



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**



**Centro de Ciências Agrárias
Depto. De Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**

MAIKON THIAGO DO NASCIMENTO

**MICROCISTINA EM ÁGUA: FOTODEGRADAÇÃO POR TiO_2
VERSUS BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA
RECOMBINANTE**

Londrina

2023

MAIKON THIAGO DO NASCIMENTO

**MICROCISTINA EM ÁGUA: FOTODEGRADAÇÃO POR TiO₂
VERSUS BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA
RECOMBINANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Nascimento, Maikon Thiago do.

MICROCISTINA EM ÁGUA : FOTODEGRADAÇÃO POR TIO₂ VERSUS BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA RECOMBINANTE / Maikon Thiago do Nascimento. - Londrina, 2023.
69 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Cianotoxina - Tese. 2. S. cerevisiae recombinante - Tese. 3. Degradação Biológica vs Fotoquímica - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.1

MAIKON THIAGO DO NASCIMENTO

**MICROCISTINA EM ÁGUA: FOTODEGRADAÇÃO POR TiO₂
VERSUS BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA
RECOMBINANTE**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Thais De Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Emilia Kiyomi Kuroda
Universidade Estadual de Londrina

SUPLENTE

Dra. Daiane Dias Lopes
US Department of Agriculture, USDA

Dra. Tatiana de Ávila Miguel
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 13 de abril de 2023

*A minha mãe Maria de Fátima Miranda do Nascimento,
por todo carinho e cuidado;
Ao meu pai José Pedro do Nascimento
por todo suporte e confiança;
Ao meu companheiro Aroldo Cleber Caldeira
por todo amor, dedicação, incentivo e ser sempre meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, conhecimento transmitido, apoio, confiança e incentivo, sem o qual não teria adquirido todo o conhecimento científico e não me tornaria o profissional que sou hoje;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado;

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

À professora Dra. Thais De Souza Rocha por todo incentivo, ensinamentos, motivações e conselhos dados, os quais foram de suma importância para o desenvolvimento da minha pesquisa;

Aos professores Dr. Fábio Yamashita e Dra. Marta de Toledo Benassi por todo conhecimento científico compartilhado, valiosos conselhos e incentivo;

À professora Dra. Emilia Kiyomi Kuroda do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo da UEL pelos conselhos e orientações;

Ao professor Dr. César Ricardo Teixeira Tarley do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelas sugestões sobre preparo de amostras e validação do método analítico;

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por todo aprendizado e incentivo;

À Dra. Daiane Dias Lopes, Dr. Lycio Shinji Watanabe e Fabiana Akemi Hirata Bae por todo conhecimento prático em cromatografia compartilhado;

Ao técnico Osvaldo Capello do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio com as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos técnicos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos Patrícia, Alessandra e Rubens pelo apoio;

Aos meus colegas de laboratório Estéfany S. Redondo, Fernando de Godoi Silva, Giovana Marcolino, Kawany Forato e Tuany Marin Pomini por todo conhecimento compartilhado, ajuda nas análises e por todos os momentos de descontração que compartilhamos juntos;

Aos amigos e colegas do Departamento Ciência e Tecnologia de Alimentos Carina Moro Benis, Eduardo Lolato, Iara Pereira, pelos momentos de ajuda e amizade;

À Dra. Maria de Almeida Silva pela por toda ajuda na elaboração deste trabalho e por todo carinho;

Aos meus novos amigos e colegas do Departamento de Química por todos os conselhos e momentos de descontração;

Aos meus pais José Pedro do Nascimento e Maria de Fátima Miranda do Nascimento e irmãos Juliana Nascimento e Márcio Nascimento por todo cuidado, apoio e carinho;

Ao meu companheiro Aroldo Cleber Caldeira por todo amor, dedicação, paciência e apoio.

RESUMO

A eutrofização, processo em que um corpo de água se torna excessivamente rico em nutrientes, pode acarretar a floração de cianobactérias. *Microcystis aeruginosa* é a mais comum entre espécies toxigênicas estudadas e, produz microcistina (MC), um heptapeptídeo cíclico potencialmente perigoso devido à hepatotoxicidade. Considerando a baixa eficiência de tratamento convencional na remoção de MC em água, o exigente controle requer contínuo desenvolvimento tecnológico. O trabalho aborda duas técnicas de degradação de MC em água: (i) biodegradação utilizando *Saccharomyces cerevisiae* recombinante imobilizada e, (ii) fotodegradação com fotocatalisador TiO_2 combinado com irradiação UV-A. As tecnologias são comparadas perante benefícios e desvantagens. Reator em escala de bancada foi construído para tratamento de água contaminada com microcistina-LR ($220 \mu\text{g.L}^{-1}$) e, testado com fotocatalisador (1 mg.mL^{-1}) irradiado com lâmpada de luz negra e levedura recombinante imobilizada em suportes ($1 \times 1 \text{ cm}$) de espuma de poliuretano – PUF, para estes ensaios serão utilizados 5 suportes de PUF com as leveduras recombinantes. Alíquotas foram coletadas em intervalos regulares de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 min para análise de degradação fotocatalítica e 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas para biodegradação. Foi também realizado um segundo experimento de biodegradação, com as mesmas condições citadas, contudo utilizando 30 PUFs e coletas realizadas ao longo de 24 h de tratamento. O controle analítico de MC remanescente foi conduzido por etapas de pré-concentração e análise HPLC/PAD, também foi realizada validação intralaboratorial do método. Os resultados obtidos demonstram que o método analítico utilizado é preciso, exato, seletivo e linear dentro da faixa de trabalho de 1 a $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Obteve-se eficiência de 95% de fotodegradação de MCs em apenas 90 minutos de tratamento, não sendo observado adsorção e nem fotólise da toxina. Para os experimentos de biodegradação obteve-se em torno de 30% de degradação da concentração inicial de microcistina em 24 horas, contudo este valor representa $84 \mu\text{g.L}^{-1}$, concentração elevada se comparado a contaminações de águas superficiais relatadas na literatura. Os resultados indicam que a baixa eficiência da biodegradação se deve provavelmente a inibição da atividade da enzima *mtrA* pela microcistina linearizada, produto da reação enzimática. São sugeridos novos experimentos para confirmação.

Palavras-chave: Cianotoxina, *S. cerevisiae* recombinante, Degradação Biológica vs Fotoquímica.

ABSTRACT

Eutrophication, a process in which a water bodies becomes excessively rich in nutrients, can lead to the blooming of cyanobacteria. *Microcystis aeruginosa* is the most common specie among studied toxigenic ones, and it is producer of microcystin (MC), a potentially dangerous cyclic heptapeptide due to its hepatotoxicity. Considering the low efficiency of conventional treatment in removing MC from water, demanding control requires continuous technological development. The work approaches two techniques for MC degradation in water: (i) biodegradation using immobilized recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, and (ii) photodegradation with TiO_2 photocatalyst combined with UV-A irradiation. The technologies are compared about benefits and disadvantages. A bench-scale reactor was constructed for the treatment of water contaminated with microcystin-LR ($220 \mu\text{g.L}^{-1}$) and tested with photocatalyst (1 mg.mL^{-1}) irradiated with a black light lamp and recombinant yeast immobilized on 5 polyurethane foam (PUF) supports ($1 \times 1 \text{ cm}$). Samples were collected at regular intervals of 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min for photodegradation analysis and 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours for biodegradation. A second biodegradation experiment was also performed under the same conditions, using 30 PUFs and samples collected over 24 hours of treatment. The analytical control of remaining MC was conducted by pre-concentration steps and HPLC/PAD analysis, and intralaboratory method validation was performed. The results obtained demonstrate that the analytical method used was precise, accurate, selective, and linear within the working range of 1 to $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. It was observed 95% efficiency of photodegradation of MC in only 90 minutes of treatment, without observing adsorption or photolysis of the toxin. For the biodegradation experiments, around 30% of the initial microcystin concentration was degraded in 24 hours, an amount that represents $84 \mu\text{g.L}^{-1}$, a higher concentration when compared to surface water contaminations reported in the literature. The results indicate that the low efficiency of the biodegradation is due to inhibition of the enzyme (mlrA) activity by linearized microcystin, a product of the enzymatic reaction. New experiments are suggested to confirm it.

Keywords: Cyanotoxin, recombinant *S. cerevisiae*, Biological vs Photochemical Degradation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estruturas do heptapeptídeo microcistina-LR isolada de cianobactérias..	21
Figura 2- Representação da partícula de um semicondutor.....	23
Figura 3 – Representação de três estruturas polimórficas do TiO ₂ : (a) rutilo; (b) anatase; (c) brookite.....	25
Figura 4 - Esquema de degradação de renovação para MCLR usando WB9. As setas sólidas indicam a rota de degradação e as setas pontilhadas indicam a degradação em peptídeo ou aminoácido não detectado.....	27
Figura 5 - Micrografia eletrônica de varredura (x5000) de NFM imobilizado com células de levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Figura 6 - Fluxograma simplificado do projeto.....	32
Figura 7 – Sistema de filtração a vácuo utilizado nas etapas de pré-concentração de MCs por SPE.....	38
Figura 8 – Esquema simplificado do método de pré-concentração de MCs utilizando cartuchos SPE.....	39
Figura 9 - Reator de bancada utilizado para os tratamentos fotocatalíticos.....	40
Figura 10 –Suportes de PUF revestidos com ouro para análise com MEV.....	43
Figura 11 – Cromatograma do branco analítico comparado com padrão de 25 µg .L ⁻¹ de MC-LR.....	47
Figura 12 –Curva de calibração com injeção direta de padrão de MC-LR.....	47
Figura 13 – Curva de calibração construída a partir as etapas de pré-concentração.....	48
Figura 14 – Ensaio de fotodegradação de 220 µg.L ⁻¹ de MCs: B1- ensaio de fotodegradação com 1mg.mL ⁻¹ de TiO ₂ e radiação UV-A; B2- ensaio de adsorção utilizando TiO ₂ sem radiação UV-A; B3 – ensaio de fotólise utilizando apenas radiação UV-A; BC- experimento controle, sem TiO ₂ e sem radiação UV-A.....	52
Figura 15 – Cromatogramas de uma das repetições do ensaio de fotodegradação (B1): Linhas com cores diferentes representam os diferentes tempos de coleta das amostras.....	53
Figura 16 – Gráfico de ln(C/C ₀) vs tempo de fotodegradação para o experimento de fotodegradação de 220 µg.L ⁻¹ MCs catalisado com 1 mg.mL ⁻¹ de TiO ₂	54
Figura 17 – Imagens de microscopia obtidas por MEV dos PUFs após etapas de imobilização: (A-C) PUFs sem levedura; (A-S) PUFs imobilizados com levedura selvagem;(A-P) PUFs imobilizados com levedura recombinante.....	56

Figura 18 – Imagens de microscopia obtidas por MEV dos PUFs após ensaios de biodegradação: (B-C) PUFs sem levedura; (B-S) PUFs imobilizados com levedura selvagem; (B-P) PUFs imobilizados com levedura recombinante.....58

Figura 19 – Ensaios de biodegradação de 220 µg L⁻¹ MCs utilizando 5 PUFs imobilizados com *S. cerevisiae* recombinante, selvagem e sem leveduras.....60

Figura 20 – Ensaio de biodegradação de MCs utilizando 30 PUFs com leveduras recombinantes.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potencial redox de alguns oxidantes.....	22
Tabela 2 – Codificação das amostras de PUF analisadas por MEV.....	44
Tabela 3 – Parâmetros e figuras de mérito das curvas analíticas elaboradas.....	49
Tabela 4 – Recuperação e análise de precisão conduzida para MC-LR em amostras de água ultrapura com TiO ₂	50
Tabela 5 – Massas das amostras de PUFs imobilizados com levedura selvagem e recombinante.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FOA: 5-fluoroorótico

Adda: (2S,3S,8S,9S) 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Arg: Arginina

ASM-1: *Artificial sputum médium*

BC: Banda de condução

BOD: *Biochemical oxygen demand*

BV: Banda de valência

CPU: Poliuretano reforçado com celulose

D-ala: D-alanina

D-Glu: γ -ácido glutâmico

DPR: Desvio padrão relativo

EMCs: Extrato de microcistina

FM: Fase móvel

FP: Fator de pré-concentração

G418: Geneticina

GLU: Glutaraldeído

GRAS: *Generally regarded as safe*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LD: Limite de determinação

LiAc: Acetato de lítio

LQ: Limite de quantificação

MC-LR: Microcistina – LR

MCs: Microcistinas

Mdha: N-metildehidroalanina

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

NL: Nailon

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: *Phosphate – buffered saline*

PEG: Polietilenoglicol

PEI: Polietilenimina

POAs: Processos oxidativos avançados

PUF: Espuma de poliuretano

R²: Coeficiente de determinação

SPE: *Solid phase extraction*

UV/Vis: Radiação ultravioleta e visível

UV-A: radiação ultravioleta A (315 – 400 nm)

YEPD: *Yeast extract peptone dextrose*

YNB: *Yeast nitrogen base*

YPD: *Yeast peptone dextrose*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	PRODUÇÃO ALIMENTÍCIA NO ESTADO DO PARANÁ.....	20
3.2	CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS.....	20
3.3	PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAs)	21
3.3.1	Fotocatálise com TiO ₂	22
3.3.2	Estrutura/morfologia das partículas de TiO ₂	24
3.4	LEVEDURA RECOMBINANTE.....	25
3.4.1	Construção do plasmídeo de expressão (pRH809+ <i>mlrA</i>) e transformação em cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> (YRH1624 + <i>mlrA</i>).....	27
3.4.2	Técnicas de imobilização celular.	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	REAGENTES.....	33
4.2	FASE EXPERIMENTAL A - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANÁLITICO E PREPARO DO EXTRATO DE MICROCISTINA (EMCs).....	33
4.2.1	Preparo do extrato de microcistina (EMCs)	33
4.2.2	Validação intralaboratorial de método analítico de quantificação de MCs por HPLC-PDA	34
4.2.2.1	Seletividade.....	33
4.2.2.2	Linearidade.....	33
4.2.2.3	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	34
4.2.2.4	Precisão e exatidão.....	35
4.2.2.5	Ensaio de recuperação e adaptação do método de pré-concentração.....	36
4.3	FASE EXPERIMENTAL B - FOTODEGRADAÇÃO COM TiO ₂	39
4.3.1	Tratamento fotocatalítico com TiO ₂	39
4.4	FASE EXPERIMENTAL C - BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA RECOMBINANTE	41
4.4.1	Imobilização em espuma de poliuretano (PUF).....	41
4.4.2	Densidade das células imobilizadas	42
4.4.3	Ensaio de biodegradação	42
4.4.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43

4.5	CONTROLE ANALÍTICO.....	44
4.5.1	Análise com HPLC/PDA	44
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	FASE EXPERIMENTAL A - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO E PREPARO DO EXTRATO DE MICROCISTINA (EMCs).....	46
5.1.1	Validação intralaboratorial de método analítico de quantificação de MCs por HPLC-PDA	46
5.1.1.1	Seletividade.....	45
5.1.1.2	Linearidade e fator de pré-concentração.....	46
5.1.1.3	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	47
5.1.1.4	Precisão e exatidão.....	48
5.2	FASE EXPERIMENTAL B - FOTODEGRADAÇÃO COM TiO ₂	51
5.2.1	Tratamento fotocatalítico	51
5.3	FASE EXPERIMENTAL C - BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA RECOMBINANTE.....	55
5.3.1	Imobilização em espuma de poliuretano (PUF).....	55
5.3.2	Ensaio de biodegradação	59
	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

O aumento de nutrientes, em especial nitrogênio e fósforo em mananciais de água destinados ao consumo humano ou animais, seja através de despejo irregular de esgoto doméstico, industrial ou fertilizante agrícola acarreta grave problema ambiental denominado de eutrofização. Em conjunto com outros fatores físicos e bióticos favorecem a floração de cianobactérias, sendo que determinados gêneros produzem cianotoxinas de caráter tóxico para humanos e animais, além de potencial carcinogênico (Kuriama et al., 2012).

Dentre as cianobactérias toxigênicas, *Microcystis aeruginosa* é a mais comumente estudada, sendo uma das principais produtoras de microcistina (MC), um heptapeptídeo cíclico potencialmente perigoso devido ao efeito hepatotóxico (Liu et al., 2018).

A contínua preocupação perante ocorrência de MC em mananciais de água decorre não somente devido ao uso em produtos farmacêuticos – principalmente em hemodiálise, mas também poderia acarretar implicação indesejável para as diversas finalidades, seja em consumo doméstico, piscicultura, agricultura, abastecimento industrial, em especial à indústria alimentícia e, também em lazer (Matthiensen et al., 1999).

