



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

Mariene Amorim De Oliveira

IDENTIFICAÇÃO E BIOATIVIDADE DE MICRORGANISMOS  
FOTOSSINTETIZANTES DO PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS-MA

São Luís

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

Mariene Amorim de Oliveira

IDENTIFICAÇÃO E BIOATIVIDADE DE MICRORGANISMOS  
FOTOSSINTETIZANTES DO PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS-MA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Henrique Gonçalves Moraes

São Luís

2019

Oliveira, Mariene Amorim de.

Identificação e bioatividade de microrganismos  
fotossintetizantes do Parque Nacional da Chapada das Mesa-  
MA / Mariene Amorim de Oliveira. - 2019.

61 p.

Orientador(a): Pablo Henrique Gonçalves Moraes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís, 2019.

1. Análise polifásica. 2. Biologia molecular. 3.  
Cianobactérias. 4. Microalgas. 5. Toxicidade. I.  
Moraes, Pablo Henrique Gonçalves. II. Título.

MARIENE AMORIM DE OLIVEIRA

IDENTIFICAÇÃO E BIOATIVIDADE DE MICRORGANISMOS  
FOTOSSINTETIZANTES DO PARQUE NACIONAL DA CHAPADA DAS MESAS-MA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em:        /    /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Pablo Henrique Gonçalves Moraes (Orientador)  
Doutor em Genética e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Christina Gomes de Azevedo Cutrim  
Doutora em Oceanografia  
Universidade Estadual do Maranhão

---

Prof. Dr. Juliano dos Santos  
Doutor em Agronomia/Fitopatologia  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall'Agnol  
Doutor em Química Sustentável  
Universidade Federal do Maranhão

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que na sua bondade me proporcionou a alegria de concluir mais um objetivo. Aos meus pais, que incansavelmente tem me cercado de amor e compreensão. Aos meus irmãos, razão da minha alegria, que me fazem sempre sorrir e nunca perder as esperanças, obrigado por jamais desistirem de mim.

Sou grata ao meu orientador, Dr. Pablo Moraes, pela paciência, conselhos e dedicação durante a execução deste trabalho, aos professores Dr<sup>a</sup>. Hivana Dall'Agnol e Dr. Leonardo Dall'Agnol, pelas contribuições e disposição em ajudar, sempre.

À todos os amigos do grupo de pesquisa GB3, esses seres iluminados que fazem rir em qualquer situação. Em especial à Ana Carolina e Lucas Salomão, Milene Brito, Igor Santana, Amanda Monteiro, Pedro Sousa, Karla Pieroti e Iolanda Barros, vocês são maravilhosos, obrigados pelas experiências e ensinamentos. Obrigada Malena Costa e Ivana Costa, pela amizade de tantos anos e pelos conselhos, à Raissa costa, pelo apoio mútuo e companheirismo.

Ao laboratório de helmintologia e parasitologia, em especial aos queridos Caio Pavão e Isabella Chaves, pela disposição e ajuda. Ao laboratórios de farmacognosia II, onde este trabalho iniciou-se, e ao laboratório de genética e biologia molecular.

À minha irmã, Lueny Amorim, que em meio à um turbilhão de acontecimentos, me deu a notícia mais maravilhosa do ano, obrigado por restaurar minha esperança.

Os caminhos que trilhamos são feitos de escolhas diárias, essas escolhas diárias, nos definem tão intimamente, que posso afirmar que somos hoje, o produto das escolhas de ontem, aprendi que sou o que sou pelas escolhas que fiz, e sou grata também por elas, pois me fizeram vencer.

*Quando tiver que escolher entre, estar certo e ser gentil, escolha ser gentil.*

- Extraordinário

## RESUMO

As cianobactérias e as microalgas compõem um grupo bastante diversificado e exibem diversas diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. São produtoras primárias de uma rica fonte de compostos secundários bioativos. Este estudo tem como objetivo identificar os gêneros de cianobactérias e microalgas presentes nos corpos d'água do Parque Nacional da Chapada das Mesas e verificar sua bioatividade. Foram coletadas amostras de sedimento em 12 pontos distintos no Parque Nacional da Chapada das Mesas, aferiu-se paralelamente à obtenção das amostras os parâmetros pH, temperatura, turbidez e oxigênio dissolvido, bem como a presença de nutrientes como: amônia, nitritos, nitratos e fosfatos. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de farmacognosia 2 da Universidade Federal do Maranhão para cultivo e isolamento. A obtenção de culturas foi obtida através de cultivo em meio BG-11 com nitrogênio. Após o período de crescimento foram preparadas assepticamente lâminas de cada cultura para observação em microscópio, conhecendo a diversidade aplicou-se diferentes técnicas de isolamento afim de se obter culturas unialgais. Para a identificação morfológica utilizou-se chaves de identificação de microalgas e cianobactérias. A análise morfológica evidenciou a presença de 2 gêneros de cianobactérias (*Synechococcus* e *Geminocystis*) e um gênero de microalga (*Chlorella*). Tais observações foram confirmadas através da identificação molecular e análise de ultraestrutura utilizando Microscopia de força atômica. Quanto à bioatividade das cepas estudadas não foram observadas atividades sobre o organismo *Rhipicephalus microplus*, de igual modo o teste de atividade antimicrobiano não apresentou halo de inibição frente aos microrganismos testados. sabe-se que, os resultados negativos observados não são decisivos, outras condições de crescimento das cepas, bem como, diferentes concentrações dos extratos devem ser testadas. O teste de citotoxicidade realizado frente ao microcrustáceo *Artemia salina* mostrou percentual de mortalidade de 50 % para a cepa GBBB 06 (*Chlorella*). Evidencia-se com este estudo que abordagens polifásicas são um excelente recurso para identificação completa e confiável de microrganismos, incluindo-se dados de análise ultraestruturais, morfológicas, fisiológicas e moleculares. Além disso o mesmo mostrou que o PNCM contém microrganismos fotossintetizantes interessantes de acordo com a literatura atual. sugere-se então a continuação de estudos voltados a elucidação de sua comunidade microbiana.

Palavras-chave: Análise polifásica. Biologia molecular. Cianobactérias. Microalgas. Toxicidade.

## ABSTRACT

Cyanobacteria and microalgae form a very diverse group and exhibit morphological, biochemical and physiological differences. They are primary producers of a rich source of bioactive secondary compounds. This study aims to identify the genera of cyanobacteria and microalgae present in the water bodies of the Chapada das Mesas National Park and verify their bioactivity. The pH, temperature, turbidity and dissolved oxygen parameters, as well as the presence of nutrients such as ammonia, nitrites, nitrates, and phosphates, were measured in parallel with the samples obtained at 12 different points in the Chapada das Mesas National Park. Samples were sent to the pharmacognosy 2 laboratory of the Federal University of Maranhão for cultivation and isolation. The samples were cultured in BG-11 medium with nitrogen. After the growing period, slides of each culture were prepared aseptically for microscopic observation, and different techniques of isolation were applied in order to obtain unialgal cultures. Identification keys of microalgae and cyanobacteria were used for the morphological identification. Morphological analysis evidenced the presence of two genera of cyanobacteria (*Synechococcus* and *Geminocystis*) and a genus of microalgae (*Chlorella*). These observations were confirmed by molecular identification and ultrastructure analysis using atomic force microscopy. Regarding the bioactivity of the studied strains, no activities were observed on the *Rhipicephalus microplus* organism. Similarly, the antimicrobial activity test showed no halo of inhibition against the tested microorganisms. It is known that the negative results observed are not decisive, other growth conditions of the strains, as well as, different concentrations of the extracts should be tested. The cytotoxicity test performed against the microcrustacean *Artemia salina* showed a 50% mortality rate for the strain GBBB 06 (*Chlorella*). This study shows that polyphase approaches are an excellent resource for the complete and reliable identification of microorganisms, including ultrastructural, morphological, physiological and molecular analysis data. In addition, it showed that PNCM contains interesting photosynthetic microorganisms according to the current literature. It is suggested to continue studies aimed at elucidating of their microbial community.

Keywords: Polyphase analysis. Molecular biology. Cyanobacteria. Microalgae. Toxicity.



## LISTA DE SIGLAS

AFM: Microscopia de Força Atômica.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

CL: Concentração letal.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DO: oxigênio dissolvido.

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.

HIV: vírus da imunodeficiência humana.

MC-LR: Microcistinas com aminoácidos, L-leucina e R-arginina.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

NTU: Unidade Nefelométrica de Turbidez.

PBS: solução salina tamponada com fosfato.

PCR: reação em cadeia da polimerase.

PHAs: Polihidroxialcanoatos.

PNCM: Parque Nacional da Chapada das Mesas.

RADAM: Projeto Radar da Amazônia.

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal.

TAE: Tampão tris-Acatato- EDTA.

UC: unidade de conservação.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Localização do Parque Nacional da Chapada das Mesas, MA .....	16
<b>Figura 2-</b> Pontos de coletas das amostras.....	25
<b>Figura 3-</b> Fotomicrografia de células da cepa GBBB06 .....	40
<b>Figura 4-</b> Fotomicrografia de células e aspecto colonial da cepa GBBB07.....	41
<b>Figura 5-</b> Fotomicrografia do aspecto colonial e células da cepa GBBB 08.....	42
<b>Figura 6-</b> produto da amplificação (PCR) dos clones.....	43
<b>Figura 7-</b> Árvore de diversidade e filogenia das cepas GBBB06 e GBBB 08.....	44
<b>Figura 8-</b> Imagens tridimensionais obtidas por microscopia de força atômica.....	45
<b>Figura 9-</b> Perfil de altura de células da cepa GBBB07.....	46
<b>Figura 10-</b> Rugosidade média (Ra) da células da cepa GBBB07.....	47
<b>Figura 11-</b> Percentual de mortalidade frente à <i>Artemia salina</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados geográficos dos pontos de coleta de amostras.....	<b>25</b>
<b>Tabela 2-</b> Compostos usados para preparo do meio BG-11 com nitrogênio.....	<b>27</b>
<b>Tabela 3-</b> Condições de amplificação dos genes.....	<b>29</b>
<b>Tabela 4-</b> Reagentes solução salina tamponada com fosfato (PBS).....	<b>31</b>
<b>Tabela 5-</b> Proporções-teste para ensaio com <i>Artemia salina</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabela 6-</b> Controles negativos usados no teste carrapaticida.....	<b>35</b>
<b>Tabela 7-</b> Parâmetros analisados <i>in situ</i> nos pontos de coleta de amostras.....	<b>37</b>
<b>Tabela 8-</b> Nutrientes observados nos pontos de coleta.....	<b>39</b>
<b>Tabela 9-</b> Resultados obtidos no sequenciamento.....	<b>43</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Parque Nacional da Chapada das Mesas MA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Microrganismos fotossintetizantes</b> .....	<b>16</b>
2.2.1 Microalgas.....	18
2.2.2 Cianobactérias .....	20
<b>2.3 Métodos de identificação</b> .....	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Coleta de amostras e dados <i>in situ</i></b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 Cultivo, isolamento e identificação morfológica</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3 Extração de DNA, clonagem e sequenciamento</b> .....	<b>27</b>
4.3.1 Avaliação da qualidade do DNA e Eletroforese em gel de agarose .....	28
4.3.4 Clonagem e PCR de colônia.....	29
4.3.5 Processamento dos dados do sequenciamento .....	30
<b>4.6 Análise de ultraestrutura: Microscopia de força atômica (AFM)</b> .....	<b>31</b>
4.6.1 Preparo das amostras com etanol/ácido acético.....	31
<b>4.5 Perfil químico dos extratos teste Q-ToF</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4 Obtenção de extrato</b> .....	<b>33</b>
<b>4.7 Testes de atividade</b> .....	<b>33</b>
4.7.1 Teste de toxicidade em <i>Artemia salina</i> .....	33
4.7.2 Teste de atividade carrapaticida.....	34
4.7.3 Atividade antimicrobiana .....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1 Dados Físico-químicos</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2 Caracterização morfofisiológica</b> .....	<b>39</b>
<b>5.3 Extração de DNA, clonagem e sequenciamento</b> .....	<b>43</b>
5.3.1 Árvore filogenética.....	43
<b>5.4 Perfil químico</b> .....	<b>45</b>

<b>5.5</b>	<b>Análise de ultraestrutura .....</b>	<b>45</b>
<b>5.6</b>	<b>Testes de atividade .....</b>	<b>48</b>
5.6.1	Teste de toxicidade <i>Artemia salina</i> .....	48
5.6.2	Teste de atividade carrapaticida .....	48
5.6.3	<i>Teste de atividade antimicrobiana</i> .....	49
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias e as microalgas compõem um grupo bastante diversificado e exibem diversas diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. O conhecimento desses organismos que habitam as águas epicontinentais no Brasil é extremamente heterogêneo em relação à região geográfica e ao grupo taxonômico. Quanto à taxonomia, há muito mais conhecimento sobre as algas das regiões Sul e Sudeste do país do que sobre as algas das regiões Norte e Centro-Oeste (ASSIS et al. 2018).

Na região nordeste Brasil diversos trabalhos voltados à comunidade fotossintetizante demonstraram a diversidade e abundância deste microrganismos em ambientes lênticos e lóticos (CARDOSO, 2016), além da identificação de espécies, estudos voltados ao monitoramento de microrganismos potencialmente tóxicos em reservatórios têm sido aplicados (ARAGÃO, 2011).

Figueredo; Giani (2009) em estudo do fitoplâncton da bacia do Rio São Francisco, observou a dominância de cianobactérias e suas florações com grande biomassa porém, pouca diversidade, enfatizando a importância de estudos ambientais associados à estudos das interações biológicas entre organismos

A taxonomia das cianobactérias é ainda muito controversa, podendo encontrá-las ainda descritas em dois grandes sistemas: botânico e bacteriológico. A organização taxonômica se dá pela caracterização morfológica, bioquímica, molecular e genética (BRITO et al. 2012).

Esses organismos apresentam uma variedade e abundância que dependem de características dos fatores abióticos e bióticos, os quais irão influenciar na sua distribuição espacial e temporal. As chuvas, por exemplo, são um importante fator para a dinâmica do fitoplâncton, provocando a diminuição das concentrações de cianobactérias pelo aumento da turbidez, em contra partida, teores de nutrientes e pH neutro-alkalino favorecem o crescimento e aumento de biomassa das mesmas (MACHADO, 2016; MÜLLER et al. 2011; BARROS et al. 2017).

Tanto as microalgas como as cianobactérias são produtores potenciais de compostos naturais únicos, com atividades biológicas significativas. Há uma demanda crescente por compostos oriundos desses microrganismos devido à sua importância em aplicações industriais, farmacêuticas, nutracêuticas, cosméticas, bem como para ração animal, tratamento biológico de resíduos, além de novas enzimas e vias

metabólicas (BULE, et al. 2018; DITTMANN, et al. 2015).

Estudos recentes apontaram que as microalgas são promissoras fontes de compostos com bioatividades, dentre as quais destacam-se as atividades antioxidante, apresentando alto teor de carotenoides totais e polifenóis (MAADANE, 2015), e antibacteriana, demonstrada por Dantas et al. (2019), frente à bactéria *Bacillus subtilis*. As microalgas apresentam também outras aplicações como, por exemplo, produção de biocombustíveis (KOLLER et al. 2014).

A variedade de metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias sempre instigou pesquisas relacionadas à sua toxicidade, visto que as mesmas produzem inúmeros compostos alcaloides tóxicos. Alguns estudos, no entanto, têm focado em outros compostos e suas aplicações, como a ficocianina, descrita com propriedades inseticidas, compostos com potencial uso como agente antifúngico e uso de cianobactérias como fonte de proteínas (LIANG et al. 2016; TOKUSOGLU; ÜUNAL 2003; VASAS et al. 2010).

