

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento da atividade anticâncer *in vitro*

Ellen Cristina Miranda Lacerda

Tese para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Fabi

São Paulo  
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Bromatologia

Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento da atividade anticâncer *in vitro*

Ellen Cristina Miranda Lacerda

Versão Original

Tese para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Fabi

São Paulo

2023

Ellen Cristina Miranda Lacerda

Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento da atividade anticâncer *in vitro*

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Orientador/presidente

---

1º. Examinador

---

2º Examinador

---

3º. Examinador

---

4º. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira – CRB – 8/5562

L128m Lacerda, Ellen Cristina Miranda  
Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento da atividade anticâncer in vitro / Ellen Cristina Miranda Lacerda. - São Paulo, 2023. 100 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Fabi, João Paulo

1. Câncer. 2. Carragenas. 3. Modificação química. I. T. II. Fabi, João Paulo, orientador.

Dedico a minha eterna base,  
meus pais,  
Shirley e Luiz.

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas fizeram parte dessa caminhada de mais de quatro anos, e eu tenho muito a agradecer!

Aos meus pais, Shirley e Luiz, que são a minha base. Aconteça o que acontecer, mude o que for no mundo ou na vida, eles estão sempre lá, me incentivando, me acolhendo e acreditando em mim e em qualquer coisa que eu resolvo fazer. Eles foram e sempre serão a minha maior inspiração e a minha maior fonte de força e amor. Obrigada!

Ao meu orientador, e amigo, Prof. João Paulo, o JP. A sua animação e o seu conhecimento pela ciência me inspiraram desde a primeira conversa. Mas ter a sua orientação e o seu companheirismo durante essa jornada foi o meu verdadeiro presente! Você vai além das portas científicas e sempre me acolheu com muito carinho nos momentos difíceis, fossem eles da pesquisa ou da vida. Sem o seu apoio teria sido infinitamente mais difícil tornar essa tese realidade. Obrigada!

À Érika, a Pepa, minha amiga, minha irmã e minha companheira, que seguiu junto comigo por toda essa trajetória, por toda essa loucura, e mesmo não estando dentro do laboratório participou ativamente de tantos e tantos experimentos! Que sempre estive com o abraço pronto, a prosa na ponta da língua e que nunca me deixou esquecer da minha força. Obrigada!

Ao Rauni, meu companheiro e meu amor, que aguentou todas as minhas crises e minhas ausências, minhas mudanças de humor, minhas horas intermináveis no laboratório ou na frente do computador. Que me abasteceu com amor, abraços e comidinhas, e que esteve ao meu lado me lembrando que eu era capaz. Obrigada!

Nesse caminho eu tive a sorte gigantesca de conhecer pessoas incríveis e de fazer amigos que permitiram que eu não enlouquesse (completamente) durante todo esse processo. Obrigada por todos os cafés acolhedores, as brejas anestésicas, as danças libertadoras, as conversas científicas, as fofocas, as escutas e as risadas! Eu vou arriscar escrever seus nomes, porque vocês são especiais demais, e sem vocês essa estadia no doutorado teria sido praticamente impossível: Bia, Bruno, Carol, Eric, Jana, Karen, Layanne, Leandro, Lucas, Luzita, Mayra, Rodrigo, Zé.

A todos os amigos da vida e meu irmão Math, que mesmo sem entender muita coisa do que eu fiz durante esses anos, se mantiveram interessados e sempre perguntavam como estavam as coisas, como estava o doutorado, como estavam os experimentos. Pelo incentivo, pelo carinho, por enxergarem em mim coisas que nem eu vejo. Obrigada!

A todos os colegas do laboratório que ajudaram com alguma simples dica (que sempre acaba fazendo a grande diferença), pelas palavras de incentivo e pelo companheirismo. Aqui muitas foram as pessoas. Obrigada a cada um de vocês!

Às técnicas do laboratório por todo o suporte em todos os momentos, em especial à Tanita Shiga e à Renata Albuquerque. Obrigada!

Aos professores do Departamento, da Faculdade e da USP, pelo compartilhamento de conhecimento. Obrigada!

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, ao Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos e ao FoRC, por me concederem a oportunidade de desenvolver essa pesquisa em seus espaços, e de me desenvolver como pesquisadora.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às agências de fomento à pesquisa: CAPES (bolsa de doutorado) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CnPQ - processo 140182/2019-5) pela bolsa concedida durante o período do doutorado, processo 307842/2022-3 (bolsa de produtividade J.P.F), e Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP - processos 2012/23970-2, 2013/07914-8, 2019/11816-8 e 2022/12834-2) pelo financiamento do projeto.

## RESUMO

LACERDA, E. C. M. **Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento da atividade anticâncer *in vitro***. 2023. 100f. Tese (Doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

O câncer colorretal foi o terceiro mais prevalente no mundo em 2020, além de ser o segundo tipo de câncer mais mortal. Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de cólon está fortemente associado ao consumo de dieta rica em alimentos processados e baixa ingestão de fibra alimentar. Os polissacarídeos apresentam papel como fibra alimentar, além de diversas atividades biológicas. As carragenas, polissacarídeos sulfatados extraídos de algas usados pela indústria alimentícia e farmacêutica, possuem estrutura molecular complexa e diversa, que está intimamente relacionada aos seus efeitos biológicos. Assim, esse trabalho teve como objetivo principal modificar polissacarídeos sulfatados usados comumente para fins alimentares e investigar os seus efeitos biológicos em cultura de células de câncer de cólon. Para isso, realizamos modificação ácida em amostras de carragenas kappa, iota e lambda, e de fucoidanos, e avaliamos os seus efeitos na viabilidade, proliferação e ciclo celular, apoptose, e síntese de proteínas relacionadas aos mecanismos investigados, além de analisar a estrutura química dessas amostras por espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier e ressonância magnética nuclear do tipo HSQC. Constatamos que o tratamento com as carragenas modificadas kappa (KM) e lambda (LM) resultou em diminuição da viabilidade celular de HCT-116 de forma distinta das amostras não modificadas. Além disso, a diminuição observada na proliferação celular foi associada ao aumento de p21 de uma maneira independente de p53 no tratamento com KM e LM, e aumento da população de células em sub-G1 apenas com LM. Foram identificadas as unidades de *D*-galactose-4-sulfato (G4S) e 3,6-anidrogactose (DA) em KM, confirmando a sua identidade como carragena kappa; e estrutura híbrida composta por *D*-galactose-2-sulfato, 3,6-anidrogactose-2-sulfato, G4S e DA em LM, indicando a sua identidade como uma mistura de carragenas theta e kappa, além da confirmação da presença de grupos sulfato em ambas as amostras. Os resultados sugerem que a diminuição do peso molecular e um provável aumento da exposição dos grupos sulfato em KM após a modificação ácida aumentaram a ação anticâncer das carragenas em cultura de células de câncer de cólon HCT-116, ficando claro o efeito estrutura-dependente. Demonstramos aqui o potencial de polissacarídeos sulfatados, que são comumente usados como suplementos ou aditivos alimentares, contra o câncer de cólon em ensaio *in vitro*. Além disso, esses achados encorajam continuação da investigação da ação desses polissacarídeos em outros modelos de câncer de cólon, pensando na possibilidade futura de seu uso em conjunto com outras alternativas terapêuticas contra o câncer.

**Palavras-chave:** Câncer; Carragenas; Modificação química.



## ABSTRACT

LACERDA, E. C. M. **Chemistry modification of sulfated polysaccharides for increased anticancer activity *in vitro***. 2023. 100f. Tese (Doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

Colorectal cancer was the third most prevalent in the world in 2020, in addition to being the second most deadly type of cancer. One of the main risk factors for the development of colon cancer is strongly associated with consumption of foods rich in processed foods and low intake of dietary fiber. Polysaccharides play a role as dietary fiber, in addition to several biological activities. Carrageenans, sulfated polysaccharides extracted from algae used by the food and pharmaceutical industries, have a complex and diverse molecular structure, which is closely related to their biological effects. In this regard, the present work had the main objective of modifying those that are conventionally food-related, and investigating their biological effects in colon cancer cell culture. For this, we used acid modification in different carrageenans (kappa, iota, and lambda) and fucoidans. We then assessed their effects on cell viability, proliferation, cell cycle, apoptosis, and protein expressions. The chemical structure was studied through Fourier-transform infrared spectroscopy and HSQC nuclear magnetic resonance. The kappa (KM) and lambda (LM) modified carrageenan treatment resulted in a cell viability decrease in HCT-116, distinctively of the same non-modified samples. Furthermore, the lower HCT-116 cell proliferation was associated with p53-independent p21 upregulation with KM and LM treatment, and an increase in the sub-G1 phase, only with LM treatment. Sulfate groups were identified in both samples, while KM had the presence of D-galactose-4-sulfate (G4S) and 3,6-Anhidro-D-Galactose (DA). LM was composed of a hybrid structure between D-galactose-2-sulfate, 3,6-anhidro-D-galactose-2-sulfate, G4S, and DA, identifying it as a mixture between theta and kappa carrageenans. The results suggest that the molecular size reduction, and a higher sulfate group exposure derived from KM acid modification, enhanced the carrageenans anticancer effects in HCT-116 cell culture, in a clear structure-dependent way. Therefore, here we demonstrated the sulfated polysaccharide potential, commonly used as food additives or supplements, against colorectal cancer cells *in vitro*. Furthermore, these findings encourage further investigation of the action of these polysaccharides in other models of colon cancer, considering the future possibility of their use together with other therapeutic alternatives against cancer.

**Keywords:** Cancer; Carrageenans; Chemical modification.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química geral dos monossacarídeos que compõem os fucoidanos.....	22
Figura 2. Estrutura química geral dos monossacarídeos que compõe as carragenas.....	24
Figura 3 - Cromatograma da distribuição do peso molecular dos polissacarídeos não modificados e modificados quimicamente.....	37
Figura 4 - Viabilidade celular de Caco-2 tratadas com polissacarídeos modificados e não modificados, após diferentes tempos de tratamento.....	41
Figura 5 - Viabilidade celular de HT-29 tratadas com polissacarídeos modificados e não modificados, após diferentes tempos de tratamento.....	42
Figura 6 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com polissacarídeos modificados e não modificados, após diferentes tempos de tratamento.....	43
Figura 7 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena kappa modificada em diferentes tempos de tratamento.....	45
Figura 8 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena lambda modificada em diferentes tempos de tratamento.....	45
Figura 9 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena iota modificada em diferentes tempos de tratamento.....	46
Figura 10 - Proliferação celular de HCT-116 tratada com diferentes concentrações das carragenas kappa, lambda e iota modificadas após 24h de tratamento; doxorubicina foi utilizada como controle positivo.....	49
Figura 11 - Efeito no ciclo celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações das carragenas kappa, lambda e iota modificadas, após 24h de tratamento; doxorubicina foi usada como controle positivo.....	51
Figura 12 - Efeito na apoptose de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações das carragenas kappa e lambda modificadas, após 24h de tratamento; doxorubicina e dimetilsulfóxido foram utilizados como controle positivo.....	54

Figura 13 - Efeito na síntese de diferentes proteínas de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações das carragenas kappa e lambda modificadas após 24h de tratamento.....	57
Figura 14 – Estrutura geral dos diferentes tipos de carragenas.....	61
Figura 15 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier das carragenas kappa não modificada e modificada.....	63
Figura 16 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier das carragenas lambda não modificada e modificada.....	64
Figura 17 - Espectros de HSQC das unidades de dissacarídeos das carragenas modificadas..	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso molecular estimado a partir do pico dos polissacarídeos sulfatados não modificados e modificados quimicamente.....	38
Tabela 2 - Concentração inibitória média das carragenas modificadas que diminuiu em 50% (IC <sub>50</sub> ) a viabilidade celular de HCT-116 em diferentes tempos de tratamento e os respectivos R <sup>2</sup> de seus gráficos.....	47
Tabela 3 - Bandas identificadas na espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier das carragenas não modificadas e modificadas kappa e lambda.....	65
Tabela 4 - Impressão digital na espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de diferentes tipos de carragenas.....	65
Tabela 5 - Assinaturas de HSQC das principais estruturas de dissacarídeos de carragenas-referência e os identificados na kappa modificada (KM) (em ppm).....	69
Tabela 6 - Assinaturas de HSQC das principais estruturas de dissacarídeos de carragenas-referência e os identificados na lambda modificada (LM) (em ppm).....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta

AKT: proteína quinase B

ATCC: *American Type Culture Collection*

BCA: ácido bicinconínico

BdrU: 5-bromo-2-desoxiuridina

CDK: proteína quinase

DA: 3,6-anidro-D-galactose

DA2S: 3,6-anidro-D-galactose-2-sulfato

DA2S,6S: *D*-galactose-2,6-dissulfato

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOX: doxorrubicina

ERK: proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1/2

FBS: soro fetal bovino

FM: fucoidano modificado

FnM: fucoidano não modificado

FTIR: infravermelho por transformada de Fourier

G4S: *D*-galactose-4-sulfato

G6S: *D*-galactose-6-sulfato

HCl: ácido clorídrico

HPSEC-RID: cromatografia de alto desempenho de exclusão de tamanho com detecção de índice de refração

IC50: concentração inibitória média necessária para diminuir em 50%

iM: carragena iota modificada

inM: carragena iota não modificada

KBr: brometo de potássio

KM: carragena kappa modificada

KnM: carragena kappa não modificada

LM: carragena lambda modificada

LnM: carragena lambda não modificada

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno  
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio  
NaOH: hidróxido de sódio  
PARP: polimerase poli(ADP-ribose)  
PCNA: antígeno nuclear de célula proliferante  
PBS: tampão salino-fosfato  
PI3K: fosfoinositídeo-3-quinase  
RMN: ressonância magnética nuclear  
rpm: rotação por minuto  
TBS-T: tampão Tris-salino com 0,1% de Tween 20 e pH 7,6  
TNF: fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1. Câncer</b> .....	<b>17</b>
<i>1.1.1. Câncer colorretal</i> .....	<i>18</i>
<b>1.2. Polissacarídeos sulfatados</b> .....	<b>21</b>
<i>1.2.1. Os fucoïdanos</i> .....	<i>22</i>
<i>1.2.2. As carragenas</i> .....	<i>24</i>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2. Gerais</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3. Específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1. Material</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2. Modificação química dos polissacarídeos</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3. Cultivo celular</b> .....	<b>29</b>
<i>4.4. Efeito dos polissacarídeos não modificados e modificados na viabilidade celular de células de câncer de cólon por ensaio colorimétrico (redução do MTT)</i> .....	<i>30</i>
<b>4.5. Ensaïos biológicos: efeito das carragenas modificadas na cultura celular de câncer de cólon HCT-116</b> .....	<b>30</b>
<i>4.5.1. Dose-dependência na viabilidade celular por redução de MTT em ensaio colorimétrico</i> .....	<i>31</i>
<i>4.5.2. Proliferação celular por incorporação de BrdU em ensaio colorimétrico</i> .....	<i>31</i>
<i>4.5.3. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo</i> .....	<i>31</i>
<i>4.5.4. Análise da apoptose por citometria de fluxo</i> .....	<i>32</i>
<i>4.5.5. Análise da síntese de proteínas por Western blotting</i> .....	<i>32</i>
<b>4.6. Caracterização dos polissacarídeos</b> .....	<b>34</b>
<i>4.6.1. Estimativa do peso molecular</i> .....	<i>34</i>
<i>4.6.2. Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier</i> ....	<i>34</i>
<i>4.6.3. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear</i> .....	<i>35</i>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>

<b>5.1. Diminuição do peso molecular dos polissacarídeos sulfatados modificados ....</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Efeito na viabilidade celular de células tratadas com polissacarídeos sulfatados não modificados e modificados .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3. Efeitos biológicos das carragenas modificadas nas células HCT-116.....</b>	<b>44</b>
<i>5.3.1. Diminuição de forma dose-dependente da viabilidade celular de HCT-116.....</i>	<i>45</i>
<i>5.3.2. Diminuição da proliferação celular de HCT-116.....</i>	<i>48</i>
<i>5.3.3. Parada do ciclo celular da fase sub-G1 .....</i>	<i>49</i>
<i>5.3.4. Ausência de efeito na apoptose celular.....</i>	<i>52</i>
<i>5.3.5. Aumento na síntese da proteína p21 .....</i>	<i>55</i>
<b>5.4. Análise da estrutura química das amostras .....</b>	<b>60</b>
<i>5.4.1. Espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....</i>	<i>62</i>
<i>5.4.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do tipo HSQC.....</i>	<i>67</i>
<b>5.5. Efeito estrutura-dependente das carragenas .....</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é definido pela Organização Mundial da Saúde como “um termo genérico para um amplo grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). É uma das principais causas de morte no mundo, somando perto de 10 milhões só em 2020, e quase 20 milhões de novos casos (SUNG *et al.*, 2021). Alguns comportamentos no estilo de vida, como tabagismo, dietas pobres em fibra alimentar e ricas em gorduras, e o sedentarismo, aumentam o risco do desenvolvimento do câncer (DAVIES; BATEHUP; THOMAS, 2011).

Os carboidratos estão envolvidos em múltiplas funções biológicas, como a regulação do sistema imune, a sinalização celular e as respostas anticâncer (THARANATHAN, 2002). Assim, os componentes alimentares, bem como outros agentes naturais, podem agir em uma ou mais vias dos mecanismos envolvidos na carcinogênese sem gerar efeitos citotóxicos em células normais, demonstrando potencial anticâncer, sozinhos ou em combinação com outras drogas (PADUA *et al.*, 2015).

### 1.1. Câncer

A estimativa do Instituto Nacional do Câncer (2023a) para o triênio de 2023 a 2025 é de 704.080 novos casos de câncer no Brasil. Segundo consulta ao Atlas da Mortalidade, 14,51% das mortes que ocorreram no Brasil em 2020 foram por neoplasias, totalizando 225.839 (mortalidade proporcional não ajustada) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022b).

Hanahan e Weinberge (2000) sugerem que durante o processo da tumorigênese diversas alterações genéticas levam à transformação progressiva de células normais até derivados altamente malignos. As marcas do câncer, conhecidas em inglês como “*hallmarks of cancer*”, compreendem as principais alterações na fisiologia celular que em conjunto permitem o desenvolvimento, sobrevivência e disseminação do tumor, sendo elas atualmente (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011):

- a) autossuficiência nos sinais de crescimento;
- b) insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento;
- c) evasão da morte celular programada (apoptose);
- d) potencial replicativo ilimitado;

- e) angiogênese sustentada;
- f) invasão de tecido e metástase;
- g) desregulação e reprogramação energética da célula;
- h) escape do ataque das células imune;
- i) plasticidade fenotípica e diferenciação perturbada;
- j) participação de células senescentes no microambiente tumoral.

Algumas características obtidas pelas células facilitam e permitem que elas adquiram as “marcas do câncer”, como: desenvolvimento de instabilidade genética e mutação; inflamação promotora de tumor; reprogramação epigenética distinta da instabilidade genômica do ácido desoxirribonucleico (DNA) e mutação; e a contribuição ou interferência da microbiota residente em diversos tecidos (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Inicialmente, em 2000, os autores haviam copilado um total de 6 “marcas do câncer”. No entanto, tal é a complexidade da doença, englobando centenas de tipos e subtipos distintos em órgãos específicos, que na verdade fica difícil categorizar precisamente os mecanismos moleculares e celulares que o conduzem (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Tanto que, de 2000 até 2022 essa lista cresceu, e provavelmente continuará crescendo, conforme mais pesquisas sejam desenvolvidas e mais informações a respeito da dinâmica e complexidade do câncer no organismo sejam conhecidas.

### ***1.1.1. Câncer colorretal***

O câncer colorretal é resultado do acúmulo progressivo de diversas mutações genéticas e alterações epigenéticas que conduz à transformação da mucosa normal do intestino para adenomas ou pequenos tumores benignos, até chegar ao estágio de carcinomas ou tumores malignos, num processo que pode levar até mais de 15 anos (CAPPELL, 2008; FIDELLE *et al.*, 2020; NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020).

Enquanto a proliferação normal das células do intestino ocorre na base das criptas, células mutadas avançam e formam protuberâncias que se projetam para o lúmen do intestino, chamadas pólipos ou adenomas (NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020; WATNE, 1997). A formação de pólipos no intestino pode ser esporádica ou decorrente de alguma síndrome, como a polipose adenomatosa familiar (MANSOOR; DOLKAR; EL-FANEK, 2013; MESEEHA; ATTIA, 2023).

É importante ressaltar que nem todo pólipo se transforma em câncer. Pólipos hiperplásicos, por exemplo, possuem um baixo potencial maligno e são muito comuns, principalmente com o avançar da idade. Por outro lado, mais de 95% dos adenocarcinomas de cólon se originam a partir de pólipos. Assim, nem todo pólipo origina câncer, mas quase todo câncer se origina de pólipos (MANSOOR; DOLKAR; EL-FANEK, 2013; MESEEHA; ATTIA, 2023; NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020).

Mutações sequenciais em genes regulatórios-chave marcam a transição da mucosa intestinal normal para carcinoma maligno. Mutações nos genes *APC* e *BRAF* fazem parte dos eventos iniciais que conduzem à formação de adenomas e ocorrem principalmente em pessoas com polipose adenomatosa familiar e com adenoma serrilhado, respectivamente (KINZLER *et al.*, 1991; NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020; SPRING *et al.*, 2006).

Os genes frequentemente mutados no câncer colorretal esporádico são: *APC*, relacionado à regulação do crescimento celular e apoptose em adenomas; da família *KRAS*, que estão envolvidos na mitose celular e cuja mutação é comum em pólipos hiperplásicos; *p53*, que é crítico na transição de adenoma tardio para o câncer inicial, e regula o ciclo celular e apoptose; *DCC*, um supressor de tumor que facilita a apoptose e participa da progressão para o carcinoma; entre outros (CAPPELL, 2008).

Embora o histórico familiar seja um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal, a ocorrência do “câncer herdado” é entre 15-35%, sendo menos comum do que o do tipo esporádico (KWAK; CHUNG, 2007; LICHTENSTEIN *et al.*, 2000; MUNDADE *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2010). O câncer colorretal esporádico ocorre em dois terços dos casos e não tem relação com predisposição genética ou histórico familiar, sendo formado pelo acúmulo de mutações genéticas somáticas e epigenéticas (CARETHERS; JUNG, 2015).

O câncer de colorretal foi o terceiro tipo de câncer mais prevalente no mundo em 2020, ficando atrás apenas do câncer de mama feminino e de pulmão, com uma estimativa para o ano de 2020 de mais de 1,9 milhão de novos casos. Além disso, é também o segundo câncer mais mortal, somando quase 1 milhão de mortes por ano, e 20.245 mortes em 2020 só no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022; SUNG *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). O aumento da idade da população, e o estilo de vida moderno, que conduz a mudanças na dieta, estão intimamente relacionados com o aumento dos casos nos últimos anos (SLATTERY, 2000).

Diversos são os fatores de risco associados ao estilo de vida que podem aumentar os riscos de desenvolvimento do câncer colorretal esporádico, como obesidade, sedentarismo, estresse

psicológico e físico, contaminantes ambientais, tabagismo e consumo de álcool (DASHTI *et al.*, 2017; OGINO *et al.*, 2011, 2013). No entanto, dentre os fatores de risco exógenos, os mais importantes estão relacionados aos hábitos alimentares, como consumo de dieta rica em alimentos processados, carne vermelha, bebidas açucaradas, fritura e ácidos graxos saturados (LABIANCA *et al.*, 2010; MATHEW *et al.*, 2004). O estilo de vida atual está, inclusive, relacionado ao aumento da ocorrência de câncer colorretal em jovens, que anteriormente ocorria somente a partir dos 50 anos (BRENNER; KLOOR; POX, 2014; SIEGEL *et al.*, 2020; THE LANCET ONCOLOGY, 2017).

A progressão do câncer colorretal também pode estar associada com a microbiota intestinal (CHO *et al.*, 2014). Tanto que a população da microbiota de pacientes com câncer de cólon é diferente das pessoas saudáveis, sugerindo maior susceptibilidade para o desenvolvimento da doença e destacando uma menor prevalência de espécies produtoras de butirato (BAXTER *et al.*, 2014; BORGES-CANHA *et al.*, 2015; WEIR *et al.*, 2013).

O aumento da ingestão de fibra alimentar melhora o perfil da microbiota intestinal, aumentando os níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que são produtos da fermentação de fibras solúveis pela microbiota intestinal e exercem benefícios sobre as células epiteliais intestinais e imunológicas (ASP, 1995; MANN DO; SIDHU DO; GOWIN DO, 2020; PARADAS VENEGAS *et al.*, 2019). O aumento dos níveis de butirato, um AGCC, pode estar associado à melhora da motilidade do cólon e à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (SEGAIN *et al.*, 2000; SORET *et al.*, 2010). Além disso, pacientes com câncer de cólon que consumiram dieta rica em vegetais, frutas e grãos apresentaram taxa de sobrevivência mais longa (VAN BLARIGAN *et al.*, 2018). No entanto, é importante destacar que o conhecimento da relação entre a dieta e os prognósticos do câncer ainda são limitados (MANN DO; SIDHU DO; GOWIN DO, 2020).

A disbiose da microbiota intestinal gera produção diferenciada de metabólitos e alterações na sinalização imunológica, o que poderia gerar estímulos pró-inflamatórios crônicos, alterando o ambiente do cólon e, assim, facilitando mutações no DNA e o desenvolvimento do câncer (BORGES-CANHA *et al.*, 2015). Além disso, pacientes com hepatocarcinoma que possuem microbiota mais diversa foram mais responsivos a imunoterapia (ZHENG *et al.*, 2019).

O tratamento do câncer de cólon consiste basicamente em cirurgia, seguida de quimioterapia, como o uso de 5-fluorouracil e oxaliplatina (CHAU; CUNNINGHAM, 2006; ISLAM *et al.*, 2022). A grande problemática das terapias atuais são os diversos efeitos colaterais gerados pela alta toxicidade dos quimioterápicos, que impactam diretamente na

qualidade de vida dos pacientes, além de gerar resistência em seguir o tratamento (ISLAM *et al.*, 2022; JI; PENG; WANG, 2018). Compostos bioativos, como fibras, vitaminas e minerais, terpenos, fenólicos, entre outros, presentes em frutas, vegetais, fungos e algas, são capazes de suprimir o câncer, a partir da modulação de múltiplas vias de sinalização celular (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; AIELLO *et al.*, 2019; EMRAN *et al.*, 2022; MONLA *et al.*, 2022; KIM, E.J. *et al.*, 2010; VISHCHUK; ERMAKOVA; ZVYAGINTSEVA, 2013).

Visto que as terapias disponíveis atualmente para tratar pacientes com câncer de cólon são agressivas e tóxicas, se faz necessária a investigação de novas opções adjuvantes e menos prejudiciais. O potencial terapêutico de compostos naturais contra o câncer tem sido evidenciado em ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo necessário o prosseguimento dessas pesquisas bem como a investigação da sua ação também em ensaios clínicos, tanto sozinhos como em combinação com outros tratamentos. Embora muitos desses compostos apresentem vantagens, como segurança farmacológica, o seu uso é limitado por terem baixa solubilidade, biodisponibilidade e absorção pelo organismo humano, além da ausência de padronização dos protocolos de extração (AGGARWAL *et al.*, 2013; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; AIELLO *et al.*, 2019; ESMEETA *et al.*, 2022; ISLAM *et al.*, 2022). Nesse sentido, a busca por métodos que contornem tais limitações é essencial para possibilitar a exploração de todo esse potencial.

Dentre esses compostos, além do seu papel como fibras dietéticas e sua relação com a microbiota, os polissacarídeos se destacam pela sua ação inibitória no desenvolvimento e na proliferação de diversos tipos de tumor *in vitro* e *in vivo* (BARBER *et al.*, 2020; EMRAN *et al.*, 2022). Como, por exemplo, os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas, que apresentam efeitos anticâncer de cólon *in vitro*, que são inclusive fortemente relacionados à sua estrutura molecular, como o nível de sulfatação (COTAS *et al.*, 2020; KIM, E. J. *et al.*, 2010; MONLA *et al.*, 2022; VISHCHUK; ERMAKOVA; ZVYAGINTSEVA, 2013; YUAN *et al.*, 2010).

## **1.2. Polissacarídeos sulfatados**

Polissacarídeos são polímeros compostos por mais de 20 monossacarídeos, organizados linearmente ou em ramificações (BEMILLER; HUBER, 2008), sendo encontrados em animais, plantas, fungos, bactérias e algas (DELATTRE; FENORADOSOA; MICHAUD, 2011).

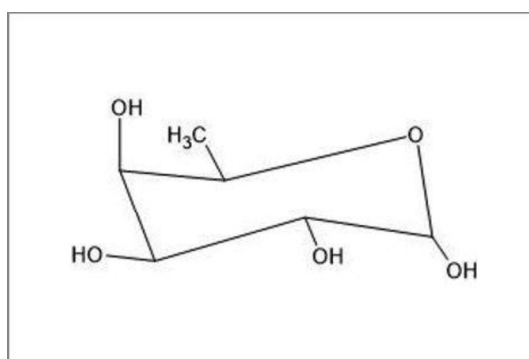
Os organismos marinhos produzem metabólitos secundários com estrutura química única, que não são encontrados em plantas terrestres. É o caso das carragenas e dos fucoidanos, polissacarídeos sulfatados sintetizados por algas, que possuem estrutura química diversa e composição variada de monossacarídeos e de grupamentos sulfato (KHOTIMCHENKO, 2010; KLOAREG; QUATRANO, 1988; MATSUBARA *et al.*, 2005).

