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

APLICAÇÃO DE BIOSSENSOR BIOLUMINESCENTE NA DETECÇÃO DO HPA NAFTALENO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU

GISELLE DA SILVA CAVALCANTI

Rio de Janeiro
2010

Giselle da Silva Cavalcanti

APLICAÇÃO DE BIOSSENSOR BIOLUMINESCENTE NA DETECÇÃO DO HPA NAFTALENO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU

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 BIOLUMINESCENTE NA DETECÇÃO DO HPA NAFTALENO EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU

Giselle da Silva Cavalcanti

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)

_____
Andréa Carmadella de Lima Rizzo, D.Sc – CETEM/MCT

_____
Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc. – EQ/UFRJ

_____
Claudia Duarte da Cunha, D.Sc – CETEM/MCT

Rio de janeiro, RJ- Brasil
Março de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Cavalcanti, Giselle da Silva.

Aplicação de biossensor bioluminescente na detecção do HPA naftaleno em solo contaminado com óleo cru / Giselle da Silva Cavalcanti. -- 2010.
124 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado, Paulo Rubens Guimarães Barrocas

1. Biossensor. 2.Bioluminescência. 3. Naftaleno.– Dissertação. I. Salgado, Andréa Medeiros (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título.

CDD: 610.28

Dedico este trabalho à minha família,

maior alicerce da minha vida.

"De tudo ficarão três coisas:
a certeza de estar sempre começando,
a certeza de que é preciso continuar e
a certeza de ser interrompido antes de terminar.
Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada,
do sonho uma ponte, da procura um encontro."

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que participaram, influíram ou ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho. A todos sou muito grata. Agradeço a todos pelo convívio e pelo enriquecimento e em especial:

- A minha família, especialmente aos meus pais Gildo e Catia e minha linda irmã Tatiana por todo amor incondicional, apoio, dedicação e acolhimento. Sem seu amor eu nada seria.
- Agradeço imensamente ao meu grande amor Marco, companheiro incansável em todas as jornadas, por toda paciência, compreensão e ternura.
- Aos meus bons e raros amigos, pois com eles a vida se torna mais simples, mais rica e mais bela.
- Agradeço enormemente a Andréa Medeiros Salgado, e também a Selma Gomes Ferreira Leite por muitas coisas, mas, sobretudo pela confiança depositada e boa vontade, e pela oportunidade. Essas duas professoras são fonte óbvia de inspiração pela qualidade, dedicação e capricho que conduzem qualquer trabalho. Agradeço também a Paulo Rubens Guimarães Barrocas pela orientação na presente dissertação.
- A toda equipe do Laboratório de Sensores Biológicos (lab 122) que participou da gestação deste trabalho. Neste ambiente composto predominantemente por mulheres a alegria reina. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados no nosso pequeno e caloroso espaço: Andrea, Ariana, Livia, Ana Carolina, Gisele (2), Lais, Melinda, Ana Claudia.
- Um parágrafo especial deve ser dedicado ao meu anjo Gabi Jacoby, não só por sua inestimável ajuda em tudo que se referiu à realização deste trabalho,

mas principalmente por sua doce e generosa companhia. Contar com seu apoio tornou essa jornada muito mais alegre. A sua amizade foi com certeza uma das maiores conquistas deste período.

- A Escola de Química e a UFRJ e todos os seus docentes por contribuírem em mais uma etapa da minha formação.
- A CAPES, pelo apoio financeiro.
- Ao CENPES/Petrobras e ANP pelo apoio e fomento, fornecimento dos solos e do óleo utilizados neste projeto de pesquisa.
- Ao Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), pelas amostras de solo contaminado com óleo provenientes de seu sistema de Atenuação Natural Monitorada (ANM), e pela coordenação do Projeto Solo Integral, do qual este trabalho é um dos frutos.
- A Deus, luz dos nossos caminhos.

RESUMO

CAVALCANTI, Giselle da Silva. **Aplicação de Biossensor Bioluminescente na detecção do HPA Naftaleno em solo contaminado com óleo cru.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Biossensores microbianos capazes de emitir luz perante um composto específico surgem como uma alternativa de ferramenta analítica para a medida de um contaminante. A bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK 44 foi selecionada para detecção de naftaleno em amostras de solo contaminado com petróleo, por ser uma cepa capaz de emitir luz suficiente para servir como um biossensor e como um repórter da atividade biodegradativa deste hidrocarboneto aromático policíclico. A genuína aplicação dos biossensores na área ambiental, entretanto, encontra alguns entraves, uma vez que os sensores biológicos devem ser expostos a amostras de natureza aquosa, em um meio tamponado. Desta maneira, a análise das amostras de solo contaminado se deu após a etapa de extração química com a hidroxipropil - beta - ciclodextrina (β-HPCD), por esta ser considerada uma metodologia de extração não exaustiva capaz de refletir a fração biodisponível do HPA naftaleno. No presente trabalho, a cepa HK44 foi aplicada no monitoramento do teor de naftaleno presente em amostras de solo provenientes de um sistema experimental de Atenuação Natural Monitorada contaminado com óleo cru nas proporções de 0,5%; 2,5% e 5% (p/p), exposto a intempéries por um período de 15 meses. A concentração inicial de naftaleno assinalada pelo sensor microbiano foi de 17,2 mg/kg na condição do solo 5,0% contaminado. No quinto mês de contaminação foi apontada pelo instrumento sensor uma concentração residual de naftaleno igual a 5,8 mg/kg na condição de maior adição de óleo (5%). A partir do oitavo mês, não foi possível detectar a presença do analito no solo em qualquer das concentrações experimentadas. Os resultados obtidos pelo biossensor corroboram outras análises deste sistema experimental que apontam um elevado percentual de remoção de óleo já no sexto mês de contaminação. Deste modo, a bioluminescência mostrou ser uma técnica sensível a poluentes orgânicos em matrizes ambientais complexas, sendo o biossensor proposto capaz de fornecer uma excelente resposta qualitativa da presença do hidrocarboneto naftaleno em solos contaminados com óleo cru.

ABSTRACT

CAVALCANTI, Giselle da Silva. **Application of Luminescence – based Biosensor in detection of Naphthalene HPA from a soil contaminated.** Rio de Janeiro, 2010. Disertation (Master in Science) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Microbial biosensors capable of emitting light in response to a specific compound emerge as an alternative analytical tool to detect a contaminant. The bacterium *Pseudomonas fluorescens* HK44 was selected as a detector of naphthalene in soil samples contaminated with oil, for the reason that this is a strain capable of emitting light enough to serve as a biosensor and as a reporter for the biodegradative activity of this polycyclic aromatic hydrocarbon. A genuine application of biosensors in the environment field, however, faces some barriers, since the biological sensors perform in aqueous phase and a buffered medium. Therefore, the analysis of samples of contaminated soil began after the chemical extraction step with hydroxypropyl - beta - cyclodextrin (β-HPCD), a non-exhaustive extraction technique used to assess the fraction of the naphthalene capable of undergoing microbial degradation in soil. In this study, the strain HK44 was used in the detection of naphthalene present in soil samples from a Natural Monitored Attenuation (NMA) experimental system, contaminated with crude oil in three different concentrations (0.5%, 2.5% and 5% w/w), exposed to intemperies for 15 months. The initial concentration of naphthalene at the soil 5% contaminated with crude oil was found to be 17,2 mg/kg. In the fifth month of experiment a residual concentration of naphthalene of 5.8 mg / kg was identified by the sensor tool in soil contaminated to 5%. From the eighth month, it is not possible to distinguish the analyte in the soil at any condition tested. The results obtained by biosensor instrument corroborate other analyses of the same experimental system that demonstrate an effective removal of a great part of the oil, after six month of NMA strategy. Accordingly, the bioluminescence was found to be a technique sensitive to organic pollutants even in environmental matrices, the proposed biosensor was able to provide an excellent qualitative response to the presence of hydrocarbon naphthalene in soil contaminated with crude oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura III.1	Estrutura química de alguns compostos encontrados no petróleo (Fonte: Baptista, 2007).	**7**
Figura III.2	Fórmula estrutural e nomenclatura de alguns HPAs (Fonte: Costa, 2001).	**9**
Figura III.3	Estrutura química do Naftaleno e suas estruturas de ressonância. As posições 1, 4, 5 e 8 indicadas na figura são chamadas posições *alpha* e as posições 2, 3, 6 e 7 são chamadas posições *beta* (Fonte: Miranda, 2008).	**15**
Figura III.4	Esquema das duas vias metabólicas do naftaleno em *Pseudomonas sp.* (Fonte: Miranda, 2008).	**18**
Figura III.5	Diagrama de Textura Adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências do Solo (Fonte: Baptista, 2007).	**21**
Figura III.6	Representação esquemática do comportamento do óleo no solo (Fonte: Baptista, 2007).	**23**
Figura III.7	Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente (Fonte: adaptado de YANG *et al.*, 2001).	**24**
Figura III.8	Estrutura das α, β, ɣ -ciclodextrinas e representação tridimensional do tronco de cone formado pelo alinhamento dos átomos (Fonte: Ribeiro, 2004).	**34**
Figura III.9	Representação dos diâmetros internos e altura dos troncos das CDs e sua solubilidade em água a 25º C (Fonte: Ribeiro, 2004).	**35**
Figura III.10	Esquema geral de funcionamento de um biossensor.	**38**
Figura III.11	Resposta bioluminescente ao naftaleno (Fonte: adaptado de Valdman, 2004).	**47**
Figura III.12	Diagrama das reações bioquímicas e moleculares envolvidas na resposta bioluminescente (Fonte: adaptado de Valdman, 2004).	**48**
Figura IV.1	Esquema do cultivo de *P. fluorescens* HK44.	**56**
Figura IV.2	Esquema da composição de cada condição testada. Acima as quatro condições de adição de água de lixiviação do solo contaminado com óleo cru a 0%, 0,5%, 2,5% e 5% (p/p). Abaixo as três condições de adição de óleo cru nas concentrações de 0,25%, 1,25% e 2,5% (%p/p) direto na água de lixiviação do solo sem contaminação.	**59**
Figura IV.3	Esquema da obtenção da suspensão celular para os experimentos de bioluminescência.	**61**
Figura IV.4	Instrumento para leitura de luminescência emitida, Luminômetro.	**61**

Figura IV.5	Esquema de fotodetecção do luminômetro.	**62**
Figura IV.6	Esquema da contaminação do solo com óleo cru.	**63**
Figura IV.7	Esquema do sistema de lixiviação.	**64**
Figura IV.8	Esquema do teste comparativo entre as metodologias de extração lixiviação estática e NEET Somente os poções em amarelo foram lidos.	**67**
Figura IV.9	Esquema das amostras no teste de avaliação da eficiência de extração NEET utilizando como solvente H_2O ou HPCD Somente os poções em amarelo foram lidos.	**68**
Figura IV.10	Disposição das amostras na placa utilizada no luminômetro no teste avaliando a concentração celular e o efeito da pré-ativação. Somente os poços em amarelo foram lidos	**69**
Figura IV.11	Disposição das amostras na placa utilizada no luminômetro no teste avaliando a idade do cultivo e o estoque de naftaleno. Somente os poções em amarelo foram lidos.	**71**
Figura IV.12	Representação das caixas utilizadas para o experimento de atenuação natural (Fonte: Telhado, 2009).	**75**
Figura IV.13	As caixas foram preenchidas com camadas de brita, areia e solo (Fonte: Telhado, 2009).	**76**
Figura V.1	Curva de crescimento de *P. fluorescens* HK44.	**79**
Figura V.2	Correlação entre absorbância e peso seco.	**80**
Figura V.3	Avaliação do crescimento de *P. fluorescens* HK44 em diferentes condições. (1) H_2O Lixiviação solo sem contaminação; (2) H_2O Lixiviação solo contaminado 0,5%; (3) H_2O Lixiviação solo contaminado 2,5%; (4) H_2O Lixiviação solo contaminado 5,0%. (5)H_2O Lixiviação 0,25% contaminada; (6)H_2O Lixiviação 1,25% contaminada; (7) H_2O Lixiviação 2,5% contaminada.	**81**
Figura V.4	Perfil cinético da resposta bioluminescente da cepa HK44 após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) (—■—) e o controle sem naftaleno (—●—).	**83**
Figura V.5	Perfil cinético da resposta bioluminescente após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) nas suspensões celulares: 0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,6 g/L e efeito da pré-ativação.	**86**
Figura V.6	Somatório da emissão bioluminescente após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) nas suspensões celulares: 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,4 g/L, e efeito da pré-ativação.	**88**
Figura V.7a	Perfil cinético da exposição do biossensor a extratos de solo contaminados com óleo cru em diferentes concentrações, obtidos por lixiviação simples (concentração celular = 0,05 g/L).	**93**

Figura V.7b	Perfil cinético da exposição do biossensor a extratos de solo contaminados com óleo cru em diferentes concentrações, obtidos por extração não exaustiva com H_2O (concentração celular = 0,05 g/L).	**93**
Figura V.8	Somatório da emissão bioluminescente após exposição a extratos obtidos pela metodologia NEET com H_2O ou HPCD de amostras de solo contaminadas a 0%, 0,5%, 2,5%, 3,5% e 5,0% (p/p) (concentração celular = 0,2 g/L).	**96**
Figura V.9	Somatório da emissão bioluminescente após exposição a extratos obtidos pela metodologia NEET com HPCD nas concentrações de 30, 60 e 90 mM com os tempos de extração de 12, 18 e 24h de amostra de solo contaminada com óleo na proporção de 5,0% (p/p) (concentração celular = 0,2 g/L).	**98**
Figura V.10	Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 expostas a soluções aquosas de naftaleno (0-21,0 mg/L), em triplicata, com concentração celular de 0,2 g/L	**100**
Figura V.11	Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 frente a extratos de solo contendo naftaleno (0-800 mg/kg), em quintuplicata, com concentração celular de 0,2 g/L.	**102**
Figura V.12	Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 frente a extratos de solo contendo naftaleno (0-200 mg/kg), em triplicata, com concentração celular de 0,2 g/L.	**103**
Figura V.13	Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 a amostra de solo do sistema de atenuação natural referente ao quinto mês de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L).	**104**
Figura V.14	Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 a amostra de solo do sistema de atenuação natural referente ao sexto mês de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L).	**105**
Figura V.15	Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 a amostra de solo do sistema de atenuação natural referente ao oitavo mês de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L).	**106**
Figura V.16	Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 extratos obtidos de solo com 0, 15, 30, 60 e 90 dias de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L).	**108**

LISTA DE TABELAS

Tabela III.1	Propriedades físico-químicas de alguns HPAs e HPANs	**12**
Tabela III.2	Valores referenciais e orientadores para o solo na Holanda e CONAMA 420.	**13**
Tabela III.3	Biossensores microbianos recombinantes usando genes *luc* ou *lux* como repórter luminescente.	**43**
Tabela III.4	Biorepórteres *luxCDABE.*	**44**
Tabela IV.1	Composição do meio de crescimento para *P. fluorescens* HK44.	**52**
Tabela IV.2	Composição do meio manutenção para *P. fluorescens* HK44.	**53**
Tabela IV.3	Relação entre volume de fosfato monobásico e dibásico de potássio para a obtenção de pH definido.	**54**
Tabela IV.4	Caracterização do solo sergipano.	**75**
Tabela IV.5	Cronograma das coletas.	**77**
Tabela IV.6	Percentual de sarutados, aromáticos, resinas e asfaltenos – SARA (%) no óleo cru.	**78**
Tabela V.1	Efeito da manutenção celular e do estoque de naftaleno na resposta bioluminescente de *P. fluorescens* HK44.	**90**

LISTA DE DIAGRAMA

Diagrama 1 Fluxograma das etapas de extração com β HPCD (Adaptado de Telhado, 2009). **65**

LISTA DE SIGLAS

ANM	Atenuação Natural Monitorada
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CENPES	Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CPMA	Coordenação de Processos Metalúrgicos e Ambientais
DEB	Departamento de Engenharia Bioquímica
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
β-HPCD	Hidroxipropil–Beta–Ciclodextrina
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HTP	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MO	Matéria Orgânica
NEET	Non-exhaustive extraction techniques
NMP	Número Mais Provável
PBS	Phosphate buffer
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
SARA	Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos
URL	Unidades Relativas de Luz
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USDA	United States Department of Agriculture
USEPA	United States Environmental Protect Agency

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO II: OBJETIVOS 4

II.1 OBJETIVO GERAL 4

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4

CAPÍTULO III: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6

III.1 PETRÓLEO E SEUS IMPACTOS 6

III.1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) 8

III.1.2. Naftaleno 15

III.2 SOLO 20

III.2.1. Textura e estrutura do solo 21

III.2.2. Poluição do solo por contaminantes orgânicos 22

III.2.3. Microrganismos do solo e a biodegradação de poluentes orgânicos 25

III.3 BIODISPONIBILIDADE 29

III.3.1. Ciclodextrinas 33

III.4 BIOSSENSSORES COMO ELEMENTOS DE DETECÇÃO 36

III.4.1. Definição de biossensor 37

III.4.2. Biossensores Bioluminescentes 42

III.4.3. *Pseudomonas flourescens* HK44 e sua aplicação como biossensor 46

CAPÍTULO IV: MATERIAL E MÉTODOS 52

IV.1 BIOSSENSOR MICROBIANO: *Pseudomonas fluorescens* HK44 52

IV.1.1. Preparo de meios e soluções 52

IV.1.1.1 - Meio de cultivo YEPG –Tc 52

IV.1.1.2 - Meio sólido de manutenção YEPG –Tc 53

IV.1.1.3 - Solução estoque de tetraciclina 53

IV.1.1.4 - Tampão fosfato de potássio 54

IV.1.1.5 - Meio de detecção para ensaios de bioluminescência 54

IV.1.1.6 - Solução estoque de naftaleno ***54***

IV.1.2. Crescimento e Manutenção de *P. fluorescens* HK44 **55**

IV.1.2.1 - Determinação do Peso Seco ***55***

IV.1.2.2 - Curva de crescimento ***56***

IV.1.2.3 - Manutenção e armazenamento das células ***57***

IV.1.3. Pré-ativação com naftaleno **58**

IV.1.4. Avaliação do crescimento do microrganismo **58**

IV.2 ENSAIOS BIOLUMINESCENTES **60**

IV.2.1. Obtenção da suspensão celular para os experimentos de bioluminescência **60**

IV.2.2. Medida e registro da luz emitida ***61***

IV.2.3. Metodologias de extração do solo contaminado com óleo **63**

IV.2.3.1 - Sistema experimental de lixiviação ***63***

IV.2.3.1.-. Técnica de Extração Não Exaustiva (NEET) ***64***

IV.2.3.3 -.Otimização NEET β-HPCD **65**

IV.2.4. Comparação metodologias de extração **66**

IV.2.5. Avaliação das condições ótimas de bioluminescência ***68***

IV.2.5.1 - Diferentes concentrações celulares e efeito da pré-ativação ***69***

IV.2.5.2 - Idade do cultivo e estoque de naftaleno ***70***

IV.2.6. Curva de calibração **71**

IV. 2.6.1 - Curva de calibração de naftaleno em soluções aquosas ***72***

IV.2.6.2. - Curva de calibração utilizando solo contaminado com naftaleno ***73***

IV.3 SISTEMA EXPERIMENTAL DE ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA **74**

IV.3.1. Caracterização do solo empregado **74**

IV.3.2. Sistema experimental para simulação do processo de Atenuação Natural **75**

IV.3.3. Disposição e coleta das amostras **76**

IV.3.4. Monitoramento da degradação do naftaleno em amostras de solo contaminado com óleo cru **77**

IV.3.4.1. - Amostras de Sitema de Atenuação Natural Monitorada **77**

IV.3..4.2 - Sistema de contaminação em escala de bancada **78**

IV.4 ÓLEO CRU **78**

79

CAPÍTULO V: RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 *Pseudomonas fluorescens* HK44 **79**

V.1.1. Determinação da curva de crescimento **79**

V.1.2. Correlação entre Absorbância e Peso Seco **80**

V.2 TESTES PRELIMINARES DE CRESCIMENTO MICROBIANO **81**

V.3 PERFIL CINÉTICO DA RESPOSTA BIOLUMINESCENTE **83**

V.4 PARÂMETROS DE INFLUÊNCIA NA RESPOSTA BIOLUMINESCENTE **85**

V.4.1. Efeito da pré-ativação e da concentração celular **85**

V.4.2. Idade do cultivo celular e do estoque de naftaleno **89**

V.5 METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DO NAFTALENO DE AMOSTRAS DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU **91**

V.5.1. Comparação entre a lixiviação simples e a metodologia de extração não exaustiva (NEET) **92**

V.5.2. NEET utilizando como o solvente H_2O e β-HPCD **95**

V.5.3. Otimização da Técnica de Extração Não Exaustiva (NEET) β-HPCD **97**

V.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO SISTEMA BIOSSENSOR **100**

V.6.1. Curva de calibração do naftaleno em soluções aquosas **100**

V.6.2. Curva de calibração a partir do solo contaminado com naftaleno **101**

V.7 DETECÇÃO DO NAFTALENO EM AMOSTRAS DO SISTEMA DE ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA – PROJETO SOLO INTEGRAL **104**

V.8 DETECÇÃO DO NAFTALENO EM AMOSTRAS DO SISTEMA CONTAMINAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA **108**

CAPÍTULO VI: CONCLUSÕES E SUGESTÕES **111**

VI.1 CONCLUSÕES **111**

VI.2 SUGESTÕES **113**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **114**

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

A determinação de poluentes orgânicos persistentes (POPs) em matrizes complexas como o solo é de grande importância ambiental. O solo é um meio com intensa atividade microbiológica, ambiente para a decomposição, equilíbrio e renovação química, em decorrência de suas propriedades filtrantes, de tamponamento e de conversão de substratos. Devido suas características, em sítios contaminados, o solo pode representar grandes reservatórios destes contaminantes orgânicos de caráter recalcitrante (DOICK *et al*, 2005).

Uma classe específica de POPs, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), são compostos mutagênicos e carcinogênicos, introduzidos no ambiente em grandes quantidades, entre outros, em decorrência das atividades relacionadas à extração, ao transporte, ao refino, à transformação e à utilização do petróleo e de seus derivados (MORET & CONTE, 2000).

O naftaleno, um hidrocarboneto composto por dois anéis aromáticos, é por si só um analito importante, além de poder ser considerado como um sistema modelo ao visar-se o biossensoriamento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em solos impactados por petróleo (CUYPERS *et al.,* 2001)

Tradicionalmente, a medida de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes complexas é realizada por técnicas de extração exaustivas, de modo a determinar as concentrações totais de contaminantes orgânicos através da aplicação de solventes orgânicos (n-hexano, diclorometano) e sistemas como Soxhlet, Ultrassom e ASE (Acelerated Solvent Extraction; DIONEX), que normalmente não correspondem à fração do contaminante realmente disponível à biota do solo.

Combinando a seletividade e a sensibilidade da biologia ao potencial de processamento dos componentes microeletrônicos modernos, os biossensores vem surgindo como alternativa de detecção de poluentes, oferecendo novas ferramentas analíticas a serem aplicadas no diagnóstico das condições do meio ambiente (TECON & MEER, 2008). Sensores biológicos podem ser mais lentos e menos duráveis que técnicas analíticas instrumentais, mas tem a importante vantagem de proporcionar informação sobre biodisponibilidade ou biotoxicidade da matriz.

Dentre os diversos biossensores propostos, os microbianos apresentam vantagens sobre aqueles que utilizam componentes biológicos isolados, como enzimas e anticorpos, por possuírem vida útil mais longa, serem mais tolerantes a variações de pH e temperatura e ainda serem mais baratos, uma vez que o componente biológico não precisa ser isolado (YAGI, 2007).

Na área ambiental estes novos sistemas de detecção baseados em sensores microbianos estão em desenvolvimento e na grande maioria usam a resposta luminescente a um composto tóxico presente no meio poluído (KARUBE & NAKANISHI, 1994). Repórteres que geram respostas fluorescentes ou luminescentes são bastante atrativos, uma vez que a bioluminescência é um dos métodos de detecção mais sensíveis da atividade metabólica.

Os experimentos de bioluminescência apresentam ainda importantes vantagens por serem não-invasivos e não-destrutivos. A aplicação de fusões gênicas com genes *lux* provenientes de várias espécies bacterianas bioluminescentes oferecem a possibilidade de combinação, em um único microrganismo, tanto da identificação e quantificação de um componente específico, quanto do seu potencial de impacto em um organismo vivo, a biodisponibilidade

(RODA *et al,* 2004). Vários trabalhos ilustram o potencial da biologia molecular no projeto de biossensores bioluminescentes para a detecção de HPAs (BARKAY *et al*, 1997; STICHER *et al,* 1997; REID *et al*, 1998; RASMUSSEN *et al*, 2000;. TIBAZARWA *et al*, 2001; KUN-LIN *et al*, 2005; MULCHANDANI *et al*, 2005; RODA *et al*, 2004).

Na presente dissertação, a bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44, (HEITZER *et al.,* 1998; VALDMAN, 2004) capaz de responder sensivelmente ao naftaleno desenvolvendo bioluminescência quando exposta a este hidrocarboneto policíclico aromático, foi selecionada para a sua aplicação como um sensor da exposição ao naftaleno e como um repórter da atividade biodegradativa deste, em amostras de solo contaminadas com óleo cru.

O presente estudo faz parte de um projeto desenvolvido por um grupo de pesquisa composto por pesquisadores do CPMA/CETEM/MCT, DEB/EQ/UFRJ, IM/CCS/UFRJ, FEEMA e ENSP/FIOCRUZ, financiado pela Petrobras/CENPES que visa investigar aspectos químicos, físico-químicos e biológicos da qualidade de solos impactados por atividades da indústria do petróleo, o denominado projeto Solo Integral. Neste projeto foi montado um sistema experimental para simulação do processo de atenuação natural, onde o principal objetivo foi simular o efeito desta estratégia de remediação na biodisponibilidade do óleo. Para tanto diversas metodologias foram utilizadas, cabendo ao grupo da DEB/EQ/UFRJ aplicar o instrumento biossensor microbiano bioluminescente, de modo a avaliar a capacidade deste em detectar e estimar a fração biodisponível do contaminante naftaleno.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral prover um instrumento biológico de avaliação da qualidade ambiental de solos impactados por atividades de petróleo, enfocando em uma classe específica de contaminante, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aplicando como elemento biológico de um biossensor o microrganismo geneticamente modificado *P. fluorescens* HK44 e como transdutor um detector bioluminescente, para a detecção de naftaleno em amostras de solo contaminadas com óleo cru.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As etapas descritas abaixo foram desenvolvidas na intenção de se alcançar o objetivo geral da presente dissertação, a saber:

- Desenvolver e otimizar procedimentos de análise, utilizando um biossensor baseado no princípio da bioluminescência, para detecção de naftaleno em amostras de solo contaminado com óleo cru;
- Caracterizar o estado fisiológico e a concentração celular que leva a melhor resposta luminescente frente a uma concentração fixa do composto contaminante;
- Verificar a influência de outros elementos presentes no meio e fatores como tempo do cultivo celular e do estoque da solução de naftaleno na emissão luminescente da cepa HK44;
- Construir a curva de calibração para o instrumento biossensor;

- Selecionar a estratégia de extração do contaminante orgânico naftaleno da matriz sólida que, em tese, melhor represente a fração biodisponível deste hidrocarboneto;
- Otimizar a técnica de extração não-exaustiva (NEET) com a β-HPCD para obtenção da fração de naftaleno teoricamente biodisponível para o solo;
- Avaliar a viabilidade e os benefícios de se aplicar o sistema biossensor no monitoramento da degradação do naftaleno com o tempo, em um sistema experimental de Atenuação Natural Monitorada.

CAPÍTULO III: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1 O PETRÓLEO E SEUS IMPACTOS

O rápido desenvolvimento tecnológico do século XX foi acompanhado por um expressivo crescimento na indústria do petróleo, dado ao amplo emprego deste recurso natural. Utilizado comercialmente a partir do século XVIII na indústria farmacêutica e na iluminação, sua aplicação atualmente além de importante fonte de energia, inclui também, com o advento da petroquímica, a produção de centenas de produtos, o que tornou o petróleo imprescindível na utilidade e comodidade da vida moderna. Entretanto, atividades legais (produção e transporte de petróleo), assim como ações ilegais ou acidentais (despejo de resíduos líquidos contaminado com petróleo e seus derivados) tem levado a contaminação de diversos compartimentos ambientais (PENNER, 2000).

O Petróleo, formado por processos biogeoquímicos, é uma substância oleosa, inflamável, geralmente menos densa que a água, com odor característico. Trata-se de uma combinação de hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos em proporções variáveis (Figura III.1), contendo impurezas, como os compostos de S, N e O e metais, e suas características variam de acordo com o campo produtor, até em um mesmo campo, podendo estar dissolvidos em sua massa líquida gases, sólidos e suspensões coloidais. Em decorrência disto, as propriedades físicas do petróleo podem variar bastante, podendo se ter óleos muito fluídos e claros, com grandes proporções de destilados leves, a óleos muito viscosos e escuros, com grandes proporções de destilados pesados (MARSHALL & RODGERS, 2003).

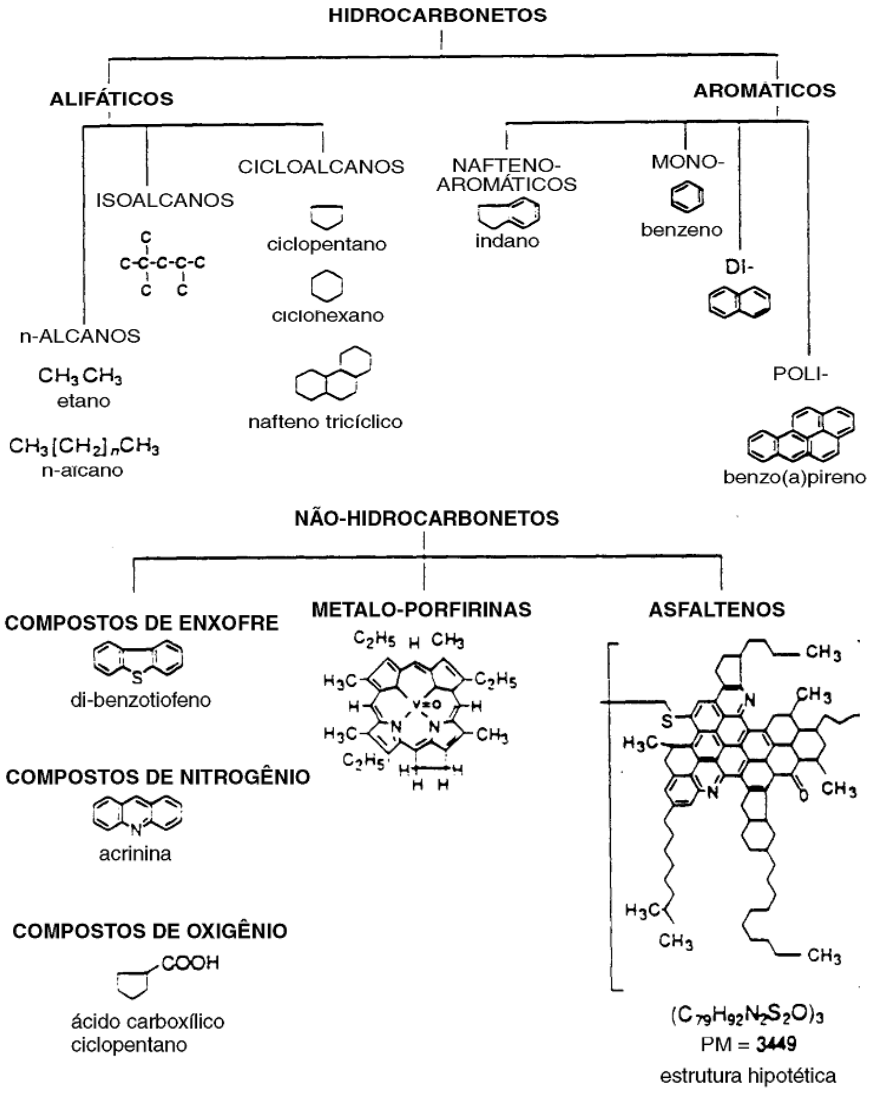


Figura III.1 Estrutura química de alguns compostos encontrados no petróleo (Fonte: Baptista, 2007).

