



Universidade Federal do Maranhão  
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATO BRUTO DE  
MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES DO “PARQUE  
NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS”, CERRADO  
BRASILEIRO**

MALENA CORREIA COSTA

São Luís/ MA

2022

MALENA CORREIA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATO BRUTO DE  
MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES DO “PARQUE  
NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS”, CERRADO  
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol  
Coorientadora: Prof. Dra. Claudia Quintino da Rocha

São Luís/ MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a). Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Correia Costa, Malena.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO BRUTO DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES DO PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS, CERRADO BRASILEIRO / Malena Correia Costa. - 2020.

72 f.

Coorientador(a): Claudia Quintino da Rocha. Orientador(a): Leonardo Teixeira Dall'Agnol. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Conservação/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2020.

1. Bioprospecção. 2. Chlorella. 3. Metabólitos secundários. 4. Nostoc. 5. Synechococcus. I. Quintino da Rocha, Claudia. II. Teixeira Dall'Agnol, Leonardo. III. Título.

MALENA CORREIA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATO BRUTO DE  
MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES DO “PARQUE  
NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS”, CERRADO  
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em: 28 /02/2020

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol (orientador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

1º Examinador Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro  
Universidade Federal do Maranhão

---

2º Examinador Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves  
Universidade Federal do Pará



*“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”*

*Marie Curie*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir a conclusão de uma etapa importante na minha vida.

Aos meus pais Francisca Pires e Hilton Costa (*in memoriam*), e irmãs, pelo incentivo aos estudos. Especialmente a minha irmã Ivana Costa por sempre me apoiar e vibrar com cada pequena vitória minha.

Ao meu orientador Leonardo Teixeira Dall’Agnol por ter aceitado me orientar, e por ter pensado em um projeto para desenvolvermos que estivesse dentro da minha área de formação. Sou imensamente grata por isso!

Sou imensamente grata a professora Cláudia Quintino da Rocha por sua coorientação, e por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Obrigada por me auxiliar durante todo o desenvolvimento desta pesquisa!

Agradeço a Aldilene Silva por cada palavra de incentivo, e por me acalmar quando tudo parecia caos para mim! Obrigada por falar as palavras certas no momento em que eu precisava ouvir!

Agradeço a todos os integrantes do grupo de pesquisa GB<sub>3</sub>, especialmente as minhas amigas Iolanda Barros, Milene Brito e Mariene Oliveira por todos os momentos de alegria compartilhados durante o desenvolvimento das nossas pesquisas e por me inspirarem a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Aos meus colegas de turma de mestrado que durante esses dois anos de convivência compartilhamos nossas experiências e nos tornamos uma turma unida onde o apoio era mútuo.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.

À UFMA, e à FAPEMA pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	10
<b>1.1 APRESENTAÇÃO</b> .....	10
<b>1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>1.2.1 Parque Nacional da Chapada das Mesas: Cerrado Brasileiro</b> .....	12
<b>1.2.2 Microalgas e cianobactérias: Definição</b> .....	13
<b>1.2.3 Metabólitos secundários produzidos por <i>Chlorella sp</i>, <i>Nostoc sp</i> e <i>Synechococcus sp</i></b> .....	15
<b>1.2.4 Técnicas químicas de análise de metabólitos secundários</b> .....	18
1.2.4.1 Cromatografia de camada delgada (Thin layer chromatography- TLC) .....	18
1.2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) .....	19
1.2.4.3 Cromatografia a gás (Gas chromatography- GC).....	20
<b>1.2.5 Métodos para avaliar a atividade antioxidante</b> .....	20
<b>1.3 Objetivo geral</b> .....	21
<b>1.4 Objetivos específicos</b> .....	22
<b>REFERÊNCIA</b> .....	22
<b>CAPÍTULO II</b> .....	29
<b>2. ARTIGO</b> .....	32
<b>2.2. ANEXO</b> .....	64

## RESUMO

Cianobactérias e microalgas são microrganismos fotossintetizantes, que produzem compostos bioativos como carotenóides, flavonoides, e ácidos graxos, de importância para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e de biocombustíveis. Este trabalho se propôs investigar o potencial bioativo dos extratos de microalga *Chlorella* sp. (GBBB06), cianobactérias *Nostoc* sp. (GBBB01) e *Synechococcus* sp. (GBBB07), coletadas no Parque Nacional da Chapada das Mesas, cerrado maranhense. Foram realizados extratos metanólicos das amostras estudadas, para então caracterizar quimicamente usando técnicas cromatográficas como Cromatografia em camada delgada, Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo, e Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas, e para avaliar o potencial antioxidante foi realizado o teste do DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>. Foi identificado através da cromatografia líquida, picos com comprimentos de onda característico de carotenóides na amostra de *Chlorella* sp. (GBBB06) e picos característicos de clorofilas em todas amostras estudadas. Na cromatografia em fase gasosa foram identificados metabólitos como ácidos graxos, álcoois e compostos nitrogenados. Entre os compostos identificados, os que apresentam maior abundância no cromatograma são fitol, glicerol, ácido acético, ácido benzoico e N, N-dimetil-Acetamida. Na avaliação do potencial antioxidante, as amostras apresentaram capacidade de sequestrar 12% (*Nostoc* sp.), 20% (*Chlorella* sp.) e 25% (*Synechococcus* sp.), do radical DPPH<sup>•</sup> na concentração do extrato de 0,675 mg/mL, não apresentando aumento de atividade nas concentrações mais altas do extrato. Os resultados com o radical ABTS<sup>•+</sup> mostraram alto potencial antioxidante das amostras, com capacidade de sequestrar o ABTS<sup>•+</sup> em 60% (*Chlorella* sp.) 70% (*Synechococcus* sp.) e 70% (*Nostoc* sp.). Esses resultados demonstraram que *Chlorella* sp. *Nostoc* sp. e *Synechococcus* sp. possuem composição química rica em metabólitos secundários bioativos com potencial aplicação biotecnológica, e assim, estes extratos representam uma alternativa para exploração econômica do cerrado brasileiro de forma sustentável.

Palavras-Chave: Bioprospecção; *Chlorella*; *Nostoc*; *Synechococcus*; metabólitos secundários

## ABSTRACT

Cyanobacteria and microalgae are photosynthetic microorganisms, which produce bioactive compounds such as carotenoids, flavonoids, and fatty acids, of importance for the pharmaceutical, cosmetic, food and biofuel industries. This work aimed to investigate the bioactive potential of the extracts of microalgae *Chlorella* sp. (GBBB06), cyanobacteria *Nostoc* sp. (GBBB01) and *Synechococcus* sp. (GBBB07), collected in the Chapada das Mesas National Park, in the Cerrado of Maranhão. Methanolic extracts of the studied samples were performed, to then chemically characterize using chromatographic techniques such as thin layer chromatography, high performance liquid chromatography coupled to the diode array detector, and gas chromatography coupled to the mass spectrometer, and to assess the antioxidant potential the DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> test was performed. Through liquid chromatography, peaks with characteristic wavelengths of carotenoids were identified in the sample of *Chlorella* sp. (GBBB06) and characteristic peaks of chlorophylls in all studied samples. In gas chromatography, metabolites such as fatty acids, alcohols and nitrogen compounds were identified. Among the identified compounds, those that present the greatest abundance in the chromatogram are phytol, glycerol, acetic acid, benzoic acid and N, N-dimethyl-acetamide. In the evaluation of the antioxidant potential, the samples had the capacity to sequester 12% (*Nostoc* sp.), 20% (*Chlorella* sp.) And 25% (*Synechococcus* sp.), of 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl in the concentration of the extract 0.675 mg / mL, showing no increase in activity at the highest concentrations of the extract. The results with the radical ABTS<sup>•+</sup> showed high antioxidant potential of the samples, with the ability to sequester ABTS<sup>•+</sup> in 60% (*Chlorella* sp.) 70% (*Synechococcus* sp.) and 70% (*Nostoc* sp). These results demonstrated that *Chlorella* sp. *Nostoc* sp. and *Synechococcus* sp. they have a chemical composition rich in secondary bioactive metabolites with potential biotechnological application, and thus, these extracts represent an alternative for economically exploring the Brazilian Cerrado in a sustainable manner.

**Key-words:** bioprospecting; *chlorella*; *nostoc*; *synechococcus*; secondary metabolites

## **CAPÍTULO I**

## 1.1 APRESENTAÇÃO

Cianobactérias e microalgas são microrganismos fotossintetizantes que possuem ampla capacidade de adaptação, possuindo tolerância às diversas condições ambientais, sendo encontrado em ambientes terrestre, marinho, de água doce, entre outros (HU et al, 2018; KOMÁREK, 2010; OLIVEIRA, 2010).

Esses microrganismos fotossintéticos, emergiram como um novo recurso biológico de alto potencial, pois seus metabólitos apresentam diferentes atividades biológicas que são de grande interesse para a humanidade devido as suas propriedades farmacêuticas (antibióticos) (MOSTAFA, 2012; ABED et al., 2009; DIXIT & SUSEELA, 2013; RASTOGI & SINHA, 2009; DITTMANN et al., 2015).

Dentre as bioatividades descritas para os metabólitos, a literatura cita, atividade citotóxica, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antiprotozoal, antifúngica, algicida, antiinflamatória, inibidora enzimática, antiobesidade, protetora contra radiação ultravioleta (NIEDERMEYER, 2015; RASTOGI et al., 2015; SWAIN et al., 2015; TAN, 2010).

Várias espécies de microalgas são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos. Elas podem ser usadas para produzir uma grande variedade de metabólitos, tais como proteínas, lipídeos, vitaminas ou carotenóides que podem ser utilizados para aditivos alimentares e alimentos para animais, em produtos farmacêuticos e cosméticos (BECKER, 2004; PRIYADARSHANI & RATH, 2012).

Igualmente às microalgas, as cianobactérias apresentam grande importância econômica, pois, algumas espécies são utilizadas na produção de alimentos com valores nutricionais elevados, na indústria de cosméticos. Já na indústria farmacêutica, apresentam um potencial promissor por produzirem ativos de grande interesse (THAJUDDIN & SUBRAMANIAN, 2005).

As cianobactérias filamentosas como *Nostoc*, *Spirulina*, *Arthrospira*, *Anabaena*, e muitas outras, são particularmente atraentes para a produção de biomassa de alta qualidade, pois representam uma fonte de proteína e uma variedade de produtos químicos e farmacêuticos (GANTAR & SVIRČEV, 2008).

Desse modo, os microrganismos fotossintetizantes demonstram ter um potencial ainda longe de ser esgotado, principalmente no que se refere à descoberta de novas substâncias para auxiliar a farmacologia moderna sendo bastante promissores para a engenharia de bioprocessos (SILVA, 2016).

Muitos estudos têm sido realizados para a bioprospecção de compostos bioativos oriundos desse grupo, contudo, muitos focam em testes de atividade, muitas vezes laboriosos e com resultados falso negativos. Portanto, é importante aliar outras ferramentas como a caracterização química para se permitir uma visualização mais completa desse potencial.

O Parque Nacional da Chapada das Mesas é uma região especial de preservação, que se caracteriza por sua grande biodiversidade. Estudar os microrganismos fotossintetizantes desse local, além de contribuir para o conhecimento dos compostos bioativos de cianobactérias e microalgas, ajuda a valorar a biodiversidade do parque. As cianobactérias e microalgas produzem uma variedade de metabólitos secundários de interesse para a indústria, e muito da sua composição química ainda é desconhecida. Portanto, é importante conhecer a composição química dos metabólitos secundários desses organismos, de maneira a direcionar a identificação da bioatividade desses metabólitos, através de técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada, e cromatografia líquida com o uso de detector de arranjo de fotodiodos e a cromatografia gasosa (RODRIGUES et al., 2015; RODRIGUES et al., 2014).

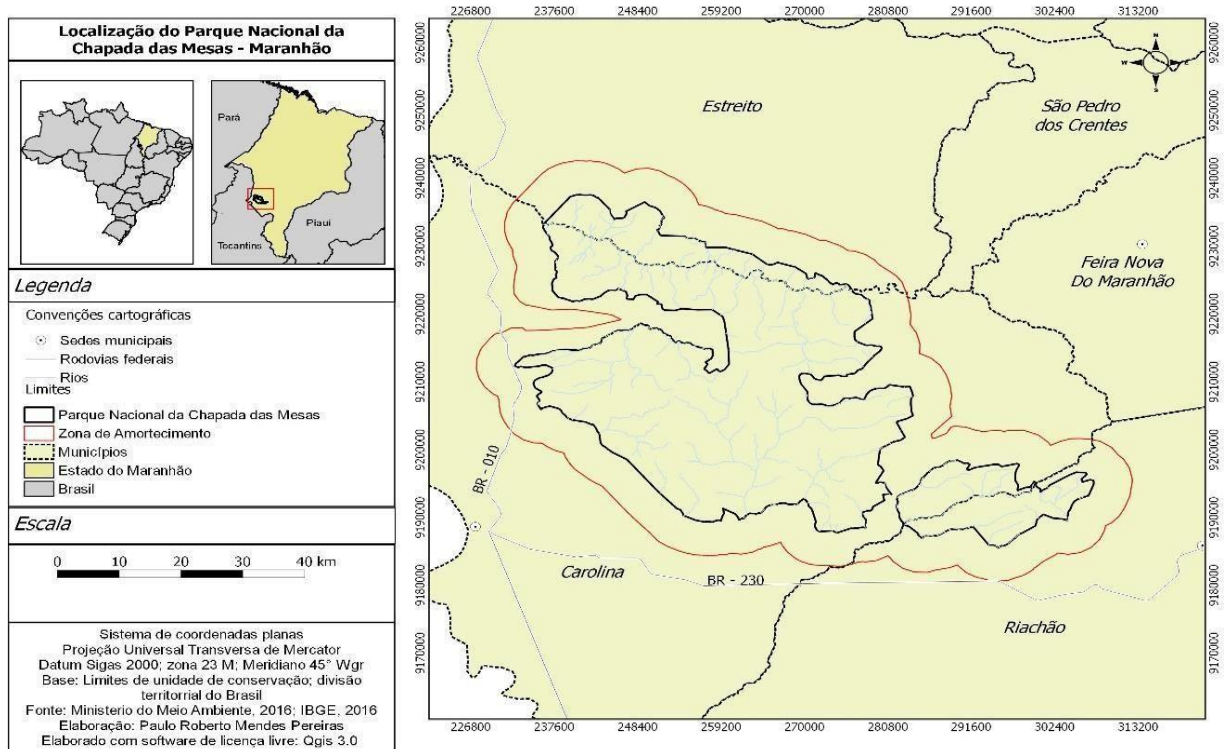


## 1. 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Parque Nacional da Chapada das Mesas: Cerrado Brasileiro

O Parque Nacional da Chapada das Mesas (PNCM) está localizado no sudoeste do Maranhão, entre os municípios de Carolina, Estreito e Riachão (Figura 1). O parque possui uma área total de 160.046 hectares divididos em duas áreas distintas, uma maior com cerca de 140.000 ha e uma menor com aproximadamente 19.000 ha (MARQUES, 2016).

Figura 1. Localização geográfica do Parque Nacional da Chapada das Mesas- MA



Fonte: MMA, 2016. Organização: PEREIRA, P. R. M

A sua criação em 2005, como uma unidade de conservação da categoria de proteção integral, trouxe novos usos para o território. A criação desta unidade é fruto de um processo histórico de organização da comunidade para proteger a região contra o avanço da fronteira agrícola e de empreendimentos que pudessem pôr em risco tanto o seu valor ecológico, como o rico potencial ecoturístico que merece destaque no cenário nacional devido as suas inúmeras e belas cachoeiras e cânions com a formação arenítica (MARQUES, 2016).

O PNCM é uma região especial de preservação, funcionando como um ecótono de três biomas nacionais (Amazônia, Caatinga e Cerrado). A região do Parque se caracteriza por uma grande biodiversidade, abrigando altos níveis de riqueza e abundância de espécies da flora e fauna (COSTA, 2016).

A sua cobertura vegetal é caracterizada, pela presença de Formações Savânicas (Cerrado), Florestais e Floresta Marginal. Nos topos das mesas e chapadas há maior ocorrência das Formações Savânicas e Florestais. Já a Floresta Marginal acompanha as margens dos canais fluviais (MORAES & LIMA, 2007).

As suas planícies fluviais abrangem uma área de aproximadamente 119,40 km<sup>2</sup>. Predominantemente elas ocorrem nos fundos dos vales dos rios Farinha, Itapicuru, Lajes Grande, ribeirão Corrente, Cancela, Cipó, Lajes, córrego Gavião, Bacuri, Angelim, da Prata, Rejeitado e outros. Em virtude da significativa amplitude altimétrica ocorrente, e sua área de abrangência, tem-se muitas cachoeiras, como as do Prata e São Romão, que apresentam grande atrativo turístico pela beleza cênica (MARQUES, 2012).

