

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA DOS SANTOS ELIAS

**AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS LACASE E PROTEASE NA
BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA**

CURITIBA

2023

ANDRESSA DOS SANTOS ELIAS

**AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS LACASE E PROTEASE NA
BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA**

Evaluation of laccase and protease enzymes in microcystin biodegradation

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2023



Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, **desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.**

[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba



ANDRESSA DOS SANTOS ELIAS

AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS LACASE E PROTEASE NA BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA.

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 04 de Julho de 2022

Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Marlene Soares, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Thomaz Aurelio Pagioro, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 07/07/2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por completamente tudo e ter conseguido chegar até aqui.

Aos meus pais e minhas irmãs pelas palavras, auxílio e distrações sempre que necessário.

Aos meus tios que foram totais receptivos e que me acolheram em sua casa do início ao final da conclusão do mestrado, não tenho palavras para agradecer toda as vezes que chegava tarde e tinha uma refeição pronta e um quarto ao meu dispor.

À Prof^a. Dra. Giselle Maria Maciel por toda sua orientação, atenção e amizade em toda a construção dessa pesquisa. Todo o conhecimento passado e o estímulo foram essenciais.

Ao Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro pela parceria na construção dessa pesquisa com o fornecimento de material, conhecimento e pelas dúvidas respondidas.

Aos meus amigos que sempre reservaram um tempo para conversar sobre “como anda a pesquisa” e pelos inúmeros momentos que me auxiliaram e tiraram minhas dúvidas, especialmente a minha amiga Paloma pelas idas a praia e longas caminhadas rindo e acompanhando meu desespero.

Aos colegas de mestrado e laboratório que me auxiliaram nas dúvidas e na prática.

Ao LAMEAA - Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais da UTFPR pela parceria, disponibilidade e atenção sempre demonstrada pelas técnicas, meu muito obrigada.

Ao PPGCTA pelo ensino de qualidade passado na formação de futuros mestres.

Uma boa mestra espiritual é capaz de esperar que os alunos amadureçam. Ela não sente necessidade de aumentar nem de provar a própria iluminação. Não impõe seus ensinamentos nem de que os alunos sigam somente ela. Deixa que eles sejam quem são para poderem crescer sozinhos.

- Haemin Sunim

RESUMO

ELIAS, Andressa dos Santos. **Avaliação das enzimas lacase e protease na biodegradação de microcistina**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

As cianobactérias são microrganismos capazes de liberar toxinas com diferentes graus de toxicidade (cianotoxinas) quando enfrentam situações de estresse abiótico. As microcistinas são cianotoxinas reconhecidamente produzidas por cianobactérias e podem ser encontradas em diferentes ambientes aquáticos, incluindo reservatórios de abastecimento público. A presença de microcistinas em reservatórios causa grande preocupação uma vez que as microcistinas são prejudiciais à saúde humana, tanto pela ingestão como por contato direto. No processo de tratamento de água, as microcistinas podem ser removidas tanto pelo uso de carvão ativado quanto por outros métodos como o POA (Processo Oxidativo Avançado). No entanto, ambos os métodos podem gerar resíduos adicionais, como carvão adsorvido de toxinas ou subprodutos do processo de degradação por POA. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a aplicação de lacase e protease como métodos enzimáticos para biodegradação de microcistina. As enzimas utilizadas foram obtidas a partir do cultivo de três espécies fúngicas: *Trametes villosa* para a enzima lacase e *Aspergillus brasiliensis* e *Trichoderma* sp. para a enzima protease. Como controle positivo foram utilizadas a enzima lacase comercial de *Aspergillus* sp e protease comercial Tripsina. As amostras de microcistinas foram obtidas pelo cultivo laboratorial de *Microcystis aeruginosa*, as quais foram submetidas ao ensaio enzimático de biodegradação e posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Avaliou-se também o efeito das enzimas no crescimento de *Microcystis aeruginosa*. A produção máxima de lacase bruta em cultivo semi-sólido com *T. villosa* foi de 3.929 U/L. Com relação à produção de proteases, observou-se uma atividade máxima de 53 U/mL em cultivo com *Aspergillus brasiliensis* e de 214 U/mL com *Trichoderma* sp. Os resultados de biodegradação demonstraram remoção máxima de 98,61% da concentração inicial de microcistina com a aplicação de lacase de *T. villosa* e 99,63% com protease comercial, em condições de agitação a 120 rpm e 37 °C por 2 h 30 min. Houve inibição do crescimento de *M. aeruginosa* com o uso do extrato bruto contendo a enzima lacase de *T. villosa* ao final de 15 dias de incubação em bancada na temperatura de 21 °C e 25 °C. Os resultados demonstram-se promissores quanto a utilização de enzimas fúngicas na biodegradação de microcistina e inibição do crescimento de cianobactérias, o qual proporciona base para estudos e aplicações futuras.

PALAVRAS CHAVE: Cianobactérias. Cianotoxinas. Enzimas fúngicas.

ABSTRACT

ELIAS, Andressa dos Santos. **Evaluation of laccase and protease enzymes in microcystin biodegradation**. Dissertation presented to the Graduate Program in Environmental Science and Technology – Academic Department of Chemistry and Biology, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

Cyanobacteria are microorganisms capable of releasing toxins with different degrees of toxicity (cyanotoxins) when facing situations of abiotic stress. Microcystins are cyanotoxins known to be produced by cyanobacteria and can be found in different aquatic environments, including public supply reservoirs. The presence of microcystins in reservoirs causes great concern since microcystins are harmful to human health, both by ingestion and by direct contact. In the water treatment process, microcystins can be removed either by the use of activated carbon or by other methods such as AOP (Advanced Oxidative Process). However, both methods can generate additional residues, such as carbon adsorbed from toxins or by-products of the AOP degradation process. In this context, the objective of the present work was to evaluate the application of laccase and protease as enzymatic methods for microcystin biodegradation. The enzymes used were obtained from the cultivation of three fungal species: *Trametes villosa* for the laccase enzyme and *Aspergillus brasiliensis* and *Trichoderma* sp. for the protease enzyme. As a positive control, commercial *Aspergillus* sp laccase enzyme and commercial Trypsin protease were used. The microcystin samples were obtained by laboratory cultivation of *Microcystis aeruginosa*, which were submitted to the enzymatic biodegradation assay and subsequent quantification by high performance liquid chromatography (HPLC). The effect of enzymes on the growth of *Microcystis aeruginosa* was also evaluated. The maximum production of crude laccase in semi-solid culture with *T. villosa* was 3,929 U/L. Regarding the production of proteases, a maximum activity of 53 U/mL was observed in culture with *Aspergillus brasiliensis* and of 214 U/mL with *Trichoderma* sp. The biodegradation results showed maximum removal of 98.61% of the initial concentration of microcystin with the application of *T. villosa* laccase and 99.63% with commercial protease, under agitation conditions at 120 rpm and 37°C for 2 h 30 min. There was inhibition of the growth of *M. aeruginosa* with the use of the crude extract containing the enzyme *T. villosa* laccase at the end of 15 days of incubation on a bench at 21 °C and 25 °C. The results are promising regarding the use of fungal enzymes in the biodegradation of microcystin and inhibition of cyanobacterial growth, which provides a basis for studies and future applications.

KEYWORDS: Cyanobacteria. Cyanotoxins. Fungal enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das principais cianotoxinas	16
Figura 2. Estrutura geral de microcistina	17
Figura 3. Estrutura de Microcistina-LR	18
Figura 4. Ciclo catalítico da enzima lacase	24
Figura 5. Estrutura tridimensional da enzima lacase de <i>Trametes versicolor</i>	25
Figura 6. Fluxograma da metodologia aplicada	28
Figura 7. Representação da câmara de Neubauer utilizada para contagem celular	32
Figura 8. Cultivo do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	40
Figura 9. Cultivo de <i>M. aeruginosa</i> sem adição de enzima; cultivada no período de 15 dias entre 21 °C a 25 °C; contagem de células 10^6 cel mL ⁻¹ (Fracos controle)	44
Figura 10. Cultivo de <i>M. aeruginosa</i> com adição de enzima lacase de <i>T. villosa</i> na concentração de 100 U/L; cultivada no período de 15 dias entre 21 °C a 25 °C; contagem de células 10^6 cel mL ⁻¹	45
Figura 11. Cultivo de <i>M. aeruginosa</i> com adição de enzima protease comercial Tripsina na concentração de 100 U/L; cultivada no período de 15 dias entre 21°C a 25 °C; contagem de células 10^6 cel mL ⁻¹	46
Figura 12. Avaliação do crescimento de <i>M. aeruginosa</i> com adição das enzimas lacase de <i>T. villosa</i> e protease comercial Tripsina, durante o tempo de cultivo de 1 a 15 dias de incubação	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaio 1: Avaliação de biodegradação de microcistina-LR por cromatografia líquida	42
Tabela 2. Ensaio 2: Avaliação da biodegradação de microcistina-LR por cromatografia líquida	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivo específico	14
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
3.1 Cianobactérias	15
3.1.1 Microcistina	16
<u>3.1.1.1 Biodegradação de microcistina</u>	<u>20</u>
3.2 Fungos	22
3.2.1 Enzima Lacase	22
3.2.2 Enzima Protease	26
4. METODOLOGIA	28
4.1 Seleção e cultivo fúngico	29
4.2 Produção, extração e determinação de atividade enzimática	29
4.2.1 Enzima lacase	30
4.2.2 Enzima protease	30
<u>4.2.2.1 Fermentação estado sólido x Fermentação submersa</u>	<u>31</u>
<u>4.2.2.2 Determinação da atividade de protease universal</u>	<u>31</u>
4.3 Obtenção microcistina	32
4.4 Avaliação de biodegradação de microcistina por atividade enzimática	33
4.4.1 Preparo amostral para avaliação – Kit ADDA Elisa 96 poços	34
4.4.1.1 Determinação de concentração de microcistina	35
4.4.2 Preparo amostral para avaliação – HPLC	35
<u>4.4.2.1 Extração em fase sólida de microcistina – LR (MC-LR)</u>	<u>37</u>
<u>4.4.2.2 Avaliação de microcistina – LR e validação do método cromatográfico</u>	<u>37</u>
4.4.3 Preparo do inóculo enzimático no cultivo de <i>M. aeruginosa</i>	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1 Produção enzimática de lacase	39

5.2 Produção enzimática de protease	39
5.3 Avaliação de biodegradação pelo método Kit Elisa 96 poços	41
5.4 Avaliação de biodegradação por HPLC	42
5.5 Avaliação de inibição de crescimento de <i>M. aeruginosa</i>	44
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A	59
APÊNDICE A	61
APÊNDICE B	62
APÊNDICE C	63
APÊNDICE D	64

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias compreendem um grande grupo heterogêneo de bactérias fototróficas oxigênicas, podendo ser encontradas em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce (MADIGAN *et al.*, 2016). Entre seus grupos são encontrados alguns gêneros que se caracterizam pela capacidade de formar florações, os quais incluem *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (DAI *et al.*, 2008, METCALF *et al.*, 2002), possuem a capacidade de ser extremamente tóxica e prejudiciais ao ser humano, quando ocorre a liberação de toxinas, incluindo algumas neurotoxinas e hepatotoxinas.

As hepatotoxinas são as mais conhecidas, que já foram identificadas tanto no ambiente natural, quanto em reservatórios de água potável (KIST *et al.*, 2012). Dentre as hepatotoxinas, as microcistinas apresentam estruturas químicas com diferentes níveis de toxicidade e que, possuem elevada persistência na água, se adaptam em diferentes temperaturas, além de resistir ao processo de oxidação, o qual gera dificuldade na sua remoção em tratamento convencional de água para consumo (MINILLO *et al.*, 2013).

Atualmente em tratamento de água para abastecimento público utiliza-se o carvão ativado para remoção de microcistina e na literatura são encontradas técnicas para avaliação e degradação de microcistinas em ambientes de floração de cianobactérias (ALBUQUERQUE, 2020; ARAGÃO, 2014; FREITAS, 2008; MINILLO *et al.*, 2013; NEWCOMBE & NICHOLSON, 2004).

Dentre os métodos biológicos para tratamento de microcistinas, podem ser encontrados na literatura científica processos enzimáticos e não enzimáticos. Kuriama *et al.*, (2012) avaliaram o potencial de degradação de MC pela bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* B9, proveniente de diferentes cepas de leveduras e bactérias probióticas, obtendo uma degradação de 98% de microcistina no período de 96 horas, considerando a eficiência da aplicação de microrganismo. Recentemente, Liu *et al.* (2020) aplicaram com sucesso a enzima microcistinase A na degradação de microcistina e inibição simultânea de *Microcystis aeruginosa*. Nos estudos realizados por Takenaka e Watanabe (1997) e Du *et al.* (2015) enzimas como a protease alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* e enzimas como a lacase e a protease de *Trametes versicolor* foram eficazes na degradação de microcistina LR e *Microcystis* spp., respectivamente. Considerando que ainda são poucos os estudos

disponíveis na literatura científica que descrevam a aplicação direta de enzimas na biodegradação de cianotoxinas, pretende-se avaliar neste trabalho o efeito de protease e lacase fúngicas junto a toxina.

O método a ser desenvolvido primeiramente em bancada visa contribuir futuramente no tratamento de água nas empresas de abastecimento público, considerando a Portaria nº1.469 e a Portaria nº 2.914, que dispõem sobre as cianotoxinas e os efeitos adversos à saúde humana e do meio ambiente, juntamente com a portaria nº 2.014 de 12 de dezembro de 2011, seção V. capítulo V. Art. 37, parágrafo §2º a §4. que estabelece o valor máximo aceitável de 1,0 µg/L da presença de microcistinas totais na água potável.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência das enzimas lacase e protease fúngicas na biodegradação de microcistinas.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar fungos produtores das enzimas lacase e protease;
- Produzir as enzimas lacase e protease fúngicas por cultivo em escala laboratorial;
- Produzir microcistina pelo cultivo de *Microcystis aeruginosa*, em parceria com o Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLiEC) UTFPR;
- Investigar a eficácia da aplicação das enzimas lacase e protease para a biodegradação de microcistinas em solução aquosa;
- Avaliar o efeito enzimático no crescimento de *Microcystis aeruginosa*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cianobactérias

As cianobactérias são seres unicelulares e filamentosas que compreendem um grupo heterogêneo de bactérias fototróficas oxigênicas, que possuem a capacidade de fixar CO₂ e N₂, e assimila componentes orgânicos simples como glicose e o acetato (MADIGAN *et al.*, 2016, CHUNLEUCHANON *et al.*, 2003).