A Organização Mundial da Saúde - OMS define o limite máximo de microcistina-LR, a mais comum entre as MCs, na água potável em $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Em consideração ao baixo nível permitido, aliado a elevada estabilidade resultante de estrutura química cíclica, o tratamento de água tradicional vem demonstrando pouca eficiência na remoção de MCs, estudos vêm sendo realizados para remoção como degradação de MCs. Outrossim, o aquecimento global causando escassez de água, expondo-a cada vez mais à eutrofização e, conseqüente contaminação com níveis alarmantes de substâncias tóxicas – carcinogênicas, requerem desenvolvimento de novas tecnologias incorporando inovações passíveis de aplicações em planta de tratamento de águas (Schneider et al., 2019).

Uma alternativa desenvolvida, utiliza processos oxidativos avançados (POAs) para degradação de MC. O procedimento usa a fotocatalise mediada por fotocatalisadores como o dióxido de titânio (TiO_2). As partículas de óxido metálico irradiados com radiação na região UV/Vis geram radicais hidroxilas capazes de

hidroxilar ligações peptídicas, rompendo a estrutura cíclica da molécula de MC (Jacobs et al., 2013; Schneider et al., 2019).

Outra alternativa promissora vem empregando técnicas de biocontrole com microrganismos degradadores de MCs. TSUJI et al., (2006) conseguiram 100% de degradação de MC-LR utilizando biofilme de *Sphingosinicella microcystinivorans* B9 aderidos a um suporte, após 16 horas de exposição. Contudo, há ressalvas para a aplicação direta de espécies do gênero no tratamento de água, visto que esta ação pode representar riscos à saúde, devido a sua ocorrência como patógenos oportunistas comuns em hospitais, além de presença frequente de genes de resistência a antibióticos em águas superficiais (Coleman et al., 2013; Zhang & Fang 2009).

Visando o aproveitamento desse potencial de biodegração, uma técnica vem sendo estudada para uso desta tecnologia de biologia molecular no tratamento de águas superficiais, trata-se da construção de linhagens de leveduras recombinantes capazes de expressar os genes responsáveis pela degradação da toxina, sendo que estas leveduras podem ser imobilizadas e aplicadas diretamente no tratamento de água, na forma de um biofilme ou suportes porosos (Kuriama et al., 2012; Kilonzo et al., 2011).

O presente trabalho abordará as duas técnicas de degradação de microcistina em soluções aquosas, biodegradação utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante imobilizada e fotodegração utilizando o fotocatalisador TiO_2 irradiado por radiação UV/Vis, com a finalidade de comparar as duas tecnologias a fim de descrever quais os benefícios e desvantagens do uso de cada, espera-se potencial de degradação em ambos os experimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar dois métodos de degradação de microcistina em solução aquosa, fotodegradação mediado pelo fotocatalisador TiO_2 e biodegradação pela aplicação da levedura recombinante *S. cerevisiae* VI08R imobilizada em espuma de poliuretano (PUF), com a finalidade de comparar as tecnologias a fim de descrever quais os benefícios e desvantagens do uso de cada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar validação intralaboratorial do método de pré-concentração e análise de microcistina por HPLC/PDA;
- Identificar possível adsorção de microcistina no fotocatalisador e se essa pode se desprender ao longo do processo de fotodegradação;
- Identificar possível degradação por fotólise devido à radiação UV-A nos experimentos de fotodegradação;
- Avaliar comparativamente vantagens e desvantagens da técnica de imobilização da levedura recombinante estudada;
- Avaliar o potencial de degradação de microcistina pela levedura recombinante se comparado com a utilização de levedura selvagem, e experimento controle, identificando possível adsorção no biocatalisador;
- Avaliar a eficiência de ambos os processos, relacionando a porcentagem de microcistina degradada em relação ao tempo de tratamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO ALIMENTÍCIA NO ESTADO DO PARANÁ

O estado do Paraná é um importante centro agroindustrial brasileiro devido ao solo fértil e condição climática propícia. Conforme Agência de Notícias do Paraná, o estado é o segundo maior produtor de grãos do país, com contribuição de 14,9% na produção nacional, ficando atrás apenas do estado de Mato Grosso que contribui com 29,3% (IBGE, 2023). Outro destaque do Estado refere-se à piscicultura com aumento da produção de pescados alcançando 18,7%, em relação a 4,9% no Brasil (PARANÁ, 2020).

Tendo em vista o potencial do Estado na produção agroalimentar, é de relevante importância o controle da qualidade da água destinada ao setor produtivo, devido a ocorrência de micotoxinas nos alimentos ou, ainda, eutrofização que ocasiona a proliferação de cianobactérias toxigênicas. Contudo, apenas o contínuo monitoramento de toxinas naturais em água não é suficiente para se garantir condições desejáveis para os mais diversos ramos produtivos de alimentos, é necessário o desenvolvimento de tecnologias eficientes, econômicas e viáveis para a eliminação de tais toxinas da água, a fim de garantir a qualidade dos alimentos produzidos.

3.2 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

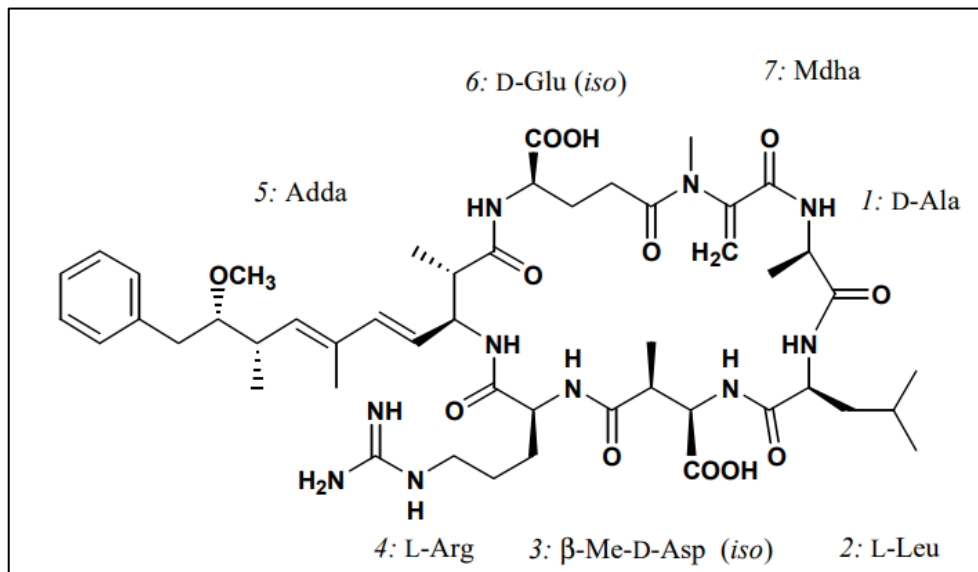
Cianobactérias são classificadas como organismos procariontes, por não possuírem núcleo verdadeiro e não possuir conteúdo celular diferenciado dentro de membranas, semelhantes às bactérias, contudo são fotossintetizantes e produtores primários assim como as algas eucariontes, cuja coloração verde azulada decorre da presença de diferentes pigmentos fotossintéticos, seja clorofila (coloração esverdeada) ou a ficocianina (coloração azul) (Sant'anna et al., 2006).

Ambientes que recebem grandes quantidades de nutrientes, em especial fósforo e nitrogênio, que favorecem o crescimento acelerado de algas e cianobactérias, esse processo é denominado de *bloom* (floração). Em mananciais destinados ao abastecimento público, abastecimento para indústrias de alimentos ou até mesmo recreação, este fenômeno pode causar grandes problemas de

saúde pública devido às toxinas produzidas por esses microrganismos (Sant'anna et al., 2006).

As toxinas biossintetizadas por cianobactérias são endotoxinas, são liberadas para o meio externo por rompimento da parede celular, o que pode ocorrer por senescência da célula ou sob ação de elementos externos como algicidas. Dentre essas toxinas encontra-se as microcistinas (MCs), heptapeptídeos cíclicos (Figura 1) produzidos por diversas espécies do gênero *Microcystis*, com destaque a *M. aeruginosa*. Dependendo da dose ingerida pode ocorrer intoxicações agudas e crônicas ou até mesmo provocar a morte de animais em horas ou dias (Sant'anna et al., 2006). Huisman *et al.* (2005) dedica o primeiro capítulo de seu livro *Harmful Cyanobacteria* a relatar diversos casos de danos à saúde de humanos e animais por ingestão de cianotoxinas, sendo a maioria causada pela ingestão de MCs.

Figura 1- Estruturas do heptapeptídeo microcistina-LR isolada de cianobactérias.



Fonte: adaptado de Harada et al., (2004).

3.3 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAs)

Os processos oxidativos avançados (POAs) baseiam-se na oxidação de compostos orgânicos através de radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$). Estes radicais apresentam um alto potencial redox se comparado com outros oxidantes (Tabela 1) (Freire et al., 2000; Martins, 2011).

Tabela 1 - Potencial redox de alguns oxidantes

Espécie	Reação	Volts (V)
Flúor	$F^{2+} + 2H^{+} + 2e \leftrightarrow 2HF$	3,05
Radical Hidroxila	$\bullet OH(g) + H^{+} + e^{-} \leftrightarrow H_2O$	2,81
Oxigênio Atômico	$O(g) + 2H^{+} + 2e \leftrightarrow H_2O$	2,42
Ozônio	$O_3 + 2H^{+} + 2e \leftrightarrow O_2 + H_2O$	2,07
Peroxido de Hidrogênio	$H_2O_2 + 2H^{+} + 2e \leftrightarrow 2H_2O$	1,77
Permanganato	$MnO_4^{-} + 4H^{+} + 3e \leftrightarrow MnO_2 + 2H_2O$	1,68
Cloro	$Cl_2(g) + 2e \leftrightarrow 2Cl^{-}$	1,36
Dióxido de Cloro	$ClO_2 + H^{+} + e \leftrightarrow HClO_2$	1,28
Iodo	$I_2 + 2e \leftrightarrow 2I^{-}$	0,53

Fonte: Martins, L. M. (2011).

As vantagens dos POAs se dão em razão da sua sustentabilidade em longo prazo e a eficiência dos radicais hidroxilas em reagir com uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, promovendo sua total mineralização em substâncias mais simples e inofensivas como CO_2 e H_2O . Segundo Britto e Rangel (2008), os POAs são viáveis para o tratamento de efluentes cuja concentração do poluente não é muito elevada ($< 5,0 \text{ g.L}^{-1}$) aos quais outros processos de abatimento são inviáveis tecnicamente ou economicamente (Britto & Rangel, 2008; Nogueira & Jardim, 1998). Alguns métodos para a produção do radical hidroxila vêm sendo pesquisados, geralmente utilizando ozônio, reagente Fenton e fotocatalise (Freire et al., 2000; Martins, 2011).

3.3.1 Fotocatalise com TiO_2

Segundo Nogueira e Jardim (1998) a fotocatalise heterogênea começou a ser desenvolvida a partir de estudos na transformação de energia solar em química, com objetivo de produzir combustível de materiais mais econômicos. Desde então este processo se voltou para área ambiental, na qual seus benefícios foram utilizados, principalmente, no tratamento de efluentes (Nogueira & Jardim, 1998).

Neste processo o catalisador pode ser fixado em um suporte e colocado em contato com o efluente a ser tratado. O TiO_2 é um dos catalisadores mais utilizados nos processos de fotodegradação, atua como um semicondutor, ou seja, quando ativado por radiação UV/Vis são criadas em sua superfície bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC), entre esses níveis energéticos existe uma região chamada de *bandgap* (Figura 2) (Nogueira & Jardim, 1998; Tarelho, 2011). Ao absorver fótons com energia maior que a da energia de *bandgap*, elétrons da BV são promovidos para

a BC gerando assim uma lacuna (h^+) (Equação 1), este elétron promovido pode interagir com a lacuna h^+ recombinação-se no interior da estrutura do óxido ou na sua superfície, desativando assim o fotocatalisador através da liberação de energia térmica (Equação 2) (Zioli & Jardim, 1998). Porém ao entrar em contato com moléculas de água adsorvida na superfície do semiconductor, o potencial positivo (na faixa de +2,0 a +3,5 V) das lacunas formadas na banda de valência tem capacidade de produzir radicais hidroxilas (Equação 3).

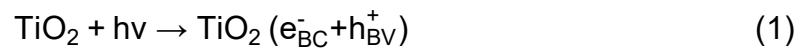
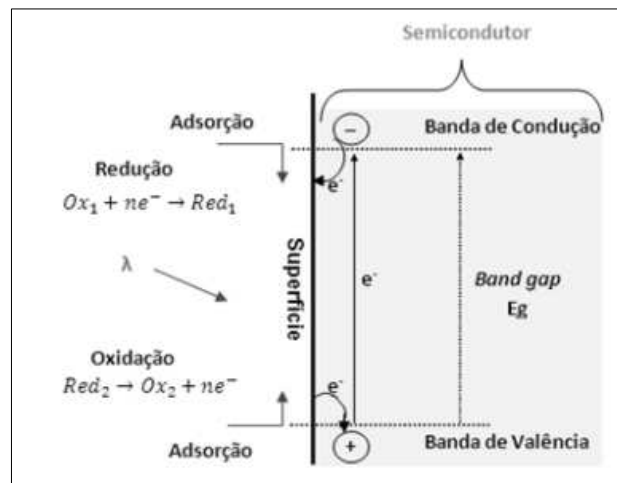


Figura 2- Representação da partícula de um semiconductor.

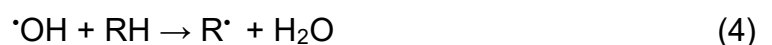


Fonte: Ilha, Jackson. (2012).



Estas hidroxilas produzidas são capazes de oxidar uma grande quantidade de poluentes orgânicos. A banda de condução, que recebe elétrons, por outro lado, pode reduzir determinadas moléculas na presença de água (Nogueira & Jardim, 1998).

A oxidação ocorre devido ao potencial do radical hidroxila de abstrair hidrogênio de compostos orgânicos (Equação 4).



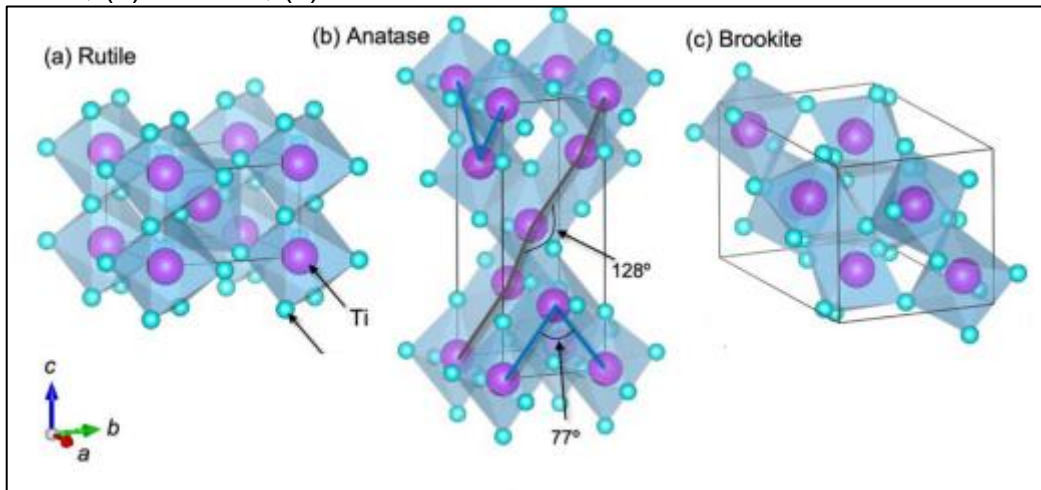
A eficiência da fotocatalise depende da competição entre o processo em que o elétron é retirado da superfície do semicondutor e o processo de recombinação do par elétron/lacuna. Assim, para garantir uma melhor eficiência no processo, é necessário um planejamento de como será realizado a fotodegradação, para estabelecer uma maior superfície de contato do fotocatalisador com as moléculas de água e com os contaminantes a serem degradados (Tarelho, 2011).

Um exemplo do estudo da fotocatalise para degradação de MCs foi o realizado por Jacobs et al., (2013), no qual foram utilizados dois fotocatalisadores, TiO_2 e ZnO para fotodegradação de uma solução aquosa de microcistina-LR ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$), sendo que o sistema foi irradiado usando lâmpadas de vapor de mercúrio a 125 W (sem o bulbo de vidro original) que foram inseridas na solução por meio de lâmpadas de quartzo (UV-C) ou Pyrex (UV-A). De acordo com os autores ambos os semicondutores exibiram uma alta capacidade de degradação em tempos de reação de 10 min (degradação maior que 95%), foram observados também fenômenos como adsorção de microcistina nos fotocatalisadores e fotólise da toxina quando utilizando lâmpada com bulbo de quartzo (UV-C).