No interior do PNCM, existem inúmeras nascentes de cursos d'água, que abastecem três importantes bacias hidrográficas, a do Parnaíba, Araguaia/Tocantins e do São Francisco. O rio Farinha é um afluente da margem esquerda do rio Tocantins, que tem uma importância muito grande para toda a região central do país (MARQUES, 2012).

Nesse panorama, tem-se a presença de comunidades que mantêm estreita relação com ambiente, de onde retiram meios para sobreviver e criar suas famílias. Nas comunidades em torno do Parque, 65% dos moradores informaram que utilizam água de rios, córregos ou riachos para o abastecimento doméstico (SILVA, 2017).

No PNCM, já foram desenvolvidos alguns trabalhos sobre bioprospecção, como o de Dias et al. (2015), que investigaram a composição química e atividade larvicida de óleos essenciais extraídos de plantas do Parque Nacional da Chapada das Mesas, contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Outro estudo sobre bioprospecção no parque, foi o de Santos et al. (2020) que realizou bioprospecção das atividades antioxidante, antibacteriana e antibiofilme contra *Corynebacterium ulcerans* e toxicidade de *Stryphnodendron coriaceum* Benth. No que se refere aos constituintes bioativos de cianobactérias e microalgas do PNCM pouco se conhece.

### **1.2.2 Microalgas e cianobactérias: Definição**

Microalgas são microrganismos eucarióticos que realizam fotossíntese como a principal via de assimilação de carbono. Esses microrganismos podem se desenvolver como células individuais ou em pequenas colônias (PRUVOST et al., 2015; KLEIN, et al, 2018).

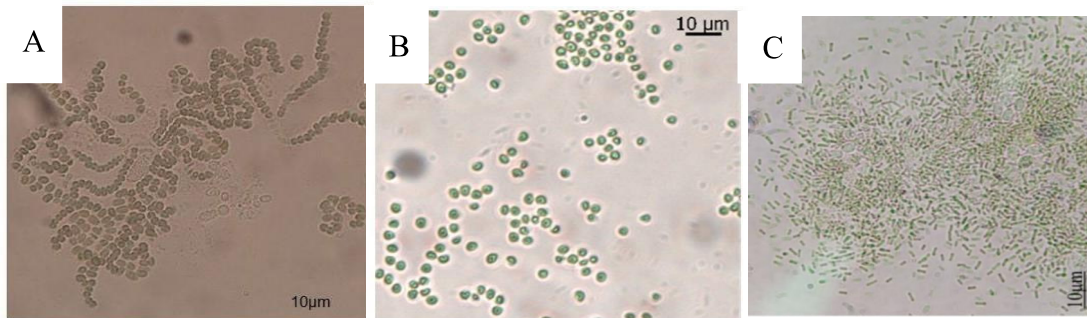
O termo "microalgas" refere-se a algas constituídas de uma grande diversidade de seres microscópicos e unicelulares (CASTRO, 2017; ZHANG et al. 2014). Elas são encontradas em ambientes de água doce e marinhos, e vivem em uma ampla gama de condições ambientais (ULLAH et al., 2015; KLEIN et al., 2018).

As cianobactérias por sua vez, são organismos procarióticos fotossintetizantes, realizam fotossíntese I e II, mas sem estarem organizadas em cloroplastos como as plantas (WHITTON, 2012). Embora sejam fotoautotróficas, algumas espécies comportam-se como heterotróficas no escuro, consumindo glicose como fonte de carbono (SINGH et al, 2015).

Possuem ampla capacidade de adaptação e tolerância às diversas condições ambientais. São amplamente distribuídas em ambientes aquáticos (marinhos e dulcícolas), terrestres, no interior de rochas, além, de habitats extremos como fontes termais, desertos e região polar (PREMANANDH et al., 2009; WHITTON, 2012; PAERL & PAUL, 2012).

Abaixo na figura 2, se encontram algumas imagens de microrganismos fotossintetizantes, microalgas e cianobactérias.

**Figura 2.** Imagens dos microrganismos, *Nostoc* (A), *Chlorella* (B) e *Synechococcus* (C), na escala de 10µm.



As cianobactérias possuem pigmentos como clorofila a e ficobiliproteínas, como a ficocianina que é responsável pela cor verde-azulada característica desse grupo, ficoeritrina, e aloficocianina, organizados em complexos de pigmentos absorvedores de energia conhecido como ficobilissomas, localizados nas membranas dos tilacóides (PARMAR et al., 2011). Alguns representantes do grupo apresentam ainda, clorofila b (*Prochloron didemni*), e clorofila d (*Acaryochloris marina*) (CHEN et al., 2010).

Quanto a sua morfologia, apresentam ampla diversidade, se apresentando em forma unicelular, tanto individualmente como formando colônias, ou em forma de filamentos (FRANCESCHINI et al., 2010).

A presença de exopolissacarídeos que formam envoltórios em torno das cianobactérias, mantem a estrutura da colônia, serve como proteção contra predadores e ajuda na absorção de nutrientes. As formas filamentosas apresentam heterocitos e acinetos, que são células diferenciadas para a fixação de nitrogênio e de resistência, respectivamente (WHITTON & POTTS, 2002; JAIME-CEBALLOS et al., 2006).

### **1.2.3 Metabólitos secundários produzidos por *Chlorella sp*, *Nostoc sp* e *Synechococcus sp***

Os compostos bioativos são em sua maioria metabólitos secundários, que podem ser definidos como compostos orgânicos que não são essenciais ao organismo como os metabólitos primários, mas possuem efeitos benéficos com diferentes atividades como, antioxidante, antibacteriano, entre outras. Microrganismos fotossintetizantes como microalgas e cianobactérias produzem metabólitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica e biotecnológica. Durante muito tempo, esse interesse esteve ligado principalmente ao estudo das cianotoxinas, como microcistina, saxitoxina e anatoxina-a.

Em contrapartida, nos últimos anos, estudos têm revelado que cianobactérias marinhas, terrestres e de água doce são capazes de produzir, somando-se a estas toxinas, uma grande variedade de metabólitos secundários não tóxicos, como os carotenóides, com diferentes estruturas químicas e importantes atividades biológicas (DITTMANN et al 2015; NUNNERY et al., 2010; CHLIPALA et al., 2011; DUCAT et al., 2011; COSTA et al., 2012).

Dentre as bioatividades já descritas na literatura para metabólitos de cianobactérias e microalgas, foram citadas, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antiprotozoal, antifúngica, algicida, antiinflamatória, antiobesidade e protetora contra radiação ultravioleta (BLUNT et al., 2016; DITTMANN et al., 2015; NIEDERMEYER, 2015; RASTOGI et al., 2015; SWAIN et al., 2015; PEREIRA et al., 2010; TAN, 2010; CHOI et al., 2012; DABAS et al., 2014).

Algumas espécies de microalgas produzem elevada quantidade de lipídios e ácidos graxos, sendo características essenciais para o desenvolvimento da produção de biomassa algal associada à produção de biodiesel (SINGH et al., 2011). Além de que, são especialmente aplicáveis em uma variedade de campos, incluindo aquicultura, alimentos, farmácia, engenharia ambiental (SENDRA et al., 2017).

Bouyam et al. (2017), ao realizar produção heterotrófica de *Chlorella sp*. cepa TISTR 8990, avaliando o crescimento e composição da biomassa sob várias condições de produção, alcançaram uma produtividade lipídica elevada em cultivo heterotrófico. Tendo em vista a sua alta taxa lipídica, Amaro et al. (2011), discutem os avanços e perspectivas no uso de microalgas para produção de biodiesel.

Hu et al, (2018), em sua revisão sobre cultivo heterotrófico de microalgas para produção de pigmentos, fala que as microalgas do gênero *Chlorella* são os candidatos mais adequados para a produção heterotrófica de carotenóides como luteína e astaxantina, em particular a espécie *C. protothecoides* para a produção de luteína, e *C. zofingensis* para a produção de astaxantina.

Ip e Chen, (2005), estudaram a produção de astaxantina pela microalga *Chlorella zofingiensis* no escuro, mostrando que o cultivo heterotrófico pode aumentar a produção desses metabólitos. Rizwan et al. (2018) discutem a exploração de microalgas para novas aplicações de biotecnologia, destacando o potencial de microalgas como alimento para animais, fertilizantes, medicamentos, cosméticos, meio ambiente e outras biotecnologias.

De acordo com Vijayavel et al., (2007) a *Chlorella vulgaris* é de grande valor nutricional, contendo altas concentrações de proteínas, fibras, vitaminas e minerais. Além disso, estudos experimentais usando *Chlorella* sp, tem demonstrado propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, e atividade antitumoral.

Em estudos realizados por Plaza et al. (2012), extratos interessantes foram obtidos a partir de *Chlorella vulgaris*, os mesmos mostraram-se ricos em carotenóides e ácidos graxos poli-insaturados, portanto atividade antioxidante e antimicrobianas foram alvos considerando à composição do extrato analisado.

Análise das cianobactérias *Anabaena vaginicola* e *Nostoc calcicola*, apontou essas espécies como fontes ricas de importantes carotenóides (HASHTROUDI et al., 2013). Sinha, (2015), identificou, através de uma caracterização bioquímica, aminoácidos do tipo microsporina (MAAs) em duas espécies de *Nostoc* oriunda de diversos habitats.

El-sheekh et al. (2006), caracterizou substância ativa antimicrobiana da cianobactéria *Nostoc muscorum*, onde os resultados mostraram compostos fenólicos, com atividade contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos.

Loaiza et al. (2016), realizou um comparativo da composição bioquímica de quatro espécies de *Nostoc* e *Anabaena*. Esse estudo comparativo mostrou que a linhagem mais eficiente para a produção de proteínas, carboidratos e lipídios corresponderam à cepa *Nostoc* LAUN0015.

Produção de citotoxicidade e metabólitos secundários realizados por Hrouzek et al. (2010), em cepas terrestres de *Nostoc*, oriundas de diferentes regiões e habitats climáticos / geográficos, mostrou uma grande fração de cepas intensamente citotóxicas entre cepas simbióticas (60%) e temperadas e isolados climáticos continentais (45%); em comparação com as incidências menos significativas nas cepas originários de regiões frias (36%), desertos (14%) e habitats tropicais (9%).

Em isolamento e avaliação da eficácia antitumoral de um polissacarídeo de *Nostoc commune* *Vauch* realizados por Guo et al. (2015), mostram que as descobertas deste estudo serão úteis não apenas para descobrir o mecanismo antitumoral dos polissacarídeos a partir dos

recursos naturais, mas também para o desenvolvimento de agentes antitumorais baseados em polissacarídeos eficazes e seguros para quimioterapia.

Na cianobactéria *Synechococcus* sp., oriunda de um ambiente marinho, Montero et al. (2005) extraiu alguns carotenóides como  $\alpha$ -caroteno, zeaxantina, criptoxantina e equinenona,

Na tabela 1 abaixo, se tem trabalhos sobre metabólitos secundários encontrados em alguns gêneros de microalgas e cianobactérias.

**Tabela 1.** Gêneros de *Chlorella*, *Nostoc*, *Synechococcus* e seus respectivos metabólitos produzidos

Gêneros	Metabólitos secundários	Referências
<i>Chlorella</i> sp.	Astaxantina, $\beta$ -caroteno, Licopeno	Po-Fung Ip e Chen (2004)
	Luteína, Zeaxantina,	
<i>Nostoc</i> sp.	Microcistina, $\beta$ -caroteno, Licopeno, Luteína,	Carmichael, (2001) Hashtroudi, (2013)
	Nodularina, nostocarbolina.	Barbaras et al. (2008)
	Criptoficinas, cianovirina- N, aminoácidos do tipo microsporina, boroficina	Churro et al. (2012) Magarvey et al. (2006)
<i>Synechococcus</i> sp.	Anatoxina-a, Saxitoxicina, Ficocianina	Sinha, (2015) Burja et al. (2001)
	$\alpha$ -caroteno, zeaxantina, criptoxantina e equinenona	Montero et al. (2005)

Os carotenóides são pigmentos isoprenóides naturais encontrados nos tecidos fotossintéticos de plantas, algas e microrganismos. Devido à sua alta hidrofobicidade, esses compostos são normalmente encontrados nas membranas ou em outros locais hidrofóbicos onde funcionam como antioxidantes e desempenham papéis especiais na proteção dos tecidos contra danos causados pela luz (CAZZANELLI et al., 2012).

Esses pigmentos são de grande interesse comercial, principalmente por sua aplicabilidade na indústria alimentícia. Os microrganismos fotossintetizantes podem conter uma grande variedade de carotenóides em cada célula, sendo que diversas espécies podem

acumular alta concentração de  $\beta$ - caroteno, astaxantina ou cantaxantina (BAKER & GUNTER, 2004; PULZ & GROSS, 2004).

Além do uso alimentar, os carotenóides são importantes nutraceuticos devido aos seus efeitos benéficos conhecidos, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiangiogênicas, cardioprotetoras e hepatoprotetoras (ZHANG et al., 2014). Os principais carotenóides de interesse comercial das microalgas são o  $\beta$ -caroteno, a luteína e a astaxantina.

Outro metabólito promissor produzido por microrganismos fotossintetizantes como as cianobactérias, é a cianovirina-N (CV-N), uma proteína única de 101 aminoácidos. Ela foi descoberta como um constituinte de uma cianobactéria cultivada *Nostoc ellipsosporum*. A cianovirina-N inativa de forma potente e irreversível as diversas estirpes primárias do VIH-1. Ela também bloqueia a transmissão célula a célula da infecção pelo HIV (BURJA et al., 2001).

A literatura também aponta a criptoficina, como um metabólito de interesse. Ele foi isolado de *Nostoc* sp. cepa (ATCC 53789) e se mostrou um potente fungicida. Também foi isolado de *Nostoc* sp. cepa (GSV 224) e exibiu uma citotoxicidade potente contra linhas celulares tumorais humanas, mostrando boa atividade contra tumores sólidos (BURJA et al., 2001).

#### **1.2.4 Técnicas químicas de análise de metabólitos secundários**

##### **1.2.4.1 Cromatografia de camada delgada (Thin layer chromatography- TLC)**

A cromatografia em camada fina (TLC) é amplamente utilizada como técnica de separação e purificação rápida na maioria dos laboratórios inorgânicos e bioquímicos. Essa técnica geralmente é uma das melhores opções para a triagem rápida de um grande número de amostras, sendo considerada econômica, pois requer limpeza mínima da amostra e várias amostras podem ser executadas em paralelo (HSU et al., 2003).

Na cromatografia, os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e outra denominada fase móvel, que percola através da fase estacionária. No processo de cromatografia, a separação dos compostos ou mistura de compostos está fundamentada na migração diferencial dos componentes desta mistura, o que ocorre devido a diferentes interações do analito e as duas fases: móvel e estacionária (LANÇAS, 2009).

A TLC de fase normal, a fase estacionária é polar, então os solutos polares se movem mais devagar e ficam mais próximos da origem, enquanto os solutos não polares se movem mais rapidamente e mais perto da frente do solvente, portanto, compostos com diferentes

propriedades podem ser separados um do outro. Uma vez separados os componentes da amostra os compostos podem ser observados em câmara UV visível (SANTIAGO & STROBEL, 2013).

Como placas cromatográficas são mais frequentemente fabricadas a partir de sílica nua, o modo predominante de TLC é a fase normal, embora também estejam disponíveis comercialmente placas de sílica de fase reversa. Apesar dessa abordagem simples seja vital para se ter o perfil inicial de uma amostra, apenas informações relacionadas ao fator de retenção (valor de Rf) obtidos pela TLC não é suficiente para atribuir qualquer estrutura ao composto, nem mesmo permite identificar com confiabilidade os componentes das amostras. Portanto, se deve utilizar outras técnicas como a HPLC acoplada a um detector eficiente para análise. O espectrômetro de massa ou o detector de diodo são alguns exemplos de detectores que podem ser acoplados ao HPLC (BAKRY et al., 2007).

#### 1.2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência, é uma técnica utilizada para a separação de materiais orgânicos e inorgânicos. Essa técnica é conhecida por realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes nas amostras, em alguns minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (SILVA, 2012).

A instrumentação necessária na técnica de HPLC é simples, contendo uma bomba de alta pressão, um sistema de distribuição de solventes, uma válvula de injeção de amostra, além de coluna de alta pressão, um detector e um computador para o controle do sistema e análise dos dados (SKOOG, 2006).