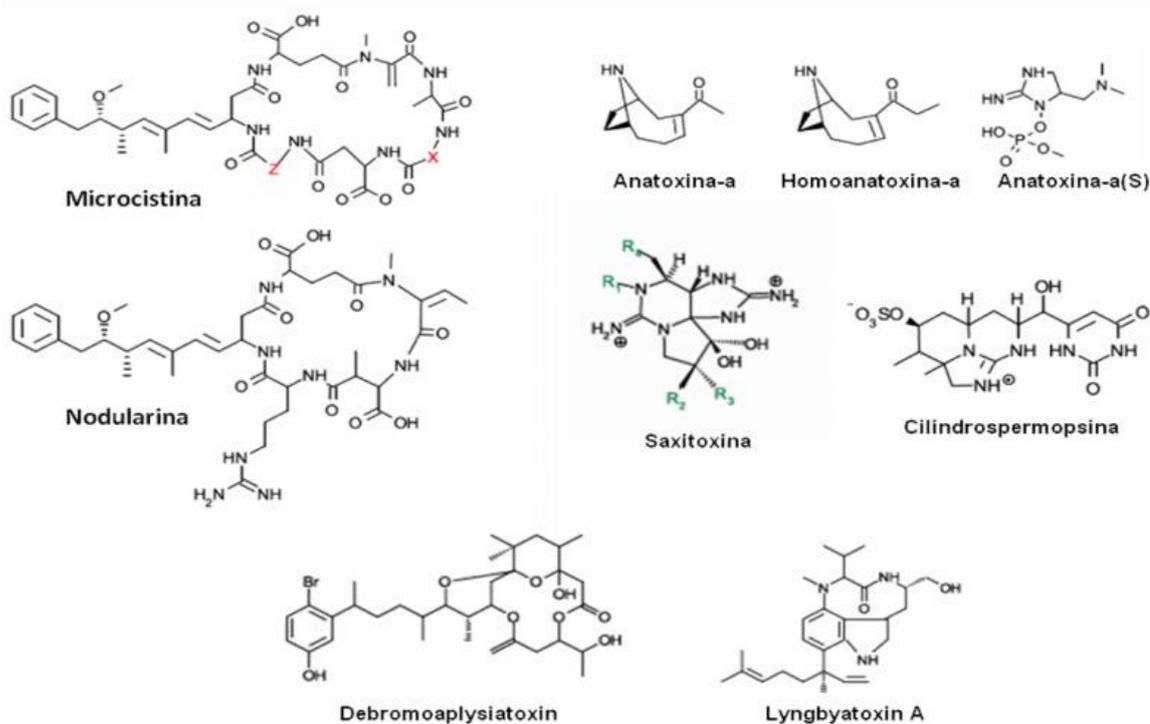
Em Madigan *et al.*, (2016, p. 440) as cianobactérias são mencionadas como sendo “fundamentais para a produtividade dos oceanos (...) correspondendo a 80% da fotossíntese marinha e 35% de toda a atividade fotossintetizante na terra”. Em estudos, a utilidade das cianobactérias é destacada na produção de alimentos (SANCHEZ *et al.*, 2019), em processos biotecnológicos (FERRARI *et al.*, 2013) e na fixação biológica de nitrogênio (CHUNLEUCHANON *et al.*, 2002).

No entanto, além das funções naturais que desempenham junto ao ecossistema e na indústria, um ponto negativo são que alguns grupos de cianobactérias produzem uma diversidade de metabólitos que geram ações tóxicas em seres humanos e animais (OLIVEIRA, 2003). São endotoxinas liberadas na água, em quantidade elevadas quando ocorre a morte e senescência das cianobactérias, produzidas por diversos gêneros, como *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia* e *Phormidium*, e possuem por principais estruturas químicas cianotoxinas como Microcistina, Nodularina, Debromoaplysiatoxin, Anatoxina-a, Homoanotoxina-a, Anatoxina-a (S), Saxitoxina, Cilindrospermopsina e Lyngbyatoxin A, representado na Figura 1 (CARVALHO *et al.*, 2013; POMPÊO *et al.*, 2015).

Mas uma vez que haja a liberação de endotoxinas, vale ressaltar que nem todas as espécies dos gêneros de cianobactérias produzem toxinas e, uma espécie não produtora pode passar a produzir em contato com as que produzem (CARVALHO *et al.*, 2013; POMPÊO *et al.*, 2015). Amorim *et al.*, (2017) avaliaram o cultivo de *Microcystis* spp., com cepas tóxicas (*M. aeruginosa*) e não tóxicas (*M. panniformis*) de espécies diferentes, no crescimento de macrófita aquática *E. densa*. Notou-se o contato com cepa toxina afetaram significativamente na redução da biomassa e consequentemente no crescimento, além de causar estresse oxidativo nas plantas devido à quantidade de malonaldeído (MDA) nos tecidos vegetais. O trabalho

demonstrou os efeitos da exposição de plantas aquáticas a cepas de cianobactérias em ecossistemas naturais.

Figura 1 – Estruturas químicas das principais cianotoxinas



Fonte: BORTOLI & PINTO, 2015

A *Microcystis* se destaca com maior número de espécies capazes de produzir microcistina (MC) a qual apresenta mais de 50 variantes, como MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA (DAI *et al.*, 2008; ROSET *et al.*, 2001; POMPÊO *et al.*, 2015).

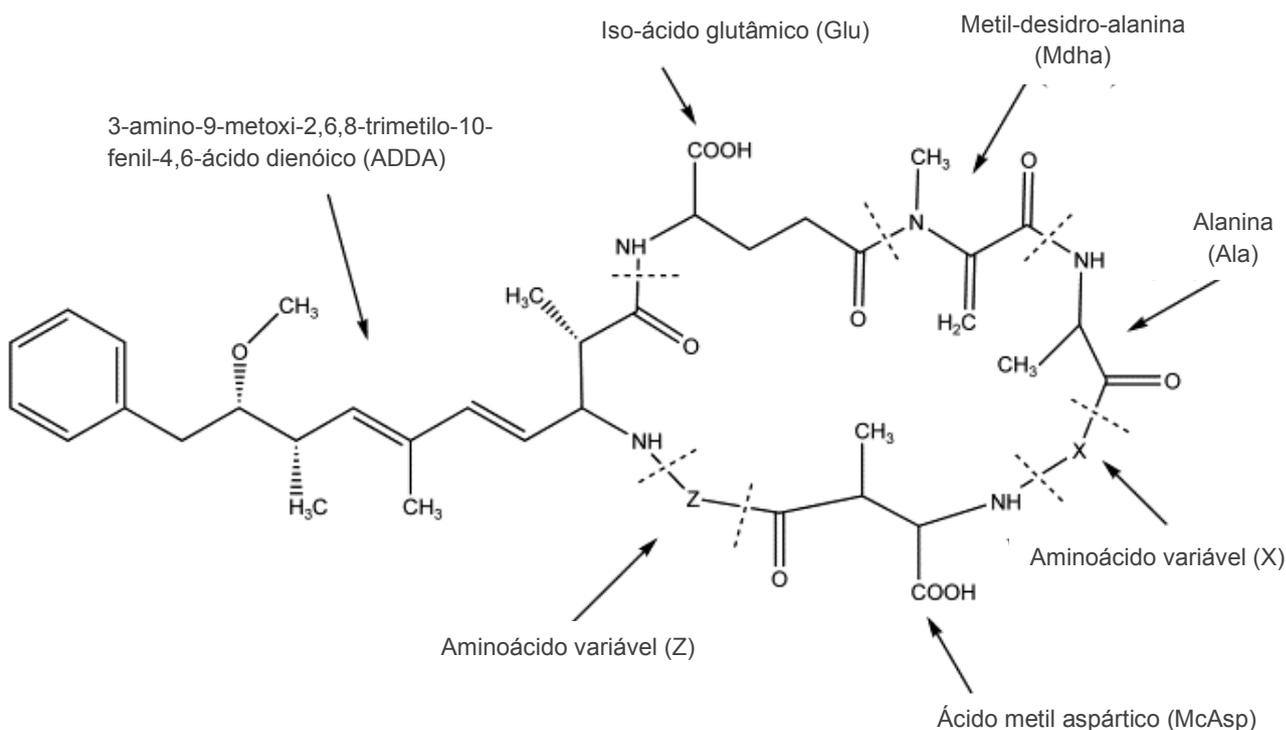
3.1.1 Microcistina

As microcistinas (MCs) formam uma família de cianotoxinas que induzem hepatotoxicidade em vários organismos (KIST *et al.*, 2012); além de serem peptídicas cíclicas, as quais compõe juntamente com as toxinas nodularinas, um grupo frequentemente encontrado em florescimento (SIVONEN & JONES, 1999).

São heptapeptídeos monocíclicos, sendo identificados em sua estrutura química três D-aminoácidos (alanina [Ala], glutâmico [Glu] e metilaspártico [MeAsp]),

dois aminoácidos incomuns (N-metildehidroalanina [Mdha] e 3-amino-9-metoxi-2,6, ácido8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico [ADDA]), e dois L-aminoácidos variáveis de molécula para molécula (X e Z) (Figura 2) (CHEN *et al.*, 2006; McELHINEY *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2012). A cadeia lateral ADDA de MCs é responsável pela toxicidade, e ao rompimento da estrutura ocorre a liberação da toxina associada (ANDERSEN *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2012).

Figura 2. Estrutura geral de microcistina

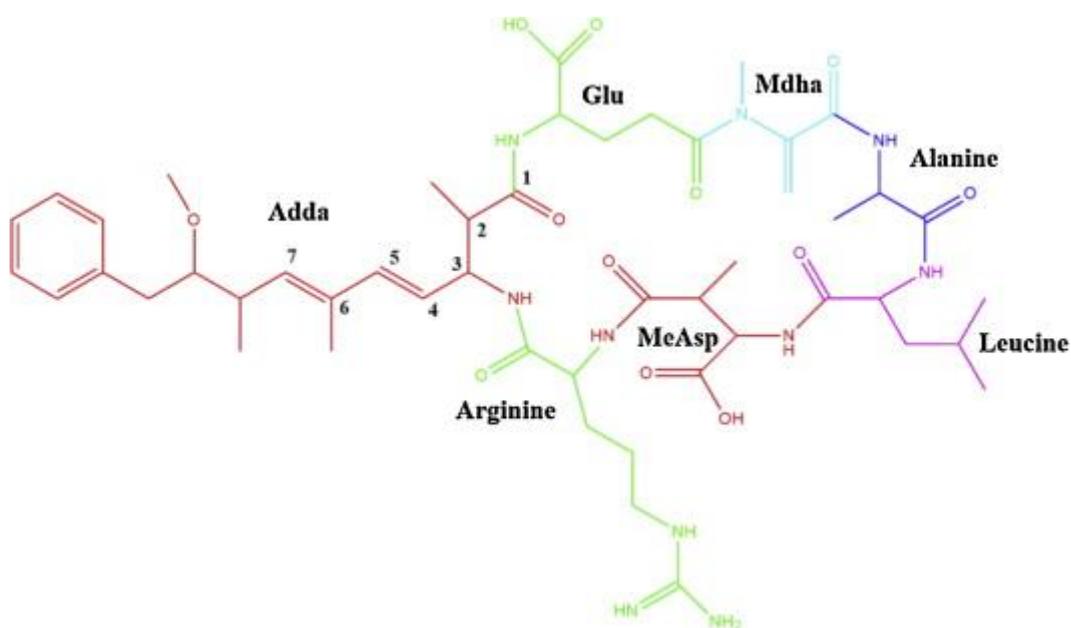


Fonte: SHARMA *et al.*, 2012

A variação dos dois aminoácidos pode ser observado no final da nomenclatura de cada microcistina, como na estrutura da microcistina-LR (Figura 3), o qual os aminoácidos X e Z em sua estrutura geral são modificados. O aminoácido L corresponde a Leucina e R a Arginina. (ANDERSEN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2006; McELHINEY *et al.*, 2005). Outros aminoácidos também podem ser encontrados na estrutura das MCs, como X podendo ser tirosina (Y), e o Z podendo ser alanina (A) ou metionina (M) (SHARMA *et al.*, 2012).

Das mais variantes MCs que se tenha registro, a MC-LR (Figura 3) é considerada a mais abundante, atingindo de 46,0% a 99,8% da concentração total de MCs em florações naturais (VASCONCELLOS *et al.*, 1996).

Figura 3. Estrutura da microcistina -LR



Fonte: ANDERSEN *et al.*, 2014

A toxina microcistina bloqueia a síntese de proteína e são responsáveis por danos citogenéticos por meio de quebra de fitas de DNA e perda de cromossomos, as quais ocasionam problemas tanto em pessoas como animais (ZACCARONI & SCARAVELLI, 2008). Sua ação tóxica pode agir lentamente ou rapidamente, como em contato com os órgãos (afetando principalmente o fígado), causando a morte em poucas horas e/ou poucos dias, em decorrência de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. A toxicidade pode gerar sintomas como náuseas, vômito, cansaço, fadiga, dor de cabeça constante e desmaio (KIST *et al.*, 2012).

O contato com MCs pelas pessoas podem coincidir com atividades recreativas em lugares próximos à água contaminada, assim como, a intoxicação pode ocorrer com o consumo de mariscos presentes no meio aquático e produtos vegetais regados com água contaminada (CAMPOS; VASCONCELOS, 2010), entretanto Carvalho *et al.*, (2013), ressaltam que, nem todas as espécies que produzem a toxina alteram o

meio aquático, pela alteração da coloração ou formação de espumas, levando a população a estar exposta ao risco sem o conhecimento.

No Brasil, o primeiro caso de mortes humana causado por cianotoxina foi registrado em 1996, com o envenenamento de pacientes que realizavam hemodiálise em uma clínica médica na cidade de Caruaru – PE, ocasionando doença hepática severa após o procedimento, o que resultou na morte de cerca de 70 pessoas. Investigações sobre o que ocasionou a morte, revelaram que, houve problemas no tratamento da água e que a mesma estaria imprópria para utilização, resultando na contaminação dos filtros da clínica com dois tipos de cianotoxinas: microcistina e cilindrospermopsina (CARVALHO *et al.*, 2013; ROSET *et al.*, 2001).

Atrelado aos problemas ocasionados à saúde, diferentes trabalhos manifestam interesse quanto ao estudo de MCs e suas habitações em meio ao ambiente, como o estudo da MCs utilizando espécies do meio aquático e terrestre para avaliação do contato direto e/ou a presença de microcistina em seus organismos, avaliando o cérebro de peixes (KIST *et al.*, 2012; DAI *et al.*, 2008; VASCONCELLOS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018), os efeitos diferenciais da microcistina em camundongos (GUPTA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2018), e efeitos adversos em seres humanos (AZEVEDO *et al.*, 2002).

O próprio Ministério da Saúde dispõe da portaria nº 2.014 de 12 de dezembro de 2011, seção V. capítulo V. Art. 37, parágrafo §2º a §4. a qual estabelece o valor máximo aceitável de 1,0 µg/L, da presença de microcistinas totais na água potável.

Art. 37. A água potável deve estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas que representam risco à saúde e cianotoxinas, expressos nos Anexos VII e VIII e demais disposições desta Portaria.

(...)

§ 2º As concentrações de cianotoxinas referidas no Anexo VIII desta Portaria devem representar as contribuições da fração intracelular e da fração extracelular na amostra analisada.

§ 3º Em complementação ao previsto no Anexo VIII desta Portaria, quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores de cilindrospermopsinas no monitoramento de cianobactérias previsto no § 1º do art. 40 desta Portaria, recomenda-se a análise dessas cianotoxinas, observando o valor máximo aceitável de 1,0 µg/L.

§ 4º Em complementação ao previsto no Anexo VIII desta Portaria, quando for detectada a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente produtores de anatoxina-a (s) no monitoramento de cianobactérias previsto no § 1º do art. 40 desta Portaria, recomenda-se a análise da presença desta cianotoxina (Portaria nº 2.914 de dezembro de 2011).

3.1.1.1 Biodegradação de microcistina

Correlacionado à degradação de microcistina, Albuquerque *et al.*, (2020) descreveram os processos oxidativos avançados (POAs), sendo homogêneos e heterogêneos aplicados em sua maioria em escalas de laboratório, mas que apresentam resultados positivos quanto à degradação de toxinas.

