UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE UM BIOSSENSOR MICROBIANO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO BIODISPONIVEL EM AMOSTRAS DA BAÍA DE GUANABARA

GISELE DOS SANTOS COSTA

Rio de Janeiro

2015

AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE UM BIOSSENSOR MICROBIANO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO BIODISPONIVEL EM AMOSTRAS DA BAÍA DE GUANABARA

GISELE DOS SANTOS COSTA

Tese submetida ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

.

Orientadores:

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Paulo Rubens Guimarães Barrocas, D.Sc.
Magali Christe Cammarota, D.Sc.

EQ/UFRJ

Rio de Janeiro

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Gisele dos Santos

Avaliação da aplicabilidade de um Biossensor microbiano para a determinação de mercúrio biodisponível em amostras da Baía de Guanabara

Rio de Janeiro, DEB, EQ/UFRJ, 2015.
XVIII, 155, f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2015.

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado, Paulo Rubens Guimarães Barrocas e Magali Christe Cammarota.

1. Biossensor; 2. Bioluminescência; 3. Mercúrio biodisponível; 4. Baía de Guanabara

Gisele dos Santos Costa

AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE UM BIOSSENSOR MICROBIANO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO BIODISPONIVEL EM AMOSTRAS DA BAÍA DE GUANABARA

Tese de doutorado apresentada 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 dos requisitos necessário à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em:

Orientador(es):

_____
Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

_____
Paulo Rubens Guimarães Barrocas, D.Sc.

_____
Magali Christe Cammarota, D.Sc.

_____
Juacyara Carbonelli Campos D.Sc.

_____
Karen Signori Pereira, D.Sc.

_____
Claudia Duarte da Cunha, D.Sc.

_____
Fernanda Ribeiro do Carmo Damasceno, D.Sc.

_____
Luana Queiroz Pinho, D.Sc.

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Sonia Maria e Antonio pelo apoio, amor, dedicação e ajuda em todas as horas. Nos últimos anos foram muitas horas ali me acompanhando, passei por problemas de saúde e duas cirurgias, foram seis meses nos quais eu não podia fazer nada sozinha, momentos muito difíceis de recuperação das cirurgias. Eu certamente não teria enfrentado sem o auxilio, amor, paciência e muita perseverança destas pessoas abençoadas.

Aos meus irmãos Maurício e Ricardo, por me lembrarem de sorrir neste processo todo, mesmo com toda tensão envolvida, não poderia deixar de agradecer aos meus sobrinhos Allan e Pedro que sempre me davam motivos para sorrir.

A todos da minha grande família por sempre movimentarem os ares da casa, mesmo quando eu só queria silêncio, mas é muito amor envolvido.

Ao meu namorado Leonardo, pelo amor, paciência e compreensão não só na fase complicada, com problemas de saúde, mas em todos os momentos de pesquisa, nos incansáveis experimentos, por todas as idas ao Fundão em feriados e fins de semana, obrigada por tudo!

Aos meus amigos pelos momentos de ternura e conforto nos estudos e pelas muitas conversas no telefone e na internet: Kelly Cristina, Kaitusha Giarola, Tilza, Juliana Louzada, Vânia Paula, Roberta Giovanini, Adriana Loeser, Verônica Parente, Carina Caputo, Priscila Abreu, Marcelle Pacheco, Erica Gaspar, Doris Campos, Luana Pinho, Juliana Leal, Karen Einsfeldt, Felipe Rodrigues, Elisângela Schneider, Guillermo Marini, Aldo Júnior, Livia Jatoba, Veronica Marinho, Karla Kitamura, Silvia Azevedo, Alline Coutinho, Verônica Marinho, Márcia Barbochler, pois conseguem entender a dificuldade da caminhada e por isso, me incentivam e apoiam.

Aos meus colegas de trabalho da Escola Municipal Professor Souza Carneiro: Fernanda Leal, Humberto Freitas, Hélio Novaes, Luana Machado, Alexandre Rodrigues, Ana Carolina, Alessandra, Ursula Zampier, e Teresa Stavele por dividirem os momentos complicados e todas as dificuldades envolvidas na educação pública, pelo apoio e incentivo para continuar nessa caminhada. E por muitas vezes me lembrarem de que é insano viver nessa correria.

Aos alunos de iniciação científica Josi Cláire, Juliana Mercadante, Renata Nalin e Luiz Ramos por serem muito dedicados e companheiros. Aos demais alunos e ex-alunos do laboratório pela amizade, carinho e pelo ânimo em cada experimento, mesmo quando dava errado, e ainda aos momentos alegres: Rafael, Rafaela, Mariana, Ana Carina, Gabrielle, Juliana, Francisca e ao Carlos.

Aos professores Andréa Medeiros Salgado, Magali Christe Cammarota, e Paulo Rubens Guimarães Barrocas, pela orientação, dedicação e apoio e pelos momentos de conversa e amizade.

Ao Laboratório de Biogeoquímica, no Departamento de Ecologia, IB/ CCS/UFRJ.

Ao Laboratório do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da ENSDP-Fiocruz.

Ao Laboratório de Geoquímica Ambiental da Universidade Federal Fluminense.

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“A problemática ambiental nos defronta com os desafios relativos aos estoques de recursos materiais e energéticos e a questão fundamental da sua utilização no longo prazo, o que impõe uma revalorização da dimensão territorial, regional e espacial.”

Enrique Leff

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Uso do mercúrio em pinturas e na alquimia 10

Figura 2: Algumas fontes emissoras de mercúrio e seu destino no ambiente. 17

Figura 3: Ciclo do Mercúrio em Ambientes Naturais. 20

Figura 4: Esquema da resistência bacteriana ao mercúrio baseado no *operon mer A.* 23

Figura 5: Esquema de Funcionamento de um Biossensor. 38

Figura 6: Esquema da inserção do promotor o *transposon* Tn 21. 44

Figura 7: Equipamento *Luminoskan Ascent* utilizado para Medição da Luminescência. 53

Figura 8: Esquema de Preparo das Células. 60

Figura 9: Esquema da lixiviação realizada nas amostras de sedimento. 63

Figura 10: Esquema de preparo de soluções das amostras após a lixiviação. 64

Figura 11: Mapa que apresenta os pontos de coleta na Baía de Guanabara. 67

Figura 12: Curva de Crescimento de *Escherichia coli* MC1061. 69

Figura 13: Correlação entre Absorbância e Peso Seco da *E. coli* MC1061**.** 70

Figura 14: Curva de Calibração de amostras de soluções de mercúrio em diferentes concentrações (0,001 a 0,01 µg/L) preparadas em água deionizada. 73

Figura 15: Curva de Calibração de amostras de soluções de mercúrio em diferentes concentrações (0,1 a 20 µg/L) preparadas em água deionizada. 73

Figura 16: Curva de Calibração de amostras de soluções de mercúrio em diferentes concentrações (0, 001 a 1 µg/L) preparadas em água deionizada. 74

Figura 17: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Abril (A,B), Maio (C.D) e Julho (E,F) de 2012. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja). 79

Figura 18: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Agosto (A,B), Setembro (C.D) e Outubro (E,F) de 2012. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja). 83

Figura 19: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Novembro (A,B), Dezembro (C.D) de 2012. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja). 86

Figura 20: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Janeiro (A,B), Fevereiro (C,D) e Março (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), 89

Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Figura 21: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Abril (A,B), Maio (C,D) e Junho (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja). 93

Figura 22: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Julho (A,B), Agosto (C,D) e Setembro (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja). 97

Figura 23: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Outubro (A,B), Novembro (C,D) e Dezembro (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja). 101

