies, que são encontradas somente neste continente. A Antártica é também considerada a região do planeta mais sensível às alterações globais, considerada um “laboratório vivo”, sendo os fenômenos naturais que lá ocorrem utilizados para esclarecer impactos ambientais observados em outros continentes (THOMAS e DIECKMANN, 2002).

A fim de preservar a fauna e flora existente, a vida no continente antártico é regida pelo Tratado da Antártica, o qual reúne diversos países e do qual o Brasil passou a fazer parte em 1982, ano em que começaram as atividades de pesquisa científica realizadas pelo país naquele continente, através da criação do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). Já em fevereiro de 1984, foi efetivada a

participação do Brasil na Antártica através da implantação de sua base científica, a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), localizada na Península Keller, Ilhas Shetlands do Sul, Baía do Almirantado, Ilha Rei George (PROANTAR, 2014).

3) Macroalgas da Antártica

Os organismos presentes nas regiões polares estão sujeitos a condições extremas, principalmente da temperatura e níveis de radiação ultravioleta. A capacidade de adaptação a esta forte sazonalidade é um dos pré-requisitos mais importantes para o desenvolvimento das algas, e algumas espécies conseguem reproduzir-se até mesmo durante o rigoroso inverno Antártico. Exemplos desta adaptação são demonstrados nas algas *Iridaea cordata* e *Palmaria decipiens*. Durante o inverno, *I. cordata* tem sua taxa de respiração aumentada através da mobilização de carboidratos. Já no período de verão, a atividade fotossintética serve como forma de armazenamento de carbono, e não como produção de biomassa. Já a macroalga *P. decipiens* degrada os pigmentos ficobilissomas e clorofila *a* durante o período de baixa exposição à luz e após 6 meses já não possui capacidade de fotossíntese, o qual é restabelecido após uma semana de exposição à luz (WIENCKE e AMSLER, 2011).

Uma das principais características dos ambientes polares é a baixa distribuição da flora, o que contrasta com regiões tropicais, onde a abundância de macroalgas é maior. Cerca de 130 espécies de algas já foram documentadas no continente antártico, destas, 35 % são endêmicas, ou seja, são encontradas somente neste local, o que torna este um ambiente tão rico e salienta a importância de estudar este continente (WULFF et al., 2009). Destas, 44 % das Heterokontophytas (*Phaeophyceae* e *Chrysophyceae*), 36 % das Rhodophytas e 18 % das Chlorophytas são endêmicas e este número cresce continuamente (HOMMERSAND et al., 2009). Esta diversidade está distribuída em maior parte na Península Antártica e em menor quantidade na região que compreende o Mar de Ross, a uma longitude de 77 ° S (WIENCKE e AMSLER, 2011).

Espécies endêmicas ecologicamente importantes incluem as algas pardas *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia anceps*, *D. menziesii*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Ascoseira mirabilis*, as algas vermelhas *Myriogramme manginii*, *Georgiella confluens*, *Phycodrys antarctica*, *Trematocarpus antarcticus*, *Palmaria*

decipiens, *Iridaea cordata*, *Pyropia endiviifolia*, entre outras (WIENCKE e AMSLER, 2011).

A distribuição das algas na Antártica está relacionada aos acontecimentos climatológicos que ocorrem no continente. Estudo recente revela que o aumento na temperatura registrado ao longo dos últimos 30 anos não foi responsável direto pela alteração da distribuição latitudinal das algas, o que ocorreu devido à mudanças na extensão e duração do gelo marinho (MÜLLER et al., 2009). Nesse sentido, houve uma diminuição considerável na biomassa e diversidade de algas encontradas historicamente ao longo da região sul da península Antártica, o que acredita-se, seja resultado do aumento da cobertura de gelo marinho que se move para o sul, fazendo com que algas típicas da região norte da península migrem para o sul (WIENCKE e AMSLER, 2011).

Caracterização e Classificação das espécies *Adenocystis utricularis*, *Sarcothalia papillosa*, *Curdiea racovitzae* e *Georgiella confluens*

Macroalga *Adenocystis utricularis* (Bory de Saint-Vincent) Skottsberg

A macroalga *A. utricularis* (**Figura 3**) apresenta-se de forma oval com alguns centímetros de comprimento, o qual diminui gradativamente em um cauloide cilíndrico. Aglomerados podem ocorrer nas regiões litoral e sublitoral, até a profundidade de 5 metros, ocorrendo raramente em águas mais profundas (até 20 m) (ZIENLINSKI, 1990).

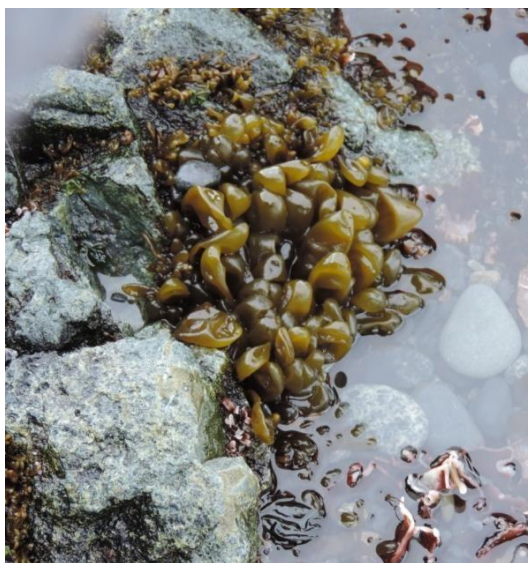


Figura 3. Macroalga *Adenocystis utricularis*

Identificação: Profa. Dra. F. Pellizzari / Universidade Estadual do Paraná

Classificação:	Filo:	Ochrophyta
	Classe:	Phaeophyceae
	Ordem:	Ectocarpales
	Família:	Adenocystaceae
	Gênero:	Adenocystis

Macroalga *Sarcothalia papillosa* (Bory de Saint-Vincent) Leister

A espécie *S. papillosa* (**Figura 4**) apresenta talo de forma variável e em geral, dicotomicamente ramificado. Ocorre principalmente na região sublitoral (HOMMERSAND et al., 1993).



Figura 4. Macroalga *Sarcothalia papillosa*

Identificação: Profa. Dra. F. Pellizzari / Universidade Estadual do Paraná

Classificação:	Filo:	Rhodophyta
	Classe:	Florideophyceae
	Ordem:	Gigartinales
	Família:	Gigartinaceae
	Gênero:	Sarcothalia

Macroalga *Curdiea racovitzae* Hariot

C. racovitzae (**Figura 5**) apresenta talo de forma variável, sua fixação ocorre através de rizoides e seu tamanho pode atingir aproximadamente 20-30 cm de diâmetro. Ocorre principalmente região sublitoral a aproximadamente 10 m de profundidade (ZIENLINSKI, 1990).



Figura 5. Macroalga *Curdiea racovitzae*

Identificação: Profa. Dra. Mutue Fujii / Instituto de Botânica de São Paulo

Classificação:	Filo:	Rhodophyta
	Classe:	Florideophyceae
	Ordem:	Gracilariales
	Família:	Gracilariaceae
	Gênero:	Curdiea

Macroalga *Georgiella confluens* (Reinsch) Kylin

G. confluens (**Figura 6**) apresenta talo de forma achatada, espesso e ramificado, atingindo aproximadamente 20 cm. Em geral, ocorre na região sublitoral (profundidades entre 5 e 60 m), sendo raramente encontrada em profundidades acima de 5 m (ZIENLINSKI, 1990; QUARTINO et al., 2005).



Figura 6. Macroalga *Georgiella confluens*

Identificação: Profa. Dra. F. Pellizzari / Universidade Estadual do Paraná

Classificação:	Filo:	Rhodophyta
	Classe:	Florideophyceae
	Ordem:	Ceramiales
	Família:	Wrangeliaceae
	Gênero:	Georgiella

4) Ácidos Graxos

Lipídeos são caracterizados por um grupo quimicamente diverso de compostos, porém, apresentam como característica em comum, sua insolubilidade em água, ou seja, são compostos apolares apresentando as mais variadas funções, como armazenamento de energia, estruturação de membrana, cofatores enzimáticos, pigmentos, hormônios, mensageiros intra e extracelulares, entre outros. Ácidos graxos são componentes de lipídeos de grande importância, pois esterificados ao glicerol (triglicerídeos) são uma forma essencial de armazenamento, além de serem componentes de lipídeos de membrana, como os fosfolipídeos e os glicolipídeos (NELSON e COX, 1995).

Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são classificados de acordo com a posição da primeira dupla no carbono oposto à carboxila. AGPIs *n*-3 são os ácidos

em que a primeira ligação dupla encontra-se no terceiro carbono em direção oposta à carboxila. Existem também os AGPI *n*-6 e *n*-9, onde a última ligação dupla encontra-se nos carbonos 6 e 9, respectivamente. Além disso, existe uma nomenclatura simplificada para ácidos graxos onde é especificado o número de carbonos e insaturações, separados por dois pontos. Para os ácidos graxos insaturados, também são demonstradas as posições das duplas ligações por números sobrescritos à letra grega delta (Δ). Por exemplo, o ácido palmítico não possui insaturações e contém 16 carbonos, sua representação é 16:0, enquanto o ácido oleico (18 carbonos, 1 insaturação entre os carbonos 9 e 10) é abreviado como 18:1(Δ^9). Na **Figura 7**, a nomenclatura dos ômegas é ilustrada através do ácido docosaheptaenoico (DHA).

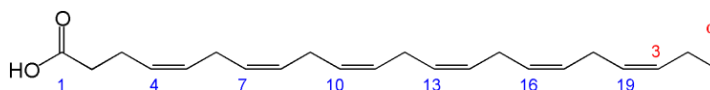


Figura 7. Ácido docosaheptaenoico (22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)); Nomenclatura de ácidos graxos indicando a numeração a partir do carbono ômega.

Ácidos graxos poli-insaturados da série dos ômegas são considerados importantes para o organismo humano por possuírem significativa aplicação farmacêutica e apresentarem inúmeros benefícios clínicos, como redução do risco de doenças cardíacas, redução de colesterol além de apresentarem resultado contra inflamações e diversos carcinomas (SIDDQUI et al., 2007; CHEN et al., 2007; SIMOPOULOS, 2008; PELLICCIA et al., 2012). Porém, Appolinário e colaboradores (2011), afirmam que a produção de ácidos graxos *n*-3 em organismos humanos é demasiadamente baixa, sendo por esse motivo considerados essenciais e devendo ser adicionados à dieta alimentar a fim de aumentar seus níveis no organismo.

Atualmente, os peixes marinhos são as maiores fontes comerciais de ácidos graxos poli-insaturados, contudo, de acordo com Bhosale e colaboradores (2009), existe uma grande preocupação em relação à qualidade da água onde estes peixes vivem, as quais podem conter toxinas lipossolúveis. Neste sentido, as algas veem surgindo como uma alternativa comercial para a produção de lipídeos, devido à possibilidade de produção em larga escala em condições controladas e sua facilidade de reprodução, pois possuem a capacidade de triplicar ou quadruplicar sua biomassa diariamente (KUMARI et al., 2010). Aliado a isso, a engenharia genética

vem sendo vastamente utilizada para obter modificações nas vias de produção de lipídeos, a fim de aumentar a produção destes compostos, bem como produzir lipídeos de maior interesse comercial (YU et al., 2011). Por apresentarem diversos benefícios à saúde humana, os ácidos graxos poli-insaturados de maior importância para o organismo são, o *n*-6 ácido araquidônico (AA) 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$) e os *n*-3 ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$) e ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) (WU et al., 2013).

Biossíntese de Ácidos Graxos

Os aspectos quantitativos e qualitativos da biossíntese de AGPIs pelas algas estão diretamente relacionados às condições as quais elas são submetidas. Com a capacidade de adaptação a diversos ambientes que estes organismos possuem, o resultado é uma notável variedade de lipídeos que podem ser gerados, bem como a síntese de diversos outros compostos (GUSCHINA et al., 2006). Sabe-se que em baixas temperaturas a composição de AGPIs das algas aumenta consideravelmente, o que é avaliado por Schwenk e colaboradores (2013) como um processo de adaptação para aumentar a fluidez da membrana.

A síntese de ácidos graxos ocorre em plantas e mamíferos de forma análoga até determinado momento, onde a acetilcoenzima-A (acetil-CoA) passa por diversas reações, com a utilização de um mesmo conjunto de enzimas, chegando ao ácido palmítico (16:0), o que ocorre em sete etapas.

Sprecher (2000) descreveu o mecanismo através do qual mamíferos são capazes de sintetizar EPA e DHA, porém em quantidades mínimas, como já citado anteriormente. A **Figura 8** ilustra a diferença da síntese de *n*-3 em mamíferos e algas.

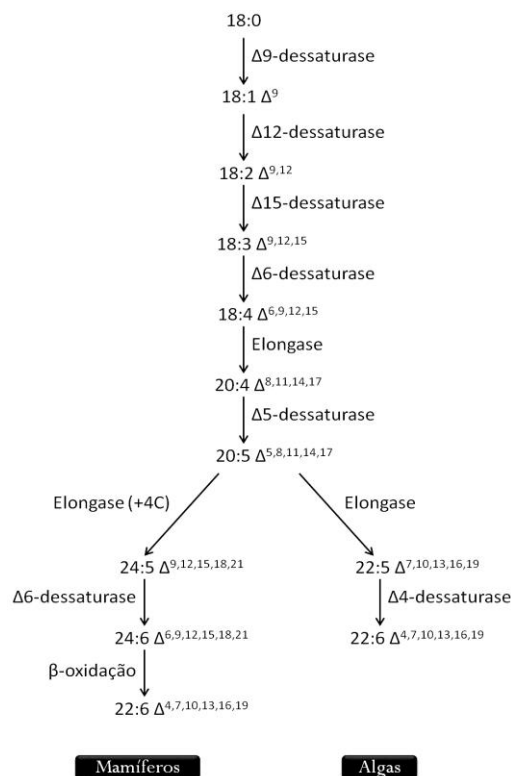


Figura 8. Comparação entre as vias de síntese de ácidos graxos em mamíferos e algas (GUSCHINA et al., 2006).