Por conta de suas propriedades químicas e físicas, as carragenas e os fucoidanos são utilizados principalmente pela indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (PARK; LEE; HONG, 2020; ŚCIESZKA; KLEWICKA, 2019; THOMAS; KIM, 2013). Além disso, estudos têm apontado diversas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, como propriedades anticoagulante, antioxidante, antialérgica, antiviral, antiinflamatória, imunomodulatória e anticâncer (DE JESUS RAPOSO; DE MORAIS; DE MORAIS, 2015; JIAO *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2019; NGO; KIM, 2013; SAJADIMAJD *et al.*, 2019).

### 1.2.1. Os fucoidanos

Os fucoidanos estão localizados na matriz extracelular de algas marinhas marrons e alguns invertebrados marinhos, como pepinos e ouriços do mar. São moléculas compostas por fucose, conforme mostra a Figura 1, e sulfato, com peso molecular que varia de 200 a 500 kDa, e são diferenciados em pelo menos dois tipos: aqueles compostos por unidades de *L*-fucopirranose com ligações  $\alpha$ -1,3 ou com ligações  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,4 alternadas (BILAN *et al.*, 2002; KHOTIMCHENKO, 2010; LI *et al.*, 2008).

Figura 1 - Estrutura química geral dos monossacarídeos que compõe os fucoidanos.



Fonte: Elaboração própria.

A complexidade estrutural dos fucoidanos varia de espécie para espécie, como em quantidade de grupos de sulfatos e fucoses, posição do grupo sulfato e a presença de outros

monossacarídeos (LI *et al.*, 2008). O fucoidano isolado da *Fucus vesiculosus*, por exemplo, tem estrutura simples, composta basicamente de fucose e sulfato (PATANKAR *et al.*, 1993); já outras espécies, como *Undaria pinnatifida*, *Ecklonia kurome* e *Sargassum henslowianum*, apresentam fucoidanos com estruturas mais complexas, com presença de outros monossacarídeos, como galactose, manose, ramnose, xilose e ácido glicurônico, e além de ácido urônico e acetato (HAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020; SYNYTSYA *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstram que os fucoidanos poderiam ser metabolizados pelo organismo humano, com absorção pelo intestino delgado e distribuição para os rins e fígado (BAI *et al.*, 2020; NAGAMINE *et al.*, 2014). Além disso, fucoidanos com peso molecular reduzido foram encontrados na urina humana após administração oral (TOKITA *et al.*, 2010). Eles são considerados como suplemento alimentar, que poderiam modular a microbiota intestinal para promoção da saúde (SHANG *et al.*, 2016; VAN WEELDEN *et al.*, 2019). A toxicidade dos fucoidanos aparentemente é baixa ou mesmo ausente em humanos (CHUNG *et al.*, 2010; KIM, K. J. *et al.*, 2010; LI; ZHANG; SONG, 2005; MYERS *et al.*, 2011).

Os fucoidanos têm ampla aplicação na indústria alimentícia, além de potencial que ainda pode ser explorado. Como por exemplo, o seu uso como surfactante ou emulsificante para aumentar propriedades sensoriais e a biodisponibilidade de alimentos, como iogurtes e bebidas; no encapsulamento de compostos bioativos; como película comestível, envolvendo alimentos para aumentar a sua validade; e no sistema de entrega de nanocompostos e nutraceuticos. Por conta de suas características físico-químicas e efeito tóxico mínimo ou mesmo ausente, é também explorado pela indústria farmacêutica em sistemas de entrega de compostos terapêuticos, como em terapias contra o câncer ou no diagnóstico de doenças (MENSAH *et al.*, 2023; VENKATESAN; MURUGAN; SEONG, 2022).

Os fucoidanos podem agir em diversos mecanismos anticâncer *in vitro*, como diminuição da proliferação celular e indução da apoptose celular, parada do ciclo celular, diminuição da regulação da proteína quinase CDK1 e ciclina B1, aumento da regulação de Bax (pró-apoptose) e diminuição de Bcl-2 (anti-apoptose) em células de hepatocarcinoma (ROSHAN *et al.*, 2014). Podem também agir pelas vias apoptóticas mediadas por receptores de morte e por mitocôndria em células de câncer de cólon (KIM, E. J. *et al.*, 2010), pela diminuição da regulação de p38 e da via PI3K/AKT (fosfoinosítideo-3-quinase/proteína quinase B) e pela ativação da via ERK1/2-MAPK (proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1/2-proteína quinase ativada por mitógeno) em células de câncer de pulmão (BOO *et al.*, 2011). O tratamento com fucoidano também pode resultar em diminuição do crescimento e migração celular pela diminuição da regulação da via PI3K/AKT/mTOR

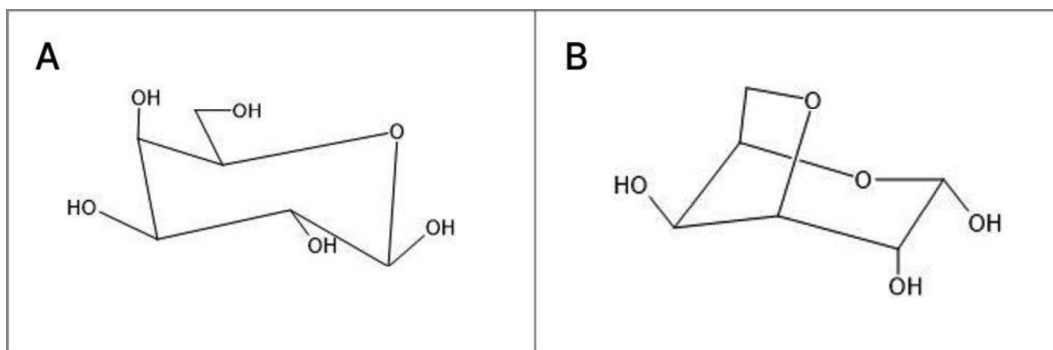
(fosfoinosítideo-3-quinase/proteína quinase B/proteína alvo da rapamicina em mamíferos), aumento da expressão de caspase-3 clivada (HAN; LEE; LEE, 2015a) e inibição da angiogênese (MATSUBARA *et al.*, 2005) em células de câncer de cólon.

### 1.2.2. As carragenas

As carragenas estão presentes na matriz extracelular de diversas espécies de algas marinhas vermelhas (Rhodophyceae) e são compostas basicamente por unidades de galactanos conectados por ligações  $\alpha$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 (PEREIRA *et al.*, 2009; REES, 1969). Essa estrutura pode conter outros resíduos de carboidratos, como xilose, glicose e outros substituintes, como grupos éster-sulfato, metoxi e piruvato (KLOAREG; QUATRANO, 1988; VAN DE VELDE *et al.*, 2002). O peso molecular das carragenas pode variar de 100 a 1000 kDa (GLICKSMAN, 1987).

As carragenas diferem em sua estrutura química entre si e são classificadas baseado na repetição das unidades A e B de galactanos, conforme mostra a Figura 2.A, embora essa não seja uma estrutura totalmente fixa. As carragenas mais importantes comercialmente são: kappa e iota, compostas por unidades A de *D*-galactose-4-sulfato (G4S) e por unidades B de 3,6-anidro-*D*-galactose (DA), conforme ilustra a Figura 2.B, ou 3,6-anidro-*D*-galactose-2-sulfato (DA2S), respectivamente; e a lambda, composta por unidades A de *D*-galactose-6-sulfato (G6S) e unidades B de *D*-galactose-2,6-dissulfato (DA2S,6S). Essas estruturas variam tanto na posição quanto na quantidade de grupos de sulfato (de 15 a 40%), além da presença do agrupamento anidro na unidade B em kappa e iota (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013; PAINTER, 1983).

Figura 2 - Estrutura química geral dos monossacarídeos que compõem as carragenas.



A. Galactose; B. 3,6-anidrogallactose.

Fonte: Elaboração própria.



A variação na estrutura dos diferentes tipos de carragenas se reflete diretamente nas propriedades que são exploradas comercialmente. Por exemplo, as carragenas kappa e iota formam géis, enquanto que a lambda forma soluções viscosas (REES, 1969; VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Assim, as carragenas são utilizadas pela indústria alimentícia como espessantes, emulsificantes, estabilizantes e gelificantes; e também na composição de alimentos, como queijo *cottage*, sorvete, leite achocolatado, presunto e ração de animais (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2003). As carragenas também são usadas em sistemas ativos de embalagem, que além de proporcionarem proteção contínua aos alimentos, também garantem a sua qualidade e segurança de consumo (AGA *et al.*, 2021).

Mais de 20% da produção de carragenas é usada nas indústrias farmacêuticas e cosméticas, como em sistemas de liberação controlada de fármacos e na composição de pastas de dente, loções, shampoos e condicionadores de cabelo, filtro solar, desodorantes, entre outros (LI *et al.*, 2014; PEREIRA, 2018). Além disso, as carragenas também têm o seu papel em aplicações biomédicas, como em sistemas de entrega de drogas e no desenvolvimento de engenharia de tecidos, por suas diversas funcionalidades, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade e atributos bioativos (PACHECO-QUITO; RUIZ-CARO; VEIGA, 2020).

As carragenas podem ser parcialmente degradadas no organismo, ocorrendo a maior parte no estômago (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). Elas não são absorvidas integralmente e são excretadas em sua grande parte nas fezes (WEINER, 2014). No entanto, estudo revelou que as carragenas poderiam ser fermentadas por bactérias específicas isoladas da microbiota intestinal humana (LI *et al.*, 2017).

Diversas pesquisas apontam a ação anticâncer das carragenas em ensaios *in vitro*, resultando em diminuição da viabilidade celular e promoção da apoptose associadas à parada do ciclo celular em células HeLa (PRASEDYA *et al.*, 2016), aumento da expressão das caspases 8, 9 e 3, aumento da regulação de *bax* (pró-apoptótica) e diminuição da regulação de *bcl-2* (antiapoptose) (JAZZARA *et al.*, 2016) e aumento da expressão de PARP (polimerase poli(ADP-ribose)) e p53 em células de câncer de mama (GHANNAM *et al.*, 2018). Ensaios *in vivo* demonstraram aumento da resposta imune decorrentes do tratamento com carragenas, associado ao aumento do número de macrófagos infiltrados no tumor, proliferação de linfócitos e aumento dos níveis de interleucinas e interferons, afetando assim o microambiente tumoral (LUO *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2006).

Além dos indícios cada vez maiores do potencial efeito anticâncer dos fucoidanos e das carragenas, pesquisas evidenciam também pontos positivos no seu uso como agente terapêutico em conjunto com os tratamentos convencionais do câncer. Em ensaios *in vivo*, o uso de carragenas em conjunto com 5-Fluorouracil renovou a função imune prejudicada pelo fármaco e adicionou atividades ao antitumoral, aumentando a proliferação de linfócitos e os níveis de fator de necrose tumoral (TNF) em camundongos transplantados com tumor de fígado (ZHOU *et al.*, 2006). A carragena também apresentou efeito positivo quando aplicada junto com vacina preventiva e terapêutica para o tratamento do câncer, além de segurança no seu uso (LUO *et al.*, 2015). O uso do fucoidano aumentou o potencial dos quimioterápicos usados no tratamento contra leucemia promielocítica aguda em ensaios *in vitro* e *in vivo* (ATASHRAZM *et al.*, 2016), e controlou a fadiga de pacientes com câncer avançado de estômago durante a quimioterapia, além de prolongar a adesão ao tratamento e aumentar a sobrevida (IKEGUCHI *et al.*, 2015).

As características que conferem maior ou menor atividade anticâncer aos polissacarídeos sulfatados variam de acordo com a linhagem celular estudada e o próprio polissacarídeo em si, já que a citotoxicidade é determinada por uma combinação de fatores e não apenas por características isoladas (ZHURISHKINA *et al.*, 2017). Existe uma grande variedade de fontes de polissacarídeos, assim como de métodos de extração e purificação, o que influencia tanto nas suas propriedades físico-químicas, quanto na sua atividade biológica (LI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Modificações nos polissacarídeos sulfatados podem aumentar as suas propriedades biológicas, como os efeitos anticâncer *in vitro* e *in vivo*, através da diminuição do peso molecular e aumento do grau do sulfatação e da posição do grupo sulfato (CHO; LEE; YOU, 2010; CICINSKAS *et al.*, 2020a; COTAS *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2017; RAMAN; DOBLE, 2014, 2015; YANG *et al.*, 2008; YUAN; SONG, 2005; YUAN *et al.*, 2010; ZHURISHKINA *et al.*, 2017).

Assim, modificamos quimicamente os fucoidanos e as carragenas kappa, iota e lambda, focando primariamente na diminuição do peso molecular desses polissacarídeos sulfatados, visando de aumentar as suas atividades biológicas *in vitro*; em seguida, investigamos os efeitos biológicos desses polissacarídeos sulfatados em linhagens de células de câncer de cólon; e por fim, caracterizamos as estruturas das moléculas que demonstraram ação anticâncer de cólon, e estabelecemos possíveis relações entre os efeitos estrutura-dependente.

## 2. JUSTIFICATIVA

O câncer acomete cada vez mais pessoas no mundo, colocando em risco a vida da população. Embora não faltem esforços no campo da medicina e da pesquisa por novas terapias contra o câncer, os tratamentos disponíveis hoje em dia são altamente tóxicos e debilitantes aos pacientes, prejudicando sua qualidade de vida. Nesse contexto, a busca por alternativas que sejam menos agressivas ao organismo é emergente.

O potencial de compostos extraídos diretamente da natureza é evidente; eles geralmente apresentam toxicidade baixa ou mesmo ausente, e ainda possuem diversos efeitos biológicos. Nesse contexto, é indispensável o levantamento de mais informações em relação aos efeitos de agentes naturais, como os polissacarídeos sulfatados, cuja ação biológica é inegável, e dentre elas, seus efeitos anticâncer.

Uma vez que a estrutura molecular dos polissacarídeos está intimamente relacionada aos seus efeitos anticâncer, o conhecimento e a consolidação das relações entre os efeitos gerados e a estrutura do polissacarídeo é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Nesse sentido, nossa pesquisa se sustenta na importância da investigação dos efeitos e mecanismos anticâncer *in vitro* de polissacarídeos sulfatados e a relação com as suas estruturas, que poderiam futuramente serem usadas em estratégias menos agressivas contra o câncer, usadas em conjunto às intervenções convencionais ou não.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.2. Gerais**

O estudo teve como objetivos principais modificar polissacarídeos sulfatados usados comumente para fins alimentares e investigar os seus efeitos biológicos em culturas de células de câncer de cólon.

#### **3.3. Específicos**

- a) modificar quimicamente, por metodologia simplificada, os polissacarídeos sulfatados usados para fins alimentares;
- b) comparar os efeitos na viabilidade celular de diferentes linhagens celulares de câncer de cólon dos polissacarídeos não modificados e modificados;
- c) investigar os efeitos biológicos dos polissacarídeos modificados em células de câncer de cólon, avaliando os mecanismos de viabilidade, proliferação e ciclo celular, apoptose, e síntese de proteínas específicas;
- d) caracterizar a estrutura molecular dos polissacarídeos selecionados;
- e) estabelecer a relação estrutura-dependência dos efeitos biológicos dos polissacarídeos sulfatados em culturas de células de câncer de cólon.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material**

Células de carcinoma colorretal humano HCT-116, e de adenocarcinoma colorretal humano HT-29 e Caco-2. Todas as células foram obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil.

Polissacarídeos sulfatados: fucoidano proveniente da alga *Fucus vesiculosus* (#F8190 SLBX3167, Sigma); carragenas do tipo kappa (#22048 BCBT9953, Sigma), iota (#C1138 SLBX1471, Sigma) e lambda (#22049 BCBP8978V, Sigma).

### **4.2. Modificação química dos polissacarídeos**

Em um sistema de banho maria com agitação magnética foram adicionados os polissacarídeos sulfatados e ácido clorídrico (HCl) a 0,1M nas carragenas e 0,01M nos fucoidanos, na proporção de 0,05 mL de HCl para cada 1 mg de polissacarídeo. A mistura foi aquecida por 30 minutos a 60 °C, sob agitação. Após esfriar, foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH), lavada com etanol gelado (1:3 v:v) e incubada a 4 °C até o dia seguinte (MATSUBARA *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2008; YUAN; SONG, 2005).

As amostras foram então centrifugadas por 1h à 4 °C, lavadas 2 vezes com etanol 80% e novamente centrifugadas por 30 minutos, com o sobrenadante sendo descartado nos intervalos. Foi adicionado acetona ao *pellet*, que foi centrifugado por mais 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante, os polissacarídeos modificados foram secos na capela por 2h, e em seguida macerados.

### **4.3. Cultivo celular**

Todas as linhagens celulares foram utilizadas em não mais do que 10 passagens da aquisição das células. As técnicas de cultivo e tratamento foram realizadas de acordo com as recomendações da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, VA, EUA). As linhagens celulares foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (chamado de DMEM completo), em estufa a 37 °C e atmosfera com 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. O crescimento das linhagens foi monitorado

periodicamente e o meio de cultura trocado a cada 3-4 dias. Ao atingir 90% de confluência as células foram subcultivadas e transferidas para novos frascos de cultura ou utilizadas nos ensaios.

#### **4.4. Efeito dos polissacarídeos não modificados e modificados na viabilidade celular de células de câncer de cólon por ensaio colorimétrico (redução do MTT)**

O efeito dos polissacarídeos sulfatados modificados e não modificados na viabilidade celular das linhagens celulares de câncer de cólon, Caco-2, HT-29 e HCT-116, foi analisado pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis.

Para isso, foram inoculadas em DMEM completo  $5 \times 10^3$  células de HCT-116 e Caco-2, e  $2 \times 10^4$  células de HT-29, em poços de placas de 96 poços, e incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. No dia seguinte, o sobrenadante foi removido e DMEM completo com as amostras em diferentes concentrações de carragenas kappa não modificada (KnM) e modificada (KM), lambda não modificada (LnM) e modificada (LM) e iota não modificada (inM) e modificada (iM), e o fucoidano não modificado (FnM) e modificado (FM) foi adicionado na concentração de 2 mg/mL. Como controle negativo foi utilizado DMEM completo sem adição de polissacarídeos.

Dado os intervalos de 24, 48 e 72h da adição dos tratamentos, MTT (Sigma) 0,5% foi adicionado à cada poço e as células foram novamente incubadas por 4h. O sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro *Synergy H1 Hybrid Reader* (BioTek) em 490 e 540 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle negativo, considerado como 100% de viabilidade.

#### **4.5. Ensaios biológicos: efeito das carragenas modificadas na cultura celular de câncer de cólon HCT-116**

Para avaliar o efeito das carragenas modificadas em cultura celular da linhagem HCT-116 foram utilizados os ensaios descritos nos tópicos a seguir.

#### **4.5.1. Dose-dependência na viabilidade celular por redução de MTT em ensaio colorimétrico**

O efeito dose-dependente das carragenas modificadas na viabilidade celular de HCT-116 foi igualmente analisado pelo método de redução do composto MTT.

O ensaio foi realizado conforme descrito em 4.4, com alterações. No dia seguinte à inoculação das células, o sobrenadante foi removido e DMEM completo com as carragenas KM, LM e iM nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL foi adicionado, além do controle negativo.

#### **4.5.2. Proliferação celular por incorporação de BrdU em ensaio colorimétrico**

O efeito das carragenas modificadas na proliferação celular das células HCT-116 foi mensurado através da incorporação do 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) durante a síntese do DNA na proliferação celular, por detecção colorimétrica.

Para isso,  $5 \times 10^3$  células de HCT-116 foram inoculadas em DMEM completo em poços de placas de 96 poços, e incubadas em estufa. No dia seguinte, o sobrenadante foi removido e DMEM completo com as carragenas modificadas foi adicionado nas concentrações de 0,25, 1 e 3 mg/mL de KM, e 1 e 3 mg/mL de LM e iM. Como controle negativo foi utilizado DMEM completo sem adição de polissacarídeos; como controle positivo foi usado DMEM completo com 1  $\mu$ M de doxorubicina (DOX). Dado o intervalo de 24h da adição dos tratamentos, o sobrenadante foi removido e os procedimentos foram realizados segundo instruções do kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* (Sigma-Aldrich).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro *Synergy H1 Hybrid Reader* (BioTek) em 450 e 690 nm. A proliferação celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle negativo, considerado como 100% de proliferação.

#### **4.5.3. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo**

O efeito das carragenas modificados nas diferentes fases do ciclo celular das células HCT-116 foi avaliado com citometria de fluxo. Para isso,  $5 \times 10^4$  células de HCT-116 foram inoculadas em DMEM completo em poços de placas de 24 poços, e incubadas em estufa. No dia seguinte, o sobrenadante foi removido e DMEM completo com as carragenas modificadas foi adicionado nas concentrações de 0,25 e 1 mg/mL de KM, e 1 e 3 mg/mL de LM. Como

controle negativo foi utilizado DMEM completo sem adição de polissacarídeos; como controle positivo foi usado DMEM completo com 1  $\mu$ M de DOX.

Dado o intervalo de 24h da adição dos tratamentos, o sobrenadante de cada poço foi coletado e adicionado individualmente em tubos. Os poços foram então lavados com tampão salino-fosfato (PBS), as células foram removidas após incubação com tripsina e os poços foram novamente lavados com PBS. Todo o conteúdo foi coletado e igualmente adicionado aos respectivos tubos de cada amostra. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 900 rpm por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado, e as células sedimentadas foram lavadas com PBS e novamente centrifugadas (CASCIOLA-ROSEN *et al.*, 1996). Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em PBS contendo 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100, foi adicionado 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (51-68981E, BD Pharmingen™) em cada tubo, e foram incubadas por 30 minutos sob proteção da luz, em banho maria a 37 °C. As células foram analisadas por citometria de fluxo, sendo possível verificar um histograma da frequência do conteúdo de DNA, a fim de se observar o efeito dos tratamentos nas diferentes fases do ciclo celular. Os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo.

#### **4.5.4. Análise da apoptose por citometria de fluxo**

O efeito das carragenas modificadas na apoptose das células HCT-116 foi avaliado com citometria de fluxo, utilizando o *Kit I de Detecção de Apoptose Anexina V FITC* (556547, BD Pharmingen™).

O ensaio foi realizado conforme descrito em 4.5.3, com alterações. Como controle positivo foi usado DMEM completo com 5% de DMSO (Sigma). Após os processos de centrifugação e lavagem, as células foram ressuspensas em tampão de ligação de anexina V do Kit, foram adicionados anexina V FITC e iodeto de propídio, e as células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz. As células foram analisadas por citometria de fluxo, sendo possível diferenciar as células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo.

#### **4.5.5. Análise da síntese de proteínas por Western blotting**

O efeito das carragenas modificadas na síntese de proteínas relacionadas à proliferação e apoptose das células HCT-116 foi verificado pela técnica de *Western blotting*. Para isso,



1x10<sup>5</sup> células de HCT-116 foram inoculadas em DMEM completo em poços de placas de 6 poços, e incubadas em estufa. No dia seguinte, o sobrenadante foi removido e DMEM completo com as carragenas modificadas foi adicionado nas concentrações de 0,25 e 1 mg/mL de KM, e 1 e 3 mg/mL de LM. Como controle negativo foi utilizado DMEM completo; como controle positivo foi usado DMEM completo com 1 µM de DOX.

Dado o intervalo de 24h da adição dos tratamentos, as células foram lisadas com tampão de lise RIPA e inibidor de protease (*Halt<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free 100X*, Thermo-Scientific). As amostras do lisado celular foram concentradas em membrana de 3 kDa (*Amicon Ultra*, Merck-IRL) e as proteínas foram quantificadas pelo método colorimétrico do ácido bicinonínico (BCA), seguindo o procedimento do *Kit BCA Protein Assay* (23227, Lote TA260208, Thermo-Scientific).

As proteínas foram desnaturadas em Laemmli 4X (Bio-Rad) e 10% de mercaptoetanol (Sigma), e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% a 200 V. Como padrão de peso molecular foi usado *Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope* (Bio-Rad). Após a transferência em membrana de nitrocelulose (Amersham<sup>TM</sup> Protan<sup>TM</sup> Premium 0,45 µm NC, GE) por via semi-seca durante 30 minutos a 25 V, a membrana foi corada com solução de vermelho de Ponceau para confirmar o sucesso da transferência.

Tampão Tris-salina com 0,1% de Tween 20 e pH 7,6 (TBS-T) foi usado em todas as incubações subsequentes. A membrana foi então bloqueada em TBS-T contendo 5% de albumina a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, a membrana foi incubada em solução contendo 2% de albumina e anticorpos primários específicos por 2h a temperatura ambiente: anti-p21 (policlonal *goat* IgG, #AF1047, R&D) na diluição de 1:500; ou anti-p53 (*rabbit*, #E1016A, R&D) na diluição de 1:1000; ou anti-caspase 3 (monoclonal *rabbit* IgG, #MAB835, R&D) na diluição de 1:500; ou anti-caspase 9 (policlonal *rabbit*, #C7729, Sigma) na diluição de 1:900. Na sequência, a membrana foi incubada em solução contendo os anticorpos secundários específicos para cada anticorpo primário por 1h a temperatura ambiente: anti-*rabbit* (HRP conjugado #A0545, Sigma) na diluição de 1:10.000; ou anti-*goat* (HRP conjugado #C272, Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:5000. Todas as incubações foram realizadas sob agitação de 100-120 rpm, e a membrana foi lavada 3 vezes em TBS-T por 5 minutos a cada troca de incubação. Como controle foi utilizado o anticorpo primário anti-β-actina (*rabbit* IgG, #D6A8, Cell Signaling) na diluição 1:20.000, e o anticorpo secundário anti-*rabbit*, conforme já descrito.

A revelação foi realizada por quimiluminescência utilizando o *Kit Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Substrate* (BioRad) em câmara reveladora ImageQuant 400 (GE). Para a quantificação

das proteínas usamos o Programa ImageJ, e a intensidade das bandas de cada proteína de interesse foi subtraída do plano de fundo da mesma membrana, e normalizada com a intensidade da banda da proteína controle,  $\beta$ -actina, que também teve a sua banda subtraída do plano de fundo da membrana.

## **4.6. Caracterização dos polissacarídeos**

### **4.6.1. Estimativa do peso molecular**

O peso molecular dos polissacarídeos não modificados e modificados foi estimado pela análise da distribuição do peso molecular por Cromatografia de Alto Desempenho de Exclusão de Tamanho acoplado com Detector de Índice de Refração (HPSEC-RID) por um sistema *Agilent 1250 Infinity* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipado com quatro colunas PL *aquagel*-OH (60, 50, 40 e 30;  $429,300 \times 7,5$  mm; Agilent) conectados em tandem. Cerca de 0,5 mg de cada polissacarídeo foi diluído em 1 mL de solução de 0,2 M de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) e 0,02% de  $\text{NaN}_3$  (usada como eluente) e filtrados em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . O eluente foi usado na leitura (0,6 mL/min) e a temperatura do RID foi mantida em 30°C. Foram utilizados como padrões externos dextransos de peso molecular entre 5-670 kDa (Sigma) (SHIGA *et al.*, 2009, 2017).

### **4.6.2. Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier**

A caracterização das amostras de carragenas kappa e lambda não modificadas e modificadas foram realizadas por análise em espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), em parceria com o Prof. Dr. Fábio Ruiz Simões e a Dra. Gabriela Martins de Araújo, do Laboratório de Pesquisas em Química e Nanotecnologia da Universidade Federal de São Paulo.

Para isso, foi feita uma pastilha de cada amostra sólida com 95% de brometo de potássio (KBr), previamente seco em estufa. Na sequência, a leitura de cada pastilha foi realizada em FTIR (modelo *Spectrum Two*, Perkin-Elmer) na faixa espectral de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (ARAÚJO; CODOGNOTO; SIMÕES, 2020).

#### 4.6.3. *Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear*

A caracterização por espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) HSQC das amostras de carragenas kappa e lambda modificadas foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão e o Dr. Felipe Bezerra, do Laboratório de Tecido Conjuntivo da Universidade do Rio de Janeiro.

Os espectros em 2D de  $^1\text{H}$  foram registrados usando espectrômetro de ressonância magnética nuclear 500 MHz (Bruker Biospin, Rheintetten, Alemanha) com uma sonda de ressonância tripla. Para isso, aproximadamente 5 mg de cada amostra (KM, LM) foi dissolvida em 0,5 mL de 99,9% de óxido de deutério (Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA). Todos os espectros foram registrados em 35°C com água deuterada e exibiram um pico devido à troca com água residual (HOD), suprimida por presaturação. Os espectros HSQC editados pela multiplicidade  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  foram registrados com 1024 x 512 pontos e 256 varreduras usando um modelo de aquisição Echo-Antiecho com pulsos retangulares de fase, alternando otimização global para desacoplamento. Os espectros de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  foram registrados com 2048 x 200 pontos e 512 varreduras, com um atraso de 50 ms para evolução de acoplamento de longo alcance e definido sem desacoplamento durante o tempo de aquisição, um filtro de passagem baixa, e modo de aquisição de magnitude QF. Os deslocamentos químicos foram exibidos em relação ao ácido trimetilsililpropiónico externo a 0 ppm para  $^1\text{H}$ . Os dados foram processados usando o programa TopSpin 4.2.0 (Bruker Biospin) (SANTOS *et al.*, 2015).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Diminuição do peso molecular dos polissacarídeos sulfatados modificados

Os polissacarídeos de algas são fibras dietéticas, e como tais não são digeridos no intestino delgado; eles seguem para o intestino grosso onde desempenham diversas funções fisiológicas (ASP, 1995; GUAN; YU; FENG, 2021; STEPHEN *et al.*, 2017). O papel das fibras depende de suas características físico-químicas, como viscosidade e solubilidade, que podem variar de acordo com temperatura e pH (LOVEGROVE *et al.*, 2017; WILLIAMS *et al.*, 2019). As fibras solúveis são facilmente fermentadas pela microbiota intestinal, como os oligossacarídeos resistentes, por terem baixo peso molecular e alta solubilidade (GUAN; YU; FENG, 2021). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são resultado da fermentação, que possuem efeitos benéficos para as células epiteliais intestinais e imunológicas, como proliferação celular, função de barreira epitelial e efeitos antiinflamatórios (PARADA VENEGAS *et al.*, 2019). Já as fibras insolúveis geralmente aumentam o volume fecal ou podem ser fermentadas lentamente (GUAN; YU; FENG, 2021).