Apesar destas diferenças em suas características físicas, sua composição elementar varia muito pouco, visto que o petróleo é composto por séries homólogas de hidrocarbonetos (VALLE, 2007).

O óleo cru, fração líquida do petróleo, é fisicamente, quimicamente e biologicamente perigoso por conter muitos compostos tóxicos, dentre eles os HPAs em concentrações relativamente altas. Os HPAs são considerados a classe de carcinógenos humanos mais amplamente distribuída no ambiente (LI *et al.*, 2005)

III.1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) que compreendem uma classe complexa de compostos benzóicos multi-anéis condensados, são importantes poluentes ambientais originados de uma ampla variedade de fontes naturais e antropogênicas.

Investigados primeiramente nas décadas de 60 e 70 (Vo-DINH *et al.*, 1998), os HPAs são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si existe atualmente mais de 100 HPAs reconhecidos pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Apesar disso, somente uma pequena parte destes HPAs são considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica (POTIN *et al*., 2004). A Figura III.2 apresenta alguns dos HPAs comumente encontrados no petróleo.

A altas temperaturas, os compostos orgânicos são parcialmente divididos em fragmentos instáveis menores (pirólise), a maioria radicais, que se recombinam para gerar HPAs relativamente estáveis (pirosíntese). A aromatização também pode ocorrer a baixas temperaturas (100 – 150º C), mas requer muito mais tempo e gera grande quantidades de HPAs alquilados. Este é o caso da formação natural de combustíveis fósseis, resultado da degradação da matéria orgânica durante milhares de anos (MORET & CONTE, 2000).

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura
Naftaleno		Fluoranteno	
1-metilnaftaleno		Pireno	
2-metilnaftaleno		Benzo(*a*)antraceno	
Bifenil		Criseno	
2,6-dimetilnaftaleno		Benzo(*b*)fluoranteno	
Acenaftileno		Benzo(*k*)fluoranteno	
Acenafteno		Benzo(*e*)pireno	
2,3,5-trimetilnaftaleno		Benzo(*a*)pireno	
Fluoreno		Perileno	
Fenantreno		Indeno[1,2,3-*cd*]pireno	
Antraceno		Dibenzo(*ah*)antraceno	
1-metil-fenantreno		Benzo(*ghi*)perileno	

Figura III.2 Fórmula estrutural e nomenclatura de alguns HPAs (Fonte: Costa, 2001)

Os HPAs são lipossolúveis, podendo atravessar prontamente a barreira seletiva das células, sua bicamada lipídica, sendo absorvidos pelo organismo via inalação, exposição oral e dermal, com posterior acúmulo no tecido adiposo (NETTO *et al*., 2000). O metabolismo dos HPAs gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no

pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido à presença desses compostos (CHAKRADEO *et al*., 1993).

A elevada taxa de mortalidade em seres humanos (cerca de 6,5 milhões de pessoas morrem de câncer anualmente) e o fato dos tratamentos para estas doenças serem dispendiosos, demorados e normalmente trazerem muito sofrimento aos doentes, expõem claramente os benefícios potenciais que o entendimento, a avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer, particularmente quando sabe-se que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunção com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes (NETTO *et al*., 2000).

No caso dos HPAs e seus derivados, isto é feito geralmente através do monitoramento dos níveis ambientais destas substâncias, do conhecimento das suas vias de penetração no organismo, de seu metabolismo, bem como da avaliação precoce de seus efeitos biológicos. Vários componentes deste grupo são capazes de reagir diretamente, ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA, tornado-se potenciais carcinógenos e eficientes mutágenos.

Os HPAs são gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica, etc. Porém, a contaminação do solo é um típico efeito da atividade antropogênica devido à produção industrial dos HPAs, à produção de carvão vegetal, à extração e gaseificação do carvão mineral e aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (BAMFOTH & SINGLETON, 2005).

Independentemente da atividade industrial, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação dos HPAs, por conta dos postos de combustíveis, que podem contaminar o ar, o solo, o subsolo e as águas subterrâneas com hidrocarbonetos resultantes dos vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis. Além disso, motores veiculares, oficinas mecânicas e garagens de automóveis são também fontes geradoras de HPAs nas cidades (LIMA *et al*.,1998). Assim, devido a estas atividades, o solo recebe anualmente quantidades consideráveis dos HPAs que, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixíssima solubilidade em água (como exemplo, a do antraceno é de somente 0,073 mg L^{-1}) e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos.

No Brasil, a resolução CONAMA 420 de 30/12/2009 trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas pelos HPAs. Nesta legislação, o naftaleno, HPA objeto do presente estudo (incluído na soma dos 10 HPAs) apresenta um Valor de Referência de 0,2 mg kg^{-1}, o que significa que, em concentrações iguais ou menores a esta, o solo pode ser considerado “limpo”. O Valor de Intervenção indica que há riscos para a saúde humana e para o ambiente, sendo que a ultrapassagem desse valor em um volume de solo de 25 m^3 ou em 100 m^3 de água subterrânea impõem a necessidade de implementação na área avaliada de ações voltadas para a sua remediação. Para o naftaleno, o Valor de Intervenção é de 30 mg kg^{-1} em solos agrícolas, de 60 mg kg^{-1} em solos residenciais e de 90 mg kg^{-1} em solos industriais. Na água subterrânea, o valor de intervenção para este HPA é de 100 μg L^{-1} (CONAMA, 2009).

Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre HPAs está principalmente nos Estados Unidos, sob competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA), e na União Européia, através da Comissão das Comunidades Européias e da Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea, sendo esta referência utilizada por alguns órgãos ambientais brasileiros. O Instituto Estadual do Ambiente (INEA), órgão ambiental estadual do Rio de Janeiro (RJ), adota os valores orientadores constantes da "Lista Holandesa", como base para estabelecer valores de qualidade do solo.

Algumas propriedades físico-químicas importantes para se entender o comportamento ambiental e biológico de representantes do grupo dos HPAs são mostradas na Tabela III.1. A tabela III.2, retirada de Telhado (2009) apresenta os valores referenciais e orientadores para o solo na Holanda e na resolução CONAMA 420.

Tabela III.1 Propriedades físico-químicas de alguns HPAs e HPANs

Substância	Peso molecular (g/mol)	Pressão de vapor (Pa, 25º C)	Log $K_{(o/a)}$	Constante de Henry	Solubilidade em H_2O	Tempo de meia vida no solo (mg/L)
Naftaleno	**128**	**36,8**	**3,37**	**$1,74x10^{-2}$**	**31**	**<125 d**
Acenaftileno	152	4,14	4,00	$3,39x10^{-3}$	16,1	43 – 60 d
Fluoreno	166	0,71	4,18	$3,18x10^{-3}$	1,9	32 d
Fenantreno	178	0,113	4,57	$1,31x10^{-3}$	1,1	2 d
Antraceno	178	0,0778	4,54	$1,60x10^{-3}$	0,045	50 d – 1,3 a
Pireno	202	0,0119	5,18	$3,72x10^{-4}$	0,132	210 d – 5,2 a
Benzo[a]pireno	252	$2,13x10^{-5}$	6,04	$1,86x10^{-5}$	0,0038	269 d – 8,2 a
Benzo[ghi]perileno	276	$2,25x10^{-5}$	6,5	$3,03x10^{-5}$	0,00026	<9,5 a
Coroneno	300	$1,98x10^{-1}0$	6,75	$1,72x10^{-7}$	0,00014	-
1-Nitronaftaleno	173	$6,38x10^{-6}$	3,32	-	18	-
1–Nitropireno	247		4,69			

(*) d = dias e a = ano. (Fonte: adaptado de Netto, 2000).

Tabela III.2 Valores Referenciais e Orientadores para solo na Holanda e CONAMA 420.

Legislação	Lista Holandesa (CETESB, 1999)						Legislação CONAMA 420 (2009)			
	Valores referencias para o solo, considerando-se um teor de argila e matéria orgânica de 0%			Valores referencias para o solo, considerando-se um teor de argila de 25% e matéria orgânica de 10%			Valores orientadores para o solo			
	Concentração em peso seco (mg/kg)			Concentração em peso seco (mg/kg)			Concentração em peso seco (mg/kg)			
Parâmetro	Referência	Alerta	Intervenção	Referência	Alerta	Intervenção	Prevenção	Intervenção -Agrícola	Intervenção - Residencial	Intervenção - Industrial
Benzeno	0,01	0,11	0,20	0,05	0,53	1	0,03	0,06	0,08	0,15
Estireno	0,02	10	20	0,1	5,1	100	0,2	15	35	80
Etilbezeno	0,01			0,05	25	50	6,2	35	40	95
Tolueno	0,01	13	26	0,05	65	130	0,14	30	30	75
Xilenos	0,01	4	8	0,05	12,5	25	0,13	25	30	70
Antraceno	-	-	-	-	-	-	0,039	-	-	-
Benzo(a)antraceno	-	-	-	-	-	-	0,025	9	20	65
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-	-	-	-	0,38	-	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	-	-	-	-	-	-	0,57	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-	-	-	-	0,052	0,4	1,5	3,5
Criseno	-	-	-	-	-	-	8,1	-	-	-
Dibenzo(h,i)antraceno	-	-	-	-	-	-	0,08	0,15	0,6	1,3
Fenantreno	-	-	-	-	-	-	3,3	15	40	95
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	-	-	-	-	-	-	0,031	2	25	130
Naftaleno	-	-	-	-	-	-	0,12	30	60	90
PAHs (soma 10)*	0,2	4,1	8	1	20,5	40	-	-	-	-
HTP	10	505	1000	50	2525	5000	-	-	-	-

*Naftaleno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Benzo(ghi)perileno, Indenol(123cd)pireno.

Fonte: Telhado, 2009.

Como pode ser observado na Tabela III.1, estas substâncias são pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do numero de anéis. HPAs apresentam também, coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica que aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula. Por outro lado, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e, consequentemente, HPAs de pesos moleculares mais baixos são mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor que os mais pesados. O mesmo é observado com os valores da constante de Henry que diminui com o aumento do peso molecular destas substâncias.

Como conseqüência destas propriedades, na atmosfera, estas substâncias podem ser encontradas tanto na fase gasosa quanto adsorvidas no material particulado. A concentração de cada componente em ambas as fases é função de sua volatilidade e de sua afinidade pelas superfícies das partículas atmosféricas.

No solo, HPAs encontram-se geralmente adsorvidos no material constituinte e ficam retidos nas camadas superiores. A meia vida do composto de maior peso molecular é relativamente elevada e indica que sua degradação é lenta, pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar, pela falta de nutrientes à microbiota degradadora ou pela baixa biodisponibilidade dos HPAs aos microrganismos degradadores, devido à sorção à fase sólida mineral e orgânica do solo (JOHNSEN *et al.*, 2005).

III.1.2 Naftaleno

O naftaleno é um HPA composto por dois anéis aromáticos condensados, cuja fórmula química é $C_{10}H_8$ e o peso molecular, 128,17 (Figura III.3). Possui três estruturas de ressonância, sendo que suas ligações carbono-carbono não possuem o mesmo comprimento, as pontes C1-C2, C3-C4, C5-C6, e C7-C8 apresentam cerca de 1,36 Å, enquanto as demais pontes possuem cerca de 1,42 Å. Outra característica apresentada por este composto é a facilidade de sublimação a temperatura ambiente (MIRANDA, 2008).

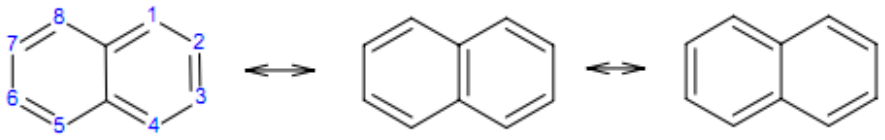


Figura III.3 Estrutura química do Naftaleno e suas estruturas de resonância. As posições 1,4,5 e 8 indicadas na figura são chamadas posições *alpha* e as posições 2,3,6 e 7 são chamadas posições *beta* (Fonte: Miranda, 2008).

O estudo de sua presença em ambientes contaminados é de grande importância devido à sua grande solubilidade em água (31,7 mg/L), maior do que o limite recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (0,1 mg/L).

A exposição aguda de humanos ao naftaleno por inalação, ingestão e contato com a pele está associado à anemia hemolítica, ao dano dos rins e, em crianças, ao dano cerebral. Os sintomas da exposição aguda incluem dor de cabeça, náusea, vômitos, diarréia, anemia, convulsões e coma. Já a exposição crônica ao naftaleno pode causar cataratas e danos da retina. Este poluente influencia ainda sistemas endócrinos e enzimáticos. Existem diversos estudos mostrando que o

naftaleno passa pelo metabolismo enzimático oxidativo do citocromo P450, resultando na produção de metabólitos reativos, que levam a depleção da glutationa, com consequente estresse oxidativo (STOHLS *et al*, 2002). O estresse oxidativo resultante produz efeitos danosos em tecidos, incluindo opacificação do cristalino e formação de catarata, como já mencionado, e danos seletivos a células do epitélio bronquiolar não ciliadas. Podem ocorrer peroxidação de lipídios, danos ao DNA e aumento da fluidez da membrana dos tecidos hepáticos e cerebrais (BAGCHI, *et al* 1998; GERMANSKY & JAMALL, 1998; STOHLS *et al*, 2002; VALDMAN, 2004).

O naftaleno entra no meio ambiente a partir de atividades industriais: é usado como intermediário na síntese de ácido antranílico, naftóis, naftilaminas, ácido sulfônico, resinas sintéticas e hidronaftalenos; é utilizado também na preparação de ácido salicílico, antraquinona, índigo e do inseticida 1-naftil-N-metilcarbamato; pelo seu uso como repelente de insetos, em desodorantes para sanitários e como antiséptico de uso tópico veterinário; pela queima de madeira e tabaco e também através de derrames acidentais de óleo (VALDMAN, 2004; MIRANDA, 2008).

Em sítios com rejeitos perigosos e aterros, o naftaleno pode se dissolver em água. Pode se ligar levemente ao solo ou percolar e atingir o lençol freático, sendo considerado, em conjunto com outros HPAs, como a classe de poluentes de maior contribuição na toxicidade total de amostras de rejeitos líquidos, passando a ser enquadrado na lista prioritária de contaminantes orgânicos persistentes (ELJARRAT & BARCELÓ, 2003)

O metabolismo microbiano de muitos hidrocarbonetos já foi elucidado em nível de vias metabólicas e de controle de processos enzimáticos e genéticos envolvidos em sua utilização. A rota de degradação do naftaleno já está bastante

elucidada para o gênero Pseudomonas, estando ilustrada na figura III.4. Os microrganismos que catabolizam o naftaleno, possuem plasmídios específicos que lhes conferem esta capacidade degradativa. Nestes sistemas já bem caracterizados, um primeiro operon codifica a via de conversão do naftaleno em salicilato (via *ortho*); enquanto um segundo operon codifica a conversão de salicilato via *meta*-clivagem do catecol em piruvato e acetil coenzima A (via *meta*). O catecol, subproduto desta reação, já pode então ser degradado por vários outros microrganismos, uma vez que este composto está presente na maioria das rotas bioquímicas comumente encontradas (VAN HAMME *et al*,.2003; VALDMAN 2004; MIRANDA, 2008).

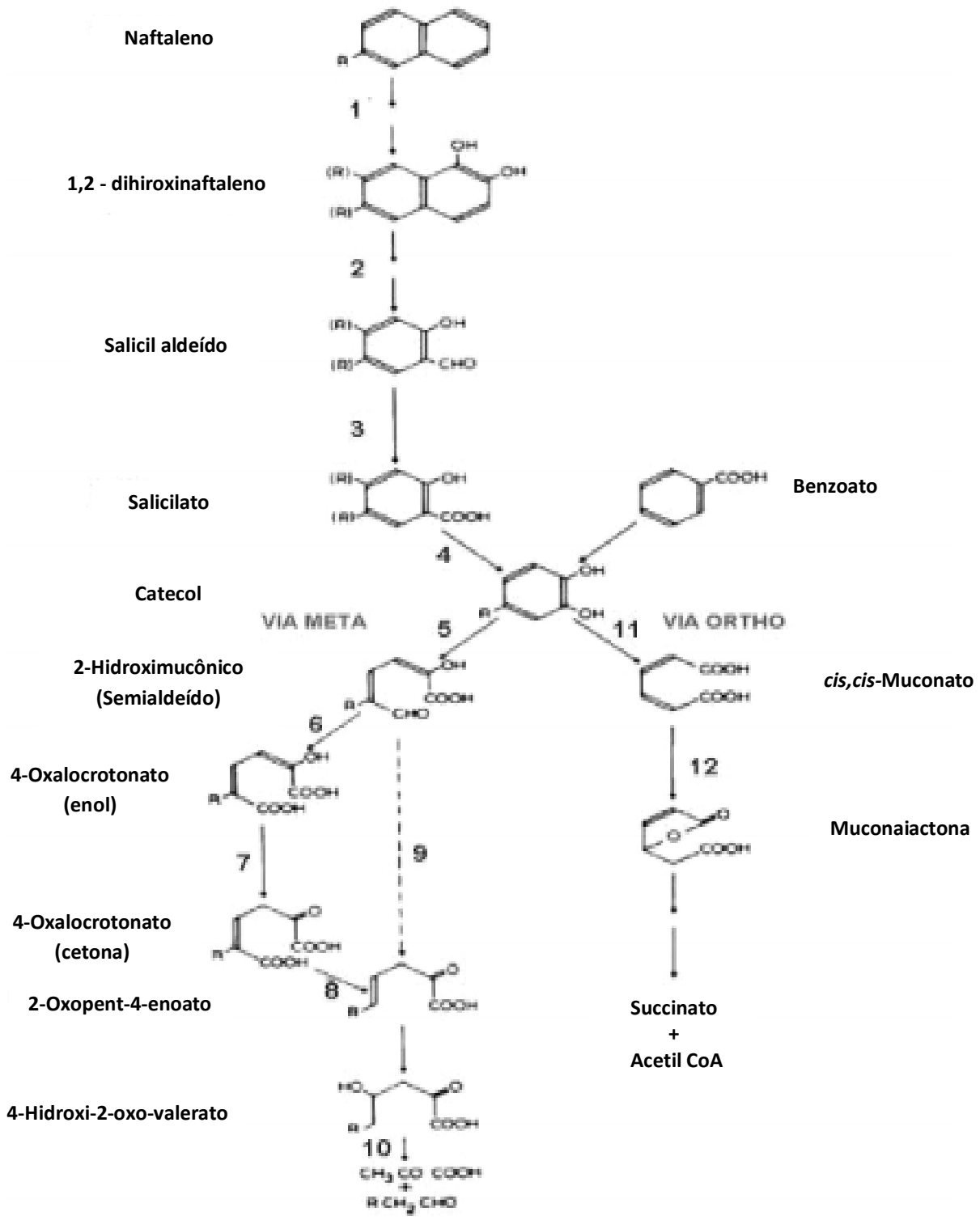


Figura III.4 Esquema das duas vias metabólicas do naftaleno em *Pseudomonas sp.* (Fonte: Miranda, 2008).

Vários estudos tem sido realizados com o objetivo de detectar HPA em compartimentos ambientais. Shimmo e colaboradores (2002) descrevem várias técnicas de extração de HPA em sólidos, dentre elas a extração por microondas, soxhlet, ultra-som e fluídos supercríticos (BOULOUBASSI & SALIOT, 1991; BUDZINSKI *et al.,* 1997; DUPEYRON *et al;* 1999; XU *et al.,* 2001; RICKING & SCHULZ, 2002; KIM *et al.,* 2003). Entretanto, pelo fato de grandes quantidades de solventes também estarem envolvidas na preparação tradicional das amostras, é necessária a concentração do extrato final em um volume pequeno para atingir um limite de detecção considerável (MORET & CONTE, 2000).

Portanto, métodos sensíveis, efetivos e de baixo custo que possam eficientemente monitorar e determinar a presença e a quantidade de HPAs em amostras de solo são necessários, tais como ensaios biológicos, que consistem em expor organismos biológicos a materiais poluídos, ou ainda a aplicação de ferramentas analíticas alternativas como os biossensores. No entanto, a detecção de toxicidade de HPAs no ambiente pode ser restrita devido à sua baixa solubilidade e sorção em superfícies sólidas. A natureza hidrofóbica destes contaminantes resulta em seu fracionamento para a matriz do solo, limitando a sua biodisponibilidade (GUHA & JAFFE, 1996).

III.2 SOLO

O termo solo deriva do latim, *solum*, cujo significado é chão, piso ou terra. Suas diversas definições variam de acordo com o interesse de quem o analisa; agricultor, engenheiro, ecólogo, pedólogo, etc. Uma definição abrangente, proposta por Vieira (1975) compreende o solo como a superfície inconsolidada que recobre as rochas e mantém a vida animal e vegetal da Terra, constituída por camadas distintas no que se refere às suas características físicas, químicas, mineralógicas e biológicas.

A formação de um solo é resultante da ação conjunta dos agentes intempéricos sobre os restos minerais depositados e enriquecidos de detritos orgânicos, provenientes da ação da biota local (ANDRADE, 2001). De tal modo, é possível compreender o solo como um meio complexo e heterogêneo produto de alteração, do remanejamento e da organização do material original (rocha, sedimento ou outro solo), sob a ação da vida, da atmosfera e das trocas de energia que aí se manifestam. É constituído por quantidades variáveis de minerais, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos, incluindo plantas, bactérias, fungos, protozoários, invertebrados e outros animais (LEPSCH, 2002).

São diversas as funções do solo, entre elas a sustentação da vida; a manutenção do ciclo da água e dos nutrientes; a proteção das águas subterrâneas; a conservação das reservas minerais e de matérias primas; a produção de alimentos; o meio para manutenção da atividade sócio-econômica, sendo, portanto, de grande importância sua preservação (PEREIRA, 2008).

II.2.1 Textura e estrutura do solo

A textura, distribuição quantitativa das partículas do solo quanto ao tamanho, constitui-se em uma das características físicas do solo mais estáveis, sendo por isso, considerada como um elemento de suma importância na sua descrição, identificação e classificação. As três principais frações texturais do solo são as partículas inorgânicas areia, silte e argila (FERREIRA & DIAS JR., 2001). Na figura III.5 é apresentado o diagrama de textura adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, o qual é baseado no sistema de classificação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

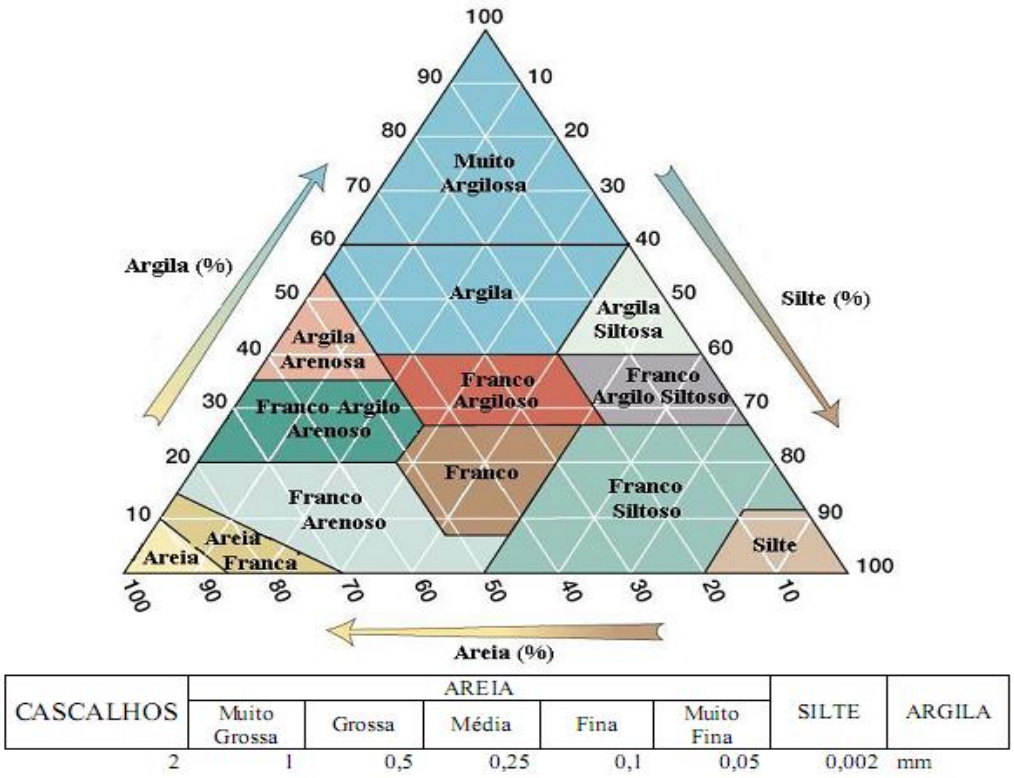


Figura III.5 Diagrama de Textura Adotado pele Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. (Fonte: Baptista, 2007).

A retenção de água e as propriedades de transporte de massa no solo são determinadas por sua textura. As areias drenam água rapidamente, facilitando processos como a lixiviação, enquanto em solos argilosos, por seus espaços porosos terem baixa interconexão, a drenagem normalmente é dificultada (FERREIRA & DIAS JR., 2001).

Outro parâmetro físico relevante do solo é a sua estrutura, maneira pela qual suas partículas se agrupam em formas estáveis, pois está relacionada com a regulação de processos como aeração, armazenamento e circulação de água, penetração de raízes, disponibilidade de nutrientes, atividade macro e microbiológicas e temperatura do solo.

III.2.2 Poluição do solo por contaminantes orgânicos

Preservar a qualidade do solo é de extrema importância para a manutenção da saúde e produtividade de um ecossistema. A poluição do solo, introdução de quaisquer substâncias ou resíduos tóxicos de forma planejada ou acidental, é um assunto complexo, por tocar múltiplos interesses, dada as diversas funções que o mesmo desempenha, assim como por seu intrínseco valor econômico (CETESB, 2009).

Uma grande preocupação associada à poluição do solo é a possibilidade de resultar no comprometimento das fontes de águas subterrâneas (lençol freático). No momento em que um contaminante ou poluente atinge a superfície do solo, este pode ser adsorvido, arrastado pelo vento ou pelas águas do escoamento superficial, ou ainda lixiviado pelas águas de infiltração, passando para as camadas inferiores e atingindo águas subterrâneas. Uma vez atingindo as águas subterrâneas, esse poluente será então carreado para outras regiões, através do fluxo dessas águas.

Na figura III.6 está esquematizado o comportamento do óleo após o vazamento de um oleoduto. Por ser um sistema complexo, o solo propicia comportamentos distintos do óleo ao longo do seu perfil. À medida que o óleo percorre o perfil do solo, parte deste é volatilizado formando uma fase vapor, cujos hidrocarbonetos voláteis podem estar confinados nos poros e/ou nos interstícios do solo. A perda de frações leves de hidrocarbonetos interfere na viscosidade e a densidade do óleo residual, implicando em alterações irreversíveis nas características de transporte no meio poroso, em virtude de interações deste com a matriz do solo (FINE *et al.*, 1997).

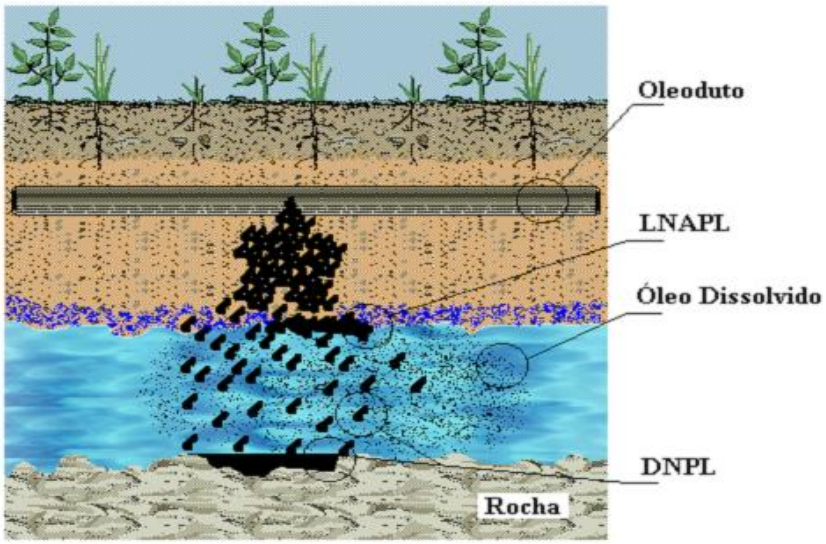


Figura III.6 Representação esquemática do comportamento do óleo no solo. (Fonte: Baptista, 2007).

A fração de óleo livre no solo pode continuar seu fluxo, atingindo o aquífero, e devido a sua baixa solubilidade, formar um líquido de fase não aquosa (NAPL – *non-aqueous phase liquid*) agindo como uma fonte contínua de contaminação. A NAPL pode ser classificada como uma fase mais densa que a água (DNAPL – *dense non-aqueous phase liquid*), tendendo a se depositar na base do aqüífero, e uma fase menos densa (LNAPL - *light non-aqueous phase liquid*) que se mantém sobre o nível d'água (Figura III.6).

O possível destino dos contaminantes orgânicos e seus metabólitos no ambiente incluem ainda a volatilização, biodegradação, transferência para organismos, ligações entre as partículas do solo, além da percolação para o lençol freático (Figura III.7). As interações solo - contaminante ocorrem através de vários tipos de forças, como dipolo- dipolo, dipolo / dipolo-induzido e pontes de hidrogênio. A matéria orgânica presente no solo é considerada o fator dominante da interação entre o solo e o contaminante orgânico (YANG *et al.,* 2001).

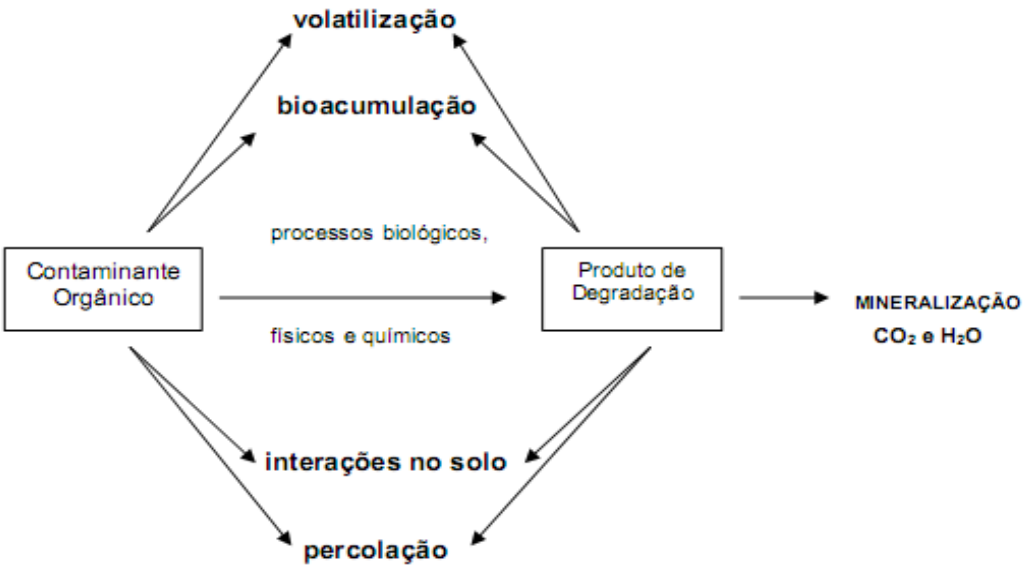


Figura III.7 Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente (Fonte: adaptado de YANG *et al.*, 2001).