Existem diversos tipos de mecanismos de separação de cromatográfica, tais como a de partição e adsorção, entre outras (SKOOG, 2006). Na adsorção é útil para separar os compostos com base nas diferenças de polaridade, como a TLC. Em contraste, as separações baseadas em partição diferenciam os compostos com base na solubilidade, como acontece na HPLC (FRIED & SHERMA, 1992).

O tipo de cromatografia mais empregado é o de fase reversa na qual a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar. Quanto a forma de eluição na cromatografia líquida, há o modo isocrática e o gradiente. A eluição isocrática é aquela que um único solvente ou uma mistura de solventes é mantido constante durante a análise, já a gradiente é aquela na qual ocorre a variação de quantidades de solventes orgânicos durante a corrida cromatográfica (SKOOG, 2006).

Um dos detectores mais amplamente empregados na cromatografia líquida é aquele baseado na absorção de radiação ultravioleta visível, sendo os detectores com um conjunto de



diodos (DAD) um dos mais modernos, capazes de registrar o espectro inteiro de cada analito em diferentes comprimentos de onda assim que ele é eluído da coluna (HARRIS, 2008).

Esse tipo de detector possui em sua constituição um conjunto de lâmpadas de deutério e de tungstênio que emitem radiação na região do UV-visível, contribuindo com uma grande exatidão e precisão nas medidas de comprimento de onda, alta resolução e sensibilidade e um nível de sinal/ruído baixo. Oferece também um espectro para cada tempo de retenção, permitindo a verificação da pureza do pico cromatográfico e da eficiência da separação (RAIMUNDO et al., 1997).

O uso da HPLC acoplado ao detector de DAD, tem sido utilizado para caracterização de extratos de microrganismos fotossintetizantes, como microalgas e cianobactérias, e apresenta confiabilidade, mostrando que com o uso dessa técnica já foram identificados uma variedade de metabólitos secundários (FRASSANITO et al., 2005).

#### 1.2.4.3 Cromatografia a gás (Gas chromatography- GC)

A cromatografia gasosa é uma ferramenta analítica poderosa, utilizada usualmente na análise de misturas complexas de compostos em fase gasosa. Isto limita a técnica à análise de compostos voláteis e semivoláteis, de baixa polaridade e baixa massa molecular (LANÇAS, 2009).

A fase móvel da cromatografia a gás é um gás de arraste que carrega a amostra através do injetor aquecido, e transporta a amostra através da coluna cromatográfica que mantém a fase estacionária (uma camada fina de líquido não volátil). A interação entre a amostra e a coluna faz com que cada um dos compostos presentes na amostra fique retidos em diferentes tempos. Após a separação na coluna, os componentes atravessam o detector um por um, e um sinal é enviado registrando-se no formato de cromatograma (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

Entre os detectores acoplado ao GC que são utilizados para a detecção de extratos, está o espectrômetro de massas (RODRIGUES et al., 2015). Esse detector permite a ionização dos componentes da amostra resultando na perda de um de seus elétrons, fazendo com que se degrade em íons cujas razão massa/carga ( $m/z$ ) são registrados pelo espectrômetro. Este é utilizado principalmente para identificar e caracterizar a estrutura de compostos isolados, tendo em vista que cada molécula possui apenas um único espectro de íons moleculares, o qual, geralmente se encontra em uma biblioteca de dados espectrométricos (McMASTER, 2008).

#### 1.2.5 Métodos para avaliar a atividade antioxidante

Os métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante se baseiam na capacidade

dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar radicais. Geralmente são analisadas pelo emprego de métodos espectrofotométricos usando DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (2,2'-azino-bis-3 etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (CZERNIAKA et al.,2008).

O ensaio do DPPH consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil, de coloração púrpura, observado em um comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (MOLYNEUX, 2004; RAMADAN, 2010).

A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH reduzido pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), também chamada de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Quanto maior for o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $CI_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante (SOUZA, 2012).

Além do método do DPPH, outro método que é muito utilizado para a determinação da atividade antioxidante é o método do ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína- 6-ácido sulfônico). Ambos apresentam excelente estabilidade em certas condições de análise, mas também mostram diferenças importantes frente aos antioxidantes e quanto a manipulação. O DPPH é um radical livre, sem a necessidade de preparo; já o radical ABTS<sup>•+</sup> deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas (RE et al.,1999).

O método baseia-se na geração do ABTS<sup>•+</sup>, de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, para o radical ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (RE et al.,1999).

### 1.3 Objetivo geral

- Caracterizar quimicamente e avaliar o potencial antioxidante de extratos bruto de microrganismos fotossintetizantes do “Parque Nacional da Chapada das Mesas”, Cerrado brasileiro

#### 1.4 Objetivos específicos

- Otimizar a obtenção dos extratos e frações;
- Caracterizar quimicamente a composição dos extratos utilizando técnicas cromatográficas hifenadas;
- Realizar testes *in vitro* para avaliar o potencial antioxidante dos extratos
- Prospectar por compostos bioativos.

#### REFERÊNCIA

ABED, R. M.M. et al. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**. 106:1–12. 2009.

AMARO, H. M. et al. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, 88: 3402–3410. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>>.

- BAKRY, R. et al. Monolithic Porous Polymer Layer for the Separation of Peptides and Proteins Using Thin-Layer Chromatography Coupled with MALDI-TOF-MS. v. **Analytical Chemistry**, 79: 486-493. 2007.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**. 34: 235–294 2016.
- BOUYAM, S. et al.. Heterotrophic production of *Chlorella* sp. TISTR 8990—biomass growth and composition under various production conditions. **Biotechnology Progress**, 33:1589–1600. 2017.
- BURJA, A. M. et al. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. **Tetrahedron**. 57: 9347-9377. 2001.
- CARMICHAEL, W. W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs”, **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, 7:1393–1407. (2001).
- CAZZANELLI, M. et al. Benthic resources are the key to *Daphnia middendorffiana* survival in a high arctic pond. **Freshwater Biology**, 57: 541–551. 2012.
- CHLIPALA, G. E. et al. Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – a Source for Drug Discovery. **Curr Drug Targets**, 12: 1654–1673. 2011.
- COSTA, M. J. G. **Permanências e rupturas à luz da dinâmica territorial de Solta/ Chapada das Mesas/ MA**. 2016. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Socioespacial e Regional). Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Socioespacial e Regional. São Luís, MA. 2016.
- COSTA. M. et al. Marine Cyanobacteria Compounds with Anticancer Properties: A Review on the Implication of Apoptosis. **Mar. Drugs**, 10: 2181-2207, 2012.
- CHURRO, C. et al. Risk Assessment of Cyanobacteria and Cyanotoxins , the Particularities and Challenges of Planktothrix spp . Monitoring. *Novel Approaches and Their Applications in Risk Assessment*. 51:978-953. 2012.
- DIAS, C. N. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015: 1-8. 2015.
- DITTMANN, E. et al.. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, 23: 642–652. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.008>>.
- DIXIT, R. B.; SUSEELA, M. R. Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery. **Antonie van Leeuwenhoek**, 103: 947–961. 2013.
- DUCAT, D. C. et al. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. **Trends in Biotechnology**, 29: 95–103. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.003>>.

EL-SHEEKH, M. M. et al. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21:42–50. 2006.

FRASSANITO, R. et al. On-line identification of secondary metabolites in freshwater microalgae and cyanobacteria by combined liquid chromatography–photodiode array detection-mass spectrometric techniques. **J. Chromatogr. A**, 1082: 33-42. 2005

FRIED, B.; SHERMA, J. **Thin-Layer Chromatography**. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1992.

GANTAR, M.; SVIRČEV, Z. Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. **Journal of Phycology**, 44: 260–268. 2008.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Tradução da 7ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, p867, 2008.

HROUZEK, P. et al. Cytotoxicity and Secondary Metabolites Production in Terrestrial *Nostoc* Strains , Originating From Different Climatic / Geographic Regions and Habitats : Is Their Cytotoxicity Environmentally Dependent ?. **Environmental Toxicology**, 35: 345–358. 2010.

HSU, F. L. et al. Interfaces To Connect Thin-Layer Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, 75: 2493-2498. 2003.

HU, J. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology Advances**, 36:54–67. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>>.

IP, P. F & CHEN, F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 733–738, 2005.

ISLAM, M. T. et al.. Phytol: A review of biomedical activities. **Food and Chemical Toxicology**, 121: 82–94, 2018.

JAIME-CEBALLOS, B. J. et al. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. **Aquaculture**, 260: 215–220, 2006.

KOMÁREK, J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). **Hydrobiologia**, 639: 245–259, 2010.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Editora Atomo, 2009. 382.

LOAIZA, N. R. et al. Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* ( cyanobacteria , nostocales ) in relation to sodium nitrate. **Act. Biol. Colomb**, 21: 347–354, 2016.

MAGARVEY, N. A. et al. Biosynthetic Characterization and Chemoenzymatic Assembly of

the Cryptophycins. *Potent Anticancer Agents from Nostoc Cyanobionts*. **ACS Chemical Biology**, 1: 766:779, 2006.

MARQUES, 2012. **Saberes geográficos integrados aos estudos territoriais sob a ótica da implantação do parque nacional da Chapada das Mesas, Sertão de Carolina/MA**. p. 32, 2012.

MARQUES, 2016. **Entre o Sertão e Cerrado: Paralelismos e disparidades**. p. 157–180, 2016.

McMASTER, M. *GC/MS: a practical user's guide*. 2. ed. Nova Jersey, Estados Unidos, JOHN WILEY & SONS, Inc. 2008.

HASHTROUDI, M. S. et al. Analysis of *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* from Northern Iran, as rich sources of major carotenoids. **Food Chemistry**, 136: 1148–1153, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.055>>.

MEZZOMO, Natália e FERREIRA, Sandra R.S. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. **Journal of Chemistry**, 2016: 1-16, 2016.

MONTERO, O. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\alpha$ -Carotene from a Marine Strain of the Cyanobacterium *Synechococcus* Species. **J. Agric. Food Chem.** 53: 9701-9707, 2005.

MORAES, R. C.& LIMA, L. P. **Utilização de SIG como ferramenta na gestão do Parque Nacional Chapada das Mesas (Carolina/MA)**. Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 13. Anais... INPE, Florianópolis, 2007.

MOSTAFA, S. S M. **Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications**. Plant Science, p. 275–314, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/53649>>.

NIEDERMEYER, T. H. J. **Anti-infective Natural Products from Cyanobacteria**. **Planta medica**, 81: 1309–1325, 2015.

NUNNERY, J. K. et al. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, 21: 787–793, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.09.019>>.

OLIVEIRA, L L. D. **Estudo da estrutura da comunidade zooplânctônica e sua relação com as cianobactérias em três reservatórios do, rio Tietê, SP**. p. 202, 2010.

PAERL, H. W. & PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**, 46:1349–1363, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>>.

PARMAR, A. et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, 102: 10163–10172, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.030>>.

PLAZA, M. et al. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. **LWT - Food Science and**

**Technology**, 46: 245–253, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.024>>.

PREMANANDH, J. et al. Genetic heterogeneity of the marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* (Pseudanabaenaceae) evidenced by RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. **Journal of Plankton Research**, 31: 1141–1150, 2009.

PRIYADARSHANI, I. & RATH, B. Bioactive Compounds From Microalgae And Cyanobacteria: Utility and Applications. **Ijpsr**, 3: 4123–4130, 2012.

PULZ, O. & GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 635–648, 2004.

RAIMUNDO, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria Multicanal e Arranjos de Fotodiodos. **Química Nova**, 20:83-88, 1997.

RASTOGI, R. P. et al. Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: Environmental health impacts and mitigation strategies. **Frontiers in Microbiology**, 6: 1–22, 2015.

RASTOGI, R. P. & SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, 27: 521–539, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.009>>.

RODRIGUES, D. B. et al. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, 77: 273–279, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.027>>.

RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, 65: 144–148, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.037>>.

SANTOS, D. C. P. et al. Bioprospecção das atividades antioxidante, antibacteriana e antibiofilme contra *Corynebacterium ulcerans* e toxicidade de *Stryphnodendron coriaceum* Benth. **Scientia Plena**. 16:104501. 2020.

SENDRA, M. et al. Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: Ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment. **Environment International**, 98: 62–68, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.024>>.

SINGH, N. K. et al.. **The phycobilisomes: An early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria**. EXCLI Journal, v. 14, p. 268–289, 2015.

SINGH, N. K. et al. Microalgae as second generation biofuel. A review. **Agronomy Sust. Developm.** 31:605–629. 2011.

SILVA, P. D. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. Universidade da Beira Interior. Dissertação (Mestrado em Química Industrial). Covilhã, Portugal, 2012.

SILVA, M. F. **Potencial biotecnológico de micro-organismos fotossintetizantes produtores de compostos bioativos de interesse na indústria de alimentos**. 2016. 165 f. Tese (Doutorado

em ciências biológicas), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016

SILVA, M. L. A. **Percepção ambiental dos moradores da Chapada Das Mesas sobre a criação do Parque Nacional, Maranhão, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade, Ambiente e Saúde. Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA. Caxias, MA. 2017.

SANTIAGO, M & STROBEL, S. Thin Layer Chromatography. **Methods in Enzymology**, 533: 76-6879. 2013.

SINHA, R.R. P. Biochemical characterization of sunscreens mycosporine-like amino acids from two Nostoc species inhabiting diverse habitats, **Protoplasma** 252:199–208 2015.

SWAIN, S. S. et al. Anticancer compounds from cyanobacterium Lyngbya species: A review. **Antonie van Leeuwenhoek**. 108:223–265, 2015.

SKOOG, W. H. C. **Fundamentos de Química Analítica.** Editora Thomson. 2006.

TAN, L. T. Filamentous tropical marine cyanobacteria: A rich source of natural products for anticancer drug discovery. **Journal of Applied Phycology**, 22, 659–676, 2010.

THAJUDDIN, N & SUBRAMANIAN, G Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. **Current Science**, 89: 47–57, 2005. Disponível em: <<http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul102005/47.pdf>>.

ULLAH, K. et al. Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: A review. **Fuel**, 143: 414–423, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.064>>.

VIJAYAVEL, K. et al. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 303: 39–44, 2007.

AQUINO NETO, F. R.&NUNES, D. S. S.; **Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins**, Editora Interciência: Rio de Janeiro, 2003

CZERNIAKA, A. S. et al. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods, **Talanta**, 76: 899-905, 2008.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 26: 211-219, 2004.

RAMADAN, M. F. Rapid antiradical method for screening deep fried oils. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, 5: 47-50, 2010.

SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico e antioxidante dos extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis* e a capacidade desta de inibir a síntese de aflatoxinas.** 2012. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em



Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2012.

## CAPÍTULO II

### **Caracterização química e atividade antioxidante de extrato bruto de microrganismos fotossintetizantes do “Parque Nacional da Chapada das Mesas”, Cerrado brasileiro**

Malena Correia Costa<sup>1</sup>, Aldilene da Silva Lima<sup>2</sup>, Cáritas de Jesus Mendonça<sup>2</sup>, Cláudia Quintino da Rocha<sup>2</sup>, Vinicyus Teles Chagas<sup>3</sup>, Leonardo Teixeira Dall’Agnol<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão; <sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão; <sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão.

### **RESUMO**

Cianobactérias e microalgas são microrganismos fotossintetizantes, que produzem compostos bioativos como carotenóides, flavonoides, e ácidos graxos, de importância para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e de biocombustíveis. Este trabalho se propôs investigar o potencial bioativo dos extratos de microalga *Chlorella* sp. (GBBB06), cianobactérias *Nostoc* sp. (GBBB01) e *Synechococcus* sp. (GBBB07), coletadas no Parque Nacional da Chapada das Mesas, cerrado maranhense. Foram realizados extratos metanólicos das amostras estudadas, para então caracterizar quimicamente usando técnicas cromatográficas como Cromatografia em camada delgada, Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo, e Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas, e para avaliar o potencial antioxidante foi realizado o teste do DPPH<sup>\*</sup> e ABTS. Foi identificado através da cromatografia líquida, picos com comprimentos de onda característico de carotenóides na amostra de *Chlorella* sp. (GBBB06) e picos característicos de clorofilas em todas amostras estudadas. Na cromatografia em fase gasosa foram identificados metabólitos como ácidos graxos, álcoois e compostos nitrogenados. Entre os compostos identificados, os que apresentam maior abundância no cromatograma são fitol, glicerol, ácido acético, ácido benzoico e N, N-dimetil-Acetamida. Na avaliação do potencial antioxidante, as amostras apresentaram capacidade de sequestrar 12% (*Nostoc* sp.), 20% (*Chlorella* sp.) e 25% (*Synechococcus* sp.), do radical DPPH na concentração do extrato de 0,675 mg/mL, não apresentando aumento de atividade nas concentrações mais altas do extrato. Os resultados com o radical *ABTS* mostraram alto potencial antioxidante das amostras, com capacidade de sequestrar o *ABTS* em 60% (*Chlorella* sp.) 70% (*Synechococcus* sp.) e 70% (*Nostoc* sp.). Esses resultados demonstraram que *Chlorella* sp. *Nostoc* sp. e *Synechococcus* sp. possuem composição química rica em metabólitos secundários bioativos com potencial aplicação biotecnológica, e assim, estes extratos representam uma alternativa para exploração econômica do cerrado brasileiro de forma sustentável.