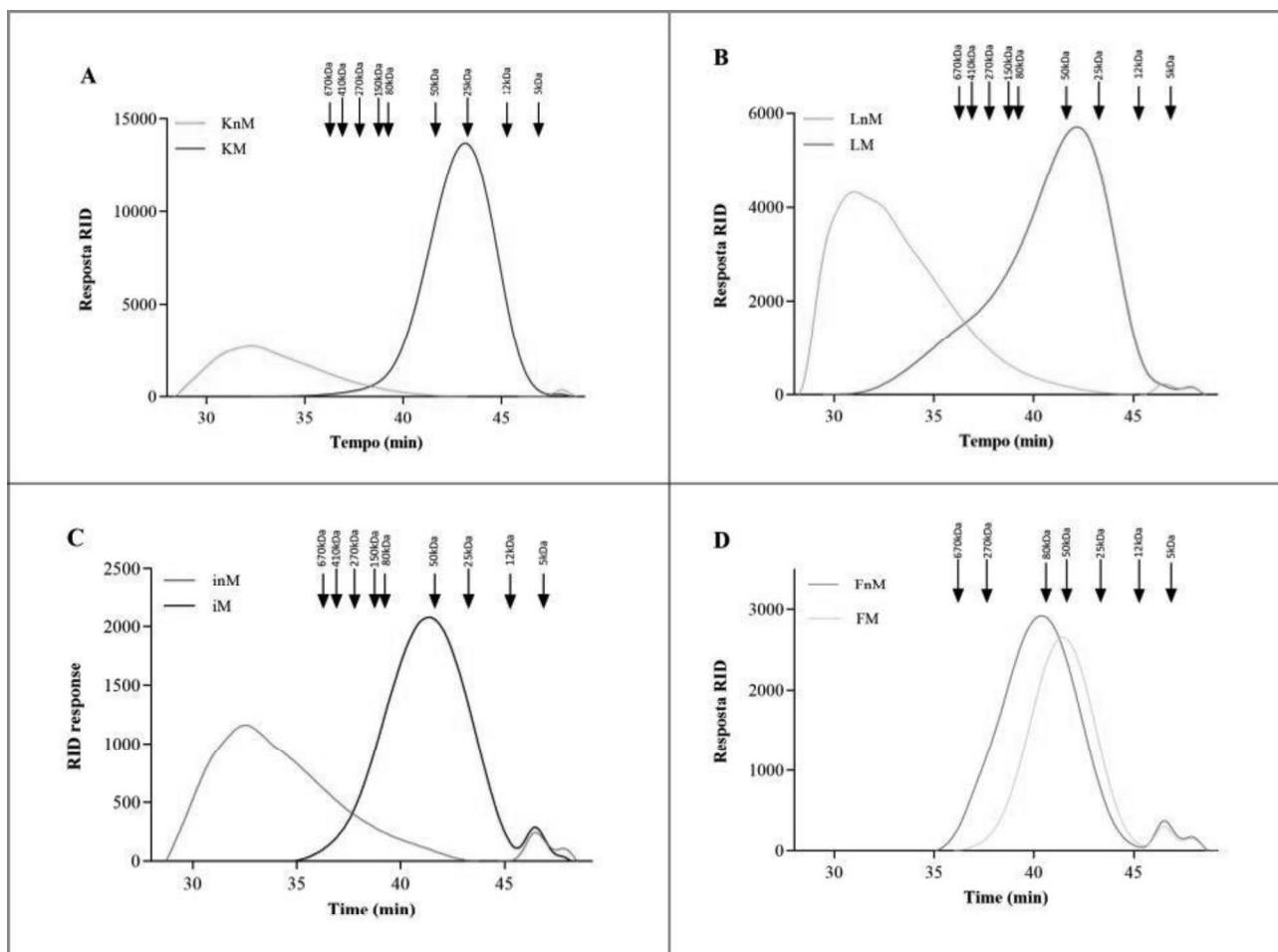
A absorção de polissacarídeos pelas células epiteliais intestinais depende da carga, peso molecular e estrutura do polissacarídeo, bem como da dose consumida e da espécie do animal (ZHENG *et al.*, 2022). A principal estratégia para aumentar a absorção de polissacarídeos é a modificação de sua estrutura, principalmente pela diminuição do peso molecular, que está intimamente ligado à atividade biológica desempenhada pelos polissacarídeos (JI; PENG; WANG, 2018).

As propriedades biológicas das carragenas e dos fucoidanos dependem de suas características físico-químicas (KHOTIMCHENKO *et al.*, 2020; ZHURISHKINA *et al.*, 2017). Frações com menores pesos moleculares derivadas de fucoidanos e carragenas geralmente apresentam maior atividade anticâncer em diferentes linhagens celulares (CHO; LEE; YOU, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2008; YUAN; SONG, 2005).

Como fucoidanos e carragenas são polissacarídeos que conhecidamente possuem alto peso molecular em sua forma nativa, o que poderia dificultar a sua ação biológica, primeiramente as amostras foram submetidas à tratamento com ácido clorídrico, conforme descrito no item 4.2, com o objetivo primário de diminuir os seus pesos moleculares. Para confirmarmos o sucesso da modificação, estimamos o peso molecular médio dos polissacarídeos não modificados e modificados por HPSEC-RID.

Conforme mostra os cromatogramas da Figura 3 e a Tabela 1, confirmamos que a modificação química diminuiu o peso molecular das três carragenas, apresentando redução maior do que 90% nos pesos moleculares estimados. Já no caso do fucoidano, a modificação química pouco alterou o seu peso molecular.

Figura 3 - Cromatograma da distribuição do peso molecular dos polissacarídeos não modificados e modificados quimicamente.



A. Carragena kappa não modificada (KnM) e modificada (KM); B. Carragena lambda não modificada (LnM) e modificada (LM); C. Carragena iota não modificada (inM) e modificada (iM); D. Fucoidano não modificado (FnM) e modificado (FM). Os dados foram apresentados de acordo os dados gerados pelo sistema de Cromatografia de Exclusão de Tamanho de Alto Desempenho com Detector de Índice de Refração (HPSEC-RID).

Tabela 1 - Peso molecular estimado a partir do pico dos polissacarídeos sulfatados não modificados e modificados quimicamente.

<b>Amostra</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>
KnM	> 670
KM	27
LnM	> 670
LM	41
inM	> 670
iM	58
FnM	92
FM	58

KnM: Carragena kappa não modificada; KM: Carragena kappa modificada; LnM: Carragena lambda não modificada; LM: Carragena lambda modificada; inM: Carragena iota não modificada; iM: Carragena iota modificada; FnM: Fucoidano não modificado; FM: Fucoidano modificado. Os cálculos foram realizados com os picos informados na análise do sistema de Cromatografia de Exclusão de Tamanho de Alto Desempenho com Detector de Índice de Refração (HPSEC-RID).

É importante acrescentar que, embora exista uma discussão em torno da segurança da ingestão das carragenas, principalmente no que tange ao peso molecular, a comunidade científica ainda não entrou em um consenso a respeito da sua toxicidade. Por um lado, estudos sugerem que elas poderiam afetar a estrutura e a função das células humanas, interferir na função epitelial normal e promover inflamação no intestino, e que especificamente as carragenas degradadas, com baixo peso molecular (10-20 kDa), poderiam induzir lesões e respostas inflamatórias gastrointestinais e tumores (FAHOUM *et al.*, 2017; MCKIM *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2012).

No entanto, carragenas de grau alimentício, com alto peso molecular (200-800 kDa), até o momento tem sua segurança indicada para o consumo humano; tanto que o peso molecular mínimo das carragenas para uso alimentício imposto pelo FDA (*Food and Drug Administration* – Órgão dos Estados Unidos da América) é de 100 kDa (KHOTIMCHENKO *et al.*, 2020; MCKIM *et al.*, 2019). De fato, ensaios *in vitro* demonstraram que a carragena não-degradada (com alto peso molecular) não apresenta citotoxicidade, e estudos em animais revelaram características não genotóxicas e não carcinogênicas para o desenvolvimento e reprodução, sustentando a seguridade do seu uso em alimentos nos níveis regulatórios atuais (MCKIM JR *et al.*, 2016; WEINER, 2014; ARIFFIN *et al.*, 2014). Todavia, alguns estudos

conduzidos com carragenas hidrolisadas, com peso molecular entre 0,7-170 kDa, demonstraram ausência de citotoxicidade para linhagens de células normais humanas e de ratos (CICINSKAS *et al.*, 2020b; RAMAN; DOBLE, 2015).

Além disso, as propriedades inflamatórias das carragenas podem ser influenciadas tanto pela forma de ingestão (como por água, pela dieta ou com caseína, no caso de formulações lácticas), como pela dieta consumida, e tal conhecimento poderia indicar formas seguras do seu consumo. Por exemplo, em ensaio com cobaias com dieta hiperlipídica que ingeriram carragena kappa em água, houve aumento dos efeitos associados à colite, correlacionado com a composição da microbiota; já a ingestão por meio da dieta, por esse mesmo grupo, e também por cobaias com dieta hipolipídica, pelos dois meios de ingestão, não foram observados sinais de colite. Isso porque o veículo de ingestão pode influenciar na conformação e exposição dos grupos sulfato na molécula (GUO *et al.*, 2022; MI *et al.*, 2020).

Além do tamanho da molécula, outras modificações podem ter acometido a estrutura química do fucoidano e das carragenas após a modificação química realizada, como alteração do grau de sulfatação e das ramificações, e posição dos grupos sulfatos. Visto que as técnicas geralmente utilizadas para caracterizar a estrutura química de moléculas, como espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear, são custosas e demoradas, optamos por realizar tal caracterização apenas daqueles polissacarídeos que apresentassem efeito biológico, após os ensaios celulares.

## **5.2. Efeito na viabilidade celular de células tratadas com polissacarídeos sulfatados não modificados e modificados**

Uma vez confirmada a diminuição do peso molecular dos polissacarídeos após a modificação química, verificamos se a alteração poderia refletir em efeitos biológicos distintos entre as amostras não modificadas e modificadas.

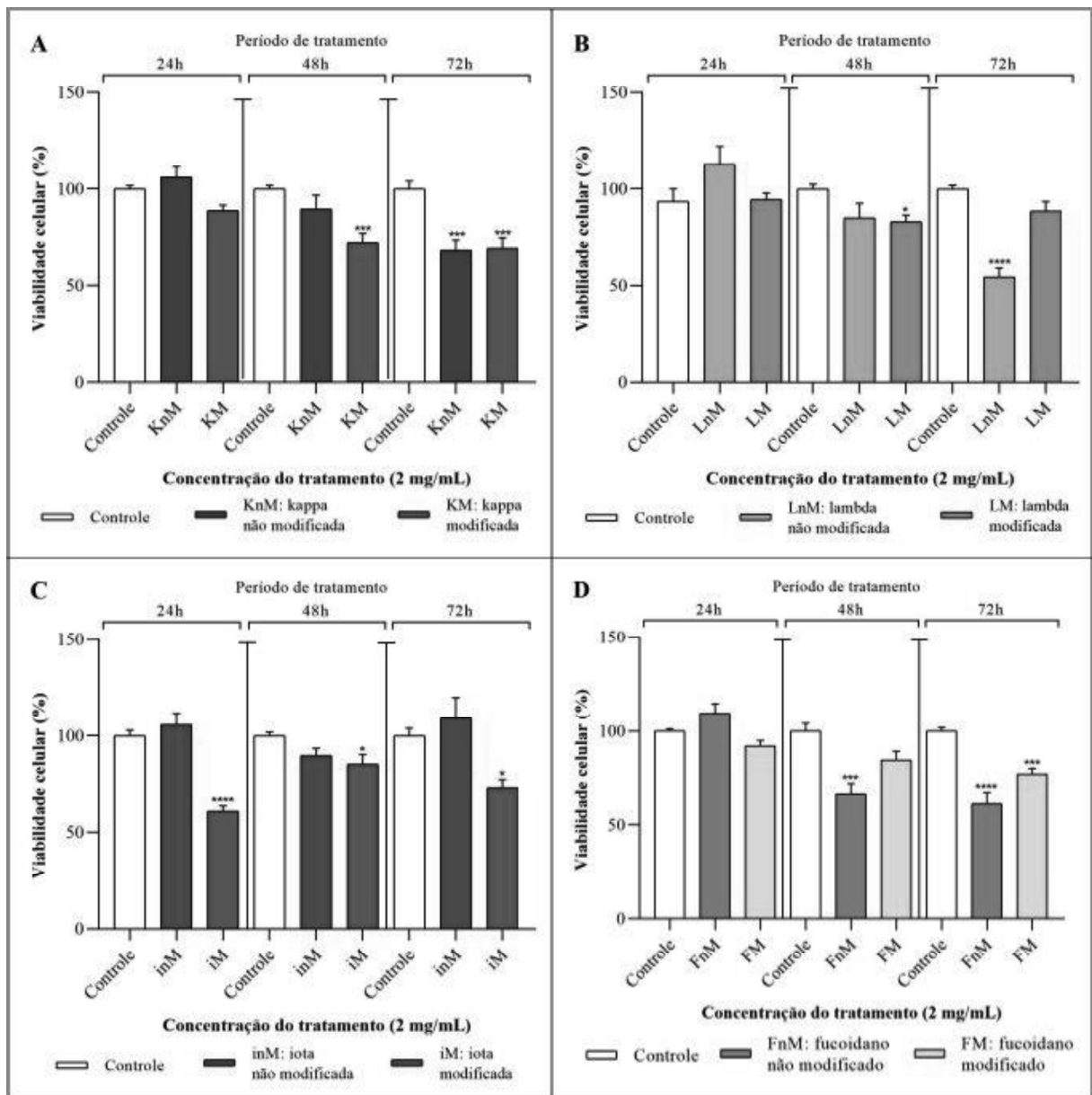
Para isso, utilizamos o teste de MTT, que mesmo considerando as suas limitações, é comumente usado como ferramenta para medição de viabilidade celular, principalmente para triagens iniciais, por ser um método simples. Nesse ensaio, o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um sal amarelo, entra nas células e é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis e metabolicamente ativas, gerando o formazan, que possui coloração violeta-azulado e é insolúvel em água. O formazan é solubilizado em DMSO, e a sua absorbância de luz é medida em leitor de microplaca (GHASEMI *et al.*, 2021; MOSMANN, 1983; STOCKERT *et al.*, 2018).

Assim, a absorvância é considerada como representante da concentração de formazan, e consequentemente, quanto maior for a proporção de células viáveis, maior será a absorvância captada, pois maior será a quantidade de MTT que foi reduzida. A absorvância do controle negativo (sem adição de polissacarídeos) foi considerada como sendo 100% da viabilidade celular, e as absorvâncias dos tratamentos foram comparadas com a do controle; assim, o resultado reflete o aumento ou diminuição da viabilidade celular em relação ao controle.

Assim, avaliamos a viabilidade celular das linhagens de células de câncer de colorretal, Caco-2, HT-29 e HCT-116, frente ao tratamento com 2 mg/mL das carragenas kappa, lambda e iota, e do fucoidano, não modificados e modificados, em três tempos de incubação diferentes (24, 48 e 72h), conforme apresentados nas Figuras 4, 5 e 6.

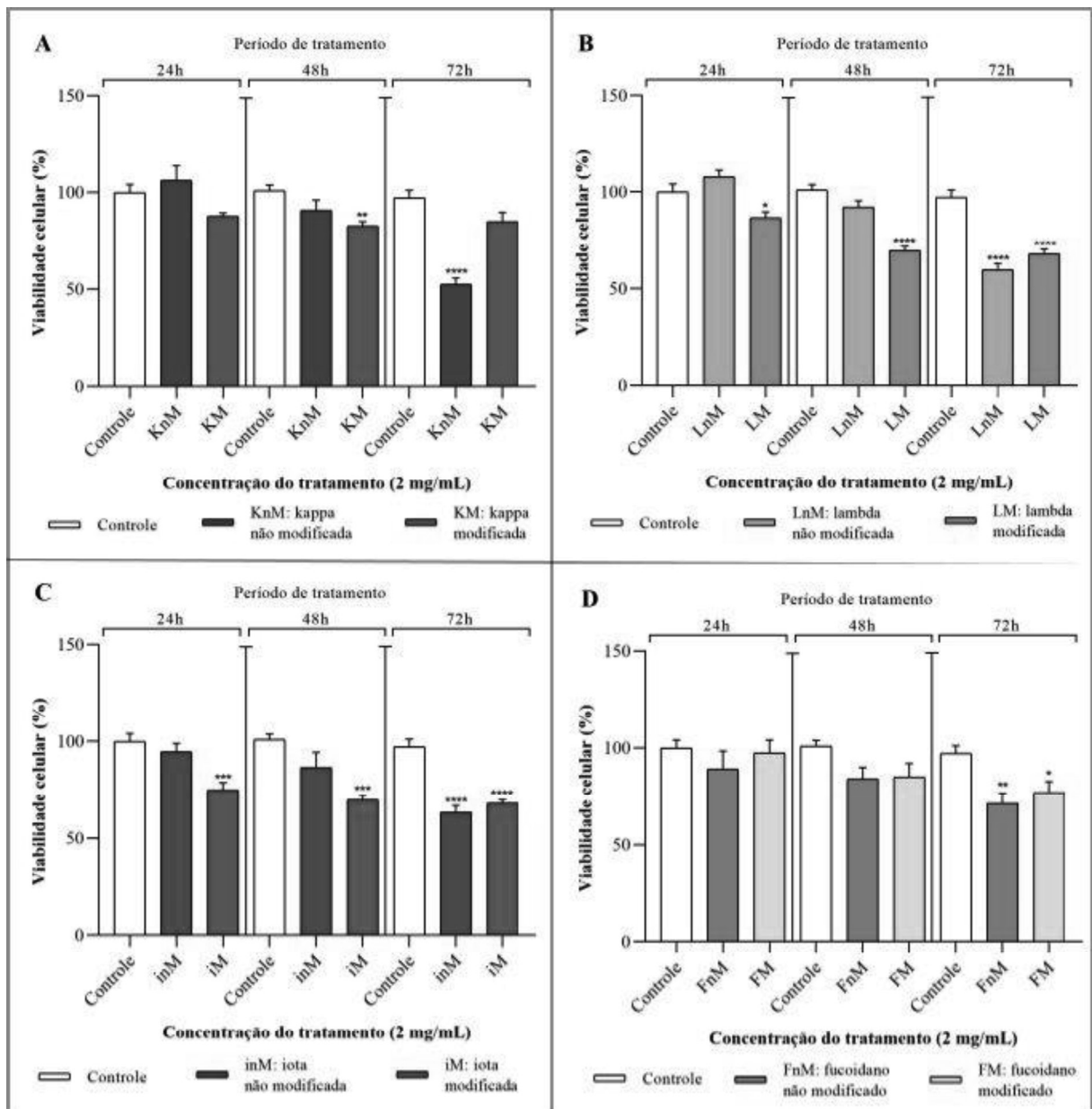


Figura 4 - Viabilidade celular de Caco-2 tratadas com polissacarídeos modificados e não modificados, após diferentes tempos de tratamento.



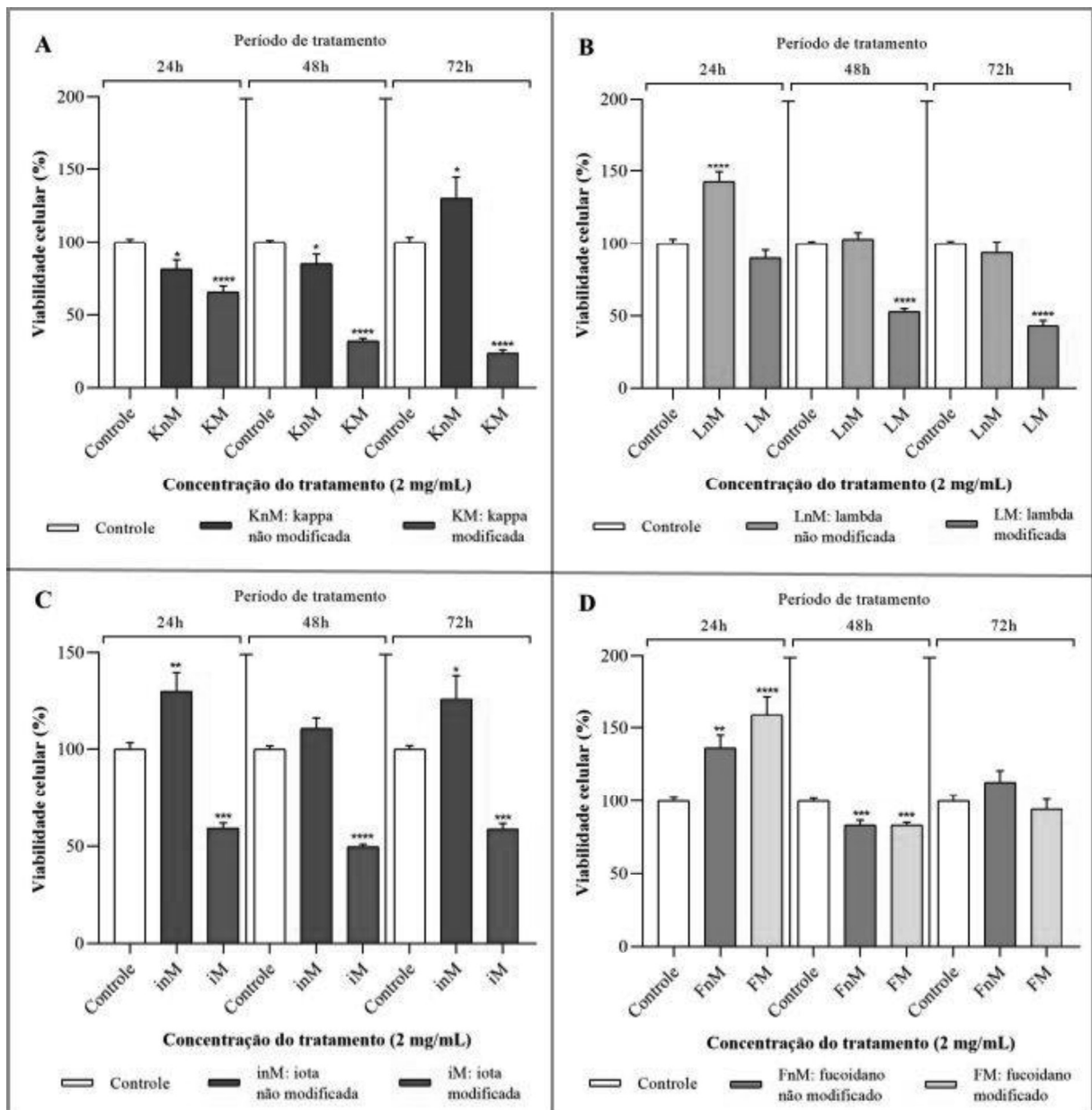
A. Carragena kappa; B. Carragena lambda; C. Carragena iota; D. Fucoidano. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle em cada tempo de tratamento e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada

Figura 5 - Viabilidade celular de HT-29 tratadas com polissacarídeos modificados e não modificados, após diferentes tempos de tratamento.



A. Carragena kappa; B. Carragena lambda; C. Carragena iota; D. Fucoïdano. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle em cada tempo de tratamento e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada.

Figura 6 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com polissacarídeos modificados e não modificados, após diferentes tempos de tratamento.



A. Carragena kappa; B. Carragena lambda; C. Carragena iota; D. Fucoxidano. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle em cada tempo de tratamento e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnett's* de comparação multivariada.

O tratamento com as amostras de carragenas modificadas resultou em menor efeito na viabilidade da Caco-2 em relação as duas outras linhagens estudadas, com exceção das amostras de KM e iM, que resultou em diminuição da viabilidade celular, conforme Figura 4. Já o tratamento com as carragenas modificadas LM e iM diminuiu a viabilidade da HT-29 nos três tempos testados; as mesmas carragenas não modificadas, LnM e inM, também

diminuíram a viabilidade de HT-29, porém apenas após 72h de tratamento, apresentados na Figura 5.

Comparando os resultados do tratamento com o mesmo tipo de carragena não modificada e modificada, nas três linhagens celulares, observamos que em HCT-116 as carragenas modificadas diminuíram a viabilidade celular nos três tempos de tratamento, enquanto que as carragenas não modificadas não tiveram esse mesmo efeito, conforme a Figura 6. Aliás, o tratamento com algumas das carragenas não modificadas, como KnM após 72h, LnM após 24h e inM nos três tempos de tratamento, interessantemente, aumentaram a viabilidade de HCT-116. Em estudo com células cancerígenas KB, baixas concentrações tanto da carragena kappa, quanto de oligossacarídeos derivados dela, também resultaram em aumento da viabilidade celular (YUAN; SONG, 2005).

Não observamos diferença na comparação entre os tratamentos com os fucoidanos não modificados e modificados nas três linhagens estudadas. Assim, o fucoidano foi desconsiderado para os experimentos subsequentes.

A diminuição da viabilidade pelas carragenas já foi demonstrada em diversas linhagens de células humanas de câncer, como de mama MDA-MB-23 (JAZZARA *et al.*, 2016) e MCF-7, neuroblastoma SH-SY5Y (SOUZA *et al.*, 2018) e câncer de cólon HT-29 (SUGANYA *et al.*, 2016), o que reforça o seu potencial como agente anticâncer.

Como um dos objetivos do estudo foi investigar a influência da estrutura química dos polissacarídeos sulfatados no efeito biológico de células de câncer colorretal, ou seja, a estrutura-dependência desses efeitos, a linhagem celular HCT-116 foi selecionada para o prosseguimento dos estudos. Isso porque ela apresentou maiores diferenças entre as carragenas não modificadas e modificadas, e diminuição de viabilidade com o tratamento das três carragenas modificadas.

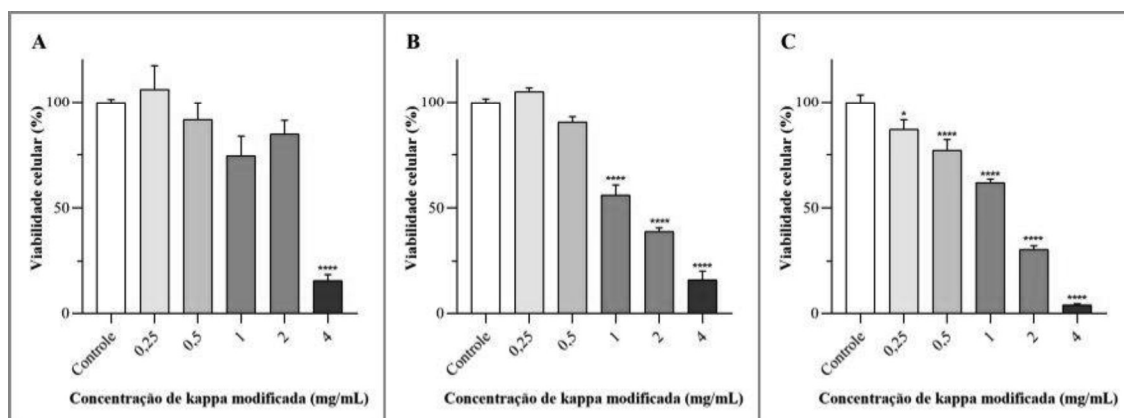
### **5.3. Efeitos biológicos das carragenas modificadas nas células HCT-116**

Na sequência, realizamos diversos experimentos para investigar o efeito biológico do tratamento com as amostras de carragenas modificadas kappa, lambda e iota em cultura de célula de câncer colorretal HCT-116, como a avaliação da viabilidade celular, proliferação celular, ciclo celular, apoptose e a expressão de proteínas relacionadas.

### 5.3.1. Diminuição de forma dose-dependente da viabilidade celular de HCT-116

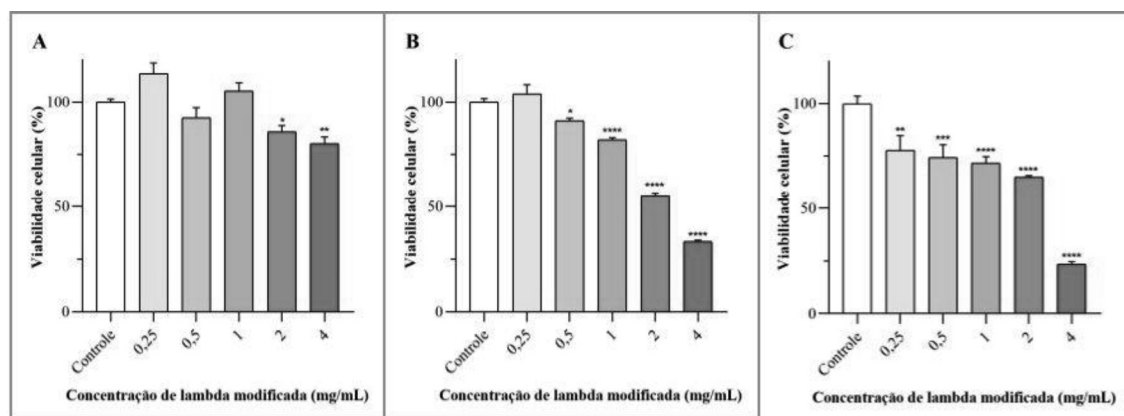
Primeiramente, verificamos o efeito de diferentes concentrações das amostras de carragenas modificadas na viabilidade de HCT-116. Para isso, foi usado novamente o teste de MTT, no qual as células foram tratadas com diferentes concentrações de KM, LM e iM (0, 0,25, 0,50, 1, 2 e 4 mg/mL), em três tempos de incubação diferentes (24, 48 e 72h). Os resultados obtidos seguem nas Figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena kappa modificada em diferentes tempos de tratamento.



