



*Avaliação da capacidade citotóxica de macroalgas da costa de
Peniche (Portugal) em células tumorais humanas*

Celso Miguel da Maia Alves

2011



*Avaliação da capacidade citotóxica de macroalgas da costa de
Peniche (Portugal) em células tumorais humanas*

Celso Miguel da Maia Alves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Rui Pedrosa

2011

Titulo: Avaliação da capacidade citotóxica de macroalgas da costa de Peniche (Portugal) em células tumorais humanas.

Copyright © Celso Miguel da Maia Alves

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais e irmão,
À Joana,
À memória de Luís Vala

Agradecimentos

A dissertação de mestrado aqui apresentada é o culminar de um trabalho que só foi possível devido ao empenho, dedicação e sacrifício de inúmeras pessoas, que de uma forma ou outra, tiveram um papel muito importante. Como tal, gostaria de agradecer:

Ao Doutor Rui Pedrosa, orientador científico desta tese, que me acompanhou ao longo deste trabalho contribuindo de forma exemplar para minha formação científica e pessoal, permitindo-me adquirir as mais variadas competências. Pelo seu profissionalismo, espírito crítico e bom humor, um muito obrigado.

Ao Professor Doutor Patrício Soares-da-Silva, Diretor do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina do Porto pela sua colaboração que foi fundamental para a realização de uma parte deste trabalho.

A todos os meus amigos e companheiros de mestrado, pelos grandes momentos que passamos ao longo destes dois anos.

À professora Susana Mendes e ao Professor Marco lemos, pela sua preocupação e pela palavra amiga que tinham sempre à “mão”.

Ao meu grande amigo Luís Vala, que já não se encontra entre nós devido a uma partida da vida, mas que foi uma fonte de inspiração constante ao longo de todo este trabalho, por todas as qualidades que o caracterizavam.

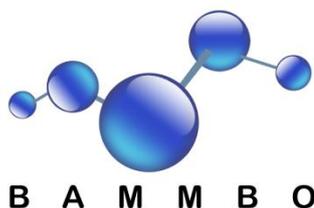
À Susete, ao André, ao Hugo, à Inês e a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta participaram na realização deste trabalho.

Aos técnicos Cristina Salas, Inês Barros, Pedro Ramalho e Vera Severiano que foram incansáveis, sempre que os solicitei.

Aos meus pais, ao meu irmão, à Joana e aos restantes familiares pela compreensão, pelo carinho e pelo apoio incondicional que demonstraram para comigo ao longo deste tempo, sem eles este percurso teria sido mais difícil.

A todos um muito obrigado!!!

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto europeu BAMMBO suportado pelo 7º programa quadro (FP7). Todos os ensaios realizados neste trabalho foram financiados por este projeto.



Até ao momento, deste trabalho resultaram duas comunicações orais em congressos internacionais e uma publicação em forma de resumo na revista científica “Current Opinion in Biotechnology”:

Comunicações orais:

- **Alves C.**, Pintéus S., Rodrigues A., Gomes A., Marques C. and Pedrosa R. (2010). “*S. coronopifolius* induced cytotoxicity against Caco-2 cells”. *International Meeting on Marine Resources*, 16-17 novembro, Peniche, Portugal.
- **Alves C.**, Pintéus S., Rodrigues A. and Pedrosa R. (2011). “*Sphaerococcus coronopifolius* and *Asparagopsis armata* induced cytotoxicity against HepG-2 cell line”. *European Biotechnology Congress*, 28 de setembro a 1 de outubro, Istanbul, Turquia.

Publicação:

Alves, C., Pintéus, S., Rodrigues, A., Pedrosa, R. (2011). *Sphaerococcus coronopifolius* and *Asparagopsis armata* induced cytotoxicity against HEPG2 cell line. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 44-45.

Resumo

Os tumores malignos são uma das maiores causas de morte em humanos, podendo tornar-se na primeira causa de morte nos países desenvolvidos em 2015. Os organismos marinhos produzem moléculas bioativas, normalmente como metabolitos secundários em resposta a pressões ecológicas. Estudos anteriores têm demonstrado que estes organismos são uma fonte importante de novas moléculas com potencial farmacológico contra o cancro. Neste trabalho foi avaliado o potencial antitumoral de doze algas da costa de Peniche em células do adenocarcinoma colorectal humano (Caco-2) e do carcinoma hepatocelular humano (HepG-2). As algas estudadas foram *Fucus spiralis*, *Halopteris filicina*, *Saccorhiza polyschides*, *Stypocaulon scoparium*, *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum*, *Ceramium ciliatum*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Codium adhaerens*, *Codium tomentosum*, *Codium vermilara* e *Ulva compressa*.

A extração dos compostos bioativos foi realizada com solventes de diferente polaridade (metanol, diclorometano e n-Hexano). O potencial antitumoral das frações metanólica e diclorometano foi testado nas linhas celulares Caco-2 e HepG-2 através de ensaios de citotoxicidade e proliferação celular. Os resultados foram obtidos pela realização de ensaios espectrofotométricos, método do 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), e por ensaios fluorimétricos, método de calceína-AM.

As algas que exibiram maior potencial citotóxico pela redução da viabilidade celular ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 24h) foram as mesmas para linha celular Caco-2 e HepG-2, a alga *A. armata*, *F. spiralis* e *S. coronopifolius*, com a exceção da fração diclorometano da *P. cartilagineum* que exibiu maior efeito nas células Caco-2 ($9,77 \pm 2,28\%$ células viáveis). Na fração metanólica observaram-se efeitos citotóxicos marcados para as algas *F. spiralis* ($23,68 \pm 2,93\%$ de células Caco-2 viáveis; $44,04 \pm 5,44\%$ de células HepG-2 viáveis), *A. armata* ($7,32 \pm 1,17\%$ de células Caco-2 viáveis; $11,22 \pm 2,98\%$ de células HepG-2 viáveis) e *S. coronopifolius* ($3,53 \pm 1,26\%$ de células Caco-2 viáveis; $14,04 \pm 2,62\%$ de células HepG-2 viáveis). Na fração diclorometano as algas *A. armata* ($1,04 \pm 0,39\%$ de células Caco-2 viáveis; $1,51 \pm 0,38\%$ de células HepG-2 viáveis) e *S. coronopifolius* ($1,92 \pm 0,89\%$ de células Caco-2 viáveis; $12,84 \pm 3,82\%$ de células HepG-2 viáveis) foram as mais citotóxicas. Todos os efeitos observados foram dependentes da concentração. A fração diclorometano da alga *S. coronopifolius* demonstrou ser a mais potente na redução

da viabilidade das células Caco-2 e HepG-2, com IC_{50} de 21,3 e 14,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respetivamente.

Na proliferação celular, as frações metanólicas (1mg m^{-1} , 24h) que apresentaram maiores efeitos de inibição nas linhas tumorais utilizadas foram a *A. armata* ($24,32 \pm 7,56\%$ de células Caco-2; $43,42 \pm 7,69\%$ de células HepG-2) e *S. coronopifolius* ($34,84 \pm 4,45\%$ de células Caco-2; $44,87 \pm 3,64\%$ de células HepG-2) para ambas as linhas celulares e a *F. spiralis* ($44,60 \pm 6,75\%$ de células), apenas para as células HepG-2. Na fração diclorometano (1mg m^{-1} , 24h) a *A. armata* ($0 \pm 0,48\%$ de células Caco-2; $1,44 \pm 0,81\%$ de células HepG-2), *P. cartilagineum* ($4,95 \pm 1,19\%$ de células Caco-2; $14,87 \pm 1,04\%$ de células HepG-2) e *S. coronopifolius* ($0,96 \pm 0,51$ de células Caco-2; $0,39 \pm 0,27\%$ de células HepG-2) exibiriam o maior efeito de inibição na proliferação celular das células Caco-2 e HepG-2. Todos os efeitos observados foram dependentes da concentração. A fração diclorometano da *S. coronopifolius* exibiu o efeito mais potente sobre a proliferação das células Caco-2 e HepG-2, com um IC_{50} de 36,5 e 32,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respetivamente.

Conclui-se que as algas *Asparagopsis armata*, *Fucus spiralis*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius* produzem moléculas bioativas com elevado potencial antitumoral contra as células Caco-2 e HepG-2, sendo portanto uma fonte promissora de novos compostos com aplicação terapêutica no cancro.

Palavras-chave: Caco-2, HepG-2; Algas; Citotoxicidade, Potencial antitumoral.

Abstract

The malignant tumors are one of the major causes of death in humans and cancer-related death will be ranked first on industrialized countries in 2015. Several marine organisms produce bioactive molecules, normally as secondary metabolites to defend themselves from ecological pressures. Moreover, earlier studies have demonstrated that marine biocompounds are an important source of new therapeutic drugs against cancer.

The aim of this study was to evaluate the antitumoral potential of the different seaweeds from Peniche coast against two “*in vitro*” carcinoma model, the human colorectal adenocarcinome (Caco-2) and a human hepatocellular liver cell line (HepG-2). The seaweeds studied were *Fucus spiralis*, *Halopteris filicina*, *Saccorhiza polyschides*, *Stypocaulon scoparium*, *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum*, *Ceramium ciliatum*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Codium adhaerens*, *Codium tomentosum*, *Codium vermilare* e *Ulva compressa*.

The extraction of bioactive compounds was done by solvents with different polarities (methanol, dichloromethane, n-Hexane). The antitumoral potential was evaluated by following decreases on cell viability and cell proliferation studies induced by the methanolic and dichloromethane fractions. This studies were performed according to the 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and calcein-AM method.

A. armata, *F. spiralis* and *S. coronopifolius* extracts (1mg.ml⁻¹, 24h) induced the highest decreases on cell viability on Caco-2 and HepG-2 cell lines. By contrast, *P. cartilagineum* only showed high effects on that Caco-2 cells (9,77 ± 2,28% viable cells). The methanolic fraction of *F. spiralis* (23,68 ± 2,93% of Caco-2 live cells; 44,04 ± 5,44% of HepG-2 live cells), *A. armata* (7,32 ± 1,17% of Caco-2 live cells; 11,22 ± 2,98% of HepG-2 live cells) and *S. coronopifolius* (3,53 ± 1,26% of Caco-2 live cells; 14,04 ± 2,62% of HepG-2 live cells) induced high cytotoxicity. Although we only observed high cytotoxicity potential on *A. armata* (1,04 ± 0,39% of Caco-2 live cells; 1,51 ± 0,38% of HepG-2 live cells) and *S. coronopifolius* (1,92 ± 0,89% of Caco-2 live cells; 12,84 ± 3,82% of HepG-2 live cells) dichloromethane fraction.. All this effects were concentration dependent. The dichloromethane fraction extracts of *S. coronopifolius* showed the highest cytotoxicity potency against both Caco-2 and HepG-2 cells, with IC₅₀ of 21,3 µg ml⁻¹ and 14,1 µg ml⁻¹, respectively.

The metanolic fractions (1mg ml⁻¹, 24h) of *A. armata* (24,32 ± 7,56% of Caco-2 cells; 43,42 ± 7,69% of HepG-2 cells) and *S. coronopifolius* (34,84 ± 4,45% of Caco-2

cells; $44,87 \pm 3,64\%$ of HepG-2 cells) showed antiproliferative effects on Caco-2 and HepG-2 cells. By contrast, *F. spiralis* ($44,60 \pm 6,75\%$ of cells) extracts only reduced the HepG-2 proliferation. The dichloromethane fraction (1mg ml^{-1} , 24h) of *A. armata* ($0 \pm 0,48\%$ of Caco-2 cells ; $1,44 \pm 0,81\%$ of HepG-2 cells), *P. cartilagineum* ($4,95 \pm 1,19\%$ of Caco-2 cells; $14,87 \pm 1,04\%$ of HepG-2 cells) and *S. coronopifolius* ($0,96 \pm 0,51$ of Caco-2 cells; $0,39 \pm 0,27\%$ of HepG-2 cells) exhibited the highest decrease on Caco-2 and HepG-2 cell proliferation. All these effects were concentration dependent. The dichloromethane fraction of *S. coronopifolius* exhibited the highest antiproliferative potential against Caco-2 and HepG-2 cells, with IC_{50} of $36,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $32,3 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively.

It is concluded that the extracts of *Asparagopsis armata*, *Fucus spiralis*, *Plocamium cartilagineum* and *Sphaerococcus coronopifolius* produce compounds with high antitumoral potential against Caco-2 and HepG-2 cells. These algae are promising sources for new molecules with application on cancer therapeutics.

Key words: Caco-2; HepG-2; Seaweeds; Cytotoxicity; Antitumoral potential

Índice

	Páginas
Resumo	xi
Abstract	xv
1. Introdução	1
1.1. Biodiversidade dos Oceanos	4
1.2. Organismos marinhos como fonte de compostos de bioativos	5
1.3. Regulação do ciclo celular e cancro	8
1.4. Papel dos organismos marinhos no desenvolvimento de novos fármacos na terapêutica do cancro	12
1.5. Metodologias para avaliação da bioatividade e citotoxicidade	14
2. Objetivos	17
2.1. Objetivos Específicos	19
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Recolha e preparação de amostras	23
3.2. Preparação dos extratos das amostras	23
3.3. Avaliação do potencial citotóxico	24
3.3.1. Ensaio de proliferação celular e viabilidade celular nas células Caco-2 e HepG-2	24
3.3.1.1 Método de 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	25
3.3.1. 2. Método de calceína – AM	26
3.4. Análise estatística	27
4. Resultados	29
4.1. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de algas sobre os modelos celulares Caco-2 e HepG-2	31
4.1.1. Ensaios de citotoxicidade realizados no modelo celular Caco-2	31

	Páginas
4.1.1.1. Efeitos de toxicidade dos extratos de algas na linha celular Caco-2	31
4.1.1.2. Efeito dos extratos de algas sobre a proliferação celular das células Caco-2	37
4.1.2. Ensaio de citotoxicidade realizados no modelo celular HepG-2	43
4.1.2.1. Efeitos de toxicidade dos extratos de algas na linha celular HepG-2	43
4.1.2.2. Efeitos dos extratos de algas sobre a proliferação celular das células HepG-2	49
5. Discussão e Conclusão	55
6. Perspetivas Futuras	65
7. Referências Bibliográficas	69

Introdução



1. Introdução

Historicamente os produtos naturais têm desempenhado um papel extremamente importante na medicina, sendo este facto evidente pelo elevado número de produtos desta origem atualmente utilizados na terapêutica de diferentes patologias. (Amador *et al.*, 2003). A importância e o uso dos produtos naturais tiveram e ainda têm as plantas como fonte predominante. Na realidade, estas foram, durante milhares de anos, a base da medicina tradicional. Ainda hoje, a medicina tradicional continua a ter uma função fulcral em muitos países, devido a diversos fatores tais como o aumento da população, a distribuição desigual de medicamentos e os elevados custos dos tratamentos. As estimativas mundiais indicam que 80% da população mundial não tem acesso aos produtos da indústria farmacêutica ocidental dependendo do uso de medicamentos tradicionais, que são principalmente derivados de plantas (Joy *et al.*, 1998; Buss e Butler, 2010).

De facto, os produtos derivados de plantas têm dominado a farmacologia humana durante milhares de anos (Schmidt *et al.*, 2010), exibindo um papel extremamente importante no tratamento e prevenção de doenças em todo o mundo (Joy *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2009). Este tratamento associado ao comportamento cultural e conhecimento tradicional, despertou interesse da comunidade científica na exploração da natureza como fonte de produtos naturais com potencial farmacêutico. A interação entre os cientistas e os povos locais (possuidores do conhecimento empírico sobre as plantas), possibilitou recolher informações relevantes acerca de plantas com potencial terapêutico, permitindo que o conhecimento empírico fosse testado cientificamente (Oubre *et al.*, 1997; Sher *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2010).

A natureza revelou-se deste modo ser uma fonte atrativa para a descoberta de novos compostos, devido à tremenda diversidade química encontrada nos milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos (Oubre *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 2001). Durante muitos anos a maioria dos esforços para esta pesquisa centrou-se essencialmente nas plantas superiores, devido ao seu fácil acesso, no entanto durante a década de 50, “emergiram” os oceanos como potencial fonte de produtos naturais com atividade biológica (compostos bioativos), que até aí tinha escapado ao interesse dos cientistas, principalmente devido ao difícil acesso às suas profundidades. Até esta altura a recolha de organismos marinhos era limitado à zona localizada entre marés e à zona infralitoral. O aparecimento de equipamentos de mergulho seguros e o desenvolvimento de

submersíveis tripulados (ROV's) veio permitir uma maior exploração dos oceanos e a descoberta de novos produtos (Pietra, 2002; Amador *et al.*, 2003; Costa-Lotufó *et al.*, 2009).

1.1. Biodiversidade dos oceanos

Ao longo dos séculos os oceanos têm sido uma fonte de grande mística e volatilidade para a humanidade. Desde muito cedo que o ser humano começou a utilizar este recurso para navegar em busca de novas fontes de alimento e novos territórios, contudo o início da exploração do fundo do mar só se deu em meados do século XIX e somente nas últimas décadas a investigação científica começou a mostrar as potencialidades deste recurso (Warner, 2009). Os oceanos são um recurso verdadeiramente global, apresentando-se como o maior bioma do planeta, totalizando 361 milhões Km², uma profundidade média de 3.730 m e cobrindo cerca de 71% da superfície do planeta (Craig, 2005; Duarte, 2006). As características físicas deste imenso corpo de água afeta direta ou indiretamente o cotidiano da população mundial e os organismos vivos que neste habitam são importantes fontes de alimentos e produtos naturais. Além de desempenhar funções importantes, por exemplo como “motor solar” de elevada potência que impulsiona vários padrões climáticos, os oceanos possuem também uma elevada diversidade química e biológica (Pomponi, 2001; Targett *et al.*, 2002; Donia e Hamann, 2003; Simmons *et al.*, 2005; Karleskint *et al.*, 2010). Este recurso representa a última grande expansão do planeta a ser explorado e cartografado (Karleskint *et al.*, 2010).

A diversidade biológica (biodiversidade) tem-se revelado uma fonte única de compostos químicos com potencial para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentar e agroquímica, demonstrando ser um fator vital para a descoberta de novos produtos (Minh *et al.*, 2005). Partindo deste pressuposto, pela imensa biodiversidade biológica, os oceanos mostram ser uma fonte extremamente atrativa para a descoberta de novos produtos. Presentemente sabe-se que a diversidade de níveis taxonômicos (Filos e classes) é muito maior no ambiente marinho do que no ambiente terrestre ou no ambiente de água doce. Atualmente, dos 82 Filos eucariotas reconhecidos, aproximadamente 60 têm representantes marinhos. A representação de eucariotas de água doce de terrestres apenas tem representação em, aproximadamente 40 Filos (Grombridge e Jenkins, 2002). Esta diferença acentua-se quando se observa os Filos animais em que dos 33 Filos descritos em 1995 pela

UNEP (United Nations Environment Programme), 32 observam-se no mar, 15 são exclusivamente marinhos, 5 são maioritariamente marinhos e apenas 1 é exclusivamente terrestre (Allsopp *et al.*, 2009).

Apesar da enorme biodiversidade evidenciada, apenas se encontram descritas 300 000 (aproximadamente) espécies marinhas, correspondendo a 15% de todas as espécies atualmente relatadas. Como consequência, mesmo para uma ordem de magnitude, o número total de espécies marinhas não é conhecido, existindo estimativas que sugerem um intervalo entre às 178 000 e os 10 milhões de espécies (Sala e Knowlton, 2006). Atualmente, pode-se dizer que a exploração da biodiversidade do ecossistema terrestre está numa fase em que as formas dominantes de vida já se encontram descritas. Por outro lado, a exploração da biodiversidade marinha ainda está numa fase inicial. Muitos cientistas acreditam que o oceano terá uma maior biodiversidade do que a terra, uma vez que muito da vida marinha ainda é desconhecido e porque, o oceano tem uma capacidade 100 vezes maior para a existência de vida. Existem alguns exemplos que sustentam esta convicção, tais como os dois maiores depositários da biodiversidade marinha, os recifes de corais, uma vez que apresentam um elevado número de espécies por unidade de área e os fundos do oceano profundo devido à sua elevada área (Gray, 1997; Sala e Knowlton, 2006). Inicialmente os cientistas pensavam que os fundos do oceano profundo seriam pobres biologicamente, contudo suportam uma diversidade de espécies que pode rivalizar com as florestas tropicais (Thorne-Miller, 1999). Deste modo, os oceanos revelam-se ser um grande desafio para os cientistas, conduzindo-os a exploração da sua biodiversidade, dos seus processos biogeoquímicos e das características físicas deste ambiente vasto e complexo.

1.2. Organismos marinhos como fonte de compostos bioativos

Os oceanos oferecem ambientes e ecossistemas únicos para o crescimento de vida, dando aos organismos marinhos características únicas e mecanismos de adaptação que geralmente não estão presentes nos organismos terrestres (Demunshi e Chugh, 2009). Ao contrário destes, os organismos marinhos necessitam de adaptar-se a condições ambientais extremas, tais como baixas concentrações de nutrientes, pressões altas, concentrações elevadas de sal, baixo conteúdo em oxigénio e pouca luz solar. Para minimizar estas condições os organismos marinhos possuem características únicas que os diferenciam dos

organismos terrestres em muitos aspetos como o comportamento, o metabolismo e a estratégia de adaptação (Hu *et al.*, 2011). Além das pressões físicas acima referidas os organismos marinhos também estão sujeitos a pressões ecológicas como por exemplo a competição pelo espaço e a predação, levando-os a desenvolver estratégias que permitam a sua sobrevivência, tais como atitudes comportamentais, processos físicos ou químicos.

Os processos químicos consistem basicamente na produção de moléculas tóxicas pelo organismo que sirvam para sua defesa face a potenciais ameaças. Independentemente de cada espécie, as moléculas químicas que desempenham um papel importante nas interações interespecíficas raramente são as mesmas substâncias usadas pelo organismo para responder a grandes necessidades do dia a dia como, a respiração, digestão, excreção e no caso específico das plantas a fotossíntese. Estes químicos desempenham nas plantas e nos animais um papel mais de carácter secundário, no entanto geralmente são derivados de metabolitos que participam nos processos fisiológicos primários. A sua distribuição biológica normalmente é limitada, muitas vezes específica de uma espécie e a sua produção ocorre normalmente por organismos que desempenham intervenções em interações ecológicas. Por exemplo, este tipo de moléculas é raro nos organismos do topo da cadeia, uma vez que a probabilidade de serem consumidos é muito baixa. Por outro lado os organismos com limitações de movimento num dado espaço ou com um controlo limitado dos seus movimentos e que não conseguem fugir de potenciais predadores, representam a maioria dos organismos com este tipo de defesas. As algas e os invertebrados marinhos sésseis como as esponjas, tunicatos, briozoários, poliquetas, equinodermes e corais são um claro exemplo de organismos com elevada capacidade de produzir este tipo de moléculas (Eisner e Meinwald, 1995; Amsler, 2008).

