

CRISTIANE ALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Nostoc* spp. SOB DIFERENTES
INTENSIDADES LUMINOSAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48c
2012

Oliveira, Cristiane Alves de, 1985-
Caracterização da produção de pigmentos e da atividade
antioxidante de *Nostoc* spp. sob diferentes intensidades
luminosas / Cristiane Alves de Oliveira. – Viçosa, MG, 2012.
xii, 78f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antônio Galvão do Nascimento.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Cianobactéria. 2. Antioxidantes. 3. Pigmentos. 4. Fenóis.
5. Luz - Efeito fisiológico. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 579.39

CRISTIANE ALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Nostoc* spp. SOB DIFERENTES
INTENSIDADES LUMINOSAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA em 06 de julho de 2012.

Paulo César Stringheta
(Coorientador)

Vanessa Cristina de Castro

Ann Honor Munteer

Antônio Galvão do Nascimento
(Orientador)

*Ao meu guia espiritual.
Aos meus grandes amores, Vinícius
e Klismam, parceiros de alma,
incondicionais...*

“Desistir?”

Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério.

É que tem mais chã nos meus olhos

do que cansaço nas minhas pernas,

mais esperança nos meus passos

do que tristeza nos meus ombros,

mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

[Cora Coralina]

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE GRÁFICOS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 <i>Nostoc</i>	3
1.2 Propriedades Nutricionais das Cianobactérias.....	4
1.3 Antioxidantes	6
1.4 Ficobiliproteínas	9
1.5 Carotenóides	15
1.6 Compostos fenólicos	21
1.7 Referências Bibliográficas	24
EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA SOBRE A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM <i>NOSTOC</i> spp.....	34
RESUMO	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Condições de cultivo	37
2.2 Determinação de massa seca	38
2.3 Extração e quantificação de carotenóides e clorofila <i>a</i>	38
2.4 Extração e quantificação de ficobiliproteínas	38
2.5 Análise estatística	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4 CONCLUSÃO	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>NOSTOC</i> spp.....	57
RESUMO	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Condições de cultivo.....	59
2.2 Extração e quantificação de clorofila e carotenóides totais	60
2.3 Extração e quantificação de ficobiliproteínas	61
2.4 Preparação das amostras para determinação de compostos fenólicos e da atividade antioxidante	61
2.5 Determinação de fenólicos totais.....	62
2.6 Determinação da atividade antioxidante	62
2.7 Análise estatística.....	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Determinação do conteúdo de ficobiliproteínas	63
3.2 Conteúdo fenólico total	66
3.3 Capacidade antioxidante	68
3.4 Comparação entre a atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos	71
4 CONCLUSÃO	73
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CONCLUSÃO GERAL	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Distribuição de elétrons no orbital externo da molécula de oxigênio e redução deste a água com intermediárias formações de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons	7
Figura 2 – Principais complexos fotossintéticos da membrana do tilacóide de cianobactérias	10
Figura 3 – Moléculas cromóforas das principais ficobiliproteínas de cianobactérias	11
Figura 4 – Estrutura tridimensional da C-ficocianina da cianobactérias termofílica <i>Synechococcus elongatus</i>	12
Figura 5 – Estrutura química da ficocianina (a) e bilirrubina (b)	14
Figura 6 – Mecanismo de fotoproteção exercido pelos carotenóides	17
Figura 7 – Fotossistema II da cianobactéria <i>T. elongatus</i> , monômero	19
Figura 8 – Um dímero da proteína OCP	20

LISTA DE GRÁFICOS

		Página
	EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA SOBRE A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM <i>NOSTOC</i> spp.....	34
Gráfico 1 –	Massa seca por mL de cultivo para <i>Nostoc</i> sp F105 e F108 sob diferentes intensidades luminosas.....	41
Gráfico 2 –	Teor de Ficobiliproteínas para <i>Nostoc</i> sp F108 sob diferentes intensidades luminosas.....	43
Gráfico 3 –	Teor de ficobiliproteínas para <i>Nostoc</i> sp F105 sob diferentes intensidades luminosas.....	44
Gráfico 4 –	Teor de clorofila para <i>Nostoc</i> sp F105 e F108 sob diferentes intensidades luminosas.....	46
Gráfico 5 –	Teor de carotenóides para <i>Nostoc</i> sp F105 e F108 sob diferentes intensidades luminosas.....	46
	EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>NOSTOC</i> spp.....	57
Gráfico 1 –	Teor das ficobiliproteínas para <i>Nostoc</i> sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas.....	64
Gráfico 2 –	Teor de clorofila para <i>Nostoc</i> sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas.....	65
Gráfico 3 –	Teor de carotenóides para <i>Nostoc</i> sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas.....	65
Gráfico 4 –	Conteúdo fenólico de <i>Nostoc</i> sp F105 pela técnica de Folin Ciocalteau, de acordo com diferentes intensidades luminosas e diferentes extratos.....	67
Gráfico 5 –	Conteúdo fenólico de <i>Nostoc</i> sp F105 pela técnica de Folin Ciocalteau, de acordo com diferentes intensidades luminosas e para a soma de todos extratos e para os extratos de ficobiliproteínas totais	68

Gráfico 6 –	Capacidade antioxidante de <i>Nostoc</i> sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas, para os extratos de hexano, acetato e água para os extratos de ficobiliproteínas totais.....	69
--------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Composição de pigmentos de <i>Nostoc</i> sp F108, de acordo com diferentes intensidades luminosas	40
Tabela 2 – Composição de pigmentos de <i>Nostoc</i> sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas	40

RESUMO

OLIVEIRA, Cristiane Alves de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012.
Caracterização da produção de pigmentos e da atividade antioxidante de *Nostoc* spp. sob diferentes intensidades luminosas. Orientador: Antônio Galvão do Nascimento. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani, Paulo César Stringheta e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

As cianobactérias, utilizadas há séculos como alimento, possuem mecanismos antioxidantes altamente desenvolvidos e produtividade superior a qualquer outro sistema agrícola, apresentando, portanto grande potencial como fonte de compostos antioxidantes naturais, além de vários outros biocompostos. Um dos fatores que mais interferem no metabolismo dos organismos fotossintetizantes é o nível de luz incidente, todavia para cianobactérias não são bem compreendidas as relações entre luminosidade, compostos bioativos e atividade antioxidante. Sob este enfoque, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência de diferentes intensidades luminosas sobre a atividade antioxidante de cianobactérias do gênero *Nostoc* spp., e sobre os níveis de alguns dos principais compostos antioxidantes presentes em suas células: os pigmentos ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina), carotenóides e clorofila *a*, além de compostos fenólicos. A atividade antioxidante foi determinada pelo percentual de inibição do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH[•]) e os fenóis foram determinados pelo método Folin-Cicalteau. Os dados deste trabalho mostraram que variações significativas podem ocorrer para os teores de pigmentos e atividade antioxidante entre faixas de intensidade luminosas estreitas; assim, uma definição precisa da intensidade aplicada, através de curvas de resposta previamente construídas é necessária de acordo com o interesse biotecnológico em questão. As menores intensidades se mostraram mais vantajosas em termos de rendimento de pigmentos, potencial antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos. A diminuição do teor de

clorofila *a* e ficobiliproteínas em maiores irradiâncias foram observadas, sendo provavelmente uma estratégia de prevenção contra o dano foto-oxidativo ocasionado pela geração de radicais livres. No entanto, para carotenóides, observou-se em alguns momentos aumento do conteúdo em maiores irradiâncias, o que poderia refletir suas funções como dissipadores da energia luminosa absorvida em excesso e como agentes antioxidantes do aparato fotossintético. As ficobiliproteínas foram as maiores contribuintes para totalidade da defesa antioxidante nas menores intensidades, enquanto que para as maiores intensidades foram os carotenóides. No entanto, nem sempre foram observados comportamentos semelhantes entre os teores de biocompostos e a atividade antioxidante, já que esta relação pode se mostrar bastante complexa, sendo necessária uma determinação quali e quantitativa dos inúmeros compostos que podem apresentar propriedades antioxidantes e utilização de extratos altamente purificados. Além disso, a própria metodologia utilizada para a determinação da atividade antioxidante também poderia ser uma fonte de variação, gerando resultados inconsistentes entre o teor de compostos bioativos e atividade antioxidante.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Cristiane Alves de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012.
Characterization of pigment production and antioxidant activity of *Nostoc spp.* under different light intensities. Advisor: Antônio Galvão do Nascimento. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani, Paulo César Stringheta and Sônia Machado Rocha Ribeiro.

Cyanobacteria used for centuries as a food has antioxidant mechanisms highly developed and production capacity higher than any other agricultural system, presenting a great potential as a source of natural antioxidant compounds, and various other compounds. One of the factors that interfere with the metabolism of photosynthetic organisms is the level of incident light, yet for cyanobacteria are not well understood the relations between luminosity, bioactive compounds and antioxidant activity. Under this approach, the objective of this study was to determine the influence of different light intensities on antioxidant activity of cyanobacteria of the genus *Nostoc spp.*, and on the levels of some of the main antioxidant compounds found in their cells: the pigments phycobiliproteins (phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin), carotenoids and chlorophyll, and phenolic compounds. The antioxidant activity was determined by the percentage of inhibition of the radical 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH •) and phenols were determined using the Folin-Cicalteau. The data from this study demonstrated that significant variations can occur for the pigment and antioxidant activity between narrow bands of light intensity, thus, a precise definition of the intensity applied through response curves previously constructed is necessary in according to biotechnological interest in question. The lowest intensities were more advantageous in terms of yield pigments, antioxidant potential and phenolic compounds. The decreased level of chlorophyll and phycobiliproteins in higher irradiances were observed, probably being prevention against photo-oxidative damage

caused by free radical generation. However, for carotenoids was observed in some instances increase the content of higher irradiances, which could reflect their function as heat sinks of the light energy absorbed in excess and as antioxidant agents of the photosynthetic apparatus. The phycobiliproteins was the major contributor to total antioxidant status at lower intensities, while for higher intensities are the carotenoids. However, not always the behaviors observed were similar between the biocompostos contents and antioxidant activity, since this relationship may prove to be quite complex, requiring a qualitative and quantitative determination of many compounds that may have antioxidant properties and use of highly purified extracts. In addition, the methodology used to determine the antioxidant activity could also be a source of variation, generating inconsistent results between the content of bioactive compounds and antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO

Por definição, cianobactérias são organismos cosmopolitas, procariotos, unicelulares e fotossintéticos; os quais podem apresentar formas uni, multicelulares ou filamentosas. Esses organismos podem também ser considerados microalgas, que de acordo com a classificação botânica, são microrganismos pertencentes ao Filo Chlorophyta, os quais possuem clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, sendo capazes de realizar fotossíntese. Assim, a classificação microalgas inclui organismos de dois tipos celulares distintos: cianobactérias, com estrutura celular procariota e as restantes microalgas de estrutura celular eucariota; não possuindo os termos algas e microalgas nenhum valor filogenético (OLAIZOLA, 2003).

As cianobactérias têm sido empregadas como alimento fonte de proteína e de inúmeros compostos como fármacos; marcadores fluorescentes; biopigmentos; enzimas; antioxidantes; compostos gelificantes, emulsificantes, flocculantes e hidratantes; vitaminas, minerais, lipídios, carboidratos e proteínas. Do ponto de vista biotecnológico, as cianobactérias seriam mais vantajosas que as plantas para obtenção de biocompostos devido a sua produtividade superior a qualquer outro sistema agrícola (PULZ; GROSS, 2004).

Os pigmentos contidos nas células das cianobactérias são utilizados atualmente pela indústria alimentícia e farmacêutica como corantes e antioxidantes, sendo adicionados em outros produtos ou utilizados isoladamente como fármacos. Além de carotenóides e clorofila, as cianobactérias possuem como diferencial em relação aos vegetais, a presença de outro grupo de compostos, as ficobiliproteínas, que incluem pigmentos vermelho e azul. A obtenção de pigmentos e antioxidantes naturais se faz importante pelo aumento da demanda atual dos consumidores por produtos naturais, aliada a possibilidade de alguns corantes e antioxidantes sintéticos desencadarem

processos alérgicos e carcinogênicos (BOTTERWECK *et al.*, 2000). Além disso, a presença de radicais livres está no cerne das discussões de inúmeras patologias, sendo o organismo humano incapaz de garantir sua própria defesa sem fontes de antioxidantes exógenos (CEPOI *et al.*, 2009).

Sabe-se que os organismos fotossintetizantes e principalmente as cianobactérias, um dos grupos pioneiros da superfície terrestre adaptado à vivência em condições extremas, apresentam mecanismos antioxidantes mais desenvolvidos. Este fato tem sido confirmado em testes laboratoriais, nos quais as cianobactérias tem apresentado potencial antioxidante comparado ao BHT (MIRANDA, 1997), um dos antioxidantes sintéticos mais utilizados industrialmente (JAIME *et al.*, 2005; CEPOI *et al.*, 2009).

A intensidade luminosa é o principal fator que influencia o metabolismo e a fisiologia de cianobactérias, no entanto a literatura até o momento não apresentou nenhum dado consistente sobre a influência da intensidade luminosa sobre o potencial antioxidante destes organismos. Todos os trabalhos versando sobre este potencial, se deram sem manipulação das condições de cultivo. Além do mais a grande maioria dos trabalhos aborda uma cianobactéria específica, a *Spirulina*, com carência de trabalhos que forneçam dados de outras espécies.

De posse destas informações, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência da intensidade luminosa sobre a capacidade antioxidante de *Nostoc sp.*, e sobre os níveis de alguns de seus principais sistemas antioxidantes: os pigmentos e os compostos fenólicos.

O estudo foi dividido em duas etapas, cada uma correspondendo à construção de um artigo específico. Na primeira etapa analisaram-se duas espécies de *Nostoc spp* quanto ao teor de pigmentos em diferentes intensidades luminosas, na segunda escolheu-se uma das espécies trabalhadas na primeira etapa para uma análise também da capacidade antioxidante e do teor de compostos fenólicos, correlacionando tais dados com os teores de pigmentos apresentados. Em razão das diferentes metodologias de análises realizadas, a forma de cultivo foi diferente em cada etapa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Nostoc*

Nostoc é um gênero de cianobactéria filamentosa, que forma colônias macroscópicas e microscópicas, sendo comum tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres (DODDS; GUDDER, 1995).

Na China, *Nostoc* possui grande valor econômico, sendo usada como alimento há cerca de dois mil anos, como relata o livro Er Zhu Ya, da dinastia chinesa Jin (265-316 dC). Neste país, atualmente se observa um aumento da demanda de mercado e uma paralela diminuição das fontes desta cianobactéria, fazendo com que o governo chinês venha implantando programas estratégicos. Neste sentido, tem ocorrido um grande número de publicações sobre morfologia, reprodução, ecologia, fisiologia, bioquímica, recursos e técnicas de cultura. No entanto, quase todos os artigos de investigação foram publicados em mandarim, sendo pouco conhecidos fora da China (GAO, 1998). Diante destas considerações, fica claro portanto, o potencial de *Nostoc* para ser reconhecido mundialmente como terapêutico e alimento funcional.

Embora seja utilizado como alimento também nas Filipinas e no Japão, a popularidade de *Nostoc* é localizada e determinada pela tradição e por sua abundância visível. Por exemplo, nas Filipinas, seu uso como alimento humano limita-se principalmente na parte norte do Luzon. No Japão, as pessoas em alguns distritos utilizam estas espécies como ingredientes em sopas e saladas. *Nostoc* também foi muito consumido pelos Incas no antigo México (NAGATA; GOSS; HORI, 2007).

Diferentes espécies de *Nostoc* são utilizadas na medicina para o tratamento de úlceras, artrites e várias formas de câncer desde 1500 antes de Cristo (BURJA, 2001). Outros relatos de efeitos terapêuticos de *Nostoc* incluem tratamento da inflamação, cegueira noturna, queimaduras, ansiedade e fadiga crônica e como agente antiviral, antifúngico e antibacteriano (KNUBEL *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1994). Vale ressaltar o efeito redutor de colesterol por *Nostoc commune* relatado em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol, fato comprovado pelo estudo de Rasmussen *et al.* (2007) que demonstrou que extratos lipídicos de *Nostoc commune* inibiram a expressão de genes relacionados ao metabolismo de colesterol e ácidos graxos em células hepáticas humanas. *Nostoc flagelliforme* também aumentou a atividade dos macrófagos de camundongos (TAKENAKA *et al.*, 1997), confirmando seu papel como modulador do sistema imune.

1.2 Propriedades nutricionais das cianobactérias

A biomassa microbiana usada como alimento fonte de proteínas, vai ao encontro da atual preocupação mundial pela implementação de estratégias agrícolas mais produtivas e menos impactantes (MARCHESAN *et al.*, 2007). No caso específico das cianobactérias, estas se mostram extremamente interessantes, pela produtividade superior a qualquer outro sistema agrícola (PULZ; GROSS, 2004), sugerindo-se a possibilidade de contribuírem para o combate à desnutrição em áreas de risco.

A utilização das cianobactérias como alimento, provavelmente remonta a períodos anteriores a história escrita, destacando-se algumas espécies do gênero *Nostoc*, na Ásia, e *Spirulina* na África pelos Kanembous e no México pelos Astecas (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

A cianobactéria *Spirulina* foi utilizada em programas espaciais, sendo recomendada pela National Aeronautics and Space Administration (NASA) como suplemento alimentar primário durante as missões (KARKOS *et al.*, 2011). Atualmente a *Spirulina* possui status GRAS - Generally Regarded As Safe - (GANTAR e SVIRČEV, 2008) sendo a cianobactéria mais estudada em todo mundo. No Brasil, pesquisas estão sendo conduzidas para sua utilização como aditivo alimentar em diferentes produtos (MORAIS *et al.*, 2006; PEREZ *et al.*, 2007) e ainda na merenda escolar devido a um projeto de pesquisadores do sul, com parcerias entre os setores público e privado (MORAIS *et al.*, 2006). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite a comercialização da *Spirulina* desde que o produto final no qual o microrganismo tenha sido adicionado seja devidamente registrado (BRASIL, 2008).

Além da *Spirulina*, outras cianobactérias vêm sendo testadas em laboratório, para produção de biomassa, como: *Anabaena*, *Nostoc*, *Tolypotrix*, *Anacystis nidulans* e cepas não tóxicas de *Microcystis* e *Oscillatoria* (PINOTTI e SEGATO, 1991). É importante ressaltar que algumas espécies de cianobactérias produzem compostos tóxicos, com potencial para causar efeitos deletérios em seres humanos e animais; por isso estudos prévios e o estabelecimento do status GRAS são essenciais antes de qualquer recomendação de consumo.

As cianobactérias constituem uma fonte alternativa de proteínas, fato já estudado em condições experimentais e industriais; trata-se de uma fonte protéica de custos mais reduzidos do que a proteína de origem animal. A maior parte dos trabalhos de avaliação do conteúdo protéico foi conduzida com *Spirulina*, mas diversos estudos têm sido

realizados com espécies do gênero *Oscillatoria* (QUEIROZ *et al.*, 1998). A *Spirulina* contém teor protéico superior a qualquer outra fonte natural de alimento e concentração de aminoácidos essenciais acima do padrão sugerido pela FAO/1985 - Food and Agriculture Organization of the United Nations - (BERTOLDI *et al.*, 2008). Para Belay *et al.* (1993), o consumo de *Spirulina* necessário para suprir as necessidades diárias de aminoácidos essenciais em um adulto seria de 25 g/dia.

No que tange à digestibilidade, o fato das cianobactérias não possuírem celulose em sua parede celular como as microalgas eucarióticas, favorece o aproveitamento (HABIB *et al.*, 2008).

Apesar de haverem controvérsias, as dosagens de *Spirulina* recomendadas como suplemento alimentar não representariam problema em relação à formação de ácido úrico, pois de acordo com Falquet (1997), o teor de ácidos nucleicos desta microalga (5%) no geral é inferior aos outros organismos unicelulares, embora seja superior ao de alimentos como fígado.

Certos polissacarídeos, oriundos de cianobactérias, possivelmente estimulam sistemas de reparo do DNA (FALQUET, 1997) e possuem propriedades imunostimuladoras e imuno-reguladoras (EVETS *et al.*, 2005). A parede celular da *Spirulina* é composta de polissacarídeos de fácil absorção e alta digestibilidade (HABIB *et al.*, 2008). Os polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS) podem ser facilmente recuperados e possuem alto potencial de utilização pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia como estabilizantes, emulsificantes e espessantes (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998).

O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004). Esses lipídios são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 a 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poliinsaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos poliinsaturados representam entre 25 a 60% dos lipídios totais (BECKER, 1988; BECKER, 2004).

Em *Spirulina*, o conteúdo de ácidos graxos insaturados é em torno de 1,3-15% do total de lipídeos e é constituído, principalmente, de ácido gama-linolênico (BOROWITZKA, 1994); podendo ser considerada uma das mais conhecidas fontes desse ácido graxo (TANTICHOROEN *et al.*, 1994). *Spirulina* possui baixo conteúdo de colesterol (32,5 mg/100 g) (HABIB *et al.*, 2008).

Novas pesquisas têm salientado a relevância dos lipídeos oriundos de cianobactérias. Rasmussen *et al.* (2008) demonstraram que lipídeos extraídos de *Nostoc commune* podem diminuir a expressão de genes envolvidos na biossíntese de colesterol e ácidos graxos. Esses lipídeos poderiam ser utilizados para diminuir a concentração de colesterol e até de triglicerídeos no plasma sanguíneo. Outros lipídeos que podem ter efeitos sobre a saúde humana são os sulfolipídeos. Há evidências que eles protejam os Linfócitos T auxiliares contra infecção do vírus HIV (GUSTAFSON *et al.*, 1989).

De acordo com Habib (2008), ratos alimentados com *Spirulina* absorveram 60% mais ferro do que os ratos que utilizaram o suplemento sulfato ferroso. Já para humanos, o trabalho de Henrikson (1989), conduzido no Japão, com oito mulheres jovens que haviam se tornado anêmicas por restrições alimentares, mostrou que depois da ingestão de 4 g de *Spirulina* após cada refeição durante 30 dias, houve aumento no conteúdo de hemoglobina de 10.9 para 13.2 ($\pm 21\%$). A terapia medicamentosa da anemia por via oral, frequentemente apresenta efeitos colaterais, principalmente gastrointestinais, como náuseas, vômitos, epigastralgia, diarreia e constipação; em aproximadamente 10 a 40% dos pacientes, a intolerância é tão intensa que inviabiliza o tratamento (RODRIGUES e JORGE, 2010).