Sabe-se que os ambientes de água doce são considerados mais favoráveis ao crescimento tanto de cianobactérias como de microalgas, o que se dá pelas suas características físicas (pH, turbidez, temperatura), e pela presença de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (MACHADO et al, 2016).

Sabe-se que as pesquisas relacionadas à comunidade fotossintetizante do Parque Nacional da Chapada das Mesas (PNCM) ainda está iniciando e há muito o que explorar visto que tais organismos mostraram-se bastante promissores em estudos anteriores com já descrito. Diante do exposto o presente estudo se propõe a identificar e verificar a bioatividade dos microrganismos fotossintetizante isolados do Parque Nacional da Chapada das Mesas, colaborando com a descoberta de novas espécies e compostos, além de valorizar a biodiversidade microbiana da região nordeste, atentando à preservação e exploração sustentável.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.4 Parque Nacional da Chapada das Mesas- MA

A paisagem da região da Chapada das Mesas envolve áreas de tabuleiros que se têm transformado, no decorrer de milhões de anos, como pode ser percebido a olhos nus, quando vislumbramos uma imensidão de areias sendo levadas pelo vento e erodindo muito devagar (MARQUES, 2012).

A primeira proposta de criação do Parque Nacional da Chapada das Mesas (PNCM), foi na década de 1970 através do Projeto RADAM Brasil, com uma área de 210.000 ha. Mostrando que o projeto RADAM já demonstrava preocupação com o uso indiscriminado do fogo em área de solos tão suscetíveis a erosão. No entanto os estudos para implantação da Unidade de Conservação (UC), teve seu início em 2005 sendo realizadas vistorias, sobrevoo na área e consultas às entidades agroextrativistas para a exclusão das áreas de coleta de frutos e realização de audiência pública no município de Carolina (COSTA, 2014).

O PNCM foi criado pelo decreto presidencial, de 12 de dezembro de 2005, do governo brasileiro, o qual consiste em uma unidade de conservação recente, a qual se destaca pelo potencial biológico, hídrico e humano também, visto que nessas regiões ocorre a presença de um breve contingente sertanejo (MARQUES et al., 2014).

O parque está localizado no sudoeste do Maranhão entre os municípios de Carolina, Estreito e Riachão. É uma região especial de preservação, pois funciona como um ecótono de três biomas nacionais (Amazônia, Caatinga e Cerrado) (COSTA, 2014). Existe um grande potencial de fauna no PNCM, porém este convive com inúmeros problemas relacionados a perda de habitat, seja pelo desmatamento e queimadas, que são constantes, e/ou pela caça predatória, que tem causado o desequilíbrio entre as espécies, promovendo o aumento sem controle de algumas em detrimento da diminuição de outras (MARQUES, 2012).

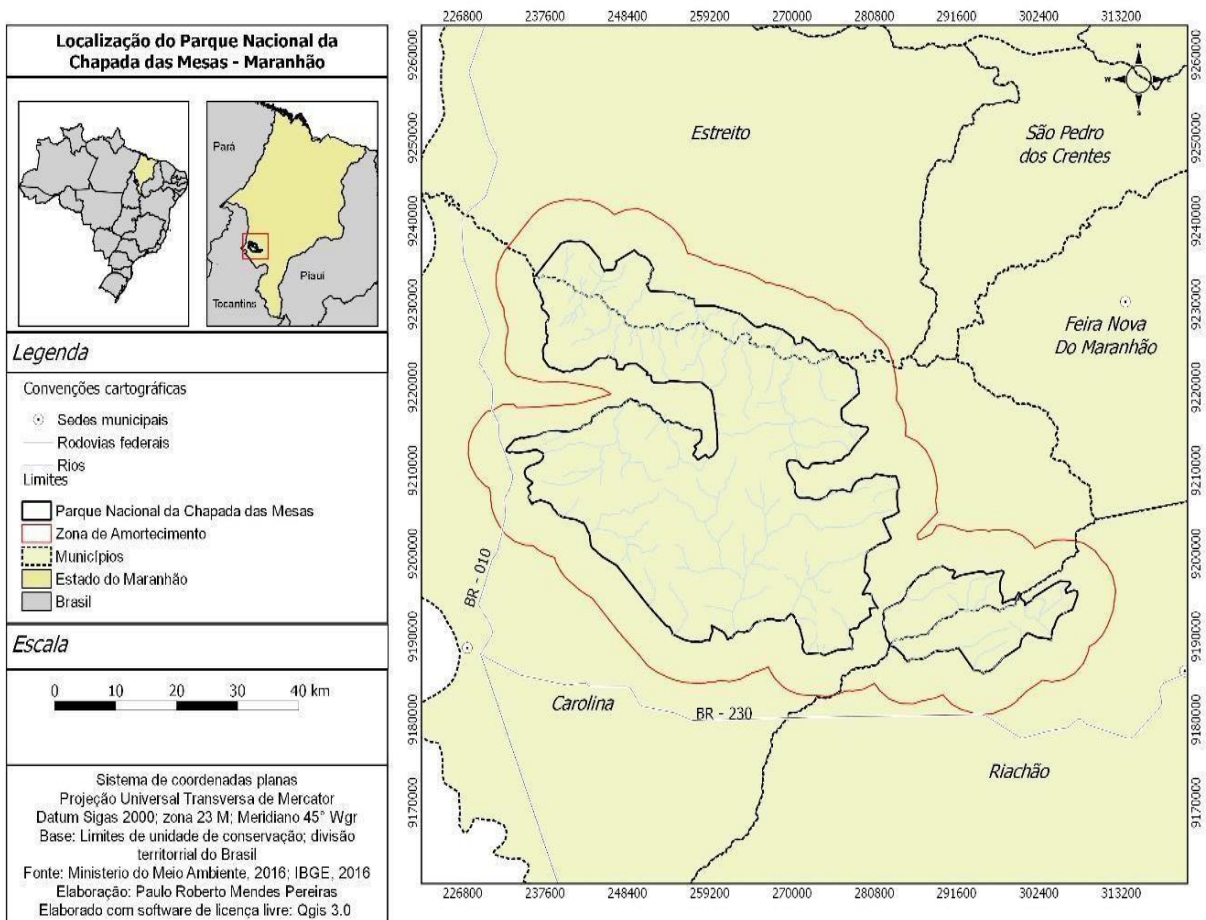
No interior do PNCM, existem inúmeras nascentes de cursos d'água, que abastecem três importantes bacias hidrográficas: a do Parnaíba, Araguaia/Tocantins e do São Francisco.

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).



A inserção do Parque Nacional da Chapada das Mesas (Figura 1) em meio a esse grande potencial hídrico, que é a bacia do rio Tocantins, considerado um importante atributo natural favoreceu a intenção de iniciar os estudos da criação e implementação desta unidade de conservação, visando a proteção das cachoeiras do Prata e São Romão, ambas localizadas no rio Farinha, ao norte do PNCM (MARQUES, 2012).

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



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

## 2.1 Microrganismos fotossintetizantes

### 2.1.1 Microalgas

O termo "microalgas" não é um conceito baseado em taxonomia, mas refere-se a algas microscópicas unicelulares e são um subgrupo de algas, constituídas de uma grande diversidade de seres microscópicos, unicelulares, podendo estar presentes no ambiente de forma isolada, em colônias ou como segmento linear de células. Entretanto, ocorre pouca ou nenhuma diferenciação entre as funções

celulares, sendo cada célula responsável por todas as funções vitais (CASTRO, 2017; ZHANG et al. 2014).

As microalgas estão presentes no fitoplâncton e no perifíton, no entanto possuem diferenças taxonômica expressivas, tal observação pode ser devido à estruturas especializadas para flutuação que as microalgas da comunidade fitoplanctônica possuem, e para fixação no substrato, das microalgas perifíticas, contribuindo deste modo, para a ocorrência de muitos táxons exclusivos na composição dessas comunidades (MENDES, 2016).

As três classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas verdes (Chlorophyceae) e as algas douradas (Chrysophyceae) (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

São produtores em potencial de compostos naturais com atividades biológicas significativas. Há, portanto, uma demanda crescente por compostos de alto valor das microalgas devido à sua importância em aplicações industriais como farmacêutica, nutracêutica, cosméticos, ração animal, tratamento biológico de resíduos, microalgas como fontes prolíficas de moléculas bioativas como carotenóides, proteínas, polissacarídeos, glicolipídeos, que foram usados ou estão sendo testados extensivamente para tratar o câncer, inflamação, Alzheimer, malária, leishmaniose, tuberculose, HIV e outros (BULE et al., 2018).

Dentre os biocompostos de alto valor agregado obtido de microalgas está a luteína que desempenha um importante papel na absorção da luz azul e exibe juntamente com a zeaxantina propriedades antioxidantes, o que suporta o seu papel na prevenção da degeneração de fotorreceptores, havendo evidências acumuladas sobre a importância da luteína e da zeaxantina na saúde dos olhos. (CARPENTIER et al., 2009).

As microalgas apresentam elevado teor de proteínas com o perfil completo de aminoácidos, como também atividade antioxidante significativa, demonstrando possível aplicabilidade como antioxidantes naturais (MACHADO et al., 2017).

Constituem uma fonte alternativa potencial na obtenção de ácidos graxos essenciais, sendo estes os precursores de uma grande variedade de metabólitos bioativos, que estão envolvidos em diversas funções fisiológicas no organismo humano. O consumo de ômega 3 obtido de microalgas é benéfico para o desenvolvimento neural, além de prevenir problemas coronários, câncer, hipertensão,

diabetes, fibrose cística, artrites, asma, esquizofrenia e depressão (FERREIRA et al., 2013).

A busca pelo incremento da qualidade dos alimentos ingeridos pela população humana, aliada ao crescente conhecimento do amplo potencial de uso das microalgas nos mais diferentes setores da indústria tem levado a um expressivo número de patentes correlatas ao tema microalgas (DRAAISMA et al., 2013; BARCELLOS et al., 2012). Algumas espécie apresentam elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), incluindo os ômegas, carotenoides e clorofilas (SASSI et al., 2019; GAO et al., 2019).

Em nível mundial, o crescente interesse em tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas na obtenção de produtos para o consumo humano, demanda uma contínua busca por espécies e/ou variedades capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos, e de como é possível potencializar a biossíntese destes compostos, condições de cultivo e melhoramento genético (DERNER et al., 2006).

Além disso, as microalgas são consideradas uma fonte promissora para a produção de PHAs (polihidroxialcanoatos), pois são os únicos microrganismos que acumulam PHAs pela fotossíntese, utilizando luz e CO<sub>2</sub> como principais fontes de energia, e possuem requisitos nutricionais mínimos para o crescimento. Tornando evidente seu potencial de produzir biopolímeros com menor custo (COSTA et al. 2019; VACCA et al. 2017).

#### a) Gênero *Chlorella*

A espécie-tipo desse gênero foi descrita por Beijinck em 1890, sendo descritas com células esféricas ou elipsóidais medindo entre 2 -15 µm de diametro, com reprodução assexuada, ocorrendo formação interna de autosporos, liberados pela ruptura da parede celular (VAN VUUREN, 2006). Embora as diferenças morfológicas sejam poucas, mais de 100 espécie já foram descritas (BOCK, 2011).

Estudos recentes tem demonstrado interesse crescente por espécies de microalgas deste Gênero devido aos compostos produzidos por eles, em sua revisão Hu et al., (2018), mostraram que as microalgas do gênero *Chlorella* são os candidatos mais adequados para a produção heterotrófica de luteína e astaxantina, além disso os mesmos são ricos em PUFAs (ácidos graxos poli-insaturados), portanto atividade antioxidante e antimicrobiana foram alvos de pesquisas considerando sua composição (PLAZA, 2012 ;MELO VAN LENT et al., 2016).

Outro importante fator para pesquisas relacionadas ao gênero é o grande valor nutricional, por conter altas concentrações de proteínas, fibras, vitaminas e minerais (VIJAYAVEL et al., 2007).

No cenário atual, há uma grande demanda por carotenoides naturais no lugar dos sintéticos atualmente disponíveis no mercado, a síntese e o acúmulo desses compostos estão associados à captação de luz na fotossíntese e também são sintetizados no escuro (cultivo heterotrófico) o que parece ser uma opção interessante para sua produção comercial (HU et al., 2018).

### 2.1.2 Cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos procarióticos, isto é, tem estrutura celular que corresponde à célula de uma bactéria. São fotossintetizantes, apresentando fotossistemas I e II, mas sem estarem organizadas em cloroplastos, como as plantas. Algumas espécies são fixadoras de nitrogênio atmosférico (HENSON et al., 2002, SANCHES et al., 2012). Podem ser aquáticos, marinhos ou dulcícolas, de corpos d'água lênticos ou lóticos, ou aerofíticos, vivendo aderidos às rochas, troncos ou mesmo partículas de solo, podem ser encontradas também em solos desérticos (RICHER et al., 2015; FERREIRA, 2008).

A morfologia das cianobactérias é rica e diversa, as mesmas podem ter aspecto filamentoso ou colonial, o formato das células é variável (cilíndrico, barril, globular, irregular) e pode ser a característica definitiva para distinguir gêneros (KOMÁREK, 2013).

A grande diversidade de cianobactérias não inclui apenas a variabilidade morfológica e preferências de habitat, mas também a variedade de metabólitos bioativos produzidos, entre eles compostos com atividades antibacteriana, anticancerígena, antiviral, citotóxica, antifúngica, inseticida, bem como lipídios e ácidos graxos (ELHAM; MOHAMED, 2013; JONES et al., 2009).

Estudos demonstraram mais de 1100 produtos naturais já conhecidos de cianobactérias e incluem diversas classes estruturais como; peptídeos, policétidos, alcaloides, lipídios e terpenos. A lógica biosintética subjacente a essa diversidade química está sendo lentamente desvendada, estabelecendo vínculos entre a diversidade química conhecida destes compostos e genomas cianobacterianos (KAPLAN et al., 2012; DITTMANN et al., 2015).

As toxinas são acumuladas no interior da célula (toxina intracelular), como forma de defesa contra competidores e predadores sem que ocorra liberação da mesma enquanto a célula está viva; a liberação da toxina para o ambiente ocorre principalmente após a morte celular e lise da cianobactéria (PAULINO, 2015).

Dentre os grupos de metabólitos secundários estão os compostos não-tóxicos com possível ação antibiótica chamados compostos aleloquímicos alguns dentre os quais compartilham a mesma via de biossíntese que as toxinas e embora não sejam tóxicos para vertebrados podem ter função semelhante na defesa ou competição contra predadores (LEFLAIVE; TEN-HAGE, 2007).

As cianobactérias possuem grande versatilidade para aplicações biotecnológicas como fonte de compostos bioativos, biofertilizantes, bioplásticos, energia e alimentos, além de serem usados na descoberta de medicamentos, diagnósticos médicos e biorremediação. Sendo a maioria dos compostos comerciais isolados de cianobactérias de água doce (ABED et al. 2009).

Alguns alcaloides indólicos, produzidos por cianobactérias, podem ser utilizados como agentes antifúngicos, e apresentam também atividade antioxidante e anticancerígena, que pode ser aplicada na confecção de novos fármacos. Dentre os compostos promissores estudados observa-se que a ficocianina e o  $\beta$ -caroteno, ingredientes ativos obtidos da cianobactéria *Spirulina*, são essenciais para as propriedades antioxidantes, imunomoduladoras e anti-inflamatórias apresentadas. A nostocarbolina, por sua vez mostrou-se um inibidor da colinesterase com perspectivas promissoras no tratamento da doença de Alzheimer (SHANAB et al. 2012; VASAS et al. 2010; WU et al. 2016).

Além disso, testes de atividade inseticida, mostraram que algumas cianobactérias possuem compostos com considerável bioatividade sobre insetos, dentre eles toxinas (microcistinas, anatoxinas), ficobiliproteínas, compostos alcaloides e peptídeos cíclicos (RASTOGI; SINHA, 2009; LIANG et al., 2016; AN et al., 2007; BECHER et al., 2007).