3.3.2 Estrutura/morfologia das partículas de TiO_2

A partícula de TiO_2 apresenta variadas espécies alotrópicas, estas espécies diferem entre si devido a suas estruturas cristalinas (Figura 3), sendo todas construídas em conexões entre TiO_6 octaedros. As estruturas mais comuns são: rutilo (tetragonal $P4_2/mnm$), é formada em altas temperaturas e geralmente mais estável que as outras formas; anatase (tetragonal $P4_1/amd$), se forma em baixas temperaturas e em nanopartículas; brokita, uma forma metaestável que se forma em condições específicas de temperatura e pressão.

Figura 3 – Representação de três estruturas polimórficas do TiO_2 : (a) rutilo; (b) anatase; (c) brookite.



Fonte: adaptado de Hiroi, Zenji. (2022).

De acordo com Haque et al., (2017), a forma anatase apresenta maior eficiência fotocatalítica que a forma rutilo, em seus estudos o TiO_2 calcinado em temperaturas inferiores ($300\text{ }^\circ\text{C}$) apresenta melhor potencial que as amostras calcinadas em temperaturas mais elevadas (500 e $800\text{ }^\circ\text{C}$), justificam com o fato de que em temperaturas de calcinação menores, forma-se predominantemente a forma anatase, que possui grande área de superfície, tamanho de partícula menor e alta cristalinidade quando se comparado com as outras formas.

3.4 LEVEDURA RECOMBINANTE

O tratamento convencional da água remove células intactas de cianobactérias. No entanto, etapas que envolvem métodos químicos durante o processo, podem ocasionar lise celular liberando as cianotoxinas na água. Embora sejam aplicados métodos físico-químicos para degradar a toxina dissolvida (pré-cloração, carvão ativado, ozônio, radiação UV, entre outros), o alto custo e/ou poluição secundária pode inviabilizar o uso de tais métodos (Ahn et al., 2003). Dessa forma, o uso de microrganismos como biocontroladores/biodegradadores é uma alternativa de grande interesse, pois geralmente são mais econômicos e menos agressivos ao meio ambiente.

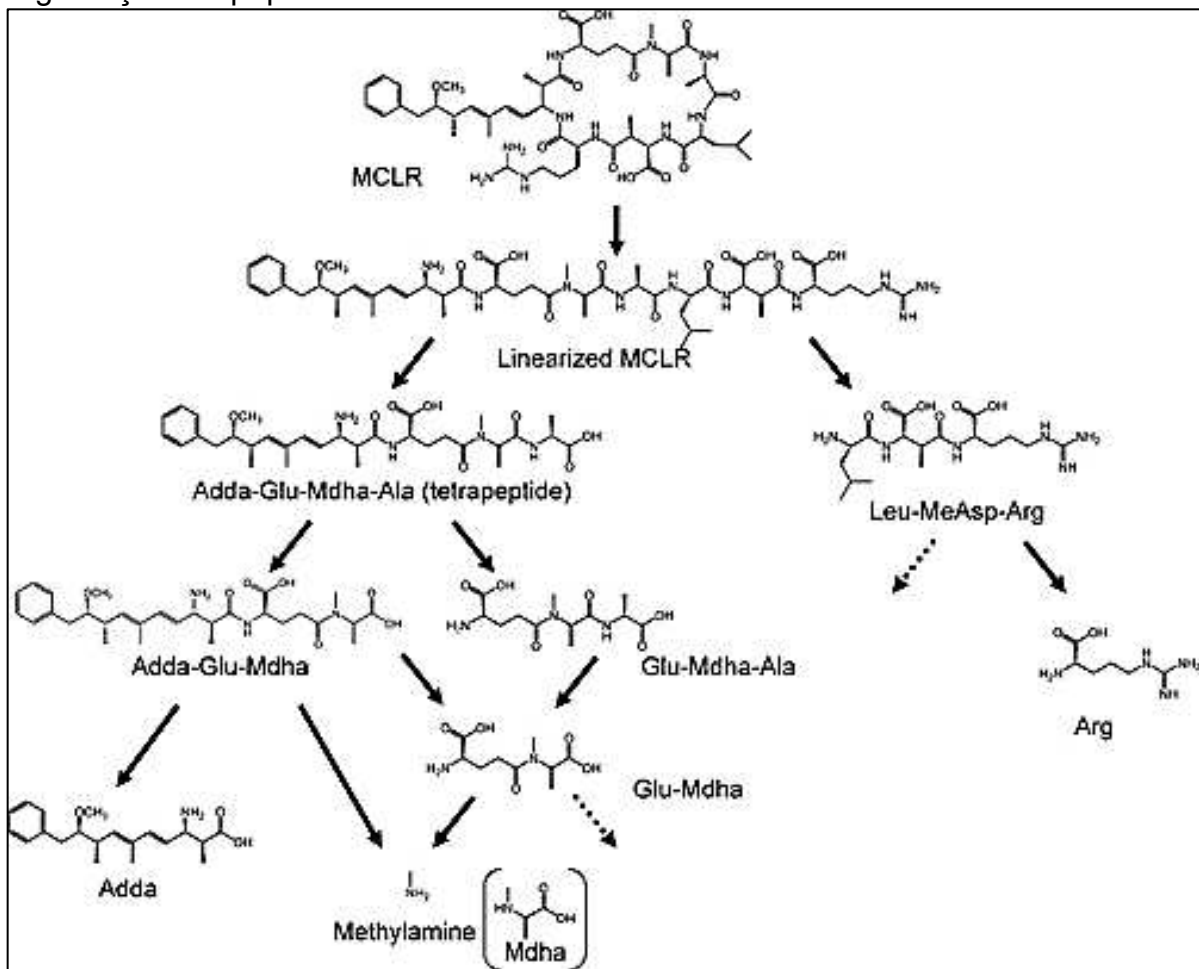
Algumas espécies bacterianas conseguem degradar MCs, um exemplo é *Sphingosinicella microcystinivorans* linhagem B9, que recentemente foi demonstrado

também ser capaz de degradar micotoxinas com resíduo de aminoácido na estrutura molecular (ex. ocratoxina e fumonisina) (Jin et al., 2018). Estudos têm proposto o uso destes microrganismos como estratégia de controle e/ou descontaminação de águas superficiais destinadas ao consumo humano (Bourne et al., 2006; Tsuji et al., 2006). Contudo, para evitar os riscos à saúde do uso direto de bactérias em tratamentos de água ou outras utilizações em alimentos, vários estudos propõem uso dos produtos de expressão gênica heteróloga dos genes específicos em microrganismos seguros.

Cepas de *Sphingomonas* (ACM-3962) apresentaram clusters de genes A, B, C e D capazes de codificar enzimas responsáveis por quebra de ligações peptídicas presentes na molécula de MC-LR. De acordo com Saito et al., (2003) o gene *mlrA* em *Sphingomonas* sp. MJ-PV e bactérias MD-1 e Y2 é exclusivo para degradação de microcistina. A metalopeptidase codificada é a enzima responsável pela clivagem da ligação peptídica Adda-Arg, linearizando a estrutura, tornando susceptível a hidrólise enzimática e consecutiva degradação em tetrapeptídeo (Figura 4). Posteriormente a estrutura linear pode ser degradada pelas peptidases codificadas pelos genes *mlrB* e *mlrC*. A enzima *mlrB* degrada a molécula em um tetrapeptídeo e a enzima *mlrC* hidrolisa em peptídeos e aminoácidos conforme demonstrado na Figura 4. (Hashimoto et al., 2009).

S. cerevisiae, classificada entre um organismo GRAS (*generally regarded as safe*), com histórico de uso seguro na alimentação, é bem aceito para produção de proteínas farmacêuticas por não apresentar risco de constituinte pirogênico na parede celular, reduzindo a necessidade de inúmeros testes de segurança biológica (Martínez et al., 2012). Um exemplo da utilização desta técnica foi a pesquisa de Liu et al., (2016), que desenvolveram uma vacina com *S. cerevisiae* recombinante com miostatina (MSTN) inativada por calor, um gene que influencia o desenvolvimento do crescimento muscular e, particularmente, regula negativamente o crescimento do músculo esquelético em várias espécies animais inclusive em humanos, a vacina foi administrada via oral em coelhos os quais apresentaram crescimento mais rápido e seus músculos eram mais pesados do que o grupo de controle, segundo os autores, a levedura é considerada um hospedeiro simples e de baixo custo para a expressão de proteínas.

Figura 4 - Esquema de degradação de renovação para MCLR usando WB9. As setas sólidas indicam a rota de degradação e as setas pontilhadas indicam a degradação em peptídeo ou aminoácido não detectado.



Fonte: Hashimoto et al., (2009)

Tendo em vista as vantagens da utilização de *S. cerevisiae*, a levedura mostra-se um promissor microrganismo hospedeiro na expressão heteróloga dos genes *mlr* e ferramenta no biocontrole/biodegradação de cianofíceas e suas toxinas.

3.4.1 Construção do plasmídeo de expressão (pRH809+ *mlrA*) e transformação em cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (YRH1624 + *mlrA*).

O gene *mlrA* pode ser expresso em hospedeiros como, por exemplo, células de *S. cerevisiae* com a finalidade de facilitar o cultivo e suas possíveis aplicações, pois a *Sphingosinicella microcystinivorans* (cepa B9) necessita de tempo relativamente maior (72 horas em meio líquido composto de peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1% e glicose 0,05%, a 25°C) se comparado com a levedura (24 horas a

25°C em meio YPD). O genoma da cepa B9 de *S. microcystinivorans* foi depositado no *GenBank* (número de acesso AP018711; Jin et al., 2018). Para construir o plasmídeo de expressão é necessário utilizar um fragmento de DNA contendo o gene *mlrA* desenvolvido por códons e regiões de homologia com o vetor de interação cromossômica pRH809, o fragmento em questão deve então ser digerido com as enzimas de restrição (*SpeI* e *Sall*), sendo os fragmentos posteriormente montados.

O plasmídeo de expressão sintetizado pode ser transformado em células de *E. coli* NEB10 β , a clonagem bacteriana é recomendada devido as condições fisiológicas destas células, sendo necessárias para receber e permitir altos níveis de replicação do plasmídeo. Após incubação das culturas bacterianas hospedeiras, o plasmídeo pRH809+ *mlrA* deve ser extraído e utilizado para criação de células de leveduras *S. cerevisiae* recombinante. (Dexter et al., 2018). Para isso Gietz e Woods (2002) descrevem o método que consiste em tratar o cultivo celular com solução LiAc/SS-DNA/PEG [acetato de lítio (1,0M) / DNA carregador (esperma de salmão 2,0 mg.mL⁻¹) / polietilenoglicol (50%, m/v)] e com o plasmídeo de expressão. Para selecionar apenas as células modificadas, estas devem ser cultivadas em placas de ágar YPD + geneticina (G418, 200 μ g.ml⁻¹) e incubados por 48 h a 30°C. Apenas as células transformadas irão crescer, pois o vetor de expressão (pRH809) possui marcadores AmpR e KanMX, que conferem resistência a ampicilina e geneticina (G418) ao hospedeiro.

Após etapa de clonagem o plasmídeo de expressão (pRH809 + *mlrA*), será digerido com utilização de enzimas de restrição (*SacI* e *XhoI*), em seguida os fragmentos devem ser analisados e purificados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O fragmento pRH809 + *mlrA* será inserido no fragmento pRH809 com regiões de homologia *URA3* com utilização da enzima *T4 DNA* ligase, para a construção do novo plasmídeo que será transformado em células de leveduras recombinantes (YRH1624 + *mlrA*). As leveduras podem ser cultivadas em placas com meio YNB com adição de Uracil (175 μ g.mL⁻¹) e ácido 5-Fluoroorótico (5-FOA, 1 mg.mL⁻¹). De acordo com Yang et al., (2022) fragmentos de DNA podem ser inseridos entre um promotor ADH1 (P_{ADH1}) e uma sequência de codificação *URA3*, sendo suportados até 130 pb de comprimento. A expressão regulada por P_{ADH1} de *URA3* permite a conversão de 5-FOA em 5-fluorouracil, que é tóxico e causa a morte das células, contudo se o fragmento inserido for maior que 130 pb a expressão de *URA3* é inibida, permitindo o

crescimento de células na presença de 5-FOA, contanto que o meio seja enriquecido com Uracil. Portanto esta técnica se aplica de forma satisfatória para seleção das células recombinantes.

Após a seleção das cepas recombinantes YRH1624 + *mlrA*, estas devem ser cruzadas com cepas YRH1636 do tipo selvagem, sendo ambas as cepas cultivadas em meio YPD (30° C por 4 h), e também em placas contendo meio YNB-Uracil (30° C por 48 h). As cepas YRH1636 selvagem e diploide serão capazes de crescer na ausência de Uracil.

3.4.2 Técnicas de imobilização celular.

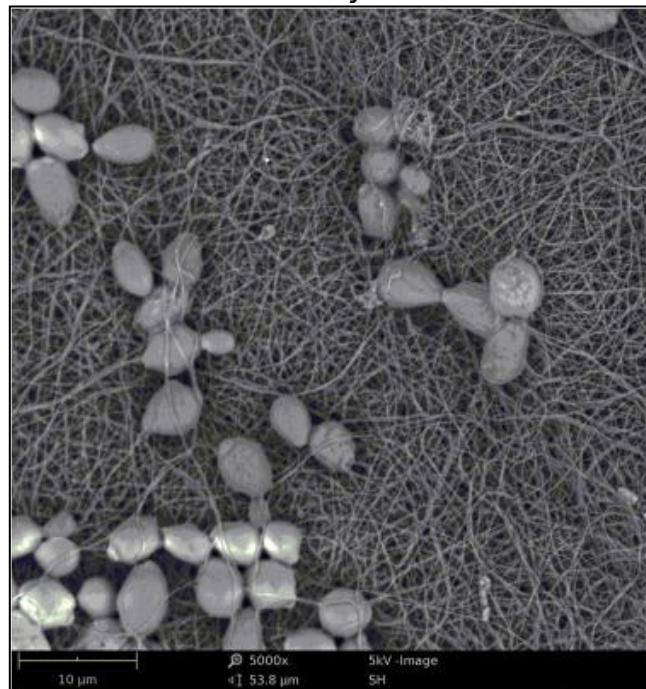
A técnica de imobilização de células é uma importante ferramenta em processos de fermentação contínua, podendo maximizar o rendimento do processo em biorreatores de leito fluidizado como, por exemplo, na produção de etanol, com vantagens em comparação com o modo em batelada, como aumento do rendimento de etanol e a redução do tempo de fermentação. Gabardo et al., (2014) investigaram o uso de cepas de *Kluyveromyces marxianus* para converter soro ou permeado de soro em etanol, usando biorreatores de células imobilizadas em alginato de cálcio em leito fluidizado contínuo, de acordo com os autores a utilização de biorreatores com células imobilizadas demonstrou aumento considerável na produção de etanol e na redução do tempo de fermentação, se comparado com métodos em batelada.

Kilonzo et al., (2011) estudaram a imobilização de cepas de *S. cerevisiae* recombinante em materiais fibrosos como náilon (NL), espuma de poliuretano (PUF) e fibras de poliuretano reforçado com celulose (CPU), foram avaliados diversos parâmetros para verificar a capacidade das matrizes fibrosas na manutenção das culturas. Os autores obtiveram 90% de adsorção das células utilizando PUF tratada por revestimento de polietilenimina (PEI), que consiste em revestir a matriz fibrosa em solução aquosa contendo o polímero. Por se tratar de um polímero catiônico altamente ramificado, a polietilenimina é amplamente utilizada para revestir superfícies de celulose para melhorar o biocatalisador e a imobilização celular (D'souza & Kamath, 1988; Albayrak & Yang, 2002). Uma segunda etapa pode ser empregada para maximizar a adsorção das células, trata-se de uma reticulação de glutaraldeído, que pode reagir com proteínas, como a Lisina, na bicamada lipídica da membrana celular, em seguida seus grupos aldeído também podem reticular os grupos amino nas

superfícies de materiais revestidos com PEI para promover ao suporte celular interações por ligação química (López-Gallego et al., 2005; Vallejo-Becerra et al., 2008).

Armani et al., (2019) realizaram imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em nanofibras de nylon-6 para aplicação em fermentação de suco de uva (Figura 5). Os autores relatam que a leveduras imobilizadas apresentam possibilidade de múltipla reutilização, não havendo perda significativa da eficiência mesmo após três ciclos de fermentação, este resultado é justificado devido à alta porosidade do material utilizado que resultou em maior fixação das células no suporte.