1.3 Antioxidantes

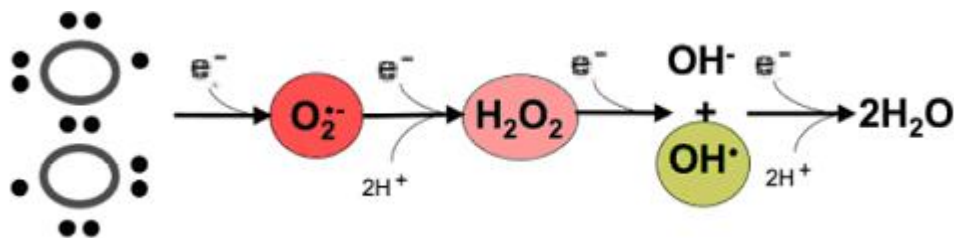
Atualmente, uma das teorias centrais para a explicação de diversos processos patológicos é a presença de radicais livres que promovem lipoperoxidação e oxidação de proteínas e DNA. Esta ideia foi formulada primeiramente em 1954 por Denhim Harman, professor da Universidade de Nebraska. Desde então, experiências positivas de médicos no mundo inteiro no uso de compostos naturais e sintéticos com propriedades antioxidantes, como medicamentos e profiláticos, têm sido incessantemente corroboradas (CEPOI *et al.*, 2009).

Reações de oxidação e redução são essenciais no metabolismo normal de todos os organismos, mas quando há um desbalanço entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante, ocorre o chamado “estresse oxidativo”. Os radicais livres em excesso podem ser originados por defeitos na respiração mitocondrial, metabolismo do ácido araquidônico, ativação-inibição de sistemas enzimáticos ou por fatores exógenos, como poluição, hábito de fumar ou ingerir álcool, ou ainda, por uma nutrição inadequada (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005). Além disso, os processos inflamatórios

também envolvem espécies reativas de oxigênio, originadas pela ativação de leucócitos durante a degranulação (SOUZA, 2007).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes agem interagindo com os radicais livres antes que estes possam reagir com as moléculas biológicas, evitando que ocorram as reações em cadeia ou prevenindo a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos (RATNAM *et al.*, 2006).

Na cadeia transportadora de elétrons, por exemplo, o oxigênio é oceptor final, recebendo quatro elétrons da citocromo *c* oxidase, em um sistema de transporte que possibilita a biossíntese de ATP. Porém, em algumas situações pode ocorrer a transferência univalente destes elétrons, gerando espécies intermediárias, ou espécies reativas de oxigênio (EROs), devido à redução incompleta do mesmo (Figura 1). Além disso, hipóxia, isquemia-reperfusão, processos do ciclo redox como a oxidação de quinonas e metabolismo de xenobióticos, entre outros, também podem gerar EROs. Sugere-se que cerca de 2 a 3% das EROs formadas podem escapar ao sistema de *scavenging* de EROs causando danos oxidativos em componentes celulares (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).



Fonte: Ferreira; Ferreira; Duarte (2007).

Figura 1 – Distribuição de elétrons no orbital externo da molécula de oxigênio e redução deste a água com intermediárias formações de EROs na cadeia transportadora de elétrons.

Dentre as espécies reativas que podem ser formadas, destacam-se as que são radicais de oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e peroxila (RO_2), e aquelas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlet (1O_2). Além das EROs, também estão envolvidas em processos redox outras espécies intermediárias, as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como $\cdot NO$ e espécies reativas de enxofre, com importância biológica significativa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

Já foi levantada a hipótese de que alguns compostos antioxidantes sintéticos largamente utilizados na indústria podem promover o desenvolvimento de células tumorais (BOTTERWECK *et al.*, 2000), o que tem levado ao aumento da demanda por antioxidantes naturais, principalmente provenientes de plantas. De fato, as folhas das plantas vasculares e os talos das algas contêm numerosas substâncias antioxidantes, já que nas células dos organismos fotossintéticos, os mecanismos antioxidantes são mais fortemente desenvolvidos, em comparação com outras células. Nestes organismos, as membranas fotossintéticas, os tilacóides, são alvo primário para os efeitos deletérios oxidativos, por conterem lipídeos não saturados como elementos estruturais majoritários (MATSUKAWA *et al.*, 1997). Além do mais, o processo de fotossíntese leva a formação de espécies reativas de oxigênio, o que determina a necessidade de criação de mecanismos antioxidantes mais desenvolvidos (CEPOI *et al.*, 2009). Portanto, várias estratégias de proteção devem ter sido desenvolvidas nessas células.

Entretanto, sugere-se que as cianobactérias podem se mostrar mais vantajosas do que as plantas como fontes de antioxidantes, por apresentarem, como já citado, produtividade superior a qualquer outro sistema agrícola (PULZ; GROSS, 2004). Além disso, as microalgas como um todo, estão sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ e, assim, sua sobrevivência depende de uma resposta muito eficiente ao estresse oxidativo. Por essas razões, esses organismos podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais, tanto para as indústrias alimentícias como para o setor farmacêutico (MATSUKAWA *et al.*, 1997). Este fato já foi comprovado cientificamente, pois várias microalgas e cianobactérias demonstraram atividade antioxidante comparada ao antioxidante BHT (SPÍNOLA, 1997), um dos antioxidantes sintéticos mais utilizados industrialmente.

Além disso, vários trabalhos têm avaliado a atividade antioxidante de microalgas frente a diferentes modelos toxicológicos, incluindo as cianobactérias *Spirulina* (JAIME *et al.*, 2005) e *Nostoc* (CEPOI *et al.*, 2009).

Já foi constatado que os efeitos negativos da radiação UV-B sobre as cianobactérias são sempre mediadas por espécies reativas de oxigênio (HE e HADER, 2002; BABU *et al.*, 2003; WENDEHENNE *et al.*, 2004; AGARWAL *et al.*, 2005). Entre os sistemas antioxidantes desenvolvidos pelas cianobactérias sob irradiação estão as moléculas antioxidantes, como carotenóides, tocoferóis, compostos fenólicos, ácido ascórbico, glutathione reduzida e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e peroxidase (POD) (APEL e HIRT, 2004; GONG *et al.*, 2005).

Também ocorreriam migrações para escapar da radiação, e ativação de sistemas de reparo do DNA; além da síntese de pigmentos de triagem para radiação ultravioleta, tais como scytoneminas e micosporinas e os aminoácidos “micosporine like” (MAAs) (SINHA *et al.*, 2003). Mais recentemente, demonstrou-se que também seriam responsáveis pela defesa antioxidante das cianobactérias, seus pigmentos acessórios: aloficocianina, ficocianina (MADHYASTHA; SIVASHANKARIA; VATSALA, 2009) e ficoeritrina (CANO-EUROPA *et al.*, 2010).

Enquanto o papel das enzimas antioxidantes na célula dos organismos fotossintetizantes é bem estabelecido, a contribuição relativa das moléculas bioativas para a totalidade da defesa antioxidante ainda permanece obscura (WOLFE-SIMON *et al.*, 2005).

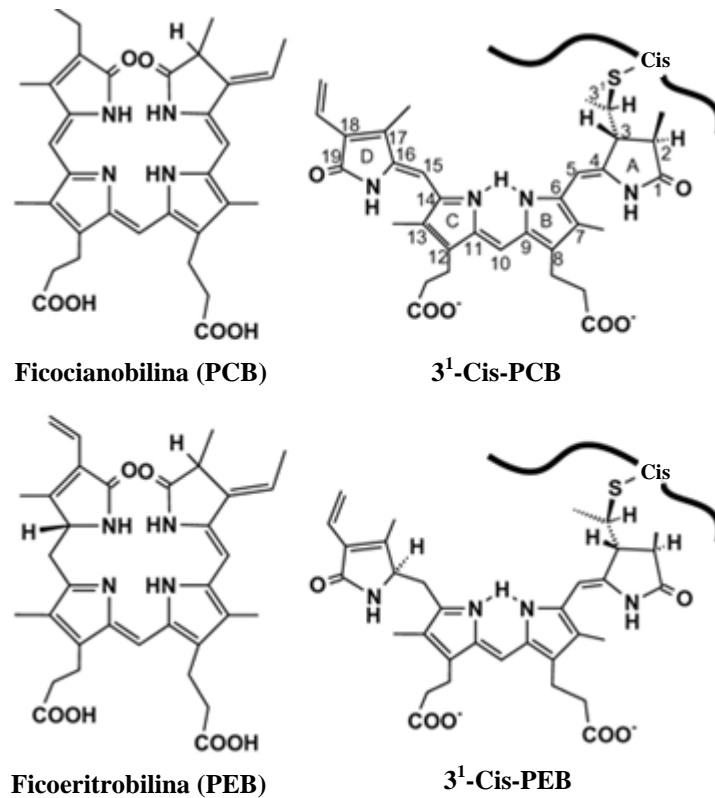
1.4 Ficobiliproteínas

As cianobactérias promovem a captação da luz através de dois tipos de sistemas antenas presentes na membrana do tilacóide, o primeiro é composto por moléculas de clorofila *a* associadas aos fotossistemas I e II; já o segundo sistema é composto por ficobiliproteínas organizadas numa estrutura denominada ficobilissomo (PBS), a qual está presente na membrana do tilacóide de algas vermelhas e cianobactérias (Figura 2). (GLAZER; MELIS, 1987). Apesar dos dois sistemas estarem na membrana tilacóide, os sistemas antenas dos ficobilissomos se situam externamente a membrana, e se movimentam transferindo a energia de excitação absorvida para os fotossistemas I (PSI) e II (PSII) (GROSSMAN *et al.*, 1993; BALD *et al.*, 1996).

O ficobilissomo é composto por dois domínios: núcleo e hastes (Figura 2). O primeiro é ligado a membrana do tilacóide e composto pela ficobiliproteína aloficocianina (Ap), o segundo está associado ao núcleo, e é composto por arranjos hexaméricos de ficoeritrina (Pe) e ficocianina (Pc). Pe absorve energia luminosa na região do verde (máximo de absorção a 565 nm) apresentando coloração vermelha, Pc absorve na região do vermelho, sendo de cor azul (máximo de absorção a 625 nm) e Ap absorve energia em luz vermelha (máximo de absorção a 650 nm) (GLAZER, 1981). O PBS de algumas cianobactérias e algas vermelhas não contém Pe; enquanto nas cianobactérias do gênero *Aphanizomenon* falta Ap, e portanto não ocorre a organização estrutural em PBS (BENEDETTI *et al.*, 2006).

destes teores, fato decorrente de uma menor taxa de síntese e/ou de um aumento da degradação. Tal comportamento conduz à proteção da célula, favorecendo o crescimento em situações que poderiam conduzir a foto-oxidação da clorofila (WYMAN; FAY, 1986).

Cada ficobiliproteína se constitui numa molécula cromófora linear tetrapirrol designada ficobilina, que por sua vez se associa covalentemente a uma apoproteína através de resíduos de cisteína (Figura 3) (ZHAO *et al.*, 2007).

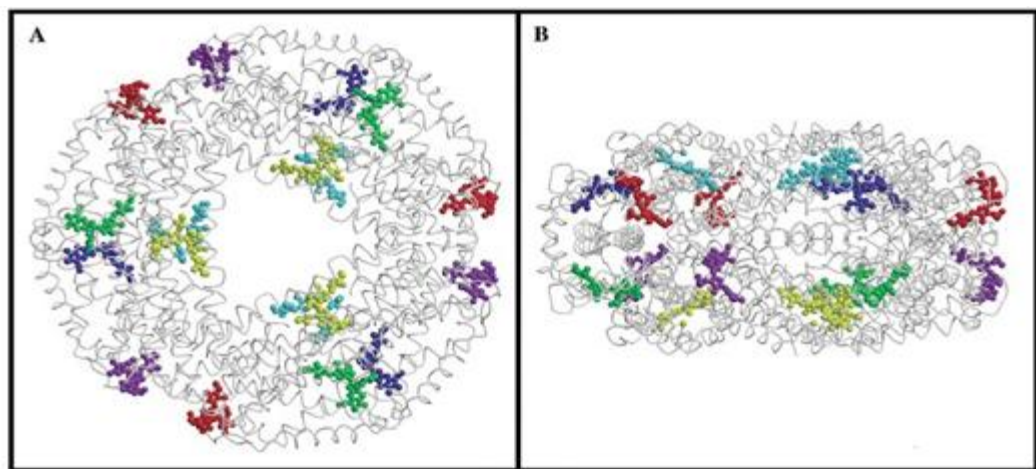


Fonte: Kai-Hong Zhao, *et al.* (2007).

Figura 3 – Moléculas cromóforas das principais ficobiliproteínas de cianobactérias.
PCB: Ficocianobilina; PEB: Ficoeritrobilina.

A ficocianina, pigmento azul, é produzida por cianobactérias e por dois grupos de algas: Rodófitas e Criptófitas. Sua estrutura química (Figura 4) se baseia em duas subunidades relativamente homólogas, uma cadeia α , em que uma ficocianobilina está associada ao resíduo de cisteína 84, e uma cadeia β , em que duas ficocianobilinas estão ligadas aos resíduos de cisteína 84 e 155. Há grandes semelhanças entre as sequências de aminoácidos e a estrutura tridimensional das ficocianinas de diferentes cianobactérias e algas vermelhas. Na estrutura tridimensional funcional da Pc, as duas

subunidades α e β formam um monômero $\alpha\beta$, que por sua vez se agregam em trímeros $\alpha_3\beta_3$ e subsequentemente em hexâmeros formando discos $\alpha_6\beta_6$ com um canal central de 35 Å (NIELD, 2003). Sabe-se que também há muita semelhança entre a estrutura tridimensional das diferentes ficobiliproteínas, Pc, Pe e Apc (BREJC *et al.*, 1995). No entanto a molécula de ficoeritrina apresenta no centro do disco $\alpha_6\beta_6$ uma subunidade adicional de ~30kDa denominada γ subunidade, a qual preenche apenas parcialmente o centro da molécula (BARTON; LUKINS, 2010). Já a molécula de Ap, em comparação com a Pc e Pe apresenta deleções e inserções nos segmentos que envolvem as interações entre a proteína e o cromóforo (BREJC *et al.*, 1995).



Fonte: Nield (2003).

Figura 4 – Estrutura tridimensional da C-ficocianina da cianobactéria termofílica *Synechococcus elongatus*. Os três cromóforos de cada heterodímero $\alpha\beta$ são retratados com a mesma cor.

Sekar e Chandramohan (2008), analisando as patentes existentes envolvendo ficobiliproteínas, encontraram 236 patentes envolvendo a utilização de suas propriedades fluorescentes, 55 patentes para sua produção e 30 patentes para aplicação medicinal, alimentar e outras áreas. Pelo menos 11 grandes companhias estão envolvidas com a produção e venda de ficobiliproteínas (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

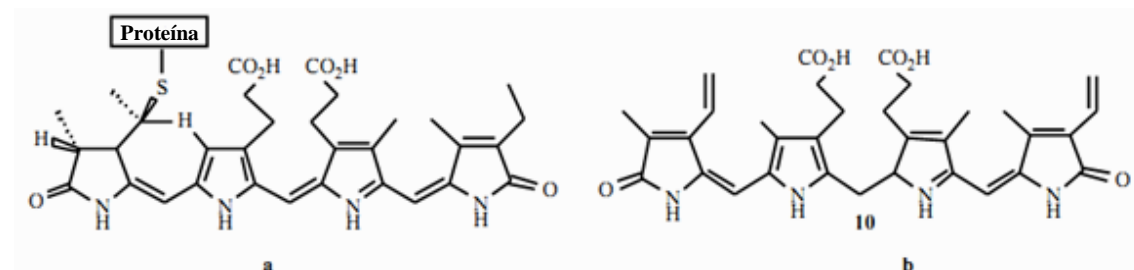
O principal papel biológico das ficobiliproteínas é o de receptores de luz durante o processo fotossintético. Recentemente têm-se discutido um papel secundário para estas moléculas, que seria o de reserva de nitrogênio, visto que são seletivamente degradadas quando as células são expostas à privação deste nutriente (SLOTH; WIEBE; ERIKSEN, 2006).

Têm sido intensivamente estudadas as propriedades antioxidantes das ficobiliproteínas, principalmente ficocianina. As primeiras investigações acerca destas propriedades se basearam nas semelhanças que ocorrem entre as estruturas químicas das ficobiliproteínas e a molécula de bilirrubina (Figura 5), importante composto antioxidante nos sistemas biológicos. A bilirrubina inibe a modificação oxidativa de proteínas e aminoácidos aromáticas no plasma. Tem sido mostrada a eliminação de radicais de oxigênio pela bilirrubina para proteção da albumina, bem como de outros alvos biológicos. Vários trabalhos *in vitro* com diferentes metodologias experimentais têm comprovado que a Pc é eficiente na remoção de radicais livres de oxigênio e também reage com outros antioxidantes importantes em processos patológicos, tais como HOC e ONOO⁻ (ROMAY *et al.*, 2003). No trabalho de Patel *et al.* (2006), a Pc demonstrou alta reatividade contra radicais peroxil, a qual foi atribuída ao alto grau de conjugação de duplas ligações do cromóforo, o que favorece fortemente a estabilização dos radicais. Já foi demonstrado também que a molécula de Pe tem capacidade de eliminar radicais superóxido, NO e hidroxila, bem como de prevenir a peroxidação lipídica *in vitro*, e que a molécula tetrapirrol é a principal responsável pelo sequestro dos radicais (SONI *et al.*, 2008).

A despeito dos conhecidos mecanismos antioxidantes exercidos pelos carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos, há três hipóteses principais pelas quais as ficobiliproteínas exerceriam seu efeito protetor nas células animais. A primeira seria devido à própria estrutura química de tetrapirroles lineares que atuariam como nucleófilos, neutralizando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; essa hipótese tem sido demonstrada tanto *in vitro* (BERMEJO-BESCOS *et al.*, 2008), quanto *in vivo* (SATHYASAIKUMAR *et al.*, 2007). A segunda se deveria às propriedades quelantes de minerais; e a terceira envolveria o incremento do sistema enzimático antioxidante, pelo aumento da atividade detoxificadora da catalase medida pela diminuição da quantidade de H₂O₂ (GALLARDO-CASAS *et al.*, 2010). Esta última hipótese, de acordo com Cano-Europa *et al.* (2010) se deveria ao fato das estruturas tetrapirroles das ficobiliproteínas funcionarem de maneira análoga a catalase, mimetizando sua função através da diminuição do teor de H₂O₂.

A possibilidade de contribuição da porção apo-proteína no total da atividade antioxidante da Pc, não pode ser descartada, já que essa porção contém resíduos de aminoácidos antioxidantes. Tem sido sugerido que triptofano, tirosina e histidina podem capturar radicais peroxil em ambientes menos polares (PATEL *et al.*, 2006).

Valores de IC₅₀ (concentração inibitória mínima, necessária para capturar 50% do radical livre) de 6,63 µM foram identificados para Pc durante testes de eliminação de radicais peroxil, o que a torna tão eficiente quanto o ácido úrico, um importante antioxidante fisiológico (PATEL *et al.*, 2006).



Fonte: Romay *et al.* (2003).

Figura 5 – Estrutura química da ficocianina (a) e bilirrubina (b).

Apesar do papel bem estabelecido das ficobiliproteínas como antioxidantes em testes *in vitro* e *in vivo*, ainda não temos conhecimento se as mesmas exerceriam esse papel também em seus organismos produtores, como ocorre, por exemplo, com os carotenóides. Aráoz e Häder (1999) relataram que Pe apresenta menor sensibilidade à fotodegradação do que Pc e Ap, e que por isso teria papel fundamental na fotoproteção de cianobactérias. Essa afirmação pode ser embasada pelo fato de que a energia solar e artificial UV-B induzem a um aumento significativo na emissão de fluorescência pela Pe de *Nostoc* sp., fazendo com que uma quantidade significativa de energia não seja transferida ao PSII prevenindo o dano oxidativo ao aparato fotossintético e a moléculas alvo (ARÁOZ; HÄDER, 1999). Resultados anteriores mostraram também, que cepas DC2 de *Synechococcus* acumulam Pe sob condições de alta intensidade luminosa, liberando a maior parte da energia absorvida na forma de fluorescência (WYMAN *et al.*, 1985).

Com relação à susceptibilidade ao dano oxidativo, o foto-branqueamento de ficobiliproteínas, especialmente Pc, ocorreu mais cedo e mais rapidamente do que o foto-branqueamento de clorofila em células de *Anabaena* submetidas ao estresse oxidativo (HE *et al.*, 2002).

As cianobactérias alteram suas taxas de crescimento em resposta às variações de intensidades luminosas. Normalmente, a taxa de crescimento varia de forma direta com a intensidade luminosa, tendendo a uma estabilização ou até mesmo a uma queda após

certo ponto, de acordo com a espécie estudada (WYMAN; FAY, 1986). Este fato é decorrente de uma adaptação a intensidades luminosas mais baixas (DONKOR; HADER, 1991), já que a radiação causa danos aos sistemas-antena e fotodegradação do aparato celular (CARR; WHITTON, 1982).

Tanto a qualidade da luz, quanto a quantidade de luz podem influenciar a composição do PBS. Em geral, altas taxas de intensidade luminosa resultam em diminuição do número de proteínas cromóforos no complexo e uma diminuição do número de PBS por célula, assim como de clorofila *a* (PORTER *et al.*, 1978; WYMAN; FAY, 1986; SENDERSKY *et al.*, 2005). Em aumentos iniciais de intensidade luminosa pode não haver modificação nos teores de clorofila e ficobiliproteínas por unidade de célula, em contrapartida à medida que a intensidade luminosa aumenta há uma redução destes teores, fato decorrente de uma menor taxa de síntese e/ou de um aumento da degradação. Tal comportamento conduz a proteção da célula, favorecendo o crescimento em situações que poderiam conduzir a foto-oxidação da clorofila (WYMAN; FAY, 1986).

As intensidades luminosas nas quais a taxa de crescimento alcança o máximo são extremamente variadas para as diferentes espécies. O trabalho de Wyman e Fay (1986) demonstrou que *Gloeotrichia echinulata* CC1 obteve máxima taxa de crescimento a 20 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, a qual se manteve estável até 184 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$; já para *Oscillatoria redekei*, *A. circinalis*, *Microcystis aeruginosa* 7806 e *Anabaena solitaria* a maior taxa ocorreu a 50-60 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$. Raps *et al.* (1983) analisando a taxa de crescimento de *M. aeruginosa* UV-027 constatou que esta taxa aumentou sem alcançar saturação a medida que a intensidade luminosa variava de 20 até 565 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$. *Nostoc commune* atingiu máxima taxa de crescimento e produção de biomassa a 33 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ (BRIONES; MARTINEZ-GROSS, 1994); enquanto que para *Spirulina platensis* isso ocorreu em intensidade de luz maior ou igual a 465 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ até 1500 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ (OLAIZOLA; DUERR, 1990).

1.5 Carotenóides

Os carotenóides são subdivididos em dois subgrupos: carotenos e xantofilas. São compostos basicamente por hidrocarbonetos com estruturas cíclicas em ambas as extremidades da molécula. Diferentemente dos carotenos, as xantofilas apresentam grupos polares contendo moléculas de oxigênio, tais como hidróxi, ceto ou epóxi, o que

facilita a solubilização em água, ao passo que os carotenos só se encontram em solução quando associados a proteínas (SÖZER, 2011).