Identificação de ácidos graxos

A identificação de moléculas bioquímicas é uma importante etapa no estudo das aplicações destes compostos. Devido à sua importância e vasta aplicação, ácidos graxos já possuem métodos bem estabelecidos para sua identificação. A extração dos ácidos graxos das células da matriz a ser estudada é realizada a partir da extração com diferentes solventes orgânicos, sendo utilizada a mistura clorofórmio-metanol, descrita em 1959 por Bligh e Dyer. Uma das mais importantes técnicas para determinação de ácidos graxos é a Cromatografia Gasosa, associada à conversão dos ácidos em ésteres metílicos de ácidos graxos, a qual permite a sua identificação quantitativa.

O início da cromatografia se deu com o experimento do biólogo russo Michael Tswett em 1906, o qual separou diferentes substâncias em extratos de plantas (CHESTER e PINKSTON, 2002). A partir disso, a técnica foi desenvolvendo-se e atualmente diversas análises podem ser realizadas a partir de sofisticadas instrumentações (MÜHLEN e LANÇAS, 2004). Os principais componentes de equipamentos de cromatografia gasosa são injetor, coluna (fase estacionária) e

detector (**Figura 9**). Esta ferramenta tem como vantagens a reprodutibilidade, baixo custo e fácil manutenção, já a limitação desta técnica se deve ao fato de que somente compostos com estabilidade térmica podem ser analisados, uma vez que as temperaturas durante a análise podem ultrapassar 300 °C.

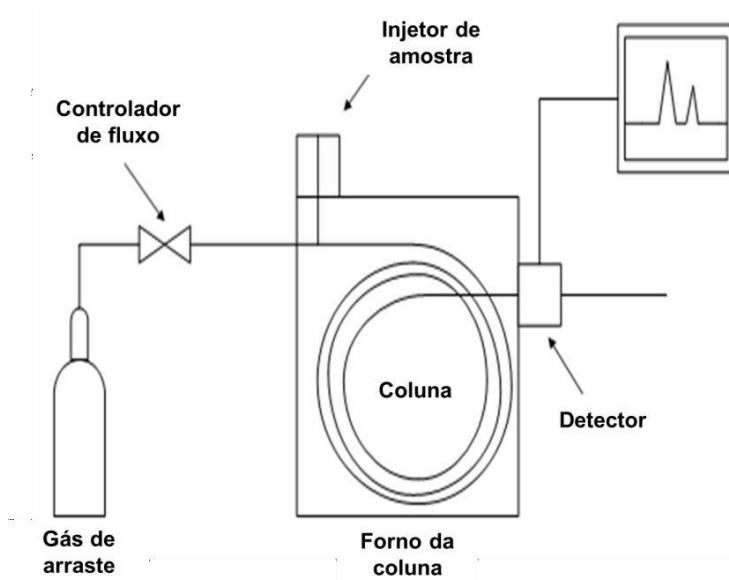


Figura 9. Esquema geral dos componentes de um cromatógrafo gasoso.

Adaptado de: <http://www.sciseek.com/>

A Cromatografia Gasosa vem sendo largamente utilizada na identificação de ácidos graxos e derivados sintéticos de macroalgas e microalgas (HAMMANN et al., 2013; CAVONIUS et al., 2014). A identificação de compostos utilizando a cromatografia gasosa pode ser realizada através da comparação com padrões previamente identificados ou através da associação da técnica à espectrometria de massas (MS). Estas técnicas são amplamente aplicadas aos mais variados tipos de análises, como demonstrado por Ragonese e colaboradores (2014), os quais elucidaram o perfil de ácidos graxos de diversas espécies de algas marinhas empregando as técnicas de Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (GC-FID) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS). A partir destas técnicas, foram quantificados 51 diferentes tipos de ácidos graxos de oito algas dos filos verde, vermelha e parda.

Câncer

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células anormais. Estas células podem afetar qualquer parte do corpo com a formação de tumor, que pode invadir os tecidos circundantes ou afetar locais distantes através de processo de metástase. Este crescimento celular desenfreado pode ser causado por fatores externos (tabaco, organismos infecciosos, produtos químicos e radiação), bem como fatores internos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem a partir do metabolismo) (CANCER FACTS AND FIGURES, 2014).

Atualmente, o câncer é considerado um processo “*multistep*”, que ocorre devido à acumulação de mutações somáticas de uma única célula, resultando em alterações fenotípicas graduais, a partir de uma célula normal a uma célula pré-neoplásica, progredindo para neoplásica. Estes estágios são descritos como iniciação, promoção e progressão. A iniciação é irreversível e desencadeada por agentes químicos ou físicos em nível de DNA. Por sua vez, a promoção, envolve mecanismos de epigenética, é um processo lento e pode ser reversível, levando à acumulação de células pré-malignas de divisão de anormal. Por fim, a etapa de progressão é em geral irreversível e conduz para a fase final da carcinogênese, com o crescimento do tumor e potencial metastático (HANAHAAN e WEINBERG, 2000; RUSSO, 2007).

Câncer é uma das principais causas de morte na atualidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2012, a estimativa era de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes causadas por esta doença. Números mais elevados quando comparados com os dados de 2008, onde estimaram-se 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes. No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2014 eram esperados 576 mil novos casos, estimativa que também é válida para o ano de 2015. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) deve ser o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo. Este câncer começa a desenvolver-se no tecido mamário, o qual é composto essencialmente por glândulas responsáveis pela produção de leite (lóbulos) e tecido adiposo, conjuntivo e tecidos linfáticos. O tratamento inclui procedimentos cirúrgicos, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia (BREAST CANCER FACTS AND FIGURES, 2014).

Na busca por novas alternativas de tratamentos contra o câncer com medicamentos mais específicos e efeitos colaterais minimizados, os produtos naturais marinhos, especialmente as algas, vem se mostrando como uma nova fonte para o desenvolvimento de fármacos. O uso medicinal das algas marinhas teve seu início durante o século 17, devido a seus componentes fitoterápicos e diversidade de espécies (BOOPATHY e KATHIRESAN, 2013). Alguns compostos de origem marinha já são comercialmente utilizados no tratamento do câncer, como o Cytosar-U® também conhecido como citarabina ou ara-C (1-barabinofuranosilcitosina), isolado da esponja *Cryptotethya crypta* e aprovado em 1969 pela *Food and Drug Administration* (FDA) utilizado no tratamento da leucemia mielóide aguda. O fármaco Yondelis®, também chamado de trabectedina ou ecteinascidina 743 e isolado da *Ecteinascidia turbinata* (aprovado em 2007 pela Agência Europeia de Avaliação de Produtos Medicinais), utilizado no tratamento de câncer de ovário. Halaven® também conhecida como mesilato de eribulina ou halicondrina E7389, é um análogo da halicondrina B, presente na esponja do mar *Halichondria okadai*, usada para tratar pacientes com câncer de mama metastático e foi aprovado pela FDA em 2010 (MAYER et al., 2010; ABRAHAM et al., 2012; INDUMATHY e DASS, 2013). Além disso, diversos outros fármacos para tratamento do câncer estão em fase clínicas de estudo (**Tabela 1**), com a utilização de compostos ativos como nucleosídeos, alcaloides, peptídeos e macrolídeos. Extratos de algas obtidos a partir do emprego de diferentes solventes orgânicos também estão sendo amplamente estudados quanto ao seu potencial antitumoral em diversas linhagens celulares (FAROOQI et al., 2012; GUEDES et al., 2013; LAU et al., 2014).

Tabela 1. Compostos com atividade antitumoral derivados de produtos naturais marinhos em fase de estudo clínico.

Status Clínico*	Nome do Composto	Fonte Natural Marinha
Fase III	Aplidina	Ascídia <i>Aplidium albican</i>
Fase III	Neovastat® (AE-941)	Cartilagem do tubarão <i>Squalus acanthias</i>
Fase II	PM1004	Molusco <i>Jorunna funebris</i>
Fase II	Kahalalide F	Molusco <i>Elysia rufescens</i>
Fase II	Plinabulin	<i>Aspergillus sp.</i> marinho
Fase II	ILX-651	Molusco <i>Dolabella auricularia</i>
Fase II	KRN7000	Esponja <i>Agelas mauritanus</i>
Fase I e II	Briostatina 1	Briozoário <i>Bugula neritina</i>
Fase I	Discodermolido	Esponja <i>Discodermia dissoluta</i>
Fase I	Espisulosina	Molusco <i>Mactromeris polynyma</i>
Fase I	Salinosporamida A	Actinomiceto <i>Salinospora tropica</i>

*Fase I: Medicamento é testado pela primeira vez, em pequenos grupos de pacientes (10 a 30 pessoas); Fase II: Estudos-piloto em grupos pequenos de pacientes (70 a 100 pacientes) para confirmar que o fármaco age na condição-alvo; Fase III: Ensaios clínicos formais com grande número de pacientes para determinar a eficácia do fármaco comparada com o tratamento existente (100 a 1000 pacientes); Fase IV: Seguimento pós-comercialização para estabelecer a eficácia e toxicidade no uso geral (SBPPC, 2014).

Fonte: THAKUR et al., 2008; GLASER e MAYER, 2009; MAYER et. al., 2010; GERWICK e MOORE, 2012; CLINICALTRIALS, 2014.

1) Ácidos Graxos e Câncer

Estudos epidemiológicos há muito tempo evidenciam a relação entre ácidos graxos poli-insaturados e a diminuição da ocorrência de diversas doenças, entre elas, o câncer (GERBER, 2012). Ácidos graxos saturados e mono-insaturados são conhecidos por aumentar o risco de câncer, ao contrário dos poli-insaturados, os quais possuem evidências de atividade citotóxica em diversos tipos de câncer, como mama (KIM et al., 2009; LIU et al., 2015), cólon (KATO et al., 2007), pele (RHODES et al., 2003), gastrointestinal (PARK et al., 2013), próstata (GU et al., 2013) e

pancreático (MOHAMMED et al., 2012). Em muitos estudos, esta diminuição está associada ao alto consumo de ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 e *n*-6 (KIM et al., 2009; MURFF et al., 2011; GERBER, 2012). Produtos de origem natural que possuam propriedades quimiopreventivas vem sendo utilizados no tratamento e prevenção de diversos carcinomas (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). Dentre estes, encontram-se os ácidos graxos essenciais ômega-3 e -6, os quais atuam sobre o câncer através de diversos mecanismos, como supressão de transformação neoplásica, inibição do crescimento celular, aumento da apoptose e inibição da produção de eicosanoides a partir de precursores de ácidos graxos ômega-6 (ROSE e CONNOLLY, 1999; TERRY et al., 2004).

Ácidos graxos podem também atuar de forma indireta na prevenção do câncer. Há muitos anos é conhecida a relação entre a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados e o aumento dos níveis de colesterol de alta densidade e diminuição dos níveis totais de colesterol (NUNEZ et al., 2014). A homeostasia dos níveis de colesterol no organismo pode ser fundamental nos tumores, o qual em altos níveis é frequentemente associado à progressão do câncer, uma vez que este se acumula nos tecidos tumorais e pode também modificar o metabolismo do colesterol, fazendo com que as células alteradas apresentem maior fenótipo proliferativo (MURAI, 2015).

Ácidos graxos livres são fundamentais em diversos processos metabólicos. Alterações nos níveis destes ácidos graxos no sangue podem estar relacionadas a múltiplas enfermidades, tais como diabetes mellitus (LIU et al., 2010), doença de Alzheimer (WANG et al., 2012) e autismo (WIEST et al., 2009). Recentemente, estas alterações passaram também a ser relacionadas ao surgimento de câncer pancreático (ZHANG et al., 2014) e de mama (LV e YANG, 2012). Em relação ao câncer de mama, foi evidenciado que os ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e linoleico (C18:2) podem atuar como biomarcadores na detecção do tumor. Em geral, ácidos graxos saturados e mono-insaturados são positivamente associados ao risco de câncer de mama, enquanto os poli-insaturados da classe *n*-3 e *n*-6 (com exceção do ácido linoleico) são inversamente associados (LV e YANG, 2012).

PARTE III

Capítulo 1

ARTIGO CIENTÍFICO

Todos os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de manuscrito a ser submetido ao periódico internacional *Journal of Applied Phycology*.

**FATTY ACID COMPOSITION AND CYTOTOXIC ACTIVITY IN HUMAN BREAST
CANCER CELLS OF ANTARCTIC MACROALGAE *Adenocystis utricularis*,
Sarcothalia papillosa, *Curdiea racovitzae* AND *Georgiella confluens***

Bruna Silveira Pacheco^{1,2}, Rosiane M. Martins^{1,2}, Marco A. Z. dos Santos¹, Eduarda
Schultze², Franciane M. Pellizzari³, Fabiana K. Seixas², Pio Colepicolo⁴, Tiago Collares²,
Claudio M. P. de Pereira^{1,2*}

¹ Center of Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas,
Laboratory of Lipidomic and Bio-Organic, Pelotas, 96001-970, Brazil.

² Research Group on Cellular and Molecular Oncology, Biotechnology / Technology
Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 96010-900, RS, Brazil;

³ Laboratory of Phycology and Marine Water Quality, Paraná State University, Paranaguá,
Brazil.

⁴ Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, 05508-900, Brazil.