Os mecanismos de degradação de contaminantes orgânicos no solo são muito complexos. O solo pode ser considerado como um sistema catalítico constituído por uma mistura de componentes biológicos, como enzimas, vírus, bactérias, fungos, algas, plantas e a fauna; e não biológicos, argila, óxidos, hidróxidos, matéria orgânica, componentes não – cristalinos (RUGGIERO *et al.,* 2002). Desta maneira, a taxa e a extensão da degradação de compostos orgânicos no solo, principalmente para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas intricadas

interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, da água intersticial e dos microrganismos degradadores (RUGGIERO *et al.,* 2002; PEREIRA, 2006).

III.2.3 Microrganismos do solo e a biodegradação de poluentes orgânicos

A presença de microrganismos em determinado solo é função das condições ambientais predominantes, assim como dos limites da sua informação genética. O sucesso de um organismo, em qualquer habitat, depende da extensão e rapidez de suas respostas fisiológicas às condições ambientais predominantes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

A atividade biológica e seus processos bioquímicos correspondentes são essenciais para a fecundidade do solo. A porção viva desse complexo sistema é representada principalmente por microrganismos (bactérias, actinomicetos, fungos e algas), raízes de plantas e animais viventes (meso e macrofauna). A ciclagem da água e de nutrientes pelos vegetais superiores complementa este panorama (RESENDE *et al.,* 2002).

Em função das características do solo, os organismos com metabolismos distintos conseguem conviver, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico, construindo muitas vezes relações de dependência essenciais para sua sobrevivência, proporcionando condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Microrganismos hidrocarbonoclásticos (degradadores de hidrocarbonetos) estão presentes de maneira autóctone na maior parte dos solos. A habilidade de metabolizar hidrocarbonetos é largamente distribuída entre as diversas populações microbianas edáficas. Muitas espécies de bactérias, cianobactérias, fungos filamentosos e leveduras coexistem no sistema natural, agindo independentemente ou em combinação para metabolizar hidrocarbonetos (CANET *et al.,* 2001; GREENWOOD *et al*., 2009).

Consórcios microbianos, comparativamente às culturas puras, tem se mostrado muito efetivos na degradação dessas substâncias. Os consórcios poderiam apresentar maior capacidade de utilização em locais com misturas de contaminantes, devido à complementaridade metabólica entre seus membros (JACQUES *et al*., 2007).

Resumidamente, três características são essenciais para a utilização de hidrocarbonetos pelos microrganismos:

- um sistema eficiente de absorção de hidrocarbonetos com sítios especiais de ligação e/ou produção de substâncias emulsificantes para o transporte do hidrocarboneto ao interior da célula;
- enzimas oxigenases específicas;
- especificidade induzida – resposta positiva do organismo ao hidrocarboneto.

A biodegradação do óleo cru ou de um resíduo de óleo é dependente de uma gama de fatores, entre os mais relevantes: a composição química do contaminante; o estado físico do poluente (líquido, lama, borra); a relação carbono:nitrogênio:fósforo, a umidade e a solubilidade, a reatividade química, a volatilidade, o pH, entre outros (ATLAS, 1981; VAN HAMME *et al.*, 2003).

A biorremediação de solos tem se estabelecido como uma técnica eficiente, econômica, e versátil (MARGESIN, *et al.* 2001). A aplicação de processos biológicos conducentes à redução ou eliminação da concentração e toxicidade de poluentes químicos no ambiente, tem surgido como uma alternativa aos métodos tradicionais de descontaminação (TROQUEST, 2003). Entretanto, para a biorremediação ser efetiva, é preciso existir microrganismos com capacidade catabólica para degradar o poluente, além disso, o contaminante tem que estar disponível ou acessível ao ataque microbiano ou enzimático, e ainda são necessárias condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador (MULLER *et al.*, 1996).

A escolha da estratégia de biorremediação mais apropriada para tratar um determinado local é determinada por vários fatores, tais como as características do(s) poluente(s) presente(s) (natureza, concentração e biodisponibilidade), a composição em termos de nutrientes e população microbiana presente no local. Desta maneira, a solução mais eficaz poderá passar por uma combinação de diferentes técnicas de biorremediação (SILVA *et al*., 2004).

Uma abordagem para a descontaminação de solos e águas subterrâneas, chamada de remediação natural, vem, recentemente, ganhando aceitação (CORSEUIL, 1997). A remediação natural é uma estratégia de gerenciamento que se baseia em mecanismos naturais de atenuação para remediar contaminantes. Também conhecida como biorremediação intrínseca, a remediação natural é uma estratégia que depende dos processos naturais para reduzir a toxicidade da massa e/ou a mobilidade de um contaminante no solo sem a intervenção do homem (SCOW & HICKS, 2005).

Processos de atenuação natural monitorada em áreas com derramamento de petróleo são bem documentados na literatura, particularmente no que tange a biodegradação. Dependendo das condições encontradas no sítio de contaminação, os compostos BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno), por exemplo, podem ser naturalmente degradados pela atividade microbiana e produzir compostos finais inertes, como dióxido de carbono e água (MULLIGAN & YONG, 2004).

III.3 BIODISPONIBILIDADE

A biorremediação é certamente uma alternativa atraente no tratamento de solos contaminados por petróleo, contudo, na prática, frequentemente são observadas taxas de biodegradação menores do que aquelas estimadas em ensaios laboratoriais (HAWS *et al*.,2006). De uma forma geral, o problema reside tanto na diferença da atividade microbiana encontrada quando da ampliação de escala, quanto na queda da biodisponibilidade dos contaminantes ao longo do tempo (SCHERR *et al.*, 2007).

Portanto, a compreensão das limitações associadas à biodisponibilidade dos contaminantes em solos impactados é hoje considerada como uma etapa essencial na determinação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação e no entendimento das limitações relacionadas à degradação do poluente ao longo do tempo (HAWS *et al*.,2006). Tais estimativas são úteis na quantificação da fração do contaminante que realmente estará susceptível ao ataque microbiano, e ainda como instrumento a ser associado a estudos de avaliação de risco (ALEXANDER, 2000).

Normalmente a confirmação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação ocorre através da avaliação de resultados obtidos na quantificação de parâmetros químicos e/ou físico-químicos pré-estabelecidos em leis e regulamentos, como por exemplo, concentração residual de hidrocarbonetos. Todavia, as metodologias analíticas associadas à quantificação desses valores envolvem, em sua maioria, pelo menos uma etapa extração química intensiva para que o composto passe para uma fase líquida e nessa seja quantificado usando, em geral, metodologias analíticas caras e que exigem profissional treinado e capacitado (cromatografia líquida, gasosa etc.).

Esse processo de extração pelo qual a amostra sólida é submetida comumente não representa a real condição de extração, a disponibilização (lixiviação e/ou solubilização) na qual esta amostra seria exposta no ambiente. Com isso, um processo de biorremediação muitas vezes é considerado ineficiente se avaliado desta forma, uma vez que a concentração residual do contaminante pode vir a permanecer acima dos valores de referência estabelecidos. Outrossim, essa concentração residual pode representar apenas a fração não biodisponível do contaminante, ou seja, a fração recalcitrante de difícil eliminação por processo biológico (ALEXANDER, 2000; SEMPLE *et al*., 2006).

Conforme esses poluentes se encontram menos biodisponíveis para os microrganismos, a tendência será ter sua disponibilidade reduzida também para os outros receptores, inclusive os seres humanos. Logo, a queda da biodisponibilidade não é necessariamente um aspecto desvantajoso na remediação de solos impactados, podendo se considerar a redução da biodisponibilidade como o objetivo mais apropriado a ser atingido ao fim de um processo de tratamento (FENG et al., 2000; SEMPLE *et al*., 2004; CHOJNACKA *et al*., 2005; HAWS *et al*.,2006; UDOVIC & LESTAN, 2007).

Atualmente diferentes metodologias vem sendo estudadas visando a real estimativa da fração biodisponível de compostos orgânicos e/ou inorgânicos presentes em amostras de solos impactados (EHLERS & LUTHY, 2003; SABATÉ *et al*., 2004; SABATÉ *et al*., 2006;). Algumas das metodologias avaliadas englobam a aplicação de testes químicos alternativos baseados em técnicas de extração não exaustivas, onde se utiliza diferentes tipos extratantes como, mistura de solventes, surfatantes, ciclodextrinas.

A aplicação efetiva dos biossensores no monitoramento de contaminantes ambientais, apesar de amplamente sugerida, por serem sensíveis, reprodutíveis e de baixo custo, esbarra na dificuldade de se trabalhar com matrizes complexas como solos contaminados com poluentes hidrofóbicos (PATON *et al*., 2009). Desta maneira, apenas algumas aplicações genuinamente ambientais são encontradas na literatura, como referenciado por Trang e colaboradores (2005), que utiliza um sensor microbiano em um estudo de As em águas potáveis de Bangladesh, e Dardenne e colaboradores (2007) que aplicam biossensores na avaliação ecológica de águas na Bélgica. Ambos os artigos, entretanto, são relacionados a amostras aquosas e focam em analitos inorgânicos.

O biossensor bioluminescente *Pseudomonas fluorescens* HK44 sensível ao naftaleno oferece resposta quantitativa a este hidrocarboneto (HEITZER *et al.*, 1992) e a uma variedade de outros compostos mono e di-aromáticos (BUNDY *et al.,* 2001). Apesar de ser o sensor luminescente baseado no catabolismo mais amplamente citado, a maior parte dos estudos realizados envolvendo esta cepa utilizou amostras aquosas. Um exemplo da aplicação deste biossensor em amostras aquosas pode ser ilustrado pelo trabalho de Valdman e colaboradores (2004) que aplicaram a cepa HK44 na detecção de naftaleno em amostras de efluentes do tratamento biológico de uma indústria petroleira, demonstrando ser esta uma técnica sensível a este poluente orgânico também em matrizes ambientais complexas.

Normalmente, biossensores ambientais aplicados a amostras sólidas interagem com seu analito após uma etapa de extração deste com solvente orgânico, que quando utilizados, devem passar por diluição apropriada. Alguns inconvenientes decorrem do uso destes solventes: efeitos negativos adversos nos biossensores; e ainda a porção dos contaminantes orgânicos hidrofóbicos extraídos

normalmente não reflete sua biodisponibilidade (KELSEY & ALEXANDER, 1997; REID *et al.*, 2000), minando assim o maior princípio de uso dos biossensores. Além disso, o solvente muitas vezes, caso seja uma fonte de carbono, pode ser usado pelo microrganismo ou mesmo inibir seu metabolismo, mascarando, portanto, a resposta do biossensor.

Para ser compatível com um biossensor a extração deve ser predominantemente aquosa. Assim sendo, soluções aquosas de ciclodextrina oferecem uma alternativa ao uso de solventes orgânicos. As ciclodextrinas apresentam alta solubilidade em água, contendo, no entanto, uma cavidade hidrofóbica que permite a separação dos contaminantes da fase sólida do solo (BRUSSEAU *et al*., 1997; STOKES *et al.*, 2005). Estudos recentes mostraram relação direta entre a extração com hidroxipropilciclodextrina (HPCD) e a degradação microbiana de HPAs no solo (REID *et al.,* 2000; CUYPERS *et al.,* 2001; DOICK *et al.,* 2005; ALLAN *et al.,* 2007; PATON *et al.,* 2009).

III.3.1 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos formados pela união de moléculas de α–(D)–glicopiranose, com estrutura semelhante a um tronco de cone. As CD mais amplamente utilizadas para fins comerciais e científicos são as α, β, ɣ - CD, formadas por seis, sete e oito unidades de D-glicose, respectivamente (RIBEIRO, 2004) (Figura III.8). No estado natural são moléculas rígidas, cristalinas e homogêneas, que oferecem inúmeras utilidades em função do seu tamanho, forma e grupos funcionais livres (LINDSEY *et al.;* 1987). Sua estrutura física foi estabelecida em 1942, por estudos de raio X (CHEN *et al.,* 2004), através dos quais foi determinado que estas moléculas anulares possuem os grupos hidroxilas primários na parte mais estreita do tronco, ao passo que os grupos hidroxilas secundários encontram-se na parte mais larga deste tronco (Figura III.8).

Deste modo, as hidroxilas das extremidades tornam as ciclodextrinas solúveis em água, devido a possibilidade de formação de interações hidrogênio com o solvente. Por outro lado, o interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos hidrogênios C(3)-H e C(5)-H e pelo oxigênio da ligação éter C(1)-O-C(4), o que lhe confere um caráter hidrofóbico (NYMAN *et al*., 2004).

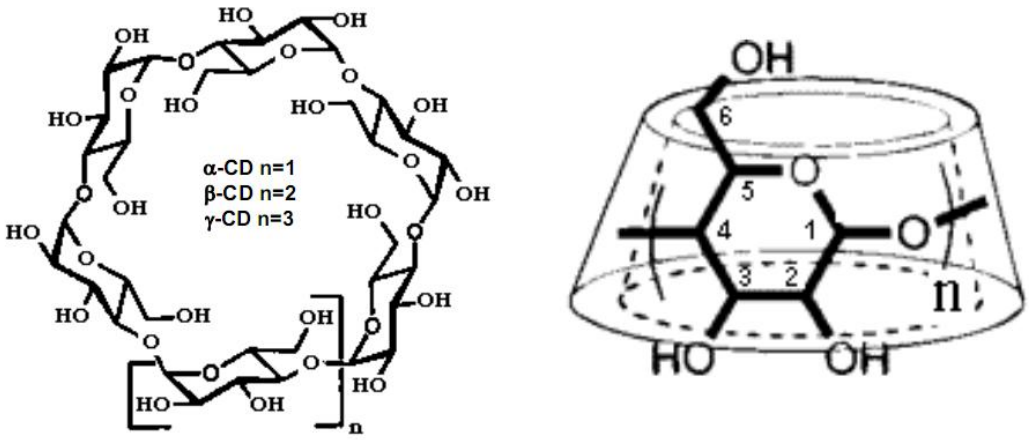
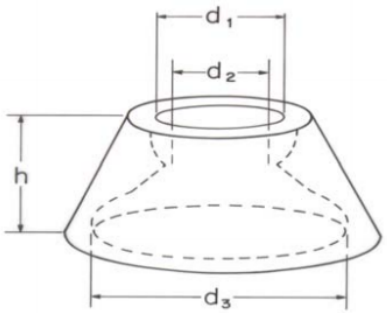


Figura III.8 Estrutura das α, β, γ -ciclodextrinas e representação tridimensional do tronco de cone formado pelo alinhamento dos átomos. (Fonte: Ribeiro, 2004).

Em meio aquoso, as cavidades das ciclodextrinas proporcionam uma matriz hidrofóbica em ambiente hidrofílico, podendo formar compostos de inclusão com uma variedade de moléculas, dependendo apenas de restrições estereoquímicas e de polaridade (MILANESE *et al.,* 1987). As dimensões da cavidade variam de acordo com o número de unidades de D-glicose que as formam (Figura III.9).



	d_1 (Å)	d_2 (Å)	D_3 (Å)	h (Å)	Solubilidade g/100mL H_2O
α	5,6	4,2	8,8	7,8	14,5
β	6,8	5,6	10,8	7,8	1,85
γ	8,0	6,8	12,0	7,8	23,2

Figura III.9 Representação dos diâmetros internos e altura dos troncos das CDs e sua solubilidade em água a 25º C. (Fonte: Ribeiro, 2004).

A formação do complexo de inclusão com as ciclodextrinas pode ser realizada em meio aquoso ou no estado sólido. Em meio aquoso, a cavidade interior das CDs é ocupada por moléculas de água através de uma interação fraca e energeticamente desfavorável (interação polar-apolar), o que facilita a inclusão de moléculas menos polares que a água.

A aplicação da metodologia de extração não exaustiva (NEET) utilizando como solvente a ciclodextrina a fim de prever biodisponibilidade foi primeiramente estudada por Reid e colaboradores (2000), que demonstraram que a extração de alguns HPAs como fenantreno, pireno e benzo[a]pireno com Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina (β-HPCD) estava fortemente relacionada com a mineralização por microrganismos. Recentemente, diversos trabalhos demonstraram que a extração com β-HPCD pode ser aplicada para avaliação da biodisponibilidade com uma grande variedade de hidrocarbonetos, em solos e sedimentos, incluindo naftaleno (PATTERSON *et al*., 2004; PATON *et al*., 2009), fenantreno (ALLAN *et al.*, 2006; DOICK *et al*., 2006; SABATÉ *et al.*, 2006), pireno (REID *et al*., 2000; DOICK *et al.*, 2006, SABATÉ *et al.*, 2006), Benzo[a]pireno (REID *et al.,* 2000), alquil benzenos lineares (DEW *et al.*, 2005), benzo[a]antraceno (SABATÉ et al., 2006), criseno (SABATÉ *et al*., 2006), fluoranteno (SABATÉ *et al.*, 2006), hexadecano (STROUD *et al.*, 2009).

III.4 BIOSSENSORES COMO ELEMENTOS DE DETECÇÃO

Todos os anos centenas de novas substâncias químicas são sintetizadas e liberadas no ambiente, sem que se conheçam profundamente seus efeitos tóxicos, principalmente os de longo prazo. Consequentemente, há uma continua demanda por novas técnicas analíticas que sejam capazes de avaliar esses potenciais riscos para o ambiente e para a saúde humana. Entretanto, apenas a determinação da concentração total de um poluente não permite esta avaliação, uma vez que suas diferentes formas químicas possuem distintas propriedades físico-químicas, as quais determinam o transporte, a ciclagem e a biodisponibilidade dos poluentes no meio (URE & DAVIDSON, 1995; CAROLI, 1996).

Normalmente os métodos químicos tradicionais, extremamente sensíveis e específicos, não conseguem distinguir as espécies que são assimiláveis pela biota (biodisponíveis) das formas inertes, que não causam efeitos tóxicos aos organismos presentes no ambiente. Muitas vezes os resultados obtidos através das análises químicas tradicionais são operacionalmente definidos e não se correlacionam com os resultados de bioensaios, uma vez que os mesmos refletem de maneira mais acurada os efeitos tóxicos dos poluentes. Isto é extremamente relevante no caso de contaminações ambientais por hidrocarbonetos (SELIFONOVA *et al.*, 1993; URE & DAVIDSON, 1995; CAROLI, 1996).

Em resposta a estas questões, uma alternativa surgida recentemente, estimulada, entre outras, pelas dificuldades das abordagens tradicionais em resolver adequadamente a questão da biodisponibilidade, é o uso de biossensores.

III.4.1 Definição de biossensor

Biossensores podem ser definidos, de forma simplificada, como um tipo particular de sensor químico que faz uso de um componente biológico na camada sensível acoplado a um transdutor de sinal, a fim de se obter uma resposta específica. Eles podem ser designados para detectar pequenas concentrações de determinado analito, ou ainda para reportar características fisiológicas ou bioquímicas de uma determinada amostra (SALGADO, 2001). Recentemente, foi proposta pela IUPAC (*International Union of Pure Apllied Chemistry* - 2001) a seguinte definição de Biossensor:

Um 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 esta em contato direto com o elemento transdutor.

A reação biológica detectada pode ser a atividade enzimática, a indução da expressão de um gene ou mesmo a morte celular. Os sistemas de detecção destes efeitos biológicos, geralmente se baseiam em princípios eletroquímicos ou óticos. Os biossensores devem ser diferenciados de bioensaios tradicionais onde o conversor ou detector não é parte integral do sistema analítico (SELIFONOVA *et al.*, 1993; RAMANATHAN *et al*, 1997; NAKAMURA & KARUBE, 2003; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2005).

O funcionamento dos biossensores se baseia inicialmente no reconhecimento de um dado substrato pelo componente biológico, sendo a alta especificidade e a alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse de grande importância para o bom funcionamento do biossensor. Em seguida, como produto da

interação entre a molécula biológica e o substrato, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos são gerados e estes produzem íons, elétrons, calor, luz, massa, fluorescência ou gases, que são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (SHARMAT & ROGERS, 1994). A figura III.10 demonstra esquematicamente o funcionamento de um biossensor.

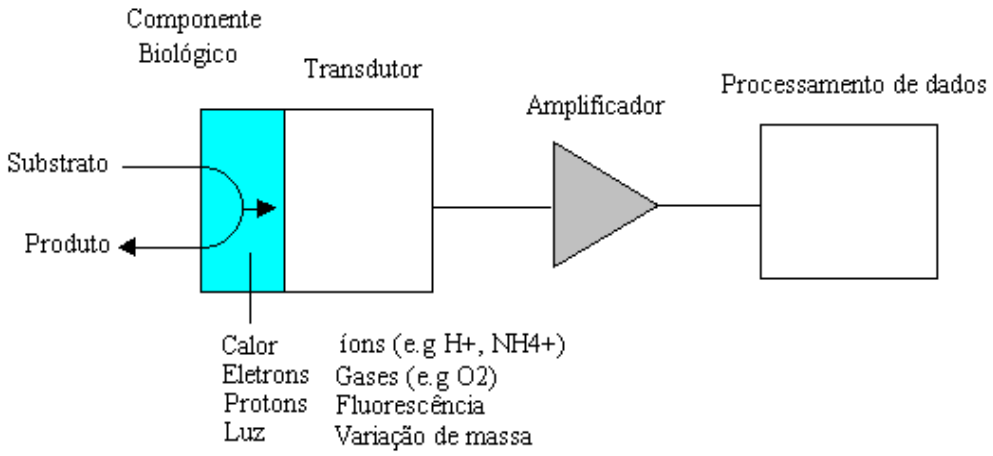


Figura III.10 Esquema geral de funcionamento de um biossensor.

A aplicação de um biossensor permite a detecção quantitativa de uma determinada espécie, pois este responde seletivamente e reversivelmente à espécie química, produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da dita espécie

O transdutor pode ser eletroquímico –mede mudanças de corrente ou voltagem-, ótico –mede mudanças de fluorescência, absorbância ou reflectância- ou acústico –mede mudanças da freqüência, resultante de pequenas mudanças na união de massa à superfície.

Alguns biocompostos se adequam para o uso na composição dos biossensores, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de microrganismos, tecidos de plantas e animais e organelas. De acordo com o elemento biológico usado na construção do biossensor, este pode ser dividido em diferentes classes. Dentre elas, as classes mais desenvolvidas são: biossensores enzimáticos, microbiológicos, os quimiorreceptores e os imunossensores.

Dentre os quatro tipos mencionados, os sensores enzimáticos tem sido os mais utilizados na detecção de analitos específicos. Porém, com o avanço da tecnologia moderna, os microrganismos também vêm sendo avaliados devido sua alta sensibilidade às mudanças em seu ambiente.

A natureza instável das enzimas tem dificultado a ampla aplicação deste biocomponente aos biossensores voltados para os campos da ciência ambiental (YAGI, 2007). Microrganismos têm várias vantagens sobre enzimas purificadas quando utilizados como componentes biológicos. Inúmeros tipos de microrganismos existem no ambiente natural e são mantidos em coleções de cultura, permitindo a escolha de uma linhagem adequada para um determinado propósito. Microrganismos, especialmente bactérias, proliferam muito rapidamente sob condições aeróbias e/ou anaeróbi]as em meios de cultura relativamente baratos. Outra vantagem importante do uso de células no instrumento biossensor é a possibilidade de analisar a amostra em questão através de uma dada via metabólica na qual um complexo enzimático está envolvido, tais como o sistema respiratório e fermentação (MATRUBUTHAM & SAYLER, 1998; RIEDEL, 1998; D'SOUZA, 2001).

Um novo tipo de sensor microbiano tem sido desenvolvido incorporando as tecnologias do DNA recombinante. Iniciada há mais de vinte anos, a engenharia de células microbianas com o objetivo de detecção química tem sido expandida enormemente desde então (DAUNERT *et al,* 2000). A principal força motriz para este desenvolvimento tem sido o avanço nas técnicas de engenharia genética, a relativa facilidade para redesenhar (alguns) componentes de células microbianas e montar circuitos genéticos (operons) com a finalidade de detecção específica de um analito produzindo um robusto sinal de saída. Embora, a princípio, qualquer componente, produto ou reação metabólica celular possa formar a base para um dispositivo sensor, a maior parte da investigação tem-se concentrado na construção das chamadas proteínas repórter que são produzidas pelas células após interação ou contato específico com um analito alvo (DAUNERT *et al,* 2000).

Desta forma, a engenharia genética tem possibilitado a combinação, em um único microrganismo, tanto da identificação e quantificação de um componente específico quanto do seu potencial de impacto em um organismo vivo (biodisponibilidade). Uma das formas de se obter essa dupla informação é com a fusão de dois elementos gênicos: primeiro o promotor reage pela presença do contaminante e sinaliza a expressão do segundo, que atua como “repórter”.

Um repórter celular é um organismo vivo que produz um sinal mensurável quando percebe um determinado produto químico ou uma alteração física em seu ambiente. Normalmente contém um sistema regulatório gênico (transcricional) acoplado a gene(s) repórter(es) que codifica para uma proteína repórter(es) responsável pelo sinal (NIVENS *et al,* 2004). Estes genes repórteres e/ou reguladores podem ser nativos de uma célula ou adquiridos por transformação genética. Um tipo comum de sistema de regulação transcricional consiste de um gene regulador, que

expressa a sua proteína reguladora e da seqüência de DNA promotora que controla a expressão jusante do gene. Estes elementos trabalham em conjunto para responder a alterações ambientais e controlar expressão de um gene ou um óperon reforçando a fisiologia celular.

Vários genes repórter foram isolados a partir de uma variedade de organismos que ocorrem naturalmente (DAUNERT *et al*., 2000) e foram categorizados pelo meio de detecção (KOHLER *et al*., 2000; KEANE *et al*., 2002). Genes repórteres codificam proteínas que produzem mudança de cor, moléculas fluorescentes, espécies eletroativas, ou bioluminescência, moléculas que podem ser detectadas por dispositivos de análise convencionais.

O monitoramento colorimétrico, fluorescente e eletroquímico pode exigir quantidades significativas de energia, um recurso limitado em sensores implantados remotamente. Por exemplo, dispositivos colorimétricos e fluorescentes exigem fontes de radiação (por exemplo, lasers, luzes ou díodos emissores de luz) para excitar o analito para detecção. Além disso, amostras ambientais contem muitos compostos que podem interferir na detecção eletroquímica, colorimétrica e fluorescente (NIVENS *et al,* 2004). Alguns produtos de sinalização colorimétrica e fluorescente também podem permanecer ativos por longos períodos de tempo (persistem ainda após a morte celular), e, portanto, não são propícios ao monitoramento da dinâmica ambiental real (TOMBOLINI *et al*. 1997; ANDERSEN *et al*. 1998).

Em contraste, a detecção da bioluminescência não requer fonte externa de radiação, uma vez que a luz é produzida por reações bioquímicas. Como a bioluminescência requer energia na forma de biomoléculas altamente energéticas, analitos que induzem o sistema *lux* e fornecem energia podem ser aplicados no

monitoramento da dinâmica. Em um estudo que comparou respostas fluorescentes (proteínas GFP e dsred) e bioluminescente (genes *luxCDABE* e *luc FF*) de um biorrepórter utilizando *Escherichia coli* engenherada, a bioluminescência obteve tempos de resposta mais rápidos e limites de detecção mais baixos do que sinais fluorescente (HAKKILA *et al*. 2002).

III.4.2 Biossensores Bioluminescentes

Como previamente exposto, a explosão na área de biossensores baseados na bioluminescência como técnica de detecção veio com o desenvolvimento da engenharia genética celular (bactérias, leveduras ou células de mamíferos) designada para gerar um sinal bioluminescente em resposta a um analito alvo (RODA *et al,* 2004).

Uma variedade de biossensores bioluminescentes para o monitoramento ambiental foram desenvolvidos (Tabela III.3). Estes são capazes de detectar as condições gerais de estresse, compostos genotóxicos, oxidantes, metais e orgânicos xenobióticos (DAUNERT *et al*., 2000).

As proteínas repórteres luminescente mais comuns são as luciferases procariota (*lux*) e eucariota (*luc*) e a proteína verde fluorescente (*gfp*). Esta última, originalmente isolada de uma água viva, necessita de uma luz de excitação prévia para que só então emita a luz que é quantificada (LEWIS *et al,* 1998). Outra desvantagem da gfp é a necessidade do rompimento celular para realizar o teste enzimático e ainda o tempo necessário para que a conformação protéica correta seja alcançada (LAROSSA & VAN DYK, 2000), já que um grande número de moléculas pode ser necessário para se detectar um mínimo de sinal (SAGI *et al,*2003).

Tabela III.3 Biossensores microbianos recombinantes usando genes *luc* ou *lux* como repórter luminescente

Célula Recombinante	Gene Repórter	Unidade Regulatória	Analito
Escherichia coli	luc luxAB luxCDABE	Mer	Mercúrio Organomercurios
E. coli *Staphylococcus aureus*	Luc luxAB	Ars	Arsenito, arsenato, antimonite
S. aureus	Luc luxAB	Cad	Cadmio, chumbo
E. coli	Luc	Znt	Zinco
Ralstonia eutrophus	Luc	Chr	Cromo
Pseudomonas fluorescens	luxCDABE	Nah	Naftaleno, salicilato
E. coli *Pseudomonas putida*	Luc	Xyl	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX)
P. putida	luxAB	Dmp	Fenol
P. putida	luxCDABE	Tod	BTEX
P. putida	luxCDABE	Sep	Compostos aromáticos
R. eutrophus	luxCDABE	Bph	Bifenois Policlorados
E. coli	luxAB	alkB	Alcanos
E. coli	luxCDABE	Tet	Tetraciclinas

(Fonte: Modificado de Roda, 2004)

Já as luciferases não necessitam de luz de excitação e a diferença entre a luciferase procariota e a eucariota está na sua estrutura e reação de emissão de luz (LEWIS *et al,* 1998). As reações catalisadas por estas enzimas são:

$$\text{Decanal} + FMNH_2 + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase bacteriana}} \text{Ácido decanóico} + FMN + H_2O$$

$$\text{Luciferina} + ATP\text{-}Mg^{2+} + O_2 \xrightarrow{\text{luciferase luciérnaga}} \text{Oxiluciferina} + AMP + PP_i$$

As luciferases bacterianas e de insetos (luciérnaga) são enzimas sem correlação alguma. O substrato luciferina da luciferase de inseto (*luc*), além de ser muito mais custoso que o da luciferase bacteriana (*lux*), só atravessa a membrana eucariota a baixos valores de pH. Adicionalmente, o uso de genes repórteres

eucarióticos em hospedeiros distintos (por exemplo células bacterianas) normalmente requer a adição de luciferina exógena para a geração de luz. Deste modo, os repórteres *luxCDABE* e *luxAB* são normalmente escolhidos para o desenvolvimento de testes fáceis e baratos (NIVENS *et al*, 2004).

A abordagem da bioluminescência tem sido utilizada em vários casos para construir ferramentas microbianas capazes de reportar sensivelmente a presença de compostos específicos como o naftaleno, benzeno e tolueno, e metais pesados. Alguns estudos utilizando biorrepórteres *luxCDABE* podem ser visualizados na tabela III.4.