Muller (2017) avaliou a toxicidade e a degradação de microcistina-LR por meio de Processos Avançados de Oxidação (AOPs) e nanopartículas de prata, mostrando a eficiência de ambos os métodos, tendo de 85,4% a 92,4% de degradação em 30 min de reação. Já com o uso de material compósito magnético usando ácido e Fe_3O_4 , Chen *et al.*, (2021) avaliaram que, em condições de pH 6, a taxa de remoção *M. aeruginosa* pode atingir mais de 90% em 5 min, estimando uma nova abordagem para o tratamento de efluentes.

No entanto, autores como Muller (2017) e Albuquerque *et al.*, (2020) ressaltam que em alguns casos além de ocorrer a degradação dessas toxinas, podem ser produzidas moléculas/subprodutos da degradação dos mesmos, ainda mais tóxicas que o original.

No tratamento de água para abastecimento público pode ser realizada a aplicação de Carvão Ativado em pó (CAP) ou Carvão Ativado Granular (CAG) para a remoção de microcistina e dos efeitos que causam na água, como odor e alteração no gosto (MULLER *et al.*, 2008). A utilização do CAP é considerada uma alternativa mais barata, podendo ser aplicado na água, sem a necessidade da criação de instalações novas (MULLER *et al.*, 2008; BRASIL, 2004). Sua matéria prima pode ser produzida a partir de materiais carbonáceos de origem vegetal (como madeira, casca de coco), animal (como ossos de animais) ou mineral (como material betuminoso) (BRASIL, 2004).

O tratamento por CAP dentro de uma estação de tratamento de água (ETA), pode ser aplicado na entrada, em um tanque de contato precedendo a mistura rápida, na própria unidade de mistura rápida ou na entrada do filtro; entretanto, em sua aplicação deve-se considerar a influência da configuração de sua estrutura porosa à definição de parâmetros como dosagens e tempos de contatos suficientes para garantir adequada remoção de microcistina (BRASIL, 2004).

Ainda sobre os métodos de degradação de microcistina, a biodegradação é um dos processos mais estudados, considerado um dos métodos mais aceitos e ecologicamente corretos no mundo (SANGALE *et al.*, 2019); e que abrange uma diversidade de espécies de fungos e bactérias. A biodegradação consiste na degradação de materiais poliméricos através da ação de organismos vivos, e que resulta na formação de CO₂, CH₄, componentes celulares microbianas e outros produtos (ROSA *et al.*, 2012).

Feng *et al.*, (2022) analisaram um novo sistema de remoção de cianobactéria através do sistema ultrassônica omnidirecional para *Microcystis aeruginosa* com o objetivo de reduzir o consumo de energia e maior proteção ambiental. As taxas de remoção de algas atingiram 55,41% e 72,97% após 30 min de tratamento ultrassônico, e os resultados experimentais mostram que as células danificadas não têm a capacidade de autorreparação.

Minillo *et al.*; (2013) avaliaram a biodegradação de MCs por microrganismos presentes em filtros de carvão com atividade biológica (CAB), o qual foi possível detectar no 84º dia de experimento, que os níveis de microcistinas apresentaram concentrações de <0,07 µg.L⁻¹ abaixo do limite de detecção aceitável na legislação de 1,0 µg/L, comprovando o potencial de metabolização da cianotoxina por componentes microbianos presentes nos biofiltros.

Wang *et al.*, (2022) utilizaram extrato de celulase ultrassônica de *Vallisneria* como sendo inibitório alelopático sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa*. Foi possível analisar que a enzima induziu o estresse oxidativo da espécie estudada e suprimiu significativamente 5 g/L o crescimento de células de algas.

Du *et al.*, (2015) avaliaram o potencial de enzimas extracelulares de *Trametes versicolor* F21a na degradação de *Microcystis* spp, alcançando a degradação cumulativa de 93,38% e 98,67%, identificando diminuição na densidade de células de cianobactérias. Entre as enzimas extracelulares detectadas, cita-se C (celulose e β-glicosidase), N (protease) e P (fosfatase alcalina, ALP), lacase e manganês peroxidase (MnP). No estudo, os autores observaram o percentual de degradação a partir de 12 horas de teste, seguido pelo aumento da decomposição da toxina durante 36 horas e depois uma diminuição ligeiramente, considerando o crescimento da *Microcystis* spp., a partir desse período. Sendo assim, é necessário que haja a avaliação antes, durante e após o tratamento para eficiência plena de degradação.

3.2 Fungos

Os fungos são organismos eucariontes presentes em uma ampla diversidade de habitats, incluindo o solo, plantas, animais e também nos seres humanos. São conhecidos por apresentarem uma organização celular mais complexa do que outros organismos, além do núcleo, a parede celular e a membrana plasmática (VERMELHO *et al.*, 2019).

Podem ser divididos em dois principais grupos: o primeiro grupo compõe os fungos filamentosos, considerados multicelulares que abrigam a maioria dos fungos (VERMELHO *et al.*, 2019); e o segundo grupo pertence aos fungos unicelulares, as leveduras, organismos anaeróbios facultativos capazes de crescer na presença de oxigênio (aeróbica) e na sua ausência de oxigênio (anaeróbica) podendo sobreviver em diferentes ambientes (TORTORA *et al.*, 2017).

Os fungos são utilizados frequentemente na área alimentícia como na fabricação de cerveja, vinho, pão e queijo, mas também se destacam na área farmacêutica na produção de vitaminas e antibióticos. Na literatura são encontrados diversos trabalhos que avaliam os fungos na produção de ácidos orgânicos (RAMOS, 2016); degradação de polietileno (SANGALE *et al.*, 2019; VIVI, 2011); melhoramento no crescimento de plantas (RODRIGUES *et al.*, 2018); degradação de xenobióticos (SILVA, 2000); processos de biorremediação (COLLA *et al.*, 2008) e processos de biodegradação (SILVA, 2018).

Os mesmos também recebem destaque na produção enzimática, sendo diferentes espécies de fungos filamentosos utilizados para a produção de proteases, como *Aspergillus brasiliensis* (CHIMBEKUJWO *et al.*, 2020) *Aspergillus niger* (YIN *et al.*, 2013) e *Trichoderma harzianum* (MARCO e FELIX, 2002), e lacases, como *Trametes versicolor* (PINHEIRO *et al.*, 2020) e *Trametes villosa* (FUKUTA *et al.*, 2001).

3.2.1 Enzima lacase

Com o passar dos anos é crescente o interesse na utilização de enzimas para remoção de compostos nocivos ao meio ambiente, pois oferecem vantagens em comparação aos tratamentos convencionais, como a baixa necessidade de energia e

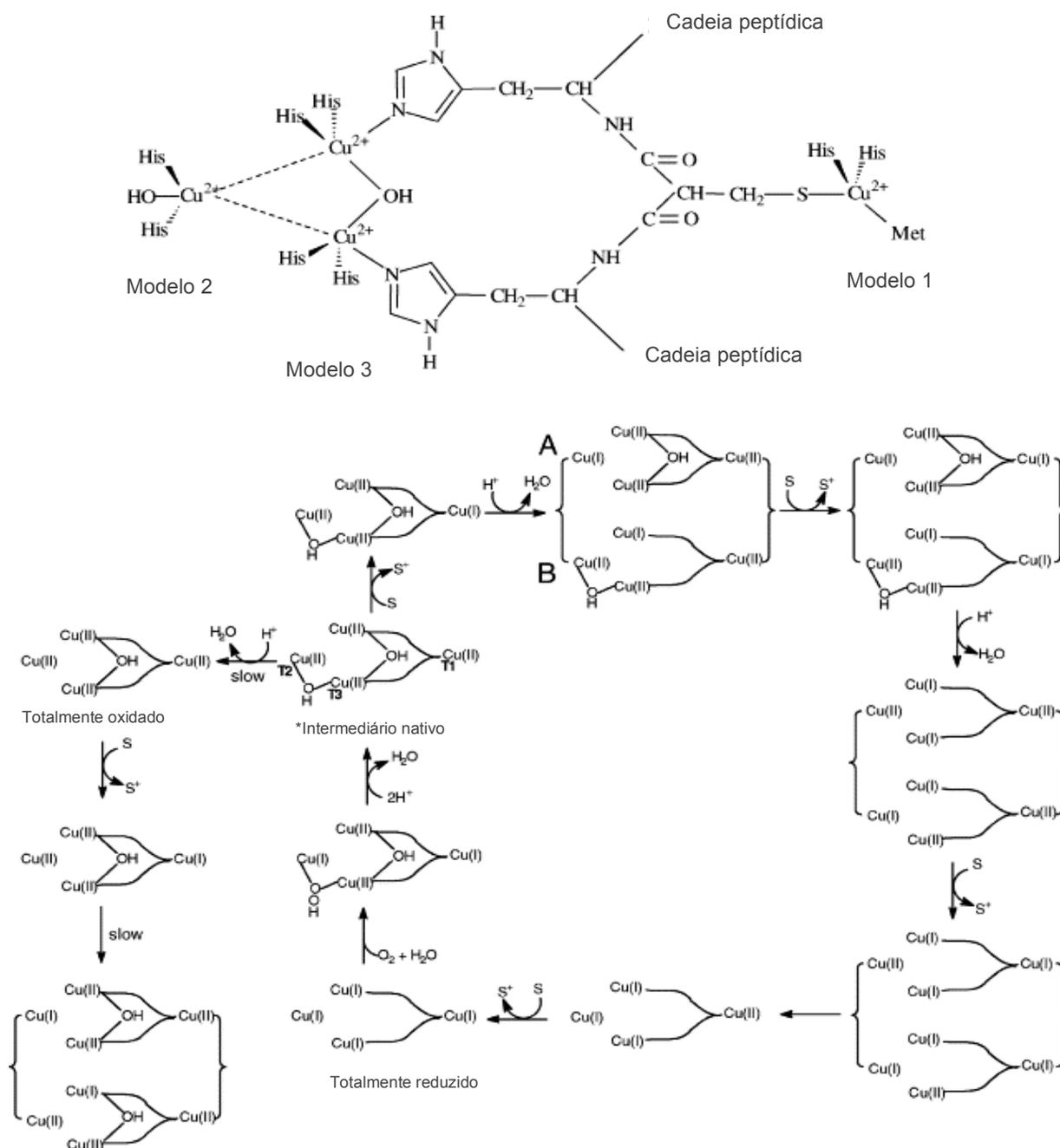
a capacidade de aplicação em uma quantidade maior de efluentes (LASSOUANE *et al.*, 2022).

Em particular, a enzima lacase possui aplicações diversas na área de biotecnologia ambiental, como na biodegradação de corantes sintéticos e micropoluentes, síntese verde de compostos orgânicos (BRUGNARI *et al.* 2021); biotransformação (VILLELA, 2006) e na oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos, incluindo mono, di, polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis, bem como complexos metálicos (BILAL, 2019; UPADHYAY *et al.*, 2016.).

A primeira descrição da enzima lacase ocorreu em 1883 após isolamento da enzima a partir de uma planta (MAYER *et al.*, 2002). No entanto, além de sua presença em plantas, as lacases podem ser encontradas em bactérias, fungos e insetos, sendo produzidas industrialmente pelo cultivo de fungos (BRUGNARI *et al.* 2021). A lacase pertence a um grupo de enzimas oxidases multicobre, que só necessitam de oxigênio molecular (encontrado no ambiente) como aceptor de elétrons para realizar seu processo catalítico produzindo água como subproduto da reação (UPADHYAY *et al.*, 2016; LASSOUANE *et al.*, 2022).

Em sua estrutura, as lacases exibem quatro átomos de cobre que são distribuídos em diferentes locais de ligação, e são classificados em três tipos: Cobre tipo 1, 2 e 3. Esses por sua vez desempenham o mecanismo catalítico (MAJEAU *et al.*, 2010) (o ciclo catalítico é representado na Figura 4). Cada um dos três tipos desempenham uma determinada função no processo enzimático. O cobre do tipo 1 (T1) é responsável pela oxidação do substrato e transmite a cor azul à enzima (MAJEAU *et al.*, 2010), após ocorre a transferência de elétrons do cobre tipo 1 para os demais cobres tipo 2 e 3 (T2 e T3), e na terceira fase ocorre a redução de oxigênio molecular (DURÁN *et al.*, 2000; DURÁN *et al.*, 2002).

Figura 4. Ciclo catalítico da lacase

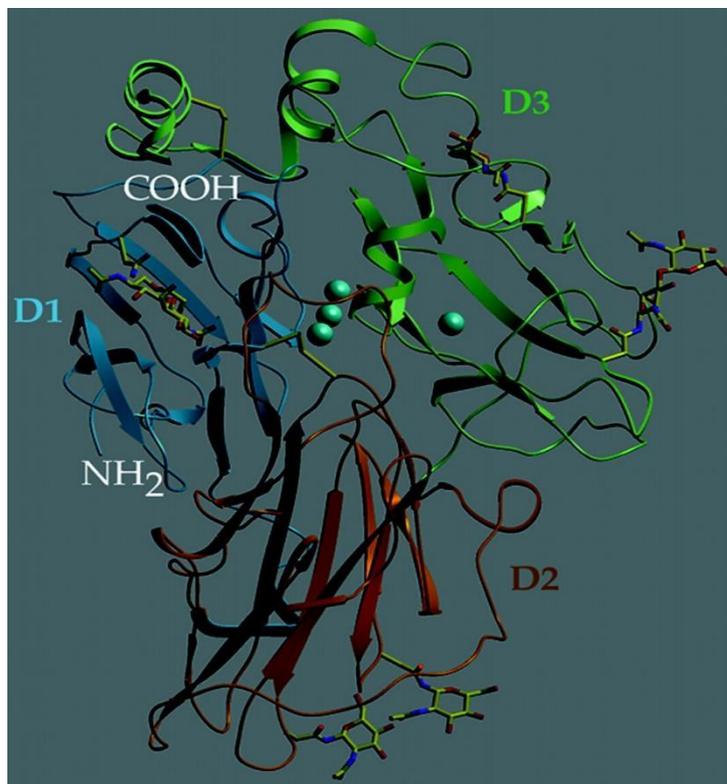


Fonte: DURÁN *et al.*, 2002, SOLOMOM *et al.*, 1996.

A enzima lacase pode ser produzida por diversos fungos, entre eles os fungos da podridão branca como *Trametes versicolor*, *Trametes menziesii*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Polyporus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* (CLAUS, 2003; DAMASCENO, 2016; GARCIA, 2006; PACHECO *et al.*, 2014; SILVA

et al., 2012; VILLELA, 2006). Na Figura 5, pode-se observar a estrutura tridimensional da lacase do fungo *Trametes versicolor*.

Figura 5. Estrutura tridimensional da lacase do fungo *Trametes versicolor*.



*A disposição da estrutura do domínio é representada em diferentes códigos de cores (D1 a D3). Os íons de cobre são desenhados como esferas azuis. Os carboidratos e as ligações dissulfeto estão incluídos como modelos em bastão (PIONTEK, ANTORINI, CHOINOWSKI, 2002).