* Corresponding author: Claudio Martin Pereira de Pereira. Laboratory of Lipidomic and Bio-
Organic, Federal University of Pelotas (UFPel). E-mail: -
claudiochemistry@gmail.com/lahbbioupel@gmail.com. Tel/Fax: +00 55 53 3275-7357

20 Abstract

21 Samples of Antarctic macroalgae from three distinct islands in Antarctic Peninsula were
22 collected and analyzed for their fatty acid content and evaluation of cytotoxic activity in
23 human breast cancer cells. The profile of fatty acids was determined by gas chromatography
24 flame ionization detection. A total of 23 fatty acids were detected, of which 9 were saturated
25 (SFA), 5 were monounsaturated (MUFA) and 9 were polyunsaturated (PUFA) fatty acids.
26 The most notable result found in this study was the vast identification of PUFA, with values
27 ranging from 61.04% to 70.79 %. Also, our results demonstrated that fatty acids from
28 Antarctic macroalgae induce the growth inhibition MCF-7 and MDA-MB-231 human breast
29 cancer cells. We found that both the *Adenocystis utricularis* and *Sarcothalia papillosa*
30 macroalgae have fatty acids that deserve to more studies to use them in cancer therapy.

31

32

33 **Keywords:** South Shetland Islands, Antarctic macroalgae, Fatty acid, Polyunsaturated fatty
34 acids, Breast cancer

35 Introduction

36 The importance of the Antarctic environment is immeasurable and global warming
37 and pollution may result serious effects on marine life of the frozen continent. The life in
38 Antarctic's continent is limited and the low biodiversity is assigned to geographical isolation
39 and climatic constraints. Only 130 species have been identified in Antarctic (Wulff et al.
40 2009) and the major fraction of this diversity is distributed in the Antarctic Peninsula and to a
41 lesser extent in the region comprising the Ross Sea, at longitude 77 °S (Wiencke and Amsler
42 2011). Algae is a polyphyletic group of photosynthetic organisms, diserver in phylum
43 Ocrophyta, Chlorophyta and Rhodophyta, which have capacity of adaptation, given them the
44 ability to produce a wide variety of unusual compounds, which are produced only by algae,
45 such as phlorotannins and specific polysaccharides (Brown et al. 2014). The molecules
46 obtained by algae have been studied extensively, among the compounds with notable activity,
47 fatty acids, specially omega-3 polyunsaturated fatty acids (*n*-3 PUFAs), have several health
48 benefits. Furthermore, besides fatty acids, main substances with potential economic impact
49 can be biosynthesized by algae, such as steroids, carotenoids, polysaccharides, lectins,
50 mycosporine-like amino acids, halogenated compounds, polyketides and toxins (Cardozo et
51 al. 2007). Moreover, there is a globally increasing demand for alternative natural resources
52 with appropriate fatty acid profiles (Ginzberg et al. 2000; Siddiqui et al. 2007; Brown et al.
53 2014). Fatty acid biosynthesis started from acetyl-CoA (acetyl coenzyme A) through several
54 reactions with enzymes elongases and desaturases, increasing the number of carbons and
55 unsaturations, respectively (Figure 1) (Sprecher 2000). In particular, the positive point of our
56 research is related to little amount of references among the macroalgae in study and influence
57 of organic constituents with biological activity.

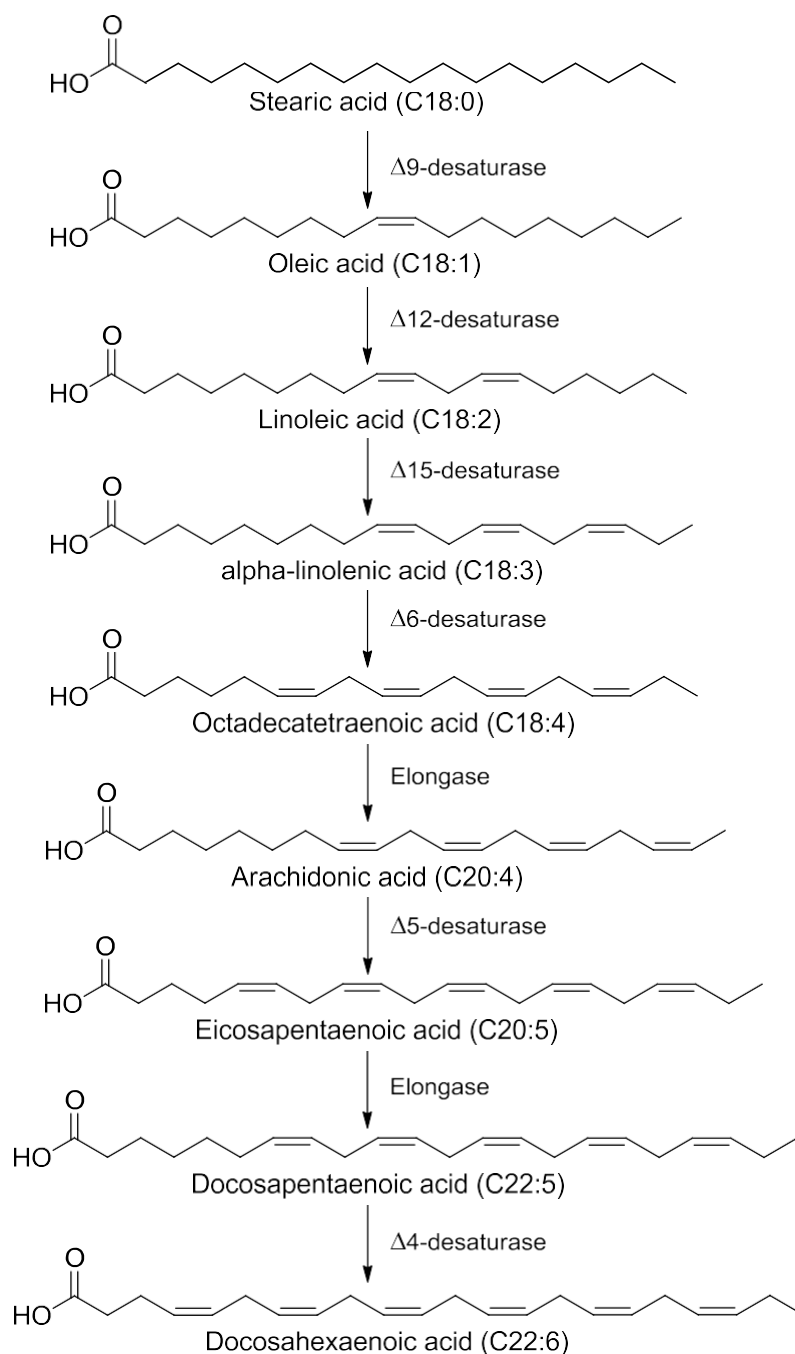


Figure 1. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids by macroalgae.

In this context, natural products play an important role in the search for development of new medicines (Boopathy and Kathiresan 2010; Yoneshigue-Valentin et al. 2013). Among these, marine natural products (MNP) represent an important source of new compounds. Currently, more than 22000 molecules from marine environment were reported in literature (Petit and Biard 2013). MNP exhibit a wide range of biological activities, such as antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis,

antiviral and anticancer (Mayer et al. 2013; Petit and Biard 2013). Our studies have demonstrated that natural products have antitumoral activity (Frezza et al. 2013; Begnini et al. 2014; Gambato et al. 2014). Recently, we also reported the antiprotozoal, antimicrobial and antioxidant activities of macroalgae (Guaratini et al. 2012; Machado et al. 2014; Martins et al. 2014; Torres et al. 2014).

Among these, cancer is one of the greatest causes of deaths in the world. In 2012, approximately 14 million new cases and 8.2 million cancer related deaths were reported (WHO 2014). Furthermore, over 20 million new cancer cases expected annually as early as 2025 (Ferlay et al. 2015). The breast cancer is the most common cancer detected in women. The treatment to breast cancer includes surgical procedures, radiotherapy, chemotherapy and hormone therapy. In the search for new alternatives for the cancer treatment, MNP, especially algae, is proving to be a new source for research of new molecules. Epidemiological and experimental studies have shown that PUFAs may reduce the incidence of several diseases, among them, cancer (Astorg 2004; Gerber 2012; Murray 2014). The protective role of *n*-3 PUFAs against breast cancer is supported by evidence from *in vitro* and *in vivo* studies, and multiple mechanisms have been proposed to reduced breast cancer risk by PUFAs, including suppression of neoplastic transformation, inhibition of cell growth, increased apoptosis and inhibition of eicosanoids production from *n*-6 fatty acid precursors (Rose and Connolly 1999; Terry et al. 2004). Besides reducing tumor growth, fatty acids may also increase the efficacy of radiotherapy and several drugs, such as doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, mitomycin C and others (Hardman 2004).

On the basis of these considerations, the present study comprises the following two objectives, determination of fatty acid composition and evaluation of potential cytotoxic in human breast cancer cells of the fatty acids from Antarctic macroalgae *Adenocystis utricularis*, *Sarcothalia papillosa*, *Curdiea racovitzae* and *Georgiella confluens*.

Materials and Methods

Macroalgae samples

Specimens of macroalgae were collected during December 2013, in the Antarctic Peninsula, South Shetland Islands. Macroalgae investigated and collect information are listed

in Table 1. Macroalgae collected were washed with local sea water to remove all the extraneous matter, dried at ambient temperature and placed in plastic bags protects from light.

Table 1. Species and data collection of macroalgae used in the study.

Species	Data Collection
Adenocystis utricularis (Bory de Saint-Vincent) Skottsberg	Robert (62°22'S, 059°41'W) 6 th December, 2013
Sarcothalia papillosa (Bory de Saint-Vincent) Leister	Livingston, Punta Hannah (62°39'S, 60°36'W) 5 th December, 2013
Curdiea racovitzae Hariot	Livingston, Punta Hannah (62°39'S, 60°36'W) 5 th December, 2013
Georgiella confluens (Reinsch) Kylin	King George, Vaureal (62°11'S, 58°18'W) 10 th December, 2013

Chemicals

FAME 37-Mix (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) was the analytical standard and nonadecanoic acid (C19:0; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was used as an internal standard in fatty acid extraction and identification. The reagents used were analytical grade and HPLC grade solvents.

Lipid extractions and fatty acids methyl esters preparation

The dried biomass was ground and 1 g from each milled sample was stirred and stored in 30 mL chloroform/methanol (1:2, v/v) and 10 mL sodium sulfate (1.5 g L⁻¹) during 30 min at 20 °C under reflux. After 30 min, 10 mL chloroform and 10 mL sodium sulfate (1.5 g L⁻¹) were added. Extracts were centrifuged at 2500 rpm and the organic phase was separated and dried using nitrogen, according to Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer 1959). The lipids were converted to their methyl esters using the standard boron trifluoride-methanol (BF₃) method (Moss et al 1974). The resultant mixture of fatty acid methyl esters (FAME) in hexane/chloroform (4:1, v/v) was subjected to gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID).

Gas-chromatography analysis

The quantitative GC analyses were performed according to the following conditions using a gas chromatograph GC/FID-2010 with an AOC-20i autosampler (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a fused-silica capillary column (Rtx-WAX, 30 m ×

0.25 mm I.D. $\times$ 0.25 μ m film thickness). Injections were performed with a 1:25 split ratio, and hydrogen was used as the carrier gas under constant flow mode at 1.2 mL/min. The injector was heated to 250 °C and a flame-ionization detector operated at 250 °C. The initial programmed oven temperature was 100 °C, which was increased by 7 °C/min up to 200 °C, increased by 5 °C/min to 202.6 °C, and held isothermal for 2 min at this temperature. It was then increased by 5 °C/min to 222.9 °C and held isothermal for 2 min, and then increased by 5 °C/min to 230 °C and held isothermal for 10 min at 230 °C (Argandoña et al 2000; Tang and Row 2013). The internal standard solution containing nonadecanoate methyl ester (C19:0 $\geq$ 99.0%; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was prepared at a concentration of 2 mg/mL by dissolving 20 mg methyl nonadecanoate in 10 mL of n-hexane in a volumetric flask.

Determination of cytotoxicity

Cell culture

Human breast cancer adenocarcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 and chinese hamster ovary (CHO) cell lines were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) and routinely cultured in our laboratory. MCF-7 and CHO cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS) purchased respectively from Vitrocell Embriolife (Campinas, Brazil) and Gibco (Grand Island, NY, USA). MDA-MB-231 cells were cultured in LEIBOVITZ L-15 medium (purchased from Cultilab, Campinas, Sao Paulo, Brazil) supplemented with 10 % FBS, 1 % L-glutamine, 1 % penicillin, and 0.2 mg mL⁻¹ sodium bicarbonate. Cells were seeded at a density of 2×10^4 cell per well in a volume of 100 mL in 96-well plates, grown at 37 °C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂ (with exception of MDA-MB-231 which was grown without any CO₂). The experiments were performed with cells in the logarithmic phase of growth. Cells without any treatment were used as controls in all experiments.

Cell viability assay

The viability of MCF-7, MDA-MB-231 and CHO cells lines were assessed by measuring the reduction of soluble MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) to water-insoluble formazan (Vasconcelos et al 2013). Cells were treated with different concentrations of fatty acids from macroalgae *A. utricularis*, *S. papillosa*, *C. racovitzae* and *G. confluens* (1-200 μ g mL⁻¹) for 24, 48 and 72 hours. These

components were previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the medium supplemented with 10% FBS to the desired concentrations. The final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.2%, and an additional group was exposed to an equivalent concentration of this solvent.

Thereafter, the incubation medium was removed, and subsequently 180 μ L of medium and 20 μ L MTT (5 mg MTT/mL solution) were added to each well. The plates were incubated for an additional 3 h, and the medium was discarded. DMSO was added to each well, and the formazan was solubilized on a shaker for 5 min at 100 g. The absorbance was read on a microplate reader (Victor X5, PerkinElmer, USA) at a test wavelength of 492 nm. Cell inhibitory growth was determinate as follows: inhibitory rate = $(1 - \text{Abs}_{492\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100 \%$. All observations were validated by at least two independent experiments in triplicates for each experiment.

Live/dead assay

The live/dead cell viability assay[®] (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) was conducted following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were treated with 100 μ g mL⁻¹ of fatty acids from macroalgae *A. utricularis* and *S. papillosa* for 48 h. Live cells were able to take up calcein and could be analyzed by green fluorescent light emission (488 nm). Ethidium bromide homodimer diffuses through the permeable membrane of dead cell and binds into their DNA. Dead cells could be detected by red fluorescent signal (546 nm). The live/dead assay was analyzed using a fluorescence microscope Olympus IX71 (Olympus Optical Co.) by multicolor imaging. The number of red (dead) and green cells (live) in a total of 100 cells was counted in triplicate for each sample. Viability was expressed as the average percentage of viable cells. This experiment was repeated two times.