#### a) Os gêneros *Geminocistis* e *Synechococcus*

O gênero *Geminocistis* foi primeiramente descrito por Koresulová et al. (2009), sendo separado do gênero *Synechocystis*. Pode ser caracterizado como um gênero morfológicamente e ecologicamente próximo a *Cyanobacterium*, mas diferencia-se deste pelo tipo de divisão celular (dois planos), e pela similaridade do RNAr 16S entre

estes (93 a 94%). Pertence a Ordem Chroococcales família Chroococcaceae (BUCH, 2019).

Segundo Koresulová et al., (2009), as células da cianobactéria *Geminocystis*, descrevem-se como solitárias, esféricas ou ligeiramente ovais, após divisão hemisférica e por um curto período de tempo (quatro) juntas, 3 a 10 µm de diâmetro, sem e geralmente envelopes mucilaginosos difusos e indistintos. Conteúdo celular homogêneo, sem separação de centro e cromatoplasma, às vezes com alongamento longitudinal (tilacóides situados em células no sentido longitudinal). A cor das células é azul esverdeada pálida, verde-clara, cinza ou rosada.

Sua divisão celular é por fissão binária em duas células-filhas hemisféricas morfologicamente iguais, que atingem a forma globular original antes da próxima divisão; as células sempre se dividem em dois planos perpendiculares em gerações sucessivas. A espécie-tipo do gênero foi descrita como: *Geminocystis herdmanii* sp. (KORESULOVA et al., 2009).

Estudo com cepas de *Geminocystis*, mostraram que tal cianobactéria acumula uma grande quantidade de ficoeritrina, que se alteram drasticamente seu conteúdo em resposta à luz verde e vermelha.

Outro gênero relevante de cianobactéria é o gênero *Synechococcus*, que faz parte do picoplâncton (células <2 µm), tendo sido observado no perifíton de ambientes de água doce (CAVATI, 2008). Este gênero foi primeiramente descrito por Nagueli (1849), descrevendo a espécie-tipo deste gênero *Synechococcus elongatus* (Nägeli), que pertence à ordem Synechococcales família Synechococcaceae.

As espécies deste gênero contribuem significativamente como produtores primários e no ciclo do carbono, representando a base da cadeia alimentar destes ambientes, essa reconhecida importância incentivou a comunidade científica a reunir informações sobre sua filogenia, fisiologia celular e biologia molecular (BEMAL, 2019; FLOMBAUM et al., 2013).

Komérek, (2014) descreve-o como unicelular; células solitárias ou aglomeradas em grupos, mas sem mucilagem comum, ovais, largamente ovais ou em forma de bastonete, às vezes curvadas ou sigmoides, arredondadas nas extremidades, com conteúdo homogêneo ou com vários grânulos polares dispersos ou solitários, geralmente azul-esverdeados, raramente verde-oliva, azul-verde-claro ou rosado, sem motilidade. Sem adaptação cromática.

Sua divisão celular é sempre por fissão binária; as células filhas crescem mais ou menos no tamanho original antes da próxima divisão.

Várias espécies crescem dentro de esteiras e colônias de outras algas, ou formam colônias finas em substratos úmidos (lama, madeira, pedras, etc.) Entre as espécies de *Synechococcus*, ocorrem vários tipos interessantes de condições ecologicamente extremas, por exemplo, *Synechococcus lividus termofílico*, *S. bigranulatus*, etc (BEMAL, 2019).

Estudos já desenvolvidos com cepas de *Synechococcus* isoladas de diferentes profundidades da coluna de água (águas superficiais e subsuperficiais), mostrou que a intensidade de luz disponível influencia diretamente a quantidade de zeaxantina e clorofila, visto que as cepas de águas superficiais possuíam maior quantidade desses compostos (BEMAL, 2019). Sugere-se também de acordo com Rosales, (2005), que o crescimento e o conteúdo de metabólitos de *Synechococcus* sp. é determinado pela salinidade, demonstrando sua capacidade halotolerante entre 0‰ e 100‰, com uma ótima salinidade de 35‰.

Testes de bioatividade deste gênero, mostraram atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas *S. aureus* e *P. aeruginosa*, mostrando o potencial para futuros estudos de compostos bioativos, e atividade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* em teste de toxicidade com mortalidade de 80%. Em ambos os testes foram observadas diferenças entre os tipos de extratos empregados (metanoico e etanoico), o que sugere diferentes compostos secundários (BARBOZA, 2017; FRAZÃO 2010).

## 2.2 Métodos de identificação

Além dos métodos microscópicos tradicionais baseados na morfologia e pigmentos, muitas técnicas moleculares baseados no DNA foram desenvolvidas como métodos alternativos para discriminar espécies de microalgas (EBENEZER, 2011).

Marcadores moleculares como o ITS 2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) que é uma região espaçadora do DNA ribossômico nuclear (nuITS2 rDNA) que está localizada entre os genes 5.8S e 28S, e o *rbcl*, um gene Cloroplastídio que codifica para a enzima RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase/Oxigenase), responsável pela conversão de CO<sub>2</sub> atmosférico e água em carboidratos, sendo assim essencial para a sobrevivência dos organismos fotossintéticos. Ambos

mostraram-se úteis não só para a identificação de espécies de microalgas, como também auxiliar na descoberta de novas espécies (HADI, 2015).

Os métodos modernos para delimitação de espécies baseadas em DNA representam uma ferramenta poderosa que se provou útil em muitos estudos focados em uma gama de organismos. No entanto somente um trabalho taxonômico preciso, combinando várias abordagens metodológicas, incluindo dados ecológicos, pode determinar os limites das espécies corretamente (MALAVASI et al. 2016).

Além dos métodos moleculares e morfofisiológicos, outro importante recurso que pode ser usado para elucidar a taxonomia de microrganismo é a microscopia de força atômica (AFM). A invenção do microscópio de força atômica por Binnig *et al.* em 1986, é agora reconhecida como uma das mais importantes marcas das ciências modernas. Uma característica interessante do AFM é sua capacidade de visualizar a topografia da superfície de células bacterianas individuais e oferece a possibilidade de resolver espacialmente a localização dos constituintes da superfície bacteriana envolvidos em várias interações (DOROBANTU; GRAY 2010).

A microscopia de força atômica surgiu como uma técnica de imagem que fornece visões topográficas tridimensionais e detalhes estruturais de amostras biológicas, tais como microrganismos, membranas celulares, biopolímeros e apêndices extracelulares (DOROBANTU; GRAY 2010).

Alguns estudos desenvolvidos nos últimos anos utilizaram microscopia de força atômica para elucidar outros componentes estruturais e interações dentre os quais, verificar o efeito de luz na estrutura e no rendimento de compostos com polissacarídeos, a presença de condutores extracelulares produzidos por cianobactérias e visualização direta da organização global e mobilidade de complexos fotossintéticos em membranas tilacóides (GE et al. 2014; SURE et al. 2015; CASELLA et al. 2017).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar espécies de microrganismos fotossintetizantes oriundas de corpos d'água do Parque Nacional da Chapada das Mesas – MA, bem como avaliar a sua toxicidade e atividade carrapaticida.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Cultivar, isolar e identificar as espécies de cianobactérias e microalgas em amostras coletadas de corpos d'água do PNCM;
- b) Verificar os níveis de toxicidade dos extratos contra *Artemia salina*;
- c) Testar os extratos microbianos obtidos quanto a sua atividade carrapaticida.
- d) Testar os extratos quanto a sua atividade antimicrobiana

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de amostras e dados *in situ*

Amostras ambientais foram coletadas em corpos d'água dentro da área do PNCM (Parque Nacional da Chapada das Mesas), e nas áreas adjacentes do mesmo, sendo selecionados 12 pontos de coleta (Tabela 1) de cinco diferentes cachoeiras (Figura 2), com a autorização do SISBIO para coleta com o número 55217-1.

O material coletado foi acondicionado em tubos plásticos de 50 mL e mantidos no gelo durante o transporte. Os quais foram encaminhados ao laboratório de farmacognosia II da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para cultivo e realização das análises.

**Tabela 1.** Dados geográficos dos pontos de coleta de amostras, no Parque Nacional da Chapada das Mesas-MA.

Pontos	Local de Coleta	Localização geográfica	Altitude
01	Cachoeira Porteira 1	07°02' 74" S 047°30' 47" W	178 m
02	Cachoeira Porteira 2	07°02' 66" S 047°30' 45" W	163 m
03	Cachoeira Garrote 1	07°01' 05" S 047°28' 63" W	162 m
04	Cachoeira Garrote 2	07°01' 03" S 047°28'65" W	195 m
05	Cachoeira Santuário 1	06°58' 62" S 047°26' 59" W	231 m
06	Cachoeira Santuário 2	06°58' 63" S 047°26' 61" W	220 m
07	Cachoeira da Prata 1	06°59' 68" S 047°09' 92" W	212 m
08	Cachoeira da Prata 2	06°59' 63" S 047°09' 95" W	178 m
09	Cachoeira de São Romão beira jusante	07°01' 21" S 047°02' 39" W	236 m
10	Cachoeira de São Romão desvio jusante	07°01' 21" S 047°02' 42" W	239 m
11	Cachoeira de São Romão mata fechada	07°01' 22" S 047°02' 44" W	243 m
12	Cachoeira São Romão beira da praia	07°01' 23" S 047°01' 23" W	247 m

**Figura 2**-Pontos de coletas das amostras. A) Cachoeira Santuário. B) Cachoeira Garrote. C) Cachoeira Porteira. D) Cachoeira São Romão. E) Cachoeira da Prata.



Nos pontos de coleta, foram analisados *in situ*, através do uso de sonda específica multiparamétrica, os seguintes parâmetros: físico-químicos, temperatura, pH, turbidez da água, oxigênio dissolvido e presença de nutrientes (nitratos, nitritos, fosfatos, silicatos).

Para a identificação e uso no presente trabalho foram estudados amostras da cachoeira porteira ( ponto 1), e da cachoeira santuário ( ponto 6), ambas situadas no município de Carolina-MA.

#### **4.2 Cultivo, isolamento e identificação morfológica**

A obtenção de culturas de cianobactérias foi alcançada através de inoculação das amostras, seguindo o protocolo Ferris e Hirsch (1991). Cada amostra foi transferida pra um Erlenmeyer (250mL) contendo meio BG-11 com nitrogênio (Tabela 2), e posteriormente incubados em estufa de fotoperíodo (SOLAB, Câmara para germinação com fotoperíodo SL-224) sob iluminação de  $3-15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 3 a 4 semanas e temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ .

Para a obtenção de culturas puras foram utilizados os métodos de isolamento em placas, contendo o meio BG-11 sólido, sob as mesmas condições de crescimento,

diluição, e “pescaria” de cianobactérias sob visualização em microscópio óptico. As amostras eram constantemente visualizadas sob microscópio óptico para averiguar o progresso no isolamento dos gêneros de interesse.

**Tabela 2-** Composição do meio BG-11 com nitrogênio, utilizado no cultivo (Allen, 1968).

Componentes	Concentração final (g/L)
1. NaNO <sub>3</sub>	1,5
2. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04
3. MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
4. CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
5. Ácido cítrico	0,006
6. Citrato de amônio férrico	0,006
7. Na <sub>2</sub> EDTA	0,001
8. Carbonato de sódio	0,02
9. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
10. MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
11. ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222
12. Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39
13. CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
14. Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049

Para identificação morfológica foram preparadas assepticamente lâminas para visualização em microscópio óptico equipado com o sistema digital de imagem AxioVisionLE (4.6 Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Foram analisados os caracteres: diâmetro, comprimento de células vegetativas e presença ou ausência de acinetos e heterócitos. As identificações das espécies foram realizadas utilizando como base a chave de identificação de Bicudo e Menezes (2006) para identificação de clorófitas, e Komárek e Agnostidis (2005) para cianobactérias.

#### 4.3 Extração de DNA, clonagem e sequenciamento

A extração de DNA foi feita com o ÔMEGA E.Z.N.A. SP Plant DNA *kit*. Em torno de 50 mL de cultura fresca foram submetidos à centrifugação com velocidade de 10.000 rpm por 5 min com Sorvall LYNX 6000 Superspeed Centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Depois o pellet foi coletado e transferido para um tubo de coleta 2mL com *beads* de vidro, após isso foi adicionado 400µL da SP1 Buffer (Solução para lise celular), por duas vezes as células foram moqueadas usando FastPrep-24 disruptor celular (MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, USA), por 20s a uma velocidade de  $6,5 \text{ m/s}^{-1}$ . Logo após, a amostra foi centrifugada por um minuto a 10.000 rpm e submetida a um vórtex. Adicionou-se então 5µL da enzima RNase à amostra, e então conduzida novamente ao vórtex. Logo após a amostra foi incubada por 20 minutos a 65°C, e, então, adicionou-se 140µL da SP2 Buffer (Solução para precipitação de proteínas e polissacarídeos) e levada ao vórtex para misturar completamente. A amostra então ficou no gelo por 5 minutos e foi centrifugada à 13.200 rpm x 10 min. Para remover os precipitados remanescentes e restos de células inseriu-se uma coluna homogeneizadora em um tubo de coleta de 2 mL, para onde o sobrenadante foi transferido e imediatamente centrifugado à 13.200 rpm x 2 min. O filtrado então foi coletado para outro tubo e mensurado, adicionou-se então SP3 Buffer (Solução de ligação do DNA) num volume de 1.5 do filtrado mensurado anteriormente, do volume total foi transferido 650 µL para uma mini coluna de DNA e centrifugado à 13.200 rpm x 1 min, após isso o filtrado foi descartado, o processo foi repetido até ser transferido todo o volume da amostra. Com a mesma coluna num novo tubo foi adicionado 650 µL SPW Wash Buffer e centrifugado à 13.200 rpm x 1 min, o filtrado foi descartado e o processo foi repetido novamente. Após, foi centrifugado novamente à 13.200 rpm x 2 min, a coluna foi transferida para outro tubo e ficou em temperatura ambiente por 5min para evaporação do etanol. Adicionou-se então 50 µL da solução Elution Buffer aquecida a 65°C e foi deixada à temperatura ambiente por 5 minutos, logo após foi centrifugada a 13.200 rpm x 1 min, o processo foi repetido com o mesmo material que decantou após centrifugação.

#### 4.3.1 Avaliação da qualidade do DNA e Eletroforese em gel de agarose

A integridade do DNA foi checada através da leitura em NanoDrop 1000 Espectrofotômetro controlado por um software (ThermoScientific). A absorbância foi mensurada em 230 nm, 260 nm e 280 nm, como A260/A280 e A260/230, as reações foram calculadas automaticamente em NanoDrop One/One<sup>C</sup> Microvolume UV-Vis Espectrofotômetro (ThermoScientific).

O gel de agarose foi preparado a 2%, com 2 g de agarose, 100 mL de 0,5x TAE

e 1 gota de brometo etílico. Para a preparação de cada amostra usou-se 2 µL de água Milli-Q, 1 µL de 6X DNA Loading Dye (ThermoScientific) e 2 µL de DNA. Como controle negativo usou-se água Milli-Q. Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA, foram utilizados marcadores de peso molecular (*ladder*): M1: λDNA/EcoRI + Hind III Marker 3 (ThermoScientific) e M2: GeneRuler 1kb Plus DNA Lader (ThermoScientific).

#### 4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O gene 16S rRNA foi selecionado para ser amplificado, seguindo as referências de Taton et al. (2006).

**Tabela 3-**Condições de amplificação do gene 16S rRNA do DNA extraído.

Gene	Iniciador	Oligonucleotídeos	Condições da PCR
16S rRNA	16S27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Desnaturação inicial 95°C/3min.
	16S1494R	GTACGGCTACCTTGTTACGAC	<b>25 ciclos:</b> Desnaturação: 95°C/30s; Anelamento: 56°C/30s; Extensão: 72°C/2min.  Extensão final 72°C/ 7min.