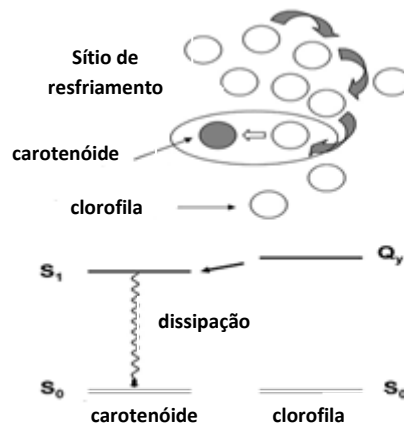
Os carotenóides funcionam como pigmentos antenas acessórios, pois absorvem e transferem a energia para moléculas de clorofila, aumentando dessa maneira a eficiência da fotossíntese. Além disso, são tidos como a primeira linha de defesa da célula contra o dano oxidativo durante a fotossíntese (STEIGER *et al.*, 1999). Por este fato, são produzidos por todos os organismos fotossintetizantes: plantas, algas e cianobactérias, e ainda por muitas espécies de bactérias não fotossintéticas, sendo que já foram descritos mais de 700 tipos diferentes de carotenóides (YUEHUI *et al.*, 2010).

A maioria dos carotenóides possui um sistema de duplas ligações conjugadas responsáveis por sua atividade antioxidante (SIES; STAHL, 1995), sendo a capacidade antioxidante potencializada com o aumento do número destas ligações (CONN *et al.*, 1991).

Os carotenóides são conhecidos como excelentes desativadores de espécies reativas de oxigênio e sequestradores de radicais livres. A desativação de oxigênio singlete ocorre através da transferência de energia, podendo tal processo ser físico ou químico. A desativação física envolve a transferência de energia de excitação do oxigênio singlete O_2 para o carotenóide, resultando em formação de oxigênio no seu estado fundamental O_2 e carotenóide em estado triplete excitado. A energia do carotenóide em estado triplete é dissipada através de interações rotacionais e vibracionais entre o carotenóide e o solvente, para recuperar o estado fundamental do mesmo, sem ocorrer degradação (RIOS *et al.*, 2009). Em contraste com a desativação física, o processo químico resulta em destruição do cromóforo e formação de produtos de oxidação com a possibilidade de reações de adição (RIOS *et al.*, 2009).

Radicais de oxigênio, como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-), podem ser reduzidos pelo β -caroteno devido à capacidade do carotenóide em doar elétrons para espécies reativas de oxigênio (RIOS *et al.*, 2009).

Nos seres fotossintetizantes sob excesso de intensidade luminosa, os carotenóides extinguem o oxigênio singlet e a clorofila em estado excitado através da dissipação da energia em forma de calor (Figura 6). O β -caroteno pode suprimir o oxigênio singlet gerado dentro do centro de reação do fotossistema II (TELFER *et al.*, 1994).



Fonte: Berera *et al.*(2009).

Figura 6 – Mecanismo de fotoproteção exercido pelos carotenóides. A energia captada por moléculas de clorofila migra dentro do sistema de um pool de moléculas até chegar a um sítio de resfriamento, onde é dissipada como calor. A clorofila transfere energia para carotenóides em estado S1, que dissipam esta energia pelo decaimento para o estado fundamental S₀ em um prazo de poucos picosegundos.

A absorção da radiação UV por uma molécula de carotenóide excita-a de um estado fundamental (S₀) para estados denominados singlet (S₁ e S₂). As moléculas de carotenóides em estado excitado também podem doar energia para moléculas de clorofila vizinhas excitando-as igualmente a um estado singlet. Essa transferência é chamada de transferência de energia singlet → singlet, e é o mecanismo pelo qual os carotenóides funcionam como pigmentos antenas acessórios. Já o mecanismo de fotoproteção funciona de maneira análoga, mas o fluxo de energia tem o sentido inverso, da clorofila convencionalmente denominada Q_x para S₂, ou da clorofila Q_y para S₁ (RITZ *et al.*, 2000); em alguns complexos, ambas as vias estão ativas (MACPHERSON *et al.*, 2001).

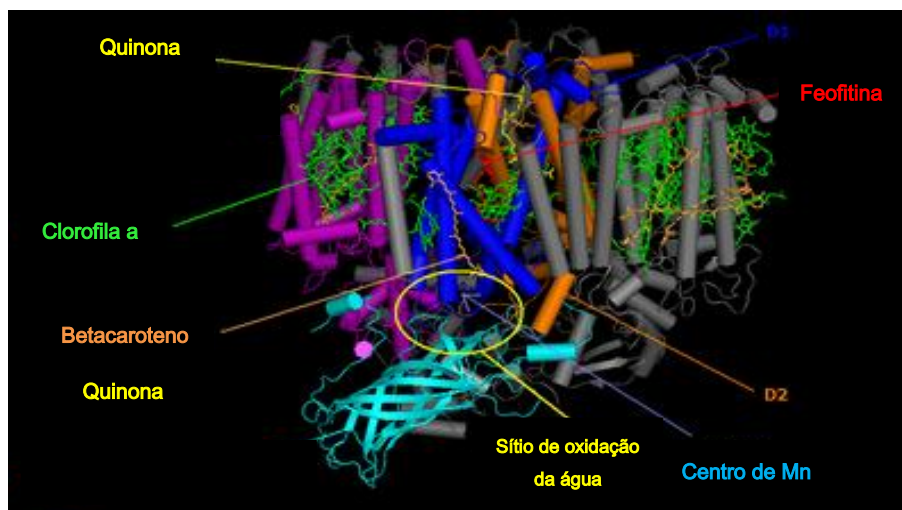
No mecanismo de fotoproteção exercido pelos carotenóides, quando um excesso de energia é transmitido à molécula de clorofila esta passa do estado singlet para triplet, contendo elétrons desemparelhados; estes podem reagir com a molécula de oxigênio, produzindo oxigênio singlet, uma espécie muito reativa que é formada principalmente dentro do fotosistema II. O dano foto-oxidativo pode resultar em oxidação de lipídios (HAVAUX *et al.*, 1996), proteínas e pigmentos (FORMAGGIO *et al.*, 2001), o que pode levar a fotoinibição da maquinaria fotossintética e fotodegradação. Neste momento, os carotenóides podem agir de duas maneiras: ou pela supressão do estado triplet da clorofila (transferência triplet → triplet) (SCHODEL *et al.*, 1999), ou por

eliminação do próprio oxigênio singlet (FARMILO; WILKINSON, 1973). Posteriormente, o carotenóide em estado S_2 pode ser convertido a S_1 e posteriormente a S_0 e/ou S_1 pode ser convertido diretamente a S_0 dissipando energia na forma de calor. A eficiência global da transferência de energia varia de organismo para organismo (BERERA *et al.*, 2009).

Para uma transferência eficiente triplete-triplete entre clorofila e carotenóides ambas as moléculas devem ser colocadas em contato, o que é favorecido por interação com proteínas (COGDELL; FRANK, 1987). No PSII, os β -carotenos não podem eliminar o estado triplet da clorofila P680 por transferência triplete-triplet, por não estarem próximos a ela; ao invés disso, sequestram o oxigênio singlete, que é formado pela interação do estado triplet da P680 com o oxigênio molecular. Em ambos os casos os carotenóides triplet são formados e depois “relaxados” para seu estado fundamental pela dissipação de calor (SÖZER, 2011).

Em cianobactérias o β -caroteno é o carotenóide majoritário. Os derivados hidroxilados, zeaxantina e nostoxantina, os ceto derivados como equinenona e cataxantina, além dos carotenóides glicosilados, mixol 2-glicosídeos e oscillool 2,2-diglicosídeos também estão entre os principais. Algumas espécies não sintetizam carotenóides específicos pela ausência de genes, enzimas ou vias biossintéticas, como no caso de *Nostoc punctiforme* que apesar de possuir β -caroteno, apresenta pouca ou nenhuma zeaxantina (TAKAICHI; MOCHIMARU, 2007). Ao contrário das plantas superiores as cianobactérias não podem sintetizar α -caroteno, incluindo seu derivado dihidroxi, a luteína (STEIGER *et al.*, 1999).

Com relação à localização dos carotenóides nas células das cianobactérias, estes se situam no próprio aparato fotossintético, nas membranas celulares e dos tilacóides, além da parede celular e do citoplasma. No que concerne às membranas, é sabido que não ocorre uma distribuição uniforme dos carotenóides através destas; as membranas citoplasmáticas de *Synechocystis*, por exemplo, contém 62% de mixoxantofila e 30% de zeaxantina, contudo as membranas dos tilacóides são enriquecidas com β -caroteno e hidroxi-carotenóides, principalmente zeaxantina; sendo que seus fotossistemas I e II contém somente β -caroteno. O fotossistema II da cianobactéria *T. elongatus*, por exemplo, é composto de 20 subunidades, entre os 99 cofatores há 35 clorofilas a e 11 moléculas de β -caroteno (Figura 7) (GUSKOV *et al.*, 2009).

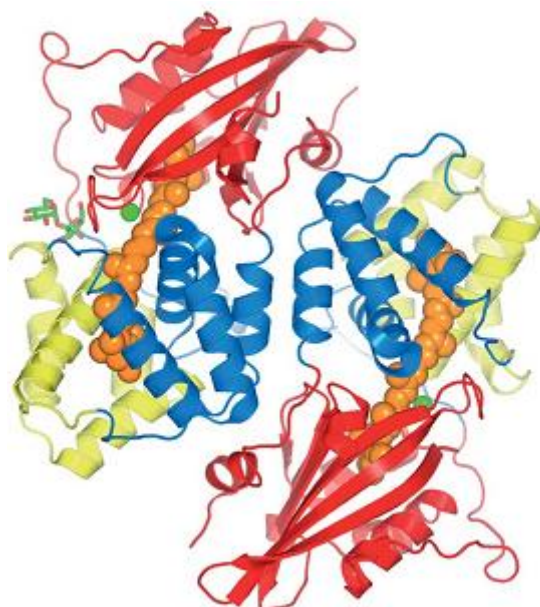


Fonte: Guskov *et al.* (2009).

Figura 7 – Fotossistema II da cianobactéria *T. elongatus*, monômero.

Tem-se bem estabelecido também, que a composição carotenóidica depende das condições de desenvolvimento, tais como estágio de crescimento, intensidade luminosa, fonte e concentração de nitrogênio na cultura, assim como a espécie e os tipos de cepa (TAKAICHI; MOCHIMARU, 2007). Portanto, sugere-se que alguns carotenóides somente sejam produzidos pela célula em situações de crescimento bem definidas. Já foi demonstrado que a intensidade luminosa estimula a expressão de genes relacionados à biossíntese de carotenóides, principalmente no que concerne às altas intensidades luminosas (SCHÄFER *et al.*, 2006). Vários trabalhos já reportaram o aumento do teor de carotenóides em cianobactérias, em resposta ao aumento da irradiância de maneira a prevenir o dano oxidativo (RUCKER *et al.*, 1995; NIGOYI *et al.*, 1997; MISKIEWICZ *et al.*, 2000). De fato, essa parece ser a resposta primordial na maioria das cianobactérias já estudadas.

Os componentes dos fotossistemas estão sujeitos a um rápido *turnover* em resposta a alta intensidade luminosa. Os níveis de transcrição do fotossistema II, polipeptídeo D1 e a proteína OCP (Orange Carotenoid Protein) (Figura 8) são similarmente aumentados em resposta ao tratamento sob altas irradiâncias (HIHARA *et al.*, 2001). A proteína OCP teria função de transportar carotenóides para a membrana citoplasmática ou para a membrana externa, e se ligaria covalentemente à parede celular. A OCP seria em forma de dímero e alinharia duas moléculas de carotenóides quase paralelamente uma à outra (KERFELD, 2004).



Fonte: Kerfeld (2004).

Figura 8 – Um dímero da proteína OCP. Pode-se observar a forma assimétrica do dímero, bem como a presença de uma molécula de carotenóide (coloração amarela/laranja) no centro de cada unidade monomérica.

Em contrapartida, a literatura já relatou diminuição no teor de carotenóides em altas intensidades luminosas, ocasionado por aumentos da degradação por fotooxidação. Sabe-se que a fotooxidação pode estimular a síntese de novo, no entanto a restauração do conteúdo de carotenóides pode não ser atingida (STEIGER *et al.*, 1999). Outros trabalhos não indicaram aumento da síntese de carotenóides em maiores irradiancias (TANDEAU de MARSAC; HOUMARD, 1993; MISKIEWICZ *et al.*, 2000; LORETO *et al.*, 2003), o que pode indicar utilização de outro processo de aclimação ou controle da fotooxidação dos pigmentos.

Em adição, sabe-se que a máxima acumulação de carotenóides na célula se dá durante a fase estacionária, fato relacionado ao envelhecimento da cultura, o que seria um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo.

Embora sofram forte competição com os carotenóides sintéticos produzidos na Europa e EUA, os extratos naturais de carotenóides continuam tendo seu lugar no mercado internacional, como é o caso do urucum, açafrão e páprica (MULLER *et al.*, 2003). De fato, atualmente, os carotenóides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas. Entretanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse pelos carotenóides obtidos naturalmente. Além da conotação natural, os produtos obtidos por produção

microbiana podem ser obtidos em curto prazo, com possibilidade de utilização de substratos de baixo custo; utilização de pequeno espaço para produção, não estando sujeitos às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, além de possibilitarem maior controle das condições de cultivo (VALDUGA *et al.*, 2009).

Um exemplo da viabilidade da produção biotecnológica de um carotenóide está na produção de astaxantina, carotenóide muito utilizado na aquicultura, especialmente na criação de salmões, trutas e crustáceos, pois estes organismos não são capazes de sintetizar carotenóides e a deposição da astaxantina em seus tecidos é muito mais eficiente quando comparado a outros carotenóides; a maioria dos criadores utiliza astaxantina sintética. Contudo, o custo deste insumo sintético é elevado, aliado ao fato de que suas formulações podem conter configurações isoméricas indesejadas, diminuindo sua eficiência na pigmentação (LATSCHA, 1990).

1.6 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. Suas estruturas são variáveis e, portanto multifuncionais, englobando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Os fenólicos nos vegetais estão presentes na forma livre ou unidos a açúcares e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são interruptores de radicais livres, muito eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI, JANITHA; WANASUNDARA, 1992), devido sua habilidade de doar um átomo de hidrogênio ou elétron formando radicais intermediários estáveis (HAJIMAHMOODI, 2010). Os compostos fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, o que favorece a abstração do seu hidrogênio (DECKER, 1998).

Apesar do exposto, ainda não há informações suficientes na literatura sobre fenóis individuais e hidroxibenzaldeídos em algas ou cianobactérias ou sobre suas funções fisiológicas em organismos humanos (L. ONOFREJOVÁ *et al.*, 2010). Em algas já está bem caracterizado que os compostos fenólicos são um importante grupo de metabólitos secundários, que possuem papel na defesa celular contra estresses abióticos

como a radiação UV e bióticos como a interação com patógenos (KLEJDUS *et al.*, 2009).

No trabalho de Nagata, Goss e Hori (2007) foram determinados o teor de fenóis totais e de polifenóis precipitáveis em *Nostoc commune* coletados em três diferentes regiões. O teor de fenólicos totais, determinado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, foi significativo, pois variou de 0,85 a 1,1%, com base na matéria seca para todas as amostras; os polifenóis precipitáveis medidos foram: 4,0, 4,32 e 4,8 mg de tanino.g⁻¹ base seca.

A maioria dos trabalhos contidos na literatura, utiliza para determinação de fenóis totais o ensaio de Folin-Ciocalteu, (NAGATA, GOSS; HORI, 2007). No entanto, é mencionado que este ensaio não seria específico para fenóis, mas poderia reduzir também substâncias não fenólicas como ácido ascórbico, aminas aromáticas e vários metais (CEPOI *et al.*, 2009).

Hajimahmoodi *et al.* (2010) utilizaram diferentes solventes extratores com diferentes polaridades (hexano, etil acetato, água), para análise da atividade antioxidante e do teor de fenólicos totais de 23 microalgas e constataram que os fenólicos se concentravam principalmente na fração aquosa.

Os dados disponíveis que correlacionam ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) com o conteúdo de compostos fenólicos em cianobactérias e algas são escassos e contraditórios. Por exemplo, Jimenez-Escrig *et al.* (2001) descreveram uma significativa relação entre a capacidade antioxidante e o teor fenólico total; e Abd El-Baky; El Baz e El-Baroty (2009) atribuíram a atividade antioxidante de *Spirulina máxima* ao conteúdo de compostos fenólicos, já que neste estudo a IC₅₀, para extratos fenólicos de *S. Máxima* foi muito superior a IC₅₀ dos antioxidantes sintéticos mais utilizados. Entretanto, os trabalhos de Li *et al.* (2007) e Hajimahmoodi *et al.* (2010) mostraram resultados opostos para esta correlação, para três solventes extratores. Sendo assim, ainda não há conclusão definitiva para o papel dos compostos fenólicos na capacidade antioxidante de cianobactérias, e mais estudos são requeridos. Cepoi *et al.* (2009) afirmam que esta correlação existiria somente para plantas superiores, onde os compostos fenólicos dominam quali e quantitativamente.

Com relação a biossíntese de compostos fenólicos, de acordo com o trabalho de Onofrejová *et al.* (2010) é provável que a biossíntese de fenóis simples seja dependente de fenilalanina tanto em cianobactérias e algas, quanto em plantas superiores. Entretanto, o espectro e a concentração de fenóis podem ser diferentes em algas em

relação às plantas terrestres. A distribuição da enzima L-fenilalanina amônia liase, assim como sua atividade em diferentes cianobactérias e algas precisa ser investigada em mais detalhes para confirmar esta hipótese. Quando comparadas às algas, as cianobactérias sintetizam fenóis *in vivo* em baixos níveis; sugere-se que isso se deva ao fato das primeiras serem mais avançadas evolutivamente, tendo as vias metabólicas relacionadas aos fenóis mais desenvolvidas.

Em *Nostoc* já se identificou os seguintes compostos fenólicos: ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldeído e 3,4 dihidroxibenzaldeído (KLEJDUS *et al.*, 2009). Para *Spirulina maxima* por meio da análise do conteúdo fenólico por HPLC, detectou-se a presença de ácidos fenólicos e poucos compostos flavonóides. Os ácidos fenólicos mais abundantes em *Spirulina* foram: gálico, clorogênico, cinâmico, p-OH-benzóico, cafeico, vanílico e ácidos ferrúlicos (Abd El-Baky; El Baz e El-Baroty, 2009). Já Miranda *et al.* (1998) encontraram para *Spirulina* os seguintes compostos fenólicos: salicílico, trans-cinâmico, sináptico, clorogênico e cefeico.

Tanto as plantas, quanto as cianobactérias mudariam seu metabolismo fenólico sob radiação UV-B (BOOIJ-JAMES *et al.*, 2000).

1.7 Referências Bibliográficas

ABD EL-BAKY, H.H.; EL BAZ, F.K.; EL-BAROTY, G.S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 24, p. 7059-7067, 2009.

AGARWAL, S.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C.; TYAGI, A. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. **Plant Science**, v. 169, n. 3, p. 559-570, 2005.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista - Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ARAOZ, R.; HÄDER, D.P. Phycoerythrin synthesis is induced by solar UV-B in the cyanobacterium *Nostoc*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 223-229, 1999.

BABU, T.S.; AKHTAR, T.A.; LAMPI, M.A.; TRIPURANTHAKAM, S.; DIXON D.G.; GREENBERG, B.M. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 1320-1329, 2003.

BACKASCH, N.; SCHULZ-FRIEDRICH, R.; APPEL, J. Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 758-766, 2005.

BALD, D.; KRUIP, J.; RÖGNER, M. Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: how is the phycobilisome connected with the photosystems? **Photosynthesis Research**, v. 49, p. 103-118, 1996.

BARTON, C.S.; LUKINS, P.B. STM of isolated complexes of R-Phycoerythrin: direct observation of the γ -subunit at the centre of the complex. **Micron**, v. 41, p. 915-918, 2010.

BECKER, E.W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A., editor. Handbook of Microalgae Culture. **Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235-241, 1993.

BENEDETTI, S. RINALDUCCI, S.; BENVENUTI, F.; FRANCOGLI, S.; PAGLIARANI, S.; GIORGI, L.; MICHELONI, M.; D'AMICI, G. M.; ZOLLA, L.; CANESTRARI, F. Purification and characterization of phycocyanin from blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **The Journal of Chromatography**, v. 833, p. 12-1, 2006.

BERMEJO-BESCOS, P.; PINERO-ESTRADA, E.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-

induced toxicity in SH-SY5Y neuro-blastoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1496-1502, 2008.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; ILVEIRA, J.L.B.; Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do CEPPA**, Curitiba v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BERERA, R., GRONDELLE, R.V.; KENNIS, J.T.M. Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems. **Photosynthesis Research**, v. 101, p. 105–118, 2009.

BOOIJ-JAMES, I.S.; DUBE, S.K.; JANSEN, M.A.K.; EDELMAN, M.; MATTOO, A. K. Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1275-1283, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **VII Lista dos novos ingredientes aprovados** – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, 2008.

BREJC, KATJUŠA. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of a phycocyanin from the Cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 249, p. 424-440, 1995.

BRIONES-NAGATA, M.P.; MARTINEZ-GOSS, M.R.; HORI, K.J. A comparison of the morpho-cytology and chemical composition of the two forms of the cyanobacterium, *Nostoc commune* Vauch., from the Philippines and Japan. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 675, 2007.

BURJA, M.A.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J.G.; WRIGHT, P.C. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, n. 590, p. 9347-9377, 2001.

CAMPBELL, D. Complementary chromatic adaptation alters photosynthetic strategies in the cyanobacterium *Calothrix*. **Microbiology**, v. 142, p. 1255-1263, 1996.

CANO-EUROPA, E.; ORTIZ-BUTRÓN, R.; GALLARDO-CASAS, C.A.; BLAS-VALDIVIA, V.; PINEDA-REYNOSO, M.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; FRANCO-COLIN, M. Phycobiliproteins from *Pseudanabaena tenuis* rich in c-phycoerythrin protect against HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. **The Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 495-501, 2010.

CARR, N.G.; WHITTON, B.A. Interactions of cyanobacteria with light. In *The Biology of Cyanobacteria*. Edited by N. G. Carr & B. A. Whitton. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*, v. 19, p. 9-45, 1982.

CEPOI, L.; RUDI, L.; MISCU, V.; COJOCARI, A.; CHIRIAC, T.; SADOVNIC, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Analele Universitatii din Oradea. Fascicula Biologie*, v. 2, p. 43-48, 2009.