Palavras-Chave: Bioprospecção; *Chlorella*; *Nostoc*; *Synechococcus*; metabólitos secundários

## 1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias e microalgas são microrganismos fotossintetizantes que possuem ampla plasticidade adaptativa ambiental, apresentando versatilidade morfológica e metabolismo diversificado, sendo capazes de colonizar ambientes terrestres, marinhos, água doce ao longo de todo o gradiente de temperatura (Oliveira 2010, Komárek 2010, Hu et al. 2017).

Esses microrganismos são vistos como um recurso de alto potencial biotecnológico, pois apresentam metabolismo secundário complexo e diversificado, sendo que muitos metabólitos produzidos já foram descritos com bioatividades relevantes contra os mais variados alvos: (i) atividade antitumoral; (ii) antiviral; (iii) antibacteriana; (iv) antifúngica; (v) antiprotozoa; (vi) algicida; (vii) anti-inflamatória; (viii) antioxidante; e (ix) proteção contra raios ultravioleta (Tan 2010, Niedermeyer 2015, Rastogi et al. 2015, Swain et al. 2015, Jerez-Martel et al. 2017).

Para além da bioatividade, algumas linhagens possuem considerável valor nutricional devido seu elevado teor proteico (*Spirulina* ou *Chlorella*) e são atualmente utilizadas na alimentação humana e animal. Essas linhagens são rotineiramente vendidas como suplementos alimentares e em muitos casos sem nenhum tipo de controle de qualidade ocasionando prejuízos econômicos e problema de saúde aos consumidores. Além da utilização direta como suplementos, a sua aplicação na indústria de alimentos é promissora devido sua capacidade de produzir compostos nutracêuticos, como os ácidos graxos poli-insaturados ou moléculas funcionais como os carotenóides betacaroteno (*Dunaliella*) e a astaxantina (*Haematococcus*) (Raja et al. 2007, Priyadarshani e Rath. 2012, Muys et al. 2019).

Muitas microalgas e cianobactérias são conhecidas por produzirem grandes quantidades de lipídios (isoprenóides) e álcoois, sendo alvo de diversas pesquisas com objetivo de desenvolver plataformas para a produção de biocombustíveis, como exemplo a empresa

americana Algenol, que é focada na produção de etanol de 3ª geração utilizando cianobactérias geneticamente modificadas (Nozzi et al. 2013, Aboim et al. 2016, Farrokh et al. 2019).

Desse modo, os microrganismos fotossintetizantes demonstram ter um potencial ainda longe de ser esgotado, logo, é importante conhecer a composição química dos metabólitos secundários de organismos através de técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida e a cromatografia gasosa, de maneira a direcionar os testes de confirmação da bioatividade (Rodrigues et al. 2014, Rodrigues et al. 2015).

Apesar de sua indiscutível relevância, os estudos de bioprospecção baseados em testes de atividade *in vitro* são muitas vezes laboriosos e dependentes de condições de cultivo específicas para a expressão dos compostos alvo em concentrações adequadas, o que frequentemente resulta em resultados falso negativos. Portanto, o ideal é aliar a caracterização química desses microrganismos para permitir uma otimização da bioprospecção (Dittmann et al. 2015, Winnikoff et al. 2014).

Apesar do potencial econômico desses microrganismos, pouco se conhece sobre os constituintes bioativos das microalgas e cianobactérias do Parque Nacional da Chapada das Mesas (PNCM), uma unidade de conservação do Cerrado Brasileiro. Nesse sentido é de extrema relevância que se desenvolvam trabalhos de bioprospecção para agregar valor à essa diversidade e assim subsidiar estratégias de preservação economicamente sustentáveis. Devido ao grande potencial bioativo que esses microrganismos fotossintetizantes possuem, o presente trabalho se propõe caracterizar quimicamente os extratos obtidos de microalgas e cianobactérias isoladas do Parque Nacional Chapada das Mesas no bioma Cerrado.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

As amostras unialgais (não axênicas) oriundas do PNCM foram cedidas da coleção pertencente ao grupo de pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia (GB<sup>3</sup>) do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Maranhão. As linhagens utilizadas com cadastro no SISGEN (AACEC6D) foram a microalga *Chlorella* sp. (cepa GBBB06) e as cianobactérias *Nostoc* sp. e *Synechococcus* sp. (cepas GBBB01 e GBBB07).

## 2.2. Obtenção dos extratos

Para o crescimento de biomassa e obtenção dos extratos, 1 mL das amostras foram inoculadas em múltiplos erlenmeyers de 5 L, contendo 3 L do meio de cultura Z8, com um inóculo inicial de 1%, e mantidas sob iluminação de  $3-15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 4 semanas e temperatura de 25°C.

A biomassa de cada amostra foi transferida para garrafas de 250 mL e centrifugadas em temperatura ambiente, com rotação de 10.000 rpm por 10 minutos (Sorvall LYNX 6000 Superspeed Centrifuge Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), depois o sobrenadante foi descartado e os pellets foram armazenados em freezer a -80°C. A liofilização das amostras foi realizada por 72 horas na ChristBeta 2-8 LSC plus freezer dryer equipada com Christ Lyo Club 4-8 câmaras (Martin, Christ, Ostrode am Harz, Germany).

Em um tubo plástico de 2mL foi transferido 100mg de células liofilizadas, 625 mg de beads de vidro (0,5mm Glass beads. Scientific Industries INC, part SI-BG05) e adicionado 1mL de metanol. Homogeneizou-se as amostras por 5 minutos à 3000 rpm em temperatura ambiente usando um shaker (Multi Mixer KASVI k40-10208).

As amostras foram então centrifugadas novamente a 10.000rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi coletado em um tubo Eppendorf de 1,5 mL, e sonificado por 2min a 40 kHz, e em seguida congelados com nitrogênio líquido e liofilizados. Para obter o valor real do

extrato, os tubos foram pesados antes e depois da liofilização, os extratos contidos nos tubos foram solubilizados em 500  $\mu\text{L}$  de metanol grau HPLC, para as análises químicas.

### **2.3. Caracterização química dos extratos de cianobactérias.**

#### **2.3.1. Cromatografia em camada delgada (TLC)**

Para obter o perfil químico inicial das amostras foram realizadas análises por TLC em fase normal por adsorção, usando cromatofolhas de alumínio, (Macherey Nagel- Alugram Xtra Sil.Gel 254, 20X20 cm), sendo recortados na dimensão 5 x 5 cm para uso. Foram utilizados como fase móvel os eluentes Hexano e Diclorometano. Inicialmente foi testado 10 mL do eluente Hexano. Foi aplicado 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra na concentração de 200mg/mL, com o auxílio de um capilar de vidro (1-5 $\mu\text{L}$ ), com uma distância de 0,7 cm entre as amostras.

A placa foi visualizada em câmara escura UV (Spencer, SP930) com leitura nos comprimentos de 254 e 365 nm para a visualização dos compostos. Num segundo momento as amostras foram testadas utilizando uma mistura eluente de hexano e diclorometano na proporção 1:1.

#### **2.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (HPLC -DAD)**

Para confirmar o perfil químico inicial da amostra observado na TLC, os extratos foram analisados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Prominence Uflc LC-20AT), com detector de arranjo de diodos (Shimadzu Prominence Spd-M20a) utilizando separação por partição em fase reversa (RP-HPLC) em eluição gradiente. A separação cromatográfica foi realizada em coluna (Phenomenex, 150x 4.60 nm), com sílica modificada  $\pm$  C18. Para o gradiente de eluição foi utilizado os solventes metanol e água acidificado com ácido fórmico à 0.01%. Foi injetado manualmente 10  $\mu\text{L}$  das amostras. A corrida foi realizada usando 75% de metanol e 25% de água, durante 60 minutos, em eluição

gradiente. Os espectros na região do UV/Vis/ DAD, foram obtidos entre 200nm a 700 nm. A identificação química foi realizada através dos espectros gerados, comparado com dados da literatura.

### **2.3.3 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)**

Para a identificação de compostos voláteis, as amostras foram analisadas em um Cromatógrafo a Gás (Shimadzu CG-2010) acoplado ao Espectrômetro de Massas (Shimadzu CG-EM QP2010 Plus), utilizando uma coluna capilar ZB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). O fluxo do gás de arraste, hélio numa velocidade linear de 30 cm/sec e fluxo da coluna 1,0 mL/min. A programação do forno foi de 90 °C por 4 min com rampa de aquecimento de 10 °C/min até 190 °C e permaneceu por 16 min. A temperatura do injetor e da fonte de íons de 250 °C e 200 °C, respectivamente. O modo de injeção Split com razão de 1/50.

A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação através da comparação direta do tempo de retenção e do padrão de fragmentação espectral de massa com os dados fornecidos da Biblioteca do Equipamento NIST08 (*National Institute of Standards and Technology*).

### **2.4 Avaliação da capacidade antioxidante: sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>**

A atividade antioxidante foi avaliada de acordo com o procedimento descrito por Sánchez-Moreno et al. (1998), com alterações. A solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> (2,4 mg/mL) foi preparada no momento do experimento e mantida em frasco âmbar. Em seguida, em microplaca, foram misturadas alíquotas de 190  $\mu$ L da solução de DPPH<sup>•</sup> a 10  $\mu$ L do extrato (concentração final de 0,625 a 5 mg/mL), e para o padrão de quercetina (concentração final de 0,0156 a 0,5 mg/mL). A mistura foi mantida sob abrigo da luz e o tempo mínimo de reação adotado foi de 30 minutos.



As leituras foram realizadas em espectrofotômetro da Biotek com leitor de multidetecção híbrido Synergy H1 em 515nm utilizando metanol 99,9% como branco. A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left[ \frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right] \times 100$$

A = absorbância

Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração efetiva para inibição de 50% do radical pré-formado) foram determinados por regressão não linear. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias com experimentos realizados em triplicata. O software GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., San Diego, CA) foi usado para plotar os gráficos.

## **2.5 Avaliação da capacidade antioxidante: sequestro do radical *ABTS*<sup>•+</sup>**

A avaliação da capacidade antioxidante com o radical *ABTS*<sup>•+</sup>, foi de acordo com Re et al. (2007), com modificações. O reagente ABTS foi dissolvido em água para obtenção de uma solução de concentração 7 mMol·L<sup>-1</sup>. Esta foi misturada a uma solução de persulfato de potássio (concentração final 2,45 mMol·L<sup>-1</sup>). A mistura foi mantida em frasco âmbar e ambiente escuro por 16 horas antes do ensaio para a completa oxidação do ABTS e geração do cromóforo *ABTS*<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico), um cátion radicalar de alta estabilidade. A solução de *ABTS*<sup>•+</sup> foi diluída em etanol absoluto até que a absorbância estivesse fixada em 0,7 ± 0,02. As leituras foram realizadas em microplaca no comprimento de 734 nm utilizando volumes fixos de 10 µL dos extratos (concentração final de 0.0625 a 0.5 mg/mL) e padrão de quercetina (concentração final de 0,0156 a 0,5 mg/mL) e 190 µL de solução radicalar. Por questões de solubilidade, as amostras foram solubilizadas em metanol e suas diluições realizadas com etanol. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados. Todos os testes foram realizados em triplicata monitorando o tempo de reação antioxidante/radical por 20 min.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Perfil químico inicial de *Chlorella* sp. *Nostoc* sp. e *Synechococcus* sp.

Na cromatografia em camada delgada foi possível visualizar a presença de spots com diferentes RF (retention factor) no cromatofolha, indicando distintas classes de metabólitos secundários em todas as amostras.

Os metabólitos observados apresentaram diferentes polaridades, ficando aderidos na fase estacionária apolar enquanto outros apresentaram maior afinidade com a fase móvel, entretanto o perfil de maior predominância foi de compostos polares. A literatura apresenta uma variedade de compostos bioativos, com diferentes polaridades, como alcaloides, tetraterpenóides (carotenóides), aminoácidos do tipo micosporina, e ficobiliproteínas que podem ser produzidos por cianobactérias e microalgas (Valente et al. 2006, Rastogi e Sinha 2009, Valduga et al. 2009, Sinha et al. 2015).

Quanto maior a polaridade da fase móvel, maior a sua força eluente, assim, foi observado que o solvente diclorometano, mais polar que o hexano, foi o eluente que permitiu um maior arraste de substâncias presentes na amostra, tornando possível visualizar maior quantidade de manchas nas placas. Foi possível observar manchas verdes e amarelas para as amostras de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01, e *Synechococcus* sp. GBBB07.

A clorofila tem absorção máxima na faixa do azul e vermelho, onde está o espectro absorção para a fotossíntese, refletindo a olho nu a cor verde, já os carotenóides absorvem na faixa do azul e violeta, refletindo geralmente no espectro do vermelho, laranja e amarelo (Schoefs 2002, Ribeiro e Seravalli 2003). Assim, as cores verde e amarela observadas na placa indicam a presença de clorofilas e carotenóides.

### 3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (HPLC -DAD)

Os resultados de HPLC corroboram com os resultados da TLC, onde o perfil predominante foi de compostos polares, além de confirmar a presença de carotenóides e clorofilas. Os cromatogramas de todas as amostras analisadas se encontram na figura 1. Os seus espectros UV, por sua vez podem ser encontrados na Figura 2 a 5.

A identificação dos picos e o tempo de retenção estão apresentados na tabela 1. Os picos 4, 5, 6 de *Chlorella* sp. GBBB06, apresentaram tempo de retenção e comprimento de onda semelhante aos picos das demais amostras, indicando que são pertencentes ao mesmo grupo de metabólitos secundários.

**Tabela 1.** Classes de metabólitos encontrados no perfil por HPLC-DAD para os extratos metanólicos de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01, e *Synechococcus* sp. GBBB07.

<b>Amostras</b>	<b>Picos</b>	<b><math>\lambda_{M\acute{a}x}</math> (nm)</b>	<b>TR(min)</b>	<b>Compostos bioativos</b>
<i>Chlorella</i> sp.	1	436,464	15,75	Carotenóides
	2	441, 466	17, 11	
	3	444, 471	30,72	
	4	464, 649	37,39	Clorofila
	5	428, 664	42,77	
	6	406, 664	51,23	
<i>Nostoc</i> sp.	1	422, 663	42,24	Clorofila
	2	419, 658	43,71	
	3	407, 665	51,41	
<i>Synechococcus</i> sp.	1	451, 640	36,21	Clorofila
	2	422, 663	42,01	
	3	420, 658	45,10	
	4	421, 658	46, 45	
	5	405, 665	51,23	
	6	405, 658	55,38	

Tempo de retenção (TR); Comprimento de onda máximo  $\lambda_{M\acute{a}x}$  (nm)

Os resultados dos espectros encontrados no UV/visível descritos na Tabela 1 para *Chlorella* sp. GBBB06, no que se refere ao seu comprimento de onda de absorção, foi a única amostra a apresentar três bandas características de carotenóides. Segundo Hashtroudi et al. (2013), os carotenóides exibem absorbância na região visível do espectro de 400-500 nm, onde os seus espectros na região do UV-Visíveis servem como base valiosa para sua identificação e quantificação, sendo que tanto o comprimento de onda de absorção máxima quanto à forma dos espectros são importantes, pois são característicos de cada tipo específico de carotenoide.

Plaza et al. (2012) e Patias et al. (2017), com o uso da HPLC-DAD também identificaram carotenoides no extrato da microalga *Chlorella vulgaris*, sendo que Patias et al. (2017), apresentaram um total de 18 diferentes carotenóides, entre eles a *cis*-luteína (441, 467nm)  $\beta$ -caroteno (445, 470 nm), *cis*-zeaxantina (449, 474nm), entre outros.

Esses pigmentos naturais possuem importância comercial, pois no cenário atual há uma grande demanda por eles, e microalgas do gênero *Chlorella* possui potencial para a sua produção. A procura por esses pigmentos é explicada pelos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórias, antiobesidade, cardioprotetoras, neuroprotetora e hepatoprotetoras (Park et al. 2010, Lee et al. 2011, Ryu et al. 2012, Zhang et al. 2014, Hu et al. 2017).

