UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

APLICAÇÃO DE BIOSSENSOR MICROBIANO BIOLUMINESCENTE NA DETECÇÃO DE HG (II)

Gisele dos Santos Costa

Rio de Janeiro
2010

Gisele dos Santos Costa

APLICAÇÃO DE BIOSSENSOR MICROBIANO BIOLUMINESCENTE NA DETECÇÃO DE HG (II)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores:

Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc
Paulo Rubens Guimarães Barrocas, D. Sc

EQ/UFRJ
Rio de Janeiro
2010

APLICAÇÃO DE BIOSSENSOR MICROBIANO BIOLUMINESCENTE NA DETECÇÃO DE HG (II)

Gisele dos Santos Costa

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado por:

_____
Andréa Medeiros Salgado, D.Sc. – EQ/UFRJ
(orientador – presidente da banca)

_____
Paulo Rubens Guimarães Barrocas, D. Sc – ENSP/FIOCRUZ
(orientador)

_____
Magali Christe Cammarota, D.Sc. – EQ/UFRJ

_____
Cláudia do Rosário Vaz Morgado, D.Sc. – Poli / UFRJ

_____
Allegra Viviane Yallouz, D.Sc. – CETEM/MCT

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Junho de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

APLICAÇÃO DE BIOSSENSOR MICROBIANO BIOLUMINESCENTE PARA DETECÇÃO DE HG (II)

Costa, Gisele dos Santos

Aplicação de Biossensor Bioluminescente na detecção de Hg (II)

Rio de Janeiro, DEB, EQ/UFRJ, 2010.
XVIII, 111f.: il.

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado e Paulo Rubens Guimarães Barrocas

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.
Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Escola de Química/Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2010.
1. Biossensor; 2. Bioluminescência; 3-mercúrio biodisponível
I. Título. - II. Dissertação (Mestrado -UFRJ/ EQ)

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Meus pais Sonia Maria e Antonio e irmãos Maurício e Ricardo

Amo todos vocês!

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Sabino

"A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Sonia Maria e Antonio pelo apoio, amor, dedicação e ajuda em todas as horas, pois nada disso seria possível sem eles.

Aos meus irmãos Maurício e Ricardo, cunhadas Fernanda e Raquel e a minha prima Natália, por me lembrarem que a diversão faz parte do processo. E a toda família que sempre movimentou a casa nos dias de estudo mais críticos (muitas alegrias).

Ao meu namorado Leonardo, pelo amor, paciência e compreensão nos incansáveis experimentos, por todas as idas ao Fundão, obrigada por tudo!

Aos meus amigos de infância, de graduação e pós graduação pelos momentos de ternura e conforto nos estudos e pelas muitas conversas no “MSN”: Kelly Cristina, Jennifer Han, Marcelle Pacheco, Cristiane Rangel, Erica Gaspar, Doris Campos, Juliana Leal, Karen Einsfeldt, Felipe Rodrigues, Elisângela Schneider, Guillermo Marini, Aldo Júnior, Cláudia Telles, Livia Jatoba, Luana Barbosa, Evelin Manoel, pois com eles consegui passar por muitos momentos difíceis nesta caminhada.

À professora Andréa Medeiros Salgado, pela acolhida, pela qualidade na orientação, dedicação e apoio durante todo o trabalho e pelos momentos de conversa e amizade. Agradeço também a Paulo Rubens Guimarães Barrocas pela orientação na presente dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Sensores Biológicos pela convivência e ajuda durante o trabalho e também pelos momentos de alegria no nosso “cafofo”: Andrea Rodrigues, Livia Maria, Ana Carolina Botelho, Giselle Cavalcanti, Lais Aguiar, Gabriela Jacoby. Um agradecimento especial a Ariana Farias Melo pela ajuda nos experimentos diurnos e noturnos, pelos momentos de estudo em estatística, pelo companheirismo nos momentos difíceis, nos dias em que os

experimentos não davam certo, ou ainda no dia que a falta de energia elétrica acabava com experimento da semana toda. E às colegas do laboratório 103: Roberta, Tatiana e Gizele. E ainda, às colegas do Laboratório de Tecnologia Ambiental: Fernanda, Verônica e Suzana.

À Escola de Química e à UFRJ e todos os seus docentes por contribuírem em mais uma etapa da minha formação.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

COSTA, Gisele dos Santos. **Aplicação de Biossensor microbiano Bioluminescente na Detecção de Hg (II).** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

No início da civilização, o homem desempenhava uma influência menor sobre o ambiente, mas ao dominar novas tecnologias, proporcionou melhoria na qualidade de vida, e também gerou diversos impactos ao ambiente, como o lançamento de diversos contaminantes no meio. O reconhecimento do perigo destes contaminantes faz com que as nações do mundo busquem por legislações mais rígidas e substituições nos processos tecnológicos. O metal pode se apresentar nas formas: solúvel, trocável, ocluso ou fixado aos minerais, precipitados com outros compostos, na biomassa e complexado na matéria orgânica. Devido a sua dispersão na atmosfera, o mercúrio é considerado um poluente global, sendo depositado até mesmo em regiões remotas. A contaminação com algumas de suas espécies químicas, metilmercúrio, por exemplo, tem causado um número significativo de mortes humanas em acidentes de várias partes do mundo. Em virtude das diversas espécies do mercúrio apresentar comportamentos diferenciados, observou-se a necessidade de buscar métodos que fossem além da determinação quantitativa total. Neste contexto procuramos utilizar a técnica de sensores específicos, os biossensores, na qual procuramos identificar a espécie de mercúrio biodisponível, uma vez que a biodisponibilidade é crítica na questão da toxicidade do metal. A bactéria *Escherichia coli* MC1061 foi selecionada como detector de mercúrio biodisponível, por ser uma cepa capaz de emitir luz suficiente para servir como um biossensor. No presente trabalho, a cepa MC1061 foi aplicada na detecção da fração biodisponível do mercúrio presente em amostras de chorume provenientes de três localidades distintas: aterro sanitário, aterro semi-controlado e lixão. Os meses amostrados foram setembro e outubro de 2009. Através de planejamento experimental conseguimos determinar as variáveis mais relevantes para o cultivo celular e para os ensaios luminométricos (melhor meio M9NO_3, fator de diluição 1:33,3 e 45 minutos como melhor tempo de incubação). A melhor curva de calibração para o instrumento biossensor, aplicado à detecção de chorume em matrizes complexas, foi definida partindo das curvas de adição padrão de cada localidade, diretamente contaminadas com o analito em questão. Uma vez que a curva de calibração obtida das soluções aquosas do mercúrio mostrou-se com valores de emissão de luminescência mais altos (por não haver nenhum complexante. Os resultados obtidos pelo instrumento biossensor apresentou alta especificidade para Hg (II) e boa repetibilidade. Das localidades amostradas, o lixão foi a que apresentou maior fração de mercúrio biodisponível no método testado, as outras duas localidades apresentaram valores menores de concentração de mercúrio biodisponível. As análises relacionadas às características físico- químicas das amostras nos evidenciou que se tratavam de localidades onde o aterro já havia passado da fase ácida, ou seja, se tratava de um chorume velho. Deste modo, a bioluminescência mostrou ser uma técnica sensível com potencial de aplicação para detecção de mercúrio biodisponível o que é comprovado nos resultados obtidos nesse trabalho.

ABSTRACT

COSTA, Gisele dos Santos. **Application of Bioluminescent Microbian Biosensor in the detection of Hg (II)** Rio de Janeiro, 2010. Disertation (Master in Science) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

In the beginning of civilization, the man had a smaller influence on the environment, but when conquered new technologies, he increased the quality of life and also produced many impacts on the environment. The recognition of the danger of these contaminants makes the nations from all over the world to search for tougher law and replacements in the technological processes. The metal can be presented in these forms: soluble, exchangeable, occluded or attached to the minerals, precipitated with other compounds, in the biomass and complex organic matter. Due to its dispersal in the atmosphere, mercury is considered a global pollutant, deposited even in remote regions. The contamination with some of its chemical species, for example, methyl mercury, has been causing a significant number of human deaths in accidents in several parts of the world. Because the many Mercury species have distinguished behaviors, there was a need to seek methods that go beyond the total quantitative determination. In this context, we try to use specific sensors techniques, the biosensors, in which we try to identify the bioavailable Mercury species, once the bioavailability is critical in the metal toxicity. The bacteria *Escherichia coli* MC1061 was selected as a detector of bioavailable Mercury in environmental samples of leachate because it produces a strain that emits enough light to serve as a biosensor and as a reporter of the biodegradation activity of this metal. In this work, the strain MC1061 was applied in the detection of the bioavailable Mercury presents in the leachate samples from three distinctive places: landfill, semi-controlled landfill and dump. The samples were collected in September and October of 2009. By experimental planning we were able to determine the more relevant variables for the cellular growth and for luminometric tests (best environment M9N03, cellular dilution factor 1:33 and 3 and 45 minutes as the best incubation time in the luminometer). The best calibration curve for the instrument biosensor applied for the detection of leachate in complex matrix, was defined by the standard addition curves of each spot contaminated directly with the analyte in question. The calibration curve resulted from the aqueous solution of mercury showed higher emission values of luminescence (by not presenting any complexing). The results presented by the biosensor instrument had a high specificity for Hg (II) and a good repeatability. Among the localities sampled, the dump showed the highest fraction of bioavailable mercury in the tested method, the other two places showed lower values of bioavailable mercury. The analysis related to physical-chemical features of the samples showed that the spots are places where the landfill had already got through the acid phase, in other words, it was an old leachate. Therefore, the bioluminescence showed to be a sensitive technique with application potential which is proved from the results of this research.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	Ciclo do mercúrio em ambientes naturais (Adaptado: Barrocas, 2004).	**11**
Figura 3.2	Esquema geral de funcionamento de um biossensor (Melo, 2008).	**19**
Figura 3.3	Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível (Melo, 2008).	**20**
Figura 3.4	Sistema de gene repórter (Adaptado: Nivens et al, 2004)	**23**
Figura 3.5	Esquema da reação redox *firefly* luciferase (Virta et al., 1995).	**25**
Figura 3.6	Esquema da inserção do promotor o transposon Tn 21.	**26**
Figura 3.7	Desenho do plasmídeo modificado geneticamente (Barrocas, 2004).	**26**
Figura 3.8	Esquema de como ocorre a contaminação do meio ambiente pelo chorume (Fonte: ducana.zip.net/images/lis-08a.jpg).	**29**
Figura 3.9	Esquema de um lixão. (Fonte: http://www.lixo.com.br)	**32**
Figura 3.10	Esquema de funcionamento de um aterro sanitário.	**33**
Figura 4.1	Equipamento utilizado para medição da luminescência.	**35**
Figura 4.2	Esquema funcionamento do luminômetro (fotodetecção).	**36**
Figura 4.3	Esquema de preparo das células para os ensaios luminométricos.	**44**
Figura 4.4	Ilustração das amostras incubadas para análises da DBO.	**52**
Figura 5.1	Curva de crescimento para meio M9 Cl e M9 NO_3 de *E. coli* MC1061	**54**
Figura 5.2	Fase exponencial do crescimento da *E. coli* MC1061	**55**
Figura 5.3	Correlação entre absorbância e peso seco M9 Cl.	**56**
Figura 5.4	Correlação entre absorbância e peso seco M9 NO_3	**56**
Figura 5.5	Perfil cinético da resposta bioluminescente do microrganismo *E. coli* MC1061 (0,2 g/L do microrganismo) após exposição ao mercúrio (0,0001 mg/mL)	**57**
Figura 5.6	Diagrama de Pareto – meio M9 Cl nos tempos de 20 e 45 minutos na câmara luminométrica.	**61**
Figura 5.7	Diagramas de Pareto do meio M9NO_3 com 20 e 45 minutos de incubação	**65**
Figura 5.8	Gráfico da probabilidade normal dos resíduos.	**66**
Figura 5.9	Gráfico de superfície de resposta do meio de M9 NO_3 com 45 minutos.	**67**
Figura 5.10	Gráfico de contorno do meio de M9 NO_3 com 45 minutos de incubação.	**68**
Figura 5.11	Gráfico da curva de calibração amostras de soluções de mercúrio em diferentes concentrações preparadas em água deionizada	**71**
Figura 5.12	Gráfico da curva de calibração (água deionizada) e curvas de adição padrão (amostras reais de chorume) para mercúrio em diferentes concentrações.	**74**
Figura 5.13	Concentração de mercúrio biodisponível (mg/L) no aterro sanitário(A), lixão (B) e aterro semi-controlado (C).	**79**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1	Métodos usados na quantificação de mercúrio (adaptado de Miraconi et al 2000).	**16**
Tabela 4.1	Composição do meio mínimo de sais *M9*.	**38**
Tabela 4.2	Soluções de mercúrio utilizadas.	**46**
Tabela 4.3	Condições preestabelecidas das variáveis independentes como nível superior (+), nível inferior (-) e ponto central (0).	**47**
Tabela 4.4	Esquema do planejamento experimental para cada meio M9 Cl e M9 NO_3 e para cada tempo.	**48**
Tabela 4.5	Amostras chorume utilizadas nos ensaios e as datas de coleta.	**48**
Tabela 5.1	Planejamento Composto Central em valor codificado e real e suas respectivas respostas para o meio de M9 Cl_20 minutos, M9 Cl_45 minutos e M9 Cl_60 min.	**59**
Tabela 5.2	ANOVA do meio M9Cl com 20 minutos de incubação na câmara.	**60**
Tabela 5.3	ANOVA do meio M9Cl com 20 minutos de incubação na câmara.	**60**
Tabela 5.4	Planejamento Composto Central em valor codificado e real e suas respectivas respostas para o meio de M9 NO_3_20 minutos, M9 NO_3_45 minutos e M9 NO_3_60 minutos.	**61**
Tabela 5.5	Estimativa dos efeitos, o erro puro e significância dos efeitos, (p) e t de student; Meio M9 NO_3-20 minutos (Confiança de 5%. t de student; p-significância).	**63**
Tabela 5.6	Estimativa dos efeitos, o erro puro e significância dos efeitos, (p) e t de student; Meio M9 NO_3-45 minutos (Confiança de 5%. t de student; p-significância)	**63**
Tabela 5.7	ANOVA NO_3 com 20 minutos de incubação R^2=0,75654; R ajustado=0,51309	**64**
Tabela 5.8	ANOVA NO_3 com 45 minutos de incubação R^2=0,96982; R ajustado=0,93963	**64**
Tabela 5.9	Análise de variância para o desenvolvimento experimental (Limite de confiança de 95%).	**66**
Tabela 5.10	Resultados dos ensaios luminométricos da curva de calibração com soluções de mercúrio de diferentes concentrações.	**72**
Tabela 5.11	Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão.	**73**
Tabela 5.12	Equações das curvas de calibração e adição padrão obtidas.	**75**
Tabela 5.13	Resultados dos ensaios luminométricos, valores de URL médio, desvio padrão, variância e coeficiente de variação entre as réplicas	**77**
Tabela 5.14	Concentrações de mercúrio biodisponível nos locais amostrados.	**78**
Tabela 5.15	Resultados dos testes de DQO, pH e DBO nas amostras reais obtidas das três localidades.	**81**

LISTA DE SIGLAS

AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ANOVA	Análise de Variânica
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CWA	Clean Water Act - Lei da Água Limpa
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DO	Densidade Ótica
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DEB	Departamento de Engenharia Bioquímica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
EQ	Escola de Química
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GFP	Proteína Verde Fluorescente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LB	Luria Bertani
MO	Matéria Orgânica
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
URL	Unidades Relativas de Luz
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
USEPA	Agência Americana de Proteção Ambiental
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS 6
2.1 Objetivo geral 6

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
3.1 Mercúrio 7
3.2 Fontes de Mercúrio 7
3.3 Ciclos Biogeoquímicos 8
3.3.1. Forma Inorgânica 9
3.3.2. Forma Orgânica 9
3.4 Toxicidade - Efeitos na Saúde 13
3.5 Especiação 15
3.6 Biossensor como elemento de detecção 17
3.6.1. Biossensores microbianos 21
3.6.1.1 Mecanismo da reação *firefly* luciferase 24
3.6.1.2 *Escherichia coli* MC1061 25
3.7 Tipos de Resíduos oriundo de amostras ambientais sólidas - Chorume 27
3.7.1 Características dos aterros sanitários, aterros semi-controlados e lixões 31

CAPÍTULO 4: MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1 Equipamentos e Reagentes 34
4.1.1 Descontaminação Química dos Materiais 34
4.1.2 Luminoskan Ascent (Labsystems, Inc.) 35
4.2 Biossensor microbiano - Componente Biológico: *E. coli* MC1061 36
4.2.1 Preparo de meios e soluções 36
4.2.2 Preparo da Solução Estoque de Canamicina (10mg/ml) 37
4.2.3 Meio LB (Luria- Bertani) 37
4.2.3.1 Preparo dos meios LB E LB agar: 37
4.2.4 Meio Mínimo de Sais 38
4.2.4.1 Solução de Sais M9 (M9Cl E $M9NO_3$): 38

4.2.4.2 Solução Estoque de $MgSO_4$ 0,1 M: 39
4.2.4.3 Solução Estoque de $Ca(NO_3)_2$ 0,01 M: 39
4.2.4.4 Solução Estoque de Glicose 200 g/L 39
4.2.4.5 Solução Estoque de Casamino Ácidos 100 g/L: 39
4.2.5 Crescimento e Caracterização *Eschericha Coli* MC1061 40
4.2.5.1 Determinação do Peso Seco 41
4.2.5.2 Manutenção e Armazenamento das Células 42
4.2.5.2.1 Manutenção em Solução de Glicerol 42
4.2.5.3 Experimentos de Bioluminescência 43
4.2.5.3.1 Preparo das Células 44
4.2.5.3.2 Preparo da Solução de Luciferina (1mM) 44
4.2.5.3.2.1 Solução Estoque de Luciferina 1 mM (pH = 5,0): 45
4.2.5.3.2.2 Solução Tampão Citrato de Sódio 100 mM (pH = 5.0) 46
4.2.5.3.3 Preparo das Soluções de Mercúrio 46
4.2.6 Otimização das Condições Experimentais 46
4.2.7 Caracterização da Amostra Real - Chorume 48
4.2.7.1 Localidades: 48
4.2.7.2 Curva de Calibração 49
4.2.7.2.1 Curva de Calibração de Mercúrio em Soluções Aquosas 49
4.2.7.2.2 Curva de Calibração de Mercúrio em Amostras Reais 50
4.2.7.3 Determinação da DQO, DBO e pH das Amostras Reais 51
4.2.7.3.1 Demanda Química de Oxigênio – DQO 51
4.2.7.3.2 Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO 51
4.2.7.1.3 Determinação de pH 53

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
5.1 Caracterização da Bactéria 54
5.1.1 Determinação da curva de crescimento 54
5.1.2 Correlação entre Absorbância e Peso Seco 55
5.2 Perfil Cinético da Resposta Bioluminescente 57
5.3 Parâmetros de Influência na Resposta Bioluminescente 58
5.3.1 Planejamento Experimental 58
5.3.2 Análise dos Resíduos no tempo de 45 minutos para o meio M9 NO_3 66
5.3.2.1 Teste de Normalidade 66
5.4 Amostras Reais 69

5.4.1 Curva de Calibração **70**
5.4.1.1 Curva de Calibração do Mercúrio em Soluções Aquosas **71**
5.4.2 Determinação da Concentração de Mercúrio Biodisponível **74**
5.4.3 Complementação das Análises – DQO, DBO e pH **80**

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E SUGESTÕES **85**
6.1 Conclusões **85**
6.2 Sugestões **87**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **88**

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

No início da civilização, o homem desempenhava pequena influência sobre seu ambiente. Entretanto com o domínio das técnicas de agricultura e de outras tecnologias para produção em escala industrial, ocorreram simultaneamente a melhoria da qualidade de vida, e aumento dos impactos antropogênicos no ambiente.

Dias-Junior e colaboradores (1998) abordam que estudos em locais próximos a complexos industriais mostram concentrações elevadas de metais pesados no solo, os quais podem afetar a produtividade, biodiversidade e sustentabilidade dos ecossistemas, distorcendo o equilíbrio biológico, químico e físico do solo.

Portanto, a poluição ambiental mundial é uma conseqüência indesejável, da crescente busca por recursos naturais, do uso intensificado, e por vezes inadequado, das tecnologias, aliado ao avanço das atividades industriais (ex: extração e mineração). Estes têm sido apontados como os principais responsáveis pela contaminação dos diferentes sistemas: atmosféricos, aquáticos e terrestres. Tais impactos podem ser imediatos, quando liberados em grande quantidade no ambiente, e a recuperação pode ser lenta e gradual, sendo um tema preocupante durante anos ou décadas. Os riscos dos processos produtivos, principalmente aqueles causados pelos agentes químicos, geralmente ultrapassam os limites da área física dos locais de trabalho (Accioly & Siqueira, 2000). Mesmo áreas remotas, como a Antártida, podem apresentar concentrações de contaminantes tais como

mercúrio e chumbo, distribuídos em uma escala global, na atmosfera, em concentrações superiores aos níveis naturais (Lacerda & Malm, 2008).

Considerar a manutenção da qualidade ambiental é questão decisiva para a sociedade atual e para as gerações futuras. Segundo Lacerda & Malm (2008) a principal questão agora, abordada pelas agências ambientais, não é se um ambiente está contaminado, mas o quão grave é a contaminação.

Alguns tipos de poluição (ecossistemas aquáticos, por exemplo) podem estar associados à ineficácia no tratamento dos efluentes domésticos e industriais, e ainda à inexistência em muitas regiões de saneamento básico. Esta situação pode ser observada ao redor da Baía de Guanabara, onde um complexo estuarino de aproximadamente 400 km^2, localizado no estado do Rio de Janeiro, na região sudeste do Brasil, tem atividade industrial e atividade portuária intensas, agregadas ainda a um complexo pólo petroquímico. É uma área importante com relação à produção pesqueira, que recebe efluentes domésticos e industriais não tratados, sendo a região impactada por matéria orgânica, óleo e um grande número de outros compostos, incluindo os metais pesados (Seixas et al., 2007). A biota está constantemente exposta a uma infinidade de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão. Estes contaminantes são capazes de interagir com o organismo vivo causando múltiplas alterações, que podem gerar conseqüências em populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (Canela, 1995).

Ainda são poucas as investigações a respeito de como os ecossistemas respondem à exposição crônica a estes contaminantes, muitos dos quais, como os

metais pesados, não são degradados, podendo afetar o funcionamento do ecossistema ao longo de décadas ou até mesmo séculos (Lacerda & Malm, 2008). Do ponto de vista dos compartimentos ambientais, são nos solos e sedimentos onde ocorre a maior acumulação dos metais. Em virtude do reconhecimento do perigo destes contaminantes as nações do mundo buscam por legislações mais rígidas e substituições nos processos tecnológicos por tecnologias mais limpas.

Os metais são elementos que ocorrem naturalmente no ambiente, constituindo menos de 1% das rochas, e podem ser definidos como elementos com densidade atômica maior do que 6 gcm^{-3}. Quanto à origem, podem ser litogênicos, quando provenientes de fontes geológicas, como resíduos de rocha liberados por intemperismo, ou antropogênicos, quando adicionados ao solo pela atividade humana. Alguns destes metais exercem funções fisiológicas nas plantas, animais, microrganismos, sendo, portanto considerados como essenciais. Outros não possuem função biológica conhecida. No entanto, mesmo os elementos considerados essenciais podem causar danos ao ambiente, se as suas concentrações forem elevadas (Costa et al., 2004).

A contaminação do solo por metais pesados pode acarretar sérias conseqüências sobre componentes funcionais dos ecossistemas. Através da absorção destes pelas plantas, os metais podem entrar na cadeia trófica, contaminando o homem e animais (Accioly & Siqueira, 2000).

O metal pesado em destaque é o *mercúrio*, pois embora ocorra naturalmente no ambiente, o seu uso indiscriminado vem trazendo o aumento das suas concentrações no meio ambiente e prejudicando a biota. Além disso, existem ainda questões relevantes do ponto de vista de contaminação, potencial de bioacumulação e biomagnificação pelos organismos.

E ainda, interesse na determinação dos seus compostos tóxicos, já que o estudo da espécie química é importante para compreensão da sua toxicologia, que trata-se de uma questão de saúde pública, quando consideramos os acidentes que já envolveram este metal pesado. A biodisponibilidade é crítica na determinação da toxicidade do metal.

Na presente dissertação, foi usada a bactéria *Escherichia coli* MC1061 (Virta et al.,1995) para compor um biossensor luminescente capaz de detectar mercúrio biodisponível. Esta bactéria foi usada como componente biológico, por ter sido geneticamente modificada para produzir luciferase do vaga-lume (*Firefly luciferase)*, quando exposta ao mercúrio, respondendo quantitativamente a este metal na forma biodisponível através da bioluminescência.

Esta é uma abordagem alternativa aos métodos tradicionais de investigação de contaminação por mercúrio. Os métodos tradicionais de detecção não permitem distinguir poluentes que estão *disponíveis* para os sistemas biológicos dos que estão *inertes* ou *indisponíveis*, uma questão especial em relação aos metais tóxicos. Os biossensores surgem como alternativa de detecção de poluentes, apresentando-se como novas ferramentas analíticas a serem aplicadas no diagnóstico das condições

do meio ambiente (Tecon & Meer, 2008), sendo promissores graças à seletividade, à rapidez e ao baixo custo deste tipo de tecnologia.