Figura 5 - Micrografia eletrônica de varredura (x5000) de NFM imobilizado com células de levedura de *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Armani et al., (2019)

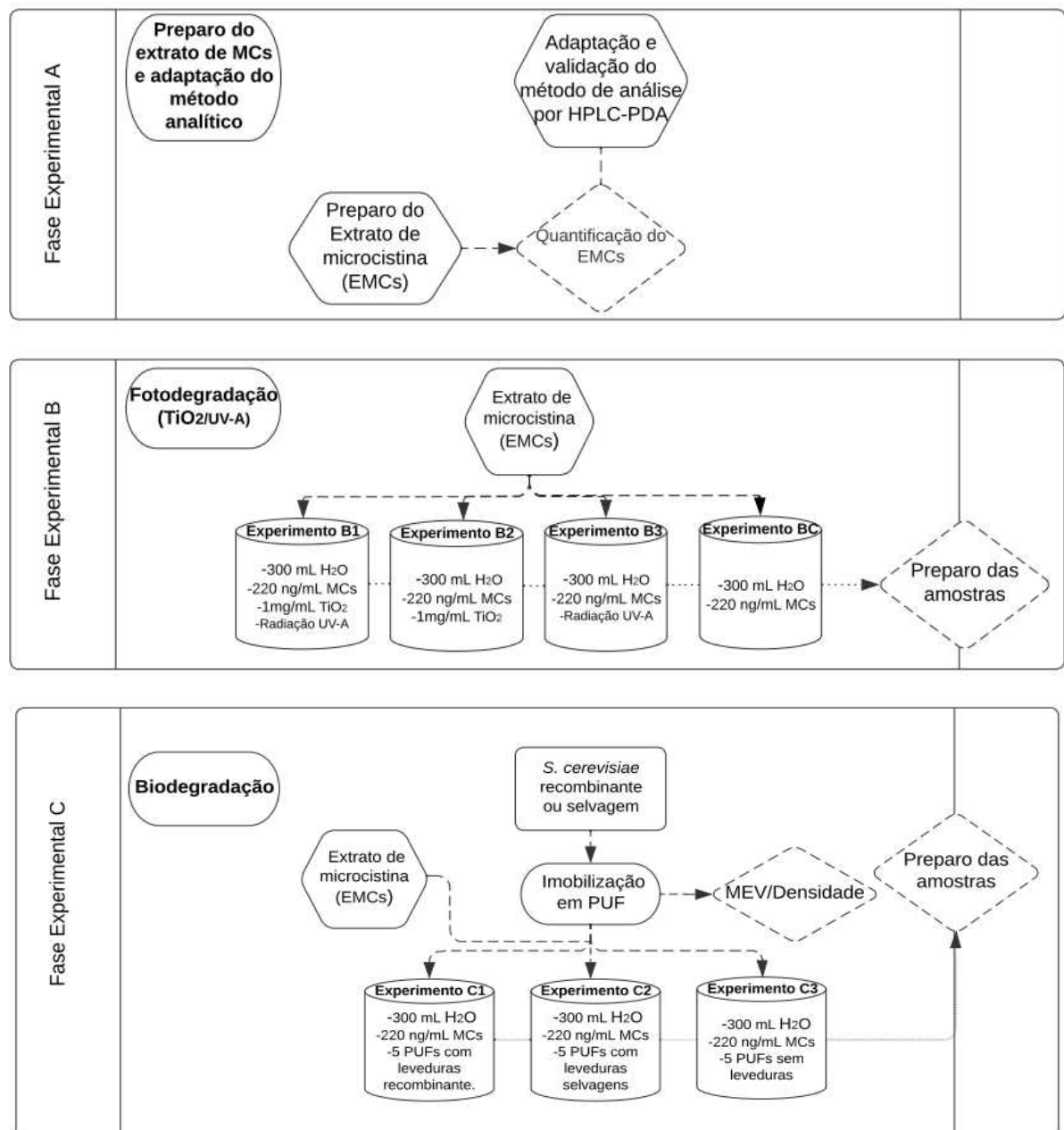
Esta biotecnologia de imobilização celular pode ser utilizada não apenas para processos fermentativos, biorreatores para tratamento de água e efluentes podem ser acoplados com matrizes contendo culturas celulares de interesse imobilizadas, sendo uma ótima alternativa para purificação ou redução de carga poluidora. Silva et al., (2005) aplicaram bactérias redutoras de sulfato (SRB) e arqueias metanogênicas imobilizadas em espuma de poliuretano (PUF), obtendo bons resultados na redução de sulfato e DQO (demanda química de oxigênio) em biorreatores anaeróbicos.

Estudos sobre a biotecnologia *Lentikats* (patente alemã DE 198 27 552), demonstram também ser uma alternativa promissora para a imobilização celular, baseada no encapsulamento de células em uma matriz de hidrogel porosa de álcool polivinílico (PVA). De acordo com Boušková et al., (2011) a matriz com excelentes características físicas e mecânicas (elasticidade, baixa abrasão), proporcionou uma longa durabilidade do biocatalisador. Os mesmos autores estudaram a aplicação desta biotecnologia para imobilização de bactérias desnitrificantes para remover nitrogênio de diferentes tipos de águas residuais industriais, demonstrando um aumento da robustez de culturas desnitrificantes para condições operacionais desfavoráveis como alta salinidade (salmouras) ou altas concentrações de compostos tóxicos (difenilguanidinafabricação, resíduos de mineração de urânio).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma apresentado na Figura 6, representa de forma simplificada os procedimentos experimentais, sendo as amostras analisadas nos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Figura 6 - Fluxograma simplificado do projeto.



Fonte: O próprio autor (2022).

4.1 REAGENTES

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada neste trabalho foi a PE-2 (levedura diploide brasileira produtora de etanol; Fermentec, Piracicaba, Brasil), a cepa recombinante foi previamente construída em trabalhos anteriores conforme descrito em Silva et al., (2023). Os reagentes utilizados foram acetato de amônio (grau HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich), acetonitrila (grau HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich), padrão de Microcistina-LR adquirido da empresa Wako Pure Chemical Industries Ltda (Japan), metanol (grau HPLC $\geq 99.9\%$, da marca Riedel de Haen/Honeywell), TiO_2 (Synth U.S.P. 100% anatase), solução tampão de fosfato [PBS (phosphate-buffered saline) 0,1 M em pH 7,4 (0,079 M de Na_2HPO_4 + 0,027M de NaH_2PO_4)], polietilenimina (solução 50% m/v em H_2O , Sigma-Aldrich).

4.2 FASE EXPERIMENTAL A - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANÁLITICO E PREPARO DO EXTRATO DE MICROCISTINA (EMCs)

4.2.1 Preparo do extrato de microcistina (EMCs)

O preparo do extrato de microcistina foi realizada no Laboratório de Produção de Imunorreagentes e Técnicas Moleculares (Lab. LIM - CCA/UEL). Conforme descrito por Kuriama, et al., (2012) a *Microcystis* spp. NIES TAC95 foi armazenada com inoculações quinzenais em duplicata, em tubos de ensaio de 22 mL, com 10 mL de cultivo a 10% (v/v) em meio ASM-1 (*artificial sputum médium*) estéril, ficaram a 27°C sob iluminação ($20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) em incubadora BOD (*biochemical oxygen demand*) com fotoperíodo de 12 h.dia⁻¹ e agitação diária.

Para a produção do extrato concentrado a cepa TAC95 foi inoculada inicialmente a 10% (v/v) em 4 tubos de ensaios nas mesmas condições descritas anteriormente, após quinze dias os cultivos foram transferidos para 2 erlenmeyers com capacidade de 250 mL a 20% (v/v) em meio ASM-1 estéril, totalizando 100 mL de cultivo em cada frasco, posteriormente foram inoculados nas mesmas condições. O procedimento foi repetido após 15 dias para a obtenção de 1L de cultivo a 20% (v/v) com densidade aproximada de 10^6 células.mL⁻¹.

Após obtenção de biomassa, o cultivo foi centrifugado a 3500G por 15 minutos a 4°C, o biovolume concentrado foi então congelado e descongelado três vezes,

procedendo-se de sonicação em lavadora ultrassônica (*Unique Ultracleaner800* 110V), posteriormente foi realizada filtragem sequencial a vácuo utilizando membranas de estér de celulose com porosidade de 0,45 e 0,2 μm e ressuspensão em água ultrapura, esses procedimentos foram repetidos até a obtenção de 2 mg de extrato de microcistina (MCs) em 100 mL de água ultrapura, quantidade necessária para realizar todos os experimentos de degradação, o extrato foi estocado a -20°C em tubos de centrifuga. A quantificação de MCs foi realizada por cromatografia conforme método descrito no item 4.4.1.

4.2.2 Validação intralaboratorial de método analítico de quantificação de MCs por HPLC-PDA

4.2.2.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico representa a capacidade deste de identificar/quantificar o analito mesmo na presença de interferentes que possam prejudicar o sinal analítico obtido, como impurezas, subprodutos de degradação, diluentes, entre outros (ANVISA, 2017).

Para comprovação da seletividade foi realizada a comparação dos cromatogramas do mesmo ponto da curva pré-concentrada ($25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR) e os cromatogramas dos brancos, sendo soluções que passaram por todas as etapas de pré-concentração, contudo sem fortificação com padrão de MC-LR, afim de verificar sinais de ruídos ou interferentes no tempo de retenção específico para o analito (ANVISA, 2017).

4.2.2.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada de forma que sua capacidade de obter resposta analítica seja diretamente proporcional à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). Portanto, foi elaborada uma curva analítica de calibração contendo concentrações teóricas de MC-LR variando de 25 a 500 ng.mL^{-1} . As soluções foram preparadas a partir do padrão seco de Microcistina-LR, o qual foi dissolvido em metanol compondo uma solução estoque de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, a partir desta solução foram realizadas diluições em metanol resultando em 7 soluções

com as respectivas concentrações, 25, 50, 75, 150, 250, 400 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a construção da curva de calibração. Também foi necessário a construção de uma curva pré-concentrada de MC-LR que consistiu nos seguintes pontos, 1, 5, 10, 15, 25 e 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, todos os pontos foram submetidos as etapas de pré-concentração de acordo com o método descrito no item 4.1.2.5, as análises foram todas realizadas em triplicata.

Seguindo as diretrizes de INMETRO (2020), as equações da reta para o ajuste linear dos resultados analíticos foram obtidas através da Equação 5.

$$y = ax + b \quad (5)$$

Em que:

y = resposta média (área do pico);

x = concentração do análio (ng.mL^{-1} ou $\mu\text{m.L}^{-1}$);

a = inclinação da curva;

b = valor da intersecção com o eixo y, quando x = 0.

A linearidade dos métodos está representada pelas equações de regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) (INMETRO, 2020 e ANVISA, 2017)

4.2.2.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Os Limites de Detecção - LD e de Quantificação - LQ foram determinados pelas curvas utilizadas para os cálculos de linearidade do método. O LD representa a menor concentração de MCs capaz de ser detectada pelo método cromatográfico utilizado. Este parâmetro foi obtido pela Equação 6, de acordo com RDC nº166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017)

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (6)$$

Em que:

LD = limite de detecção ($\mu\text{g.L}^{-1}$);

DP_a = desvio padrão do intercepto com eixo y das curvas de calibração elaboradas;

IC = inclinação média das curvas;

Diferente do LD que determina a menor concentração de MCs não sendo necessariamente quantificável, o LQ por sua vez determina a concentração mínima quantificável do analito pelo método cromatográfico. Seu cálculo foi determinado pela Equação 7.

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (7)$$

Em que:

LQ = limite de quantificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$);

DP_a = desvio padrão do intercepto com eixo y das curvas de calibração elaboradas;

IC = inclinação média das curvas;

4.2.2.4 Precisão e Exatidão

A precisão determina a proximidade entre os resultados obtidos de múltiplas coletas de uma mesma amostra, ela pode ser avaliada a partir de dois níveis distintos: repetibilidade, determinada pela precisão intracorrida, avaliada por ensaios de recuperação em três níveis de concentrações (2, 14 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$), um baixo, um médio e um alto respectivamente, em sete replicatas em um mesmo dia e precisão intermediária, determinada pela precisão intercorrida, avaliada para as mesmas três concentrações, analisadas em sete replicatas em três dias diferentes.

Tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária foram certificadas com base no cálculo da média dos valores de desvio padrão relativo –DPR de cada um dos níveis de concentração estudados, conforme Equação 8.

$$DPR = \frac{DP_a}{CMD} \times 100 \quad (8)$$

Em que:

DPR = desvio padrão relativo (%);

DP_a = desvio padrão do intercepto com eixo y das curvas de calibração elaboradas;
 CMD = concentração média determinada (µg.L⁻¹).

A exatidão do método se refere ao grau de conformidade dos valores obtidos nos experimentos de recuperação em relação ao valor considerado verdadeiro (concentração teórica). Tanto a exatidão, quanto a precisão do método foram determinadas com experimentos de recuperação conforme descrito no item 4.1.2.5. A porcentagem de recuperação foi definida pela Equação 9. (ANVISA, 2017)

$$REC = \frac{C_{\bar{x}}}{C_t} \times 100 \quad (9)$$

Em que:

REC = porcentagem de recuperação (%);

$C_{\bar{x}}$ = concentração média experimental (µg.L⁻¹);

C_t = concentração teórica (µg.L⁻¹).

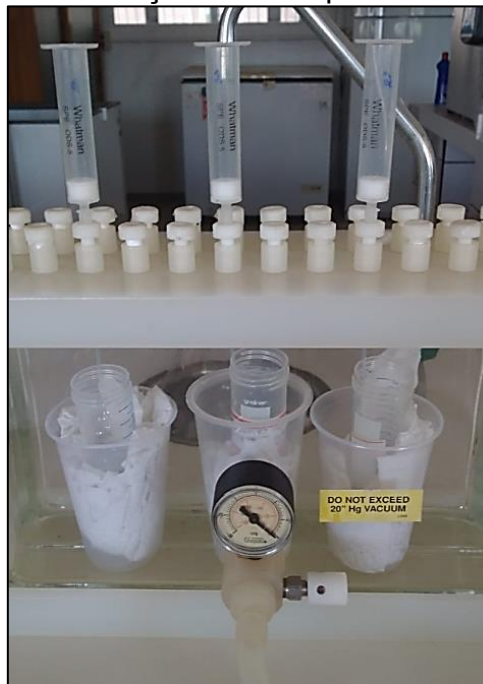
4.2.2.5 Ensaio de recuperação e adaptação do método de pré-concentração.

A extração de MCs para análise cromatográfica foi realizado procedendo modificação da metodologia descrita por Jurkevicz (2017). O ensaio de recuperação consistiu de coleta em triplicata de amostras de 55 mL de água ultrapura, contendo 1 mg.mL⁻¹ de TiO₂ (Synth U.S.P. 100% anatase) e fortificada com concentrações de 2, 14 e 30 µg.L⁻¹ de padrão de MC-LR. As amostras foram centrifugadas a 5000 G por 10 minutos a 4 °C, na metodologia de referência as amostras eram filtradas, posteriormente 50 mL dos sobrenadantes foram submetidos à Extração em Fase Sólida – SPE (*Sólid Phase Extraction*) (Cartucho SPE - Whatman® ODS-5, 500 mg).

Os cartuchos foram acoplados em um sistema a vácuo (Figura 7), sob pressão variando de 100 a 150 mm Hg em bomba de vácuo e ar comprimido (Fabbe, modelo 141 Tipo 2VC), com vazão controlada entre 2 a 5 mL.min⁻¹. Os cartuchos SPE foram ativados com 4 mL de metanol e 4 mL de água ultrapura. Após passagem das amostras nos cartuchos foi realizada uma etapa de limpeza, com a finalidade de remover impurezas retidas no cartucho, consistindo de passagem de 5 mL de água ultrapura, por fim, foi realizada eluição com 5 mL de metanol para arraste do analito retido, este volume foi dividido em dois tubos de ensaio com capacidade de 10 mL

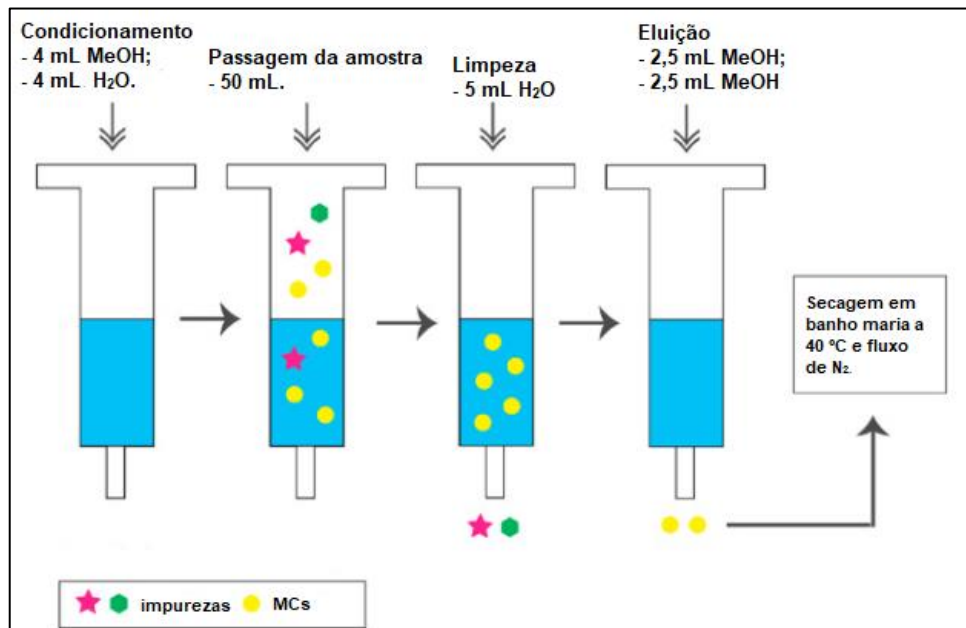
(2,5 mL em cada tubo) de forma a facilitar o processo de secagem em fluxo de nitrogênio gasoso, sob temperatura de banho maria de 40 °C, as amostras foram armazenadas secas a temperatura de -20 °C até o momento da análise, este procedimento está representado de forma simplificada na Figura 8.