Os carotenóides desempenham um papel importante na proteção e inibição de doenças graves como câncer, aterosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, doenças degenerativas e doenças cardiovasculares (Obulesu et al. 2011, Ozawa et al. 2012, Ryu et al. 2012, Zhang et al. 2014, Mezzomo e Ferreira 2016).

Apesar da TLC apontar todas as amostras com manchas características de carotenóides, apenas o gênero *Chlorella* sp. apresentou este metabólito, no qual foi confirmado através da análise de HPLC/DAD, isso porque a luz UV não é um revelador específico. Além de que a concentração de carotenóides nas demais amostras pode estar em baixa quantidade, não sendo possível de ser detectada na HPLC/DAD. Os carotenóides são facilmente suscetíveis a degradação oxidativa, podendo sofrer oxidação na presença de luz e calor, isso também pode justificar a não identificação desses metabólitos nas demais amostras (Ribeiro e Seravalli, 2003).

Além dos carotenóides, foram identificados picos característicos de clorofila em *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01 e *Synechococcus* sp. GBBB07 (TABELA 1). As clorofilas absorvem fortemente de 460 e 660nm na região visível do espectro, semelhantes aos resultados desta pesquisa (Kamffer et al. 2010, Rodrigues et al. 2015).

Ao estudar a composição química e a bioatividade em extratos de *Chlorella vulgaris*, Plaza et al. (2012) identificou através de HPLC/DAD clorofila a e b. Segundo Romero-Lopez et al. (2012), microalgas do gênero *Chlorella* possui uma quantidade elevada de pigmentos, quando comparada com outros gêneros de microalgas clorófitas.

Os resultados de HPLC/DAD mostram que a cianobactéria *Synechococcus* sp. GBBB07 foi a amostra que apresentou a maior quantidade de picos, seis (6), característicos de clorofila. Os extratos de *Nostoc* sp. GBBB01 e *Chorella* sp. GBBB06 apresentaram apenas 3 picos (TABELA 1). A presença de clorofila em todas as amostras era esperada, uma vez que os microrganismos estudados são fotossintetizantes, sendo como característica fundamental desses organismos a presença desse pigmento.

Devido a cor intensa e as propriedades físico-químicas, as clorofilas são usadas como aditivos para produtos alimentícios como corantes em queijos, gelados, bebidas, chocolates e biscoitos (Schoefs 2002, Volp et al. 2009).

Além disso, foi relatado que esses compostos fotoquímicos possuem benefícios para a saúde humana, como efeito antimutagênico, propriedades antígeno-tóxicas e capacidade antioxidante (Amrani-Allalou et al. 2019).

### 3.3 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)

Na Figura 6, se encontram os cromatogramas, nos quais foram identificados 8 compostos no extrato de *Chlorella* sp., 9 compostos no extrato de *Nostoc* sp, e 7 compostos no extrato de *Synechococcus* sp. A listagem dos compostos está contida nas Tabelas 2 a 4.

Os compostos identificados são da classe dos álcoois, ácidos graxos, hidrocarbonetos e compostos nitrogenados. Entre os compostos, os que apresentam maior área foi o fitol, glicerol, ácido acético, ácido benzoico e N, N-dimetil-Acetamida.

**Tabela 2.** Compostos identificados correspondentes ao cromatograma obtido por GC/MS de *Chlorella* sp. GBBB06.

PICO	TR (min)	COMPOSTO	ÁREA%
1	5.240	Ácido acético	7,18
2	10.700	9-Eicoseno	4,14
3	12.807	2-Pirrolidinona	2,21
4	14.010	Éster etílico do Ácido, 4 etoxi benzóico	6,91
5	14.429	Éster metílico de Ácido hexadecanoico	2,37
6	15.375	Glicerol	26,98
7	16.972	Ácido benzoico	15,07
8	20.282	Fitol	35,14

**Tabela 3.** Compostos identificados correspondes ao cromatograma obtido por GC/MS de *Nostoc* sp. GBBB01.

PICO	TR (min)	COMPOSTO	ÁREA%
1	5.185	Ácido acético	30,35
2	10.961	DL-Alanina, N - [(fenilmetoxi) carbonil]	0,98
3	11.590	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	2,45
4	12.238	Acrilato de dodecila	3,50
5	14.280	Éster metílico do Ácido 1H-imidazol-4-carboxílico	1,99
6	14.430	Éster metílico do ácido Hexadecanoico	6,75
7	15.026	1,2,3-Propanotriol, monoacetato	3,07
8	15.374	Glicerol	6,44
9	20.280	Fitol	44,47

**Tabela 4.** Compostos identificados correspondes ao cromatograma obtido por GC/MS de *Synechococcus* sp. GBBB07.

PICO	TR (min)	COMPOSTO	%ÁREA
1	5.207	Ácido acético	0,85
2	11.583	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	2,67
3	14.429	Éster metílico do ácido Hexadecanoico	1,93
4	14.674	Éster metílico do Ácido 9 Hexadecenoico, (Z)	1,87
5	15.380	Glicerol	10,00
6	20.287	Fitol	70,26
7	26.781	Dimetil Acetamida, N,N-	10,31

O álcool terpenóide fitol que é exibido em alta porcentagem em *Chlorella* sp. GBBB06 (35.14%) *Nostoc* sp. GBBB01 (44,47%) e *Synechococcus* sp. GBBB07 (70.26%) é um dos compostos que se destaca por sua aplicabilidade na indústria. Esse metabólito faz parte da molécula de clorofila, sendo usada na indústria de cosméticos como um ingrediente aromático na composição de fragrâncias. Embora seja usado principalmente como constituinte de fragrâncias, suas propriedades biológicas recentemente chamaram a atenção para uma possível aplicação nos campos farmacêutico e biotecnológico (Islam et al. 2018).

De acordo com Dandekar et al. (2015), o fitol apresenta importantes atividades como antimicrobiano, anti-inflamatório, anticancerígeno e diurético. A literatura aponta que esse composto já foi identificado por meio de GC/MS em microalgas do gênero *Chlorella*, e cianobactérias do gênero *Nostoc* e *Synechococcus* (Lütke-Brinkhaus et al. 1985, Salem et al. 2014, Adamakis et al. 2018).



Outro composto relevante identificado foi o glicerol, com picos expressivos em *Chlorella* sp. GBBB06 (26.98%) *Nostoc* sp. GBBB01 (6.44%) e *Synechococcus* sp. GBBB07 (10,00%). O glicerol é precursor dos triacilgliceróis (TAG), que podem servir como matéria-prima para aplicações na produção de biocombustíveis (Kobayashi et al. 2013).

De acordo com Amaro et al. (2011) e Parmar et al. (2011), microrganismos fotossintéticos como cianobactérias e microalgas possuem potencial para a produção de biocombustíveis de maneira economicamente eficaz e ambientalmente sustentável, haja vista não precisarem de solo agriculturável e por seu rápido crescimento e alto teor de lipídios. Verma et al. (2010), apontou diferentes espécies de microalgas, *Chlorella emersonii*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* como potencial para produzir biodiesel a partir de triacilgliceróis.

O potencial de microalgas do gênero *Chlorella* é extenso, pois produzem compostos com diferentes aplicações. Khoeyi et al. (2012), ao estudar a cepa de *Chlorella* sp. MCCS 040 identificou ácidos graxos altamente saturados, sendo sua composição principalmente de éster metílico de ácido palmítico e éster metílico de ácido undecanóico. De acordo com o autor, cepas com ácidos graxos altamente saturados podem ser candidatas ideais à produção de biodiesel.

As cepas estudadas apresentaram composição de ácidos graxos, como o éster metílico do Ácido 9-hexadecenóico identificado em *Synechococcus* sp. GBBB07 (1.87%), o éster metílico do Ácido 1H-imidazol-4-carboxílico em *Nostoc* sp. GBBB01 (1.99%), o éster etílico do Ácido 4 etoxi benzóico em *Chlorella* sp. GBBB06, e o éster metílico do Ácido hexadecanóico, também conhecido como ácido palmítico, encontrado em GBBB06 (2.37%), GBBB01 (6.75%), e GBBB07 (1.93%), respectivamente.

Entre os ácidos graxos identificados, o éster metílico do ácido hexadecanóico, se destaca, pois a literatura aponta esse composto como um antioxidante, hipocolesterolêmico,

antiandrogênico e pesticida, além de sua aplicação na indústria alimentícia e cosmética (Rajeswari et al. 2012, Dandekar et al. 2015).

Esse composto bioativo foi identificado por Widiyanto et al. (2018) ao estudar compostos voláteis em *Chlorella* sp. usando GC-MS, além de identificarem outras biomoléculas como eicosano e hexadecano. Kamal (2016), também identificou em *Nostoc muscurum*, o ácido hexadecanóico, bem como o éster etílico do ácido tetradecanóico, ácidos ftálicos, e éster etílico do ácido 9-octadecenóico, mostrando que tanto cianobactérias como microalgas podem produzir importantes ácidos graxos de interesse para a indústria biotecnológica.

Assim como os demais gêneros de microrganismos estudados, cianobactérias do gênero *Synechococcus*, também possui composição de ácidos graxos. Verma et al. (2019) ao estudar a espécie de *Synechococcus* sp. PCC7942, apontou essa cepa como produtora de diversos ácidos graxos, hidrocarbonetos lineares de cadeia longa e outros produtos de alto valor, como álcoois graxos, sugerindo que *Synechococcus* sp. PCC 7942 possui um grande potencial para a produção de biocombustível como diesel, além de ser recurso natural promissor para as indústrias de alimentos e cosméticos.

### **3.4 Avaliação do potencial antioxidante**

Os resultados referentes à atividade antioxidante dos extratos de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01, e *Synechococcus* sp. GBBB07, utilizando o ensaio do sequestro do DPPH\*, são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Avaliação do potencial antioxidante através do sequestro de radicais DPPH do extrato metanólico de *Chlorella* sp (GBBB06), *Nostoc* sp (GBBB01) e *Synechococcus* sp GBBB07.

	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
GBBB06	8,61 ± 1,31
GBBB01	10,85 ± 1,16
GBBB07	6,65 ± 1,24
Quercetina (padrão)	0,00065 ± 1,23

Concentração efetiva para inibição de 50% do radical (IC<sub>50</sub>)

De acordo com a Tabela 5, percebe-se que os extratos possuem o IC<sub>50</sub> próximos, e que todas as amostras possuem capacidade antioxidante.

Nas figuras 7 e 8 são apresentados os gráficos com a capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>\*</sup> e ABTS<sup>\*\*+</sup> de cada amostra. De acordo com a figura 7, as amostras foram capazes de eliminar o radical DPPH em 12% (*Nostoc* sp.) 20% (*Chlorella* sp.) e 25% (*Synechococcus* sp.) na concentração de 0,675mg/mL, não apresentando aumento de potencial antioxidante nas concentrações mais altas dos extratos.

Quando comparado com o controle positivo percebe-se que essa atividade encontrada é baixa, pois a quercetina apresentou a concentração para inibir 50% do radical DPPH de 0,00065 mg/mL ± 1,23, enquanto nas amostras estudadas a IC<sub>50</sub> foi de 10,85 ± 1,16 (*Nostoc* sp.) 8,61 ± 1,31 (*Chlorella* sp.) e 6,65 ± 1,24 (*Synechococcus* sp.).

Em estudos realizados sobre a atividade antioxidante em extratos de *Chorella marina*, se encontrou potencial antioxidante com capacidade de eliminar o DPPH em diferentes níveis, sendo o extrato de acetona em 20,54% e o extrato metanólico em 23,08% (Hemalatha et al. 2013).

Em trabalhos realizados por Jerez-Martel et al. (2017), demonstraram que várias cianobactérias e microalgas foram efetivas como sequestradoras de radicais, entre as cianobactérias, o gênero *Nostoc* demonstrou capacidade de eliminação de 27,89% do DPPH estando relacionada essa atividade a presença de compostos fenólicos nos extratos analisados.

Na cianobactéria *Synechococcus* sp. Nägeli isolada do estuário de Cochin, Índia, foi realizado um estudo sobre atividade antioxidante em seus extratos metanólicos, onde se conseguiu um grande potencial de eliminação de radicais livres de 55,83% (Lekshmi e Saramma 2018).

A capacidade dos extratos estudados de *Chlorella* sp. *Nostoc* sp. e *Synechococcus* sp. em capturar o radical DPPH pode estar relacionado com a presença de carotenóides e clorofilas identificados através de HPLC/DAD. Os carotenóides ao interagir com os radicais livres atuam como antioxidantes eficazes, podendo ter diferentes atividades dependendo do tipo de carotenoide presente na amostra (Young e Lowe, 2018).

Alguns estudos afirmam que clorofilas, bem como seus derivados como a clorofilina de cobre, também podem exibir potente atividade antioxidante (Ferruzzi e Blakeslee 2007, Tumolo e Lanfer-Marquez 2012, Stinco et al. 2014, Amrani-Allalou et al. 2019).

Os resultados referentes à atividade antioxidante dos extratos de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01, e *Synechococcus* sp. GBBB07, utilizando o ensaio do sequestro do  $ABTS^{*+}$  são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Avaliação do potencial antioxidante através do sequestro de radicais ABTS do extrato metanólico GBBB06, GBBB01 e GBBB07.

	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
GBBB06	0,02647 ± 2,01
GBBB01	0,01629 ± 1,9
GBBB07	0,01649 ± 2,05
Quercetina	0,00065 ± 1,23

Concentração efetiva para inibição de 50% do radical (IC<sub>50</sub>)

Por ser um método mais sensível, o teste com o *ABTS*<sup>+</sup> apresentou maior atividade antioxidante do que o método DPPH. Com o radical *ABTS* as amostras apresentaram valores de IC<sub>50</sub> baixo, indicando alta atividade antioxidante, como mostra a tabela 6 acima, com inibição do radical *ABTS* de 60% (*Chlorella* sp.) 70% (*Synechococcus* sp.) e 70% (*Nostoc* sp) na concentração dos extratos de 0,1 mg/mL (Figura 8). Nesse teste, as amostras *Synechococcus* sp. e *Nostoc* sp. se destacaram por atingir potencial antioxidante elevado.

Dados semelhantes foram obtidos por Shanab et al., (2012). Estes encontraram atividade antioxidante para extratos aquosos de *Nostoc muscorum*, com capacidade de inibição do radical ABTS de 72,8%. Em estudos realizados por WU et al (2005), em extrato aquoso de *Chlorella Vulgaris* na concentração de 0,2 mg, encontraram capacidade inibição de 40% do radical ABTS.

Os antioxidantes são sequestradores de radicais podendo proteger os tecidos celulares dos radicais livres, prevenindo doenças como o câncer, por exemplo (Hemalatha et al. 2013). Dessa forma microrganismos produtores dessa classe de moléculas possuem potencial para o desenvolvimento de produtos alimentícios e fármacos ricos em antioxidantes com efeitos quimio-preventivos benéficos (Yucharoen et al. 2015).

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial dos microrganismos fotossintetizantes do Cerrado maranhense para utilização como fontes de metabólitos secundários bioativos, como carotenoides e clorofila, com aplicações na indústria farmacêutica, nutracêutica e alimentícia. A presença de ácidos graxos também indica um potencial na indústria cosmética e de biocombustíveis. A atividade antioxidante encontrada nos extratos confirma o potencial desses microrganismos para a utilização como fonte de produtos alimentícios e fármacos ricos em antioxidantes.

### **AGRADECIMENTOS**

Esta pesquisa recebeu apoio técnico do Laboratório de produtos naturais, Laboratório de fisiologia experimental, e Laboratório de Biocombustíveis, da Universidade Federal do Maranhão. Agradecemos ao grupo de pesquisa GB3 por ceder as amostras da sua coleção, e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA.

### **REFERÊNCIAS**

- Adamakis, I. D., Lazaridis, P. A., Terzopoulou, E., Torofias, S., Valaril, M., Kalaitzi, P., Rousonikolos, V., Gkoutzikosta, D., Zouboulis, A., Zalidis, G., Triantafyllidis, K. S. 2018. Cultivation, characterization, and properties of *Chlorella vulgaris* microalgae with different lipid contents and effect on fast pyrolysis oil composition. *Environmental Science and Pollution Research*. 23: 23018–23032.
- Amaro, H. M., Guedes, A. C., Malcata, F. X. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. 10:3402–3410. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>>.
- Amrani-Allalou, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Mapelli-Brahm, P., Sait. A., Tenores, G. C., Benmeziane, A., Kadri, N., Madani, K., Martínez, A. J. M. 2019. Antioxidant activity,

carotenoids, chlorophylls and mineral composition from leaves of *Pallenis spinosa*: an Algerian medicinal plant. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*.