Nos últimos anos como consequência de uma procura crescente por novos produtos naturais com interesse para diferentes áreas, como por exemplo a alimentar, a cosmética e a farmacêutica, existe um maior interesse pelos organismos marinhos (Duan *et al.*, 2006; Shanmughapriya *et al.*, 2008). Muitos destes são produtores de moléculas bioativas através do seu metabolismo secundário, de modo a responder a diferentes pressões ecológicas como a competição pelo espaço, dissuasão de práticas predatórias e a capacidade de reprodução com sucesso (Donia e Hamann, 2003; Salvador *et al.*, 2007; -Villarreal-Gómez *et al.*, 2010). Foi já demonstrado que estas moléculas podem possuir diferentes atividades biológicas como antimicrobiana, antifúngica, anticoagulante, antitumoral, antioxidante, etc (Mayer e Gustafson, 2008).

Ao longo das últimas décadas tem ocorrido um aumento do número de moléculas naturais isoladas a partir de organismos marinhos, existindo um aumento de ano para ano. O aumento da exploração de organismos marinhos para a obtenção de novos produtos tem sido coincidente com a invenção e desenvolvimento de tecnologia, nomeadamente do espectrómetro de ressonância magnética nuclear de alta resolução (meados da década 70), que veio desempenhar um papel chave na elucidação da estrutura dos produtos naturais marinhos (Hu *et al.*, 2011). Desde da década de 1970 (Figura 1), mais de 15.000 estruturas de novos produtos naturais foram descobertos a partir de microrganismos, algas e invertebrados marinhos, exibindo uma espantosa variedade de atividades biológicas (Jimenez *et al.*, 2009).

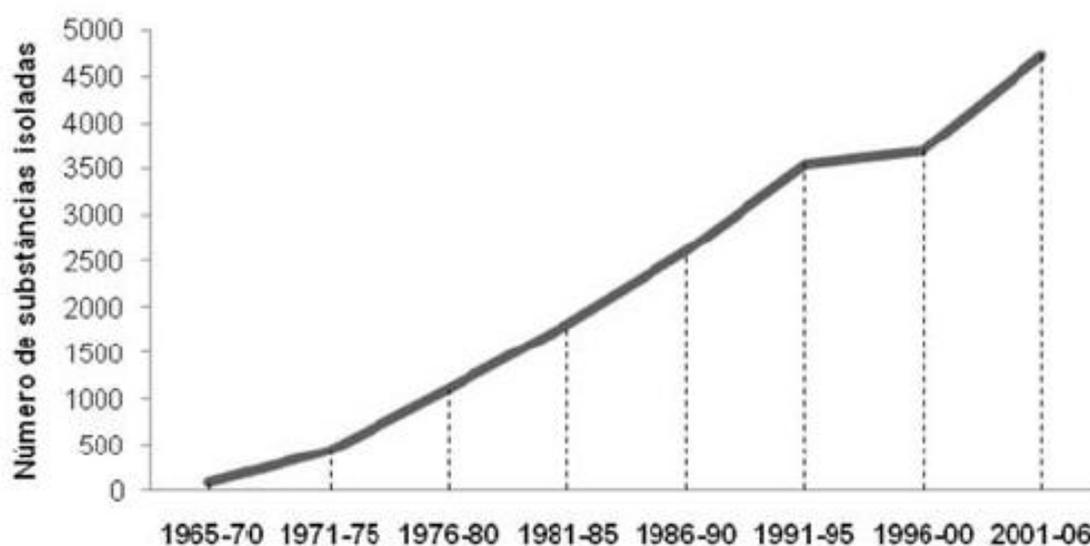


Figura 1. Tendência temporal do número de novos produtos naturais obtidos a partir de organismos marinhos (Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

Ao longo das últimas décadas as algas têm despertado o interesse de muitos cientistas, uma vez que representam um conjunto de organismos fotossintéticos muito diverso quanto à sua organização, origem, características morfológicas, fisiológicas e ecológicas, podendo ser simples células microscópicas ou organismos multicelulares de grandes dimensões (Ibrahim *et al.*, 2005; Riviers, 2006). Estes organismos têm ganho importância como componente integral dos ecossistemas marinhos, uma vez que são a base da cadeia alimentar e fornecem um habitat para uma enorme diversidade de organismos que habitam na zona intertidal e subtidal. De igual modo também têm ganho cada vez mais

importância económica, em grande parte devido a expansão da indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, onde os produtos oriundos de algas têm um lugar proeminente (Denny e Gaines, 2007; Yasuhara-Bell *et al.*, 2010). As algas marinhas que se encontram nas praias rochosas podem ser classificadas por, Filos, em Chlorophytas (algas verdes), Heterokontophytas (algas castanhas) e Rhodophytas (algas vermelhas). Esta divisão baseia-se na diversidade e quantidade de pigmentos característicos que cada espécie usa para captar e dissipar a energia da luz além da clorofila *a*, por exemplo outras clorofilas, carotenoides e biloproteínas (Denny e Gaines, 2007; Steele *et al.*, 2009).

De facto, as algas oferecem uma fonte rica de metabolitos secundários estruturalmente diferentes, incluindo terpenos, acetogeninas, alcaloides e polifenóis, sendo alguns destes compostos halogenados. Esta produção resulta essencialmente, da sua defesa contra herbívoros, organismos incrustantes e agentes patogénicos, desempenhando também um papel importante na reprodução, na proteção contra a radiação UV e como agentes alelopáticos (Supriya e Yogesh, 2010). Estes organismos têm sido alvo de inúmeros estudos, destacando-se como um dos maiores produtores de moléculas bioativas, com elevado potencial antimicrobiano, antioxidante, anticoagulante, ant-inflamatório, antimalarial, antiprotozoal, antiviral e antitumoral (Chew *et al.*, 2008; Díaz-Rubio *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2009; Khanavi *et al.*, 2010).

Neste contexto, Portugal revela-se um país com um enorme potencial na exploração dos recursos biotecnológicos marinhos, uma vez que, possui uma enorme zona económica exclusiva, na qual está incluída uma extensa costa com aproximadamente 830 km. No que diz respeito à diversidade de algas, Portugal localiza-se num local privilegiado demonstrando ter um interessante gradiente de espécies ao longo da costa. A norte as espécies existentes são similares às presentes na costa da Europa Central e a sul possuem uma grande influência das espécies mediterrânicas e africanas (Sousa-Pinto, 1998).

1.3. Regulação do ciclo celular e Cancro

Há evidências de cancro em seres humanos na literatura médica desde a antiguidade, que remonta aos tempos dos faraós do antigo Egito e do mundo clássico. Embora seja difícil interpretar o diagnóstico dos médicos que viveram à muitos séculos atrás, pode-se supor que muitas das suas descrições são relacionadas com casos de cancro (Nobili *et al.*, 2009). Atualmente o quotidiano da população mundial é afetado por

inúmeras patologias, entre as quais o cancro se destaca, quer pelo impacto social, quer pelo impacto económico que tem em todas as sociedades. Representa uma das maiores ameaças à saúde humana, sendo diagnosticado milhões de novos casos todos os anos (Yaacob *et al.*, 2010). Nos seres humanos o que é vulgarmente designado de “cancro”, na realidade compreende mais de 200 patologias diferentes, mas que têm um facto em comum, resultam de uma desordem celular que geralmente aparece como um tumor formado por uma massa de células anormais (Knowles e Selby, 2005; Schulz, 2007). Tumor ou neoplasia são termos usados indistintamente para descrever um grupo diversificado de condições associadas à replicação celular descontrolada. A massa de tecido é normalmente controlada de uma forma rígida, mas “fina” para responder às necessidades do organismo. Este controlo é realizado através do equilíbrio de vários processos celulares como por exemplo a morte celular (apoptose e necrose) e a replicação celular (mitose). A perturbação do equilíbrio destes processos resulta no aparecimento de patologias. Se a perda de células for superior à renovação, ocorre um processo de degeneração, enquanto o inverso resulta num processo de expansão do tecido, hiperplasia ou neoplasia. Se a expansão no número de células se limita localmente é descrita como “benigna”, se a replicação celular for acompanhada por invasão de tecidos vizinhos ou se propagar para locais distantes (metástases), então é descrita como “maligna” (Pelengaris e Khan, 2006).

Nas células existe um balanço controlado entre a promoção e a repressão do crescimento celular. Este balanço pode variar quando um aumento do número de células é necessário, por exemplo durante a cicatrização de feridas ou durante a renovação natural dos tecidos. A proliferação e a diferenciação de células durante estes processos ocorrem de uma forma ordenada e cessa quando já não é necessária. Esta coordenação resulta do correto funcionamento dos mecanismos que regulam o ciclo celular que nas células tumorais encontra-se alterado. O ciclo celular, ou o ciclo de divisão celular, consiste numa série de eventos que levam à replicação de uma célula, podendo ser dividido em duas fases: interfase e a mitose. A interfase é constituída pelas fases G1, S e G2 e caracteriza-se essencialmente pelo crescimento da célula e pela replicação do ADN, por sua vez a mitose é uma sucessão de eventos durante os quais a célula se divide em duas. O processo de divisão celular é regulado de modo a que não interfira com as atividades das outras células ou com o organismo. Durante o ciclo celular são feitos *checkpoints* de modo a determinar se as células estão preparadas para avançar com a divisão celular. Nestes “postos de controlo” as células utilizam proteínas para avaliar a sua saúde genética, a sua localização

no corpo e se existe necessidade de mais células. São fatores geralmente interpretados como sinais para o bloqueio da divisão celular, alterações genéticas, localização errada das células ou se não existirem necessidades celulares. Por outro lado se a saúde genética for boa, a localização das células for correta ou se existir déficit celular, estes fatores são interpretados como sinais para prosseguir com a divisão celular. As células expressam muitas proteínas cuja principal função é controlar a divisão celular. Estas proteínas são expressas por duas classes de genes, os protooncogenes que codificam para proteínas que promovem a divisão celular e os genes supressores-tumorais, que codificam para proteínas que fornecem sinais que inibem a divisão celular. Uma célula “saudável” recebe sinais de ambos os grupos de proteínas sobre o quanto é apropriado dividir-se. O equilíbrio das informações fornecidas por esses dois grupos de proteínas permite a divisão celular controlada. Um dos genes supressores-tumorais que tem um papel central na proliferação celular é o p53. Perto do fim da fase G1 do ciclo celular a proteína p53 é expressa por este gene, regulando o processo. Se não existirem mutações no ADN, a p53 “permite” que a célula se divida. Se forem detetadas mutações no ADN, a proteína p53 ativa outras proteínas de modo a que se efetuem as reparações das mutações. No entanto se o dano for demasiado extenso para reparar, a proteína p53 desencadeia uma resposta que visa a autodestruição da célula (apoptose), impedindo que as células mutantes continuem a crescer. Por outro lado, outras células serão submetidas ao processo de divisão celular para substituir a perda anterior. Outro grupo de proteínas importantes na regulação da apoptose é a família das proteínas Bcl-2. Membros desta família incluem proteínas antiapoptóticas (bcl-2, bcl-x1, bcl-w, bfl-1, bcl-1, mcl-1 e A1) e pró-apoptóticas (bax, bad, bak, bcl-xS, bid, bik e HrK). As suas ações podem ser independentes ou em competição umas com as outras. Quando a proteína Bax está em excesso, os homodímeros predominam favorecendo a apoptose, por sua vez quando existe um excesso da proteína bcl-2, esta conduz a formação do heterodímero bcl-2/bax que inibe a apoptose. Estes são alguns exemplos dos mecanismos que ocorrem durante o ciclo celular, sendo que mutações nos genes que codificam para estas proteínas estão associadas a patologias. Quando múltiplas mutações ocorrem nos genes responsáveis por desencadear a divisão celular, a probabilidade da célula controlar este processo de forma adequada é menor (Hoskins *et al.*, 2005; Freshney, 2005; Enger *et al.*, 2007; Sa e Das, 2008). A perturbação do equilíbrio destes mecanismos num organismo poderá conseqüentemente levar à gênese de um tumor. Existem diversos fatores que podem desencadear o desenvolvimento desta

patologia, tais como, a dieta alimentar, hereditariedade, tabaco, consumo de álcool em excesso, obesidade, sedentarismo e infeções (Kwabi-Addo, 2011).

De facto, os tumores malignos são uma das maiores causas de morte em humanos, sendo mesmo a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento, tornando-se de extrema importância o desenvolvimento de novos fármacos (Jemal *et al.*, 2011, Alves *et al.*, 2011). De entre os vários carcinomas que ocorrem no ser humano, o cancro da mama, estômago, fígado, cólon e pulmão são responsáveis pela maioria das mortes provocadas por esta doença. No que diz respeito ao carcinoma hepatocelular a maioria dos casos ocorre na Ásia e na África sub- Saara, onde o maior fator de risco é a infeção crónica pelo vírus da hepatite B ou C. Apesar da maioria dos casos ocorrer em países asiáticos e africanos em desenvolvimento, o predomínio do cancro do fígado aumentou consideravelmente no Japão, na Europa Ocidental e nos Estados Unidos da América. Neste último aumentou mais de 70% nos últimos 25 anos (Senn e Otto, 2011). Relativamente ao cancro do cólon as maiores taxas de incidência são encontradas na Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte e as menores taxas em África. No entanto este tipo de cancro tem vindo a diminuir em vários países ocidentais, em grande parte devido a melhores tratamentos, uma maior sensibilização e também devido à sua deteção precoce. Contudo representa o terceiro mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres a nível mundial (Jemal *et al.*, 2011).

Em Portugal, a incidência do cancro hepatocelular têm vindo a aumentar ao longo dos últimos anos, representado uma taxa de mortalidade que afeta um quarto dos pacientes que recebem admissão hospitalar (Marinho *et al.*, 2007; Nery *et al.*, 2010). No entanto o cancro do cólon e reto demonstram um panorama bastante mais preocupante, tratando-se de uma questão de saúde pública. Este tipo de cancro representa a segunda causa de morte no país sendo que, entre as doenças tumorais representa a primeira causa de morte. Contrariamente ao que acontece na maioria dos países da Europa, a taxa de mortalidade por cancro do cólon e reto, em Portugal, tem vindo a aumentar progressivamente (Pinto *et al.*, 2010; Santo *et al.*, 2011).

1.4. Papel dos organismos marinhos no desenvolvimento de novos fármacos na terapêutica do cancro

As terapêuticas utilizadas nesta doença têm evoluído ao longo dos anos, sendo atualmente um tratamento multifacetado, em que as várias terapêuticas (quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, transfusões de sangue, terapia hormonal) são muitas vezes aplicadas simultaneamente, de modo a obter o maior sucesso terapêutico possível (Blows, 2005). Uma das terapias tradicionais mais utilizada é a quimioterapia que consiste na administração de fármacos citotóxicos aos pacientes como parte do tratamento da doença maligna, muitas vezes com efeitos colaterais significativos (Knowles e Selby, 2005). Estudando os fármacos utilizados nesta terapia, verifica-se que os produtos naturais provam ser uma excelente fonte de moléculas anticancerígenas, sendo referido que 40% de todos os fármacos antitumorais desenvolvidos antes 2002 são produtos naturais e 20% são compostos sintéticos que foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (Minev, 2011).

Neste contexto os organismos marinhos não possuem uma história tão significativa como as plantas terrestres (Buss e Butler, 2010). No entanto começaram a ganhar importância durante a década 50, a partir do trabalho pioneiro desenvolvido pelo investigador Werner Bergmann, o qual isolou os nucleosídeos espongouridina e espongotimidina a partir da esponja *Cryptotethya crypta*. Estas moléculas serviram posteriormente como modelo químico para o desenvolvimento dos derivados ara-C (*citarabina*) e ara-A (*vidarabina*), dois nucleosídeos com importantes propriedades anticancerígenas e antivirais, respetivamente (Molinski *et al.*, 2009; Raviña, 2011). Atualmente o fármaco ara-C é utilizado no tratamento da leucemia aguda e no linfoma de Hodgkin (Fattorusso e Tagliatela – Scafati, 2007). Desde então novas classes de moléculas antitumorais tem sido isoladas a partir de organismos marinhos, demonstrado possuírem atividade citotóxica contra vários tipos de tumores (Patel *et al.*, 2010). Algumas destas moléculas encontram-se em fases de ensaios clínicos para o tratamento de vários tumores humanos (Jimenez *et al.*, 2009), com destaque para trabectedina (ET-743), isolada a partir da ascídia *Ecteinascidia turbinata* e que foi recentemente aprovada pela Comissão Europeia para o tratamento de sarcomas de tecidos moles em pacientes refratários a antraciclinas e ifosfamida (Costa-Lotufo *et al.*, 2009). Outros exemplos em ensaios clínicos são a briostatina 1, uma lactona macrocíclica, isolada da espécie de briozoários *Bugula neritina*; a dolastina 10 que corresponde ao peptídeo mais ativo isolado do molusco

Dolabella auricularia; o kahalalido F, um depsipeptídeo cíclico isolado do molusco *Elysia rufescens*; a didemnina B, um depsipeptídeo cíclico isolado da ascídia *Trididemnum solidum*; o discodermolido, um polipeptídeo isolado da esponja marinha *Discodermia dissoluta*, a halichondrina B isolada da esponja marinha *Halichondria okadai* e a aplidina, um depsipeptídeo cíclico similar à didemnina B, isolado da ascídia mediterrânea *Aplidium albicans*. Mais recentemente outras moléculas como a *squalamine* isolada do tubarão *Squalus acanthias* e o neovastat, um derivado da cartilagem de tubarão foram desenvolvidos para a fase de ensaios clínicos (Costa-Lotufo, 2009; Nobili *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010). A maioria destes compostos tem sido reconhecida pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela EMEA (*European Medicines Agency*) para o tratamento de várias neoplasias (Nobili *et al.*, 2009).

No que diz respeito às algas, estas revelam ser fontes importantes de proteínas, iodo, vitaminas e minerais e os seus metabolitos tem demonstrado atividades promissoras contra a incidência de tumores. Certos autores sugerem que o seu consumo funciona como agente quimiopreventivo contra esta patologia. Este facto é sustentado, de algum modo, pela baixa taxa de incidência de alguns tumores verificada nos povos orientais quando comparada com os povos ocidentais (Xu *et al.*, 2004; Yuan e Walsh, 2006). Diferentes grupos de moléculas com atividade antitumoral têm sido isolados a partir de algas, dos quais se pode destacar os polissacarídeos sulfatados, caratenóides e terpenóides (Nakazawa *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010; Taskin *et al.*, 2010). Os polissacarídeos sulfatados podem ser encontrados nas três divisões de algas marinhas e diversos estudos reportam que estes têm uma interessante atividade antitumoral em linhas celulares (*in vitro*), assim como uma atividade inibitória em ratos com tumores em desenvolvimento (Ozawa *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2007). Estes polissacarídeos induzem o processo apoptótico em diversas linhas celulares e estimulam o sistema imunitário contra células cancerosas (Aisa *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010). Por sua vez os carotenóides têm desempenhado um papel biológico importante como quimiopreventivo do processo de carcinogénese. Um dos carotenóides com potencial antitumoral é a fucoxantina isolada a partir da alga castanha *Undaria pinnatifida*, a qual demonstrou inibição do crescimento celular em células GOTO do neuroblastoma humano, células HL-60 de leucemia humana, células do cancro da próstata e células Caco-2 do cancro do cólon (Konishi *et al.*, 2006; Hosokawa *et al.*, 2004). Foi também observado em ratos um efeito inibitório na carcinogénese da pele e do duodeno, assim como um efeito quimiopreventivo no desenvolvimento de criptas

aberrantes no cólon (Hosokawa *et al.*, 1999). No que diz respeito aos terpenos, o screening realizado pelo NCI (National Cancer Institute – USA) permitiu encontrar na alga *Portieria hornemaniai* um monoterpene penta halogenado, designado por *halomon*, que exibiu uma elevada citotoxicidade. O *halomon* foi selecionado para ensaios pré-clínicos, demonstrando toxicidade contra linhas celulares tumorais do cérebro, rins e colon. Avaliações preliminares *in vivo* têm mostrado resultados promissores com este fármaco (Taskin *et al.*, 2010; Supriya e Yogesh, 2010).

Deste modo, o ambiente marinho revela ser uma importante fonte de novos agentes antitumorais, muitas vezes com novos mecanismos de ação, tornando-se imprescindível a continuação de estudos fundamentais pré-clínicos e clínicos nesta área. Prevê-se que estes fármacos representem uma valiosa ferramenta na área da oncologia (Amador *et al.*, 2003).

1.5. Metodologias para avaliação da bioatividade e citotoxicidade

Os organismos marinhos produzem uma enorme variedade de metabolitos secundários bioativos, podendo ser divididos em aminoácidos, peptídeos, nucleosídeos, alcaloides, terpenóides, esteróis, saponinas, éteres policíclicos, entre outros. Consequentemente, os extratos obtidos a partir destes organismos correspondem a uma mistura complexa de diversas moléculas. Contudo, pode-se obter uma ampla separação da mistura através do fracionamento com solventes orgânicos. Estas frações, após a evaporação dos solventes são utilizadas em ensaios biológicos, podendo a atividade biológica estar concentrada numa única fração ou não. Os compostos normalmente isolados da fração apolar poderão ser ésteres, éteres, hidrocarbonetos de terpenóides, esteróis, ácidos gordos, alcanos, cumarinas, entre outros; com solventes de polaridade intermédia consegue-se extrair compostos como alguns alcaloides, flavonoides, entre outros; com solventes polares extraem-se os compostos como glicosídeos, taninas, alguns alcaloides, entre outros (Bhakuni e Rawat, 2005; Sarker *et al.*, 2006).

Numa fase inicial, a metodologia utilizada para analisar a atividade das diferentes frações passa pela realização de ensaios *in vitro*, uma vez que os resultados são obtidos mais rapidamente e têm menores custos associados. No caso da avaliação da atividade antitumoral, utilizam-se normalmente linhas celulares e só posteriormente são efetuados ensaios *in-vivo*. Quando se inicia um processo de *screening* deve-se ter em conta algumas premissas, nomeadamente se os extratos ou moléculas (uma vez isoladas) operam de um

modo dependente da concentração (Bhakuni e Rawat, 2005). Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a viabilidade celular e a proliferação de células vivas, dos quais são exemplos o método de fluorescência, que utiliza como fluoróforo a calceína (calceína-AM) e o método colorimétrico MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) (Vellonen *et al.*, 2004; Hayes, 1997). Neste trabalho utilizaram-se as duas metodologias para avaliar o potencial antitumoral das algas em estudo.