Figura 24: Concentrações de mercúrio biodisponível nas amostras do ponto A. 103

Figura 25: Concentrações de mercúrio biodisponível nas amostras do ponto D. 104

Figura 26: Gráficos das curvas de calibração, Porto do Rio de Janeiro (losango azul) e Porto de Niterói (quadrado vermelho), Rio Iguaçu (triângulo verde) e Rio Meriti (círculo roxo) e as equações da reta, respectivamente. 112

Figura 27: Gráficos das curvas de calibração, Porto do Rio de Janeiro (triângulo azul) e Porto de Niterói (quadrado vermelho) do Rio Iguaçu (triângulo verde) e Rio Meriti (círculo roxo) lixiviados com HCl 1M. 114

Figura 28: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento). 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inventário da Emissão Antrópica de Mercúrio Total Global/Simulação por Modelo de Transporte de $Hg^{0.}$ 14

Tabela 2: Contribuição de Diferentes Setores na Emissão de Mercúrio no Brasil (1998 a 2002). 18

Tabela 3: Espécies de mercúrio e suas categorias. 21

Tabela 4: Transformações Mercuriais durante o Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio. 24

Tabela 5: Métodos usados na Quantificação do Mercúrio 31

Tabela 6: Biossensores detectores de mercúrio mais recentes. 40

Tabela 7: Biossensores microbianos recombinantes usando genes *luc* ou *lux* como repórter luminescente. 43

Tabela 8: Equipamentos e reagentes. 52

Tabela 9: Etapas dos banhos de descontaminação. 53

Tabela 10: Meio Utilizado para o Experimento Luminométrico. 55

Tabela 11: Composição dos Meios LB Broth e LB Ágar. 56

Tabela 12: Soluções de mercúrio utilizadas no presente estudo. 57

Tabela 13: Localização dos pontos de coleta. 66

Tabela14: Resultados dos Ensaios Luminométricos em URL para a água deionizada. 72

Tabela 15: Resultados dos ensaios de simulação com salinidade. 72

Tabela 16: Resultados dos Ensaios Luminométricos da curva de calibração com soluções de mercúrio(0,001 a 20 µg/L). 72

Tabela 17: Resultados dos Ensaios Luminométricos da curva de calibração com soluções de mercúrio (0,001 a 1 µg/L). 74

Tabela 18: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas no mês de Abril, Maio e Julho de 2012. 78

Tabela 19: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Abril, Maio e Julho de 2012. 80

Tabela 20: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas no mês de Agosto, Setembro e Outubro de 2012. 82

Tabela 21: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Agosto, Setembro e Outubro de 2012. 84

Tabela 22: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Novembro e Dezembro de 2012. 85

Tabela 23: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Novembro e Dezembro de 2012. 86

Tabela 24: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2013. 88

Tabela 25: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2013. 90

Tabela 26: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Abril, Maio e Junho de 2013. 92

Tabela 27: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Abril, Maio e Junho de 2013. 94

Tabela 28: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Julho, Agosto e Setembro de 2013. 96

Tabela 29: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Julho, Agosto e Setembro de 2013. 98

Tabela 30: curva de calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2013. 100

Tabela 31: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2013. 102

Tabela 32: Resultados da Correlação de Spearman para A fundo, A meio e A superfície, respectivamente. 108

Tabela 33: Resultados da Correlação de Spearman para D fundo e D superfície, respectivamente. 108

Tabela 34: Resultados da Comparação dos métodos. 110

Tabela 35: Curva de calibração com amostras ambientais de sedimento do Porto do Rio de Janeiro e Porto de Niterói lixiviados com água da Baía de Guanabara. 111

Tabela 36: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento) no lixiviados com água da Baía de Guanabara. 112

Tabela 37: Curva de calibração com amostras ambientais de sedimento do Porto do Rio de Janeiro e Porto de Niterói lixiviados com HCl 1M. 113

Tabela 38: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de solo) no lixiviados com HCl 1M. 114

Tabela 39: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento). 115

Tabela 40: Custo de procedimento experimental de Análise usando Biossensor. 120

COSTA, Gisele dos Santos. Avaliação da Aplicabilidade de um Biossensor Microbiano para Determinação de Mercúrio Biodisponível em Amostras da Baía de Guanabara. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

O mercúrio pode ser considerado um dos elementos de maior potencial tóxico graças à sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação ao longo das cadeias tróficas. O uso crescente do mercúrio pelo homem tem provocado sensíveis alterações em seu ciclo biogeoquímico, comprometendo a saúde de populações humanas expostas. A contaminação com algumas de suas espécies químicas, como o metilmercúrio, tem causado um número significativo de mortes humanas em várias partes do mundo. De tal modo que o reconhecimento do perigo deste contaminante resultou em legislações mais rígidas e modificações de processos tecnológicos em todo o mundo. A contaminação por mercúrio também pode ser observada ao redor da Baía de Guanabara, na região sudeste do Brasil, pois esta possui atividades industriais e portuárias intensas, agregadas a um complexo pólo petroquímico. Em virtude de diversas espécies de mercúrio apresentarem comportamentos diferenciados, observou-se a necessidade de se buscar métodos que fossem além da determinação quantitativa total. Neste contexto procurou-se utilizar a técnica de sensores específicos, os biossensores, na qual se procura identificar a espécie de mercúrio biodisponível. A cepa *Escherichia coli* MC1061 foi aplicada na detecção da fração biodisponível do mercúrio presente em amostras aquosas e sedimento. As amostras aquosas foram coletadas de abril/2012 a dezembro/2013, em dois locais da Baía de Guanabara, já o sedimento foi coletado em quatro localidades (Porto do Rio de Janeiro, Porto de Niterói, Rio Iguaçu e Rio Meriti). A bioluminescência produzida por *Escherichia coli* MC1061 se apresentou como uma técnica analítica sensível com potencial de aplicação para detecção de mercúrio biodisponível, pois os valores de desvio padrão em todos os ensaios foram baixos com os valores de CV < 10% indicando baixa dispersão e valores homogêneos, tanto nas amostras aquosas como nos sedimentos. Nos pontos A e D, o mês de setembro de 2012 apresentou os maiores valores de mercúrio biodisponível (0,352 a 0,765 µg/L). Sendo as amostras de superfície as que apresentaram valores acima da Resolução CONAMA n° 357/ 2005 (0,2 µg/L). Nas análises de correlação de Spearman duas variáveis apresentaram resultados

significativos no ano de 2012, pH no ponto A meio e salinidade no ponto D superfície. Com relação à validação do método, foi possível obter 99% do mercúrio biodisponível no biossensor microbiano e na metodologia tradicional. Os resultados mostraram que os dois métodos de lixiviação testados foram capazes de lixiviar mercúrio biodisponível das amostras de sedimento e, portanto, foi comprovado seu potencial de aplicação. O sedimento do Rio Meriti apresentou uma fração de mercúrio biodisponível maior que as outras amostras (0,847 µg/Kg de sedimento). Os resultados obtidos comprovam a eficiência da tecnologia proposta e ainda, a importância da avaliação da biodisponibilidade do metal no ambiente, para definir normas ambientais aceitáveis, conduzir avaliações de risco ambiental, e ainda, estabelecer políticas ambientais.