Andrade, L. M., Andrade, C. J., Dias, M., Nascimento, C. A. O., Mendes, M. A. 2018. *Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview*. *MOJ Food Processing & Technology*. 2:00144.

Aboim, Joseline e Oliveira, Deborah & Ferreira, John & Siqueira, Andrei & Dall'Agnol, Leonardo & Da Rocha Filho, Geraldo & Gonçalves, Evonnildo & Nascimento, Luís. (2016). Determination of biodiesel properties based on a fatty acid profile of eight Amazon cyanobacterial strains grown in two different culture media. *RSC Adv.* 6. 10.1039/C6RA23268J.

Dandekar, R. E., Fegade, B. E., Bhaskar, V. H. 2015. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1: 149–154.

Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., Fewer, D. P. 2015. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends in Microbiology*, 23: 10.

Farrokh, P., Sheikhpour, M., Kasaeian, A., Asadi, H., & Bavandi, R. 2019. Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A Critical Review. *Biotechnology Progress*, 35: 1–16 . Disponível em <doi:10.1002/btpr.2835>.

Ferruzzi, M. G. & Blakeslee, J. 2007. Digestion , absorption , and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. 27: 1–12.

Hashtroudi. M. S. 2013. Analysis of *Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola* from Northern Iran , as rich sources of major carotenoids. *Food Chemistry*. 3–4: 1148–1153. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.055>>.

Hemalatha, A., Giriya, K., Parthiban, C., Saranya, C., Anantharaman, P. 2013.

- Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom , *Navicula clavata* and green microalgae , *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Pelagia Research Library*. 5:151–157.
- Hu, C. C., Lin, J. T., Lu, F. J., Chou, F. P., Yang, D. J. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*. 2:439–446.
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., Lee, D. J. 2017. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 1: 54–67.
- Islam, M. T., Alic, E. S., Uddind, S. J., Shawe, S., Islamd, M.A., Ahmedd, M. I., Shillf, C. M., Karmakard, U. K., Yarlag, N. S., Khanh, I. N., Billahi, M. M., Pieczynskaj, M. D., Zengink, G., Malainerl, C., Nicolettim, F., Gulein, D., Neagoen, I. B., Apostolov, A., Banachr, M., Yeungu, A. W.K., El-Demerdashv, A., Xiaox, J., Deyy, P., Yelez, S., Jóźwikj, A. Strzałkowskaj, N., Marchewkaj, J., Rengasamyaa, K. R. R., Horbańczukj, J., Kamal, M. A., Mubarak, M. S., Mishraaf, S. K. Shilpid, J. A., Atanasovj, A. G. 2018. *Phytol*: A review of biomedical activities. *Food and Chemical Toxicology*. 121:82–94.
- Jerez-Martel, I. García-Poza, S., Rodríguez-Martel, G., Rico, M., Afonso-Olivares, C., Gómez-Pinchetti, J. L. 2017. Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and cyanobacteria strains. *Journal of Food Quality*.
- Kamal, A. A. 2016. Fatty acid profiling and antioxidant potential of total polar lipid content of cyanobacterium *Nostoc muscurum*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2:159–163.
- Khoeyi, Z. A., Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z. 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*. 1:41–49.



- Kobayashi, N., Noel, E. A., Barnes, A., Rosenberg, J., Dirusso, C., Black, P., Oyler, G. A. 2013. Rapid detection and quantification of triacylglycerol by HPLC-ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* strains. *Lipids*. 10:1035–1049.
- Komárek, J. 2010. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia*. 1:245–259.
- Lütke-Brinkhaus, F. E. Weiss, G. E. Kleinig, H. 1985. Prenyl lipid formation in spinach chloroplasts and in a cell-free system of *Synechococcus* (Cyanobacteria): polyprenols, chlorophylls, and fatty acid prenyl esters. *Planta*. 1:68–74.
- Lekshmi, S. & Saramma, A. V. 2018. Antioxidant activity of *Synechococcus* sp. Nägeli isolated from Cochin estuary, India. 47: 2213–2216.
- Li, D., Lee, J., Li, Y., & Li, C. (2011). Natural products and body weight control. *North American Journal of Medical Sciences*, 3: 13.
- Mezzomo, N., Ferreira, S. R. S. 2016. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *Journal of Chemistry*.
- Niedermeyer, T. H. J. 2015. Anti-infective Natural Products from Cyanobacteria. *Planta medica*. 15:1309–1325.
- Nozzi, N. E. Oliver, John W. K. & Atsumi, S. 2013. Cyanobacteria as a Platform for Biofuel Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 1: 1–6.
- Oliveira, L L. D. 2010. Estudo da estrutura da comunidade zooplanctônica e sua relação com as cianobactérias em três reservatórios do rio Tietê, SP. p. 202.
- Obulesu, M e Rao, Muralidhara e Bramhachari, P V. 2011. Carotenoids and Alzheimer ' s Disease : An insight into therapeutic role of retinoids in animal models Author ' s Personal Copy. *Neurochemistry International*. 59:535–541.,Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2011.04.004>>.

- Ozawa, Y., Sasaki, M., Takahashi, N., Kamoshita, M., Miyake, S., & Tsubota, K. 2012. Neuroprotective Effects of Lutein in the Retina. *Current Pharmaceutical Design*, 18:51–56.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D. 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*. 22:10163–10172. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.030>>.
- Park, J., Chyun, J., Kim, Y., Line, L. L., & Chew, B. P. 2010. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & Metabolism*, 7:18.
- Patias, L. D., Fernandes, A. S., Petry, F. C., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., Zepka, L. Q. 2017. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. *Food Research International*. 100:260–266. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.069>>.
- Farrokh, Parisa & Sheikhpour, Mojghan & Kasaeian, Alibakhsh & Asadi, Hassan & Bavandi, Roya. (2019). Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A Critical Review. *Biotechnology Progress*. 35. 10.1002/btpr.2835
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., Reina, G. G., Señoráns, F. J., Ibáñez, L. 2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Science and Technology*. 46:245–253. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.024>>.
- Premanandh, J., Priya, B., Prabakaran, D., Lakshmanan, U.M.A 2009. Genetic heterogeneity of the marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* (Pseudanabaenaceae) evidenced by RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Journal of Plankton Research*. 10:1141–1150.

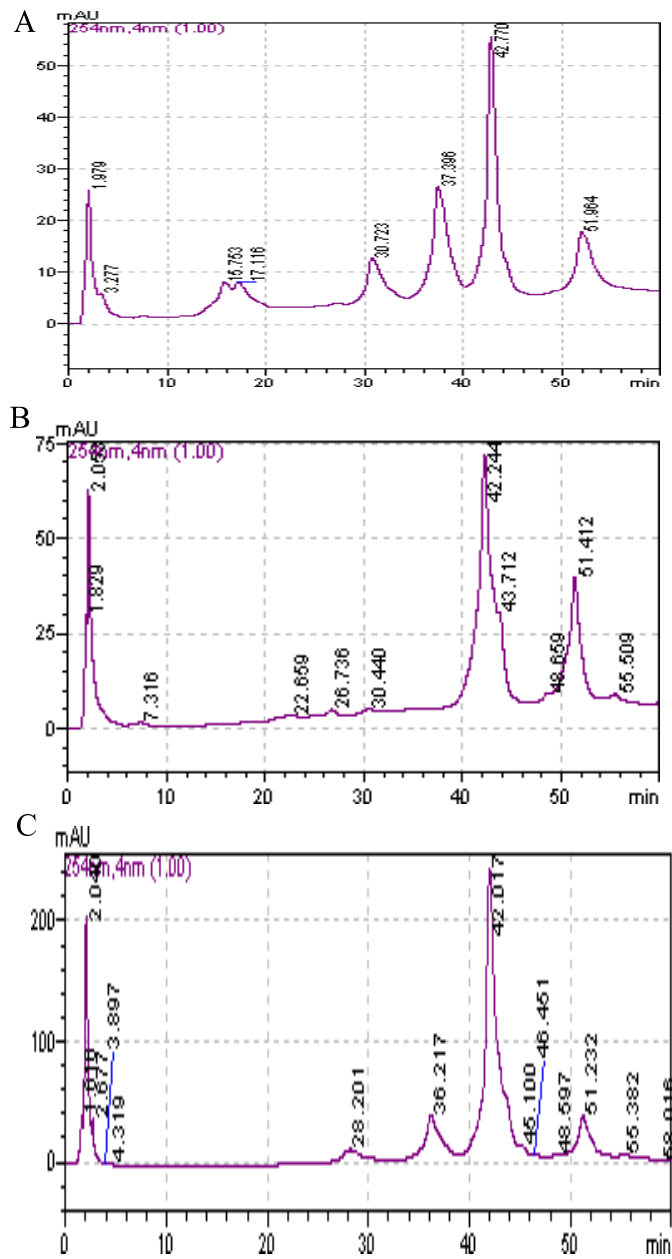
- Rajeswari, G. E., Murugan, M. E., Mohan, V. R. 2012. GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (Linaceae). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4:301–308.
- Rastogi, R. P. E., Madamwar, D. Incharoensakdi, A. 2015. Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: Environmental health impacts and mitigation strategies. *Frontiers in Microbiology*.
- Rastogi, R. P. e Sinha, R. P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 4:521–539. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.009>>.
- Ribeiro, E. e Seravalli, E. A. G. 2003. *Química de Alimentos 2º ed.* Instituto Mauá de Tecnologia, Mauá, 190pp.
- Rodrigues, D. B., Menezes, C. R., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., Zepka, L. Q. 2015. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. *Food Research International*. 77:273–279.
- Rodrigues, D. B., Flores, E. M. M., Barin, J. S., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., Zepka, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*. 65:144–148, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.037>>.
- Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas, V., Costas, E. 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquatic Toxicology*. 124–125:227–237, Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.001>>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231–1237.

- Ryu, S. K., King, T. J., Fujioka, K., Pattison, J., Pashkow, F. J., & Tsimikas, S. 2012. Effect of an oral astaxanthin prodrug (CDX-085) on lipoprotein levels and progression of atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis*. 222: 99–105
- Salem, O. M. A., Hoballah, E.M., Ghazi1, S. M., Hanna, S. N. 2014. Antimicrobial activity of microalgal extracts with special emphasize on Nostoc sp. *Life Science Journal*. 12:752–758.
- Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A., Mahmoud, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. 2012. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2:608-615
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 270–276.
- Schoefs, Benoît. 2002. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*. 11:361–371.
- Sinha, R. P. 2015. Biochemical characterization of sunscreens mycosporine-like amino acids from two Nostoc species inhabiting diverse habitats. p. 199–208.
- Stinco, C. M., Benítez-González, A. M., Hernanz, D., Vicario, I. M. & Meléndez-Martínez, A. J. (2014). Development and validation of a rapid resolution liquid chromatography method for the screening of dietary plant isoprenoids: Carotenoids, tocopherols and chlorophylls. *Journal of Chromatography*. 1370: 162–170. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.044>>.
- Swain, S. S., Padhy, R. N. E Singh, P. K. 2015. Anticancer compounds from cyanobacterium *Lyngbya* species: A review. Springer International Publishing, v. 108.
- Tan, L. T.. 2010. Filamentous tropical marine cyanobacteria: A rich source of natural products for anticancer drug discovery. *Journal of Applied Phycology*. 5:659–676.
- Tumolo, T. & Lanfer-Marquez, U. M. 2012. Copper chlorophyllin: A food colorant with

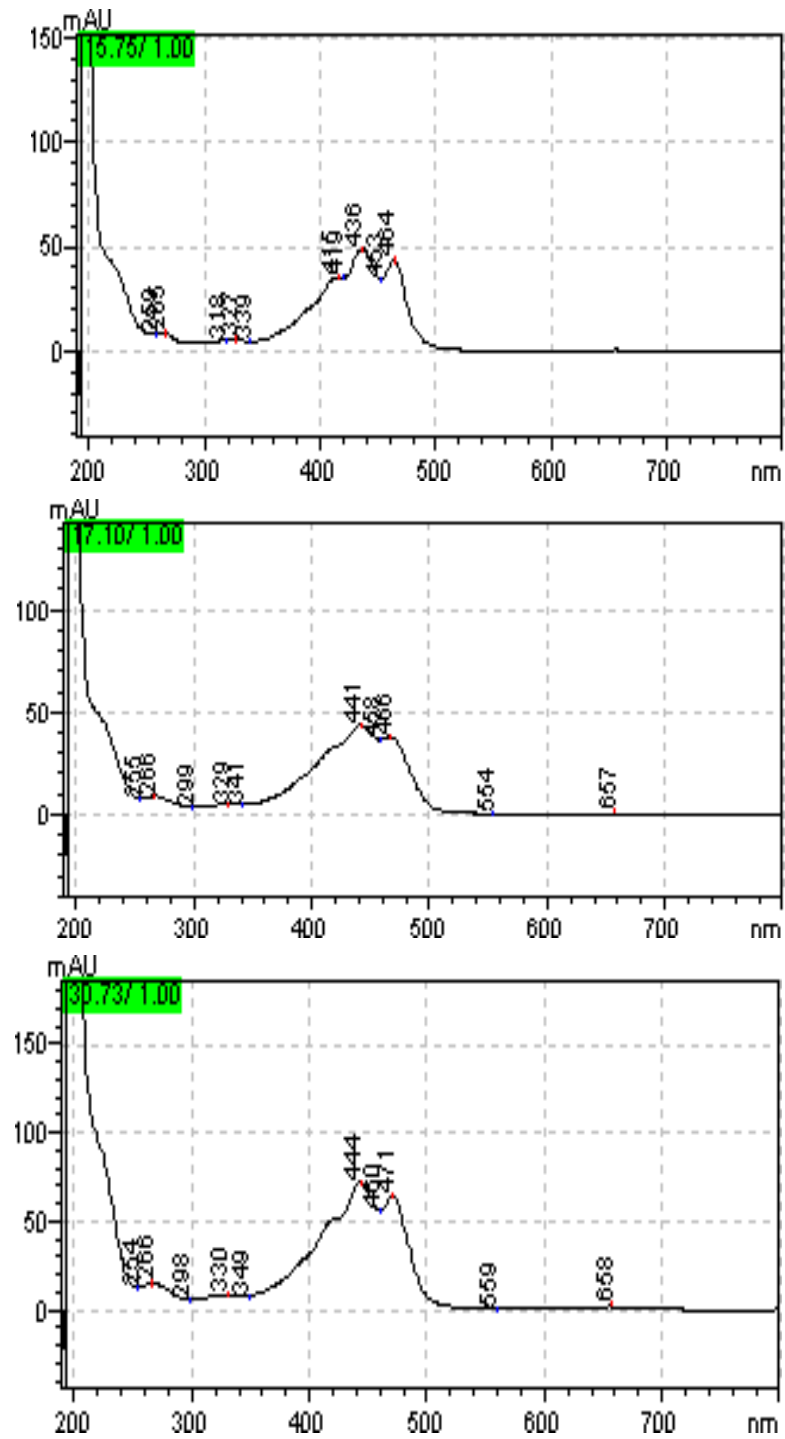
- bioactive properties? *Food Research International*. 46: 451–459. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.031>>.
- Valduga, E., Tatsch, P. O., Tiggemann, L., Treichel, H., Toniazzo, G., Zeni, J. e Luccio, M. D 2009. Produção de carotenoides: Microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quimica Nova*. 9:2429–2436.
- Valente, L. M.M., Alves, F. F., Bezerra, G. M., Almeida, M. B. S., Rosario. S. L., Mazzei, J. L., d’Avila, L. A., Siani, A. C. 2006. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2:216–223.
- Verma, E., Singh, S., Mishra, A. K. 2019. Salinity-induced oxidative stress-mediated change in fatty acids composition of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2:875–886. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1720-0>>.
- Verma, N. M., Mehrotra, S., Shukla, A. e Mishra, B. N. 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology*. 10:1402–1411.
- Volp, A. C., P., Renhe, I. R. T., Stringueta, P. C. 2009. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 1:157–166.
- Widiyanto, S., Sarto, M., Fitria, I., Yudo, R., Suyono, E. A. 2018. *Journal of. Spectrum*. Biochemical compounds and sub-chronic toxicity test of *Chlorella* sp. and *Spirulina* sp. isolated from Glagah Coastal Water. 1926:1926–1929.
- Winnikoff, J. R., Glukhov, E., Watrous, J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H. 2014. Quantitative molecular networking to profile marine cyanobacterial metabolomes. *Journal of Antibiotics*. 67: 105–112.