A reação de amplificação (PCR), foi feita para um volume final de 25 µL, contendo, 2,5 µL *DreamTaq buffer* com MgCl<sub>2</sub> 20 mM 10X, 0,5 µL MgCl<sub>2</sub>, 0,625 µL dNTP's 10 mM (em cada), 1,25µL do primer inicial 10 mM, 1,25 µL do primer reverso 10 mM, 0,625 µL *DreamTaq polymerase* 5u/λ, 16,25 µL de ddH<sub>2</sub>O e 2 µL de DNA. A reação foi realizada no termociclador *BioRader Cycler*, nas condições descritas na Tabela 03.

#### 4.3.4 Clonagem e PCR de colônia

Após a amplificação por PCR das sequências de DNA, foi realizada a clonagem dos *amplicons*, para isso foi utilizado o kit de clonagem TOPO® TA (Thermo Fisher Scientific). Para a clonagem foi adicionado 2 µL do produto da PCR, 2 µL de água milli-Q, 0,5 µL solução de sal e 0,5 µL do vetor, o material foi mantido à temperatura ambiente por 15 min, seguindo as instruções do fabricante. A transformação foi

realizada através de choque térmico, mantendo o material 30 seg em banho-maria a 42°C e imediatamente colocando no gelo novamente. Posteriormente, foi adicionado 250 µL de meio S.O.C. à mistura e o material foi incubado por 1h à 37°C em agitação constante de 160 rpm. As células transformadas foram inoculadas em placas de cultivo com meio LB ágar (nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 60 µL de inóculo) e incubadas por 12 h a 37°C. Após isso, os clones foram selecionados a partir de colônias de coloração branca.

As colônias de interesse foram retiradas das placas e a presença dos insertos foi confirmada por meio de PCR utilizando os iniciadores M13F (5' CTGGCCGTCGTTTTAC-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3').

A amplificação foi feita para um volume final de 25 µL, contendo, 2,5 µL DreamTaq buffer com MgCl<sub>2</sub> 20 mM 10X, 0,5 µL MgCl<sub>2</sub>, 0,625 µL dNTP's 10 mM (em cada), 1,25 µL do primer inicial 10 mM, 1,25 µL do primer reverso 10 mM, 0,625 µL *DreamTaq polymerase* 5u/λ, 16,25 µL de dH<sub>2</sub>O e 2 µL de DNA. As condições da termociclagem foram: pré-desnaturação a 95°C por 3 min, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 50°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

O produto da PCR foi verificado através de gel de agarose a 0,7%. Os clones que apareceram com resultados positivos no gel de agarose passaram então por uma PCR com primers específicos para DNA de cianobactérias, utilizando os iniciadores 359F e 1350R. A amplificação foi feita para um volume final de 20 µL, contendo, 2 µL *DreamTaq buffer* com MgCl<sub>2</sub> 20 mM 10X, 0,4 µL MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL dNTP's 10 mM (em cada), 1 µL do primer inicial 10 mM, 1 µL do primer reverso 10 mM, 0,5 µL *DreamTaq polymerase* 5u/λ, 12,6 µL de ddH<sub>2</sub>O e 2 µL de DNA. As condições da termociclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 56°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

Os produtos de PCR foram enviados para um parceiro e sequenciados de acordo com protocolos dos mesmos.

#### 4.3.5 Processamento dos dados do sequenciamento

As sequências obtidas foram verificadas quanto à qualidade e alinhadas pela ferramenta ClustalW e editadas manualmente no programa BioEdit (HALL, 2011). A

ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizada para comparações de homologias e obtenção de sequências similares para a construção das árvores de diversidade e filogenia. As análises de diversidade gênica foram realizadas utilizando-se o método agrupamento de vizinhos (NJ) (SAITOU; NEI, 1987), no programa Mega V6 (TAMURA et al., 2011) e a inferência bayesiana, realizada no programa MrBayes 3.2.1 (RONQUIST et al., 2012).

#### 4.6 Análise de ultraestrutura: Microscopia de força atômica (AFM)

As amostras foram fixadas utilizando solução de etanol/ácido acético na proporção 3:1, conforme descrito por CELIE et al. (2005) e Chao; Zhang (2011).

Inicialmente foi preparada a solução salina tamponada com fosfato (PBS) descrito na tabela 04, e a solução fixadora de etanol/ácido acético, preparada na proporção 3:1 e mantida em temperatura ambiente, até o uso.

**Tabela 4-**Reagentes solução salina tamponada com fosfato (PBS)

<b>Solução de PBS (tampão)</b>	
NaCl	8.475 g/L
Na <sub>2</sub> -HPO <sub>4</sub>	1,093 g/L
NaH <sub>2</sub> -PO <sub>4</sub>	0,276/L
Água deionizada	1L

Foi adicionado 1 ml de cada amostra em tubos plásticos e centrifugados para concentrar as células e retirar o meio de cultivo, em seguida as amostras foram lavadas com a solução de PBS onde; 1 mL da referida solução foi adicionado à amostra, agitou-se levemente, e então novamente centrifugada por 3 minutos 10000 X g, para retirada da solução, após serem lavadas foram adicionados 1mL da solução fixadora etanol/ácido acético e agitada levemente, permanecendo nesta solução por 10 minutos, após esse período a solução foi retirada por centrifugação e as amostras foram lavadas novamente com a solução de PBS 2 vezes. Após serem lavadas as amostras foram suspensas em água ultrapura estéril.

Cerca de 50 µl da amostra foi, então, colocada em lamínula, deixando secar



à temperatura ambiente e, após terem secado, as mesmas foram armazenadas em geladeira para análise posterior. As células fixadas foram observadas em microscópio óptico antes de serem analisadas para a análise de AFM para verificação da viabilidade das mesmas.

As amostras foram analisadas em microscópio de força atômica na Central Analítica de Materiais (CEMat), da Universidade Federal do Maranhão.

#### **4.5 Perfil químico dos extratos**

A análise de metabólitos secundários no extrato de cianobactéria foi realizada no Departamento de Ciências Alimentares e Ambientais, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinque, Finlândia, em um sistema Shimadzu Prominence LC acoplado a um Quadrupole time-of-flight (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics) e equipado com uma interface de ionização por Electrospray. A separação foi obtida em uma coluna RP (Phenomenex, Luna C18 (2), 5 microm, 250 mm x 3.0 mm) a 200  $\mu\text{L min}^{-1}$  usando uma eluição de gradiente linear (5–90% B em 50 min). As fases móveis usadas foram (A) água contendo formiato de amônio 5 mM e ácido fórmico 0,1%, e (B) acetonitrila. As condições da fonte de ionização foram as seguintes: ionização positiva, potencial de capilaridade de 3.500 V, temperatura e fluxo do gás de secagem (nitrogênio) de 300°C e 5 mL  $\text{min}^{-1}$  respectivamente e pressão do nebulizador de 35 psi.

O equipamento Q/TOF foi operado no modo scan e AutoMS/MS, realizando experimentos de MS/MS sobre os três íons mais intensos a partir de cada pesquisa por MS. As análises por UPLC-QTOF foram realizadas com o sistema Acquity I-Class UPLC – Synapt G2-Si HDMS (Waters Corp.). O extrato de metanol de cianobactéria filtrado de 0,2  $\mu\text{L}$  foi injetado na coluna Cortecst UPLC® C18+ (2,1 x 50 mm, 1,6  $\mu\text{m}$ , Waters) que é eluído a 40 °C com uma taxa de fluxo de 0,3 mL  $\text{min}^{-1}$  de acetonitrila/isopropanol 5% (1:1, + 0,1% HCOOH) (solvente B) em HCOOH 0,1% a 100% de B em 5 min, mantido por 2 min, então de volta a 5% de B em 0,5 min e, finalmente, mantido por 2,5 min antes da próxima corrida. A calibração do QTOF foi realizada com formato de sódio. Os dados precisos de massa foram processados pelo programa Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics) (JOKELA et al., 2012)

#### 4.4 Obtenção de extrato

As cepas foram cultivadas em maior volume e então as células foram concentradas por centrifugação de 10.000 rpm por 10 min com Sorvall LYNX 6000 Superspeed Centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) em temperatura ambiente, então foram armazenadas a -80°C antes da liofilização. A liofilização foi realizada na ChristBeta 2-8 LSC plus freezer dryer equipada com Christ Lyo Club 4-8 câmaras (Martin, Christ, Ostrode am Harz, Germany). O material ficou 71 horas no liofilizador.

Em um tubo plástico de 2 mL foram transferidos 200µL de pérolas de vidro lavadas em ácido (SIGMA-ALDRIC, 425-600 microns), 100mg de células liofilizadas e 1 mL de MeOH 100%. Homogeneizou-se as amostras usando shaker (Multi Mixer KASVI k40-10208), por 5 minutos à 3000 rpm em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (Microcentrífuga Hsiangtai DC2000) por 5 min a 10.000 x g em Eppendorff (5451D Centrifuge, 2 mL), depois disso o sobrenadante foi coletado em um novo tubo de plástico (2 mL), e passou por processo de sonicação por imersão (Sonicador Ultracleaner 1400A) aquecido à ~60°C e frequência ultrassônica 40 kHz por 2 minutos, seguido pelo processo de congelamento com Nitrogênio líquido e liofilização (Liofilizador k105, LIOTOP). Os extratos liofilizados foram mantidos a uma temperatura de -20°C para análises posteriores. Os extratos foram suspensos em 1 mL de solvente (SHISHIDO et al., 2015).

#### 4.7 Testes de atividade

##### 4.7.1 Teste de toxicidade em *Artemia salina*

O teste piloto foi realizado utilizando o extrato com concentração de células liofilizadas igual à 100 mg/mL, com proporção de 90% de extrato e 10% de solução salina em triplicata, conforme descrito por Batista; Suzuki (2013), com adaptações. Para o teste, foram utilizadas apenas as cepas, GBBB06 (*Chlorella sp.*) e GBBB07 (*Synechococcus sp.*). A cepa GBBB08 (*Geminocystis sp.*) não apresentou crescimento suficiente para obtenção de extratos.

Para a eclosão, os cistos de *A. salina* foram incubados por 48 horas em solução salina artificial com pH entre 8 e 9 e à temperatura de 27° a 30° C com iluminação constante de 60 – 100 W. Para isso, foi utilizado um aquário com capacidade de 3 L,

onde foi adicionado 1 L de solução salina e aproximadamente 1g de cistos de *Artemia salina*, mantido em constante aeração.

Os ensaios foram realizados em copos de 10 mL em 3 réplicas para cada uma das concentrações de extrato de cianobactéria limitados a 90% com ajuste de pH para 8-9, pra este teste utilizou-se como solvente dH<sub>2</sub>O, para um volume total de 2 mL. Após a preparação de todos os tubos com as concentrações pré- estabelecidas (tabela 6), com o auxílio de uma pipeta Pasteur de diâmetro adequado e ponta arredondada, colocou-se 10 náuplios de *A. salina* por copo, os quais foram mantidos sob iluminação à temperatura de 27° a 30° C por 24 h. O controle negativo foi realizado com a solução salina e o controle positivo, com solução de dicromato de potássio em meio salino com concentração de 0,2 g L<sup>-1</sup>.

Após a exposição por 24 h, o número de organismos vivos e mortos em cada tubo foi contado para, posteriormente, determinar a concentração da amostra que causou mortalidade de 50% (CL50), dos organismos após exposição de 24 h nas condições do teste. A CL50 será obtida por cálculo estatístico usando o programa Trimmed SpearmanKarber (Hamilton et al., 1977) com intervalo de confiança de 95%.

A tabela 5 apresenta os valores proporcionais para diluição de extrato utilizados em ensaio com *Artemia salina*.

**Tabela 5-**Proporções-teste para ensaio com *Artemia salina*

<b>Proporção</b>	<b>Fator diluição</b>	<b>Volume amostra</b>	<b>de Vol. s. salina</b>	<b>Volume final</b>
90%	1	1,8 mL	0,2 mL	2 mL
50%	2	1 mL	1 mL	2 mL
25%	3	0,5 mL	1,5 mL	2 mL
12,5%	4	0,25 mL	1,75 mL	2 mL

**Fonte:** Batista, 2013, com adaptações.

#### 4.7.2 Teste de atividade carrapaticida

Os testes de atividade carrapaticida foram realizados no Laboratório de Helmintologia, no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Maranhão. O laboratório trabalha com duas cepas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, uma cepa resistente e uma cepa considerada sensível aos carrapaticidas químicos sintéticos: JAGUAR e POA, respectivamente. Ambas foram utilizadas para

o teste de atividade com os extratos das cepas isoladas neste trabalho.

Uma vez que foi o primeiro teste com este organismo, foi realizado um teste com extrato na concentração padrão (100 mg/mL), para verificar o melhor diluente e a necessidade de diluições da amostra. Em suma os extratos foram obtidos a partir de dois solventes diferentes, um utilizando metanol 100% e outro etanol 70%.

O extrato metanoico foi liofilizado e suspenso em dois diferentes diluentes, água deionizada e solução de ET-Triton 0,02%. Ao final foram obtidos 3 produtos a serem testados: extrato metanoico suspenso em água deionizada, extrato metanoico suspenso em solução de ET-Triton 0,02%, e extrato etanoico. Como controle negativo foram utilizados soluções diferentes conforme descritos na Tabela 6.

Foram adicionados 1000 µL do extrato, em tubos plásticos de 1,5 mL e aproximadamente, 500 larvas foram adicionadas. Imediatamente após a adição de larvas, o tubo foi fechado e agitado vigorosamente por alguns segundos e, em seguida, suavemente por 10 min. Os tubos foram então abertos e as larvas transferidas com auxílio de uma espátula para um filtro de papel.

Após secagem, cerca de 100 larvas foram transferidas para filtro de papel quadriculado (850 mm/ 750 mm) dobrados e fechados com cliques de pacote "bulldog" de forma semelhante a um "pacote".

Os pacotes foram incubados a 27-28 °C e 80-90% de umidade relativa por 24 h, em seguida, a mortalidade foi determinada. Apenas larvas capazes de locomoção foram consideradas vivas. Estes passos foram repetidos para cada um dos extratos obtidos, e para cada cepa de organismo testada (KLAFKE et al. 2006).

**Tabela 6-** Controles negativos usados no teste carrapaticida.

<b>Material (Extrato)</b>	<b>Solução controle</b>
Extrato etanoico	Etanol 70%
Extrato metanoico suspenso Em dH <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O
Extrato metanoico suspenso em Solução de triton 0,02%	Solução de triton 0,02%

dH<sub>2</sub>O: água deionizada

Para o teste de atividade carrapaticida utilizou-se apenas a cepa GBBB06, visto que a cepa GBBB08 não apresentou crescimento suficiente para a obtenção de

extrato, e a cepa GBBB07, no período do teste supracitado ainda não havia Biotecnologia sido inclusa neste trabalho, de modo que a mesma foi testada apenas frente à *Artemia salina*.

### 5.6.3 Atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foi realizados no Departamento de Ciências Alimentares e Ambientais, Divisão de Microbiologia e, na Universidade de Helsinque, Finlândia.