Objetivo

Os organismos marinhos ao longo dos últimos anos têm-se revelado uma fonte única de moléculas com elevado interesse biotecnológico, fornecendo novos compostos com as mais diversas propriedades farmacológicas. Contudo, os organismos presentes na costa portuguesa, nomeadamente as algas, encontram-se muito pouco explorados e caracterizados, principalmente quanto ao seu potencial para a produção de moléculas com elevada atividade biológica. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação do potencial biotecnológico de doze algas da costa de Peniche relativamente à sua citotoxicidade nas linhas celulares tumorais humanas Caco-2 (adenocarcinoma coloretal Humano) e HepG-2 (carcinoma hepatocelular Humano). As algas estudadas foram: *Asparagopsis armata*, *Ceramium ciliatum*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius* (Filo Rhodophyta); *Codium adhaerens*, *Codium tomentosum*, *Codium vermilara* e *Ulva compressa*, (Filo Chlorophyta); *Fucus spiralis*, *Halopteris filicina*, *Saccorhiza polyschides* e *Stypocaulon scoparium* (Filo Heterokontophyta).

2.1. Objetivos Específicos

Neste trabalho pretendeu-se extrair compostos bioativos de algas com recurso a solventes orgânicos, efetuando-se o fracionamento dos extratos de algas pela polaridade dos solventes utilizados, metanol (polar), diclorometano (intermédio) e *n*-Hexano (apolar). Posteriormente as frações de metanol e diclorometano de cada alga foram utilizados para:

1. Avaliar o seu potencial citotóxico através de estudos de viabilidade celular e de proliferação celular por método espectrofotométrico (redução do MTT) e por método de fluorescência (desesterificação da Calceína-AM). Todos os ensaios experimentais foram testados “*in vitro*” na concentração de 1 mg ml⁻¹ durante 24 horas nos modelos *in vitro* referidos anteriormente.
2. Realizar ensaios de dose-resposta para determinação do IC₅₀ nas frações que exibirem maiores efeitos na viabilidade e na proliferação celular das linhas tumorais em estudo.
3. Avaliar o efeito citotóxico para diferentes tempos de incubação. Para as frações que exibiram maiores efeitos viabilidade celular das células Caco-2 e HepG-2,

após 24 horas (1mg ml^{-1}) de incubação, foi testado o efeito após 12 horas de incubação. Por sua vez as frações que exibiram maior atividade de inibição da proliferação celular às 24 horas (1mg ml^{-1}), foi testado o seu efeito após 12 horas e 48 horas de incubação.

Materiais e Métodos

3.1. Recolha e preparação de amostras

As algas foram recolhidas nas praias da Papôa (39° 22' 8.08" N 9° 22' 40.92" W) e Quebrado (39° 22' 5.00" N 9° 22' 24.00" W), Peniche, Portugal e identificadas com a colaboração de uma profissional botânica, a Doutora Teresa Mouga da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (Instituto Politécnico de Leiria), como: *Asparagopsis armata*, *Ceramium ciliatum*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius* (Filo Rhodophyta); *Codium adhaerens*, *Codium tomentosum*, *Codium vermilara* e *Ulva compressa*, (Filo Chlorophyta); *Fucus spiralis*, *Halopteris filicina*, *Saccorhiza polyschides* e *Stypocaulon scoparium* (Filo Heterokontophyta).

As diferentes amostras foram lavadas em laboratório com água do mar, de modo a remover organismos invertebrados, areias e detritos. Após a lavagem, as algas foram pesadas, embaladas e congeladas a -80°C (Thermo, Electron Corporation).

3.2. Preparação dos extratos das amostras

O método de preparação dos diferentes extratos de algas foi adaptado a partir do trabalho realizado por Mayachiew e colaboradores (2008). As algas previamente congeladas foram trituradas, obtendo-se um pó ao qual foi adicionado solventes orgânicos de diferentes polaridades, nomeadamente metanol (> 99%, Fisher Scientific, United Kingdom), diclorometano (Fisher Scientific, United Kingdom) e *n*-Hexano (Lab-Scan analytical Sciences, Poland). O pó obtido a partir da trituração, foi colocado em agitação num gobelé com 400 ml de metanol durante 12 horas protegido da luz, posteriormente foi filtrado e colocado numa ampola de decantação, a qual se adicionou 400 ml de *n*-Hexano e procedeu-se a uma extração líquido – líquido. Por sua vez, à biomassa retida no filtro adicionou-se 400 ml de diclorometano ficando em agitação durante 12 horas protegido da luz, sendo de seguida filtrado. Os extratos obtidos após a filtração foram concentrados através da utilização de um rotavapor Laborota 4000 (Heidolph) a 40°C, obtendo-se no final a biomassa de cada uma das três frações. Estas foram dissolvidas em DMSO ($\geq 99.9\%$, Dimetilsulfóxido) (Sigma, Germany) e mantidas a -20 °C até posterior utilização.

3.3. Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação do potencial citotóxico (proliferação celular e toxicidade) dos diferentes extratos de algas foi testada em duas linhas celulares tumorais humanas, as células Caco-2 e as células HepG-2. O modelo celular proveniente do adenocarcinoma colorectal humano (células Caco-2) foi gentilmente cedido pela Faculdade de Medicina do Porto. As células foram cultivadas em *minimum essencial medium Eagle* (MEM) (Sigma, U.S.A.) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, U.S.A) e 1% de antibiótico/ antimicótico (Sigma, U.S.A). Por sua vez o modelo celular proveniente de carcinoma hepatocelular de fígado humano (células HepG-2) (ATCC number: HTB-37) foi cultivado em meio RPMI 1640 (Sigma, U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, U.S.A) e 1% de antibiótico/ antimicótico (Sigma, U.S.A). O meio de cultura foi sempre mudado 12 horas após as células serem semeadas. De dois em dois dias o meio de cultura foi mudado em ambas as linhas celulares.

As células foram mantidas em cultura numa incubadora de CO₂ (CO₂ Unitherm) com 5% de CO₂, 95% de humidade e a uma temperatura constante de 37 °C.

3.3.1. Ensaio de proliferação celular e viabilidade celular nas células Caco-2 e HepG-2.

A avaliação do efeito dos extratos de algas sobre a proliferação celular e viabilidade celular das células Caco-2 e HepG-2 foi adaptado do método realizado por Yuan e Walsh (2006). As células Caco-2 e HepG-2 foram semeadas em placas de 25 cm² com meio MEM e RPMI 1640 (respetivamente), demorando cinco/seis dias até atingir a confluência total das placas. Após este período de tempo, as células presentes nas placas de 25 cm² foram levantadas com tripsina (Sigma, U.S.A) e semeadas em placas de 96 poços, adicionando-se 20 µL de suspensão celular e 180 µL de meio MEM ou RPMI 1640 com soro em cada poço (conforme a respetiva linha celular).

Para testar o efeito das algas na proliferação celular das linhas celulares em estudo, os extratos de algas (dissolvidos em DMSO) foram preparados em meio de cultura sem FBS e filtrados esterilmente (0,2 µm, Whatman, U.K.). Após 36h das células serem semeadas em placas de 96 poços, removeu-se o meio destas e adicionou-se 100 µL de meio com FBS (para assegurar o crescimento celular) e 100 µL de meio sem FBS com

extrato de alga. Todas as frações testadas foram incubadas à concentração de 1 mg ml^{-1} durante 24 horas. Para as frações, metanólica ou diclorometano, que exibiram efeitos de inibição mais marcantes nas duas linhas celulares foram realizados ensaios de 12 horas e 48 horas (dependência do tempo) à concentração máxima de 1 mg ml^{-1} .

Para avaliar o efeito dos extratos de algas sobre a viabilidade das linhas celulares em estudo foi necessário esperar cerca de 5/6 dias até as placas de 96 poços atingirem a confluência total. Os extratos de algas (dissolvidos em DMSO) foram dissolvidos em meio sem FBS e filtrados esterilmente ($0,2\ \mu\text{m}$, Whatman, U.K.). Após as placas atingirem a confluência total em todos os poços, removeu-se o meio e de seguida adicionou-se $200\ \mu\text{l}$ da solução anteriormente preparada (meio sem soro + extrato de alga). Todas as frações foram testadas à concentração de 1 mg ml^{-1} e incubadas durante 24 horas. Para as frações que exibiram maior potencial foram realizados ensaios às 12 horas (dependência do tempo) à concentração máxima de 1 mg ml^{-1} .

Para os extratos de algas que demonstraram maior atividade sobre a inibição da proliferação celular ou redução da viabilidade celular das linhas celulares em estudo (Caco-2 ou HepG-2), realizaram-se ensaios de dose-resposta (dependência da concentração), incubando-se as células Caco-2 e HepG-2 com diferentes concentrações de extrato durante 24 horas. As concentrações testadas variaram entre $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ e $1000\ \mu\text{g ml}^{-1}$.

O efeito das diferentes frações das algas sobre as linhas celulares em estudo foi revelado pelo método de MTT e pelo método de calceína-AM. No que diz respeito ao ensaio de MTT, este foi utilizado para avaliar os efeitos dos extratos de algas em todas as experiências realizadas. Por sua vez o ensaio de calceína-AM foi apenas utilizado para avaliar os efeitos das frações que revelaram maior potencial através do método MTT à concentração máxima de 1 mg ml^{-1} (24 horas), para confirmação de resultados. O procedimento para método de MTT e para o método da calceína-AM encontra-se descrito no ponto 3.3.1.1 e 3.3.1.2, respetivamente.

3.3.1.1. Método de 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

Este método baseia-se na redução de sais tetrazólicos de MTT por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas (células viáveis) em cristais de formazam. Posteriormente, estes cristais são dissolvidos num solvente orgânico de modo a serem

medidos espectrofotometricamente, permitindo uma relação com o número de células viáveis, pois quanto maior a quantidade de células viáveis maior o número de cristais formados (Rotter *et al.*, 1993; Castell e Gómez-Lechón, 1997).

Neste trabalho experimental o método de MTT foi adaptado do trabalho realizado por Yuan e Walsh (2006). Após o período de experiência definido, aspirou-se o meio contendo os extratos de algas e lavou-se as células com 200µl de tampão Hank's. Após esta lavagem adicionou-se 100µl de MTT (1,2mM) (Sigma, Germany), previamente dissolvido em tampão Hank's (composição de meio em mM: NaCl 137, KCl 5, MgSO₄ 0.8, Na₂HPO₄ 0.33, KH₂PO₄ 0.44, CaCl₂ 0.25; MgCl₂ 1.0, Tris HCl 0.15 e butirato de sódio 1.0, pH=7.4) e filtrado esterilmente (0,2 µm, Whatman, U.K.) de modo a determinar o efeito provocado na proliferação celular e na viabilidade celular. De seguida, as células foram incubadas 4 horas a 37°C, com 5% CO₂, em atmosfera humidificada (95%). Para solubilizar os cristais de formazan resultantes da reação, adicionou-se a todos os poços 100 µL de isopropanol (Panreac, Espanha) contendo 0,04M HCl, homogeneizando com o auxílio de uma micropipeta (processo realizado em gelo). Posteriormente as células foram incubadas 1 hora, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Finalmente os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 570 nm. Este tipo de metodologia permite de um modo rápido, perceber qual o efeito dos extratos algas sobre as linhas celulares em estudo.

3.3.1.2. Método de calceína – AM

Este método tem por base o fluoróforo de calceína-AM. A calceína na sua forma natural apresenta fluorescência, no entanto uma vez esterificada perde esta característica mas ganha a capacidade de penetrar a membrana da célula. No interior desta, as esterases existentes no citoplasma quebram as ligações estéres, voltando a calceína à sua forma natural, emitindo fluorescência. Para as esterases terem uma atividade normal, as células têm de estar viáveis, logo quanto maior for a fluorescência maior será o número de células viáveis (Hayes, 1997).

Neste trabalho experimental o ensaio de calceína-AM (Invitrogen, U.S.A) foi adaptado do trabalho realizado por Pedrosa e Soares-da-Silva (2002). A seguir ao período de experiência definido, as células foram lavadas duas vezes com 200µl de tampão Hank's.

De seguida, foi adicionado a cada poço 100µl de uma solução de calceína 2µM (previamente preparada em tampão Hank's), exceto nos poços definidos para avaliar a autofluorescência celular, nos quais se adicionou 100µl de tampão Hank's. As placas de 96 poços foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz, durante 30 minutos. Após este período as células foram lavadas novamente com 200µl de tampão Hank's para remover todos os vestígios de calceína-AM e adicionou-se 100µl de tampão Hank's a cada um dos poços. Os resultados foram obtidos pela leitura de fluorescência num leitor de fluorescência (Spectromax Gemini, Molecular Devices, USA), utilizando como comprimento de onda de excitação 485 nm e um comprimento de onda de emissão 530 nm.

Este tipo de metodologia permite de um modo rápido perceber qual o efeito dos extratos algas sobre as linhas celulares em estudo.

Os resultados do efeito dos extratos de algas sobre a proliferação e a viabilidade celular das células Caco-2 e HepG-2 são apresentados em percentagem do controlo, sendo calculados através da seguinte equação:

$$(\% \text{ do controlo}) = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controlo}}) \times 100$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controlo}}$ corresponde à absorvância do controlo (células cultivadas em meio de cultura contendo o veículo) e a $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ corresponde à absorvância da amostra em teste (células cultivadas em meio de cultura contendo os extratos de algas).

3.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados através do teste de análise de variância com 1 fator (ANOVA-1 fator), seguido pelo teste de Dunnett (Zar, 2009). Os dados experimentais foram comparados com os do grupo controlo. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$) ou ao nível de 1% ($p < 0,01$).

Todas as análises foram realizadas no GraphPad InStat software.

Resultados



4.1. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de algas sobre os modelos celulares Caco-2 e HepG-2

4.1.1. Ensaio de citotoxicidade realizados no modelo celular Caco-2

4.1.1.1. Efeitos de toxicidade dos extratos de algas na linha celular Caco-2

A avaliação da toxicidade dos extratos de algas sobre a viabilidade celular das células Caco-2 foi realizada após a confluência total. De seguida incubou-se as células com os extratos de algas correspondentes à fração metanólica e diclorometano, à concentração de 1 mg ml⁻¹. Os resultados obtidos demonstram o efeito das duas frações testadas na viabilidade celular das células Caco-2 após 24 horas de incubação (Figura 2).

Através da análise da figura 2 é possível verificar que a fração metanólica (Figura 2A) das algas *Fucus spiralis* (23,68 ± 2,93% de células viáveis), *Asparagopsis armata* (7,32 ± 1,17% de células viáveis) e *Sphaerococcus coronopifolius* (3,53 ± 1,26% de células viáveis) foram as que exibiram maior capacidade de redução da viabilidade celular nas células Caco-2, correspondendo a algas do Filo Heterokontophyta (algas castanhas) e do Filo Rhodophyta (algas vermelhas). Por sua vez as algas do Filo Chlorophyta (algas verdes) não demonstraram qualquer efeito sobre a viabilidade celular deste modelo celular. No que diz respeito à fração de diclorometano (Figura 2B), pode-se observar que a maior redução da viabilidade celular foi originada pelas algas pertencentes ao Filo Rhodophyta (algas vermelhas), designadamente as algas *Asparagopsis armata* (1,04 ± 0,39% de células viáveis), *Plocamium cartilagineum* (9,77 ± 2,28% de células viáveis) e *Sphaerococcus coronopifolius* (1,92 ± 0,89% de células viáveis). No entanto a alga *Codium adhaerens* pertencente ao Filo Chlorophyta também demonstrou algum potencial (83,97 ± 1,40% de células viáveis). Por sua vez as algas do Filo Heterokontophyta na fração diclorometano não exibiram qualquer efeito sobre a viabilidade celular das células Caco-2.

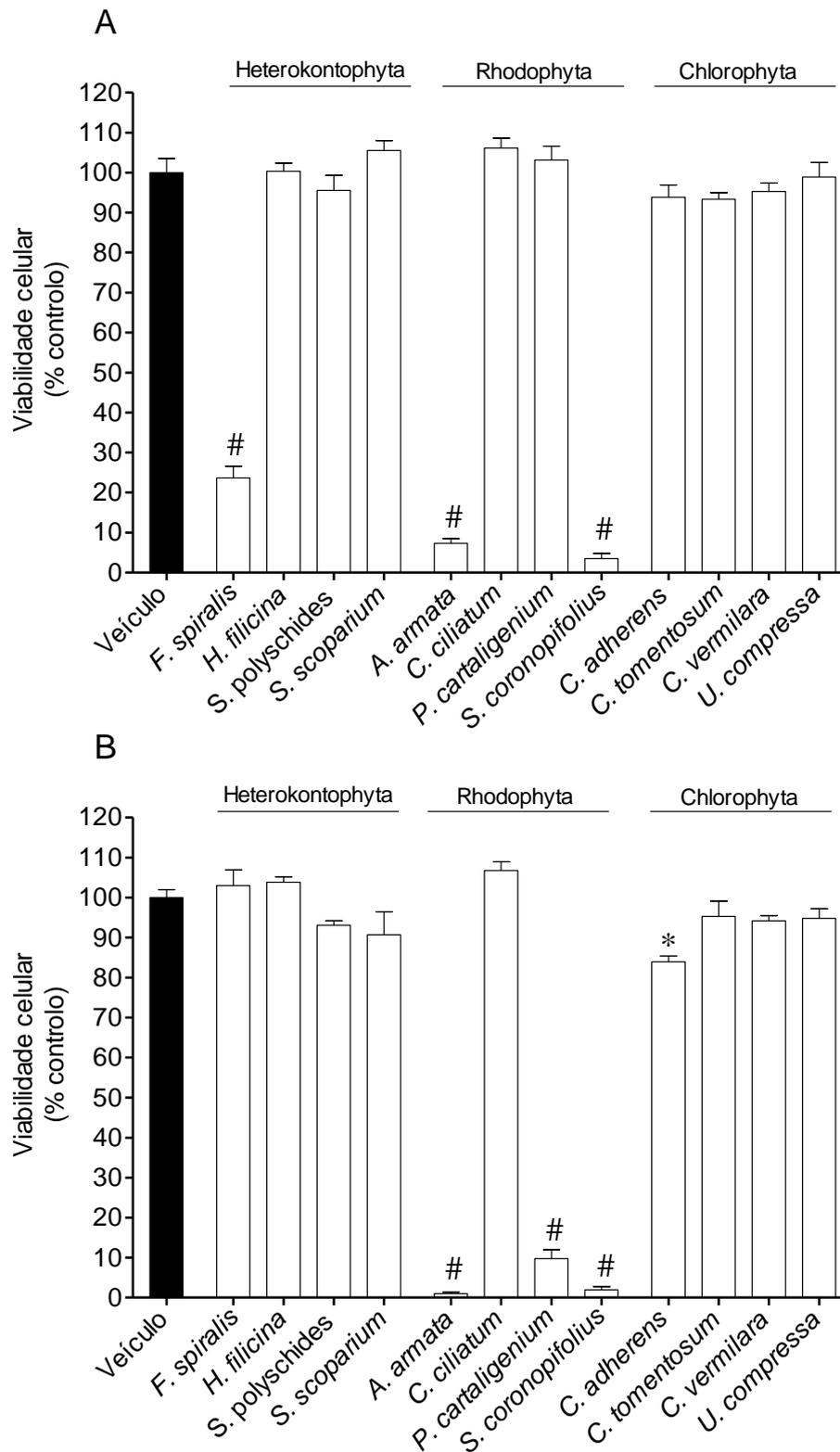


Figura 2. Efeitos da fração metanólica (A) e da fração de diclorometano (B) dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

Para as algas que exibiram uma redução da viabilidade celular igual ou superior a 50% (1mg ml^{-1} ; 24 horas), decidiu-se validar os resultados obtidos, utilizando outro método laboratorial. Deste modo, mantendo as mesmas condições (1mg ml^{-1} , 24 horas) avaliou-se o potencial das algas na viabilidade celular através de um método de fluorescência (Calceína - AM), estando os resultados representados na figura 3.

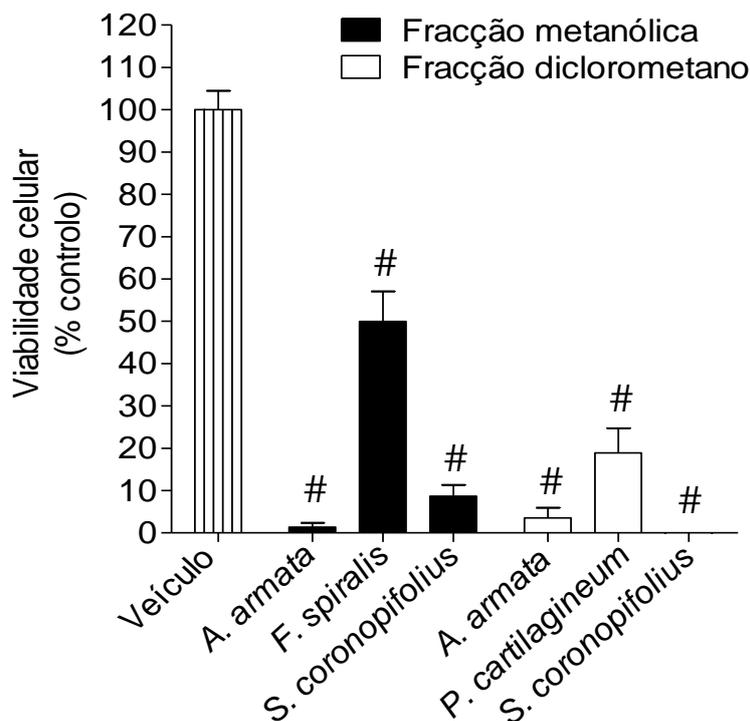


Figura 3. Efeitos dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a viabilidade celular das células Caco-2 (% controlo) após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de fluorescência com calceína-AM. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo.

Através da figura 3 é possível constatar que a alga *Asparagopsis armata* e *Sphaerococcus coronopifolius* quer na fração metanólica ($1,39 \pm 0,98\%$ de células viáveis; $8,69 \pm 2,68\%$ de células viáveis, respetivamente) quer na fração diclorometano ($3,53 \pm 2,39\%$ de células viáveis; $0 \pm 0,52\%$ de células viáveis, respetivamente) demonstraram o maior efeito sobre a viabilidade celular, à semelhança dos resultados obtidos através do método MTT. A realização deste ensaio validou todos os resultados obtidos pelo método de MTT.

De modo a perceber se a redução da viabilidade celular ocorre de um modo dependente da concentração, e principalmente para conseguir comparar a potência dos efeitos demonstrados pelos vários extratos das algas estudadas, decidiu-se realizar um

ensaio de dependência da concentração para as algas que apresentaram uma capacidade de redução igual ou superior a 50% nas diferentes frações, para a concentração máxima testada de 1 mg ml^{-1} (Figura 2). A maioria das algas demonstrou reduzir a viabilidade celular de um modo dependente da concentração (Figura 4), sendo este facto mais evidente na fração diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius* e *Asparagopsis armata*. Por sua vez a fração metanólica da alga *Asparagopsis armata* e *Fucus spiralis* não exibiram a mesma tendência, demonstrando atividade apenas à concentração máxima.