DAPI assay

To detection of apoptosis was by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining, which forms fluorescent complex with double-stranded DNA. Cells seeded in 96-well plate were treated with 100 μ g mL⁻¹ of fatty acids from *A. utricularis* and *S. papillosa* macroalgae. After incubation, the cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 1 mL methanol solution at room temperature for 10 min. The fixed cells were then washed with PBS and stained with a DAPI solution at room temperature in the dark. The nuclear morphology of the cells was examined by fluorescence microscopy Olympus IX71 (Olympus Optical Co.).

Statistical analysis

Data sets MTT assay were analyzed using a factorial ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons, while LIVE/DEAD and DAPI were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. All data were expressed as mean $\pm$ SEM. Significance was considered at p value < 0.05 in all analyses.

Results

Fatty acid composition of macroalgae Adenocystis utricularis, Sarctothalia papillosa, Curdiea racovitzae and Georgiella confluens

Fatty acids from macroalgae samples were identified and quantified using GC-FID analyses. Total fatty acids content in the analyzed algae are shown in Table 2. In the brown algae *Adenocystis utricularis* was identified twenty different fatty acids, whereas in red macroalgae *Sarctothalia papillosa*, *Curdiea racovitzae* and *Georgiella confluens* were identified fourteen, fifteen and thirteen different fatty acids, respectively.

Saturated fatty acids (SFAs) represented 29.45% of the total of fatty acids in macroalgae *A. utricularis*. In red algae *S. papillosa*, *C. racovitzae* and *G. confluens* the total of SFA was 24.97%, 27.45% and 25.76%, in that order. The most abundant SFA in all macroalgae studied was palmitic acid (C16:0). Among unsaturated fatty acids, eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n3) was the most representative PUFA in all species.

Palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1n9c), linoleic acid (C18:2n6c), linolenic acid (C18:3n3) and arachidonic acid (C20:4n6) were found in significant concentrations in the macroalgae. PUFA constituted more than half of total fatty acids in macroalgae studied, ranging from 61.04% to 70.79% of the total fatty acids. The major concentrations of monounsaturated fatty acids (MUFA) oleic acid (8.25% of total FA) and palmitoleic acid (5.28% of total FA) were found in *A. utricularis* and *G. confluens*, respectively. The highest concentrations of linoleic acid (9.36% of total FA) and linolenic acid (9.99% of total FA) were found in red macroalgae *A. utricularis*.

Some fatty acids were found only in one algae, such as heptadecanoic acid (C17:1, 0.71% of total FA), *cis*-11,14,17-eicosatrienoic acid (C20:3n3, 0.45% of total FA, behenic acid (C22:0, 0.35% of total FA) and lignoceric acid (C24:0, 0.04% of total FA), which were found just in *A. utricularis*. Moreover, lauric acid (C12:0, 1.33% of total FA), euric acid

(C22:1n9, 0.67% of total FA) and docosahexaenoic acid (C22:6n3, 0.93% of total FA) were found only in *C. racovitzae*, *S. papillosa* and *G. confluens*, respectively.

In a near future these data can be sources of chemical constituents of these algae. Furthermore, it is important to point out the implications of these fatty acids extracts in the study of new bioactive field in combat to tumor cells.

Determination of cytotoxicity by MTT assay

Between all four fatty acids from Antarctic macroalgae tested for cytotoxic activity against MCF-7 and MDA-MB-231 cells, two (*A. utricularis* and *S. papillosa*) demonstrated a significant activity at 48 h, inhibiting more than 50% of tumor cells at the concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Among CHO cell (non-tumor cell), in the major fatty acids from macroalgae analyzed, did not reach 50% growth inhibition, with the exception of macroalgae *A. utricularis* and *G. confluens*, which achieved 50% inhibition at the highest concentration (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). For all tumor and non-tumor cells analyzed, cell viability was decreased in a concentration and time-dependent behavior (Figure 2a-d). To tumor cells, all macroalgae fatty acid analyzed (with exception of *A. utricularis*) demonstrated the capacity to inhibiting more than 50% of the growth of cells.

Live/dead assay

Live/dead assay showed that fatty acids from Antarctic macroalgae *A. utricularis* and *S. papillosa* significantly reduced the cell viability (top panel in Figure 3). The bottom panel in Figure 2 shows the mean of dead cells calculated from three different areas of the plate.

DAPI assay

DAPI staining revealed that nuclei with chromatin condensation and apoptotic bodies were formed in cells that were cultured with fatty acids from *A. utricularis* and *S. papillosa* macroalgae, however, no significant difference was found between samples and control. The Figure 4 illustrates the cells stained with DAPI and observed under a fluorescence microscope. Viable cells (control group) with intact DNA and just slightly activated in the fluorescence microscope image were negative to DAPI and the compound Doxorubicin was used as a positive control to DAPI.

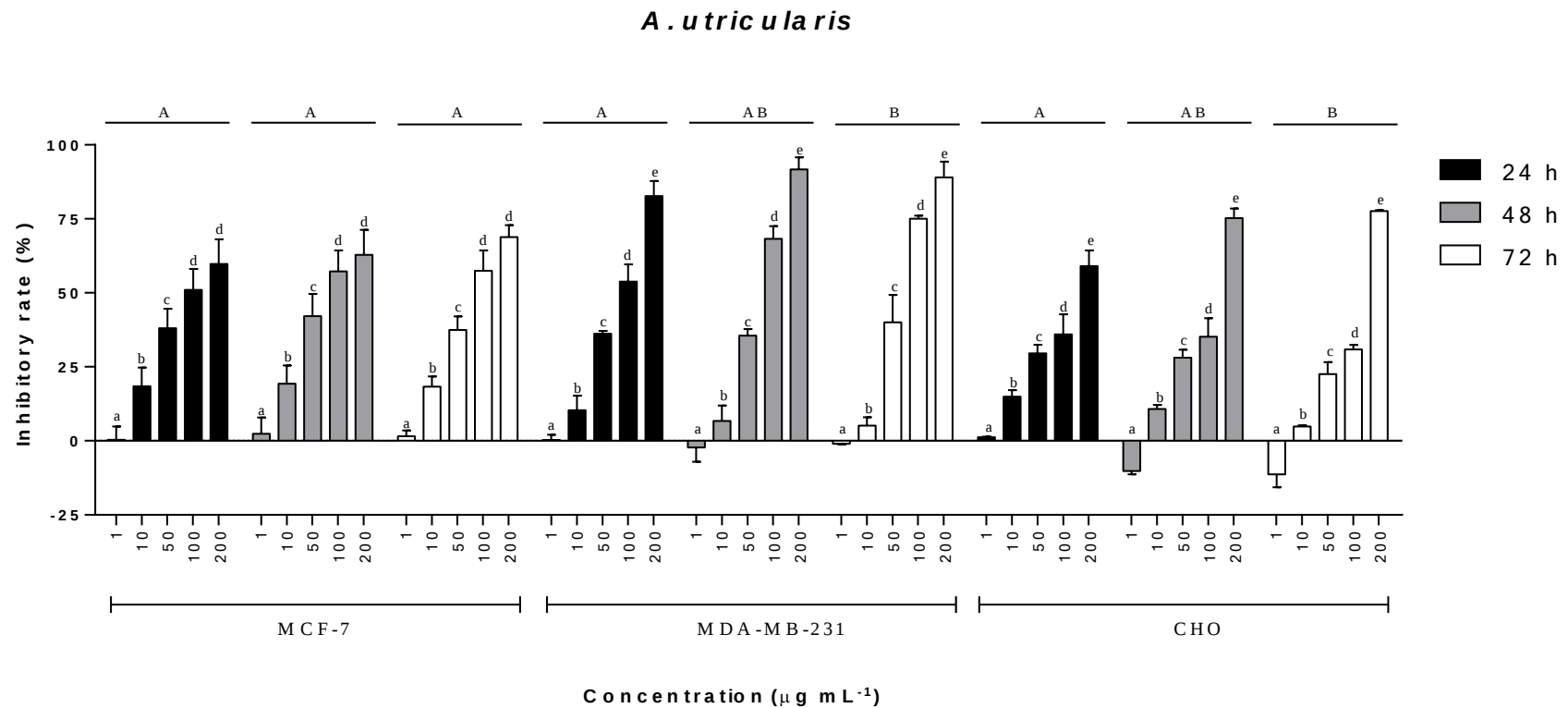
258

Table 2. Percentage fatty acid composition of Antarctic macroalgae.

	<i>Adenocystis utricularis</i>	<i>Sarcothalia papillosa</i>	<i>Curdiea racovitzae</i>	<i>Georgiella confluens</i>
C12:0	-	-	1.33 ± 0.00	-
C14:0	6.46 ± 0.01	1.42 ± 0.00	1.85 ± 0.01	2.24 ± 0.02
C15:0	0.23 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.34 ± 0.00
C16:0	19.15 ± 0.04	19.97 ± 0.07	20.62 ± 0.11	21.77 ± 0.20
C16:1	0.39 ± 0.00	1.51 ± 0.00	1.39 ± 0.00	5.28 ± 0.03
C17:0	0.51 ± 0.00	-	0.49 ± 0.00	-
C17:1	0.71 ± 0.00	-	-	-
C18:0	2.19 ± 0.01	3.39 ± 0.00	2.92 ± 0.02	1.41 ± 0.00
C18:1n9c	8.25 ± 0.01	1.62 ± 0.00	1.26 ± 0.00	1.29 ± 0.01
C18:2n6c	9.36 ± 0.01	1.20 ± 0.00	1.56 ± 0.02	1.30 ± 0.00
C18:3n6	0.55 ± 0.00	1.31 ± 0.00	0.86 ± 0.00	0.78 ± 0.00
C18:3n3	9.99 ± 0.02	0.64 ± 0.00	-	3.05 ± 0.01
C20:0	0.52 ± 0.00	-	-	-
C20:2	0.27 ± 0.00	-	0.10 ± 0.00	-
C20:3n6	0.81 ± 0.00	0.70 ± 0.00	1.10 ± 0.00	0.53 ± 0.00
C20:4n6	9.05 ± 0.00	17.11 ± 0.05	15.06 ± 0.08	1.70 ± 0.01
C20:3n3	0.45 ± 0.00	-	-	-
C20:5n3	30.56 ± 0.03	49.83 ± 0.16	51.10 ± 0.26	59.39 ± 0.54
C22:0	0.35 ± 0.00	-	-	-
C22:1n9	-	0.67 ± 0.00	-	-
C22:6n3	-	-	-	0.93 ± 0.01
C24:0	0.04 ± 0.00	-	-	-
C24:1n9	0.11 ± 0.00	0.43 ± 0.00	0.08 ± 0.00	-
Σn-3	41.0	50.47	51.10	63.37
Σn-6	19.77	20.32	18.58	4.31