Entre suas funções, a mesma possui a ação direta na biodegradação de cianotoxinas e/ou na inibição do crescimento de cianobactérias, no entanto são limitados os estudos encontrados na literatura científica. Du et al. (2015) avaliaram o potencial de *T. versicolor* na eliminação de células de *Microcystis* spp. e relacionou o efeito inibidor à secreção de enzimas extracelulares como celulase, beta-glicosidase, protease, lacase e manganês peroxidase em diferentes estágios do crescimento da cianobactéria. Os resultados apontaram que os produtos produzidos por essa linhagem fúngica foram capazes no período de 60 h de incubação inibir 96% de *Microcystis* spp., alterar o crescimento no estágio inicial (0 h a 24 h) e na fase tardia (24 h a 60h), considerando o potencial uso no controle de cianobactérias em

ecossistemas naturais; contudo, deve-se avaliar os efeitos ecológicos da cepa fúngica antes da aplicação.

3.2.2 Enzima protease

As proteases estão ligadas junto ao mercado industrial de enzimas como sendo o grupo mais utilizado, como em detergentes (HADJ-AL *et al.*, 2007; RAMKUMAR *et al.*, 2018; YILDIRIM *et al.*, 2017), no processamento de alimentos (BOYCE *et al.*, 2012), em combater a doenças em animais (SOARES *et al.*, 2013), processos de degradação (GOMAA, 2013), no aprimoramento de couro e tecidos e como catalisadores em síntese orgânica e terapêuticos (OP, 2011; SHUKLA *et al.*, 2020).

De acordo com Op (2011, p.1), “As proteases representam um grande e diversificado grupo de enzimas hidrolíticas que são classificadas pelo seu sítio de ação, estrutura do sítio ativo da enzima e mecanismos específicos de reação”. São enzimas que se diversificam quanto à sua produção, podem ser proteases animais (insetos), vegetais (plantas) e microbianas (fungos e bactérias) (RAO *et al.*, 1998; OP, 2011).

Levando em consideração a produção de protease microbianas os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Bacillus*, possuem espécies utilizadas há muito tempo na fermentação de alimentos, como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *A. niger* e *A. oryzae*, como enzimas extracelulares no meio de cultura (OP, 2011).

Segundo Rao *et al.*, (1998), as proteases microbianas podem ser classificadas em três grupos, sendo protease ácida, alcalina e/ou neutra de acordo com as faixas de pH em que atuam, e como serina, aspártico, cisteína e metaloproteases, conforme o grupo funcional encontrado em sua área ativa. Assim há uma diversidade na produção realizada por cada microrganismo e que, nem toda protease produzida é eficaz para determinada aplicação (OP, 2011).

Abidi *et al.*, (2008) também mencionam que em processos experimentais, os respectivos fatores físicos: pH, temperatura, tempo de incubação, agitação e densidade do inóculo são condições de grande relevância para o desenvolvimento e obtenção da enzima protease. No entanto, quando produzida por fungos, a protease

pode ser ativa em uma ampla faixa de pH (pH 4 a 11) (RAO *et al.*, 1998), considerando essa uma vantagem na produção fúngica.

No estudo realizado por Op (2011), o autor avalia a produção de protease por bactérias e fungos, e sua utilização, o qual menciona espécies de bactérias (*Bacillus*) produtoras de proteases alcalinas e serina, entre pH 9 a 10 e 11 a 12, podendo ser comercializadas para uso em detergentes, já as espécies fúngicas (*Aspergillus*), podem ser aplicadas no processamento de cerveja e cereais, e outros alimentos.

Proteases fúngicas podem também além de contribuir na produção de alimentos, desempenhar papel de micoparasitismo em fungos fitopatogênicos, inibindo o crescimento desses fungos em plantas e animais, como é o caso da protease aspártica secretada pela espécie fúngica *Trichoderma harzianum*, o qual inibiu o desenvolvimento de mofo que levam ao apodrecimento de maçã, laranja e outros alimentos (DEN *et al.*, 2018).

As proteases fúngicas e bacterianas podem estar relacionadas a processos de inibição de cianobactérias e biodegradação de cianotoxinas, segundo alguns autores. Dai *et al.* (2018) relacionaram o efeito algicida de *Trametes versicolor* contra *M. aeruginosa* à produção de enzimas como celulase, beta-glucanase, e endopeptidases. Em outro experimento, os autores reportaram a inibição da cianobactéria pelo uso de proteases comerciais, como a pepsina, no entanto, se faz necessário elevada atividade enzimática (5.000 – 10.000 U/L de pepsina) para obtenção do efeito inibidor. Takenaka e Watanabe (1997) relacionaram a degradação de microcistina-LR como resultado da ação de uma protease alcalina em cultivo com uma cepa isolada de *Pseudomonas aeruginosa*, a MC-LR foi adicionada ao cultivo de *P. aeruginosa* e foi possível que hidrolisasse nucleofilicamente a ligação peptídica da microcistina LR e gradativamente a toxina foi diminuindo quando ocorreu a produção enzimática, a qual detectou principalmente a ação da protease alcalina produzida a 75% molar a partir da toxina.

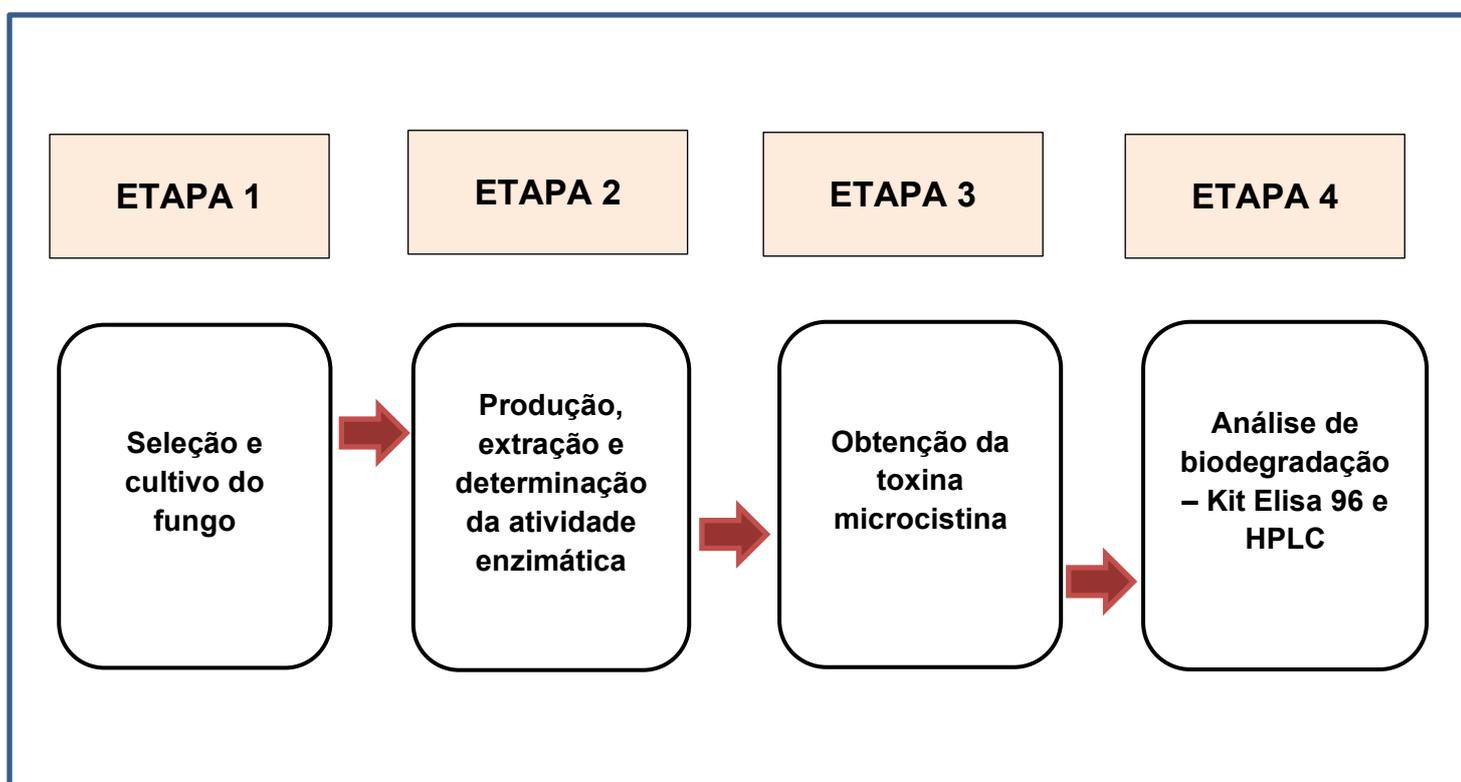
4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - campus Ecoville, no laboratório de biotecnologia (LaBiotec) e microbiologia. A pesquisa contou também com a parceria do Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLiEC) e o laboratório multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA).

As etapas que seguiram decorreram na seleção e cultivo de microrganismos fúngicos para a produção de duas enzimas – Lacase e Protease, seguido pela aplicação e avaliação biotecnológica na degradação de microcistina.

O passo a passo das etapas realizadas pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma da metodologia aplicada



4.1 Seleção e cultivo fúngico

Para o presente trabalho foram selecionadas quatro espécies fúngicas *Trametes villosa*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. As espécies de *Trametes villosa*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. foram obtidas do estoque de cepas do Laboratório de Biotecnologia (LaBiotec) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Ecoville, e a espécie de *Aspergillus brasiliensis* foi adquirida comercialmente (Sigma – Aldrich, Supelco).

Entre os fungos selecionados destaca a cepa de *Trichoderma* sp., a qual foi isolado do solo de manguezal na cidade de Paranaguá-PR e juntamente identificado pela ex aluna do Programa de pós graduação em ciência e tecnologia ambiental (PPGCTA) Nigella Mendes de Paula (PAULA, 2019).

Para a cultivo do fungo *Trametes villosa* foi utilizado um plug micélio retirado da cepa mantida em estoque no tamanho de 2,5 cm, cortado com o auxílio de um tubo de ensaio do mesmo diâmetro, e passado para uma placa de Petri que continha 25 ml do meio nutriente Ágar Batata Dextrose (PDA) – (o meio foi preparado conforme o fabricante). As placas foram incubadas na estufa a 28°C durante sete dias. Todo o cultivo foi feito em triplicata (BONATO, 2018).

Já as espécies de fungo *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. com o auxílio de uma alça estéril foram coletados esporos de cada espécie, os quais foram inoculados em placa de Petri contendo meio nutriente PDA (PAULA, 2019). E para a espécie de *Aspergillus brasiliensis* foi realizado o procedimento de manuseio conforme instruções do fabricante (<https://www.atcc.org/products/crm-16404>). Todas as placas foram incubadas a 30°C durante quatro dias. Todo o cultivo foi feito em triplicata.

4.2 Produção, extração e determinação de atividade enzimática

Para cada espécie fúngica utilizada se fez uso de uma determinada metodologia, a qual teve como base as características morfológicas de adaptação de cada espécie – temperatura, nutriente, pH e tempo de crescimento. Todo o experimento foi preparado em triplicada.

4.2.1 Enzima lacase

A enzima lacase foi extraída do fungo *T. villosa* cultivado em meio semi-sólido (preparado em frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g de glicose, 0,250 g de peptona, 0,150 g de fosfato de potássio, 0,500 g de casca de arroz, 0,250 g de bagaço de uva bordô, 1 g de bagaço de cana, 2 mL de cada solução MnSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 e MgSO_4 (todas as soluções em concentração de 25 mM)) e 40 mL de água destilada. O meio foi autoclavado a 120°C (BONATO, 2018).

Após o preparo do meio nutriente foram inoculados três plugs miceliais da espécie fúngica no tamanho de 2,5 cm cortado com o auxílio de um tubo de ensaio com o mesmo diâmetro. Os frascos foram incubados na estufa a 28 °C por quatro dias. No término da incubação, todo o material presente no frasco foi macerado com o auxílio de um bastão de vidro e o extrato líquido foi filtrado utilizando filtro e papel filtro e armazenado na geladeira, o material sólido foi descartado (BONATO, 2018; MATEI, 2018).

Com a obtenção do extrato bruto foi determinado a atividade enzimática de acordo com Hou *et al.*, (2004); em espectrofotômetro a 420 nm pela oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS).

4.2.2 Enzima protease

A produção de protease foi realizada com as espécies fúngicas de *Aspergillus brasiliensis* e *Trichoderma* sp. (cultivados na seção 4.1). Com o auxílio de uma alça estéril, os esporos foram suspensos e colocados em um Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 ml de solução estéril (NaCL 0,9% + Tween 80 0,01%) juntamente com pérolas de vidro. (MACIEL, 2006).

A solução com esporos foi agitada com agitador magnético pelo período de 15 min, após a extração a solução foi diluída em três concentrações 10^5 , 10^6 e 10^7 e 200 μL de cada diluição foi analisada na câmara de Neubauer para contagem de esporos (MACIEL, 2006). Das três concentrações realizadas, foi utilizada 1 mL da concentração 10^6 esporos/g de substrato para a realização do cultivo FES (Fermentação do estado sólido) e FSm (Fermentação submersa).

4.2.2.1 Fermentação estado sólido x Fermentação submersa

O cultivo FES foi preparado com 5 g de farelo de trigo grosso e 1 g de extrato de levedura na concentração de 40% de teor de umidade (após o meio foi devidamente autoclavado a 120°C por 20 minutos). No meio estéril foi colocado 1 mL da solução de esporos 10⁶ e incubados na estufa a 30°C por 72 horas (modificado de SILVA *et al.*, 2015)

No final do período de incubação foi adicionado ao meio de cultivo 7,5 mL/g do tampão fosfato de sódio (concentrada em 0,1M, pH 7). O meio foi homogeneizado em bancada com o auxílio de um bastão de vidro e levado ao agitador magnético por 30 minutos. Logo o material foi filtrado com gazes para a obtenção do extrato bruto. O material sólido foi secado em estufa 40° C por 24 horas para determinação do material seco fermentado, e o material líquido foi armazenado no freezer (modificado de SILVA *et al.*, 2015; MACIEL, 2006).

Para o preparado do cultivo FSm foi realizado com 1% glicose, 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 0,3% extrato de malde e 200 mL de água destilada, colocados em Erlenmeyer de 250 mL (após o meio foi devidamente autoclavado a 120°C por 20 minutos). O meio estéril foi inoculado com 1 mL da solução de esporos 10⁶ e mantidos sobre agitação na incubadora Shaker a 130 rpm, 25°C por 96 horas (modificado de KIRSCH *et al.*, 2013).