COSTA, Gisele dos Santos. Evaluation of applicability of a Microbial Biosensor for Determination of Mercury Bioavailable in samples of Guanabara Bay**.** Rio de Janeiro, 2015. Thesis (Doctorate in Science) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

The mercury can be considered one of the greatest potential toxic elements thanks to its bioaccumulation potential and Biomagnification along the trophic chains. The increasing use of mercury by man has caused significant changes in its biogeochemical cycle, compromising the health of exposed human populations. Contamination with some of its chemical species such as methylmercury, has caused a significant number of human deaths around the world. Such that the recognition of the danger of contaminating resulted in more stringent laws and modifications of technological processes in the world. The mercury contamination can also be seen around the Guanabara Bay, in southeastern Brazil, as this has intense industrial and port activities, aggregate to a complex petrochemical complex. In view of various species of mercury present different behaviors, there is a need to seek methods which were beyond the total quantitative determination. In this context it is tried to use a specific technique sensors, biosensors, in which one seeks to identify the species of bioavailable mercury. The Escherichia coli strain MC1061 has been applied in the detection of the bioavailable fraction of the mercury present in aqueous and sediment samples. Aqueous samples were collected from April / 2012 to December / 2013 in two locations of Guanabara Bay (points A and D), as the sediment was collected in four locations (Port of Rio de Janeiro, Porto de Niterói, Rio and Iguaçu Rio Meriti). The bioluminescence produced by Escherichia coli MC1061 introduced as a sensitive analytical technique with potential application for mercury detection bioavailable because the standard deviation values in all the tests were with low CV values <10% indicating low dispersion and homogeneous values in both aqueous samples such as sediments. In A and D, the month of September 2012 showed the highest bioavailable mercury values (from 0.352 to 0.765 µg/L). Since the surface of the samples that showed values above the CONAMA No. 357/2005 (0.2 µg/L). In Spearman correlation analysis two variables showed significant results in 2012, pH at point A through point D and salinity in the surface. Regarding the method validation, it was possible to obtain 99% of bioavailable mercury in microbial biosensor and traditional methodology. The results showed that both leaching methods tested were able to leach the mercury bioavailable pellet samples and thus

it was demonstrated its potential application. The Meriti River sediment had a mercury bioavailable fraction larger than the other samples (0.847 µg/Kg pellet). The results demonstrate the importance of evaluating the zinc bioavailability in the environment, to define acceptable environmental standards, conduct environmental risk assessments, and even establish environmental policies.

LISTA DE SIGLAS

AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ATSDR	Agency for Toxic Substance and Disease Registry
BID	Banco Internacional de Desenvolvimento
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
DQO	Demanda Química de Oxigênio
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CV	Coeficiente de Variação
CWA	Clean Water Act
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
DO_{600}	Densidade Ótica no Comprimento de Onda de 600 nm
DPC	Diretoria de Portos e Costas
EMGEPRON	Empresa Gerencial de Projetos Navais
EQ	Escola de Química
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GEF	Global Environmental Facility
GFP	Green Fluorescente Protein (Proteína Verde Fluorescente)
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JICA	Japan International Cooperation Agency
LB	Luria Bertani
MeHg	Metilmercúrio
NOAA	National Oceanic and Atmospheric Administration
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDBG	Programa de Despoluição da Baía de Guanabara
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppb	Partes por bilhão (SI)
PPi	Ânion Pirofosfato
URL	Unidades Relativas de Luz
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

ÍNDICE GERAL

1: INTRODUÇÃO 1

2: OBJETIVOS 9

3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 10
3.1 USOS DO MERCÚRIO AO LONGO DO TEMPO 10
3.2 PROPRIEDADES DO MERCÚRIO 11
3.3 FONTES DO MERCÚRIO 12
3.3.1 FONTES NO BRASIL 16
3.4 CICLOS BIOGEOQUÍMICOS 19
3.5 TOXICIDADE 23
3.6 ESPECIAÇÃO 30
3.6.1 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO 30
3.7 BIOSSENSOR COMO ELEMENTO DE DETECÇÃO 36
3.7.1. BIOSSENSORES MICROBIANOS 40
3.8 BAÍA DE GUANABARA 45
3.9 CONSIDERAÇÕES DO PRESENTE ESTUDO 50

4: MATERIAL E MÉTODOS 52
4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES 52
4.1.1 DESCONTAMINAÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS 52
4.1.2 LUMINOSKAN COMO ELEMENTO DE TRANSDUÇÃO 53
4.1.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE BIOLUMINESCÊNCIA 54
4.2 COMPONENTE BIOLÓGICO: *ESCHERICHIA COLI* MC1061 54
4.2.1 PREPARO DE MEIOS E SOLUÇÕES 54
4.2.1.1 MEIO MÍNIMO DE SAIS 55
4.2.1.2 MANUTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DE CÉLULAS 55
4.2.1.3 SOLUÇÃO DE LUCIFERINA 56
4.2.1.4 SOLUÇÕES DE MERCÚRIO 57
4.2.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E CONSTRUÇÃO DA CURVA DE PESO SECO 58
4.2.2.1 CURVA DE CRESCIMENTO 58
4.2.2.2 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO 58
4.2.2.3 PREPARO DAS CÉLULAS 59
4.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO 60

4.3.1 BRANCOS REACIONAIS 60
4.3.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MERCÚRIO 61
4.3.2.1 SOLUÇÕES AQUOSAS 61
4.3.2.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS REAIS 62
4.3.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SEDIMENTOS E MÉTODO DE LIXIVIAÇÃO 62
4.4 EXPERIMENTOS DE BIOLUMINESCÊNCIA 64
4.5 DETERMINAÇÃO POR VAPOR FRIO 65
4.6 ÁREA DE ESTUDO 65
4.6.1 LOCALIDADES 65

5: RESULTADOS E DISCUSSÃO 68
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA 68
5.1.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO 68
5.1.2 CORRELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO 69
5.2 AMOSTRAS REAIS 70
5.2.1 AMOSTRAS AQUOSAS 70
5.2.1.1CURVA DE CALIBRAÇÃO 71
5.2.1.2CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MERCÚRIO NAS AMOSTRAS AMBIENTAIS 75
5.2.1.3COMPARAÇÃO RESULTADOS OBTIDOS COM BIOSSENSOR COM AMOSTRAS AQUOSAS E COM METODOLOGIA PADRÃO 109
5.2.2 AMOSTRAS DE SEDIMENTOS 110
5.2.2.1LIXIVIAÇÃO E CURVA DE CALIBRAÇÃO 111
5.2.2.1.1 LIXIVIAÇÃO COM ÁGUA DA BAÍA DE GUANABARA 111
5.2.2.1.2 LIXIVIAÇÃO DO HCL 1M 113

6: ANÁLISE DE CUSTOS DA TECNOLOGIA PROPOSTA 117

7: CONCLUSÕES 121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 123

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios de sua existência, o homem, como qualquer outra espécie habitante do planeta, interage com o ambiente à sua volta, modificando-o e transformando-o de acordo com suas necessidades. Os resultados dessa modificação são facilmente percebidos ao longo da história. Ainda, nas últimas décadas do século XX a preocupação com o ambiente tem se disseminado na sociedade, a princípio individualmente, fluindo para as organizações sociais, inclusive as escolas, desde o ensino fundamental.

A humanidade em sua narrativa apresenta descobertas de novas fontes, domínio de técnicas, transformações e novas aplicações de energia. No trajeto do seu desenvolvimento, desde as primeiras civilizações, tais descobertas proporcionaram melhoria na qualidade de vida (como na Revolução Industrial, por exemplo, que tornou possível a produção em larga escala, acarretando transformações sociais e econômicas), e simultaneamente, o aumento dos impactos antropogênicos no ambiente (LEFF, 2009).

O desenvolvimento da sociedade organizada sempre esteve vinculado ao controle da água. Os rios, por exemplo, proporcionavam a água para beber, facilitavam o deslocamento de pessoas e produtos, eram utilizados como fonte de irrigação e de energia. Nos últimos cem anos, o desenvolvimento industrial potencializou uma crescente capacidade de transportar e controlar a água, o que resultou em um aumento da capacidade de consumir mais, desperdiçar mais e poluir mais (PNUD, 2006).