- COGDELL, R.J.; FRANK, H.A. How carotenoids function in photosynthetic bacteria. **Acta Biochim Biophys**, n. 895, p. 63-79, 1987.
- CONN, P.F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T.G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **The Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 11, p. 41-47, 1991.
- DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 22, p. 151-175, 1998.
- DECKER, E.A. Strategies for manipulating the prooxidative/ antioxidant balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 241-248, 1998.
- DODDS, W.K.; GUDDER, D. A. The ecology of *Nostoc*. **Journal of Phycology**, n. 31, 1995.
- DONKOR, V.; HADER, D.P. Effects of solar and ultraviolet radiation on motility, photomovement and pigmentation in filamentous, gliding cyanobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 86, p. 159-168, 1991.
- EVETS, L.B. Means to normalise the levels of immunoglobulin E, using the food supplement *Spirulina*. Grodenski State Medical university Russian federation committee of patents and trade. Patent (19) RU (11) , 1994.
- FALQUET, J. The Nutritional Aspects of *Spirulina*. **Antenna Technology**, 1997. Disponível em: http://www.antenna.ch/UK/Aspect_UK.htm.
- FARMILO, A.; WILKINSON, F. On the mechanism of quenching of singlet oxygen in solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 18, p. 447-450, 1973.
- FORMAGGIO, E.; CINQUE, G.; BASSI, R. Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 1157-1166, 2001.
- GALLARDO-CASAS, C.A. CANO-EUROPA, E.; LÓPEZ-GALINDO, G.E.; BLAS-VALDIVIA V.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; FRANCO-COLÍN, M.; ORTIZ-BUTRÓN, R. Phycobiliproteins from *Spirulina maxima* and *Pseudanabaena tenuis* protect against hepatic damage and oxidative stress caused by Hg²⁺. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 41, n. 2, p. 30-35, 2010.
- GANTAR, M.; SVIRČEV, Z. "Microalgae and cyanobacteria: Food for thought." **Journal of Phycology**, 44, p. 260-268, 2008.
- GAO, K. Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 37-49, 1998.
- GLAZER, A.N. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic, p. 51-96, 1981.

- GLAZER, A.N.; MELIS, A. Photochemical reaction centers: structure, organization, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p.11-45, 1987.
- GRASSES, T.; GRIMM, B.; KOROLEVA, O.; JAHNS, P. Loss of alpha-tocopherol in tobacco plants with decreased geranyl- geranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. **Planta**, v. 213, n. 4, p. 620-628, 2001.
- GROSSMAN, A.R.; SCHAEFER, M.R.; CHIANG, G.G.; COLLIER, J.L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiology Reviews**, v. 57, p. 725-749, 1993.
- GUSKOV, A. KERN, J.; GABDULKHAKOV, A.; BROSER, M.; ZOUNI, A.; SAENGER, W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, p. 334-342, 2009.
- HABIB, M.A.B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T.C.; HASAN. M.R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food humans and feeds for domestic animals and fish. **Food and agriculture Organization of the United Nations**, v. 33, n. 1034, p. 28-32, 2008.
- HAJIMAHMOODI, M.; FARAMARZI, M.A.; MOHAMMADI, N.; SOLTANI, N.; OVEISI, M.R.; NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 43-50, 2010.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3. ed., Oxford: **Oxford Science Publications**, 1998.
- HAVAUX, M.; TARDY, F.; RAVENEL, J.; CHANU, D.; PAROT, P. Thylakoid membrane stability to heat stress studied by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves: influence of the xanthophyll content. **Plant, Cell & Environment**, v. 19, p. 1359-1368, 1996.
- HE, Y.Y.; KLISCH, M.; HÄDER, D. P. Photochemistry and photobiology, adaptation of Cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 2, p. 188-196, 2002.
- HIHARA, Y.; KAMEI, A.; KANEHISA, M.; KAPLAN, A.; IKEUCHI, M. DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. **Plant Cell**, v. 13, p. 793-806, 2001.
- HENRIKSON, R. Earth food *Spirulina*. San Rafael, California, USA, Ronore, Enterprises, Inc, Laguna Beach, CA, 1989.
- INOUE, S.; EJIMA, K.; IWAI, E.; HAYASHI, H.; APPEL, J.; TYYSTJÄRVI, E.; MURATA, N.; NISHIYAMA, Y. Protection by α -tocopherol of the repair of photosystem II during photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 236-241, 2011.

JAIME, L.; MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M., SOLER-RIVAS, C.; SANTOYO, S.; SEÑORANS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 16, p. 2111-2119, 2005.

JIMENEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 5, p. 530-534, 2001.

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, v. 31, p. 671-701, 1996.

KARKOS, P.D.; LEONG, S.C.; KARKOS, C.D.; SIVAJI, N.; ASSIMAKOPOULOS, D. A. *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 4, 2011.

KERFELD, C.A. Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, v. 81, p. 215-225, 2004.

KLEJDUS, B.; KOPECKÝ, J.; BENESOVÁ, L.; VACEK, J. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography**, v. 1216, n. 5, p. 763-771, 2009.

KNUBEL, G.; LARSEN, L.K.; MOORE, R.E.; LEVINE, I.A.; PATTERSON, G.M. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae. **Journal of Antibiotics**, v. 43, n. 10, p. 1236-1239, 1990.

LATSCHA, T. Carotenoids – their nature and significance in animal feeds. **Basel: Hoffman-La Roche Ltd.**, p. 110, 1990.

LI, H.B.; CHENG, K.W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, n. 102, p. 771-776, 2007.

LORETO, C.; ROSALES, N.; BERMÚDEZ, J.; MORALES, E. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. **Gayana Botánica**, v. 60, n. 2, p. 83-89, 2003.

MACPHERSON, A.N.; ARELLANO, J.B.; FRASER, N.J.; COGDELL, R.J.; GILLBRO, T. Efficient energy transfer from the carotenoid S-2 state in a photosynthetic light-harvesting complex. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 923-930, 2001.

MADHYASTHA, H.K.; SIVASHANKARI, S.; VATSALA, T.M. C-phycoyanin from *Spirulina fusiformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 221-224, 2009.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIHARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. A

comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, n. 9, p. 29-35, 1997.

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 31, p. 1075-1079, 1998.

MIŚKIEWICZ, E.; IVANOV, A.G.; WILLIAMS, J.P.; KHAN, M.U.; FALK, S.; HUNER, N.P.A. Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, p. 767-775, 2000.

MORAIS, M.G.; MIRANDA, M.Z. ; COSTA, J.A.V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 3, p. 323-328, 2006.

MULLER, M.C.; AMAYA, D.B.R.; LOURENÇO, S.O. Carotenóides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida condições normais e sob limitação de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, 2003.

MULLINEAUX, C.W. Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1184, p. 71-77, 1994.

NAGATA, B.M.P.; GOSS, M.M.R.; HORI, K. A comparison of the morpho-cytology and chemical composition of the two forms of the cyanobacterium, *Nostoc commune* Vauch., from the Philippines and Japan. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 6, p. 675-683, 2007.

NIELD, J. The 1.45 Å A three-dimensional structure of C-phycoyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. **Journal of Structural Biology**, v. 141, p. 149-155, 2003.

NIGOYI, K.; BJÖRKMAN, O.; GROSSMAN, R. The roof specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 14162-14167, 1997.

NÚÑEZ-SELLÉS, A.J. Antioxidant therapy: Myth or reality? **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-610, 2005.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLAIZOLA, M.; DUERR, E.O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 97-104, 1990.

ONOFREJOVÁ, L.; VASÍCKOVÁ, J.; KLEJDUS, B.; STRATIL, P.; MISURCOVÁ, L.; KRÁČMAR, S.; KOPECKÝ, J.; VACEK, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 464-470, 2010.

SÖZER, Ö. Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in cyanobacteria. Ph.D. Thesis. University of Szeged, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences Szeged, 2011.

PATEL, A.; MISHRA, S.; GHOSH, P.K. Antioxidant potential of C-phycoyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 43, p. 25-31, 2006.

PEREZ, K.J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Viabilidade de bactérias lácticas em iogurte adicionado de biomassa da microalga *Spirulina platensis* durante o armazenamento refrigerado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 1, p. 77-82, 2007.

PINOTTI, M.H.P.; SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. **Semina**, v. 12, n. 4, p. 275-280, 1991.

PORTER, G.; TREDWELL, C.J.; SEARLE, G.F.W.; BARBER, J. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact chloroplast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 501, p. 532-545, 1978.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

QUEIROZ, M.I.; SOARES, L.A.S.; KOETZ, P.R.; TREPTOW, R.O., YUNES, J.S. Avaliação do teor de proteína da *Aphanothece* sp. Caracterização em aminoácidos. IN: Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciências e **Tecnologia de Alimentos**, v.2, n. 1, p. 1089-1091, p. 100, 1998.

RAPS, S. Adaptation of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity. **Plant Physiology**, v. 72, p. 829-832, 1983.

RASMUSSEN, H.E.; BLOBAUM, K.R.; PARK, Y.K.; EHLERS, S.J.; LU, F.; LEE, J.Y. Lipid extract of *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kutzing, a blue-green Alga, inhibits the activation of sterol regulatory element binding proteins in HepG2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 3, p. 476-481, 2008.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; RAVI KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. The 80th anniversary of vitamin E: beyond its antioxidant properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 383, p. 457-465, 2002.

RIOS, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L. P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 343-350, 2009.

RODRIGUES, L.P.; JORGE, S.R.P.F.. The iron deficiency in pregnancy, labor and puerperium. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, suppl. 2, p. 53-56, 2010.

ROMAY, C.H.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein and Peptide Science**, 4, p. 207-216, 2003.

RUCKER, J.; KOHL, J.; KAISER, K. Response of carotenoids to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae. **Algological Studies**, v. 77, p. 51-65, 1995.

SATHYASAIKUMAR, K.V.; SWAPNA, I.; REDDY, P.V.B.; MURTHY, C.R.K. ; ROY, K.R.; DUTTA GUPTA, A.; SENTHILKUMARAN, B.; REDDANNA, P. Co-administration of c-phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 252, p. 67-75, 2007.

SCHÄFER, L.; SANDMANN, M.; WOITSCH, S.; SANDMANN, G. Coordinate up-regulation of carotenoid biosynthesis as a response to light stress in *Synechococcus* PCC7942. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 1349-1356, 2006.

SCHODEL, R.; IRRGANG, K.D.; VOIGT, J.; RENGER, G. Quenching of chlorophyll fluorescence by triplets in solubilized light-harvesting complex II (LHCII). **Biophysical Journal**, v. 76, p. 2238-2248, 1999.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113-136, 2008.

SENDERSKY, E.; LAHMI R.; SHALTIEL, J.; PERELMAN, A.; SCHWARZ, R. NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. **Molecular Microbiology**, v. 58, v. 3, p. 659-668, 2005.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamin-E and vitamin-C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315-1321, 1995.

SINHA, R.P.; AMBASHT, N.K; SINHA, J.P.; HÄDER, D.P. Wavelength dependent induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Nostoc commune*: role of inhibitors and salt stress. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, p. 171-176, 2003.

SLOTH, J.K.; WIEBE, M.G.; ERIKSEN, N.T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 168-175, 2006.

SMITH, C.D.; ZHANG, X.; MOOBERRY, S.L.; PATTERSON, G.M.; MOORE, R.E. Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. **Cancer Research**, n. 54, p. 3779-3784, 1994.

SONI, B.; VISAVADIYA, N.P.; MADAMWAR, D. Attenuation of diabetic complications by C-phycoerythrin in rats: antioxidant activity of C-phycoerythrin

including copper-induced lipoprotein and serum oxidation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 102, p. 102-109, 2009.

SOUZA, T.J.T.; APEL, M.A.; BORDIGNON, S.A.L.; MATZENBACHER, N.I.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 368-372, jul./set. 2007.

SÖZER, Ö. **Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in cyanobacteria**. Ph.D. Thesis. University of Szeged. Biological Research Centre. Hungarian Academy of Sciences Szeged, 2011. p. 1-90.

SPÍNOLA, M.M.P. **Antioxidantes naturais em microalgas cultivadas em condições especiais: avaliação química e biologia**. Tese apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas para obtenção do grau de Doutor. São Paulo; s. n. p. 105, 1997.

STEIGER, S.; SCHAFFER, L.; SANDMANN, G. High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 52, p. 14-18, 1999.

TAKAICHI, S.; MOCHIMARU, M. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2607-2619, 2007.

TAKENAKA, H.; SUMIYA, T.; ITO, H. Effects of hot-water extract prepared from *Nostoc flagelliforme* on macrophage activities in tumor-bearing mice. **Medicine and Biology**, n. 135, p. 231-234, 1997.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMAR, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 119-190, 1993.

TELFER, A. Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem-II reaction centers. **Biochemistry**, v. 33, p. 14469-14474, 1994.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 263-271, 2003.

WENDEHENNE, D.; DURNER, J.; KLESSIG, D.F. Nitric oxide: a new player in plant signaling and defense responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 449-455, 2004.

WOLFE-SIMON F.; GRZEBYK, D.; SCHOFIELD, O. The role and evolution of superoxide dismutases in algae. **Journal of Phycology**, v. 41, p. 453–465, 2005.

WYMAN, M.; FAY, P. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria). II. The influence of light quality. **Proceedures of the Royal Society**, v. 227, p. 381-393, 1986.

YUEHUI Z., GRAHAM, J.E.; LUDWIG, M.; XIONG, W.; ALVEY, R.M.; SHEN, G.; BRYANT, D.A. Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 504, p. 86–99, 2010.

ZHAO, K.H.; SU, P.; TU, J.M.; WANG, X.; LIU, H.; PLÖSCHER, M.; EICHACKER, L.; YANG, B.; ZHOU, M.; SCHEER, H. Phycobilin:cystein-84 biliprotein lyase, a near universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. **PNAS**, v. 104, n. 36, p. 14300-14305, 2007.

EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA SOBRE A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM *Nostoc* spp.^{1/}

RESUMO

Um dos fatores que mais interferem no metabolismo dos organismos fotossintetizantes é o nível de luz incidente, todavia para cianobactérias não são bem compreendidas as relações entre intensidade luminosa e compostos bioativos. Sob este enfoque, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência de diferentes intensidades luminosas: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 150 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, sobre os níveis dos pigmentos presentes em suas células: ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina), carotenóides e clorofila *a*. As menores intensidades se mostraram mais vantajosas em termos de rendimento de ficobiliproteínas e clorofila *a*. A diminuição do teor de clorofila *a* e ficobiliproteínas em maiores irradiâncias foi observada, sendo uma estratégia de prevenção contra o dano foto-oxidativo ocasionado pela geração de radicais livres. No entanto, para carotenóides, observou-se em alguns momentos aumento do conteúdo em maiores irradiâncias, o que reflete suas funções como dissipadores da energia luminosa absorvida em excesso e como agentes antioxidantes do aparato fotossintético. A melhor intensidade luminosa para se conduzir o cultivo de determinada cianobactéria, deve ser escolhida com base em curvas de resposta que forneçam informações sobre o rendimento de biomassa e dos compostos bioativos de interesse.

Palavras-chave: cianobactérias, *Nostoc* spp., carotenóides, clorofila *a*, ficobiliproteínas.

1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias são organismos cosmopolitas, procariotos, unicelulares e fotossintéticos; podendo assumir formas uni, multicelulares ou filamentosas; anteriormente eram denominadas algas verdes-azuis (DE PHILIPPIS; VINCENZINI, 1998). A inclusão das cianobactérias dentro da classificação de microalgas tem sido atualmente utilizada por grande parte da literatura pertinente ao assunto; a qual engloba microrganismos unicelulares fotossintéticos, tanto procarióticos quanto eucarióticos (OLAIZOLA, 2003); sendo, portanto uma definição usual, sem valor filogenético.

As cianobactérias apresentam altíssimo potencial biotecnológico, já sendo produzidas em foto-biorreatores fechados e em tanques abertos, para utilização como alimento e para obtenção de inúmeros produtos, tais como: fármacos; marcadores fluorescentes; biopigmentos; enzimas; antioxidantes; exopolissacarídeos usados como gelificantes, emulsificantes, floculantes e hidratantes; além de diversos nutrientes, como vitaminas, minerais, lipídios, carboidratos e proteínas (OTERO; VINCENZINI, 2003; TOKUSOGLU; UNAL, 2003; CEPOI, *et al.*, 2009).

Tem sido amplamente estudada a aplicação de cianobactérias que realizam a fixação biológica de nitrogênio como biofertilizantes em solos alagados, pois este processo pode substituir, parcialmente, a adição de fertilizantes nitrogenados, e reduzir os custos da produção (ROGER; KULASOORIYA, 1980; CHOUDHURY; KENNEDY, 2004).

Outras possíveis aplicações destes microrganismos incluem: inibição da replicação viral (HIRAHASHI *et al.*, 2002); atividade anticancerígena (BERTOLIN *et al.*, 2009) redução da colesterolemia (HAMIDAH *et al.*, 2009), efeito antidiabetogênico (PEREZ *et al.*, 2008); imunomodulação (RAVI *et al.*, 2010) regulação da resposta alérgica (CINGI *et al.*, 2008); aumento da absorção intestinal de vitaminas e minerais (BELAY *et al.*, 1993); acréscimo dos lactobacilos intestinais (PEREZ *et al.*, 2007); auxílio ao tratamento contra obesidade (BECKER *et al.*, 1986) e desnutrição; redução da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade por metais pesados e medicamentos (MOHAN *et al.*, 2006) além de proteção contra a radiação (LOSEVA; DARDYNSKAYA, 1993).

A biomassa microbiana usada como alimento fonte de proteínas para humanos e animais, vai ao encontro da atual preocupação mundial pela implementação de estratégias agrícolas mais produtivas e menos impactantes (MARCHESAN *et al.*,

2007). No caso específico das cianobactérias, estas se mostram extremamente interessantes, pela produtividade superior a qualquer outro sistema agrícola (PULZ; GROSS, 2004), apresentando facilidades de manipulação quando comparadas às macroalgas e plantas, sugerindo-se inclusive a possibilidade de contribuírem para o combate à desnutrição em áreas de risco.

Em cianobactérias há três grupos de pigmentos: as ficobiliproteínas, os carotenóides e a clorofila *a*. As ficobiliproteínas incluem o pigmento azul ficocianina e o vermelho ficoeritrina, e representam os maiores constituintes das algas vermelhas e cianobactérias, podendo representar até 60% do conteúdo total de proteína da célula (VISKARI; COLYER, 2003). Estes pigmentos são amplamente utilizados como marcadores fluorescentes e corantes em alimentos e cosméticos (BERMEJO, 2000; RODRÍGUEZ, 2006). Atualmente seus valores terapêuticos têm sido bem explorados, como os efeitos antiplaquetários, imunomoduladores (JENSEN, 2001), anti-diabetogênicos (SONI, *et al.*, 2009), anti-hepatotóxicos (GALLARDO-CASAS *et al.*, 2010) (JENSEN, 2001; CHIU, 2006. in: SONI, 2009), anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos, e até mesmo o efeito de reverter o fenótipo de multirresistência a fármacos de vários tipos de células tumorais (MORLIÈRE, 1998; in: RODRÍGUEZ, 2006). Pelo menos 11 grandes companhias no mundo estão envolvidas com a produção e venda de ficobiliproteínas (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008). A ficocianina também tem sido utilizada no tratamento das doenças de Parkinson e Alzheimer (RIMBAU *et al.*, 2001).

A composição de pigmentos nas diferentes espécies e cepas de cianobactérias é extremamente diversificada, assim como a resposta de sua produção para com as diferentes variáveis. Tanto a qualidade, quanto a quantidade de luz podem influenciar a composição de pigmentos e outras biomoléculas em cianobactérias (PORTER *et al.*, 1978). Os dados para a variação de ficobiliproteínas em relação à intensidade luminosa são mais abundantes. Todavia os dados com relação ao conteúdo de carotenóides versus intensidade luminosa são mais escassos e divergentes: alguns defendem o aumento total de carotenóides nas altas irradiâncias de maneira a prevenir o dano oxidativo (RUCKER *et al.*, 1995; NIGOYI *et al.*, 1997; MISKIEWICZ *et al.*, 2000), outros apontam a diminuição (MISKIEWICZ *et al.*, 2000); outros ainda, o aumento de grupos específicos de carotenóides minoritários de alto valor biotecnológico, mas com diminuição do conteúdo total (STEIGER *et al.*, 1999; SCHÄFER *et al.*, 2006). Além disso, distintos estudos apontam a ausência de alteração do conteúdo de carotenóides em relação à

intensidade luminosa (TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD, 1993; LORETO *et al.*, 2003). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da intensidade luminosa na produção de pigmentos de dois isolados de *Nostoc sp.*

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo

Foram selecionados dois isolados do gênero *Nostoc* de origem edáfica, denominados *Nostoc sp* F108 e *Nostoc sp* F105, provenientes da Coleção de Cianobactérias do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (CCLFM) da Universidade Federal de Viçosa.

As espécies foram cultivadas em diferentes intensidades luminosas, a saber: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 150 $\mu\text{moles de f\u00f3tons/m}^2/\text{s}^1$, todas obtidas através de um banco de lâmpadas fluorescentes brancas. As intensidades eram devidamente ajustadas por meio de radiômetro. As culturas foram iluminadas durante todo tempo. O cultivo se deu em processo semidescontínuo sobre a bancada. Essas intensidades foram eleitas pela frequente referência na literatura à intensidade de 30 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^1$ como padrão para o crescimento de *Nostoc sp*, sendo assim buscou-se o cultivo nessa intensidade e em outras de modo a abranger uma maior gama de tratamentos.

O cultivo se deu sobre mesa agitadora com velocidade de 110 rotações por minuto. Foram utilizados Erlenmeyers de 50 mL de capacidade contendo 20 mL de meio BG11 padrão líquido (ALLEN; STANIER, 1968, modificado por PONTES, 1988), adicionado de NaNO_3 (concentração de 1,5g/L de meio) como fonte de nitrogênio.

As células, provenientes de culturas estoques em meio BG11 sólido, eram inicialmente ativadas pela pré-inoculação durante sete dias em meio BG11 líquido; posteriormente a biomassa era centrifugada e lavada com solução salina estéril para subsequente inoculação em meio novo, onde permanecia pelo mesmo período de tempo da pré-inoculação até o momento das análises. Todo o crescimento das células, tanto pré-inoculação quanto inoculação, se deu sob a intensidade luminosa em teste.

As culturas foram mantidas em temperatura ambiente. Os tratamentos foram conduzidos em duplicata, e as análises para cada composto em cada tratamento realizadas em triplicata.

O máximo percentual inoculado nos frascos com meio BG11 líquido foi de 2% de biomassa úmida. Com intuito de prevenir a agregação das células ao centro do recipiente, fato favorecido pela agitação rotacional, o rompimento dos agregados através de fluxo por seringa estéril era promovido diariamente.

2.2 Determinação de massa seca

A determinação de massa seca foi desempenhada de acordo com Fiore *et al.* (2000). Um volume de 2 mL da suspensão celular foi centrifugado com posterior descarte do meio, sendo então promovidas duas lavagens sucessivas do centrifugado com solução salina estéril. A ressuspensão final foi também realizada em 2 mL da mesma solução, posteriormente todo este volume foi pesado em cadinhos de alumínio, previamente tarados e secos a 105 °C por 72 horas; sendo a biomassa mantida em estufa também a 105°C por no mínimo 48 horas.

Esta análise permitiu a expressão dos dados por peso seco, apesar da utilização de biomassa úmida para todos os experimentos.