- Wu, L. C., HO, J. A., SHIEH, M. C., LU, I. W. 2005. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Spirulina and Chlorella Water Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4207-4212
- Young, A. J. e Lowe, G. L. 2018. Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants*.2:10–13.
- Yucharoen, R., Srisuksomwong, P., Tragoolpua, Y. 2015. Science and Technology Communications Science and Technology Communications. *Communications*. 2:182–183.
- Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chena , T., e Chen, F. 2014. Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food and Function*. 3: 413–425.
- Priyadarshani, I. & Rath, B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. 3: 89–100.
- Muys, M., Sui, Y., Schwaiger, B., Lesueur, C., Vandenneuvel, D., Vermeir, P., & Vlaeminck, S. E. 2019. High variability in nutritional value and safety of commercially available Chlorella and Spirulina biomass indicates the need for smart production strategies. *Bioresource Technology*. 275: 247–257.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. 2007. Exploitation of Dunaliella for  $\beta$ -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:517–523.

## ANEXOS

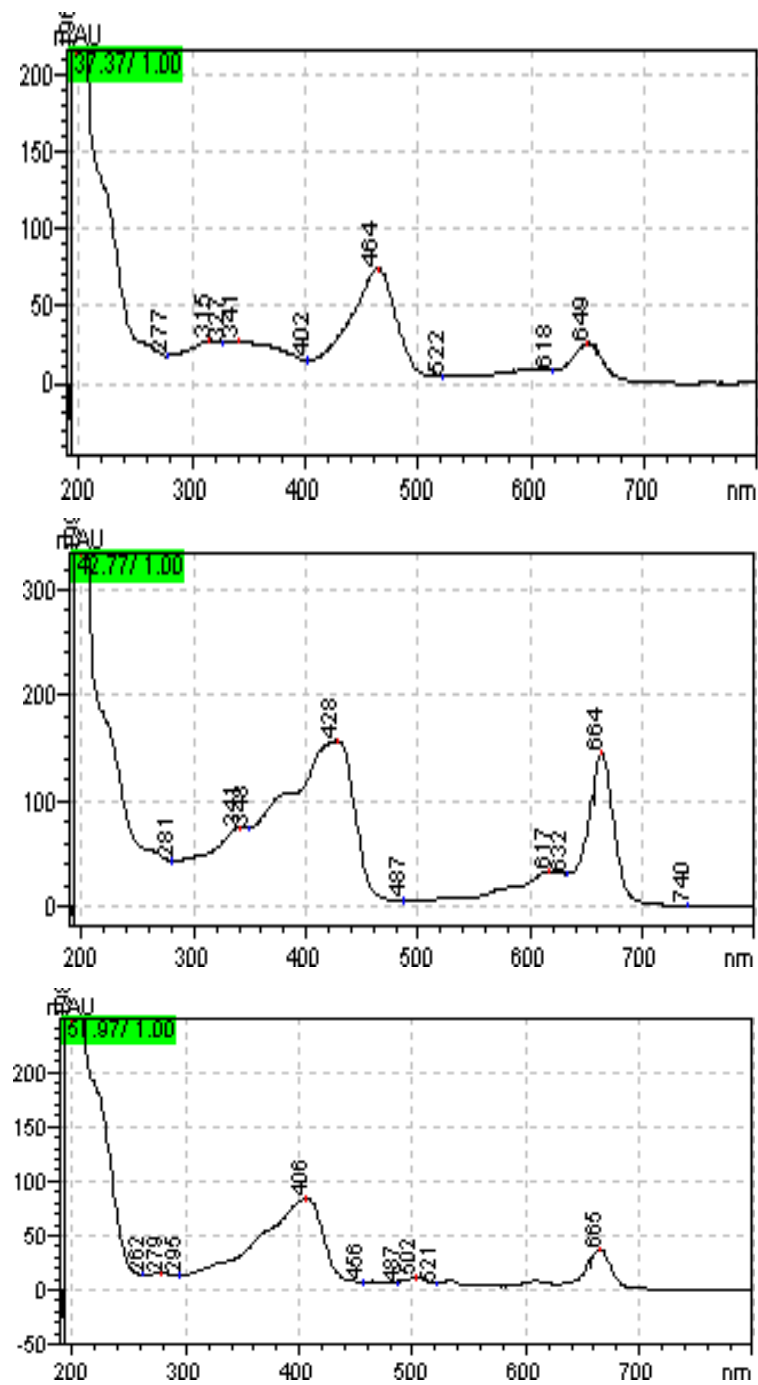


**Figura 1.** Cromatogramas obtidos por HPLC -DAD para os extratos metanólicos de *Chlorella* sp. GBBB06 (A), *Nostoc* sp. GBBB01 (B), *Synechococcus* sp. GBBB07 (C)

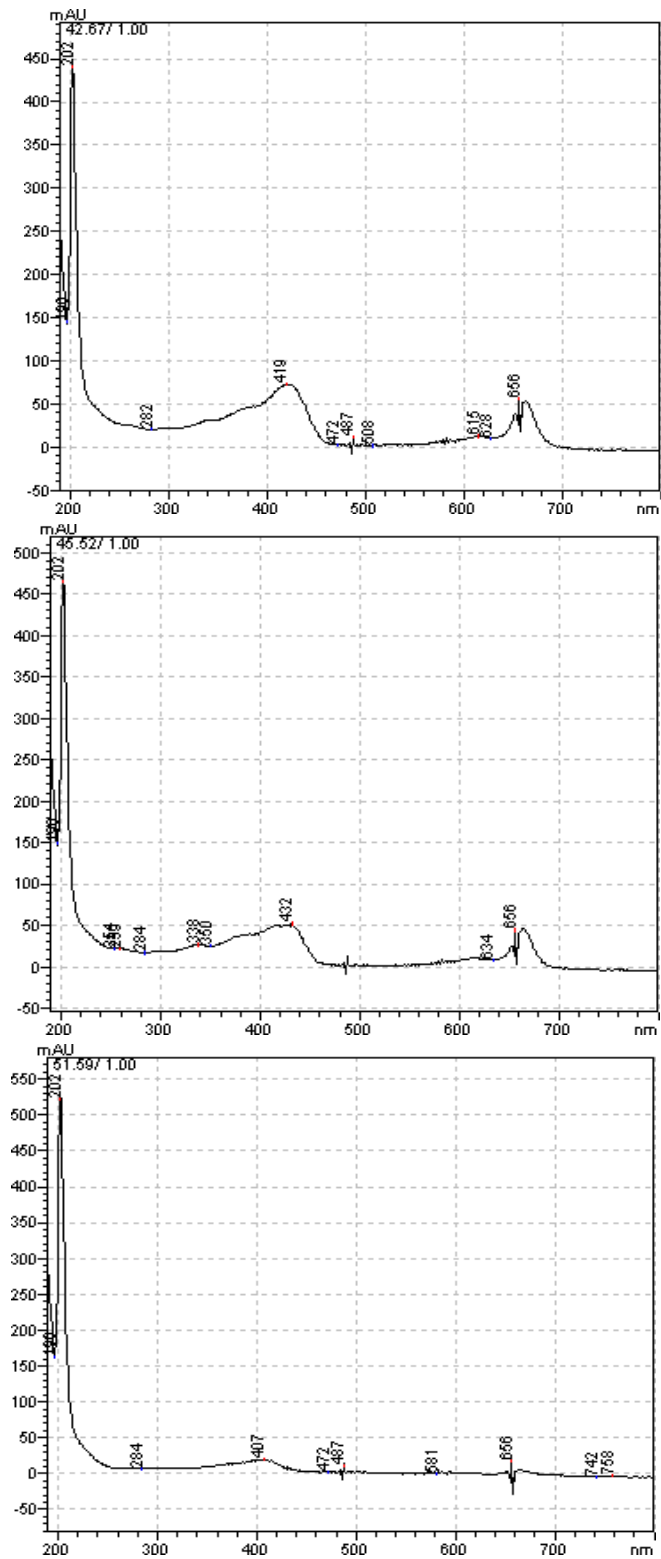


**Figura 2:** Espectros de carotenóides obtidos por HPLC/DAD para o extrato de *Chlorella* sp. GBBB06.

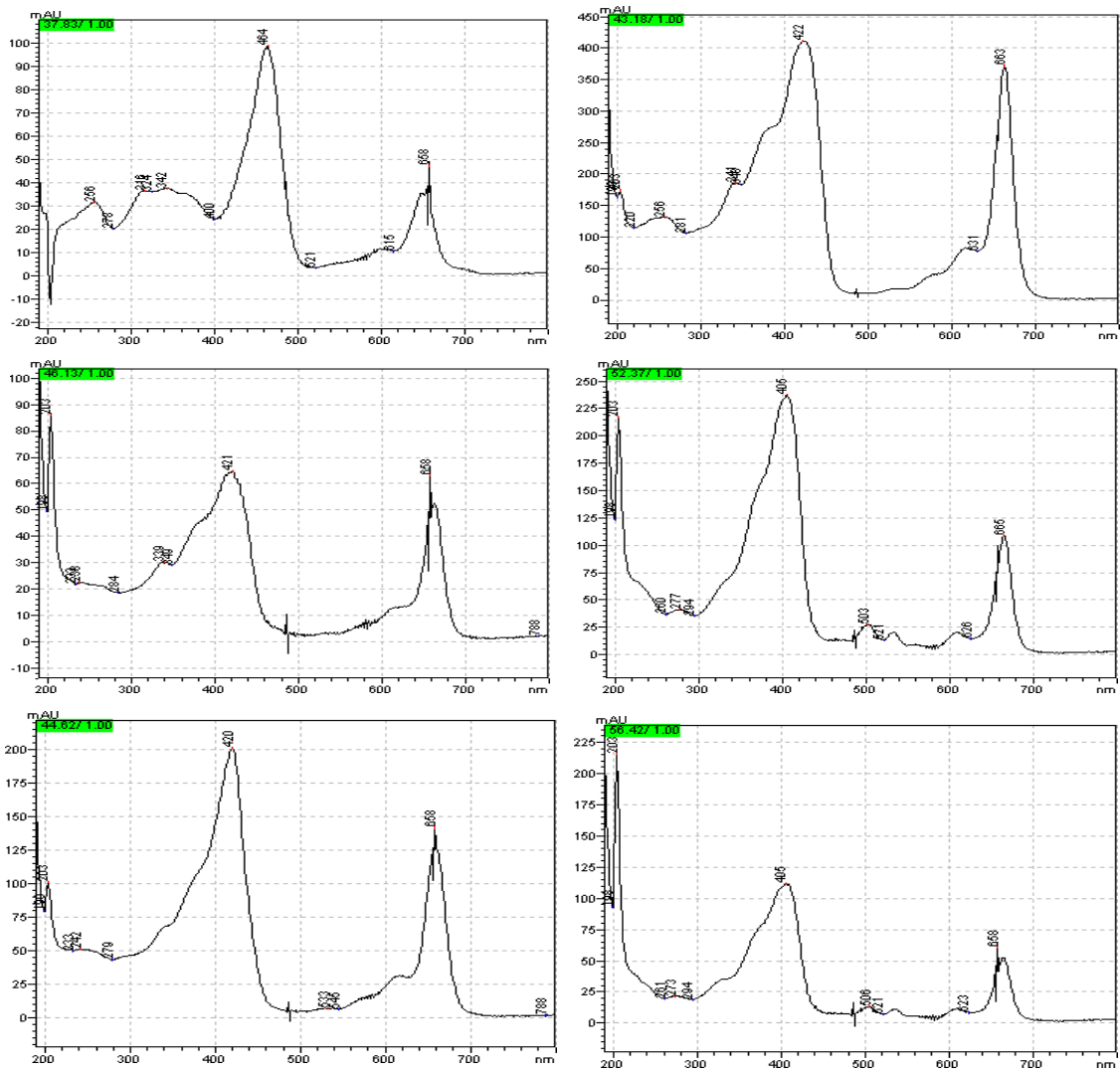




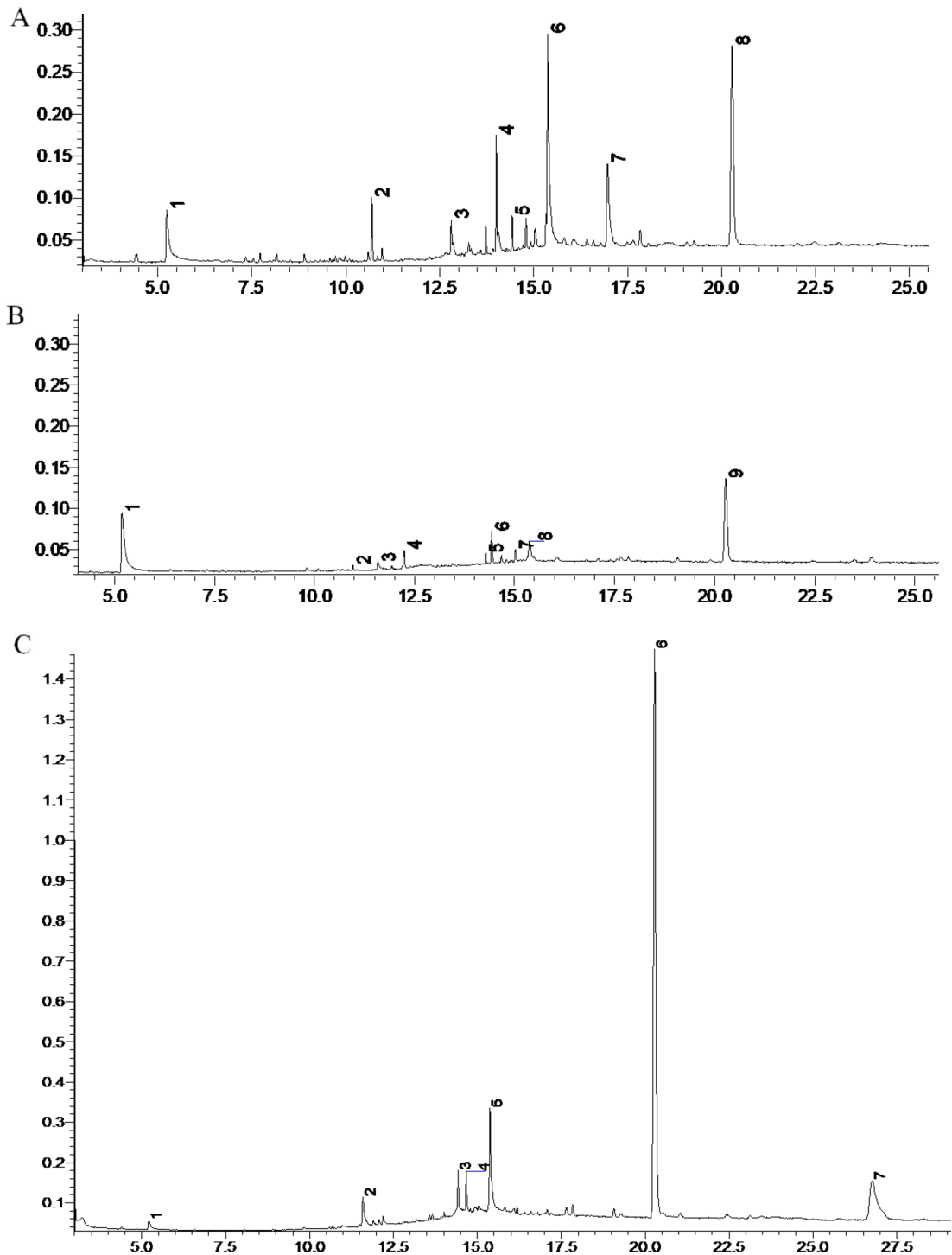
**Figura 3.** Espectros de clorofila obtidos do extrato de *Chlorella* sp. GBBB06.



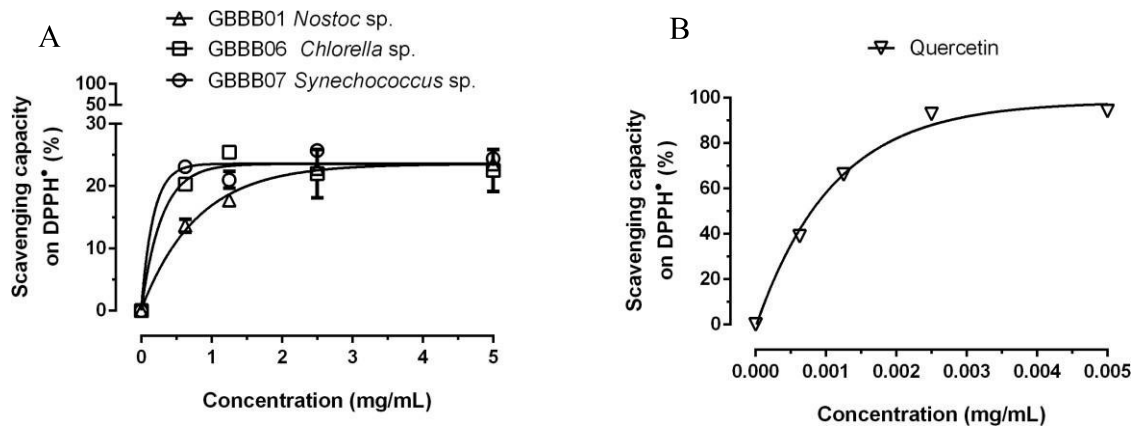
**Figura 4.** Espectros de clorofila obtidos do extrato de *Nostoc* sp. GBBB01.