Com o avanço da tecnologia, o grau de interferência no ambiente aumentou bastante. Segundo CUNHA & GUERRA, (2012) estas interferências são efetuadas de forma inadequada em todo mundo. São diversos os benefícios econômicos e sociais que explicam a interferência humana nos ciclos naturais. No ciclo hidrológico, as alterações afetam o funcionamento do sistema de bacia de drenagem (nos depósitos e transferências das águas), a capacidade de absorção e distribuição das águas nos seus trajetos originais (sejam fluviais ou litorâneos). Ocasionando mudanças no relevo (erosão e deposição ficam com seu balanço alterado, este terá sua duração alterada, encurtado ou acelerado). Estas alterações raramente são

sentidas somente no ponto em que ocorreu a interferência (CUNHA & GUERRA, 2012).

Nos ambientes marinhos, o conjunto de fatores que estabilizam os oceanos e o controlam seu equilíbrio não está completamente compreendido, mas sabe-se que impactos nestes ambientes poderão afetar ou transformar gravemente todo o ambiente terrestre (CUNHA & GUERRA, 2012). Muitas das alterações sofridas nos ambientes litorâneos devem-se principalmente aos fatores demográficos (as áreas costeiras mundiais são densamente povoadas), e ainda, a própria fragilidade dos ambientes litorâneos, muitas linhas costeiras são batidas por ondas de alta energia (PEREIRA & SOARES-GOMES, 2002).

Desta forma, as interferências ocasionaram um aumento na introdução de contaminantes no ambiente, liberados para atmosfera, solos, sedimentos e sistemas aquáticos, na forma: de *matéria orgânica, poluentes orgânicos e um grande número de compostos metálicos* (BOENING, 2000).

A consciência ecológica gerada no século XX promoveu políticas públicas em matéria de meio ambiente e desenvolvimento sustentável, e iniciou o estabelecimento de leis com níveis supostamente seguros para exposição humana a diversos contaminantes (CARSON, 1962; CARVALHEIRA, 2012).

Entretanto, a crise ambiental segue avançando, se acentuando e se complexificando (LEFF, 2009). Crise esta decorrente da crescente busca por recursos naturais, do seu uso intensificado, e por vezes inadequado, das tecnologias, aliado ao avanço das atividades industriais, por exemplo a extração e mineração. Esses últimos são os frequentemente apontados como os responsáveis pela contaminação dos diferentes sistemas: *atmosféricos, aquáticos e terrestres* (LEFF, 2009; CUNHA & GUERRA, 2012).

As alterações provocadas nesses sistemas podem ser mais ou menos abrangentes, localizadas ou extensivas, criando gradientes de interferência nos macrocompartimentos da biosfera (CUNHA & GUERRA, 2012). Quando liberados em grande quantidade no ambiente, os impactos podem ser imediatos, e a recuperação pode ser lenta e gradual, cumulativa, sendo um tema preocupante durante anos ou décadas. No que se refere aos riscos dos processos produtivos,

sobretudo aqueles causados pelos agentes químicos, geralmente ultrapassam os limites da área física dos locais de trabalho (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

Considerar a manutenção da qualidade ambiental é questão decisiva para a sociedade atual e para as gerações futuras. Atualmente a principal questão, abordada pelas agências ambientais, não é se um ambiente está contaminado, mas o quão grave é a contaminação (LACERDA & MALM, 2008). Os problemas e os desafios são inúmeros na busca por soluções que, na sua grande maioria, seguem, ainda, a ótica da remediação e da minimização dos danos ambientais. O desenvolvimento de alternativas seguras exige mudanças de paradigmas, ações que nos levam não à substituição de problemas, mas a uma real solução. Entende-se que esta é a ótica correta para a busca de soluções para um real controle da poluição ambiental (BARBIERE, 2007; CUNHA & GUERRA, 2012).

Em ecossistemas aquáticos, por exemplo, a poluição ambiental pode estar associada à ineficácia nos tratamentos dos efluentes domésticos e industriais, e ainda de adjuntos, como por exemplo, muitas regiões não possuem saneamento básico.

Neste contexto está a Baía de Guanabara, um complexo estuarino, de aproximadamente 400 km^2, para vários rios e canais que cercam as cidades do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, São Gonçalo, Niterói e outras cidades menores. É uma área importante com relação à produção pesqueira, que recebe efluentes domésticos e industriais não tratados, sendo a região impactada por matéria orgânica, óleo e um grande número de outros compostos, incluindo os metais pesados (SEIXAS *et al.*, 2007). Isso se deve à intensa atividade portuária, à presença de um complexo pólo petroquímico, além do despejo de esgoto doméstico e efluentes industriais não tratados, provenientes de uma área densamente populosa com mais de 10.000 indústrias (JABLONSKI *et al.*, 2006). O volume total da bacia hidrográfica da Baía de Guanabara é estimado em $2,2 \times 10^9$ m^3 (JICA,1994).

A biota desta região está constantemente exposta a uma infinidade de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriunda de diversas fontes de emissão. Estes contaminantes são capazes de interagir com o organismo vivo causando múltiplas alterações, que podem gerar consequências em populações, comunidades

ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (CANELA, 1995).

A Baía de Guanabara é um dos ecossistemas mais poluídos do país (PDRH-BG, 2005) e o desmatamento histórico da Mata Atlântica, a constante emissão de esgoto e de lixo nas águas da Baía, a poluição industrial, a poluição causada pelos derramamentos de óleo e a poluição do ar são fatores que contribuem ativamente para a permanência deste quadro de profunda degradação ambiental (COELHO, 2007).

Programas de despoluição tem sido matéria de uma série de discussões envolvendo o Estado, as indústrias, as diversas empresas, as organizações não governamentais (ONGs) e a população como um todo. Existe o consenso que a Baía de Guanabara necessita de um plano emergencial de gestão ambiental. Dentre estes, o Programa de Despoluição da Baía de Guanabara (PDBG) prevê a diminuição de carga de nutrientes e de metais para a baía, para tanto investiu cerca de R$ 1,6 bilhão de 1994 até 2009 (dado da avaliação realizada pelo Banco Internacional de Desenvolvimento – BID, em 2009).

Porém, uma avaliação de sua sustentabilidade não foi ainda realizada. Tais projetos possibilitaram a promoção de ações do *Plano Guanabara Limpa*, como Baía sem Lixo, o início das obras de saneamento da Marina da Glória, a reconstrução das Estações de Tratamento de Esgoto, coleta e tratamento de esgoto de Alcântara e o programa Sena Limpa e revitalização dos emissários submarinos da Barra e de Ipanema (GUANABARA LIMPA, 2014).

Segundo CRUZ e colaboradores (1996), pode-se relacionar a qualidade ambiental de uma baía com sua localização geográfica, dimensões, rede de drenagem e as características do litoral no qual se encontra, uma vez que estes fatores são determinantes na circulação e renovação de suas águas. A área que apresenta melhor qualidade das águas é delimitada pelo canal central de circulação e recebe um grande volume de troca de água, promovido pelas correntes de maré (CONVÊNIO PETROBRAS-DPC-EMGEPRON, 2004).

A bacia da Baía de Guanabara sofre modificações desde o início do século XIX. Como consequências, a renovação e a qualidade das águas têm sido prejudicadas, acarretando uma elevada taxa de sedimentação.

De acordo com a USEPA (2000) os estuários podem funcionar como reservatórios de poluentes derivados da bacia de drenagem. Quando corpos hídricos dulcícolas se encontram com águas salinas da região costeira, os processos físico-químicos típicos levam a precipitação e sedimentação de boa parte dos poluentes carreados pelas águas dos rios na forma dissolvida, e com isso, altas concentrações de metais tóxicos e hidrocarbonetos são evidenciadas nos sedimentos e alterações nos seres aquáticos.