4.2.2.2 Determinação da atividade de protease universal

A atividade proteolítica foi realizada utilizando o protocolo SIGMA – *Universal Protease Activity Assay: Casein as a Substrate* (SIGMA). E para obter da atividade da enzima em unidades por mL foi utilizado o cálculo descrito equação (1).

$$\text{Unidades / mL Enzima} = \frac{(\text{equivalente de } \mu\text{mol de tirosina liberado}) \times (11)}{(1) \times (10) \times (2)} \quad (1)$$

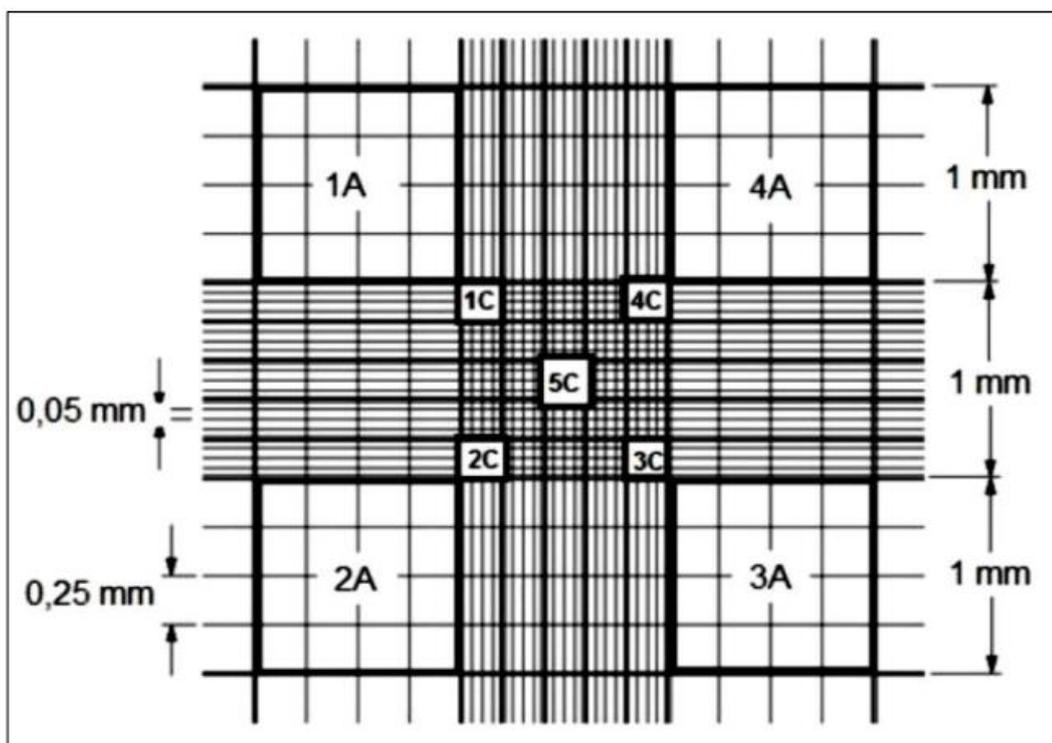
- 11 = Volume total (em mililitros) do ensaio
- 10 = Tempo do ensaio (em mililitros) de acordo com a definição da unidade
- 1 = Volume da enzima (em mililitros) da enzima usada
- 2 = Volume (em mililitros) usado na determinação colorimétrica

4.3 Obtenção de microcistina-LR

O experimento foi realizado com extratos de cianobactérias da espécie *Microcystis aeruginosa* obtidos em parceria com o Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLiEC) -UTFPR, campus Ecoville, o qual realizou integralmente o processo de obtenção e cultivo da espécie.

Obtido o extrato de cianobactéria cultivado foi realizado primeiramente a contagem celular por meio da câmara de Neubauer (Figura 7) e determinada a quantidade de células presentes no cultivo.

Figura 7 – Representação da câmara de Neubauer utilizada para contagem celular



Fonte: SILVEIRA, 2012.

A contagem celular pode ser realizada de duas formas, através da contagem dos quadrantes grandes (1A a 4A) e pelos quadrantes médios (1C a 5C), fazendo uso das equações (2) ou (3). No trabalho realizado foram utilizados a contagem nos quadrantes grandes.

$$y = XA \cdot FD \cdot 10^4 \quad (2)$$

$$y = XC \cdot FD \cdot 1,6 \cdot 10^5 \quad (3)$$

Sendo:

y= concentração celular (células mL⁻¹);

XA= média das contagens entre os quatro campos indicados pela letra A;

XC= média das contagens entre os cinco campos indicados pela letra C;

FD= fator utilizado para diluições que forem realizadas (quando não realizada diluição, o valor é 1).

Sucessivamente a contagem de células foi registrado em 10⁵ cel mL⁻¹. Após foi separado 200 mL do extrato em tubos Falcon de 50 mL e esses foram submetidos a três processos de congelamento/descongelamento utilizando freezer comum, com o objetivo de realizar do rompimento da lise celular para liberação de microcistina.

No término do ciclo, o extrato rompido foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), para determinação da concentração inicial de toxina (condições de aplicação descrita na sessão 4.4.2.2).

4.4 Avaliação de biodegradação de microcistina por atividade enzimática

A avaliação foi realizada com dois métodos, o primeiro utilizado Kit ADDA Elisa 96 poços e o segundo Cromatografia Líquida (HPLC). Para cada um dos métodos de avaliação, foi utilizado um volume final determinante: 10 mL volume final para o método Kit Elisa e 100 mL para HPLC. Considerando dessa forma diferenças no preparado da amostra, podendo ser observado nas sessões 4.4.1 e 4.4.2.

Também foram estabelecidas concentrações diferentes do volume de cada enzima utilizada. Para a enzima lacase foi estabelecido a concentração final de 500 a 1000 U/L sendo uma unidade de atividade definida como a quantidade de enzima

necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto (ALOKPA *et al.*, 2022; LASSOUANE *et al.*, 2022). Para protease foi estabelecido a quantidade μmol de tirosina liberados da caseína por minuto (CHIMBERKUTWO *et al.*, 2020).

4.4.1 Preparo amostral para avaliação - Kit ADDA Elisa 96 poços

Para a avaliação de biodegradação foi preparado uma sequência de seis diferentes amostras, com as enzimas: 1. Lacase de *T. villosa* (obtida em laboratório), 2. Lacase comercial de *Aspergillus* sp., (diluído 1000 x), 3. Lacase desnaturada de *T. villosa* (obtida em laboratório), 4. Protease de *A. brasiliense* (obtida em laboratório), 5. Protease de *Trichoderma* sp., (obtida em laboratório) e 6. Protease comercial (Tripsina) (diluída a 10^5).

O preparado amostral foi preparado com volume final de 10 mL, e para todos foram utilizados Erlenmeyer de 50 mL. O ensaio foi feito em duplicata.

Preparo

- A amostra da enzima lacase *T. villosa* (1) foi preparada contendo 100 μL de microcistina, 1,265 mL de lacase (na concentração de 500 U/L) e 8,635 mL do tampão acetato de sódio (tampão 50 mM);
- A amostra da enzima lacase comercial de *Aspergillus* sp (2) foi preparada contendo 100 μL de microcistina, 100 μL de lacase (na concentração de 500 U/L) e 9,800 mL do tampão acetato de sódio (tampão 50 mM);
- Para a amostra da enzima lacase desnaturada de *T. villosa* (3) 5 mL do extrato foi mantido por 10 minutos a 100°C no Banho-Maria. A amostra foi preparada com 100 μL de microcistina, 1,265 mL de lacase desnaturada e 8,635 mL do tampão acetato de sódio (tampão 50 mM);
- Para a amostra da enzima protease de *A. brasiliense* (4) foram preparadas contendo 100 μL de microcistina, 1,265 mL protease (na concentração de 6,70 U/L) e 8,635 mL de água autoclavada;
- Para a amostra da enzima protease de *Trichoderma* sp (5) foram preparadas contendo 100 μL de microcistina, 1,265 mL protease e 8,635 mL de água autoclavada;

- Para a amostra da enzima protease comercial Tripsina (6) foram preparadas contendo 100 µL de microcistina, 1,265 mL protease e 8,635 mL de água autoclavada.

Juntamente foram preparadas as amostras controles de lacase (1 e 2) e protease (4, 5 e 6) contendo água no lugar da adição de toxina no volume de 100 µL. Também foi realizado o controle da toxina, contendo apenas toxina e água (100 µL de microcistina e 9,900 mL de água autoclavada), sem adição de tampão e enzima.

Após o preparado todas foram mantidas em agitação no Shaker a 120 rpm em 37°C por 2 h e 30 min.

4.4.1.1 Determinação da concentração de microcistina

A avaliação do processo de biodegradação de microcistina foi avaliada por meio do Kit Microcistina - ADDA Elisa 96 poços seguindo o protocolo (ANEXO A).

4.4.2 Preparo amostral para avaliação - HPLC

O preparo das amostras foi realizado em duas etapas (Análise 1 e Análise 2). Foi primeiramente realizado a análise 1, e com o resultado parcial, foram selecionadas determinadas amostras e o ensaio foi repetido (Análise 2).

Para a avaliação de biodegradação (Análise 1) foi preparado uma sequência de seis diferentes amostras, sendo: 1. Lacase de *T. villosa* (obtida em laboratório), 2. Lacase comercial de *Aspergillus* sp. (diluído 1000 x) 3. Protease de *A. brasiliense* (obtida em laboratório), 4. Protease de *Trichoderma* spp., (obtida em laboratório) e 5. Protease comercial (Tripsina) (diluído 10⁵).

O preparo amostral conteve volume final de 100 mL, e para todos foi utilizado Erlenmeyer de 125 mL. Os ensaios foram todos feitos em duplicata.

Preparo para Análise 1 de HPLC

- A amostra de enzima lacase *T. villosa* (1) foi preparada contendo 10 mL de microcistina, 49,26 mL de lacase (concentração final 1000 U/L) e 40,74 mL de tampão acetato de sódio (tampão 50 mM);
- A amostra de enzima lacase comercial de *Aspergillus* sp (2) foi preparada contendo 10 mL de microcistina, 2 mL de lacase (concentração final 1000 U/L) e 88 mL de tampão acetato de sódio (tampão 50 mM);
- Para a amostra da enzima protease *A. brasiliense* (3) foram preparadas contendo 2 mL de microcistina, 5 mL protease (concentração final 2,65 mL/L) e 85 mL de água autoclavada;
- Para a amostra da enzima protease *Trichoderma* spp (4) foram preparadas contendo 2 mL de microcistina, 5 mL protease (concentração final 10,7 mL/L) e 85 mL de água autoclavada;
- Para a amostra da enzima protease (5) foram preparadas contendo 2 mL de microcistina, 5 mL protease comercial (TRIPSINA, lote 1056566) (concentração final 382,35 mL/L) e 85 mL de água autoclavada.

Juntamente foram preparados controles (amostra branco) para as amostras de lacase 1 e 2, e protease 3, 4 e 5 contendo água no lugar de toxina. Também foi realizado o controle da toxina (amostra branco) contendo apenas toxina e água (10 mL de microcistina e 90 mL de água autoclavada), sem adição de tampão e enzima.

Após o preparado todas foram mantidas em agitação no Shaker a 120 rpm em 37°C por 2 h e 30 min.

Preparo análise 2 de HPLC

- A amostra de enzima lacase de *T. villosa* (1) foi preparada contendo 10 mL de microcistina, 38,17 mL de lacase (na concentração final de 1000 U/L) e 51,83 mL de tampão acetato de sódio (tampão 50 mM);
- Para a amostra da enzima protease (5) foram preparadas contendo 10 mL de microcistina, 5 mL protease comercial (TRIPSINA, lote 1056566) (na concentração final de 382,35 mL/L) e 85 mL de água autoclavada.

Juntamente foram preparadas as amostras controles de lacase (1) e protease (5) contendo água no lugar da adição de toxina no volume de 10 mL. Também foi realizado o controle da toxina, contendo apenas toxina e água (10 mL de microcistina e 90 mL de água autoclavada), sem adição de tampão e enzima.

Após o preparado todas as amostras foram mantidas em agitação no Shaker a 120 rpm em 37°C por 2 h e 30 min.

4.4.2.1 Extração em Fase Sólida de Microcistina-LR (MC-LR)

Após o preparo das amostras como descrito no item 4.2.2, para o pré-tratamento das amostras, foi utilizado cartuchos de extração em fase sólida contendo fase estacionária octadecilsilica (1000 mg, Applied Separations®), em sistema Manifold (Agilent®) com controle de vácuo (bomba Logen Scientific®). Os cartuchos foram condicionados com metanol (10 mL) e água ultrapura (10 mL), seguido da aplicação da amostra, eluição em metanol (10 mL) e regeneração com acetonitrila (10 mL). A alíquota correspondente à eluição foi evaporada sob fluxo de ar comprimido, redissolvida em 500 µL de água ultrapura e homogeneizada por agitação em Vortex. A solução obtida foi transferida para vials e 50 µL injetados no sistema cromatográfico.

4.4.2.2 Avaliação de Microcistina-LR (MC-LR) e Validação de Método Cromatográfico

As análises foram realizadas no sistema cromatográfico HPLC, com coluna C18 X-Terra® (Waters; 150 x 30 mm d. i., 3,5µm), precedida de coluna guarda com fase estacionária C18 (Phenomenex®). A fase móvel foi composta por solução de ácido trifluoacético 0,05% e acetonitrila, com o tempo de retenção de 26,611 min, em 0,3 mL.min⁻¹. A coluna foi mantida a 35 °C e o volume de injeção foi de 50 µL. Os cromatogramas foram analisados em 238 nm (comprimento de onda máximo da MC-LR) com auxílio do software LC Solution (LabSolution, Shimadzu).

4.4.3 Preparo do cultivo de *M. aeruginosa* com extrato enzimático

O cultivo foi realizado no Laboratório de Limnologia (UTFPR), em meio líquido ASM-1 modificado (GORHAM et al., 1964), cuja composição é apresentada no Anexo B. A espécie de *M. aeruginosa* foi inoculada (inóculo de 10% - 1 mL) em 100 mL do meio líquido ASM-1 em Erlenmeyer de 250 mL (foram preparados nove Erlenmeyer com a meio líquido e o inóculo). Em três frascos foram acrescentados 2 mL da enzima lacase bruta individualmente (na concentração de 100 U/L), em outros três frascos 2 mL da enzima protease comercial (na concentração de 278 U/L) e nos demais Erlenmeyer foi estabelecido como controle permanecendo apenas o inóculo de *M. aeruginosa* não adicionando enzima (modificado de DU et al., 2015).

As condições de cultivo foram baseadas em Soares et al., (2004) e Jiang et al., (2008), as quais consistiram em fotoperíodo (14 h claro e 10 h escuro), pH 7,4; com luminosidade de 2385 lux ($45 \mu\text{mol f\u00f3tons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), e temperatura mantida entre 21 °C a 25 °C. Após a inoculação permaneceram sobre bancada, sendo agitados manualmente uma vez ao dia durante 15 dias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Produção de lacase

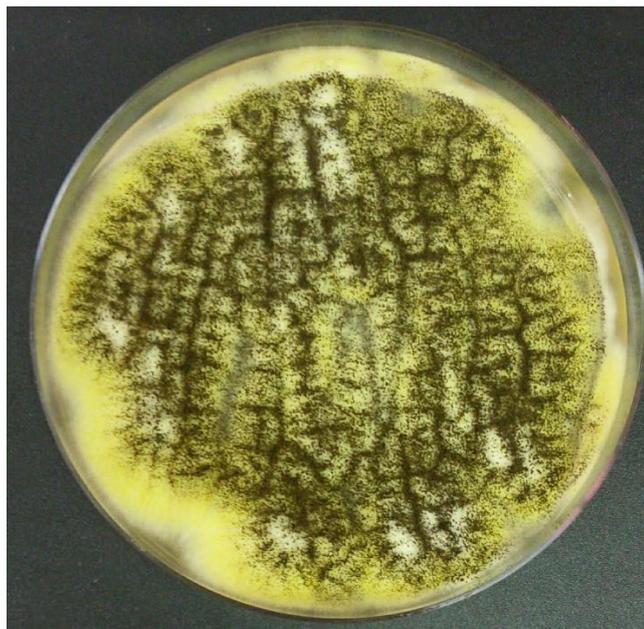
O extrato bruto do cultivo de *Trametes villosa* apresentou atividade de 3.929 U/L para lacase. O gênero *Trametes* é frequentemente utilizado na produção enzimática de lacase, como registra Riede (2019) que obteve uma produção de 8.964 com a espécie de *Trametes villosa*. Em comparação com a produção obtida no presente trabalho é suposto que o percentual de produção enzimática de lacase pode ser alterado quanto a estabilidade do fungo, o tempo de cultivo, substratos utilizados e ações de congelamento e descongelamento do extrato enzimático do mesmo modo que ocorre com demais enzimas (BOYCE & WALSH, 2012).