Na área ambiental têm sido desenvolvidos biossensores que utilizam genes específicos de resistência bacteriana para análise de metais. Este mecanismo de resistência foi sendo desenvolvido ao longo da evolução, e permite a sobrevivência dos microrganismos na presença destes metais. Os novos sistemas de detecção, baseados em sensores microbianos, na sua grande maioria, utilizam a resposta luminescente a um composto tóxico presente no meio poluído (Karube & Nakanishi, 1994). A tecnologia de DNA recombinante (com uso de genes repórteres) é usada para projetar e otimizar tais sensores microbianos, pois estes genes produzem respostas fluorescentes ou luminescentes, um método de detecção mais sensível à atividade metabólica, se tornando bem atrativo.

Este trabalho visa dar continuidade àquele desenvolvido por Barrocas (2004), no qual vislumbrou os aspectos mais importantes para a utilização do biossensor em questão.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral de pesquisa investigar e aplicar como elemento biológico de um biossensor o microrganismo geneticamente modificado *Escherichia coli* MC1061 (Virta et al., 1995) utilizando um luminômetro como transdutor, para a detecção do mercúrio biodisponível em amostras ambientais.

As etapas descritas abaixo foram desenvolvidas para atingir o objetivo geral da presente dissertação, a saber:

✓ Desenvolvimento e otimização do cultivo do microrganismo *E. coli* MC1061, para melhoria da resposta luminescente.

✓ Utilização da ferramenta, planejamento experimental, para otimização do cultivo celular (fator de diluição celular) e o tempo de incubação na câmara luminométrica nos ensaios bioluminescentes.

✓ Construção de uma curva de calibração (água deionizada) e uma curva de adição padrão (com as amostras reais) para o instrumento biossensor;

✓ Desenvolvimento e otimização dos procedimentos de análise, utilizando biossensor baseado no princípio da bioluminescência, para detecção de mercúrio em amostras reais contaminadas (chorume proveniente de lixão, aterro semi-controlado e aterro sanitário);

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MERCÚRIO

O mercúrio pode ocorrer naturalmente no meio ambiente, na crosta terrestre, na água, na biota e na atmosfera. Pode se apresentar sob formas inorgânicas e/ou orgânicas, ou ainda, associado a outros elementos. A distribuição das diversas espécies de mercúrio é regulada por processos físicos, químicos e biológicos, e a conversão das mesmas leva a um ciclo de distribuição que pode ser local ou global, podendo este metal pesado se alojar nos compartimentos ambientais mais diversos (Canela, 1995).

3.2 FONTES DE MERCÚRIO

As principais fontes naturais de mercúrio são oriundas do desgaste natural da crosta terrestre, podendo estar associado a outros elementos, onde o enxofre é o mais comum. Esta associação leva à formação do minério cinábrio (HgS), composto de cor vermelha ou preta, cujas maiores reservas encontram-se na Espanha, Itália, China, EUA e Rússia (Canela, 1995). Outras fontes do metal são as erupções vulcânicas e desgaseificação de compartimentos ambientais (ex: solos, oceanos, etc.).

O aporte antrópico deste metal ocorre através de indústrias que queimam combustíveis fósseis, da produção eletrolítica de cloro-soda, responsável pela principal importação de mercúrio no país, e pelas principais emissões até a década de 80, localizadas na região sul-sudeste (Lacerda, 1997). Destacam-se ainda a

produção de acetaldeído, incineradores de lixo, polpa de papel, tintas, pesticidas, fungicidas, lâmpadas de vapor de mercúrio, baterias, produtos odontológicos, amalgamação de mercúrio em extração de ouro, entre outros.

No Brasil, as fontes industriais foram as responsáveis pela totalidade das emissões até 1970, quando se percebeu uma mudança no controle das emissões industriais conhecidas e a substituição de tecnologias “sujas” (Lacerda, 1997). A principal carga de mercúrio passou a ser oriunda dos garimpos de ouro, pela explosão do garimpo de ouro na Amazônia, enquanto as fontes industriais de mercúrio ficaram com menos que 30% da emissão total. A emissão de fontes difusas, associado a um crescimento acelerado dos grandes centros urbanos, tem substituído em importância as fontes industriais clássicas, como a disposição de resíduos sólidos. As emissões de mercúrio com geração de energia elétrica hoje são cerca de 300 t ano^{-1} e outra fonte antrópica importante é a queima de combustíveis fósseis aproximadamente 1.500 t ano^{-1}, em nível global (Lacerda et al., 2007).

3.3 CICLOS BIOGEOQUÍMICOS

O mercúrio e seus compostos podem ser biotransformados da forma inorgânica para a forma orgânica, forma pela qual podem ser biomagnificados ao longo da cadeia alimentar. Os aspectos relacionados à toxicidade e também ao ciclo biogeoquímico, envolvendo distribuição, bioacumulação, transformação e transporte no ambiente tem chamado atenção da comunidade científica desde o acidente em Minamata. As diversas espécies químicas possuem toxicidade elevada e podem causar danos aos seres humanos dependendo da forma química e dos fatores de exposição.

3.3.1 FORMAS INORGÂNICAS

- ✓ Hg elementar (Hg^0) - principalmente na forma de gás;
- ✓ Íon mercuroso ($Hg_2{}^{2+}$) - pouco estável em sistemas naturais;
- ✓ Íon mercúrico (Hg^{2+}). Principal forma dissolvida (como sais ou complexos solúveis) nos sistemas aquáticos.

3.3.2 FORMA ORGÂNICA - quando ligado covalentemente a um radical orgânico. As duas formas mais comuns:

- ✓ Metilmercúrio (CH_3Hg^+);
- ✓ Dimetilmercúrio ($(CH_3)_2Hg$)

Segundo Bisinoti & Jardim (2004) o ciclo do mercúrio é caracterizado pelas várias rotas que este composto pode seguir no ambiente, desde sua liberação do solo como resíduos de rocha, até o retorno para atmosfera, seja na forma de Hg^0 gasoso ou, em menor extensão, como compostos voláteis. A atmosfera desempenha um importante papel de receptor de mercúrio tanto das emissões naturais como das antrópicas, (Marins *et al.,* 2004), possuindo um tempo de residência da ordem de meses e até anos (Mason *et al*.,1990). Esta liberação, e o seu retorno, contribuem para o ciclo global do mercúrio (Poissant *et al*., 2004). E o alcance global envolve a evaporação do mercúrio pela desgaseificação da crosta terrestre, a circulação atmosférica de seus vapores e sua precipitação com as chuvas retornando ao solo e às águas (Azevedo, 2003).

O mercúrio dissolvido distribui-se nas formas de Hg^0, em espécies de mercúrio divalente (Hg^{2+} - livre ou complexada) e orgânicas, principalmente metilmercúrio e dimetilmercúrio (Morel *et al.,* 1998). O Hg^{2+} pode se complexar com diferentes

ligantes, dependendo das condições físico-químicas, sendo capaz de se associar com sulfetos, matéria orgânica e óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganês (Morel et al.,1998).

O mercúrio é capaz de ser emitido do solo, através de lixiviação e erosão, para corpos d'água (Fostier *et al*., 2000). Desta maneira o solo pode ser visto como uma interface entre atmosfera, hidrosfera, biosfera e litosfera. Quando em contato com o solo ou sedimento, é possível ocorrer sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação. Os solos possuem uma elevada capacidade de reter e armazenar mercúrio, principalmente os solos argilosos, devido a forte associação deste com o carbono presente, formando um complexo com o material orgânico (ex: ácidos húmicos e fúlvicos), podendo este acúmulo persistir por muitos anos. A quantidade de mercúrio acumulada dependerá da história de deposição, da idade e das características do solo.

O ciclo vai se completando pelas rotas de *precipitação, bioconversão* em formas voláteis ou solúveis, *reinteração* deste na atmosfera ou *bioacumulação* na cadeia alimentar dos compartimentos aquáticos ou terrestres (Figura 3-1). Estudos têm mostrado que o metilmercúrio é a espécie dominante de mercúrio na biota (Bloom, 1992).

A rota atmosférica envolve a retenção do Hg^0 na atmosfera por períodos longos, sendo possível a circulação através de grandes distâncias. Nos sedimentos, água e solo o íon mercúrico (Hg^{2+}) é a espécie mais abundante, esta espécie possui tempo de resistência curto na atmosfera devido à sua solubilidade em água, baixa volatilização e capacidade de reação (Bisinoti, 2005; Environment Canadá, 2007).

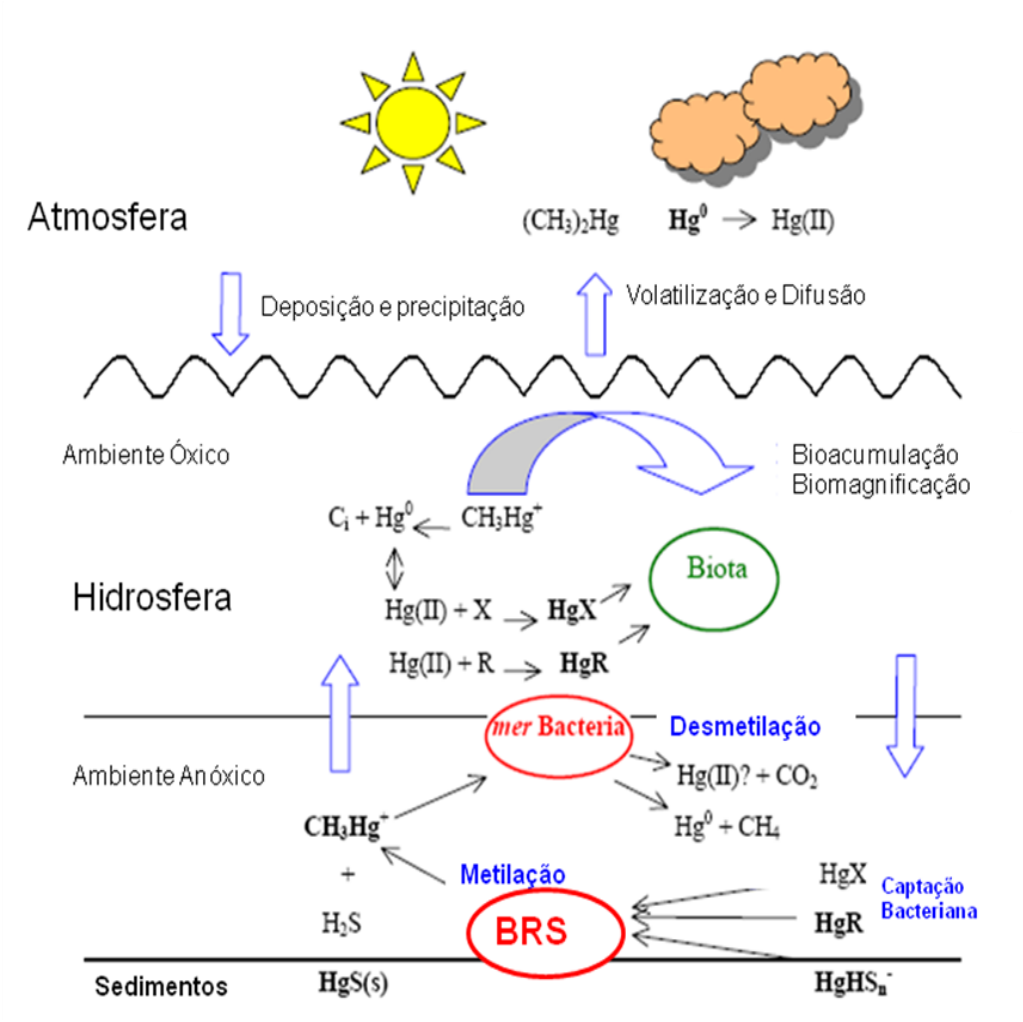

Figura 3-1: Ciclo do mercúrio em ambientes naturais (Adaptado: Barrocas, 2004).

No fundo dos oceanos o mercúrio pode ser depositado na forma insolúvel (HgS), e permanecer ativo nos sedimentos como substrato para a metilação por cerca de 100 anos, mesmo quando a fonte é eliminada. No entanto, mesmo após a sua deposição como HgS, e com baixa solubilidade, uma pequena porção de íons mercúrio proveniente do HgS pode sofrer *redissolução*. Nos sedimentos pode ocorrer a distribuição relacionada com o conteúdo de carbono orgânico, argila, ferro, fósforo, potencial redox e enxofre, dentre outros. Os agentes orgânicos complexantes solúveis em água, tais como humatos e fulvatos, podem quelar as espécies solúveis e insolúveis na água. O *pH ácido* favorece a absorção do mercúrio

pelo húmus. No *pH básico* o mercúrio tem maior afinidade pela fração mineral, desfavorecendo a formação do metilmercúrio (Bisinoti & Jardim, 2004; Canela, 1995).

A metilação do mercúrio constitui a etapa chave do ciclo do mercúrio em sistemas aquáticos e é de extrema importância em ambientes remotos e contaminados. O mercúrio inorgânico pode ser metilado, principalmente por dois mecanismos: biológico (pelas vias aeróbia e anaeróbia) e químico (Azevedo, 2003).

Assume-se que as reações de metilação e desmetilação ocorram em todos os compartimentos ambientais, sendo que cada ecossistema atinge seu próprio estado de equilíbrio com respeito às espécies individuais de mercúrio (Bisinoti & Jardim, 2004).

É o balanço das reações de metilação e desmetilação que determina se o ambiente atuará como fonte ou sumidouro de metilmercúrio. Segundo Bisinoti & Jardim (2004) o processo de metilação é mediado por bactérias redutoras de sulfato, presentes na via reversa, ocorrendo preferencialmente em ambientes com alta concentração de material orgânico e elevadas taxas de decomposição, sendo favorecida por águas ácidas e ricas em carbono orgânico dissolvido (COD).

Bisinoti & Jardim (2004) demonstraram a importância do estudo do comportamento do metilmercúrio no ambiente por ser este bastante complexo, sendo fundamental o entendimento do seu ciclo, bem como da análise dos seus efeitos tóxicos na saúde humana e na biota. Cabe ressaltar que a metilação do mercúrio ocorre tanto em ambientes naturais quanto impactados (Cossa et al. 1994).

Alguns ambientes e condições ambientais ajudam a maximizar os mecanismos de metilação e complexação orgânica de mercúrio, resultando em processos

diferenciados de contaminação. As condições favoráveis para metilação, em um ambiente redutor são: anoxia e acidez. (WHO, 1990).

Acredita-se que existam ao menos duas vias diferentes na desmetilação oxidativa. Numa destas vias, o metilmercúrio é utilizado como substrato de carbono por bactérias redutoras de sulfato e metanogênicas, foi investigado recentemente (Oremland et al. 1991). Esta a desmetilação biológica foi associada ao operon mer, sendo investigada e razoavelmente bem compreendida (Barkay et al., 2003).

Consideram-se ainda fatores físicos e químicos como pH, temperatura, condutividade, potencial de oxiredução, oxigênio dissolvido, presença de íons sulfeto e carbono orgânico quando se avalia a metilação do Hg e sua acumulação na biota aquática.

3.4 TOXICIDADE – EFEITOS NA SAÚDE

O que se conhece a respeito dos efeitos da contaminação com mercúrio é oriundo de estudos com a população contaminada, normalmente por acidentes de contaminação ambiental que afetaram os alimentos e a água de consumo.

Acidentes com contaminação por mercúrio ocorreram em Minamata, Iraque e Niigata. O mais conhecido foi o que ocorreu na Baía de Minamata (Japão) em 1953, que levou ao consumo de pescado contaminado pela população. Na época a concentração de mercúrio nos sedimentos da baía chegou até 2.010 mg /Kg peso seco) (Harada, 1995).

A toxicidade deste metal pesado pode ocorrer com os diferentes compostos em que se apresenta. O mercúrio metálico, por exemplo, usado na fabricação de

amálgamas para o uso odontológico, quando inalado apresenta um elevado poder de toxicidade, pois pode ser convertido à forma metilada nos pulmões. Na forma de vapor, como é liberado na maior parte em garimpos de ouro, é absorvido através do pulmão, e em contato com o sangue é oxidado pelos eritrócitos a Hg^{2+} e rapidamente distribuído pelo corpo, podendo se ligar também à albumina e à hemoglobina e se acumular no SNC (Azevedo, 2003; Canela,1995; Neathery & Miller, 1975).

O metilmercúrio é a espécie mais tóxica do mercúrio e o interesse em seu estudo deve-se ao potencial de bioacumulação e biomagnificação. Este composto age como inibidor e modificador das atividades protéicas mesmo quando em baixas concentrações, por se ligar aos grupos sulfidrilas das proteínas (Galvão & Corey, 1987), e rapidamente se converter em um complexo protéico de grande mobilidade através dos tecidos. Sua distribuição pode levar até 6 dias, já que são lipossolúveis e difundem facilmente através das membranas celulares tendo longo tempo de retenção biológica. O composto pode ser absorvido pela pele, e aproximadamente 100% pelo trato gastrointestinal, sendo a dieta uma das principais vias de exposição ao metilmercúrio. No entanto, o ar e a água, dependendo do nível de concentração, podem contribuir significativamente para o aumento do nível de mercúrio total no organismo humano.

Canela (1995) relata acidentes por intoxicação com metilmercúrio onde se constatou maior suscetibilidade na vida intra-uterina, na qual o composto pode interferir nos processos de divisão celular, causando danos no sistema nervoso central, onde pode ser citado o córtex cerebral, especialmente o córtex visual, e a camada granulosa do cerebelo, por ser uma neurotoxina potente, levando inclusive à má formação cefálica. Canela (1995) descreve ainda que em pesquisas realizadas

em ratos comprovou-se que o metilmercúrio exerce ação cancerígena. Nos seres humanos, o metilmercúrio tem um tempo de meia-vida biológico relativamente longo, de 44 a 80 dias (Neathery & Miller, 1975), e sua excreção ocorre via fezes, leite materno e urina. Os principais sintomas associados à toxicidade incluem tremor, vertigem, entorpecimento, dor de cabeça, cãibra, fraqueza, depressão, distúrbios visuais, dispnéia, tosse, inflamações gastrointestinais, queda de cabelo, náuseas e vômitos.

3.5 ESPECIAÇÃO

Em virtude das diversas espécies de um mesmo elemento apresentar comportamentos diferenciados como, solubilidade, volatilidade e toxicidade distintas, entre as espécies, observou-se a necessidade de buscar métodos que fossem além da determinação quantitativa dos elementos presentes, ou seja, a identificação de cada espécie. Muitos estudos tratam da necessidade de técnicas mais sensíveis e precisas para a determinação das espécies em diferentes matrizes amostrais (Canela,1995).

As principais áreas de interesse da especiação envolvem o monitoramento de locais poluídos por espécies organometálicas e inorgânicas tóxicas. Muitos estudos relacionados à biometilação de metais (especialmente mercúrio) e semi-metais (arsênio e selênio) têm sido feitos, uma vez que estes elementos podem apresentar um alto nível de toxidez, dependendo do estado de oxidação em que se encontram (Gervasio et al. 2003).

Segundo Canela (1995) os passos para a determinação de mercúrio em geral são: coleta de amostra, pré-tratamento/preservação/estocagem da amostra,

liberação do mercúrio da matriz, extração/purificação/ pré-concentração, separação das espécies de mercúrio de interesse e quantificação. As técnicas tradicionais de métodos específicos em química analítica mostram - se altamente sensíveis.

Os métodos mais freqüentemente utilizados para a quantificação de mercúrio e seus respectivos limites de detecção são encontrados na tabela 3-1. No entanto estes possuem limites de detecção bastante dependentes do procedimento analítico global, incluindo coleta e preparação da amostra antes da quantificação.

Tabela 3-1: Métodos usados na quantificação de mercúrio (adaptado de Miraconi et al 2000).

Método		**Limite de Detecção Relatado**
Método colorimétrico		0,01-0,1 µg/g
Espectrometria de Absorção Atômica -	Forno de grafite (GF AAS)	1 ng/g
	Vapor Frio (CVAAS)	0,01-1 ng/g
Espectrometria de Fluorescência Atômica - Vapor Frio (CVAFS)		0,001-0,01 ng/g
Análise por Ativação com Nêutrons -	Instrumental (INAA)	1-10 ng/g
	Radioquímica (RNAA)	0,01-1 ng/g
Cromatografia Gasosa	Detector de Captura Eletrônica	0,01-0,05ng/g
	Detector de Emissão Atômica	~0,05ng/g
	Espectrometria de massa	0,1ng/g
	CVAAS/CVAFS	0,01-0,05ng/g
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	Detector de Ultra- violeta	1 ng/mL
	CVAAS	0,5 ng/mL
	CVAFS	0,08 ng/mL
	Eletroquímico	0,1-1 ng/mL
Plasma Acoplado Indutivamente	Espectrometria de massa (ICP MS)	0,01 ng/mL
	Espectrometria de Emissão Atômica (ICP AES)	2 ng/mL
Espectrometria Foto- Acústica		0,05 ng
Fluorescência de Raio – X		5 ng/g - 1 µg/g
Métodos Eletroquímicos		0,1-1 µg/g
Analisador de Filme de Ouro		0,05 µg/g

Tais métodos tradicionais não permitem distinguir poluentes que estão disponíveis para os sistemas biológicos dos que estão inertes ou indisponíveis, uma questão especial em relação aos metais tóxicos. O conhecimento da

biodisponibilidade é essencial na determinação da toxicidade e do potencial de bioacumulação do metal, bem como na busca por métodos eficientes de remediação. Novas tecnologias analíticas vêm sendo desenvolvidas para serem aplicadas no diagnóstico do meio ambiente. Neste contexto, surgem sensores específicos, os biossensores, como alternativa aos métodos tradicionais, pois permitem determinar diretamente a biodisponibilidade das substâncias químicas e seus efeitos biológicos, e ainda, complementar os métodos tradicionais, gerando novas informações que são fundamentais na avaliação do risco de poluentes (Selifonova et al., 1993).

Tais sensores apresentam características únicas: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis. A utilização de um biossensor, na maioria dos casos, não necessita de técnicos ou especialistas, podendo em alguns casos dispensar o uso de reagentes, e atuar tanto como aparelhos de uso contínuo ou como descartáveis (Silva, 2009).

3.6 BIOSSENSOR CELULAR COMO ELEMENTO DE DETECÇÃO

Os biossensores pertencem a uma área multidisciplinar para a qual não existe uma definição que contemple todas as suas possíveis configurações, por isso podemos encontrar várias formas de definição para estes na literatura.

Em geral trata-se de uma ferramenta analítica, um sensor químico que usa propriedades de reconhecimento de componentes biológicos com atividade catalítica ou reações de afinidade em contato íntimo, camada sensível, com um transdutor de sinal. O potencial para aplicação de um biossensor está na habilidade deste em

medir a interação de contaminantes com sistemas biológicos através da capacidade de reconhecimento biomolecular (Arya et al., 2008). De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, 2001 *apud* Salgado, 2001) biossensor é “um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa, através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução”.

De um modo geral, como componentes usados no desenvolvimento de um biossensor, incluem-se:

- ✓ Componente biológico;
- ✓ Sistema de transdução;
- ✓ Sistema de processamento de dados e registro.

O transdutor é usado para converter o sinal químico em um sinal elétrico, que poderá ser processado e reproduzido. Este sinal é proporcional à concentração do analito, permitindo medições quantitativas em tempo real (o sinal pode ser transformado em um formato analógico ou digital). A Figura 3-2 resume de forma clara o que foi supracitado.

O sinal pode ser eletroquímico (mudanças de corrente, voltagem ou condutância), ótico (medidas de absorbância, reflectância, emissão de fluorescência ou luminescência,) piezoelétrico (variações de massa) ou acústico (Valdman, 2004).

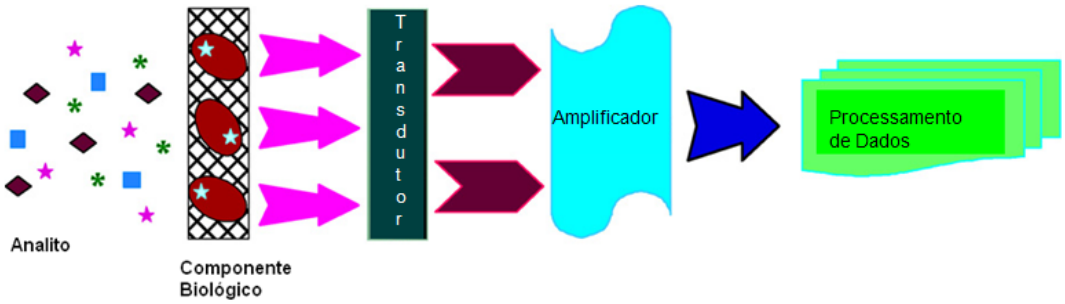

Figura 3-2: Esquema geral de funcionamento de um biossensor (Melo, 2008).

A função de um biossensor vai depender da especificidade bioquímica do material biologicamente ativo. A escolha do componente biológico está sujeita a uma série de fatores visando especificidade, estocagem e estabilidade operacional e ambiental. A seleção também depende do analito a ser detectado. Alguns requisitos básicos são exigidos na escolha de um biocomposto para atuar como elemento de reconhecimento biológico, dentre eles (Salgado, 2001):

- ✓ Disponibilidade de um sítio reativo que posso reagir/interagir com o analito;
- ✓ Estabilidade face ao meio e as condições de medição;
- ✓ Possibilidade de modificação/imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho.

Entre os compostos adequados para a composição dos biossensores temos: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de microrganismos, tecidos de plantas e animais e organelas. De acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes (Figura 3-3). Dentre elas, as classes mais desenvolvidas são: biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimioreceptores e os imunossensores (Melo, 2008).