A realização destes ensaios permitiu definir a concentração de extrato necessária para reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}), estando os valores de IC_{50} representados na tabela I.

Tabela I – Determinação dos valores de IC_{50} para capacidade dos diferentes extratos na redução da viabilidade celular das células Caco-2.

Algas	Fração	Metanol	Diclorometano
		IC_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	IC_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>Fucus spiralis</i>		935,2 (573,3 – 1526,0)	-----
<i>Asparagopsis armata</i>		823,0 (421,8 – 1606,0)	531,6 (384,6 – 734,7)
<i>Plocamium cartilagineum</i>		-----	995,4 (756,0 – 1311,0)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>		559,5 (374,2 – 836,4)	21,3 (12,9 – 35,2)

Através da interpretação da tabela I é possível constatar que fração metanólica e diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius*, assim como a fração diclorometano da alga *Asparagopsis armata* exibiram os valores de IC_{50} mais baixos, com os valores de $559,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $21,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $531,6 \mu\text{g ml}^{-1}$, respetivamente.

Para os diferentes extratos de algas (*Fucus spiralis*, *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius*) que demonstraram uma redução da viabilidade celular igual ou superior a 50%, à concentração máxima de 1 mg ml^{-1} (24 horas), decidiu-se perceber a dependência do tempo pela incubação dos extratos durante 12 horas. Os resultados encontram-se representados na figura 5.

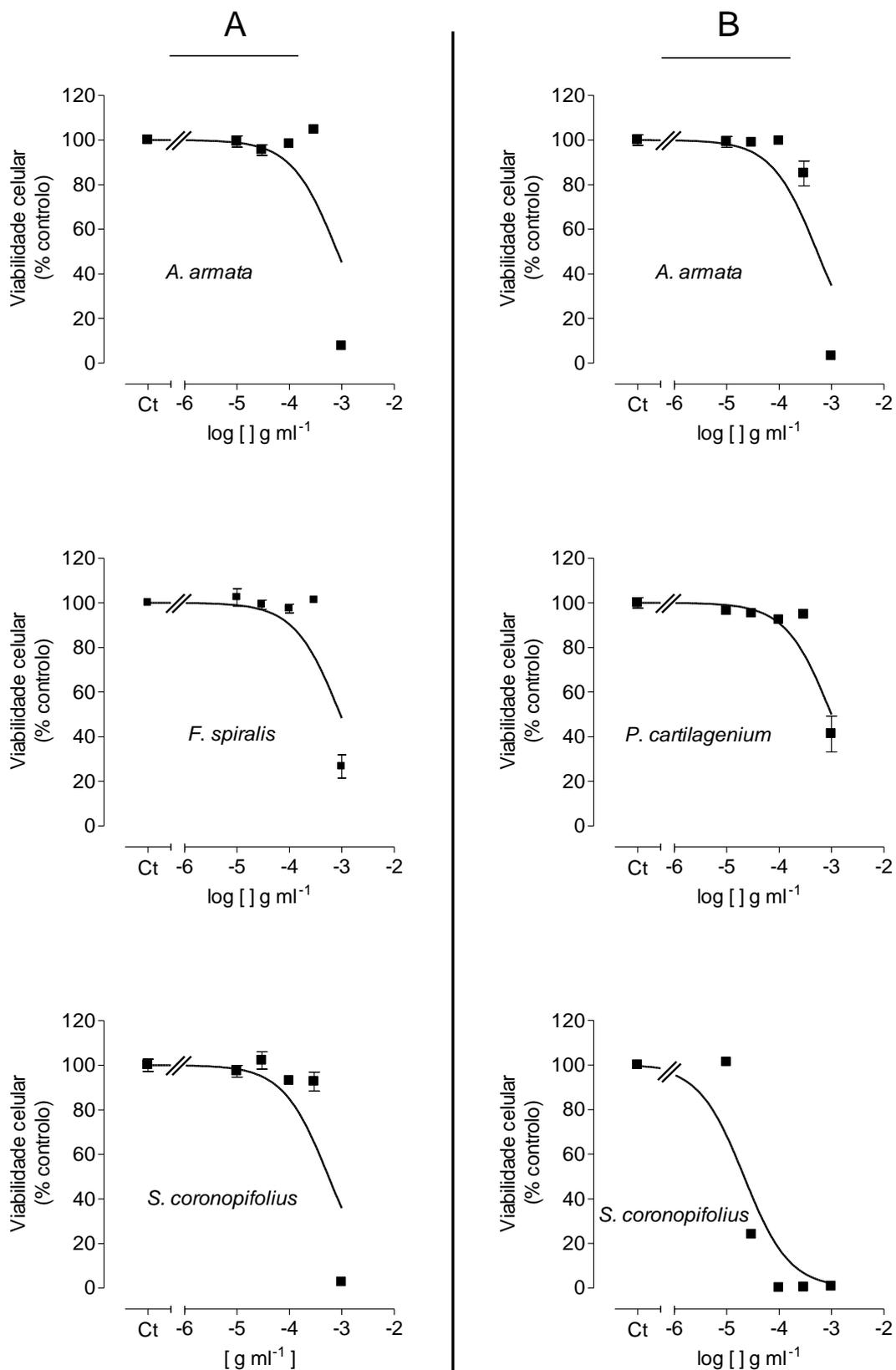


Figura 4. Dependência da concentração ($10 - 1000\mu\text{g ml}^{-1}$) das frações metanólica (A) e diclorometano (B) das algas que reduzem ($\geq 50\%$, 1 mg ml^{-1}) a viabilidade celular das células Caco-2. Os símbolos correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$)

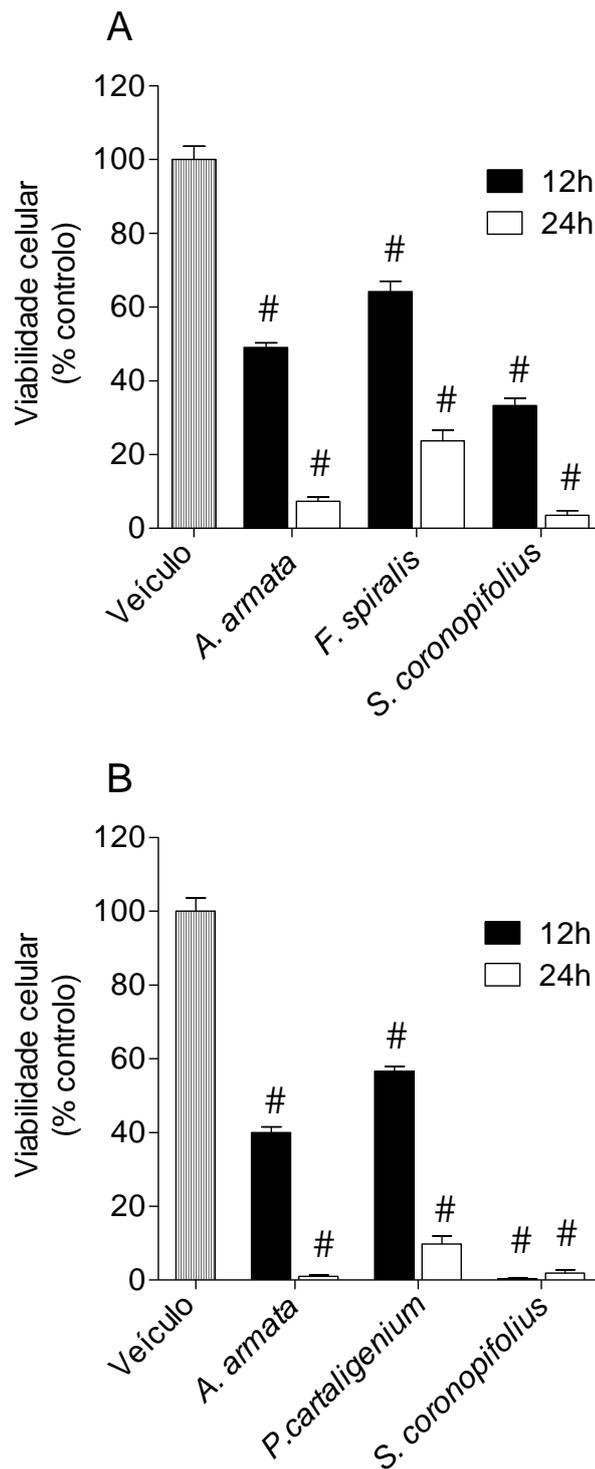


Figura 5. Efeitos dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) na viabilidade celular das células Caco-2 (% controle) após 12 horas e 24 horas de incubação. Situação A) fração metanólica; B) fração de diclorometano. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

Na figura 5 verifica-se que todos os efeitos têm dependência do tempo, com exceção da fração diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius* em que às 12

horas ($0,33 \pm 0,18\%$ de células viáveis) apresenta uma redução quase total da viabilidade celular. Na fração metanólica o efeito mais potente às 12 horas é conseguido pela alga *Sphaerococcus coronopifolius* ($33,32 \pm 1,96\%$ de células viáveis) assim como na fração diclorometano como já foi referido. Por sua vez a alga *Asparagopsis armata* também demonstrou um elevado potencial após 12 horas de incubação, quer na fração metanólica ($49,00 \pm 1,24\%$ de células viáveis) quer na fração diclorometano ($39,96 \pm 1,62\%$ de células viáveis), nas quais apresentou uma redução da viabilidade celular superior a 50%.

4.1.1.2 Efeito dos extratos de algas sobre a proliferação celular das células Caco-2

Para avaliar o efeito dos extratos das algas sobre a proliferação celular, procedeu-se à incubação das células com a fração metanólica e diclorometano após 36h do início da cultura. Todos os extratos foram testados à concentração de 1 mg ml^{-1} . Os resultados obtidos estão apresentados em percentagem do controlo e demonstram o efeito dos extratos sobre a proliferação celular das células Caco-2 após 24 horas de incubação (Figura 6).

Tal como pode ser observado na figura 6, para a fração metanólica (Figura 6A), houve cinco algas que demonstraram capacidade de inibir a proliferação celular das células Caco-2, no entanto o efeito mais marcante foi demonstrado pelas algas *Asparagopsis armata* ($24,32 \pm 7,56\%$ de células) e *Sphaerococcus coronopifolius* ($9,27 \pm 3,26\%$ de células) ao fim de 24 horas de incubação. Por sua vez as algas do Filo Chlorophyta não revelaram qualquer tipo de efeito sobre este modelo celular. Na fração diclorometano (Figura 6B) as algas vermelhas *Asparagopsis armata* ($0 \pm 0,48\%$ de células), *Plocamium cartilagineum* ($4,95 \pm 1,19\%$ de células) e *Sphaerococcus coronopifolius* ($0,96 \pm 0,51\%$ de células) evidenciaram um enorme potencial na inibição da proliferação celular desta linha celular. Por outro lado, com a exceção da alga *Stypocaulon scoparium* ($72,74 \pm 7,98\%$ de células), todas as outras algas não exibiram qualquer tipo de atividade.

De modo a comprovar os resultados obtidos para as algas que exibiram um potencial de inibição da proliferação celular igual ou superior a 50%, procedeu-se novamente ao teste destes extratos, usando um método fluorimétrico. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 7 e demonstram o potencial das algas selecionadas na fração metanólica e diclorometano, à concentração de 1 mg ml^{-1} durante 24 horas.

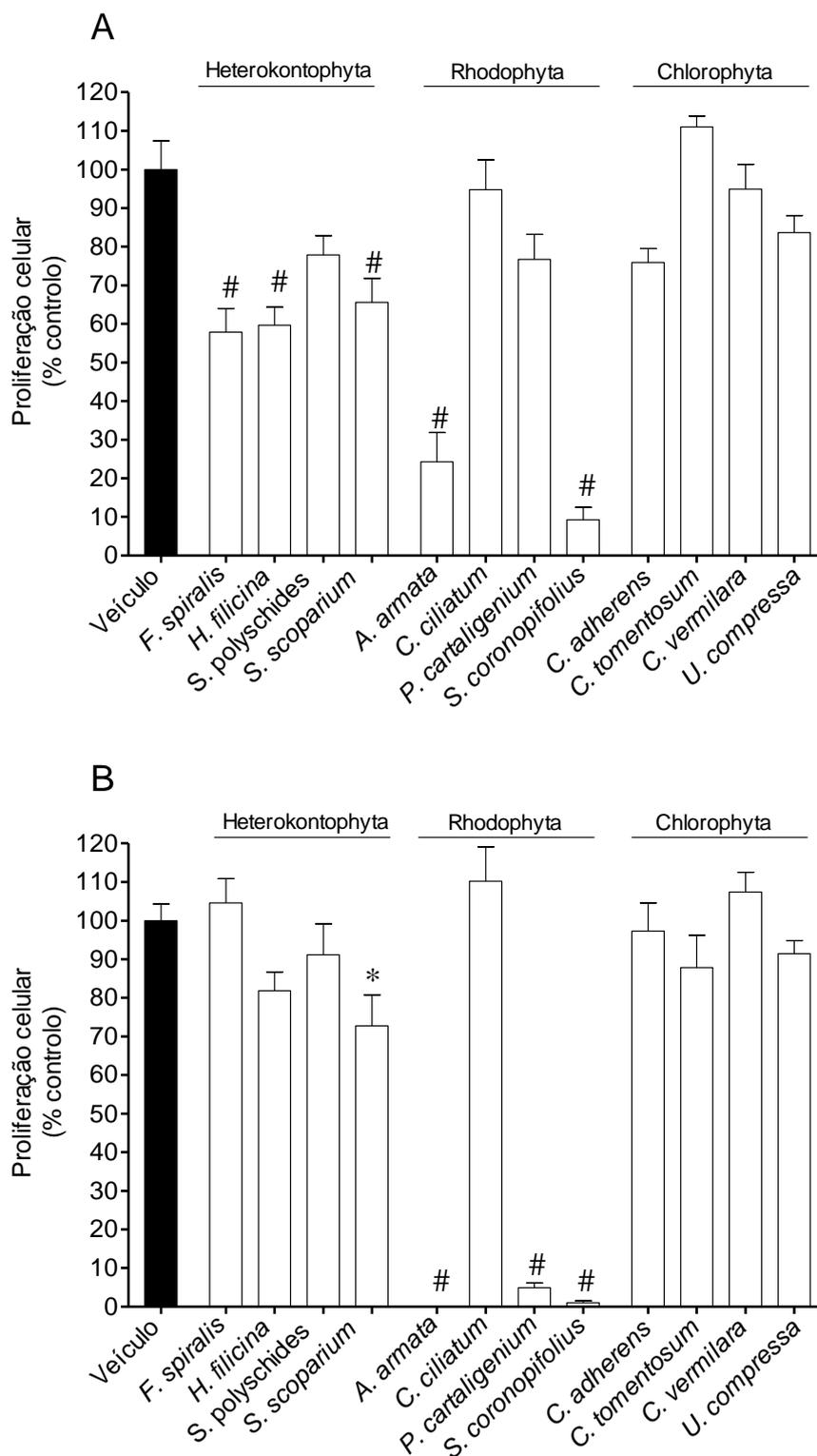


Figura 6. Efeitos das frações metanólica (A) e fração de diclorometano (B) dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a proliferação celular das células Caco-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

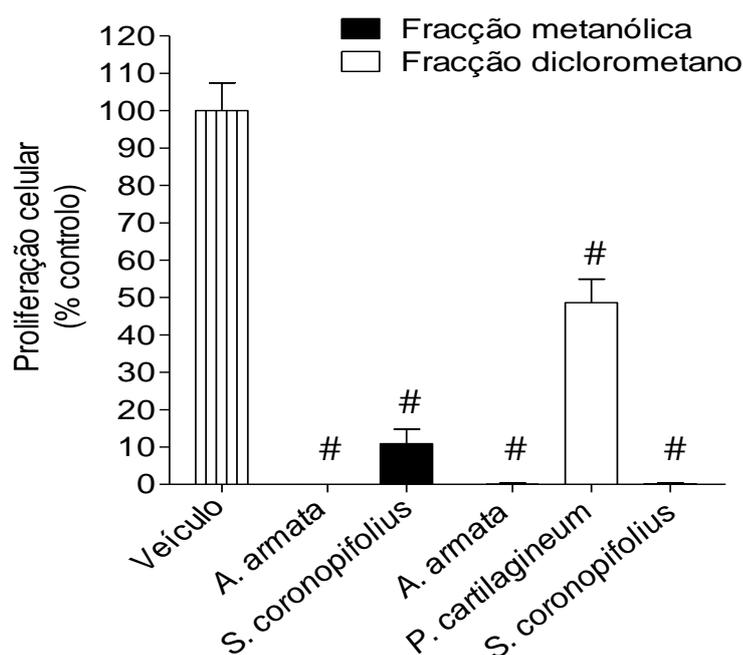


Figura 7. Efeitos dos extratos de algas (1 mg ml^{-1}) sobre a proliferação celular das células Caco-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de fluorescência com calceína-AM. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

Através da utilização desta metodologia foi possível comprovar os resultados obtidos pelo método de MTT, uma vez que as algas demonstraram a mesma capacidade de inibir a proliferação celular das células Caco-2. Contudo o potencial exibido pelas algas no método de fluorescência, demonstra ser superior ao evidenciado pelo método de MTT. Por sua vez a fração diclorometano da alga *Plocamium cartilagineum* ($48,64 \pm 6,25\%$ de células) foi a única que exibiu uma perda de atividade quando utilizado este método.

Para as algas que exibiram uma capacidade de inibição da proliferação celular igual ou superior a 50% para a concentração máxima testada (1 mg ml^{-1}) após 24 horas, decidiu-se estudar a potência dos efeitos dos extratos testados, fazendo ensaios de dependência da concentração. Os resultados referentes às frações metanólica e diclorometano encontram-se expressos na figura 8.

Como se pode observar na figura 8, todos extratos testados demonstraram um efeito dependente da concentração. A partir dos ensaios realizados foi possível obter os valores de IC_{50} estando os valores descritos na tabela II.

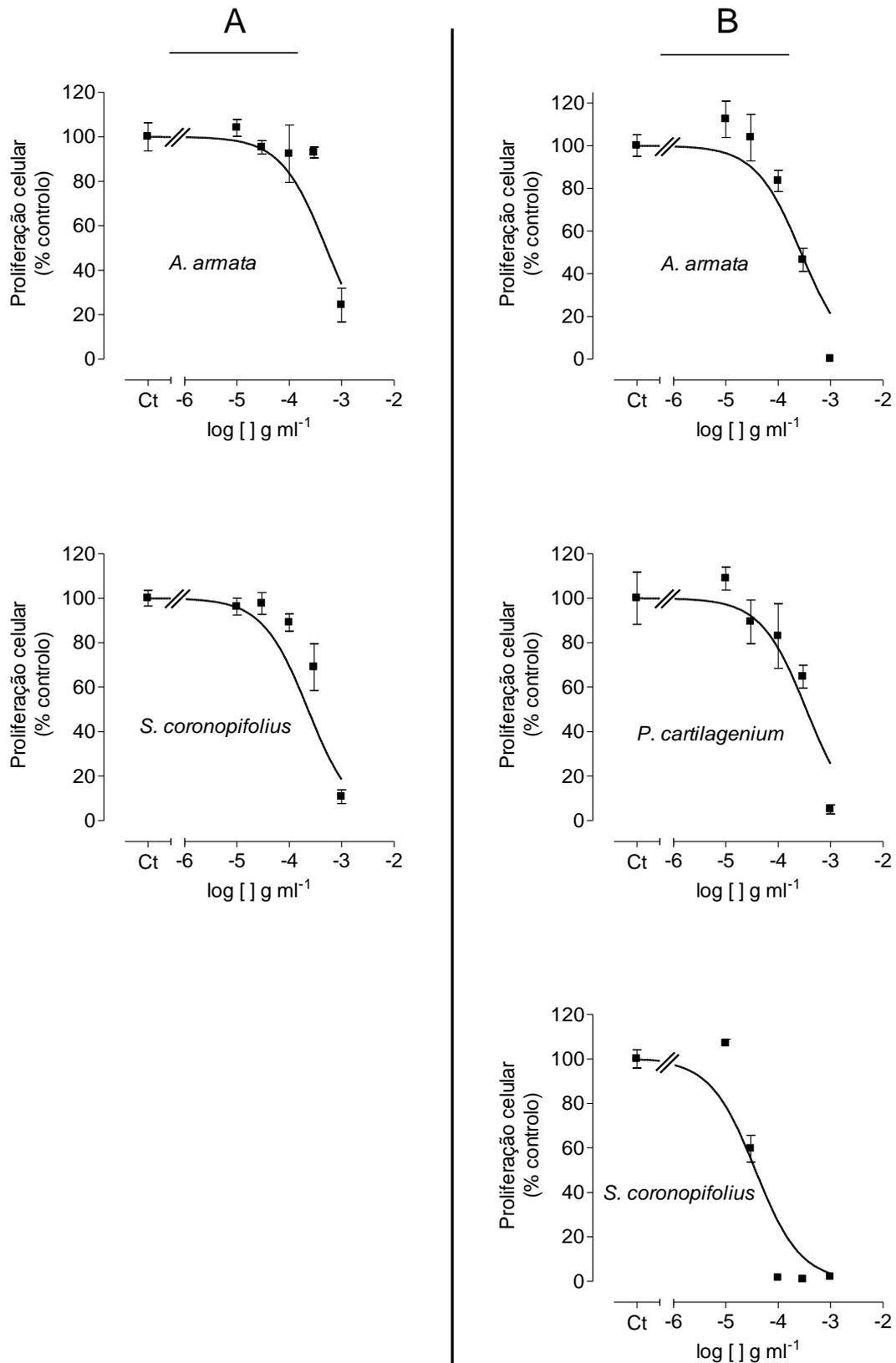


Figura 8. Dependência da concentração ($10 - 1000\mu\text{g ml}^{-1}$) das frações metanólica (A) e diclorometano (B) das algas que inibem ($\geq 50\%$, 1 mg ml^{-1}) a proliferação celular das células Caco-2. Os símbolos correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$).

Tabela II – Determinação dos valores de IC₅₀ para capacidade dos diferentes extratos na inibição da proliferação celular das células Caco-2.

Fração	Metanol	Diclorometano
	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Asparagopsis armata</i>	508,1 (312,9 – 825,1)	271,5 (165,5 – 445,4)
<i>Plocamium cartilagineum</i>	-----	343,4 (197,1 – 598,3)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	227,1 (161,0 – 320,3)	36,5 (22,5 – 59,2)

Analisando a tabela II verifica-se que a fração diclorometano das diferentes algas mais a fração metanólica da alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresentaram os valores de IC₅₀ mais baixos. Por sua vez, à semelhança dos resultados de IC₅₀ obtidos para a viabilidade celular, também a alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou o menor IC₅₀ para as duas frações estudadas.