Extratos metanólicos (300 µL) de todas as cepas estudadas foram aplicados a um disco de papel (ABTek Biologicals Ltd., Liverpool, Reino Unido) e mantidos *overnight* para a absorção do extrato pelos discos. *Candida albicans* HAMB1484 e *Aspergillus flavus* HAMB1829 foram cultivados em meio Ágar dextrose batata (PDA), *Micrococcus luteus* HAMB12688 e *Escherichia coli* HAMB11723, em meio Ágar nutriente (NA), *Staphylococcus aureus* HAMB166 foi cultivado em meio Ágar (BHI), (brain heart infusion), enquanto *Acinetobacter baumannii* HAMB1760 foi cultivado em Ágar triptona glicose (TGY). Os discos contendo extrato foram aplicados nas placas com meio PDA, NA, BHI ou TGY, contendo cada um dos microrganismos. Após um período de incubação das placas de 24-72 horas em temperaturas de 28°C-37°C, as placas foram analisadas com mensuramento das zonas de inibição, que foram medidas incluindo o diâmetro do disco de papel. Como controle positivo foi utilizado canamicina 1000 µg por disco para bactérias e Nistatina 300 µg por disco para fungos e como controle negativo 300 µL de MeOH 100% por disco (VESTOLA et al., 2014).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dados Físico-químicos

A capacidade de crescimento nos mais diferentes meios é uma das características marcantes das cianobactérias. Entretanto, ambientes de água doce são os mais favoráveis para o crescimento de cianobactérias, visto que a maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas neutro-alcálinas (pH 6-9), temperatura entre 15°C a 30°C e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (BRASIL, 2003).

Na tabela 7 estão descritos os resultados obtidos a partir da análise físico-química dos parâmetros de temperatura, pH, turbidez, e oxigênio dissolvido, para cada um dos pontos 12 de coleta de amostra.

**Tabela 7-**Parâmetros analisados *in situ* nos pontos de coleta de água e sedimentos.

Pontos	Temp °C	pH	Turbidez (NTU)	OD (mg/L)
1	27.5	7,1	4,39	06.20
2	27.2	7,3	4,82	07.66
3	27.8	7,3	3,97	05.63
4	28.2	7,2	4,57	05.65
5	27.5	7,3	7,44	4.35
6	27.4	6,9	5,93	02.75
7	26.2	6,9	14,3	05.98
8	25.0	6,9	11,7	3.48
9	26.4	7,0	12,9	7.51
10	26.5	7,3	22,3	7.12
11	26.2	7,4	16	3.55
12	26.5	7,4	20,6	7.77

Temp: Temperatura; pH: potencial hidrogeniônico; NTU: Unidade Nefolométrica de Turbidez; OD: oxigênio dissolvido.

A sensibilidade e adaptação das cianobactérias às mudanças climáticas, combinadas com sua flexibilidade ecofisiológica, são em grande parte produtos de uma longa evolução (PAERL; HUISMAN 2009).

Cianobactérias do gênero *Geminocystis* mostraram crescimento satisfatório em temperatura entre 20 e 30°C, condições de fotoperíodo (14h luz e 10h escuro), constantemente borbulhado e pH entre 7-8 (HIROSE et al. 2017; BUCH 2019). Observações semelhantes foram observadas para o crescimento de cianobactérias do gênero *Synechocystis*, que cresce em temperatura em torno de 30°C e pH entre 7-8 (YU et al. 2013; COELHO MÜLLER et al. 2003). Em particular, este grupo parece bem adaptado e capaz de tomar vantagem de um mundo cada vez mais quente (PAERL; HUISMAN 2009).

Os dados obtidos neste estudo mostraram temperatura média dos pontos de coleta igual 26,8°C, os valores de pH não tiveram variação significativa, apresentando média igual a 7,0. Estes valores são considerados favoráveis ao crescimento de microrganismos fotossintetizantes os quais em geral, apresentam um melhor crescimento em águas neutro-alcálicas (pH 6-9), temperatura entre 15°C a 30°C (BRASIL, 2003).

Em um estudo com a cepa cianobacteriana *Cylindropermopsis raciborskii* observou-se que a temperatura foi fator limitante para o crescimento da cianobactéria em experimento laboratorial (MESQUITA et al. 2019; SOARES et al. 2009). Além disso, causou diminuição na quantidade de biomassa total de cianobactérias, onde as taxas máximas de crescimento foram obtidas com intensidade de luz mais alta combinadas com temperaturas iguais ou acima de 20° C. Segundo Soares et al. (2009), a estabilidade térmica e a intensidade de luz nos meses do verão têm relação direta com a substituição de espécies no ambiente.

A diminuição da concentração de nitrato está associada à maior quantidade de biomassa de cianobactéria, visto que as mesmas superam outros microrganismos do fitoplâncton em baixas concentrações de nitrogênio. Outros fatores como o alto pH, e baixa transparência da água foram associados à abundância de cianobactérias (DALU; WASSERMAN 2018; YANG et al., 2017; CREMONA et al., 2018).

A Tabela 8 apresenta os resultados observados nos pontos de coleta de amostras. Observa-se que os pontos 1 e 8 apresentaram os maiores valores para a presença de amônia, o ponto 12 apresentou maiores valores de nitratos e silicatos, para a presença de fosfatos o maior valor foi observado no ponto 3.

**Tabela 8-**Nutrientes observados nos pontos de coleta dentro do Parque Nacional da Chapada das Mesas-MA.

Pontos	NH <sub>3</sub> μmol.L <sup>-1</sup>	NO <sup>-2</sup> μmol.L <sup>-2</sup>	NO <sup>-3</sup> μmol.L <sup>-3</sup>	PO <sub>3</sub> <sup>-4</sup> μmol.L <sup>-4</sup>	SiO <sub>2</sub> μmol.L <sup>-5</sup>
1	112,56	0,02	4,03	0,02	1,73
2	18,59	0,03	2,63	0,26	2,64
3	17,20	0,04	4,63	1,21	1,20
4	12,33	0,05	4,17	0,07	2,00
5	10,93	0,04	3,88	0,02	0,57
6	6,76	0,06	3,60	0,11	0,62
7	7,45	0,11	2,20	0,38	0,81
8	26,25	0,24	7,57	0,53	2,52
9	8,85	0,14	5,46	0,26	3,78
10	10,24	0,08	5,71	0,60	4,26
11	8,85	0,10	6,74	0,55	3,93
12	6,76	0,16	58,07	0,40	4,30

NH<sub>3</sub>: Amônia; NO<sup>-2</sup>: Nitritos; NO<sup>-3</sup>: Nitratos; PO<sub>3</sub><sup>-4</sup>:Fosfato; SiO<sub>2</sub>:silicatos; μmol.L: milimoles por litro.

O fósforo tem sido tradicionalmente considerado o principal nutriente que limita a produtividade primária e a acumulação de biomassa de algas nos ecossistemas de água doce (YU,2013). O conceito de limitação de nutrientes é, considerado chave para a pesquisa de cianobactérias, como é na pesquisa de eutrofização em geral (DALU, 2018).

O aumento dos níveis de fósforo foi apontado como fator importante na mudança da composição das espécies de cianobactérias fixadoras de nitrogênio, a redução deste nutriente também causou diminuição na expressão de toxinas produzidas por estes microrganismos (YU, et al. 2013; DALU; WASSERMAN, 2018).

## 5.2 Caracterização morfofisiológica

Utilizando protocolos combinados foram isolados três microrganismos fotossintetizantes, sendo dois gêneros de cianobactérias e um de microalga, descritos a seguir:



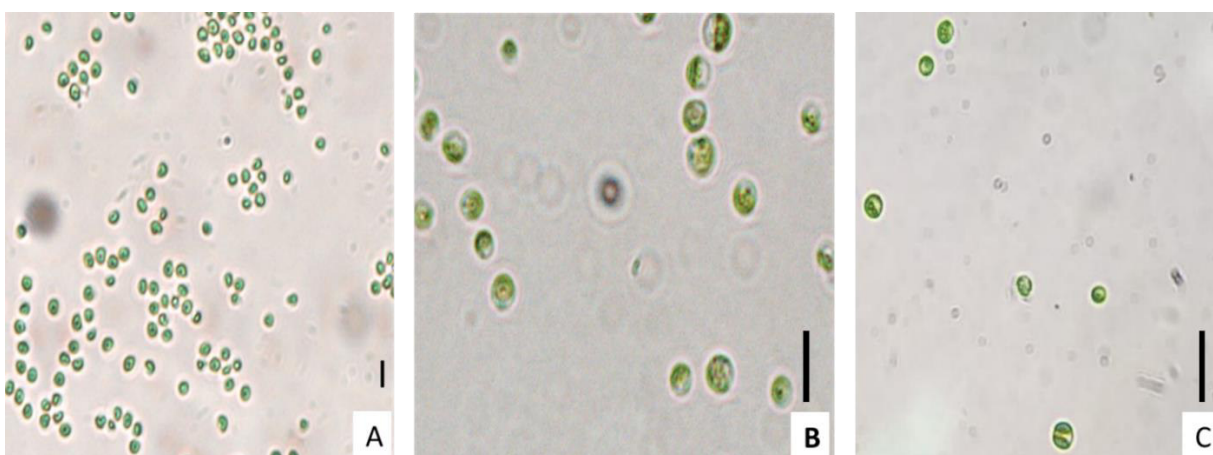
### a. *Chlorella* cepa GBBB06

A cepa GBBB06 foi isolada do ponto 6 (Cachoeira Santuário) e pertence ao gênero *Chlorella* (figura3), que é representado por indivíduos solitários e de vida livre.

A célula é, em geral, esférica, elipsoidal ou ovóide, mas também pode ser reniforme ou um pouco assimétrica. A parede celular é bem distinta, porém, delgada. O cloroplastídio é único na maioria das vezes, raro ocorrem dois. Quando é único, o Cloroplastídio tem a forma de taça e quando em número de dois cada um tem a forma de uma calota rasa e aberta. O pirenoide nem sempre se encontra presente (BICUDO E MENEZES, 2006).

Em meio líquido, a amostra possui coloração verde-escuro, e não formam colônias macroscópicas, nem aderem ao fundo do frasco, apresentou bom crescimento em temperatura média de 28°C sob iluminação.

**Figura 3-** Fotomicrografia de células de *Chlorella*, cepa GBBB06. escala 10µm.



Segundo Samek et al. (2014), microalgas do gênero *Chlorella* crescem em temperatura média 30°C, pH em torno de 7, sendo organismos fotoautotróficos, naturalmente fixadores de gás carbônico.

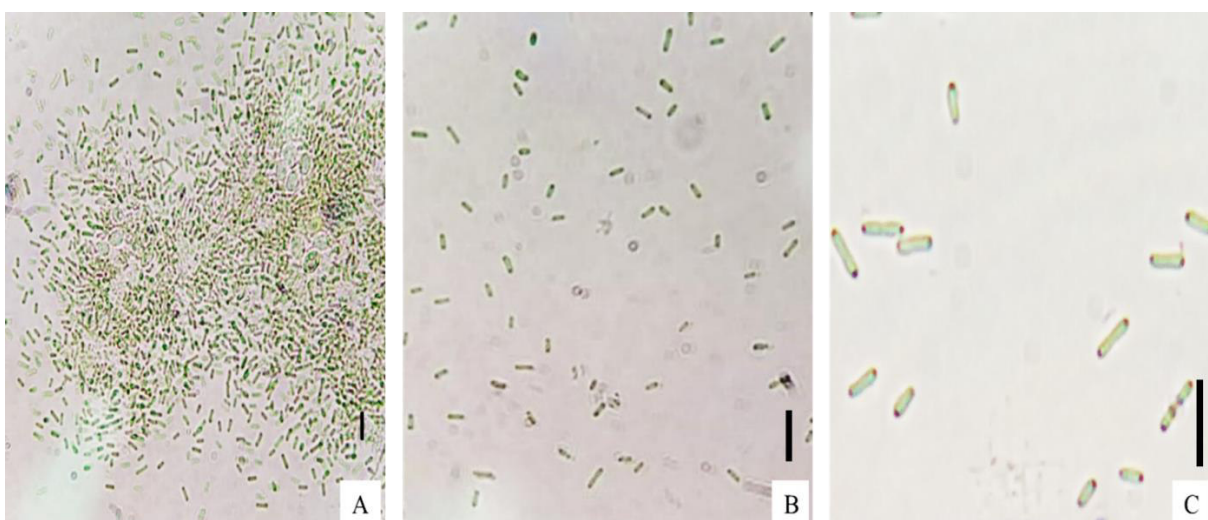
Produzem grande variedade de biomoléculas primárias, tais como proteínas, carboidratos e lipídios, além de clorofilas *a* e clorofila *b*, que são pigmentos componente do fotossistema II de microalgas verdes e pigmentos acessórios como carotenoides, xantofilas e ficobilinas.

Apresentam também elevados teores de leucina (aminoácido essencial), glutamina, ácido aspártico e arginina (não essenciais) e clorofila, (SAMEK et al., 2013; LELIAERT et al., 2012).

### b. *Synechococcus* cepa GBBB07

A cepa cianobacteriana GBBB 07 (figura 4) foi obtida do ponto 1 (Cachoeira Porteira) e apresenta células cilíndricas ou alongadas, arredondada nas extremidades. Aparecem como indivíduos livres ou em colônias irregulares; não apresentando mucilagem. Em meio líquido, a amostra apresenta coloração verde claro. As condições de cultivo utilizadas foram: temperatura em torno de 28°C em estufa de fotoperíodo em meio BG-11. A Figura 4 apresenta os aspectos coloniais e das células individuais da cepa GBBB07.

**Figura 4**-Fotomicrografia de células e aspecto colonial da cepa GBBB07. A) Aspecto Colonial, aumento b) células livres. c) células livres, imagem ampliada. escala 10µm.



As condições de cultura ótimas para o rápido crescimento da cepa *Synechococcus* UTEX 2973, inclui temperatura entre 38°C a 41°C, 3% de CO<sub>2</sub>, usando meio BG-11, apresentando crescimento acelerado nessas condições sem necessidade de adição de quaisquer nutrientes especiais (YU et al. 2015).

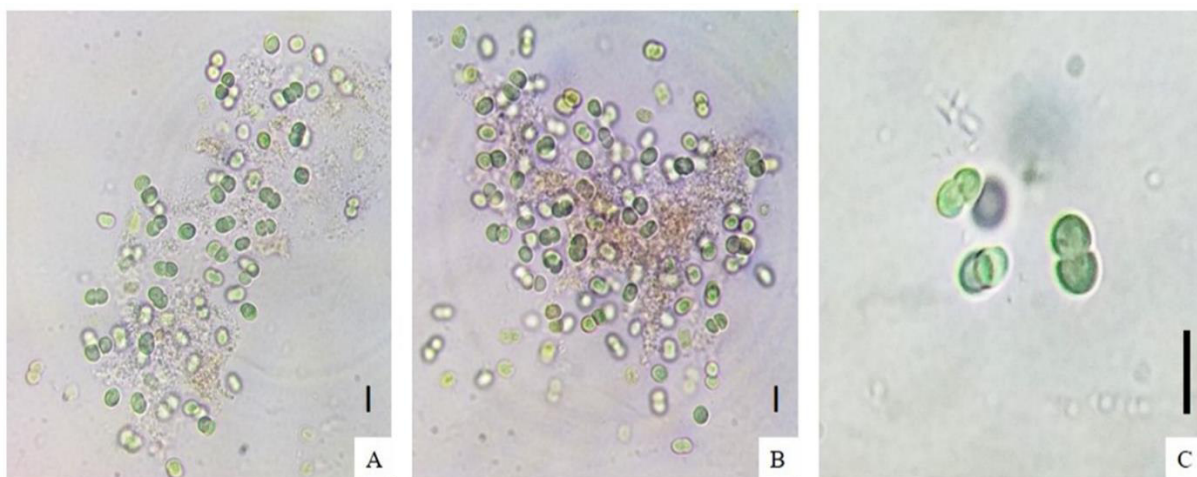
Cepas de cianobactérias do gênero *Synechococcus* apresentaram quantidade significativa de clorofila a, zeaxantina e beta-caroteno, estes pigmentos mostraram variação da concentração diferente de acordo com o diâmetro celular médio (BEMAL, 2016).