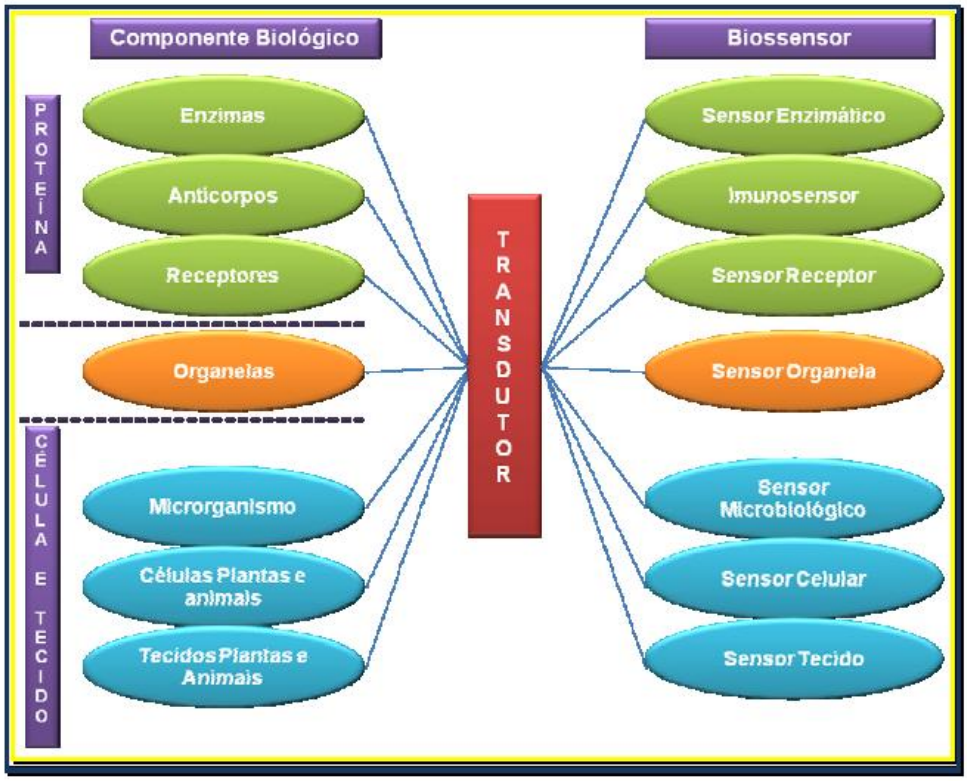

Figura 3-3: Classificação dos biossensores de acordo com o elemento biológico sensível (Melo, 2008).

Algumas considerações devem ser feitas ao se buscar o desenvolvimento destes sensores como: conhecimento de bioquímica e biologia do elemento biológico, a seleção do método de imobilização (conhecimento de química), a seleção do transdutor adequado (conhecimento de eletroquímica e física), considerar a faixa de medição, linearidade e minimização de interferência (conhecimento em cinética e transferência de massa) e o empacotamento do biossensor (Luong et al., 1988; Barker, 1989; Turner, 2000).

Tais instrumentos biossensores apresentam ainda alguns problemas relacionados à estabilidade e a falta de credibilidade em algumas áreas de aplicação. Estes desafios contribuem para a escassez de instrumentos no mercado. O fundamental é almejar a melhoria na confiança e robustez destes sensores de

modo a se obter um biossensor com a performance desejada em termos de sensibilidade, alcance dinâmico e reprodutibilidade (Silva, 2009).

3.6.1 BIOSSENSORES MICROBIANOS

Dentre os biossensores utilizados, os microbianos possuem muitas vantagens sobre aqueles que utilizam componentes biológicos isolados, como enzimas e anticorpos: são menos sensíveis a inibição por solutos e mais tolerantes a valores sub-ótimos de pH e temperatura; possuem uma vida útil mais longa; são mais baratos, pois geralmente, as células são produzidas facilmente, em grandes quantidades e não é necessário o isolamento dos componentes celulares receptores. No entanto, apresentam a desvantagem devido ao longo tempo de resposta quando comparado aos enzimáticos e por serem menos seletivos, já que um microorganismo contém inúmeras enzimas (Selifonova *et al*., 1993; Silva, 2009; Ramanathan *et al.*, 1997).

A utilização de microrganismos preserva as proteínas em seu ambiente natural, protegendo-as da inativação por agentes tóxicos externos, tais como, metais pesados e ainda evita etapas de purificação. Este tipo de biossensor permite obter informações do funcionamento do analito dentro da célula, relacionando-os aos seus efeitos (ex: tóxico, estimulante ou inibidor). Dependendo do objetivo do estudo, estas informações podem ser muito valiosas.

A chave da utilização de bactérias como biossensores reside no fato de que os genes que determinam as proteínas envolvidas se transcrevem, quando um composto contaminante está presente no meio. Desta forma, na presença ou ausência do contaminante no meio, uma propriedade poderá ser medida. A

tecnologia molecular disponível atualmente permite também aumentar a sensibilidade do sistema sinalisador frente a um determinado contaminante, mediante o desenho de cascatas reguladoras que multiplicam ou desfazem a expressão do gene empregado como indicador. Além disso, a atividade reguladora pode ser manipulada na direção de ampliar sua resposta frente a variedades estruturais do contaminante, em diferentes espécies (Lee et al., 1992).

Biossensores baseados neste tipo de elemento biológico são amplamente utilizados no monitoramento de contaminantes químicos no meio ambiente, como é o caso de metais pesados (Selifonova *et al*., 1993; Ramanathan *et al.*, 1997).

Assim, o uso da engenharia genética tem facilitado, por exemplo, a utilização de microrganismos geneticamente modificados, com genes sinalizadores ou ausência de certas enzimas. A utilização destes genes favorece a sensibilidade, ampliando a faixa dinâmica, a seletividade e especificidade destes biossensores. Além disso, são de fácil manipulação e alguns estudos já comprovaram ser ambientalmente seguros. O gene sinalizador é colocado sob o controle de um promotor, muitas vezes proveniente de um gene de resistência à substância que se deseja estudar, o qual é induzido apenas pela presença intracelular desta substância. A sensibilidade é definida pela efetividade da expressão do gene sinalizador (Lee et al., 1992; Barrocas, 2004; Barrocas, 2008).

Na construção de biossensores poucos genes sinalizadores são disponíveis, a maioria deles codifica proteínas repórteres facilmente detectáveis. As proteínas repórteres mais comuns incluem as luciferases procariota (lux) e eucariota (luc) e ainda a proteína verde fluorescente (GFP). Assim, o promotor reage na presença do contaminante e ativa a expressão deste componente, possibilitando sua quantificação. Tais genes sinalizadores e/ou reguladores podem ser nativos de uma

célula ou adquiridos por transformação genética. É comum o sistema de regulação transcricional consistir de um gene regulador, que expressa a sua proteína reguladora e a seqüência de DNA promotora, que controla a sua expressão, a jusante do gene (Nivens et al. 2004). A figura 3-4 resume o funcionamento do sistema repórter.

Estes sistemas de regulação são elementos que trabalham em conjunto para responder a alterações ambientais e controlar a expressão de um gene ou um operon, reforçando a fisiologia celular.

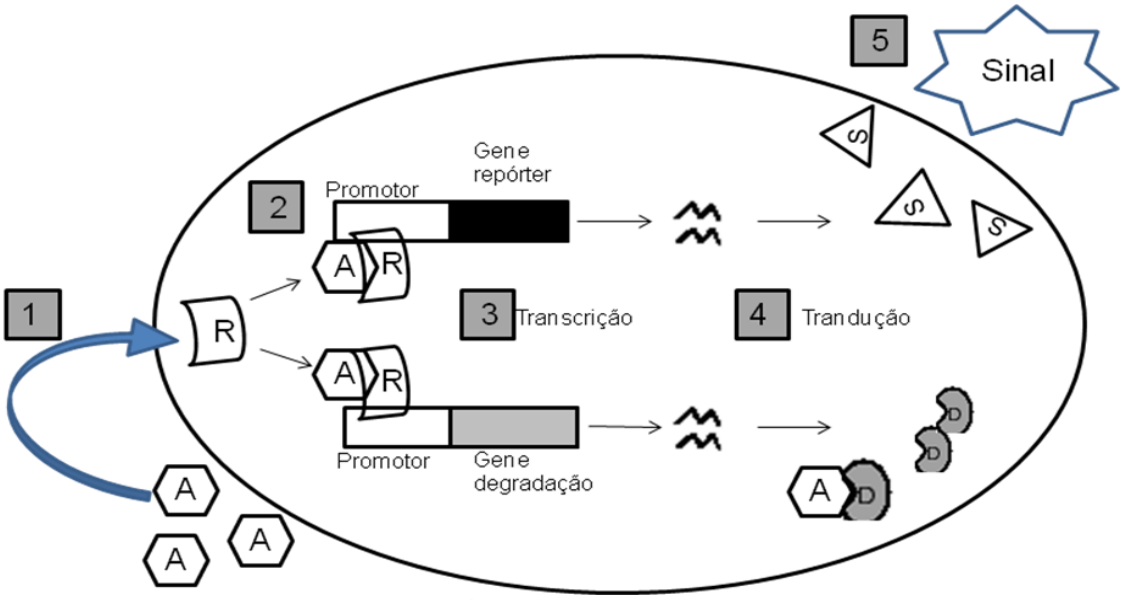

Figura 3-4: Sistema de gene repórter (Adaptado: Nivens et al, 2004) (Abreviações: A- analito; R- proteína reguladora; S- proteína sinalizadora; D- enzima degradativa).

Os genes repórteres que geram respostas fluorescentes ou luminescentes são mais atrativos devido à quantificação da emissão de luz por um microrganismo ser medida por um simples luminômetro. Entretanto, recentemente, têm surgido novos sistemas de informação que na presença do contaminante a resposta é traduzida em um sinal imunológico (como as proteínas verdes fluorescentes - GFP).

Para análise de metais foram desenvolvidos muitos biossensores que utilizam genes específicos de resistência bacteriana a estes elementos (exemplo operon mer), como elementos receptores. Ao longo da evolução, os microorganismos desenvolveram mecanismos que permitem sua sobrevivência na presença de metais.

O presente trabalho se encontra inserido na categoria dos sensores microbianos bioluminescentes, visto que a classificação se baseia no material biológico, e que utilizamos como biocomponente, o microrganismo geneticamente modificado *Escherichia coli* MC1061 para detecção de mercúrio biodisponível.

3.6.1.1 MECANISMO DA REAÇÃO LUCIFERASE DE VAGA-LUME

Na detecção bioluminescente não se faz necessário uma fonte externa de radiação, uma vez que a luz é produzida pelas reações químicas. A bioluminescência requer energia na forma de biomoléculas altamente energéticas. As luciferases não necessitam de luz de excitação e a diferença entre a luciferase procariota e a eucariota está na sua estrutura e na reação de emissão de luz (Lewis et a.l, 1998). O substrato luciferina da luciferase de vaga-lume (*luc*) só permeia a membrana eucariota em baixos valores de pH e requer a adição de luciferina exógena para a geração de luz.

A reação da luciferase de vaga-lume, *Photinus pyralis*, apresenta algumas características únicas, quando comparada a outros ensaios. As reações enzimáticas em sua maioria são medidas tanto pelo consumo de um substrato, quanto pela geração de um produto, geralmente um composto estável que pode ser determinado

após um tempo específico. A reação da luciferase de vaga-lume é representada na figura 3-4.

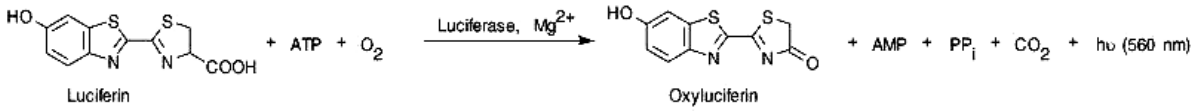

Figura 3-5: Esquema da reação redox luciferase de vaga-lume (Virta et al., 1995).

Nesta reação, os produtos típicos que se acumulam, ou seja, AMP, PPi e CO_2, não são medidos, e sim a luz produzida pela reação durante um determinado período de tempo (Ford & Leach, 1998). Cabe ressaltar que a emissão de luz é função da quantidade de ATP presente no meio, um dos cofatores da reação.

3.6.1.2 *Escherichia coli* MC1061 E SUA APLICAÇÃO COMO COMPONENTE BIOLÓGICO DO BIOSSENSOR

O microrganismo utilizado no presente estudo foi desenvolvido por um grupo de pesquisa finlandesa (Virta et al., 1995) utilizando tecnologia de DNA recombinante e vêm sendo utilizado como ferramenta para pesquisar a biodisponibilidade do mercúrio em amostras ambientais.

Em relação ao mecanismo de funcionamento da *Escherichia coli* MC1061, usada no presente trabalho, esta tem o gene repórter sob o controle de um promotor que é induzido pela presença intracelular de um metal específico, o mercúrio. Utiliza o gene *LucFF* da luciferase do vaga-lume como gene repórter inserido no transposon 21. O plasmídeo (pT0011), responsável pela detecção do Hg (II), contém o gene repórter sob o controle do promotor mer (*mer* + R + gene promotor), que é induzido por Hg (II) dentro da célula, ver Figura 3-6 (Barrocas, 2004).

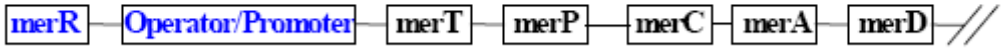

Figura 3-6: Esquema da inserção do promotor o transposon Tn 21.(Barrocas, 2004.

A *E.coli* (MC1061) possui ainda dois outros genes (Figura 3-7), que conferem resistência aos antibióticos kan = Canamicina e Cat = cloranfenicol. O gene de resistência a cloranfenicol está localizado a jusante do gene da luciferase do vaga-lume e também está sob o controle do promotor mer. A resistência a canamicina é peculiaridade para esta estirpe em particular, uma vez que o gene que confere a resistência está ativo o tempo todo (Barrocas, 2004).

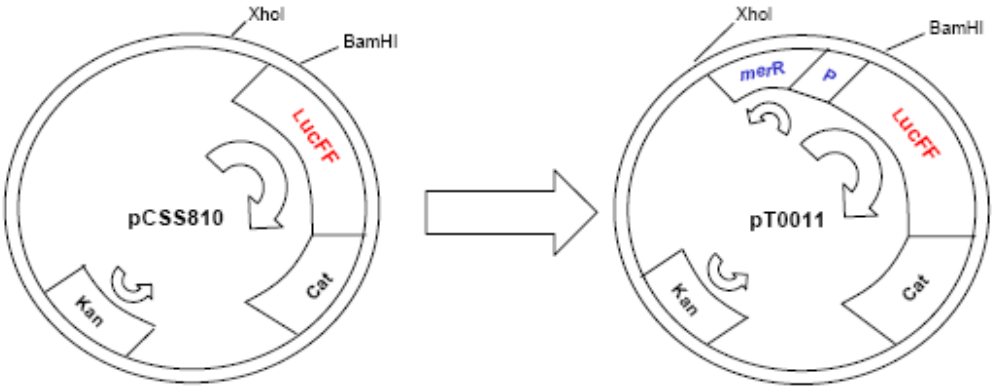

Figura 3-7: Desenho do plasmídeo modificado geneticamente (Barrocas, 2004).

3.7 TIPOS DE RESÍDUOS ORIUNDOS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS SÓLIDAS – CHORUME

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) saneamento pode ser definido como, “o controle de fatores que atuam sobre o meio ambiente e que exercem, ou podem exercer, efeitos prejudiciais ao bem-estar físico, mental ou social do homem”. A partir desta definição pode ser inserido também o conceito de limpeza urbana, que engloba, além de outros serviços, a coleta, o tratamento e a destinação final do lixo ou resíduos sólidos (Celere et al., 2007).

A disposição e o gerenciamento de resíduos urbanos e industriais constituem hoje um dos grandes desafios do gerenciamento ambiental no Brasil. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no Brasil, 64% dos resíduos dos municípios vão para os lixões a céu aberto, que degradam o meio ambiente e comprometem a saúde pública.

A maior parte do lixo do planeta acaba sendo disposta em lixões, sem controle (depósitos a céu aberto, oficiais ou clandestinos) ou jogada nos cursos d'água**,** para que desapareça do alcance de nossas vistas. O mais correto seria depositar em local seguro, cujo destino idealmente, seria o aterro sanitário. Este acaba sendo rejeitado em todos os lugares planejados para seu funcionamento, uma vez que ninguém quer ficar próximo a um empreendimento desta natureza.

Um dos desafios nos projetos de aterros sanitários é o tratamento do lixiviado uma vez que sua qualidade é alterada em função das características dos resíduos dispostos no aterro, de fatores relativos à área, de fatores climáticos e, sobretudo, da idade do aterro (Mannarino et al., 2006).

A maior parte dos aterros sanitários hoje disponíveis está com sua vida útil limitada, muitos não possuem nenhum tipo de tratamento para o lixiviado, ou o tratamento nem sempre acontece da maneira adequada. O uso inadequado dos locais para disposição final dos resíduos sólidos vem acarretando sérias conseqüências para o ecossistema natural e para a saúde humana, principalmente a poluição dos solos e águas subterrâneas pela infiltração de líquidos e percolados, e das águas superficiais pelo escoamento de líquidos percolados ou carreamento de resíduos das águas da chuva (Lima, 2005).

Além disso, as áreas de despejo dos resíduos (lixões, aterros semi-controlados e aterros sanitários) não se tratam de um ponto final, devido ao resíduo líquido, chorume. Este é produzido pelo lixo, principalmente após as chuvas, quando várias das substâncias orgânicas e inorgânicas dos resíduos são carreadas pela água.

A composição físico-química do chorume é extremamente variável, dependendo de fatores que vão desde as condições pluviométricas locais até tempo de disposição e características do próprio lixo, dos quais podemos enumerar: dinâmica de decomposição ao longo do tempo, variações na forma de operação do aterro sanitário, na composição dos resíduos depositados, no volume de chuvas entre outras alterações climáticas (Mannarino et al., 2006; Celere et al., 2007).

O chorume se caracteriza por ser um líquido malcheiroso, constituído de ácidos orgânicos, produto da ação enzimática dos microrganismos, de substâncias solubilizadas através das águas da chuva, que incidem sobre a massa de lixo e, ainda, de substâncias formadas a partir de reações químicas que ocorrem entre os constituintes do resíduo. Sua composição está relacionada ainda a alta concentração de matéria orgânica, reduzida biodegradabilidade (em aterros

antigos), presença de metais pesados, sólidos suspensos, compostos orgânicos originados da degradação de substâncias que são metabolizadas, como carboidratos, proteínas e gorduras e de substâncias recalcitrantes (Celere et al., 2007).

Este resíduo pode contaminar por centenas de anos um lençol freático, caso não seja tratado. Por apresentar substâncias altamente solúveis, pode escoar e alcançar as coleções hídricas superficiais ou até mesmo infiltrar- se no solo e atingir as águas subterrâneas (Figura 3-8), comprometendo sua qualidade e potenciais usos (Celere et al., 2007).

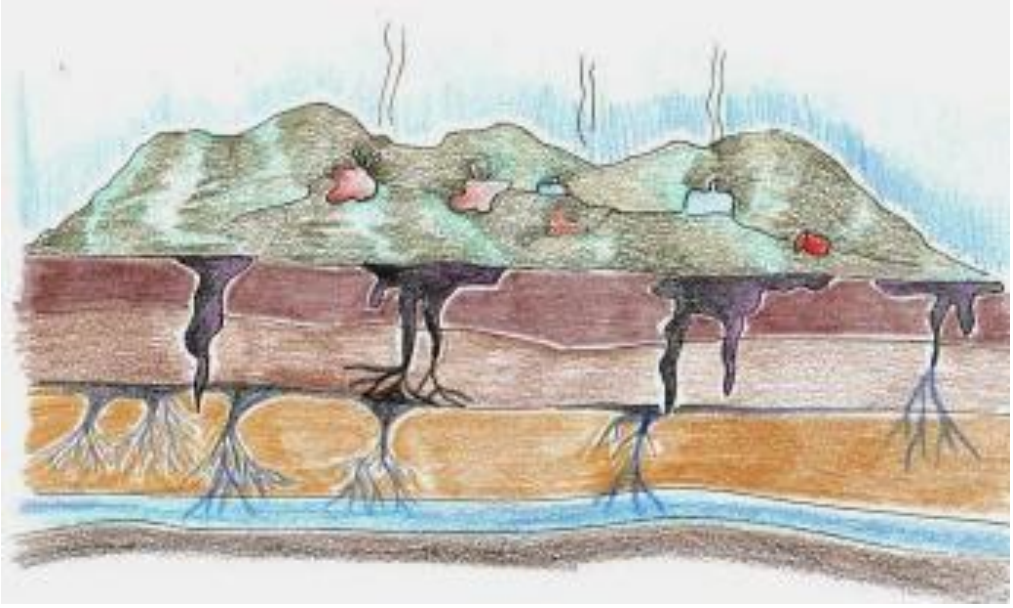

Figura 3-8: Esquema de como ocorre a contaminação do meio ambiente pelo chorume (Fonte: ducana.zip.net/images/lis-08a.jpg acessado em 22 de janeiro de 2010).

A decomposição dos resíduos sólidos é um processo dinâmico comandado por organismos decompositores de matéria orgânica, sendo em sua maioria bactérias heterotróficas, anaeróbias e facultativas. Esta decomposição pode ser descrita pelas fases aeróbia e anaeróbia (Augenstein e Pacey, 1991).

A fase aeróbia ocorre durante as primeiras semanas de deposição e recobrimento do lixo no local de despejo. A ação de decomposição é realizada pelas bactérias aeróbias que utilizam o oxigênio presente no interior do aterro. É mais intensa no início, e à medida que o oxigênio vai ficando escasso, a decomposição torna-se mais lenta. O pH inicial do lixo na decomposição aeróbia é quase neutro (aproximadamente 7), decrescendo à medida que a decomposição anaeróbia ácida se estabelece. A presença de águas pluviais exerce grande influência sobre esta fase, pois facilita a redistribuição de nutrientes e microrganismos ao longo do aterro (Schalch, 1984).

Após o período de consumo do O_2 ou da predominância de espécies aeróbias, inicia-se a fase anaeróbia, onde a decomposição ocorre através dos organismos anaeróbios e/ou facultativos (inicialmente por bactérias acetogênicas, o que dá um caráter ácido ao chorume produzido). Esta fase é caracterizada, inicialmente, pela “quebra” de polímeros complexos em monômeros na presença de água (hidrólise) e baixa produção de ácidos. O término desta fase ocorre quando os monômeros são transformados em diferentes ácidos (carboxílicos, graxos voláteis, acéticos) por processos acidogênicos e/ou acetogênicos (Lin & Chang, 2000; Schalch, 1984).

Após a fase ácida, inicia-se a fase metanogênica instável com a presença das bactérias acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas simultaneamente. Em seguida inicia-se a metanogênica estável, a fase mais longa do processo. A presença de ácidos decresce com a queda da população de bactérias acidogênicas e o pH tende a voltar a neutralidade e há formação do biogás nesta fase. A matéria orgânica facilmente e medianamente degradável já foi praticamente consumida e os

resíduos encontram-se em processo de bioestabilização e o pH tende a ser maior que 7 (Lin & Chang, 2000; Celere et al., 2007).

O estudo dos metais pesados no chorume e em outras matrizes ambientais vem sendo considerado prioritário nos programas de promoção da saúde em escala mundial, pois todas as formas de vida podem ser afetadas direta ou indiretamente pela presença de metais pesados (Segura-Muñoz, 2003).

3.7.1 CARACTERÍSTICAS DOS ATERROS SANITÁRIOS, ATERROS SEMI CONTROLADOS E LIXÕES

Os resíduos sólidos são o tema principal de diversas reuniões científicas, devido a um aumento considerável na produção e na importância do seu gerenciamento. Gerenciar os resíduos de forma adequada, em aterros sanitários, é necessário para que se possa estabelecer um controle dos aspectos sanitários, ambientais e sociais, tais como a disseminação de doenças, a contaminação do solo e das águas subterrâneas e superficiais, a poluição do ar pelo gás metano, e o favorecimento da presença de catadores. Os locais de despejo que não recebem nenhum tipo de controle ou tratamento são denominados de lixões (lixo a céu aberto*)*, como na figura 3-9. Existe ainda outro tipo de local de despejo que pode ser considerado como aterro semi- controlado, que periodicamente pode ser coberto por terra.

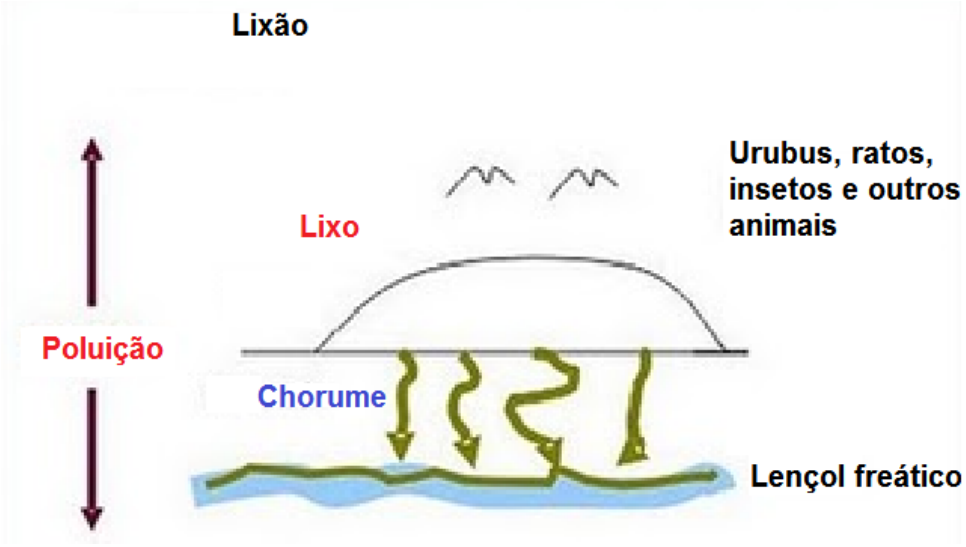

Figura 3-9: Esquema de um lixão. (Fonte: http://www.lixo.com.br, acessado dia 09 de fevereiro de 2010).