Outra implicação da poluição da baía é o processo de eutrofização, causado por elevadas concentrações de nutrientes. Tal processo altera a qualidade da água, através da redução de oxigênio dissolvido (OD), devido ao intenso consumo na produção biológica. A baixa oferta de oxigênio acarreta em mortes de peixes e na perda da biodiversidade aquática (GODOY *et al*., 1998; BRANCO, 2007).

Segundo PARAQUETTI e colaboradores (2004), nos efluentes das atividades antrópicas, os compostos metálicos possuem baixas concentrações devido a sua baixa solubilidade em água. No entanto, em áreas estuarinas, os contaminantes metálicos estão geralmente complexados ao material particulado em suspensão, podendo assim, se difundir para áreas mais distantes de suas fontes. Por isso, em regiões próximas a complexos industriais, há um risco considerável de que a contaminação por metais pesados desencadeie um desequilíbrio nos seus ecossistemas (DIAS-JUNIOR *et al*., 1998).

Concentrações de mercúrio elevadas foram detectadas próximo à desembocadura do rio São João de Meriti (BARROCAS, 1994; WASSERMAN *et al*., 2000). No entanto, a biota da Baía de Guanabara apresenta níveis de mercúrio baixos, abaixo de 200ppb, inclusive em peixes (KEHRIG *et al*., 1998; RODRIGUES, 2006; RODRIGUES, 2010), para efeito de mercúrio em peixes observamos o limite de 500ppb em filés de peixes, para inviabilizar seu comércio – o valor limite para consumo humano definido pela Organização Mundial de Saúde (CARVALHEIRA, 2012). Em sedimentos superficiais os níveis podem alcançar 10ppm em pontos

específicos do setor noroeste, variando de 1 a 2 ppm nos demais setores (BARROCAS, 1994; WASSERMAN *et al*., 2000).

Do ponto de vista dos compartimentos ambientais, são nos solos e sedimentos onde ocorre a maior acumulação dos metais. A contaminação destes por metais pesados pode acarretar sérias consequências sobre componentes funcionais dos ecossistemas. Nas plantas, por exemplo, quando são absorvidos, os metais passam a participar da cadeia trófica, contaminando o homem e animais (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Geralmente são encontrados como contaminantes metálicos: chumbo, cromo, zinco, mercúrio, cádmio e cobre (MAFFIA & DAVIS, 2001).

Em virtude do reconhecimento do perigo destes contaminantes as nações do mundo buscam por legislações mais rígidas e substituições por processos tecnológicos mais limpos. Atualmente, a legislação ambiental ainda é insuficiente para lidar adequadamente com estas questões, e assim, diversas áreas do planeta continuam a receber cargas pesadas de poluentes.

Quando se aborda a poluição por metais pesados, sabe-se que são elementos que ocorrem naturalmente no ambiente e constituem menos de 1% das rochas. Tais elementos podem causar danos ao ambiente, se as suas concentrações forem elevadas (COSTA *et al.*, 2004). Dentre os metais pesados encontrados na natureza, o *mercúrio* é considerado o mais tóxico. Este metal ocorre naturalmente no ambiente, mas seu uso indiscriminado vem trazendo o aumento das suas concentrações no meio ambiente e prejudicando a biota (COSTA, 2010). Grande parte do mercúrio encontrado no meio ambiente tem origem nas fontes antropogênicas, que se dão por meio da queima de combustíveis fósseis, na amalgamação de ouro com mercúrio, em rejeitos de indústrias, em incineradores de lixo e também no uso de agrotóxicos com mercúrio (MITRA, 1986).

Existem ainda questões relevantes sobre o interesse na determinação dos seus compostos tóxicos e sobre o ponto de vista da contaminação, do potencial de bioacumulação e biomagnificação pelos organismos.

O estudo da espécie química é de grande importância para compreensão da sua toxicologia, e por tratar de uma questão de saúde pública, quando consideramos os acidentes que já envolveram este metal pesado. A questão da biodisponibilidade

deve ser interpretada como o ponto crucial na determinação da toxicidade do metal (COSTA, 2010). A biodisponibilidade de poluentes pode ser avaliada em diferentes matrizes ambientais. Em sedimentos, por exemplo, uma substância está disponível quando se encontra em formas fracamente ligadas (MACHADO *et al.*, 2008). Enquanto que em águas a substância está disponível quando dissolvida, ou ainda, quando presente na circulação interna de um organismo vivo (CARVALHEIRA, 2012).

Na investigação das metodologias de detecção, pode ser observado que os métodos tradicionais não permitem distinguir poluentes que estão *disponíveis* para os sistemas biológicos dos que estão *inertes* ou *indisponíveis*, uma questão especial em relação aos metais tóxicos (COSTA, 2010).

Desta forma, os biossensores surgem como alternativa na detecção de poluentes e se apresentam como nova ferramenta analítica a ser aplicada no diagnóstico das condições do meio ambiente (TECON & MEER, 2008), sendo promissores graças à seletividade e ao baixo custo deste tipo de tecnologia (SALGADO, 2001; MELO, 2008).

Os sensores biológicos podem ser mais lentos e menos duráveis, precisos ou seletivos que técnicas analíticas instrumentais, mas possuem a vantagem de proporcionar informação sobre *biodisponibilidade* ou *biotoxicidade* da matriz. Dentre estes sensores, os biossensores 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 mais baratos, uma vez que o componente biológico não precisa ser isolado (YAGY, 2007).

No presente estudo, a ferramenta analítica utilizada se baseia em um biossensor composto pela bactéria geneticamente modificada *Escherichia coli* MC1061 (VIRTA *et al.*,1995), capaz de detectar mercúrio biodisponível, através da reação da enzima luciferase do vaga-lume (*Firefly luciferase*), respondendo quantitativamente quando exposta ao mercúrio, através de bioluminescência.

Este trabalho está assim estruturado:

- Capítulo 1: Trata da introdução do trabalho onde é apresentado um panorama geral do assunto.

- Capítulo 2: Apresenta os objetivos do presente projeto.

- Capítulo 3: Descreve os embasamentos teóricos pertinentes à análise dos resultados, através de uma revisão bibliográfica referentes ao tema desta tese.

- Capítulo 4: Descreve as metodologias e materiais utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.

- Capítulo 5: Apresenta os resultados obtidos bem como as discussões comparando como os resultados encontrados na literatura.

- Capítulo 6: Avaliação econômica envolvida no presente trabalho.

- Capítulo 7: Relata as conclusões obtidas ao longo do estudo, as considerações sobre o tema da tese e as sugestões para a continuidade da linha de pesquisa.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar a aplicabilidade e validação de um biossensor, que utiliza como elemento biológico o micro-organismo geneticamente modificado *Escherichia coli* MC1061 (VIRTA *et al.*, 1995) e como transdutor um luminômetro, para a detecção do mercúrio biodisponível em amostras ambientais da Baía de Guanabara.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre o mercúrio englobando fontes e usos, contaminações, ciclo biogeoquímico, toxicidade, especiação, e diversos métodos de quantificação do metal pesado incluindo os biossensores.