### c. *Geminocystis* cepa GBBB08

A cepa GBBB08 (figura 5) foi isolada do ponto 6 (Cachoeira Santuário), em meios sólidos, as células desta cepa cianobacteriana formam colônias mucilaginosas, macroscópicas de cor verde-escura. Em meios líquidos, as células crescem no fundo

do frasco, mas nunca se fixam ao fundo / vidro. As células aparecem de cor azul-esverdeada a cor acinzentada. A forma da célula é quase esférica a esférica com pequenos grânulos. As células têm 5 a 7 µm de diâmetro, sem envelope e aparecem hemisféricas após a divisão.

**Figura 5**-Fotomicrografia do aspecto colonial e células de *Geminocystis*, cepa GBBB 08. A e B) aspecto colonial. Escala 10 µm. C) células livres.



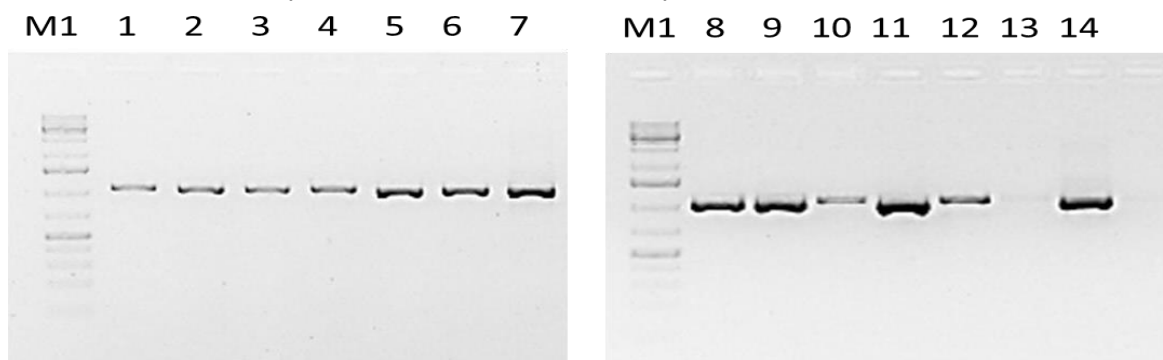
Em estudo com duas cepas de *Geminocystis*, observou-se que as mesmas podem ajustar os comprimentos de onda da luz que absorvem, através de um processo chamado aclimação cromática, onde alteraram drasticamente o teor de ficoeritrina em resposta à luz verde e vermelha. O cultivo dessas cepas foi feito em meio BG-11 continuamente borbulhado com ar contendo 1% (V/V) de CO<sub>2</sub> à 30°C. (HIROSE et al. 2017).

### 5.3 Extração de DNA, clonagem e sequenciamento

O DNA extraído apresentou, na maioria dos casos, boa qualidade, verificados em Nanodrop e por eletroforese em gel de agarose.

A partir dos produtos de PCR do gene rRNA16S, foram realizadas clonagens com as cepas GBBB06 e GBBB08. Os resultados das clonagens foram checados após um dia, observou-se a presença de colônias brancas e dessas colônias então foi feita uma nova PCR com a utilização do *primer* universal M13F e M13R para avaliar a ligação com o vetor, seguida por outra PCR com os *primers* específicos 359F e 1350R foi realizada, neste caso, somente para os clones que apresentaram resultado positivo (Figura 06).

**Figura 6**-Produto da amplificação (PCR) dos clones. M1: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; 1-7: clone da cepa GBBB08; 8-14: clones da cepa GBBB06.



O material clonado, após amplificação, foi sequenciado e os resultados estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 9**-Resultados obtidos no sequenciamento das amostras GBBB06 (*Chlorella*) e GBBB07(*Geminocystis*).

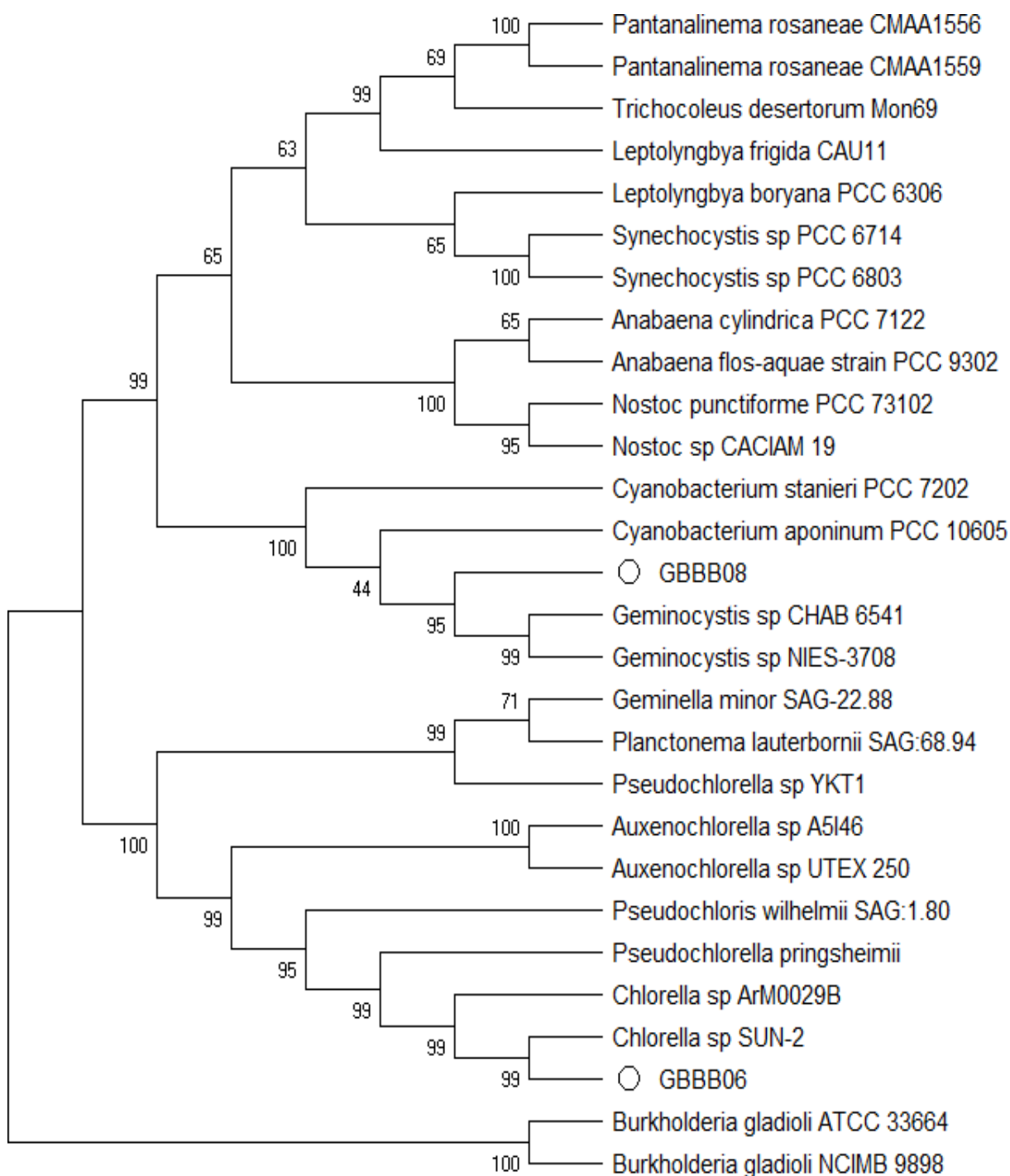
Cepa	Descrição	Pontuação total	Cobertura	E-Value	Identidade	Genbank
GBBB06	<i>Chlorella</i> sp. SUN-2	2614	93%	0.0	99.17%	<a href="#">EF1146</a> <a href="#">78.1</a>
GBBB08	<i>Geminocystis</i> sp. NIES-3708.	6414	97%	0.0	95.51%	<a href="#">AP0148</a> <a href="#">15.1</a>

### 5.3.1 Árvore filogenética

A relação filogenética (figura 7), foi inferida usando o método de agrupamento de vizinhos A árvore consenso de Bootstrap foi inferida usando 10.000 replicatas (FELSENSTEIN 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura 2 (KIMURA 1980). Esta análise envolveu 28 sequências de nucleotídeos.

Todas as posições ambíguas foram removidas para cada sequência de par (*Pairwise deletion option*). Havia um total de 1625 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X (KUMAR et al.2018). Como marcador molecular foi utilizado a subunidade 16S rRNA, e com grupos externos as cepas bacterianas *Burkholderia gladioli* ATCC 33664 e *Burkholderia gladioli* NCIMB 9898.

**Figura 7**-Árvore de diversidade e filogenia das cepas GBBB06 e GBBB 08, baseada na análise do gene marcador 16sr RNA, utilizando como grupo externo duas cepas da espécie bacteriana *Burkholderia gladioli*.



A árvore filogenética gerada refletiu os resultados já obtidos da identificação molecular das cepas estudadas, onde a cepa GBBB 06 apresentou-se mais próxima filogeneticamente de cepas do gênero *Chlorella*, e a cepa GBBB08 mostrou-se filogeneticamente mais próxima de cepas do gênero *Geminocystis*.



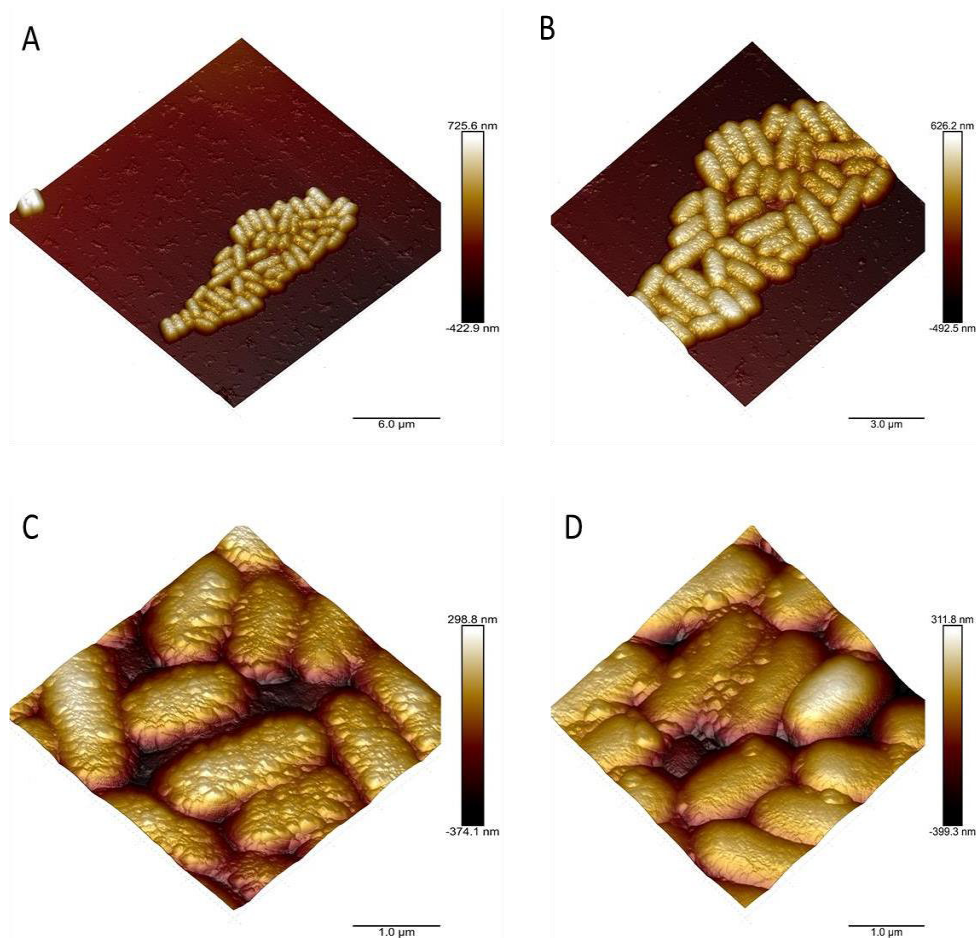
## 5.4 Perfil químico

Os dados obtidos não evidenciaram compostos interessantes do ponto de vista de aplicabilidade industrial ou bioatividade. Entretanto novos testes estão sendo desenvolvidos para uma caracterização mais refinada dos compostos presentes nas cepas estudadas. Tal fato pode ser explicado pelas condições de cultivo aplicadas, que, embora ideais para o crescimento e manutenção da cepa, não foram adequadas para a produção de compostos com bioatividade, ou a quantidade de biomassa utilizada na obtenção dos extratos (100 mg) e sua concentração final (100mg/mL), não foram suficientes para observar a presença dos compostos de interesse.

## 5.5 Análise de ultraestrutura

A Figura 8 apresenta as imagens obtidas a partir da análise de AFM, para a cepa GBBB07 (*Synechococcus sp*), utilizando protocolo de etanol/ácido acético 3:1.

**Figura 8**-Imagens tridimensionais obtida por microscopia de força atômica da cepa GBBB07.

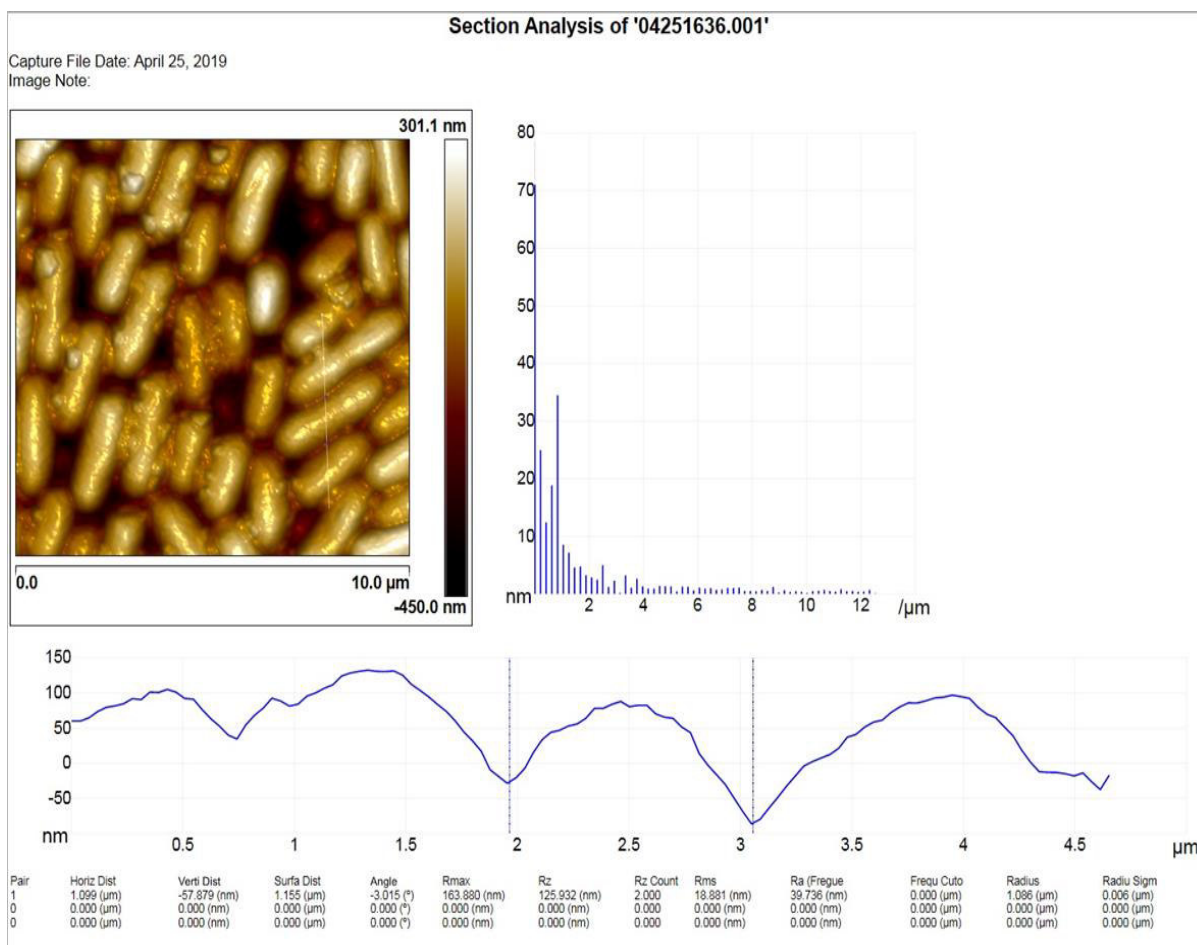


Os resultados da análise de AFM corroboram com a identificação morfológica desta cepa, que apresentou células cilíndricas, com extremidades arredondadas e sem mucilagem.