Tabela III.4 Biorrepórteres *luxCDABE*

Analito (efetor)	Promotor	Microrganismo	Referência
Reposta de estresse não específica	*recA, uvrA, alkA*	*E. coli*	Vollmer *et al.* (1997)
Dano DNA	*recA*	*E. coli DPD2794*	Min *et al.* (2000)
Radiação-gama	*cda*	*E. coli*	Ptitsyn *et al.* (1997)
Genotoxinas	*dnaK, grpE, lon*	*E. coli*	Van Dyk *et al.* (1995)
Choque térmico			Rupani *et al.* (1996)
	recA	*E. coli e*	Davidov *et al.* (2000)
Toxinas Orgânicas		*S. typhimurium*	
	katG		Belkin *et al.* (1996)
Estresse oxidativo	*katG, micF, recA, grpE,*	*E. coli*	Belkin *et al*. (1997)
Várias toxinas	*fabA*	*E. coli DPD2794*	
	fbaA, grpE, katG, recA	*E. coli*	Vollmer *et al*. (1998)
Ultrasom	*recA*	*P. aeruginosa*	Elasri & Miller (1998)
Luz ultravioleta			

Metais			
Cadmio	*Não especificado*	*R. eutrophus*	Corbisier *et al.* (1996)
Cromo	*chr*	*AE1239 R.*	Peitzsch *et al.* (1998)
Cobalto	*chr*	*eutrophus CH34*	Tibazarwa *et al.* (2000)
Cobre	*cup 1*	*R eutrophus CH34*	Holmes *et al.* (1994);
		E. coli	Daunert *et al*. (2000)
Metais Pesados	*zntA, copA*		Riether *et al.* (2001)
Ferro	*pupa*	*E. coli*	Khang *et al.* (1997)
Mercúrio	*mer*	*P. Putida*	Selifonova *et al*. (1993)
Níquel	*cnr*	*E. coli*	Tibazarwa *et al.* (2000)
Zinco	*smtA*	*R. eutrophus CH34*	Erbe *et al.* (1996)
		Synechococcus	
		PCC7942	
Compostos Orgânicos			
2,4 – Diclorofenol	*tdfDII*	*R. eutropha JMP134*	Hay *et al.* (2000)
3- Xileno	*xyl*	*P. putida*	Burlage *et al.* (1998)
4- Clorobenzeno	*fcbA*	*E. coli*	Rozen *et al.* (1999)
BTEX	*tod*	*P. putida TVA8*	Applegate *et al.* (1998)
Isopropil benzeno	*ipb*	*P. putida RE204*	Selifonova Eaton (1996)
Naftaleno	*nahG*	*P fluorescens HK44*	King *et al.* (1990)
Peróxidos Orgânicos	*katG*	*E. coli*	Belkin *et al*. (1996)
PCBs	*orfO-bphA*	*R. eutropha ENV307*	Layton *et al*. (1998)
p-ácido clorobenzóico	*fcbA¢*	*E. coli*	Rozen *et al.* (1999)
p-cimene	*cymB*	*P. putida*	Ripp *et al.* (2004)
Salicilato	*nahG*	*P. fluorescens HK44*	King *et al.* (1990)
Tricloroetileno			

(Fonte: Adaptado de Nivens, 2004).

Biossensores utilizando o fragmento gênico *luxCDABE* podem ser: isolados ambientais que ocorrem naturalmente; construções genéticas com um promotor constitutivo (sempre expresso); construções com fusões de um promotor-*lux* para respostas de estresse específicas e construções com um sistema regulatório gênico que são específicas para uma analito ou classe de analito.

O monitoramento *in vivo* da bioluminescência é muito mais conveniente e rápido do que outros testes de fusão de genes repórteres baseados em ensaios enzimáticos ou na medida do produto do gene (BELKIN *et al,* 2003). Deste modo, essa técnica foi a escolhida para ser utilizada no desenvolvimento do biossensor

microbiano para a detecção de poluentes ambientais. Sendo o naftaleno o HPA de maior solubilidade em água, este foi selecionado como modelo para avaliar o risco ambiental de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). O microrganismo escolhido para tal fim foi a bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44 e uma abordagem da literatura relacionada a este tema está relatado no próximo tópico.

III.4.3 *Pseudomonas fluorescens* HK44 e sua aplicação como biossensor

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44, surge como uma cepa capaz de emitir luz suficiente para servir como um biossensor da exposição ao naftaleno e como um repórter da atividade biodegradativa deste (VALDMAN, 2004). A cepa HK44 contém um plasmídio catabólico de naftaleno (pUTK21) mutado pela inserção de genes *lux* por um transposon. O biossensor luminescente utilizando como componente biológico *P. fluorescens* HK44 pode ser aplicado de maneira semi-quantitativa para detectar hidrocarbonetos de solo contaminados. Na figura III.11 encontra-se um esquema resumido da construção do plasmídio inserido neste biossensor, primeiro a sequência original do plasmídio NAH7, seguido da modificação feita com os genes *lux*:

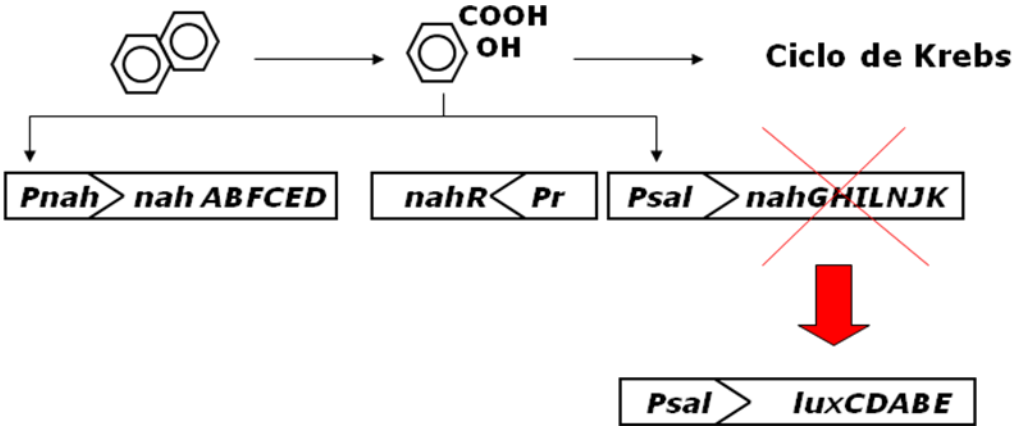


Figura III.11 Resposta bioluminescente ao naftaleno (Fonte: adaptado de Valdmam, 2004).

O catabolismo do naftaleno por cepas de *P. fluorescens* que contenham o plasmídio NAH7 é determinado por dois operons: o primeiro resulta nas várias atividades requeridas para a transformação oxidativa do naftaleno a salicilato, enquanto que o segundo operon da sequência determina o metabolismo subseqüente deste composto a acetaldeído e piruvato, iniciadores do Ciclo de Krebs (CEBOLLA *et al.,* 1997).

O plasmídio pUTK21 contido na cepa HK44 contem apenas o primeiro operon supracitado. No lugar do segundo operon está inserido os genes *luxCDABE* de *Vibrio fischeri.* A expressão dos cinco genes *lux* na presença de oxigênio, ATP e força reduzida resulta em uma bioluminescência contínua (LAROSSA & VAN DYK, 2000; VALDMAN, 2004). As reações bioquímicas e moleculares envolvidas na produção bioluminescente estão mostradas na figura III.12.

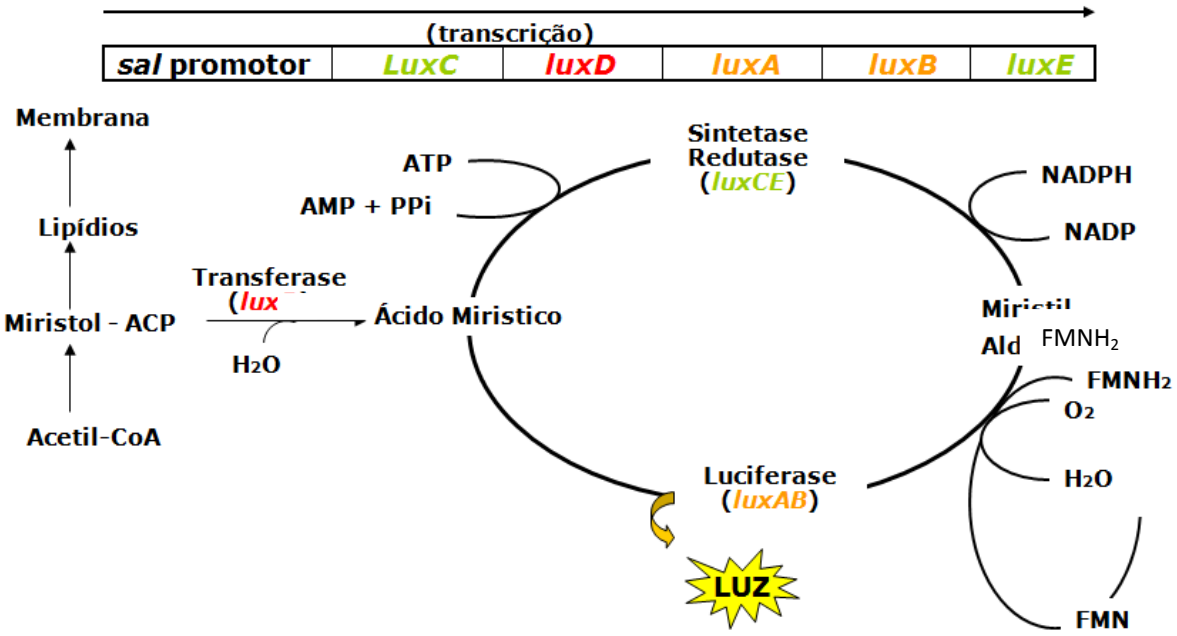


Figura III.12 Diagrama das reações bioquímicas e moleculares envolvidas na resposta bioluminescente (Fonte: adaptado de Valdman, 2004).

A resposta bioluminescente é produto da transcrição dos cinco genes estruturais, codificados como sendo *luxA, luxB, luxC, luxD* e *luxE.* O produto de *luxD* gera um ácido graxo de cadeia longa pela hidrólise da proteína transportadora acil acetilada (Figura III.12). Este ácido graxo de cadeia longa ativa uma enzima acil conjugada em uma reação dependente de ATP através da ação do produto de *luxE.* A enzima acil (produto de *luxE*) serve como um agente de transferência, doando o grupamento acil ao produto de *luxC.* O composto binário resultante acil-LuxC é então reduzido a uma longa cadeia de aldeído utilizando NADPH como um par eletrônico e um doador de próton. A luz produzida é catalisada pela luciferase heterodimérica, produto de *luxA* e *luxB*. A energia para a emissão luminosa é fornecida pela conversão de aldeído a ácido graxo e pela oxidação da flavina mononucleotídeo reduzida – $FMNH_2$ (LAROSSA & VAN DYK, 2000).

Resumidamente, a emissão de luz pela cepa HK44 requer oxigênio, NADPH, ATP, $FMNH_2$ e substrato aldeído. Os genes *luxCDABE* codificam para as enzimas heterodiméricas luciferase, redutase, transferase e sintetase (WEBB *et al*, 1996). A exposição deste microrganismo ao naftaleno e ao seu intermediário salicilato resulta em uma maior indução do operon *luxCDABE* e, consequentemente, em um aumento proporcional da resposta bioluminescente (HEITZER *et al*, 1998).

Apesar de estudos mostrarem o sucesso da utilização de microrganismos geneticamente modificados para a biorremediação, a sua liberação em ambientes abertos ainda é uma grande preocupação pública. A linhagem *P. fluorescens* HK44 representa o primeiro microrganismo geneticamente modificado aprovado para estudo em campo nos Estados Unidos (VALDMAN *et al.,* 2004). Deve-se ressaltar ainda que tanto o microrganismo hóspede original quanto o plasmídio original (NAH7) foram isolados de solo de uma planta de gás natural contaminado com HPAs. Esta cepa degrada compostos de dois a três anéis aromáticos assim como outros HPAs substituídos devido a rota catabólica de naftaleno conferida pelo plasmídio PUTK21. A cepa HK44 além do naftaleno emite luz em resposta ao salicilato ou 4-metil-salicilato quando fisiologicamente ativa durante o processo de biorremediação (RIPP *et al.,*2000).

Ensaios com biossensores microbianos de HPAs demonstraram que as células são muito sensíveis aos processos de transferência de massa e são facilmente limitadas pela concentração da fase aquosa. Por exemplo, o limite de detecção de naftaleno foi reduzido de 0,5 μM para 50 nM usando um biossensor na fase gasosa, ao invés de uma suspensão aquosa (WERLEN *et al*, 2004; KOHLMEIER *et al*, 2007). Isto ocorre dada a alta volatilidade do naftaleno e das taxas de difusão cerca de 10000 vezes mais rápido no ar do que no líquido (WERLEN *et al*, 2004).

Kohlmeier e colaboradores (2007) mostraram que biossensores repórteres expostos a concentrações saturantes de naftaleno em solução aquosa, na presença ou não de mais cristais de naftaleno, produziram o mesmo sinal máximo de saída do repórter GFP após 4 horas de incubação. No entanto, as células no ensaio com naftaleno cristalino continuaram a crescer, levando a uma diluição da quantidade de GFP nas células em tempos de incubão maiores que 4h, como consequência da ativação da via metabólica do naftaleno.

Frequentemente, biossensores aplicados a área ambiental devem estar integrados em um bioensaio com uma etapa de extração que é de relevância ecológica. Werlen e colaboradores (2004) foram pioneiros ao propor uma técnica de extração não euxastiva (NEET), refinada por vários autores (TECON *et al*, 2008; KOHLMEIER *et al,* 2007) importante para a detecção de contaminantes em amostra reais, por ser uma tentativa de se averiguar a fração disponível de determinado contaminante em matrizes complexas como o solo.

Paton e colaboradores (2009) mostraram recentemente que a resposta bioluminescente do sensor microbiano utilizando a cepa HK44 frente a extratos aquosos de HPCD e metanol 10% obtidos por uma técnica de extração não exaustiva (NEET) reflete a fração disponível de naftaleno no solo, a qual é também relacionada com os atributos físico-químicos do tipo de solo utilizado. Para aplicação de biossensores em amostras ambientais, as NEETs são uma parte essencial do ensaio. Este trabalho foi o primeiro a combinar a extração com a ciclodextrina (HPCD) com um biossensor bioluminescente, relacionando a determinação química da fração biodisponível de um analito com a indução catabólica em um biossensor. O estudo progrediu de solos experimentalmente contaminados diretamente com naftaleno, à avaliação da biodisponibilidade deste HPA em amostras de solo de uma planta de

gás manufaturado historicamente contaminados (antes e após experimentos de biodegradação do analito por *P. fluorescens* TTC1). O percentual de remoção obtido pela extração utilizando como solvente apenas a água foi significativamente menor do que a porção degradada por *P. fluorescens* TTC1, enquanto que a porção extraída com metanol foi maior do que a fração biodegradável das amostras com baixas concentrações de naftaleno (abaixo de 50 mg/kg). De uma maneira geral, a extração tanto com ciclodextrina (HPCD) quanto com metanol apresentaram boa correlação com a fração passível de degradação microbiana.

Patterson e colaboradores (2004) também reportaram que a solução de ciclodextrina (HPCD) é a escolha ideal para a técnica de extração não-exaustiva quando considerado o acoplamento com biossensores, uma vez que outros métodos, como Tenax TA e XAD-4, exigem a aplicação de uma etapa de eluição com solvente solúvel em água seguido por um estágio de diluição. Além disso, os referidos autores encontraram baixa correlação entre a resposta do biossensor pelo método XAD e a fração disponível para mineralização em uma variedade de solos testados. Neste estudo, a resposta a extratos de metanol diluídos foi similar àquelas com solvente ciclodextrina. Enquanto a metodologia aplicando o metanol requer uma etapa de diluição, a técnica de extração com cilcodextrina é inteiramente compatível com o instrumento biossensor, provendo uma forte correlação entre o percentual de naftaleno extraído e a resposta bioluminescente.

Com base nas referências encontradas, o presente trabalho teve como objetivo a aplicação do biossensor luminescente utilizando como biocomponente a cepa *P. fluorescens* HK44 para o monitoramento do hidrocarboneto aromático policíclico naftaleno em amostras de solo contaminadas por petróleo.

CAPÍTULO IV: MATERIAL E MÉTODOS

IV.1 BIOSSENSOR MICROBIANO: *Pseudomonas fluorescens* HK44

IV.1.1 Preparo de meios e soluções

Neste primeiro item estão descritas as composições dos meios utilizados tanto para o crescimento celular (meio de cultivo), quanto para os experimentos de bioluminescência (meio de detecção), assim como o meio sólido de manutenção do microrganismo. Os protocolos de preparação de soluções estoque de antibiótico tetraciclina e tampão fosfato, também estão apresentados a seguir.

IV.1.1.1 Meio de cultivo YEPG -Tc

As células foram crescidas, previamente aos experimentos de detecção de naftaleno, no meio de cultivo YEPG adaptado de Heitzer (1992), como proposto por Valdman (2004):

Tabela IV.1 Composição do meio de crescimento para *P. fluorescens* HK44

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de lêvedo (YE)	2,0
Peptona de caseína (P)	2,0
Glicose (G)	1,0
Nitrato de amônio – NH_4NO_3	0,2

O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,0 com solução tampão fosfato de potássio 0,1M e o antibiótico tetraciclina (Tc) foi adicionado em uma concentração final de 15 mg/L para seleção positiva do transposon *lux* presente no plasmídio

pUTK21 da cepa HK44, garantindo o crescimento só de células capazes de emitir luz em contato com naftaleno.

IV.1.1.2 Meio sólido de manutenção YEPG –Tc

Repiques periódicos foram feitos mantendo-se a cepa HK44 em meio sólido de manutenção como proposto por Valdman (2004):

Tabela IV.2 Composição do meio manutenção para *P. fluorescens* HK44

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de lêvedo (YE)	0,2
Peptona de caseína (P)	2,0
Glicose (G)	1,0
Nitrato de amônio – NH_4NO_3	0,2
Agar-ágar	30

O pH do meio sólido de manutenção foi ajustado para 7,5 com solução tampão fosfato de potássio 0,1M e o antibiótico tetraciclina (Tc) foi adicionado em uma concentração final de 15 mg/L para seleção positiva da bactéria *P. fluorescens* HK44.

IV.1.1.3 Solução estoque de tetraciclina

No preparo da solução estoque de tetraciclina (Tc), 15 mg do antibiótico adquirido em farmácia foram pesados e dissolvidos em 0,5 mL de etanol, adicionando também 0,5 mL de água destilada estéril. A solução foi armazenada em um frasco escuro a fim de se evitar a decomposição do antibiótico, sendo a mesma mantida em congelador (-5º C). Em cada 1L de meio adicionou-se 1 mL desta solução estoque (C_f = 15 mg/L) (MILLER, 1992).

IV.1.1.4 Tampão fosfato de potássio

Para obter o tampão misto de fosfato de potássio K_2HPO_4 – KH_2PO_4 0,1M com pH definido, preparou-se a solução 1M de cada fosfato e de acordo com a tabela IV.3 os devidos volumes foram misturados (VALDMAN, 2004).

Tabela IV.3 Relação entre volume de fosfato monobásico e dibásico de potássio para a obtenção de pH definido

pH	Solução 1M K_2HPO_4 (mL)	Solução 1M KH_2PO_4 (mL)
6,6	38,1	61,9
6,8	49,7	50,3
7,2	71,7	28,3
7,4	80,2	19,8

IV.1.1.5 Meio de detecção para ensaios de bioluminescência

De acordo com Valdman (2004) foi utilizado nos experimentos de bioluminescência, um meio de detecção para o naftaleno, composto apenas de 0,1 g YE/L (0,01%). O pH do meio foi ajustado para 7,0 com uma solução tampão de 0,1M K_2HPO_4 – KH_2PO_4 e 15 mg/L de tetraciclina (Tc) foram adicionados ao meio para manter a seleção positiva do transposon *lux* durante os experimentos de bioluminescência.

IV.1.1.6 Solução estoque de naftaleno

Como o naftaleno não possui alta solubilidade em água, uma solução estoque em etanol foi preparada para garantir a concentração desejada deste HPA nos experimentos de bioluminescência.

Para obtenção da solução estoque de naftaleno, uma massa conhecida deste hidrocarboneto (Naftaleno P.S. – VETEC) foi pesada e dissolvida em 1,0 mL de etanol para obtenção das concentrações de naftaleno desejadas, que variaram de 0,5 a 21 mg/mL. Essas soluções foram mantidas no congelador (-5°C), em um recipiente bem fechado. A concentração final de trabalho exigida em cada teste só foi atingida após diluição de 1000 vezes (adicionou-se 1 mL da solução estoque para cada 1000 mL de meio de detecção), a fim de se eliminar qualquer influência que o etanol pudesse vir a ter nos experimentos de bioluminescência.

IV.1.2 Crescimento e Manutenção de *P. fluorescens* HK44

O microrganismo bioluminescente repórter, *Pseudomonas fluorescens* HK44, foi gentilmente cedido pela prof Erika Valdman (Instituto de Química, Universidade de São Paulo), sendo este adquirido originalmente junto ao banco de cepas DMSZ, Alemanha, com o registro de DMSZ 6700. Os protocolos de crescimento celular e da obtenção da correlação entre absorbância e concentração celular se encontram descritos a seguir.

IV.1.2.1 Determinação do Peso Seco

Após crescimento celular em meio YEPG-Tc *overnight* (20h) a 28ºC em shaker a 150 rpm, as células de *Pseudomonas fluorescens* HK44 em estado estacionário foram centrifugadas por 25 minutos a 3500 rpm e o precipitado obtido foi ressuspendido em um mínimo de água destilada (cerca de 5 mL). As células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e lavadas com água destilada novamente. A biomassa foi ressuspendida em 10 mL de água destilada para se obter uma suspensão concentrada de células.

Três mililitros dessa suspensão celular foram filtrados a vácuo em uma membrana Millipore (0,5 µm), então a biomassa foi pesada em uma balança que elimina toda a umidade da amostra (Balança AG 200, IV2000 – Analisador de Umidade por Infra-vermelho, GEHAKA). Calculou-se a concentração (g/L) da suspensão original, dividindo a massa celular (g) obtida, pelo volume conhecido da alíquota (0,003 L). Este procedimento foi feito em duplicata.

Desta mesma suspensão utilizada para o cálculo da concentração celular, utilizando mais três mililitros, várias diluições foram feitas para obter cerca de sete leituras de absorbância a 546nm entre 0,1 e 0,5, correspondendo cada leitura à sua respectiva concentração celular.

IV.1.2.2 Curva de crescimento

Para construção da curva de crescimento celular, o cultivo do pré-inóculo, com células obtidas de uma alçada do estoque de *P. fluorescens* HK44 em meio sólido, foi feito em um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPG-Tc *overnight* (20h) a 28ºC em shaker a 150 rpm.

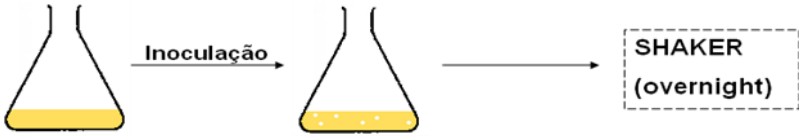


Figura IV.1 Esquema do cultivo de *P. fluorescens* HK44

Após o crescimento celular, fez-se a leitura da densidade ótica no comprimento de onda de 546 nm (DO_{546}) em espectrofotômetro UV-visível (Q798DRM - QUIMIS). Calculou-se então a quantidade (mL) necessária do pré-

inóculo para se obter uma DO_{546} inicial de aproximadamente 0,2 em 200 mL de meio YEPG-Tc.

Para iniciar o acompanhamento do perfil de crescimento da cepa HK44, adicionou-se a quantidade calculada anteriormente a um Erlenmeyer de 1L contendo 200 mL de meio YEPG-Tc, sendo retirada a primeira alíquota para leitura da DO_{546} no tempo inicial (0 h). O cultivo foi mantido então a 28ºC em shaker a 150 rpm e o crescimento celular foi monitorado a intervalos de 1 hora pela absorbância medida a 546 nm até ser alcançado um valor máximo estável, sendo atingida a fase estacionária do crescimento microbiano.

IV.1.2.3 Manutenção e armazenamento das células

As células foram mantidas em placas de petri com meio sólido YEPG-Tc, descrito no item IV.1.1.2, armazenadas a 4ºC (geladeira). Foram realizados repiques mensais para manutenção da viabilidade celular.

Como método de estocagem por períodos maiores, as células foram mantidas em solução de glicerol, o procedimento adaptado de Helms (1990). Inoculou-se um tudo de ensaio contendo 2 mL de meio seletivo YEPG-Tc com uma colônia isolada recém crescida. A cultura foi incubada por 20h (*overnight)* a 28º 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% autoclavado. Misturou-se vigorosamente para evitar a formação de cristais de gelo, o que poderia diminuir a viabilidade celular. Os tubos foram então armazenados no congelador.

IV.1.3 Pré-ativação com naftaleno

Após cultivo *overnight* (20h) a 28º C em shaker a 1500 rpm, tendo sido atingido o estado estacionário, foi adicionado ao meio já esgotado o naftaleno em uma concentração final de 0,5 mg/L, com o objetivo de ativar as enzimas envolvidas na reação de bioluminescência. Para se atingir a diluição recomendada (1000 vezes) evitando a influência do etanol da solução estoque de naftaleno, a um cultivo de 50mL são adicionados 50 µL de naftaleno (0,5 mg/mL). Essa pré-ativação foi realizada por 24 h, mantida novamente a 28ºC em shaker a 150 rpm, e só então as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min (Centrífuga para tubos, QUIMIS) e submetidas ao protocolo de obtenção da suspensão celular para os testes de bioluminescência.

IV.1.4 Avaliação do crescimento do microrganismo em condições específicas

Testes preliminares foram realizados com o intuito de avaliar o crescimento do microrganismo *Pseudomonas fluorescens* HK44, através do aumento da absorbância da cultura com o tempo de cultivo, em meio YEP com a adição de extratos aquosos provenientes de solos contaminados por óleo cru em diferentes concentrações. A avaliação do crescimento visava verificar se o microrganismo, ativo em meios contendo glicose como substrato, seria capaz de metabolizar HPA, em especial naftaleno, em amostras complexas, contendo óleo cru.

Para tanto foram utilizados tubos de ensaio de 30 mL, cada um contendo uma distinta composição de meio para o crescimento: 19,0mL de meio YEP-Tc (sem glicose) com a adição de 1,0mL da água de lixiviação de solos contaminados com óleo cru a 0%, 0,5%, 2,5% e 5% (p/p), provenientes de um sistema de contaminação

de bancada, descrito a seguir. Em um recipiente de vidro, à 5,0 g de solo foram adicionados óleo cru (p/p) na proporção de 0%, 0,5%, 2,5% e 5%. Após 48 h, foram adicionados 50 mL de água destilada a cada recipiente. Esta interação se deu por 24h, logo após, foi recolhido o sobrenadante de cada amostra. Este protocolo de lixiviação experimental se encontra mais detalhado no item IV.2.3.1.

Foram avaliadas ainda condições onde o óleo cru foi adicionado direto na água de lixiviação do solo sem contaminação prévia, nas concentrações de 0,25%, 1,25% e 2,5% (p/p), uma vez que a metodologia de extração aplicada poderia não remover adequadamente os HPAs contidos no solo contaminado. O esquema do protocolo destes experimentos é apresentado na figura IV.2.

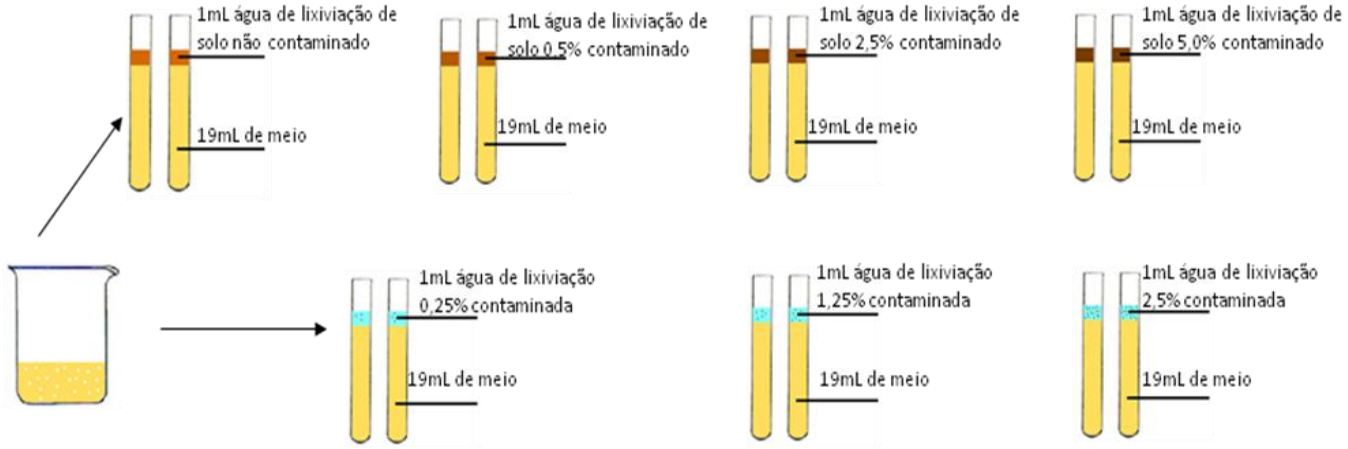


Figura IV.2: Esquema da composição de cada condição testada. Acima as quatro condições de adição de água de lixiviação do solo contaminado com óleo cru a 0%, 0,5%, 2,5% e 5% (p/p). Abaixo as três condições de adição de óleo cru nas concentrações de 0,25%, 1,25% e 2,5% (%p/p) direto na água de lixiviação do solo sem contaminação.

Todos os tubos de ensaio foram inoculados com o microrganismo *Pseudomonas fluorescens* HK44 na mesma concentração inicial.

Para iniciar o acompanhamento do crescimento, retirou-se a primeira alíquota para a leitura da DO_{546} no início do experimento (0 h). Os cultivos foram mantidos a 28 ºC em shaker a 150 rpm. Monitorou-se o crescimento celular depois de 3 horas e 6 horas pela absorbância medida a 546 nm. Os tempos de 3 horas e 6 horas foram selecionados, por serem os tempos onde se atinge o meio e o fim, respectivamente da fase exponencial do crescimento da cepa HK44.

IV.2 ENSAIOS BIOLUMINESCENTES

IV.2.1 – Obtenção da suspensão celular para os experimentos de bioluminescência

Os experimentos de bioluminescência foram sempre realizados com células recém crescidas. A cepa HK 44 foi incubada em 50 mL de meio YEPG-Tc, *overnight* (20h), a 28ºC em shaker a 150 rpm. Após o procedimento de crescimento celular em meio YEPG-Tc, leu-se a absorbância do cultivo em um espectrofotômetro (DO_{546}), utilizando-se a curva de peso seco, determinada no item IV.1.2.1, para relacioná-la a sua respectiva concentração celular. As células foram então centrifugadas a 5000 rpm por 15 min e ressuspendidas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), no volume necessário para se atingir a concentração celular desejada (0,05 a 0,6 g/L). Essa suspensão foi mantida em gelo até o início dos testes de bioluminescência (Figura IV.3).