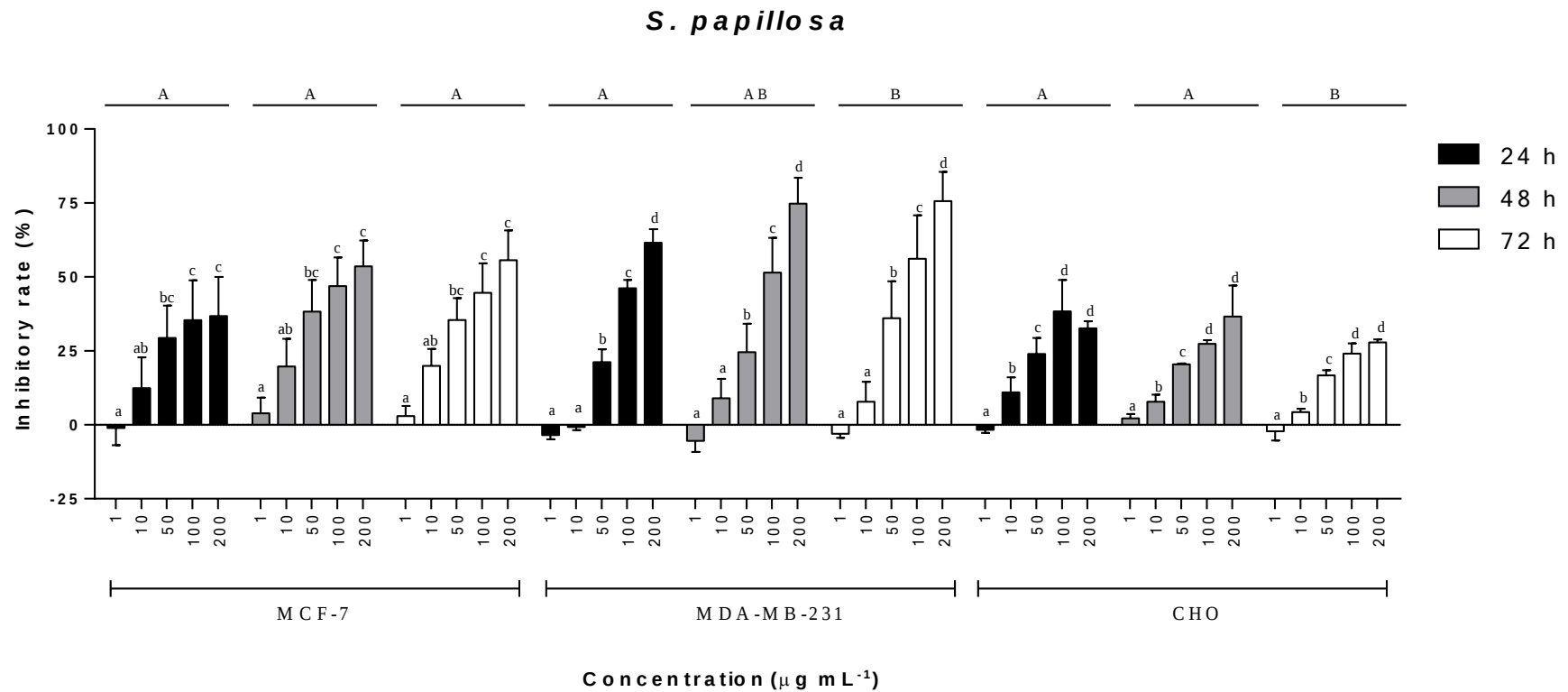
– not detected

259



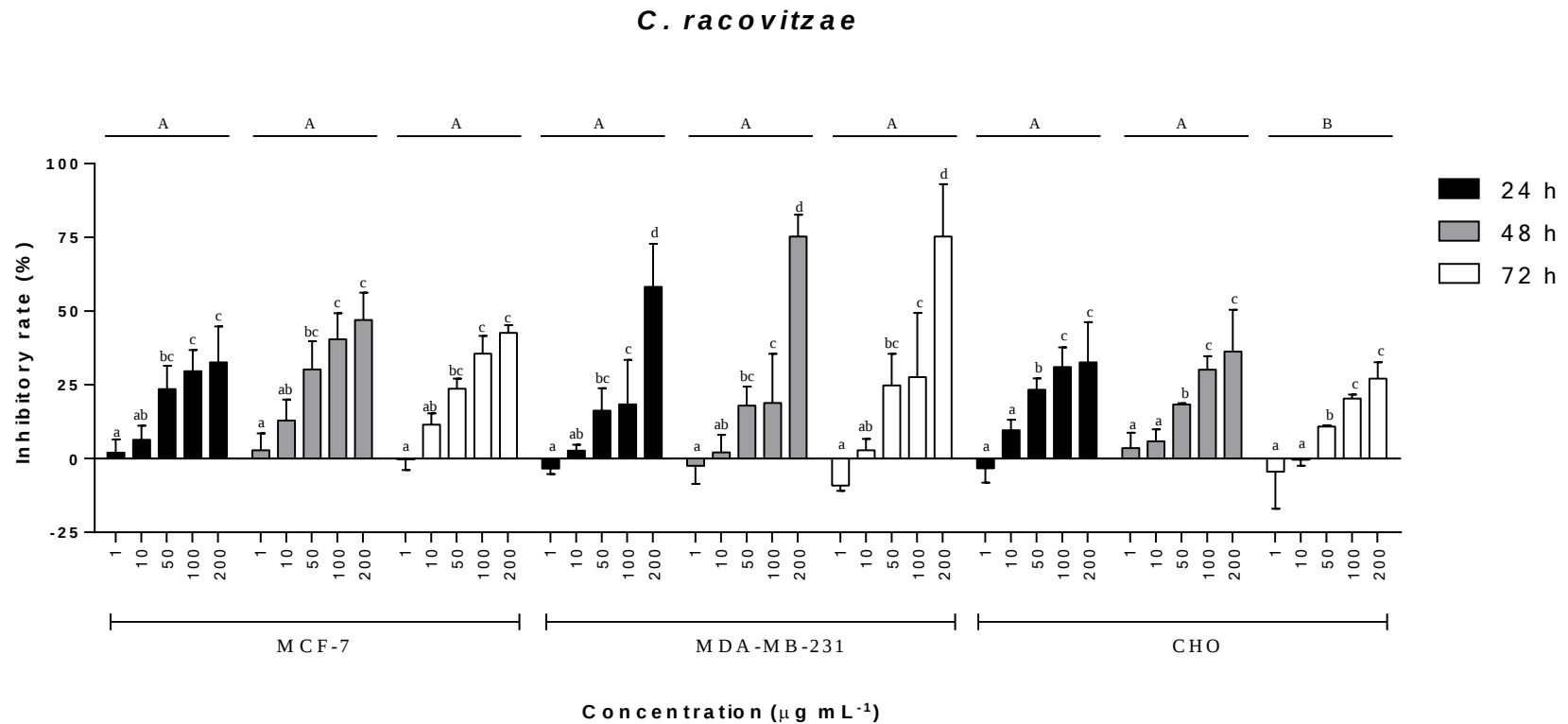
260

261 **Figure 2a.** Effect of different concentrations at 24, 48 and 72 h of fatty acids from macroalgae *A. utricularis* in inhibition of MCF-7, MDA-MB-
 262 231 and CHO cells. Cytotoxicity was assessed by MTT assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of a representative experiment performed in
 263 duplicate ($n = 2$). Significance was considered at $P < 0.05$ (Tukey test). Capital letters indicate differences between different times. Lower case
 264 letter indicate differences between different concentrations. Difference between cells was not considered.



265

266 **Figure 2b.** Effect of different concentrations at 24, 48 and 72 h of fatty acids from macroalgae *S. papillosa* in inhibition of MCF-7, MDA-MB-
 267 231 and CHO cells. Cytotoxicity was assessed by MTT assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of a representative experiment performed in
 268 duplicate (n = 2). Significance was considered at $P < 0.05$ (Tukey test). Capital letters indicate differences between different times. Lower case
 269 letter indicate differences between different concentrations. Difference between cells was not considered.



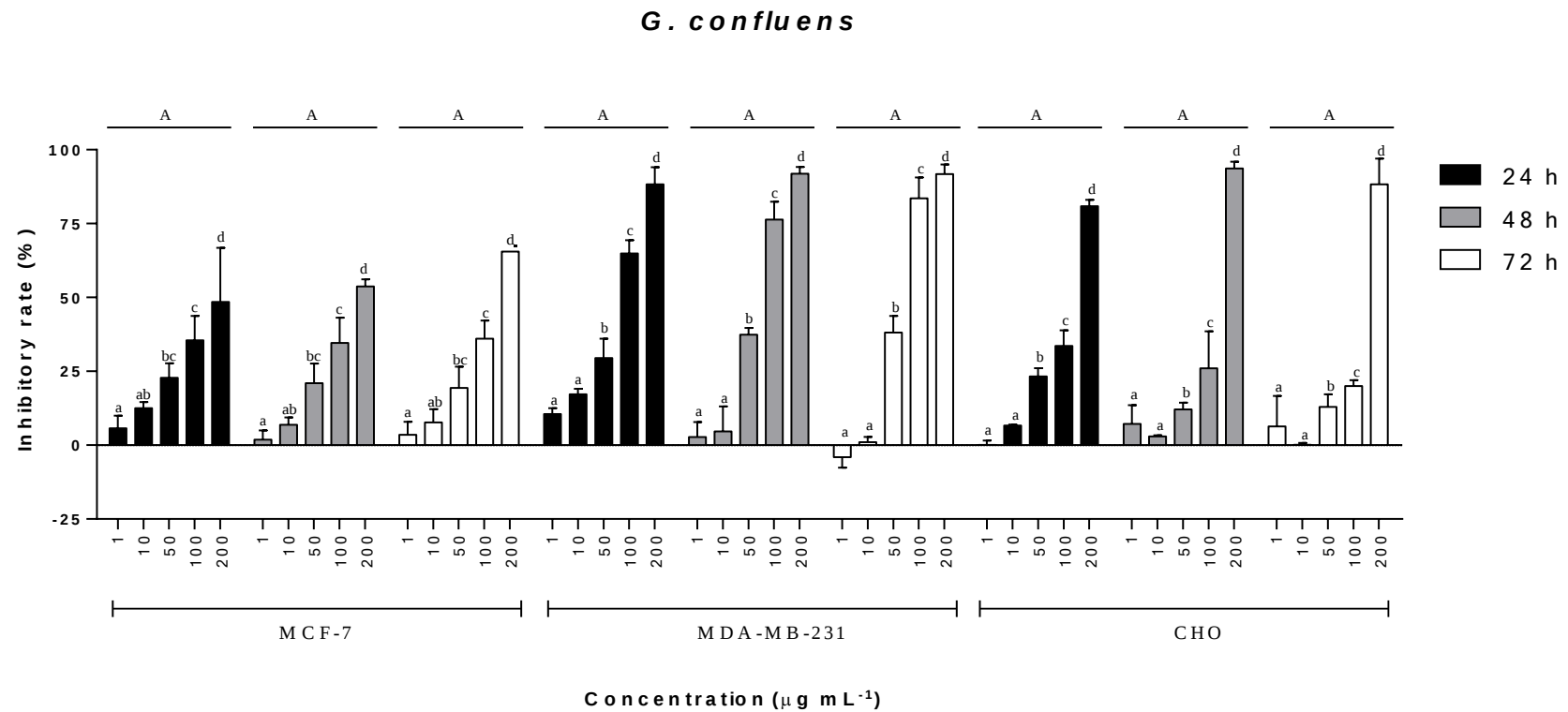
270

271 **Figure 2c.** Effect of different concentrations at 24, 48 and 72 h of fatty acids from macroalgae *C. racovitzae* in inhibition of MCF-7, MDA-MB-

272 231 and CHO cells. Cytotoxicity was assessed by MTT assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of a representative experiment performed in

273 duplicate (n = 2). Significance was considered at $P < 0.05$ (Tukey test). Capital letters indicate differences between different times. Lower case

274 letter indicate differences between different concentrations. Difference between cells was not considered.



275

276 **Figure 2d.** Effect of different concentrations at 24, 48 and 72 h of fatty acids from macroalgae *G. confluens* in inhibition of MCF-7, MDA-MB-
 277 231 and CHO cells. Cytotoxicity was assessed by MTT assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of a representative experiment performed in
 278 duplicate (n = 2). Significance was considered at $P < 0.05$ (Tukey test). Capital letters indicate differences between different times. Lower case
 279 letter indicate differences between different concentrations. Difference between cells was not considered.

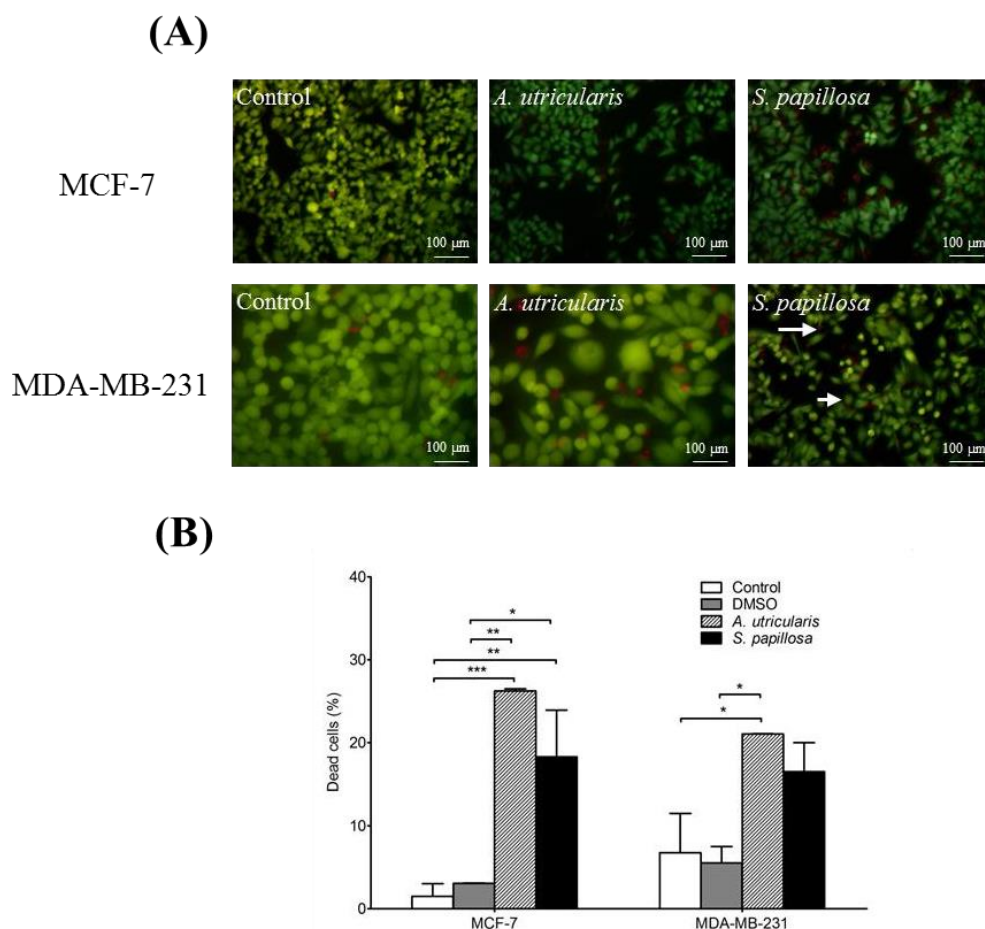
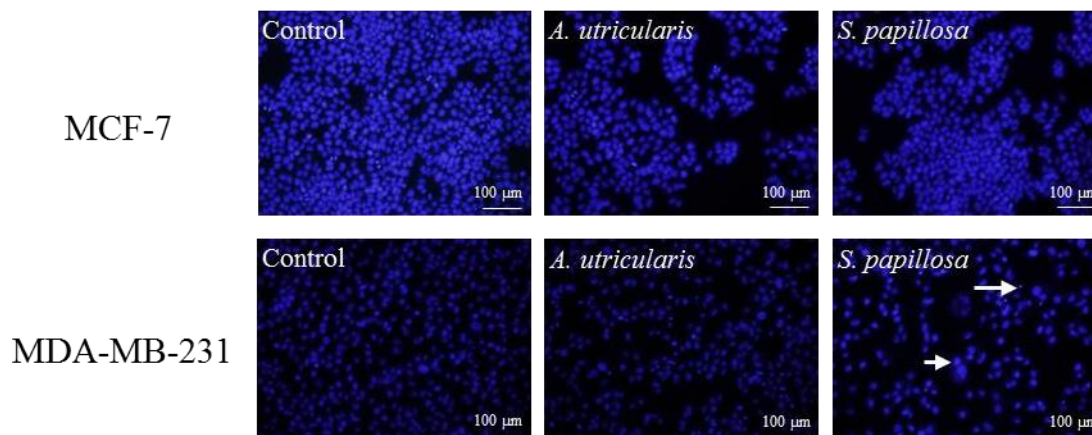


Figure 23. Breast cancer cells were treated with fatty acids from *A. utricularis* and *S. papillosa* macroalgae 48 h. (A) Quantitative analysis of cell death was estimated by LIVE/DEAD assay, using a fluorescence microscope Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan). (B) The graphic shows the mean $\pm$ SEM of three different areas of the plate. The long arrow indicates dead cells and the short arrow indicates live cells. Symbols indicate statistical differences. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Bar indicates 100 μ m.