A microscopia de força atômica tem sido utilizada para observação e detecção de estruturas específicas de cianobactérias como o desenvolvido por Dubrovin (2005), em cepas de *Synechocystis* para verificação e estudo da *pili* de linhagens móveis e não móveis, bem como, para a detecção de metabólitos tóxicos a nível molecular, como as microcistinas, sugerindo que outras substâncias tóxicas também poderiam ser estudadas. E vem adicionar mais um método de detecção de cianotoxinas aos já conhecidos, providenciando uma detecção sensível (a nível molecular) e rápida (BUENO, 2010).

A Figura apresenta o perfil de altura celular da cepa de *Synechococcus* (GBBB 07), o valor máximo de altura das células foi de 70 nm na secção aferida.

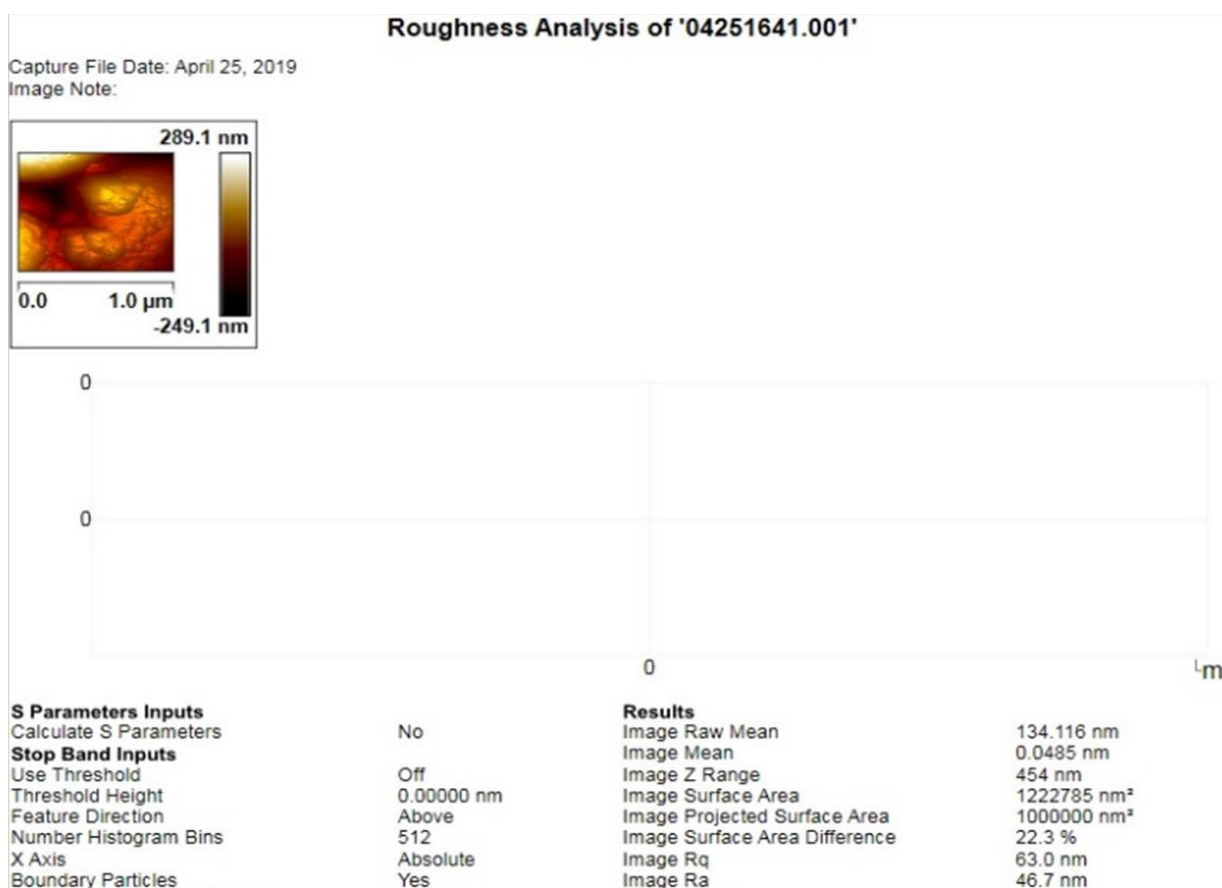
**Figura 9-** Perfil de altura das células cianobacterianas da cepa GBBB07 (*Synechococcus*).



Além de estudos estruturais e detecção de metabólitos a microscopia de força atômica também tem sido utilizado para estudos de interação de cianobactérias com diferentes compostos e sua possível aplicação em tecnologias sustentáveis além de possibilitar compreensão da relação entre a morfologia e a função celular (DUBROVIN, 2005; ZHU, 2015).

A medida de rugosidade média (figura 9), é a medida da variação do relevo presente na amostra estudada, e tem sido utilizada como medida útil na compreensão das mudanças morfológicas das membranas celulares frente a diferentes situações, sendo importante na avaliação dos efeitos biológicos reais que podem ser utilizados principalmente nas áreas médicas e farmacológicas (SILVA, 2016).

**Figura 10-** Rugosidade média (Ra) de células da cepa *Synechococcus* (GBBB07).



Para a cepa GBBB 07 a rugosidade média foi de 46.7 nm. A rugosidade média pode sofrer influência do método de preparo da amostra ou aderência à substratos causando observações de valores de Ra (rugosidade média) maiores ou menores (SILVA, 2016).

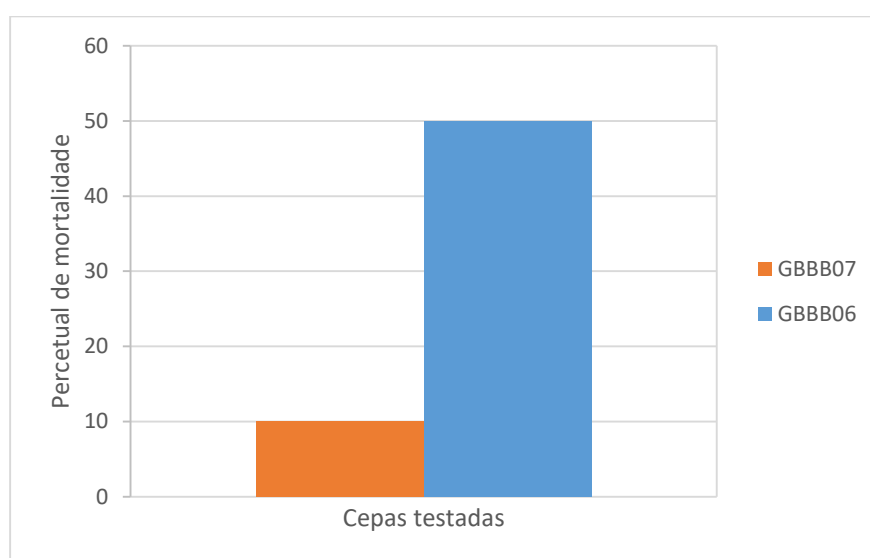


## 5.6 Testes de atividade

### 5.6.1 Teste de toxicidade *Artemia salina*

As amostras submetidas ao teste (GBBB06 e GBBB07), usando extrato bruto cianobacteriano (100 mg de biomassa liofilizada em 1 mL de Metanol), apontaram percentual de mortalidade de 10% para a cepa GBBB06 e 50% para a cepa GBBB07 (figura 9).

**Figura 9**-Percentual de mortalidade de *Artemia salina* frente aos extratos metanoicos das cepas GBBB 06 (*Cihorella*) e GBBB 07 (*Synechococcus*).



Estudo desenvolvido por Frazão (2010), mostrou que a toxicidade frente aos de náuplios de *Artemia salina* foi mais evidente para os extratos aquosos de todas as cepas de cianobactérias estudadas, indicando a produção de compostos tóxicos. Dados semelhantes também foram obtidos em estudos com as cepas de *Microcystis* e *Prymnesium parvum*, que apresentaram alta toxicidade (BATISTA; SUZUKI 2013; GRANÉLI; SALOMON 2010).

### 5.6.2 Teste de atividade carrapaticida

O teste realizado com a cepa GBBB 06, frente às larvas do carrapato *Rhipicephalos microplus* (cepa resistente), incluiu métodos e eluentes diferentes. Os resultados do teste usando os eluentes: solução 1% ET+TritonX 0,02% (material liofilizado), e etanol 70% respectivamente, não apresentaram resultados positivos quanto à bioatividade.

Cepas cianobacterianas têm sido aplicadas para teste de atividade sobre várias

espécies de organismos, no entanto não foram encontrados estudos anteriores de testes sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Embora a bioatividade frente as variadas espécies de organismos testados seja em sua maioria relacionadas a produção de toxinas, outros compostos já foram descritos como responsável pela ação inseticida observada (ELHAM; MOHAMED 2013; TAN et al. 2008; CAGIDE et al. 2014).

Utilizando água deionizada como eluente, para o teste conduzido frente à cepa sensível aos carrapaticidas convencionais, não foi observada atividade contra a mesma.

De acordo com a literatura a ação inseticida varia de acordo com o organismo testado e com o método empregado. Cepas do gênero cianobacteriano *Nostoc* sp., mostraram atividade inseticida, onde todas as larvas do organismo-teste *Helicoverpa armigera*, foram mortas por biomassa do extrato, com uma concentração letal de 50%, e induziu esterilidade máxima nos testes contra o organismo *Agrotis ipsilon*. No entanto, não foi obtido o mesmo resultado para testes com *Galleria mellonella* e *Aedes aegypti* que não apresentaram mortalidade significativa (BIONDI, 2004; MARTEN 2007; ELHAM; MOHAMED 2013).

### 5.6.3 Teste de atividade antimicrobiana

Os testes antimicrobianos realização realizados com cepas de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos da coleção Microbial Domain Biological resource center (HAMBI) com extrato bruto correspondente a 100 mg de biomassa liofilizada. A zona de inibição foi mensurada em mm incluindo diâmetro de disco (6 mm).

Embora não tenha sido observado resultado positivo em nenhum dos microrganismos testados, dados da literatura apontam que cepas de *Synechococcus* mostraram-se como promissoras frente à microrganismos patogênicos (BARBOZA et al. 2017). Atividade igualmente promissora foi verificada também com extratos de *Nostoc* e *Synechocystis* (BARBOZA et al. 2017; NIVESHKA et al. 2016), No entanto, a maioria dos compostos derivados de cianobactérias apresenta, além da atividade antibiótica desejada, citotoxicidade contra células eucarióticas e eritrócitos, o que provoca limitação em seu uso direto.

Embora seja inegável o potencial uso de metabólitos secundários como fonte para o desenvolvimento de compostos bioativos, mais estudos precisam ser realizados para elucidar os mecanismos de ação dos mesmos (RAO, 2015).

Senhorinho et al. (2015), sugere que as mudanças nas condições ambientais têm relação direta com o aumento da produção de compostos antibacterianos pelas microalgas, e que a capacidade de certas espécies de microalgas de sobreviver e se adaptar a condições ambientais extremas sugere que as cepas desses ambientes possuem maior potencial para produzir compostos antibacterianos.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com o que foi exposto ao longo do trabalho, pode-se concluir que o Parque Nacional da Chapada das Mesas-MA, apresenta condições favoráveis ao crescimento de microrganismos fotossintetizantes, abrigando importantes gêneros de cianobactérias e microalgas. Assim:

- O cultivo e isolamento de cianobactérias e microalgas mostraram-se eficientes, tornando possível a identificação morfológica dos gêneros descritos ao longo do trabalho;
- As técnicas de biologia molecular possibilitaram maior confiabilidade na identificação das cepas isoladas, corroborando com as mesmas (*Chlorella*, *Synechococcus* e *Geminocystis*);
- Quanto à bioatividade das cepas estudadas, sabe-se que, os resultados negativos observados não são decisivos, outras condições de crescimento das cepas, bem como, diferentes concentrações dos extratos devem ser testadas.
- As análises de ultraestrutura além de corroborar com as técnicas primeiramente efetuadas de identificação, forneceu novos e interessantes dados que auxiliaram na identificação morfológica da amostra.

As técnicas conjuntas de indentificação, incluindo-se dados de análises ultraestruturais, morfológicas, fisiológicas e moleculares, mostraram-se um excelente recurso para identificação completa e confiável de microrganismos fotossintetizantes.

## REFERÊNCIAS

- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 1, p. 1–12, 2009.
- AN, T.; KUMAR, T. K. S.; WANG, M.; et al. Structures of pahayokolides A and B, cyclic peptides from a *Lyngbya* sp. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 5, p. 730–735, 2007.
- BARBOZA, G.; GORLACH-LIRA, K.; SASSI, C.; SASSI, R. Microcystins production and antibacterial activity of cyanobacterial strains of *Synechocystis*, *Synechococcus* and *Romeria* isolated from water and coral reef organisms of Brazilian coast. *Revista de Biología Tropical*, v. 65, n. 3, p. 890, 2017.
- BARCELLOS, A. D.; BARRETO, A. G. DA S. S.; MACHADO, B. A. S.; DRUZIAN, J. I. Microalgas E Seu Potencial De Uso. *Cadernos de Prospecção*, v. 5, n. 4, p. 178–184, 2012.
- BARROS, M. U. G.; LOPES, I. K. C.; CARVALHO, S. M. DE C.; CAPELO NETO, J. Impact of filamentous cyanobacteria on the water quality of two tropical reservoirs. *Rbrh*, v. 22, n. 0, 2017.
- BATISTA, A. D.; SUZUKI, L. Y. CIANOBACTÉRIAS COM DIFERENTES ORGANISMOS-TESTE Aline Domingues Batista Lais Yuko Suzuki. , p. 186–201.
- BECHER, P. G.; BEUCHAT, J.; GADEMANN, K.; JÜTTNER, F. Nostocarboline: Isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from *Nostoc* 78-12A. *Journal of Natural Products*, v. 68, n. 12, p. 1793–1795, 2005.
- BECHER, P. G.; JÜTTNER, F. Insecticidal compounds of the biofilm-forming cyanobacterium *Fischerella* sp. (ATCC 43239). *Environmental Toxicology*, v. 20, n. 3, p. 363–372, 2005.
- BECHER, P. G.; KELLER, S.; JUNG, G.; SÜSSMUTH, R. D.; JÜTTNER, F. Insecticidal activity of 12-epi-hapalindole J isonitrile. *Phytochemistry*, v. 68, n. 19, p. 2493–2497, 2007.
- BERRY, J. P.; GANTAR, M.; PEREZ, M. H.; BERRY, G.; NORIEGA, F. G. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*, v. 6, n. 2, p. 117–146, 2008.

BIANCHINI, R.; SILVANA, D.; MAURÍCIO, O.; BIBLIOGRÁFICA, R. Microalgae products and applications. *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. (Org). Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições), ed. 2. São Carlos: RiMa, 2006. 502p.

BIONDI, N. et al. Evaluation of Nostoc strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and environmental microbiology*, n. 70, p. 3313-3320, 2004.

BRASIL. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. – Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2003.

BRITO, Â.; RAMOS, V.; SEABRA, R.; et al. Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: A polyphasic study. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 110–119, 2012.

BULE, M. H.; AHMED, I.; MAQBOOL, F.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Microalgae as a source of high-value bioactive compounds. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, v. 10, n. 2, p. 197–216, 2018.