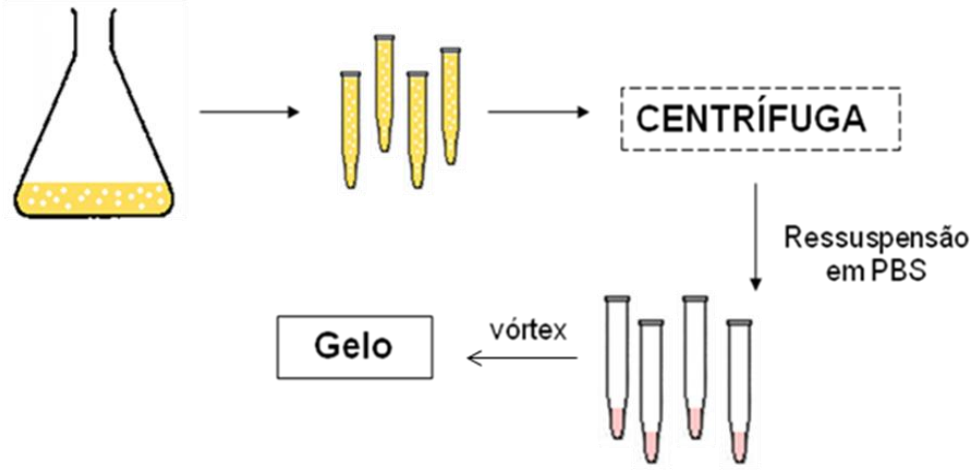


Figura IV.3 Esquema da obtenção da suspensão celular para os experimentos de bioluminescência

IV.2.2 – Medida e registro da luz emitida, Luminômetro

Para a quantificação da luz emitida nos experimentos, utilizou-se um luminômetro, modelo *Luminoskan Ascent 2.4* - Labsystens, (Figura IV.4) gentilmente cedido pelo professor Paulo Barrocas (ENSP/Fiocruz). A detecção da luz em todos os ensaios bioluminescentes foi medida em unidades relativas de luz (URL).

Figura IV.4 Instrumento para leitura de luminescência emitida, Luminômetro

Seu princípio básico de funcionamento está esquematizado abaixo na figura IV.5. A bioluminescência é captada de cada poço da placa a ser lido, sendo refletida pela lente, passando pelo filtro de emissão até atingir o tubo fotomultiplicador. O caminho da luz do poço medido até o espelho refletor deve ser protegido por um componente denominado *light shield*, para evitar a captação de luminescência de poços vizinhos, o denominado *cross-talking*.

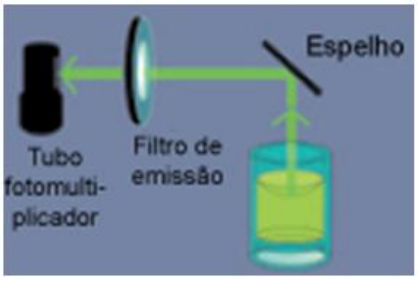


Figura IV.5 Esquema de fotodetecção do luminômetro

Nos testes de bioluminescência realizados no presente estudo foram utilizadas placas brancas opacas de 96 poços, sendo possível a realização de desenhos experimentais variando diversos parâmetros em cada teste. A emissão luminescente foi monitorada até ser atingido o estado estacionário, com os testes durando em torno de 120 minutos.

Foi escolhida a opção de monitoramento cinético, no qual diversas medidas são tomadas de cada poço estabelecido em um definido intervalo de tempo, seguindo um padrão pré-estabelecido pelo operador, gerando ao fim do teste, um perfil cinético de emissão de cada condição avaliada, ou seja, de cada poço e consequentemente de cada amostra avaliada.

Nos testes de bioluminescência, 30 μL da suspensão celular obtida, com densidade celular conhecida eram adicionadas a cada poço da placa teste (a ser introduzida no luminômetro para realização da leitura da bioluminescência

produzida), de acordo com o desenho experimental previamente estabelecido (ordem de leitura de cada amostra). A seguir, um volume de 270 μL da solução amostra a ser exposta ao biossensor foi adicionado, completando um volume final de 300 μL por poço. Com isso, a suspensão celular sofria diluição de 10 vezes, sendo usada, portanto, no início a adição de 30 μL da suspensão celular em concentração superior visando atingir a concentração celular de trabalho desejada.

Os resultados dos experimentos bioluminescentes são apresentados nesta dissertação tanto através do perfil cinético obtido no intervalo de tempo monitorado, como através da integral da curva gerada, como o somatório de luz emitida (URL) em cada condição testada.

IV.2.3 – Metodologias de extração do solo contaminado com óleo

IV.2.3.1 – Sistema experimental de lixiviação

Visando simular um processo de lixiviação, 5,0g de solo sergipano foram contaminados com óleo cru, ambos cedidos pelo CENPES/Petrobras, CETEM/MCT, nas concentrações de 0%, 0,5%, 2,5% e 5,0% (p/p). As amostras foram então mantidas no laboratório por dois dias a temperatura ambiente e abrigados da luz (Figura IV.6).

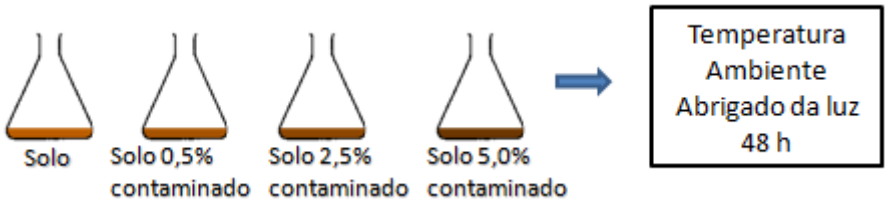


Figura IV.6 Esquema da contaminação do solo com óleo cru

Posteriormente, a cada recipiente contendo o solo contaminado, foi adicionada água destilada numa proporção 1:10 (50 mL). O sistema foi mantido a temperatura ambiente por 24h (Figura IV.7).

Nesta extração estática, o sobrenadante foi utilizado como água de lixiviação das distintas concentrações de contaminação.

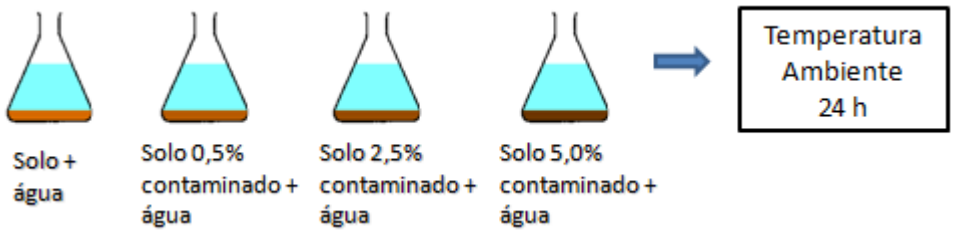


Figura IV.7 Esquema do sistema de lixiviação

IV.2.3.2 - Técnica de Extração Não Exaustiva (NEET)

No presente estudo, foi empregada a metodologia de extração não exaustiva (NEET), sendo a mesma adaptada segundo os métodos descritos por Paton e colaboradores (2009), sendo avaliada a eficiência de extração com dois solventes: água destilada e beta propil ciclodextrina (β–HPCD). Foram colocados, em tubos de vidro de 35 ml, 1,25 g de solo contaminado a 0,5%, 2,5% ou 5% (m/m), além do solo controle sem contaminação, com 25 ml de H_2O, ou 25 ml de solução 50 mM de β–HPCD (Acros Organic, 97% de pureza). Os tubos foram vedados e agitados horizontalmente a 150 rpm, 28ºC. Após 20 h, foram centrifugados por 15 minutos a 3200 rpm, para separação do solo do solvente H_2O ou β–HPCD. O sobrenadante foi exposto então aos testes com o biossensor microbiano.

IV.2.3.3 - Otimização NEET β-HPCD

Visando o estabelecimento das melhores condições de extração específicas para o solo e óleo utilizados nesta dissertação, no sentido de otimizar o desempenho deste biossensor bioluminescente aplicado à detecção de naftaleno, foi realizado um desenho experimental, verificando-se a influência dos principais parâmetros da metodologia de extração não exaustiva (NEET) com a beta propil ciclodextrina: concentração do solvente β-HPCD e tempo de extração. Utilizou-se na extração (NEET) a combinação de concentrações de β-HPCD de 30mM, 60mM e 90mM e tempos de 12h, 18h e 24h de extração. Essas condições foram testadas em solo contaminado com óleo na proporção de 5,0% p/p.

A metodologia de extração com β-HPCD foi adaptada segundo os métodos descritos por Paton e colaboradores (2009), como apresentado no Diagrama 1.

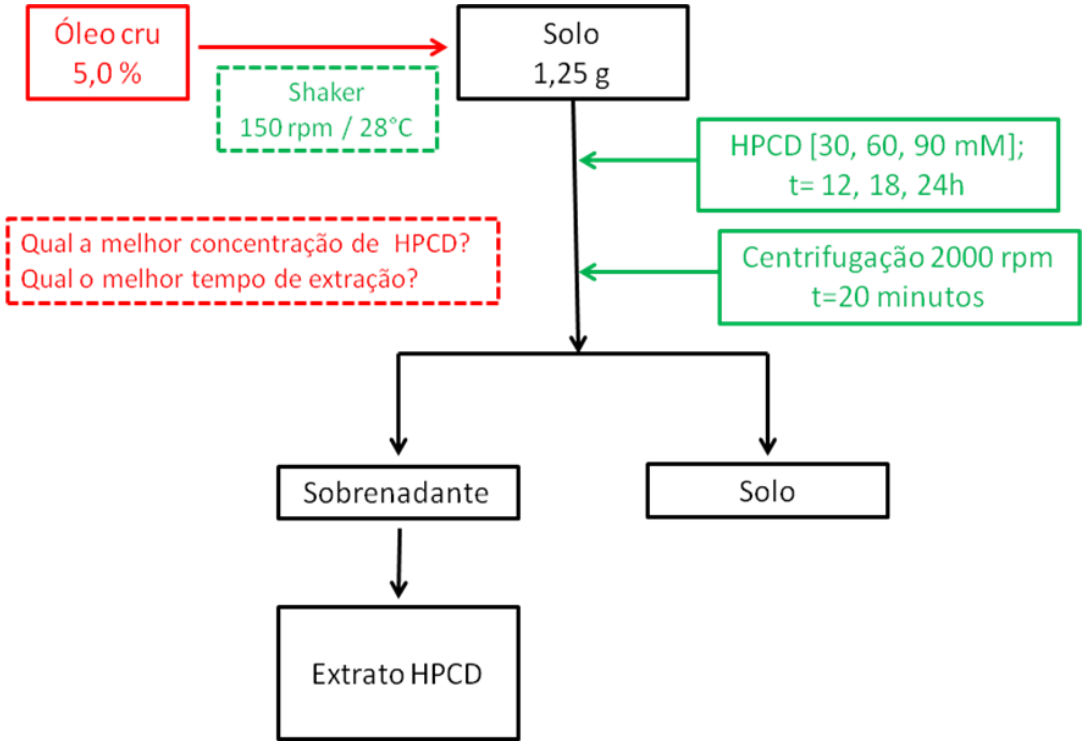


Diagrama 1 Fluxograma das etapas de extração com β-HPCD (Adaptado de Telhado, 2009)

IV.2.4 - Comparação metodologia extração

Ensaios bioluminescentes foram realizados a fim de se determinar a melhor metodologia de extração do HPA naftaleno dos solos contaminados, etapa prévia necessária a exposição ao biossensor. Procurou se determinar a metodologia que apresentasse ao sensor microbiano a maior fração biodisponível deste poluente orgânico hidrofóbico.

Primeiramente foi avaliada a resposta bioluminescente da cepa HK44 nas concentrações celulares de 0,05 g/L e 0,2 g/L a extratos obtidos pelo método de lixiviação estática e extração não exaustiva (NEET), utilizando como solvente somente água destilada. Ambas as metodologias foram aplicadas a amostras de solo 0,5%, 2,5% e 5,0% contaminado com óleo cru (p/p), assim como ao controle sem contaminação. Todas as condições foram avaliadas em duplicata.

Os extratos obtidos por lixiviação estática ou extração não exaustiva foram expostos ao biossensor, 270 μL de cada condição foram adicionados a placa de leitura contendo previamente 30 μL da suspensão celular 10 vezes concentrada em cada poço monitorado. A resposta luminescente foi avaliada até ser atingido o estado estacionário de emissão de luz.

Um esquema da disposição experimental das amostras na placa de leitura está apresentado a seguir (Figura IV.8).

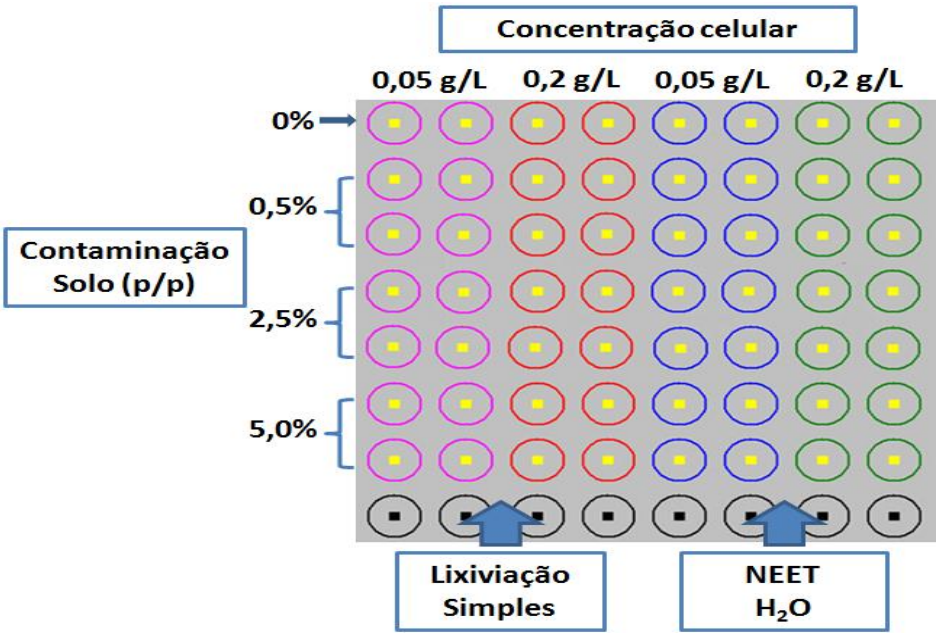


Figura IV.8 Esquema do teste comparativo entre as metodologias de extração lixiviação simples e NEET. Somente os poços em amarelo foram lidos.

Posteriormente foi testada a resposta celular a extratos de solos contaminados com óleo cru a 0%, 0,5%, 2,5%, 3,5% e 5,0% obtidos pela metodologia de extração não exaustiva (NEET) utilizando água destilada ou solução de beta ciclodextrina (50 mM) como solvente. Cada condição foi avaliada em triplicata, seguindo o procolo descrito acima. Foram testadas as concentrações celulares de 0,05g/L e de 0,20g/L. A disposição das amostras na placa de leitura estão esquematizadas na figura IV.9.

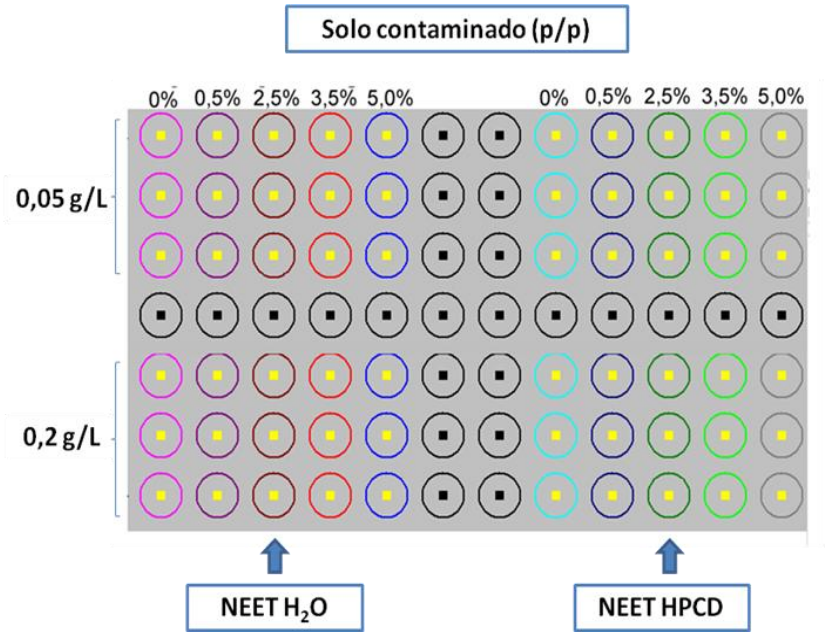


Figura IV.9 Esquema das amostras no teste de avaliação da eficiência de extração NEET utilizando como solvente H_2O ou HPCD. Somente os poços em amarelo foram lidos

IV.2.5 Avaliação das condições ótimas de bioluminescência

De acordo com Sticher e colaboradores (1997), o sinal de emissão da luz medida por biossensores de células íntegras é dependente não só da concentração presente do substrato indutor, mas também da estabilidade da enzima luciferase em uma cepa particular, do seu estado fisiológico assim como da presença de outras substâncias estimulantes ou inibitórias na amostra a ser medida.

Desta maneira, as condições ótimas de trabalho para o microrganismo selecionado foram avaliadas, dentre elas a pré-ativação celular e distintas concentrações celulares. Parâmetros como composição do meio de detecção e os aceptores finais de elétrons foram mantidos como proposto por Valdman (2004). Também foi avaliada a influência do tempo de estocagem do cultivo do microrganismo *P. fluorescens* HK44 em meio sólido, assim como do estoque de naftaleno na resposta luminescente da cepa a cada amostra padrão de naftaleno.

IV.2.5.1 Diferentes concentrações celulares e efeito da pré-ativação

A influência da densidade celular combinado ao efeito da pré-ativação (descrito no item IV.1.3) na resposta bioluminescente a 0,5 mg naftaleno/L, foi avaliada nas concentrações celulares de 0,05 a 0,60 g/L obtidas de um cultivo na fase estacionária. Os testes foram conduzidos até que o estado estacionário de emissão de luz fosse observado.

Em um primeiro teste foram avaliadas as concentrações celulares de 0,2, 0,4 e 0,6 g/L, assim como o efeito da pré-ativação. Cada condição foi avaliada em triplicata, e ensaios sem a exposição ao naftaleno (branco) também foram feitos, a fim de se obter a resposta luminescente inespecífica ao analito naftaleno. Um esquema do desenho experimental da disposição de cada amostra na placa do equipamento luminômetro é apresentado na figura IV.10.

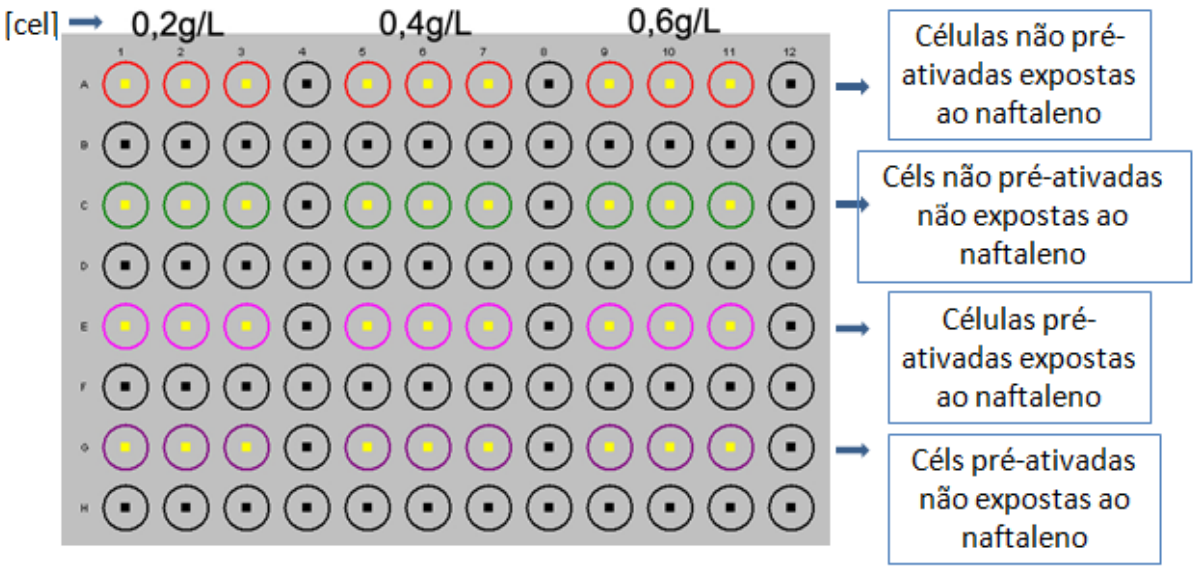


Figura IV.10 Disposição das amostras na placa utilizada no luminômetro no teste avaliando a concentração celular e o efeito da pré-ativação. Somente os poços em amarelo foram lidos.

Em um segundo experimento densidades celulares ainda menores foram avaliadas, como 0,05, 0,10, 0,20 e 0,40 g/L a fim de se obter a melhor resposta bioluminescente. A melhor concentração celular foi então selecionada para ser empregada nos próximos experimentos.

IV.2.5.2 Idade do cultivo e estoque de naftaleno

Como descrito no item IV.2.1, a obtenção da suspensão celular para os experimentos de bioluminescência passa necessariamente por uma etapa de crescimento em meio líquido YEPG-Tc da massa celular retirada do cultivo sólido da cepa de trabalho, a fim de se aumentar o metabolismo celular.

A fim de se avaliar a influência do tempo de estocagem do cultivo em meio sólido, mantido a 4º C, na resposta bioluminescente do microrganismo *P. fluorescens* HK44 a 0,5 mg/L de naftaleno, foi realizado um experimento utilizando células recém plaqueadas e células obtidas de um cultivo em meio sólido mantidas na geladeira por 30 dias. Neste teste foram avaliadas as respostas luminescentes das células recém crescidas assim como do cultivo antigo nas concentrações celulares de 0,05g/L, 0,1 g/L, 0,2 g/L e 0,4 g/L.

Também foi avaliado o efeito do estoque da solução de naftaleno a ser usada como amostra, para averiguar se o armazenamento proposto estaria mantendo a concentração de naftaleno desejada, verificando a influência deste parâmetro na variação da intensidade de resposta luminescente da cepa HK44. Assim o estoque de trabalho (com 50 dias), e um estoque produzido no mesmo dia do teste foram expostos ao biossensor microbiano, de acordo com o desenho experimental apresentado abaixo (Figura IV.11):

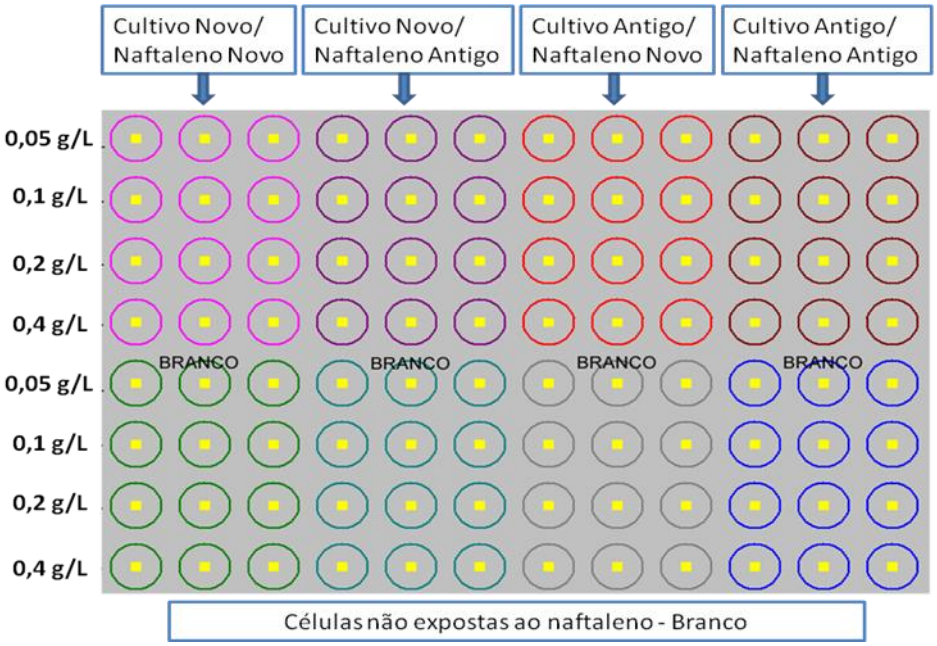


Figura IV.11 Disposição das amostras na placa utilizada no luminômetro no teste avaliando a idade do cultivo e o estoque de naftaleno

IV.2.6 – Curva de calibração

Ensaios de detecção da bioluminescência para diferentes faixas de concentração de naftaleno em soluções aquosas, assim como com amostras de lixivias de solos contaminados diretamente com o analito naftaleno, 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 naftaleno presente nas amostras.

IV.2.6.1 - Curva de calibração de naftaleno em soluções aquosas

Após obter a suspensão celular concentrada descrita anteriormente (item IV.2.1) a mesma foi mantida em gelo a fim de reduzir a atividade microbiana. Frascos contendo 10 mL de meio de detecção foram inoculados com uma quantidade conhecida da suspensão celular, resultando na concentração celular ótima pré-definida. A seguir, 10 μL de cada solução estoque de naftaleno com distintas concentrações (mg/mL) foram adicionadas aos frascos para alcançar a concentração final (1000 vezes diluída) entre 0 e 21,0 mg/L. Então, 300 μL de volume de cada condição citada, foi adicionado à poços separadamente na placa de leitura para registro da resposta bioluminescente no equipamento luminômetro até ser atingido o estado estacionário de emissão de luz.

A fim de se minimizar variações decorrentes do erro experimental intrínsecas ao operador do experimento, pequenas alterações no protocolo anterior foram realizadas. Para tanto, uma única solução estoque de naftaleno foi feita, realizando a partir desta as diluições para se obter as concentrações de naftaleno a serem testadas com intuito de construir a curva de calibração.

Então, 270 μL de cada solução obtida contendo naftaleno em conhecidas concentrações foram adicionadas à placa de leitura contendo previamente 30μL da suspensão celular (10 vezes concentrada). Sendo atingido um volume final de 300μL por poço, com a densidade celular previamente estabelecida e concentrações de naftaleno variando de 0 a 21 mg/L. A seguir a emissão da bioluminescência foi monitorada até ser atingido o estado estacionário.

IV.2.6.2 Curva de calibração utilizando solo contaminado com naftaleno

No presente estudo trabalhou-se com amostras complexas, como o solo. Portanto, foi planejada a contaminação de amostras do solo sergipano provenientes do CENPES/Petrobras, CETEM/MCT, diretamente com naftaleno em concentrações conhecidas, passando a seguir por etapa de extração não exaustiva com β–HPCD para só então expor os extratos ao biossensor microbiano, a fim de se obter uma curva de calibração melhor comparável ao sistema de atenuação natural a ser monitorado e ao procedimento a ser aplicado na monitoração.

A contaminação do solo com naftaleno seguiu a metodologia adaptada de Reid e colaboradores (1998). Uma massa conhecida de naftaleno foi dissolvida em 1 mL de etanol. As diferentes soluções contendo naftaleno foram então adicionadas a 10 g do solo sergipano, obtendo-se contaminações variando de 0 a 800 mg de naftaleno/ kg de solo. O sistema foi mantido abrigado da luz, a temperatura ambiente, por 48h sendo a seguir submetido a metodologia de extração não exaustiva com β–HPCD (50 mM) como proposto no item IV.2.3.2.

Os extratos obtidos foram então expostos ao biossensor, 270 μL de cada condição foram adicionados a cada poço da placa de leitura contendo previamente 30 μL da suspensão celular 10 vezes concentrada. Todas as condições foram feitas em triplicata, e a bioluminescência foi avaliada até ser atingido o estado estacionário de emissão de luz.

IV.3 SISTEMA EXPERIMENTAL DE ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA

O sistema experimental de atenuação natural monitorada montado utilizou solo proveniente do Estado de Sergipe, oriundos de um campo de exploração de petróleo em terra. O material, coletado por equipe especializada visando a garantia de representatividade da amostra, foi mantido a temperatura ambiente por quatro semanas, no Centro de Tecnologia Mineral (CETEM).

O solo foi então desagregado em um britador de mandíbulas e classificado em uma peneira de 5 mm para retirada de folhas, raízes e gravitos. O material acima dessa granulometria retido na peneira foi desagregado no moinho de rolos, e mais uma vez peneirado. Somente o material abaixo de 5 mm foi recolhido ao inicial. Todo material, após secagem e peneiramento, foi homogeneizado e quarteado.

IV.3.1 Caracterização do solo empregado

O solo utilizado já vinha sendo empregado no desenvolvimento de outros estudos envolvendo a aplicação do processo de biorremediação (biopilhas e biorreatores) no CETEM. Desta maneira, algumas características físicas e químicas já haviam sido determinadas, estando apresentadas na tabela IV.4.

Tabela IV.4 Caracterização do solo sergipano

Características	Valores
Areia (%)	75
Silte (%)	14
Argila (%)	11
Densidade da Partícula (g/mL)	2,2
Densidade do solo (g/mL)	1,3
Porosidade (%)	43
pH	6,8
Capacidade de Retenção de Água (%)	34
Matéria orgânica (%)	1,7

(Fonte: Rizzo, 2008 apud Telhado 2009).

IV.3.2 Sistema experimental para simulação do processo de Atenuação Natural

O biossensor microbiano luminescente *P. fluorescens* HK44, foi aplicado na detecção de naftaleno em solo impactado com óleo cru, em amostras oriundas do sistema experimental para simulação do processo de atenuação natural montado no CETEM.

Para montagem do sistema experimental, foram utilizadas 7 caixas de polietileno de alta densidade, com largura de 36 cm, comprimento de 53 cm e altura de 19 cm (aproximadamente 36,25 L de volume útil). As caixas foram furadas no fundo com um espaçamento de 3 cm, e mantidas sobre uma caixa coletora, representado na figura IV.12 (TELHADO, 2009).

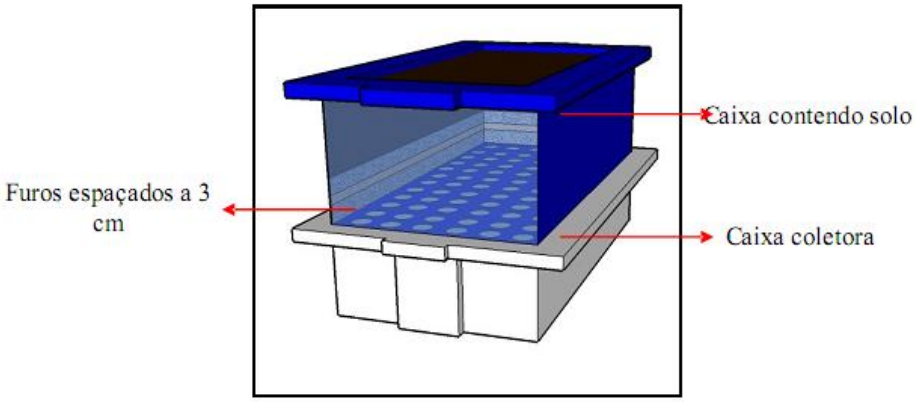


Figura IV.12 Representação das caixas utilizadas para o experimento de atenuação natural. (Fonte: Telhado, 2009).

As caixas foram preenchidas com uma camada de 3 cm de brita, correspondendo a 5,75 L, uma camada de areia de 2 cm (3,83 L) e uma 1 camada de brita (5,75 L) de 3 cm. Preencheu-se o volume restante aproximadamente 15,33 L, com solo contaminado a 0,5%, 2,5% e 5% (m/m) em duplicata, ou não contaminado (controle), como mostra a figura IV.13 (TELHADO, 2009).