(A)



(B)

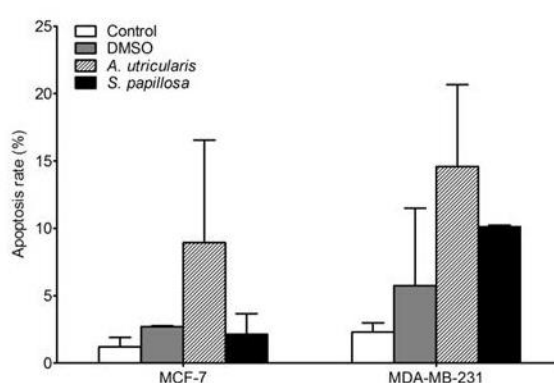


Figure 4. MCF-7 and MDA-MB-231 cell apoptosis (as assessed by DAPI staining). (A) Quantitative analysis of apoptotic cell was estimated by DAPI staining, using a fluorescence microscope Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan). (B) The graphic shows the mean $\pm$ SEM of three different areas of the plate. The long arrow indicates apoptotic cells (condensed or fragmented nuclei) and the short arrow indicates live cells. No significant difference was found. Bar indicates 100 μm .

297 Discussion

298 In recent years, our researcher group has reported the identification of fatty acids from
 299 microalgae (Pinto et al. 2011), macroalgae (Martins et al. 2012) and synthetic derivatives
 300 (Hobuss et al. 2012; Pacheco et al. 2014). The biosynthesis of chemical molecules by
 301 macroalgae may change according to the environmental conditions. In special, to regulate
 302 membrane fluidity in response to low temperatures, macroalgae from cold regions have a high
 303 production of fatty acids and increasing the degree of unsaturation, as a result of adaptation to
 304 the environment, producing PUFAs in larger quantities, specially omegas-3 and -6 (Graeve et
 305 al. 2002; Bhosale et al. 2009). In our study, the high PUFAs values found in these Antarctic
 306 macroalgae (ranging from 61.04% to 70.79%) can be explained by their necessity to adapt at
 307 temperatures lower than -20 °C (Thomas and Dieckmann 2002). The main metabolic function
 308 changed in these conditions is among the maintenance of the function of lipid membranes by
 309 increasing the production of unsaturation (Guschina and Harwood 2006; Los et al. 2013).
 310 Fatty acids are an important class of lipids, which are energy storage molecules and
 311 components of cell membranes, commonly present as esters of glycerol in phospholipids,
 312 glycolipids and triacylglycerols. Fatty acids are constituents of lipid bilayer, act as intra /
 313 extracellular messengers and as cofactors in enzymatic electron transfer reactions in
 314 mitochondria and chloroplast (Simopoulos 2008).

315 Macroalgae of Ochrophyta class is known to have concentration of C20 PUFA higher
 316 than C18 PUFA, which is in agreement with our results in brown macroalgae *A. utricularis*
 317 (Li et al. 2002; Narayan et al. 2004). In this study, the total content of C20 PUFA ranged from
 318 61.62% to 67.64% in brown algae, while total C18 PUFA ranged from 2.42% to 5.13%. The
 319 main C20 PUFA showed was eicosapentaenoic acid (C20:5n3) ranging from 30.56% to
 320 59.39% of total FA. Beside these fatty acids, Kumari and co-authors (2010) described that
 321 myristic acid (C14:0) and palmitic acid (C16:0) were found in large quantities in Ochrophyta
 322 macroalgae, which was also found in our study, where, myristic acid corresponded to 6.46%
 323 and palmitic acid to 19.15% to the total fatty acids showed in *A. utricularis*.

324 Among red algae (Rhodophyceae), the literature describes that the most prevalent
 325 PUFA are arachidonic acid (ARA, C20:4n6) and EPA (C20:5n3) (Kumari et al. 2010), which
 326 is in agreement with our results, with exception of *G. confluens*, which presented ARA
 327 corresponding to 1.70% of the total fatty acids. Fatty acid composition of Antarctic *G.*
 328 *confluens* was previously studied by Graeve (2002). Similarly to our study, *G. confluens* was
 329 rich in palmitic acid and eicosapentaenoic acid, but in the present study, was found the highest
 330 level of total n-3 PUFA. The variation of fatty acid content between species of the same

phylum can be influenced by season, geographical regions and age (Thomas and Dieckmann 2002). Palmitic acid (C16:0) was the most prevalent SFA in all red algae studied (19.15% to 21.77% of total FA). The high values of omega-3 found in macroalgae under study are interesting because algae produce PUFA which mammals cannot make, such as omegas-3 and -6, considered essential for humans (Plourde and Cunnane 2007) and confirm the capacity of macroalgae to survive at low temperatures, ice and variations in solar radiation (Wiencke et al. 2007).

Previous *in vivo* and *in vitro* studies in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells showed that *n*-3 PUFAs may be effective in reducing cell growth, reduced tumor volume and prevention of metastasis, among others (Barascu et al. 2006; Horia and Watkins 2007; Mandal et al. 2010; Corsetto et al. 2012; Wannous et al. 2013). In this study, according to MTT assay (Figure 2) all FA from Antarctic macroalgae showing antitumor activity against both cells, and the inhibition was lower against non-tumor CHO cell line than for the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. The Fatty acids tested showed little or no cytotoxicity against CHO cell line at concentrations up to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results demonstrated that FA from Antarctic macroalgae were selective to tumorigenic cells, furthermore they affected to a lesser proportion the non-tumor CHO cells.

Nevertheless, the percentage of non-viable cells was evaluated by LIVE/DEAD assay (Figure 3). Results showed that the treatment with fatty acids from *A. utricularis* and *S. papillosa* in a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were effective to growth inhibition of tumor cells, resulting in significantly lower number of viable cells after 48 h compared to control untreated cells, a previously described capacity of PUFAs (Barascu et al. 2006). In MCF-7 cell the percentage of non-viable cells was 26.26% to *A. utricularis* and 10.31% to *S. papillosa* compared with 1.5% of control. To MDA-MB-231 cell the results was 21 and 16.5% to *A. utricularis* and *S. papillosa*, respectively. In the literature, was related the inhibition of breast cancer tumor cells by *n*-3 PUFAs (Wannous et al. 2006) as well as other types of cancer (Xia et al. 2006; Zheng et al. 2014; Liu et al. 2015).

Several studies investigated the cytotoxicity induced by fatty acids, mainly *n*-3 PUFA in some types of cancer, such as breast (Kim et al. 2009; Liu et al. 2015), colon (Kato et al. 2007), skin (Rhodes et al. 2003), gastrointestinal (Park et al. 2013), prostate (Gu et al. 2013) and pancreatic (Mohammed et al. 2012), while SFA and MUFA have been found to increase risk of cancer. Moreover, *n*-3 PUFAs could be effective to treatment of side effects of cancer, such as cachexia, cognitive impairment, distress, pain and fatigue (Pottel et al. 2014). Yu et al. (2015) investigated four major types of FA for their possible involvement in pancreatic

cancer. They found evidence that suggests that increased SFAs, MUFAs and *n*-6 PUFAs augmented lipid metabolisms so as to increase the viability of pancreatic cancer cells. In contrast, increased *n*-3 PUFA augmented lipid metabolisms so as to promote pancreatic cancer cell death. It could be explain some of results, since that tested macroalgae samples exhibited different fatty acid profiles and anticancer potential. Furthermore, it has been demonstrated that different types of FA may exert differential impact on many cancer cells by different mechanisms (Terry et al. 2004; Liu et al. 2015; Nielsen et al. 2014). Also, reduction of tumor growth of some types of cancer by the anti-inflammatory eicosanoid prostaglandin D₂ (PGD₂), while pro-inflammatory eicosanoids (derived from *n*-6 PUFA) prostaglandin E₂ (PGE₂) and leukotrienes B₄ and D₄ (LTB₄ and LTD₄) promote tumor growth and metastasis (Wang and Dubois 2010). Our study demonstrated that fatty acids of *A. utricularis* and *S. papillosa* macroalgae from Antarctic region was be able to induce the death cell but not by apoptosis, according to DAPI staining results (Figure 4). Similarly, Shinohara et al. (2015) reported that several fatty-acid derivatives induce autophagic cell death, in human leukemia K562 cells. Despite several *in vivo* and *in vitro* studies assert that FA may inhibit the breast tumor growth, the mechanisms by which cell proliferation or cell death, or both, are affected by *n*-3 PUFA (Schley et al. 2005).

The application of these lipid extracts has significant results for bioassays cytotoxicity. The cold environment of macroalgae lead to the formation of lipid materials with high levels of PUFAs. In the future, these results of fatty acids may be compared with current environmental values and characters may be taken into account. Algae other polar environments under similar conditions also deserve further study of biochemistry and its implications.

Conclusion

Data presented in this paper indicated that the production of polyunsaturated fatty acids is significant in macroalgae from Antarctic. The present study is a part of an environmental program researcher and reports for the first time identification of fatty acid profile of macroalgae *Adenocystis utricularis*, *Sarcothalia papillosa* and *Curdiea racovitzae*. We have showed that macroalgae from Antarctic are a rich source of PUFAs, especially omega-3. Our results demonstrated that fatty acids from Antarctic macroalgae in special for *A. utricularis* and *S. papillosa* were able to induce the growth inhibition in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. Moreover, to non-tumor cell line analysed, the growth inhibition

was significantly lesser than tumor cells. Further studies are necessary to understand how fatty acids interact with cell metabolism and developing future strategies to use them in cancer prevention and therapy.

Acknowledgements

This study had financial and logistic support from the Brazilian Antarctic Program (PROANTAR/MCT/CNPq-No. 23/2009; 64/2013) and Marine of Brazil. Authors are grateful to Brazilian research funding agencies FAPERGS, CNPq and CAPES for financial and fellowship support.

409 **References**

- 410 Argandoña V, Pozo T, San-Martín A, Roviroso J (2000) Insecticidal activity of Plocamium
411 cartilagineum monoterpenes. Bol Soc Chil Quim 45:339-344
- 412 Astorg P (2004) Dietary n – 6 and n – 3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prostate Cancer
413 Risk: A Review of Epidemiological and Experimental Evidence. Cancer Cause Control
414 15:367-386
- 415 Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P, Jourdan ML (2006) CDK1-cyclin B1
416 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231
417 breast cancer cells. Int J Biochem Cell Biol 38:196-208
- 418 Begnini KR, Leon PMM, Thurow H, Schultze E, Campos VF, Rodrigues FM, Borsuk S,
419 Dellagostin OA, Savegnago L, Roesch-Ely M, Moura S, Padilha FF, Collares T, Henriques
420 JAP, Seixas FK (2014) Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis-Like Cell Death and
421 Decreases Migration Potential in Bladder Cancer Cells. Evid Based Complement Alternat
422 Med. doi: 10.1155/2014/639856
- 423 Bhosale RA, Velankar DA, Chaugule BB (2009) Fatty acid composition of the cold-water-
424 inhabiting freshwater red alga *Sirodotia kylin*. J Appl Phycol 21:99-102
- 425 Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J
426 Biochem Phys 37:911-917
- 427 Boopathy NS, Kathiresan K (2010) Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. J
428 Oncol. doi:10.1155/2010/214186
- 429 Brown EM, Allsopp PJ, Magee PJ, Gill CI, Nitecki S, Strain CR, McSorley EM (2014)
430 Seaweed and human health. Nutr Rev 72:205-216
- 431 Cardozo KHM, Guaratini T, Barros, MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S,
432 Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E (2007) Metabolites from algae with economical
433 impact. Comp Biochem Phys C 146:60-78
- 434 Corsetto PA, Cremona A, Montorfano G, Jovenitti IE, Orsini F, Arosio P, Rizzo AM (2012)
435 Chemical-physical changes in cell membrane microdomains of breast cancer cells after
436 omega-3 PUFA incorporation. Cell Biochem Biophys 64:45-59
- 437 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D,
438 Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major
439 patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 136:E359-E386
- 440 Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas
441 FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, Roesch-Ely M (2013) Chemical

- 442 characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. Food Chem
443 Toxicol 52:137-142
- 444 Gambato G, Baroni EG, Garcia CSC, Frassini R, Frozza COS, Moura S, Pereira CMP, Fujii
445 MT, Colepicolo P, Lambert APF, Henriques JAP, Roesch-Ely M (2014) Brown Algae
446 *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) Suppresses Proliferation and
447 Promotes Apoptosis-Mediated Cell Death in Tumor Cells. Adv Biol Chem 4:98-108
- 448 Gerber M (2012) Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of
449 epidemiological studies. Brit J Nutr 107:S228-S239
- 450 Ginzberg A, Cohen M, Sod-Moriah UA, Shany S, Rosenstrauch A, Arad SM (2000) Chickens
451 fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. Have reduced blood cholesterol level
452 and modified fatty acid composition in egg yolk. J Appl Phycol 12:325-330
- 453 Graeve M, Kattner G, Wiencke C, Karsten U (2002) Fatty acid composition of Arctic and
454 Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. Mar Ecol Prog Ser
455 231:67-74
- 456 Gu Z, Suburu J, Chen H, Chen YQ (2013) Mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty
457 acids in prostate cancer prevention. Biomed Res Int. doi: 10.1155/2013/824563
- 458 Guaratini T, Lopes NP, Marinho-Soriano E, Colepicolo P, Pinto E (2012) Antioxidant activity
459 and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis*(Kützinger)
460 Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). Rev Bras Farmacogn 22:724-
461 729
- 462 Guschina IA, Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog Lipid
463 Res 45:160-186
- 464 Hardman WE (2004) (n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy. J Nutr 134:3427S-3430S
- 465 Hobuss CB, Venzke D, Pacheco BS, Souza AO, Santos MAZ, Moura S, Quina FH, Fiametti
466 KG, Oliveira JV, Pereira CMP (2012) Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at
467 room temperature. Ultrason Sonochem 19:387–389
- 468 Horia E, Watkins BA (2007) Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein
469 on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. Carcinogenesis
470 28:809-815
- 471 Kato T, Kolenic N, Pardini RS (2007) Docosahexaenoic acid (DHA), a primary tumor
472 suppressive omega-3 fatty acid, inhibits growth of colorectal cancer independent of p53
473 mutational status. Nutr Cancer 58:178-187