5.2 Produção de protease

Para obtenção da enzima protease foi realizado uma seleção de espécies, entre *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis* e *Trichoderma* sp. Todas as espécies foram cultivadas no mesmo meio de cultivo PDA. No final do tempo de cultivo, a espécie de *Aspergillus niger* foi descartada por apresentar contaminação por outros microrganismos.

A produção de protease foi realizada com as espécies de *Aspergillus brasiliensis* e *Trichoderma* sp., por apresentarem o devido crescimento no decorrer de cinco dias de incubação. Na Figura 8 é possível observar o aspecto macromorfológico do fungo *Aspergillus brasiliensis* em placa de Petri com meio de cultivo PDA cultivado no período de cinco dias a temperatura de 30°C.

Figura 8 - Cultivo do fungo *Aspergillus brasiliensis*



Fonte: Autoria própria

Obtido o crescimento fúngico, os fungos foram submetidos ao cultivo semi-sólido. Para o devido cultivo foram testados dois meios nutrientes, entre os quais o meio de cultivo FES apresentou melhor crescimento das espécies fúngicas, desconsiderando-se assim o segundo meio de cultivo testado FSm por apresentar menor quantidade de esporos visualmente e/ou nenhum crescimento fúngico.

A determinação da atividade foi alcançada utilizando o padrão de protease por liberação de μmol de tirosina, e foram detectadas atividades de protease produzida por *Aspergillus brasiliensis* no valor de 53 U/mL e para *Trichoderma* sp., 214 U/mL, em meio de cultivo FES (contendo farelo de trigo e extrato de levedura); pH 7 a 30 °C durante 72 h de incubação.

A produção de protease foi alcançada com os dois fungos cultivados, considerando as condições de cultivo: substratos utilizados (farelo de trigo e extrato de levedura) e o período de incubação, como fatores determinantes na produção enzimática, uma vez que, a produção de protease é alcançada após a espécie fúngica consumir toda fonte de nutriente presente no meio de cultivo (WERNECK, 2016).

A espécie de *Aspergillus brasiliensis* já demonstrou ser eficaz na produção de protease, como mostra Novelli *et al.*, (2016), os quais obtiveram a atividade enzimática da mesma espécie fúngica em 11,89 U/L. Chimberkujwo *et al.*, (2020) caracterizou

por meio da liberação de μmol de tirosina protease de *A. brasiliensis* no período de 72 h de incubação, em pH 9, temperatura de 30 °C com produção de 2.304 U/mL.

Já proteases produzidas por *Trichoderma* spp. são conhecidas pela capacidade de controle biológico, desempenho no papel de controle de fungos patogênicos e também em promover o crescimento de plantas. A sua atividade proteolítica foi avaliada por Dou *et al.*, (2014), onde os autores identificaram um novo gene de protease aspártica da espécie de *Trichoderma asperellum*, e a capacidade de inibição do crescimento de fungos patogênicos. Os autores alcançaram uma taxa de inibição de 15,1%, e quanto a atividade enzimática foi de 9,52 U/mL em pH 5,5 e 30 °C.

Para Jin-Deng *et al.*, (2018) a protease produzida pela espécie de *Thichoderma harzianum* demonstrou alta atividade de 321,8 U/mL em pH 2,4 a 40 °C, contribuindo também na inibição de germinação de esporos e crescimento de fungos patogênicos em plantas e animais, como *Botrytis cinérea*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* e *Candida albicans*.

Em seu trabalho Werneck (2016) avaliou o percentual de dias para produção da enzima de protease por espécies de fungos filamentosos, durante 2 a 18 dias, considerando o 9º dia como melhor, atingindo a 41 U/L de atividade proteolítica. Outros autores também consideraram a interferência na concentração e disponibilidade de carbono e nitrogênio no meio de cultivo para a produção de protease, mas também consideraram a diversidade de cada microrganismo na produção enzimática (HADDAR *et al.*, 2010; ADINARAYANA & ELLAIAH, 2002), além de que, a enzima protease pode ser ácida, alcalina e/ou neutra de acordo com as faixas de pH em que atuam, e como serina, aspártico, cisteína e metaloproteinasas, conforme o grupo funcional encontrado em sua área ativa (RAO *et al.*, 1998), a produção de protease poderá ser maior dependendo da espécie fúngica.

5.3 Avaliação de biodegradação pelo método de Kit Elisa 96 poços

O resultado esperado consistia em identificar a possível biodegradação de microcistina por meio da atividade enzimática de lacase e protease. O resultado demonstrou a inexistência de biodegradação de microcistina e maior concentração de toxina junto as amostras, ocorrendo a identificação do processo inverso ao de biodegradação, o que poderia estar relacionado a interferentes durante a realização do teste (perda de atividade enzimática, substratos presentes no extrato enzimático,

uma vez que foram utilizados extratos da enzima bruta e soluções do kit com inatividade) ou à taxa de detecção.

Portanto o resultado demonstrou a necessidade da utilização de um segundo método para análise, considerando a análise por meio do HPLC.

5.4 Avaliação de biodegradação por HPCL

A concentração inicial de microcistina-LR no primeiro ensaio foi de 218,81 $\mu\text{g/L}^{-1}$, e a degradação pelo uso das enzimas lacase e protease por cromatografia líquida pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Ensaio 1: Avaliação da biodegradação de microcistina-LR por cromatografia líquida.

Amostra	Concentração inicial enzimática	Média Concentração de toxina ($\mu\text{g/L}$)	Taxa de remoção (%)
Ext. bruto Microcistina-LR	-	218,81 \pm 5,89	
Lacase bruta de <i>T. villosa</i> *	496 U/L	12,20 \pm 1,28	94,42%
Lacase comercial de <i>Aspergillus</i> sp., *	20 U/L	89,98 \pm 3,80	58,88%
Protease bruta de <i>Trichoderma</i> sp., *	0,144 U/mL	108,88 \pm 29,68	50,24%
Protease Comercial Tripsina *	21,32 U/mL	40,84 \pm 3,42	81,34%

***Quantidade de enzima utilizada: lacase bruta de *T. villosa* 49,26 mL; lacase comercial de *Aspergillus* sp. 2 mL; protease bruta de *Trichoderma* sp., 5 mL; protease comercial tripsina 5 mL.**

Por meio da análise realizada, é possível observar maior remoção de microcistina nas amostras contendo lacase bruta (obtenção em laboratório) em comparação com a taxa de remoção utilizando lacase comercial, e o inverso acontece com a utilização da enzima protease, demonstrando maior taxa de remoção através

da protease comercial tripsina, uma vez comparada com a porcentagem de remoção utilizando a protease bruta (obtenção em laboratório).

Com a taxa de remoção de microcistina foi considerado a realização de um segundo ensaio para confirmação do resultado apenas com as amostras superiores a 80% de remoção, o qual é mostrado na Tabela 2.

Em segundo análise a concentração inicial de microcistina-LR foi de 230,27 $\mu\text{g/L}^{-1}$, sendo maior do que no ensaio 1 levando a analisar as condições de temperatura junto ao tempo de cultivo e a mudança na estação climática (ensaio 1 foi realizado no verão e o ensaio 2 realizado no outono, devido a disponibilidade do uso do equipamento) que são determinantes para o crescimento de *Microcystis* spp. Para *M. aeruginosa* são registrados a temperatura de 25 °C com constante utilização (DU *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2021; LE *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2021).

Tabela 2 – Ensaio 2: Avaliação da biodegradação de microcistina-LR por cromatografia líquida

Amostra	Concentração inicial enzimática	Média Concentração de toxina ($\mu\text{g/L}$)	Taxa de remoção (%)
Ext. bruto Microcistina-LR	-	230,27 \pm 18,68	
Lacase bruta <i>T. villosa</i> *	381 U/L	3,20 \pm 0,03	98,61%
Protease Comercial Tripsina*	19 U/mL	0,86 \pm 0,07	99,63%

***Quantidade de enzima utilizada: lacase bruta de *T. villosa* 38,17 mL; protease comercial tripsina 5 ml.**

O resultado mostrou a eficiência das enzimas lacase e protease na remoção de microcistina, o que leva a considerar a atividade enzimática como um método a ser aplicado em processos futuros. De acordo com o percentual de 1,0 $\mu\text{g/L}^{-1}$ de microcistina permitido pela legislação, o ensaio 2 detectou 0,14 $\mu\text{g/L}^{-1}$ abaixo do que

é estabelecido, permitindo a remoção praticamente completa da microcistina utilizando protease comercial em 2 h e 30 min de agitação a 125 rpm, a 30 °C.

Du *et al.*, (2015) avaliaram o potencial de degradação de enzimas fúngicas de *Trametes versicolor*, em contato com *Microcystis* sp, e as taxas acumulativa foram de 96,38% e 98,67% com o tempo máximo de 60 horas de agitação a 120 rpm a 27 °C. Foram incluindo nesse estudo a utilização das enzimas lacase e protease, que juntas apresentaram aumento contínuo e gradual junto ao crescimento, e que as taxas de degradação aumentaram na fase inicial de incubação com ambas as enzimas.

5.5 Avaliação do inoculo enzimático no cultivo de *M. aeruginosa*

A atividade enzimática de lacase e protease foi avaliada junto ao cultivo de *M. aeruginosa* durante o período de 15 dias (Figura 9, 10 e 11). Os frascos com extrato controle de *M. aeruginosa* apresentaram concentração inicial de 8.533×10^4 cel mL⁻¹, já para os frascos que foram adicionados a enzima lacase 7.633×10^4 cel mL⁻¹ e protease 7.966×10^4 cel mL⁻¹. Tendo realizado contagens seletivas entre dois, sete, onze e quinze dias de incubação.

Figura 9 - Cultivo de *M. aeruginosa* sem adição de enzima; cultivado no período de 15 dias entre 21 °C a 25 °C; contagem de células 10^6 cel mL⁻¹, feitos em triplicata (Erlenmeyers numerados 1, 2 e 3).



Fonte: Autoria própria

Figura 10 - Cultivo de *M. aeruginosa* com a adição da enzima lacase de *T. villosa* (obtida em laboratório) na concentração de 100 U/L; cultivado por 15 dias entre 21 °C a 25 °C; contagem de células 10^6 cel mL⁻¹, feitos em triplicata (Erlenmeyers numerados 1, 2 e 3).



Fonte: Autoria própria

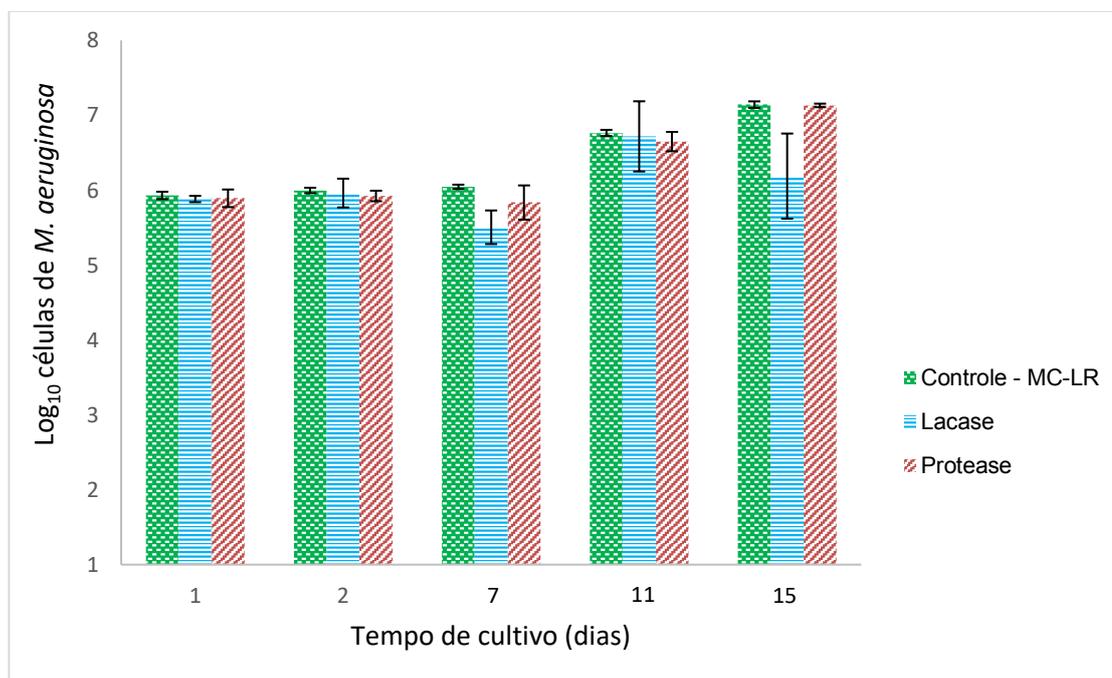
Figura 11 - Cultivo de *M. aeruginosa* com enzima protease comercial Tripsina na concentração de 100 U/L; cultivado durante 15 dia entre 20 °C a 25 °C; contagem de células 10^6 cel mL⁻¹, feitos em triplicata (Erlenmeyers numerados 1, 2 e 3).



Fonte: Autoria própria

Na figura 12 é possível analisar a taxa de crescimento natural e contínuo da cianobactéria (coluna verde), no entanto, no cultivo de *M. aeruginosa* junto com a enzima lacase (coluna azul) é possível analisar uma baixa diminuição no percentual de crescimento da espécie com sete dias de incubação, elevando o crescimento até o décimo primeiro dia de incubação e decaindo novamente após esse período. Já para o cultivo com protease (coluna vermelha), o crescimento foi igualado ao percentual do cultivo controle sem enzima, não sendo identificado inibição do crescimento.

Figura 12 – Avaliação do crescimento de *M. aeruginosa* com adição das enzimas lacase de *T. villosa* e protease comercial Tripsina durante o tempo de cultivo de 1 a 15 dias de incubação.



Fonte: Autoria própria

Identificou-se a baixa taxa de crescimento *M. aeruginosa* junto a enzima lacase, e houve a identificação de outros microrganismos presentes junto ao cultivo. Considera-se que uma vez que a utilização da enzima lacase inoculada junto ao cultivo foi extraída no próprio laboratório LaBiotec, sendo essa uma enzima bruta, pode conter outros substratos que ao contato com o meio de cultivo líquido ASM-1 pode ter sofrido reação e conseqüentemente ocasionado a inibição do crescimento da cianobactéria, no entanto, demais autores realizaram trabalhos semelhantes e detectaram a inibição do crescimento de cianobactérias pelo mesmo método avaliativo, considerando assim, a possibilidade de refazer o experimento e reconfirmar o resultado.

Du *et al.* (2015) avaliaram a degradação *Microcystis* spp através da aplicação enzimática de diferentes enzimas, onde incluiu o efeito de lacase e protease produzida pelo fungo *T. versicolor* em diferentes estágios do crescimento da cianobactéria. Os resultados concluíram que os produtos produzidos por essa linhagem fúngica foram capazes de degradar em 60 h de incubação 96% de *Microcystis* spp. alterando o

crescimento no estágio inicial (0 h a 24 h) e na fase tardia (24 h a 60h), considerando o potencial uso no controle de cianobactérias em ecossistemas naturais.