Figura 7 – Sistema de filtração a vácuo utilizado nas etapas de pré-concentração de MCs por SPE.



Fonte: O próprio autor (2022).

Figura 8 – Esquema simplificado do método de pré-concentração de MCs utilizando cartuchos SPE.



Fonte: adaptado de Maranata et al., (2021).

Para as análises as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol 100%, volume este que foi transferido para os dois tubos os quais as amostras foram divididas, então foram sonicadas em lavadora ultrassônica (*Unique Ultracleaner800* 110V) por 5 min, em seguida filtradas em filtro de seringa 0,22 µm (fibra de vidro) antes da injeção no cromatógrafo, o fator de pré-concentração (FP) foi calculado como a razão entre as inclinações médias das curvas analíticas obtidas com e sem etapa de pré-concentração.

4.3 FASE EXPERIMENTAL B - FOTODEGRADAÇÃO COM TiO₂

4.3.1 Tratamento fotocatalítico com TiO₂

A partir de adaptação do trabalho realizado por Jacobs et al., (2013) a degradação da MCs (220 µg.L⁻¹) foi estudada em triplicata em um reator fotoquímico com volume de 300 mL de solução, que consistiu em um béquer de 600 mL que foi acoplado em uma incubadora de bancada com agitação orbital (Quimis, modelo DB161M22) com rotação de 150 rpm e temperatura variando na faixa de 25 – 27 °C. A solução foi irradiada usando uma lâmpada fluorescente eletrônica de neon (luz negra 26W, UV-A), que foi fixada dentro da incubadora.

Neste reator (Figura 9), 1 mg.mL⁻¹ do fotocatalisador TiO₂ foi adicionado à solução de MCs (300 mL, pH 7,0), esta foi tratada por até 1 hora e 30 minutos, a incubadora foi coberta com um suporte para impedir a entrada de luz externa o qual foi removido apenas para coleta de amostras. Alíquotas foram coletadas em intervalos regulares (tipicamente 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min) e levadas para o preparo de amostra, conforme descrito no item 4.1.2.5, e posterior controle analítico.

Para avaliar a possível adsorção de MCs na superfície do fotocatalisador e a possível fotólise devido à radiação UV-A, foram realizados os seguintes ensaios: Com a adição de TiO₂ irradiado pela lâmpada acoplada (Experimento B1); com TiO₂, mas ausência de radiação e conduzido no escuro (Experimento B2) e sem a presença do fotocatalisador, mas com radiação UV-A (Experimento B3) e um experimento controle sem adição de TiO₂, na ausência de radiação e conduzido no escuro (Experimento BC – controle).

Figura 9 - Reator de bancada utilizado para os tratamentos fotocatalíticos.



Fonte: O próprio autor (2022).

O estudo da cinética de degradação de MCs foi realizado a partir do modelo cinético de primeira ordem de Langmuir-Hinshelwood utilizando a Equação 10 (Bettoni et al., 2020; Khedr et al., 2019).

$$\ln(C/C_0) = K \times t \quad (10)$$

No qual:

C = concentração de MCs durante o experimento ($\mu\text{g.L}^{-1}$);

C_0 = concentração inicial de MCs ($\mu\text{g.L}^{-1}$);

K = constante de velocidade (m^{-1});

t = tempo de experimento (min).

4.4 FASE EXPERIMENTAL C - BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA RECOMBINANTE

4.4.1 Imobilização em espuma de poliuretano (PUF)

Os materiais fibrosos (PUFs) foram cortados em pedaços pequenos (1x1 cm) e a imobilização foi procedida conforme metodologia descrita por Kilonzo et al., 2011. Antes do uso, 10 peças foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL e então embebidas duas vezes em etanol 95% por 2 horas cada vez, posteriormente foi realizado um tratamento com HCl 0,5 M por 10 min, em seguida com NaOH 0,5 M por 10 minutos em temperatura ambiente, foram realizados duplos enxágues com solução tampão de fosfato depois de cada tratamento.

Os frascos com os materiais fibrosos foram preenchidos com 100 mL de solução PBS e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. A solução PBS foi descartada e os frascos foram preenchidos com 100 mL de meio complexo YEPG não seletivo. O pH do conteúdo dos frascos foi ajustado para 5,0 usando HCl 2M e /ou NaOH 2M e então autoclavados novamente nas mesmas condições. Cada frasco foi inoculado com 5% em meio de colona contendo uma concentração celular final de $3,1 \times 10^8$ células.L⁻¹ da cepa recombinantes de *S. cerevisiae* YRH1624 + *mlrA*, sendo esta previamente construída em trabalhos anteriores, e da cepa selvagem de *S. cerevisiae*, ambas incubadas em um agitador rotativo operado a 250 rpm e 30 °C. Também foram realizados os mesmos procedimentos para amostras de espuma, contudo sem inoculação de levedura, experimento denominado controle. O meio nos frascos foi trocado após três e seis dias.

Após esta etapa os materiais passaram por um tratamento para modificar a carga superficial do suporte de imobilização a fim de aumentar a adsorção da

levedura, que consistiu em embeber por 2 horas em solução aquosa de 0,2% de polietilenimina (PEI) ajustando o pH para 7,0 com HCl. Os materiais embebidos em PEI foram, então, enxaguados extensivamente com água destilada e secos à temperatura ambiente. Após secos foram colocados em solução de 1% (m/v) de glutaraldeído (GLU) em 0,05 M, pH 7,0 PBS por 2 h, então enxaguados novamente com água destilada e secos a temperatura ambiente. Todas as matrizes fibrosas modificadas foram armazenadas a 4°C até o uso.

4.4.2 Densidade das células imobilizadas

Para avaliar a massa celular imobilizada nos PUFs, foram secas a 70 °C, amostras de três cubos (1x1 cm) em triplicata, estes foram submetidos as etapas de imbolização descrita no item 4.3.1, tanto para cepa de levedura selvagem quanto para cepa recombinante. Após a imbolização os PUFs modificados foram secos também a 70 °C em estufa durante a noite. A densidade das células imobilizadas foi estipulada a partir da diferença entre o peso total dos PUFs secos com células imobilizadas pelo peso total dos PUFs antes da imobilização.

4.4.3 Ensaio de biodegradação

A biodegradação utilizando a cepa de levedura recombinante imobilizada foi realizada em biorreator de 600 mL, o mesmo utilizado para o tratamento fotocatalítico, contudo sem a inserção da lâmpada (Figura 4), operado em regime de batelada. No biorreator contendo solução de MCs (220 µg.L⁻¹, 300 mL, pH 7) foram realizados experimentos de biodegradação que consistiram de: adição de 5 suportes de PUF com as cepas de leveduras recombinantes, com intuito de avaliar a degradação pela ação da enzima *mlrA* (Experimento C1); adição de 5 suportes de PUF com cepas de leveduras selvagens, a fim de avaliar o efeito da possível adsorção de MCs na parede celular das leveduras (Experimento C2) e, também, com intuito de avaliar possível adsorção do analito nos PUFs, foi realizado a adição de 5 suportes os quais não foram imobilizadas leveduras (Experimento C3). A solução foi tratada por até 120 horas, com agitação à 150 rpm e temperatura mantida a 25°C. Alíquotas foram coletadas em

intervalos regulares (tipicamente 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) e submetidas ao preparo de amostras conforme descrito no item 4.1.2.5, e posterior controle analítico.

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a eficiência da imobilização das leveduras, foram coletados PUFs após as etapas de imobilização, após as etapas de biodegradação e também amostras que passaram por todas as etapas de imobilização, contudo sem a inoculação com as leveduras, foram analisados suportes imobilizados com cepas de leveduras selvagem e recombinante, estes procedimentos estão descritos na Tabela 2 para facilitar a compreensão. Todas os PUFs foram cortados assepticamente em amostras de 0,5x0,5. Estas amostras foram imersas em 25 mL de glutaraldeído a 2,5% (m/v) por 48 h a 4°C e lavadas três vezes com solução tampão 0,1 M PBS por 30 min, três vezes com solução salina 0,9% (m/v) por 30 min, e completamente enxaguadas com água destilada estéril. Após secas em temperatura ambiente, os suportes foram montados em *stubs* contendo fita de carbono dupla face (Figura 10) e, em seguida, receberam uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura no metalizador Sputter Coater (modelo SCD 050, Fabricante Bal-Tec). Por fim as amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Marca FEI-Philips, modelo Quanta 200).

Figura 10 –Suportes de PUF revestidos com ouro para análise com MEV.



Fonte: O próprio autor (2022).

Tabela 2 – Codificação das amostras de PUF analisadas por MEV.

Especificação das amostras de PUFs	Tipo de levedura imobilizada	Código
Coletadas após as etapas de imobilização	Selvagem	A-S
	Recombinante	A-R
	Sem levedura (Controle)	A-C
Coletadas após as etapas de biodegradação	Selvagem	B-S
	Recombinante	B-R
	Sem levedura (Controle)	B-C

Fonte: O próprio autor (2022).

4.5 CONTROLE ANALÍTICO

4.5.1 Análise com HPLC/PDA

A análise em HPLC/PDA foi adaptada a partir do método de Kuroda et al (2007). As amostras foram preparadas conforme item 4.2.1, as análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, constituído de um sistema de bombeamento de solvente LC-10AD, gerenciado por uma interface CBM-20A, válvula injetora Rheodyne® com alça de amostragem de 20 µL e forno de coluna CTO-20AC. O sistema é acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, onde a aquisição de dados e o controle do instrumento foram realizados por um microcomputador pelo software LC Solutions®. A separação cromatográfica foi isocrática, fase móvel (FM) composta de acetonitrila:acetato de amônio 20 mM (30:70, v/v, valores estes adaptados em relação ao método de referência que utilizava 28:72, v/v), com vazão de 1 mL por minuto, em coluna de guarda C18 (4 x 3.0 mm - Phenomenex®) e coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm - Phenomenex®) em 10 min de corrida. A coluna foi mantida a 30 °C e o comprimento de onda monitorado 238 nm. A quantificação de MC-LR consistiu na aplicação da equação da reta obtida a partir de curvas analíticas com e sem etapas de pré-cocentração, para determinação das concentrações em relação as áreas obtidas nos cromatogramas das amostras, além da verificação do tempo de retenção e espectro obtido.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey utilizando o software Statistica 7.0. A análise estatística foi realizada em nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FASE EXPERIMENTAL A - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANÁLITICO E PREPARO DO EXTRATO DE MICROCISTINA (EMCs)

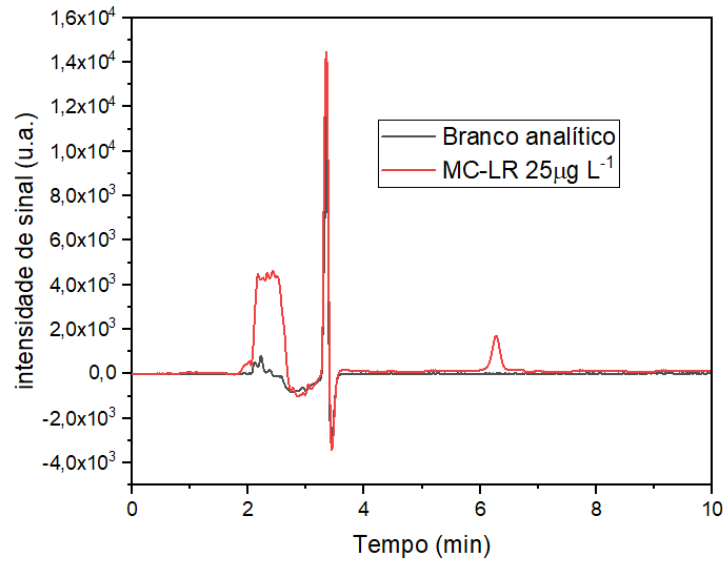
5.1.1 Validação intralaboratorial de método analítico de quantificação de MCs por HPLC-PDA

5.1.1.1 Seletividade

Os cromatogramas para o ponto da curva pré-concentrada de $25 \mu\text{L}^{-1}$ e do branco analítico (50 mL de amostra de água ultrapura com $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do fotocatalisador TiO_2 , submetida a todas as etapas de pré-concentração sem a dopagem com o padrão de MC-LR) estão representados na Figura 11. Os tempos de retenção dos picos identificados para o padrão de MC-LR variaram entre 6,2 e 6,5 min, Kuroda et al., (2007) identificou picos entre os intervalos de 7,3 a 7,8 min, valores próximos dos tempos de retenção encontrados neste trabalho, a variação de cerca de 1 minuto se deve a adaptação realizada no método que consistiu de alteração nas porcentagens da FM utilizada.

Para os cromatogramas dos brancos analíticos, não foram identificados picos no mesmo intervalo entre os tempos de retenção dos picos de MC-LR, demonstrando assim que não há interferentes nos mesmos tempos de retenção referentes ao pico de MC-LR

Figura 11 – Cromatograma do branco analítico comparado com padrão de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR.

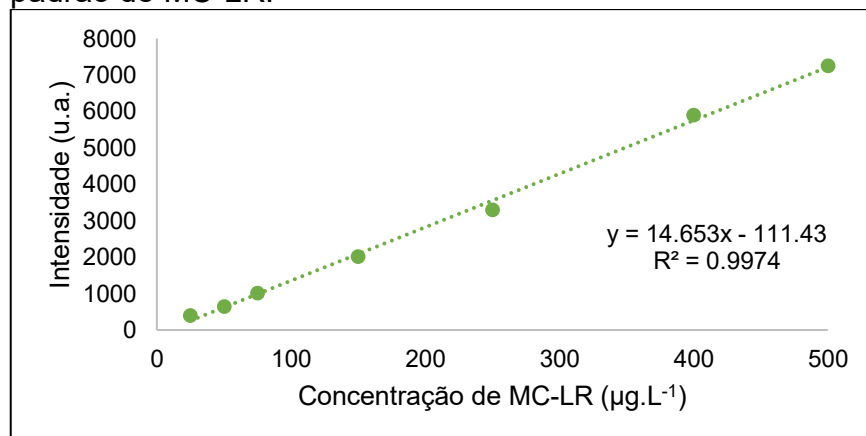


Fonte: O próprio autor (2022).

5.1.1.2 Linearidade e fator de pré-concentração

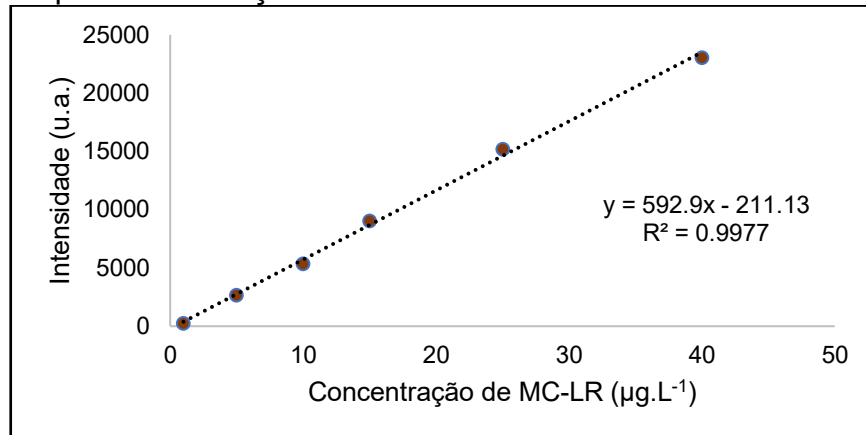
As curvas analíticas foram construídas com base nas áreas adquiridas a partir de integração dos picos referentes aos pontos de concentrações previamente estipulados, obtidos a partir de análises em triplicatas pelo HPLC-PDA, as equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2) foram obtidos a partir da relação entre as áreas dos picos e as respectivas concentrações de cada ponto (Figura 12 13).