3.1 USOS DO MERCÚRIO AO LONGO DO TEMPO

O homem já se relaciona com o mercúrio desde épocas remotas, na pré-história usava um minério do mercúrio de cor avermelhada, o cinábrio ou sulfeto de mercúrio, para escrever e desenhar nas paredes de cavernas e em objetos de argila (Figura 1). Algumas evidências mostram o uso do metal como parte de rituais de sepultamento na Grécia e no Egito, no ano de 1500 a.C. (GRAEME & POLLOCK, 1998; STILLMAN, 2003), e ainda o uso terapêutico, pois os seus efeitos tóxicos eram desconhecidos. Acredita-se que o primeiro registro sobre o uso do mercúrio tenha sido escrito por volta do ano 400 a.C, por Aristóteles em sua obra "*Meteorologia e De Anima"*, denominando-o *Hydrargyrum*, que quer dizer água prateada. Por isso, a escolha de seu símbolo atômico Hg (BARROCAS, 1994; AZEVEDO, 2003; MIRANDA *et al.,* 2007). Sabe-se que na Idade Média o metal era usado na alquimia. Ao longo dos anos, o conhecimento do homem sobre as propriedades químicas do mercúrio foi expandido e, provavelmente, o primeiro uso comercial do mercúrio tenha sido a amalgamação (MIRANDA *et al.,* 2007).

Figura 1: Uso do mercúrio em pinturas e na alquimia (Fonte: http://www.informe10.com/img/fotos; http://palacios49.files.wordpress.com/2008/10/alquimia4.jpg)

Historicamente, a amalgamação do mercúrio foi usada para extrair metais preciosos (isto é, ouro, prata) do minério do metal. Por exemplo, o ouro é amalgamado com mercúrio, a amálgama é então aquecida para assim volatilizar o mercúrio e por consequência recuperar o ouro (VASCONCELLOS, 2010).

Os romanos tornaram o uso do mercúrio na extração de ouro e de outros metais muito popular (GRAEME & POLLOCK, 1998), e no século XVII, época em que a prioridade era o acúmulo de metais, grandes quantidades de mercúrio foram usadas para extrair prata em minas por todo o continente americano. No mesmo período, esse metal teve participação fundamental no desenvolvimento de instrumentos de medição, em processos industriais, e ainda usado como princípio ativo em pomadas, no século XVIII, mesmo se conhecendo as propriedades biocidas deste metal. Essas pomadas foram usadas durante anos para tratamento de doenças de pele e sífilis (VASCONCELLOS, 2010).

Na segunda metade do século XVIII, os riscos à saúde envolvendo o uso do mercúrio começaram a ser percebidos. O metal era consumido na mineração, e a maior parte do mercúrio vinha das Minas de Almadén, na Espanha, extraído por escravos (AZEVEDO, 2003). Espanha, Itália, Estados Unidos, México, China e Japão, apresentam as formações geológicas mais abundantes em minérios do mercúrio. Nas minas de Almadén, há registros que o início da exploração de mercúrio ocorreu há pelo menos dois mil anos. Na China há registros de que o uso de cinabre como pigmento ocorreu há três mil anos (VASCONCELLOS, 2010). O mercúrio metálico é obtido por aquecimento do cinabre seguido de condensação (BOENING, 2000). No Brasil, não existem registros de minas de mercúrio, por este motivo todo o mercúrio usado no país é importado (BARROCAS, 1994).

No Brasil, em muitos consultórios odontológicos, ocorre, de forma discreta, uma migração para técnicas que não utilizam amálgama, e o resíduo gerado nestes pode ser guardado de maneira segura no próprio local (VASCONCELLOS, 2010).

3.2 PROPRIEDADES DO MERCÚRIO

O mercúrio elementar (Hg^0) é o único metal que pode ser encontrado no estado líquido em temperatura ambiente, passando facilmente para o estado gasoso nessa

mesma condição. Este metal pode ocorrer naturalmente no meio ambiente, na água, na biota, na atmosfera e na crosta terrestre (em sua forma elementar e nas formas minerais do sulfeto de mercúrio como cinábrio, metacinábrio e hipercinábrio). Pode se apresentar sob as formas inorgânicas e/ou orgânicas, ou ainda, associado a outros elementos. Suas propriedades físico-químicas estão intimamente relacionadas ao ânion ao qual o metal se liga, sendo que o nitrato e o sulfato possuem elevada hidrossolubilidade, enquanto o cloreto é bastante solúvel em solventes orgânicos (REIS, 2008).

Outra característica do metal é a absorção da luz ultravioleta a 253,7 nm, de forma bastante intensa, o que é aproveitado em alguns métodos analíticos, com alta sensibilidade de detecção (AZEVEDO, 2003).

O metal pode ser encontrado nas diversas formas químicas: *solúvel, trocável, ocluso ou fixado* aos minerais, precipitado com outros compostos, na biomassa e complexado na matéria orgânica. As formas químicas que definem a toxicidade, que se caracteriza por influenciar: no bloqueio de grupos funcionais essenciais à atuação de uma biomolécula, na competição e deslocamento de outros metais presentes no sistema, e na modificação da conformação de sítios ativos e da estrutura quaternária de proteínas (MANO *et. al.*, 2005). E conforme o estado molecular do elemento mercúrio, a sua toxicidade varia significativamente. Devem ser distinguidas três formas químicas principais: os vapores de mercúrio elementar, os sais de mercúrio e os compostos organomercúricos. A forma mais volátil é Hg^0, sendo que o dimetilmercúrio também pode volatilizar. Sua volatilidade explica a sua baixa concentração em águas não poluídas (HORVAT, 1996).

3.3 FONTES DE MERCÚRIO

Segundo WANG e colaboradores (2004), as fontes de mercúrio podem ser naturais, antrópicas e de reemissão. A principal fonte de mercúrio se dá através de emissões gasosas, que podem ter origem natural ou antrópica.

As fontes naturais de mercúrio são oriundas do desgaste natural da crosta terrestre, podendo estar associado a outros elementos, sendo o *enxofre* o mais comum. A sua forma metálica é obtida pelo aquecimento do sulfeto de mercúrio

(HgS) a seco, seguido de condensação (MIRACONI *et al.*, 2000). No interior da crosta terrestre, as concentrações de mercúrio podem variar entre 21 e 56 ppb, dependendo da profundidade onde é encontrado (BARKAY *et al.* 2003).

A associação do metal com enxofre leva à formação do minério cinábrio (HgS), composto de cor vermelha, cujas maiores reservas encontram-se na Espanha e na Itália (CANELA, 1995), dentre outras reservas importantes como China, Estados Unidos, Canadá, Rússia, Irlanda, Turquia, Filipinas e México (BIESTER *et al.*, 1999).

Outra fonte importante é proveniente das emissões vulcânicas que contribuem com a liberação na atmosfera de aproximadamente 2.500 t ano^{-1} de mercúrio total (MARINS *et al.*, 2004), além da evaporação de sistemas aquáticos e erosão de depósitos minerais.

Dentre as fontes de origem antrópica, destacam-se: a emissão de efluentes industriais e urbanos; a queima de combustíveis fósseis, que é responsável por cerca de dois terços dos lançamentos (MARINS *et al.*, 2004), uma vez que o mercúrio se apresenta como impureza nessas fontes de energia; aterros sanitários, os quais contém uma infinidade de resíduos contendo mercúrio; e atividades industriais, agrícolas e mineradoras.

A produção anual de mercúrio vem sendo estimada em torno de 10.000 toneladas, sendo os seus maiores produtores o Canadá, a Rússia e a Espanha (GRIGOLETTTO *et al.*, 2008). O mercúrio pode ser despejado durante o processo de produção ou durante a eliminação e incineração de resíduos. Como exemplo, a indústria de cloro soda foi a principal fonte de poluição de mercúrio no Brasil até a década de 80, na qual o metal era utilizado como catalisador do processo de produção (LACERDA, 1997). Pode ser destacada ainda a produção de acetaldeído, polpa de papel, tintas, pesticidas, fungicidas, lâmpadas de vapor de mercúrio, baterias, produtos odontológicos, além de incineradores de lixo, amalgamação de mercúrio em extração de ouro, entre outros, como atividades emissoras de mercúrio (MIRACONI *et al.*, 2000).