- Kim J, Lim SY, Shin A, Sung MK, Ro J, Kang HS, Lee KS, Kim SW, Lee ES (2009) Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer*. doi: 10.1186/1471-2407-9-216
- Kumari P, Kumar M, Gupta V, Reddy CRK, JHA B (2010) Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem* 120:749-757
- Li X, Fan X, Han L, Lou Q (2002) Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry* 59:157-161
- Liu Z, Hopkins MM, Zhang Z, Quisenberry CB, Fix LC, Galvan BM, Meier KE (2015) Omega-3 fatty acids and other FFA4 agonists inhibit growth factor signaling in human prostate cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 352:380-394
- Los DA, Mironov KS, Allakhverdiev SI (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res* 116:489-509
- Machado LP, Matsumoto ST, Jamal CM, da Silva MB, Centeno DC, Colepicolo P, Carvalho LR, Yokoya NS (2014) Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi. *J Sci Food Agric* 94:1739-1744
- Mandal CC, Ghosh-Choudhury T, Yoneda T, Choudhury GG, Ghosh-Choudhury N (2010) Fish oil prevents breast cancer cell metastasis to bone. *Biochem Biophys Res Commun* 26:602-607
- Martins AP, Yokoya NS, Colepicolo P (2012) Comparison of extraction and transesterification methods on the determination of the fatty acid contents of three Brazilian seaweed species. *Rev Bras Farmacogn* 22:854-860
- Martins CDL, Lhullier C, Ramlov F, Simonassi JC, Gouvea LP, Noernberg M, Maraschin M, Colepicolo P, Hall-Spencer JM, Horta PA (2014) Seaweed chemical diversity: an additional and efficient tool for coastal evaluation. *J Appl Phycol* 26:2037-2045
- Mayer AM, Rodríguez AD, Tagliatela-Scafati O, Fusetani N (2013) Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Drugs* 11:2510-2573
- Mohammed A, Janakiram NB, Brewer M, Duff A, Lightfoot S, Brush RS, Anderson RE, Rao CV (2012) Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids delay progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in Fat-1-p48(Cre/+)-LSL-Kras(G12D/+) mice. *Neoplasia* 14:1249-1259
- Moss CW, Lambert MA, Merwin WH (1974) Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *Appl Microbiol* 28:80-85

- 508 Murray M (2014) ω -3 Polyunsaturated fatty acids and their metabolites as inhibitors of
509 mammalian tumorigenesis. *Phytochem Rev* 13:139-156
- 510 Narayan B, Miyashita K, Hosakawa M (2004) Comparative evaluation of fatty acid
511 composition of different Sargassum (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate
512 and tropical waters. *J Aquat Food Prod Tech* 13:53-70
- 513 Nielsen SD, Amer B, Young JF, Mortensen G, Petersen RK, Kristiansen K, Dalsgaard TK
514 (2014) Medium chain fatty acids from milk induce angiopoietin-like 4 (*ANGPTL4*) gene
515 expression. *Int Dairy J* 42:34-41
- 516 Pacheco BS, Nunes CFP, Rockembach CT, Bertelli P, Mesko MF, Roesch-Ely M, Moura S,
517 Pereira CMP (2014) Eco-friendly synthesis of esters under ultrasound with p-toluenesulfonic
518 acid as catalyst. *Green Chem Lett Rev* 7:265-270
- 519 Park JM, Kwon SH, Han YM, Hahm KB, Kim EH (2013) Omega-3 polyunsaturated Fatty
520 acids as potential chemopreventive agent for gastrointestinal cancer. *J Cancer Prev* 18:201-
521 208
- 522 Petit K, Biard JF (2013) Marine natural products and related compounds as anticancer agents:
523 an overview of their clinical status. *Anticancer Agents Med Chem* 13:603-631
- 524 Pinto E, Carvalho AP, Cardozo KHM, Malcata FX, Anjos FM, Colepicolo P (2011) Effects of
525 heavy metals and light levels on the biosynthesis of carotenoids and fatty acids in the
526 macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* (var. *liui* Zhang & Xia). *Rev Bras Farmacogn* 21:349-
527 354
- 528 Plourde M, Cunnane SC (2007) Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in
529 adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr*
530 *Metab* 32:619-634
- 531 Pottel L, Lycke M, Boterberg T, Foubert I, Pottel H, Duprez F, Goethals L, Debruyne PR
532 (2014) Omega-3 fatty acids: physiology, biological sources and potential applications in
533 supportive cancer care. *Phytochem Rev* 13:223-244
- 534 Rhodes LE, Shahbakhti H, Azurdia RM, Moison RM, Steenwinkel MJ, Homburg MI, Dean
535 MP, McArdle F, Beijersbergen van Henegouwen GM, Epe B, Vink AA (2003) Effect of
536 eicosapentaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, on UVR-related cancer risk in
537 humans. An assessment of early genotoxic markers. *Carcinogenesis* 24:919-925
- 538 Rose DP, Connolly JM (1999) Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents.
539 *Pharmacol Therapeut* 83:217-244

- Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ (2005) Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 92:187-195
- Shinohara H, Taniguchi K, Kumazaki M, Yamada N, Ito Y, Otsuki Y, Uno B, Hayakawa F, Minami Y, Naoe T, Akao Y (2013) Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett.* doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.039
- Siddiqui RA, Harvey KA, Zaloga GP, Stillwell W (2007) Modulation of lipids rafts by ω -3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support. *Nutr Clin Pract* 22:74-88
- Simopoulos AP (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233:674-688
- Sprecher H (2000) Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1486:219-231
- Tang B, Row KH (2013) Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. *J Chromatogr Sci* 51:599-607
- Terry PD, Terry JB, Rohan TE (2004) Long-Chain (n-3) Fatty Acid Intake and Risk of Cancers of the Breast and the Prostate: Recent Epidemiological Studies, Biological Mechanisms, and Directions for Future Research. *J Nutr* 134:3412S–3420S
- Thomas DN, Dieckmann GS (2002) Antarctic Sea Ice—a Habitat for Extremophiles. *Science* 295:641-644
- Torres FAE, Passalacqua TG, Velásquez AMA, Souza RA, Colepicolo P, Graminha MAS (2014) New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Rev Bras Farmacogn* 24:265–276
- Vasconcelos A, Campos VF, Nedel F, Seixas FK, Dellagostin OA, Smith KR, Pereira CMP, Stefanello FM, Collares T, Barschak AG (2013) Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct* 31:289-297
- Wang D, Dubois RN (2010) Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* 10:181-193
- Wannous R, Bon E, Mahéo K, Goupille C, Chamouton J, Bougnoux P, Roger S, Besson P, Chevalier S (2013) PPAR β mRNA expression, reduced by n-3 PUFA diet in mammary tumor, controls breast cancer cell growth. *Biochim Biophys Acta* 1831:1618-1625
- WHO – World Health Organization (2015) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Accessed 13 January 2015

- 574 Wiencke C, Amsler CD (2011) Seaweeds and Their Communities in Polar Regions. In:
 575 Wiencke C, Bischof K (Ed) Seaweed Biology: Novel Insights into Ecophysiology, Ecology
 576 and Utilization, Heidelberg: Springer, pp 265-292
- 577 Wiencke C, Clayton MN, Gómez I, Iken K, Lüder UH, Amsler CD, Karsten U, Hanelt D,
 578 Bischof K, Dunton K (2007) Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar
 579 waters. *Rev Environ Sci Biotechnol* 6:95-126
- 580 Wulff A, Iken K, Quartino ML, Al-Handal A, Wiencke C, Clayton MN (2009) Biodiversity,
 581 biogeography and zonation of marine benthic micro- and macroalgae in the Arctic and
 582 Antarctic. *Bot Mar* 52:491-507
- 583 Xia S, Lu Y, Wang J, He C, Hong S, Serhan CN, Kang JX (2006) Melanoma growth is
 584 reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Proc Natl*
 585 *Acad Sci* 103:12499-12504
- 586 Yoneshigue-Valentin Y, Silva IB, Fujii MT, Yokoya NS, Pupo D, Guimarães SMPB, Martins
 587 AP, Sanches PF, Pereira DC, Dalto AG, Souza JMC, Pereira CMP, Pellizzari FM, Colepicolo
 588 P (2013) Marine Macroalgal Diversity in Admiralty Bay, King George Island, South
 589 Shetlands Islands, Antarctica. *INCT-APA Annual Activity Report* 1:140-148
- 590 Yu M, Liu H, Duan Y, Zhang D, Li S, Wang F (2015) Four types of fatty acids exert
 591 differential impact on pancreatic cancer growth. *Cancer Lett.* doi:
 592 10.1016/j.canlet.2015.02.002
- 593 Zheng H, Tang H, Liu M, He M, Lai P, Dong H, Lin J, Jia C, Zhong M, Dai Y, Bai X, Wang
 594 L (2014) Inhibition of endometrial cancer by n-3 polyunsaturated fatty acids in preclinical
 595 models. *Cancer Prev Res* 7:824-834

PARTE IV

5 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi reportado o estudo de composição de ácidos graxos das macroalgas Antárticas *Adenocystis utricularis*, *Sarcothalia papillosa* e *Curdiea racovitzae* e foi avaliado o potencial efeito citotóxico destes compostos em linhagens tumorais de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. A Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (GC-FID) foi a ferramenta empregada para a identificação desses ácidos graxos. Foram identificados 23 ácidos graxos, destacando-se a expressiva proporção de ácidos graxos poli-insaturados encontrados em todas as algas estudadas e valores que variaram de 61,04 a 70,79 % do total de ácidos graxos. Todas as algas estudadas apresentaram satisfatório efeito sob a inibição do crescimento de células tumorais de mama, destacando-se entre elas, as espécies *A. utricularis* e *S. papillosa* em concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após 48 horas de tratamento, que apresentaram valores menores de inibição na linhagem não tumoral CHO quando comparadas às linhagens tumorais. Com base nisto, podemos concluir que as macroalgas *A. utricularis* e *S. papillosa* apresentaram ácidos graxos com potencial citotoxicidade em linhagens tumorais de mama, porém, estudos complementares são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual estes ácidos graxos interagem com o metabolismo celular.

6 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, I.; SAYED, K.; CHEN, Z.; GUO, H. Current Status on Marine Products with Reversal Effect on Cancer Multidrug Resistance. **Marine Drugs**, v. 10, n. 10, p. 2312-2321, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer facts & figures 2014. Atlanta: American Cancer Society, 2014. 40 p.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2014. Atlanta: American Cancer Society, 2014. 72 p.

APPOLINÁRIO, P. P.; DEROGIS, P. B. M. C.; YAMAGUTI, T. H.; MIYAMOTO, S. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1409-1416, 2011.

ARTERBURN, L. M.; OKEN, H. A.; HOFFMAN, J. P.; HALL, E. B.; CHUNG, G.; ROM, D.; HAMERSLEY, J.; MCCARTHY, D. Bioequivalence of docosahexaenoic acid from different algal oils in capsules and in a DHA-fortified food. **Lipids**, v. 42, n. 11, p. 1011-1024, 2007.

ASTORG, P. Dietary n - 6 and n - 3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prostate Cancer Risk: A Review of Epidemiological and Experimental Evidence. **Cancer Causes & Control**, v. 15, n. 4, p. 367-386, 2004.

BEGINI, K. R.; LEON, P. M. M.; THUROW, H.; SCHULTZE, E.; CAMPOS, V. F.; RODRIGUES, F. M.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; SAVEGNAGO, L.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; COLLARES, T.; HENRIQUES, J. A. P.; SEIXAS, F. K. Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis-Like Cell Death and Decreases Migration Potential in Bladder Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, doi: 10.1155/2014/639856, 2014.

BHOSALE, R. A.; VELANKAR, D. A.; CHAUGULE, B. B. Fatty acid composition of the cold-water-inhabiting freshwater red alga *Sirodotia* Kylin. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 1, p. 99-102, 2009.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOOPATHY, N. S.; KATHIRESAN, K. Anticancer agents derived from marine algae. In: DOMÍNGUEZ, H. (Org). **Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals**. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2013. p. 307-337.

BROWN, E. M.; ALLSOPP, P. J.; MAGEE, P. J.; GILL, C. I.; NITECKI, S.; STRAIN, C. R.; MCSORLEY, E. M. Seaweed and human health. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 3, p. 205-216, 2014.

CANDE, S. C.; STOCK, J. M.; MULLER, R. D.; ISHIHARA, T. Cenozoic motion between East and West Antarctica. **Nature**, v. 404, p. 145-150, 2000.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007.

CAVONIUS, L. R.; CARLSSON, N. G.; UNDELAND, I. Quantification of total fatty acids in microalgae: comparison of extraction and transesterification methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 28, p. 7313-7322, 2014.

CHEN, G.; JIANG, Y.; CHEN, F. Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1580-1585, 2007.

CHESTER, T. L.; PINKSTON, J. D. Supercritical Fluid and Unified Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2801-2812, 2002.

CLINICALTRIALS. National Institute of Health. Disponível em <http://www.clinicaltrials.gov/>. Acesso em 30/12/2014.