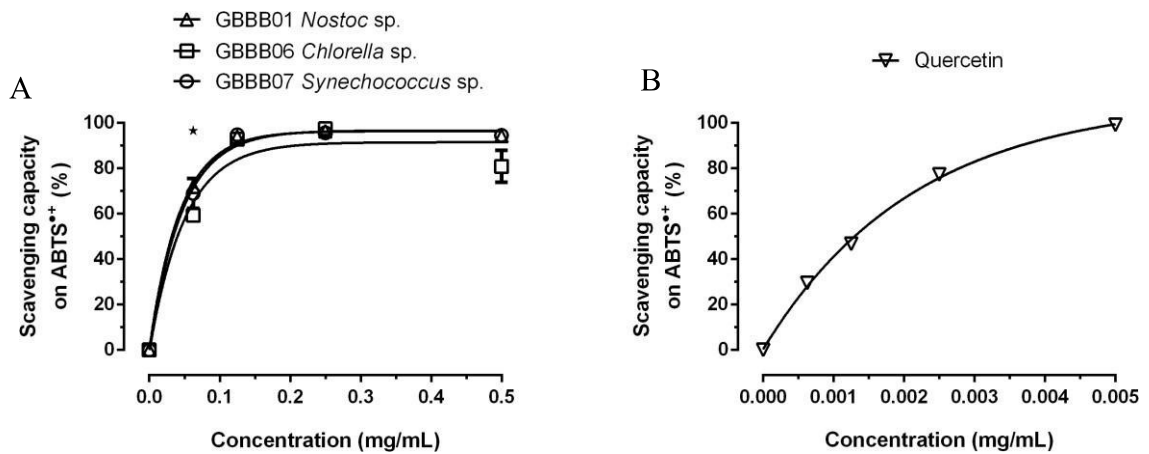
**Figura 5.** Espectros de clorofila obtidos do extrato de *Synechococcus* sp. GBBB07



**Figura 6.** Cromatogramas obtidos por GC/MS para os extratos metanólicos de *Chlorella* sp. GBBB06 (A), *Nostoc* sp. GBBB01 (B), *Synechococcus* sp. GBBB07 (C)

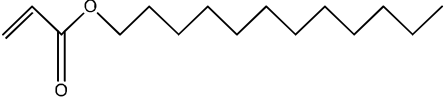
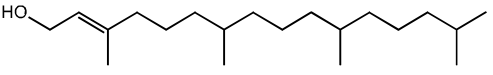
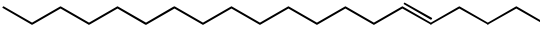
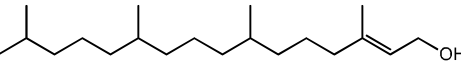
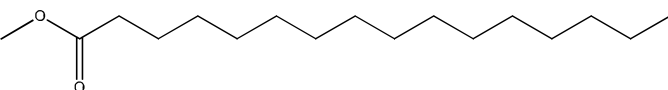
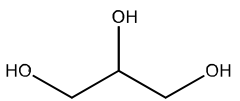
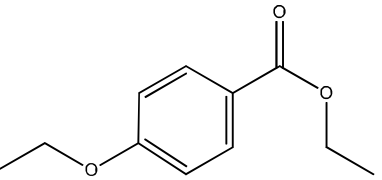
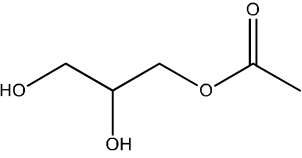
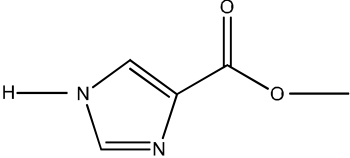


**Figura 7.** Capacidade de sequestro do radical DPPH para o extrato metanólico bruto: (A) de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01 e *Synechococcus* sp. GBBB07; (B) Controle positivo (Quercetina).



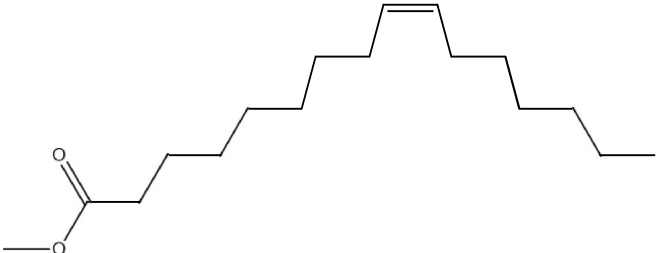
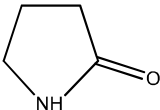
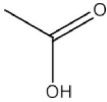
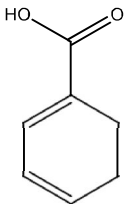
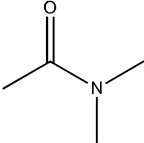
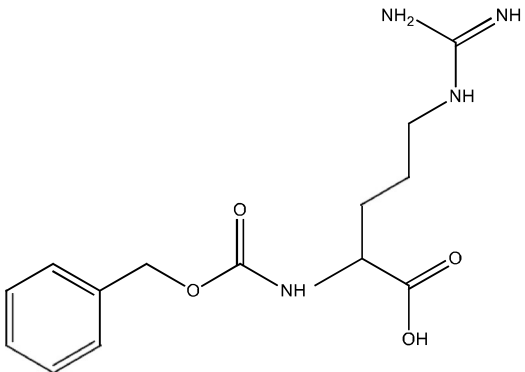
**Figura 8.** Capacidade de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> para o extrato metanólico bruto: (A) de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01 e *Synechococcus* sp. GBBB07; (B) Controle positivo (Quercetina).

Tabela 7. Estruturas químicas dos compostos identificados através de GC/MS em extratos metanólicos de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01 e *Synechococcus* sp. GBBB07

Nome dos compostos	Estruturas químicas
Acrilato de dodecila	
Fitol	
9-Eicoseno	
3,7,11,15- tetrametil-2-hexadecen-1-ol	
Ester metílico do ácido hexadecanoico	
Glicerol	
Éster etílico do ácido- 4-etoxi benzóico	
1,2,3- Propanotriol, monoacetato	
Éster metílico do ácido 1H_imidazol-4-carboxílico	

Continuação do Quadro 1. Estruturas químicas dos compostos identificados através de GC/MS em extratos metanólicos de *Chlorella* sp. GBBB06, *Nostoc* sp. GBBB01 e *Synechococcus* sp.

GBBB07

Nome dos compostos	Estruturas químicas
Éster metílico do ácido-9-Hexadecenoico, (Z)	
2-Pirrolidinona	
Ácido acético	
Ácido Benzoico	
Dimetil Acetamida, N, N	
DL- Alanina, N-[(fenilmetoxi) carbonil]	

## ANEXO

### NORMAS DA REVISTA ALGAE

#### MANUSCRIPT PREPARATION

##### General Requirements

The target length of Research Articles is approximately 10 journal pages (note: estimate 3 typed pages of text for every printed journal page; about 4,000 words). Authors preparing papers in excess of 15 journal pages should contact the Editor-in-Chief first. Research Notes of 1–3 printed pages are acceptable. Use the same general format as that of Research Articles. Review Articles can be up to 20 printed pages and can include several levels of headings.

Manuscripts must be prepared in a 12-point font size and double-spaced throughout (including references, tables and legends) with margins of at least 3 cm all round. Times New Roman, Courier or Helvetica fonts are preferred. All pages should be numbered serially, with the first page a title page, the second an abstract, followed by the text, references, tables, and legends for figures, in that order. It is also suggested that you number the lines of your manuscript to facilitate the review/editing process. Do not right justify or divide words at the ends of lines. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced when the article is processed. In particular, do not embed “graphically designed” equations or tables, but prepare these using the word processor alone.

The Abstract and Results should be written in past tense, except in the case of descriptions of new species. Latin names of algal species studied should have the taxonomic author(s) of the name listed when first used (but not other species cited from the reference). To find the taxonomic author(s), check the Algaebase Web site (<http://www.algaebase.org>). To see the accepted form of the author’s name, please consult with the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/index.html>). Consult the latest issue of the journal for other questions regarding style. New taxa must be established in accordance with the latest International Code of Botanical Nomenclature (for more information on this, see below).

##### Research Articles

##### Research Articles should be subdivided into six sections:

INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS (or OBSERVATIONS), DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, and REFERENCES, although this may not be appropriate for some articles (such as some taxonomic papers). To



avoid unnecessary errors, authors are strongly advised to use the “spell-check” and “grammar-check” functions of their word processor. Do your very best to use correct English grammar, spelling and punctuation; if you are not a native English speaker, you should have the text edited by someone, as the editors cannot always be expected to carry out major linguistic revision.

**Research Articles should be prepared according to the following format:**

**1. The title page** should contain a concise title, the name(s) and address(es) of the author(s), any necessary footnotes, and a short running title suitable for page headings.

- *Title.* Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. The title should have not more than 100 characters (ca. 15 words, 2 lines in print), and 150 characters at most. If the name of an organism is used in the title, an indication of its taxonomic position must be given. Nomenclatural authorities should only be used in titles when nomenclatural changes are being proposed.

- *Author names and affiliations.* Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors’ affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript number immediately after the author’s name and in front of the appropriate address for identification. Provide a valid address with ZIP or postal number for each affiliation, including the country name.

- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, as well as post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided, in addition to the e-mail address and the complete postal address.

- *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a “Present address” (or “Permanent address”) may be indicated as a footnote to that author’s name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address. Superscript letters are used for such footnotes.

- *Running title.* Provide a condensed running head with 3 to 6 words.

**2. The ABSTRACT** should not be more than 250 words and should be concise, informative and intelligible without reference to the main text. It should indicate the objectives, main results and conclusions of the paper. Do not repeat information in the title or make reference to the literature. Authorities for species names should be included in the abstract only for primarily taxonomic papers. Begin the abstract by stating the scientific question of concern. Explain the methods used to tackle the question. The results should be outlined briefly and put

into a concise, broad perspective. Immediately after the abstract, list 5 to 8 **Key Words** (arranged alphabetically and separated by semicolons), using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, “and” or “of”). Include a section of **Abbreviations** after the keywords. List the abbreviation, followed by its meaning written out in full (e.g., DIN, dissolved inorganic nitrogen). Common abbreviations (e.g., DNA) do not need to be listed. The journal accepts standard abbreviations from the *Journal of Biological Chemistry*. All non-standard abbreviations should be listed alphabetically. The abbreviation is spelled out at first mention in the main text, and thereafter, only the abbreviation/acronym is used.

**3. The INTRODUCTION** must define the problem within the context of existing knowledge, state the objectives of the work and provide an adequate background; avoid a detailed literature survey or a summary of the results. It should not be a general review of the field, but it should provide essential background for those who are not experts in the particular area.

#### **4. MATERIALS AND METHODS**

Describe the methodology used in the study in sufficient detail to allow the work to be reproduced by another scientist. Methods already published should be indicated by a reference, and only relevant modifications should be described. Whenever possible, give sources of materials in detail. If cultures are used, indicate the strain or clone number and the source. If study sites are mentioned, provide latitudes/longitudes. For materials and supplies (including software), indicate the source (company name, city, state, country) on first reference. In addition, list the model number for equipment used, as appropriate. Use metric units (*Système International d’Unités*, SI) and SI style (e.g.,  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). For description of laboratory procedures, the terms liter (abbreviated to L) and milliliter (mL) may be used. Do not use dots or full-stops between parts of the term. For more information on this see below. For further guidance on taxonomic papers, please see the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (<https://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art29>).

#### **6. DISCUSSION**

This should explore the significance of the results in relation to the problem outlined in the introduction - not repeat them. Reference to illustrative material should be minimal and should be provided only when necessary to emphasize a specific interpretation. A **CONCLUSION** should be added if results and discussion are combined.

## 7. ACKNOWLEDGEMENTS

This is to be used as necessary to acknowledge the source of financial grants in completing the study. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Thanks to anonymous reviewers are not allowed.

## 8. REFERENCES

In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication. When reference is made to a work by two authors, both names should be given using "and" (e.g., Lee and Kang 1986); for three or more author names, give the first author followed by "et al." and the year (e.g., Kim et al. 2010). Multiple references must be arranged in chronological order (e.g., Lee and Kang 1986, Kim 1990, Kim et al. 2000*a*, 2000*b*). Only cite articles or books already published or in press, not unpublished work "in preparation". The author is responsible for verifying the accuracy of unpublished citations.

In the list at the end of the paper, references in the **REFERENCES** section should be typed, double-spaced and in alphabetical order, with multiple references by the same author(s) arranged chronologically. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors, the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with one co-author; publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000*a*, 2000*b*, etc. For Volume (Vol.) and Bulletin (Bull.), Arabic numerals should be used; the full number of pages should be given in the form of pp. 123-128. Type references flush left with an extra space between citations; they will be formatted properly at the press. The name of the journal should be abbreviated according to the *World List of Scientific Periodicals* and the selection according to *Abbreviated Titles of Biological Journals* issued by the Biological Council or the *Biosis Serial Sources*, which is published each December and is available in most libraries (or go to <http://www.library.uq.edu.au/faqs/endnote/biosciences.txt>). If in doubt about any journal abbreviation, write out the journal title in full. The number of a fascicle in brackets after the volume number should be given only if the volume is not paginated consecutively. The titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Korean)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press". References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text. All publications cited in the text should be

presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

### **9. Tables**

Authors should take notice of the limitations set by the size and layout of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables. Tables should be created using the Table function in the word processor (rather than using tabs). Tables should have a descriptive title at the top of each table. The title and table of contents must be double-spaced throughout, in 12-point font, and on a separate numbered page. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals according to their sequence in the text. The text should include references to all tables. Tables should not include vertical lines or shading; if either is essential, the material must be submitted as a figure for direct reproduction. Column headings should be brief, with units in parentheses. Tables and their captions should be self-explanatory; e.g., abbreviations and acronyms must be defined again. Any explanation essential to understanding the table should be given as a footnote at the bottom of the table, not in the heading. Include in the footnotes all non-standard abbreviations used and enough information for the table to be understood without undue recourse to the text. For table footnotes, use superscripted lower case letters (a, b, c) rather than symbols or numbers; asterisks (\*, \*\*, \*\*\*) can be used to indicate statistical significance. These can be applied in the case of figures. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings. If a table provides data on biological species, its legend should begin with the full Latin name of that species.

### **10. Figures**

Line drawings, diagrams and photographs should be planned so that after reduction they will fit within either the width of one column (8 cm) or two columns (17 cm), and be no more than 25 cm in length. Normally, only previously unpublished illustrations are acceptable. Figures should be numbered in Arabic numerals consecutively as they are mentioned in the text (Fig. 1), (Figs 2 & 3), (Figs 1-4), etc. Each figure should be submitted as a separate Tagged Image Format (TIFF), Encapsulated PostScript (EPS) or MS Office files created at a resolution of 300 dpi (or 600 dpi for combination images). In the case of very large files, Joint Photographic Experts Group (JPEG) or Graphics Interchange Format (GIF) files may be submitted initially. Do not import the figures into the text file, but, instead, indicate their approximate locations directly on the manuscript.

Combination images, or images that contain both line artwork (vector graphics) and halftones or photographs (bitmap graphics), must be supplied at a higher resolution to prevent image quality loss in the bitmap graphics, such as in the symbol keys. Please do not attempt to increase the resolution of a lower resolution figure by resaving it at 300 dpi or higher. The result may be pixilated or grainy images and poor text quality. Photographs (halftones) will not be reduced or enlarged; thus, they must be printed to fit in one column or two columns in width and be no more than 18–20 cm (8 inches) in length so that the legend will fit on the same page as the illustration. Plan line drawings and graphs to fit these dimensions after reduction, and with all lines, symbols and lettering bold enough to permit 1/2 to 2/3 reduction in size; many line drawings are reduced to the width of a single column. All terms, abbreviations, and symbols should correspond to those used in the text of the paper. It is preferable to include a symbol key on line drawings. Component figures within a plate should be labeled with letters, not numbers and should not be encircled (e.g., a, b, c, not 1, 2, 3, □, □, □). Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol. Do not use two shades of gray in histograms.