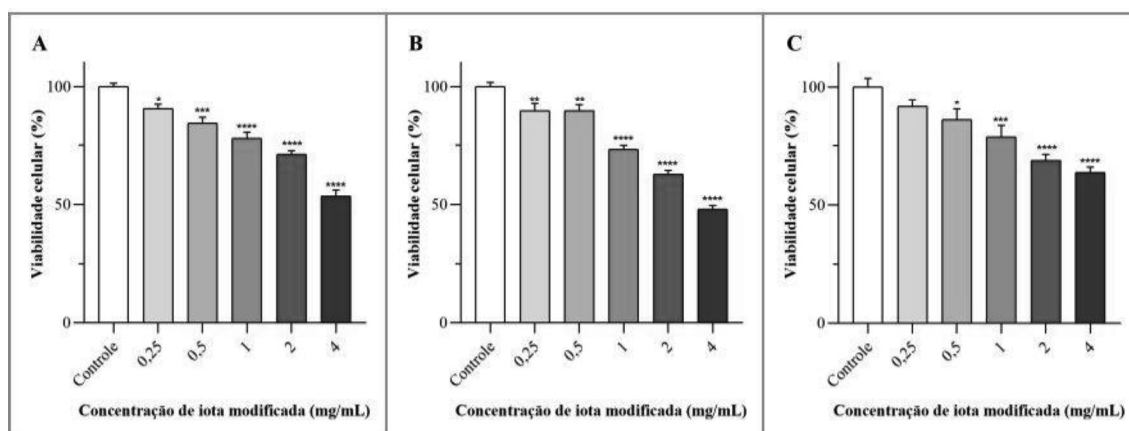
A. 24h; B. 48h; C. 72h de tratamento. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada.

Figura 8 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena lambda modificada em diferentes tempos de tratamento.



A. 24h; B. 48h; C. 72h de tratamento. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada.

Figura 9 - Viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena iota modificada em diferentes tempos de tratamento.



A. 24h; B. 48h; C. 72h de tratamento. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada.

Conforme demonstrado nas Figuras 7 e 8, constatamos que as amostras de KM e LM agiram de uma forma dose-dependente na diminuição da viabilidade celular de HCT-116 a partir de 48h de tratamento, enquanto que com iM foi a partir de 24h, demonstrado na Figura 9. O tratamento que teve maior efeito na diminuição da viabilidade celular foi a maior concentração testada de KM, 4 mg/mL, chegando a 3,99% de viabilidade após 72h de tratamento.

Diminuição de viabilidade de uma maneira dose-dependente também já foi demonstrada em ensaios com células HCT-116 tratadas com sulfato de condroitina derivada de esturção (WU, R. *et al.*, 2020) e fucoidano (KIM, E. J. *et al.*, 2010); HT-29 tratadas com fucoidano extraído de *Fucus vesiculosus* (HAN; LEE; LEE, 2015); e MDA-MB-231 (células de câncer de mama) tratadas com carragena predominantemente do tipo iota (MURAD *et al.*, 2015).

Os dados obtidos no teste de MTT foram então utilizados para calcular a concentração inibitória média que diminuiu em 50% (IC<sub>50</sub>) a viabilidade celular de HCT-116 (Anexos A, B e C). O cálculo do IC<sub>50</sub> é comumente utilizado para testar a citotoxicidade de moléculas e drogas em ensaios *in vitro* (FEMINA *et al.*, 2023). Quanto menor o IC<sub>50</sub>, maior o efeito citotóxico da carragena modificada na viabilidade celular de HCT-116.

Tabela 2 - Concentração inibitória média das carragenas modificadas que diminuiu em 50% (IC<sub>50</sub>) a viabilidade celular de HCT-116 em diferentes tempos de tratamento e os respectivos R<sup>2</sup> de seus gráficos.

<b>Amostra</b>	<b>Tempo de tratamento</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>KM</b>	<b>24h</b>	-	0,5896
	<b>48h</b>	1,035	0,9286
	<b>72h</b>	2,801	0,9469
<b>LM</b>	<b>24h</b>	-	0,2345
	<b>48h</b>	1,811	0,928
	<b>72h</b>	-	0,8398
<b>iM</b>	<b>24h</b>	-	0,8128
	<b>48h</b>	2,304	0,8674
	<b>72h</b>	1,271	0,7961

KM: Carragena kappa modificada; LM: Carragena lambda modificada; iM: Carragena iota modificada.

Conforme mostra a Tabela 2, não foi possível determinar o IC<sub>50</sub> de HCT-116 tratadas por 24h com as três carragenas modificadas. Embora o efeito da iM tenha ocorrido de uma maneira dose-dependente em 24h, ela não diminuiu a viabilidade celular a ponto de atingir o IC<sub>50</sub>. Células Caco-2 tratadas com fucoidano proveniente de *Sargassum fusiforme* apresentaram IC<sub>50</sub> de 0,25 mg/mL após 24h de tratamento (WU, T. C. *et al.*, 2020); e células HeLa tratadas com as carragenas kappa e lambda apresentaram IC<sub>50</sub> de 0,551 mg/mL para kappa e 0,475 mg/mL para lambda após 72h de tratamento (PRASEDYA *et al.*, 2016).

Analisando a Tabela 2 concluímos que as carragenas tiveram um maior efeito na viabilidade da HCT-116 em 48h de tratamento. Mesmo que em 24h não tenha sido possível calcular o IC<sub>50</sub>, optamos por realizar os ensaios subsequentes apenas com 24h, no intuito de analisar as alterações celulares iniciais que as carragenas modificadas poderiam causar na HCT-116. Baseado no IC<sub>50</sub> das três carragenas modificadas em 48h de tratamento (1-1,8 mg/mL), selecionamos as concentrações de 1 e 3 mg/mL para o prosseguimento dos ensaios celulares.

### **5.3.2. Diminuição da proliferação celular de HCT-116**

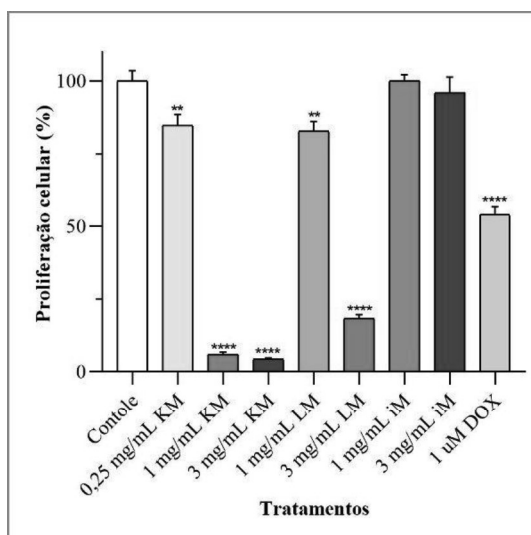
No câncer surgem defeitos na regulação da proliferação normal das células, que dentre outras, é uma das capacidades adquiridas pela maioria dos tipos de câncer humano (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Um dos parâmetros indiretos que podem ser usados para medir a proliferação celular é o monitoramento da síntese de DNA, já que ocorre a replicação do DNA no processo de divisão das células. O BrdU é um análogo da timidina, um dos nucleotídeos que formam o DNA. Assim, esse método se baseia na incorporação do BrdU na síntese do DNA que ocorre durante a proliferação celular, e com o uso de anticorpo específico para o BrdU, é possível fazer a sua quantificação colorimétrica em leitor de microplaca (VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011). A intensidade de absorvância captada é relacionada à quantidade de BrdU incorporado, que por fim é associado à proporção de células que proliferaram durante o tratamento. Da mesma forma que foi calculada a viabilidade, a absorvância do controle negativo (sem adição de polissacarídeos) foi considerada como sendo 100% da proliferação celular, e comparada com as dos tratamentos.

Assim, investigamos o efeito das carragenas modificadas na proliferação celular de HCT-116 tratadas por 24h com as concentrações de 1 e 3 mg/mL de KM, LM e iM, e adicionamos também a concentração de 0,25 mg/mL para KM, visto que foi a carragena mais tóxica para HCT-116 nos ensaios de viabilidade celular. Os resultados estão demonstrados na Figura 10.



Figura 10 - Proliferação celular de HCT-116 tratada com diferentes concentrações das carragenas kappa, lambda e iota modificadas após 24h de tratamento; doxorubicina foi utilizada como controle positivo.



KM: kappa modificada; LM: lambda modificada; iM: iota modificada; DOX: doxorubicina.

Os resultados foram expressos como porcentagem de proliferação celular em comparação ao controle e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnett's* de comparação multivariada.

As amostras KM e LM diminuíram a proliferação celular de HCT-116 em todas as concentrações testadas, principalmente nas mais altas, ao contrário do que foi observado no tratamento com iM, que não teve efeito na proliferação. Ensaio com células HT-29 tratadas com fucoidano extraído de *Fucus vesiculosus* por 24h (HAN; LEE; LEE, 2015), e DLD-1 e SW480 (de câncer de cólon) tratadas com fucoidano proveniente de *Sargassum fusiforme* (LI *et al.*, 2022) também apresentaram diminuição da proliferação celular.

Notamos que as concentrações mais altas de KM e LM tiveram um efeito ainda maior do que com o tratamento com 1  $\mu$ M de DOX, que é um quimioterápico utilizado contra o câncer de mama. Diminuição da viabilidade celular de HCT-116 após tratamento com DOX já foi anteriormente reportada, e foi associada à parada do ciclo de Krebs, depleção metabólica, disfunção mitocondrial e ausência de Ki67 (um marcador comum de proliferação) (GANESAN; PRABHAKARAN; GOPALAKRISHNAN, 2022; SLIWINSKA *et al.*, 2009).

### 5.3.3. Parada do ciclo celular da fase sub-G1

A diminuição observada na proliferação celular de HCT-116 tratadas com as amostras KM e LM apontaram para uma possível alteração nos eventos relacionados ao ciclo celular e

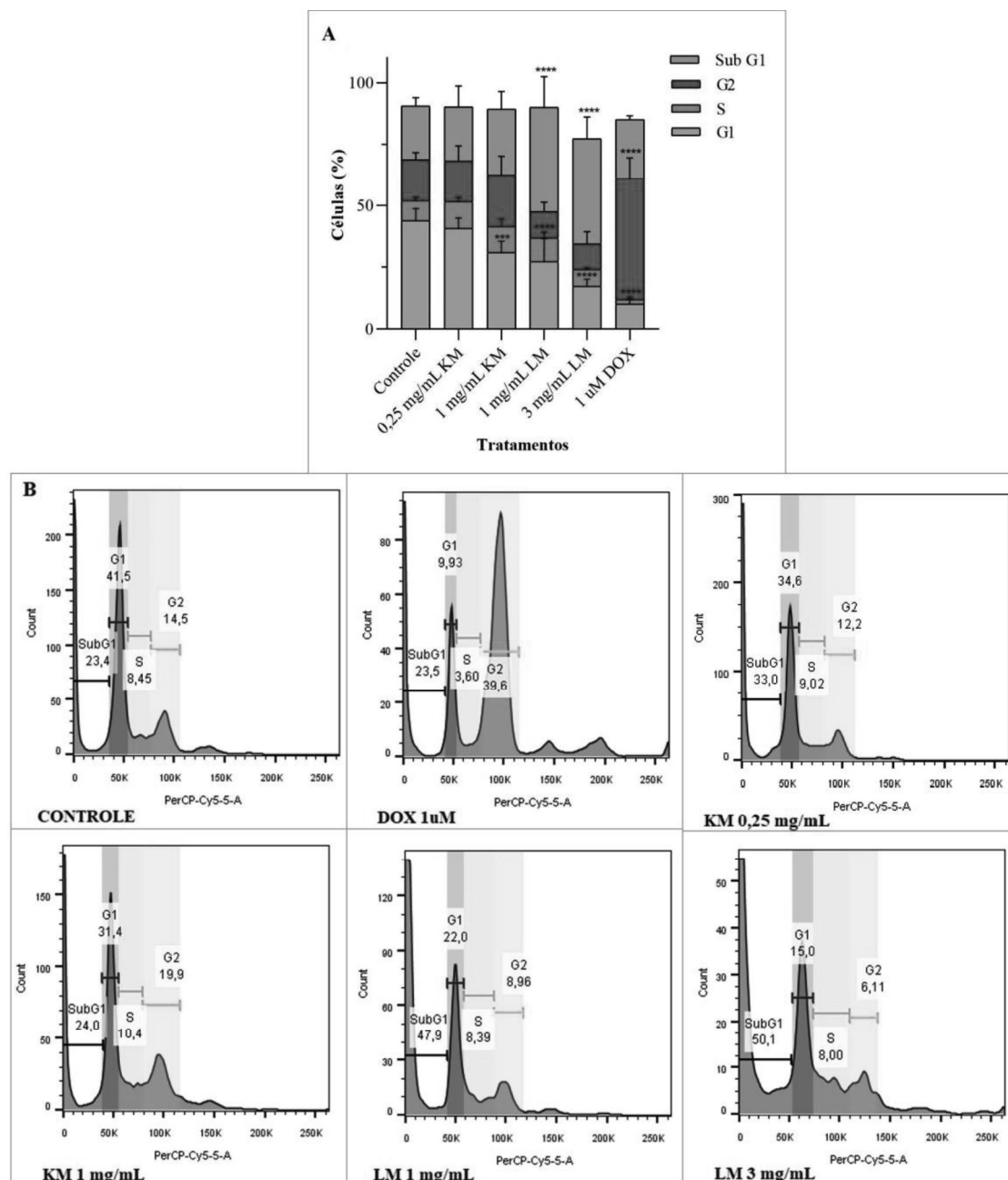
apoptose. O ciclo celular é um complexo conjunto de processos metabólicos que ocorrem com as células a partir do seu surgimento após a mitose até o momento em que ela se divide e origina duas células-filhas, e é composta pela interfase e pelo estágio M (mitótico). A interfase é dividida em 3 principais fases: na G1 ocorre o preparo para a síntese do DNA e é o primeiro ponto de restrição; na fase S ocorre principalmente a duplicação do DNA; e na fase G2/M ocorre a preparação para a mitose, além de ser também outro ponto de restrição. Nos pontos de restrição ocorre a checagem da estrutura do DNA, prevenindo assim a progressão do ciclo no caso de danos no DNA ou replicação incompleta, promovendo assim a parada do ciclo caso seja necessário (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013; SCHAFER, 1998; VAN DEN HEUVEL, 2005).

Enquanto nas células normais há um controle dos sinais de proliferação e sobrevivência, e a ativação de mecanismos em resposta à danos no DNA, como reparo, parada da progressão do ciclo celular e indução da apoptose, as células de câncer desenvolvem mecanismos que ignoram tais sinais e perturbam as vias que restringem a resposta proliferativa (EVAN; VOUSDEN, 2001; KASTAN; BARTEK, 2004).

Assim, primeiramente investigamos o efeito no ciclo celular de HCT-116 tratadas com 0,25 e 1 mg/mL de KM, e 1 e 3 mg/mL de LM, por 24h. Uma vez que o tratamento com 1 e 3 mg/mL de KM apresentaram praticamente o mesmo efeito no ensaio de proliferação celular, eliminamos a concentração de 3 mg/mL nos ensaios subsequentes, bem como o tratamento com iM, que não teve efeito na proliferação de HCT-116 (Figura 10).

Após 24h de tratamento com as amostras KM e LM, a membrana das células foi permeabilizada com Triton e o DNA das células foi corado com 7-AAD, um corante que se insere entre as bases nitrogenadas citosina-guanina da fita dupla de DNA. Assim, a partir da análise da quantificação de DNA no interior das células é possível identificar as diferentes fases do ciclo celular, onde as células que estão na fase G2/M possuem o dobro de DNA do que aquelas na fase G0/G1, representadas pela intensidade de fluorescência; já as células em morte celular, cujo DNA está fragmentado, apresentam menor intensidade (CARVALHO; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2010). Os efeitos das amostras KM e LM no ciclo celular de HCT-116 estão ilustrados na Figura 11.

Figura 11 - Efeito no ciclo celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações das carragenas kappa, lambda e iota modificadas, após 24h de tratamento; doxorrubicina foi usada como controle positivo.



KM: kappa modificada; LM: lambda modificada; DOX: doxorrubicina.

**A.** Os resultados foram expressos em porcentagem de células e apresentados como média  $\pm$  desvio padrão em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada. **B.** Histogramas representativos da separação das células marcadas com 7-AAD por citometria de fluxo.

Notamos que houve uma diminuição da população de células na fase G1 nos tratamentos com 1 mg/mL de KM, e com 1 e 3 mg/mL de LM, bem como no tratamento com 1  $\mu$ M de DOX. No caso do tratamento com DOX, também observamos um aumento de

células na fase G2, caracterizando uma parada do ciclo celular nessa fase, resultado semelhante ao reportado por Kitada, Pu e Toi (2019), que além disso observou também parada na fase G1. Geralmente, a DOX induz ao dano no DNA, parada do ciclo celular e ativa os pontos de controle das fases G1 e G2/M (MIZUNO *et al.*, 2009).

Constatamos também que o tratamento com as duas concentrações de LM, 1 e 3 mg/mL, aumentaram a população de células na fase sub-G1. O aumento da fase sub-G1 geralmente está associado à indução de morte celular, como a apoptose. Células HCT-116 tratadas com extrato da planta *Artemisia absinthium* (NAZERI *et al.*, 2020) e células HT-29 tratadas com fucoidano extraído de *Fucus vesiculosus* (KIM; KWON; NAM, 2017), que tiveram aumento do sub-G1, sofreram apoptose associada ao aumento de proteínas pró-apoptose, como Bax e Fas, e diminuição de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL.

#### **5.3.4. Ausência de efeito na apoptose celular**

A homeostase celular garante o balanço entre a quantidade de células novas e células com danos que são removidas (D'ARCY, 2019). Uma das formas de regulação da homeostase celular é através da morte celular, que pode ocorrer de três principais formas: apoptose, necrose e autofagia.

A apoptose, ou morte celular programada, é a forma mais prevalente de morte celular. Na apoptose, a célula para de crescer e se dividir, e tem início um processo que conduz à destruição da célula. A apoptose pode ocorrer como resposta a danos na célula ou estresses, mas também durante o desenvolvimento normal e morfogênese. Ela ocorre através da ativação das caspases, e a partir daí ocorrem diversos eventos bioquímicos e celulares, como a condensação do citoplasma e da cromatina, fragmentação do DNA e fragmentação celular em corpos apoptóticos, que são degradados por fagocitose sem que ocorra o lançamento do seu conteúdo no ambiente ao redor (D'ARCY, 2019; GREEN, 2005; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013; SHINTANI; KLIONSKY, 2004).

A necrose é uma forma de morte celular patológica, induzida por danos externos ou por patologia, mas não no desenvolvimento normal. A necrose geralmente envolve a super regulação de várias proteínas e compostos pró inflamatórios. Na necrose ocorre a ruptura da membrana plasmática e o lançamento do conteúdo celular no ambiente ao redor (D'ARCY, 2019; LOS *et al.*, 2002; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013).

Visto que uma das seis alterações fisiológicas que é considerada como “marca do câncer” é a capacidade de escapar da apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000), e dado

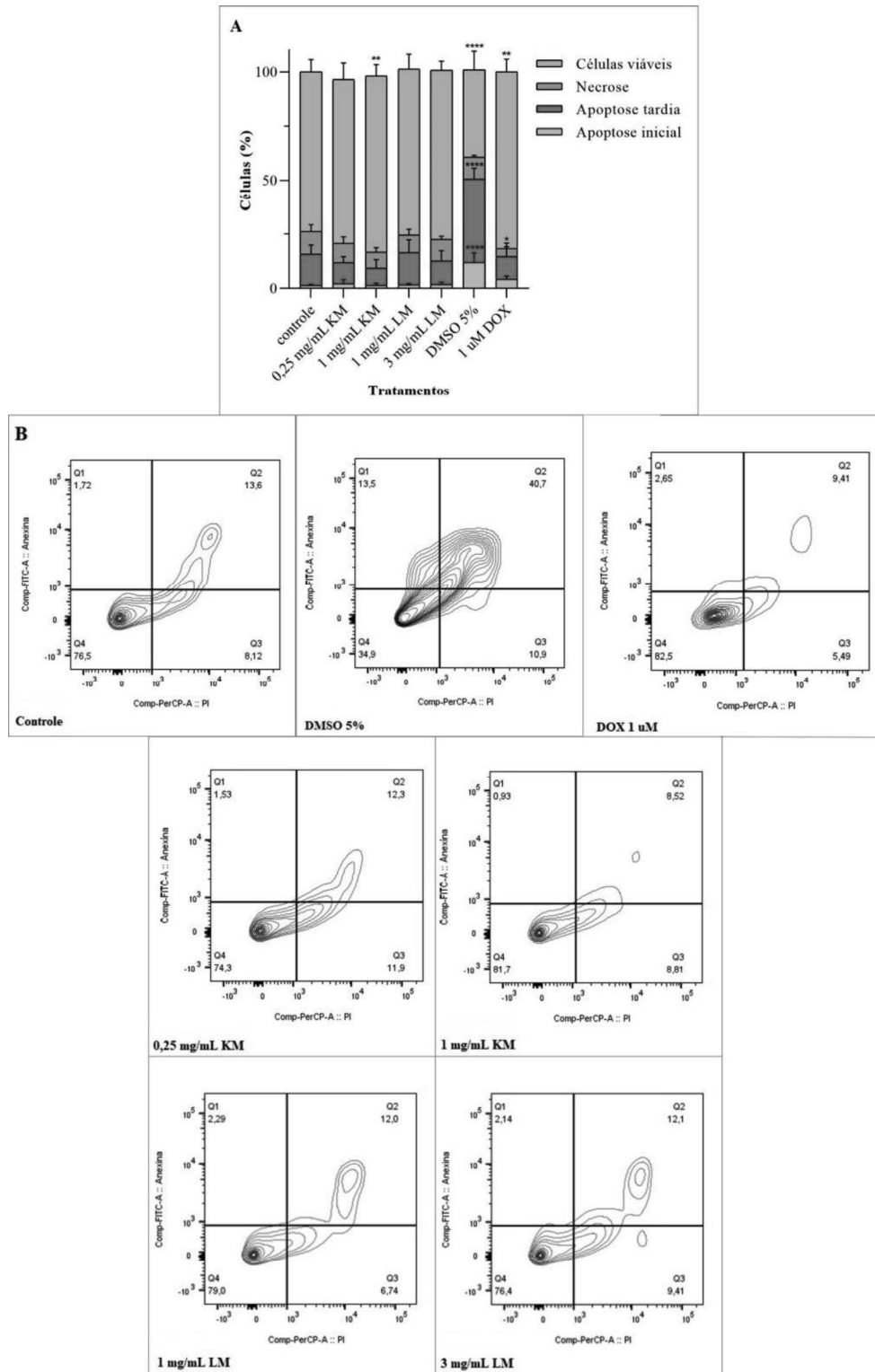
que, além da diminuição da viabilidade (Figuras 7 e 8) e da proliferação celular (Figura 10) de HCT-116 após o tratamento com KM e LM, observamos também aumento da fase sub-G1 na análise do ciclo celular (Figura 11), seguimos com a verificação o efeito do tratamento das carragenas KM e LM na apoptose de HCT-116 tratadas por 24h nas concentrações de 1 e 3 mg/mL de LM, e 0,25 e 1 mg/mL de KM.

Após 24h de tratamento, as células foram coradas com anexina V e iodeto de propídio, seguido de análise por citometria de fluxo. Em células viáveis, as fosfatidilserinas se encontram na superfície interna da membrana plasmática (voltadas para o citoplasma); no entanto, na fase inicial da apoptose, elas são translocadas para a superfície externa, como sinalizadoras para a fagocitose por macrófagos. Nesse momento, a anexina V, que tem afinidade pelas fosfatidilserinas, consegue se ligar a elas. Na apoptose também ocorre a fragmentação do DNA e a perda de conteúdo de DNA nuclear, e em células em necrose ocorre a ruptura de membranas, permitindo assim que o iodeto de propídio, um corante com afinidade por DNA que se intercala em pequenas sequências de bases de nucleotídeos, se ligue à ele (CROWLEY *et al.*, 2016; NAGATA, 2018; RICCARDI; NICOLETTI, 2006; VORSELEN, 2022). Dessa forma, com o uso desses dois marcadores, é possível identificar:

- a) células em apoptose inicial, marcadas apenas com anexina V, uma vez que a membrana ainda está íntegra e o iodeto de propídio não consegue entrar na célula (quadrante 1 – Q1);
- b) células em apoptose tardia, duplamente marcadas, tanto com anexina V como com iodeto de propídio, uma vez que nesse estágio o iodeto de propídio já consegue entrar (quadrante 2 – Q2);
- c) células em necrose, marcadas apenas com iodeto de propídio (quadrante 3 – Q3);
- d) células viáveis, que não estão marcadas nem com anexina V nem com iodeto de propídio (quadrante 4 – Q4).

A análise do efeito do tratamento com KM e LM na apoptose de HCT-116 está exposto na Figura 12.

Figura 12 - Efeito na apoptose de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações das carragenas kappa e lambda modificadas, após 24h de tratamento; doxorubicina e dimetilsulfóxido foram utilizados como controle positivo.



KM: kappa modificada; LM: lambda modificada; DOX: doxorubicina; DMSO: dimetilsulfóxido.

A. Os resultados foram expressos em porcentagem de células apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0,05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada. B. Imagens representativas das células marcadas com

Anexina V FITC e iodeto de propídio por citometria de fluxo, sendo, Q1: quadrante de apoptose; Q2: quadrante de apoptose tardia; Q3: quadrante de necrose; Q4: quadrante de células viáveis.

O tratamento com KM e LM não interferiu no perfil de apoptose nem de necrose das células. O tratamento com 1  $\mu$ M DOX, inclusive, diminuiu as células em necrose e aumentou as viáveis. A maioria das células de HCT-116 tratadas com 0,1  $\mu$ M de DOX também não sofreu apoptose em ensaio realizado por SLIWINSKA et al. (2009). Já no tratamento com 5% de DMSO observamos aumento das células que sofreram apoptose e diminuição das células viáveis. De fato, já foi reportado que o tratamento com 2% de DMSO por 24h induziu a morte neuronal (GALVAO *et al.*, 2014), e aumentou a expressão de Fas e a atividade das caspases 3/7 e 8, indicando apoptose em células pré-osteoblásticas de camundongos (THALER *et al.*, 2012).

Outro tipo de morte celular é a autofagia, um processo de autodigestão na qual ocorre o envolvimento de organelas e material citoplasmáticos dentro de vesículas, que se fundem com lisossomos e então são degradadas por hidrolases específicas. Em nível basal, a autofagia colabora com a renovação dos componentes citoplasmáticos, mas ela também pode ser induzida por fatores externos (EISENBERG-LERNER; KIMCHI, 2009; LEVINE; KROEMER, 2008; SHINTANI; KLIONSKY, 2004). Células de câncer podem apresentar morte celular por autofagia como resposta a tratamentos que não tiveram efeito na apoptose, na necrose e nem no ciclo celular, como em células DLD-1 (de câncer colorretal) tratadas com panitumumabe (GIANNOPOULOU *et al.*, 2009). Assim, a autofagia pode ter sido um dos mecanismos ativados após o tratamento com KM e LM; no entanto, ensaios específicos não foram conduzidos para confirmar tal hipótese.

### **5.3.5. Aumento na síntese da proteína p21**

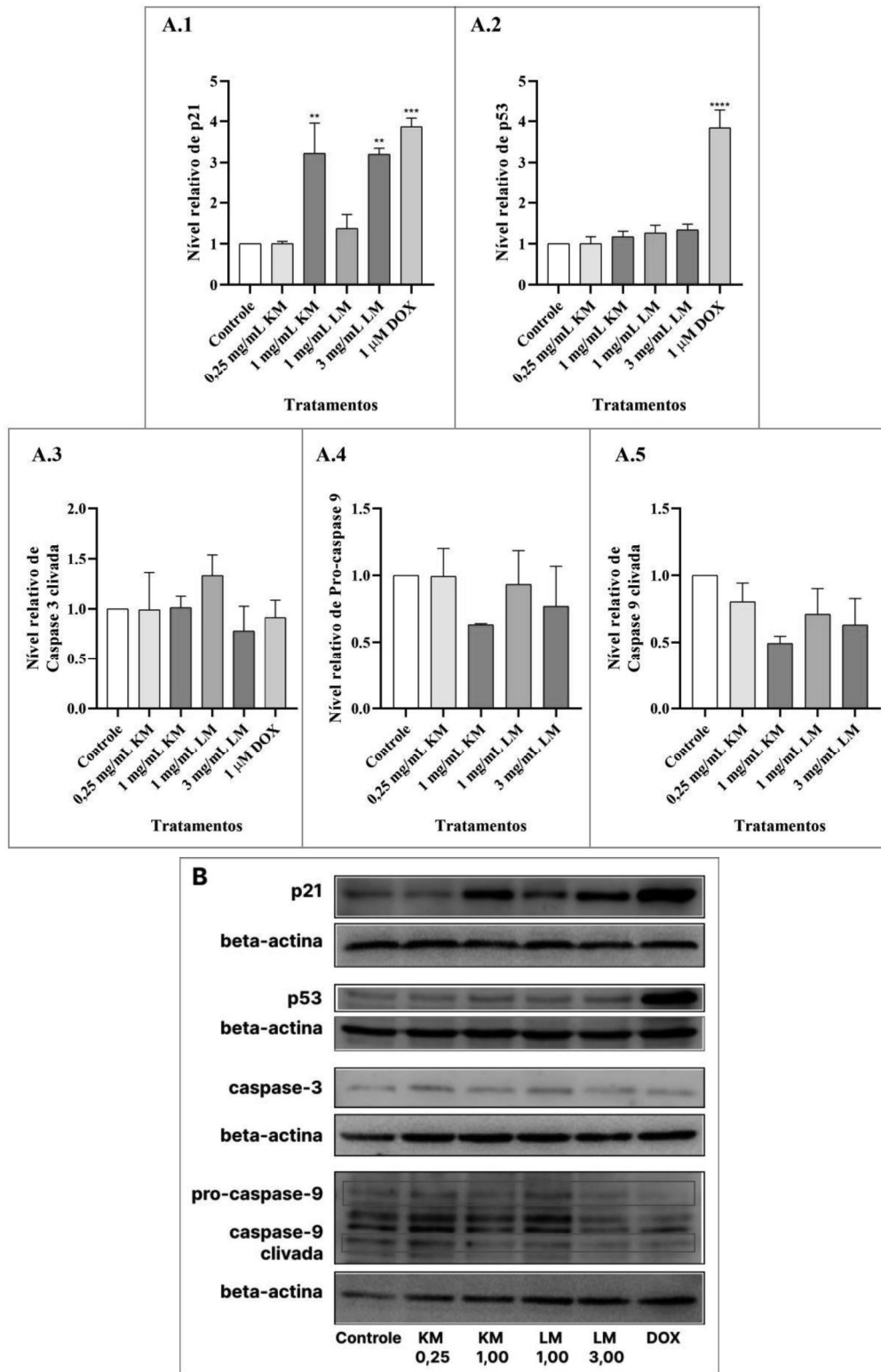
Finalmente, utilizamos o método de *Western blotting* para verificar o efeito após 24h de tratamento com 0,25 e 1 mg/mL de KM, 1 e 3 mg/mL de LM, na síntese de proteínas associadas ao ciclo celular - p21 e p53 - e à apoptose - caspase 3 clivada, pró caspase 9, e caspase 9 clivada.