2.3 Extração e quantificação de carotenóides e clorofila a

A extração foi realizada de acordo com o procedimento descrito pelo trabalho de Morales *et al* (2002), cuja análise foi também realizada para biomassa úmida de cianobactérias. Para a extração de carotenóides e clorofila, 1 mL da cultura foi centrifugada. O sedimento foi resuspendido em 1 mL de metanol 100% e mantido em escuridão durante 24 horas a 4 °C. Promoveu-se a centrifugação para coleta dos sobrenadantes, seguida da repetição do procedimento descrito até a exaustão da extração dos pigmentos, fato verificado através da descoloração da biomassa. Ao final do processo de extração, os sobrenadantes coletados foram reunidos para efeitos de dosagem. Para a quantificação de clorofila e carotenóides, o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro Beckman/DU 640 aos comprimentos de onda de 665 nm e 480 nm, respectivamente. A concentração de clorofila foi determinada segundo a equação de Marker (1972) e a de carotenóides segundo a equação de Britton (1985).

2.4 Extração e quantificação de ficobiliproteínas

A quantificação de ficobiliproteínas foi realizada de acordo com Tandeau de Marsac e Houmard (1988). Uma alíquota de 5 mL de cultura foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos, a 20 °C. A biomassa então, foi lavada por duas vezes através da

ressuspensão em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,5, com posterior descarte do sobrenadante. O centrifugado final foi novamente ressuspendido em 5 mL do mesmo tampão. Para promoção do rompimento celular, a suspensão foi submetida ao equipamento French Press[®], aplicando-se uma pressão de 800 atm, sob um fluxo de 3 a 4 gotas por segundo.

Em seguida, a 1,9 mL dos extratos livres de células rompidas foram adicionados 100 µL de solução de sulfato de estreptomicina (200 mg mL⁻¹, foram mantidos a 4 °C por 30 minutos. Após esse período, a solução foi centrifugada a 18.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi, então, suplementado com 400 µL de solução de ditiotreitol a 1 mM, um antioxidante amplamente utilizado a baixas concentrações para estabilização de enzimas e outras proteínas.

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro Beckman/DU 640 a 565, 620 e 650 nm. As concentrações de ficocianina (Pc), aloficocianina (Ap) e ficoeritrina (Pe) foram obtidas a partir dos dados de absorbância de cada amostra, utilizando as expressões adotadas por Tandeau de Marsac e Houmard (1988):

$$Pc \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = (Abs_{620 \text{ nm}} - 0,7 \times Abs_{650 \text{ nm}})/7,38;$$

$$Ap \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = (Abs_{650 \text{ nm}} - 0,19 \times Abs_{620 \text{ nm}})/5,65 \text{ e}$$

$$Pe \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = [Abs_{565 \text{ nm}} - 2,8(Pc) - 1,34 (Ap)]/12,7.$$

2.5 Análise estatística

Os valores de pigmentos nas diferentes intensidades luminosas foram comparados por análise de variância - ANOVA. O teste de Tukey foi utilizado a um nível significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 e 2 trazem os teores de massa seca e pigmentos de *Nostoc* sp F108 e F105, respectivamente, para todas as intensidades luminosas testadas.

Tabela 1 – Rendimento de biomassa e de pigmentos de *Nostoc* sp F108 cultivada em diferentes intensidades luminosas.

Intensidade luminosa	Massa seca (MS) (g mL ⁻¹)	Ficobiliproteínas (mg/g)			Carotenóides (mg g ⁻¹)	Clorofila (mg g ⁻¹)
		Pc	Pe	Ap		
0	0,0003	-	-	-	-	-
10	0,0010	39,65898	4,920618	23,04018	1,835628	16,28570
20	0,0009	41,13092	2,949197	23,12402	1,704784	14,30755
30	0,0011	28,19201	3,347753	21,85377	1,279103	9,857831
40	0,0012	15,77544	1,795576	9,877616	1,214645	8,031756
50	0,0012	13,27921	1,727922	9,065072	1,140091	6,552544
60	0,0011	8,812419	2,222516	7,393767	1,208673	5,631428
70	0,0006	17,44908	2,916087	10,56161	2,208399	10,35133
80	0,0005	18,20617	3,370218	11,72476	2,333280	10,98637
90	0,0007	13,39536	2,883983	8,247492	1,904571	7,262702
100	0,0006	14,63097	2,974503	8,393906	1,957704	6,745815
110	0,0006	15,57806	3,337073	9,82465	2,312242	6,787216
120	0,0007	11,4851	2,631617	7,587255	1,694582	4,669680
150	0,0005	11,55961	3,680488	9,058744	2,642771	6,772722

Tabela 2 – Rendimento de biomassa e de pigmentos de *Nostoc* sp F105 cultivada em diferentes intensidades luminosas.

Intensidade luminosa	Massa seca (MS) (g mL ⁻¹)	Ficobiliproteínas (mg/g)			Carotenóides (mg g ⁻¹)	Clorofila (mg g ⁻¹)
		Pc	Pe	Ap		
0	0,0006	-	-	-	-	-
10	0,0019	11,45426	21,7414	4,965386	1,523006	8,221561
20	0,0024	9,06764	16,64234	3,727695	1,317558	6,465552
30	0,0025	8,430322	15,93954	4,203403	1,342317	6,253311
40	0,0029	7,822502	13,92883	3,927251	1,23543	4,792526
50	0,0024	7,411521	16,07673	4,711618	1,737795	5,357152
60	0,0022	8,292423	13,14312	4,341824	1,924698	4,996997
70	0,0025	5,957334	11,00199	3,257482	1,758049	3,845645
80	0,0025	3,668801	9,80767	2,186524	1,693329	3,123988
90	0,0025	3,387805	9,788691	1,789381	1,641465	2,919786
100	0,0026	3,393782	3,238789	1,883809	1,625324	2,943446
110	0,0024	2,5245	3,563229	2,15729	1,71868	3,059054
120	0,0027	2,286863	2,394012	1,852165	1,544458	2,792774
150	0,0025	2,390844	2,556283	2,240269	1,662075	2,927076

O rendimento de biomassa de *Nostoc* sp F108 foi maior nas intensidades luminosas de 10 a 60 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ (gráfico 1). Não houve diferença estatística significativa entre as intensidades de 10, 20 e 60 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ e entre as intensidades de 30, 40 e 50 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$.

Vários trabalhos já foram conduzidos demonstrando que muitas espécies de cianobactérias se caracterizam por crescerem de maneira ótima a baixas ou intermediárias irradiâncias. Dentre as espécies que podem ser citadas estão: *Spirulina platensis* (BALDIA, *et al.*, 1991), *Anabaena* PCC7120 (LORETO *et al.* 2003), *Anabaena* PCC7120, *Pseudanabaena galeata* (ROMO, 1994), *Anabaena variabilis* (YOON *et al.* 2007).

Para *Nostoc* sp F105 (Gráfico 1), a intensidade com maior rendimento de biomassa foi a de 40 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$. Com excessão das intensidades de 40 e 60 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$, não há diferença estatística significativa entre todas as intensidades após 20 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

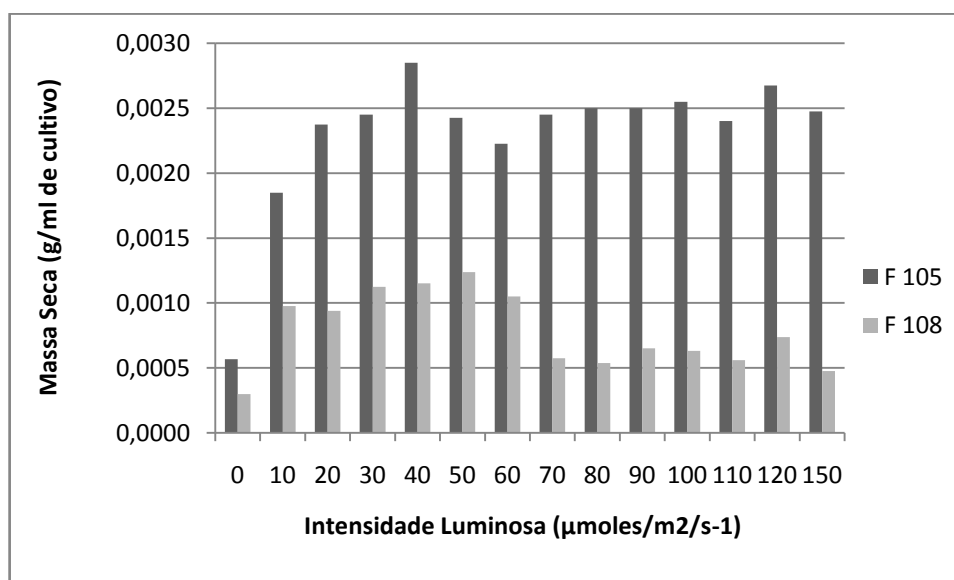


Gráfico 1 – Massa seca por mL de cultivo para *Nostoc* sp F105 e F108 sob diferentes intensidades luminosas. Os cultivos se deram sob agitação constante de 110 rpm, por sete dias, sendo promovido o rompimento diário dos agregados com fluxo por seringa.

Confrontando-se os dois isolados em relação à quantidade de biomassa produzida, pode-se verificar que *Nostoc* sp F105 apresentou para todas as intensidades valores mais elevados. A literatura reporta a possibilidade de cianobactérias de um mesmo gênero apresentarem diferentes respostas de crescimento ao incremento da irradiância (WILMOTTE, 1988).

Para *Nostoc* sp F105, ao contrário de *Nostoc* sp F108, não ocorreu uma diminuição significativa do rendimento de biomassa nas maiores intensidades em teste. Este fato é explicado pela arquitetura das colônias, mais agregadas para *Nostoc* sp F105,

o que impediria a real percepção da intensidade luminosa pelas células posicionadas ao interior da colônia, já que a agregação é um dos fatores que mais contribui para o auto-sombreamento das células. A interferência deste sombreamento foi minimizada neste trabalho através do rompimento diário dos agregados por meio de fluxos com seringa.

O aspecto macroscópico da biomassa dos dois isolados em meio de cultivo líquido difere significativamente. Apesar dos dados apresentados, visivelmente *Nostoc* sp F108 alude a um maior rendimento de biomassa; este fato se deve a sua maior produção de exopolissacarídeos, os quais por suas características higroscópicas ocasionam aumento no volume da biomassa presente em meio de cultura, conduzindo a falsa impressão de maior rendimento quando comparado a *Nostoc* sp F105.

Neste trabalho, em experimentos secundários, a comparação da perda de peso dos dois isolados após a liofilização da massa celular demonstrou mais uma vez a relação entre a maior produção de exopolissacarídeos e a maior higroscopicidade. Posteriormente a liofilização o rendimento em massa seca para *Nostoc* sp F108, alcançou apenas 1%, enquanto que para *Nostoc* sp F105 esta marca atingiu 8%.

Tal divergência sugere que de acordo com o interesse biotecnológico, o perfil de síntese de exopolissacarídeos deve ser analisado. Quando este interesse se dá por compostos intracelulares tais como pigmentos, uma cepa que apresente alta produção de polissacarídeos extracelulares pode não se fazer interessante.

Para *Nostoc* sp F108 (gráfico 2), as menores intensidades analisadas apresentaram os melhores resultados para a produção de ficobiliproteínas em relação à massa seca. Ficocianina, especificamente, apresentou maior destaque a 10 e 20 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ (sem diferenças significativas) seguido da intensidade de 30 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$. Já os menores valores foram observados para 60, 120, 150 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ (sem diferenças significativas). Os resultados citados corroboram a afirmação de que, por funcionarem como pigmentos acessórios, as ficobiliproteínas teriam sua síntese otimizada em baixas intensidade luminosas. Já em altas intensidade luminosas a diminuição dos ficobilissomos é devido à redução da síntese e ao aumento da degradação por proteases (POJIDAEVA, et al, 2004)

Rosales-Loaiza *et al.* (2008) levantaram a hipótese de que a altas irradiâncias se induz a incorporação de carbono total de maneira mais pronunciada para a fração polissacarídica do que para a fração proteica.

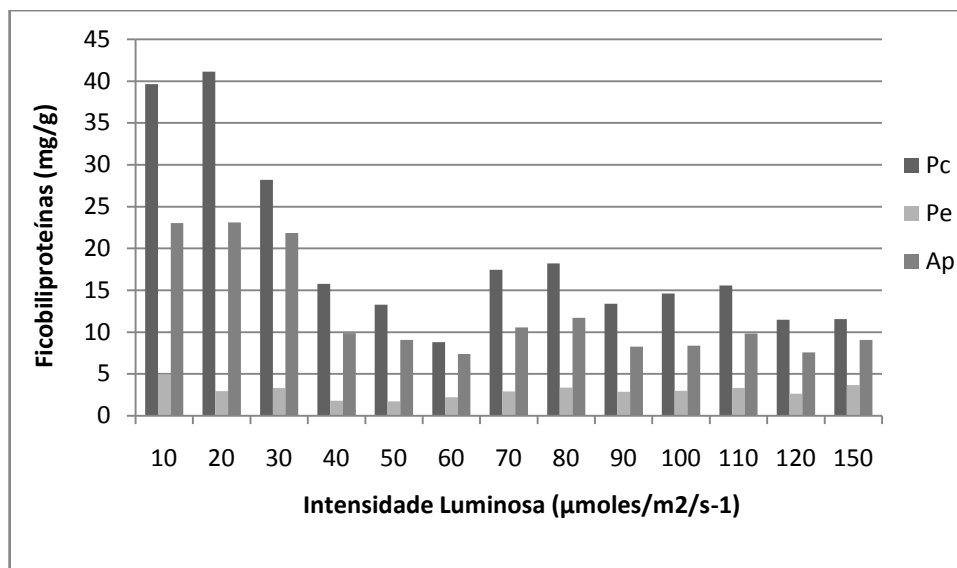


Gráfico 2 – Teor de Ficobiliproteínas para *Nostoc* sp F108 sob diferentes intensidades luminosas. Os cultivos se deram sob agitação constante de 110 rpm, por sete dias, sendo promovido o rompimento diário dos agregados com fluxo por seringa. Pc: Ficocianina; Pe: Ficoeritrina; Ap: Aloficocianina.

Para F108, a concentração do pigmento vermelho ficoeritrina, sofreu pouca alteração de acordo com as variações de intensidade luminosa, estando sempre em concentrações muito inferiores ao pigmento azul. Este fato pode ser comprovado pela coloração exclusivamente azulada dos extratos de ficobiliproteínas deste isolado. Já o pigmento aloficocianina, foi o segundo mais importante em termos de quantidade, e se alterou de maneira bastante semelhante à ficocianina, apontando que para este isolado, em diferentes intensidades luminosas, estas duas ficobiliproteínas variaram de maneira diretamente proporcional.

Para *Nostoc* sp F105, quando comparado a F108, a relação entre as ficobiliproteínas predominantes se inverteu (gráfico 3). A ficoeritrina foi o pigmento majoritário para todas as intensidades com exceção de $100 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, seguido da ficocianina. O tratamento de $10 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ foi o que apresentou maior quantidade de todas as ficobiliproteínas analisadas. Não houve diferença estatística significativa para ficoeritrina de 20 até $60 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ e de 100 até $150 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$.

Tratando da relação ficocianina/ficoeritrina, para F105 os níveis destes dois pigmentos mostraram-se menos discrepantes entre si. Tal peculiaridade, de combinação dos dois pigmentos em proporções expressivas, conferiu coloração rosa/arroxeadas intensa aos extratos de ficobiliproteínas de F105.

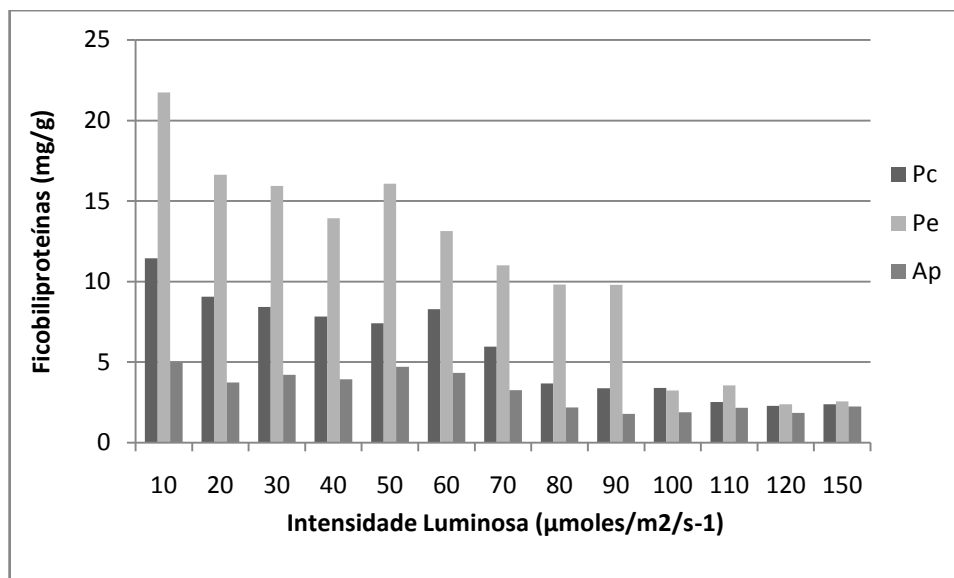


Gráfico 3 – Teor de ficobiliproteínas para *Nostoc* sp F105 sob diferentes intensidades luminosas. Os cultivos se deram sob agitação constante de 110 rpm, por sete dias, sendo promovido o rompimento diário dos agregados com fluxo por seringa. Pc: Ficocianina; Pe: Ficoeritrina; Ap: Aloficocianina.

Embora a resposta primordial seja a diminuição do teor de ficobiliproteínas nas maiores intensidades luminosas para prevenir a absorção de radiação em excesso, a menor queda no rendimento de biomassa para F105 comparado a F108 (gráfico 1) nas maiores intensidades em teste, pode ser devido à predominância da ficobiliproteína ficoeritrina, já que esta apresenta menor sensibilidade à fotodegradação do que a ficocianina, e que por isso teria papel fundamental na fotoproteção da célula (ARÁOZ e HäDER, 1999). Este fato é corroborado pelo aumento na emissão de fluorescência por Pe de *Nostoc* sp., induzido por energia solar e artificial UV-B, fazendo com que uma quantidade significativa de energia não seja transferida ao FPII prevenindo o dano oxidativo ao aparato fotossintético e a moléculas alvo (ARÁOZ; HäDER, 1999).

Com relação à susceptibilidade ao dano oxidativo, o foto-branqueamento de ficobiliproteínas, especialmente Pc, ocorreu mais cedo e mais rapidamente do que a clorofila em células de *Anabaena* submetidas ao estresse oxidativo (HE *et al.*, 2002).

Os teores de clorofila e carotenóides em relação à intensidade luminosa para *Nostoc* sp F105 e F108 são demonstrados nos gráficos 4 e 5, respectivamente. Pode-se verificar que estes dois pigmentos variaram de maneira relativamente semelhante entre si de acordo com a intensidade de luz.

Para ambos os isolados o maior valor para clorofila, se deu para a menor intensidade luminosa em teste, 10 μmoles/m²/s⁻¹. Apesar dos aumentos pós-queda,

constatados em algumas intensidades, para ambos os isolados o perfil do teor de clorofila foi de maneira geral descendente em relação à intensidade luminosa. O aumento da produção de clorofila *a* em baixa intensidade luminosa é um fenômeno conhecido para várias espécies de cianobactérias como *Anabaena* (MARTÍN-TRILLO, 1995), *Spirulina subsalsa* (TOMASELLI; MARGHERI 1995), *Plectonema boryanum* UTEX 485 (MISKIEWICZ *et al.* 2000) e *Anabaena* PCC7120 (LORETO *et al.*, 2003).

A diminuição no teor de clorofila, e de pigmentos acessórios como as ficobiliproteínas e carotenóides à medida que a intensidade luminosa aumenta, representa uma estratégia de defesa da célula contra o dano foto-oxidativo ocasionado pelo excesso de irradiância, pois tal diminuição faz com que a célula absorva menos luz. O excesso de energia luminosa absorvida conduz a formação de radicais livres, como o oxigênio singlet, que podem oxidar proteínas centrais do aparato fotossintético, como a proteína D1 do fotossistema II, conduzindo o fotoinibição (GRASSES *et al.*, 2001; BACKASCH *et al.*, 2005; INOUE *et al.*, 2011).

Não obstante ao exposto, tem-se demonstrado que um maior teor de clorofila em cianobactérias pode ser também encontrado a níveis intermediários de intensidade luminosa (LORETO *et al.*, 2003). Estes níveis intermediários são específicos para cada espécie.

O perfil de síntese de carotenóides em relação à intensidade luminosa foi bastante semelhante para ambos os organismos. Após 10 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ foi verificado decaimento constante até 60 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ para *Nostoc* sp F108 (Gráfico 5) e até 40 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ para *Nostoc* sp F105 (Gráfico 5). A partir destes pontos várias oscilações ocorreram, caracterizadas por aumentos e reduções subsequentes. Em oposto ao observado para clorofila, onde os aumentos subsequentes não foram suficientes para atingir ou sobrepor os maiores níveis iniciais (Gráfico 4), o aumento no teor de carotenóides alcançou em grande parte das intensidades valores superiores aos iniciais, para os dois organismos. *Nostoc* sp F108 apresentou, de maneira geral, a partir da intensidade de 70 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, aumento significativo no teor de carotenóides; sendo os maiores valores observados para 80, 110 e 150 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, os quais não diferiram estatisticamente entre si (Gráfico 5). Já o aumento no teor de carotenóides para *Nostoc* sp F105 ocorreu a partir de uma intensidade mais baixa, 50 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$; com o maior valor verificado também para uma intensidade luminosa mais baixa, 60 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ (Gráfico 5). Para este isolado não houve diferença significativa nos valores de carotenóides de 50 a 110 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$.

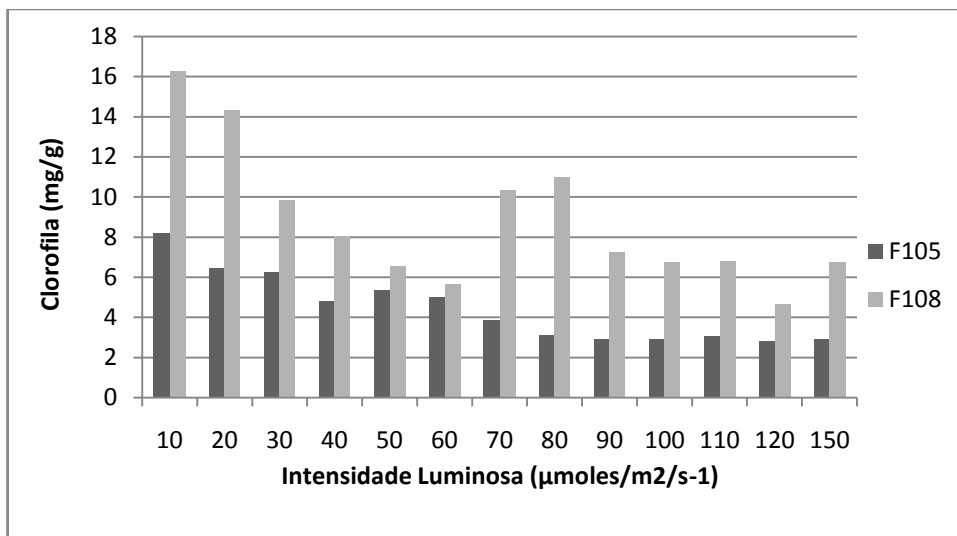


Gráfico 4 – Teor de clorofila para *Nostoc* sp F105 e F108 sob diferentes intensidades luminosas. Os cultivos se deram sob agitação constante de 110 rpm, por sete dias, sendo promovido o rompimento diário dos agregados com fluxo por seringa.