Figura 12 –Curva de calibração com injeção direta de padrão de MC-LR.



Fonte: O próprio autor (2022).

Figura 13 –Curva de calibração construída a partir as etapas de pré-concentração.



Fonte: O próprio autor (2022).

A curva de calibração construída a partir de etapas de pré-concentração descrita no item 4.1.2.5, apresentou maior coeficiente angular (b) em relação a curva construída a partir de injeção direta, sendo os valores de 592,90 e 14,65 respectivamente, podendo assim concluir que houve aumento da sensibilidade do método, sendo esta diretamente proporcional a inclinação da curva analítica, o FP foi de 40,46 vezes, demonstrando que o método é capaz de pré-concentrar MC-LR com eficiência (INMETRO, 2020).

Os coeficientes de determinação (R^2) estão representados nas Figuras 7 e 8, sendo 0,9987 para a curva de injeção direta e 0,9988 para a curva pré-concentrada. De acordo com ANVISA (2017), para que um método apresente linearidade, o coeficiente de determinação deve estar acima de 0,99, portanto é possível afirmar que ambos os valores estão de acordo com a norma da ANVISA. Afirma-se, portanto, que ambas as curvas apresentam linearidade adequada para a faixa de 1 a 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a curva submetida as etapas de pré-concentração e 25 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a curva de injeção direta, ainda pode se dizer que ambos os métodos apresentam cromatogramas com áreas dos picos diretamente proporcionais as concentrações de MCs.

5.1.1.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).

O LD e LQ da curva analítica com injeção direta foram de 10,01 e 33,38 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente, todos os dados utilizados para os cálculos estão presentes na

Tabela 3. Pode-se constatar que o valor de LQ ficou acima do primeiro ponto da curva ($25 \mu\text{g.L}^{-1}$), e ainda bem superior ao limite estabelecido pela OMS ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) para água potável, não sendo possível quantificar concentrações inferiores. Justificando assim a necessidade das etapas de pré-concentração com cartuchos SPE, para obter valores de LD e LQ inferiores a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e assim avaliar satisfatoriamente as concentrações de MCs nos experimentos de degradação.

A curva analítica pré-concentrada apresentou $0,27$ e $0,91 \mu\text{g.L}^{-1}$ de LD e LQ respectivamente, valores inferiores aos da curva por injeção direta devido as etapas de pré-concentração utilizadas. Pode-se constatar que o valor de LQ ficou inferior ao estabelecido pela OMS, o LD encontrado está próximo ao obtido por Thuret-Benoist et al., (2019), onde foi utilizado extração com cartucho SPE, contudo com FP de 500 vezes, e obtendo LD entre $0,1$ e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, apesar do menor valor de FP obtido neste trabalho, este foi suficiente para a quantificação das concentrações estudadas nos testes de degradação e também é possível avaliar se os experimentos tem potencial para degradar concentrações até o limite estabelecido pela OMS.

Tabela 3 – Parâmetros e figuras de mérito das curvas analíticas elaboradas.

Curva analítica	Coefficiente angular (b)	Intercepto com eixo y (a)	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Injeção direta	$14,54 \pm 0,34$	$-114,15 \pm 48,53$	10,01	33,38
Pré-concentrada	$592,90 \pm 4,02$	$-208,10 \pm 53,97$	0,27	0,91

Fonte: O próprio autor (2022).

5.1.1.4 Precisão e exatidão

Os valores de desvio padrão relativos (DPR) intracorrída, representados na Tabela 4, foram calculados a partir de três pontos obtidos na curva elaborada a partir de etapas de pré-concentração (2 , 14 e $30 \mu\text{g L}^{-1}$), estas análises foram realizadas em um mesmo dia, os resultados obtidos foram utilizados para avaliar a repetibilidade do método.

De acordo com a INMETRO (2020), os critérios de aceitação estão atrelados ao nível de concentração e para concentrações em níveis inferiores a 100 ppb os valores de DPR para se garantir a repetibilidade do método, não podem ser superiores a 15% . Os valores médios para as concentrações de 2 , 14 e $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram respectivamente $8,55$, $2,93$ e $2,55\%$, todos inferiores ao valor máximo recomendado.

Mthembu et al., (2023) validaram um método analítico para detecção de MC-LR utilizando extração em fase sólida (SPE) e análise por HPLC-PDA, com FP de 100 vezes, obtendo valores de 0,49, 1,99 e 1,46 % para as concentrações de 60, 250 e 380 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente, para análises intracorrída, valores estes inferiores aos obtidos neste trabalho que se devem aos maiores níveis de concentrações estudados pelos autores.

Tabela 4 – Recuperação e análise de precisão conduzida para MC-LR em amostras de água ultrapura com TiO_2 .

MC-LR ^a ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Exatidão		Precisão	
	Média \pm DP ^b ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	REC ^c (%)	RPB ^d	PI ^e
			DPR (%)	DPR (%)
2	1,65 \pm 0,48	82,43	8,55	7,73
14	12,77 \pm 0,27	91,22	2,93	2,36
30	26,22 \pm 1,41	87,39	2,55	2,42

Fonte: O próprio autor (2022).

^a Concentração teórica de microcistina – LR. ^b Resultados expressos em média \pm desvio padrão de três repetições analisadas em sete replicatas. ^c Exatidão do método expresso em porcentagem de recuperação. ^d Resultados do teste de repetibilidade expressos em coeficiente de variação (CV) de uma repetição analisada em sete replicatas para cada concentração. ^e Resultados do teste de precisão intermediária (PI) expressos em coeficiente de variação (CV) de três repetições analisada em sete replicatas para cada concentração.

Estão representados na Tabela 4. os valores de DPR para os ensaios intercorrida, realizados em três dias diferentes para avaliar a precisão intermediária do método, assim como a repetibilidade. Os valores para as concentrações de 2, 14 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foram respectivamente 7,73, 2,36 e 2,42%, inferiores aos 15% recomendados pelo INMETRO (2020), Mthembu et al., (2023) obtiveram valores de 1,87, 5,59 e 5,31% para as concentrações de 60, 250 e 380 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente, nos ensaios intercorrida, valores próximos ao obtido neste trabalho, contudo para concentrações relativamente superiores.

Para avaliação da exatidão do método foram realizados experimentos de recuperação onde amostras foram fortificadas com padrão de MC-LR em três níveis de concentrações, 2, 14 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, as recuperações médias foram de 82,43, 91,22 e 87,39% respectivamente de (Tabela 4). De acordo com o INMETRO (2020) os valores de recuperação aceitáveis para se considerar o método exato para concentrações menores que 100 ppb devem variar entre 80 a 110%, constatando assim que os valores se encontram todos dentro dos critérios recomendados.

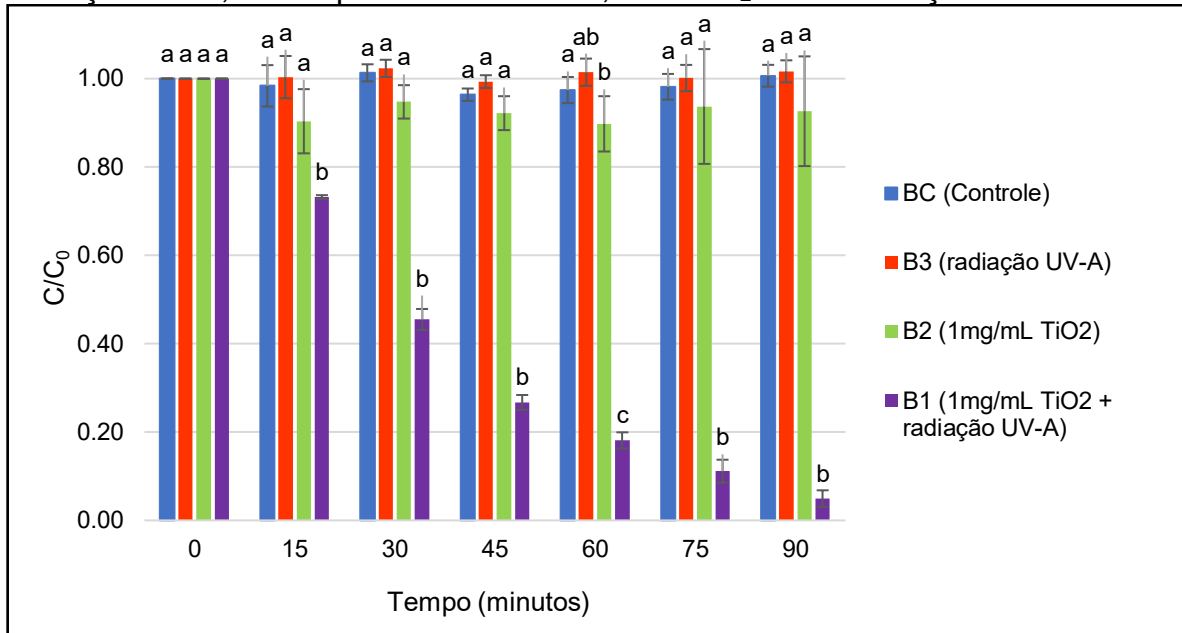
5.2 FASE EXPERIMENTAL B - FOTODEGRADAÇÃO COM TiO₂

5.2.1 Tratamento fotocatalítico

Foram realizados três experimentos para avaliar a possível degradação de MCs nas soluções preparadas, os resultados estão expressos na Figura 14. Os experimentos B2 e B3 não apresentaram variação significativa na concentração de MCs quando comparadas as médias com o experimento BC, podendo concluir assim que uma possível redução na concentração de MCs não está relacionado com adsorção do analito no catalisador ou no biorreator e nem, portanto, a fotólise causada pela radiação UV-A. No tempo de 60 minutos de análise, os experimentos B2 e B3 apresentaram diferença significativa na concentração de MCs, isto pode ter ocorrido devido a percas nas etapas de preparo da amostra, considerando que os resultados dos experimentos de recuperação (Tabela 4) demonstraram cerca de 10 a 20% de perca do analito em relação a concentração teórica.

Nawaz et al., (2018) realizaram experimentos de fotodegradação de MC-LR utilizando aerogéis de TiO₂, oxido de grafeno e alginato de sódio, segundo os autores ocorreu elevada adsorção de MC-LR devido à disponibilidade de sítios quimicamente ativos dos aerogéis, os autores também não verificaram redução na concentração de MC-LR por fotólise. A adsorção de MCs na superfície do catalisador pode ser desvantajosa para um sistema de tratamento de água, inviabilizando a reutilização do suporte, sendo necessário o descarte correto deste resíduo, ou ainda podendo causar o aumento da concentração por desprendimento do poluente ao longo do processo.

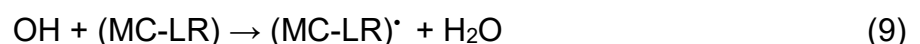
Figura 14 – Ensaios de fotodegradação de 220 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs: B1- ensaio de fotodegradação com 1mg.mL⁻¹ de TiO₂ e radiação UV-A; B2- ensaio de adsorção utilizando TiO₂ sem radiação UV-A; B3 – ensaio de fotólise utilizando apenas radiação UV-A; BC- experimento controle, sem TiO₂ e sem radiação UV-A.



Fonte: O próprio autor (2022).

*Médias seguidas de mesma letra não o diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para um mesmo tempo de tratamento; Barras representam o desvio padrão das três repetições de cada tratamento.

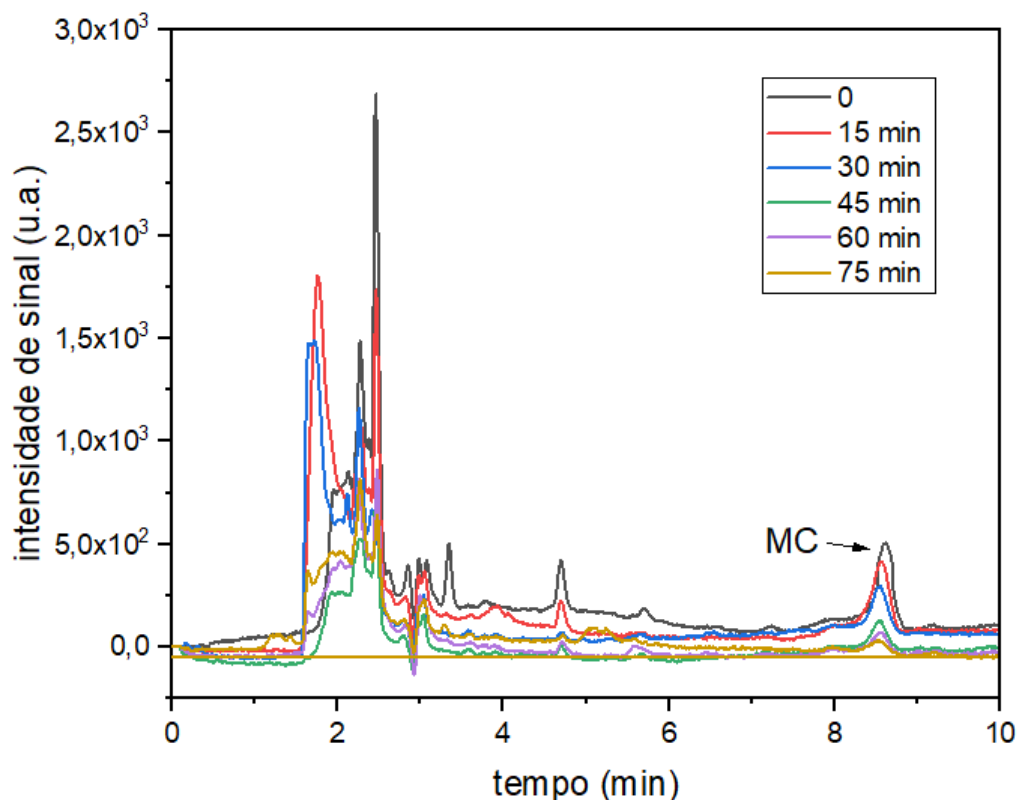
O experimento B1 foi o único que apresentou redução significativa na concentração de MCs em comparação com o experimento controle, com degradação de aproximadamente 55% com 30 minutos de tratamento, e após 90 minutos observou-se degradação maior que 95% da concentração inicial, esta degradação ocorre devido aos processos que ocorrem na superfície da partícula de TiO₂, onde fótons são absorvidos com energia maior ou igual a do gap do TiO₂, gerando um par elétron-lacuna, podem então ocorrer dois mecanismos de degradação das MCs: fotodegradação pelos radicais hidroxila gerados (Eq. 12) ou oxidação direta a partir da lacuna formada (Eq. 10). (Nawaz et al., 2018)



Os cromatogramas para amostras coletadas ao longo de uma das repetições realizadas no experimento B1 estão representados na Figura 15. A amostra coletada no tempo de 90 minutos não foi apresentada devido a aplicação

das etapas de pré-concentração para quantificá-la, pois sua concentração era inferior ao limite de quantificação da curva de injeção direta (Figura 12). Os tempos de retenção dos picos referentes a MCs variaram do tempo de retenção dos picos obtidos com padrão de MC-LR, possivelmente por se tratar de outro tipo de MC presente no extrato de microcistinas, uma variante da MC-LR. Kuroda et al., (2007) também observaram o mesmo em seu estudo, os autores afirmam que apesar de a principal MC presente no extrato ser a MC-LR, ela pode ser quimicamente diferente a do padrão utilizado, contudo os grupos cromóforos podem ser muito similares ou coincidentes. Pode se observar que o pico de MCs diminui ao longo do tempo de tratamento demonstrando a total fotodegradação do composto, não sendo observado o aparecimento de novos picos.

Figura 15 – Cromatogramas de uma das repetições do ensaio de Fotodegradação (B1): Linhas com cores diferentes representam os diferentes tempos de coleta das amostras.



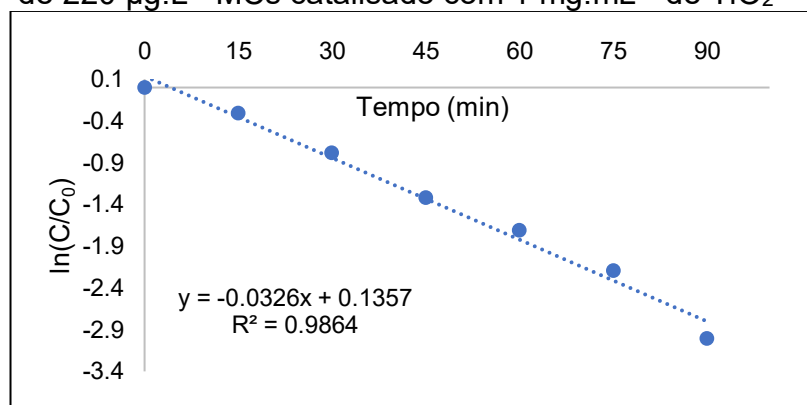
Fonte: O próprio autor (2022).