O *Western blotting* é uma técnica pela qual é possível detectar e quantificar proteínas de amostras biológicas. Primeiramente, as células tratadas foram lisadas, e após preparação da amostra, as proteínas foram colocadas em gel de poliacrilamida, que foi submetido à eletroforese; assim, a separação das proteínas ocorreu de acordo com os seus pesos moleculares. Na sequência, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, e

com o uso de anticorpos específicos para as proteínas de interesse foi finalmente realizada a sua detecção, e posterior quantificação. Os resultados foram expostos em quantidade relativa de cada proteína em relação à proteína constitutiva,  $\beta$ -actina, e estão apresentados na Figura 13.



Figura 13 - Efeito na síntese de diferentes proteínas de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações das carragenas kappa e lambda modificadas após 24h de tratamento.



KM: kappa modificada; LM: lambda modificada; DOX: doxorrubicina.

**A.** Os resultados foram normalizados pela razão de  $\beta$ -actina carregada e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em três experimentos independentes (passagens celulares). \* $p < 0.05$  vs controle, de acordo com análise One-Way ANOVA e teste *Dunnnett's* de comparação multivariada. **B.** Imagens representativas das membranas contendo as diferentes proteínas que foram investigadas.

Reforçando a ausência de efeito do tratamento com KM e LM na apoptose de HCT-116, não observamos alteração na quantidade relativa de caspase 3 clivada, pró caspase 9 e caspase 9 clivada, conforme mostram as Figuras 13.A3, A4, A5 e B. A indução da apoptose frequentemente ocorre pela via das caspases, como em células HT-29 tratadas com fucoidano extraído de *Fucus vesiculosus* (KIM, E. J. *et al.*, 2010) e em células MDA-MB-231 (de câncer de mama) tratadas com carragena predominantemente do tipo iota, cuja apoptose demonstrou ser regulada pelos genes das caspases 3 e 9, p53, Bax e Bcl-2 (MURAD *et al.*, 2015).

Constatamos aumento na quantidade relativa de p21 decorrente do tratamento com 1 mg/mL de KM e 3 mg/mL de LM, conforme Figuras 13.A1 e B, resultado que corrobora com a diminuição observada na proliferação celular (Figura 10). A p21 é uma proteína que está associada à parada do crescimento e do ciclo celular, e que pode regular as suas diversas fases, da G1 até G2/M, através da inibição dos complexos formados por ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), associação à PCNA (antígeno nuclear de célula proliferante), entre outros mecanismos (ABBAS; DUTTA, 2009; JUNG; QIAN; CHEN, 2010).

Comumente, a diminuição da viabilidade e proliferação celular, bem como a parada do ciclo celular na fase G1, estão associadas ao aumento de p21 em diferentes linhagens de células de câncer colorretal, como em: HCT-116 tratadas com peptídeo específico (LI *et al.*, 2018), e com L-carnosina, um dipeptídeo de aminoácidos beta-alanina e histidina (LEE *et al.*, 2018); DLD-1 e SW480 tratadas com fucoidano proveniente de *Sargassum fusiforme* (LI *et al.*, 2022); e HT-29 tratadas com fucoidano extraído de *Fucus vesiculosus* (HAN; LEE; LEE, 2015), cujos efeitos ainda foram associados à diminuição das ciclinas E, E1 e D1, CDK2 e 4, aumento de Bax, caspase 3 clivada e p53, e ativação da via AKT. No entanto, o aumento de p21 após tratamento com 3 mg/mL de LM foi associado à parada no ciclo celular em sub-G1, ou seja, antes da fase G1. Embora o tratamento com 1 mg/mL de KM também tenha sido associado ao aumento de p21, não foi observada alteração no ciclo celular de HCT-116 após esse tratamento.

Além de ser uma proteína-chave na regulação do ciclo celular, a p21 pode também estar envolvida em processos autofágicos, como em células HT-29 tratadas com dimetilfumarato, cujo o aumento de p21 esteve associado ao aumento da atividade autofágica e ausência de indução de apoptose, e em células T84 (de câncer colorretal), que além da autofagia, também apresentou modesta indução de apoptose e aumento da atividade das caspases 3 e 7 (KALUZKI *et al.*, 2019); em células DLD-1 e COLO 205 tratadas com extrato de *Koelreuteria formosana* (planta comum no Taiwan), que também demonstrou parada do ciclo em G2/M (HORNG *et al.*, 2017); e em células HT-29 tratadas com derivado

benzaldeído de ascorbato de sódio, que tiveram também ausência de caspase-3 ativa e fosforilação de AKT (CHEUNG *et al.*, 2010). A apoptose e a autofagia também podem ocorrer concomitantemente e estarem associadas ao aumento de p21, como em células SW620 (de câncer colorretal) tratadas com hexóxido tetra arsênico, que exibiram diminuição da viabilidade, parada do ciclo celular em G2/M e aumento de sub-G1, com indução de apoptose dependente das caspases 3, 8 e 9 e indução de autofagia (NAGAPPAN *et al.*, 2017); e em HCT-116 tratadas com protopina que apresentaram indução de apoptose associada ao aumento da atividade das caspases 3 e 7, autofagia e ativação da via de p53 (SON *et al.*, 2019).

O aumento de p21 pode estar associado ainda à indução de diversos genes correlacionados com células em senescência (CHANG *et al.*, 2000). De fato, já foi reportado que a p21 é requerida para o desenvolvimento de senescência em células HCT-116 (HAN *et al.*, 2002), e estar associada, simultaneamente, à indução da autofagia e da senescência, como em células HCT-116 tratadas com curcumina, um polifenol derivado de *Curcuma longa*, que apresentaram ainda evidências de indução de p21 independente de p53 (MOSIENIAK *et al.*, 2012). A senescência é uma parada estável do ciclo celular, na qual as células se mantêm metabolicamente ativas, mas com diversas alterações metabólicas, como resistência à apoptose, parada do ciclo celular e inibição de CDKs (HERNANDEZ-SEGURA; NEHME; DEMARIA, 2018; KUMARI; JAT, 2021).

O tratamento com 1  $\mu$ M de DOX aumentou não somente a quantidade de p21 como também de p53 (Figuras 13.A1, A2 e B). Em ensaio conduzido por SLIWINSKA *et al.* (2009), após tratamento de HCT-116 com 0,1  $\mu$ M de DOX, a maioria das células pararam de proliferar, e foi detectado aumento de p53, p21 e ciclina D1, que podem ser marcadores de senescência. O tratamento com DOX induz o fenótipo de senescência e a parada do crescimento terminal em HCT-116, sendo p21 e p53 reguladores positivos da senescência, embora não sejam os únicos (CHANG *et al.*, 1999).

Apesar do gene da p53 estar diretamente relacionado à regulação da transcrição da p21, ao contrário do observado no tratamento com a DOX, não observamos alteração na quantidade relativa de p53 após o tratamento com KM e LM, constatado pelas Figuras 13.A2 e B. Embora a expressão de p21 seja regulada por p53, outros mecanismos de ativação e fatores de transcrição também ativam a expressão de p21 de uma maneira independente de p53, como através de TGF- $\beta$  (DATTO *et al.*, 1995; EROL, 2011; JUNG; QIAN; CHEN, 2010; MOSIENIAK *et al.*, 2012).

Em suma, é inegável o efeito do tratamento de KM e LM na cultura de células HCT-116, que demonstrou diminuição tanto da viabilidade quanto da proliferação celular. Tal diminuição foi associada à alteração no ciclo celular com o tratamento com LM, com aumento da fase sub-G1, que não foi associada à apoptose nem à ativação das caspases 3 e 9, mas sim ao aumento da proteína p21, que provavelmente foi ativada de forma independente de p53, tanto com KM como LM. Por fim, o aumento da fase sub-G1 indica aumento de morte celular, que foi distinta de apoptose e necrose. Assim, nós sugerimos, baseado na revisão bibliográfica aqui apresentada, que os efeitos biológicos observados em HCT-116 são dependentes de p21, associado a senescência e/ou à morte celular do tipo autofágica.

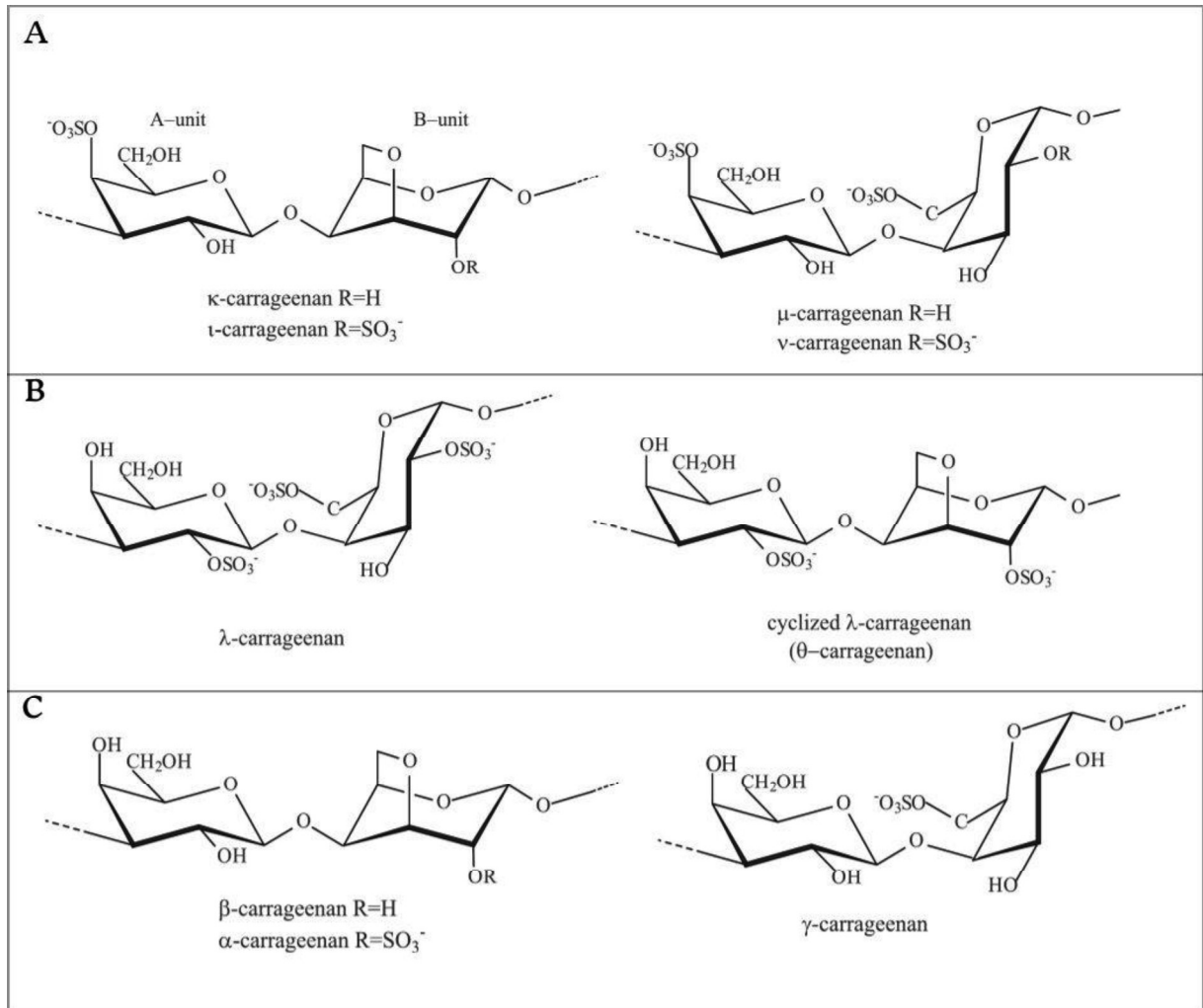
Contudo, reforçamos que ensaios específicos, como visualização de corpos autofágicos e identificação da proteína LC3-II, que é convertida a partir de LC3-I por indução autofágica, precisariam ser realizados para confirmar tal teoria. Também encorajados pelo aumento da p21, sugerimos que o processo de senescência poderia ser outro mecanismo ativado nas células HCT-116 tratadas com KM e LM, induzido ainda de forma concomitante ou distinta da autofagia. Novamente, outros experimentos precisariam ser conduzidos para amparar tal proposta, como detecção da presença de  $\gamma$ -H2AX foci, que demonstra dano contínuo e irreparável do DNA.

#### **5.4. Análise da estrutura química das amostras**

As carragenas são galactanos sulfatados que possuem um suporte principal de dissacarídeos formados por unidades alternadas de *D*-galactopiranosil (unidade A) conectadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 com *D*-galactopiranosil (unidade B); algumas estruturas de carragenas apresentam as unidades B ciclizadas como 3,6-anidrogactose (RODRÍGUEZ SÁNCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA, 2022).

Dependendo do padrão de sulfatação das unidades A (também conhecida por unidade G) e da estrutura da unidade B (também conhecida como unidade D), as carragenas podem ser classificadas em diferentes famílias (RODRÍGUEZ SÁNCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA, 2022), conforme mostra a Figura 14.

Figura 14 – Estrutura geral dos diferentes tipos de carragenas.



Família das carragenas: **A.** Kappa (κ); **B.** Lambda (λ); **C.** Beta (β).

Fonte: RODRÍGUEZ SÁNCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA (2022).

- kappa (κ): todas composta por unidades A de *D*-galactose-4-sulfato (G4S); e variam entre elas em relação à unidade B: enquanto mu (μ) é composta por *D*-galactose-6-sulfato (D6S) e nu (ν) por *D*-galactose-2,6-dissulfato (D2S,6S); em kappa a unidade B é ciclizada em 3,6-anidrogactose não sulfatada (DA), e em iota (ι) em 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S);
- lambda (λ): unidade A com *D*-galactose-2-sulfato (G2S); e enquanto em lambda a unidade B é composta por *D*-galactose-2,6-dissulfato (D2S,6S), em theta (θ) ela é ciclizada em 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S);
- beta (β): a família menos comum, na qual a unidade A não é sulfatada (G); e a unidade B de gamma (γ) é composta por *D*-galactose-6-sulfato (D6S); em beta é ciclizada em 3,6-anidrogactose não sulfatada (DA), e em alpha (α) em 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S).

As carragenas produzidas pelas algas vermelhas não possuem essas estruturas puras e idealizadas, apresentando-se, na verdade, como uma mistura de estruturas ou estruturas híbridas. Entre as carragenas mais recorrentes e comercialmente relevantes estão as do tipo kappa, iota e lambda (PEREIRA et al., 2009; RODRÍGUEZ SÁNCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA, 2022).

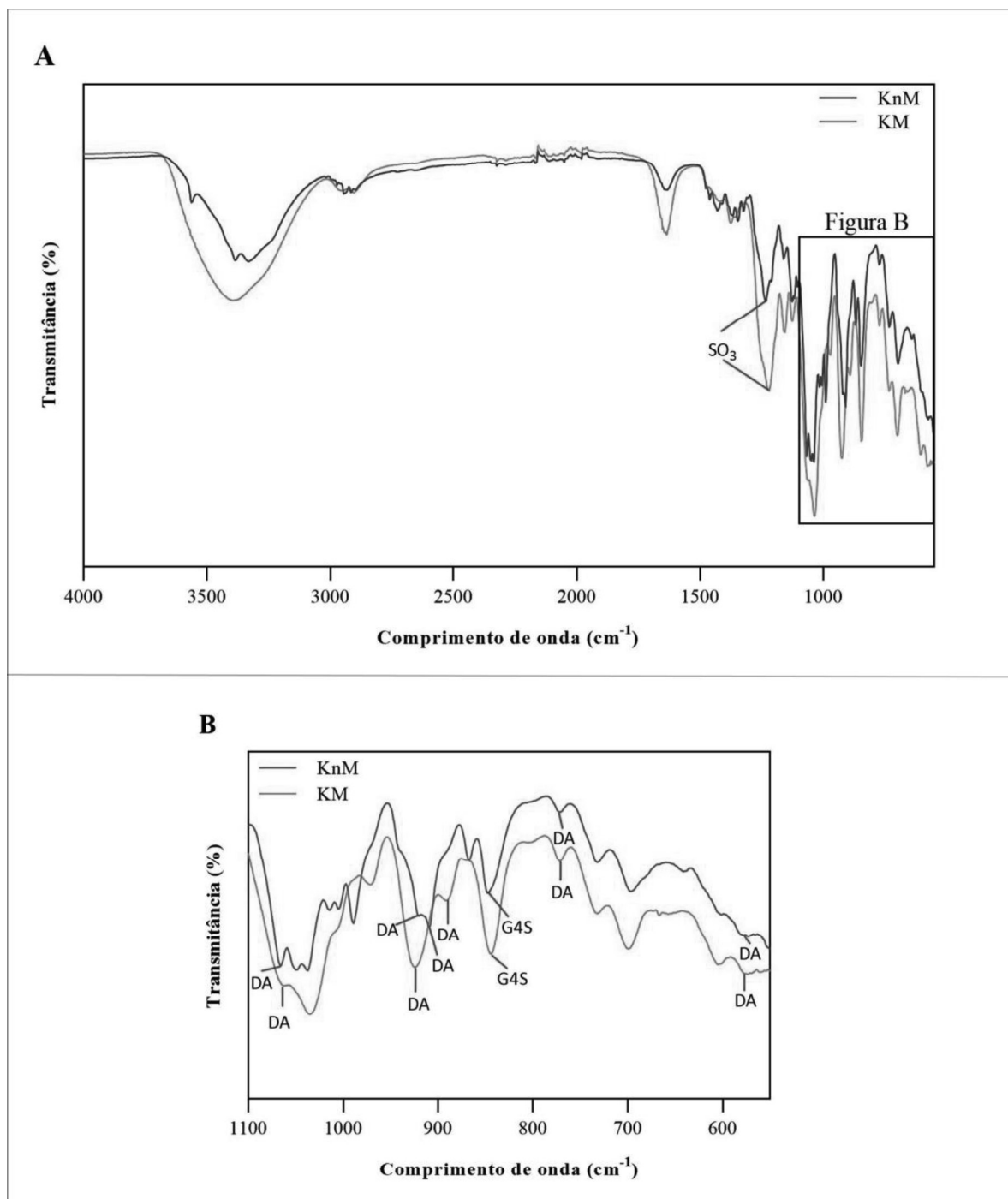
Uma vez que as amostras de KM e LM demonstraram efeitos biológicos em cultura celular de HCT-116 (conforme apresentado no item 5.3), realizamos a análise estrutural das moléculas de ambas as carragenas por FTIR e RMN HSQC, para identificar as suas estruturas químicas.

#### ***5.4.1. Espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)***

A FTIR é uma técnica eficiente para analisar estruturas de polissacarídeos. Nessa técnica, a molécula absorve radiação no infravermelho, que se converte em energia de vibração molecular, representada em forma de bandas. Grupos funcionais específicos geram picos de absorção característicos em certos comprimentos de onda, e a partir dessa análise é possível identificar a estrutura das moléculas (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011).

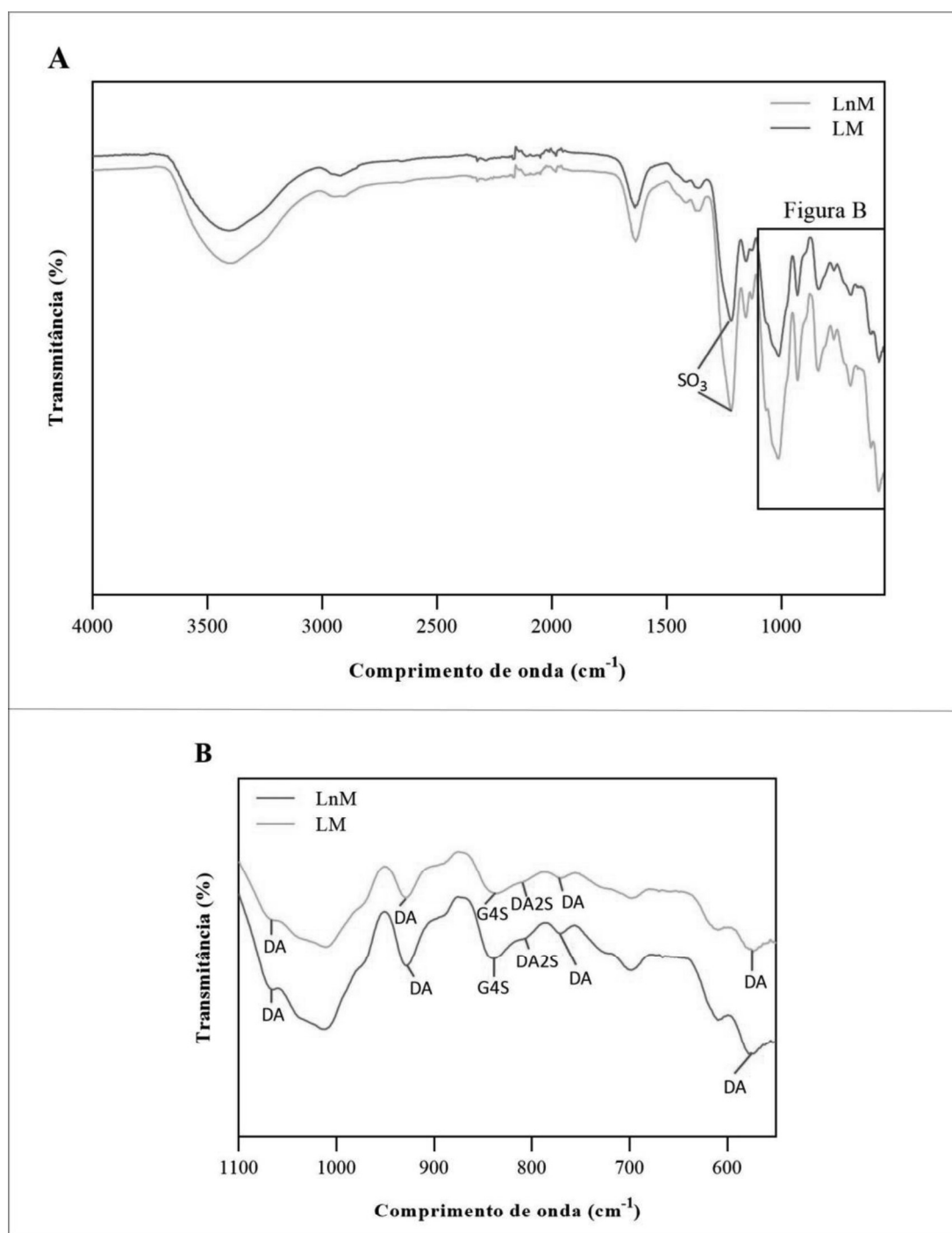
Os espectros de KnM, KM, LnM e LM entre 4000-550  $\text{cm}^{-1}$  foram apresentados nas Figuras 15 e 16. Os valores das bandas encontradas nos espectros constam na Tabela 3, e foram comparadas com as conhecidas impressões digitais das unidades de dissacarídeos ou grupos químicos das carragenas já reportados na literatura, conforme Tabela 4, para identificação das unidades que compõem as amostras estudadas.

Figura 15 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier das carragenas kappa não modificada (KnM) e modificada (KM).



**A.** Espectro entre 4000-550 cm<sup>-1</sup>; **B.** Espectro entre 1100-550 cm<sup>-1</sup>.  
KnM: carragenas kappa não modificada; KM: carragena kappa modificada; G4S: *D*-galactose-4-sulfato; DA: 3,6-anidrogactose; SO<sub>3</sub>: éster sulfato.

Figura 16 - Espectros de infravermelho por transformada de Fourier das carragenas lambda não modificada e modificada.



A. Espectro entre 4000-550  $\text{cm}^{-1}$ ; B. Espectro entre 1100-550  $\text{cm}^{-1}$ .  
LnM: carragenas lambda não modificada; KM: carragenas lambda modificada; G4S: *D*-galactose-4-sulfato; DA: 3,6-anidrogactose; DA2S: 3,6-anidrogactose-2-sulfato;  $\text{SO}_3$ : éster sulfato.



Tabela 3 - Bandas identificadas na espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier das carragenas não modificadas e modificadas kappa e lambda.

<b>Unidade de dissacarídeo ou Grupo químico</b>	<b>Amostra</b>	<b>Banda (cm<sup>-1</sup>)</b>
G4S	KnM	848
G4S	KM	845
DA	KM	577; 772; 891; 925; 1064;
DA	KnM	577; 772; 891; 909; 921; 1066
SO <sub>3</sub>	KnM	1234
SO <sub>3</sub>	KM	1222
DA2S	LnM	807
DA2S	LM	809
DA	LM, LnM	575; 771; 929; 1067
G4S	LM, LnM	841
SO <sub>3</sub>	LM, LnM	1221

KnM: kappa não modificada; KM: kappa modificada; LnM: lambda não modificada; LM: lambda modificada; G4S: *D*-galactose-4-sulfato; G2S: *D*-galactose-2-sulfato; DA: 3,6-anidrogactose; DA2S: 3,6-anidrogactose-2-sulfato; D2S,6S: *D*-galactose-2,6-dissulfato; D6S: *D*-galactose-6-sulfato; SO<sub>3</sub>: éster sulfato.

Tabela 4 - Impressão digital na espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier de diferentes tipos de carragenas.

<b>Unidade de dissacarídeo ou Grupo químico</b>	<b>Impressão digital</b>	
	<b>Banda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Carragena</b>
<b>G4S</b>	840-850	κ, ĩ, μ, ν
<b>G2S</b>	830	λ, θ
<b>DA</b>	928-933; 1070	κ, β
<b>DA</b>	575-928	
<b>DA2S</b>	800-805; 905	ĩ, θ
<b>D2S,6S</b>	820, 825	λ, ν
<b>D6S</b>	810-820; 867	μ
<b>SO<sub>3</sub></b>	1210-1260	κ, ĩ, μ, ν, λ, θ, β

G4S: *D*-galactose-4-sulfato; G2S: *D*-galactose-2-sulfato; DA: 3,6-anidrogactose; DA2S: 3,6-anidrogactose-2-sulfato; D2S,6S: *D*-galactose-2,6-dissulfato; D6S: *D*-galactose-6-sulfato; SO<sub>3</sub>: éster sulfato.

Fonte: GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ (2011); HA *et al.* (2022).

Bandas entre 840-850  $\text{cm}^{-1}$  são impressões digitais da carragena kappa e correspondem à unidade G4S, que foram observadas nos espectros tanto de KnM quanto KM (848 e 845  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente), sendo que o pico na KM foi mais intenso (Figura 15.B e Tabela 3) (ARMAN; QADER, 2012; HA *et al.*, 2022; CICINSKAS *et al.*, 2020a, 2020b; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011; OKOLIŠAN *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2009; TECSON *et al.*, 2021).

A unidade de dissacarídeo DA, que compõe a unidade B da carragena kappa, aparece tipicamente no FTIR em banda característica entre 928-933  $\text{cm}^{-1}$ , além também de aparecer na região compreendida entre 928-575  $\text{cm}^{-1}$ . Essa unidade aparece bem caracterizada nos espectros de ambas as amostras da carragena, em um pico bem definido em 925  $\text{cm}^{-1}$  na KM, e em dois picos, um em 921  $\text{cm}^{-1}$  e outro em 909  $\text{cm}^{-1}$ , na KnM, além de picos em 577, 772 e 891  $\text{cm}^{-1}$ , e em 1066  $\text{cm}^{-1}$  na KnM, e em 1064  $\text{cm}^{-1}$  na KM (Figura 15.B e Tabela 3).

A região entre 1210-1260  $\text{cm}^{-1}$  é típica do grupo sulfato. Foram constatados picos bem definidos em 1234 e 1222  $\text{cm}^{-1}$  na KnM e KM, respectivamente (Figura 15.A e Tabela 3), com maior intensidade na KM, o que pode representar uma maior exposição dos grupos sulfato após a modificação da molécula, reforçado também pelo pico mais intenso da G4S em KM (ARMAN; QADER, 2012; CICINSKAS *et al.*, 2020a, 2020b; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011; MI *et al.*, 2020; OKOLIŠAN *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2009).