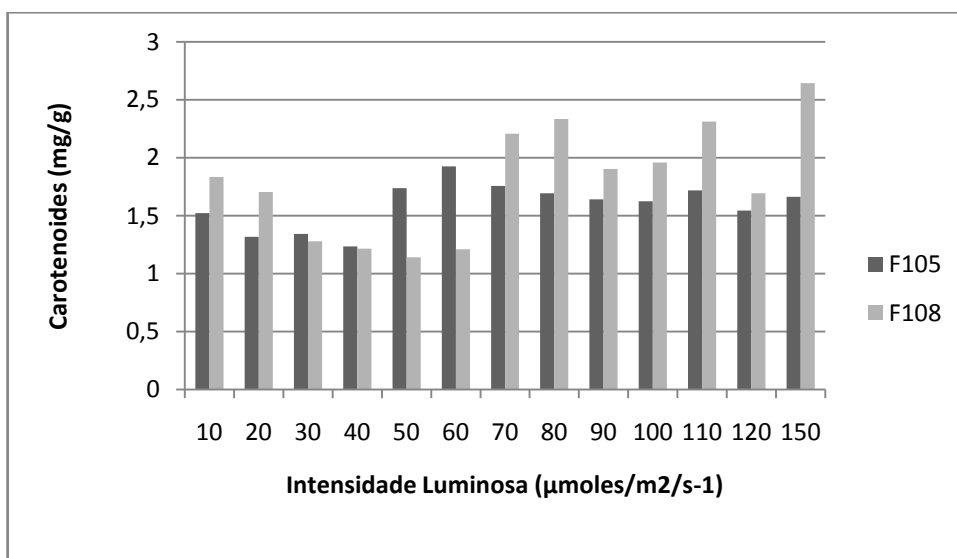


Gráfico 5 – Teor de carotenóides para *Nostoc* sp F105 e F108 sob diferentes intensidades luminosas. Os cultivos se deram sob agitação constante de 110 rpm, por sete dias, sendo promovido o rompimento diário dos agregados com fluxo por seringa.

O maior teor de clorofila para a intensidade de $10 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, reflete a função que este pigmento exerce na captação da energia luminosa quando a disponibilidade de luz é baixa. As células em baixa incidência de luz promovem o aumento de membranas tilacóides e de ficobilissomos para captarem uma maior quantidade de energia radiante possível (TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD 1993). Acredita-se, portanto que

10 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ pode ser considerada uma baixa intensidade luminosa para os dois organismos estudados. Os carotenóides funcionam como pigmentos antenas acessórios aumentando a eficiência da fotossíntese, por se localizarem nos fotossistemas próximos às moléculas de clorofila, em condições de baixa intensidade luminosa, captam e transferem a energia para as mesmas. As diminuições de clorofila e carotenóides, em intensidades maiores que 10 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, podem indicar que o aumento na concentração de pigmentos não era mais uma resposta necessária, já que a luz estava se tornando cada vez mais disponível. Em outras palavras, o aumento da disponibilidade de energia luminosa promoveu uma diminuição no conteúdo de clorofila e carotenóides.

Após a queda na concentração de carotenóides e clorofila, relatada acima, o aumento no teor de carotenóides pode refletir suas funções de dissipadores da energia luminosa absorvida em excesso, e sua função como primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo ocasionado pelo processo fotossintético (STEIGER *et al.*, 1999). Vários trabalhos já reportaram o aumento do teor de carotenóides em cianobactérias, em resposta ao aumento da irradiância de maneira a prevenir o dano oxidativo (RUCKER *et al.*, 1995; NIGOYI *et al.*, 1997; MISKIEWICZ *et al.*, 2000). De fato, essa parece ser a resposta primordial na maioria das cianobactérias já estudadas.

Já foi ilustrado que a zeaxantina pode suprimir o excesso de energia de excitação da clorofila por meio de transferência de cargas (HOLT *et al.*, 2005); sendo que os mutantes para zeaxantina apresentaram maior sensibilidade à luz, com diminuição da concentração de pigmentos e aumento dos níveis de radicais livres. A presença de ligações duplas conjugadas é responsável pela atividade antioxidante dos carotenóides (SIES; STAHL, 1995), funcionando, portanto como desativadores de espécies reativas de oxigênio e sequestradores de radicais livres. Diante do excesso de iluminância para os organismos fotossintetizantes, os carotenóides suprimem o oxigênio singlet, bem como a clorofila em estado excitado, dissipando a energia na forma de calor. Já foi demonstrado que o β -caroteno elimina com eficiência o oxigênio singlet originado no centro de reação do fotossistema II (TELFER *et al.*, 1994). Maiores conteúdos de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) foram gerados em células mutantes para xantofilas (BIANCHI *et al.*, 2010).

Sendo assim, o aumento de carotenóides pode ter dois diferentes significados, em baixas irradiâncias funcionariam como pigmentos acessórios aumentando a captação de luz, ao passo que em altas, funcionariam como dissipadores da energia absorvida em excesso e como agentes antioxidantes.

Apesar do exposto, já se constatou a ocorrência de aumento da degradação dos carotenóides por foto-oxidação com a exposição a maiores irradiâncias, e este evento pode conseqüentemente estimular a síntese de novo dos carotenóides. Sendo assim o pool de carotenóides nas células das cianobactérias, pode ser resultado da degradação, da síntese de novo, ou uma combinação de ambos. No entanto, algumas vezes a síntese de novo pode não ser suficiente para restaurar o conteúdo inicial de carotenóides (STEIGER *et al.*, 1999). Além disso, outros trabalhos também não indicam aumento do conteúdo de carotenóides com o aumento da irradiância. Loreto *et al.* (2003) analisando a produção de pigmentos por *Anabaena*, não verificaram qualquer alteração no conteúdo de carotenóides nas diferentes intensidades luminosas; o que significa que esta cianobactéria ativa outro processo de aclimatação ou controle para evitar a fotooxidação dos pigmentos a elevadas intensidades luminosas. Resultados análogos foram verificados em *Synechococcus* PCC 7002, *Synechococcus* PCC 6301 e *Microcystis aeruginosa*; nas quais também não houve variação nos conteúdos de carotenóides com a iluminância (TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD, 1993). Em *Plectonema boryanum* UTEX 485 observou-se que a concentração de clorofila a e β -caroteno diminuíram com o incremento da irradiância de 150 a 750 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ (MISKIEWICZ *et al.*, 2000).

Em cianobactérias o β -caroteno é frequentemente o carotenóide majoritário. Além deste, os derivados hidroxilados, zeaxantina e nostoxantina; os ceto derivados como equinenona e cataxantina, os carotenóides glicosilados, mixol 2-glicosídeos e oscillool 2,2-diglicosídeos, também estão entre os principais carotenóides de cianobactérias. Algumas espécies apresentam ausência de carotenóides específicos devido à ausência de genes, enzimas ou vias biossintéticas; por exemplo: *Nostoc punctiforme* apresentou β -caroteno e pouca ou nenhuma zeaxantina (TAKAICHI; MOCHIMARU, 2007).

Comparando-se o perfil de massa seca (gráfico 1) com o de carotenóides em relação a intensidade luminosa (gráfico 5), uma análise interessante pode ser feita. Para *Nostoc* sp F108 os perfis são claramente inversos, a 70 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ (gráfico 1) ocorreu queda significativa no valor de massa seca, coincidentemente este foi o tratamento onde ocorreu o primeiro aumento no conteúdo de carotenóides (gráfico 5). De maneira análoga a 50 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ observou-se o maior valor para massa seca e o menor para carotenóides. Comparação semelhante pode ser feita para *Nostoc* sp F105 onde o perfil para carotenóides até 40 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ foi descendente (gráfico 8) e o de

massa seca foi ascendente (gráfico 1). A cianobactéria, nesta intensidade, apresentou o maior rendimento de massa seca, no entanto o menor valor de carotenóides. Estes dados conduzem a hipótese de que para estes isolados os carotenóides teriam função de defesa contra o estresse oxidativo, aumentando sua concentração celular exatamente quando a célula diminui seu crescimento em consequência de uma maior irradiância.

A manipulação dos cultivos para obtenção de biomassa enriquecida em pigmentos deve ser feita em função da iluminação, levando em conta a quantidade e a qualidade da luz (ROSALES-LOAIZA, *et al.*, 2008). Pode-se afirmar que nem sempre a intensidade que apresenta maior rendimento de biomassa deve ser a elegida, já que muitas vezes esta pode não corresponder a intensidade onde a produção de pigmentos é otimizada. Uma alternativa viável para estes casos é promover o cultivo inicial sob a intensidade luminosa que mais favoreça o crescimento e posteriormente transferir a biomassa para a intensidade que mais favoreça a produção do(s) pigmento(s) de interesse. Para *Nostoc* sp F105 a produção de biomassa atingiu um máximo aos 40 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, mas a produção de ficobiliproteínas e clorofila foi mais expressiva para a intensidade de 10 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, enquanto que a produção de carotenóides foi maior para 60 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$. Para *Nostoc* sp F108 a faixa de intensidade de maior rendimento de biomassa foi 30 a 50 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, já a produção de ficobiliproteínas e clorofila foi maior para as intensidades de 10 e 20 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, enquanto que o maior teor de carotenóides se deu para as intensidades de 70, 80, 110 e 150 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, sendo esta a de maior destaque entre as citadas.

4 CONCLUSÃO

A melhor intensidade luminosa para se conduzir o cultivo de determinada cianobactéria deve ser escolhida com base em curvas de resposta que forneçam informações sobre o rendimento de biomassa e dos compostos bioativos de interesse. O isolado *Nostoc sp* 105 forneceu maior rendimento de biomassa do que *Nostoc sp* 108.

Para os isolados estudados neste trabalho, o teor de pigmentos captadores de luz como clorofila e ficobiliproteínas foi maior quando a disponibilidade de luz foi baixa. Quando esta aumentou, o teor destes pigmentos diminuiu como uma estratégia de prevenção contra o dano foto-oxidativo ocasionado pela geração de radicais livres. No entanto, para carotenóides, após a citada diminuição do teor, observou-se em alguns momentos aumento do conteúdo em maiores irradiâncias, o que poderia estar refletindo suas funções como dissipadores da energia luminosa absorvida em excesso e como agentes antioxidantes do aparato fotossintético.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.M.; STANIER, R.Y. Growth and division of some unicellular blue-green algae. **Journal of general microbiology**, v. 51, p. 199-202, 1968.

BACKASCH, N.; SCHULZ-FRIEDRICH, R.; APPEL, J. Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 758-766, 2005.

BALDÍA, S.; NISHIJIMA, T.; HATA, Y. Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Spirulina platensis* isolated from Lake Kojima, Japan. Suisan Gakkaishi Bull. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 57, p. 481-490, 1991.

BECKER, E.W.; JAKOBER, B.; HUFT, D.; SCHMÜLLING, R.M. Clinical and biochemical evaluations of the alga *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity. A double-blind cross-over study. **Nutrition Reports International**, Los Altos, Calif.: Geron-X, Inc. v. 33, n. 4, p. 565-574, 1986.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K. *et al.* Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Physics**, v. 5, n. 2, p. 235-241, 1993.

BERMEJO, R.R.; ALVÁREZ-PEZ, J.M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G.; MOLINA GRIMA, E. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, n. 93, p. 73-85, 2000.

BERTOLIN, T.E.; PILATTI, D.; GIACOMINI, A.C.V.V; BAVARESCO, C.S.; COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1253-1259, 2009.

BIANCHI, S.; BALLOTTARI, M.; DALL'OSTO, L.; BASSI, R. Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, p. 651-660, 2010.

BRITTON, G. Carotenoids and polyterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 2, p. 349-388, 1985.

CEPOI, L.; RUDI, L.; MISCU, V.; COJOCARI, A.; CHIRIAC, T.; SADOVNIC, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. Analele Universitatii din Oradea, **Fascicula Biologie**, Tom. XVI, v. 2, p. 43-48, 2009.

CHIU, H.F. YANG, S.P.; KUO, Y.; LAI, Y.S.; CHOU, T.C. Mechanisms involved in the antiplatelet effect of C-phycoerythrin. **British Journal of Nutrition**, n. 95, p. 435-440, 2006.

CHOUDHURY, A.T.M.A.; KENNEDY, I.R. Prospects and potentials for system of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biological Fertility Soils**, v. 39, p. 219-227, 2004.

- CINGI, C.; CONK-DALAY, M.; CAKLI, H.; BAL, C. The effects of *Spirulina* on allergic rhinitis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 265, n. 10, p. 1219-1223, 2008.
- DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 22, p. 151-175, 1998.
- FIGLIORE, M.F.; MOON, D.H.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, p. 159-169, 2000.
- GALLARDO-CASAS, C.A. CANO-EUROPA, E.; LÓPEZ-GALINDO, G.E.; BLAS-VALDIVIA V.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; FRANCO-COLÍN, M.; ORTIZ-BUTRÓN, R. Phycobiliproteins from *Spirulina maxima* and *Pseudanabaena tenuis* protect against hepatic damage and oxidative stress caused by Hg²⁺. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 41, n. 2, 2010.
- GRASSES, T.; GRIMM, B.; KOROLEVA, O.; JAHNS, P. Loss of alpha-tocopherol in tobacco plants with decreased geranyl- geranyl reductase activity does not modify photo-synthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. **Planta**, v. 213, n. 4, p. 620-628, 2001.
- HAMIDAH, A.; RUSTAM, Z.A.; TAMIL, A.M.; ZARINA, L.A.; ZULKIFLI, Z.S.; JAMAL, R. Prevalence and parental perceptions of complementary and alternative medicine use by children with cancer in a multi-ethnic Southeast Asian population. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 52, n. 1, p. 70-74, 2009.
- HE, Y.Y.; HADER, D.P. Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena* sp. **The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, p. 73-80, 2002.
- HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 423-434, 2002.
- HOLT, N.E.; ZIGMANTAS, D.; VALKUNAS, L.; LI, X.P.; NIYOGI, K.K.; FLEMING, G.R. Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. **Science**, 307, p. 433-436, 2005.
- INOUE, S.; EJIMA, K.; IWAI, E.; HAYASHI, H.; APPEL, J.; TYYSTJÄRVI, E.; MURATA, N.; NISHIYAMA, Y. Protection by α -tocopherol of the repair of photosystem II during photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 236-241, 2011.
- JENSEN, G.S.; GINSBERG, D.I.; DRAPEAU, C. Blue-green algae as an immunoenhancer and biomodulator. **Jana**, v. 3, n. 4, p. 24-30, 2001.
- LORETO, C.; ROSALES, N.; BERMÚDEZ, J.; MORALES, E. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. **Gayana Botánica**, v. 60, p. 83-89, 2003.

LOSEVA, L.P.; DARDYNSKAYA, I.V. *Spirulina*: a natural sorbent of radionucleides. Research Institute of Radiation Medicine, Minsk, Belarus. In: 6th INTERNATIONAL CONGRESS OF APPLIED ALGOLOGY, Belarus: Czech Republic, 1993.

MARCHESAN, E.; SANTOS, F.M.; AVILA, L.A.; CAMARGO, E.R.; MARTIN, T.N.; BRENZONI, E.O. Desempenho do arroz irrigado em resposta à utilização de cianobactérias fixadoras de nitrogênio. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 1, p. 63-68, 2007.

MARKER, A.F.H. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of pheophytin. **Freshwater Biology**, v. 2 p. 361-385, 1972.

MARTÍN-TRILLO, M. **Afloramientos masivos (blooms) de cianobacterias en los arrozales valencianos: seguimiento de su desarrollo y caracterización de dos estirpes formadoras**. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid, España, 1995.

MISKIEWICZ, E.; IVANOV, A.G.; WILLIAMS, J.P.; KHAN, M.U.; FALK, S.; HUNER, N.P.A. Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 767-775, 2000.

MOHAN, I.K.; KHAN, M.; SHOBHA, J.C.; NAIDU, M.U.; PRAYAG, A.; KUPPUSAMY, P.; KUTALA, V.K. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by *Spirulina* in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 58, n. 6, p. 802-808, 2006.

MORALES, E.; RODRÍGUEZ, M.; GARCÍA, D.; LORETO, C.; MARCO, E. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. **Interciencia**, v. 27, n. 7, p. 373-378, 2002.

MORLIÈRE, P.; MAZIÈRE J.C.; SANTUS, R.; SMITH, C.D.; PRINSEP, M.R.; STOBBE, C.C.; FENNING M.C.; GOLBERG, J.L.; CHAPMAN, J.D. *et al.* Tolyphorphin: A natural product from cyanobacteria with potent photosensitizing activity against tumor cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, n. 58, p. 3571-3578, 1998.

NIGOYI, K.; BJÖRKMAN, O.; GROSSMAN, R. The roof specific xanthophylls in photoprotection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 14162-14167, 1997.

OLAIZOLA, M.; DUERR, E.O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 97-104, 1990.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 2, p.143-153, 2003.

PEREZ, K.J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Viabilidade de bactérias lácticas em iogurte adicionado de biomassa da microalga

Spirulina platensis durante o armazenamento refrigerado. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 1, p. 77-82, 2007.

PEREZ, G.R.M.; VARGAS, R.; MOTA FLORES, J.M.; HERNANDEZ GARRIDO, S. Hypoglycemic activity of aqueous extract of *Oscillatoria limnetica*, *Blennothrix ganeshii*, *Hydrodictyon reticulatum* and *Microcoleus lacustris* in normal and alloxan induced diabetic mice. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1145, 2008.

POJIDAEVA, E., ZINCHENKO, V.; SHESTAKOV, S.V.; SOKOLENKO, A. Involvement of the SppA1 Peptidase in Acclimation to Saturating Light Intensities in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology**, v. 12, n. 186, p. 3991, 2004.

PONTES, M.C.F. *Contribuição de nitrogênio biologicamente fixado por cianobactérias de vida livre em cultura de arroz irrigado*. 1988. 161 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1988.

PORTER G.; TREDWELL, C.J.; SEARLE, G.F.W.; BARBER, J. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact chloroplast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 501, p. 532-545, 1978.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RAVI, M.; LATA DE, S.; AZHARUDDIN, S.; PAUL, S.F.D. The beneficial effects of *Spirulina* focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 2, p. 73-83, 2010.

RIMBAU V.; CAMINS, A.; PUBILL, D.; SUREDA, F.X.; ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R.; JIMÉNEZ, A.; ESCUBEDO, E.; CAMARASA, J.; PALLÀS, M. C-phycoyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/ serum deprivation-induced apoptosis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 364, p. 96-104, 2001.

RODRÍGUEZ, A.L.V.; RAMÓN-GALLEGOS, E.; VEGA-BARRITA, M.L.; CRUZ-OREA, A.; OLVERA-RAMÍREZ, R. Efecto in vitro de las ficobiliproteínas en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. **Revista del Centro de Investigación**, v. 7, n. 25, p. 5-12, 2006.

ROGER, P.A.; KULASOORIYA, S.A. Blue-green algae and rice. Los Bânos, Philippines: **The International Rice Research Institute**, p. 112, 1980.

ROMO, S. Growth parameters of *Pseudanabaena galeata* Böcher in culture under different light and temperature conditions. **Algological Studies**, v. 75, p. 239-248, 1994.

ROSALES-LOAIZA, N.; GUEVARA, M., LODEIROS, C.; MORALES, E. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiância. **Revista de Biología Tropical**, v. 56, n. 2, p. 421-429, 2008.

- RUCKER, J.; KOHL, J.; KAISER, K. Response of carotenoids to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae. **Algological Studies**, v. 77, p. 51-65, 1995.
- SCHÄFER, L.; SANDMANN, M.; WOITSCH, S.; SANDMANN, G. Coordinate up-regulation of carotenoid biosynthesis as a response to light stress in *Synechococcus* PCC7942. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 1349-1356, 2006.
- SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113-136, 2007.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamin-E and vitamin-C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315-1321, 1995.
- SONI, B.; VISAVADIYA, N.P.; MADAMWAR, D. Ameliorative action of cyanobacterial phycoerythrin on CCl₄-induced toxicity in rats. **Toxicology**, v. 248, p. 59-65, 2008.
- SONI, B.; VISAVADIYA, N.P.; MADAMWAR, D. Attenuation of diabetic complications by C-phycoerythrin in rats: antioxidant activity of C-phycoerythrin including copper-induced lipoprotein and serum oxidation. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 102-109, 2009.
- STEIGER, S.; SCHAFFER, L.; SANDMANN, G. High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 52, p. 14-18, 1999.
- TAKAICHI, S.; MOCHIMARU, M. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2607-2619, 2007.
- TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMAR, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 119-190, 1993.
- TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. **Methods in Enzymology**, v. 167, p. 318-128, 1988.
- TELFER, A.; DHAMI S.; BISHOP S.M.; PHILLIPS D.; BARBER J. Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem-II reaction centers. **Biochemistry**, v. 33, p. 14469-14474, 1994.
- TOKUSOGLU, Ö.; UNAL, M.K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.
- TOMASELLI, L.; MARGHERI, M. Effects of light on pigments and photosynthetic activity in a phycoerythrin-rich strain of *Spirulina subsalsa*. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 9, p. 27-31, 1995.

VISKARI, P.J.; COLYER, C.L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 263-271, 2003.

WILMOTTE, A. Growth and morphological variability of six strains of *Phormidium* cf. *ectocarpi* Gomont (Cyanophyceae) cultivated under different temperatures and light intensities. **Archives of Hydrobiology/Algological Studies**, v. 50, n. 53, p. 35-46, 1988.

WYMAN, M.; GREGORY R. P.F.; CARR N.G. Novel role for phycoerythrin in a marine cyanobacterium, *Synechococcus* strain DC2, **Science** v. 230, p. 818–820, 1985.

YOON, J.; SHIN, J.; PARK, T. Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1204-1210, 2007.

EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Nostoc* spp.