Apesar de não serem realizados testes para identificar os subprodutos gerados nos ensaios de fotodegradação, alguns autores afirmam que as MCs

podem ser completamente mineralizadas em subprodutos não tóxicos. Khedr et al., (2019) estudaram fotodegradação de MC-LR utilizando nanopartículas de TiO_2 modificado (anatase mesoporoso/brookite), os autores demonstraram total degradação após três horas de tratamento sob luz visível, afirmam ainda que a MC-LR foi totalmente convertido em CO_2 , H_2O e subprodutos não tóxicos.

Está representado na Figura 16. a aplicação do modelo cinético de primeira ordem para o experimento B1, único que apresentou redução significativa na concentração inicial de MCs, como confirmado pelo coeficiente de determinação (R^2) de 0,9864, obteve-se um K de $0,0326 \text{ min}^{-1}$, este valor retrata que a velocidade de degradação das MCs diminui ao longo do tempo de experimento, diminuindo também a eficiência de degradação, isto se deve a formação de subprodutos da oxidação que competem com o composto de origem tanto pela adsorção na superfície do fotocatalisador quanto por espécies reativas como os radicais hidroxila.

Figura 16 – Gráfico de $\ln(C/C_0)$ vs tempo de fotodegradação para o experimento de fotodegradação de $220 \mu\text{g.L}^{-1}$ MCs catalisado com 1 mg.mL^{-1} de TiO_2



Fonte: O próprio autor (2022).

Khedr et al., (2019) obtiveram eficiência de degradação de MC-LR próximas ($K = 0,0340 \text{ min}^{-1}$) para experimentos conduzidos com pH 4,0, outros autores também sugerem operação neste pH (Nawaz et al., 2018; Khadgi & Upreti, 2019). A superfície do TiO_2 possui cargas positivas nestas condições, enquanto a MC-LR é carregada negativamente em pH superior a 2,1, aumentando assim as forças atrativas entre TiO_2 e as moléculas de MC-LR o que aumenta a eficiência de degradação devido ao maior contato, contudo, nos experimentos conduzidos neste trabalho, obteve-se boa eficiência de degradação mesmo operando em pH 7, acredita-se que a utilização do fotocatalisador em suspensão garanta maior

superfície de contato entre o TiO₂ e as MCs, a desvantagem é a dificuldade para recuperação e separação do TiO₂ suspenso na solução tratada.

5.3 FASE EXPERIMENTAL C - BIODEGRADAÇÃO COM LEVEDURA RECOMBINANTE

5.3.1 Imobilização em espuma de poliuretano (PUF)

Na Tabela 5 são apresentados os pesos secos dos PUFs antes e após as etapas de imobilização e a densidade celular de leveduras adsorvida na superfície dos materiais fibrosos, sendo de 73,74 mg g⁻¹ e 41,53 mg g⁻¹ para as amostras imobilizadas com cepas de leveduras selvagens e recombinante respectivamente, valores esses relativamente inferiores aos obtidos por Kilonzo et al., (2011), 113,59 mg g⁻¹ para leveduras *S. cerevisiae* imobilizadas em espumas de poliuretano. Os autores afirmam que o PEI aumenta as taxas de imobilização celular devido a sua alta densidade catiônica, que possui capacidade de modificar a carga superficial das células. O GLU atua como um agente reticulante, reage com a lisina, aminoácido presente em proteínas na bicamada lipídica da membrana celular e também com os grupos aminos dos PUFs. Contudo, mesmo com a modificação dos suportes para aumentar a eficiência, os valores indicam que a imobilização não foi eficaz.

Tabela 5 – Massas das amostras de PUFs imobilizados com levedura selvagem e recombinante

	PUFs antes da imobilização (g)	PUFs modificados (g)	Densidade em massa de células por massa de PUFs (mg g ⁻¹)
PUFs imobilizados com levedura selvagem	0,251 ± 0,001	0,269 ± 0,003	73,740 ± 12,433
PUFs imobilizados com levedura recombinante	0,223 ± 0,004	0,232 ± 0,003	41,532 ± 7,591

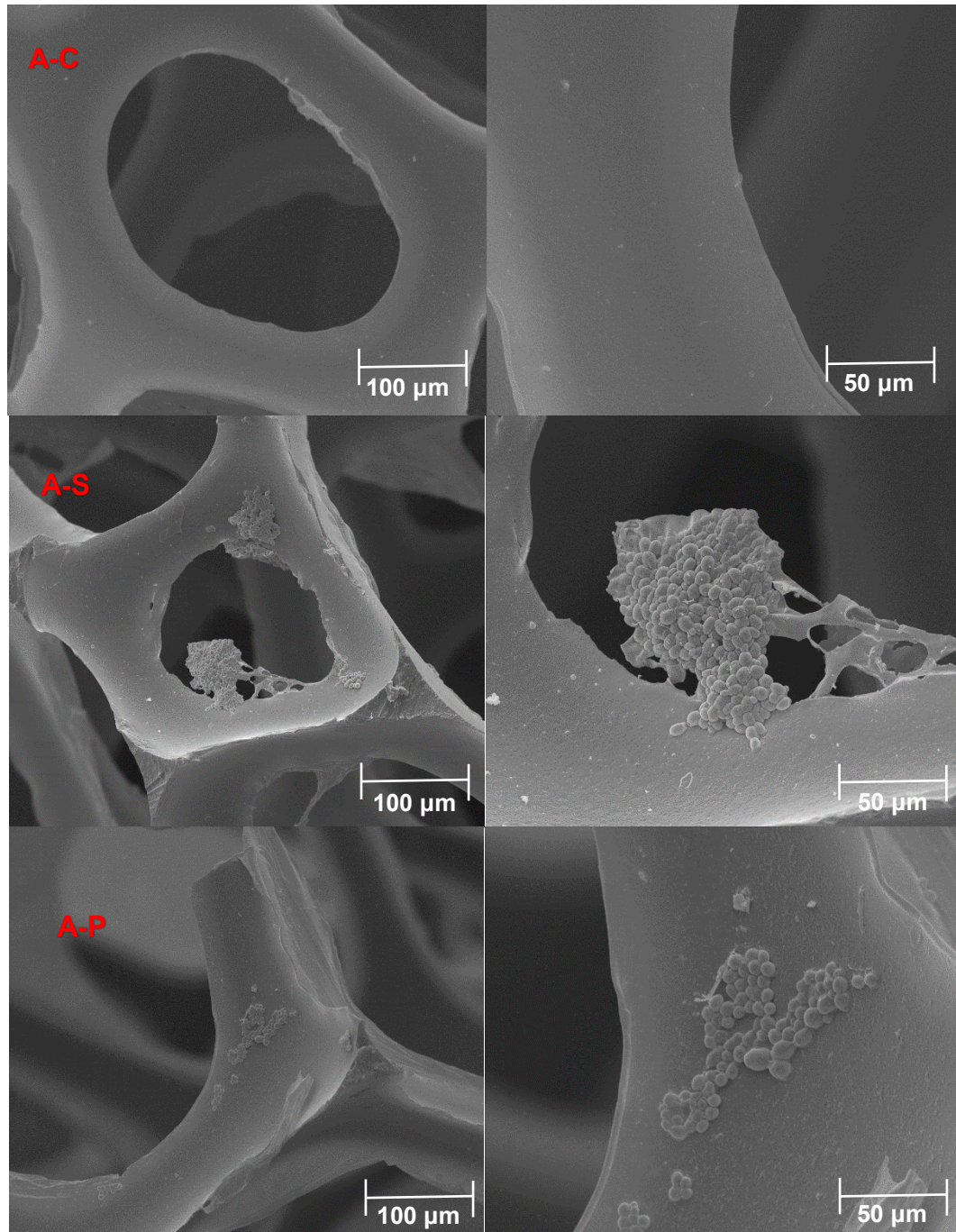
Fonte: O próprio autor (2022).

A baixa adsorção das células na superfície dos PUFs pode ter ocorrido devido a porosidade do material fibroso utilizado, sua superfície é lisa e pouco porosa conforme demonstrado na Figura 17. Materiais com superfície mais áspera tendem a aumentar a adsorção de células devido a ocorrência de concavidades e depressões, podendo fornecer locais mais favoráveis para a colonização.

Armani et al., (2019) realizou imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em membranas nanofibras de nylon-6 para fermentação de suco de uva, os autores

observaram que mesmo após vários ciclos de fermentação, quantidades significativas de células continuaram retidas nas fibras, este resultado é justificado devido a porosidade do nylon que auxiliou na fixação das leveduras imobilizadas.

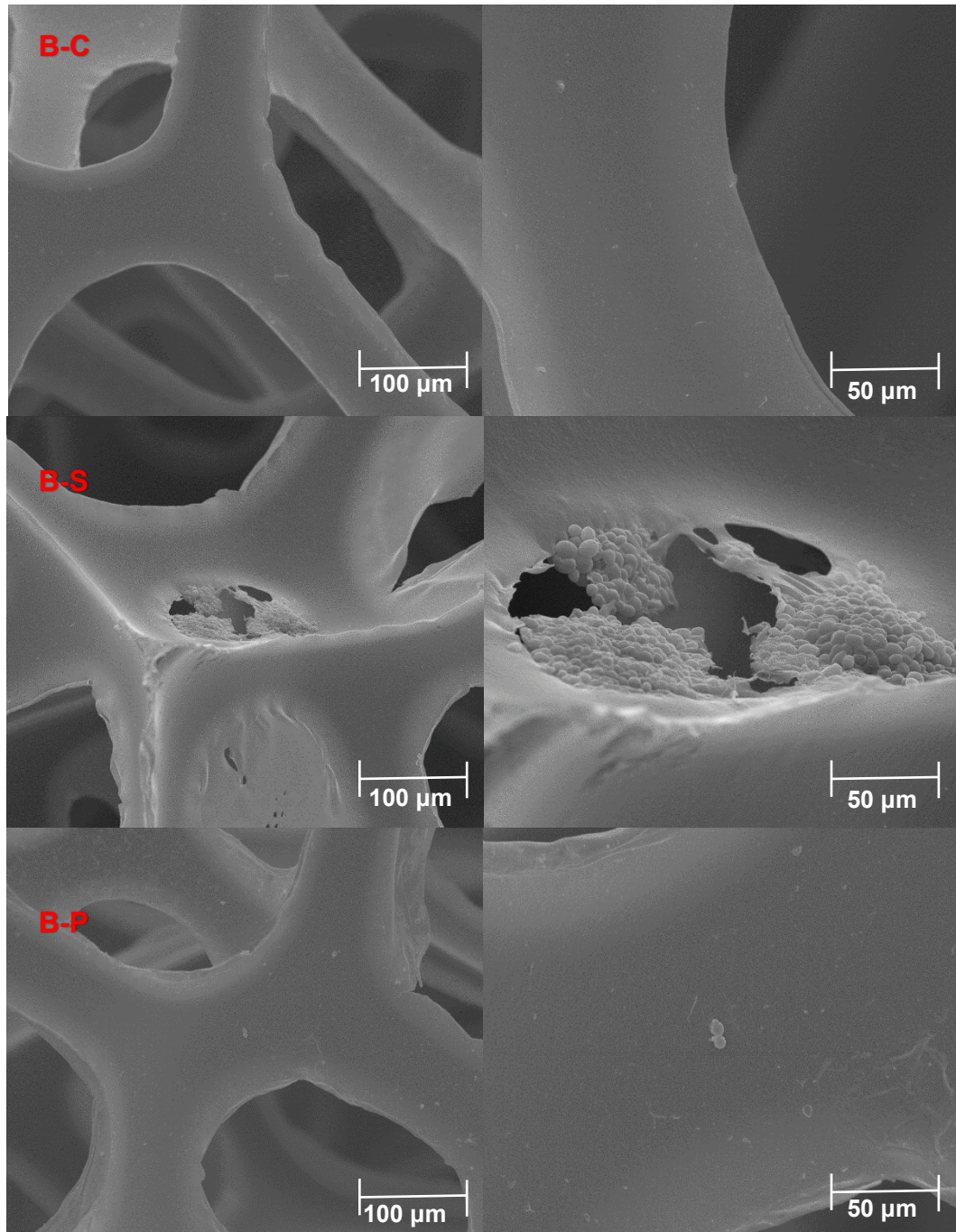
Figura 17 – Imagens de microscopia obtidas por MEV dos PUFs após etapas de imobilização: (A-C) PUFs sem levedura; (A-S) PUFs imobilizados com levedura selvagem; (A-P) PUFs imobilizados com levedura recombinante.



Fonte: O próprio autor (2022).

Estão apresentados na Figura 18 as imagens de microscopia de varredura de PUFs após serem utilizadas nos ensaios de biodegradação, pode-se constatar que os materiais imobilizados com cepas de leveduras recombinantes (Figura 14:B-P) não manteve quantidades significativas de células após os experimentos, quando se comparado com os materiais imobilizados com cepas de leveduras selvagens (Figura 15:B-S). Isto pode ter ocorrido devido à baixa sensibilidade e a lenta velocidade de crescimento da levedura recombinante. As leveduras selvagens formaram redes nos poros dos PUFs, o que não ocorreu com a recombinante, estas redes auxiliaram na imobilização das células impedindo sua dessorção mesmo após cinco dias de tratamento sob agitação no biorreator.

Figura 18 – Imagens de microscopia obtidas por MEV dos PUFs após ensaios de biodegradação: (B-C) PUFs sem levedura; (B-S) PUFs imobilizados com levedura selvagem; (B-P) PUFs imobilizados com levedura recombinante.



Fonte: O próprio autor (2022).

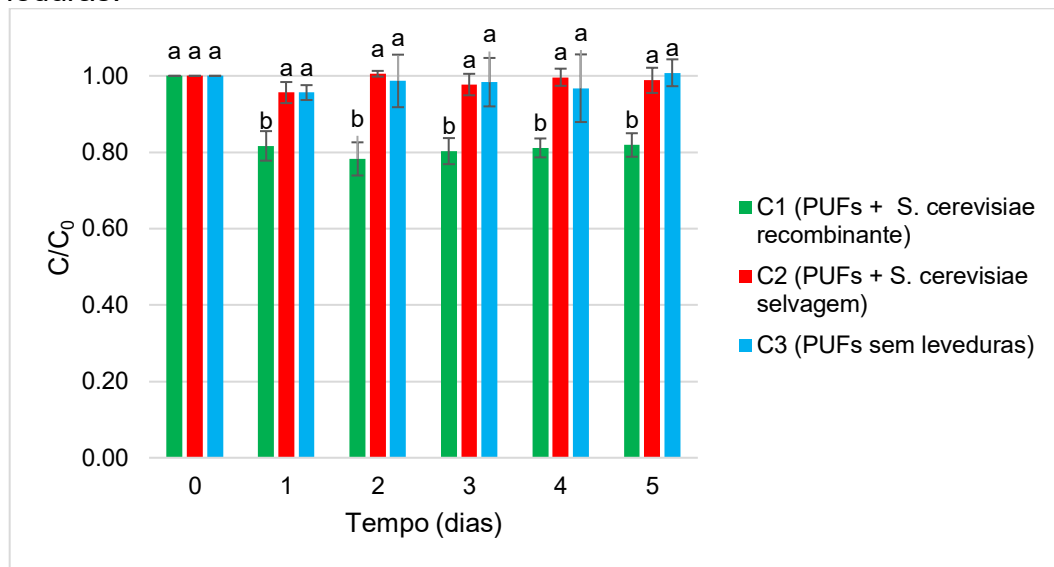
5.3.2 Ensaio de biodegradação

Estão apresentados na Figura 19 os resultados dos ensaios de biodegradação de soluções contendo concentrações de $220 \mu\text{g L}^{-1}$ de MCs. Pode se observar que os tratamentos C2 (contendo cinco PUFs com cepas de leveduras selvagens) e o tratamento C3 (contendo cinco PUFs sem imobilização com leveduras) não apresentaram redução significativa na concentração inicial de MCs ao longo dos cinco dias de tratamento, demonstrando assim que não houve adsorção nos suportes e biodegradação pelas leveduras selvagens imobilizadas.

Apenas o tratamento C1 apresentou redução significativa na concentração inicial, com redução média de 18,1% e 20,2% ($180,4 \mu\text{g L}^{-1}$ e $171,6 \mu\text{g L}^{-1}$) no primeiro e segundo dia de tratamento respectivamente, não variando significativamente nos próximos dias de tratamento. Isto demonstra que houve degradação de MCs devido a utilização de células hospedeiras do plasmídeo de expressão (*pRH809+mlrA*), demonstrando também a eficiência da ação da enzima microcistinase A, que pode hidrolisar a ligação Adda-Arg presente na molécula da toxina, tornando a linear, assim diminuindo sua toxicidade (Silva et al., 2023).