Nos espectros de LnM e LM esperava-se encontrar os picos característicos da carragena lambda, correspondentes à G2S (830  $\text{cm}^{-1}$ ) e D2S,6S (820, 825  $\text{cm}^{-1}$ ) (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011; PEREIRA *et al.*, 2009). No entanto, como mostra a Figura 16.B, curiosamente a carragena adquirida da Sigma como sendo lambda não apresentou nenhuma dessas bandas características, apenas um ombro em 807 e 809  $\text{cm}^{-1}$  na LnM e LM, respectivamente, correspondendo à unidade DA2S, observada nas carragenas do tipo theta e iota (Tabela 4). Além disso, tanto LM como LnM apresentaram bandas características de DA, em 1067  $\text{cm}^{-1}$  e 929  $\text{cm}^{-1}$ , e de G4S, em 841  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 3). Tais dados indicam que essa carragena é composta principalmente por G4S e DA, além de DA2S. Ademais, a presença do grupo sulfato em ambas as amostras, LnM e LM, foi confirmada pela presença de pico característico em 1221  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 16.A).

Na comparação entre a KnM e LnM (Anexo D), notamos que a molécula de LnM é mais sulfatada do que KnM, por apresentar pico mais intenso na região do grupo sulfato (1210-1260  $\text{cm}^{-1}$ ). No entanto, observamos que LM apresentou pico menos intenso nessa região na comparação com LnM, o que demonstra uma possível diminuição da exposição dos grupos sulfato após a modificação, ao contrário do que foi observado em relação a KnM/KM.

De fato, na comparação entre as quatro amostras, é notável que KM é a molécula mais sulfatada, baseado na intensidade dos picos dessa região (Anexo D).

#### 5.4.2. *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do tipo HSQC*

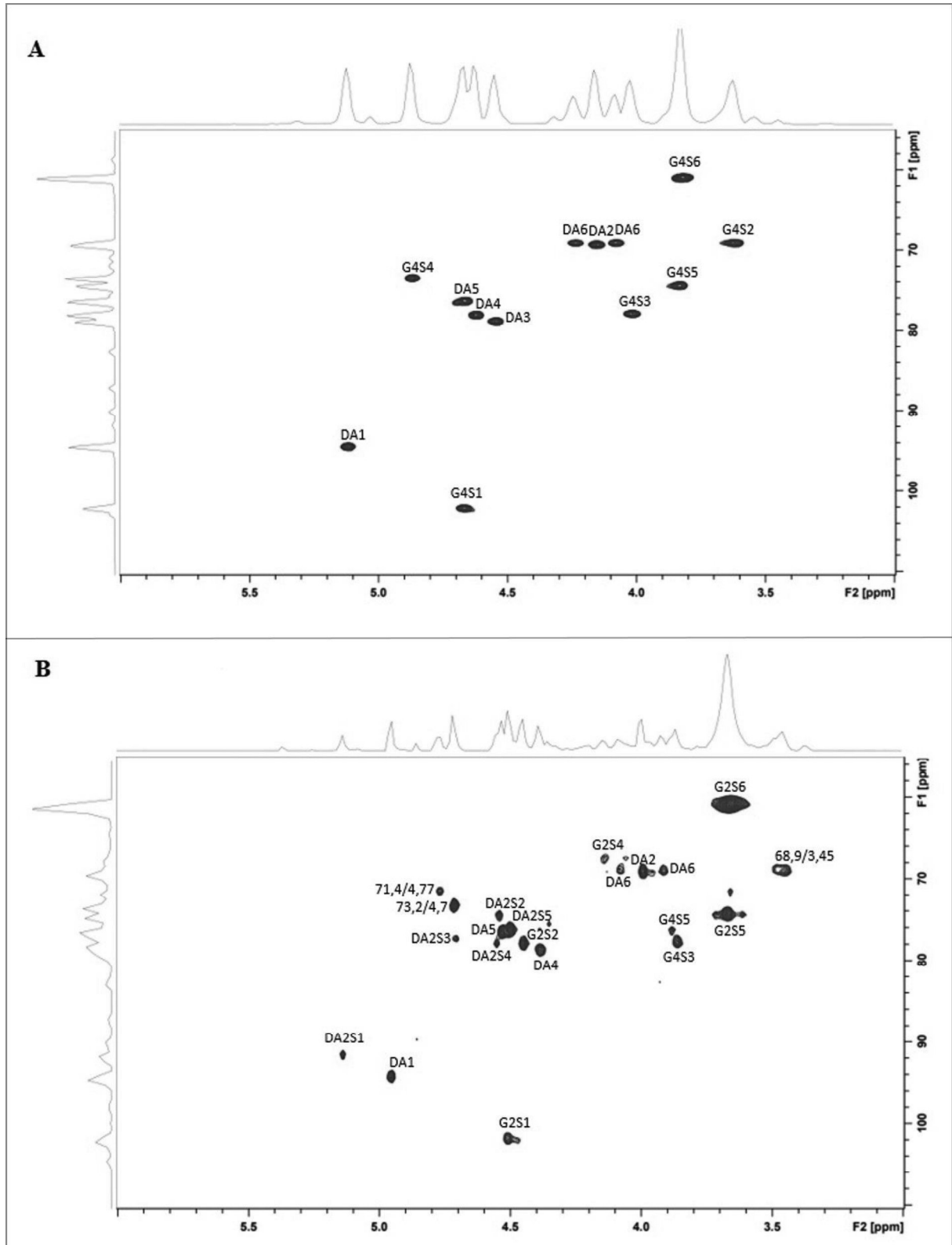
A espectroscopia de RMN é uma técnica que analisa a interação da rotação nuclear (spin) de átomos em um determinado campo magnético, que influencia o estado de energia dos spins dos átomos. Assim, ela determina a absorção e reemissão de radiação eletromagnética que ocorrem em frequências de ressonâncias específicas. Os núcleos mais comumente analisados são os de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , que fornecem informações sobre o esqueleto da molécula e das periferias. O espectro é representado pelos deslocamentos químicos (em ppm), que expressam a razão entre a frequência de ressonância de  $^{13}\text{C}$  ou  $^1\text{H}$  em relação à frequência de um composto referência (comumente o tetrametilsilano), ou seja, quanto a ressonância de  $^{13}\text{C}$  ou  $^1\text{H}$  é deslocada em relação à referência (BOTHWELL; GRIFFIN, 2011; MLYNÁRIK, 2017; RHODES, 2017).

Nos tipos de análise em 2D, como na espectroscopia de correlação, são observados os acoplamentos internucleares, ou seja, a correlação de um núcleo individual com outro núcleo, através de ligação ou acoplamento espacial, e a detecção da frequência desses núcleos correlacionados. Como no HSQC, do inglês *heteronuclear single quantum coherence*, que permite analisar o acoplamento entre os núcleos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  separados por uma única ligação química, que fornecem informações mais confiáveis em termos de assinaturas dos deslocamentos químicos (BOTHWELL; GRIFFIN, 2011; MLYNÁRIK, 2017; RHODES, 2017; RODRÍGUEZ SÁNCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA, 2022).

Os deslocamentos químicos mudam de acordo com a quantidade e posição do grupo sulfato, uma vez que a alta densidade eletrônica dos grupos sulfato gera uma desblindagem dos átomos vizinhos, como C e H (RODRÍGUEZ SÁNCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA, 2022).

Os espectros de HSQC de KM e LM estão apresentados na Figura 17, na qual foram identificadas as possíveis unidades estruturais de dissacarídeos que compõem cada amostra, baseado na comparação com dados já conhecidos da literatura, expostos nas Tabelas 5 e 6.

Figura 17 - Espectros de HSQC das unidades de dissacarídeos das carragenas modificadas.



**A.** Kappa (KM); **B.** Lambda (LM).

**G4S:** *D*-galactose-4-sulfato; **G2S:** *D*-galactose-2-sulfato; **DA:** 3,6-anidrogactose; **DA2S:** 3,6-anidrogactose-2-sulfato.

Tabela 5 - Assinaturas de HSQC das principais estruturas de dissacarídeos de carragenas-referência e os identificados na kappa modificada (KM) (em ppm).

Unidade estrutural de dissacarídeos	Carragena ou Amostra	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
G4S	Kappa ( $\kappa$ )	102,5/4,70	69,4/3,65	78,2/4,06	73,7/4,91	74,8/3,87	61,2/3,86
G4S	KM	102,1/4,7	69,3/3,6	78,2/4,0	73,5/4,9	74,5/3,8	61,0/3,8
DA	Kappa ( $\kappa$ )	94,7/5,15	69,7/4,19	79,2/4,58	78,4/4,65	76,7/4,7	69,7/4,10;4,19
DA	KM	94,5/5,1	69,3/4,17	78,9/4,5	78,2/4,6	76,5/4,7	69,3/4,24;4,08

G4S: D-galactose-4-sulfato; DA: 3,6-anidrogactose.

Fonte: RODRÍGUEZ SANCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA (2022); Próprio autor.

Tabela 6 - Assinaturas de HSQC das principais estruturas de dissacarídeos de carragenas-referência e os identificados na lambda modificada (LM) (em ppm).

Unidade estrutural de dissacarídeos	Carragena ou Amostra	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
G2S	Theta ( $\theta$ )	100,6/4,76	77,7/4,37	79,5/3,91	67,8/4,14	74,9/3,71	61,2/3,77
G2S	LM	101,7/4,5	77,8/4,45	x	67,6/4,15	74,7/3,7	61,4/3,7

<b>DA2S</b>	<b>Theta (θ)</b>	95,5/5,29	74,9/4,6	77,4/4,75	77,7/4,7	77,0/4,66	70,1/4,14
<b>DA2S</b>	<b>Iota (ϊ)</b>	92,5/5,30	75,5/4,71	78,2/4,86	78,8/4,71	77,4/4,69	70,3/4,16;4,28
<b>DA2S</b>	<b>LM</b>	91,5/5,14	74,7/4,5	77,2/4,7	77,8/4,55	76,3/4,5	x
<b>G4S</b>	<b>Kappa (κ)</b>	102,5/4,70	69,4/3,65	78,2/4,06	73,7/4,91	74,8/3,87	61,2/3,86
<b>G4S</b>	<b>Mi (μ)</b>	105,3/4,71	70,7/3,72	78,8/3,93	73,8/4,89	75,4/3,77	61,9/3,84
<b>G4S</b>	<b>Iota (ϊ)</b>	102,6/4,67	69,5/3,64	77,4/4,04	72,4/4,92	75,3/3,83	61,8/3,82
<b>G4S</b>	<b>LM</b>	x	x	77,7/3,86	x	76,3/3,77	x
<b>DA</b>	<b>Kappa (κ)</b>	94,7/5,15	69,7/4,19	79,2/4,58	78,4/4,65	76,7/4,7	69,7/4,10;4,19
<b>DA</b>	<b>LM</b>	94,16/4,95	67,4/4,06	x	78,64/4,4	76,5/4,53	68,9/3,90;4,07

G4S: *D*-galactose-4-sulfato; G2S: *D*-galactose-2-sulfato; DA: 3,6-anidrogalaactose; DA2S: 3,6-anidrogalaactose-2-sulfato.  
 Fonte: RODRÍGUEZ SANCHEZ; MATULEWICZ; CIANCIA (2022); Próprio autor.

Conforme mostra tanto os dados obtidos por HSQC, na Figura 17.A e na Tabela 5, como os dados obtidos pelo FTIR, Figura 15, a identidade da amostra KM foi confirmada como sendo carragena do tipo kappa, indicando que a sua estrutura química é composta majoritariamente pelas unidades de dissacarídeos G4S e DA.

A análise dos espectros de HSQC de LM, Figura 17.B e Tabela 6, mostrou a presença de diversas unidades de dissacarídeos distintas. Primeiramente, unidades de G2S e DA2S foram confirmadas praticamente por todas as ressonâncias de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , indicando a presença da carragena do tipo theta, informação que não foi fornecida apenas com os resultados de FTIR. A carragena theta faz parte da família das carragenas lambda, na qual a unidade B da *D*-galactose-2,6-dissulfato (D2S,6S) sofre ciclização, perdendo um grupo sulfato e formando a unidade 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S).

Além das unidades de dissacarídeos da carragena theta, também foram obtidos deslocamentos típicos das unidades das carragenas da família kappa: unidades de G4S, presente nas carragenas do tipo kappa, iota e mu; e de DA, encontrado em carragenas do tipo kappa, dados que corroboram com os obtidos através da análise por FTIR.

Utilizando as técnicas de FTIR e HSQC para analisar as estruturas químicas que compõem as amostras KM e LM, foi possível identificar que KM é composta majoritariamente por unidades de G4S e DA, típicas da carragena kappa; e que LM é composta por uma mistura de estruturas, formada principalmente por unidades de G2S e DA2S, típicas da carragena theta, e por G4S e DA, típicas da carragena kappa. Importante ressaltar que LnM, que foi modificada e resultou em LM, foi obtida da Sigma, identificada como sendo carragena do tipo lambda; mas nossas análises mostraram que a amostra provavelmente trata-se de uma mistura.

## 5.5. Efeito estrutura-dependente das carragenas

Os efeitos biológicos das carragenas dependem do peso e estrutura molecular, e da linhagem celular estudada (CICINSKAS *et al.*, 2020a). No entanto, a relação entre a estrutura química e a atividade biológica das carragenas ainda não é bem entendida (MATSUBARA *et al.*, 2005), embora algumas publicações já tenham começado a apontar essas conexões.

De uma maneira geral, carragenas com menor peso molecular apresentam maior efeito anticâncer em culturas de células quando comparadas com estruturas de maior peso molecular. Em ensaio realizado com duas frações de menor peso molecular de carragenas modificadas em ácido, e que apresentaram diferenças na análise por RMN, foi reportado

diminuição da viabilidade de HCT-116, e que, inclusive, as frações agiram por mecanismos distintos: uma por aumento da apoptose, e a outra por parada do ciclo celular na fase G1 (RAMAN; DOBLE, 2014, 2015). Além disso, carragenas kappa e lambda também modificadas em ácido resultaram em moléculas com baixo peso molecular e maior efeito antimetabólico em células de câncer (CICINSKAS et al., 2020a).

No entanto, na contramão do que comumente é reportado, Silchenko et al. (2018) observou que fucoidano com menor peso molecular teve menor efeito anticâncer em cultura de células do que com maior peso molecular, concluindo que poderia ter ocorrido diminuição dos locais ativos e dos potenciais alvos moleculares para interagir com as células.

Um grau de sulfatação maior também é fortemente conectado com maior atividade anticâncer de polissacarídeos sulfatados em ensaios *in vitro* e *in vivo* (COTAS et al., 2020; YUAN et al., 2010; ZHURISHKINA et al., 2017). A maior sulfatação das moléculas resulta em aumento das cargas negativas, o que poderia facilitar a interação e a formação de complexos entre os polissacarídeos sulfatados e as proteínas envolvidas na proliferação celular, resultando em supressão de crescimento (CHO; LEE; YOU, 2010). Estudos já demonstraram maior citotoxicidade de carragenas lambda em comparação com kappa e iota em diferentes linhagens de células cancerígenas (GHANNAM et al., 2018; PRASEDYA et al., 2016), o que poderia estar conectado também ao maior grau de sulfatação da carragena lambda.

A posição do grupo sulfato também é importante e pode interferir de maneiras diversas nas atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados (LI et al., 2008). Maior atividade anticâncer foi demonstrada em fucoidanos com grupos sulfato localizados tanto na posição axial (no carbono 4 da fucose) quanto axial e equatorial (carbono 2 da fucose), além de citotoxicidade seletiva para células de câncer por fucoidano com grupo sulfato na posição equatorial (CHO; LEE; YOU, 2010; OLIVEIRA et al., 2017; ZHURISHKINA et al., 2017).

As carragenas KM e LM apresentaram diminuição de peso molecular de >670 kDa para 27 e 41 kDa, respectivamente, e embora o peso molecular esteja abaixo do grau comercial (100 kDa), não chegou a gerar carragenas de baixo peso molecular (10-20 kDa), que geralmente estão associadas a efeitos inflamatórios e indutores de tumor em ensaios *in vivo* (DELAHUNTY; RECHER; HOLLANDER, 1987). Como os reportados por Ariffin et al. (2014), que modificaram carragenas em ácido por 4h, tempo superior aos 30 minutos da modificação realizada por nós, e que provavelmente resultou em carragenas com menor peso molecular do que de KM e LM, baseado no maior tempo de hidrólise ácida.



A modificação química realizada em KnM e LnM, além de diminuir o peso molecular de KM e LM, aumentou a exposição dos grupos sulfato em KM. Um menor peso molecular foi associado ao aumento do efeito biológico dessas moléculas, refletido em maior diminuição da viabilidade celular de HCT-116, de forma distinta de KnM e LnM, e efeitos na proliferação celular e síntese de p21.

Como fica evidente, as características que conferem maior ou menor atividade anticâncer aos polissacarídeos sulfatados variam de acordo com as características estruturais do polissacarídeo. Além disso, a citotoxicidade é determinada por uma combinação de fatores (ZHURISHKINA *et al.*, 2017) e não apenas por características isoladas. Existe uma grande variedade de fontes de polissacarídeos, assim como métodos de extração e purificação, o que influencia as suas propriedades físico-químicas, e conseqüentemente na sua atividade biológica (LI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

## 6. CONCLUSÃO

A modificação ácida diminuiu eficientemente o peso molecular das carragenas KmM, LnM e inM, e também do fucoidano FnM, porém em uma taxa menor. O efeito das amostras não modificadas e modificadas na viabilidade celular de linhagens de câncer de cólon foi amostra-dependente e célula-dependente. Tanto o fucoidano não modificado como o modificado praticamente não tiveram efeito na viabilidade celular das células estudadas. As células HCT-116 tiveram diminuição de viabilidade celular frente ao tratamento com as carragenas modificadas, mas não com as carragenas não modificadas. Além disso, os efeitos dos tratamentos foram tempo-dependente, apresentando efeito após 48h de tratamento, agindo de forma dose-dependente.

Embora iM tenha diminuído a viabilidade celular de HCT-116, nenhum efeito foi observado na proliferação celular. Já KM e LM diminuíram de forma significativa a proliferação celular de HCT-116, provavelmente agindo por mecanismos distintos, uma vez que foi detectado efeito no ciclo celular, com aumento de sub-G1 apenas no tratamento com LM. Ambas as amostras não tiveram efeito na apoptose e necrose, nem na síntese das caspases 3 e 9, mas refletiram em aumento de p21 de uma maneira independente de p53.

A partir das análises de FTIR e HSQC, foram identificadas as unidades de G4S e DA em KM, confirmando a sua identidade como carragana kappa, e estrutura híbrida composta por G2S, DA2S,6S, G4S e DA em LM, indicando a sua identidade como uma mistura de carragenas theta e kappa, além da confirmação da presença de grupos sulfato em ambas as amostras.

Desse modo, o tratamento com as carragenas modificadas kappa e lambda resultou em diminuição da viabilidade e proliferação celular das células de HCT-116 associado ao aumento de p21 independente de p53, e aumento de sub-G1 apenas no tratamento com LM, e por meio de mecanismos que precisam ser mais explorados. Os resultados sugerem que a diminuição do peso molecular, e uma maior exposição dos grupos sulfato de KM, provenientes da modificação ácida, aumentou a ação anticâncer das carragenas em cultura de células de câncer de cólon HCT-116, ficando claro o efeito estrutura-dependente e que a ação biológica de polissacarídeos sulfatados está intimamente relacionada à sua estrutura química.

Tais resultados são promissores, e certamente mais experimentos precisam ser realizados para investigar os mecanismos de ação das carragenas modificadas quimicamente, kappa e lambda, frente às células de câncer de cólon. Demonstramos aqui o potencial de polissacarídeos sulfatados, que são comumente usados como suplementos ou aditivos

alimentares, contra o câncer de cólon em ensaio *in vitro*. Esses achados encorajam a continuação da investigação da ação desses polissacarídeos em outros modelos de câncer de cólon, pensando na possibilidade futura de seu uso em conjunto com outras alternativas terapêuticas contra o câncer.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, jun. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrc2657>>.
- AGA, M. B.; DAR, A. H.; NAYIK, G. A.; PANESAR, P. S.; ALLAI, F.; KHAN, S. A.; SHAMS, R.; KENNEDY, J. F.; ALTAF, A. Recent insights into carrageenan-based bio-nanocomposite polymers in food applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 197–209, dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.212>>.
- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1397–1421, maio 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.009>>.
- AGGARWAL, B.; PRASAD, S.; SUNG, B.; KRISHNAN, S.; GUHA, S. Prevention and treatment of colorectal cancer by natural agents from mother nature. **Current Colorectal Cancer Reports**, v. 9, n. 1, p. 37–56, mar. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11888-012-0154-1>>.
- AIELLO, P.; SHARGHI, M.; MANSOURKHANI, S. M.; ARDEKAN, A. P.; JOUYBARI, L.; DARAEI, N.; PEIRO, K.; MOHAMADIAN, S.; REZAEI, M.; HEIDARI, M.; PELUSO, I.; GHORAT, F.; BISHAYEE, A.; KOOTI, W. Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Colon Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2019/2075614>>.
- ARAÚJO, G. M.; CODOGNOTO, L.; SIMÕES, F. R. Self-assembled electrodes based on polyaniline grafted with reduced graphene oxide and polystyrene sulfonate. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1857–1866, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10008-020-04517-1>>.
- ARIFFIN, S. H.Z.; YEEN, W. W.; ABIDIN, I. Z.Z.; WAHAB, R.M.A.; ARIFFIN, Z.Z.; SENAFI, S. Cytotoxicity effect of degraded and undegraded kappa and iota carrageenan in human intestine and liver cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 508, dez. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-508>>.
- ARMAN, M.; QADER, S. A. U. Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1264–1271, maio 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.003>>.
- ASP, N. G. Classification and methodology of food carbohydrates as related to nutritional effects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 930S-937S, abr. 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ajcn/61.4.930s>>.
- ATASHRAZM, F.; LOWENTHAL, R. M.; DICKINSON, J. L.; HOLLOWAY, A. F.; WOODS, G. M. Fucoidan enhances the therapeutic potential of arsenic trioxide and all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia, in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 46028–46041, jul. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10016>>.

BAI, X.; ZHANG, E.; HU, B.; LIANG, H.; SONG, S.; JI, A. Study on Absorption Mechanism and Tissue Distribution of Fucoidan. **Molecules**, v. 25, n. 5, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25051087>>.

BARBER, T. M.; KABISCH, S.; PFEIFFER, A. F. H.; WEICKERT, M. O. The Health Benefits of Dietary Fibre. **Nutrients**, v. 12, n. 10, out. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7589116/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3481116/)>.

BAXTER, N. T.; ZACKULAR, J. P.; CHEN, G. Y.; SCHLOSS, P. D. Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden. **Microbiome**, v. 2, n. 20, jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-20>>.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carbohydrates. *Em*: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (Eds.) **Fennema's Food Chemistry**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. p. 169.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**, v. 101, n. 2-3, p. 157–170, ago-set. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>>.

BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 518–528, ago. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrm3629>>.

BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 8, p. 719–730, abr. 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(02\)00053-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00053-8)>.

BOO, H.-J.; HYUN, J.-H.; KIM, S.-C.; KANG, J.-I.; KIM, M.-K.; KIM, S.-Y.; CHO, H.; YOO, E.-S.; KANG, H.-K. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 7, p. 1082–1086, jul. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ptr.3489>>.

BORGES-CANHA, M.; PEDRO PORTELA-CIDADE, J.; DINIS-RIBEIRO, M.; LEITE-MOREIRA, A. F.; PIMENTEL-NUNES, P. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: A systematic review. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 107, n. 11, p. 659–671, nov. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.17235/reed.2015.3830/2015>>.

BOTHWELL, J. H. F.; GRIFFIN, J. L. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 493–510, maio 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2010.00157.x>>.

BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9927, p. 1490–1502, abr. 2014. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61649-9)>.

CAPPELL, M. S. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 37, n. 1, p. 1–24, mar. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>>.

CARETHERS, J. M.; JUNG, B. H. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1177- 1190, out. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.047>>.

CARVALHO, A. T. de; RIBEIRO, G. A.; NOGUEIRA, R. F. **Citometria de fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias**, São Paulo. Instituto Oswaldo Cruz, 2010. Disponível em: <[https://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD\\_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFCurso\\_Ferias2010.pdf](https://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFCurso_Ferias2010.pdf)>.

CASCIOLA-ROSEN, L.; ROSEN, A.; PETRI, M.; SCHLISSEL, M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 4, p. 1624-1629, fev. 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1624>>.

CHANG, B. D.; WATANABE, K.; BROUDE, E. V.; FANG, J.; POOLE, J. C.; KALINICHENKO, T. V.; RONINSON, I. B. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: Implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 4291-4296, abr. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4291>>.

CHANG, B. D.; XUAN, Y.; BROUDE, E. V.; ZHU, H.; SCHOTT, B.; FANG, J.; RONINSON, I. B. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. **Oncogene**, v. 18, n. 34, p. 4808–4818, ago. 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203078>>.

CHAU, I.; CUNNINGHAM, D. Adjuvant therapy in colon cancer - What, when and how? **Annals of Oncology**, v. 17, n. 9, p. 1347–1359, set. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/annonc/mdl029>>.

CHEUNG, F. W. K.; CHE, C. T.; SAKAGAMI, H.; KOCHI, M.; LIU, W. K. Sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate induces oxidative stress, autophagy, and growth arrest in human colon cancer HT-29 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 2, p. 412–424, out. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcb.22717>>.

CHO, M.; CARTER, J.; HARARI, S.; PEI, Z. The Interrelationships of the Gut Microbiome and Inflammation in Colorectal Carcinogenesis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 34, n. 4, p. 699–710, dez. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.08.002>>.

CHO, M. L.; LEE, B.-Y.; YOU, S. G. Relationship between Oversulfation and Conformation of Low and High Molecular Weight Fucoidans and Evaluation of Their in Vitro Anticancer Activity. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 291–297, dez. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules16010291>>.

CHUNG, H.-J.; JEUN, J.; HOUNG, S.-J.; JUN, H.-J.; KWEON, D.-K.; LEE, S.-J. Toxicological evaluation of fucoidan from *Undaria pinnatifida* in vitro and in vivo.

**Phytotherapy Research**, v. 24, n. 7, p. 1078–1083, jul. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ptr.3138>>.

CICINSKAS, E.; BEGUN, M. A.; TIASTO, V. A.; BELOUSOV, A. S.; VIKHAREVA, V. V.; MIKHAILOVA, V. A.; KALITNIK, A. A. In vitro antitumor and immunotropic activity of carrageenans from red algae *Chondrus armatus* and their low-molecular weight degradation products. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 108, n. 2, p. 254–266, fev. 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36812>>.

CICINSKAS, E.; KALITNIK, A. A.; KARETIN, Y. A.; MOHAN RAM, M. S. G.; ACHARY, A.; KRAVCHENKO, A. O. Immunomodulating Properties of Carrageenan from *Tichocarpus crinitus*. **Inflammation**, v. 43, n. 4, p. 1387–1396, ago. 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10753-020-01216-x>>.

COTAS, J.; MARQUES, V.; AFONSO, M. B.; RODRIGUES, C. M. P.; PEREIRA, L. Antitumour potential of *gigartina pistillata* carrageenans against colorectal cancer stem cell-enriched tumourspheres. **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md18010050>>.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>>.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cbin.11137>>.

DASHTI, S. G.; BUCHANAN, D. D.; JAYASEKARA, H.; OUAKRIM, D. A.; CLENDENNING, M.; ROSTY, C.; WINSHIP, I. M.; MACRAE, F. A.; GILES, G. G.; PARRY, S.; CASEY, G.; HAILE, R. W.; GALLINGER, S.; LE MARCHAND, L.; THIBODEAU, S. N.; LINDOR, N. M.; NEWCOMB, P. A.; POTTER, J. D.; BARON, J. A.; HOPPER, J. L.; JENKINS, M. A.; WIN, A. K. Alcohol consumption and the risk of colorectal cancer for mismatch repair gene mutation carriers. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 26, n. 3, p. 366–375, mar. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-16-0496>>.

DATTO, M. B.; LI, Y.; PANUS, J. F.; HOWE, D. J.; XIONG, Y.; WANG, X.-F. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 92, n. 12, p. 5545–5549, jun. 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5545>>.

DAVIES, N. J.; BATEHUP, L.; THOMAS, R. The role of diet and physical activity in breast, colorectal, and prostate cancer survivorship: A review of the literature. **British Journal of Cancer**, v. 105, p. S52–S73, nov. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.423>>.

DE JESUS RAPOSO, M. F. J.; DE MORAIS, A. M. B.; DE MORAIS, R. M. S. C. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2967-3028, maio 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md13052967>>.

DELAHUNTY, T.; RECHER, L.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability changes in rodents: A possible mechanism for degraded carrageenan-induced colitis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 113–118, fev. 1987. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(87\)90143-8](https://doi.org/10.1016/0278-6915(87)90143-8)>.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T. A.; MICHAUD, P. Galactans: An overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Agriculture, Agribusiness and Biotechnology**, v. 54, n. 6, dez. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600002>>.

EISENBERG-LERNER, A.; KIMCHI, A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 376–391, abr. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10495-008-0307-5>>.

EMRAN, T. Bin; ISLAM, F.; MITRA, S.; PAUL, S.; NATH, N.; KHAN, Z.; DAS, R.; CHANDRAN, D.; SHARMA, R.; LIMA, C. M. G.; AWADH, A. A. Al; ALMAZNI, I. A.; ALHASANIAH, A. H.; GUINÉ, R. P. F. Pectin: A Bioactive Food Polysaccharide with Cancer Preventive Potential. **Molecules**, v. 27, n. 21, out. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules27217405>>.

EROL, A. Deciphering the intricate regulatory mechanisms for the cellular choice between cell repair, apoptosis or senescence in response to damaging signals. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 7, p. 1076–1081, jul. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.11.023>>.

ESMEETA, A.; ADHIKARY, S.; DHARSHNAA, V.; SWARNAMUGHI, P.; UMMUL MAQSUMMIYA, Z.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; DUTTARROY, A. K. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113384, set. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113384>>.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342–348, maio 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/35077213>>.