Para Dai *et al.*, (2018), enzimas de cultivo fúngico são eficazes na eliminação de algas azuis agindo como algicidas junto ao cultivo de cianobactérias, as quais ocasionam o rompimento da parede celular. Cerca de 85% das células de algas foram eliminadas em 30 horas, assim como, Zeng *et al.*, (2015) registram o percentual de espécies fúngicas como sendo algicidas, mostrando efeito inibitório após 48 horas de co-cultura de *Phanerochaete chrysosporium*.

É importante também mencionar que pode ocorrer o processo inverso ao de degradação e que espécies de cianobactérias podem afetar significativamente a atividade enzimática (Du *et al.*, 2015).

6. CONCLUSÃO

O trabalho mostrou eficiência na produção enzimática com o uso de microrganismos fúngicos, onde foram utilizadas as espécies de *Trametes villosa*, *Aspergillus brasiliensis* e *Trichoderma* sp.

A produção enzimática nesse estudo se concentrou em produzir lacase e protease, onde ambas obtidas foram utilizadas na biodegradação da toxina microcistina-LR.

O processo de análise de biodegradação passou por duas etapas: a primeira através do Kit Elisa, o qual demonstrou maior concentração de microcistinas, não apresentando o resultado de biodegradação, levando a questionar que, a concentração da toxina aumentou quando em contato com a enzima lacase e protease, e também a falta de precisão do método de detecção, descartando a experimento.

Já o segundo processo de análise foi utilizado o método de cromatografia líquida, que mostrou a remoção de 98,61% de toxina com enzima lacase e 99,63% de remoção com enzima protease comercial, resultando na efetividade enzimática na biodegradação de microcistina-LR, demonstrando o alcance do objetivo desse trabalho.

O resultado também apresentou efetividade na redução da taxa de crescimento de cianobactérias quando adicionado enzima lacase bruta de *T. villosa* junto ao meio nutriente, apresentando redução com 7º dia de incubação e após 11º dia de incubação.

Todo o trabalho demonstrou ser de alcance na área de biotecnologia e apresentou uma forma limpa de auxiliar o tratamento de eliminação de microcistinas na água. Acredita-se que o trabalho abre portas para o aprofundamento na área de estudo, e que pode gerar mais resultados na linha de pesquisa, sendo utilizados dentro e fora da universidade.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, F.; LIMAM, F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodegreaser. **Process Biochemistry**, v.43, n. 11, p. 1202-1208, 2008.
- ADINARAYANA, K.; ELLAIAH, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. **J Pharm Pharm Sci**, 2002.
- ALBUQUERQUE, M. V. C *et al.* Removal of cyanobacteria and cyanotoxins present in waters from eutrophic reservoir by advanced oxidation process (AOPs). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61234-61248, 2020.
- ALOKPA, K.; LAFORTUNE, F.; CABANA, H. Application of laccase and hydrolases for trace organic contaminants removal from contaminated water. **Environmental Advances**, v. 8, n; 100243, 2022.
- AMORIN, C. A.; ULISSES, C.; MOURA, A. N. Biometric and physiological responses of *Egeria densa* Planch. Cultivated with toxic and non-toxic strains of *Microcystis*. **Aquatic Toxicology**, v. 191, p. 201-208, 2017.
- ANDERSEN, J. *et al.* Revealing the degradation intermediates and pathways of visiblelight - induced NF-TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 154-155, p. 259-266, 2014.
- ANTUNES, P. W. P. **OTIMIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2013
- ARAGÃO, M. H. S. **Aplicação do processo fenton na remoção de Microcistina-Lr para água destinada a abastecimento humano**. Universidade Estadual do Paraná, Centro de Ciências e Tecnologia - Trabalho de conclusão de curso. Campina Grande, 2014.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181–182, p. 441-446, 2002.
- BIBAL, M *et al.* Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. **Environment International**, v. 124, p. 336-353, 2019.
- BONATO, A. C. H. **AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA POR ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E FOTÓLISE**. Dissertação – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Curitiba. 2018.

BOYCE, A.; WALSH, G. Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. **Chemosphere**, v. 88, n. 2, p. 211-218, 2012.

BORTOLI, S.; PINTO, E. **Ecologia de reservatório e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: http://ecologia.ib.usp.br/reservatorios/PDF/Cap._21_Cianotoxinas.pdf. Acesso em 20/06/2022.

BRASIL, C. P. **Avaliação da Remoção de Microcistina em Água de Abastecimento Público por Diferentes Carvões Ativados em Pó Produzidos no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos). Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. Brasília, 2004.

BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. Portaria nº 1.469/2000, de 29 de dezembro de 2000: aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_1469.pdf. Acesso em: 26 out. 2019.

BRASIL. Ministério da saúde. PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/25/Portaria-MS-no-2.914-12-12-2011.pdf>. Acesso em: 26 out. 2019.

CARVALHO, M. de C *et al.* Manual de cianobactérias planctônicas : legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais. São Paulo: **CETESB**, 2013.

CHEN, L *et al.* Study on removal of *Microcystis aeruginosa* and Cr (VI) using attapulgite-Fe₃O₄ magnetic composite material (MCM). **Algal Research**, v. 60, n. 102501, 2021.

CHEN, T.; CUI, J.; LIANG, Y *et al.* Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. **Toxicology**. v. 220, n. 1, p. 71-80, 2006.

CHIMBERKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **Scientific African**. v. 8, 2020.

CHOUHAN, S *et al.* Effect of Bisphenol A on human health and its degradation by microorganisms a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 63, p. 13-21, 2014.

CHUNLEUCHANON, S.; SOOKSAWANG, A.; TEAUMROONG, N *et al.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 167-173, 2003.

CLAUS, Harald. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Archives of Microbiology**. v. 179, n. 3, p. 145-150, 2003.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; DE LIMA, M *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos 809. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 809-813, 2008.

DAI, M.; XIE, P.; LIANG, G *et al.* Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 862, n. 1–2, p. 43-50, 2008.

DAI, W *et al.* The Algicidal Fungos *Trametes versicolor* F21a eliminating blue algae via gene encoding degradation enzymes and metabolic pathways revealed by transcriptomic analysis. **In Microbiology**, 2018

DAMASCENO, A. A. **Purificação e caracterização da lacase do fungo**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de pós-graduação em Biotecnologia PPGBIOTEC, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

DURAN, N.; ROSA, M. A.; D'Annibale, A *et al.* Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n. 7, p. 907-931, 2002.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

DU, J. *et al.* Potential of extracellular enzymes from *Trametes versicolor* F21a in *Microcystis* spp. degradation. **Materials Science and Engineering:C**. v. 48, p. 138-144, 2015.

FENG, H-R *et al.* Study on a novel omnidirectional ultrasonic cavitation removal system for *Microcystis aeruginosa*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 86, n. 106008, 2022.

FERRARI, S. G.; SILVA, P. G.; GONZÁLEZ, D. M *et al.* Tolerância a arsénico de cianobactérias com usos biotecnológicos. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2013.

FREITAS, A. M. **Utilização de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas por toxinas produzidas por cianobactérias**. Programa de

pós-graduação em química, setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

FUKUDA, T. *et al.* Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 284, n. 3, p. 704-706, 2001.

GARCIA, T. A. **Purificação e Caracterização Das Lacases De *Pycnoporus sanguineus***. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GOMAA, E. Z. Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on Ficus nitida wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 529-537, 2013.

GUPTA, N.; PANT, S.C.; VIJAYARAGHAVAN *et al.* Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin *microcystin variants* (LR, RR, YR) in mice. **Toxicology**, v. 188, n. 2–3, p. 285-296, 2003.

HADDAR, A *et al.* Lowcost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **J Biosci Bioeng**, 2010.

HADJ-ALI, N. E.; AGREDI, R.; GHORBEL-FRIKHA, B *et al.* Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 515-523, 2007.

HOU, H. *et al.* Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004.

JIANG, Y.; JI, B.; WONG, R. N. S.; WONG, M. H. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*. V. 7, p. 127-136, 2008.

JIN-DENG, J *et al.* Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* **Against pathogenic fungi**. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 112, p. 35-42, 2018.

KIRSCH, L. de S.; EBINUMA, V. C. S. Mycelial Biomass and Biochemical Properties of Protease Produced by *Lentinus cintrinus* DPU 1535 (Higher Basidiomycetes) in Submerged Cultivation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, n. 5, p. 505-515, 2013.

KIST, L. W. **Avaliação da toxicidade induzida pela exposição à microcistina-LR sobre a neurotransmissões colinérgica e purinérgica em zebrafish (Danio rerio)**. Tese (Programa de pós graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

KURIAMA, F.; KURODA, E. K.; GUERGOLETTI, K. B *et al.* Potencial de biodegradação de microcistinas por microrganismos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 181-186, 2012.

LASSOUANE, F.; AMAR, H.; COUTO, S. R. High BPA removal by immobilized crude laccase in a batch fluidized bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 184, n° 108489, 2022.

LE, V. V *et al.* Algicide capacity of *Paucibacter aquatile* DH15 on *Microcystis aeruginosa* by attachment and non-attachment effects. **Environmental Pollution**, v. 302, n. 119078, 2022.

MACIEL, G. M. **DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E FARELO DE SOJA**. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

MADIGAN, M. T *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. - Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAJEAU, J, A.; K.BRAR, S.; DAYALTYAG, R. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2331-2350, 2010.

MATEI, J. C. **Pré-tratamento biológico de resíduos agroindustriais por enzimas ligninolíticas para produção de bioetanol**. Dissertação - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MARCO, J. L DE.; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **MC Biochemistry**. n. 3, 2002.

McELHINEY, J.; LAWTON, L. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 219-230, 2005.

METCALF, J. S.; LINDSAY, J.; BEATTIE, K *et al.* Toxicity of *Cylindrospermopsis* to the Brine Shrimp *Artemia Salina*: Comparasions With Protein Synthesis Inhibitors and Microcystins. **Toxicon**, v. 40, p. 1115-1120, 2002.

MINILLO, A.; FREITAS, S. de C.; ISIQUE, W. D *et al.* Biodegradação da hepatotoxina (D-Leu1)-microcistina-LR por bactérias presentes em filtros biológicos de carvão. **Eng Saint Ambiente**. vol. 18. n° 3, p. 205-214, 2013.

MULLER, C. C. **Avaliação sa utilização de carvão ativado em pó na remoção de microcistina em água para abastecimento público**. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

MULLER, L. **Avaliação da toxidade e degradação de *M. aeruginosa* e Microcistina-LR por AOPs e Nanopartículas de prata**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

NEWCOMBE, G. & NICHOLSON, B. Water treatment options for dissolved cyanotoxins. **Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA**, v. 53, n. 4, p. 227-239, 2004.

NOVELLI, P. K *et al.* Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food chem**, 2016.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PAULA, N. M DE. **Potencial Biotecnológico de fungos de ecossistema manguezal**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal do Paraná, 2019.

PINHEIRO, V. E *et al.* *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 43, p. 507-514, 2020.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37663-37669, 2002.

RAMKUMAR, A.; SIVAKUMAR, N.; GUJARATHI, A. M *et al.* Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

RAMOS, T. C. D'A. de A. **Identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do Quadrilátero Ferrífero, MG.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas. Sete Lagoas, 2016.

RAO, MB.; TANKSALE, A.; GHATGE, M *et al.*, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbial mol biol rev.** v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RIEDE, H. DE P. **Purificação, caracterização e imobilização de lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

RODAK, P. C.; PAULISTA, P. F. **Aplicação de lacase na degradação de corantes sintéticos.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

RODRIGUES, L. A.; BARROSO, D. G.; FIQUEIREDO, F. A. M. M. de A. Fungos *Micorrízicos arbusculares* no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* L. F. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2018.

ROSET, J *et al.* Detección de cianobacterias y sus toxinas. **Una revisión. Revista de Toxicología**, v. 18, p. 65-71, 2001.

SÁNCHEZ, C. I.; BENINTENDE, M. C.; SILVIA, M. B. Población de cianobacterias en suelos arroceros: efecto de las rotaciones Cyanobacteria populations in rice soils: rotation effects. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 51, n. 1, p. 71-76, 2019.

SANGALE, M. K.; SHAHNAWAZ, M.; ADE, A. B. Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

SHARMA, V. K *et al.* Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 91, p. 3-17, 2012.

SILVA, J. H.; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 3, p. 669-674, 2000.

SILVA, J. J. da.; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C *et al.* Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. v. 15, n. 1, p. 191-196, 2012.

SILVA, O. da S *et al.* Caracterização parcial de protease por *Aspergillus tamaritii* URM4634 por fermentação em estado sólido (FES). XX Congresso Brasileiro de Engenharia. Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, 2015.

SILVEIRA, A. L. **AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Microcystis aeruginosa* Kützing.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, 2012.

SIVONEN, K.; JONES, G. A. Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. **Toxic Cyanobacteria in Water**, 1999.

SHUKLA, D *et al.* Chapter 14 – Tumor-suppressive proteases revisited: Role in inhibiting tumor progression and metastasis. **Cancer-Leading Proteases**, p. 391-415, 2020.

SOARES, F. E. F *et al.* Optimization of protease production by the fungus *Monascus purpureus* and its action against *Angiostrongylus vasorum* larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 285-288, 2013.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, v. 70, p. 1-10, 2004.

SUMANTHA, A *et al.* Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technol Biotech**, 2006.

TAKENAKA, S.; WATANABE, M. F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. **Chemosphere**. v. 34, ed.4, p. 749-757, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L *et al.* **Microbiologia**. 12 ed - Porto Alegre: Artmed, 2017.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications laccase. **Materials Theory**, v. 6, n. 5, 2016.

VASCONCELOS, F. J.; BARBOSA, J. E. L.; LIRA, W *et al.* **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 3, p. 185-192, 2013.

VASCONCELOS, V. M.; SIVONEN, K.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters, **Water Res**. v. 30, p. 2377–2384, 1999.

VERMELHO, A. B *et al.* **Práticas de Microbiologia**. 2. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

VILLELA, S. M. **Biodegradação de efluentes industriais na presença de lacase de *Aspergillus spp* e peroxidase de raís forte**. (Relatório de estágio) Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de química. Florianópolis, 2006.

VIVI, V. K. **Biodegradação de filmes de PVC e PCL por fungos filamentosos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociência de Rio Claro. Rio Claro, 2011.

WANG, F *et al.* Allelopathic inhibitory effect on the growth of *Microcystis aeruginosa* by improved ultrasonic-cellulase extract of *Vallisneria*. **Chemosphere**, v. 298, 2022.

WANG, X.; XU, L.; LI, X *et al.* The differential effects of microcystin-LR on mitochondrial DNA in the hippocampus and cerebral cortex. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 68-76, 2018.

WERNECK, G. C. **PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS DO CERRADO**. Dissertação – Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

YILDIRIM, V *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 468-477, 2017.

YIN, L. J.; HSU, T. H.; JIANG, S. T. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 61, n.3, p. 662-666, 2013.

ZACCARONI, A & SCARAVELLI, D. Toxicity of fresh water algal toxins to humans and animals. **Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect na Detection**, p. 45-89, 2008.

ZEN, G.; WANG, P.; WANG, Y. Algicidal efficiency and mechanism of *Phanerochaete chrysosporium* against harmful algal bloom species. **Algal Research**, v, 12, p. 182-190, 2015.