Para as algas que apresentaram um efeito inibitório sobre a proliferação celular superior ou igual a 50%, quer na fração metanólica (*Asparagopsis armata* e *Sphaerococcus coronopifolius*) quer na fração diclorometano (*Asparagopsis armata*; *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius*) (1mg ml⁻¹; 24 horas), decidiu-se realizar ensaios ao longo do tempo. Os efeitos dos extratos sobre a proliferação celular das células Caco-2 após 12, 24 e 48 horas de incubação encontram-se representados na figura 9.

Na figura 9 é possível verificar que o efeito da fração metanólica da alga *Asparagopsis armata* revelou ser dependente do tempo entre as 12 horas (111,16 ± 3,72% de células) e as 24 horas (10,73 ± 5,34% de células) de incubação, mantendo o efeito após 48 horas (14,91 ± 3,44% de células). Por sua vez a fração metanólica da alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresenta uma inibição da proliferação semelhante ao longo do tempo. Na fração de diclorometano a alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou uma inibição quase total da proliferação celular até às 24 horas, contudo a partir deste tempo de incubação começou a perder o efeito. Já alga *Asparagopsis armata* demonstrou uma inibição similar da proliferação celular ao longo dos três tempos testados. O efeito da alga *Plocamium cartilagineum* apresenta dependência do tempo entre as 12 horas (28,69 ±

5,58% de células) e as 24 horas ($4,95 \pm 1,19\%$ de células), mantendo-se aproximadamente constante após 48 horas de incubação ($13,60 \pm 3,63\%$ de células).

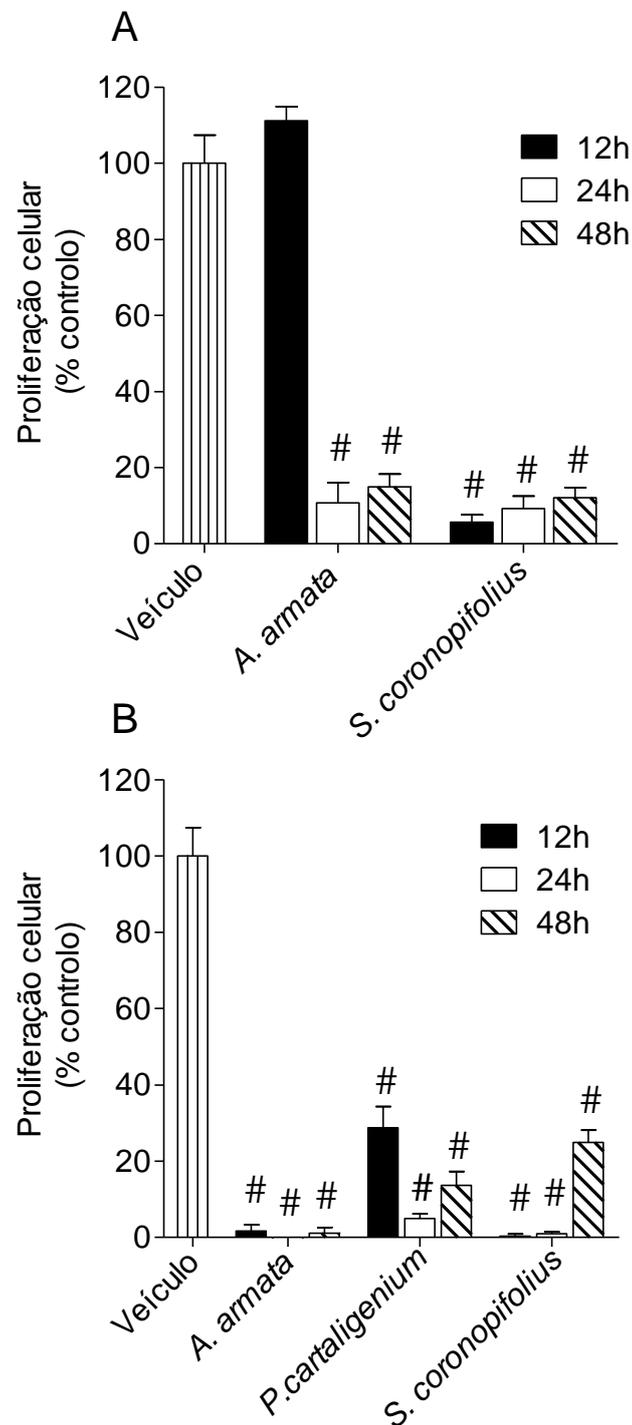


Figura 9. Efeitos dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a proliferação celular das células Caco-2 (% controle) após 12, 24 e 48 horas de incubação. A) fração metanólica; B) fração diclorometano. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) entre 7 e 9 experiências independentes. # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

4.1.2. Ensaios de citotoxicidade realizados no modelo celular HepG-2

4.1.2.1. Efeitos de toxicidade dos extratos de algas na linha celular HepG-2

A toxicidade da fração metanólica e diclorometano de todas as algas em estudo foi avaliado na linha celular hepática, HepG-2, à concentração máxima de 1mg ml^{-1} (24 horas). Os resultados encontram-se representados na figura 10 e demonstram o efeito dos extratos de algas testados sobre a viabilidade celular das células HepG-2, após 24 horas de incubação.

Pela análise da figura 10, verifica-se que no ensaio de viabilidade celular realizado com a fração metanólica (Figura 10A), cinco algas (*Fucus spiralis*, *Halopteris filicina*, *Asparagopsis armata*, *Sphaerococcus coronopifolius* e *Codium tomentosum*) demonstraram capacidade de redução da viabilidade celular nas células HepG-2, após 24 horas de incubação. Todavia a maior redução foi exibida pelas algas *Fucus spiralis* ($44,04 \pm 5,44\%$ de células viáveis), *Asparagopsis armata* ($11,22 \pm 2,98\%$ de células viáveis) e *Sphaerococcus coronopifolius* ($14,04 \pm 2,62\%$ de células viáveis) que reduziram a viabilidade celular em mais de 50%. Na fração de diclorometano (Figura 10B), apenas quatro algas demonstram capacidade de diminuir a viabilidade celular, destacando-se uma vez mais as algas *Asparagopsis armata* ($1,51 \pm 0,38\%$ de células viáveis) e *Sphaerococcus coronopifolius* ($12,84 \pm 3,82\%$ de células viáveis) que reduziram a viabilidade celular em mais de 80%. Por sua vez as algas do Filo Chlorophyta não exibiram qualquer tipo de atividade.

Para as algas que demonstraram maior potencial na redução da viabilidade celular, decidiu-se comprovar estes efeitos através de um método de fluorescência, como foi referido para as células Caco-2. Deste modo, os resultados obtidos com a utilização de um fluoróforo de calceína encontram-se representados na figura 11 e demonstram o efeito dos extratos testados sobre a linha celular HepG-2 após 24 horas de incubação à concentração de 1mg ml^{-1} . Comparado os resultados obtidos pelo método de MTT (Figura 10) e pelo método de calceína (Figura 11) pode-se constatar que a fração metanólica ($11,22 \pm 2,98\%$ de células viáveis vs $14,75 \pm 1,85\%$ de células viáveis) e diclorometano ($1,51 \pm 0,38\%$ de células viáveis vs $4,95 \pm 1,08\%$ de células viáveis) da alga *Asparagopsis armata*, assim como, a fração diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius* ($12,84 \pm 3,82\%$ de células viáveis vs $1,19 \pm 0,21\%$ de células viáveis) apresentaram um potencial de redução

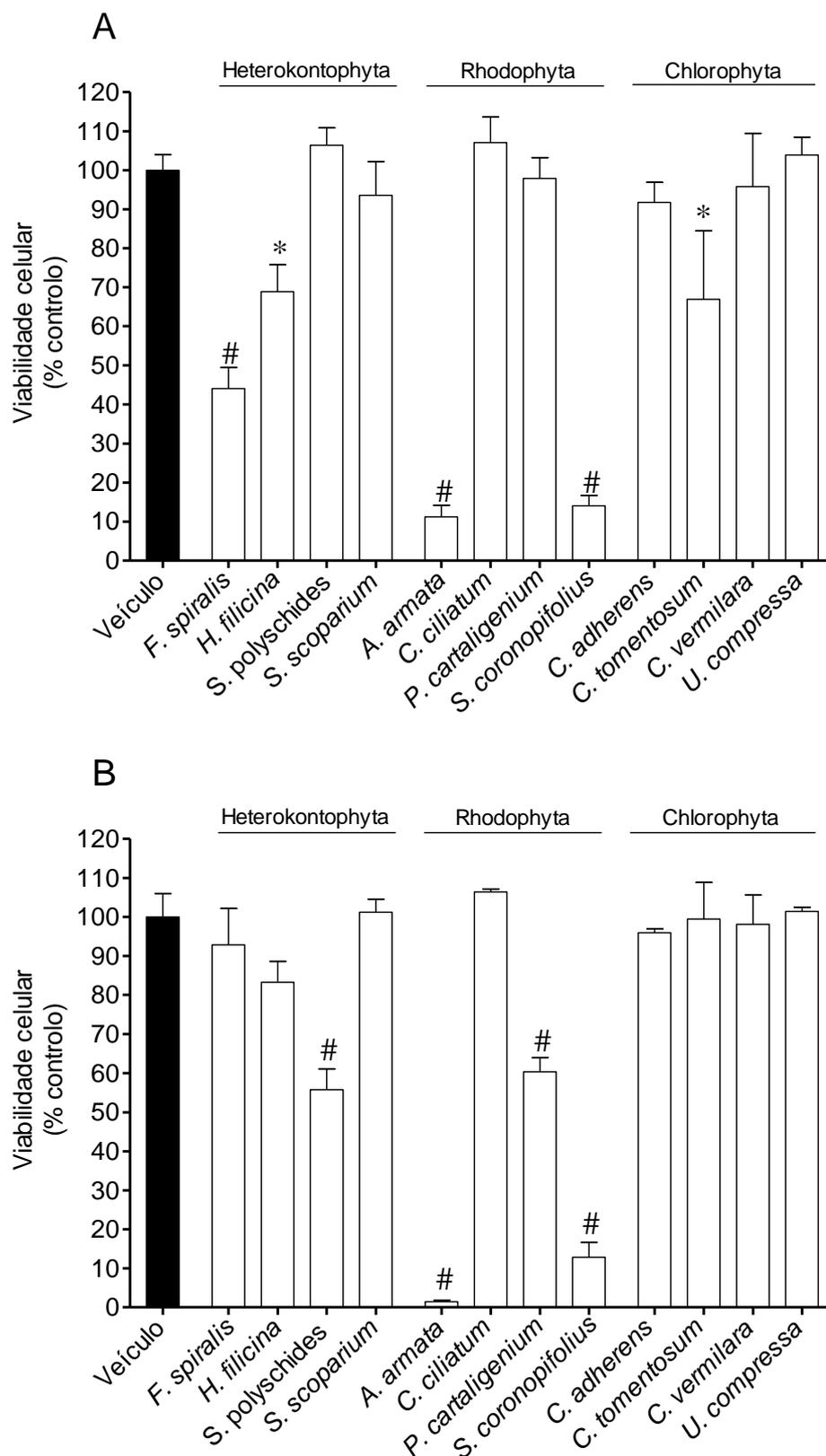


Figura 10. Efeitos da fração metanólica (A) e da fração de diclorometano (B) dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a viabilidade celular das células HepG-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

da viabilidade celular em células HepG-2 semelhante nos dois métodos utilizados. Por outro lado, a fração metanólica da alga *Fucus spiralis* ($98,27 \pm 2,04\%$ de células viáveis) não apresentou nenhuma atividade e a fração metanólica da alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou um efeito muito inferior ao verificado pelo método de MTT.

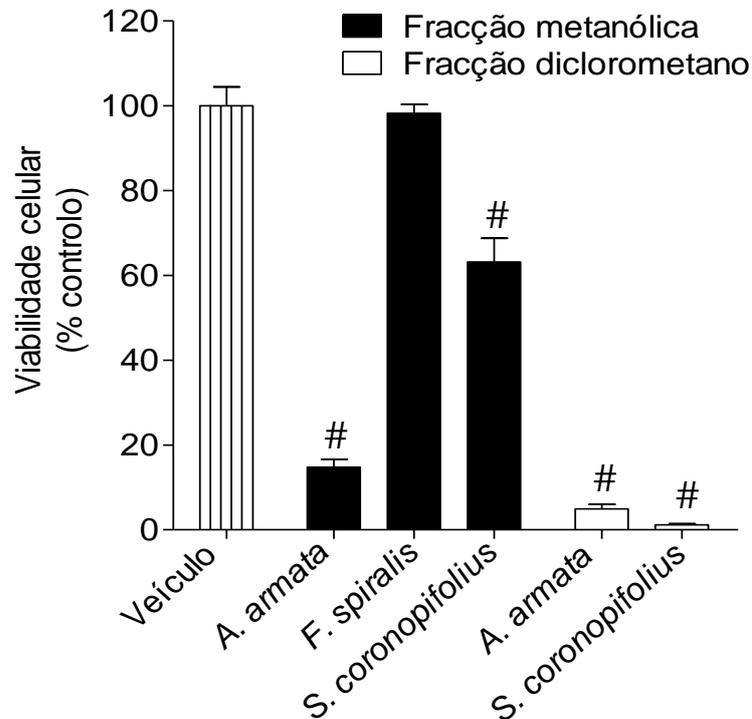


Figura 11. Efeitos dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a viabilidade celular das células HepG-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de fluorescência com calceína-AM. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

À semelhança do efetuado para a linha celular Caco-2, para todas as algas que demonstraram uma redução da viabilidade celular nas células HepG-2 igual ou superior a 50%, realizou-se ensaios de dependência da concentração. As algas testadas foram a *Fucus Spiralis*, *Asparagopsis armata* e *Sphaerococcus coronopifolius*. Estes ensaios tiveram o objetivo de definir a potência dos efeitos dos extratos, estando os resultados representados na figura 12.

Todos os extratos mostraram um efeito dependente da concentração, como se pode constatar na figura 12. Quando se observa os valores de IC_{50} representados na tabela III, uma vez mais, as algas do Filo Rhodophyta apresentaram as concentrações de extrato mais baixas necessárias para reduzir 50% da viabilidade celular.

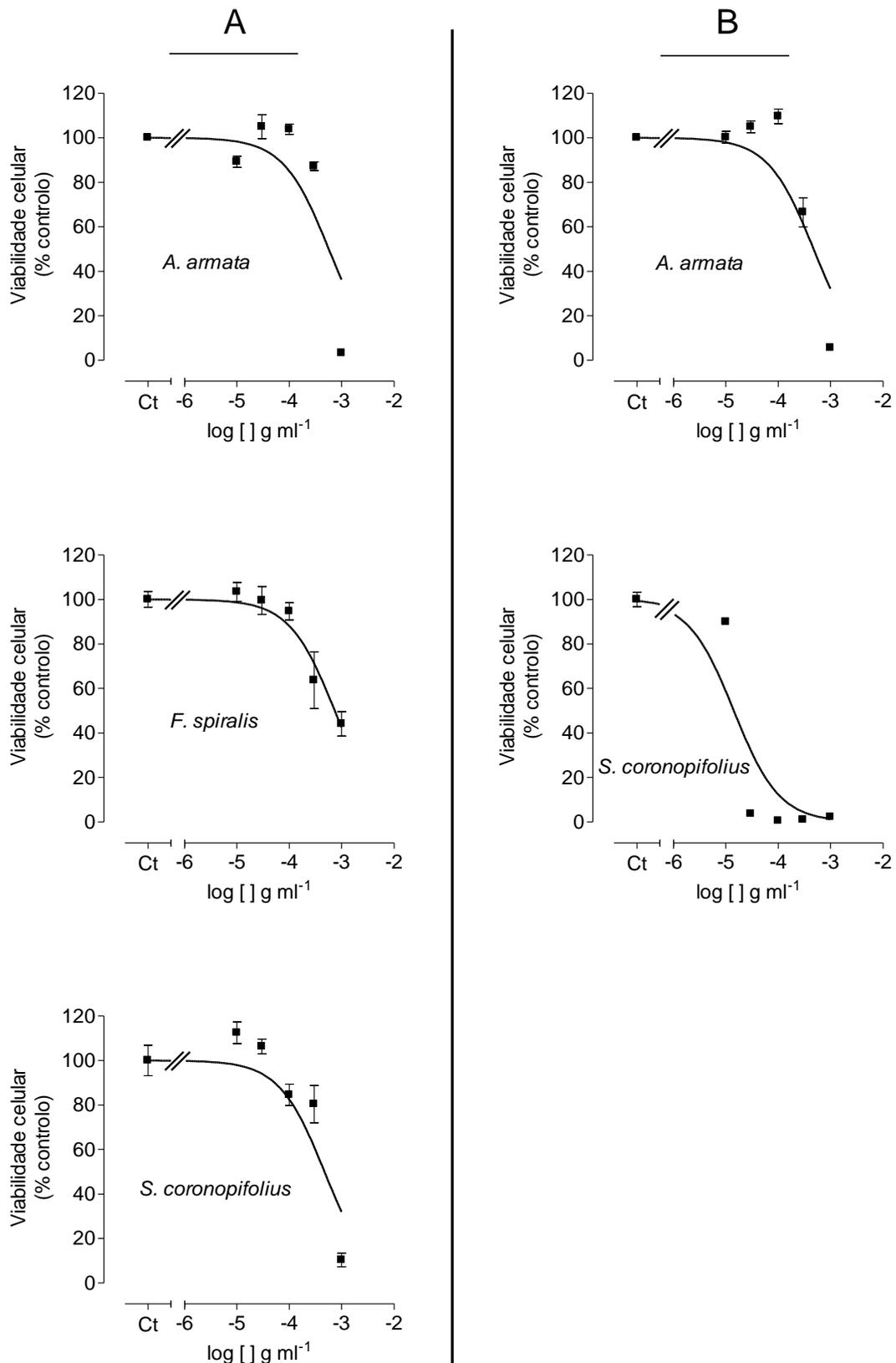


Figura 12. Dependência da concentração (10 – 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) das frações metanólica (A) e diclorometano (B) das algas que reduzem ($\geq 50\%$, 1 mg ml^{-1}) a viabilidade celular das células HepG-2. Os símbolos correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=8)

Tabela III – Determinação do IC₅₀ para capacidade de redução da viabilidade celular dos diferentes extratos testados na linha celular HepG-2.

Algas	Fração	Metanol	Diclorometano
		IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Fucus spiralis</i>		739,4 (521,9 – 1047,0)	-----
<i>Asparagopsis armata</i>		567,9 (317,7 – 1015,0)	473,1 (341,9 – 654,7)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>		470,6 (310,7 – 712,6)	14,1 (8,1 – 24,6)

Posteriormente, para as algas que demonstraram maior potencial, nomeadamente a alga *Fucus spiralis*, *Asparagopsis armata* e *Sphaerococcus coronopifolius*, decidiu-se estudar a toxicidade causada pelos extratos nesta linha celular após diferentes tempos de incubação. Os resultados encontram-se na figura 13 e representam os efeitos dos extratos após 12 horas e 24 horas de incubação.

Através da análise da figura 13 verifica-se que todos efeitos dos extratos ocorrem de um modo dependente do tempo, quer na fração metanólica, quer na fração diclorometano. Porém, na fração metanólica (Figura 13A) o efeito que se instala mais rapidamente (após 12 horas de incubação) pertence a alga *Sphaerococcus coronopifolius* (30,31 ± 0,73% de células viáveis), por sua vez na fração diclorometano (Figura 13 B) o efeito mais marcado às 12 horas pertence à alga *Asparagopsis armata* (19,31 ± 1,53% de células viáveis). Apenas a alga *Fucus spiralis* (99,85 ± 1,03% de células viáveis), na fração metanólica, não apresentou nenhum efeito às 12 horas.

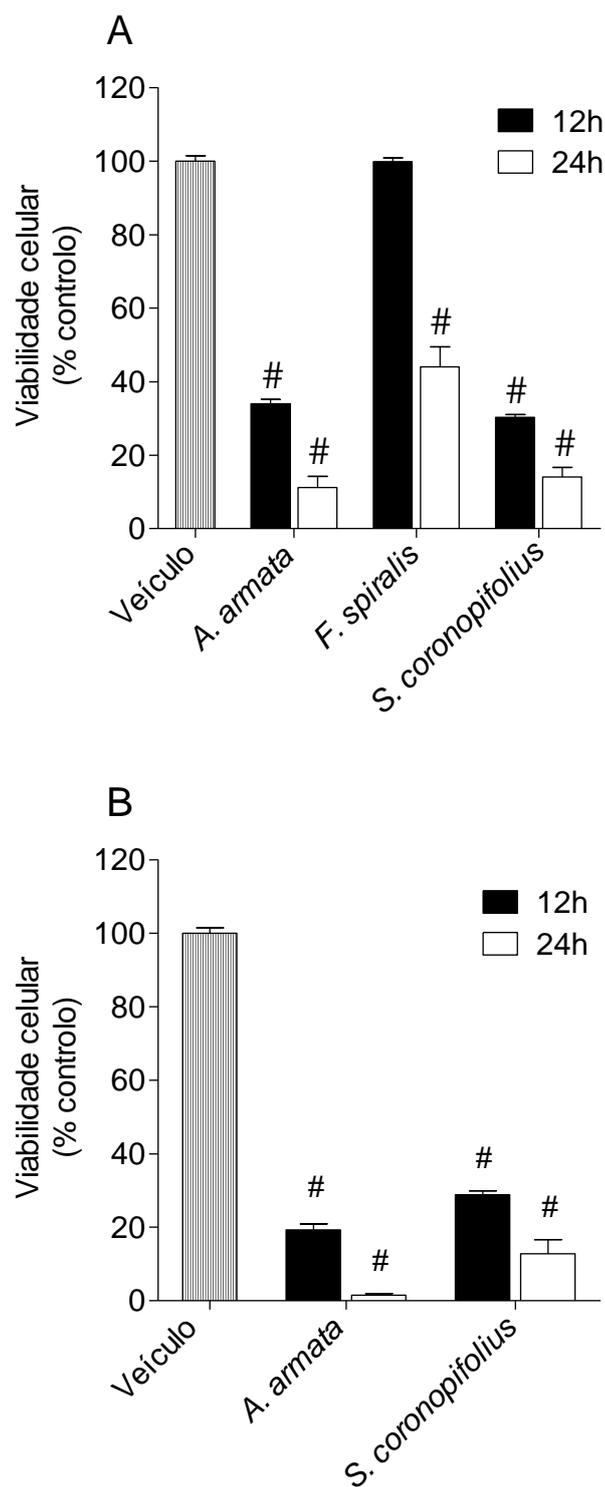


Figura 13. Efeitos dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a viabilidade celular das células HepG-2 (% controle) após 12 e 24 horas de incubação. A) fração metanólica; B) fração diclorometano. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) entre 7 e 9 experiências independentes. # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

4.1.2.2. Efeitos dos extratos de algas sobre a proliferação celular das células HepG-2

No que respeita à proliferação celular, todos os extratos das algas em estudo foram testados na linha celular HepG-2 após 36 horas das células serem semeadas na placa de ensaio. As experiências realizadas com a fração metanólica e diclorometano das diferentes algas presentes no neste estudo foram efetuadas à concentração máxima de 1mg ml^{-1} , durante um período de incubação de 24 horas, estando os resultados obtidos apresentados na figura 14.