FAHOUM, L.; MOSCOVICI, A.; DAVID, S.; SHAOUL, R.; ROZEN, G.; MEYRON-HOLTZ, E. G.; LESMES, U. Digestive fate of dietary carrageenan: Evidence of interference with digestive proteolysis and disruption of gut epithelial function. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 3, mar. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600545>>.

FEMINA, T. A.; BARGHAVI, V.; ARCHANA, K.; SWETHAA, N. G.; MADDALY, R. Non-uniformity in in vitro drug-induced cytotoxicity as evidenced by differences in IC50 values – implications and way forward. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 119, p. 107238, jan. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2022.107238>>.



FIDELLE, M.; YONEKURA, S.; PICARD, M.; COGDILL, A.; HOLLEBECQUE, A.; ROBERTI, M. P.; ZITVOGEL, L. Resolving the Paradox of Colon Cancer Through the Integration of Genetics, Immunology, and the Microbiota. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 600886, dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600886>>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. A guide to the seaweed industry (D. J. McHugh, Ed.) **Production and utilization of products from commercial seaweeds**. Rome: FAO Fish. Tech. Pap, 2003. Disponível em: <[http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e05.htm#chapter 3 production, properties and uses of carrageenan](http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e05.htm#chapter%203%20production,%20properties%20and%20uses%20of%20carrageenan)>.

GALVAO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E.; DUCHEN, M. R.; CORDEIRO, M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 28, n. 3, p. 1317–1330, mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>>.

GANESAN, R.; PRABHAKARAN, V.-S.; GOPALAKRISHNAN, A. V. Metabolomic Signatures in Doxorubicin-Induced Metabolites Characterization, Metabolic Inhibition, and Signaling Pathway Mechanisms in Colon Cancer HCT116 Cells. **Metabolites**, v. 12, n. 11, out. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/metabo12111047>>.

GHANNAM, A.; MURAD, H.; JAZZARA, M.; ODEH, A.; ALLAF, A. W. Isolation, Structural characterization, and antiproliferative activity of phycocolloids from the red seaweed *Laurencia papillosa* on MCF-7 human breast cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 916–926, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.001>>.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, nov. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms222312827>>.

GIANNOPOULOU, E.; ANTONACOPOULOU, A.; MATSOUKA, P.; KALOFONOS, H. P. Autophagy: Novel Action of Panitumumab in Colon Cancer. **Anticancer Research**, v. 29, n. 12, p. 5077–5082, dez. 2009.

GLICKSMAN, M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia**, v. 151, p. 31–47, 1987.

GREEN, D. R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. **Cell**, v. 121, n. 5, p. 671–674, jun. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.019>>.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1514–1520, ago. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>>.

GUAN, Z.-W.; YU, E.-Z.; FENG, Q. Soluble Dietary Fiber, One of the Most Important Nutrients for the Gut Microbiota. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6802, nov. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules26226802>>.

GUO, J.; ZHU, S.; LV, P.; HUANG, X.; PANG, J. Physicochemical dynamic changes and differences of  $\kappa$ -carrageenan in different vehicles (aqueous and casein solution) during in vitro gastrointestinal digestion. **Food Hydrocolloids**, v. 129, p. 107553, ago. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107553>>.

HA, H. T.; CUONG, D. X.; THUY, L. H.; THUAN, P. T.; TUYEN, D. T. T.; MO, V. T.; DONG, D. H. Carrageenan of Red Algae *Eucheuma gelatinae*: Extraction, Antioxidant Activity, Rheology Characteristics, and Physicochemistry Characterization. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1268, fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules27041268>>.

HAN, M.; SUN, P.; LI, Y.; WU, G.; NIE, J. Structural characterization of a polysaccharide from *Sargassum henslowianum*, and its immunomodulatory effect on gastric cancer rat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1120–1127, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.109>>.

HAN, Y. S.; LEE, J. H.; LEE, S. H. Antitumor Effects of Fucoidan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 225–232, maio. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.136>>.

HAN, Y. S.; LEE, J. H.; LEE, S. H. Fucoidan inhibits the migration and proliferation of HT-29 human colon cancer cells via the phosphoinositide-3 kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 3, p. 3446–3452, set. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3804>>.

HAN, Z.; WEI, W.; DUNAWAY, S.; DARNOWSKI, J. W.; CALABRESI, P.; SEDIVY, J.; HENDRICKSON, E. A.; BALAN, K. V.; PANTAZIS, P.; WYCHE, J. H. Role of p21 in Apoptosis and Senescence of Human Colon Cancer Cells Treated with Camptothecin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 17154–17160, maio 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.m112401200>>.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.

HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. Hallmarks of Cellular Senescence. **Trends Cell Biology**, v. 28, n. 6, p. 436–453, jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>>.

HORNG, C. T.; WU, Y. J.; CHEN, P. N.; CHU, S. C.; TSAI, C. M.; HSIEH, Y. S. Koelreuteria Formosana Extract Induces Growth Inhibition and Cell Death in Human Colon Carcinoma Cells via G2/M Arrest and LC3-II Activation-Dependent Autophagy. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 1, p. 44–55, jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1247889>>.

IKEGUCHI, M.; SAITO, H.; MIKI, Y.; KIMURA, T. Effect of fucoidan dietary supplement on the chemotherapy treatment of patients with unresectable advanced gastric cancer. **Journal of Cancer Therapy**, v. 6, n. 11, 2015. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=60808&#abstract>>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. 2022a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas On-Line de Mortalidade**. 2022b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml?jsessionid=16F3B7F3A9BA02AEBA48C241732C6669#panelResultado>>. Acesso em: 23 abr. 2023.

ISLAM, M. R.; AKASH, S.; RAHMAN, M. M.; NOWRIN, F. T.; AKTER, T.; SHOHAG, S.; RAUF, A.; ALJOHANI, A. S. M.; SIMAL-GANDARA, J. Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. **Chemico-Biological Interactions**, v. 368, p. 110170, dez. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110170>>.

JAZZARA, M.; GHANNAM, A.; SOUKKARIEH, C.; MURAD, H. Anti-proliferative activity of  $\lambda$ -carrageenan through the induction of apoptosis in human breast cancer cells. **International Journal of Cancer Management**, v. 9, n. 4, p. 3836, jun. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.17795/ijcp-3836>>.

JI, X.; PENG, Q.; WANG, M. Anti-colon-cancer effects of polysaccharides: A mini-review of the mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1127–1133, jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.186>>.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–223, fev. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md9020196>>.

JUNG, Y. S.; QIAN, Y.; CHEN, X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 7, p. 1003–1012, jul. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013>>.

KALUZKI, I.; HAILEMARIAM-JAHN, T.; DOLL, M.; KAUFMANN, R.; BALERMPAS, P.; ZÖLLER, N.; KIPPENBERGER, S.; MEISSNER, M. Dimethylfumarate Inhibits Colorectal Carcinoma Cell Proliferation: Evidence for Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1329, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells8111329>>.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, nov. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature03097>>.

KHOTIMCHENKO, M.; TIASTO, V.; KALITNIK, A.; BEGUN, M.; KHOTIMCHENKO, R.; LEONTEVA, E.; BRYUKHOVETSKIY, I.; KHOTIMCHENKO, Y. Antitumor potential of carrageenans from marine red algae Carbohydrate Polymers. **Carbohydrate Polymers**, v.

246, p. 116568, 15 out. 2020. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116568>>.

KHOTIMCHENKO, Y. S. Antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Fucoidans and chitosans. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 36, p. 321–330, nov. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1063074010050019>>.

KIM, E. J.; PARK, S. Y.; LEE, J.-Y.; PARK, J. H. Y. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. **BMC Gastroenterology**, v. 10, n. 96, ago. 2010a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-230x-10-96>>.

KIM, I. H.; KWON, M. J.; NAM, T. J. Differences in cell death and cell cycle following fucoidan treatment in high-density HT-29 colon cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 6, p. 4116–4122, jun. 2017. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6520>>.

KIM, K. J.; LEE, O. H.; LEE, H. H.; LEE, B. Y. A 4-week repeated oral dose toxicity study of fucoidan from the Sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 267, n. 1–3, p. 154–158, jan. 2010. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.11.007>>.

KINZLER, K. W.; NILBERT, M. C.; SU, L. K.; VOGELSTEIN, B.; BRYAN, T. M.; LEVY, D. B.; SMITH, K. J.; PREISINGER, A. C.; HEDGE, P.; MCKECHNIE, D.; FINNIEAR, R.; MARKHAM, A.; GROFFEN, J.; BOGUSKI, M. S.; ALTSCHUL, S. F.; HORII, A.; ANDO, H.; MIYOSHI, Y.; MIKI, Y.; NISHISHO, I.; NAKAMURA, Y. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. **Science**, v. 253, n. 5020, p. 661–665, ago. 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1651562>>.

KITADA, K.; PU, F.; TOI, M. Occurrence of senescence-escaping cells in doxorubicin-induced senescence is enhanced by PD0332991, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in colon cancer HCT116 cells. **Oncology Letters**, v. 17, n. 1, p. 1153–1159, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/ol.2018.9657>>.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. *Em*: BARNES, M. **Oceanography and Marine Biology, An Annual Review**. [s.l.] Aberdeen University Press, p. 259–315, 1988.

KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 645593, mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>>.

KWAK, E. L.; CHUNG, D. C. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: An Overview. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 6, n. 5, p. 340–344, jan. 2007. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.3816/cc.2007.n.002>>.

LABIANCA, R.; BERETTA, G. D.; KILDANI, B.; MILESI, L.; MERLIN, F.; MOSCONI, S.; PESSI, M. A.; PROCHILLO, T.; QUADRI, A.; GATTA, G.; DE BRAUD, F.; WILS, J. Colon cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 74, n. 2, p. 106–133, maio. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010>>.

LEE, J.; PARK, J. R.; LEE, H.; JANG, S.; RYU, S. M.; KIM, H.; KIM, D.; JANG, A.; YANG, S. R. l-carnosine induces apoptosis/cell cycle arrest via suppression of NF- $\kappa$ B/STAT1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 54, n. 7, p. 505–512, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11626-018-0264-4>>.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, jan. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>>.

LI, B.; LU, F.; WEI, X.; ZHAO, R. Fucoïdan: Structure and bioactivity. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1671–1695, ago. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules13081671>>.

LI, B.; LYU, P.; XI, X.; GE, L.; MAHADEVAPPA, R.; SHAW, C.; KWOK, H. F. Triggering of cancer cell cycle arrest by a novel scorpion venom-derived peptide—Gonearrestide. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 9, p. 4460-473, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jcmm.13745>>.

LI, L.; NI, R.; SHAO, Y.; MAO, S. Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 1–11, mar. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.008>>.

LI, M.; SHANG, Q.; LI, G.; WANG, X.; YU, G. Degradation of marine algae-derived carbohydrates by bacteroidetes isolated from human gut microbiota. **Marine Drugs**, v. 15, n. 4, p. 92, mar. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md15040092>>.

LI, N.; ZHANG, Q.; SONG, J. Toxicological evaluation of fucoïdan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 421–426, mar. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.001>>.

LI, Y.; QIN, G.; CHENG, C.; YUAN, B.; HUANG, D.; CHENG, S.; CAO, C.; CHEN, G. Purification, characterization and anti-tumor activities of polysaccharides from *Ecklonia kurome* obtained by three different extraction methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1000–1010, maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.216>>.

LI, X.; XIN, S.; ZHENG, X.; LOU, L.; YE, S.; LI, S.; WU, Q.; DING, Q.; JI, L.; NAN, C.; LOU, Y. Inhibition of the Occurrence and Development of Inflammation-Related Colorectal Cancer by Fucoïdan Extracted from *Sargassum fusiforme*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 30, p. 9463-9476, ago. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02357>>.

LICHTENSTEIN, P.; HOLM, N. V.; VERKASALO, P. K.; ILIADOU, A.; KPRIIO, J.; KOSKENVUO, M.; PUKKALA, E.; SKYTTHE, A.; HEMMINKI, K.; EMMINKI, H. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. **The New England Journal of Medicina**, v. 343, n. 2, p. 78–85, jul. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/nejm200007133430201>>.

- LIN, Y.; QI, X.; LIU, H.; XUE, K.; XU, S.; TIAN, Z. The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both *in vivo* and *in vitro* investigations. **Cancer Cell International**, v. 20, p. 154, maio. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8>>.
- LIU, Z.; GAO, T.; YANG, Y.; MENG, F.; ZHAN, F.; JIANG, Q.; SUN, X. Anti-Cancer Activity of Porphyrin and Carrageenan from Red Seaweeds. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4286, nov. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules24234286>>.
- LOS, M.; MOZOLUK, M.; FERRARI, D.; STEP CZYNSKA, A.; STROH, C.; RENZ, A.; HERCEG, Z.; WANG, Z. Q.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 3, p. 978-988, mar. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1091/mbc.01-05-0272>>.
- LOVEGROVE, A.; EDWARDS, C. H.; DE NONI, I.; PATEL, H.; EL, S. N.; GRASSBY, T.; ZIELKE, C.; ULMIUS, M.; NILSSON, L.; BUTTERWORTH, P. J.; ELLIS, P. R.; SHEWRY, P. R. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 237–253, jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939263>>.
- LUO, M.; SHAO, B.; NIE, W.; WEI, X. W.; LI, Y. L.; WANG, B. L.; HE, Z. Y.; LIANG, X.; YE, T. H.; WEI, Y. Q. Antitumor and Adjuvant Activity of  $\lambda$ -carrageenan by Stimulating Immune Response in Cancer Immunotherapy. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11062, jun. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep11062>>.
- MANN DO, S.; SIDHU DO, M.; GOWIN DO, K. Understanding the Mechanisms of Diet and Outcomes in Colon, Prostate, and Breast Cancer; Malignant Gliomas; and Cancer Patients on Immunotherapy. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2226, jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu12082226>>.
- MANSOOR, S.; DOLKAR, T.; EL-FANEK, H. Polyps and polypoid lesions of the colon. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 21, n. 3, p. 215–223, jun. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1066896913481060>>.
- MATHEW, A.; PETERS, U.; CHATTERJEE, N.; KULLDORFF, M.; SINHA, R. Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 2, p. 287–292, jan. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ijc.10984>>.
- MATSUBARA, K.; XUE, C.; ZHAO, X.; MORI, M.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T. Effects of middle molecular weight fucoidans on *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis of endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 15, n. 4, p. 695-699, 2005. Disponível em: <<https://spandidos-publications.com/ijmm/15/4/695>>.
- MCKIM, J. M.; WILLOUGHBY, J. A.; BLAKEMORE, W. R.; WEINER, M. L. Clarifying the confusion between poligeenan, degraded carrageenan, and carrageenan: A review of the chemistry, nomenclature, and *in vivo* toxicology by the oral route. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 19, p. 3054–3073, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1481822>>.

MCKIM JR, J. M.; BAAS, H.; RICE, G. P.; WILLOUGHBY, J. A.; WEINER, M. L.; BLAKEMORE, W. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 96, p. 1–10, out. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.006>>.

MENSAH, E. O.; KANWUGU, O. N.; PANDA, P. K.; ADADI, P. Marine fucoidans: Structural, extraction, biological activities and their applications in the food industry. **Food Hydrocolloids**, v. 142, p. 108784, set. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108784>>.

MESEEHA, M.; ATTIA, M. Colon Polyps. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, fev. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430761/>>.

MI, Y.; CHIN, Y. X.; CAO, W. X.; CHANG, Y. G.; LIM, P. E.; XUE, C. H.; TANG, Q. J. Native  $\kappa$ -carrageenan induced-colitis is related to host intestinal microecology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 147, p. 284–294, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.072>>.

MIZUNO, H.; NAKANISHI, Y.; ISHII, N.; SARAI, A.; KITADA, K. A signature-based method for indexing cell cycle phase distribution from microarray profiles. **BMC Genomics**, v. 10, p. 137, mar. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-137>>.

MLYNÁRIK, V. Introduction to nuclear magnetic resonance. **Analytical Biochemistry**, v. 529, p. 4–9, jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.006>>.

MONLA, R. A.; DASSOUKI, Z.; SARI-CHMAYSEM, N.; MAWLAWI, H.; GALI-MUHTASIB, H. Fucoidan and Alginate from the Brown Algae *Colpomenia sinuosa* and Their Combination with Vitamin C Trigger Apoptosis in Colon Cancer. **Molecules**, v. 27, n. 2, jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules27020358>>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)>.

MOSIENIAK, G.; ADAMOWICZ, M.; ALSTER, O.; JASKOWIAK, H.; SZCZEPANKIEWICZ, A. A.; WILCZYNSKI, G. M.; CIECHOMSKA, I. A.; SIKORA, E. Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: Link between senescence and autophagy. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 133, n. 6, p. 444–455, jun. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.05.004>>.

MUNDADE, R.; IMPERIALE, T. F.; PRABHU, L.; LOEHRER, P. J.; LU, T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. **Oncoscience**, v. 1, n. 6, p. 400–406, jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.18632/oncoscience.59>>.

MURAD, H.; GHANNAM, A.; AL-KTAIFANI, M.; ABBAS, A.; HAWAT, M. Algal sulfated carrageenan inhibits proliferation of MDA-MB-231 cells via apoptosis regulatory genes. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 2153–2158, mar. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2915>>.

MYERS, S. P.; O'CONNOR, J.; FITTON, J. H.; BROOKS, L.; ROLFE, M.; CONNELLAN, P.; WOHLMUTH, H.; CHERAS, P. A.; MORRIS, C. A combined phase I and II open-label study on the immunomodulatory effects of seaweed extract nutrient complex. **Biologics: Targets & Therapy**, v. 5, p. 45–60, 2011. Disponível em:

<<https://doi.org/10.2147/btt.s12535>>.

NAGAMINE, T.; NAKAZATO, K.; TOMIOKA, S.; IHA, M.; NAKAJIMA, K. Intestinal absorption of fucoidan extracted from the brown seaweed, *Cladosiphon okamuranus*. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 48–64, dez. 2014. Disponível em:

<<https://doi.org/10.3390/md13010048>>.

NAGAPPAN, A.; LEE, W. S.; YUN, J. W.; LU, J. N.; CHANG, S. H.; JEONG, J. H.; KIM, G. S.; JUNG, J. M.; HONG, S. C. Tetraarsenic hexoxide induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt suppression and p38 MAPK activation in SW620 human colon cancer cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, mar. 2017. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174591>>.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 489–517, 26 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>>.

NAZERI, M.; MIRZAIE-ASL, A.; SAIDIJAM, M.; MORADI, M. Methanolic extract of *Artemisia absinthium* prompts apoptosis, enhancing expression of Bax/Bcl-2 ratio, cell cycle arrest, caspase-3 activation and mitochondrial membrane potential destruction in human colorectal cancer HCT-116 cells. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 11, p. 8831–8840, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05933-2>>.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.17221/6758-VETMED>>.

NGO, D.-H.; KIM, S.-K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 70–75, nov. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.036>>.

NGUYEN, L. H.; GOEL, A.; CHUNG, D. C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 158, n. 2, p. 291–302, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>>.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, dez. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>>.

OGINO, S.; CHAN, A. T.; FUCHS, C. S.; GIOVANNUCCI, E. Molecular Pathologic Epidemiology of Colorectal Neoplasia: An Emerging Transdisciplinary and Interdisciplinary Field. **Gut**, v. 60, n. 3, p. 397–411, mar. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/gut.2010.217182>>.

OGINO, S.; LOCHHEAD, P.; CHAN, A. T.; NISHIHARA, R.; CHO, E.; WOLPIN, B. M.; MEYERHARDT, J. A.; MEISSNER, A.; SCHERNHAMMER, E. S.; FUCHS, C. S.; GIOVANNUCCI, E. Molecular pathological epidemiology of epigenetics: emerging



integrative science to analyze environment, host, and disease. **Modern Pathology**, v. 26, n. 4, p. 465–484, abr. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.214>>.

OKOLIŠAN, D.; VLASE, G.; VLASE, T.; AVRAM, C. Preliminary Study of  $\kappa$ -Carrageenan Based Membranes for Anti-Inflammatory Drug Delivery. **Polymers**, v. 14, n. 20, p. 4275, out. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/polym14204275>>.

OLIVEIRA, C.; FERREIRA, A. S.; NOVOA-CARBALLAL, R.; NUNES, C.; PASHKULEVA, I.; NEVES, N. M.; COIMBRA, M. A.; REIS, R. L.; MARTINS, A.; SILVA, T. H. The Key Role of Sulfation and Branching on Fucoidan Antitumor Activity. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 5, maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mabi.201600340>>.

PACHECO-QUITO, E. M.; RUIZ-CARO, R.; VEIGA, M. D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 583, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md18110583>>.

PADUA, D.; ROCHA, E.; GARGIULO, D.; RAMOS, A. A. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 91–98, dez. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.09.007>>.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. **The Polysaccharides**, p. 195–285, 1983. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-065602-8.50009-1>>.

PARADA VENEGAS, D.; DE LA FUENTE, M.K.; LANDSKRON, G.; GONZÁLEZ, M.J.; QUERA, R.; DIJKSTRA, G.; HARMSSEN, H.J.M.; FABER, K.N.; HERMOSO, M.A. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 277, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>>.

PARK, S. H.; LEE, C. R.; HONG, S. K. Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 7, p. 2815–2832, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10412-6>>.

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21770–21776, out. 1993.

PEREIRA, L. Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algotherapy, and Thalassotherapy. **Cosmetics**, v. 5, n. 4, p. 68, nov. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cosmetics5040068>>.

PEREIRA, L.; AMADO, A. M.; CRITCHLEY, A. T.; VAN DE VELDE, F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1903–1909, out. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.11.014>>.

PRASEDYA, E. S.; MIYAKE, M.; KOBAYASHI, D.; HAZAMA, A. Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by Fucci imaging. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 270, ago. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12906-016-1199-5>>.

RAMAN, M.; DOBLE, M. Physicochemical and structural characterisation of marine algae *Kappaphycus alvarezii* and the ability of its dietary fibres to bind mutagenic amines. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 2183–2191, fev. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0241-6>>

RAMAN, M.; DOBLE, M.  $\kappa$ -Carrageenan from marine red algae, *Kappaphycus alvarezii* – A functional food to prevent colon carcinogenesis. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 354–364, maio. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.037>>.

REES, D. A. Structure, Conformation, and Mechanism in the Formation of Polysaccharide Gels and Networks. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 24, p. 267–332, 1969. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0065-2318\(08\)60352-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2318(08)60352-2)>.

RHODES, C. J. Magnetic Resonance Spectroscopy. **Science Progress**, v. 100, n. 3, p. 241–292, set. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3184/003685017x14993478654307>>.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>>

ROSHAN, S.; LIU, Y. Y.; BANAFSA, A.; CHEN, H. J.; LI, K. X.; YANG, G. X.; HE, G. Y.; CHEN, M. J. Fucoidan induces apoptosis of HepG2 cells by down-regulating p-Stat3. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v. 34, n. 3, p. 330–336, jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11596-014-1278-0>>.

SAJADIMAJD, S.; MOMTAZ, S.; HARATIPOUR, P.; EL-SENDUNY, F. F.; PANAHA, A. I.; NAVABI, J.; SOHEILIKHAH, Z.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Molecular Mechanisms Underlying Cancer Preventive and Therapeutic Potential of Algal Polysaccharides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 11, p. 1210–1235, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1381612825666190425155126>>.

RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, R. A.; MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M. NMR spectroscopy for structural elucidation of sulfated polysaccharides from red seaweeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 199, p. 386–400, fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.080>>.

SANTOS, G. R. C.; GLAUSER, B. F.; PARREIRAS, L. A.; VILANOVA, E.; MOURÃO, P. A. S. Distinct structures of the  $\alpha$ -fucose branches in fucosylated chondroitin sulfates do not affect their anticoagulant activity. **Glycobiology**, v. 25, n. 10, p. 1043–1052, out. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/glycob/cwv044>>.

SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 461–478, nov. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/030098589803500601>>.

ŚCIESZKA, S.; KLEWICKA, E. Algae in food: a general review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 21, p. 3538-3547, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>>.

SEGAIN, J. P.; GALMICHE, J. P.; RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE, D.; BOURREILLE, A.; LERAY, V.; GERVOIS, N.; ROSALES, C.; FERRIER, L.; BONNET, C.; BLOTTIÈRE, H. M. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 397-403, set. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397>>.

SHANG, Q.; SHAN, X.; CAI, C.; HAO, J.; LIAB, G.; YU, G. Dietary fucoidan modulates the gut microbiota in mice by increasing the abundance of Lactobacillus and Ruminococcaceae. **Food & Function**, v. 7, n. 7, p. 3224–3232, jul. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c6fo00309e>>.

SHIGA, T. M.; CARPITA, N. C.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI-LYSENKO, B. R. Two banana cultivars differ in composition of potentially immunomodulatory mannan and arabinogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 31–41, maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.079>>.

SHIGA, T. M.; FABI, J. P.; NASCIMENTO, J. R. O. Do; DE PETKOWICZ, C. L. O.; VRIESMANN, L. C.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Changes in cell wall composition associated to the softening of ripening Papaya: Evidence of extensive solubilization of large molecular mass galactouronides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 7064–7071, ago. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf900073b>>.

SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 990-995, nov. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1099993>>.

SIEGEL, R. L.; JAKUBOWSKI, C. D.; FEDEWA, S. A.; DAVIS, A.; AZAD, N. S. Colorectal Cancer in the Young: Epidemiology, Prevention, Management. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 40, p. 1-14, mar. 2020. Disponível em: <[https://doi.org/10.1200/edbk\\_279901](https://doi.org/10.1200/edbk_279901)>.

SILCHENKO, A. S.; RASIN, A. B.; KUSAYKIN, M. I.; MALYARENKO, O. S.; SHEVCHENKO, N. M.; ZUEVA, A. O.; KALINOVSKY, A. I.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; ERMAKOVA, S. P. Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa* algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, p. 189–195, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.094>>.

SLATTERY, M. L. Diet, lifestyle, and colon cancer. **Seminars in Gastrointestinal Disease**, v. 11, n. 3, p. 142–146, jul. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10950460/>>.

SLIWINSKA, M. A.; MOSIENIAK, G.; WOLANIN, K.; BABIK, A.; PIWOCKA, K.; MAGALSKA, A.; SZCZEPANOWSKA, J.; FRONK, J.; SIKORA, E. Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells.

**Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 1–2, p. 24–32, jan-fev. 2009.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.04.011>>.

SON, Y.; AN, Y.; JUNG, J.; SHIN, S.; PARK, I. W.; GWAK, J.; JU, B. G.; CHUNG, Y. H.; NA, M. K.; OH, S. Protopine isolated from *Nandina domestica* induces apoptosis and autophagy in colon cancer cells by stabilizing p53. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 6, p. 1689–1696, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ptr.6357>>.

SORET, R.; CHEVALIER, J.; DE COPPET, P.; POUPEAU, G.; DERKINDEREN, P.; SEGAIN, J. P.; NEUNLIST, M. Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. **Gastroenterology**, v. 138, n. 5, p. 1772–1782, maio 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.053>>.

SOUZA, R. B.; FROTA, A. F.; SILVA, J.; ALVES, C.; NEUGEBAUER, A. Z.; PINTEUS, S.; RODRIGUES, J. A. G.; CORDEIRO, E. M. S.; DE ALMEIDA, R. R.; PEDROSA, R.; BENEVIDES, N. M. B. In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 1248–1256, jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.029>>.

SPRING, K. J.; ZHAO, Z. Z.; KARAMATIC, R.; WALSH, M. D.; WHITEHALL, V. L. J.; PIKE, T.; SIMMS, L. A.; YOUNG, J.; JAMES, M.; MONTGOMERY, G. W.; APPEYARD, M.; HEWETT, D.; TOGASHI, K.; JASS, J. R.; LEGGETT, B. A. High Prevalence of Sessile Serrated Adenomas With BRAF Mutations: A Prospective Study of Patients Undergoing Colonoscopy. **Gastroenterology**, v. 131, n. 5, p. 1400–1407, nov. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.038>>.

STEPHEN, A. M.; CHAMP, M. M. J.; CLORAN, S. J.; FLEITH, M.; VAN LIESHOUT, L.; MEJBORN, H.; BURLEY, V. J. Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 2, p. 149–190, dez. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/s095442241700004x>>.

STOCKERT, J. C.; HOROBIN, R. W.; COLOMBO, L. L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159–167, abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>>.

SUGANYA, A. M.; SANJIVKUMAR, M.; CHANDRAN, M. N.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Pharmacological importance of sulphated polysaccharide carrageenan from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in comparison with commercial carrageenan. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1300–1312, dez. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.067>>.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3322/caac.21660>>.

SYNYTSYA, A.; KIM, W. J.; KIM, S. M.; POHL, R.; SYNYTSYA, A.; KVASNIČKA, F.; ČOPIKOVÁ, J.; PARK, Y. I. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 1, p. 41–48, maio 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.052>>.

TAYLOR, D. P.; BURT, R. W.; WILLIAMS, M. S.; HAUG, P. J.; CANNON-ALBRIGHT, L. A. Population-Based Family History–Specific Risks for Colorectal Cancer: A Constellation Approach. **Gastroenterology**, v. 138, n. 3, p. 877–885, mar. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.044>>.

TECSON, M. G.; ABAD, L. V.; EBAJO, V. D.; CAMACHO, D. H. Ultrasound-assisted depolymerization of kappa-carrageenan and characterization of degradation product. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 73, p. 105540, maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105540>>.

THALER, R.; SPITZER, S.; KARLIC, H.; KLAUSHOFER, K.; VARGA, F. DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Epigenetics**, v. 7, n. 6, p. 635-651, jun. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.4161/epi.20163>>.

THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates-structural complexity and functional diversity. **Critical Review in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 65–84, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07388550290789469>>.

THE LANCET ONCOLOGY. Colorectal cancer: a disease of the young? **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 4, p. 413, abr. 2017. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30202-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30202-4)>.