A não degradação após o segundo dia de tratamento pode ser justificada por inúmeras razões, contudo duas suposições mais prováveis foram analisadas: a quantidade de células nos cinco suportes utilizados é insuficiente para produzir enzimas necessárias para biodegradar a alta concentração de MCs estudada; ou ocorre inibição da atividade da enzima microcistinase A pela toxina linearizada, produto da reação enzimática.

Figura 19 – Ensaio de biodegradação de 220 $\mu\text{g L}^{-1}$ MCs utilizando 5 PUFs imobilizados com *S. cerevisiae* recombinante, selvagem e sem leveduras.

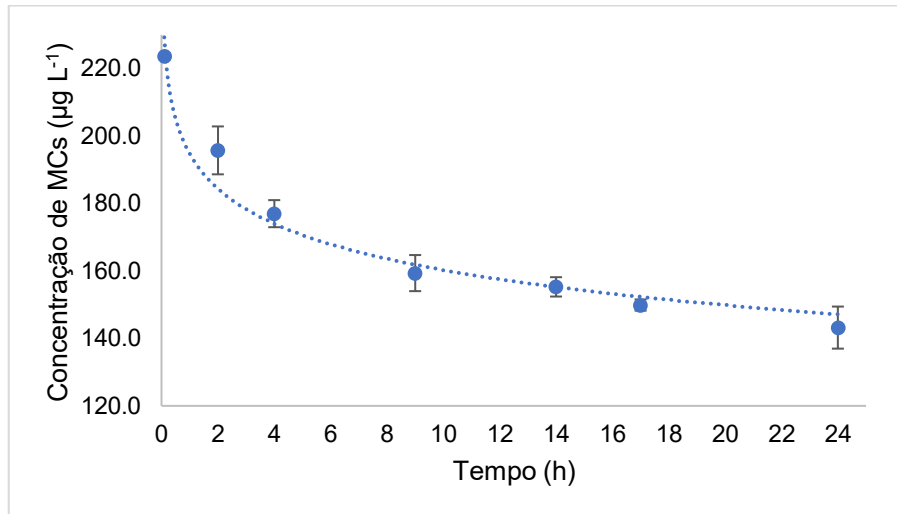


Fonte: O próprio autor (2022).

*Médias seguidas de mesma letra não o diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para um mesmo tempo de tratamento; Barras representam o desvio padrão das três repetições de cada tratamento.

Para avaliar a possível causa da baixa eficiência de biodegradação de MCs um novo experimento foi realizado em triplicata, utilizando as mesmas condições do experimento C1 (item 5.3.3), contudo variando a quantidade de PUFs com células de cepas de *S. cerevisiae* recombinante. Neste novo experimento foram utilizados 30 PUFs em vez de apenas 5, o tempo de tratamento foi de apenas 24 horas e as coletas de amostras foram realizadas em 0, 2, 4, 8, 14, 17 e 24 horas, as alíquotas coletadas (5 mL) passaram pelas etapas de preparo de amostras (item 5.1.2.5). Os resultados desse novo experimento estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Ensaio de biodegradação de MCs utilizando 30 PUFs com leveduras recombinantes.



Fonte: O próprio autor (2022).

Neste novo experimento pode-se observar que a concentração de MCs decaiu de aproximadamente 223,73 para 143,20 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtendo uma eficiência de degradação de aproximadamente 35,9%, valor inferior ao esperado considerando que foram utilizados 6 vezes a quantidade de PUFs com leveduras recombinantes em comparação ao experimento C1, que obteve apenas 22,0% de eficiência de degradação. Conclui-se que apenas o aumento de PUFs não pode ser considerado um fator significativo para aumento da eficiência de degradação.

Analisando o perfil de degradação de MCs apresentados na Figura 20, pode se constatar uma maior velocidade de reação nas quatro primeiras horas de experimento, apresentando uma redução na concentração de 17,7% em 4 horas, chegando aos 30,5% de degradação nas próximas 24 horas. Este perfil é característico de processos de reações onde o produto formado inibe a atividade da enzima. Cai et al., (2022) demonstraram que a taxa de degradação de MC-LR varia com a concentração do substrato no meio, obtiveram taxas de degradação de 0,40, 0,80 e 1,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para concentrações de MC-LR de 5, 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da enzima microcistinase *mIra* purificada, contudo não é completamente esclarecido os mecanismos enzimáticos que interferem na taxa de degradação. O perfil de degradação da toxina obtida pelos autores se compara ao obtido neste trabalho, onde a velocidade de reação é maior no início do experimento e diminui progressivamente, contudo a maior eficiência de degradação se deve a utilização da enzima *mIra* purificada e a sua alta concentração.

Apesar da baixa eficiência de degradação obtida, é importante ressaltar que foi utilizada alta concentração de MCs nos experimentos ($220 \mu\text{g.L}^{-1}$), necessária para avaliar o perfil de degradação da toxina em ambas as técnicas empregadas, e não há relatos de águas naturais e potáveis contaminadas com MCs nesta concentração, Melaram et al., (2022) afirma que as concentrações de MCs em águas poluídas usualmente se mantem inferior a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Massey et al., (2018) relata um acidente ocorrido no dia 7 de janeiro em uma represa em Salto Grande localizada na Argentina, onde um jovem de dezenove anos se contaminou devido a ingestão de água com nível de $48,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC- LR. Outro caso de contaminação ocorreu em Toledo (Ohio, EUA) onde foi detectada concentração de $3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ na água potável (Carmichael & Boyer, 2016; Giannuzzi et al., 2011). Afirma-se, portanto, que mesmo com baixa eficiência de redução da concentração de MCs no experimento de biodegradação com PUFs imobilizados com cepa de *S. cerevisiae* recombinante, foi degradado uma média de aproximadamente $80,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs em 24 horas de tratamento, valor superior as contaminações relatadas.

CONCLUSÃO

O método analítico de pré-concentração e análise de microcistina por HPLC-PDA se demonstrou preciso, exato, seletivo e linear dentro da faixa de trabalho de 1 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo adequado para análise de degradação de MCs com TiO_2 por ser um método que garante limpeza das amostras com eficiência.

O ensaio de fotodegradação com TiO_2 degradou valor superior a 95% em 90 minutos, não apresentando adsorção na superfície da partícula e nem fotólise com a radiação UV-A, sendo, portanto, uma metodologia promissora para a remoção de contaminações de águas com elevadas concentrações de MCs devido a elevada taxa de degradação, a desvantagem consistiu na dificuldade de separação do óxido metálico do leito de água tratada, sendo necessárias técnicas de imobilização do fotocatalisador e um reator específico que supra a necessidade de utilização de radiação UV-A.

Não se obteve eficiente imobilização da levedura nos PUFs, requerendo novos ensaios de imobilização, modificando o material utilizado por um com maior porosidade. Além disso a levedura selvagem apresentou maior imobilização nos PUFs devido a sua maior velocidade de crescimento em comparação com a levedura recombinante, se mantendo em quantidades significativas mesmo após os ensaios de biodegradação, o que não ocorreu com os PUFs com *S. cerevisiae* recombinante.

A eficiência de biodegradação reduziu gradativamente ao longo dos experimentos, suspeita-se que a atividade da enzima *mlrA* foi inibida pelo produto da reação, a microcistina linearizada, contudo para se confirmar esta hipótese é necessário a realização de novos experimentos de biodegradação, variando a concentração de substrato utilizado para avaliar o perfil cinético da reação enzimática.

Apesar da baixa eficiência de imobilização, os experimentos de biodegradação apresentaram redução aproximada de 30% da concentração inicial de microcistina (220 $\mu\text{g.L}^{-1}$) em um dia de tratamento, não sendo observado adsorção nos biocatalisadores e nem redução da concentração utilizando levedura selvagem imobilizada, demonstrando assim que a degradação de MCs ocorreu devido a atividade da enzima *mlrA* sintetizada pela cepa de levedura *S. cerevisiae* recombinante. Ainda que os resultados não sejam satisfatórios, é importante avaliar que a concentração de MCs degradada foi de aproximadamente 80,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em 24

horas de tratamento, concentração elevada se comparada as concentrações encontradas em contaminações relatadas na literatura.

Mesmo com baixa taxa de degradação, este método ainda se apresenta eficiente para degradação de concentrações reduzidas de MCs, com vantagem se comparado com a técnica de fotodegradação de não necessitar de reator acoplado com radiação UV-A e facilidade na recuperação dos biocatalisadores.

REFERÊNCIAS

- AHN, Chi-Yong et al. Selective control of cyanobacteria by surfactin-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 14, p. 1137–1142, 2003.
- ALBAYRAK, Nedim; YANG, Shang-Tian. Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 2, p. 240-251, 2002.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 294, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.
- ARMANI, Mariachiara; MOROZOVA, Ksenia; SCAMPICCHIO, Matteo. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on nylon-6 nanofibrous membranes for grape juice fermentation. **LWT**, v. 110, p. 360-364, 2019.
- BETTONI, Marta et al. Gas-phase TiO₂ photosensitized mineralization of some vocs: Mechanistic suggestions through a langmuir–hinshelwood kinetic approach. **Catalysts**, v. 11, n. 1, p. 20, 2020.
- BOURNE, David G. et al. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1294–1302, 2006.
- BOUŠKOVÁ, Alžběta et al. Three examples of nitrogen removal from industrial wastewater using Lentikats Biotechnology. **Desalination**, v. 280, n. 1-3, p. 191-196, 2011.
- BRITTO, Jaildes M; RANGEL, Maria do C. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 114-122, 2008.
- CAI, Danping et al. The detoxification activities and mechanisms of microcystinase towards MC-LR. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 236, 2022.
- CARMICHAEL, Wayne W.; BOYER, Gregory L. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. **Harmful algae**, v. 54, p. 194-212, 2016.
- COLEMAN, D. C. et al. Minimising microbial contamination in dental unit water systems and microbial control in dental hospitals. In: **Decontamination in hospitals and healthcare**. Woodhead Publishing, p. 166-207. 2014.
- DEXTER, Jason et al. Heterologous expression of mlrA in a photoautotrophic host–Engineering cyanobacteria to degrade microcystins. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 926-935, 2018.

D'SOUZA, S. F.; KAMATH, Nivedita. Cloth bioreactor containing yeast cells immobilized on cotton cloth using polythylenimine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 29, p. 136-140, 1988.

FREIRE, R. S. et al. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23 n. 4, p.504-511, 2000.

GABARDO, Sabrina et al. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89-96, 2014.

GIANNUZZI, Leda et al. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. **Marine Drugs**, v. 9, n. 11, p. 2164-2175, 2011.

GIETZ, R. Daniel; WOODS, Robin A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in enzymology**, v. 350, p. 87-96, 2002.

HAQUE, Fozia Z. et al. Purnima. Evaluating photodegradation properties of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles for organic compounds. **Optik**, v. 128, p. 191-200, 2017.

HARADA, Ken-ichi et al. Comprehensive analysis system using liquid chromatography–mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, n. 1, p. 107-113, 2004.

HASHIMOTO, Elisabete Hiromi et al. Further investigation of microbial degradation of microcystin using the advanced Marfey method. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 391-398, 2009.

HIROI, Zenji. Inorganic structural chemistry of titanium dioxide polymorphs. **Inorganic Chemistry**, v. 61, n. 22, p. 8393-8401, 2022.

HUISMAN J, MATTHIJS HCP, VISSER PM. **Harmful cyanobacteria**. Springer, Berlin; 2005.

ILHA, Jackson. **Degradação Fotocatalítica de Fenol Utilizando Nanofios de Dióxido de Titânio Modificados com Nitrogênio**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestra em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE 61 INDUSTRIAL. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008. Revisão 09. 2020, 30 p.

JACOBS, Loraine C. V. et al. Photocatalytic degradation of microcystin-LR in aqueous solutions. **Chemosphere**, v. 90, n. 4, p. 1552-1557, 2013.

JIN, Haiyan et al. Complete genome sequence of a microcystin-degrading bacterium, *Sphingosinicella microcystinivorans* strain B-9. **Microbiology Resource Announcements**, v. 7, n. 9, 2018.

JIN, Haiyan et al. Microbial degradation of amino acid-containing compounds using the microcystin-degrading bacterial strain B-9. **Marine drugs**, v. 16, n. 2, p. 50, 2018.

JURKEVICZ, S. S. Remoção de diuron e metolacloro em águas pela técnica de tratamento de ciclo completo e adsorção em carvão ativado. 2017. 120 p. **Dissertação (Mestrado em engenharia de edificações e saneamento)** – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

KILONZO, Peter; MARGARITIS, Argyrios; BERGOUGNOU, Maurice. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource technology**, v. 102, n. 4, p. 3662-3672, 2011.

KHADGI, Nirina; UPRETI, Akhanda Raj. Photocatalytic degradation of Microcystin-LR by visible light active and magnetic, ZnFe₂O₄-Ag/rGO nanocomposite and toxicity assessment of the intermediates. **Chemosphere** v. 221, p. 441–451, 2019.

KHEDR, Tamer M. et al. Photodegradation of microcystin-LR using visible light-activated C/N-co-modified mesoporous TiO₂ photocatalyst. **Materials**, v. 12, n. 7, p. 1027, 2019.

KURIAMA, Francine et al. Potencial de biodegradação de microcistinas por microrganismos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 181-186, 2012.

KURODA, Emília Kiyomi et al. Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, p. 24-31, 2007.

LIU, Guangfu et al. Reproductive and endocrine-disrupting toxicity of *Microcystis aeruginosa* in female zebrafish. **Chemosphere**, v. 192, p. 289-296, 2018.

LIU, Zhongtian et al. Oral administration of myostatin-specific recombinant *Saccharomyces cerevisiae* vaccine in rabbit. **Vaccine**, v. 34, n. 20, p. 2378-2382, 2016.

LÓPEZ-GALLEGO, Fernando et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70-75, 2005.

MARANATA, Gabriella Josephine; SURYA, Natasha Octavianti; HASANAH, Aliya Nur. Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 2021

MARTÍNEZ, José L. et al. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 965-971, 2012.

MARTINS, L. M. **Estudo da aplicação de processos oxidativos avançados no tratamento de efluentes têxteis visando o seu reuso**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Núcleo de Referência em Ciências Ambientais do Trópico Ecotonal do Nordeste, Universidade Federal do Piauí. 2011.

MASSEY, Isaac Yaw et al. Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review. **Toxicon**, v. 151, p. 156-162, 2018.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 3, p. 361-376, 1999.

MELARAM, Rajesh; NEWTON, Amanda R.; CHAFIN, Jennifer. Microcystin contamination and toxicity: Implications for agriculture and public health. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 350, 2022.

MTHEMBU, Zama et al. Detection of Microcystins in South African surface waters by high performance liquid chromatography in the light of Quality by Design statistical tool. **Research Square**, 2023.

NAGATA, Satoshi et al.. Enzyme Immunoassay for Direct Determination of Microcystins in Environmental Water. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 2, p. 408–417, 1997.

NAWAZ, Mohsin et al. Photodegradation of microcystin-LR using graphene-TiO₂/sodium alginate aerogels. **Carbohydrate polymers**, v. 199, p. 109-118, 2018.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v.21, n. 1, p.69-72, 1998.

PARANÁ AMPLIA LIDERANÇA EM PISCICULTURA DE CULTIVO. Agência de notícias do Paraná. Curitiba, 20, fev. 2020. Disponível em: <
<http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=105826&tit=Parana-amplia-lideranca-em-piscicultura-de-cultivo>>

PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ALIMENTOS CRESCE 8,9% NO ANO NO PARANÁ. Agência de notícias do Paraná. Curitiba, 13, dez. 2019. Disponível em: <<http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=105058&tit=Producao-industrial-de-alimentos-cresce-89-no-ano-no-Parana>>

SILVA, Fernando de Godoi et al. Microcystin-detoxifying recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *mlrA* gene from *Sphingosinicella microcystinivorans* B9. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 575, 2023.

SANT'ANNA, Célia L et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006.

SCHNEIDER, Olivia M. et al. Photocatalytic degradation of microcystins by TiO₂ using UV-led controlled periodic illumination. **Catalysts**, v. 9, n. 2, p. 181, 2019.

TARELHO, João P. G. **Atividade fotocatalítica de camadas de TiO₂ otimizadas**. 2011. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro. 2011.

TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K. Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. **Chemosphere**, v. 65, n. 1, p. 117-124. 2006.

VALLEJO-BECERRA, Vanessa et al. Immobilization of the recombinant invertase INVB from *Zymomonas mobilis* on Nylon-6. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1289-1295, 2008.

YANG, Lei et al. Efficient assembly of a large fragment of monkeypox virus genome as a qPCR template using dual-selection based transformation-associated recombination. **Virologica Sinica**, v. 37, n. 3, p. 341-347, 2022.

ZHANG, X. X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 397-414, 2009.

ZIOLLI, R. L., JARDIM W. F. Mecanismo de Fotodegradação de Compostos Orgânicos Catalisada por TiO₂. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p.319-325, 1998