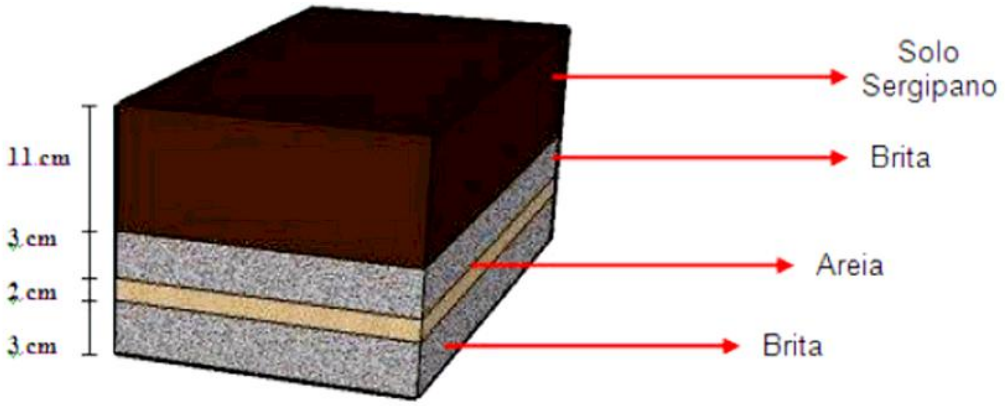


Figura IV.13 As caixas foram preenchidas com camadas de brita, areia e solo (Fonte: Telhado, 2009).

IV.3.3 Disposição e coleta das amostras

O sistema foi colocado em um espaço aberto nas dependências da usina piloto do CETEM, onde foi submetido a intempéries. Montado no início de Junho de 2008, o sistema experimental de atenuação natural foi monitorado por 15 meses.

Amostras representativas do solo foram coletadas conforme cronograma pré - estabelecido na Tabela IV.5 e armazenadas em congelador a -5ºC para posterior análise.

Tabela IV.5 Cronograma das coletas

Amostra	Mês da coleta
T = 5 meses	Novembro/2008
T = 6 meses	Dezembro/2008
T = 8 meses	Fevereiro/2009
T = 10 meses	Abril/2009
T = 12 meses	Junho/2009
T = 15 meses	Setembro/2009

IV.3.4 Monitoramento da degradação do naftaleno em amostras de solo contaminados com óleo cru

IV.3.4.1 Amostras do Sistema de Atenuação Natural Monitorada

Utilizando as condições ótimas determinadas para o biossensor proposto, foi analisado o teor de naftaleno existente em amostras de solos do sistema de atenuação natural, contaminados com óleo cru (p/p) a 0%, 0,5%, 2,5% e 5,0%, cedidas pelo CENPES/Petrobras, CETEM/MCT.

As amostras expostas ao biossensor *Pseudomonas fluorescens* HK44 para o monitoramento do decaimento do HPA naftaleno são referentes aos tempos de cinco, seis, oito, dez, doze e quinze meses após a contaminação por óleo cru.

O instrumento sensor microbiano foi aplicado na detecção do naftaleno de maneira qualitativa, demonstrando a diferença do perfil de emissão luminescente de amostras com distintas concentrações de óleo, assim como uma ferramenta quantitativa. Em cada experimento, as concentrações de naftaleno foram obtidas por meio de correlação (regressão linear simples) com uma curva de calibração feita no mesmo dia e com a mesma cultura celular.

IV.3.4.2 Sistema de contaminação em escala de bancada

Visando à verificação do decaimento da concentração do analito naftaleno nos primeiros meses após contaminação do solo com óleo cru, foi montado um sistema em menor escala no qual se contaminaram 10 gramas de solo sergipano obtidos do CETEM/MCT, nas proporções de 0,5%, 2,5%, 3,5% e 5,0% (p/p). Foi também mantido um controle (0%), sem contaminação. O sistema foi mantido em local abrigado, a temperatura ambiente.

Foram acompanhados os perfis de emissão luminescente do biossensor *P. fluorescens* frente a extratos deste sistema de monitoramento referentes aos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias de contaminação.

IV.4 ÓLEO CRU

No desenvolvimento experimental do presente estudo, foi utilizado o óleo cru proveniente da mesma região de origem do solo, de forma a simular uma contaminação que poderia acidentalmente ocorrer durante a exploração dos poços da área, ocasionando vazamento involuntário de petróleo. Os teores de contaminação adotados foram de 0,5, 2,5 e 5% (m/m), conforme estabelecido pelos pesquisadores envolvidos no projeto Solo Integral. As frações de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos do óleo cru, determinado por Telhado (2009) encontram-se na Tabela IV.6.

Tabela IV.6 Percentual de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos – SARA (%) no óleo cru

SARA (%)	
Saturados	55,00
Aromáticos	20,46
Resinas + Asfaltenos	24,52

(Fonte: Telhado, 2009)

CAPÍTULO V RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 *Pseudomonas fluorescens* HK44

V.1.1 Determinação da curva de crescimento

O perfil de crescimento do microrganismo *P. fluorescens* HK44 é apresentado abaixo, na figura V.1. A partir da curva de crescimento obtida, pode ser observado que as células entram em fase exponencial após aproximadamente duas horas, enquanto que para atingir a fase estacionária foram necessárias em torno de oito horas.

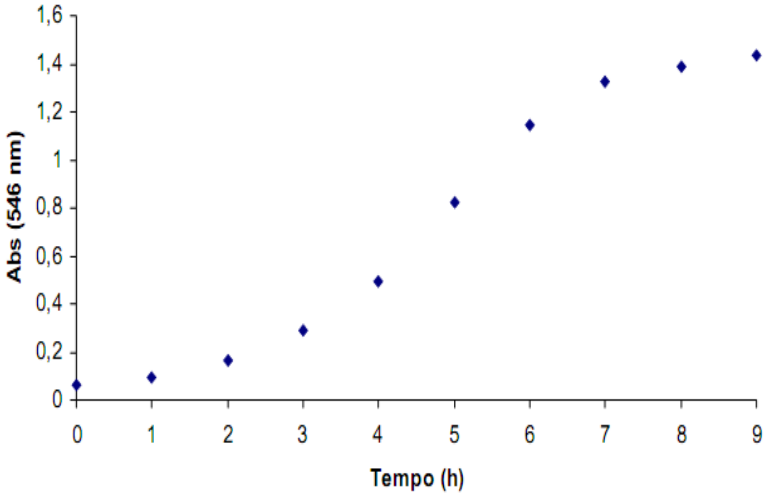


Figura V.1 Curva de crescimento de *P. fluorescens* HK44

Os ensaios para determinação da curva de crescimento foram realizados em triplicata com medição de pontos continuados até alcançar o estado estacionário. Esta curva foi considerada para a obtenção da densidade celular e determinação do estado fisiológico das células utilizadas nos experimentos posteriores de bioluminescência.

V.1.2 Correlação entre Absorbância e Peso Seco

A curva de Peso Seco obtida, a partir da qual é possível relacionar a densidade ótica com a concentração celular é apresentada na figura V.2.

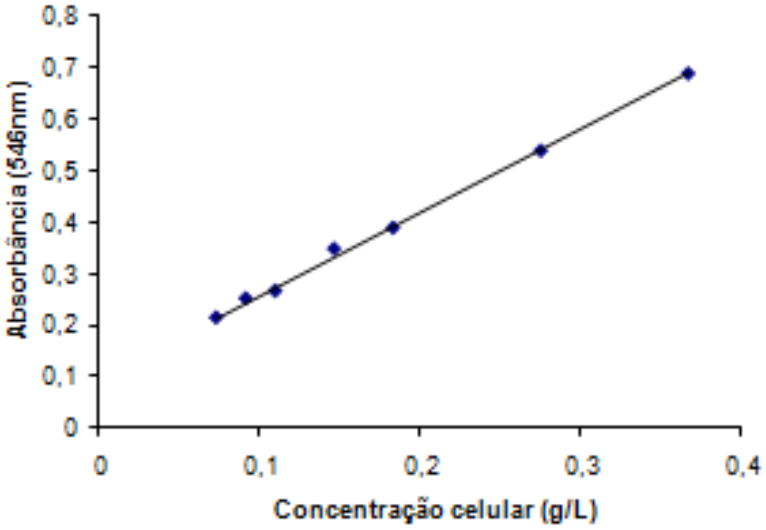


Figura V.2 Correlação entre absorbância e peso seco

Pelos dados obtidos, foi possível gerar a seguinte equação da reta correlacionando a leitura da absorbância a 546nm com a concentração (g/L) da suspensão celular:

Concentração celular [g/L] = $(Abs_{546nm} – 0,0977)/ 1,608$	$R^2 = 0,9981$

A equação descrita acima foi utilizada em todos os experimentos para determinação da concentração celular nos testes de bioluminescência para detecção de naftaleno.

V.2 TESTES PRELIMINARES DE CRESCIMENTO MICROBIANO

A figura V.3 apresenta o resultado obtido a partir de testes preliminares realizados com o intuito de avaliar o crescimento do microrganismo *P. fluorescens* HK44 frente à água de lixiviação de solos contaminados com óleo cru em diferentes concentrações.

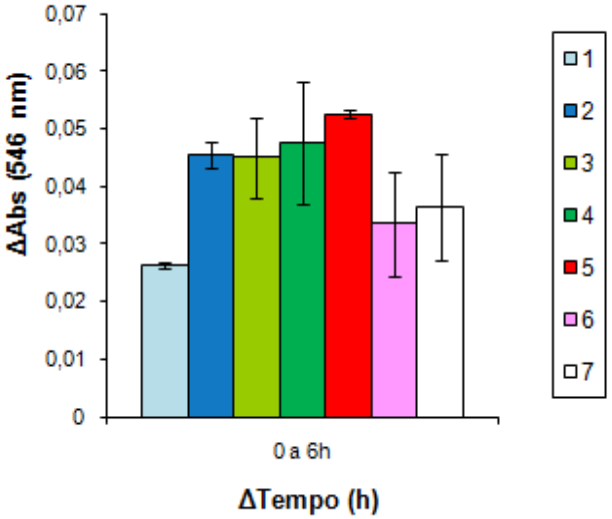


Figura V.3 Avaliação do crescimento de *P. fluorescens* HK44 em diferentes condições. (1) H_2O Lixiviação solo sem contaminação; (2) H_2O Lixiviação solo contaminado 0,5%; (3) H_2O Lixiviação solo contaminado 2,5%; (4) H_2O Lixiviação solo contaminado 5,0%. (5)H_2O Lixiviação 0,25% contaminada; (6)H_2O Lixiviação 1,25% contaminada; (7) H_2O Lixiviação 2,5% contaminada.

O crescimento microbiano foi avaliado a partir do aumento de absorbância do cultivo, indicando aumento de densidade celular, nas seis horas referentes à fase exponencial do crescimento da cepa HK44. O teste buscava responder se a cepa, ativa em meios contendo glicose como substrato, seria capaz de metabolizar HPA, em especial naftaleno, em amostras complexas.

Em todas as condições apresentadas o inóculo do microrganismo foi realizado em 19 mL de meio YEP-Tc (sem glicose) com a adição de 1 mL de água

de lixiviação de solo contaminados em distintas concentrações de óleo cru (0,5%, 2,5% 5,0%, p/p). Como poluentes orgânicos hidrofóbicos não são facilmente solubilizados em água, optou-se também por fazer a contaminação diretamente na água de lixiviação da condição controle (solo sem contaminação). Desta maneira, as três últimas condições apresentadas sofreram adição de óleo (p/p) diretamente na água de lixiviação nas concentrações de 0,25%, 1,25%, 2,5%. Cada condição experimentada foi realizada em duplicata, sendo apresentada a média obtida com seus respectivos desvios padrão.

Como observado na figura V.3, o microrganismo *P. fluorescens* HK44 está ativo e consome nutrientes disponíveis na água de lixiviação de solos contaminados, o que pode ser inferido do menor crescimento celular apresentado na condição 1 (lixiviação do solo sem contaminação) em relação as demais condições, mais notadamente quando se analisa toda a duração do teste (0 a 6h).

Avaliando a variação da absorbância nas seis horas de cultivo em relação ao início do experimento (0 a 6h), pode ser observado que não houve diferença no crescimento celular nas condições 2, 3, 4, referentes, respectivamente, a H_2O de lixiviação do solo contaminado com 0,5%, 2,5% e 5,0% de óleo cru. A condição 5, H_2O Lixiviação 0,25% contaminada, apresentou crescimento ligeiramente maior do que as demais condições. Considerando, entretanto, os desvios encontrados para esta condição, a diferença observada não pode ser considerada significativa. Nas outras duas condições onde concentrações maiores de óleo foram adicionadas diretamente a água de lixiviação (condições 6 e 7) possivelmente houve inibição do microrganismo, uma vez que nestas condições, mesmo com um percentual maior de óleo disponível como substrato, o crescimento celular observado foi menor do que nas condições anteriores.

Este teste preliminar não confirma o uso específico do naftaleno pela cepa HK44, uma vez que ainda não estava sendo avaliada a resposta bioluminescente, esta sim específica ao HPA em questão.

V.3. PERFIL CINÉTICO DA RESPOSTA BIOLUMINESCENTE

Ensaios preliminares foram realizados a fim de se estabelecer os parâmetros de monitoramento do equipamento de fotodetecção utilizado no presente estudo e conhecer o perfil cinético da resposta bioluminescente do biossensor *P. fluorescens* HK44 (0,4 g/L do microrganismo) após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) (Figura V.4).

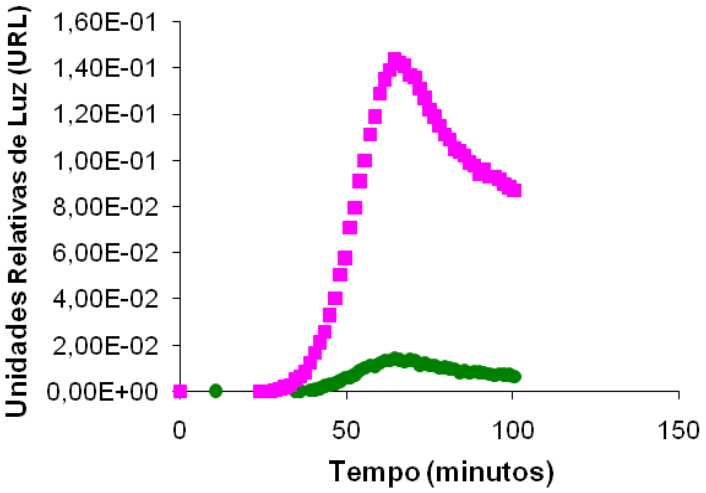


Figura V.4 Perfil cinético da resposta bioluminescente da cepa HK44 após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) (—■—) e o controle sem naftaleno (—●—)

O perfil cinético da resposta bioluminescente foi continuamente monitorado até alcançar a emissão máxima de luz, cada condição experimentada foi avaliada em triplicata, sendo apresentado na figura V.4 a média das triplicatas. Esta mesma condição foi utilizada em todos os testes de medida da emissão da bioluminescência apresentados nesta dissertação, ou seja, testes foram realizados normalmente em

triplicata e as curvas cinéticas foram continuamente monitoradas até alcançarem a emissão máxima de luz.

Neste teste preliminar cada poço foi monitorado por 10 s, sendo realizadas 70 leituras de todos os poços da placa até o fim do experimento, completando 100 minutos de teste.

O tempo de resposta do biossensor após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) foi em torno de 30 min (Figura V.4). Heitzer e colaboradores (1994) reportaram um tempo de resposta de 8 min para a mesma cepa imobilizada em alginato de estrôncio também na presença de naftaleno (15,5 mg/L). Segundo os autores, maiores tempos de resposta são verificados para menores concentrações de naftaleno; assim, o tempo de resposta obtido no presente trabalho com 0,5 mg naftaleno/L está de acordo com essa observação. Após cerca de 60 min, o sinal de saída começou a decrescer.

Foi observado um ligeiro aumento da atividade bioluminescente do experimento controle (sem naftaleno) no momento de máxima emissão das células expostas ao naftaleno, indicando a possibilidade de *cross-talking,* uma vez que as placas de leitura utilizadas até então eram translúcidas. Para evitar a influência da bioluminescência de poços vizinhos na leitura de emissão do luminômetro, passaram a ser utilizadas placas opacas brancas em todos os testes.

A partir de então, o sinal de intensidade de luz registrado durante os experimentos de bioluminescência foi subtraído do sinal de referência obtido com suspensão celular sem naftaleno.

V.4 PARÂMETROS DE INFLUÊNCIA NA RESPOSTA BIOLUMINESCENTE

Alguns parâmetros que poderiam influenciar a bioluminescência foram selecionados para serem avaliados: a concentração celular, a pré-ativação como forma de agilizar o processo, a idade do cultivo celular e da solução estoque de naftaleno.

V.4.1 Efeito da pré-ativação e da concentração celular

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração celular e o efeito da pré-ativação na resposta bioluminescente da bactéria *P. fluorescens* HK44 à adição de 0,5 mg/L de naftaleno, foi realizado primeiramente um experimento avaliando as concentrações celulares de 0,2, 0,4 e 0,6 g/L expostas previamente ou não ao naftaleno.

O efeito da pré-ativação foi avaliado concomitantemente com a concentração celular a fim de se observar se uma combinação destes parâmetros forneceria a melhor condição de resposta para este biossensor. As curvas cinéticas obtidas estão apresentadas a seguir (Figura V.5).

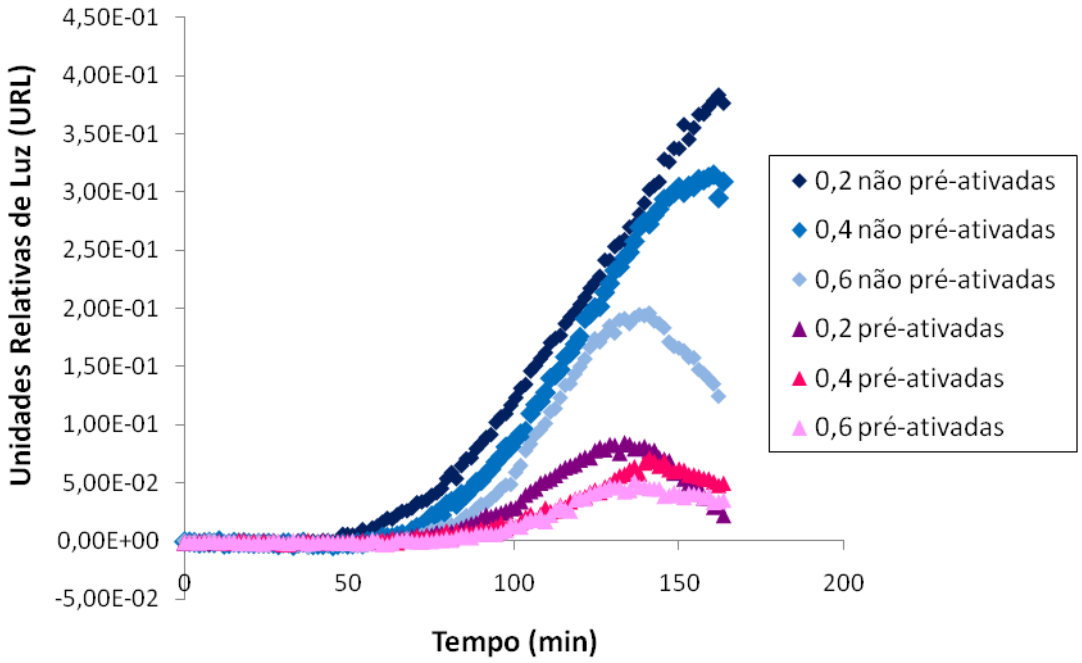


Figura V.5 Perfil cinético da resposta bioluminescente após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) nas suspensões celulares: 0,2 g/L, 0,4 g/L, 0,6 g/L e efeito da pré-ativação

Como observado na figura V.5, em todas as concentrações celulares as curvas cinéticas obtidas tem uma forma em S, de acordo com o encontrado por Valdman (2004). No entanto, o sistema biossensor bioluminescente proposto pela referida autora, empregando o mesmo microrganismo da presente dissertação, utiliza um sistema de fotodetecção em fluxo, comparável ao dispositivo FIA (*flow injection analysis*), permitindo análise *on-line* de amostras líquidas. Para Valdman, as curvas cinéticas da cepa HK44 pré-expostas ao naftaleno (0,5 mg/L) se tornam mais acentuadas e alcançam um maior sinal com o aumento da densidade celular. Além disso, para autora supra citada, a pré-ativação celular com naftaleno não tem efeito significativo nem no tempo de início de resposta, nem na inclinação da parte linear da curva, oferecendo, no entanto, um grande aumento de intensidade no sinal bioluminescente.

No presente estudo, onde a resposta bioluminescente é obtida a partir do monitoramento da suspensão celular contida em um volume de 300 μL por poço da placa de leitura, foram encontrados resultados diferentes para o efeito da pré-ativação e da concentração celular.

A pré-ativação, que é a indução enzimática das atividades biológicas da célula, afetou a reposta bioluminescente da cepa HK44 como mostrado na figura V.6. Para todas as concentrações celulares testadas a magnitude de resposta diminui drasticamente nas suspensões celulares pré-ativadas, nas condições do presente trabalho.

Pode ser observado ainda, que densidade celulares maiores (0,6 g/L) alcançam um sinal máximo de resposta menor do que os apresentados nas concentrações celulares de 0,2 g/L e 0,4 g/L. Uma possível explicação poderia ser a limitação de oxigênio para densidades celulares maiores. Applegate e colaboradores (1998) também verificaram esse comportamento de limitação ao oxigênio em experimentos de bioluminescência com tolueno, sugerindo um estado estacionário da luciferase na célula.

O tempo de resposta do biossensor após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) foi ligeiramente menor para as concentrações celulares menores, sendo este tempo limitado pela transferência de massa do naftaleno através da membrana celular.

O mesmo teste foi realizado então para concentrações celulares ainda menores, a saber: 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,2 g/L e 0,4 g/L. Sendo avaliado mais uma vez o efeito da pré-ativação. Os resultados obtidos estão apresentados na figura V.6 como a integral da curva cinética gerada, o somatório das emissões de cada condição ao longo de todo teste.

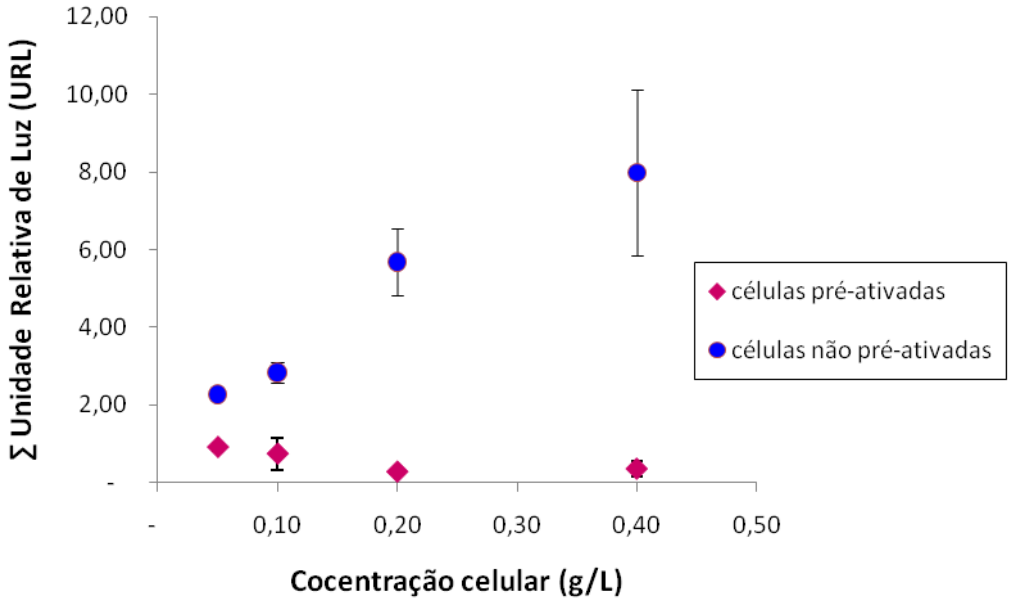


Figura V.6. Somatório da emissão bioluminescente após exposição ao naftaleno (0,5 mg/L) nas suspensões celulares: 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,4 g/L, e efeito da pré-ativação

Quando avaliadas densidades celulares menores, a pré-ativação teve efeito significativo na redução do tempo de início de resposta para aproximadamente 20 minutos, principalmente para as concentrações celulares menores de 0,05 e 0,1 g/L. No entanto, mais uma vez, a magnitude de resposta diminui drasticamente nas suspensões celulares pré-ativadas, como pode ser observado na figura V.6.

Para as condições celulares onde não houve a exposição prévia ao naftaleno, o sinal de resposta é mais intenso com o aumento da densidade celular, atingindo a maior sinal de saída na concentração celular de 0,4 g/L (figura V.6). No entanto, o coeficiente de variação desta condição foi bastante alto, como pode ser observado pela amplitude do desvio encontrado. O tempo de resposta do biossensor após exposição ao naftaleno foi em torno de 50 minutos

Valdman (2004) no desenvolvimento de um biossensor luminescente para a detecção de naftaleno, utilizando como componente biológico a mesma bactéria *P.*

fluorescens HK44, utilizou um modelo matemático proposto por Uesugi e colaboradores (2001) para auxiliar na escolha da concentração celular ótima. Na presença contínua do indutor da bioluminescência foi assumido que os produtos do gen *lux* acumulam dentro da célula e que a atividade bioluminescente aumenta com o tempo até limitação do oxigênio (UESUGI *et al.,* 2001). No referido trabalho utilizando a cepa HK44, o modelo citado permitiu a definição da densidade celular de 0,2 g/L como a melhor para detectar baixas concentrações de naftaleno, resultando no maior aumento da taxa de emissão de luz produzida pelo microrganismo na presença do indutor naftaleno.

De acordo com o referenciado na literatura, corroborado pelos resultados obtidos nas condições experimentadas na presente dissertação para o proposto biossensor, foi estabelecida a concentração celular de 0,2 g/L como a ideal para os ensaios bioluminescentes de monitoramento do naftaleno presente nas amostra de solo contaminado com óleo cru.

V.4.2 Idade do cultivo celular e do estoque de naftaleno

Com o intuito de avaliar a influência do estoque de naftaleno, e do tempo de estocagem do cultivo em meio sólido, foi realizado um experimento monitorando a resposta bioluminescente da bactéria *P. fluorescens* HK44 mantida a 4ºC por 30 dias ou recém-plaqueada, nas concentrações celulares de 0,05, 0,1, 0,2 e 0,4 g/L expostas ao naftaleno (0,5 mg/L) proveniente de estoque em etanol utilizado desde os primeiros testes (50 dias), ou do estoque preparado no mesmo dia do experimento.

O delineamento experimental proposto permitiria avaliar qual parâmetro em questão influencia mais significativamente a resposta bioluminescente da cepa HK44.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela V.1 como o somatório da emissão luminescente (∑ URL) ao longo de todo o teste. Cada condição foi realizada em triplicata, sendo apresentada na tabela a média obtida.

Tabela V.1 Efeito da manutenção celular e do estoque de naftaleno na resposta bioluminescente de *P. fluorescens* HK44

Solução Estoque Naftaleno	Cultivo celular: Recém-crescido	Cultivo celular: Antigo	Concentração celular (g/L)
Nova	5,74	15,68	0,05
Nova	4,10	6,39	0,1
Nova	6,14	5,67	0,2
Nova	4,70	4,78	0,4
Antiga	17,04	6,97	0,05
Antiga	5,67	7,65	0,1
Antiga	6,51	6,47	0,2
Antiga	5,39	3,89	0,4

Nenhuma das variáveis em questão apresentou-se como determinante na resposta bioluminescente da cepa HK44. Tanto células obtidas do estoque recém-plaqueado, como células armazenadas em meio sólido por períodos maiores responderam de forma semelhante à exposição a 0,5 mg/L de naftaleno. Da mesma maneira, o armazenamento do naftaleno não alterou significativamente a emissão luminescente do microrganismo biossensor, como pode ser observado na tabela V.1.

Apenas para a concentração celular de 0,05 g/L respostas muito discrepantes foram encontradas. Na combinação do cultivo celular recém-crescido com a solução estoque de naftaleno antiga foi observada uma emissão luminescente mais intensa que as demais concentrações celulares testadas. Da mesma forma, uma resposta mais proeminente foi obtida para a concentração celular de 0,05 g/L provenientes do cultivo antigo quando expostas a solução de naftaleno mais nova. No entanto, foram estas as condições cujas triplicatas apresentaram os maiores desvios. Sendo impossível destacar qualquer dos parâmetros avaliados como o de maior contribuição para o aumento da resposta para esta concentração celular.

Portanto, descartou-se tanto o estoque de naftaleno, quanto o armazenamento do cultivo celular como parâmetros de influência na variabilidade da resposta bioluminescente da cepa HK44.

V.5 METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DO NAFTALENO DE AMOSTRAS DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU

A determinação da fração biodisponível de contaminantes orgânicos é de suma importância para os processos de remediação de solos impactados, uma vez que auxilia no entendimento das limitações relacionadas à degradação do poluente ao longo do tempo (HAWS *et al*.,2006).

As metodologias analíticas associadas à quantificação de valores referência da qualidade do solo envolvem normalmente alguma etapa de extração química intensiva para que o composto passe para uma fase líquida e nessa seja quantificado. Esse processo de extração pelo qual a amostra sólida é submetida, comumente não representa a real condição de extração (lixiviação e/ou

solubilização) na qual esta amostra seria exposta no ambiente, podendo muitas vezes superestimar a concentração de determinado contaminante por revelar também sua fração não disponível ao ataque microbiano (ALEXANDER, 2000; SEMPLE *et al*., 2006).

No presente estudo, procurou-se adotar a metodologia de extração, etapa necessária a exposição ao sensor microbiano, que refletisse a fração biodisponível do HPA naftaleno em solos contaminados com óleo cru.

V.5.1 Comparação entre a lixiviação e a metodologia de extração não exaustiva (NEET)

Em um primeiro momento, foi comparada metodologia de lixiviação estática empregada nos testes preliminares de crescimento do microrganismo *P. fluorescens* HK44, onde se procurou obter de forma passiva um extrato que simularia o processo natural de lixiviação, com a metodologia de extração não exaustiva (NEET), utilizando também como solvente apenas água destilada.

Foi avaliada a resposta bioluminescente da cepa HK44 nas concentrações celulares de 0,05 g/L e 0,2 g/L frente aos extratos, obtidos por ambas estratégias, de solos 0,5%, 2,5% e 5,0% contaminados com óleo cru (p/p), assim como do controle sem contaminação.

A figura V.7a apresenta o perfil cinético do biossensor (concentração celular de 0,05 g/L) quando exposto a extratos obtidos por lixiviação estática, enquanto a figura V.7b apresenta o perfil cinético da exposição a extratos obtidos pela metodologia não exaustiva de extração, com o microrganismo na mesma concentração celular (0,05 g/L).