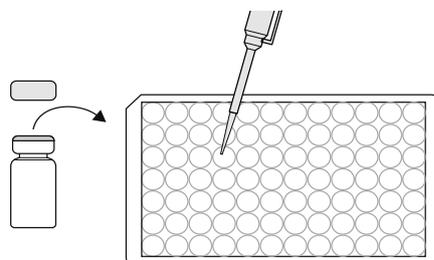
ANEXO A

Protocolo de avaliação Kit ADDA Elisa 96 poços

Microcystins-ADDA SAES ELISA Plate 520011SAES

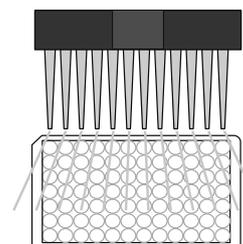
1. Addition of Standards, Samples

Add 50 μ L of the standard solutions, control, or samples into the wells of the test strips according to the working scheme given. We recommend using duplicates or triplicates.



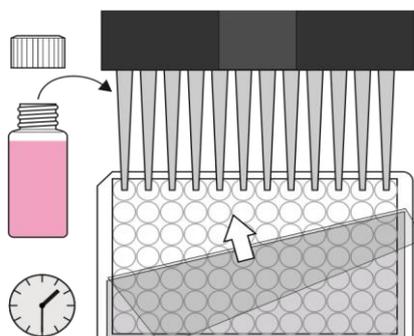
5. Washing of Plates

After incubation, remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Wash the strips three times with a multi-channel pipette using the 1X washing buffer solution. Please use at least a volume of 250 μ L of washing buffer for each well and each washing step. Remaining buffer in the wells should be removed by patting the plate dry on a stack of paper towels.



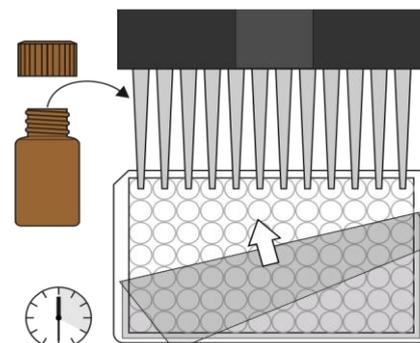
2. Addition of Antibody Solution

Add 50 μ L of the antibody solution to the individual wells successively using a multi-channel pipette or a stepping pipette. Cover the wells with parafilm or tape and mix the contents by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop for 30 seconds. Be careful not to spill contents. Incubate for 20 minutes at room temperature.



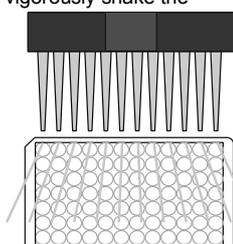
6. Addition of Substrate/Color Solution

Add 100 μ L of substrate/color solution to the wells using a multi-channel pipette or a stepping pipette. The strips are incubated for 20-30 minutes at room temperature. Protect the strips from direct sunlight.



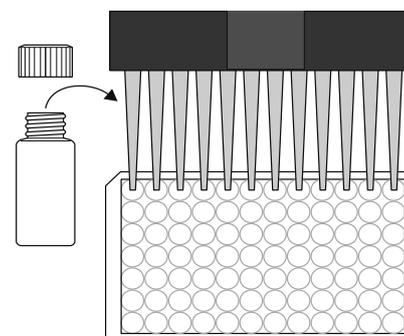
3. Washing of Plates

After incubation, remove the covering and vigorously shake the contents of the wells into a sink. Wash the strips three times with a multi-channel pipette using the 1X washing buffer solution. Please use at least a volume of 250 μ L of washing buffer for each well and each washing step. Remaining buffer in the wells should be removed by patting the plate dry on a stack of paper towels.



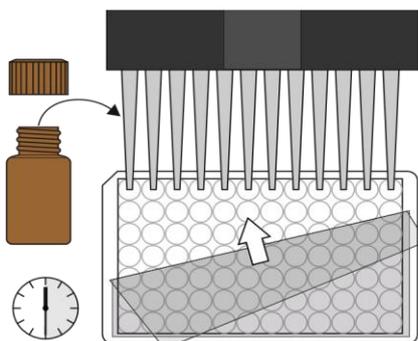
7. Addition of Stopping Solution

Add 50 μ L of stop solution to the wells in the same sequence as for the substrate solution using a multi-channel pipette or a stepping pipette.



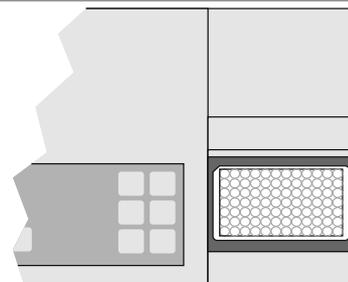
4. Addition of Enzyme Conjugate

Add 100 μ L of enzyme conjugate solution to the individual wells successively using a multi-channel pipette or a stepping pipette. Cover the wells with parafilm or tape and mix the contents by moving the strip holder in a rapid circular motion on the benchtop. Incubate for 30 minutes at room temperature.



8. Measurement of Color

Read the absorbance at 450 nm using a microplate ELISA reader. Calculate results.



Eurofins Abraxis
124 Railroad Drive
Warminster, PA 18974
WEB: www.abraxiskits.com

Technical Support: support.ET.Warminster@eurofinsus.com Date this Flow Chart is effective: 15FEB2022

Ordering: info.ET.Warminster@eurofinsus.com

T (215) 357 3911
F (215) 357 5232
Version: 01



Abraxis

Link de acesso: https://abraxis.eurofins-technologies.com/media/10828/ug-21-078-rev-01-microcystins-adda-streptavidin-amplified-enhanced-sensitivity-saes-elisa_520011saes.pdf

APÊNDICE A

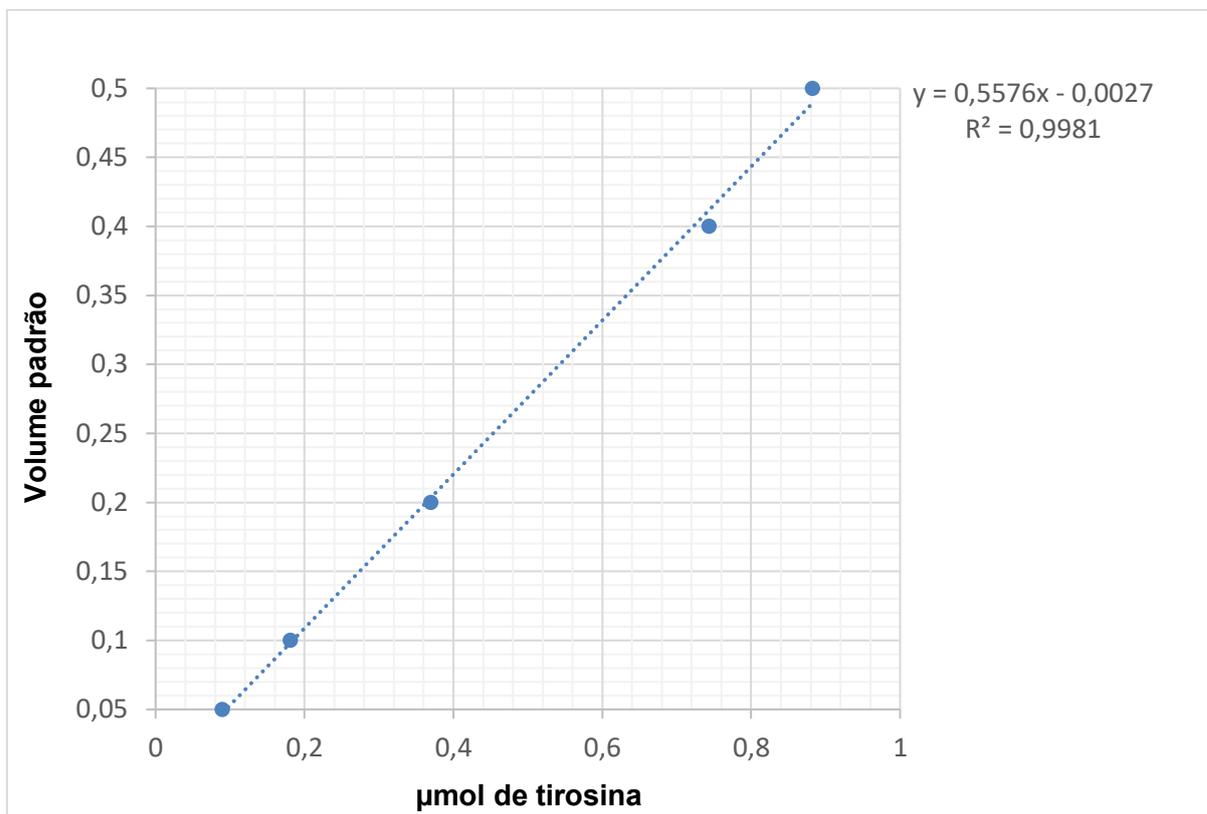
Meio de cultura ASM-1 utilizado para cultivo de *Microcystis aeruginosa*

Tabela x - Composição do meio de cultivo ASM-1

Solução estoque para o preparo do Meio ASM-1	Composição da Solução Estoque	Quantidade (g/L)	Volume para 1 L de meio
Solução A	NaNO ₃	8,5	20 mL
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2,45	
	MgCl ₂ .6H ₂ O	2,05	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,45	
Solução B	KH ₂ PO ₄	8,7	5 mL
	Na ₂ HPO ₄	7,06	
Solução C	H ₃ BO ₃	28,4	0,1 mL
	MnCl ₂ .4H ₂ O	13,9	
	FeCl ₂ .4H ₂ O	9,14	
	ZnCl ₂	3,35	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,19	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,014	
Solução D	EDTA Tritriplex	18,6	0,4 mL

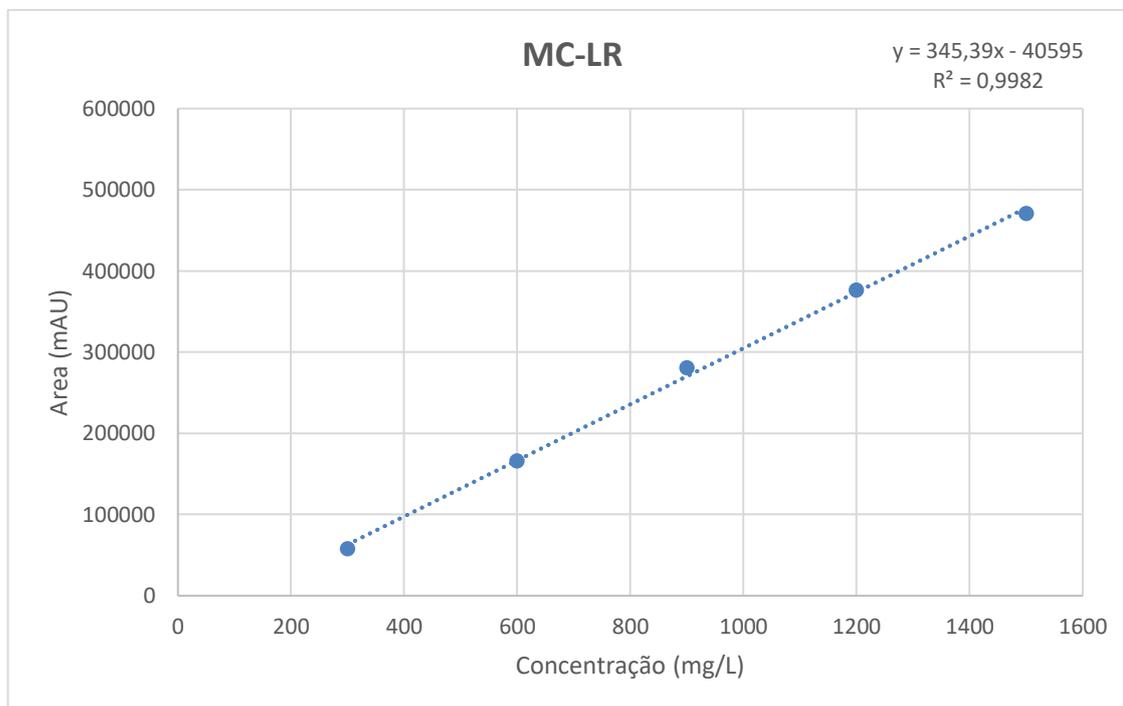
Fonte: Adaptado de Silveira (2012).

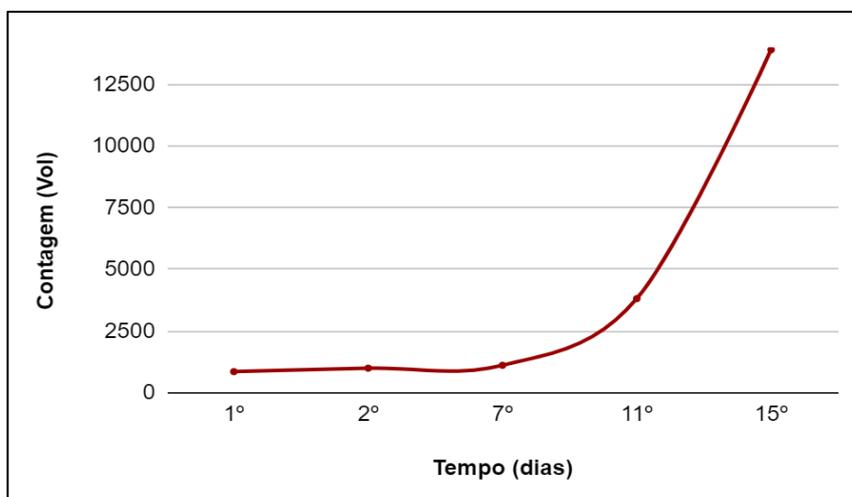
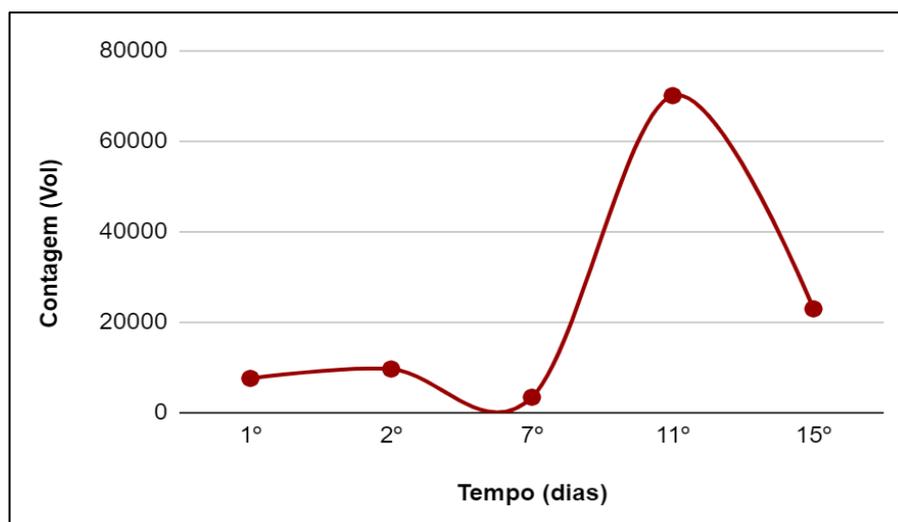
APÊNDICE B
Curva padrão de tirosina



APÊNDICE C

Curva analítica de concentração de MC-LR



APÊNDICE D**Curva de crescimento de *M. aeruginosa*****Curva de crescimento da *M. aeruginosa* controle****Curva de crescimento da *M. aeruginosa* com enzima lacase**

Curva de crescimento da *M. aeruginosa* com enzima protease comercial