O chorume gerado por um lixo recém-disposto no aterro apresenta elevada carga orgânica, pH ácido e diversos compostos potencialmente tóxicos, diferentemente do chorume resultante de resíduos dispostos há muito tempo, que apresenta pH alcalino e a carga orgânica drasticamente reduzida em relação ao primeiro (Bidone & Povinelli, 1999; Bisordi, 1999).

Os aterros denominados como controlados, geralmente são antigos lixões que passam por um processo de "remediação" da área do aterro, ou seja, isolamento do entorno para minimizar os efeitos da contaminação ambiental, por um processo de gerenciamento, para posterior recebimento e tratamento adequado a novos resíduos recebidos.

O local de despejo denominado aterro sanitário (Figura 3-10) serve para lixo residencial urbano e possui pré-requisitos de ordem sanitária e ambiental. Deve ser construído de acordo com técnicas definidas, como: impermeabilização do solo

para que o chorume não atinja os lençóis freáticos, contaminando as águas; sistema de drenagem para chorume, que deve ser retirado do aterro sanitário e depositado em lagoa próxima que tenha essa finalidade específica, vedada ao público; sistema de drenagem de tubos para os gases, principalmente o gás carbônico, o gás metano e o gás sulfídrico, pois, se isso não for feito, o terreno fica sujeito a explosões e deslizamentos (CETESB, 2001). O objetivo essencial deste aterro é minimizar os impactos ao meio ambiente.

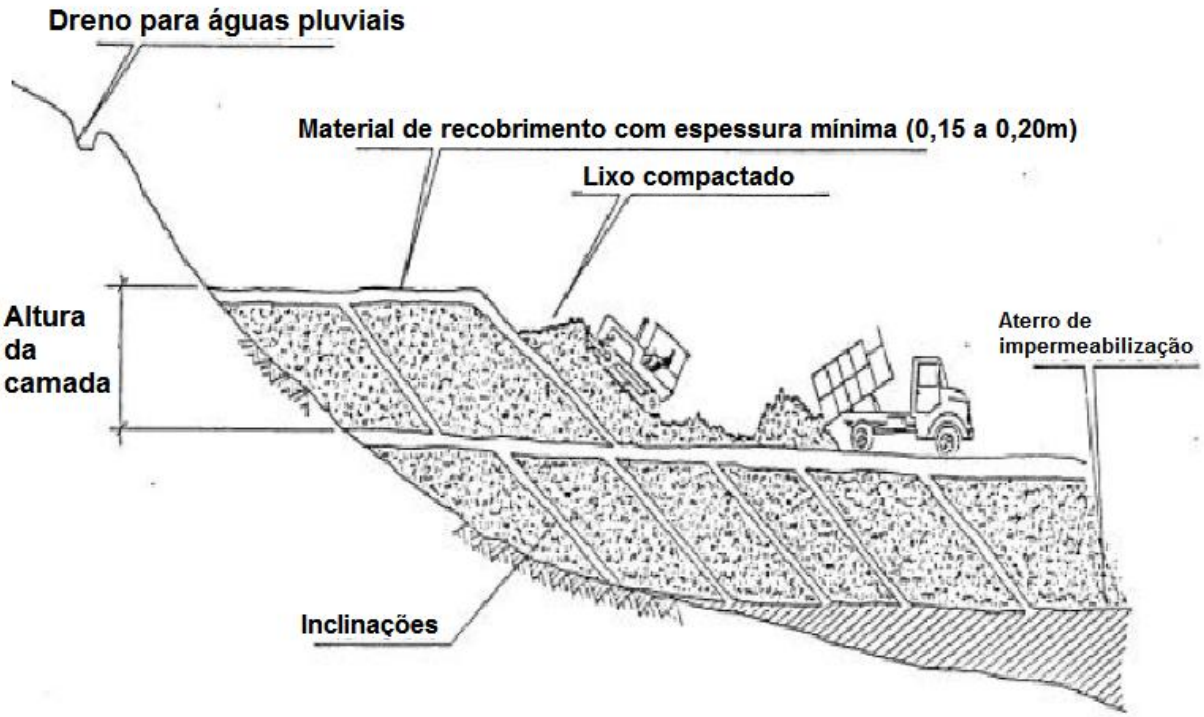

Figura 3-10: Esquema de funcionamento de um aterro sanitário. (Fonte: Adaptado de http://www.infoescola.com/ecologia/aterro-sanitario-e-mdl/, acessado dia 09 de fevereiro de 2010).

No presente estudo as amostras ambientais a serem testadas e monitoradas quanto a presença de mercúrio biodisponível, serão provenientes de três localidades diferentes que podem ser tratadas como: lixão, aterro semi-controlado e aterro sanitário.

CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Durante o presente trabalho, foram utilizados os seguintes equipamentos: Estufa de secagem (QUIMIS); Placa de aquecimento e agitação (QUIMIS); agitador de tubos vortex (QUIMIS); Espectrofotômetro UV-visível (Q798DRM – QUIMIS) e Espectrofotômetro Hach DR 2000; Balança AG 200- IV2000 – Analisador de Umidade por Infra-vermelho, (GEHAKA); Centrífuga (QUIMIS); Luminômetro (Luminoskan Ascent 2.4); Oxímetro (DM – 4P Digimed – Digicrom Analytical 41814) e Medidor de pH (Q400MT – QUIMIS). Os reagentes utilizados foram adquiridos da VETEC e SIGMA de grau P.A.

4.1.1 DESCONTAMINAÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS

Os materiais de vidro e plástico do laboratório foram descontaminados utilizando procedimentos de lavagem, ajustado para a sua resistência química específica. Em geral, eles foram colocados em um banho de HCl 3M por 2 dias, seguido por um banho de HCl 0.5M por 2 dias. Depois da lavagem com água deionizada, eles foram então colocados em sacos plásticos duplos e armazenados até serem utilizados. A descontaminação se fez obrigatória para minimizar a contaminação (pelo metal mercúrio) nos materiais a serem utilizados nos testes bioluminescentes.

4.1.2 EQUIPAMENTO LUMINOSKAN ASCENT (Labsystems, Inc.)

O luminômetro, figura 4-1, é capaz de medir emissões de luminescências em uma variedade de poços presentes nas placas onde as amostras são condicionadas, e podem atuar em pequenos valores de concentrações. Este equipamento foi utilizado para todos os bioensaios luminométricos e a unidade de detecção de luz é medida em unidades relativas de luz (URL).

Figura 4-1: Equipamento Luminoskan Ascent utilizado para medição da luminescência. (Fonte: www.thermo.com)

O princípio de funcionamento do luminômetro é baseado no plano onde a bioluminescência é captada de cada poço da placa a ser lido, sendo esta refletida pela lente, passada pelo filtro de emissão até atingir o tubo fotomultiplicador. A figura 4-2 ilustra a forma de funcionamento do luminômetro. No equipamento há também um sistema de proteção denominado *ligth shield*, que serve para evitar interferência na captação de luz dos poços vizinhos.

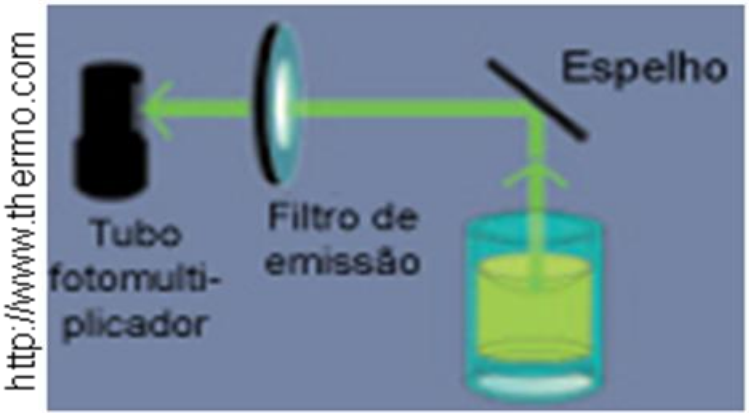

Figura 4-2: Esquema funcionamento do luminômetro (fotodetecção). (Fonte: www.thermo.com)

4.2 BIOSSENSOR MICROBIANO - COMPONENTE BIOLÓGICO: *E. coli* MC1061

4.2.1 PREPARO DE MEIOS E SOLUÇÕES

A primeira tarefa de qualquer estudo microbiológico é o preparo dos meios de cultura que serão utilizados para cultivar os microrganismos a serem estudados. Neste estudo foram usados dois meios de cultura: *LB e M9* sais mínimos (Barrocas, 2004). Todas as soluções utilizadas diretamente nos experimentos com o biossensor de mercúrio foram biologicamente descontaminadas. A maioria dos materiais e soluções foram esterilizados em autoclave e guardados em local limpo e a manipulação foi cuidadosa utilizando técnicas assépticas rigorosas. O protocolo de esterilização da autoclave envolve aquecimento a 121°C por 25 minutos a 1 atm. Neste item estão descritas as composições dos meios e soluções utilizados tanto para o crescimento celular (LB e M9), quanto para os experimentos de bioluminescência (M9), assim como o meio sólido de manutenção do microrganismo (LB agar).

4.2.2 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE CANAMICINA (10mg/mL)

A conservação da solução estoque foi realizada em frasco escuro, sem troca de oxigênio, e sob refrigeração, a fim de se evitar a decomposição do antibiótico, sendo a mesma mantida em congelador (- 5º C).

4.2.3 MEIO LB (*LURIA-BERTANI*)

O meio LB é considerado um meio quimicamente indefinido devido a sua complexa composição e é usado principalmente para manutenção do microrganismo. O meio LB é utilizado para a reconstituição das unidades populacionais ou bactérias liofilizadas e o meio LB agar utilizado para crescimento em placas, a partir de colônias congeladas do microrganismo.

Os tipos de meios LB usados no presente trabalho foram: LB Broth, Miller (Sigma - cat # BP1426-500); LB Agar, Miller (Sigma - cat # BP1425-500), cujos procedimentos de preparo são descritos a seguir.

4.2.3.1 PREPARO DOS MEIOS LB E LB AGAR:

- ✓ 400 mL de água deionizada no erlenmeyer;
- ✓ 10g de LB ou 16g de LB agar, sendo estes transferidos para os respectivos erlenmeyers. Em cada erlenmeyer foi colocada uma barra de agitação magnética, e estes colocados em placas magnéticas de agitação, até que os reagentes fossem dissolvidos.
- ✓ Os erlenmeyers foram devidamente vedados e levados à autoclave.

✓ Após a esterilização completa, e o devido resfriamento à temperatura ambiente, foram acrescentados 1,2 mL da solução estoque de monossulfato de canamicina para uma concentração de 30 mg/mL. Os meios foram conservados sob refrigeração.

4.2.4 MEIO MÍNIMO DE SAIS

O meio mínimo de sais M9 é o principal meio utilizado nos experimentos com o microrganismo em questão. Este foi usado no crescimento prévio e nos ensaios luminométricos com o biossensor. O meio **M9** consiste basicamente de uma mistura de sais inorgânicos acrescidos de fatores de crescimento (glicose e casamino ácidos) preparados em tampão de pH 7 elaborado com sais de fosfato. Duas alternativas de M9 são utilizadas nos experimentos **M9 Cl** e **M9 NO_3**. A diferença entre as duas formulações é a eliminação de sais cloreto, a partir da receita original, e da substituição dos respectivos sais de nitrato (Atlas, 1997).

Tabela 4-1: Composição do meio mínimo de sais *M9*.

Componentes M9 Cl	Componentes M9 NO_3
Água deionizada	Água deionizada
Na_2HPO_4	Na_2HPO_4
KH_2PO_4	KH_2PO_4
$MgSO_4$	$MgSO_4$
$Ca(NO_3)_2$	$Ca(NO_3)_2$
glicose	glicose
Casamino ácidos	Casamino ácidos
NH_4Cl	NH_4NO_3
NaCl	$NaNO_3$

4.2.4.1 <u>SOLUÇÃO DE SAIS M9 (M9Cl E M9NO_3)</u>:

✓ 987 mL de água deionizada em balão de 1L, para os meios M9Cl e M9NO_3, respectivamente. Adição de 11,37g de Na_2HPO_4 e 3,00g de KH_2PO_4 a cada um dos frascos.

✓ Adição de 1,50g de NH_4NO_3 e 0,73g de $NaNO_3$ ao balão de solução de sais $M9NO_{3,}$ e de 1,00g de NH_4Cl e 0,50g de NaCl ao balão de solução de sais M9Cl, misturando bem as soluções de sais que foram em seguida autoclavadas.

4.2.4.2 SOLUÇÃO ESTOQUE DE $MgSO_4$ 0,1 M:

Para o preparo da solução estoque de $MgSO_4$ 0,1 M foram adicionados 100mL de água deionizada em um erlenmeyer de 125 mL, e em seguida adicionados 2,46g de $MgSO_{4.}7H_2O$ misturando bem a solução que foi em seguida levada à autoclave.

4.2.4.3 SOLUÇÃO ESTOQUE DE $Ca(NO_3)_2$ 0,01 M:

Para o preparo da solução estoque de $Ca(NO_3)_2$ 0,01 M foram adicionados 100mL de água deionizada em um erlenmeyer de 125 mL, e em seguida adicionados 0,24g de $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ misturando bem a solução que foi em seguida levada à autoclave.

4.2.4.4 SOLUÇÃO ESTOQUE DE GLICOSE 200g/L:

Para o preparo da solução estoque de glicose de 200g/L foram adicionados 10mL de água deionizada em um erlenmeyer de 50 mL, e em seguida adicionados 2,00g de glicose, misturando bem a solução que em seguida foi levada à autoclave.

4.2.4.5 SOLUÇÃO ESTOQUE DE CASAMINO ÁCIDOS 100 g/L:

Para o preparo da solução estoque de casamino ácidos 100g/L foram adicionadas 10 mL de água deionizada em um erlenmeyer de 50 mL, e em seguida,

adicionados 1,00g de casamino ácidos misturando bem a solução, sendo em seguida levada à autoclave.

O meio mínimo de sais utilizado foi preparado com a solução de sais M9 (M9Cl e $M9NO_3$) e as outras soluções individuais, que são combinadas, imediatamente antes da utilização. No qual se transfere 500µL de soluções previamente preparadas (solução 0,1M $MgSO_4.7H_2O$; solução 0,01M $Ca(NO_3)_2.4H_2O$; 200 g/L de solução glicosada, solução 100 g/L casamino ácidos) para erlenmeyers de 250 mL, nos quais já haviam sido adicionados 48 mL de solução de sais M9 (quer M9Cl ou $M9NO_3$). O volume total foi de 50 mL em cada meio de cultivo, no crescimento prévio e nos experimentos luminométricos.

O antibiótico canamicina foi adicionado (150µL) em uma concentração final de 30mg/L para seleção positiva do transposon *luc* presente no plasmídio, garantindo o crescimento só de células capazes de emitirem luz em contato com mercúrio.

4.2.5 CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *ESCHERICHIA COLI* MC1061

O microrganismo bioluminescente repórter*, Escherichia coli* MC1061, foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa da Finlândia (Virta et al, 1995).

Após o crescimento celular, fez-se a leitura da densidade ótica no comprimento de onda de 600nm (DO_{600}) em espectrofotômetro UV-visível (Q798DRM - QUIMIS). Calculou-se então a quantidade (mL) necessária do pré-inóculo para se obter uma DO_{600} inicial de aproximadamente 0,2 em 50 mL de meio M9 (M9Cl ou $M9NO_3$).

Para iniciar o acompanhamento do perfil de crescimento da cepa MC1061, adicionou-se a quantidade calculada anteriormente a um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio M9 (M9Cl ou $M9NO_3$) sendo retirada a primeira alíquota

para leitura da DO_{600} no tempo inicial (0 h). O cultivo foi mantido então a 30ºC em shaker a 150 rpm e o crescimento celular foi monitorado em intervalos de 1 hora, pela retirada de alíquotas e medida da absorbância destas a 600 nm, até que fosse alcançado um valor máximo estável, sendo neste caso atingida a fase estacionária do crescimento microbiano.

4.2.5.1 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

Após crescimento celular em meio mínimo de sais, conforme descrito no item 4.2.4, a cultura foi incubada de 10 a 16 horas a 30ºC em shaker a 150 rpm, as células de *Escherichia coli* MC1061 obtidas em estado estacionário, foram centrifugadas por 25 minutos a 3500 rpm e o precipitado obtido foi ressuspenso em um mínimo de água deionizada (cerca de 5 mL). As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e lavadas com água destilada novamente. A biomassa foi ressuspenso em 10 mL de água deionizada para se obter uma suspensão concentrada de células.

Sete mililitros dessa suspensão celular foram filtrados a vácuo em uma membrana Millipore, a biomassa foi então pesada em uma balança que elimina toda a umidade da amostra (Balança AG 200, IV2000), calculando-se em seguida a concentração (g/L) da suspensão celular, dividindo a massa celular (g) obtida, pelo volume conhecido (0,007L). Este procedimento foi feito em duplicata. Desta mesma suspensão utilizada para o cálculo da concentração celular, utilizando os três mililitros restantes, várias diluições foram feitas para obter cerca de oito leituras de absorbância a 600nm, entre 0,08 e 0,7, correspondendo cada leitura à sua respectiva concentração celular.

4.2.5.2 MANUTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS

As células foram mantidas em placas de Petri com meio sólido LB agar, descrito no item 4.2.3.1, armazenadas a 5 ºC (geladeira). Foram realizados repiques mensais para manutenção da viabilidade celular. Para estocagem por períodos maiores, as células foram mantidas em solução de glicerol.

4.2.5.2.1 MANUTENÇÃO EM SOLUÇÃO DE GLICEROL

Outra forma conveniente para armazenar bactérias é a manutenção em glicerol. As culturas podem ser armazenadas por tempo indeterminado sem perder a sua viabilidade ou evitando a contaminação com outras cepas, assim é definida como uma técnica de armazenamento a longo prazo. Variações do mesmo podem ser encontradas na literatura (Perry & Staley, 1997). Neste procedimento microrganismos foram inoculados em um tudo de ensaio contendo 5 mL de meio LB com canamicina (conforme descrito no item 4.2.3.1), partindo de uma colônia isolada recém crescida. A cultura foi incubada, de 10 a 16 horas a 30º C até atingir a fase estacionária de crescimento.

O estoque a -5º C foi feito adicionando 1,5 mL do cultivo bacteriano a um tubo de polipropileno com tampa rosqueada (criotubo) contendo 0,5 mL de glicerol 80% estéril, foi feita uma mistura vigorosa, com uso do vortex, para assegurar que o glicerol era uniformemente disperso, evitando a formação de cristais de gelo, o que poderia diminuir a viabilidade celular. Os tubos foram então guardados no congelador.

4.2.5.3 EXPERIMENTOS DE BIOLUMINESCÊNCIA

Para os procedimentos de determinação da bioluminescência foram utilizadas placas brancas opacas de 96 poços, sendo possível a realização de desenhos experimentais, de acordo com a ordem de leitura do aparelho.

Para tais ensaios, definidos como *processo tradicional* segundo Barrocas (2004), porque envolve a adição das amostras diretamente nos poços das microplacas, as soluções de mercúrio (10 µL) foram adicionadas aos poços da placa luminométrica de acordo com o desenho experimental previamente estabelecido (baseado na ordem de leitura de cada amostra), antes das alíquotas das amostras celulares (50 µL), com densidade celular conhecida. Após serem adicionadas as soluções, as placas foram incubadas a temperatura ambiente no interior da câmara do luminômetro por 60 minutos (Barrocas, 2004), para a produção da luciferase, que por sua vez, deve ser proporcional ao mercúrio incorporado pelos microrganismos. Após a etapa de incubação, o processo de medição se iniciou com o aparelho dispensando 100µL de substrato da luciferase em cada poço da placa, luciferina 1mM, e monitorando em seguida cada poço por 12 segundos. O volume total utilizado em cada poço foi de 160µL. A suspensão celular utilizada foi diluída 5 vezes, visando atingir a concentração celular de trabalho desejada.

Os resultados dos experimentos bioluminescentes são apresentados nesta dissertação como o somatório de luz emitida (URL) em cada condição testada.

4.2.5.3.1 PREPARO DAS CÉLULAS

O preparo da suspensão celular usada nos ensaios bioluminescentes foi realizado a partir de uma cultura nova, figura 4-3, obtida de inóculo crescido em 50mL de meio M9 (Cl ou NO_3), incubados de 10 a 16 horas, a 150 rpm e 30ºC , centrifugada por 6 minutos a 3200 rpm, sendo o sobrenadante adicionado de 10 mL de água deionizada (para o processo de lavagem), centrifugado por mais 6 minutos, retirando o sobrenadante e adicionando à cultura 10 mL de meio fresco (M9 Cl ou M9 NO_3). Este último passo foi repetido, estando então as células prontas para os ensaios, sendo mantidas no gelo até o início dos testes. As diluições que foram utilizadas para os ensaios luminométricos partiram das obtidas a partir da curva de peso seco.

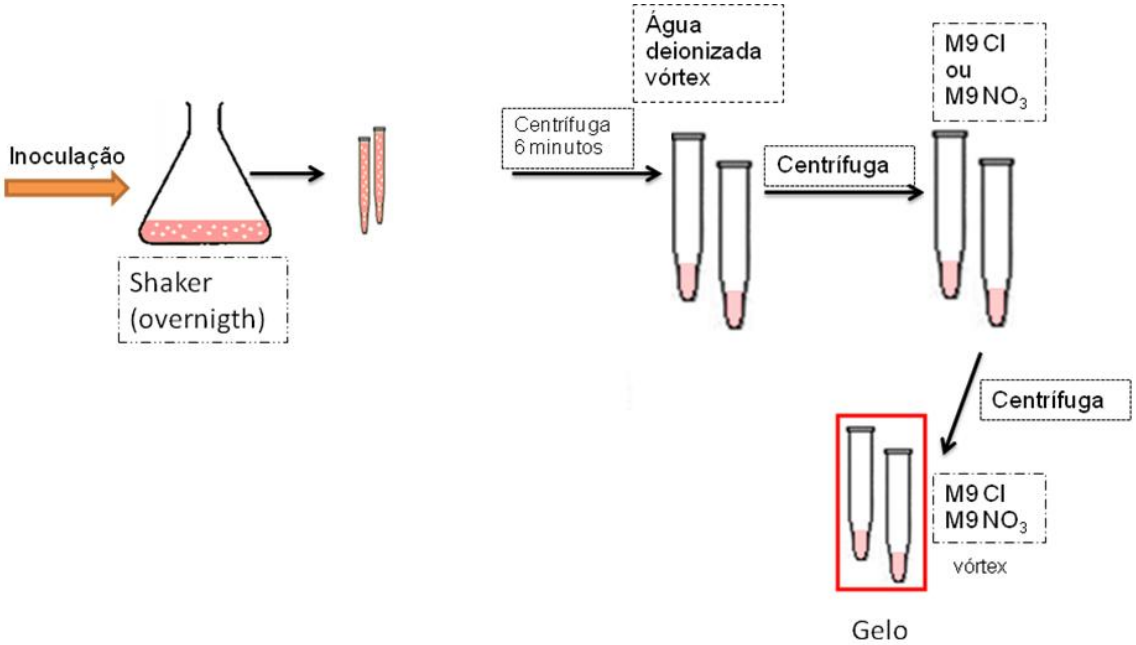

Figura 4-3: Esquema de preparo das células para os ensaios luminométricos**.**

4.2.5.3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE LUCIFERINA (1mM)

A luciferina, o substrato para a reação, atravessa as membranas celulares bacterianas apenas em pH ácido. Assim, apenas a forma protonada de luciferina é

facilmente permeável à membrana celular. Por conseguinte, para um ensaio bem sucedido da reação da luciferase do vaga-lume in vivo, o pH extracelular do meio deve ser ligeiramente ácido. Se esta condição não for atingida, a membrana celular funciona como uma barreira ao transporte da luciferina, e a medida de luminescência será mais dependente da taxa de difusão da luciferina que sobre o montante da luciferase intracelular (Ford e Leach, 1998; Tauriainen et al., 1999).

O sinal de emissão da luz medida por biossensores de células inteiras é dependente não só da concentração do substrato indutor, como da estabilidade da enzima luciferase em uma cepa particular, do seu estado fisiológico e também da presença de outras substâncias estimulantes ou inibitórias na amostra a ser medida (Sticher et al.,1997).

4.2.5.3.2.1 SOLUÇÃO ESTOQUE DE D-LUCIFERINA 1 mM (pH = 5,0):

Em um frasco contendo 25mg de luciferina (sal de sódio) foi adicionado 1 ml de solução tampão de citrato 100mM que foi colocado sob agitação em vortex para dissolver ao máximo a luciferina. Em seguida, esta foi transferida para um balão volumétrico contendo 79 mL de solução tampão citrato 100 mM, previamente adicionados. Alíquotas da solução estoque de luciferina foram transferidas para tubo de polipropileno com tampa rosqueada, previamente marcado, usando volumes adequados para os ensaios.

Os tubos foram conservados em congelador (-5º C) envoltos por papel alumínio, pois a luciferina é sensível ao oxigênio e luz, por isso é importante minimizar sua exposição a estes agentes durante a preparação e o armazenamento da solução.