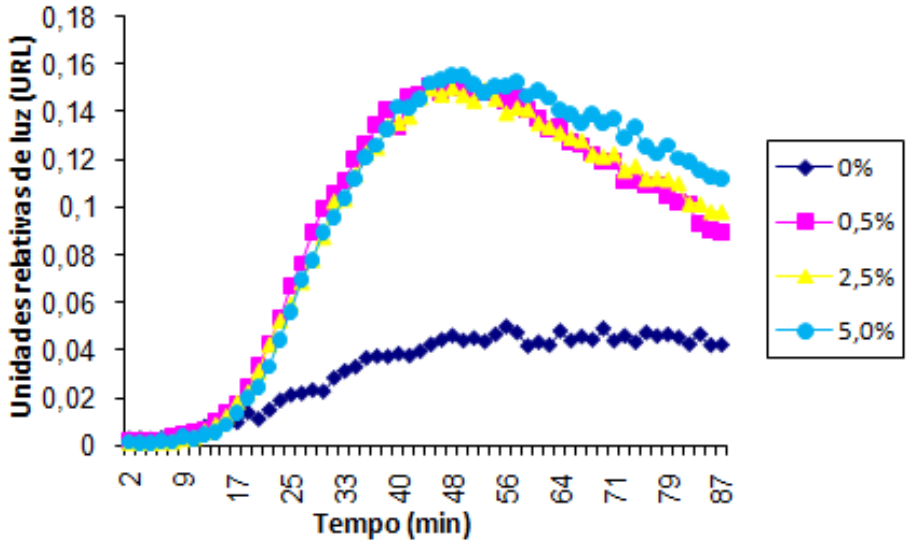


Figura V.7a Perfil cinético da exposição do biossensor a extratos de solo contaminados com óleo cru em diferentes concentrações, obtidos por lixiviação simples (concentração celular = 0,05 g/L)

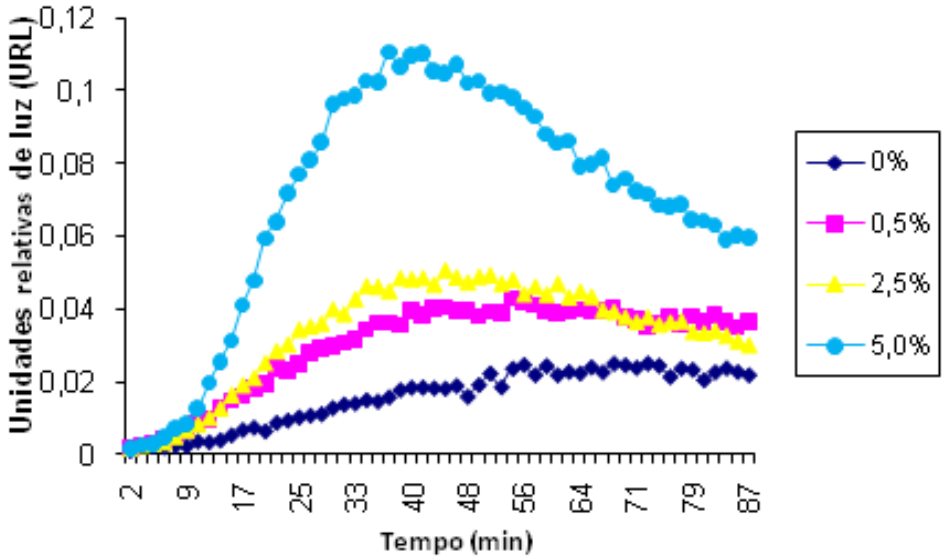


Figura V.7b Perfil cinético da exposição do biossensor a extratos de solo contaminados com óleo cru em diferentes concentrações, obtidos por extração não exaustiva com H_2O (conc. celular = 0,05 g/L)

Pode ser observado que os extratos dos solos contaminados com óleo cru nas proporções 0,5%, 2,5% e 5,0% obtidos pelo método de lixiviação estática não apresentaram diferença de intensidade na resposta luminescente do biossensor, caracterizando este como um método de extração ineficiente (figura V.7a). Este resultado está de acordo com o encontrado nos testes preliminares de crescimento microbiano, onde não foram observadas grandes diferenças no metabolismo do microrganismo *P. fluorescens* HK44 frente a extratos obtidos a partir de solos com concentrações crescentes de óleo (figura V.3).

O perfil cinético do biossensor frente aos extratos obtidos pela técnica de extração não exaustiva, utilizando como solvente também água destilada, apresenta diferenças relacionadas ao percentual de contaminação da amostra (figura V.7b). Desta forma, a condição avaliada na qual está presente o maior percentual de óleo (p/p) apresenta também a resposta luminescente mais intensa. Os extratos obtidos a partir de solos contaminados na proporção 0,5% e 2,5% apresentaram perfis cinéticos de emissão luminescente semelhantes, sendo observada uma emissão ligeiramente superior na concentração de 2,5%.

Por se tratar de um contaminante orgânico hidrofóbico, metodologias de extração de naftaleno utilizando como solvente a água muitas vezes subestimam o percentual deste poluente em solos impactados por óleo. Portanto, a eficiência de extração do HPA naftaleno pela técnica de extração não exaustiva foi também avaliada comparando diferentes tipos de extratantes.

V.5.2 Técnica de extração não exaustiva (NEET) utilizando como o solvente H_2O e β-HPCD

Biossensores bacterianos tem sido descritos como instrumentos importantes em estudos de biodisponibilidade (VAN DER MEER *et al.*, 2004), no entanto uma de suas maiores restrições está na impossibilidade de interação direta com matrizes ambientais complexas (HARMS *et al.*, 2006). É evidente que, com o auxílio das tecnologias moleculares modernas, diversos biossensores com aplicações na área ambiental foram desenvolvidos, entretanto extrações comumente usadas aplicando apenas água como solvente falham em remover adequada ou significativamente os componentes alvo de amostras ambientais complexas.

Para ser compatível com o instrumento biossensor a metodologia de extração empregada em matrizes complexas como o solo deve ser predominantemente aquosa. Desta maneira, soluções de ciclodextrina se colocam como uma alternativa atraente de extratante, pois são moléculas que apresentam alta solubilidade em água, mas contem uma cavidade hidrofóbica, possibilitando a separação dos contaminantes hidrofóbicos da fase sólida do solo (STOKES *et al.*, 2005).

Tendo isso em vista, foi avaliada a resposta bioluminescente da cepa HK44, nas concentrações celulares de 0,05g/L e de 0,20g/L, com relação à técnica de extração não exaustiva (NEET) utilizando água destilada ou solução de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (β-HPCD) a 50mM como solvente.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura V.8 como a média do somatório de emissão luminescente obtido durante todo o teste, com seus respectivos desvios padrão.

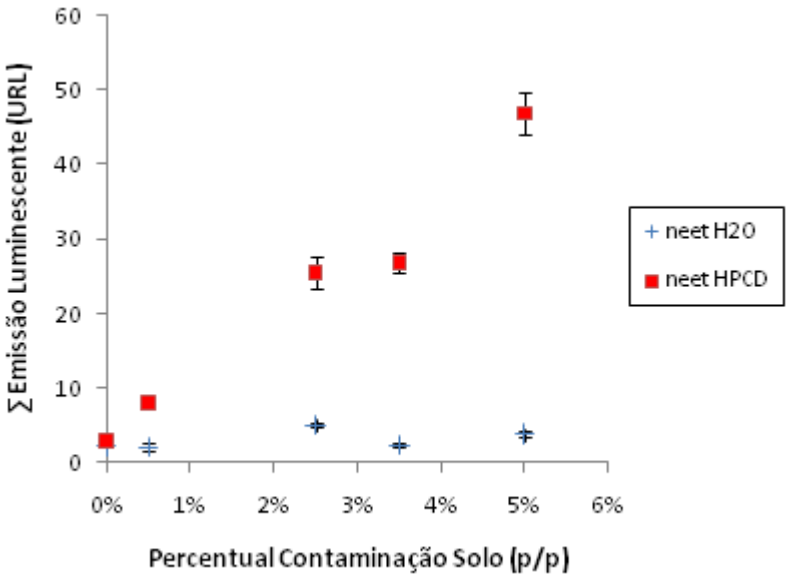


Figura V.8 Somatório da emissão bioluminescente após exposição a extratos obtidos pela metodologia NEET com H_2O ou HPCD de amostras de solo contaminadas a 0%, 0,5%, 2,5%, 3,5% e 5,0% (p/p) (concentração celular = 0,2 g/L).

Como mostra a figura V.8, a técnica de extração não exaustiva utilizando a ciclodextrina como solvente se mostrou significativamente mais eficiente, sendo possível perceber nítidas diferenças na resposta bioluminescente do biossensor quando exposto a extratos obtidos a partir de amostras de solo com percentuais crescente de contaminação por óleo (0,5%, 2,5%, 3,5%, 5,0%).

Para a condição de extração a partir de amostras 5,0% contaminadas foi obtida a emissão luminescente mais intensa, evidenciando esta como a condição de maior concentração do analito naftaleno disponível para a cepa HK44. Nos solos contaminados com óleo na proporção 2,5% e 3,5% pouca diferença na intensidade de resposta foi observada. Mesmo no extrato de solo 0,5% contaminado foi possível observar diferença em relação ao controle sem contaminação (0%).

Uma vez que as condições de extração devem ser específicas para o tipo de solo e óleo aplicados no presente estudo, foi avaliada a resposta bioluminescente do sensor microbiano *P. fluorescens* HK44 frente a extratos obtidos com diferentes concentrações de β-HPCD variando também o tempo de extração.

V.5.3 Otimização da Técnica de Extração Não Exaustiva (NEET) β-HPCD

Ainda no sentido de otimizar o desempenho do biossensor, foi realizado um delineamento experimental, que visava verificar a influência de parâmetros como a concentração da solução de ciclodextrina utilizada como solvente assim como do tempo de extração na metodologia aplicada. Utilizou-se a técnica de extração não exaustiva (NEET) combinando as concentrações de β-HPCD de 30mM, 60mM e 90mM com os tempos de 12h, 18h e 24h de extração. Essas condições foram testadas em solo contaminado com óleo na proporção máxima de 5,0% (p/p), utilizando a suspensão celular na densidade de 0,2 g/L.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura V.9, como o somatório de emissão obtida ao longo de todo teste, para cada condição. A condição de extração não exaustiva com solução de β-HPCD a 90mM por 24 horas obteve a melhor resposta bioluminescente.

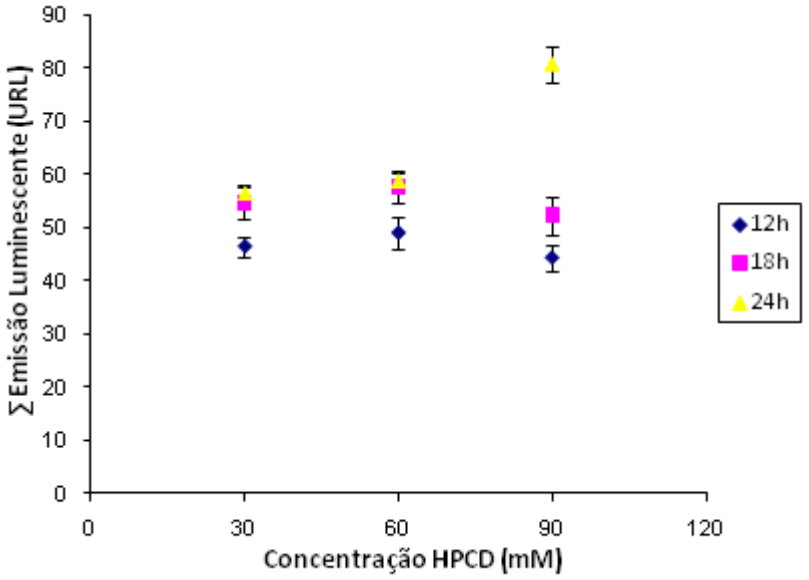


Figura V.9 Somatório da emissão bioluminescente após exposição a extratos obtidos pela metodologia NEET com HPCD nas concentrações de 30, 60 e 90 mM com os tempos de extração de 12, 18 e 24h de amostra de solo contaminada com óleo na proporção de 5,0% (p/p) (concentração celular = 0,2 g/L).

Recentemente, Telhado (2009) empregou a metodologia de extração não exaustiva utilizando como solvente a β-HPCD para prever a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) no mesmo sistema de atenuação natural monitorada (ANM). No referido estudo, foi verificado que nas concentrações da solução de β-HPCD superiores a 90mM, a fração de óleo extraída se mantinha constante, sendo esta também a concentração da solução de β-HPCD determinada para os estudos de biodisponibilidade de HTP em solos impactados por óleo.

Pretende-se que a extração com a β-HPCD seja feita com excesso desta, de maneira a garantir que todas as moléculas do contaminante dessorvidas sejam encapsuladas no interior da molécula de ciclodextrina. No entanto, no trabalho supracitado a metodologia de extração com β-HPCD falhou em prever a fração biodisponível dos hidrocarbonetos totais de petróleo no solo contaminado. Esta subestimação da fração de HTP biodisponível observada se deve segundo Telhado

(2009), ao fato da cavidade formada por estes complexos de ciclodextrina suportarem um determinado tamanho de moléculas hospedeiras, impossibilitando que hidrocarbonetos maiores, presentes no petróleo, sejam incluídos nas cavidades da ciclodextrina, permanecendo, consequentemente, retidos no solo após a extração (SABATÉ *et al.*, 2006).

Na presente dissertação, o microrganismo empregado no biossensor responde especificamente ao HPA naftaleno, um hidrocarboneto de apenas dois anéis e peso molecular de 128,17 g/mol, que provavelmente não sofre a limitação de inclusão nas cavidades da ciclodextrina discutida acima.

Além disso, recentemente, Paton e colaboradores (2009) acoplaram a extração com β-HPCD com o uso do biossensor bacteriano empregando o mesmo componente biológico, o microrganismo *Pseudomonas fluorescens* HK44, na detecção de naftaleno pela investigação da ligação entre a fração quimicamente extraível do naftaleno e da indução do catabolismo com o biossensor. O estudo progrediu de sistemas de solos experimentalmente contaminados com naftaleno contemplando também a avaliação da biodisponibilidade do naftaleno em amostras de solos provenientes de plantas de gás manufaturados (MPG) historicamente contaminados. Os autores obtiveram excelentes correlações entre a quantificação pelo biossensor com os experimentos de biodegradação, sendo possível relacionar com a fração de naftaleno disponível no solo.

V.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO SISTEMA BIOSSENSOR

V.6.1 Curva de calibração do naftaleno em soluções aquosas

Inicialmente, tentou-se estabelecer uma curva padrão de calibração a partir da exposição do microrganismo *P. fluorescens* HK44 a soluções aquosas contendo naftaleno nas seguintes concentrações finais: 0,5mg/L, 1,0mg/L, 4,0mg/L, 8,0mg/L, 12,0mg/L, 15,0mg/L, 18,0mg/L e 21,0mg/L.

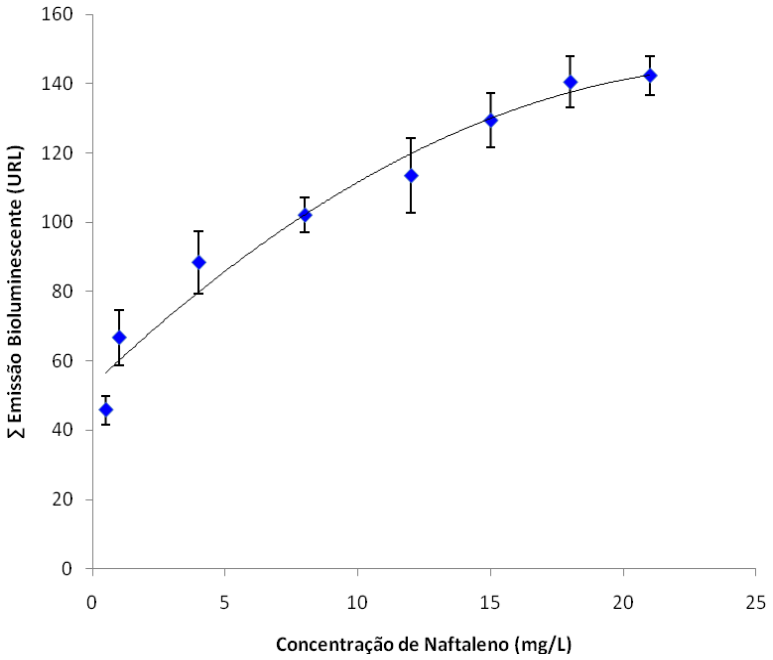


Figura V.10 Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 expostas a soluções aquosas de naftaleno (0-21,0 mg/L), em triplicata, com concentração celular de 0,2 g/L

A emissão de luz pela cepa HK44 mostrou uma saturação dependente da concentração de naftaleno (Figura V.10) e os dados foram ajustados a uma equação de terceira ordem com boa correlação (R^2 > 0,98). A inibição da bioluminescência nesta cepa em concentrações maiores de naftaleno provavelmente indica um efeito tóxico provocado pelo aumento da concentração intracelular do hidrocarboneto.

Uma correlação linear entre resposta bioluminescente do microrganismo *P. fluorescens* HK44 frente a concentrações de naftaleno entre 0 e 15 mg/L foi descrito por Paton e colaboradores (2009). A dependência sigmoidal dos níveis de contaminantes também foi verificada em vários estudos de luminescênciaa descritos na literatura (APPLEGATE *et al.,* 1998; WILLARDSON *et al.,* 1998; BECHOR *et al.,* 2002; VALDMAN, 2004)

Problemas com a repetibilidade do padrão de emissão encontrado frente a amostras aquosas de naftaleno, aliado ao fato da proposta de aplicação do presente biossensor se referir a amostras de solo, levaram a iniciativa de se estabelecer a curva de calibração a partir da contaminação direta do solo de trabalho com naftaleno.

V.6.2 Curva de calibração a partir do solo contaminado com naftaleno

A presente dissertação objetiva a aplicação do biossensor bioluminescente na detecção do HPA naftaleno em solo contaminado com óleo. Portanto, para a construção da curva de calibração, foi realizada a contaminação de amostras do solo cedidas pelo CETEM/MCT, diretamente com naftaleno, em concentrações conhecidas, a saber: 100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg, 600mg/kg e 800mg/kg. Em seguida, as amostras passaram pela extração não exaustiva com β–HPCD (50 mM), para só então serem expostas ao biossensor microbiano, com o intuito de obter uma curva de calibração melhor comparável ao sistema de atenuação natural a ser monitorado.

A emissão luminescente da cepa HK44 (0,2 g/L) foi monitorada até ser atingido o estado estacionário. Para cada condição, cinco réplicas foram construídas, estando a resposta bioluminescente obtida apresentada na figura V.11 como o somatório de emissão ao longo de todo o teste.

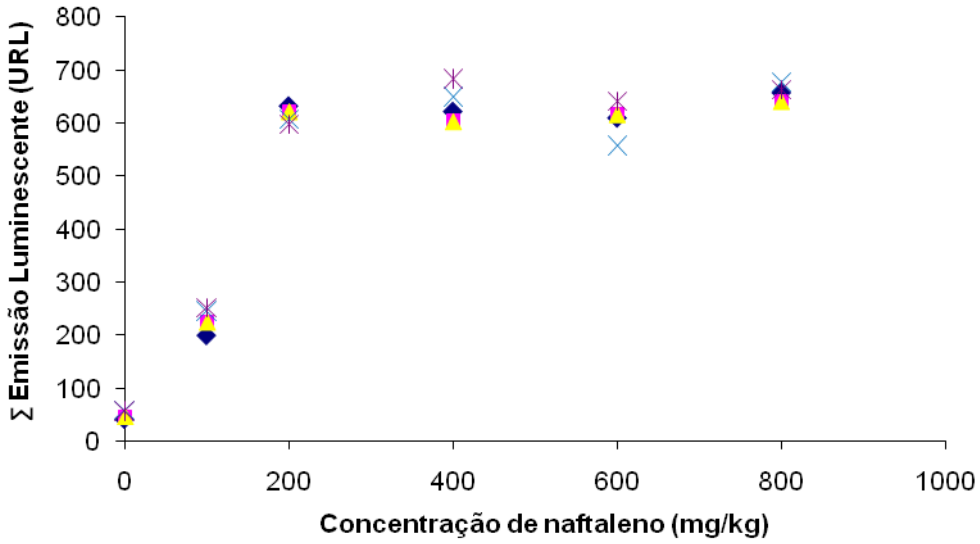


Figura V.11 Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 frente a extratos de solo contendo naftaleno (0-800 mg/kg) com concentração celular de 0,2 g/L (quintuplicata de cada condição)

Como pode ser observado na figura V.11, os resultados mostraram linearidade até a faixa de 200mg/kg, a partir da qual se observou um platô no perfil da curva (concentração de naftaleno) x (bioluminescência) obtida, indicando a saturação do sistema biossensor. As réplicas de cada condição apresentaram médias de emissão luminescente bastante próximas para todas as condições testadas.

A fim de se conhecer o padrão luminescente da cepa HK44 na faixa linear apresentada na figura V.11, o teste foi realizado com solos contaminados por naftaleno nas seguintes proporções: 0mg/kg, 20mg/kg, 40mg/kg, 60mg/kg, 80mg/kg, 100mg/kg, 120mg/kg, 140mg/kg, 160mg/kg, 180mg/kg e 200mg/kg.

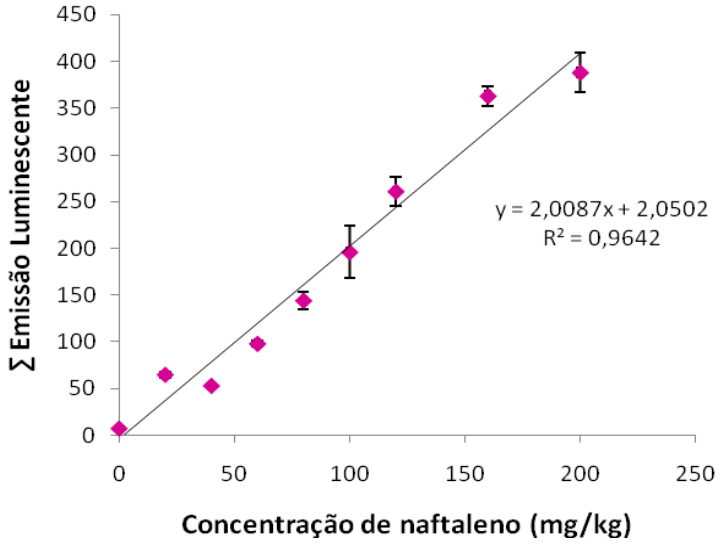


Figura V.12 Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 frente a extratos de solo contendo naftaleno (0-200 mg/kg), em triplicata, com concentração celular de 0,2 g/L

De acordo com o perfil encontrado na figura V.12, pode ser constatado uma dependência linear (R^2 > 0,96) da resposta do biossensor nesta faixa de detecção (0-200 mg/kg). Os valores de intervenção previstos pela Legislação CONAMA, resolução 420/2009 para o naftaleno é de 30 mg kg^{-1} em solos agrícolas, de 60 mg kg^{-1} em solos residenciais e de 90 mg kg^{-1} em solos industriais, compreendidos na faixa de detecção do instrumento biossensor proposto.

Os perfis das curvas obtidas nos repetidos testes foram bastante semelhantes, e todas apresentaram faixas lineares quando expostas a extratos de amostras de solo contaminadas com naftaleno. Houve discrepância, entretanto, na escala das emissões de bioluminescência de um dia para outro; concluindo-se, assim, como sendo necessária a calibração concomitante, realizando a exposição dos extratos armazenados ao biossensor, a cada experimento quantitativo realizado.

V.7 DETECÇÃO DO NAFTALENO EM AMOSTRAS DO SISTEMA DE ATENUAÇÃO NATURAL MONITORADA

Utilizando as condições ótimas pré-determinadas para o biossensor *P. fluorescens* HK44, o mesmo foi aplicado na detecção do teor de naftaleno existente nas amostras de solos contaminadas, oriundas do sistema experimental de Atenuação Natural Monitorada (ANM), cedidas pelo CETEM/MCT. As amostras obtidas referem-se aos tempos de cinco, seis, oito, dez, doze e quinze meses após a contaminação por óleo cru. Em cada experimento, as concentrações de naftaleno foram inferidas por meio de correlação com a curva de calibração feita no mesmo dia e com a mesma cultura celular.

Estão apresentados abaixo os perfis de emissão encontrados nos testes para as amostras de solo referentes ao quinto e sexto mês de contaminação, dos sistemas A e B (réplicas), nas proporções óleo-solo de 0%, 0,5%, 2,5% e 5,0%.

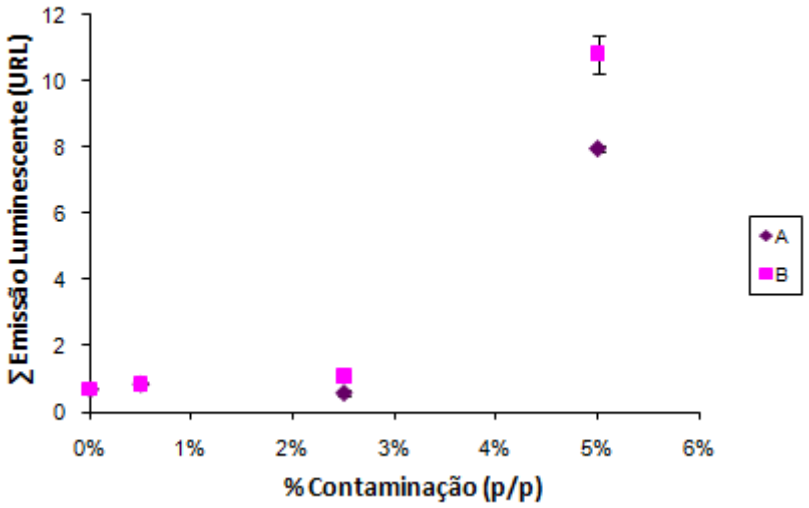


Figura V.13 Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 a amostra de solo do sistema de atenuação natural referente ao quinto mês de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L)

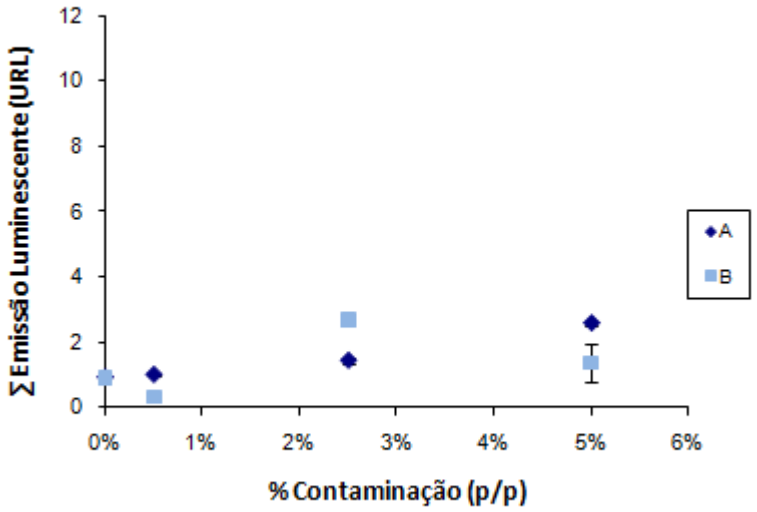


Figura V.14 Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 a amostra de solo do sistema de atenuação natural referente ao sexto mês de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L)

As amostras referentes ao mês cinco e seis de contaminação do sistema de atenuação natural montado foram testadas no mesmo dia, o que permite a comparação direta da intensidade de emissão obtida em cada teste.

Para o quinto mês de contaminação, os sistemas A e B apresentaram perfis de emissão semelhantes, as concentrações de naftaleno encontradas nas amostras 0,5% e 2,5% contaminadas mostram-se próximas do solo sem contaminação (0%), sendo detectado a presença de naftaleno apenas no solo 5,0% contaminado, havendo um máximo de 5,8 mg/kg de naftaleno, de acordo com a correlação obtida pela curva de calibração (Figura V.12).

No mês seis, foi observado o decaimento da concentração do analito. Para a condição 5,0% contaminada do sistema A, foi encontrado uma concentração residual de naftaleno de 0,95 mg/kg, enquanto para o sistema B, foi a condição de contaminação a 2,5% que apresentou a maior concentração de naftaleno, de 1,02

mg/kg. Para ambos os sistemas a concentração de contaminação 0,5% não apresentou diferença em relação ao solo controle sem contaminação (figura V.14).

As amostras do sistema experimental de atenuação natural referentes aos meses oito, dez, doze e quinze de monitoramento foram expostas ao biossensor, não sendo possível detectar diferenças significativas em relação ao perfil de emissão obtido a partir do solo controle sem contaminação (Figura V.15).

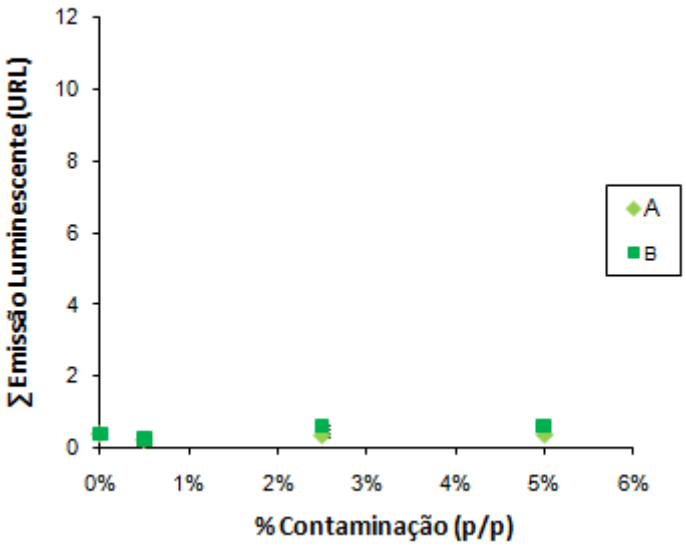


Figura V.15 Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 a amostra de solo do sistema de atenuação natural referente ao oitavo mês de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L)

Desse modo, se é assumido que no solo sem contaminação não há nenhum naftaleno, não podemos mais detectar presença do analito no solo a partir do oitavo mês do experimento, em qualquer das concentrações experimentadas.

Este mesmo sistema experimental foi objeto de estudo de Telhado (2009), que, entre outros, avaliou a remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) durante os primeiros 180 dias de contaminação. De acordo com a referida autora, no período monitorado, houve uma alta biodegradação dos HTP, com remoção de

49,3% para o solo contaminado a 0,5%, 42,5% no solo a 2,5% e 52,2% no solo a 5%, demonstrando que os microrganismos nativos são capazes de biodegradar de forma satisfatória o contaminante, indicando que os mesmos utilizaram parte dos hidrocarbonetos do petróleo como fonte de energia.

Ainda segundo Telhado (2009), as perdas abióticas no sistema de ANM foram elevadas, em torno de 27,05% no solo contaminado a 0,5%; 43,04% no solo contaminado a 2,5% e 29,02% no solo contaminado a 5%. Para a autora, esses valores obtidos parecem estar associados, principalmente, à percolação e lixiviação do contaminante.

Desta forma, os resultados obtidos por Telhado (2009), evidenciando uma alta remoção do contaminante no período dos seis primeiros meses de monitoramento do sistema experimental de atenuação natural, estão de acordo com o observado na presente dissertação, que encontrou baixas concentrações do analito naftaleno, a partir do sexto mês de contaminação.

V.8 DETECÇÃO DO NAFTALENO EM AMOSTRAS DO SISTEMA DE CONTAMINAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA

Visando à verificação do decaimento da concentração do analito naftaleno nos primeiros meses após contaminação do solo com óleo, foi montado um sistema em escala de bancada, no qual se contaminaram com o óleo cru, amostras de solo provenientes do CETEM/MCT, nas proporções de 0,5%, 2,5%, 3,5% e 5,0% (p/p). Foi também mantido um controle (0%), sem contaminação. O sistema armazenado em local abrigado, a temperatura ambiente, foi monitorado por 90 dias.

A figura V.16 apresenta os perfis de emissão luminescente do biossensor nos testes referentes aos tempos: 0, 15, 30, 60 e 90 dias de contaminação. Cada condição foi avaliada em triplicata, estando apresentados como a média do somatório obtido. A resposta bioluminescente foi acompanhada até ser atingido o estado estacionário de emissão.