THOMAS, N. V.; KIM, S. K. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. **Marine Drugs**, v. 11, n.1, p. 146-164, jan. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md11010146>>.

TOKITA, Y.; NAKAJIMA, K.; MOCHIDA, H.; IHA, M.; NAGAMINE, T. Development of a fucoidan-specific antibody and measurement of fucoidan in serum and urine by sandwich ELISA. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 2, p. 350–357, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1271/bbb.90705>>.

VAN BLARIGAN, E. L.; FUCHS, C. S.; NIEDZWIECKI, D.; ZHANG, S.; SALTZ, L. B.; MAYER, R. J.; MOWAT, R. B.; WHITTOM, R.; HANTEL, A.; BENSON, A.; ATIENZA, D.; MESSINO, M.; KINDLER, H.; VENOOK, A.; OGINO, S.; GIOVANNUCCI, E. L.; NG, K.; MEYERHARDT, J. A. Association of Survival With Adherence to the American Cancer Society Nutrition and Physical Activity Guidelines for Cancer Survivors After Colon Cancer Diagnosis: The CALGB 89803/Alliance Trial. **JAMA Oncology**, v. 4, n. 6, p. 783-790, jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.0126>>.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CERESO, A. S. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 3, p. 73–92, mar. 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00066-3)>.

VAN DEN HEUVEL, S. Cell-cycle regulation. **WormBook**, WormBook, p. 1-16, set. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.28.1>>.

VAN WEELDEN, G.; BOBI, M.; OKŁA, K.; VAN WEELDEN, W. J.; ROMANO, A.; PIJNENBORG, J. M. A. Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 32, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md17010032>>.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10–14, 2011. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/22423572>>.

VENKATESAN, J.; MURUGAN, S. S.; SEONG, G. H. Fucoidan-based nanoparticles: Preparations and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 217, p. 652–667, set. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.068>>.

VISHCHUK, O. S.; ERMAKOVA, S. P.; ZVYAGINTSEVA, T. N. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: Anti-tumor activity and structure–function relationship. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1211–1217, nov. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.065>>.

VORSELEN, D. Dynamics of phagocytosis mediated by phosphatidylserine. **Biochemical Society Transactions**, v. 50, n. 5, p. 1281-1291, out. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/bst20211254>>.

WATNE, A. L. Colon polyps. **Journal of Surgical Oncology**, v. 66, n. 3, p. 207–214, nov. 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9098\(199711\)66:3%3C207::aid-jsol10%3E3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9098(199711)66:3%3C207::aid-jsol10%3E3.0.co;2-z)>.

WEINER, M. L. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 244–269, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/10408444.2013.861798>>

WEIR, T. L.; MANTER, D. K.; SHEFLIN, A. M.; BARNETT, B. A.; HEUBERGER, A. L.; RYAN, E. P. Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adults. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, ago. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070803>>.

WILLIAMS, B. A.; MIKKELSEN, D.; FLANAGAN, B. M.; GIDLEY, M. J. “Dietary fibre”: Moving beyond the “soluble/insoluble” classification for monogastric nutrition, with an emphasis on humans and pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, p. 45, maio 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40104-019-0350-9>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 19 abr. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Colorectal cancer**. 2022. Disponível em: <<https://www.iarc.who.int/cancer-type/colorectal-cancer/>>. Acesso em: 24 abr. 2023.

WU, R.; SHANG, N.; GUI, M.; YIN, J.; LI, P. Sturgeon (*Acipenser*)-derived chondroitin sulfate suppresses human colon cancer HCT-116 both in vitro and in vivo by inhibiting proliferation and inducing apoptosis. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1130, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu12041130>>.

WU, T. C.; HONG, Y. H.; TSAI, Y. H.; HSIEH, S. L.; HUANG, R. H.; KUO, C. H.; HUANG, C. Y. Degradation of *Sargassum crassifolium* Fucoidan by Ascorbic Acid and Hydrogen Peroxide, and Compositional, Structural, and In Vitro Anti-Lung Cancer Analyses of the Degradation Products. **Marine drugs**, v. 18, n. 6, p. 334, jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md18060334>>.

YANG, B.; BHATTACHARYYA, S.; LINHARDT, R.; TOBACMAN, J. Exposure to common food additive carrageenan leads to reduced sulfatase activity and increase in sulfated glycosaminoglycans in human epithelial cells. **Biochimie**, v. 94, n. 6, p. 1309–1316, jun. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.031>>.

YANG, C.; CHUNG, D.; SHIN, I. S.; LEE, H. Y.; KIM, J. C.; LEE, Y. J.; YOU, S. G. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 5, p. 433–437, dez. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.08.006>>.

YUAN, H.; SONG, J. Preparation, structural characterization and in vitro antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharide fraction from *Kappaphycus striatum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, p. 7–13, jan. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-005-5513-8>>.

YUAN, H.; SONG, J.; LI, X.; LI, N.; DAI, J. Immunomodulation and antitumor activity of  $\kappa$ -carrageenan oligosaccharides. **Cancer Letters**, v. 243, n. 2, p. 228–234, nov. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.11.032>>.

YUAN, H.; SONG, J.; LI, X.; LI, N.; LIU, S. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of  $\kappa$ -carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 59–65, jun. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-010-9536-4>>.

ZHENG, Y.; WANG, T.; TU, X.; HUANG, Y.; ZHANG, H.; TAN, D.; JIANG, W.; CAI, S.; ZHAO, P.; SONG, R.; LI, P.; QIN, N.; FANG, W. Gut microbiome affects the response to anti-PD-1 immunotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 193, jul. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40425-019-0650-9>>.

ZHENG, Z.; PAN, X.; LUO, L.; ZHANG, Q.; HUANG, X.; LIU, Y.; WANG, K.; ZHANG, Y. Advances in oral absorption of polysaccharides: Mechanism, affecting factors, and improvement strategies. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, p. 119110, 15 abr. 2022.

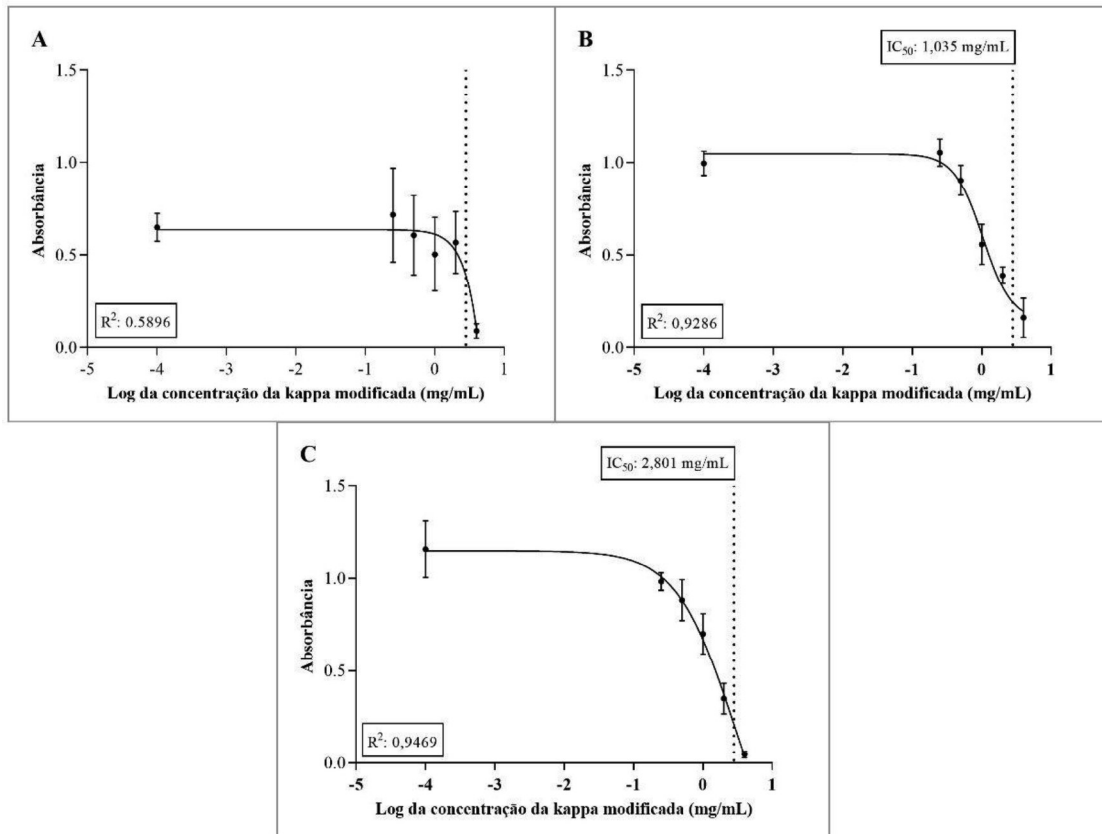
ZHOU, G.; SHENG, W.; YAO, W.; WANG, C. Effect of low molecular  $\lambda$ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research**, v. 53, n. 2, p. 129–134, fev. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.09.009>>.

ZHURISHKINA, E. V.; STEPANOV, S. I.; SHVETSOVA, S. V.; KULMINSKAYA, A. A.; LAPINA, I. M. A comparison of the effect of fucoidan from alga *Fucus vesiculosus* and its fractions obtained by anion-exchange chromatography on HeLa G-63, Hep G2, and Chang liver cells. **Cell and Tissue Biology**, v. 11, p. 242–249, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1134/S1990519X17030117>>.



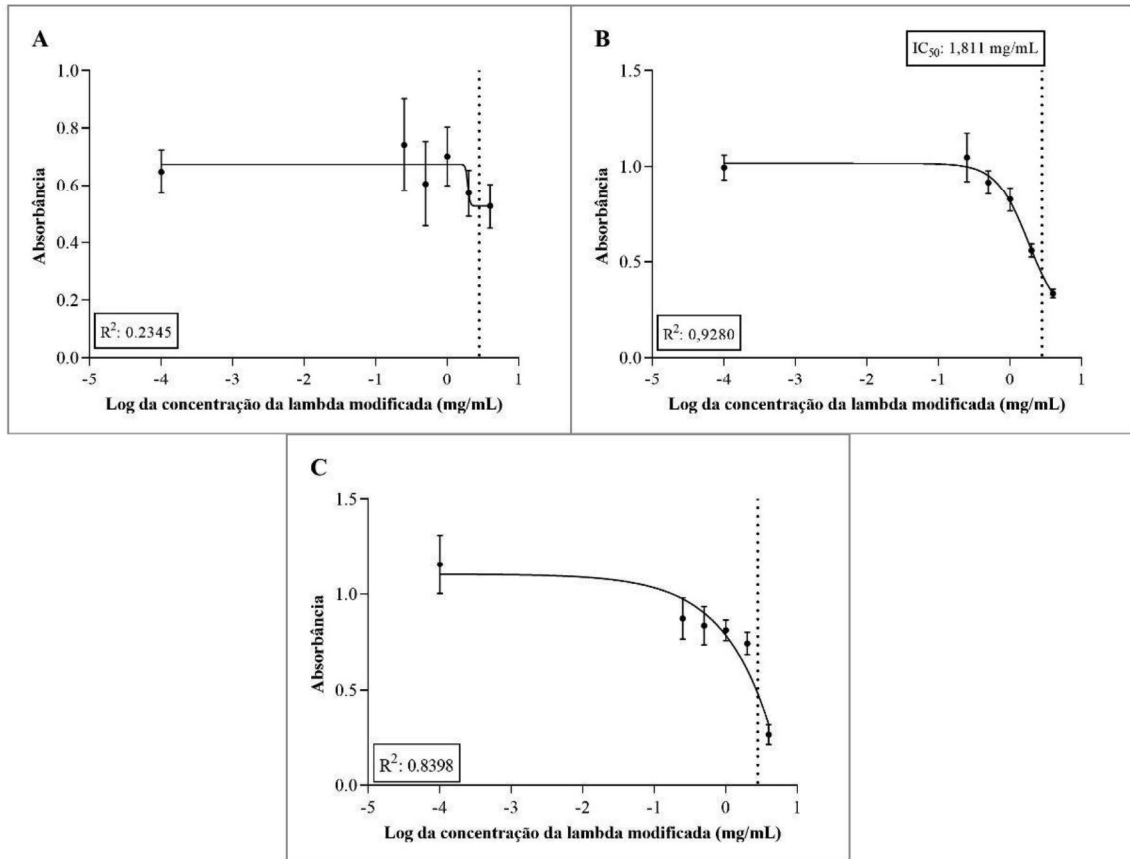
## ANEXOS

Anexo A – Concentração inibitória média que diminui em 50% (IC<sub>50</sub>) a viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena kappa modificada em diferentes tempos de tratamento.



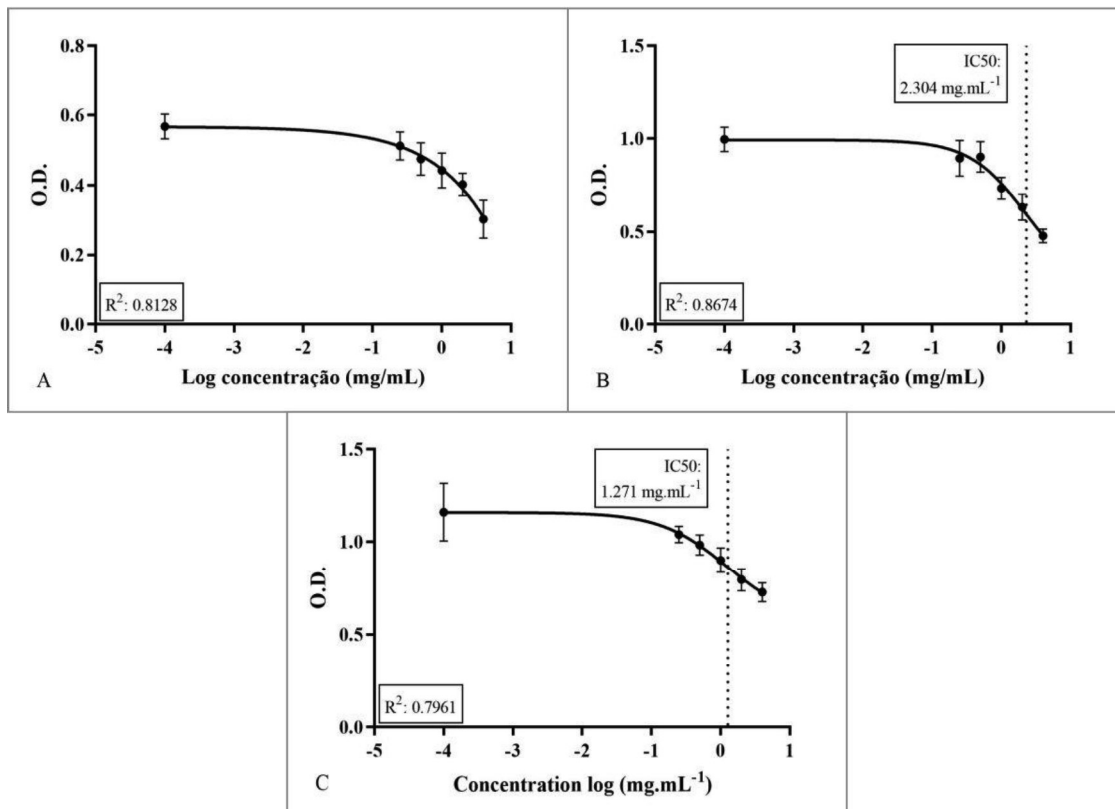
A. 24h; B. 48h; C. 72h de tratamento. Os resultados foram expressos como absorbância e apresentados como média ± erro padrão, em dois experimentos independentes, cada um realizado em quadruplicata.

Anexo B – Concentração inibitória média que diminui em 50% (IC50) a viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena lambda modificada em diferentes tempos de tratamento.



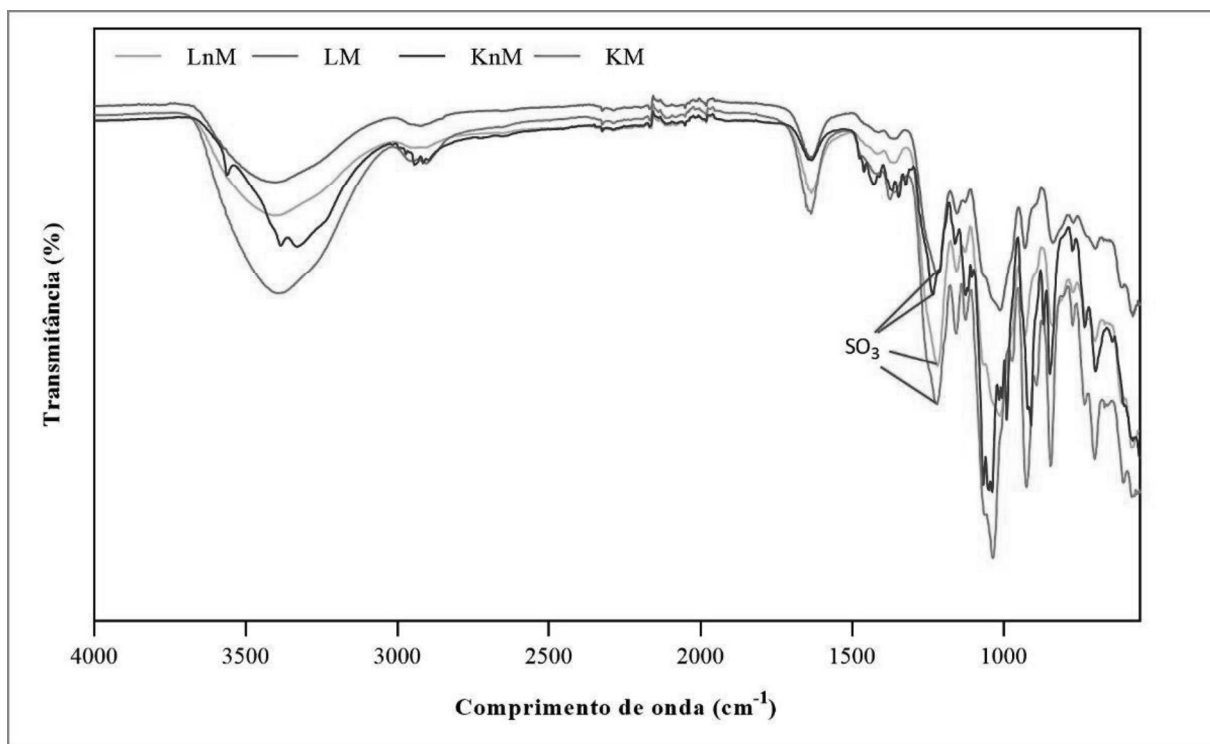
A. 24h; B. 48h; C. 72h de tratamento. Os resultados foram expressos como absorbância e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em dois experimentos independentes, cada um realizado em quadruplicata.

Anexo C – Concentração inibitória média que diminui em 50% (IC50) a viabilidade celular de HCT-116 tratadas com diferentes concentrações da carragena iota modificada em diferentes tempos de tratamento.



A. 24h; B. 48h; C. 72h de tratamento. Os resultados foram expressos como absorvância e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, em dois experimentos independentes, cada um realizado em quadruplicata.  
 Fonte: Elaboração própria.

Anexo D – Espectros entre 4000-550  $\text{cm}^{-1}$  de infravermelho por transformada de Fourier das carragenas kappa e lambda não modificada e modificada.



KnM: kappa não modificada; KM: kappa modificada; LnM: lambda não modificada; LM: lambda modificada; SO<sub>3</sub>: éster sulfato.



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**FICHA DO ALUNO**

---

**9131 - 9408219/1 - Ellen Cristina Miranda Lacerda**

**Email:** ellenlacerda@usp.br  
**Data de Nascimento:** 02/06/1988  
**Cédula de Identidade:** RG - 43.540.098-8 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharela em Química Tecnológica - Universidade Católica de Santos - São Paulo - Brasil - 2015  
**Mestrado:** Mestra em Ciências - Área: Biotecnologia - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

---

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Ciência dos Alimentos  
**Área:** Bromatologia  
**Data de Matrícula:** 26/09/2018  
**Início da Contagem de Prazo:** 26/09/2018  
**Data Limite para o Depósito:** 24/07/2023  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). João Paulo Fabi - 26/09/2018 até o presente. Email: jpfabi@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, 26/09/2018  
**Prorrogação(ões):** 120 dias  
Período de 25/03/2023 até 23/07/2023  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 02/06/2021  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 26/09/2018  
Prorrogação em 08/03/2023

---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

**Última ocorrência:** Prorrogação em 08/03/2023

**Impresso em:** 11/07/2023 12:36:20



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**FICHA DO ALUNO**

9131 - 9408219/1 - Ellen Cristina Miranda Lacerda

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5754-2/1	Atualização em Ciências Farmacêuticas	22/10/2018	28/10/2018	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5844-1/1	Proteínas Recombinantes em Sistemas Microbianos – Desenho, Bioprocessos, Modificações e Caracterização – uma Visão Global (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	19/03/2019	29/04/2019	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/8	Aprimoramento Pedagógico	02/04/2019	30/04/2019	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
MCM5923-1/4	Mecanismos de Carcinogênese (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	14/05/2019	27/05/2019	60	4	100	A	N	Concluída
VCI5803-1/2	Escrita Científica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	11/06/2019	25/06/2019	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5741-4/1	Química e Bioquímica de Alimentos I	10/09/2019	14/10/2019	60	4	100	A	N	Concluída
MCM5851-5/2	Biologia Celular do Câncer (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	25/09/2019	26/11/2019	90	6	80	A	N	Concluída
FBA5728-4/9	Aprimoramento Pedagógico	17/03/2020	13/04/2020	60	0	-	-	S	Turma cancelada
BMH5778-1/3	Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	25/05/2020	28/06/2020	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
<b>Disciplinas:</b>	0	20	24
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	20	24

**Créditos Atribuídos à Tese: 172**

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Prorrogação em 08/03/2023

**Impresso em:** 11/07/2023 12:36:20

**Ellen Cristina Miranda Lacerda**Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/2887194975331100>



Última atualização do currículo em 11/07/2023

**Resumo informado pelo autor**

Graduada em Química Tecnológica pela Universidade Católica de Santos (2014), foi bolsista de Iniciação Científica pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - PIBITI/CNPq (2014). Mestre em Ciências pelo Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (2017). Atualmente, é aluna de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP). Tem experiência em Cultura de Fungos Filamentosos, principalmente na área de Biorremediação em locais contaminados com metais. Tem experiência em Cultura de Células Aderentes (células de câncer e fibroblastos) e Ensaio biológicos, como: Viabilidade, Proliferação e Migração celular, Ciclo celular, Apoptose e Western blotting.

**(Texto informado pelo autor)**

**Nome civil****Nome** Ellen Cristina Miranda Lacerda**Dados pessoais****Filiação** Luiz Humberto Lacerda e Shirley Miranda Lacerda**Nascimento** 02/06/1988 - Santos/SP - Brasil**Carteira de Identidade** 435400988 SSP - SP - 09/08/2008**CPF** 368.639.538-03**Formação acadêmica/titulação**

- 2018** Doutorado em Ciências dos Alimentos.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento da atividade anticâncer in vitro  
Orientador: João Paulo Fabi   
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2015 - 2017** Mestrado em Biotecnologia.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Avaliação do potencial de biorremediação por fungos presentes em áreas de processamento de cobre, Ano de obtenção: 2017  
Orientador: Luciana Jandelli Gimenes   
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2014** Graduação em Química Tecnológica.  
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, Brasil  
Título: Resistência de fungos presentes em áreas de processamento de cobre  
Orientador: Luciana Gimenes Jandelli
- 2009 - 2010** Ensino Profissional de nível técnico em Meio Ambiente.  
Escola Técnica Estadual de Cubatão, ETEC DE CUBATÃO, Brasil
- 2006 - 2007** Ensino Profissional de nível técnico em Administração.  
Escola Técnica Estadual Dona Escolástica Rosa, ETEC ESCOLÁSTICA, Brasil

**Formação complementar**

- 2022 - 2022** Boas práticas em cultura de células - Teórico. . (Carga horária: 40h).  
Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ, Brasil
- 2020 - 2020** Redação científica. . (Carga horária: 40h).  
Stanford University - On-line, STANFORD UNIVER, Estados Unidos
- 2020 - 2020** Curso Básico de HPLC - Módulo I. . (Carga horária: 3h).  
Shimadzu do Brasil Comércio, SBC, São Paulo, Brasil
- 2018 - 2018** Análise de Eros Comuns na Escrita Acadêmica em Inglês. . (Carga horária: 6h).  
Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas - USP, FFLCH, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de cromatografia: Fundamentos e desenvolvimento de metodologia em HPLC. . (Carga horária: 8h).  
ALLCROM, ALLCROM, Brasil
- 2015 - 2015** Treinamento em Biossegurança. . (Carga horária: 8h).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2014 - 2014** Plano de gerenciamento de resíduos. . (Carga horária: 8h).  
Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Controle de qualidade químico. . (Carga horária: 68h).  
Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, Brasil
- 2012 - 2012** Automação e gestão de lab. e controle de qualidade. . (Carga horária: 8h).  
Conselho Regional de Química IV Região, CRQ-IV, São Paulo, Brasil
- 2012 - 2012** Gestão de produtos químicos. . (Carga horária: 8h).  
Conselho Regional de Química IV Região, CRQ-IV, São Paulo, Brasil

**Atuação profissional**

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

**Vínculo institucional**

2018 - 2022 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: aluna de doutorado, Regime: Dedicção exclusiva

2. Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - ICB/USP

**Vínculo institucional**

2015 - 2017 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

3. Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas - IPECI

**Vínculo institucional**

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

4. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IB/USP

**Vínculo institucional**

2023 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Desenvolvimento Tecnológico e Industrial DTI- , Carga horária: 40, Regime: Integral  
Outras informações:  
Vinculado ao Projeto Envelhecimento e Doenças Genéticas: Genômica e Metagenômica.

## Membro de comitê de assessoramento

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF-USP

**Vínculo**

2019 - 2020 Regime: Parcial  
Outras informações:  
Membro Titular, na qualidade de Representante dos Alunos de Pós Graduação, junto à Comissão de Ética em Pesquisa (CEP).


## Idiomas

**Inglês** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem


## Produção

Produção bibliográfica


**Artigos completos publicados em periódicos**

1.  [doi](#) LACERDA, ELLEN CRISTINA MIRANDA; DOS PASSOS GALLUZZI BALTAZAR, MARCELA; DOS REIS, TÁTIANA ALVES; DO NASCIMENTO, CLAUDIO AUGUSTO OLLER; CÔRREA, BENEDITO; GIMENES, LUCIANA JANDELLI  
Copper biosorption from an aqueous solution by the dead biomass of *Penicillium ochrochloron*. ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT (DORDRECHT. ONLINE), **2019**, v.191, p.1 - , 2019.

**Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1.  LACERDA, E. C. M.; REIS, T. A.; CORREA, B.; GIMENES, L. J.; PERPETUO, E. A.  
Avaliação da tolerância ao cobre de fungos filamentosos presentes em áreas de processamento de cobre In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 2016, Florianópolis.  
**Anais 2016 - VIII Congresso Brasileiro de Micologia.** , 2016. v.01. p.639 - 639

**Apresentação de trabalho e palestra**

1. LACERDA, ELLEN CRISTINA MIRANDA; FABI, J. P.  
Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento da atividade anticâncer in vitro, 2022. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. LACERDA, ELLEN CRISTINA MIRANDA; FABI, J. P.  
Biological Effects Of Sulfated Polysaccharides On Cancer Cell, 2021. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
3.  LACERDA, E. C. M.; REIS, T. A.; CORREA, B.; GIMENES, L. J.; PERPETUO, E. A.  
Avaliação da tolerância ao cobre por fungos filamentosos presentes em áreas de mineração, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. GIMENES, L. J.; AVANZI, I.; BALTAZAR, M.; GRASIOSO, L. H.; KAROLSKI, B.; LACERDA, E. C. M.; PERPETUO, E. A.; NASCIMENTO, C. A. O.; REIS, T. A.; CORREA, B.  
Growth evaluation of Fungi Isolated in the Sossogo copper mine (Pará State, Brazil). 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

## Eventos



## Eventos

### Participação em eventos

1. **16 Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN)ão**, 2022. (Congresso)  
Modificação química de polissacarídeos sulfatados para aumento de atividades anticâncer in vitro.
2. **XXIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2021. (Outra)  
Biological Effects Of Sulfated Polysaccharides On Cancer Cell.
3. **II Workshop NAPAN: Perspectivas Interdisciplinares em Alimentos e Nutrição**, 2019. (Oficina)
4. **Ciclo ILP + FAPESP: A ciência contra o câncer**, 2018. (Outra)
5. **I SIMPÓSIO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS: ENSINO E PESQUISA PARA UMA ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL**, 2018. (Simpósio)
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA**, 2016. (Congresso)  
Avaliação da tolerância ao cobre por fungos filamentosos presentes em áreas de mineração.
7. **IX JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**, 2014. (Seminário)  
Resistência de fungos presentes em áreas de processamento de cobre.

## Bancas

### Bancas

### Participação em banca de trabalhos de conclusão

#### Graduação

1. LACERDA, E. C. M.; GIMENES, L. J.  
Participação em banca de Miriam Dias Brito Machado. **Comparação de crescimento dos gêneros Aspergillus e Penicillium isolados em áreas de extração de cobre**, 2015  
(Química Tecnológica) Universidade Católica de Santos

### Citações

#### Outras

Total de trabalhos: 1

Total de citações: 4

Ellen Cristina Miranda Lacerda

## Totais de produção

### Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	1
Trabalhos publicados em anais de eventos	1
Apresentações de trabalhos (Congresso)	3
Apresentações de trabalhos (Seminário)	1

### Eventos

Participações em eventos (congresso)	2
Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (simpósio)	1
Participações em eventos (oficina)	1
Participações em eventos (outra)	2
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação)	1