4.2.5.3.2.2 SOLUÇÃO TAMPÃO CITRATO 100 mM (pH = 5.0)

Para o preparo da solução tampão citrato 100 mM foram pesados 14,71 g de citrato de sódio, que estes foram transferidos para um balão de 500 mL sendo em seguida adicionados 400 mL de água deionizada. O pH foi controlado através da adição de HCl 1M em quantidade necessária para ajustar o pH para 5,0.

4.2.5.3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE MERCÚRIO

As amostras de mercúrio foram preparadas a partir de uma solução padrão de mercúrio (1g/L). Todas as soluções foram preparadas, no dia de cada experimento, utilizando solução de HNO_3 0,0045 M. Na tabela 4-2 estão descritas as concentrações de mercúrio utilizadas durante todo o trabalho, em cada procedimento, ou seja, no planejamento experimental e na elaboração da curva de calibração.

Tabela 4-2: Soluções de mercúrio utilizadas no presente estudo.

Soluções de mercúrio utilizadas relativas a cada procedimento	Concentração das amostras de mercúrio (mg/L)
Planejamento experimental	0,0001; 0,00299; 0,01005; 0,0171 e 0,02
Curva de calibração e adição padrão	$1x\ 10^{-8}$; $1x\ 10^{-7}$; $1x\ 10^{-6}$; $2x\ 10^{-6}$; $4x\ 10^{-6}$; $6x\ 10^{-6}$; $8x\ 10^{-6}$; $10x\ 10^{-6}$

4.2.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A otimização das condições experimentais, seleção do melhor meio de cultura e do melhor tempo de incubação no luminômetro, foi utilizada para maximizar a variável de resposta (URL), através de um planejamento delineamento composto central rotacional (DCCR). A análise dos resultados foi realizada através dos cálculos do efeito estimado, do erro padrão e da distribuição de Student de cada

variável controle sobre a variável resposta empregando o programa Statistica (versão 6.0).

Para estimativa do erro experimental foram feitas três replicatas do experimento, correspondendo aos pontos centrais, e quatro (4) pontos axiais (alfa) foram adicionados ao planejamento experimental elaborado. As variáveis independentes estudadas, concentração celular (fator de diluição) e concentração de mercúrio variaram de acordo com a tabela 4-3. Todos os experimentos foram executados de forma randômica.

Tabela 4-3: Condições preestabelecidas das variáveis independentes como nível superior (+), nível inferior (-) e ponto central (0).

	Níveis de Variáveis				
Parâmetros	**-1,41**	**-1**	**0**	**1**	**1,41**
A - Concentração celular (fdil)	01:33,3	01:30,4	01:23,3	01:16,2	01:13,3
B - Concentração de Hg (mg/L)	0,0001	0,00299	0,01005	0,0171	0,02

O preparo das células nesta etapa foi feito conforme descrito no item 4.2.5.3.1 e as diluições utilizadas neste planejamento experimental partiram da curva de peso seco. Sendo assim, foram utilizadas as seguintes diluições: 1:33,3 e 1:13,3 como pontos axiais do planejamento, sendo as restantes calculadas por interpolação. As respectivas concentrações celulares foram então calculadas a partir da curva de peso seco (Tabela 4-4). O processo de adição de amostras na placa se deu conforme descrito no item 4.2.5.3.

Para a avaliação do tempo de incubação os ensaios foram realizados em separado (20, 45 e 60 minutos). Para cada ensaio foram realizados um total de 11 experimentos, ou seja, 11 poços para cada meio M9 testado (M9Cl e M9NO_3), conforme pode ser observado na tabela 4-4, resultando em 6 planejamentos experimentais: M9 Cl_20 minutos; M9 Cl_45 minutos; M9 Cl_60 minutos; M9 NO_3_20 minutos; M9 NO_3_45 minutos e M9 NO_3_60 minutos.

Tabela 4-4: Esquema do planejamento experimental para cada meio M9 Cl e M9 NO_3 e para cada tempo.

Número de Ensaios	Níveis de Variáveis		Fator de diluição	Concentração de mercúrio
	Amostra celular	Amostra de Hg		
1	-1,00	-1,00	01: 30,4	0,00299 mg/L
2	-1,00	1,00	01: 30,4	0,0171 mg/L
3	1,00	-1,00	01: 16	0,00299 mg/L
4	1,00	1,00	01: 16	0,0171 mg/L
5	-1,41	0,00	01: 33,3	0,01005 mg/L
6	1,41	0,00	01: 13,3	0,01005 mg/L
7	0,00	-1,41	01: 23,3	0,0001 mg/L
8	0,00	1,41	01: 23,3	0,02 mg/L
9	0,00	0,00	01: 23,3	0,01005 mg/L
10	0,00	0,00	01: 23,3	0,01005 mg/L
11	0,00	0,00	01: 23,3	0,01005 mg/L

4.2.7 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA REAL - CHORUME

4.2.7.1 LOCALIDADES

As amostras de chorume utilizadas nesta dissertação já vinham sendo empregadas em outros estudos tratando da contaminação por mercúrio no Laboratório de Análises Semiquantitativas - CETEM. Em virtude da impossibilidade da divulgação dos nomes das localidades de onde foram recolhidas, as amostras (coletadas entre os meses de setembro e outubro de 2009), foran denominadas de acordo com o descrito na tabela 4-5.

Tabela 4-5: Amostras de chorume utilizadas nos ensaios e as datas de coleta.

Amostra (Aterro sanitário)	Data da coleta	Amostra (Lixão)	Data da coleta	Amostra (Semi-controlado)	Data da coleta
A_1_1	24/9/2009	B_1_1	25/9/2009	C_1_1	25/9/2009
A_1_2	1/10/2009	B_1_2	1/10/2009	C_1_2	28/9/2009
A_1_3	8/10/2009	B_1_3	8/10/2009	C_1_3	6/10/2009
A_1_4	16/10/2009	B_1_4	16/10/2009	C_1_4	13/10/2009

As amostras de chorume foram estudadas conforme os experimentos descritos no item 4.2.5.3, por ensaios de bioluminescência para detecção do mercúrio biodisponível, por meio das curvas de calibração (água deionizada e adição de padrão nas amostras de chorume). Determinou-se ainda fatores físico-químicos como pH, demanda bioquímica de oxigênio - DBO e a demanda química de oxigênio - DQO. Todos os parâmetros foram analisados utilizando-se o software Excel, por meio da média, variância e desvio padrão.

4.2.7.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Ensaios de detecção da bioluminescência, para diferentes faixas de concentração de mercúrio em soluções aquosas (descrito no 4.2.5.3.3 na tabela 4-2), assim como, com amostras de chorume diretamente com Hg (II) adicionado, foram realizados para estudo da sensibilidade de medição, alcance de limites máximos e mínimos de concentração e linearidade das curvas de calibração. A obtenção da curva de calibração para o sistema proposto é essencial, pois permitirá correlacionar o sinal bioluminescente lido com a concentração de mercúrio presente nas amostras.

4.2.7.2.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MERCÚRIO EM SOLUÇÕES AQUOSAS

Após obter a suspensão celular concentrada descrita anteriormente (item 4.2.5.3.1), a mesma foi mantida em gelo a fim de reduzir a atividade microbiana.

Para os ensaios luminescentes, conforme descrito no item 4.2.5.3, utilizou-se placas brancas opacas, sendo possível a realização de desenhos experimentais, de

acordo com a ordem de leitura do aparelho. A adição de 10µL das amostras de mercúrio em soluções aquosas utilizando água deionizada (concentrações definidas como mostra tabela 4-2, para construção da curva de calibração) foi feita diretamente nos poços das microplacas, de acordo com o desenho experimental previamente estabelecido (baseado na ordem de leitura), antes das alíquotas das amostras celulares (50 µL).

Após serem adicionadas as soluções, as placas foram incubadas à temperatura ambiente no interior da câmara do luminômetro pelo melhor tempo definido após planejamento experimental (45 minutos).

Em seguida, o processo de medição se iniciou com o aparelho dispensando 100µL de substrato da luciferase em cada poço da placa, monitorando cada poço por 12 segundos. O volume total utilizado em cada poço foi de 160µL. Todas as condições foram feitas em triplicata, os resultados da curva de calibração são apresentados em somatório de luz emitida (URL) em cada condição testada.

4.2.7.2.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MERCÚRIO UTILIZANDO AMOSTRAS REAIS

No presente estudo trabalhou-se com amostras complexas, como o chorume. Portanto, foi planejada uma curva de adição padrão na qual diferentes alíquotas do padrão de mercúrio foram adicionadas nas próprias amostras reais analisadas, segundo diferentes faixas de concentração de mercúrio (descrito no 4.2.5.3.3 na tabela 4-2). Todas as condições foram feitas em triplicata e os resultados da curva de calibração são apresentados em somatório de luz emitida (URL) em cada condição testada.

4.2.7.3 DETERMINAÇÃO DA DQO, DBO E pH DAS AMOSTRAS REAIS

4.2.7.3.1 DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO – DQO

A Demanda Química de Oxigênio das amostras de chorume foi determinada pelo método padrão colorimétrico de refluxo fechado (Hach), com $K_2Cr_2O_7$ em meio ácido, contendo Ag_2SO_4 como catalisador e $HgSO_4$ para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. Primeiramente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, e então diluídas. Às amostras foram acrescentados os reagentes e estas foram digeridas a 150ºC, durante 2 horas. Após resfriamento, a absorbância a 600nm era lida em espectrofotômetro Hach DR 2000. As análises foram realizadas em triplicata e o branco reacional foi preparado pela adição de água em substituição à amostra. Uma curva padrão foi preparada previamente empregando-se biftalato de potássio como substância padrão, sendo utilizada para converter a absorbância (600nm) das amostras em DQO (APHA, 1992).

4.2.7.3.2 DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO - DBO

A Demanda Bioquímica de Oxigênio das amostras de chorume foi determinada através do método da incubação (com diluição), com medição da quantidade de oxigênio consumida durante a incubação. Geralmente a DBO da amostra excede a quantidade de oxigênio dissolvido disponível no frasco, sendo necessário diluir a amostra. Como o crescimento microbiano requer nutrientes (nitrogênio, fósforo, metais traços), estes são adicionados à água de diluição, que é tamponada para assegurar que o pH permaneça em faixa adequada aos microrganismos. A água de diluição utilizada nos testes deve ser de boa qualidade, não havendo restrições

quanto à fonte, desde que esta não contenha compostos orgânicos biodegradáveis e substâncias bioinibitórias.

Algumas amostras não contêm uma população microbiana suficiente. Neste caso, a adição de uma população de microrganismos (ou semente) se faz necessária. Neste estudo usou-se uma semente comercial contendo microrganismos liofilizados na determinação da DBO.

As amostras foram colocadas em frascos específicos para as análises de DBO completamente selados e mantidos em incubadora a 20º C por 05 dias (Figura 4-4). O oxigênio foi medido através do Método Analítico Digital (Oxímetro DM – 4P Digimed – Digicrom Analytical 41814), antes e após a incubação (descontando o valor medido para semente comercial) sendo a diferença da concentração de oxigênio determinada, o valor de DBO (APHA, 2005).

Figura 4-4: Ilustração das amostras incubadas para análises da DBO.

4.2.7.3.3 DETERMINAÇÃO DE pH

A medida do pH é uma das determinações mais importantes e freqüentes no controle do tratamento da água para abastecimento público e de efluentes industriais. O pH das amostras das três localidades foi medido em um medidor de pH (Q400MT – QUIMIS). As medidas foram feitas em triplicatas e então foi feita uma média destes valores.

O pH representa a concentração dos íons hidrogênio (em escala antilogarítima) e expressa a acidez, (pH < 7,0), ou neutralidade (pH=7) da água. A presença de ácidos húmicos ou atividade fotossintética intensa, podem contribuir para a elevação ou redução do pH. O pH influencia na solubilidade de diversas substâncias, na forma em que estas se apresentam na água e em sua toxicidade.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no desenvolvimento do biossensor microbiano proposto estão apresentados no decorrer deste capítulo, sendo todos obtidos em triplicata.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA

5.1.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

O perfil de crescimento do microrganismo *Escherichia coli* MC1061 é apresentado abaixo, na figura 5.1. A partir da curva de crescimento obtida, pode ser observado que as células entram em fase exponencial após aproximadamente sete horas, enquanto que para atingir a fase estacionária foram necessárias em torno de onze horas.

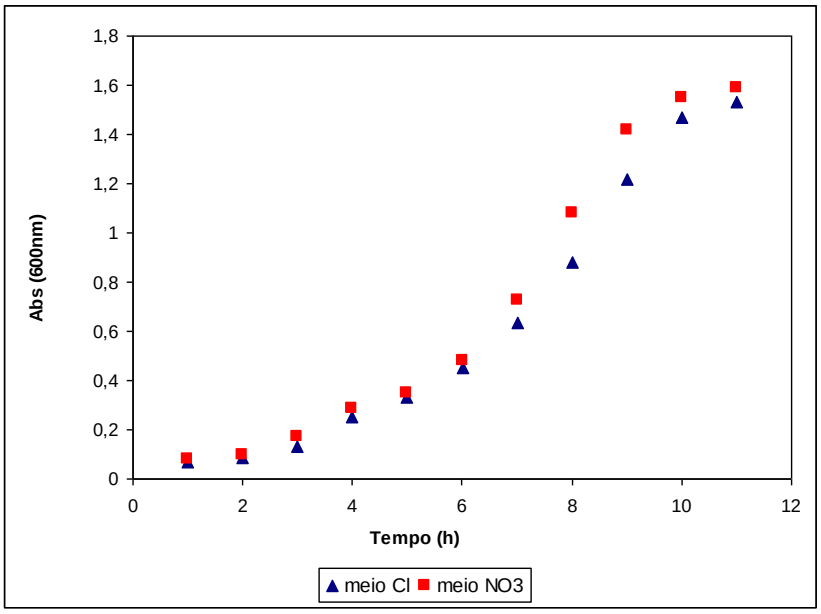

Figura 5-1: Curva de crescimento para meio **M9 Cl** e **M9 NO_3** de *E. coli* MC1061

O teste da curva de crescimento foi considerado para a obtenção da densidade celular e determinação do estado fisiológico das células utilizadas nos experimentos posteriores de bioluminescência. A curva referente à fase exponencial está apresentada a seguir (figura 5-2).

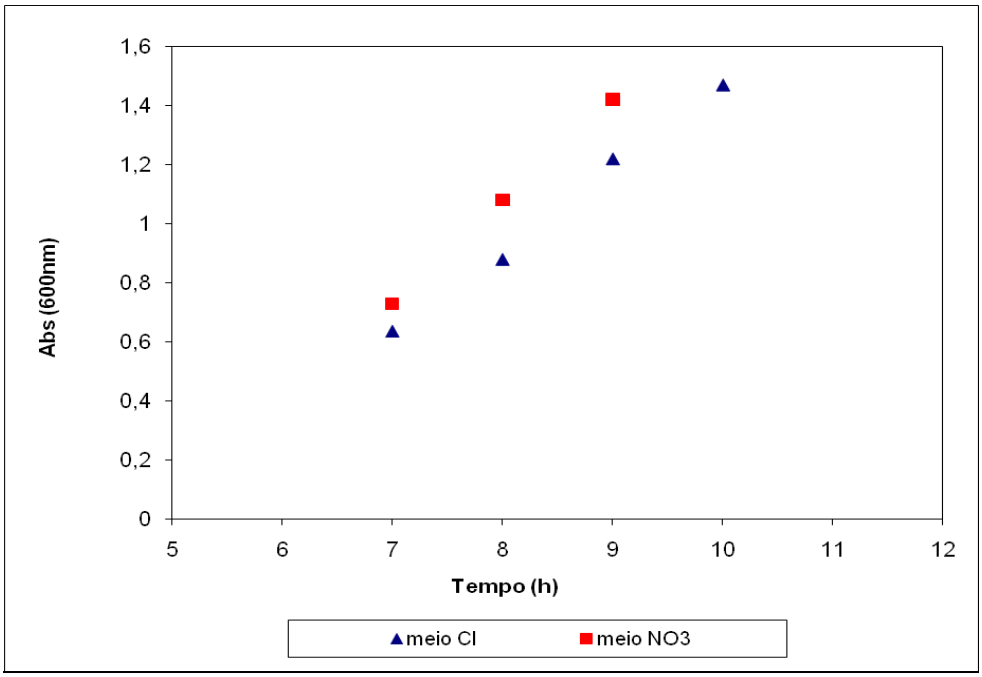

Figura 5-2: Fase exponencial do crescimento da *E. coli* MC1061

5.1.2 CORRELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO

Duas curvas de peso seco foram obtidas (meios M9Cl e M9 NO_3), a partir das quais relacionou-se a densidade ótica com a concentração celular apresentadas nas figuras 5.3 e 5.4 respectivamente. Sendo possível gerar as seguintes equações da reta: Concentração celular [g/L] = (Abs_{600nm} – 0,0218)/ 1,7673) e Concentração celular [g/L] = (Abs_{600nm} – 0,0336)/ 1,7923), correlacionando a leitura da absorbância a 600nm com a concentração (g/L) da suspensão celular, para os meios M9Cl e $M9NO_3$, respectivamente.

As equações descritas acima foram utilizadas em todos os experimentos posteriores para determinação da concentração celular, na etapa de otimização

(planejamento experimental) e nos ensaios luminométricos com as curvas de calibração com amostras padrões e reais.

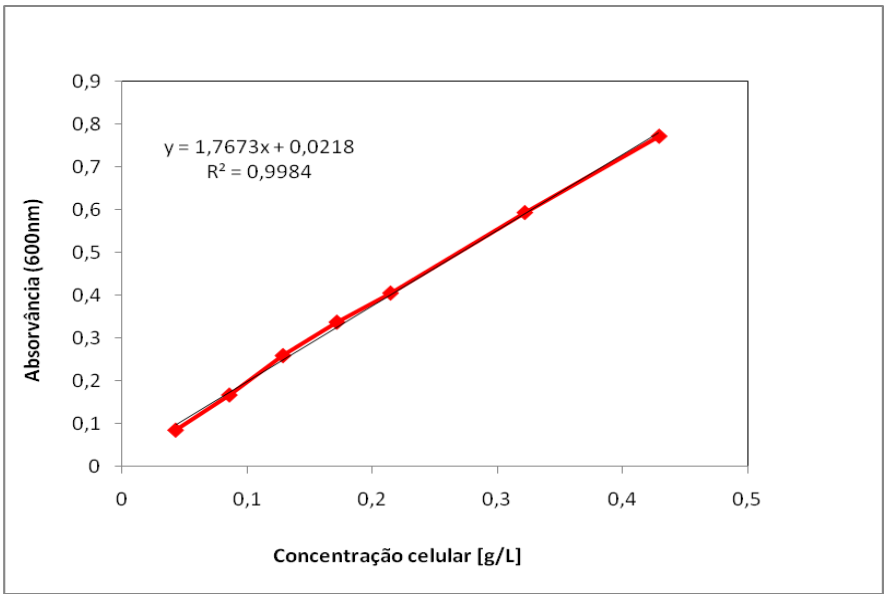

Figura 5-3: Correlação entre absorbância e peso seco M9 Cl.

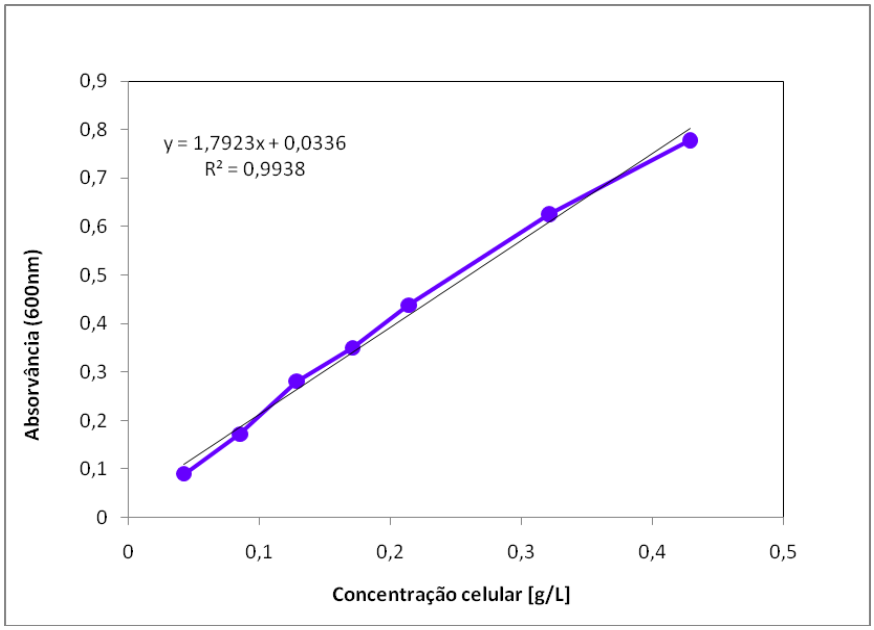

Figura 5-4: Correlação entre absorbância e peso seco M9 NO_3.

5.2 PERFIL CINÉTICO DA RESPOSTA BIOLUMINESCENTE

Ensaios preliminares com microrganismo foram realizados a fim de se estabelecer os parâmetros de monitoramento a serem aplicados ao equipamento de fotodetecção, como o tempo de detecção, utilizado no presente estudo e conhecer o perfil cinético da resposta bioluminescente do microrganismo *E. coli* MC1061 (Figura 5-5). Além disso, foi possível identificar que a interferência de “ruído” era mínima, ou seja, o ensaio realizado com amostra sem mercúrio (branco) não apresentou emissão luminescente sigfinicativa.

No estudo desenvolvido por Barrocas (2004) um perfil preliminar foi iniciado através do monitoramento do sinal por um período longo (25 minutos) para ter certeza de que toda a luz emitida era integrada. No entanto, os dados obtidos no presente trabalho demonstraram uma redução significativa na emissão de luz depois de alguns minutos, e o monitoramento passou a ser até 1 minuto para obter um perfil mais detalhado da reação e assim otimizar a análise global.

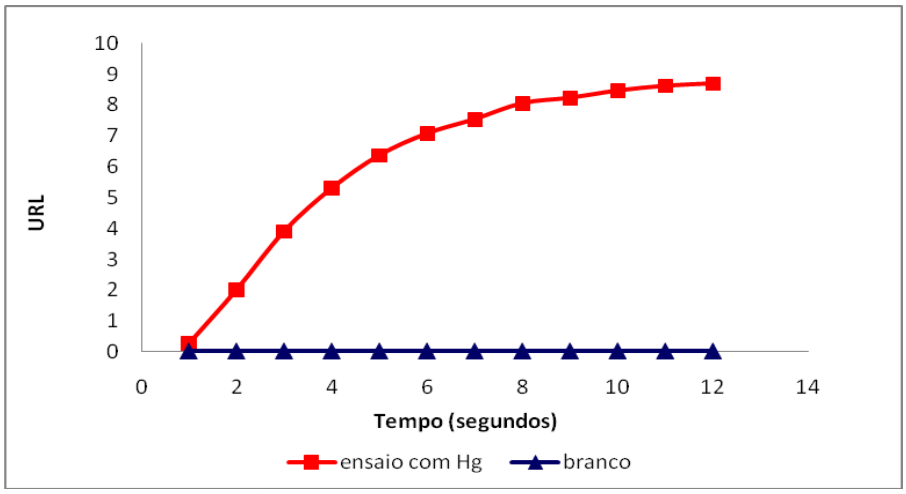

Figura 5-5: Perfil cinético da resposta bioluminescente do microrganismo *E. coli* MC1061 (0,2 g/L do microrganismo) após exposição ao mercúrio (0,0001 mg/mL)

O perfil cinético da resposta bioluminescente foi continuamente monitorado até alcançar a emissão máxima de luz na condição testada, cada condição experimental foi avaliada em triplicata, sendo apresentado na figura 5.5 a média de cada triplicata.

A condição de monitoramento após a adição da luciferina nos poços foi de 12 segundos, o mesmo definido por Barrocas (2004), após análises preliminares. No presente estudo o tempo de 12 de monitoramento foi utilizada em todos os testes de medida da emissão da bioluminescência apresentados e as curvas cinéticas foram continuamente monitoradas até alcançarem a emissão máxima de luz. Neste teste preliminar foi utilizado o tempo de incubação 20 minutos na câmara luminométrica até o início da monitoração pelo equipamento. Foram monitorados 6 poços, cada um foi medido 12 vezes, sendo realizadas 72 leituras no total até o fim do experimento, completando 22 minutos de teste.

5.3 PARÂMETROS DE INFLUÊNCIA NA RESPOSTA BIOLUMINESCENTE

Alguns parâmetros que poderiam influenciar a bioluminescência foram selecionados para serem avaliados através da ferramenta planejamento experimental, como: a concentração celular (variada utilizando diferentes fatores de diluição na amostra de microrganismo original), e tempo de incubação na câmara luminométrica (20; 45 e 60 minutos).

5.3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A matriz do delineamento pode ser vista nas tabelas 5-1 e 5-4, com suas variáveis na forma codificada e com seus respectivos valores reais. Apresentam

ainda os resultados da variável resposta em cada meio **M9 Cl e M9 NO_3** nos tempos testados.

Tabela 5-1: Planejamento Composto Central em valor codificado e real e suas respectivas respostas para o meio de M9 Cl_20 minutos, M9 Cl_45 minutos e M9 Cl_60 min.