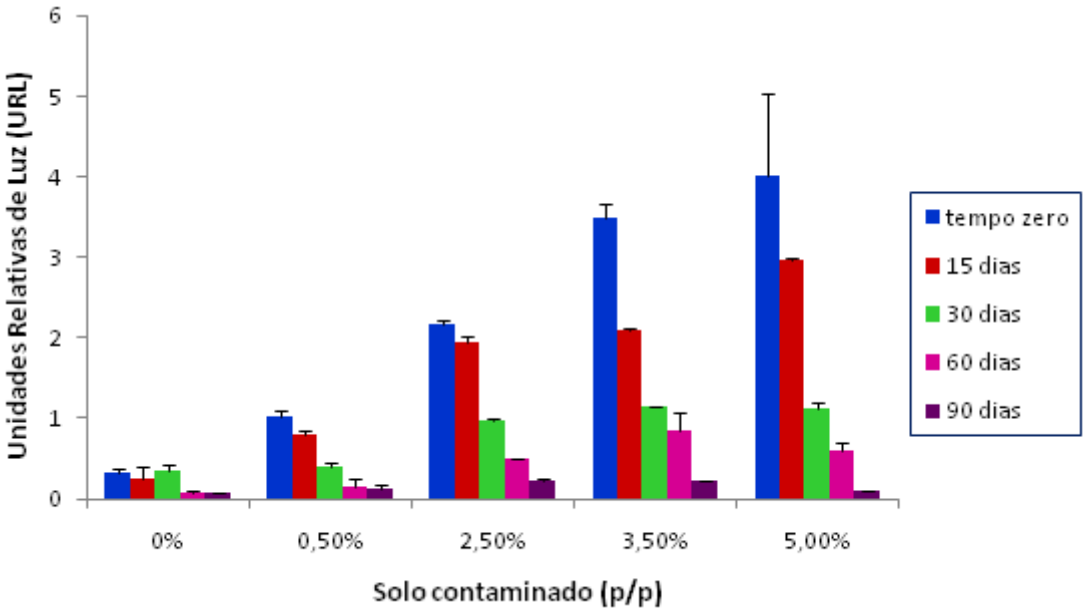


Figura V.16 Resposta bioluminescente *P. fluorescens* HK44 extratos obtidos de solo com 0, 15, 30, 60 e 90 dias de contaminação (concentração celular = 0,2 g/L)

A análise do tempo zero dessa contaminação apontou valores crescentes de naftaleno com relação às proporções de contaminação dos solos. Como pode ser observado na figura V.16, a resposta da condição 5,0% foi 11,21 vezes mais intensa que o controle sem contaminação, as condições de contaminação 3,5%, 2,5% e 0,5% apresentaram, respectivamente, respostas luminescentes 8,67, 5,88 e 2,39 vezes mais intensa que o controle sem contaminação. A correlação com a curva de calibração obtida no mesmo dia do experimento assinalou um máximo de 17,2 mg/kg de naftaleno na condição do solo 5,0% contaminado.

Após quinze dias de contaminação, as análises com o biossensor indicaram um decaimento da concentração de naftaleno em todas as condições avaliadas, sendo observada a maior redução na condição 3,5%, seguida pela condição 5,0%.

Com 30 dias de experimento observou-se um significativo decaimento na intensidade de resposta da cepa HK44 para todas as amostras, sendo observada uma menor diferença na concentração de naftaleno entre as porcentagens de contaminação 5,0%, 3,5% e 2,5%, obtendo-se, respectivamente para estas condições, respostas luminescente 3,02, 2,85 e 2,37 vezes mais intensas do que as obtidas para o controle sem contaminação. O valor máximo obtido para a concentração de naftaleno a partir da curva de calibração, nesse caso, foi de 3,1 mg/kg, para a condição de solo 5,0% contaminado.

A partir do segundo mês de experimento, as concentrações de naftaleno obtidas foram bastante baixas e com valores próximos para cada condição, mesmo para diferentes porcentagens de contaminação. Com 90 dias de monitoramento, já não é possível perceber diferenças significativas na intensidade de resposta luminescente do biossensor em relação ao controle sem contaminação, repetindo a tendência dos resultados observados nas amostras do sistema de atenuação natural monitorada do CETEM/MCT.

O ruído de emissão obtido na condição controle, solo sem contaminação, foi investigado como uma possível resposta da cepa HK44 ao solvente β-HPCD. Desta maneira, testes expondo o biossensor somente a solução de ciclodextrina 90mM foram realizados. No entanto, o somatório de emissão obtido nesta condição é significativamente menor do que o observado para o extrato do solo controle. Com isso não se pode identificar a solução de ciclodextrina como a indutora do ruído de

resposta luminescente do microrganismo *P. fluorescens* HK44, nas condições do presente trabalho.

Os valores de concentração de naftaleno obtidos nas análises de amostras de solo contaminado com óleo, avaliados na presente dissertação não puderam ser confrontados com quantificações obtidas a partir de metodologias convencionais, como, por exemplo, através do equipamento Infracal, medidor portátil de óleos e graxas totais (OGT), cuja técnica empregada é a espectrofotometria de infravermelho, utilizada por Telhado (2009) no monitoramento da concentração de óleo deste mesmo sistema de ANM, por não permitir a análise direta da solução aquosa de ciclodextrina, exigindo a extração do óleo do solo com solvente orgânico n-hexano.

Uma vez que o monitoramento de amostras ambientais complexas como o solo, utilizando biossensores na detecção de poluentes, exige uma etapa prévia de extração, a comparação dos valores quantificados pelo instrumento sensor, para ser coerente, deve ser feita diretamente com a concentração do analito alvo presente no extrato exposto à célula, não com a concentração do poluente encontrada no solo contaminado obtida por outras metodologias de extração.

Desta maneira, mesmo não sendo possível creditar ao instrumento biossensor aplicado na presente dissertação total confiabilidade como metodologia de quantificação do analito naftaleno, pode-se certamente aplicá-lo como ferramenta biológica sensível de detecção do HPA naftaleno, fornecendo uma excelente resposta qualitativa da presença deste hidrocarboneto em solos contaminados com óleo cru.

CAPÍTULO VI CONCLUSÕES E SUGESTÕES

VI.1 CONCLUSÕES

A bioluminescência produzida por *Pseudomonas fluorescens* HK44 tem sido descrita como uma técnica analítica sensível com potencial de aplicação na detecção da contaminação ambiental por HPAs. Com base nos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- A concentração celular influenciou na resposta bioluminescente da cepa HK44 ao naftaleno (0,5 mg/L), estabelecendo a concentração 0,2 g/L como a ideal para detectar baixas concentrações de naftaleno;
- Parâmetros como a idade do cultivo celular e do estoque da solução de naftaleno não influenciaram significativamente a resposta luminescente do biossensor. A pré-ativação com naftaleno apresentou efeitos negativos na intensidade de resposta do microrganismo *P. fluorescens* HK44, nas condições experimentadas no presente estudo;
- A melhor curva de calibração para o instrumento biossensor, aplicado à detecção de naftaleno em matrizes sólidas, foi definida como sendo a obtida a partir de amostras de solo diretamente contaminadas com o analito em questão. A curva de calibração do naftaleno assim alcançada com 0,2 g células /L mostrou ser linear até a concentração de 200mg/kg;
- A extração do contaminante orgânico naftaleno com β-HPCD foi determinada como a que melhor representa a fração biodisponível deste hidrocarboneto em um sistema experimental de ANM.
- Dentre as condições estudadas para obtenção da fração de naftaleno teoricamente biodisponível no solo, através da técnica de extração não-

exaustiva (NEET) com a β-HPCD, as melhores condições para a reposta bioluminescente são a concentração da solução do extratante químico igual a 90 mM, e o tempo de extração de 24h;

- O monitoramento das amostras de solo contaminado provenientes do sistema experimental de Atenuação Natural (CETEM/MCT), utilizando o instrumento biossensor proposto, revelou uma concentração residual de naftaleno apenas na amostra com maior teor de contaminação (solo 5%), no quinto mês de experimento. No sexto mês de contaminação a diferença da emissão bioluminescente obtida entre o solo controle (0%) e as outras condições (0,5%, 2,5% e 5,0%) se tornam mais discretas.
- As análises realizadas aplicando a cepa HK44 como sensor luminescente apontam não ser possível detectar a presença do analito naftaleno, a partir do oitavo mês do experimento de ANM, em qualquer das concentrações experimentadas.
- O sistema biossensor aplicado no monitoramento de um sistema experimental de atenuação monitorada se mostrou como uma ferramenta biológica sensível de detecção do naftaleno em solos impactados por petróleo, fornecendo uma excelente resposta qualitativa da presença deste HPA em solos contaminados com óleo cru.

VI.2 SUGESTÕES

- Creditar a confiabilidade do sistema biossensor como método também de quantificação do naftaleno em amostras ambientais complexas, através do confronto dos valores obtidos por este instrumento sensor com metodologias tradicionais de análise, como HPLC ou análises deste HPA no Infracal. A fração de naftaleno exposta ao biossensor pela metodologia de extração aplicada poderia ser calculada pela diferença entre a concentração inicial do naftaleno e a remanescente após a extração com β-HPCD para cada mês analisado durante o experimento de ANM.
- 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 solos impactados por atividades de petróleo de maneira integrada com aspectos químicos, físico-químicos e biológicos neste experimento de Atenuação Natural Monitorada.
- Observar o comportamento do sistema biossensor baseado na bioluminescência com amostras ambientais reais provenientes de sítios contaminados por petróleo e confirmar a confiabilidade do biossensor.

REFEFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, I.J., SEMPLE, K.T., ARYA, R., REID, B.J. Prediction of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction. **Environmental Pollution** v44, 562–571, 2006.

ALLAN, I.J., SEMPLE, K.T., ARYA, R., REID, B.J. Cyclodextrin enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenolic compounds. **Environmental Science and Technology**, v41, 5498–5504, 2007

ALEXANDER, M. Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 4259 – 4265, 2000.

ANDERSEN, J.B., STERNBERG, C., POULSEN, L.K., BJORN, S.P., GIVSKOV, M., MOLIN, S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 2240–2246, 1998.

ANDRADE, H. **Solos: origem, componentes e organização***.* Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 134p.

APPLEGATE, B.M., KEHRMEYER, S.R., SAYLER, G.S. A chromosomally based *tod-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) sensing. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.64, 7, p2730-2735*,* 1998.

ATLAS, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbos an Environmental Perspective. **Microbiological Reviews**. 45, 1, p180-209, 1981.

BAGCHI, D., BAGCHI, M., BALMOORI, J., VUCHETICH, P.J., STOHS, S. Induction of oxidative stress and DNA damage by chronic administration of naphthalene to rats. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.,** v101, p249-257, 1998.

BANKFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BAPTISTA, S.J. **Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel**. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química. 2007. 146p.

BARKAY, T.; GILLMAN, M.; TURNER, M.M. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 4267, 1997.

BECHOR, O*.,* SMULSKI,D.R., Van DICK, T.K., LaROSSA, R.A., BELKIS, S. Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants detection by *Escherichia coli* bearing *fabA'::lux* fusion. **J. Biotechnol.,** v94, p125-132, 2002

BELKIN, S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. **Curr. Opinion. Microbiol**., v.6. p.206-212, 2003.

BONIN, J. L.; SIMPSON, M. J. Variation in Phenanthrene Sorption Coefficients with Soil Organic Matter Fractionation: The Result of Structure or Conformation? **Environmental Science Technology**, v.41, p.153-159, 2007.

BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A.. Sources and Transport of Hydrocarbons in theRhone Delta Sediments (Northwestern Mediterranean). **Analytical Chemistry**., n.399, p.765 – 771. 1991.

BRUSSEAU, M.L., WANG, X.J., WANG, W.Z. Simultaneous elution of heavy metals and organic compounds from soil by cyclodextrin. **Environmental Science &Technology,** v31, 1087–1092, 1997.

BUDZINSKI, H.; JONES, I.; BELLOCQ, J.; PIÉRARD, C.; GARRIGUES, P. Evaluation of Sediment Contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Gironde Estuary. **Marine Chemistry**. n.58, p.85 – 97. França. 1997.

BUNDY, J.B., CAMPBELL, C.D., PATON, G.I., Comparison of the response of six different luminescent bacterial bioassays to bioremediation of five contrasting oils. **Journal of Environmental Monitoring,** v3, 404–410, 2001.

CANET, R.; BIRNSTINGL, J. G.; MALCOLM, D. G.; LOPEZ-REAL, J. M.; BECK, A. J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource Technology,** v. 76, p.113–117, 2001.

CAROLI, S. **Element speciation in bioinorganic chemistry**. Chemical Analysis series, John Willey & Sons, Inc. 1996.

CEBOLLA, A., SOUSA, C., LORENZO, V. Effector specificity mutants of the transcriptional activator *nahR* of naphthalene degrading *Pseudomonas* define protein sites involved in binding of aromatic inducers. **J. Biol. Chem.**, v272, n7, p3986-3992, 1997.

CHAKRADEO, P.P., *et al.* Effect of benzo(a)pireno and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. **Cellular Biology International**, Amsterdam, v.17, n.7, p.671- 676, 1993.

CHEN, Y.H., LI, G.L., PANDEY, R.K. Synthesis of Bacteriochlorins and Their Potential Utility in Photodynamic Therapy (PDT) **Cur. Org. Chem**, v8, p1105-1134, 2004.

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKI, A.; GÓRECKA, H.; GÓRECKI, H. Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. **Science of the Total Environment**, v. 337, p. 175– 182, 2005.

CETESB. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Acesso em 20 nov. 2009. Online. Disponível na Internet http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/ relacao_areas.asp.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (2009). Resoluções CONAMA 420. Brasília, Brasil

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTXcontaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.,** v. 34, p.311-318, 1996.

COSTA, A.F. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: determinação de 1-hidroxipireno urinário.** Dissertação de Mestrado. São Paulo: Fundação Osvaldo Cruz/Escola Nacional de Saúde Pública. 2001.

CUYPERS, C., CLEMENS, R., GROTENHUIS, T., RULKENS, W. Prediction of petroleum hydrocarbon bioavailability in contaminated soils and sediments. **Soil and Sediment Contamination,** v10, 459–482, 2001.

DARDENNE, F., SMOLDERS, R., DE COEN, W., BLUST, R. Prokaryotic gene profiling assays to detect sediment toxicity: evaluating the ecotoxicological relevance of a cell-based assay. **Environmental Science & Technology**, v41, 1790–1796, 2007.

DAUNERT, S., BARRETT, G., FELICIANO, J.S., SHETTY, R.S., SHRESTHA, S., SMITH-SPENCER, W. Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. **Chemical Reviews,** 100, 2705–2738, 2000.

DEW, N.M.; PATON, G.I.; SEMPLE, K.T. Prediction of [3-14C] phenyldodecane biodegradation in cable insulating oil-spiked soil using selected extraction techniques. **Environmental Pollution**, v.138, p. 316-323, 2005.

DOICK, K.J., DEW, N.M., SEMPLE, K.T. Linking catabolism to cyclodextrin extractability: determination of the microbial availability of PAHs in soil. **Environmental Science & Technology,** v39, 8858–8864, 2005.

DOICK, K.J., CLASPER, P.J., URMANN, K., SEMPLE, K.T. Further validation of the HPCD technique for the evaluation of PAH microbial availability in soil. **Environmental Pollution**, v.144, p.345 – 354, 2006.

DRAGUN, J. **The soil chemistry of hazardous materials.** Massachusetts: Amherst Scientific Publishers Ed., 830 p., 1998.

D'SOUZA S.F. Microbial biosensors. **Biosens Bioelectron** 16:337–353, 2001.

DUPEYRON, S.; DUDERMEL, P.M.; COUTURIER, D.; GUARINI, P.; DELATTRE,J.M. Extraction of PAHs from Soils - A Comparison Between Focused Microwave-Assisted Extraction, Supercritical- Fluid Extraction, Subcritical Solvent-ExtractionSonication and Soxhlet Techniques. Int. J. **Env. Anal. Chemistry.** n.73, p.191–210.1999.

EHLERS, L.J.; LUTHY, R.G. Contaminant bioavailability in soil and sediment. **Environmental Science Technology**, v. 37, p. 295A– 302A, 2003.

ELJARRAT, E., BACELÓ, D. Priority lists for persistent organic pollutans and emerging contaminants bases on their relative toxic potency in environmental samples. **Trenda in Analytical Chemistry,** 22 (10): 655-665, 2003.

FENG, Y.C.; JEONG-HUNPARK, R.; VOICE, T.C.; BOYD, S. Bioavailability of Soil-Sorbed Biphenyl to Bacteria**. Environmental Science and Technology**, v.34, p.1977-1984, 2000.

FERREIRA, M.M., DIAS JR., M.S. **Física do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 117p.

FINE, P., GRABER, E.R., YARON, B. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. **Soil Technology**, 1997, v.10, p.133-153.

GERMANSKY, M., JAMALL, I.S. Organ-specifc effects of naphthalene on tissue peroxidation, glutathione peroxidases and superoxide dismutase in rat. **Archives in Toxicology,** v61, p480-483, 1998.

GREENWOOD, P.F., WIBROW, S.; GEORGE, S.J.; TIBBETT, M. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. **Organic Geochemistry**, v.40, p.293–300, 2009.

GUHA, S., JAFFE, R..P. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. **Environ. Sci. Technol**., v30, 605–611, 1996.

HAKKILA, K., MAKSIMOW, M., KARP, M., VIRTA, M. Reporter genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. **Analytical Biochemistry** 301, 235–242, 2002.

HARMS, H., WELLS, M.C., VAN DER MEER, J.R. Whole-cell living biosensors – are they ready for environmental application? **Applied Microbiology and Biotechnology** 70, 273–280. 2006.

HAWS, N. W., Ball, W. P. E Bouwer, E. J. Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. **Journal of Contaminant Hydrology**, 82, 255-292, 2006.

HEITZER, A., WEBB, O.F., THONNARD, J.E., SAYLER, G.S. Specific and quantitative assessment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminescent catabolic reporter bacterium. **Applied and Environmental Microbiology** v58, 1839–1846, 1992.

HEITZER, A.; MALACHOWSKY, K.; THONNARD, J.E.; BIENKOWSKI, P.R.; WHITE, D.C.; SAYLER, G.S. Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. **Appl. Environ. Microbiol**. 5, 1487-1494, 1994.

HEITZER, A., APPLEGATE, B., KEHRMEYER, S., PINKART, H., WEEB, O.F., PHELPS, T.J., WHITE, D.C., SAYLER, G.S. Physiological considerations of environmental applications of *lux* reporter fusions. **J. Microbiol. Methods,** v33, p45-57, 1998.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, 2007.

JOHNSEN, A.R. *et al*. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution, **Oxford,** v.133, n.1, p.71-84, 2005.

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

KEANE, A., PHOENIX, P., GHOSHAL, S., LAU, P.C.K. Exposing culprit organic pollutants: a review. **Journal of Microbiological Methods**, 49, 103–119, 2002.

KELSEY, J.W., ALEXANDER, M. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v16, 582–585, 1997.

KIM, E.J.; OH, J.E.; CHANG, Y.S. Effects of Forest Fire on the Level and Distribution of PCDD/Fs and PHAs in Soil. **The Science of the Total Environment**. n.311, p.177-189. 2003.

KOHLER, S., BELKIN, S., SCHMID, R.D. Reporter gene bioassays in environmental analysis. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** 366, 769–779, 2000.

KOHLMEIER, S.; MANCUSO, M.; TECON, R.; HARMS, H.; VAN DER MEER, J.R.; WELLS, M. Bioreporters: gfp versus lux revisited and single-cell response. **Biosens. Bioelectron**. 8, 1578-1585, 2007.

KUN-LIN, O.; LIAO, V.H.C.; CHIEN, M.T.; TSENG, Y.Y. Assment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein –based bacterial biosensors. **Environmental Pollution**, 1-7, 2005.

LaROSSA. R.A., VAN DYK, T.K. Applications of stress responses for enviromental monitoring and molecular toxicology. In: Bacterial Stress Response. 2000.

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

LI, A.; SCHOONOVER, T.M.; ZOU, Q.; NORLOCK, F.; SCHEFF, P.A.; WADDEN, R. A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Air of Ten Chicago Area Homes. **NUATRC Research Report**, nº 6, 2005.

LIMA, C.B.S. *et. al*. **Efluentes: a qualidade da água comprometida**. In: MENEGAT, R. et al. (Ed). Atlas ambiental de Porto Alegre. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1998. p.157-158

LINDSEY, J.S., SCHEREIMAN, I.C., HSU, H.C., KEARNEY, P.C., MARGUERETTZ, A.M. Rothemund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions **Journal of Organic Chemistry**, v52, p.827, 1987.

LEPSCH, I.F. **Formação e Conservação dos Solos**. São Paulo, Oficina de Textos, 2002.

MARSHALL, A.G.; RODGERS, R.P. Petroleomics: The Next Grand Challenge for Chemical Analysis. **Accounts of Chemical Research**, v.37, p.53-59, 2004.

MARGESIN, R., SCHINNER, F. Biorremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-oil-contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. **Applied and Environmental Microbiology.** 67. 7 p3127-3133, 2001.

MATRUBUTHAM U, SAYLER GS *Microbial biosensors based on optical detection.* In: Mulchandani A, Rogers KR (eds) Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols. Humana, Clifton, pp 249–25,1998.

MIRANDA, V.J.M. **Degradação de naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno em solos e sedimentos de ambientes costeiros, oceânicos e antárticos.** Dissertação de Mestrado. Minas Gerais: UFV. 2008.

MILLER, J.H. **A short course in bacterial genetcs strain**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1992.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 626p.

MORET, S., CONTE, L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. **J. Chromatogr. A.**, v882, p.245-253, 2000.

MULCHANDANI, P.; CARLOS, M.H.; LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Amperometric microbial biosensor for p-nitrophenol using Moraxella sp.-modified carbon paste electrode **Biosens. Bioelectron.;** 21, 523, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. Natural attenuation of contaminated soils. **Environment International. Química Nova,** v.30, p. 587– 601, 2004.

NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in biosensors. **Anal. Bioanal. Chem**, 377, 446, 2003**.**

NCIBI, M. C.; MAHJOUB, B; GOURDON, R. Effects of aging on the extractability of naphthalene and phenanthrene from Mediterranean soils. **Journal of Hazardous Materials**, v.146, p.378–384, 2007.

NETTO, A.D.P.*et al*. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

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.

NYMAN, E.S., HYNNINEN, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy **J. Photochem. Photobio. B: Biology**, 73, 1, 2004.

PATTERSON, C.J.; SEMPLE, K. T.; PATON, G.I. Non-exhaustive extraction techniques (NEETs) for the prediction of naphthalene mineralisation in soil. **FEMS Microbiology Letters**, v.241, p.215–220, 2004.

PATON, G. I.; REID, B. J.; SEMPLE, K. T. Application of a luminescence-based biosensor for assessing naphthalene biodegradation in soils from a manufactured gas plant. **Environmental Pollution**, v.157, p.1643–1648, 2009.

PEREIRA, C B. **População Bacteriana Associada à Degradação de Hidrocarbonetos de Petróleo: Uma Abordagem.** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química. 2006.

PEREIRA,P. F. da S. **Perfil analítico da biodegradação de solos arenoso e argiloso contaminados por óleo cru.** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Química. 2008. 215p.

PENNER, G.C. **Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina em o Uso de Detector de Fotoionização.** Dissertação de Mestrado. EFSC/USP, 2000.

POTIN, O. *et al*. Bioremediation of an aged polycylic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation,** Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

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

RASMUSSEN, L.D.; SORENSEN, S.J.; TURNER, R.R..; BARKAY, T. Application of a mer-lux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil**Soil Biol. Biochem**, 32, 639, 2000.

REID, B.J., SEMPLE, K.T., MACLEOD, C.J. WEITZ, H.J., PATON, G.I. Feasibility of using prokaryote biosensors to asses acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiol. Lett.,** v169, p227-233, 1998.

REID, B.J., STOKES, J.D., JONES, K.C., SEMPLE, K.T. A non-exhaustive cyclodextrin based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. **Environmental Science & Technology,** v34, 3174–3179, 2000.

RESENDE, M., CURI, N., REZENDE, S.B., CORRÊA, G.F. **Pedologia – base para distinção de ambientes.** Viçosa: NEPUT, 2002. 338p..

RICKING, M.; SCHULZ, H.M. PAH – Profiles in Sediment Cores from the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin.** Alemanha. n.44, p565-570. 2002.

RIEDEL, K Microbial biosensors based on oxygen electrodes. In: Mulchandani A, Rogers KR (eds) Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols. Humana, Clifton, pp 199–223, 1998.

RIBEIRO, A.O. **Estudo da interação entre sistemas luminescentes e α β e γ-ciclodextrina em solução aquosa.** Tese de Doutorado. Ribeirão Preto: USP/FFC, 2004. 94p.

RIPP, S., NIVENS, D.E., WERNER, C., SAYLER, G.S. Bioluminescent most-probable-number monitoring of a genetically engineered bacterium during a long-term contained field release.**Appl Microbiol Biotechnol.**, v53, n6, p736-741, 2000.

RIZZO, A.C. de L.. **Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo**. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química, 2008. 188 p.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M.J.L.; MARCO, M.-P.; BARCELO, D. Biosensors for environmental monitoring A global perspective. **Talanta** 65: 291-297, 2005.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; MARCO, M.-P.; ALDA, M.J.L.; BARCELO, D. Biosensors for environmental monitoring endocrine disruptors: a review article. **Anal Bioanal Chem**. 378: 588-598, 2004.

RODA, A. *et al.* Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence*.* Review. **Trens in Biotechnology** , v 22, 2004.

RUGGIERO, P.; PIZZIGALLO, M.D.R.; CRECCHIO, C. Effects of soil abiotic processes on the bioavailability of anthropogenic organic residues. **Developments in Soil Science**, v. 28B, p. 95-133, 2002.

SABATÉ, J.; VINAS, M., SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 54, 19-25, 2004.

SABATÉ, J., VINÃS, M.; SOLANAS, A. M. Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. **Chemosphere**, v.63, p.1648 – 1659, 2006.

SAGI, E.; HEVER, N.; ROSEN, R.; BARTOLOME, A.J.; PREMKUMAR, J.R.; BELKIN, S. Fluorescence and bioluminescencereporter functions in genetically modified bacterial sensor strains*.* **Sens. Actuat. B**. v.90, p..2-8, 2003.

SALGADO, A M. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de doutorado. Rio de Janeiro, UFRJ/Escola de Química. 2001.

SCHERR, K.; AICHBERGER, H.; BRAUN, R.; LOIBNER, A. P. Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology,** v.43, p. 341-350, 2007.

SCOW, K.M., HICKS, K.A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p.1-8, 2005.

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.

SEMPLE, K.T.; MORRISS, A.W.J.; PATON, G.I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. **Eur. J. Soil Sci**. 809-818, 2003.

SEMPLE, K.T.; KIERON, D.J.; JONES, K.C.; BURAUEL, P.; CRAVEN, A.; HARMS, H. Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediments is Complicated. **Environmental Science and Technology,** v38, p.229A-231A, 2004.

SEMPLE, K.T.; DEW, N.M.; DOICK, K.J.; RHODES, A.H. Can microbial mineralizationbe used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil? **Environmental Pollution**, v.140, p.164 – 172, 2006.

SHARMAT, F., ROGERS, K. Article review - Biosensors, **Meas Sci. Technology**, v. 5, p461-472, 1994.

SHIMMO, M.; ADLER, H.; HYÖTYLÄINEN, T.; HARTONEN, K.; KULMALA, M.; RIEKKOLA, M.L. Analysis of Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by on-line Coupled Supercritical Fluid Extraction–Liquid Chromatography–Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Atmospheric Environment**. n.36, p.2985-2995. 2002.

SILVA, E, FIALHO AM, SÁ-CORREIA I, BURNS RG, SHAW LJ. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine**. Environ Sci Technol.** Jan 15; 38(2):632-7. 2004

STEINBERG, S.M.; POZIOMEK, E.J.; ENGELMANN, W.H.; ROGERS, K.R. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. **Chemosphere,** 30(11): 2155-2197, 1995

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.

STOHS, S.J., OHIA, S., BAGCHI, D. Naphthalene toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology,** n180, p.97-105, 2002.

STOKES, J.D., PATON, G.I., SEMPLE, K.T. Behaviour and assessment of the bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. **Soil Use and Management,** v21, 475–486, 2005.

STROUD, J.L.; PATON, G.I.; SEMPLE, K.T. Predicting the biodegradation of target hydrocarbons in the presence of mixed contaminants in soil. **Chemosphere,** v.74, p.563–567, 2009.

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

TELHADO, M.C.S.C.L. **Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo contaminado.** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química. 2009. P.115.

TOMBOLINI, R., UNGE, A., DAVEY, M.E., DE BRUIJN, F.J., JANSSON, J.K. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged Pseudomonas fluorescens bacteria. **Fems Microbiology Ecology,** 22, 17–28, 1997.

TRANG, P.T.K., BERG,M., VIET, P.H., VANMUI, N., VANDERMEEr, J.R. Bacterial bioassay for rapid and accurate analysis of arsenic in highly variable groundwater samples. **Environmental Science & Technology,** v39, 7625–7630, 2005.

TRINDADE, P.V.O. **Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.** Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro, UFRJ/Escola de Química, 2002. 127p.

TROQUET, I., LARROCHE, C., DUSSAP, C..G. Evidence For the Occcurence of an Oxygen Limitation During Soil Bioremediation by Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** v13, p103-112, 2003.

UDOVIC, M.; LESTAN, D. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after soil remediation. **Environmental Pollution**, v.148, p.663-668, 2007.

UESEGI, S.L., YARWOOD, R.R., SELKER, J.S. BOTTOMLEY, P.J. A model that uses the induction phase of lux gene-dependent bioluminescence in *Pseudomonas fluorescens* HK44 to quantify cell density in translucent porous media. **J. Microbial. Methods,** v47, p315-322, 2001.

URE, A.M. & DAVIDSON, C.M. **Chemical Speciation in the Environment,** Ed. Blackie Academic & Professional (1995).

VALDMAN, E. **Desenvolvimento e aplicação de um biossensor luminescente para a detecção de naftaleno**. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química, 2004, p124.

VALDMAN, E.; VALDMAN, B. LEITE, S.G.F. On line detection of low naphthalene concentration by a bioluminescent sensor. **Proc. Biochem**. 2004.

VALLE, M. L. M. **Produtos do setor de combustíveis e de lubrificantes**. Rio de Janeiro, Publit, 2007.

VAN HAMME, J.D., SINGH, A., WARD, O.P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular – Biology reviews** – 67. 4, p503-549, 2003.

VAN DER MEER, J.R., TROPEL, D., JASPERS, M. Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. **Environmental Microbiology** 6, 1005-1020, 2004.

VIEIRA, L.S. **Manual da Ciência do Solo.** São Paulo. Ed Agronômica Ceres Ltda, 1975.

Vo-DINH, T., FETZER, J., CAMPIGLIA, A.D. Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment. **Talanta**, v47, p.943-969.

WEEB, O.F., BIENKOWSKI, P.R., MATRUBUTHAM, U., EVANS, F.A., HEITZER, A., SAYLER, G.S. Kinetics and response of a *Pseudomonas fluorescens* HK44 biosensor. **Biotechnol. Bioeng.**, v54, n5, p491-502, 1996.

WERLEN, C.; JASPERS, M.C.M.; VAN DER MEER, J.R. Measurement of biologically available naphthalene in gas, and aqueous phases by use of a Pseudomonas putida biosensor. **Appl. Environ. Microbiol**. 43-51, 2004.

WILLARDSON, B.M., WILKINS, J.F. RAND, T.A., SCHUPP, J.M., HILL, K.K., KEIM, P., JACKSON, P.J. Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. **Appl. Environ. Microbiol.,** v64, 3, p1006-1012, 1998.

YAGI, K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. **Appl Microbiol Biotechnol** 73:1251-1258, 2007.

XU, S.; GAO, X.; LIU, M.; CHEN, Z. China's Yangtze Estuary II. Phosphorus and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tidal Flat Sediments**. Geomorphology**. n.4, p.207 – 217. China. 2001.