Nos resultados obtidos para a fração metanólica (Figura 14A) é possível verificar que a inibição da proliferação celular das células HepG-2 foi provocada por quatro algas, duas do Filo Heterokontophyta, *Fucus spiralis* ($44,60 \pm 6,75\%$ de células) e *Saccorhiza polyschides* ($62,66 \pm 2,95\%$ de células) e duas do Filo Rhodophyta, *Asparagopsis armata* ($43,42 \pm 7,69\%$ de células) e *Sphaerococcus coronopifolius* ($44,87 \pm 3,64\%$ de células). Por sua vez a fração metanólica das algas verdes, ou seja do Filo Chlorophyta não revelou qualquer atividade. Relativamente a fração de diclorometano (Figura 14B) constata-se que seis algas exibiram potencial de inibição sobre a proliferação celular. Contudo as algas que mais estimularam a inibição da proliferação celular ($> 50\%$) foram as algas *Asparagopsis armata* ($1,44 \pm 0,81\%$ de células), *Plocamium cartilagineum* ($14,87 \pm 1,04\%$ de células) e *Sphaerococcus coronopifolius* ($0,39 \pm 0,27\%$ de células).

Procedendo-se como anteriormente, decidiu-se validar por outro método os resultados das algas que exibiram maior potencial ($\geq 50\%$.) pelo método de MTT. Deste modo, os efeitos provocados pelas algas selecionadas foram revelados por um método de fluorescência estando os resultados obtidos presentes na figura 15.

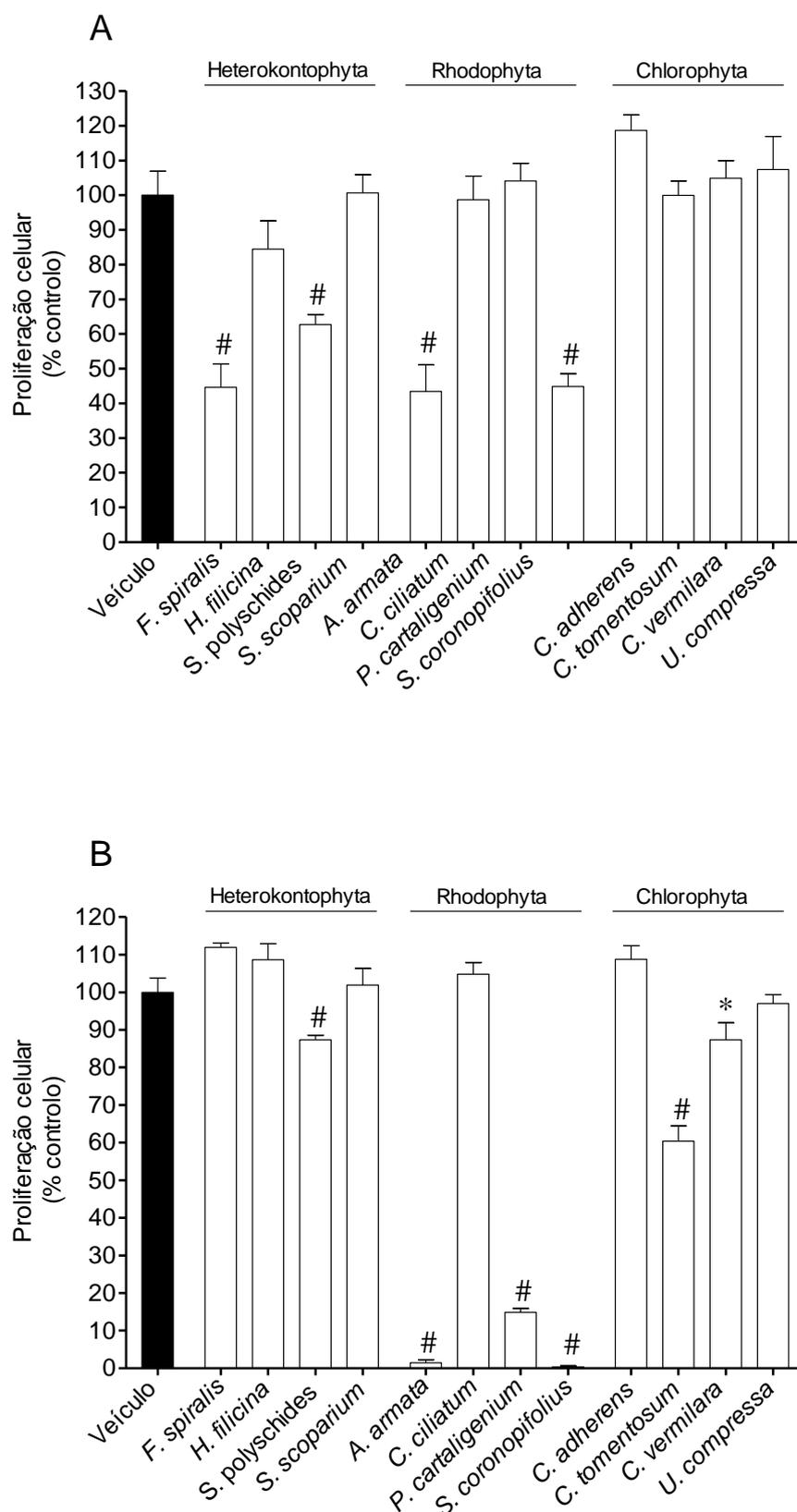


Figura 14. Efeitos das frações metanólica (A) e fração de diclorometano (B) dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a proliferação celular das células HepG-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

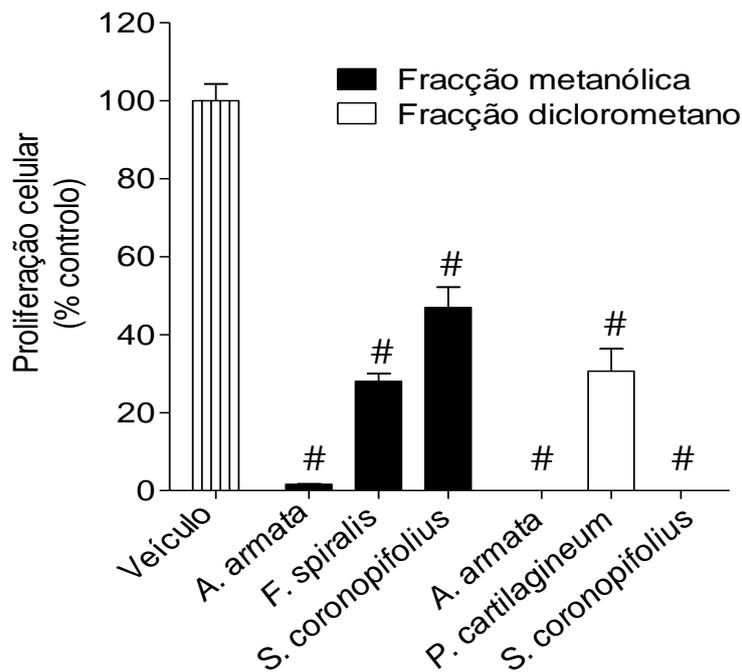


Figura 15. Efeitos dos extratos de algas (1 mg ml^{-1}) sobre a proliferação celular de células HepG-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de fluorescência com calcéina-AM. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$). # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

Comparando os resultados da figura 14 com a figura 15, para as algas selecionadas, verifica-se que as algas que exibiram efeitos interessantes pelo método de MTT, continuaram a revelar o mesmo potencial quando ensaio foi realizado com o método de fluorescência. Contudo os efeitos exibidos através do método de fluorescência foram mais marcantes para a alga *Asparagopsis armata* em ambas as frações (metanólica – $1,61 \pm 0,15\%$ de células; diclorometano – $0 \pm 0,09\%$ de células), assim como para a fração diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius* ($0 \pm 0,08\%$ de células). Por outro lado a fração metanólica ($46,99 \pm 5,22\%$ de células) e fração diclorometano ($30,65 \pm 5,73\%$ de células) da alga *Sphaerococcus coronopifolis* e *Plocamium cartilagineum*, respetivamente, perderam atividade quando comparada com a exibida pelo método de MTT. No entanto mantiveram um efeito de inibição da proliferação celular superior a 50%.

Em conformidade com os ensaios realizados anteriormente, para todos os extratos que exibiram um efeito de inibição igual ou superior a 50% sobre proliferação celular, planeou-se experiências de dependência da concentração para definir a potência dos mesmos. Todos os extratos exibiram um efeito dependente da concentração, a exceção da alga *Fucus spiralis* que apenas apresentou efeito à concentração máxima de 1 mg ml^{-1} . Os resultados encontram-se representados na figura 16.

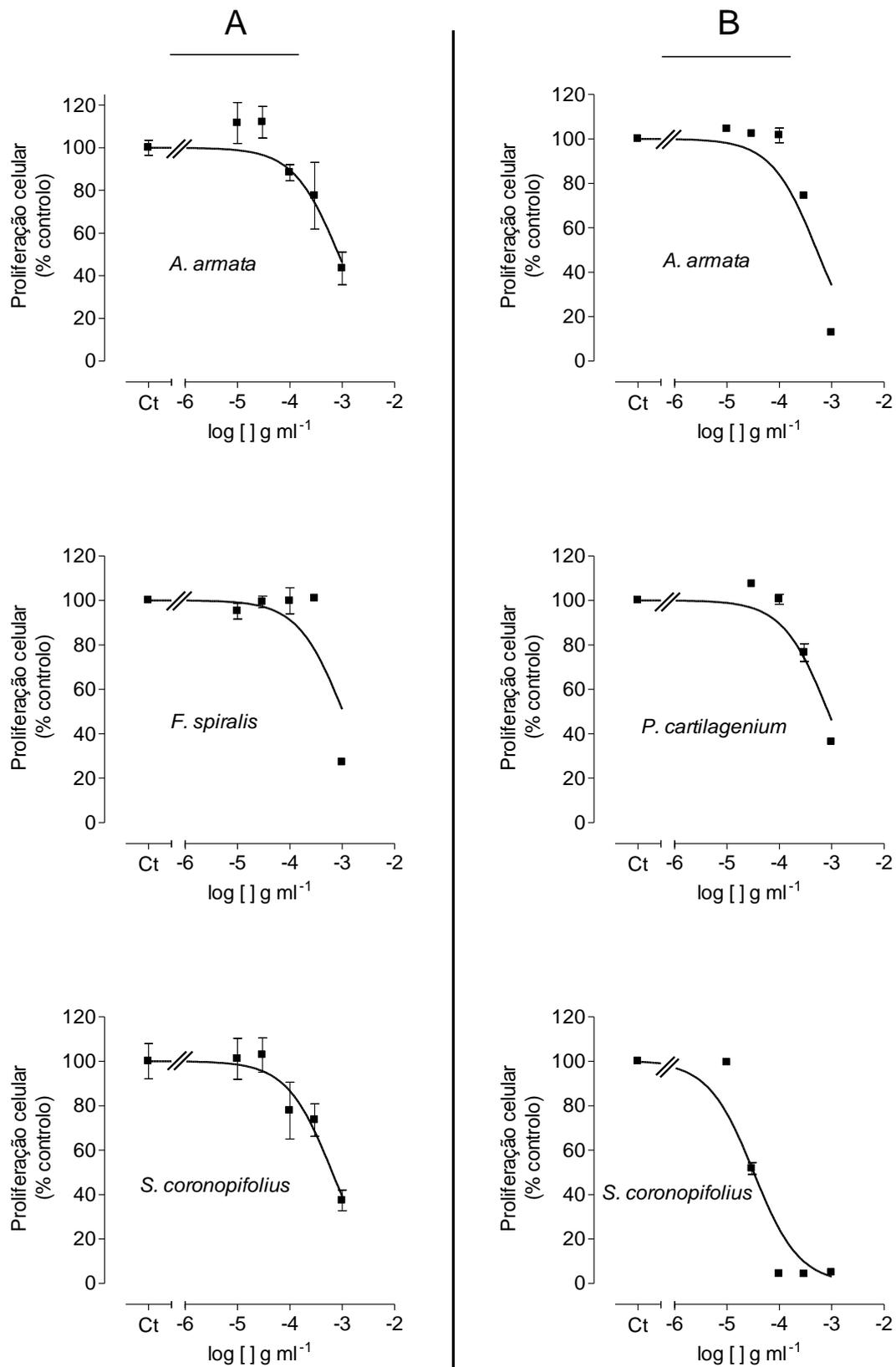


Figura 16. Dependência da concentração ($10 - 1000\mu\text{g ml}^{-1}$) das frações metanólica (A) e diclorometano (B) das algas que inibem ($\geq 50\%$, 1 mg ml^{-1}) a proliferação celular das células HepG-2. Os símbolos correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) ($n=8$).

Através dos resultados obtidos nos ensaios de dependência da concentração retirou-se os valores de IC₅₀, estando representados na tabela IV.

Tabela IV – Determinação dos valores de IC₅₀ para capacidade dos diferentes extratos na inibição da proliferação celular das células HepG-2.

Algas	Fração	Metanol	Diclorometano
		IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Fucus spiralis</i>		1039,0 (603,7 – 1789,0)	-----
<i>Asparagopsis armata</i>		857,3 (524,5 – 1401,0)	518,9 (341,3 – 789,0)
<i>Plocamium cartilagineum</i>		-----	852,7 (471,9 – 1541,0)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>		646,5 (398,4 – 1049,0)	32,3 (22,4 – 46,7)

Na tabela IV é possível visualizar que a alga que exibiu maior potencial de inibição da proliferação celular foi a *Sphaerococcus coronopifolius* quer na fração metanólica quer na fração de diclorometano, apresentado os valores de IC₅₀ mais baixos. Contudo a alga *Asparagopsis armata* também apresentou um potencial interessante em ambas as frações.

Para algas presentes na tabela IV decidiu-se estudar o efeito dos seus extratos ao longo tempo na proliferação celular, nomeadamente às 12, 24 e 48 horas de incubação. Os resultados encontram-se representados na figura 17.

Nos resultados apresentados na figura 17, para a fração metanólica (Figura 17A) todos os extratos testados exibiram um efeito dependente do tempo entre as 12 e as 24 horas de incubação. Quando se analisa os resultados de cada uma das algas, constata-se que o efeito que se instala mais rápido (às 12 horas) corresponde à alga *Sphaerococcus coronopifolius*, contudo esta alga é a única que perde efeito após 48 horas de incubação, todas as outras acentuam a sua atividade sobre a proliferação celular das células HepG-2. Relativamente à fração de diclorometano (Figura 17B), a alga *Asparagopsis armata* (25,28 ± 2,59% de células) apresentou o maior potencial de inibição após 12 horas de incubação com as células HepG-2, seguida pela alga *Sphaerococcus coronopifolius* (39,21 ± 7,13% de células). Todos os extratos exibiram efeitos dependentes do tempo entre as 12

e as 24 horas, perdendo atividade após 48 horas. Este facto é mais evidente na alga *Plocamium cartilagenium*.

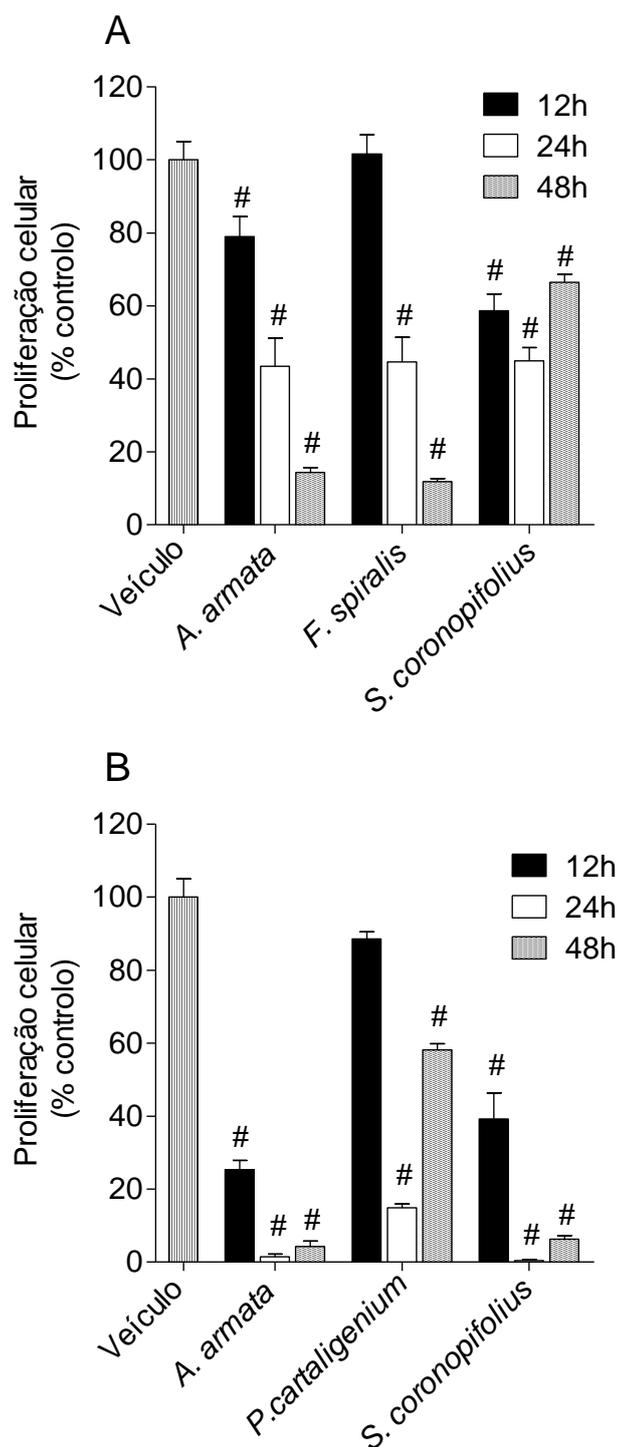


Figura 17. Efeitos dos extratos de algas (1mg ml^{-1}) sobre a proliferação celular das células HepG-2 (% controlo) após 12, 24 e 48 horas de incubação. A) fração metanólica; B) fração diclorometano. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) entre 7 e 9 experiências independentes. # $p < 0.01$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo.

Discussão e Conclusão

Num ambiente tão competitivo e exigente como o marinho, as algas possuem mecanismos de defesa que levam à produção de uma variedade significativa de novas moléculas bioativas, muitas das quais têm exibido potencial antitumoral contra diversas linhas celulares (Cardozo *et al.*, 2007; Zandi *et al.*, 2010). Neste estudo, todas as algas foram recolhidas na região intertidal (zona “entre-marés”), estando sujeitas a períodos de imersão e emersão, assim como à ação de organismos epífitas, competidores, bactérias patogénicas e herbívoros. Estes fatores são preponderantes na produção de novas moléculas com atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, etc (Bianco *et al.*, 2010). Este facto foi confirmado pelos nossos resultados que demonstram uma elevada atividade citotóxica de diferentes algas nos dois modelos celulares tumorais humanos utilizados, o adenocarcinoma colórectal (Caco-2) e o carcinoma hepatocelular (HepG-2).

A avaliação da viabilidade celular revelou um potente efeito citotóxico associado à fração metanólica das algas *Fucus spiralis*, *Asparagopsis armata* e a *Sphaerococcus coronopifolius*. Este efeito foi observado em ambas as linhas celulares. Na fração de diclorometano, basicamente, só as algas vermelhas (Filo Rhodophyta) demonstraram um levado potencial citotóxico associado, principalmente, às algas *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius*. Como foi já mencionado, os citotóxicos podem exercer atividade por mecanismos de indução de morte celular, por necrose ou apoptose, ou por bloqueio do ciclo celular. Deste modo, é fundamental tentar perceber não só a viabilidade celular, mas também os efeitos dos extratos de algas na proliferação celular. Os resultados referentes à proliferação celular revelaram, de um modo concordante com os efeitos observados nos ensaios de viabilidade celular, que, para ambas as linhas celulares, as algas com maior potencial, quer na fracção metanólica, quer na fração diclorometano, pertencem ao Filo Rhodophyta (*Asparagopsis armata* e *Sphaerococcus coronopifolius*). No entanto, a alga castanha *Fucus spiralis* e alga vermelha *Plocamium cartilagineum* também apresentaram resultados muito interessantes, para a fração metanólica e para a fração diclorometano, respetivamente. No caso da *Fucus spiralis*, o efeito verificado nas células HepG-2 foi mais potente do que o verificado para as células Caco-2, facto observado pelo método fluorimétrico. Esta situação é particularmente interessante, pois revela a existência de moléculas que medeiam efeitos seletivos e diferenciadores entre as linhas tumorais intestinais e hepáticas. A suportar esta ideia é interessante sublinhar que as células Caco-2 não exibiram qualquer suscetibilidade perante as frações diclorometano das algas castanhas (Filo Heterokontophyta). Por outro

lado, as células HepG-2 não demonstraram qualquer tipo de sensibilidade na presença das frações de diclorometano das algas verdes (Filo Chlorophyta). Outro argumento que favorece esta multiplicidade de mecanismos está associado ao facto de alguns extratos de algas não mostrarem qualquer tipo de redução da viabilidade celular, apesar de inibirem a proliferação celular ou vice-versa. Alguns destes exemplos são a fração metanólica da *Halopteris filicina* e as duas frações da *Stypocaulon scoparium* na linha celular Caco-2. Nas células HepG-2 esta situação ocorreu com as duas frações da *Saccorhiza polyschides* e com a fração metanólica das algas *Halopteris filicina* e *Codium tomentosum*. Os processos fundamentais de proliferação celular são regulados finamente pelo ciclo celular e pela apoptose, envolvendo uma interação coordenada e complexa de várias famílias de proteínas. Estes processos são distintos, no entanto estão intimamente relacionados, facto que é evidenciado pelo papel central da proteína p53, quer no controlo do ciclo celular, quer na indução da apoptose (Sa e Das, 2008). Tudo isto aponta que alguns dos resultados possam estar associados a mecanismos diferentes, isto é, as frações testadas podem estar apenas a bloquear o ciclo celular, apenas a induzir apoptose ou a promoverem estes mecanismos em simultâneo.