			Valores experimentais				
Ensaios	**Escalonados**		**Não-escalonados**				
	Concentração celular	Hg	Concentração celular (g/L)	Hg (mg/mL)	URL Cl _20 min	URL Cl _45 min	URL Cl_60 min
1	-1	-1	0,08603	0,00299	11,5026	9,0735	8,0382
2	-1	1	0,08603	0,0171	11,3432	10,8923	9,3604
3	1	-1	0,13458	0,00299	15,4214	27,9189	18,5894
4	1	1	0,13458	0,0171	14,6955	37,2655	23,7528
5	-1,41	0	0,07209	0,01005	10,9826	30,0729	34,9201
6	1,41	0	0,16359	0,01005	12,87	44,3473	58,4838
7	0	-1,41	0,07934	0,0001	8,3184	30,3318	28,5819
8	0	1,41	0,07934	0,02	9,9357	30,7952	31,0912
9	0	0	0,07934	0,01005	10,8125	31,7195	4,1689
10	0	0	0,07934	0,01005	6,9395	33,5628	31,4362
11	0	0	0,07934	0,01005	10,4836	28,202	31,1115

Na condição **M9 Cl** com 20 minutos de incubação pode-se observar que o maior valor de emissão de luz em URL foi 15,4214, no *nível +1* para concentração celular e no *nível -1* para concentração de mercúrio. Pode-se destacar que a diferença entre os pontos de máximo e mínimo (Δ= 7,103) se mostrou maior que o erro puro encontrado, indicando que as variações observadas para os diferentes ensaios neste planejamento foram decorrentes das diferentes condições das variáveis independentes.

Nos ensaios **M9 Cl** com 45 minutos e 60 minutos foi observado que os maiores valores obtidos em URL foram 44,3473 e 58,4838, respectivamente, no *nível +1,41* para concentração celular e no *nível 0* para concentração de mercúrio. Destaca-se ainda a diferença entre os pontos de máximo e mínimo (Δ=35,2738 e Δ=50,4456

respectivamente). No ensaio com 45 minutos onde foi encontrado o delta maior que o erro puro, enquanto que no planejamento **M9 Cl** com 60 minutos o delta se apresentou menor que o erro puro (244,9191). A decisão foi excluir o planejamento com 60 minutos das análises subseqüentes, por não ser possível afirmar se a variação decorreu das variáveis independentes ou ainda de problemas com o erro puro.

Na análise experimental do meio **M9 Cl** (usando programa *Statistica* versão 6.0) no tempo de incubação de 20 minutos, o valor não se mostrou significativo ($p < 0,05$). No tempo de 45 minutos, apenas o termo linear da variável independente, concentração celular, mostrou-se significativa (tabelas 5-2 e 5-3).

Tabela 5-2: ANOVA do meio M9Cl com 20 minutos de incubação na câmara.

Fator	SS	dF	MS	F	p
(1) Concentração celular (L)	12,35116	1	12,35116	2,678344	0,243364
Concentração celular (Q)	21,15952	1	21,15952	4,588434	0,165472
Concentração de Hg (L)	0,24567	1	0,24567	0,053273	0,838924
(2)Concentração de Hg (Q)	1,62293	1	1,62293	0,351932	0,613173
1L by 2 L	0,08023	1	0,08023	0,017398	0,907135
Lack of fit	18,63689	3	6,21230	1,347134	0,452869
Erro Puro	9,22298	2	4,61149		
Total SS	61,70329	10			

Tabela 5-3: ANOVA do meio M9Cl com 45 minutos de incubação na câmara.

Fator	SS	dF	MS	F	p
(1) Concentração celular (L)	534,737	1	534,7374	72,08527	0,013590
Concentração celular (Q)	0,089	1	0,0889	0,01199	0,922817
Concentração de Hg (L)	17,466	1	17,4663	2,35454	0,264671
(2)Concentração de Hg (Q)	67,167	1	67,1666	9,05439	0,094972
1L by 2 L	14,167	1	14,1669	1,90977	0,301100
Lack of fit	409,612	3	136,5374	18,40592	0,051970
Erro Puro	14,836	2	7,4181		
Total SS	1062,870	10			

O diagrama de pareto, conforme apresentado na figura 5-6 evidencia de forma rápida e clara os efeitos padrozinados que são significativamente importantes. Quando ultrapassam a linha divisória, a hipótese nula é rejeitada ($p < 0,05$).

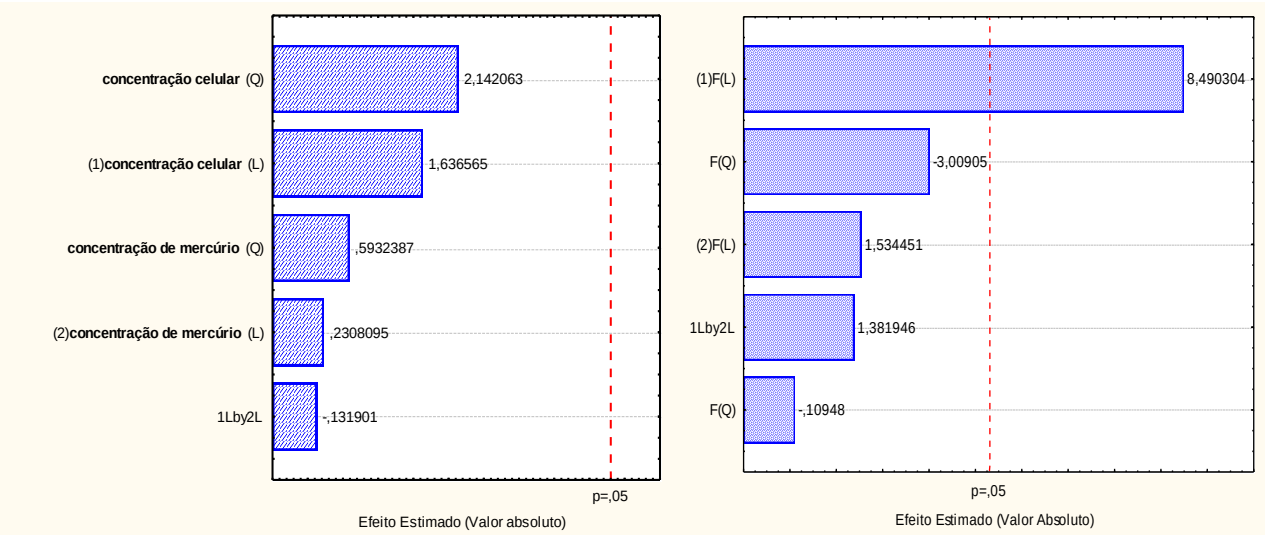

Figura 5-6: Diagrama de Pareto – meio M9 Cl nos tempos de 20 e 45 minutos na câmara luminométrica.

A matriz do delineamento para o meio M9NO_3 pode ser vista na tabela 5-4, com suas variáveis na forma codificada e com seus respectivos valores reais, e ainda os resultados da variável resposta nos tempos testados.

Tabela 5-4: Planejamento Composto Central em valor codificado e real e suas respectivas respostas para o meio de M9 NO_3_20 minutos, M9 NO_3_45 minutos e M9 NO_3_60 minutos.

			Valores experimentais				
Ensaios	**Escalonados**		**Não-escalonados**				
	Concentração celular	Hg	Concentração celular (g/L)	Hg (mg/ml)	URL NO_3_20min	URL NO_3_45min	URL NO_3_60min
1	-1	-1	0,06473	0,00299	11,6586	18,1855	20,0524
2	-1	1	0,06473	0,0171	74,4607	142,569	207,6073
3	1	-1	0,14791	0,00299	26,9451	16,881	17,2776
4	1	1	0,14791	0,0171	74,2226	70,4758	78,6795
5	-1,41	0	0,06643	0,01005	38,2126	59,5338	46,9837
6	1,41	0	0,19487	0,01005	32,3132	36,9677	90,3306
7	0	-1,41	0,10151	0,0001	10,362	16,7806	33,1695
8	0	1,41	0,10151	0,02	41,4743	179,6632	211,8178
9	0	0	0,10151	0,01005	24,8592	52,2264	15,4428
10	0	0	0,10151	0,01005	25,5763	53,5218	133,5535
11	0	0	0,10151	0,01005	23,4343	47,859	168,5995

No ensaio do meio **M9 NO_3** com 20 minutos de incubação pode ser observado que o maior valor em URL foi 74,4607, no *nível -1* para concentração celular e no

nível +1 para concentração de mercúrio. Na análise dos efeitos (contrastes) das variáveis independentes, pode ser observado que o efeito de **a** contribui positivamente (15,05), o que significa que o efeito leva a um acréscimo na média da variável resposta, quando passa do nível baixo (-1) para nível alto (+1), assim como o efeito da variável **b** (110,0796). Pode-se ressaltar ainda que a diferença entre os pontos de máximo e mínimo (Δ=64,0987) foi maior que o erro puro encontrado.

Na condição **M9 NO_3** com 45 minutos de incubação foi observado que o maior valor em URL foi 179,6632, no *nível 0* para concentração celular e no *nível +1,41* para concentração de mercúrio. Analisando os efeitos das variáveis independentes, observa-se o efeito de **a** contribuindo negativamente (-79,3977) e o efeito da variável **b** positivamente (177,9783). Ressalta-se que a diferença entre os pontos de máximo e mínimo (Δ=162,8826), foi maior que o erro puro encontrado, assim como no ensaio M9 NO_3 com 20 minutos, sugerindo que nestes dois ensaios as variações observadas foram decorrentes das diferentes condições das variáveis independentes.

No ensaio **M9 NO_3** com 60 minutos de incubação observa-se que o maior valor de emissão de luz foi 211,8178, no *nível 0* para concentração celular e no *nível +1,41* para concentração de mercúrio. Neste ensaio o delta (Δ=194,5402) se apresentou menor que o erro puro (6439,22), assim decidiu-se excluir este planejamento das análises subseqüentes, pelo mesmo motivo que no ensaio M9Cl 60 minutos.

Para a análise experimental do meio **M9 NO_3** (usando programa Statistica versão 6.0) nos tempos de incubação de 20 e 45 minutos, os valores se

apresentaram significativos com exceção do termo linear da concentração celular e do quadrático, no primeiro e no segundo caso, respectivamente (tabela 5-5 e tabela 5-6). Contudo, estes valores são marginalmente significativos (0,05 < p < 0,1).

Tabela 5-5: Estimativa dos efeitos, erro puro e significância dos efeitos, (p) e *t de student*; Meio M9 NO_3-20 minutos (Confiança de 5% *t de student*; p-significância).

Fator	Estimativa dos efeitos	Erro puro	t(2)	p
Média	24,62327	0,629494	39,11595	0,000653
(1) Concentração celular (L)	1,67635	0,770970	2,17434	0,161714
Concentração celular (Q)	18,75525	0,917638	20,43861	0,002385
Concentração de Hg (L)	38,51976	0,770970	49,96272	0,000400
(2) Concentração de Hg (Q)	9,41050	0,917638	10,25513	0,009375
1L by 2 L	-7,76230	1,090316	-7,11931	0,019165

Tabela 5-6: Estimativa dos efeitos, erro puro e significância dos efeitos, (p) e *t de student*; Meio M9 NO_3-45 minutos (Confiança de 5% *t de student*; p-significância)

Fator	Estimativa dos efeitos	Erro Puro	t(2)	p
Média	51,2024	1,713015	29,8902	0,001117
(1) Concentração celular (L)	-26,3277	2,098006	-12,5489	0,006290
Concentração celular (Q)	-8,5559	2,497127	-3,4263	0,075644
Concentração de Hg (L)	102,0823	2,098006	48,6568	0,000422
(2) Concentração de Hg (Q)	41,4153	2,497127	16,5852	0,003616
1L by 2 L	-35,3944	2,967028	-11,9292	0,006954

Analisando o meio M9 NO_3, verificou-se que os efeitos estipulados nas tabelas 5-5 e 5-6 são estatisticamente significativos, visto os valores de (p) e *t de student* para o experimento. O fator de maior significância para o modelo foi a concentração de mercúrio (termo linear) nos dois tempos: 20 e 45 minutos. Na análise da interação dos termos lineares percebe-se que à medida que esses valores aumentam, a variável resposta (emissão de luz obtida em URL) diminui, ou seja, estes fatores contribuirão negativamente para a resposta (Y) do modelo.

As tabelas 5-7 e 5-8 apresentam os valores dos coeficientes de determinação (R^2). O R^2 é uma medida da quantidade de redução na variabilidade de y, obtida pelo uso dos regressores x_1, x_2, ..., x_k . Entretanto, um valor de R^2 não implica necessariamente que o modelo de regressão é bom. A adição de uma variável ao modelo sempre aumentará o R^2, independente da variável adicional ser ou não estatisticamente significativa. Assim, modelos que tenham valores grandes de R^2 podem resultar em "previsões pobres" de novas observações ou estimativas da resposta média (Montgomery & Runger, 2003; Calado & Montgomery, 2003). Por estas razões, o *R adj*. (valor de R ajustado) é que tem de ser avaliado na validação do modelo.

Tabela 5-7: ANOVA NO_3 com 20 minutos de incubação R^2=0,75654; R ajustado=0,51309.

Fator	SS	dF	MS	F	p
(1) Concentração celular (L)	5,620	1	5,620	4,728	0,161714
Concentração celular (Q)	496,601	1	496,601	417,737	0,002385
Concentração de Hg (L)	2967,544	1	2967,544	2496,274	0,000400
(2)Concentração de Hg (Q)	125,022	1	125,022	105,168	0,009375
1L by 2 L	60,253	1	60,253	50,685	0,019165
Lack of fit	1141,124	3	380,375	319,968	0,003117
Erro Puro	2,378	2	1,189		
Total SS	4696,957	10			

Tabela 5-8: ANOVA NO_3 com 45 minutos de incubação R^2=0,96982; R ajustado=0,93963.

Fator	SS	dF	MS	F	p
(1) Concentração celular (L)	1386,30	1	1386,30	157,476	0,006290
Concentração celular (Q)	103,35	1	103,35	11,740	0,075644
Concentração de Hg (L)	20841,58	1	20841,58	2367,485	0,000422
(2)Concentração de Hg (Q)	2421,49	1	2421,49	275,068	0,003616
1L by 2 L	1252,76	1	1252,76	142,306	0,006954
Lack of fit	809,24	3	269,75	30,642	0,031770
Erro Puro	17,61	2	8,80		
Total SS	27393,55	10			

O coeficiente de determinação (R^2) ajustado para o meio de NO_3 20 minutos foi de 51,30% enquanto no tempo de 45 minutos este foi 93,96% (tabelas 5-7 e 5-8). É

importante perceber que o tempo de incubação (20 minutos) pode não ter sido suficiente na produção de luciferase, não refletindo completamente os níveis intracelulares de Hg (II).

Por esta razão, o meio M9 NO_3 no tempo de 45 minutos de incubação na câmara luminométrica se ajusta melhor ao modelo matemático. O diagrama de pareto para os tempos de 20 e 45 minutos de incubação podem ser observados na figura 5-7.

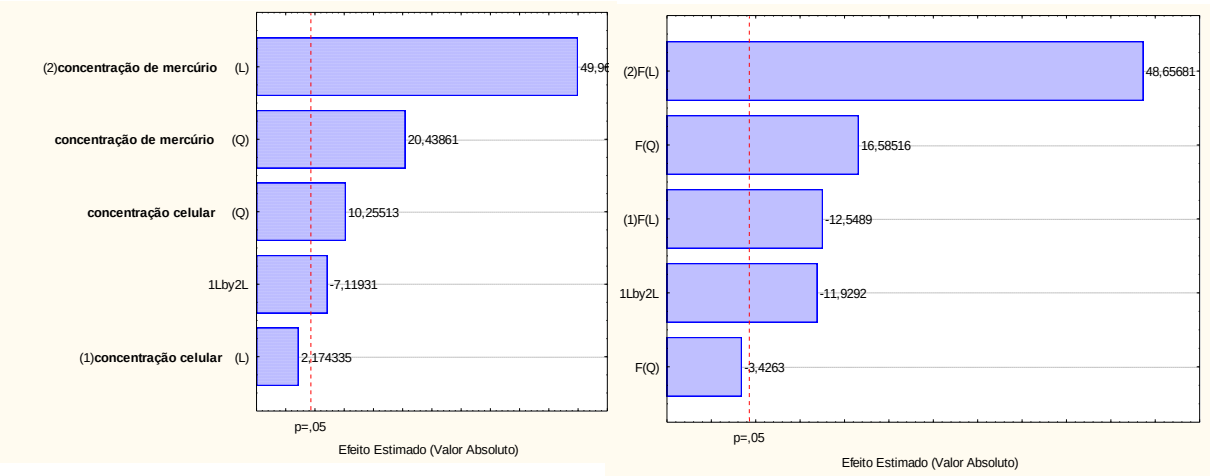

Figura 5-7: Diagramas de Pareto do meio M9NO_3 com 20 e 45 minutos de incubação.

Avaliando os valores do teste *F*, sabe-se que quanto maior o valor de *F* maior é a significância do fator, devendo assim ser considerados significativos os termos que apresentem um valor do teste *F* maior do que o *F* tabelado. A tabela 5-9 de análise de variância (ANOVA) mostra a validade do modelo pelo teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental. O F-tabelado foi menor que o F calculado, validando o modelo experimental (tabela 5-9).

Tabela 5-9: Análise de variância para o desenvolvimento experimental (Limite de confiança de 95%).

Fonte de variação	SQ	Graus de liberdade	QM	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	184,49	5	36,8982	32,1301	1,95	0,00083
Resíduos	5,74	5	1,1484			
Falta de ajuste	5,6197	3				
Erro puro	0,1223	2				
TOTAL	190,233	10				

5.3.2 ANÁLISE DOS RESÍDUOS NO TEMPO DE 45 MINUTOS PARA O MEIO M9 NO_3

Ainda, para a verificação da adequação do modelo, foi feito o teste da normalidade dos resíduos (figura 5.8). Este é um teste exato de hipóteses de nenhuma diferença nas médias dos tratamentos.

5.3.2.1 TESTE DA NORMALIDADE:

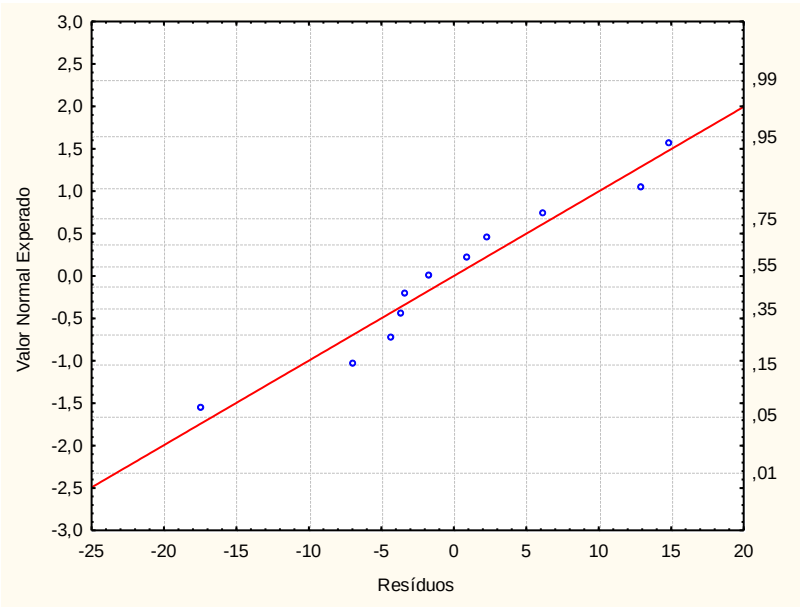

Figura 5-8: Gráfico da probabilidade normal dos resíduos.

Pode-se concluir que é válida a normalidade dos resíduos pela proximidade dos pontos experimentais da linha contínua. Diante do exposto, o modelo para

descrever o efeito da atividade de resposta, URL, no meio de M9 NO_3 – 45 minutos é representado abaixo através da equação (1):

$$\mathbf{Y = 51{,}20 - 13{,}16\ X_1 - 4{,}27\ X_1^2 + 51{,}04\ X_2 + 20{,}70\ X_2^2 - 17{,}69\ X_1\ X_2} \quad \mathbf{(1)}$$

Sendo X1-Concentração celular - termo linear; X_1^2-Concentração celular - termo quadrático; X_2-Concentração de Hg (mercúrio) – termo linear; X_2^2-Concentração de Hg (mercúrio) - termo quadrático; X_1X_2 – Interação entre os termos lineares da concentração celular e de Hg.

Pode ser observado nas figuras 5-9 e 5-10 que quanto mais próximo da região vermelha, maior o valor da emissão de luz em URL. Logo no meio M9 NO_3 com 45 minutos de incubação, a resposta é mais significativa conforme se tem uma diminuição da diluição da concentração celular, mostrando, por conseqüência, uma maior quantidade de mercúrio no interior da célula (teste 5 do planejamento experimental).

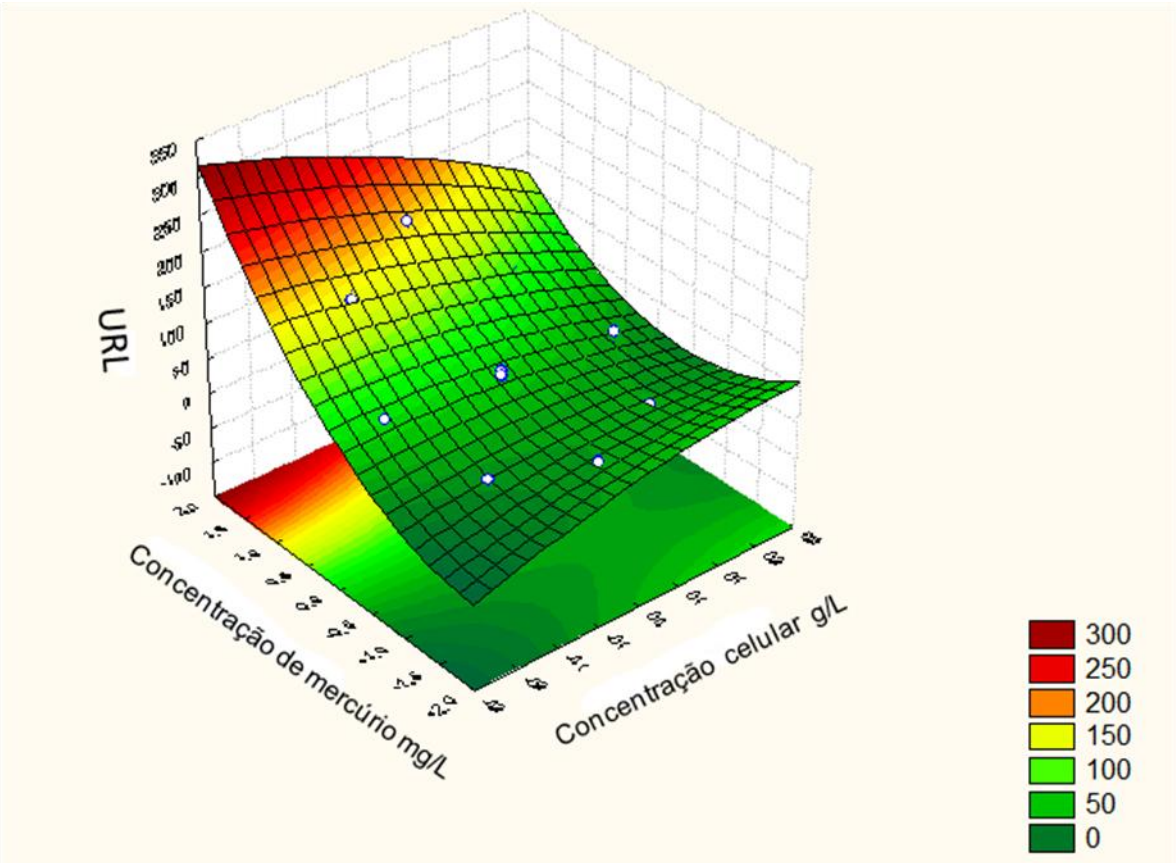

Figura 5-9: Gráfico de superfície de resposta do meio M9 NO_3 com 45 minutos de incubação

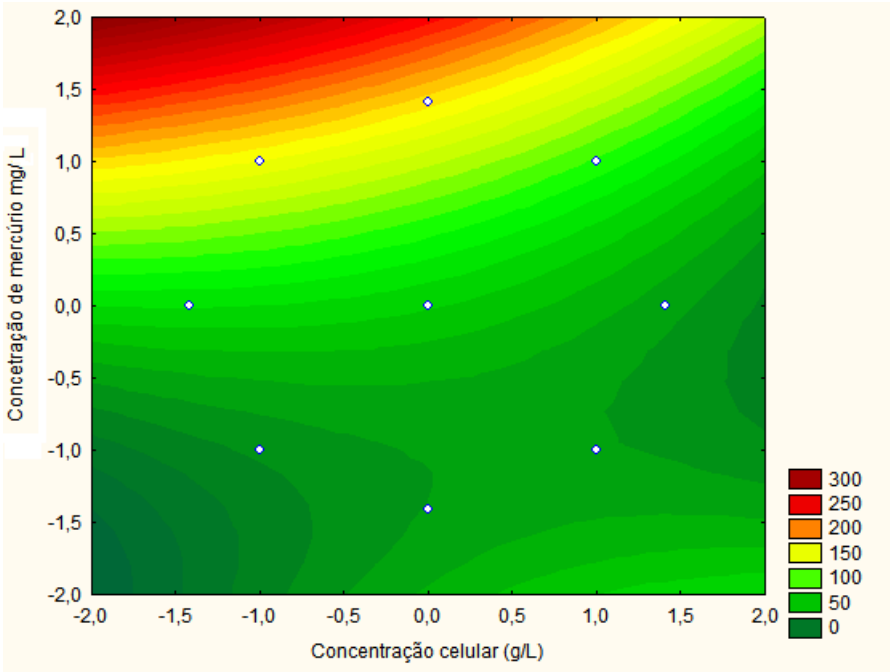

Figura 5-10: Gráfico de contorno do meio de M9 NO_3 com 45 minutos de incubação

Ao se realizar uma comparação da estimativa de efeitos e o ANOVA entre os meios M9Cl e M9NO_3 pode ser observado que o último foi bem mais significativo. Barrocas (2004) através de experimentos de especiação demonstrou que o M9Cl pode ter a especiação do mercúrio afetada. Em virtude disso, se fez necessário a comparação dos meios M9Cl e M9NO_3, uma vez que o meio com nitrato possui a mesma força iônica, além das outras características das substâncias químicas do M9Cl. Deve ser ressaltado que o mais importante é manter um meio que atenda às exigências nutricionais do biossensor em questão.