Já a remissão de mercúrio ocorre através de uma remobilização deste metal de atividades antropogênicas anteriores, que estava acumulado ou depositado em compartimentos ambientais (NRIAGU & BECKER, 2003; LOPPI, 2001).

Estudos indicam que 200.000 toneladas de mercúrio foram emitidas para a atmosfera desde 1890, sendo aproximadamente 95% em solos, 3% nas águas oceânicas superficiais e 2% na atmosfera (MIRACONI *et al.*, 2000). A Tabela 1 apresenta um resumo das emissões resultantes de atividades humanas (ano de referência 2000). Nos Estados Unidos, estima-se que 8000 kg/ano de mercúrio são processados sendo 6000 kg/ano emitidos direto para a atmosfera (WILHELM, 2001). A Ásia o continente com a maior contribuição dos lançamentos, seguido pela África. Na China os números são bastante representativos, com 536 toneladas de mercúrio em 1999 e 586 toneladas em 2000 (LOHMAN *et al.,* 2008).

Tabela 1: Inventário da Emissão Antrópica de Mercúrio Total Global/Simulação por Modelo de Transporte de Hg^0 (LOHMAN *et al.,*2008).

País/Continente	Emissão anual de Hg 10^6 Kg/ano	Hg^0	Hg^{2+}	Hg_P
Estados Unidos	104 (1999)	60%	31%	9%
Canadá	8	54%	35%	11%
México	26	71%	20%	9%
Ásia	1204	57%	34%	9%
Europa	239	61%	32%	7%
América do Sul e Central	92	71%	23%	6%
África	407	65%	28%	7%
Oceania	125	55%	36%	9%
Total	2206			

Segundo LACERDA (2007) as estimativas de emissões de mercúrio para a atmosfera global sugerem um total de cerca de 6.000 t ano^{-1}, sendo cerca de 2.000 t ano^{-1} correspondentes à volatilização natural do Hg presente nos oceanos. Enquanto que cerca de 1.000 t ano^{-1} correspondem à reemissão de superfícies terrestres e 3.000 t ano^{-1} às emissões antrópicas. Destacando as principais fontes antrópicas nas indústrias químicas e na eletroeletrônica, e ainda, a queima de combustíveis fósseis.

As emissões provenientes do processamento de petróleo geram resíduos tóxicos e descargas atmosféricas que contém mercúrio. Em nível global, a queima de combustíveis fósseis emite para a atmosfera cerca de 1.500 t ano^{-1}. Deste total, cerca de 300 t ano^{-1} são emitidas pela geração de energia elétrica e 1.200 t ano^{-1} por outros usos industriais (FENG *et al.,* 2009).

Nas últimas décadas, uma quantidade considerável de pesquisas tem sido feita para melhorar inventários de emissões de mercúrio em nível global, incluindo aqueles países com economias de transição (FENG *et al.,* 2009).

A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2013) em seu último relatório sobre emissões globais de mercúrio, confirma o papel das mineradoras em pequena escala como emissoras de mercúrio e ainda ressalta que queima de carvão é um maiores componentes das emissões antropogênicas seguido pela produção de metais ferrosos e a produção de cimento. Uma grande quantidade de carvão é queimado em torno do mundo para gerar eletricidade, para executar plantas industriais, e para o aquecimento de casas. A emissão de mercúrio pela combustão do carvão emitida alguns países chegou a 475 toneladas de mercúrio em 2010, a maioria para geração de energia e utilização industrial. Tais emissões antropogênicas de fontes industriais podem estar subindo. Entretanto acreditava-se ter atingido o pico na década de 1970, pois houve uma diminuição durante duas décadas seguintes, e têm sido relativamente estável entre 1990 e 2005, mesmo com algumas indicações de ligeiros aumentos na emissões entre 2000 e 2005. Indicações gerais são que as emissões dos setores industriais têm aumentado novamente desde 2005.

De acordo com PIRRONE e colaboradores (2010) mudanças no clima global também podem complicar a resposta dos ecossistemas globais ao mercúrio, as reduções de emissões, através de efeitos em muitos aspectos de movimento e transformações químicas do mercúrio no ambiente. Por exemplo, o aumento das temperaturas influenciam as taxas de da produtividade biológica e as taxas de atividade bacteriana em ecossistemas de água doce e marinhos, o que possivelmente, levaria a conversão mais rápida de mercúrio inorgânico ao metilmercúrio.

Outra preocupação é que em muitas regiões as fontes pontuais não são adequadamente descritas (África, América do Sul e Ásia). Estas incertezas afetam o modelo de desenvolvimento, política ambiental e do bem-estar humano. Modelos de mercúrio para a atmosfera desenvolvidos nos últimos anos para avaliar a relação entre as regiões-fonte de emissão e regiões-receptoras mostram uma precisão limitada. A capacidade para determinar a precisão dos modelos é severamente

limitada pela falta de um inventário global de emissão que inclua uma melhor caracterização da emissão das fontes relacionada com as usinas de combustíveis fósseis nos países em desenvolvimento rápido. Pois nestes países a demanda de energia segue uma tendência de crescimento na próxima década (NOAA, 2012).

Recentemente, estudos em colaboração do laboratório de modelagem do *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) e a EPA vêm investigando os valores atuais das emissões globais de mercúrio (1° fase dessa investigação foi realizada em lagos nos Estados Unidos) para o desenvolvimento de um modelo matemático com objetivo de determinar e compreender as tendências temporais e espaciais (NOAA, 2012).

3.3.1 FONTES NO BRASIL

O Brasil não possui reserva de cinábrio, e assim, precisa importar todo mercúrio que necessita para a indústria eletroeletrônica, lâmpadas, aparelhos científicos, produção de tintas e pilhas, dentre outros setores químicos. Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (MDIC, 2013) apontam que entre janeiro e abril de 2013 foram importados 24.939 kg de mercúrio metálico, dos quais 18.113 kg foram procedentes dos Estados Unidos, 5.003 kg do Reino Unido, 960 kg da Alemanha e 863 kg do Japão.

Os resíduos dos materiais não tem controle e nem segregação especial, tendo como exceção as lâmpadas fluorescentes, que contam com empresas recicladoras, e já reciclaram 6,5 milhões de lâmpadas até 2000 e aterros licenciados para mercúrio (REIS, 2008). Embora uma pequena quantidade de mercúrio esteja contida em cada lâmpada, o efeito acumulativo e persistente do mercúrio proveniente de muitas lâmpadas é considerável. Por esse motivo as lâmpadas que contêm mercúrio devem ser separadas. Uma prática esta adotada em diversos países e no Brasil, em que muitas indústrias, universidades, órgãos públicos e empresas concessionárias de energia elétrica proíbem a disposição de suas lâmpadas no lixo. Por outro lado, diversos municípios nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais já gozam do benefício da coleta separada e da destinação adequada de suas lâmpadas de iluminação pública evitando assim que as mesmas tenham como destinação os aterros municipais. No processo, as lâmpadas são quebradas, com

exaustão e captura do mercúrio metálico emitido, e separação dos componentes metálicos (APLIQUIM, 2004).

O mercúrio subproduto da descontaminação de lâmpadas é usado na fabricação de novas lâmpadas ou de termômetro, manômetros, etc. (WINDMOLLER *et al.,* 2008). Dentre os equipamentos contendo mercúrio, utilizados nos Serviços de Saúde do Brasil, 55% são termômetros, 35% esfignomanômetros e 10% produtos químicos de laboratórios (MMA, 2010).