Os efeitos provocados nas diferentes linhas celulares pelas algas do Filo Chlorophyta foram pouco significativos. Contudo existem estudos que reportam a atividade antiproliferativa de algas verdes. Cavas e colaboradores (2006) verificaram atividade antiproliferativa associada à alga *Caulerpa racemosa* (alga verde). Polissacarídeos sulfatados isolados a partir da alga *Ulva lactuca* também demonstraram capacidade de inibir a proliferação da linha celular Caco-2 (Costa *et al.*, 2010). Contudo também existem alguns estudos que reportam a inexistência de qualquer tipo de atividade por este tipo de algas. Por exemplo, no estudo realizado por Spavieri e colaboradores (2010), incluindo algas do género *Ulva* e do género *Codium*, não se verificou qualquer tipo de atividade sobre a linha tumoral muscular L6. Do mesmo modo, a espécie *Codium fragile*, num estudo de Villarreal-Gómez e colaboradores (2010), não demonstrou qualquer tipo de atividade citotóxica sobre linha celular de cancro de cólon (HCT-116). Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, uma vez que na maioria dos ensaios realizados com extratos de algas verdes não se verificou qualquer tipo de atividade relevante. Por outro lado, Moo-Puc e colaboradores (2009), quando avaliaram o potencial citotóxico de diversas algas pertencentes aos três Filos (Herokontophyta, Rhodophyta e Chlorophyta), demonstraram que as algas pertencentes ao Filo Chlorophyta foram as que

apresentaram maior atividade contra as linhas celulares tumorais testadas, incluído a linha HepG-2. Estes resultados parecem de algum modo contraditórios, porém esta aparente “contradição” não é de todo surpreendente, uma vez que estamos a falar de organismos que produzem estas moléculas através do seu metabolismo secundário, de modo a responder às pressões a que estão sujeitos. Diversos estudos têm associado a toxicidade exibida pelas algas com variações espaço-temporais. A toxicidade varia ainda intraespécies, bem como interespecies, em função da comunidade ou da temporada, apontando para o papel importante dos fatores bióticos e abióticos na produção de defesas químicas por estes organismos. A variação destes fatores poderá ser interessante, uma vez que o potencial verificado pelas algas neste estudo poderá dever-se a moléculas já descritas ou então a novas moléculas. Outro fator que pode contribuir para esta diferença de resultados é o tipo de protocolos de extração adotados (por exemplo diferentes tipos de solventes) para recuperar metabolitos de interesse, uma vez que métodos distintos podem extrair diferentes tipos de moléculas e conseqüentemente criar suscetibilidades diferentes nos modelos alvo a testar (Martí *et al.*, 2004; Osman *et al.*, 2010; Taskin *et al.*, 2010).

A elevada atividade citotóxica encontrada na alga castanha *Fucus spiralis* não é de todo surpreendente, uma vez que algas pertencentes ao Filo Heterokontophyta encontram-se descritas como sendo produtoras de uma variedade de metabolitos secundários com atividade biológica (Amsler, 2008; Costa *et al.*, 2010). Diversos estudos têm demonstrado o potencial antiproliferativo das algas castanhas em várias linhas celulares tumorais, nomeadamente em linhas tumorais intestinais humanas, como foi o caso das algas *Sargassum thunbergii* e *Dictyopteris divaricata*, que evidenciaram uma excelente atividade citotóxica em células HT-29 (linha tumoral humana de cólon) (Kim *et al.*, 2009). No caso da *Fucus spiralis*, o facto de nas células hepáticas o efeito ser muito mais marcado na inibição da proliferação celular (método fluorimétrico), sugere que o mecanismo de ação poderá passar pela inibição do ciclo celular e não pela indução de apoptose ou de mecanismos necróticos. Na realidade, Moreau e colaboradores (2006) demonstraram um efeito antiproliferativo da alga castanha *Bifurcaria bifurcata*, pela inibição da fase G1 do ciclo celular das células NSCLC-N6 (linha celular humana de tumor brônquio-pulmonar).

A atividade exibida pelos extratos das algas castanhas pode dever-se à presença de uma das famílias de polissacarídeos sulfatados, os *fucoïdians*, que têm despertado a atenção de muitos grupos de investigação. Estes polissacarídeos têm características polares e encontram-se nas paredes celulares de várias algas castanhas. Não só está descrito que

estas moléculas suprimem o crescimento de células tumorais e ativam o sistema imunitário contra os tumores (Kamihira *et al.*, 2010), como Ye e colaboradores (2005) demonstraram que a digestão enzimática de extrato de *fucoïdan* inibe a invasão e a angiogênese de células tumorais. No trabalho realizado por Costa e colaboradores (2011) foi ainda descrito outro grupo de polissacarídeos sulfatados designados por *heterofucans*, que foram isolados a partir da alga castanha *Sargassum filipendula*, e que mostraram provocar uma forte atividade antiproliferativa em células HeLa (Linha tumoral humana de cervical) e uma atividade moderada em células HepG-2, facto que também foi observado no nosso estudo. Por sua vez, Pereira e colaboradores (2011) isolaram cinco moléculas pertencentes à classe dos terpenoides a partir da alga castanha *Styopodium flabelliforme*, das quais três demonstraram ter um efeito inibitório da proliferação celular em células Caco-2. Nesta linha de investigação, Ayyad e colaboradores (2011) isolaram três novos diterpenos a partir da alga castanha *Dictyota dichotoma*, em que dois tiveram uma atividade citotóxica bastante potente nas células HepG-2.

Quer terpenoides, quer os polissacarídeos são fortes candidatos a mediar o efeito citotóxico associado à alga *Fucus spiralis*, já que estas moléculas podem ser extraídas na fração metanólica (polar), precisamente a fração em que obtivemos elevada atividade. Na realidade foi já descrito que *fucoïdants* isolados a partir da alga *Fucus vesiculosus* demonstraram reduzir a viabilidade celular das células Lewis do carcinoma do pulmão e das células B16, modelo de melanoma. Este potencial foi também encontrado em células modelo de cancro do cólon, onde a presença do extrato de *fucoïdants*, da alga *Fucus vesiculosus*, inibiu o crescimento das células HCT-15, induzindo eventos apoptóticos como fragmentação de ADN e a condensação de cromatina. Neste estudo foram também observadas mudanças nos níveis de expressão das proteínas Bcl-2 e Bax, assim como a ativação de caspases (Hyun *et al.*, 2009; Ale *et al.*, 2011). Por outro lado, a espécie *Fucus evanescens*, no estudo de Imbs e colaboradores (2009), demonstrou suprimir o crescimento de células do cancro do cólon, sendo este efeito visível nas linhas celulares DLD-1 e HT-29. Todos estes mecanismos mediados pelo *fucoïdants* apontam para indução de processos apoptóticos em linhas tumorais intestinais. Em linha com estes resultados, também o nosso estudo aponta para um mecanismo de indução de citotoxicidade independente da inibição do ciclo celular, já que nas células Caco-2 os efeitos na viabilidade celular foram bastante mais potentes, quando comparados com os efeitos antiproliferativos observados. Diversos estudos têm apontado para a existência de uma possível relação entre a atividade

antioxidante e a atividade antitumoral de extratos de algas. No entanto, estes efeitos prooxidantes, associados a alguns antioxidantes, como mecanismo mediador de citotoxicidade continuam a ser bastante controversos. Neste contexto, as florotaninas podem assumir um destaque particular enquanto moléculas com uma atividade antioxidante notável, representando o maior grupo de polifenóis detetado em algas castanhas (Wang *et al.*, 2009). Também aqui os resultados são controversos, por exemplo, a alga *Fucus cerenoides*, num estudo realizado por Zubia e colaboradores (2009a), demonstrou possuir uma elevada capacidade antioxidante, assim como um elevado teor em polifenóis, no entanto o ensaio de citotoxicidade não revelou qualquer tipo de efeito sobre linhas celulares testadas. Por outro lado, Huicheng e colaboradores (2010) demonstraram que florotaninas extraídas da alga *Laminaria japonica* inibem a proliferação de células tumorais. Reddy e colaboradores (2003) associaram estes efeitos em células tumorais a mecanismos prooxidantes. A existência de elevadas concentrações de florotaninas na alga *Fucus vesiculosus*, uma alga do mesmo género da *Fucus spiralis*, bem como o facto de estudos anteriores do nosso grupo (Pintéus *et al.*, 2009) demonstrarem que a alga *Fucus spiralis* possui uma elevada concentração de polifenóis na fração metanólica, precisamente a fração que revelou potencial citotóxico sobre as linhas celulares HepG-2 e Caco-2, não excluem a hipótese das florotaninas poderem mediar este efeito. A fortalecer esta ideia, Díaz-Rubio e colaboradores (2008) demonstraram que as algas do género *Fucus* são maioritariamente constituídas por polissacarídeos não digestíveis e polifenóis (Díaz-Rubio *et al.*, 2008).

As algas vermelhas (Filo Rhodophyta) também são produtoras de uma variedade de metabolitos secundários com elevado interesse, como por exemplo mono e diterpenos halogenados, esteróis, alcaloides, polifenóis e açúcares sulfatados (Allmendinger *et al.*, 2010). Existem inclusive alguns trabalhos que evidenciam atividade deste tipo de algas sobre linhas celulares hepáticas. A alga *Gloiopeltis furcata* demonstrou suprimir o crescimento de células HepG-2 através da indução do bloqueamento da fase G2/M do ciclo celular (Bae e Choi, 2007). De igual modo, compostos bromofenólicos isolados a partir da alga *Rhodomela confervoides* exibiram atividade citotóxica na linha celular hepática humana Bel7402 (Lijun *et al.*, 2005). Por outro lado, o monoterpene penta-halogenado, halomon, que se encontra em fase de ensaios pré-clínicos, foi isolado a partir da alga vermelha *Portieria hornemanni* demonstrou possuir citotoxicidade contra várias linhas celulares tumorais, nomeadamente do cólon (Jha e Zi-rong, 2004; Zubia *et al.*, 2009b).

Tendo por base estes estudos, observa-se que diferentes espécies de algas do Filo Rhodophyta (algas vermelhas) têm capacidade de produzir moléculas com atividade citotóxica contra várias linhas celulares, entre as quais hepáticas e colorectais. Também neste trabalho foi possível observar este potencial, visto que as algas pertencentes ao Filo Rhodophyta (algas vermelhas) nomeadamente as algas *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagenium* e *Sphaerococcus coronopifolis* mostraram resultados muito interessantes para as linhas celulares HepG-2 e Caco-2.

Na realidade, diversos estudos têm reportado a atividade antimicrobiana da alga *Asparagopsis armata* contra vários tipos de micro-organismos (Kladi *et al.*, 2004; Bansemir *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2007; Genovese *et al.*, 2009). Contudo, o seu potencial citotóxico apenas foi reportado no trabalho de Zubia e colaboradores (2009b), no qual avaliaram o potencial citotóxico de diferentes algas vermelhas sobre as linhas celulares tumorais modelo de linfoma e de leucemia. No estudo referido anteriormente, a alga *Asparagopsis armata* revelou ter um efeito citotóxico bastante potente contra as linhas celulares tumorais linfoblásticas, resultados concordantes com o potencial citotóxico exibido no nosso trabalho contra as linhas celulares HepG-2 e Caco-2.

A atividade citotóxica associada à alga *Plocamium cartilagenium*, pode dever-se à presença de monoterpenos halogenados, já que Inés e colaboradores (2004) demonstraram que estas moléculas (isoladas a partir desta alga) exibiram grande atividade contra células de adenocarcinoma humano de cólon (SW480).

Dentro do Filo Rhodophyta, a alga *Sphaerococcus coronopifolius* tem sido alvo de vários estudos, pois mostra possuir diterpenos com muito interesse (Smyrniotopoulos *et al.*, 2009). Alguns destes diterpenos isolados demonstraram ter atividade citotóxica contra células do cancro do pulmão Humano (NSCLC-N6-L16 e A549) e algumas destas moléculas foram capazes de superar a resistência natural de algumas células cancerígenas ao processo de apoptose (Smyrniotopoulos *et al.*, 2008; Smyrniotopoulos *et al.*, 2010). A existência destas moléculas nas frações testadas da alga *Sphaerococcus coronopifolius* poderá ser responsável pela potente atividade citotóxica exibida nas linhas celulares tumorais HepG-2 e Caco-2. Isto é ainda mais evidente se atentarmos ao facto das frações diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius* apresentarem os menores valores de IC₅₀, sendo portanto, em princípio, a fração com maior potencial encontrado. Estes resultados são ainda mais interessantes se os compararmos com fármacos atualmente utilizados no tratamento do carcinoma hepatocelular. Por exemplo, o *Sorafenib*,

comercialmente conhecido por Nexavar, é uma molécula com capacidade de inibir a proliferação celular de tumores, a angiogénese e estimular o processo apoptótico em diversos modelos tumorais (Llovet *et al.*, 2008.). No estudo realizado por Liu e colaboradores (2006) este fármaco revelou um efeito de inibição da proliferação celular em células HepG-2 com IC₅₀ igual a 20,92 µg/ml, valores que comparam bem com o IC₅₀ obtido nos nosso trabalho (viabilidade celular – IC₅₀ 14,1 µg/ml; proliferação celular – IC₅₀ 32,3 µg/ml) na redução da proliferação celular das células hepáticas (HepG-2) pelo extrato da fração diclorometano da *Sphaerococcus coronopifolius*. Uma situação semelhante é observada quando analisamos o *5-fluorouracil*, um dos fármacos atualmente utilizado na terapêutica do carcinoma colorrectal, (Flis e Spławiński, 2009). Este fármaco no estudo realizado por Ciccolini e colaboradores (2000) exibiu um IC₅₀ de 8,46 µg/ml no ensaio de proliferação com a linha celular Caco-2. Estes valores são muito próximos dos valores obtidos pelos extratos da fração diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius*, quer na redução da viabilidade celular (IC₅₀ – 21,3 µg/ml), quer na redução da proliferação celular (IC₅₀ – 36,5 µg/ml).

Os resultados verificados para várias algas, mas principalmente para a alga *Sphaerococcus coronopifolius*, demonstram ser bastante promissores, pois trata-se de um extrato bruto (composto por uma diversidade de moléculas), e uma vez isoladas e purificadas as moléculas responsáveis por esta atividade, poder-se-á potenciar em muito a sua capacidade. De igual modo, a atividade dos outros extratos que exibiram valores de IC₅₀ mais elevados poderá ser intensificada. Este facto foi reportado no trabalho de Cavas e colaboradores (2006), em que a molécula *Caulerpenyne* isolada e purificada a partir dos géneros *Caulerpa* apresentou mais propriedades antiproliferativas do que os extratos da alga *Caulerpa racemosa* (alga verde). Por outro lado os efeitos evidenciados pelos extratos brutos poderão ser resultantes do sinergismo de diferentes moléculas, uma vez começado o processo de fracionamento (isolamento e purificação) dos extratos poder-se-á perder esta atividade (Efferth *et al.*, 2008 Sarker *et al.*, 2006). Na área farmacoterapêutica o efeito de sinergismo entre moléculas tem sido alvo de alguns estudos. Por exemplo, no trabalho realizado por Flis e Spławiński (2009), a combinação de *5-fluorouracil* ou *oxaliplatin* (fármaco utilizado no tratamento do carcinoma colorrectal) com *sulindac sulfide* resultou no potenciamento dos efeitos de inibição do crescimento de células do carcinoma colorrectal (*in vitro*). Atualmente, uma das práticas mais comuns na terapêutica de um determinado cancro é a utilização de diferentes fármacos em simultâneo, de modo a evitar o

desenvolvimento de resistências pelas células cancerígenas, um dos principais fatores no fracasso de algumas formas de quimioterapia (Shah e Schwartz, 2001). De facto, nos extratos das algas que exibiram maior potencial, o sinergismo entre diferentes moléculas poderá estar a ocorrer e ser responsável pela atividade demonstrada. Contudo só será possível compreender esta situação após o isolamento e purificação de moléculas, verificando se existe ou não perda de atividade durante o processo.

Em suma, os organismos marinhos têm revelado uma fonte de novos compostos com múltiplas propriedades farmacológicas (Arif *et al.*, 2004). No caso específico das algas, estas encontram-se reportadas como sendo produtoras de uma variedade de metabolitos secundários com atividades citotóxicas bastante interessantes em diferentes linhas celulares. Através do presente trabalho algumas das algas recolhidas na costa de Peniche revelaram possuir atividade antiproliferativa contra as linhas celulares Caco-2 e HepG-2. De todas as algas, os extratos da *Fucus spiralis*, *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius* (Filo Heterokontophyta e Rhodophyta) foram os que revelaram maior capacidade de redução da viabilidade celular e inibição da proliferação das linhas celulares em estudo. De todas estas, os extratos com maior potencial parecem estar, claramente, associados à alga *Sphaerococcus coronopifolius*. Por sua vez a atividade exibida pelas algas do Filo Chlorophyta foi pouco significativa. Embora sejam ensaios preliminares e sejam necessários mais estudos, este trabalho demonstra a potencialidade das algas da costa de Peniche como fonte promissora de novas moléculas com atividade antitumoral.

Perspetivas Futuras

A investigação sobre as propriedades farmacológicas de produtos naturais marinhos levou à descoberta de muitos compostos que atualmente são utilizados clinicamente. Através da realização deste trabalho foi possível constatar que as algas da costa de Peniche revelam-se ser uma fonte promissora de novas moléculas bioativas com atividade antitumoral. No entanto, este foi o primeiro passo de um longo trabalho de investigação, onde muitos ensaios serão necessários para comprovar a possível aplicabilidade destas moléculas como citostáticos no tratamento do cancro.

Para complementar este trabalho será necessário realizar ensaios de viabilidade celular e proliferação celular após 48 e 72 horas, para as algas que não exibiram nenhuma atividade após 24 horas de incubação, uma vez que estes extratos poderão necessitar de mais tempo para exibir efeitos sobre as linhas celulares em estudo. De igual modo, será necessário proceder a realização de curvas dose-resposta com fármacos utilizados na terapêutica dos dois tipos de carcinoma abordados neste trabalho, de modo a comparar com mais rigor a potência dos efeitos encontrados.

A próxima etapa para os extratos de algas que demonstraram maior potencial será o processo de identificação, isolamento e purificação das moléculas responsáveis pela atividade exibida nas linhas celulares Caco-2 e HepG-2. Para a identificação será necessário utilizar diferentes técnicas analíticas, como por exemplo a cromatografia líquida (LC) e/ou gasosa (GC), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massa (MS). Por sua vez, para o isolamento e purificação das moléculas poder-se-á utilizar diversos tipos de cromatografia, bem como métodos de preparação de amostra, como por exemplo a extração em fase sólida (SPE). Este processo deverá ser acompanhado em paralelo com ensaios *in vitro*, de modo a verificar se existe perda de atividade.

Qualquer molécula para ser utilizada como agente terapêutico é necessário conhecer-se os seus mecanismos de ação. Nesta fase inicial poderá tentar-se compreender de que modo é que estes extratos reduzem a viabilidade celular e inibem a proliferação celular das células Caco-2 e HepG-2. Na viabilidade celular será interessante perceber se a redução verificada se deve ou não ao desencadeamento do processo de apoptose. Isto poderá ser avaliado através da realização de Western-blots, verificando os níveis de expressão da proteína p53 ou bcl-2, através da atividade da caspase 3 ou pela análise da fragmentação de ADN. Por sua vez para os extratos que demonstraram maiores efeitos de inibição sobre a proliferação celular será interessante analisar o ciclo celular, determinando a sua distribuição por análise de citometria de fluxo.

Atualmente no tratamento do cancro, um dos fatores que condiciona o sucesso da quimioterapia é a existência de células tumorais resistentes à ação de alguns fármacos. Futuramente poderá ser de interesse testar estes extratos de algas em linhas celulares tumorais resistentes, assim como noutras linhas celulares tumorais (por exemplo do carcinoma da mama ou do pâncreas). Além destes dois tipos de linhas celulares também se deverá testar estes extratos em células normais, de modo a compreender se existe alguma seletividade para as células tumorais. Na realidade, este será mesmo um passo determinante, já que o citostático ideal será aquele que reduzir a proliferação celular das células alvo, causando a menor toxicidade possível para outras células do organismo. Deste modo os compostos só são interessantes para quimioterapia humana quando a sua toxicidade é maior em células cancerígenas do que em células normais (Pereira, *et al.*, 2011). Por esta razão será essencial avaliar a toxicidade em modelos animais ou em culturas primárias dos nossos extratos ou dos compostos isolados a partir destes.

Tendo por base os resultados obtidos, faz todo o sentido prosseguir com estudo das algas que exibiram os efeitos mais marcantes nas linhas celulares Caco-2 e HepG-2, contribuindo deste modo para a dinamização da Zona Económica Exclusiva Portuguesa, para a descoberta e desenvolvimento novas moléculas com potencial para o tratamento do cancro e, obviamente para a divulgação do conhecimento junto da comunidade científica nacional e internacional.

Referências Bibliográficas

- Aisa, y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, k., Ikeda, y., Kizaki, M. (2005). Fucoidan Induces Apoptosis of Human HS-Sultan Cells accompanied by activation Caspase-3 and Down-Regulation of ERK Pathways. *American Journal of Hematology*, 78:7 - 14.
- Ale, M. T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. (2011). Fucoidan from *Sargassum sp.* and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49: 331 - 336.
- Allmendinger, A., Spavieri, J., Kaiser, M., Casey, R., Hingley-Wilson, S., Lalvais, A., Guiry, M., Blunden, G., Tasdemir, D. (2010). Antiprotozoal, Antimycobacterial and Cytotoxic Potential of Twenty-Three British and Irish Red Algae. *Phytotherapy Research*, 24: 1999 - 1103.
- Allsopp, M., Page, R., Johnston, P., Santillo, D. (2009). *State of the World's Oceans*. Springer. Heidelberg, Germany.
- Alves, C., Pinteus, S., Rodrigues, A., Pedrosa, R. (2011). Sphaerococcus coronopifolius and Asparagopsis armata induced cytotoxicity against HEPG2 cell line. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 44 - 45.
- Amador, M. L., Jimeno, L., Paz-Ares, L. Cortes-Funes, H., Hildalgo, M. (2003). Progress in the Development and acquisition of Anticancer agentes from Marine Source. *Annals of Oncology*, 14: 1607 - 1615.
- Amsler, C. D. (2008). *Algal Chemical Ecology*. Springer. Heidelberg, Germany.
- Arif, J. M., Al-Hazzami, A. A., Kunhi, M., Al-khodairy, F. (2004). Novel Marine Compounds: Anticancer or Genotoxic ?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2: 93 - 98.
- Ayyad, S-E. N., Makki, M. S., Al-Kayal, N. S., Basaif, S. A., El-Foty, K.O., Asiri, A. M., Alarif, W. M., Badria, F. A. (2011). Cytotoxic and protective DNA damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *European journal of medicinal chemistry*, 46(1): 175 - 182.
- Bae, S. J., Choi, Y. H. (2007). Methanol Extract of the Seaweed *Gloiopeltis furcata* Induces G2 / M Arrest and Inhibits Cyclooxygenase-2 Activity in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Phytotherapy Research*, 57: 52 - 57.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*. 252: 79 - 84.
- Bhakuni, D. S., Rawat, D. S. (2005). *Bioactive Marine Natural Products*. Springer, New York, United States of America.
- Bianco, M.E., Teixeira, V.L., Pereira, R.C. (2010) Chemical Defenses of the Tropical Marine Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* Against Herbivory by Sea Urchin. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(3): 213 - 218.
- Blows, W. T. (2005). *The Biological Basis of Nursing: Cancer*. One Edition. Routledge. Abingdon, Oxfordshire, United Kingdom.
- Buss, A. D., Butler, M.S. (2010). *Natural Product Chemistry for Drug Discovery*. Royal Society of Chemistry Publishing. Cambridge, United Kingdom.