Farrell et al. (1990) fez a mesma substituição na composição do meio de cultura para estudar os efeitos sobre especiação do Hg (II) e biotoxicidade. Por também acreditar que o meio com cloreto afeta na especiação do mercúrio, o autor estudou a sua influência sobre a biodisponibilidade de Hg (II) e as formas

alternativas para os meios de cultura, como M9NO_3, utilizando sais de nitrato para substituir sais de cloreto análogos.

Dos meios de cultura avaliados, o M9 NO_3 foi o estatisticamente significativo nos tempos: 20 e 45 minutos. Com base nos resultados do planejamento e na experiência laboratorial pode-se dizer que o meio mais estatisticamente significativo para dar prosseguimento aos experimentos com biossensor bacteriano bioluminescente, *Escherichia coli* MC1061, utilizando as melhores condições de crescimento encontradas, e o melhor tempo de incubação na câmara luminométrica foi o meio M9 NO_3 e com 45 minutos de incubação. Diferentemente do tempo encontrado por Barrocas (2004), que foi o de 60 minutos de incubação. No presente estudo foram encontrados valores para erro puro bem maiores que os valores *delta* nos planejamentos com tempo de 60 minutos e por não se poder afirmar se a variação observada decorreu das variáveis independentes ou ainda de problemas com o erro puro, os ensaios foram excluídos.

5.4 AMOSTRAS REAIS

Após análises dos resultados do planejamento de experimentos, os ensaios luminométricos com as amostras reais foram conduzidos utilizando a concentração celular apontada pelo planejamento (item 5.3): a melhor concentração celular de 0,06g/L, um fator de diluição 1:33,3, e o melhor tempo de incubação na câmara luminométrica com o meio M9 NO_3 de 45 minutos.

5.4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Ensaios de detecção da bioluminescência, conforme descrito no item 4.2.5.3, para diferentes faixas de concentração de mercúrio foram realizados para estudo da sensibilidade da medição, alcance dos limites máximo e mínimo de concentração e linearidade das curvas de calibração.

A sensibilidade é um parâmetro muito importante na validação do método. Alguns requisitos são necessários, como por exemplo, obtenção de baixos níveis de resposta do biossensor para o que é considerado como branco reacional (amostra onde o mercúrio não foi adicionado às soluções sintéticas). Esta resposta residual pode ser proveniente de níveis traço de mercúrio (II) nos reagentes ou nos meios utilizados nos ensaios. Portanto, cabe ressaltar que os valores das leituras dos brancos iniciais foram descontados dos valores finais em todos os ensaios realizados neste estudo (o valor máximo encontrado em URL como branco foi 0,0006).

Outro aspecto relevante na caracterização dos ensaios bioluminescentes é a repetibilidade, que inclui a variabilidade dentro de um experimento. (Durand et al., 2003).

Neste caso incluí-se a precisão de medição do equipamento, luminômetro, e a preparação da amostra incluindo a reprodutibilidade de manipulação (por exemplo, pipetagem de soluções e inóculo usados nas análises do biossensor, centrifugação e decantação de amostras, etc.).

A precisão no experimento foi avaliada pela variabilidade de amostras idênticas analisadas repetidamente, tendo as triplicatas suas variâncias calculadas. Tal variância é definida como uma medida da dispersão dos valores de uma amostra em relação à sua média. Para uma medida mais significativa da dispersão dos dados foi utilizada a medida do desvio padrão e o coeficiente de variação (calculado dividindo o desvio padrão pela média).

5.4.1.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MERCÚRIO EM SOLUÇÕES AQUOSAS

Inicialmente, tentou-se estabelecer uma curva padrão de calibração a partir da exposição do microrganismo *Escherichia coli* MC1061 as soluções aquosas contendo mercúrio nas seguintes concentrações finais (mg/L): 1x 10^{-8}; 1x 10^{-7}; 1x 10^{-6}; 2x 10^{-6}; 4x 10^{-6}; 6x 10^{-6}; 8x 10^{-6}; 10x 10^{-6} (tabela 4-2). Entretanto, após os primeiros ensaios para determinação da curva de calibração, a faixa selecionada onde se obteve uma região linear nos dados foi 1,00E-7 a 4,00E-6 mg/L (figura 5-11).

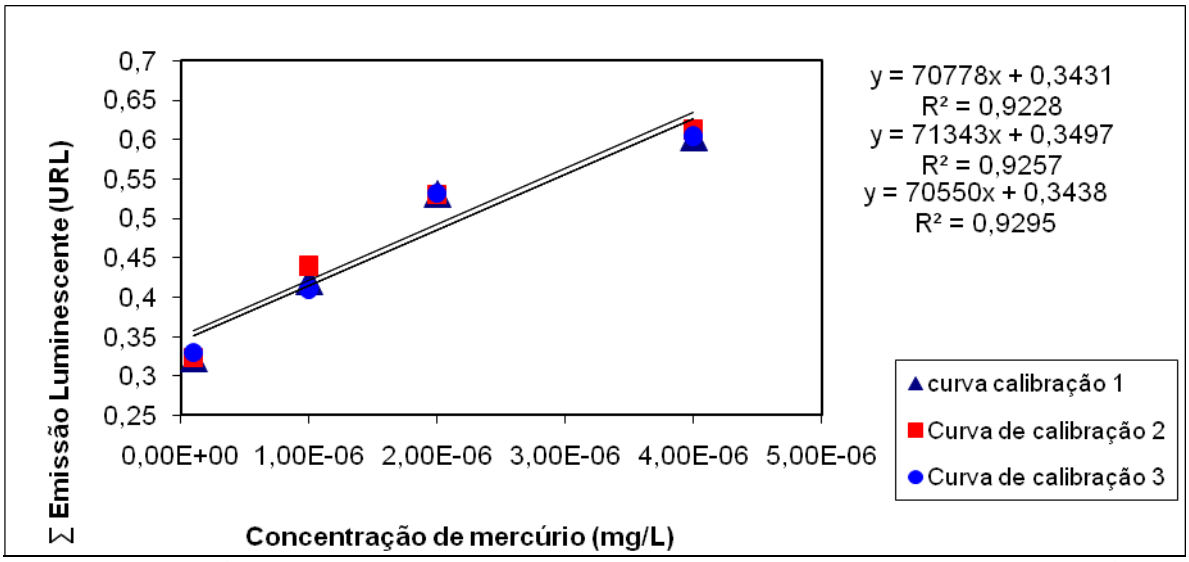

Figura 5-11: Gráfico da curva de calibração de amostras de soluções de mercúrio em diferentes concentrações preparadas em água deionizada.

Nos ensaios para elaboração da curva de calibração com água deionizada três experimentos independentes foram realizados em triplicata, e seus desvios foram calculados e um valor médio de URL obtido, em emissão luminescente, para cada concentração de mercúrio na curva em questão (tabela 5-10). Os valores encontrados para os desvios padrões indicaram que o teste foi realizado com boa repetibilidade. E isso ocorre mesmo encontrando valores maiores de coeficiente de variação (1,35 e 3,60) na faixa de $1x10^{-7}$ a $1x10^{-6}$mg/L de mercúrio, respectivamente.

Tabela 5-10: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de calibração com soluções de mercúrio de diferentes concentrações; CV= coeficiente de variação.

Concentração de mercúrio (mg/L)	Média	Desvio Padrão	CV (%)
$1,00\ x10^{-7}$	0,325	0,0044	1,352
$1,00\ x10^{-6}$	0,423	0,0153	3,608
$2,00\ x10^{-6}$	0,531	0,0011	0,212
$4,00\ x10^{-6}$	0,606	0,0054	0,886

A equação da reta obtida dos valores médios de emissão de luminescência para curva de calibração de mercúrio em soluções aquosas é descrita como: **y = 70890x + 0,3456** e o R^2 = 0,9288 (figura 5-11),

Entretanto, sabe-se que as medições quantitativas em amostras de campo são muito mais complexas que a análise de soluções sintéticas preparadas em laboratório, onde as condições são controladas.

Além disso, o ciclo biogeoquímico natural do mercúrio é bem complicado devido às suas características químicas (ou seja, de alta reatividade, interconversão de espécies químicas diferentes, etc.) Assim, o mercúrio pode estar presente em amostras naturais como várias espécies químicas diferentes, geralmente em

concentrações muito baixas. Deve ser ressaltado que o microrganismo em questão só detecta a fração de mercúrio biodisponível, possivelmente uma pequena parte de todas as espécies de mercúrio presentes.

Nas análises do conteúdo de mercúrio biodisponível nas amostras reais de chorume, uma amostra complexa, foram levados em consideração os possíveis efeitos de matriz que estas amostras ambientais poderiam causar, principalmente em função dos ligantes naturais presentes. Desta forma foram feitas curvas de adição padrão para cada chorume, com o intuito de obter uma curva de calibração que pudesse ser melhor comparável ao sistema. Os resultados em URL dos ensaios luminométricos das curvas de adição padrão podem ser visualizados na tabela 5-11. Cabe ressaltar também que os desvios padrão obtidos nas análises das triplicatas foram pequenos, na faixa de 0,001 a 0,003, indicando boa repetibilidade dos testes.

Tabela 5-11: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão.

chorume A	URL	chorume B	URL	chorume C	URL
amostra	0,2282	amostra	0,3335	amostra	0,3041
amostra + 10^{-7}	0,2497	amostra + 10^{-7}	0,5873	amostra 10^{-7}	0,3552
amostra + $1*10^{-6}$	0,2659	amostra + $1*10^{-6}$	0,6013	amostra + $1*10^{-6}$	0,3572
amostra + $2*10^{-6}$	0,2847	amostra + $2*10^{-6}$	0,6568	amostra + $2*10^{-6}$	0,3607
amostra + $4*10^{-6}$	0,3249	amostra + $4*10^{-6}$	0,6857	amostra + $4*10^{-6}$	0,3691

Na figura 5-12 podemos visualizar as curvas de adição padrão (e suas respectivas equações da reta) e comparar com a curva de calibração obtida com valores médios de URL, provenientes da tabela 5-10.

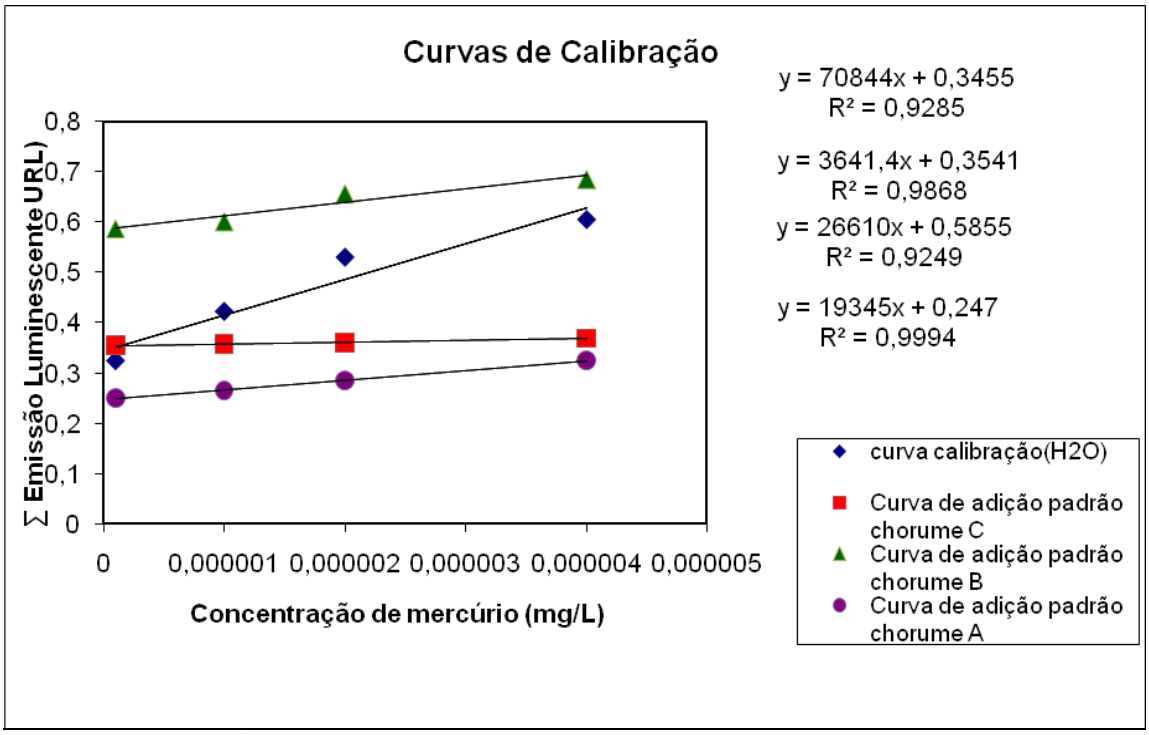

Figura 5-12: Gráfico da curva de calibração e curvas de adição padrão para mercúrio em diferentes concentrações.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO BIODISPONÍVEL

A partir da figura 5-12, pode-se perceber como as curvas de adição padrão foram importantes para as análises de quantificação do mercúrio biodisponível nas amostras. Ao se utilizar apenas a curva de calibração elaborada com água deionizada obtêm valores de URL maiores. Pode se observado que o valor do coeficiente angular desta curva foi *70890*, visto na figura 5-12 (uma vez que não existe nenhum agente complexante na água para atenuar a emissão da luminescência, todo mercúrio biodisponível é enxergado pelo microrganismo), o mesmo não é observado nas curvas de adição padrão, realizadas diretamente com as amostras de chorume. Onde pode ser observado o efeito de matriz, devido aos agentes orgânicos (possíveis ligantes presentes nos chorumes que complexam o mercúrio biodisponível).

Analisando as curvas de adição padrão, figura 5-12, pode-se perceber que a curva da amostra B, o lixão, apresentou a maior inclinação da reta (26610) quando comparada às outras curvas de adição padrão, indicando ser a amostra que apresenta menor efeito de matriz, inferindo que as amostras desta localidade possuem menos agentes complexantes. Enquanto na amostra de chorume C, o aterro semi-controlado, percebeu-se a menor inclinação da reta (3641,4) quase não há inclinação, sustentando a idéia de que esta amostra possui o maior efeito de matriz. A amostra de chorume A, aterro controlado foi intermediária entre as outras duas curvas de adição padrão, esta curva ainda apresentou melhor valor de R^2 (0,9994) e menor valor de resíduo na equação da reta (0,247), significando que os valores experimentais foram mais precisos no teste com amostra A.

Entretanto pode-se ver que todas as curvas de adição padrão apresentaram um R^2>0,9 e, partindo destes resultados, foram consideradas as equações da reta das curvas ao realizarmos os cálculos de determinação de mercúrio das respectivas amostras de chorume. As equações estão resumidas na tabela 5-12.

Tabela 5-12: Equações das curvas de calibração e adição padrão obtidas.

	Equações
Curva de Calibração (água deionizada)	y = 70890x + 0,3456
Curva de adição padrão chorume A	y = 19345x + 0,247
Curva de adição padrão chorume B	y = 26610x + 0,5855
Curva de adição padrão chorume C	y = 3641,4x + 0,3541

Com base nas curvas de adição padrão podemos calcular a concentração de mercúrio biodisponível nas amostras das três localidades, utilizando as equações da reta e os valores de emissão de luminescência encontrados para cada localidade.

Para cada local amostrado foram realizados ensaios em triplicata e calculadas a média, desvio padrão e variância dos valores de luminescência (URL) do aterro sanitário, lixão e aterro semi-controlado, que podem ser visualizados na tabela 5-13.

Com os resultados das análises do aterro sanitário pode-se considerar que entre as triplicatas os desvios encontrados foram baixos (tabela 5-13), mesmo com a amostra A_1_4 apresentando um desvio maior que as outras amostras (0,02369). O mesmo ocorre quando é observado o coeficiente de variação (9,72% em torno do valor da média), indicando baixa dispersão, valores homogêneos. Entretanto, tais resultados podem ser considerados com boa repetibilidade entre as réplicas. A variância entre as semanas coletadas foi calculada e observou-se um valor de variância igual a *0,00163*, ou seja, há diferença entre as semanas amostradas, mesmo não sendo um valor alto.

Nos resultados das análises do lixão pode-se considerar, assim como a amostra de aterro sanitário, que entre as triplicatas dos ensaios não obteve-se desvios altos (tabela 5-13), mesmo com a amostra B_1_3 apresentando um desvio maior que as outras amostras (0,11512) e também uma variância maior (0,01325). A amostra B_1_4 apresentou coeficiente de variação maior que as outras semanas (7,15%, em torno do valor da média), indicando baixa dispersão, valores homogêneos. Os resultados foram considerados com boa repetibilidade por serem baixos. Ao calcular a variância entre as semanas coletadas, observou-se um valor de variância alto (*0,38580)*, havendo uma diferença entre as semanas amostradas.

Com os resultados das análises do aterro semi-controlado (tabela 5-13) pode-se considerar os desvios entre as triplicatas baixo. A amostra C_1_4 apresentou um

desvio maior que as outras amostras (0,12949), e coeficiente de variação alto (36,47% em torno da média), indicando alta dispersão, valores heterogêneos para C_1_4. Os resultados foram considerados com boa repetibilidade nas réplicas das amostras C_1_1, C_1_2 e C_1_3, por serem baixos. Ao analisar a variância entre as semanas coletadas obteve-se um valor baixo, igual a *0,00246*, ou seja, há diferença entre as semanas amostradas, mesmo não sendo um valor alto.

Tabela 5-13: Resultados dos ensaios luminométricos, valores de URL médio, desvio padrão, variância e coeficiente de variação entre as réplicas.

	Amostras do aterro sanitário			
	A_1_1	**A_1_2**	**A_1_3**	**A_1_4**
Média	0,315025	0,2452	0,31405	0,24385
Desvio padrão	0,01304	0,01283	0,01164	0,02369
Variância	0,00017	0,000165	0,000136	0,000561
CV (%)	4,14	5,23	3,71	9,72
	Amostras do lixão			
	B_1_1	**B_1_2**	**B_1_3**	**B_1_4**
Média	1,526825	0,556125	1,93475	0,885675
Desvio padrão	0,0286218	0,0386107	0,11512	0,063292
Variância	0,0008192	0,0014908	0,0132524	0,0040059
CV (%)	1,87	6,94	5,95	7,15
	Amostras do aterro semi-controlado			
	C_1_1	**C_1_2**	**C_1_3**	**C_1_4**
Média	0,44155	0,37035	0,324325	0,35505
Desvio padrão	0,0067194	0,0438492	0,0169108	0,12949
Variância	4,52E-05	0,0019228	0,000286	0,0167673
CV (%)	1,52	11,84	5,21	36,47

As concentrações de mercúrio biodisponível calculadas a partir das equações da reta das curvas de adição padrão, do aterro sanitário, lixão e aterro semi-controlado são encontradas nas tabelas 5-14.

Tabela 5-14: Concentrações de mercúrio biodisponível nos locais amostrados.

	URL médio	Concentração de mercúrio biodisponível (mg/L)
A_1_1	0,315025	172,29 x10^{-7}
A_1_2	0,2452	12,624 x10^{-7}
A_1_3	0,31405	170,66 x10^{-7}
A_1_4	0,24385	9,5257 x10^{-7}
	URL médio	**Concentração de mercúrio biodisponível (mg/L)**
B_1_1	1,526825	1768,74 x10^{-7}
B_1_2	0,556125	551,95 x10^{-7}
B_1_3	1,93475	2535,23 x10^{-7}
B_1_4	0,885675	5640,27 x10^{-7}
	URL médio	**Concentração de mercúrio biodisponível (mg/L)**
C_1_1	0,44155	120077 x10^{-7}
C_1_2	0,37035	2231,28 x10^{-7}
C_1_3	0,324325	4088,4 x10^{-7}
C_1_4	0,35505	130,44 x10^{-7}

A figura 5-13 ilustra as três localidades e as concentrações de mercúrio ao longo das semanas amostradas, sendo uma forma mais rápida e clara de visualizar o comportamento do mercúrio nas diferentes localidades.

Pode ser observado que dentre as localidades amostradas no estudo, a localidade B, lixão, foi a que apresentou valores maiores de mercúrio biodisponível, sendo a amostra B_1_4 com maior valor 5640,27 x10^{-7} mg/L. Observa-se ainda valores de URL mais altos que a localidade A e C.

O aterro sanitário mostrou valores bem menores e a amostra C, aterro semi-controlado, com valores médios, sendo que a C_1_3 apresentou valor alto 4088,4 x10^{-7} mg/L na terceira semana amostrada, bem próxima da amostra B_1_4.

Uma série de questões pode ser levantada para tratar dos valores encontrados para estas localidades (todos os valores ficaram abaixo dos valores permitidos pela Resolução CONAMA nº 357). Os locais amostrados podem apresentar em sua matriz agentes complexantes, sendo assim o microrganismo não estaria enxergando

todo o mercúrio biodisponível (amostra C apresentou maior efeito de matriz dentre as três curvas de adição padrão). Pode ser ainda que estes locais não recebam resíduos potencialmente tóxicos (como metais pesados, por exemplo), ou são locais que se utilizam da separação dos resíduos possívelmente tóxicos (o que deveria ser feito ao menos nos aterros sanitários).

A partir destes resultados e das determinações de DQO, DBO e pH das amostras será possível obter conclusões a respeito dos valores de mercúrio encontrados.

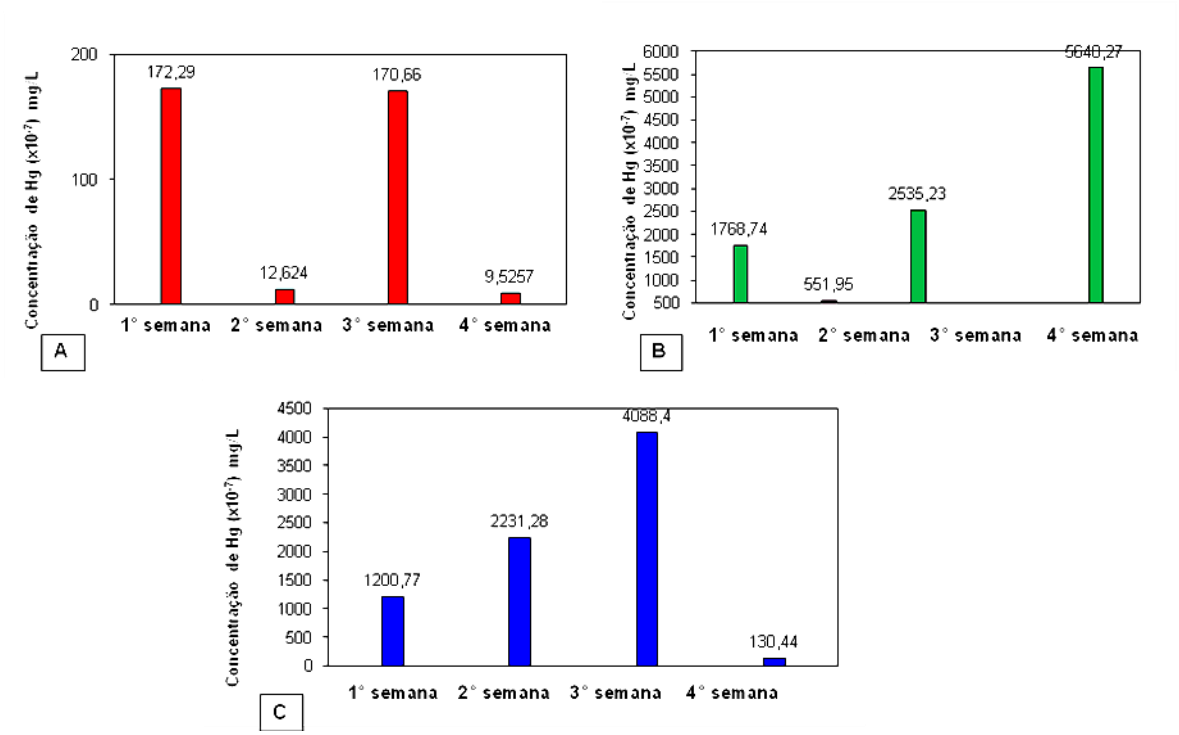

Figura 5-13: Concentração de mercúrio biodisponível (mg/L) no aterro sanitário (A), lixão (B) e aterro semi-controlado (C).

5.4.3 COMPLEMENTAÇÃO DAS ANÁLISES – DQO, DBO e pH

A biodisponibilidade, dinâmica e toxicidade do mercúrio pode ser afetada por alguns fatores como oxigênio dissolvido, potencial redox, pH e temperatura (Förstner et al., 1993).

Sabe-se que a composição química do chorume varia de acordo com a idade do aterro, e dos eventos que ocorreram antes da amostragem. Em termos gerais os processos de bioquímicos que ocorrem podem ser aeróbios e anaeróbios.