CAGIDE, E.; BECHER, P. G.; LOUZAO, M. C.; et al. Hapalindoles from the cyanobacterium *Fischerella*: Potential sodium channel modulators. *Chemical Research in Toxicology*, v. 27, n. 10, p. 1696–1706, 2014.

CARPENTIER, S.; KNAUS, M.; SUH, M. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 49, n. 4, p. 313–326, 2009.

CASELLA, S.; HUANG, F.; MASON, D.; et al. Dissecting the Native Architecture and Dynamics of Cyanobacterial Photosynthetic Machinery. *Molecular Plant*, v. 10, n. 11, p. 1434–1448, 2017.

CASTRO, G. M. DE. DAS MICROALGAS PARA CONSERVAÇÃO E Guilherme Miola de Castro. 2017.

CELIE, J. W. A. M.; BEELEN, R. H. J.; VAN DEN BORN, J. Effect of fixation protocols on in situ detection of L-selectin ligands. *Journal of Immunological Methods*, v. 298, n. 1–2, p. 155–159, 2005.

CHAO, Y.; ZHANG, T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, n. 2, p. 381–392, 2011.

COELHO MÜLLER, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. .; LOURENÇO, S. O. . Carotenoids of the cyanobacterium *Synechocystis pevalekii* produced under normal conditions and under nutrient limitation. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n. 4, p. 415–423, 2003.

COSTA, T. M. D. Unidades de conservação em territórios tradicionalmente ocupados: reflexões sobre as comunidades sertanejas e suas interações com os corpos hídricos no Parque Nacional da Chapada das Mesas. 2014. 68f. Monografia (Curso de Geografia) - Universidade Estadual do Maranhão, Departamento de História e Geografia, Imperatriz.

COSTA, S. S.; MIRANDA, A. L.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DRUZIAN, J. I. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 131, p. 536–547, 2019.

CREMONA, F.; TUVIKENE, L.; HABERMAN, J.; NÖGES, P.; NÖGES, T. Factors controlling the three-decade long rise in cyanobacteria biomass in a eutrophic shallow lake. *Science of the Total Environment*, v. 621, p. 352–359, 2018.

DALU, T.; WASSERMAN, R. J. Cyanobacteria dynamics in a small tropical reservoir: Understanding spatio-temporal variability and influence of environmental variables. *Science of the Total Environment*, v. 643, p. 835–841, 2018.

DANTAS, D. M. DE M.; OLIVEIRA, C. Y. B. DE; COSTA, R. M. P. B.; et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial capacity of green microalgae *Scenedesmus subspicatus*. *Food Science and Technology International*, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2019.

DELANEY, J. M.; WILKINS, R. M. Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon*, v. 33, n. 6, p. 771–778, 1995.

DEMIRBAS, A.; FATIH DEMIRBAS, M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 1, p. 163–170, 2011.

DITTMANN, E.; GUGGER, M.; SIVONEN, K.; FEWER, D. P. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends in Microbiology*, v. 23, n. 10, p. 642–652, 2015.

DOROBANTU, L. S.; GRAY, M. R. Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning*, v. 32, n. 2, p. 74–96, 2010.

DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H.; SLEGGERS, P. M.; et al. Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, n. 2, p. 169–177, 2013.

ELHAM, F.; MOHAMED, S. M. Comparative Toxic Activity of Four Algae , Against the 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> Larval Instars of Black Cutworm , *Agrotis Ipsilon* ( Hufnagel ). *Egypt. J. Agric. Res.*, v. 91, n. 4, p. 1303–1318, 2013.

FERNANDA, G.; ASSIS, P.; PEREIRA DA SILVA, S.; et al. Inventory of cyanobacteria and microalgae cited for the National Park of the Chapada dos Guimarães (MT) and 80 new records from the region. *Biota Neotropica*, v. 18, n. 2, 2018.

FERREIRA, S. P.; DE SOUZA-SOARES, L.; VIEIRA COSTA, J. A. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais Review: microalgae: an alternative source to obtain essential fatty acids. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 275–287, 2013.

FERREIRA, V. Caracterização morfológica e diversidade molecular de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista com ênfase em organismos aerofíticos. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.

FERRIS, M. J.; HIRSCH, C. F. Method for isolation and purification of cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, n. 57, p. 1448-1452, 1991.

GAO, F.; GUO, W.; ZENG, M.; FENG, Y.; FENG, G. Effect of microalgae as iron supplements on iron-deficiency anemia in rats. *Food and Function*, v. 10, n. 2, p. 723–732, 2019. Royal Society of Chemistry.



GE, H.; XIA, L.; ZHOU, X.; ZHANG, D.; HU, C. Effects of light intensity on components and topographical structures of extracellular polysaccharides from the cyanobacteria *Nostoc* sp. *Journal of Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 179–183, 2014.

GRANÉLI, E.; SALOMON, P. S. Factors influencing allelopathy and toxicity in *prymnesium parvum*. *Journal of the American Water Resources Association*, v. 46, n. 1, p. 108–120, 2010.

HADI, S. I. I. A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P. M.; et al. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLoS ONE*, v. 11, n. 2, p. 1–18, 2016.

HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, v. 2, n. 1, p. 60-61, 2011.

HARADA, K. I.; SUOMALAINEN, M.; UCHIDA, H.; et al. Insecticidal compounds against mosquito larvae from *Oscillatoria agardhii* strain 27. *Environmental Toxicology*, v. 15, n. 2, p. 114–119, 2000.

HENSON, B. J.; WATSON, L. E.; BARNUM, S. R. Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *NifD* sequences. *Current Microbiology*, v. 45, n. 3, p. 161–164, 2002.

HIROSE, Y.; MISAWA, N.; YONEKAWA, C.; et al. Characterization of the genuine type 2 chromatic acclimation in the two *Geminocystis* cyanobacteria. *DNA Research*, v. 24, n. 4, p. 387–396, 2017.

HU, J.; NAGARAJAN, D.; ZHANG, Q.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 1, p. 54–67, 2018.

JONES, A. C.; GU, L.; SORRELS, C. M.; SHERMAN, D. H.; GERWICK, W. H. New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 13, n. 2, p. 216–223, 2009.

KAPLAN, A.; HAREL, M.; KAPLAN-LEVY, R. N.; et al. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Frontiers in Microbiology*, v. 3, n. APR, p. 1–11, 2012.

KETSEOGLOU, I.; BOUWER, G. The susceptibility of five African Anopheles species to Anabaena PCC 7120 expressing Bacillus thuringiensis subsp. israelensis mosquitoicidal cry genes. Parasites and Vectors, v. 5, n. 1, p. 2–5, 2012.

KHASDAN, V.; BEN-DOV, E.; MANASHEROB, R.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. Mosquito larvicidal activity of transgenic Anabaena PCC 7120 expressing toxin genes from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. FEMS Microbiology Letters, v. 227, n. 2, p. 189–195, 2003.

KIVIRANTA, J. Kiviranta 1994. , v. 10, p. 517–520, 1994.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; DE ALBUQUERQUE, T. A.; et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Veterinary Parasitology, v. 142, n. 3–4, p. 386–390, 2006.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. Algal Research, v. 6, n. PA, p. 52–63, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>>. .

KOMÁREK, J. (2013): Cyanoprokaryota. 3. Heterocytous genera. In: Büdel B., Gärtner G., Krienitz L. & Schagerl M. (eds), Süswasserflora von Mitteleuropa/Freshwater flora of Central Europe, p. 1130, Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.

KOMÁREK, J.; K. ANAGNOSTIDIS. Cyanoprokaryota, Oscillatoriales, Süßwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag v. 19, 1-759. 2005.

KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J.; MARES, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia v. 86, 295-335. 2014.

KRIENITZ, L.; HUSS, V. A. R.; BOCK, C. Chlorella: 125 years of the green survivalist. Trends in Plant Science, v. 20, n. 2, p. 67–69, 2015.

LEFLAIVE, J.; TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: A comparison of allelopathic compounds and toxins. Freshwater Biology, v. 52, n. 2, p. 199–214, 2007.

LIANG, J.; LIU, Z. J.; WU, Z. H.; et al. Study on photoactivatable toxicity of phycobiliprotein from *Microcystis aeruginosa* as potential photoinsecticide. *Journal of Applied Phycology*, v. 28, n. 4, p. 2387–2396, 2016.

MACHADO, A. R.; GRAÇA, C. S.; DE ASSIS, L. M.; DE SOUZA-SOARES, L. A. Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 40, n. 1, p. 264–278, 2017.

MACHADO, L. S. et al. Fatores ambientais relacionados à ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas no reservatório de Guarapiranga, SP, Brasil. *ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. ISSN 1980-993X, 2016.

MALAVASI, V.; ŠKALOUD, P.; RINDI, F.; et al. DNA-based taxonomy in ecologically versatile microalgae: A re-evaluation of the species concept within the coccoid green algal genus *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *PLoS ONE*, v. 11, n. 3, p. 1–25, 2016.

MARQUES, A. R. Abordagens sobre o território e a territorialidade das comunidades sertanejas do cerrado da Chapada Das Mesas / MA. *Campo-Território: Revista de geografia agrária*, v. 9, n. 36, 2014.

MARQUES, A. R. Saberes geográficos integrados aos estudos territoriais sob a ótica da implantação do parque nacional da Chapada Das Mesas, sertão de Carolina/MA. 2012. 205f. Tese (Doutorado) - Universidade estadual Paulista, Presidente Prudente.

MARTEN, G. G. Larvicidal Algae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 23, n. sp2, p. 177–183, 2007.

MELO VAN LENT, D.; LEERMAKERS, E. T. M.; DARWEESH, S. K. L.; et al. The effects of lutein on respiratory health across the life course: A systematic review. *Clinical Nutrition ESPEN*, v. 13, p. e1–e7, 2016.

MESQUITA, M. C. B.; LÜRLING, M.; DORR, F.; PINTO, E.; MARINHO, M. M. Combined effect of light and temperature on the production of saxitoxins in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Toxins*, v. 11, n. 1, 2019.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, v. 129, n. 1, p. 139–148, 2011.

MÜLLER, M. C., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., Lourenço, S. O. Carotenóides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação de nutrientes *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas- Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 39, n. 4, out./dez., 2003.

NIVESHKA; VERMA, E.; MISHRA, A. K.; SINGH, A. K.; SINGH, V. K. Structural elucidation and molecular docking of a novel antibiotic compound from cyanobacterium *Nostoc* sp. MGL001. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. NOV, p. 1–15, 2016.

PAULINO, M. G. Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fernandoi* no teleósteo, *Hoplias malabaricus*. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos -São Carlos, 2015.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, v. 1, n. 1, p. 27–37, 2009.

BUCH, BRUNA. Caracterização taxonômica e prospecção de toxinas de cianobactérias bentônicas de ambientes lênticos da região noroeste do estado de São Paulo São José do Rio Preto Caracterização taxonômica e prospecção de toxinas de cianobactérias bentônicas 2019.

RAO, B. D. Antibacterial Activity of Fresh Water Cyanobacteria. *J. Algal Biomass Utiln*, v. 6, n. 3, p. 60–64, 2015.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 521–539, 2009.

RICHER, R.; BANACK, S. A.; METCALF, J. S.; COX, P. A. The persistence of cyanobacterial toxins in desert soils. *Journal of Arid Environments*, v. 112, n. PB, p. 134–139, 2015.

RICKARDS, R. W.; ROTHSCCHILD, J. M.; WILLIS, A. C.; et al. Calothrixins A and B, novel pentacyclic metabolites from *Calothrix* cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells. *Tetrahedron*, v. 55, n. 47, p. 13513–13520, 1999.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* n. 61, p. 539, 2012.

SAARIO, E.; ABDEL-HAMEED, A.; KIVIRANTA, J. Larvicidal microcystin toxins of cyanobacteria affect midgut epithelial cells of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 8, n. 4, p. 398–400, 1994.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, n. 4, p. 406–425, 1987.

SAMEK, D.; MIŠURCOVA, L.; MACHU, L.; BUNKA, F.; FIŠERA, M. Influencing of Amino Acid Composition of Green Freshwater Algae and Cyanobacterium by Methods of Cultivation. *Turkish Journal of Biochemistry*, v. 38, n. 4, p. 360–368, 2014.

SANCHES, S. M.; DO PRADO, E. L.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Microcystin toxin in the presence of water, public health impact and control measures [Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle]. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 33, n. 2, p. 181–187, 2012.

SASSI, K. K. B.; DA SILVA, J. A.; CALIXTO, C. D.; SASSI, R.; SASSI, C. F. DA C. Metabolites of interest for food technology produced by microalgae from the Northeast Brazil. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 50, n. 1, p. 54–65, 2019.

SENHORINHO, G. N. A.; ROSS, G. M.; SCOTT, J. A. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycologia*, v. 54, n. 3, p. 271–282, 2015.

SHANAB, S. M. M.; MOSTAFA, S. S. M.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 2, n. 8, p. 608–615, 2012. *Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine*.

SOARES, M. C. S.; MARIA, M. I.; MARINHO, M. M.; et al. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: Physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 57, n. 2, p. 137–149, 2009.

SURE, S.; TORRIERO, A. A. J.; GAUR, A.; et al. Inquisition of *Microcystis aeruginosa* and *Synechocystis nanowires*: characterization and modelling. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 108, n. 5, p. 1213–1225, 2015. Springer International Publishing.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, n. 28, p. 2731–2739, 2011.

TAN, L. T.; CHANG, Y. Y.; ASHOOTOSH, T. Besarhanamides A and B from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*, v. 69, n. 10, p. 2067–2069, 2008.

TOKU\CSOGLU, Ö.; ÜUNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of food science*, v. 68, n. 4, p. 1144–1148, 2003.

VACCA, V. A.; ANGULO, E. R.; PUENTES, D. M.; TORRES, J. G.; PLAZA, M. E. Uso de la microalga *Chlorella sp.* viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil. *Prospectiva*, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2017.

VASAS, G.; BORBELY, G.; NANASI, P.; NANASI, P. P. Alkaloids from Cyanobacteria with Diverse Powerful Bioactivities. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 10, p. 946–955, 2010.

WU, Q.; LIU, L.; MIRON, A.; et al. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of Toxicology*, v. 90, n. 8, p. 1817–1840, 2016.

YANG, Y.; JIANG, Y.; LI, X.; et al. Variations of growth and toxin yield in *Cylindrospermopsis raciborskii* under different phosphorus concentrations. *Toxins*, v. 9, n. 1, 2017.

YU, J.; LIBERTON, M.; CLIFTEN, P. F.; et al. *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO<sub>2</sub>. *Scientific reports*, v. 5, p. 8132, 2015.

YU, Y.; YOU, L.; LIU, D.; et al. Development of *synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs*, v. 11, n. 8, p. 2894–2916, 2013.

ZHANG, J.; SUN, Z.; SUN, P.; CHEN, T.; CHEN, F. Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food and Function*, v. 5, n. 3, p. 413–425, 2014.

JOKELA, J.; OFTEDAL, L.; HERFINDAL, L.; PERMI, P.; WAHLSTEN, M.; DOSKELAND, S. O.; SIVONEN, K. Anabaenolysins, Novel Cytolytic Lipopeptides from Benthic *Anabaena* Cyanobacteria. *PLoS ONE* v. 12, 1-9. 2012.

SHISHIDO, T. K., HUMISTO, A.; JOKELA, J.; LIU, L.; WAHLSTEN, M.; TAMRAKAR, A.; FEWER, D. P.; PERMI, P.; ANDREOTE, A. P. D.; FIORE, M. F.; SIVONEN, K. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. *Marine Drugs* v. 13, p. 2124-2140. 2015.

VESTOLA, J.; SHISHIDO, T.K.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; AITIO, O.; PERMI, P.; WAHLSTEN, M.; WANG, H.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 111, p. 1909-1917. 2014.