RESUMO

A oxidação de proteínas, DNA e lipídios por radicais livres está no centro das discussões para a elucidação de inúmeros processos patológicos. As cianobactérias possuem sistemas antioxidantes altamente desenvolvidos e produtividade agrícola superior às plantas, podendo se mostrar mais vantajosas do que estas para a obtenção de pigmentos e compostos antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi determinar a influência da intensidade luminosa sobre a atividade antioxidante de *Nostoc* sp., e sobre os níveis de alguns dos principais compostos antioxidantes presentes em suas células: pigmentos e compostos fenólicos. O cultivo se deu em processo semidescontínuo sobre a bancada. As intensidades luminosas testadas foram: 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$. Foram promovidas extrações com solventes de diferentes polaridades, hexano, acetato de etila e água. A atividade antioxidante foi determinada pelo percentual de inibição do radical DPPH[•] e os compostos fenólicos pelo método de Folin-Cicalteau. A definição precisa da intensidade luminosa por meio de curvas de resposta é necessária, já que variações expressivas nos teores de biocompostos podem ocorrer em intervalos curtos de iluminância. As menores intensidades se mostraram mais vantajosas em termos de rendimento de pigmentos, potencial antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos, sendo as de maior destaque 5 e 15 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$. As ficobiliproteínas foram as maiores contribuintes para a totalidade da defesa antioxidante nas menores intensidades enquanto os carotenóides foram para as maiores. A análise da contribuição dos compostos bioativos para a totalidade da defesa antioxidante é bastante complexa, já que são necessários extratos altamente purificados e a determinação quali e quantitativa dos inúmeros compostos antioxidantes.

Palavras-chave: cianobactérias, antioxidantes, DPPH, compostos fenólicos, ficobiliproteínas.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a oxidação de proteínas, DNA e lipídios por compostos denominados radicais livres está no centro das discussões para a elucidação de inúmeros processos patológicos. Experiências médicas compartilhadas, aliadas a milhares de estudos epidemiológicos de relevância científica, sugerem a correlação inversa entre consumo de antioxidantes e a presença de diversas morbidades (CEPOI *et al.*, 2009).

Segundo Ratnam *et al.* (2006), o sistema de defesa antioxidante humano não é completo sem os antioxidantes dietéticos, o que confirma a importância da ingestão diária destes compostos. Em adição, os antioxidantes são indispensáveis a indústria farmacêutica e alimentícia, para a garantia da estabilidade dos produtos confeccionados. Em contrapartida, postula-se que alguns compostos antioxidantes sintéticos, largamente utilizados, poderiam favorecer o processo de carcinogênese (BOTTERWECK *et al.*, 2000). Estes fatos, aliados ao aumento da demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis, têm incrementado as buscas por compostos antioxidantes naturais, principalmente provenientes de plantas.

As cianobactérias (procariotos fotossintetizantes, anteriormente denominadas algas verdes-azuis), se mostram mais vantajosas do que as plantas, para obtenção de antioxidantes, por possuírem produtividade superior a qualquer outro sistema agrícola (PULZ; GROSS, 2004); e por virem demonstrando atividades antioxidantes significativas para com diferentes modelos toxicológicos (JAIME *et al.*, 2005; CEPOI *et al.*, 2009); inclusive comparadas ao antioxidante BHT (MIRANDA, 1997), um dos antioxidantes sintéticos mais utilizados industrialmente.

As microalgas (eucariotos ou procariotos unicelulares fotossintetizantes) como um todo, pela característica unicelular, estão sempre sujeitas a rápidas alterações de intensidade de luz, O₂ e CO₂; assim, sua sobrevivência depende de uma resposta muito eficiente ao estresse oxidativo (MATSUKAWA *et al.*, 1997). Entre os sistemas antioxidantes desenvolvidos pelas cianobactérias sob irradiação estão as moléculas antioxidantes, como carotenóides, tocoferóis, compostos fenólicos, ácido ascórbico, glutathione reduzida, e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e peroxidase (POD) (GONG *et al.*, 2005). Como estratégia defensiva, também ocorre migração na coluna de água para escapar da radiação, e ativação de sistemas de reparo do DNA; além da síntese de pigmentos de triagem para radiação ultravioleta, tais como scytoneminas e micosporinas e os aminoácidos “micosporine

like” (MAAs) (SINHA *et al.*, 2003). Mais recentemente, sugeriu-se que também seriam responsáveis pela defesa antioxidante das cianobactérias, seus pigmentos acessórios aloficocianina, ficocianina (MADHYASTHA; SIVASHANKARIA; VATSALA, 2009) e ficoeritrina (CANO-EUROPA *et al.*, 2010).

Apesar de a intensidade luminosa ser uma das principais variáveis intervenientes no metabolismo e fisiologia de organismos fotossintéticos, ainda não foi estabelecida nenhuma correlação na literatura para a influência do nível de irradiância sobre os citados sistemas antioxidantes de cianobactérias e microalgas. Todas as triagens sobre o potencial antioxidante destes organismos, realizadas até o momento, se deram sem variações das condições de cultivo. Sob este enfoque, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência da intensidade luminosa sobre a atividade antioxidante de *Nostoc sp.*, e sobre os níveis de alguns dos principais compostos antioxidantes presentes em suas células, pigmentos e compostos fenólicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo

Neste trabalho o isolado F105 foi eleito ao invés do isolado F108, pois este apresenta alta produção de exopolissacarídeos e, portanto rendimento de biomassa inferior.

O cultivo se deu em processo semidescontínuo sobre a bancada. As intensidades luminosas testadas foram: 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$. Tais intensidades foram escolhidas pelo fato da literatura apontar frequentemente 30 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ como a intensidade padrão para o crescimento de *Nostoc sp.*, sendo assim buscou-se o cultivo nessa intensidade e em outras de modo a abranger uma maior gama de tratamentos.

O organismo estudado pertence ao gênero *Nostoc sp* F105, sendo de origem edáfica e proveniente da Coleção de Cianobactérias do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (CCLFM) da Universidade Federal de Viçosa.

O cultivo se deu em processo semidescontínuo sobre a bancada, com agitação manual diária, a qual poderia ser comparada ao cultivo em tanques abertos. Foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio BG11 padrão, líquido, adicionado de NaNO_3 (1,5 g/L de meio) como fonte de nitrogênio.

Elegeu-se, ao invés da construção de um microtanque laboratorial aberto, pelo cultivo em sistema fechado em Erlenmeyers com intuito de controlar a proliferação de contaminantes. No entanto, optou-se pela agitação manual periódica ao invés da agitação rotativa em mesas agitadoras, para minimizar o autosombreamento decorrente desta, a qual tende a promover o agrupamento de células ao centro do recipiente, no caso de alguns organismos que crescem formando filamentos agregados.

Cada intensidade foi obtida através de um banco de lâmpadas fluorescentes brancas, e confirmada por meio de radiômetro. As culturas foram constantemente iluminadas.

As células, provenientes de culturas estoques em meio BG11 sólido, eram inicialmente ativadas pela pré-inoculação em meio BG11 líquido onde permaneciam durante sete dias. Posteriormente, a biomassa era centrifugada e lavada duas vezes com solução salina estéril por meio de centrifugação, para subsequente inoculação em novo meio BG11, onde permanecia pelo mesmo período de tempo da pré-inoculação. Após a pré-inoculação e inoculação promovia-se fluxo por meio de seringa estéril para rompimento dos agregados, este fluxo era promovido somente ao momento da inoculação. Todo o crescimento das células, tanto pré-inoculação quanto inoculação, se deu sob a intensidade luminosa em teste. O período de sete dias foi tomado como período mais aceitável para o qual as células ainda não teriam atingido a fase estacionária de crescimento, de acordo com dados previamente obtidos por este grupo de pesquisa (VAZ, 2010).

Os tratamentos foram mantidos em temperatura ambiente. Os tratamentos foram conduzidos em duplicata, e as análises para cada tratamento realizadas em triplicata.

Após a retirada das células do meio de cultivo para realização das análises, duas lavagens sucessivas com solução salina estéril foram promovidas por meio de centrifugação.

A biomassa lavada foi armazenada a - 80 °C e posteriormente liofilizada. Após a liofilização as amostras foram armazenadas em dessecador, protegidas da luz e em temperatura ambiente até a realização das análises.

2.2 Extração e quantificação de clorofila e carotenóides totais

A extração foi realizada de acordo com o procedimento descrito pelo trabalho de Morales, *et al* (2002). Para a extração de carotenóides e clorofila, 100 mg de biomassa

liofilizada foi resuspenso em 1 mL de metanol 100% e mantido em escuridão durante 24 horas a 4 °C. Após este período, promoveu-se a centrifugação para coleta do sobrenadante, seguida da repetição do procedimento descrito até a exaustão da extração dos pigmentos, fato verificado através da descoloração da biomassa. Ao final do processo de extração, os sobrenadantes coletados foram reunidos para efeitos de dosagem. Para a quantificação de clorofila e carotenóides, o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro Beckman/DU 640 aos comprimentos de onda de 665nm e 480nm, respectivamente. A concentração de clorofila foi determinada segundo a equação de Marker (1972) e a de carotenóides segundo a equação de Britton (1985).

2.3 Extração e quantificação de ficobiliproteínas

A quantificação de ficobiliproteínas foi realizada de acordo com Tandeau de Marsac e Houmard (1988). Uma quantidade de 100 mg de biomassa liofilizada foi ressuspendida em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,5. Para promoção do rompimento celular, essa suspensão foi submetida ao equipamento French Press, aplicando-se uma pressão de 800 Pascal, sob um fluxo de 3 a 4 gotas por segundo.

Em seguida, 1,9 mL dos extratos de células rompidas, adicionado de 100 µL de solução de sulfato de estreptomicina 200 mg mL⁻¹, foram mantidos a 4 °C por 30 minutos, para promover a purificação das proteínas extraídas através da precipitação dos contaminantes. Após esse período, a solução foi centrifugada a 18.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi, então, suplementado com 400 µL de solução de ditioneitol a 1 mM, o qual é um antioxidante amplamente utilizado a baixas concentrações para estabilização de enzimas e outras proteínas.

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro Beckman/DU 640 a 565, 620 e 650 nm. As concentrações de ficocianina (Pc), aloficocianina (Ap) e ficoeritrina (Pe) foram obtidas a partir dos dados de absorbância de cada amostra, utilizando as expressões adotadas por Tandeau de Marsac e Houmard (1988):

2.4 Preparação das amostras para determinação de compostos fenólicos e da atividade antioxidante

O procedimento de extração adotado foi de acordo com a determinação de Hajimahmoodi *et al.* (2010) e Li *et al.* (2007), em que três solventes com diferentes

polaridades foram utilizados em extrações sequenciais. Resumidamente, uma quantidade precisa de 100 mg de biomassa de células liofilizada foi extraída primeiramente com 2 mL de hexano à temperatura ambiente por 30 min seguido de centrifugação a 4.500 g/10 min e recuperação do sobrenadante. O procedimento foi repetido e o resíduo novamente extraído com hexano com posterior combinação dos sobrenadantes. Extrações semelhantes foram conduzidas com acetato de etila e posteriormente água a 80°C.

Uma quarta extração foi promovida a partir de uma nova porção de 100 mg de biomassa, a qual correspondeu a extração da fração de ficobiliproteínas, conduzida de acordo com o protocolo de Tandeau de Marsac e Houmard (1988) já citado. Esta extração foi conduzida porque a extração sequencial descrita acima não promovia a eluição destes pigmentos.

Todos os extratos foram armazenados a 0 °C antes do uso.

2.5 Determinação de fenólicos totais

Para quantificação dos fenólicos totais foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Alíquotas de 200 µl dos extratos brutos de hexano, acetato de etila, água e ficobiliproteínas foram acrescentadas a 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído na proporção de 1:10 com agitação vigorosa promovida logo em seguida; após 4 minutos foram adicionados 800 µl de solução saturada de Na₂CO₃ (75 g L). Após 2 horas em repouso, a leitura foi efetuada em espectrofotômetro Beckman/DU 640 a 765 nm. A quantificação dos compostos fenólicos se deu através da utilização de uma curva padrão, construída nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L de ácido gálico. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de biomassa seca em valores médios ± DP (n = 3).

2.6 Determinação da atividade antioxidante

O método utilizado para a determinação da atividade antioxidante via radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi desenvolvido por Brand-Willians *et al.* (1995) com modificações por Mensor *et al.* (2001).

A técnica DPPH consiste na redução do radical DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), de coloração púrpura, que, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, muda sua coloração de violeta para amarelo (difenil-picril-hidrazina), ficando estável, resultando em decréscimo da absorbância a 517 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005). A quantidade do radical DPPH^{*} removido do meio é proporcional à atividade antioxidante das substâncias presentes na amostra.

Um total de 0,5 mL de extrato foi adicionado a 2,0 mL de solução metanólica do radical livre DPPH^{*} 1 mM. Após 40 minutos de incubação ao abrigo da luz, a redução do radical livre foi mensurada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro Beckman/DU 640, ao comprimento de onda de 517 nm. A porcentagem de inibição foi calculada conforme a equação:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{absorbância}_{\text{controle}} - \text{absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{absorbância}_{\text{controle}}} \times 100 \right)$$

O controle era composto pelo solvente extrator mais a solução de DPPH^{*}, sem presença da amostra. Um branco específico foi utilizado para cada avaliação para calibração do espectrofotômetro, formado somente pelas amostras nas suas respectivas diluições.

2.7 Análise estatística

Os valores de pigmentos nas diferentes intensidades luminosas foram comparados por análise de variância - ANOVA. O teste de Tukey foi utilizado a um nível significância de 5 %.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conteúdo de ficobiliproteínas, clorofila e carotenóides

Os maiores teores de ficobiliproteínas foram observados para as intensidades de 5 e 15 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ (gráfico 1) sem diferenças estatísticas significativas. Já o menor valor se deu sob a maior intensidade analisada, 120 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$. Ficoeritrina foi a ficobiliproteína predominante com excessão das intensidades de 105 e 120 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

As células cultivadas em baixa incidência de luz promovem o aumento de membranas tilacóides e de ficobilissomos aumentando consequentemente o teor de ficobiliproteínas, para captarem uma maior quantidade de energia radiante possível e assim garantirem o crescimento celular (TANDEAU DE MARSAC; HOUMARD 1993). Do ponto de vista industrial esta característica se mostra bastante importante frente a economia de energia proporcionada pelo cultivo sob menores intensidades luminosas. A produção da biomassa em tanques abertos também poderia ser conduzida com menor necessidade de agitação constante dos tanques para ressuspensão da biomassa localizada ao fundo do recipiente, fato que também representaria mais praticidade e economia para o setor.

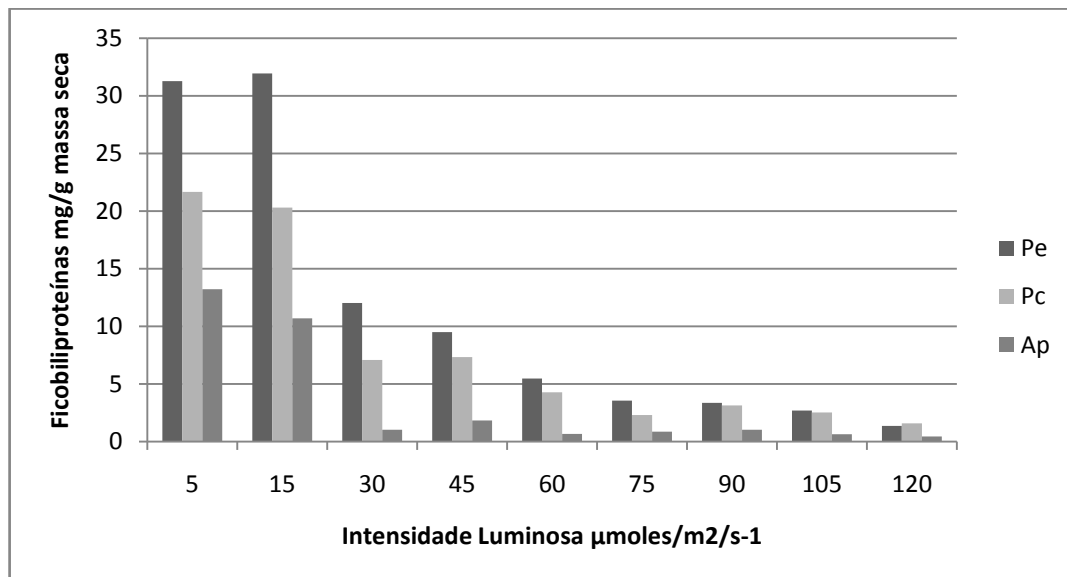


Gráfico 1 – Teor das ficobiliproteínas Ficocianina (Pc), Aloficocianina (Ap) e Ficoeritrina (Pe) em miligrama por grama de massa liofilizada, para *Nostoc* sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas.

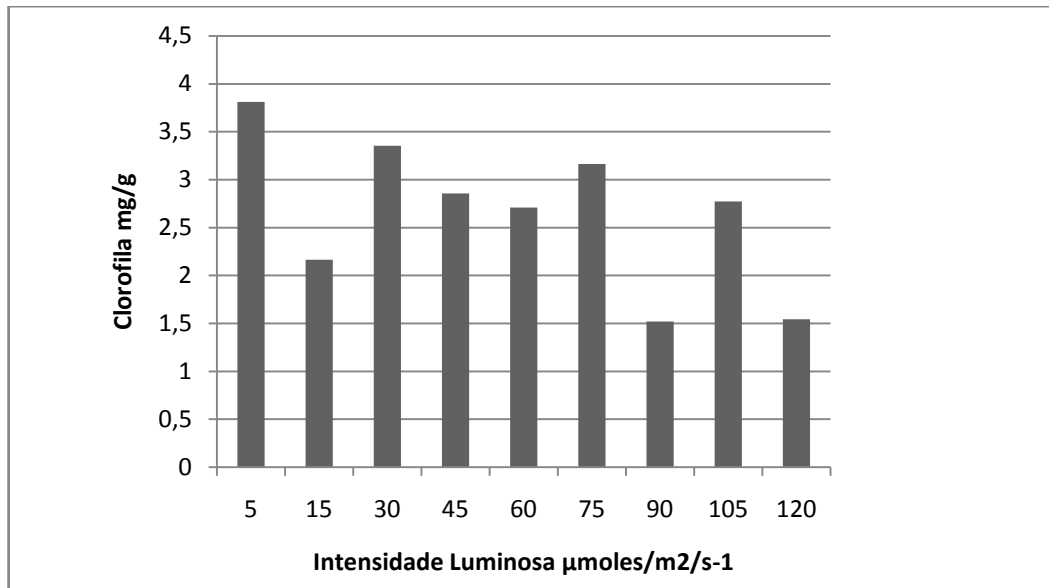


Gráfico 2 – Teor de clorofila em miligrama por grama de massa liofilizada, para *Nostoc* sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas.

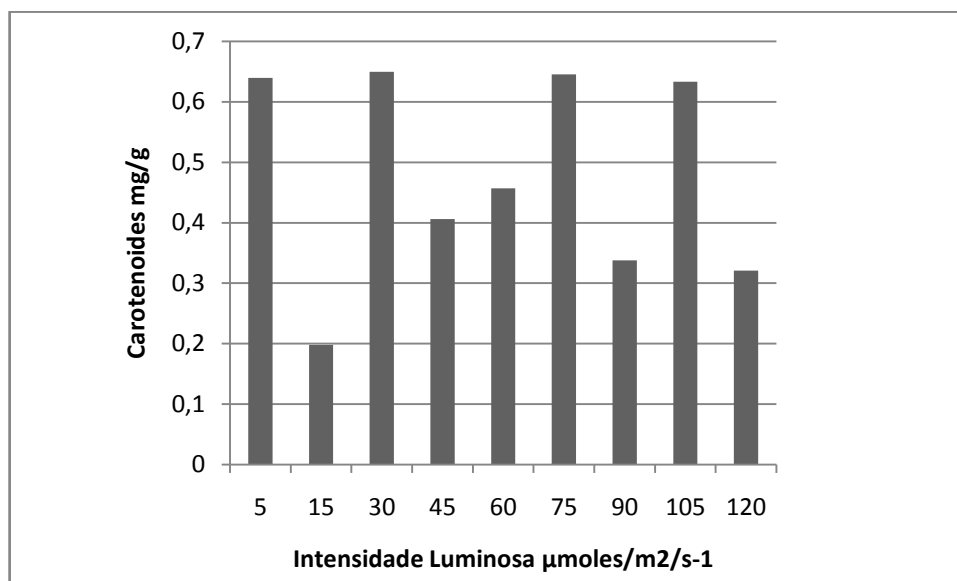


Gráfico 3 – Teor de carotenóides totais em miligrama por grama de massa liofilizada, para *Nostoc* sp F105, de acordo com diferentes intensidades luminosas.

Como pode ser constatado pela análise dos gráficos 2 e 3, o teor de clorofila e carotenoides exibiu comportamento semelhante de acordo com as diferentes intensidades luminosas. O perfil de maneira geral se caracterizou por maiores teores na menor intensidade em teste seguido de diminuições e aumentos subsequentes para os dois pigmentos. Todavia os aumentos nos teores de clorofila nas maiores intensidades

não foram suficientes para o alcance do maior nível observado a $15 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$. Ao contrário, os valores de carotenóides foram semelhantes ao nível apresentado para $15 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ nas intensidades de 30, 75 e $105 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, sem diferenças estatisticamente significativas entre essas. Tanto os carotenóides quanto as clorofilas funcionam como pigmentos acessórios aumentando a captação de luz em baixas intensidades, no entanto, apenas os carotenóides atuam na defesa antioxidante em intensidades luminosas mais elevadas.

3.2 Conteúdo fenólico total

Não há informações na literatura científica sobre a função dos compostos fenólicos para as cianobactérias (ONOFREJOVÁ *et al.*, 2010). Todavia para as algas já foi elucidada sua função como metabólitos secundários, importantes para a resposta celular contra radiação ultra-violeta e presença de patógenos (KLEJDUS *et al.*, 2009). Tanto as plantas, quanto as cianobactérias alterariam seu metabolismo fenólico sob influência da radiação UV-B (BOOIJ-JAMES *et al.*, 2000).

Neste estudo, não houve variação significativa do conteúdo de compostos fenólicos analisados para os extratos de hexano e acetato entre as diferentes intensidades luminosas (Gráfico 4). O extrato aquoso apresentou maior conteúdo de fenólicos do que os extratos de hexano e acetato de etila, para todas as intensidades testadas. Este resultado é semelhante ao encontrado por Li *et al.* (2007) para diferentes cepas de *Nostoc ellipsosporum* e semelhante ao observado por Hajimahmoodi *et al.* (2010), para *Nostoc ellipsosporum*, *Nostoc piscinale* e *Nostoc muscorum*. Para o extrato aquoso os valores se apresentaram sempre muito próximos, sem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

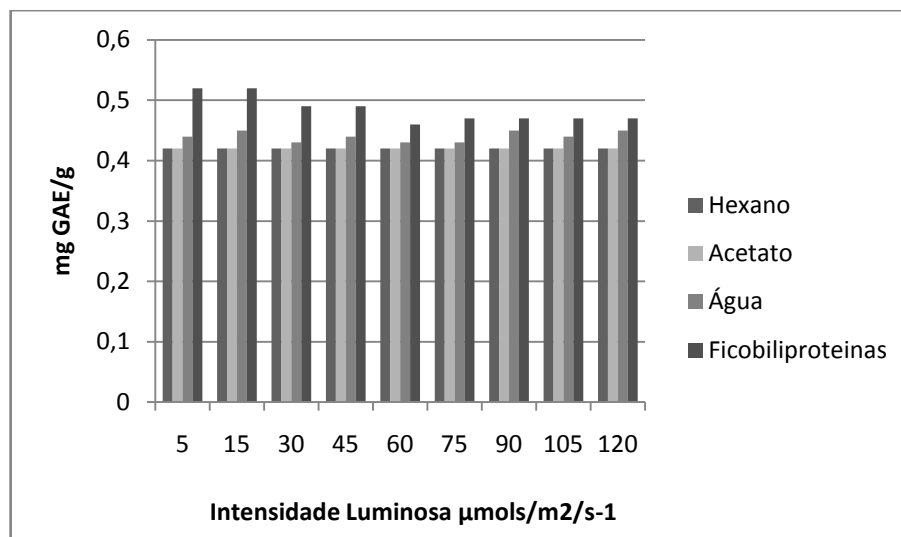


Gráfico 4 – Conteúdo fenólico de *Nostoc* sp F105 expresso em equivalentes de ácido Gálico (GAE) por grama de massa seca, cultivado sob diferentes intensidades luminosas, nos extratos de hexano, acetato e água produzidos por extração sequencial e nos extratos de ficobiliproteínas totais.