A cobertura diária promove processos biológicos aeróbios, que possuem duração de um dia a várias semanas, até que seja consumido todo o oxigênio que a carga contenha. Após esta fase, dá-se início a degradação anaeróbia. Assim se o chorume for coletado na fase ácida, quando o aterro é jovem e não atingiu a fase estável de fermentação anaeróbia tem como características pH baixo (deve-se à oxidação de carboidratos e gorduras e formação de ácidos orgânicos) e DQO e DBO em altas concentrações (Arruda, 1995; Clareto, 1997; Held, 1996). O pH do chorume está diretamente relacionado a matéria orgânica presente no solo do aterro, e o pH tende a ser ácido (por causa da formação de ácidos orgânicos por biodegradação) na presença de alto teor de matéria orgânica (Maia, 2004).

Tais determinações foram realizadas com intuito de complementar os resultados obtidos com mercúrio. No entanto, não foi possível a realização destes testes complementares com todas as amostras, devido a problemas com armazenamento durante a semana em que não houve fornecimento de energia elétrica adequada. Entretanto, nas amostras em que se realizou os testes foi possível observar algumas características das localidades acerca do pH e da

demanda química de oxigênio (DQO) e da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (tabela 5-15).

Tabela 5-15: Resultados dos testes de DQO, pH e DBO nas amostras reais obtidas das três localidades.

Amostra (Aterro sanitário)	DQO média	Desvio Padrão	Amostra (Lixão)	DQO média	Desvio Padrão	Amostra (Semi-controlado)	DQO média	Desvio Padrão
A_1_1	-	-	B_1_1	-	-	C_1_1	-	-
A_1_2	2275	125	B_1_2	1225	90,14	C_1_2	1133	52,04
A_1_3	2025	180,28	B_1_3	300	0	C_1_3	4058	128,29
A_1_4	1641	123,32	B_1_4	737	17,68	C_1_4	2350	50
Amostra (Aterro sanitário)	**pH média**	**Desvio Padrão**	**Amostra (Lixão)**	**pH média**	**Desvio Padrão**	**Amostra (Semi-controlado)**	**pH média**	**Desvio Padrão**
A_1_1	7	0,1762	B_1_1	7	0,0289	C_1_1	7	0,1762
A_1_2	7	0,3153	B_1_2	7	0,5221	C_1_2	7	0,4637
A_1_3	7	0,5583	B_1_3	7	0,4842	C_1_3	7	0,4597
A_1_4	7	0,34	B_1_4	7	0,2593	C_1_4	7	0,3932
Amostra (Aterro sanitário)	**DBO média**	**Desvio Padrão**	**Amostra (Lixão)**	**DBO média**	**Desvio Padrão**	**Amostra (Semi-controlado)**	**DBO média**	**Desvio Padrão**
A_1_1	-	-	B_1_1	-	-	C_1_1	-	-
A_1_2	979	17,56	B_1_2	861	95	C_1_2	1037	87,8
A_1_3	367	59,68	B_1_3	344	6,928	C_1_3	415	19,01
A_1_4	441	35,35	B_1_4	410	9,018	C_1_4	426	9,165

Segundo Segato & Silva (2000) a DQO do chorume é uma característica importante, pois através desta pode-se identificar a idade de um aterro, uma vez que o chorume possui elevada concentração de DQO quando é jovem. E ao analisarmos os valores de DQO encontrados neste estudo comparar com valores encontrados na literatura (chorume “novo” DQO na faixa de 21.000-78.000 mg/L) (Segato & Silva, 2000), chegou-se a conclusão que as amostras das três localidades testadas foram provenientes de aterros antigos. A mesma análise pode ser feita para os valores de pH obtidos, onde todos os valores estão próximos da neutralidade (pH na faixa de 7,0 a 7,5).

A partir destes dados pode ser inferido que as amostras são oriundas de um chorume que já passou pela fase ácida, onde as concentrações da DQO seriam altas e o pH ácido. Esta fase é caracterizada pela ação de bactérias metanogênicas e é a fase mais ativa biologicamente, onde é possível estabelecer um equilíbrio dinâmico entre a população de bactérias acetogênicas e metanogênicas. Nesta fase, ocorre também a produção em grande quantidade de sulfetos, pela redução das mais diversas formas de enxofre, causando a precipitação de cátions inorgânicos, principalmente os metais pesados (Pacheco Jr., 2004; Ezakl & Hypolito, 2006). Este último fato poderia também explicar os valores encontrados para concentração de mercúrio no presente estudo, uma vez que o mercúrio tende a formar compostos insolúveis quando associado a sulfetos (Badarudeen et al.,1996; Harbison, 1986).

O Hg (II) pode se complexar com diferentes ligantes, dependendo das condições físico-químicas, sendo capaz de se associar com sulfetos, matéria orgânica e óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganês (Morel et al.,1998).

Considerando-se a afinidade que o mercúrio possui com a matéria orgânica, a DBO e a DQO são análises que permitem avaliar a interferência destes suportes geoquímicos na fração do mercúrio biodisponível.

Observa-se na literatura que a determinação de DBO é fundamental para tomada de decisão de qual tratamento é mais adequado para o chorume antes de ser descartado dentro dos limites da legislação vigente. Os valores de DBO encontrados para as localidades com chorume de aterro novo estão na faixa de15.000 – 50.000 mg/L (Segato & Silva, 2000). Desta forma, pode-se dizer que os valores encontrados no presente estudo são relativamente baixos, podendo inferir

que a influência da matéria orgânica não foi muito acentuada, mesmo sendo observado um efeito de matriz na amostra de chorume C.

Entretanto para confirmar todas estas questões, outras análises seriam necessárias. Que viessem a considerar mais aspectos, como a possibilidade do retorno do mercúrio para a atmosfera; que abordasse a ligação do metal com agentes orgânicos ou inorgânicos, tratasse dos fatores como: tipo do solo do aterro - dependendo do solo pode se ligar à superfície da partícula do sedimento (Badarudeen et al.,1996; Harbison, 1986), e ainda os climatológicos, como chuva, (para avaliação do líquido percolado). Isso porque os metais pesados podem ser carreados para meio do chorume. O chorume mistura-se com a água da chuva e outros líquidos, originalmente existentes no lixo, infiltrando-se no solo e podendo alcançar o lençol freático (Chen et al., 2004).

Ao observar a figura 5-13 pode se perceber que dentro de uma mesma localidade, há concentrações de mercúrio bem menores que as outras. Na localidade A, por exemplo, as amostras da segunda e quarta semana apresentam valores bem menores quando comparados com as outras duas semanas. Na localidade B pode ser percebido a mesma coisa, na segunda semana amostrada.

Nas duas localidades a segunda amostragem foi realizada no mesmo dia. Sendo assim, poderia se atribuir a fatores como a chuva, que poderia ter influenciado na quantidade de mercúrio na amostra, uma vez que o metal pode ter sido carreado através da chuva. No entanto, não se pode afirmar que isto ocorreu por não haverem dados pluviométricos das regiões amostradas. Na localidade C percebe-se um valor de concentração menor na quarta semana amostrada, tal coleta foi realizada em uma data próxima da amostragem das outras duas localidades.

O monitoramento dos níveis de metais no chorume constitui um importante instrumento de gestão ambiental. Visando à manutenção ou à melhoria da qualidade de vida da população. A falta de controle e tratamento do chorume gerado em sistemas de disposição de resíduos sólidos promove a contaminação do solo, do ar e das águas superficiais e subterrâneas, além de propiciar a proliferação de vetores de doenças, em detrimento da qualidade do meio ambiente e da saúde pública.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho pode se concluir que:

- ✓ A bioluminescência produzida por *Escherichia coli* MC1061 tem sido descrita como uma técnica analítica sensível com potencial de aplicação para detecção de mercúrio biodisponível o que é comprovado nos resultados obtidos nesse trabalho.

- ✓ A concentração celular influenciou na resposta bioluminescente da cepa MC1061 durante os testes do planejamento experimental, estabelecendo-se o fator de diluição 1:33,3 como ideal para detectar baixas concentrações de mercúrio biodisponível. Esta ferramenta experimental ainda possibilitou a execução do procedimento em menor tempo (45 minutos) que aquele utilizado em Barrocas (2004);

- ✓ A melhor curva de calibração para o instrumento biossensor, aplicado à detecção de chorume em matrizes complexas, foi definida partindo das curvas de adição padrão de cada localidade, diretamente contaminadas com o analito em questão. Uma vez que a curva de calibração obtida das soluções aquosas do mercúrio mostrou-se com valores de emissão de luminescência mais altos (por não haver nenhum complexante), o que poderia dificultar a correlação entre os valores de concentração de Hg (II) e o valor encontrado nos ensaios luminescentes das amostras;

- ✓ Dentre as localidades amostradas no estudo, a localidade B, lixão, foi a que apresentou maior fração de mercúrio biodisponível no método testado, as outras duas localidades (aterro semi-controlado e aterro sanitário) apresentaram valores menores de concentração de mercúrio biodisponível. O que não quer dizer que não haja mercúrio ali presente, ele só não foi detectado por não estar na forma disponível.

- ✓ O aterro sanitário (amostra A) poderia ainda apresentar mais controle sobre os resíduos, separando os potencialmente tóxicos (como metais pesados) do restante do resíduo sólido, o que proporcionaria uma menor quantidade de mercúrio na amostra coletada;

- ✓ As análises relacionadas às características físico- químicas das amostras nos evidenciou que se tratavam de localidades onde o aterro já havia passado da fase ácida, ou seja, se tratava de um chorume velho;

- ✓ O sistema aplicado na detecção de mercúrio biodisponível se mostrou como uma ferramenta biológica sensível nas amostras provenientes de resíduos sólidos, fornecendo uma excelente resposta qualitativa da presença deste mercúrio em amostras ambientais.

6.2 SUGESTÕES

- ✓ Creditar a confiabilidade do sistema biossensor como método também de quantificação do mercúrio biodisponível em outras amostras ambientais como também em amostras de efluentes industriais, através do confronto dos valores obtidos por este instrumento sensor com metodologias tradicionais de análise, como Espectrometria de Absorção Atômica e Forno de grafite; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

- ✓ Uma vez que os biossensores não devem ser encarados como uma substituição das técnicas analíticas clássicas, mas sim como um complemento a estas, empregá-lo na avaliação da qualidade ambiental de efluentes industriais e amostras ambientais potencialmente contaminados com mercúrio de maneira integrada com aspectos químicos, físico-químicos e biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A.M.A. & SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H. & SCHAEFFER, C.E.G.R. Tópicos em Ciência do Solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 299-352, 2000.

APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19 th edition, New York: APHA, AWWA, WPCR, 1.198 p, 1992.

APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21th. ed. New York: APHA, AWWA, WPCR, 1.194 p., 2005.

ARRUDA, A. C. S.. Estudo do Comportamento de parâmetros Físico-químicos Relacionados ao processo de estabilização de resíduos sólidos urbanos no sistema de remediação de São Giácomo, Caxias do Sul, RS, In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Salvador, 1995.

ARYA, S.K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B.D. Recent advances in cholesterol biosensor. Biosensors and Bioelectronics, 23, 1083–1100, 2008.

ATLAS, R. M. Handbook of microbiological media. Boca Raton, Florida, CRC press,1997.

AUGENSTEIN, D. & PACEY, J. Modelling landfill methane generation. Proceedings of The Third International Landfill Symposium, Sardinia, Itália, vol.1, pp.115-148, 1991.

AZEVEDO, F.A. Toxicologia do mercúrio. São Carlos: RIMA, 292p., 2003.

BADARUDEEN, A.; DAMODARAN, K. T.; SAJAN, K.; PADMALAL, D. Texture and geochemistry of the sediments of a tropical mangrove ecosystem, southwest coast of India. Environmental Geology 27: 64−169, 1996.

BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 779: 355-384, 2003.

BARKER, S.A. Immobilization of the biological componente of sensors, Biosensors: Fundamentals and applications. Oxford University Press, New York, p 85-97, 1989.

BARROCAS, P.R.G. Assessment of mercury (II) species bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor. Tese de Doutorado. Departamento de Oceanografia, Universidade Estadual da Florida, 2004.

BARROCAS, P.R.G.; VASCONCELLOS, A.C.S.; DUQUE, S.S.; SANTOS, L.M.G.; JACOB, S.C.; LAURIA-FILGUEIRAS, A.L.; MOREIRA, J.C. Biossensores Para o Monitoramento da Exposição a Poluentes Ambientais. Cad. Saúde Colet., Rio de Janeiro, 16 (4): 677-700, 2008.

BIDONE F.R.A. & POVINELLI J. Conceitos básicos de resíduos sólidos. São Carlos: EESC/USP; 1999.

BISINOTI, M.C. & JARDIM, W.F. O Comportamento do Metilmercúrio (METILHg) no ambiente. Química Nova*,* 27(4): 593-600, 2004.

BISINOTI, M.C. Biogeoquímica aquatica do mercúrio orgânico na Bacia do Rio Negro, Amazônia. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Campinas: Campinas, 169p., 2005.

BISORDI, M.S. Encerramento e projetos de recuperação ambiental de aterros sanitários. In: RESID 99: Seminário sobre resíduos sólidos, São Paulo, (BR). São Paulo: Associação Brasileira de Geologia de Engenharia; 1999. p. 69-82, 1999.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução Normativa nº 357, de 17 de março de 2005. Estabelece normas e padrões para a qualidade das águas, lançamentos de efluentes nas coleções de águas, e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Série A - Normas e Manuais Técnicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2006.

CALADO, V. & MONTGOMERY, D. C. Planejamento de experimentos usando o *Statistica.* Rio de Janeiro: E-papers Serviços editoriais, 2003.

CANELA, M. C. Determinação de Mercúrio, UNICAMP, 1995.

CELERE, M.S.;OLIVEIRA, A.S.;TREVILATO, T.M.B.;SEGURA-MUÑOZ, S.I. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 23(4): 939-947, 2007.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo, 2001.

CHAVES, E.V. Absorção de metais pesados de solos contaminados do aterro sanitário e pólo industrial de Manaus pelas espécies de plantas *Senna multijuga, Schizolobium amazonicum* e *Caesalpinia echinata* / Tese de Doutorado em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus: UFAM, 2008.

CHEN, Y.; SHEN, Z.; LI, X. The use of vetiver grass (Vetiveria zizanioides) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. Applied Geochemistry. v.19, 2004.

CLARETO, C. R. , Tratamento biológico de líquidos percolados gerados em aterros sanitários utilizando reator anaeróbio compartimentado, São Carlos. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.

COSSA, MASON, R.P. & FITZGERALD, W.F. Chemical speciations of Mercury in a neromictic lake. In:C.J. Watras & I.W. Iuckabee, (eds.). Mercury Pollution – Integration and Synthesis. Lewis Publishers, Boca Raton. FL, 57-67, 1994.

COSTA, C. N. MEURER, E. J, BISSANI, C. A., SELBACH, P. Contaminantes e Poluentes do Solo e Meio Ambiente. In: MEURER, E. J. Fundamentos de química do solo. 2 ed. Porto Alegre, 2004.

DIAS-JUNIOR, H.E.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. R. Bras. Ci. Solo, 22: 631-640, 1998.

DURAND, M. J., G. THOUAND, T. DANCHEVA-IVANOVA, P. VACHON AND M. DUBOW. Specific detection of organotin compounds with a recombinant luminescent bacteria. Chemosphere 52: 103-111, 2003.

ENVIRONMENT CANADÁ. Mercury and the environment. Disponível em: http://www.ec.gc.ca/MERCURY/EH/EN/eh-b.cfm. Acessado em novembro de 2009.

EPA (Environmental Protection Agency). Ambient water quality criteria for mercury. Criteria and Standards Division, Washington (EPA-600/479-049), 1980.

EPA (Environmental Protection Agency). Ambient water quality criteria for mercury. Criteria and Standards Division, Washington (EPA-600/479-049), 1980.

EZAKI S, HYPOLITO R. Comportamento de íons de metais pesados (Pb, Cu, Cr e Ni) no sistema solo-lixo-chorume de aterros sanitários. In: III Congresso Brasileiro ICTR 2006. Gestão Ambiental e Desenvolvimento Sustentável: Resíduo-Desafio Brasileiro. São Pedro: Instituto de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável, p.324-7, 2006.

FEEMA, Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Manual do Meio Ambiente; métodos. Rio de Janeiro, Dicomt, 1983.

FITZGERALD, W.F & MASON, R.P. Biogeochemical Cycling of Mercur in the Marine Enviroment. In: A. Sigel & H. Sigel, (eds.). Metals in Biological Systems: Mercury and its Effect on Environment and Biology. Marcel Dekker, New York, 53-111, 1997.

FORD, S. R. AND F. R. LEACH. Improvements in the application of firefly luciferase assays. Bioluminescence Methods and Protocols. R. A. La Rossa. Totowa, NJ, Humana Press Inc. 102: 3-20, 1998.

FOSTIER A.H.; FORTI, M.C.; GUIMARÃES, J.R.D.; MELFI, A.J.; BOULET, R.; ESPIRITO SANTO, C.M. & KRUG, F.J. 2000. Mercury fluxes in a natural forested Amazonian catchment (Serra do Navio, Amapá State, Brazil). *Science of the Total Environment,* 260: 201-211.

Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente - RJ; Projeto de recuperação gradual do ecossistema da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, 1990.

GALVÃO, L. A. C. & Corey, G. Mercúrio. Serie Vigilancia 7, Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, 1987.

GERVASIO, A.P.G.; LAVORANTE, A.F.; MORAES, M.C.B.; GINÉ, M.F.; MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. Química Nova, 26, (1): 65-74, 2003.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by enviromental pollutin. Critical reviews in Toxicology, 25: 1-24, 1995.

HARBISON, P. Mangrove muds -a sink and source for trace metals', Marine Pollution Bulletin. 17 : 273−276, 1986

HELD, A., Processos Para el Tratamiento de Lixiviados de Vertederos, Revista Residuos, n.º. 30,Bilbao – Espanha, Mai/Jun, 1996.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saneamento básico: limpeza urbana e coleta de lixo. http://www.ibge.gov.br/

home/estatistica/populacao/condicaodevida/ pnsb/pnsb.pdf (acessado em 24/nov/2009).

KARUBE, I., NAKANISHI, K. Immobilized cells used for detection and analysis. Curr. Opin. Biotechnol., n5, p.54-59, 1994.

LACERDA, L.D.; MALM, O. Mercury Contamination in Aquatic Ecosystems: na Analysis of the Critical Areas. Estudos avançados, 22 (63):173-191, 2008.

LACERDA, L.D.; MARINS, R.V. Anthropogenic Mercury emissions to the atmosphere in Brazil: the impact of gold mining. Journal of Geochemical exploration, v.58, p. 223-229, 1997.

LACERDA, L.D.; SANTOS, A.F.; MARINS, R.V.EMISSÃO DE MERCÚRIO PARA A ATMOSFERA PELA QUEIMA DE GÁS NATURAL NO BRASIL. *Quim. Nova,* Vol. 30, No. 2, 366-369, 2007.

LEE, S.; SODE, K.; NAKANISHI, K.; MARTY, J.L; TAMUYA, E. A novel microbial sensor using luminous bacteria. Biosensors & Bioelectronics, 7, p 273-277, 1992.

LEWIS, J.C.; FELTUS, A.; ENNSOR, C.M.; RAMANATHAN, S., DAUNERT, S. Applications of reporter genes. Anal. Chem., v.1, 1998.

LIMA, F. R. N. Localização de Aterros Sanitários – Utilizando a Lógica Nebulosa. Dissertação de Mestrado, COPPE / UFRJ. 98p. 2005.

LIN, S. H.; CHANG, C. C. Treatament of Landfill Leachate by Combined Electro-Fenton Oxidation and Sequencing Batch Reactor Method. Water Research. v. 34, n. 17, p. 4243 – 4249, 2000.

LUONG, J.H.T.; MULCHANDANI, A.; GUILBAULT, J.D.R. Biosensors for monitoring and environmental control" Tibtech, 6, p 310-318, 1988.

MAIA A. D. Avaliação da geração de drenagem ácida em um solo fabricado em laboratório contendo sulfeto de ferro e matéria orgânica [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004.

MANNARINO,C.F.; FERREIRA, J.A.;CAMPO, J.C; RITTER, E..Landfill leachate treatment using wetlands – experiences in piraí municipality solid waste landfill and gramacho metropolitan solid waste landfill. Eng. sanit. Ambient,11(2), 108-112, 2006.

MARINS, R. V.; PAULA FILHO, F. J.; LACERDA, L. D.; RODRIGUES, S. R.; MARQUES, W.S. Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. Química Nova, 27:763-770, 2004.

MASON ,R.P.; FITZGERALD, W. F. Alkymercury species in the equatorial Pacific. Nature, 347: 457-459, 1990.

MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

MIRACONI, R.C.C.M.; BUENO, M.I.M.S.; JARDIM, W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. Química Nova, 23(4), p. 487-495, 2000.

MONTGOMERY, D.C. & RUNGER, G.C. Estatística Aplicada e probabilidade para engenheiros. Segunda edição. LTC editora. S.A. 2003.

MOREL F. M. M., KRAEPIEL, A. M. L , AMYOT, M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. Annual Review of Ecology and Systematics, 29: 543-566, 1998.

NEATHERY, M. W. & MILLER, W.J. Metabolism and Toxicity of cadimiun, Mercury and lead in animals. Journal Dairy Science, 58(12): 1767-1781, 1975.

NIVENS, D.E. *et al.* Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small, rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring.Journal of Applied Microbiology, 96, 33-46, 2004.

OREMLAND, R. S., CULBERTSON, C.W.; WINFREY, M.R. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. Applied and Environmental Microbiology 57(1): 130-137, 1991.

PACHECO Jr. Estudo de certas potencialidades de processos oxidativos avançados para o tratamento de percolado de aterro sanitário [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2004.

PERRY, J. J. AND J. T. STALEY (1997). Microbiology: Dynamics and Diversity, Harcourt Brace College Publishers, 1997.

POISSANT, L. & PILOTE,M.; XIAOHONG Xu & HONG ZHANG; BEAUVAIS, C. Atmospheric mercury speciation and deposition in the Bay St. Franc¸ois wetlands. JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH, 109,1-11, 2004.

RAMANATHAN, S., ENSOR, M., DAUNERT, S. Bacterial biosensor for monitoring toxic metals. Trends in Biotechnol., v15, p.500-506, 1997.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Editora Casa do Pão, Campinas, 2005.

SALGADO, A. M. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

SANTOS, R.M.; LEITE, S.G.F.; SOBRAL, L.G.S.; RIZZO, A.C.L. Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas 4º PDPETRO, Campinas, SP 21-24 de Outubro de 2007.

SCHALCH, V., Produção e características do chorume em processo de decomposição de lixo urbano. São Carlos. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1984.

SEGATO, L.M.; SILVA, C.L. DA. Caracterização do chorume do aterro Sanitário de bauru. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental 1, 2000.

SEGURA-MUÑOZ, S.I.. Impactos ambientais na área do Aterro Sanitário e Incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: avaliação dos níveis de mestais pesados. Tese de Doutorado. Programa de Pós – Graduação de Enfermagem na Saúde Pública, USP, 2002.

SEGURA-MUÑOZ, S.I.; TAKAYANAGUI, A.M.M.; TREVILATO, T.M.B.; hering, S.E. Metais pesados em líquido percolado e água subterrânea da área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. In: Anais de Trabalhos Completos do I Fórum das Universidades Públicas Paulistas Ciência e Tecnologia em Resíduos, 1; p. 937-48, 2003.

SEIXAS, T.G.; MOREIRA, I.; KEHRIG, H.A.; MALM, O. Distribuição de selênio em organismos marinhos da Baía de Guanabara/RJ. Químmica Nova, 30(3): 554-559, 2007.

SELIFONOVA, O.; BURLAGE,R.; BARKAY,T. Bioluminescent Sensors for Detection of Bioavailable Hg(II) in the Environment. Applied and Environmental Microbiology, 59 (9): 3083-3090,1993.

SILVA, L.M.C. Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de *Agaricus bisporus c*omo biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol. . Dissertação de Mestrado em Tecnologia de

processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009.

STICHER, P., JASPERS, M.C.M., STEMMLER, K., HARMS, H., ZEHNDER, A.J.B., VAN DER MEER, J.R. Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. Appl. Environ. Microbiol., v63, n10, p4053-4060, 1997.

TAURIAINEN, S., M. VIRTA, W. CHANG AND M. KARP. Measurement of firefly luciferase reporter gene activity from cells and lysates using Escherichia coli arsenite and mercury sensors. Analytical Biochemistry 272: 191-198, 1999.

TECON, R., VAN DER MEER. Bacterial Biosensors for measuring availability of enviromental pollutans. Sensors, 4062-4080, 2008.

TUBINO, M.; Magalhães, M. E. A. Ciência Hoje, *23*, 20, 1997.

TURNER, A.P.F. Techreview. Biochemistry Science, 290, p 1315-1317, 2000.

VALDMAN, E. “Desenvolvimento e aplicação de um biossensor luminescente para detecção de naftaleno”. / Tese de Doutorado em Ciências, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 124 p, 2004.

VIRTA, M.; LAMPINEN,J.; KARP, M. A luminescence based mercury biosensor. *Anal. Chem.* 67(3): 667-669, 1995.

VIVIAN HSIU-CHUAN LIAO, MING-TE CHIEN, YUEN-YI TSENG, KUN-LIN OU. Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. Environmental Pollution xx 1-7, 2005.

WHO - World Health Organization. Methylmercury. Environmental health Criteria. Gênova, 1990.

Imagens:

ducana.zip.net/images/lis-08a.jpg

http://www.infoescola.com/ecologia/aterro-sanitario-e-mdl/, acessado dia 09 de fevereiro de 2010)

http://www.lixo.com.br, acessado dia 09 de fevereiro de 2010