FAROOQI, A. A.; BUTT, G.; RAZZAQ, Z. Algae extracts and methyl jasmonate anti-cancer activities in prostate cancer: choreographers of 'the dance macabre'. **Cancer Cell International**, v. 12, 2012.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FIOL-DeROQUE, M. A.; LANZA, R. G.; TERÉS, S.; TORRES, M.; BARCELÓ, P.; RIAL, R. V.; VERKHRATSKY, A.; ESCRIBÁ, P. V.; BUSQUETS, X.; RODRÍGUEZ, J. J. Cognitive recovery and restoration of cell proliferation in the dentate gyrus in the 5XFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease following 2-hydroxy-DHA treatment. **Biogerontology**, v. 14, n. 6, p. 763-775, 2013.

FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

GAMBATO, G.; BARONI, E. G.; GARCIA, C. S. C.; FRASSINI, R.; FROZZA, C. O. S.; MOURA, S.; PEREIRA, C. M. P.; FUJII, M. T.; COLEPICOLO, P.; LAMBERT, A. P. F.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M. Brown Algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis-Mediated Cell Death in Tumor Cells. **Advances in Biological Chemistry**, v. 4, p. 98-108, 2014.

GERBER, M. Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of epidemiological studies. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. S228-S239, 2012.

GERBER, M. Omega-3 fatty acids and cancers: a systematic update review of epidemiological studies. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 2, p. S228-S239, 2012.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 85-98, 2012.

GLASER, K. B; MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 440-448, 2009.

GRAEVE, M.; KATTNER, G.; WIENCKE, C.; KARSTEN, U. Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. **Marine Ecology Progress Series**, v. 231, p. 67-74, 2002.

GU, Z.; SUBURU, J.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q. Mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids in prostate cancer prevention. **BioMed Research International**, v. 2013, doi: 10.1155/2013/824563, 2013.

GUEDES, E. A. C.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; BARROS, L. D.; PINOTTI, L. M.; SANT'ANA, A. E. G. Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 668-673, 2013.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160-186, 2006.

HAMMANN, S.; TILLMANN, U.; SCHRÖDER, M.; VETTER, W. Profiling the fatty acids from a strain of the microalgae *Alexandrium tamarense* by means of high-speed counter-current chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1312, p. 93-103, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3427S-3430S, 2004.

HARWOOD, J.L.; GUSCHINA, I. A. The versatility of algae and their lipid metabolism. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 679-684, 2009.

HOMMERSAND, M. H.; MOE, R. L.; AMSLER, C. D.; FREDERICQ, S. Notes on the systematics and biogeographical relationships of Antarctic and sub-Antarctic Rhodophyta with descriptions of four new genera and five new species. **Botanica Marina**, v. 52, n. 6, p. 509-534, 2009.

HOMMERSAND, M. H.; GUIRY, M. D.; FREDERICQ, S.; LEISTER, G. L. New perspectives in the taxonomy of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 260-261, p. 105-120, 1993.

INDUMATHY, S.; DASS, C. R. Finding chemo: the search for marine-based pharmaceutical drugs active against cancer. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 9, p. 1280-1301, 2013.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> Acesso em 29/12/2014.

KATO, T.; KOLENIC, N.; PARDINI, R. S. Docosahexaenoic acid (DHA), a primary tumor suppressive omega-3 fatty acid, inhibits growth of colorectal cancer independent of p53 mutational status. **Nutrition and Cancer**, v. 58, n. 2, p. 178-187, 2007.

KIM, J.; LIM, S. Y.; SHIN, A.; SUNG, M. K.; RO, J.; KANG, H. S.; LEE, K. S.; KIM, S. W.; LEE, E. S. Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 9, doi: 10.1186/1471-2407-9-216, 2009.

KOBAYASHI, N.; NOEL, E. A.; BARNES, A.; ROSENBERG, J.; DIRUSSO, C.; BLACK, P.; OYLER, G. A. Rapid detection and quantification of triacylglycerol by HPLC-ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* Strains. **Lipids**, v. 48, n. 10, p. 1035-1049, 2013.

KUMARI, P.; KUMAR, M.; GUPTA, V.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 749-757, 2010.

LAU, T. Y.; VITTAL, D. F.; CHEW, C. S. Y.; YONG, W. T. L. Antiproliferative Potential of Extracts from Kappaphycus Seaweeds on HeLa Cancer Cell Lines. **Sains Malaysiana**, v. 43, n. 12, p. 1895-1900, 2014.

LEAL, M.C.; MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; PUGA, J.; JESUS, B.; CALADO, R.; ROSA, R.; MADEIRA, C. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 30, p. 1380-1390, 2013.

LIU, L.; LI, Y.; GUAN, C.; LI, K.; WANG, C.; FENG, R.; SUN, C. Free fatty acid metabolic profile and biomarkers of isolated post-challenge diabetes and type 2 diabetes mellitus based on GC-MS and multivariate statistical analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 28, p. 2817-2825, 2010.

LIU, Z.; HOPKINS, M. M.; ZHANG, Z.; QUISENBERRY, C. B.; FIX, L. C.; GALVAN, B. M.; MEIER, K. E. Omega-3 fatty acids and other FFA4 agonists inhibit growth factor signaling in human prostate cancer cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 352, n. 2, p. 380-394, 2015.

LV, W.; YANG, T. Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis. **Clinical Biochemistry**, v. 45, p. 127-133, 2012.

MACLEAN, C. H.; ISSA, A. M.; NEWBERRY, S. J.; MOJICA, W. A.; MORTON, S. C.; GARLAND, R. H.; HILTON, L. G.; TRAINA, S. B.; SHEKELLE, P. G. Effects of omega-3 fatty acids on cognitive function with aging, dementia, and neurological diseases. **Evidence Report/Technology Assessment**, v. 114, p. 1-3, 2005.

MARINHO-SORIANO, E.; PINTO, E.; YOKOYA, N. S.; COLEPICOLO, P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Frontiers on algae bioactive compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 200-201, 2011.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; MCINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

McCANN, J. C.; AMES, B. N. Is docosahexaenoic acid, an n3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 2, p. 281-295, 2005.

MOHAMMED, A.; JANAKIRAM, N. B.; BREWER, M.; DUFF, A.; LIGHTFOOT, S.; BRUSH, R. S.; ANDERSON, R. E.; RAO, C. V. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids delay progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in Fat-1-p48(Cre/+)-LSL-Kras(G12D/+) mice. **Neoplasia**, v. 14, n. 12, p. 1249-1259, 2012.

MORALE, S. E.; HOFFMAN, D. R.; CASTAÑEDA, Y. S.; WHEATON, D. H.; BURNS, R. A.; BIRCH, E. E. Duration of long-chain polyunsaturated fatty acids availability in the diet and visual acuity. **Early Human Development**, v. 81, n. 2, p. 197-203, 2005.

MORI, T. A.; WOODMAN, R. J. The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 9, n. 2, p. 95-104, 2006.

MÜHLEN, C.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.

MÜLLER, R.; LAEPPE, T.; BARTSCH, I.; WIENCKE, C. Impact of oceanic warming on the distribution of seaweeds in polar and cold-temperate waters. **Botanica Marina**, v. 52, n. 6, p. 617-638, 2009.

MURAI, T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. **Biological Chemistry - Walter de Gruyter**, v. 396, n. 1, p. 1-11, 2015.

MURFF, H. J.; SHU, X.; LI, H.; YANG, G.; WU, X.; CAI, H.; WEN, W.; GAO, Y.; ZHENG, W. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Breast Cancer Risk in Chinese Women: A Prospective Cohort Study. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 6, p. 1434-1441, 2011.

MURRAY M. ω -3 Polyunsaturated fatty acids and their metabolites as inhibitors of mammalian tumorigenesis. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 139-156, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NUNEZ, B. R.; KUIPERS, R. S.; LUXWOLDA, M. F.; GRAAF, D. J.; BREEUWSMA, B. B.; BROUWER, D. A. J. D.; MUSKIET, F. A. J. Saturated fatty acid (SFA) status and SFA intake exhibit different relations with serum total cholesterol and lipoprotein cholesterol: a mechanistic explanation centered around lifestyle-induced low-grade inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 304-312, 2014.

PAREJA, F. B.; LEÓN, J. B.; VEJA, S.; MEDRANO, M. J.; ROMÁN, G. C. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 264, n. 1-2, p. 63-72, 2008.

PARK, J. M.; KWON, S. H.; HAN, Y. M.; HAHM, K. B.; KIM, E. H. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids as potential chemopreventive agent for gastrointestinal cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 3, p. 201-208, 2013.

PELLICCIA, F.; MARAZZI, G.; GRECO, C.; FRANZONI, F.; SPEZIALE, G.; GAUDIO, C. Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs. **International Journal of Cardiology**, v. 170, p. S3-S7, 2013.

PETIT, K.; BIARD, J. F. Marine natural products and related compounds as anticancer agents: an overview of their clinical status. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 603-631, 2013.

PROANTAR - PROGRAMA ANTÁRTICO BRASILEIRO. Disponível em <https://www.mar.mil.br/secirm/proantar.html> Acesso em 26/12/2014.

QUARTINO, M. L.; ZAIXSO, H. E.; ZAIXSO, A. L. B. Biological and environmental characterization of marine macroalgal assemblages in Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. **Botanica Marina**, v. 48, p. 187-197, 2005.

RAGONESE, C.; TEDONE, L.; BECCARIA, M.; TORRE, G.; CICHELO, F.; CACCIOLA, F.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Characterisation of lipid fraction of marine macroalgae by means of chromatography techniques coupled to mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 145, p. 932-940, 2014.

RAPOPORT, S. I.; CHANG, M. C. J.; SPECTOR, A. A. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 5, p. 678-685, 2011.

RHODES, L. E.; SHAHBAKHTI, H.; AZURDIA, R. M.; MOISON, R. M.; STEENWINKEL, M. J.; HOMBURG, M. I.; DEAN, M. P.; MCARDLE, F.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M.; EPE, B.; VINK, A. A. Effect of eicosapentaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, on UVR-related cancer risk in humans. An assessment of early genotoxic markers. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 5, p. 919-925, 2003.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M.; Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 3, p. 217-244, 1999.

RUSSO, G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 533-544, 2007.

SBPPC - Sociedade Brasileira de Profissionais em Pesquisa Clínica. Disponível em <http://www.sbppc.org.br/site/> Acesso em 21/12/2014.

SCHWENK, D.; SEPPÄLÄ, J.; SPILLING, K.; VIRKKI, A.; TAMMINEN, T.; CALDENTEY, K. M. O.; RISCHER, H. Lipid content in 19 brackish and marine

microalgae: influence of growth phase, salinity and temperature. **Aquatic Ecology**, v. 47, n. 4, p. 415-424, 2013.

SIDDIQUI, R. A.; HARVEY, K. A.; ZALOGA, G. P.; STILLWELL, W. Modulation of lipids rafts by ω -3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 22, n. 1, p. 74-88, 2007.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 6, p. 674-688, 2008.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated *n*-3 and *n*-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, n. 2-3, p. 219-231, 2000.

TERRY, P. D.; TERRY, J. B.; ROHAN, T. E. Long-Chain (n-3) Fatty Acid Intake and Risk of Cancers of the Breast and the Prostate: Recent Epidemiological Studies, Biological Mechanisms, and Directions for Future Research. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3412S-3420S, 2004.

THAKUR, N. L.; JAIN, R.; NATALIO, F.; HAMER, B.; THAKUR, A. N.; MÜLLER, W. E. G. Marine molecular biology: An emerging field of biological sciences. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 233-245, 2008.

THOMAS, D. N.; DIECKMANN, G. S. Antarctic Sea Ice—a Habitat for Extremophiles. **Science**, v. 295, n. 5555, p. 641-644, 2002.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e a química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIEIRA, F. B. O Tratado da Antártica: perspectivas territorialista e internacionalista. **Cadernos PROLAM/USP**, v. 2, n. 5, p. 49-82, 2006.

WANG, D.; SUN, C.; LIU, L.; SUN, X.; JIN, X.; SONG, W.; LIU, X.; WAN, X. Serum fatty acid profiles using GC-MS and multivariate statistical analysis: potential biomarkers of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 6, p. 1057-1066, 2012.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 13/01/2015.

WIENCKE, C.; AMSLER, C. D. Seaweeds and Their Communities in Polar Regions. In: WIENCKE, C.; BISCHOF, K. (Org). **Seaweed Biology: Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization**. Heidelberg: Springer, 2011. p. 265-292.

WUEST, M. M.; GERMAN, J. B.; HARVEY, D. J.; WATKINS, S. M.; PICCIOTTO, I. H. Plasma fatty acid profiles in autism: A case-control study. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids**, v. 80, n. 4, p. 221-227, 2009.

WU, L.; ROE, C. L.; WEN, Z. The safety assessment of *Pythium irregulare* as a producer of biomass and eicosapentaenoic acid for use in dietary supplements and food ingredients. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7579-7585, 2013.

WULFF, A.; IKEN, K.; QUARTINO, M. L.; AL-HANDAL, A.; WIENCKE, C.; CLAYTON, M. N. Biodiversity, biogeography and zonation of marine benthic micro- and macroalgae in the Arctic and Antarctic. **Botanica Marina**, v. 52, n. 6, p. 491-507, 2009.

YU, W. L.; ANSARI, W.; SCHOEPP, N. G.; HANNON, M. J.; MAYFIELD, S. P.; BURKART, M. D. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 91, p. 1-11, 2011.

ZHANG, Y.; QIU, L.; WANG, Y.; QIN, X.; LI, Z. High-throughput and high-sensitivity quantitative analysis of serum unsaturated fatty acids by chipbased nanoelectrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Early stage diagnostic biomarkers of pancreatic cancer. **Analyst**, v. 139, n. 7, p. 1697-1706, 2014.

ZIENLINSKI, K. Bottom macroalgae of the Admiralty Bay (King George Island, South Shetlands, Antarctica). **Polish Polar Research**, v. 11, p. 95-131, 1990.