Ao se analisar o conteúdo de fenólicos totais em todos os extratos (Gráfico 5), temos que 5 e 15 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ apresentaram os maiores teores, o que condiz também com os maiores teores de ficobiliproteínas nestes tratamentos (Gráfico 1). Este resultado pode indicar que a maior produção de ficobiliproteínas se dá paralelamente a uma maior síntese de compostos fenólicos para algumas intensidades, no entanto este fato necessitaria de confirmação através da identificação destes fenóis e não apenas pela determinação total. Este resultado poderia também não estar associado realmente a um maior teor de compostos fenólicos, mas à baixa especificidade do ensaio Folin-Ciocalteu para fenóis, o qual poderia reduzir ainda substâncias não fenólicas como ácido ascórbico, amins aromáticas e vários metais (CEPOI *et al.*, 2009). Levanta-se para este trabalho mais uma hipótese, a de que este ensaio poderia ter reduzido aminoácidos aromáticos presentes na porção apoproteína destes pigmentos ou ter reduzido as próprias estruturas tetrapirroles das ficobiliproteínas, fazendo com que a maior determinação de fenólicos em certas intensidades seja realmente devido à maior presença de ficobiliproteínas.

Este é o primeiro trabalho a avaliar a presença de compostos fenólicos nos extratos de ficobiliproteínas e mais estudos se fazem necessários.

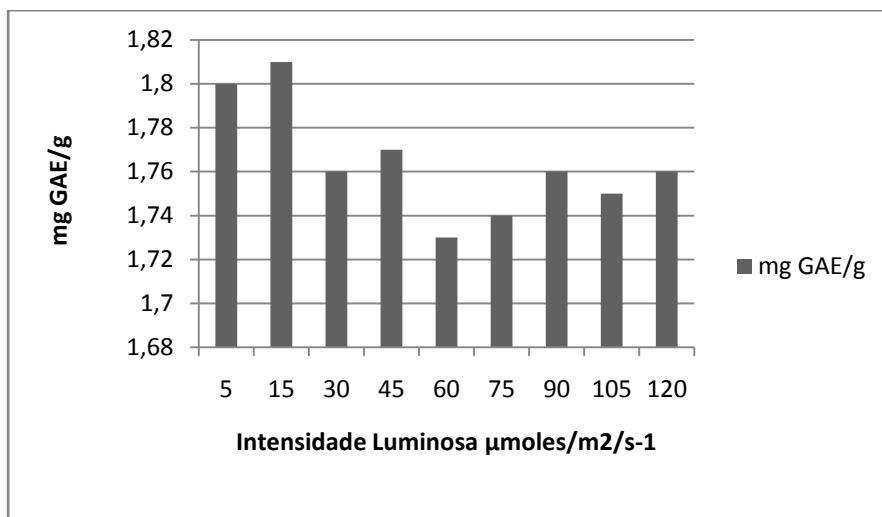


Gráfico 5 – Conteúdo fenólico total (soma de todos os extratos) de *Nostoc* sp F105 expresso em equivalentes de Ácido Gálico (GAE) por grama de massa seca nas diferentes intensidades luminosas.

Já foi demonstrado que a presença de aminoácidos aromáticos influencia fortemente a extensão do dano na molécula de Pe, pois as proteínas são alvos potenciais para a radiação UV-B. Aminoácidos aromáticos como triptofano e tirosina absorvem radiação UV-B até 305 nm podendo ser degradados levando a ligações cruzadas inter e intramoleculares e subsequente quebra da cadeia polipeptídica, mudanças estruturais e/ou inativação enzimática (FUJIMORI, 1981; KOCHEVAR, 1990; WILSON *et al.*, 1995). O número de aminoácidos aromáticos na cadeia do polipeptídeo pode limitar a extensão do dano à proteína. A análise de sequências de onze subunidades α e β de da Pe em várias espécies (APT *et al.*, 1995) revelou a presença de um grupo de triptofano e 5-7 resíduos de tirosina.

De acordo com ONOFREJOVÁ *et al.* (2010) a biossíntese de fenólicos em plantas, algas e cianobactérias poderia ocorrer por vias semelhantes, mas o espectro de concentração seria diferente, já que estas últimas sintetizam fenóis em baixos níveis. Segundo os mesmos autores, este fato pode ser devido a características evolutivas, tendo as cianobactérias vias metabólicas relacionadas a fenóis menos desenvolvidas.

3.3 Capacidade antioxidante

Para a atividade antioxidante, verificada pelo percentual de inibição do radical DPPH[•], os resultados indicam claramente que o perfil dos compostos antioxidantes predominantes varia de acordo com a intensidade luminosa. O potencial antioxidante foi

maior para a intensidade de 5 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, seguido de 15 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ para o extrato de ficobiliproteínas (Gráfico 6). Estes tratamentos são também aqueles que apresentaram as maiores concentrações de ficobiliproteínas. A literatura reporta principalmente que as ficobiliproteínas ficocianina e ficoeritrina possuem atividade antioxidante, com poucos relatos para o potencial antioxidante da aloficocianina (BAOSHENG, *et al.*, 2003).

Os extratos de 5 e 15 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ apresentaram quantidades muito equiparadas de pigmentos (Gráfico 1), no entanto demonstraram percentuais de inibição radicalar bem diferentes. Estes dados podem indicar que o potencial antioxidante das ficobiliproteínas pode não estar somente relacionado ao cromóforo em questão, mas também a alterações envolvendo a porção apoproteica do pigmento.

Os aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano e histidina, possuem duplas ligações alternadas em seu anel constituinte, as mesmas características que explicam o potencial antioxidante de outras moléculas como os carotenóides e os próprios cromóforos tetrapirróles das ficobiliproteínas. Estes fatos embasariam os dados atuais de que triptofano, tirosina e histidina podem capturar radicais peroxil em ambientes menos polares (PATEL *et al.*, 2006).

A baixa correspondência entre os perfis de atividades antioxidantes para com os de ficobiliproteínas em algumas intensidades pode ser decorrente da presença de outros compostos antioxidantes na biomassa como ácido ascórbico, os pigmentos scytoneminas e micosporinas ou os aminoácidos tipo micosporina.

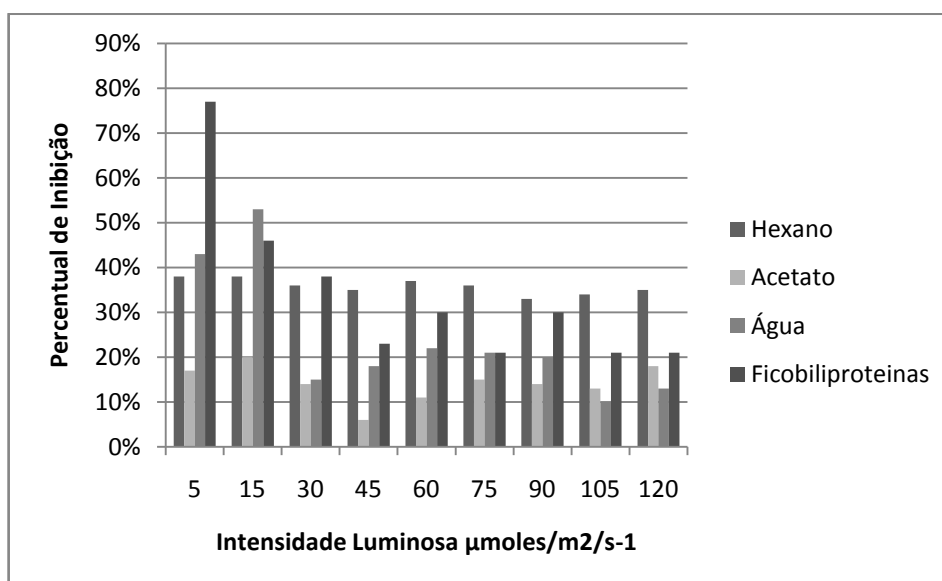


Gráfico 6 – Capacidade antioxidante de *Nostoc* sp F105 expresso em percentual de inibição do radical DPPH*, de acordo com diferentes intensidades

luminosas, para os extratos de hexano, acetato e água produzidos por extração sequencial e para os extratos de ficobiliproteínas totais.

O solvente hexano por sua natureza apolar teria permitido a eluição principalmente de carotenóides pela coloração amarelada dos extratos; já o solvente acetato de etila de maior polaridade que o primeiro, teria permitido maior eluição das clorofilas pela coloração esverdeada dos extratos.

Percebe-se que para as maiores intensidades os extratos de hexano foram mais importantes para o potencial antioxidante do que os de ficobiliproteínas. Entretanto, apesar do conteúdo de carotenóides totais ter diferido significativamente para algumas intensidades, não houve variação significativa entre o percentual de inibição para os extratos de hexano. Este fato só poderia ser analisado de posse de uma análise qualitativa e quantitativa de todos os carotenóides presentes na biomassa de cada tratamento, visto que estes podem diferir significativamente quanto à capacidade antioxidante (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008)

O extrato de acetato de etila não variou de forma direta aos teores de clorofila das diferentes intensidades. No entanto, não se pode afirmar que o principal componente responsável pela atividade antioxidante dos extratos de acetato de etila é a clorofila presente, já que outros carotenóides polares como xantofilas e compostos fenólicos também podem eluir juntamente com este solvente.

Para a extração aquosa o maior percentual de inibição foi observado para $15 \text{ umoles/m}^2/\text{s}^{-1}$, seguido de $5 \text{ umoles/m}^2/\text{s}^{-1}$. Também ao contrário do que se previa não se pode estabelecer uma relação entre o percentual de inibição deste extrato e o conteúdo de fenólicos presentes.

Outros trabalhos conduzidos com intuito de avaliar o potencial antioxidante de cianobactérias, também têm sido conduzidos com utilização de solventes de polaridades variadas, objetivando assim uma triagem mais abrangente dos antioxidantes presentes na biomassa (HAJIMAHMOODI *et al.*; 2010; LI *et al.*; 2007). No entanto, verificou-se neste trabalho que os solventes testados não promoveram a extração de ficobiliproteínas, pelo contrário, contribuíram para sua oxidação; fato corroborado pela coloração dos extratos e dos sedimentos ao final dos processos de extração, os quais não apresentaram o aspecto róseo/avermelhado intenso, típico da mistura de ficoeritrina e ficocianina. Este estudo sugere, portanto que quando se avalia o potencial antioxidante da biomassa de cianobactérias, as ficobiliproteínas poderiam ser os principais

responsáveis por este potencial, dependendo das condições de desenvolvimento, não podendo sua contribuição ser desconsiderada durante as análises.

Todavia, de acordo com a intensidade luminosa analisada neste estudo, outros extratos apresentaram maior percentual de inibição radicalar que o extrato de ficobiliproteínas. Na intensidade de $15 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$ o extrato de água contribuiu com o maior percentual antioxidante em relação aos outros extratos. Ao passo que a partir da intensidade de $45 \mu\text{moles/m}^2/\text{s}^{-1}$, o extrato de hexano foi o responsável pelo maior percentual de inibição comparado aos outros extratos.

Estes dados sugerem que a triagem do potencial antioxidante de diferentes espécies de cianobactérias, a título de comparação destes potenciais entre si, não pode ser conduzida sem uma definição exata das condições de desenvolvimento, principalmente no que concerne à intensidade luminosa. A ausência de padronização desta variável pode conduzir a resultados equivocados.

Estudos devem ser conduzidos no sentido de elucidar a contribuição dos sistemas antioxidantes não enzimáticos para a totalidade da defesa antioxidante de cianobactérias e microalgas. Já que, além dos pigmentos e compostos fenólicos, outras moléculas poderiam estar envolvidas nesta defesa, tais como: tocoferóis, ácido ascórbico, ácidos graxos poliinsaturados, polissacarídeos, glutatona reduzida (CHEN, 1996; HIRT, 2004; CHEN *et al.*, 2005); além de pigmentos de triagem para radiação ultravioleta, tais como scytoneminas e micosporinas e os aminoácidos “micosporine like” (SINHA *et al.*, 2003). Não é conhecida a influência da intensidade luminosa sobre a biossíntese e degradação destes compostos em cianobactérias.

3.4 Comparação entre a atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos

A ausência de correlação entre o conteúdo de carotenóides, clorofila e compostos fenólicos em cada intensidade com o percentual de inibição do radical DPPH[•] para os extratos de hexano, acetato de etila e água, pode ser devido ao fato da eficácia antioxidante depender não somente da concentração total destes fitoquímicos, mas também do perfil dos mesmos, já que alguns compostos dentro de uma mesma classe apresentam potenciais antioxidantes diversificados. No caso dos polifenóis, a posição e o número de hidroxilas na molécula são fatores relevantes para sua eficácia antioxidante, portanto a caracterização da estrutura química do composto ativo pode se fazer necessária. Além do mais, outros compostos antioxidantes como ácidos graxos

poliinsaturados e polissacarídeos podem estar envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (CHEN, 1996; HIRT, 2004; CHEN *et al.*, 2005).

Em plantas superiores vários autores tem demonstrado uma forte relação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante (VELIOGLU, *et al.*, 1998; VISON, *et al.*, 1998; KAUR; KAPOOR, 2002; ABIDILLE, *et al.*, 2005), enquanto outros autores não observaram esta associação (KAHKONEN *et al.*, 1999; ISMAIL *et al.*, 2004). Para macroalgas o estudo de Jimenez-Escrig *et al.* (2001) também identificou esta correlação. Os dados disponíveis que avaliam a influência do conteúdo de compostos fenólicos em cianobactérias e macroalgas em ensaios DPPH são escassos e contraditórios. Hajimahmoodi *et al.* (2010) analisaram a correlação entre o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de 12 microalgas e não encontraram correlação significativa; assim como o trabalho de Li *et al.* (2007), o qual avaliou a correlação entre os mesmos parâmetros para 23 microalgas, e não observou também relação significativa. Em contrapartida, Abd El-Baky; El Baz e El-Baroty (2009) creditaram a capacidade antioxidante de *Spirulina maxima* ao seu conteúdo fenólico, já que neste estudo a IC₅₀ (concentração inibitória mínima, necessária para capturar 50% do radical livre), para extratos fenólicos foi superior a IC₅₀ de alguns antioxidantes sintéticos muito utilizados. Sendo assim, ainda não há conclusão definitiva para o papel dos compostos fenólicos na capacidade antioxidante de cianobactérias, sendo necessários mais estudos. Cepoi *et al.* (2009) afirmaram que esta correlação existe somente para plantas superiores, onde os compostos fenólicos dominam quali e quantitativamente. Pode-se sugerir que na verdade o perfil destas correlações seria mais complexo, podendo variar inclusive entre cepas de uma mesma espécie (HAJIMAHMOODI *et al.*, 2010).

4 CONCLUSÃO

As intensidades de 5 e 15 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ se mostraram mais interessantes em termos de rendimento de pigmentos, potencial antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos. Os fenólicos presentes seriam predominantemente hidrofílicos, já que o extrato aquoso apresentou maior conteúdo de fenólicos do que os extratos de hexano e acetato de etila, para todas as intensidades testadas. Em adição a relação entre conteúdo de ficobiliproteínas e compostos fenólicos na biomassa precisa ser melhor investigada.

As ficobiliproteínas foram as maiores contribuintes para a totalidade da defesa antioxidante nas menores intensidades, enquanto os carotenóides ocuparam este papel nas maiores intensidade luminosas.

A análise da contribuição dos compostos bioativos para a totalidade da defesa antioxidante é bastante complexa, já que são necessários extratos altamente purificados e a determinação quali e quantitativa dos inúmeros compostos antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDILLE, M.D.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts, from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

APT, K.E.; COLLIER, J.L.; GROSSMAN, A.R. Evolution of the phycobiliproteins. *J. Mol. Biol.*, v. 248, p. 79-96, 1995. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 175-180, 2006.

BAOSHENG, G.; QIN, S.; HAN, L.; LIN, F.; REN, Y. Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 3, 1, p. 175 – 180, 2006.

BOOIJ-JAMES, I.S.; DUBE, S.K.; JANSEN, M.A.K.; EDELMAN, M.; MATTOO, A. K. Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1275-1283, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, n. 28, p. 25-30, 1995.

BRITTON, G. Carotenoids and polyterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 2, p. 349-388, 1985.

CANO-EUROPA, E.; ORTIZ-BUTRÓN, R.; GALLARDO-CASAS, C.A.; BLAS-VALDIVIA, V.; PINEDA-REYNOSO, M.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; FRANCO-COLIN, M. Phycobiliproteins from *Pseudanabaena tenuis* rich in c-phycoerythrin protect against HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 495-501, 2010.

CEPOI, L.; RUDI, L.; MISCU, V.; COJOCARI, A.; CHIRIAC, T.; SADOVNIC, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Analele Universitatii din Oradea. Fascicula Biologie*, Tom. XVI, v. 2, p. 43-48, 2009.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 421-426, 1996.

CHEN, F.; LI, H.B.; WONG, R.N.S.; JI, B.; JIANG, Y. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, p. 183-186, 2005.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O.R. **Fennema's food chemistry**. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, p. 1144, 2008.

FUJIMORI, E. Blue fluorescence and cross-linking of photooxidized proteins. **FEBS Letters**, 135, p. 257-260, 1981.

GONG, B.Y.; HO, J.W. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. **Plant Science**, v. 169, p. 313-321, 2005.

HAJIMAHMOODI, M.; FARAMARZI, M.A.; MOHAMMADI, N.; SOLTANI, N.; OVEISI, M.R.; NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 43-50, 2010.

ISMAIL, A.; MARJAN; Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 581-586, 2004.

JAIME, L.; MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M., SOLER-RIVAS, C.; SANTOYO, S.; SEÑORANS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 16, p. 2111-2119, 2005.

JIMENEZ-ESCRIG, A.; JIMENEZ-JIMENEZ, I.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 530-534, 2001.

KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Food Science and Technology International**, v. 37, n. 2, p. 153-161, 2002.

KLEJDUS, B.; KOPECKÝ, J.; BENESOVÁ, L.; VACEK, J. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 5, p. 763-771, January 2009.

KOCHEVAR, I.E. UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 52, p. 795-800, 1990.

LI, H.B.; CHENG, K.W.; WONG, C.C.; FAN, K.W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, n. 102, p. 771-776, 2007.

MADHYASTHA, H.K.; SIVASHANKARI, S.; VATSALA, T.M. C-phycoyanin from *Spirulina fusciformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 221-224, 2009.

MARKER, A.F.H. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of pheophytin. **Freshwater Biology**, v. 2 p. 361-385, 1972.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIHARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, n. 9, p. 29-35, 1997.

MENSOR, L.L. MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MIRANDA, M.P.S. **Antioxidantes naturais em microalgas cultivadas em condições especiais: avaliação química e biologia**. 1997. 105 f. Tese de Doutorado em Ciências dos Alimentos – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1997.

MORALES, E.; RODRÍGUEZ, M.; GARCÍA, D.; LORETO, C.; MARCO, E. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. **Interciencia**, v. 27, n. 7, p. 373-378, 2002.

ONOFREJOVÁ, L.; VASÍCKOVÁ, J.; KLEJDUS, B.; STRATIL, P.; MISURCOVÁ, L.; KRÁCMAR, S.; KOPECKÝ, J.; VACEK, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 464-470, 2010.

PATEL, A.; MISHRA, S.; GHOSH, P.K. Antioxidant potential of C-phycoerythrin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 43, p. 25-31, February 2006.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; RAVI KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SINHA, R.P.; AMBASHT, N.K.; SINHA, J.P.; HÄDER, D.P. Wavelength dependent induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Nostoc commune*: role of inhibitors and salt stress. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, p. 171-176, 2003.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMAR, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps toward molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, p. 119-190, 1993.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. **Methods in Enzymology**, v. 167, p. 318-128, 1988.

VAZ, M.G.M. V. **Diferenciação celular em Nostoc spp: efeito da intensidade luminosa e do padrão de sobreposição dos filamentos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VISON, J.A.; HAO, Y.; SU, X.; ZUBIK, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3630-3634, 1998.

WILSON M.; GHOSH, S.; GERHARDT, K.E.; HOLLAND, N.; BABU, T.S.; EDELMAN, M.; DUMBROFF, E.B.; GREENBERG, B.M. In vivo photomodification of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/ oxygenase holoenzyme by ultraviolet-B radiation. **Plant Physiology**, v. 119, p. 221-229, 1995.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados deste trabalho analisados conjuntamente mostram que variações expressivas podem ocorrer para os teores de pigmentos entre faixas de intensidade luminosas estreitas, o mesmo ocorrendo para o perfil antioxidante da biomassa. Assim, uma definição precisa da intensidade aplicada pode ser necessária de acordo com o interesse biotecnológico em cheque. Nem sempre a intensidade que apresenta maior rendimento de biomassa deve ser a elegida, já que muitas vezes esta pode não corresponder a intensidade onde a produção de pigmentos é otimizada.

O isolado *Nostoc* sp F105 forneceu maior rendimento de biomassa do que *Nostoc* sp F108. No entanto este último apresentou maior teor de pigmentos na maioria das intensidades analisadas.

As menores intensidades luminosas garantiram maior produção de ficobiliproteínas e clorofila *a*, ao passo que para carotenóides em vários tratamentos as maiores intensidades se mostraram mais vantajosas. Nas menores intensidades as ficobiliproteínas foram os maiores contribuintes para a totalidade da capacidade antioxidante, ao passo que nas maiores os carotenóides assumiriam este papel.

A análise da contribuição dos compostos bioativos para a totalidade da defesa antioxidante pode se mostrar bastante complexa, já que para uma adequada elucidação é necessário estar de posse de extratos altamente purificados e determinar quali e quantitativamente os inúmeros compostos que podem apresentar propriedades antioxidantes. Além disso, diferentes métodos podem se fazer necessários, visto que cada um apresentará especificidades e limitações características. Mais estudos são imprescindíveis neste sentido, já que os dados da literatura atual são bastante escassos.