- 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. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 60 - 78.
- Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J. (1997). In *Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press. California, United States of America.
- Cavas, L., Baskin, Y., Yurdakod, K., Olgun, N. (2006). Antiproliferative and newly attributed apoptotic activities from an invasive marine alga: *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 339: 111 - 119.
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in south East Asia. *LWT- Food Science and Technology*, 41: 1067 - 1072.
- Chin, Y-W., Balunas, M. J., Chai, H. B., Kinghorn, A. D. (2006). Drugs Discovery from Natural Sources. *The AAPS Journal*, 8(2): 239 - 253.
- Ciccolini, J., Peillard, L., Evrard, A., Cuq, P., Aubert, C., Pelegri, A., Formento, P., Milano, G., Catalin, J. (2000). Enhancer Antitumor Activity of 5 - Fluorouracil in Combination with 2'-Deoxynosine in Human Colorectal Cell Lines and Human Colon Tumor Xenografts. *Clinical Cancer Research*, 6: 1529 - 1535.
- Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. A., Camara, R. B. G., Nobre, L. T. D. B., Costa, M. S. S. P., Almeida - Lima, J., Farias, E. H. C., Leite, E. L., Rocha, H. A. O. (2010). Biological Activities of Sulfated Polysaccharides from Tropical Seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64: 21 - 28.
- Costa, L. S., Fidelis, G. P., Telles, C. B. C., Dantas - Santos, N., Camara, R. B. G., Cordeiro, S. L., Costa, M. S. S. P., Almeida - Lima, J., Melo-Silveira, R. F., Oliveira, R. M., Albuquerque, I. R. L., Andrade, G. P. V., Rocha, H. A. O. (2011). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Heterofucans from the Seaweed *Sargassum filipendula*. *Marine Drugs*, 9: 952 - 966.
- Costa-Lotufo, L. V., Wilke, D.V., Jimenez, P. C. (2009). Organismos Marinhos como Fonte de Novos Fármacos: Histórico & Perspectivas. *Química Nova*, 32(3): 703 - 716.
- Craig, K. R. (2005). Protecting international marine biodiversity: International treaties and national systems of marine protected areas. *Journal of Land Use*, 20(2): 337 - 373.
- Demunshi, Y., Chugh, A. (2009). Patenting Trends in Marine Bioprospecting based Pharmaceutical Sector. *Journal of Intellectual Property Rights*, 14: 122 - 130.
- Denny, M. W. Gaines, S. D. (2007). *Encyclopedia of Tidepools & Rocky Shores*. University of California Press. London, England, United Kingdom.
- Díaz-Rubio, M. E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2008). Dietary fiber and antioxidant capacity in *fucus vesiculosus* products. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 1 - 12.
- Donia, M., Hamann, M. T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, 3:338 - 348.
- Duan, X. J., Zhang, W. W., Li, X. M., Wang, B. G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fraction from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95: 37 - 43.

- Duarte, M. C. (2006). The Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and technological challenges. Fundación BBVA. Bilbao, Spain.
- Efferth, T., Kahl, S., Paulus, K., Adams, M., Rauh, R., Boechzelt, H., Hao, X., Kaina, B., (2008) Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional chinese medicine and chinese material medica with activity against tumor cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 7: 152 -161.
- Eisner, T., Meinwald, J. (1995). Chemical Ecology – The chemistry of Biotic Interaction. National Academy Press. Washington, United States of America.
- Enger, E. D., Ross, F., Bailey, D. (2007). Concepts in Biology. Twelfth Edition. McGraw-Hill Companies. Philippines, United States of America.
- Fattorusso, E., Tagliatalata – Scafati, O. (2007). Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. Weinheim, Germany.
- Flis, S., Splawinski, J. (2009). Inhibitory effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin on Human Colorectal Cancer Cell Survival are Synergistically Enhanced by Sulindac Sulfide. *Anticancer Research*, 29: 435 - 442.
- Freshney, I. (2005). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Fifth Edition. Wiley-Liss. United States of America.
- Genovese, G., Tedone, L., Hamann, M. T., Morabito, M. (2009). The Mediterranean Red Alga *Asparagopsis*: A Source of Compounds against *Leishmania*. *Marine Drugs*, 7: 361 - 366.
- Gray, J. S. (1997). Marine Biodiversity: patterns, threats and Conservation needs. *Biodiversity and conservation*, 6: 153 - 175.
- Groombridge, B., Jenkins, M. D. (2002). World Atlas of Biodiversity. Prepared by the UNEP World Conservation Monitoring Centre University of California Press. Berkeley, United States of America.
- Hayes, A.W. (1994). Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. Raven Press. New York, USA.
- Hoskins, W. J., Young, R. C., Markman, M., Perez, C. A., Barakat, R., Randall, M. (2005). Principles and Practice of Gynecologic Oncology. Lippincott Williams & Wilkins. Fourth Edition. Philadelphia, United States of America.
- Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S., Takahashi, K. (1999). Apoptosis-Inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60. *Food Science Technology Research*, 5(3): 243 - 246.
- Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K. (2004). Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1675: 113 – 119.
- Hu, G. P., Yuan, J., Sun, L., Wu, Z. G., Lan, X. J., Zhu, X., Lin, Y. C., Chen, S. P. (2011). Statistical Research on Marine Natural Products Based on data Obtained Between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9(4): 514 – 525.

- Huicheng, Y., Mingyong, Z., Shiyuan, D., Zunying, L., Ruixue, L. (2010) Anti-proliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica* Aresch. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28 (1): 122-130.
- Hyun, J-H., Kim, S-C., Kang, J-I., Kim, M-K., Boo, H-J., Koh, Y-S., Hyun, J-W., Park, D-B., Yoo, E-S., Kang, H-K. (2009). Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 32(10): 1760 - 1764.
- Ibrahim, A. M. M., Mostafa, M. H., Hisham, M., El-Masy, El-Naggar, M. M. A. (2005). Active Biological Materials Inhibiting Tumor Initiation Extracted From Marine Algae. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31(1):146 - 155.
- Imbs, T. I., Krasovskaya, N. P., Ermakova, S. P., Makarieva, T. N., Shevchenko, N. M., Zvyagintseva, T. N. (2009). Comparative Study of Chemical Composition and Antitumor Activity of Aqueous – Ethanol Extracts of Brown Algae *Laminaria cichorioides*, *Costaria Costata* and *Fucus evanescens*. *Russian Journal of marine Biology*, 35(2): 164 - 170.
- Inés, C., Argandoña, V.H., Roviroso, J., Martín-San, A., Díaz-Marrero, A. R, Cueto, M., González-Coloma, A. (2004). Cytotoxic Activity of Halogenated Monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. *Z.Naturforsch*, 59: 339 - 334.
- Jemal, A., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. Forman, D. (2011). Global cancer statistics:A cancer. *Journal for Clinicians*, 61:69 – 90.
- Jha, R.K., Zi-rong, X. (2004) Biomedical Compounds from Marine organisms. *Marine Drugs*, 2: 123 – 146.
- Jimenez, J. T., Šturdíková, M., Šturdík, E. (2009). Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca*, 2(2): 63-74.
- Joy, P. P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, B. P. (1998). Medicinal Plants. Kerala Agricultural University – Aromatic and Medicinal Plants Research Station. Kerala, India.
- Kamihira, M., Katakura, Y., Ito, A. (2010). *Animal Cell Technology: Basic &Applied Aspects*. Springer. Heidelberg, Germany.
- Karleskint, G., Turner, R., Small, W. J. (2010). *Introduction to Marine Biology*. Third Edition. Brooks/Cole, Cengage learning. Belmont, United States of America.
- Khanavi, M., Nabavi, M., Sadati, N., Ardekani, M. S., Sohrabipour, J., Nabavi, S. M. B., Ghaeli, P., Ostad, S. N. (2010). Cytotoxic activity of some marine brown algae against Cancer cell lines. *Biological research*, 43: 31 - 37.
- Kim, K. N., Ham, Y.M., Moon, J.Y., kim, M.J., Kim, D.S.,Lee, W.J., Lee, N.H., Hyun, C.G. (2009). In Vitro Cytotoxic Activity of *Sargassum thunbergii* and *Dictyopteris divaricata* (Jeju Seaweeds) on the HL-60 Tumour Cell Line. *International Journal of Pharmacology*, 1 - 9.
- Kladi, M., Vagias, C., Roussis, V. (2004). Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochemistry Reviews*, 337 - 366.
- Knowles, M., Selby, P. (2005). *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Fifth Edition. Oxford University. New York, Unitates Kingdom.

- Konishi, I., Hosokawa, M., Sashima, T., Kobayashi, H., Miyashita, H. (2006). Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142: 53 - 59.
- Kwabi – Addo, B. (2011). *Cancer Causes and Controversies: Understanding Risk Reduction and Prevention*. Praeger. Santa Barbara, Califórnia, United States of America.
- Lijun, H., Nianjum, X., Jiangong, S., Xiaojun, Y., Chenkui, Z. (2005). Isolation and Pharmacological Activities of Bromophenols from *Rhodomela confervoides*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 23(2): 226 - 229.
- Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, Wilkie, D., Wilhelm, S., Mynch, M., Carter, C. (2006). Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, inhibits Tumor angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, 66: 11851 - 11858.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J-F., Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J-l., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J-F., Borbath, I., Häussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J. (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359 - 364.
- Marinho, R. T., Gíria, J., Moura, M. C. (2007). Rising costs and hospital admissions for hepatocellular carcinoma in Portugal (1993-2005). *World Journal of Gastroenterology*. 13(10): 1522 – 1527.
- Martí, R., Uriz, M. J., Turon, X. (2004). Seasonal and spatial variaton of species toxicity in Mediterranean seaweed communities: correlation to biotic and abiotic factors. *Marine Ecology Progress Series*, 282: 73 - 85.
- Mayachiew, P., Devahastin, S. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT- Food Science and Technology*. 41: 1153 – 1159.
- Mayer, A. M. S., Gustafson, K. S. (2008). Marine Pharmacology in 2005-2006: Antitumour and Cytotoxic Compounds. *European Journal of Cancer*, 44: 2357 - 2387.
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S. Hamann, M. T. (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790: 283 - 308.
- Minev, B. R. (2011). *Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures*. Springer. Dordrecht, Netherlands.
- Minh, V. C., Kiem, P. V., Dang. H. N. (2005). *Marine Natural Products and Their Application in the Future*. *ASEAN Journal for Science and Technology Development*, 22(4): 297 - 311.
- Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L. Saludes, J. P. (2009). *Drug Development from Marine Natural Products*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 69 – 85.
- Moo-Puc, R., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. (2009). In Vitro and Antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas*, 35(4): 345 - 358.

- Moreau, D., Thomas-Guyon, T., Jacquot, C., Jugél, M., Culioli, G., Ortalo-Magn, A., Pioveti, L., Roussakis, C. (2006). An Extract from the Brown alga *Bifurcaria bifurcata* Induces Irreversible arrest of Cell Proliferation in a non-small Cell Bronchopulmonary Carcinoma Line. *Journal of Applied Phycology*, 18: 87 - 93.
- Nakazawa, Y., Sashima, T., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2009). Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *Journal of Functional Foods*, 1: 88 - 97.
- Nery, F., Graça, L., Ribeiro, M., Guimarães, H., Miranda, H. P. (2010). Sorafenib Improves Survival in Metastatic Hepatocellular Carcinoma: A case Report. *World Journal of Oncology*. 5 (1): 213 - 217.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S. (2009). Natural Compounds for Cancer Treatment and Prevention. *Pharmacological Research*, 59: 365 – 378.
- Osman, M. E. H., Abushady, A. M., Elshobary, M. E. (2010). In vitro Screening of antimicrobial activity of extracts of some macroalgae collected from abu-Qir bay Alexandria, Egypt. *African Journal of Biotechnology*, 9(12): 7203 - 7208.
- Oubré, A. Y., Carlson, T. J., King, S. R., Reaven, G. M. (1997). From Plant Patient: An Ethnomedical Approach to the Identification of New Drugs for the Treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40(5): 614 - 617.
- Ozawa, T., Yamamoto, J., Yamagishi, T., Yamazaki, N., Kishizawa, M. (2006). Two fucoidans in the holdfast of cultivated laminaria japonica. *Journal of Natural Medicines*, 60(3): 236 - 239.
- Patel, B., Das, S., Prakash, R., yasir. (2010). Natural Bioactive Compound with Anticancer Potential. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1: 32 - 41.
- Pedrosa, R., Soares-da-Silva, P. (2002). Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine, *British Journal of Pharmacology*, 137: 1305 – 1313.
- Pelengaris, S., Khan, M. (2006). *The Molecular Biology of Cancer*. First Edition. Blackwell Publishing. Malden, United States of America.
- Pereira, D. M., Chell, J., Areche, C., San-Martin, A., Roviroso, J., Silva, L. R., Valentao, P., Andrade, P. B. (2011). Anti-Proliferative Activity of Meroditerpenoids Isolated from the Brown Alga *Stypodium flabelliforme* against Several Cancer Cell Lines. *Marine Drugs*, 9: 852 - 862.
- Pietra, F. (2002). *Biodiversity and Natural Products Diversity*. Vol. 21. Fifth Edition. Elsevier Science. Oxford, United Kingdom.
- Pintéus, S., Azevedo, S., Alves, C., Mouga, T., Cruz, A., Afonso, C. Sampaio, M. M., Rodrigues, A. I., Pedrosa, R. (2009). High antioxidant potential of *Fucus spiralis* extracts collected from Peniche coast (Portugal). *New Biotechnology*, 25S.
- Pinto, C. G., Paquete, A.T., Pissarra, I. (2010). Colorectal câncer in Portugal. *The European Journal of Health Economics*. 10 (1): 65 - 73.
- Pomponi, S. A. (2001). The Roger Revelle Commemorative Lecture. The Oceans and Human Health: The Discovery and Development of Marine-Derived Drugs. *Oceanography*. 14(1): 78 – 87.

Ravina, E. (2011). The Evolution of Drug Discovery – From Traditional Medicines to Modern Drugs. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, Germany.

Reddy, L., Odhava, B., Bhoola, K. D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 99: 1 - 13.

Riviers, B. (2006). Biologia e Filogenia das algas. Artmed. Porto Alegre, Brasil.

Rocha, A. B., Lopes, R. M., Schwartzmann, G. (2001). Natural Products in Anticancer Therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 1: 364 - 369.

Rocha, F. D., Soares, A. R., Houghton, P. J., Pereira, R. C., Kaplan, M. A. C., Teixeira, V. L. (2007). Potential Cytotoxic activity of some Brazilian Seaweeds on Human Melanoma Cells. *Phytotherapy Research*, 21:170 - 175.

Rotter, B. A., Thompson, B. K., Clarkin, S., Owen, T. C. (1993). Rapid colorimetric bioassay for screening of fusarium mycotoxins. *Natural Toxins*, 1: 303 - 307.

Sa, G., Das, T. (2008). Anticancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Division*, 3 (14): 1 - 14.

Sala, E., Knowlton, N. (2006). Global Marine Biodiversity Trends. *Annual Review of Environment and Resources*, 31: 93 - 122.

Salvador, N., Garreta, A. G., Lavelli, L., Ribera, M. (2007). Antimicrobial Activity of Iberian Macroalgae. *Scientia Marina*. 71: 101 - 113.

Santo, M. E., Ribeiro, E., Colaço, T., Gomes, T. (2011). Cancro do cólon e do recto: taxa de cobertura do rastreio e factores associados. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*. 27: 290 - 295.

Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I. (2006). *Natural Product Isolation. Methods in Biotechnology*. Second Edition. Humana Press. New Jersey, United States of America.

Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., Raskin, I. (2008). A Natural history of Botanical Therapeutics. *Metabolism*, 57(7): 1 - 12.

Schulz, W., A. (2007). Molecular Biology of Human Cancers – An advanced Student's Textbook. Springer. Dordrecht, Netherlands.

Senn, H-J., Otto, F. (2011). Clinical Cancer Prevention. Springer. Heideberg, Germany.

Shah, M. A., Schwartz, G. K. (2001). Cell Cycle-mediated drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 7: 2168 - 2181.

Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G. S., Natarajaseebivasan, K. (2008). Antimicrobial Activity of Seaweeds Extracts Against Multiresistan Pathogens. *Annals of Microbiology*, 58: 535 - 541.

Sher, H., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Shah, A. J. (2010). Ethnopharmacologically important medicinal plants and its utilization in traditional system of medicine, observation from the Northern Parts of Pakistan. *Journal Medicinal Plants Research*, 4(18): 1853 – 1864.

Simmons, T. L., Andrianasolo, E., Mcphail, K., Flatt, P., Gerwich, W. H. (2005). Marine Natural Products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutic*, 4(2): 333 – 42.

- Smyrniotopoulos, V., Quesada, A., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., Roussis, V. (2008). Cytotoxic bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Tetrahedron*, 64: 5184 - 5190.
- Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., Bruyères, C., Lamoral-Theys, D., Kiss, R., Roussis, V. (2010). Structure and in Vitro Antitumor Activity evaluation of Brominated diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 1321 - 1330.
- Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., Roussis, V. (2009). Sphaeroane and Neodolabellane Diterpenes from the Red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Marine Drugs*, 184 - 195.
- Sousa – Pinto, I., Araujo, R. (1998). The Seaweed Resources of Portugal. Department of Botany, Faculty of Science of the University of Porto. Porto, Portugal.
- Souza, M. C. R., Marques, T. C., Dore, C. M. G., Silva, F. R. F., Rocha, H. A. O., Leite, E. L. (2007). Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 19: 153 - 160.
- Spavieri, J., Allmendinger, A., Kaiser, M., Rosalyn, C., Hingley-Wilson, S., Lalvani, A., Guiry, M.D. Blunden, G., Tasdemir, D. (2010). Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (Phaeophyceae) from British and Irish waters. *Phytotherapy Research*, 24(11): 1724 - 1729.
- Steele, J. H., Thorpe, S. A., Turekian, K. K. (2009). Marine Biology: A Derivative of the Encyclopedia of Ocean Sciences. Second Edition. Elsevier. Oxford, United Kingdom.
- Supriya, S. J., Yogesh, C. S. (2010). Marine: The Ultimate source of Bioactive and Drug Metabolites. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 1(1): 55 - 62.
- Targett, N., Baier, R., Gerwick, W., Grimes, W., Pomponi, S., Prince, R. (2002). Marine Biotechnology in the Twent – First Century Problems, Promise, and Products. National Academy Press. Washington, United States of America.
- Taskin, E., Caki, Z., Ozturk, M., Taskin, E. (2010). Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea. *Journal of Biotechnology*, 9 (27): 4272 – 4277.
- Thorne – Miller, B. (1999). The living Ocean: Understanding and Protecting the Marine Diversity. Sixth Edition. Foreword By Sylvia Earle. Washington, United States of America.
- Vellonen, K-S., Honkakoski, P., Urtti, A. (2004). Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23: 181 - 188.
- Villareal-Gómez, L.J., Soria-Mercado, I.E., Guerra-Rivas, G., Ayala-Sánchez, N.E. (2010). Antibacterial and Anticancer Activity of Seaweeds and Bacteria Associated With their surfasse. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(2): 267 - 275.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*. 116: 240 - 248.
- Warner, R. (2009). Protecting the oceans beyond national jurisdiction. Martinusnijhoff Publishers. Leiden, Netherlands.

- Wiebke, E. A., Grieshop, N. A., Loehrer, P. J., Eckert, G. J., Sidner, R. A. (2003). Antitumor Effects of 5-Fluorouracil on Human Colon Cancer Cell Lines: Antagonism by Levamisole. *Journal of Surgical Research*, 111: 63 - 69.
- Xu, N., Fan, X., Yan, X., Tseng, C. K. (2004). Screening marine algae from China for their antitumor activities. *Journal of Applied Phycology*, 451 - 456.
- Yaacob, N. S., Hamzah, N., Kamal, N. N. N. M., Abidin, S. A. Z. Lai, C. S. Navaratnam, V., Norazmi, M. N. (2010). Anticancer Activity of a sub – fraction of Dichloromethane Extracto *Strobilanthes Crispus* on Human Breast and prostate câncer cells in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 – 42.
- Yasuhara-Bell, J., Lu, Y. (2010) Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*, 86: 231 – 240.
- Ye, J., Li, Y., Teruya, K., Katakura, Y., Ivhikawa, A., Eto, H., Hosoi, M., Hosoi, M., Nishimoto, S., Shirahata, S. (2005). Enzyme-digested fucoïdan extracts derived from seaweed Mozuku of *cladosiphon nova-caledoniae* Kylin inhibit invasion and angiogenesis of tumor cells. *Cytotechnology*, 47: 117 - 126.
- Yoo, Y-C., Kim, W-J., Kim, S-Y., Kim,S-M., Chung, M-K., Park, J-W., Suh, H-H., Lee, K-B., Park, Y-I. (2007). Immunomodulating activity of a Fucoïdan Isolated from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophyll. *Algae*, 22(4): 333 – 338.
- Yuan, Y. V., Walsh, N. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and chemical Toxicology*, 44: 1144 - 1150.
- Zandi, K., Tajbakhsh, S., Nabipour, I., Rastian, Z., Yousefi, F., Sharafian, S., Sartavi, K. (2010). In vitro Antitumor Activity of *Gracilaria Corticata* (a red alga) against Jurkat and molt-4 Human Cancer cell lines. *African journal of biotechnology*, 9(40): 6787 - 6790.
- Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Lann, K, L., Fauchon, V. M., Deslandes, E. (2009a). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, 116: 693 - 701.
- Zubia, M., Fabrem, M-S., Kerjean, V., Deslandes, E. (2009b). Antioxidante and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittanay coasts (France). *Botanica Marina*, 52: 268 – 277.