No Brasil, as emissões de mercúrio por fontes antrópicas (alguns tipos podem ser observados na figura 2) são inventariadas desde 1995 (LACERDA, 1997; LACERDA & MARINS, 1997; MOREIRA & PIVETTA, 1997; VAISMAN *et al*., 2003; LACERDA *et al*., 2007). Segundo LACERDA (1997), embora os dados sejam apenas locais ou por setores específicos são suficientes para hierarquizar a participação relativa de cada fonte na emissão total de Hg.

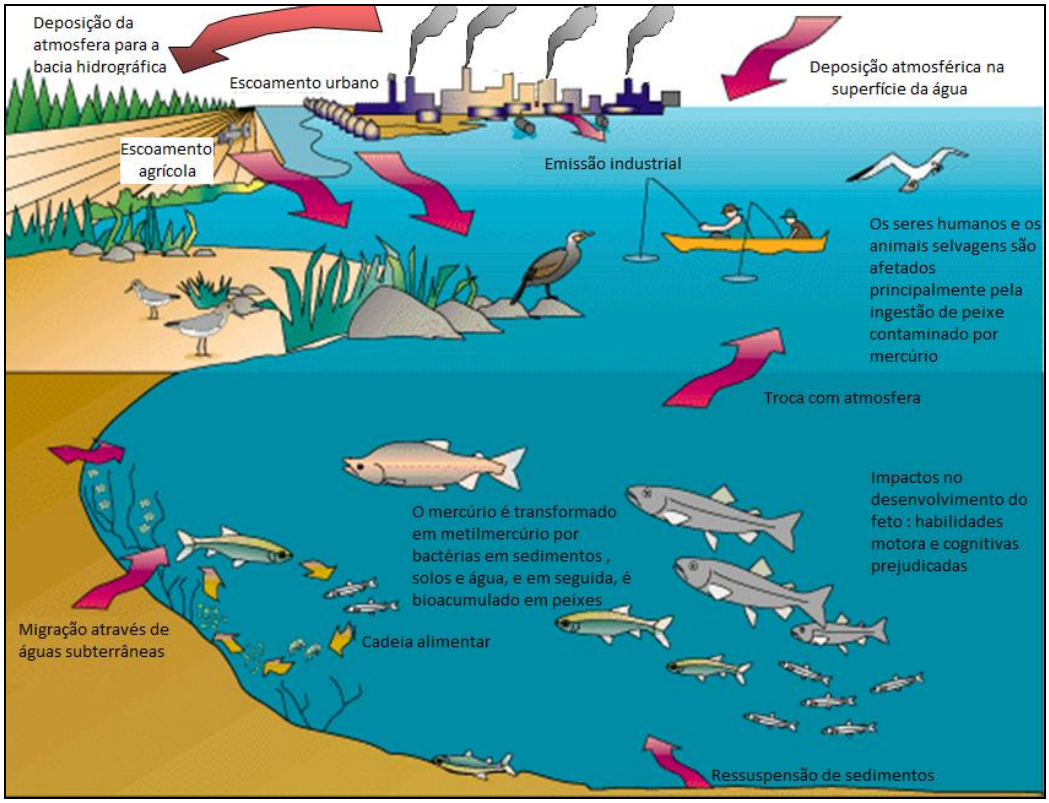

Figura 2: Algumas fontes emissoras de mercúrio e seu destino no ambiente (Adaptado de NOAA, 2012).

Estudos apontam que o Brasil importou, entre as décadas de 1970 e 1980, cerca de 160 t ano^{-1}, atingindo 340 t ano^{-1} em 1984 (LACERDA, 1997). As fontes industriais foram as responsáveis pela totalidade das emissões até 1970, quando se

percebeu uma mudança no controle das emissões industriais conhecidas (LACERDA, 1997). A partir deste momento a carga de mercúrio oriunda dos garimpos de ouro na Amazônia, passou a ser a principal fonte emissora do metal. A emissão de fontes difusas, associado a um crescimento acelerado dos grandes centros urbanos, tem substituído em importância as fontes industriais clássicas, com a disposição de resíduos sólidos. As emissões com geração de energia elétrica hoje representam cerca de 300 t ano^{-1} e a queima de combustíveis fósseis aproximadamente 1.500 t ano^{-1} em nível global (LACERDA *et al.*, 2007). Pode ser observada na Tabela 2, a contribuição dos diversos setores na emissão de mercúrio no Brasil.

Tabela 2: Contribuição de Diferentes Setores na Emissão de Mercúrio no Brasil (1998 a 2002). *inclui lâmpadas e produtos eletroeletrônicos. Fonte: LACERDA *et al.*, 2007.

Fonte/Setor	Emissão (%)
Garimpo de ouro	29,7
Indústria de cloro/soda	25,2
Produção de aço e ferro	17,8
Queimadas na Amazônia	12,9
Pirometalurgia	6,7
Geração de energia	6,2
*Outras fontes	1,5

LACERDA e colaboradores (2007) afirmam que emissão de mercúrio para a atmosfera por queima de gás natural é pequena em relação às demais fontes, incluindo a combustão de outros combustíveis, não resultando em impacto ambiental ou de saúde pública, significativo. Ressaltando ainda que a geração de energia pela queima de carvão, óleo combustível e biomassa geram 1.200, 250 e 2 vezes mais mercúrio para o meio ambiente, respectivamente, que a queima de gás natural, por unidade de energia gerada. Desta forma, o gás natural seria uma opção “limpa” em relação esse metal pesado entre os diferentes combustíveis potencialmente utilizáveis.

É importante ressaltar que grande parte do mercúrio presente no gás natural fica retido nas etapas de refino e transporte. Assim, fontes pontuais de mercúrio poderão ser criadas em refinarias, dutos de transporte e usinas termoelétricas (LACERDA *et al.,* 2007).

3.4 CICLOS BIOGEOQUÍMICOS

O homem, há séculos, voluntariamente ou em decorrência de suas atividades, vem interferindo nos ciclos de nutrientes minerais. O nitrogênio, o fósforo, o cálcio, o potássio e os ciclos hidrológicos, além dos inúmeros microelementos químicos, são partes fundamentais para o funcionamento do sistema ambiental. Todos esses componentes devem influenciar no ciclo do mercúrio.

Nos diferentes ecossistemas a quantidade armazenada de metal é variável (dependendo da composição desse ecossistema), e existe ainda, variação nas taxas de distribuição, transferência e armazenagem dentro de cada sistema (CUNHA & GUERRA, 2012). As diferentes espécies de mercúrio tem sua distribuição regulada por processos físicos, químicos e biológicos, e a conversão das mesmas leva a um ciclo de distribuição que pode ser local ou global, podendo este metal pesado se alojar nos compartimentos ambientais mais diversos (CANELA, 1995).

Nos ambientes aquáticos envolve uma complexa relação entre os processos biológicos, principalmente mediados por micro-organismos, e os processos geoquímicos, que ocorrem em escalas microscópicas e macroscópicas (WARREN & HAACK, 2001). Nesse ambiente, a especiação de mercúrio depende das interações com outros elementos (possibilidade de complexação), solubilidade, pH, temperatura, potencial redox, sorção e dessorção, parâmetros estes, que influenciam na rota de transformação que o mercúrio pode seguir (STEIN *et al.,*1996).

Sabe-se que valores altos de pH (alcalino) de sistemas hídricos pode estar associado a proliferação de vegetais em geral, pois com o aumento da fotossíntese há consumo de gás carbônico, e portanto, diminuição do ácido carbônico na água e consequente aumento do pH. Já a acidez é causada principalmente pela presença de CO_2, ácidos minerais e sais hidrolisados. Quando um ácido reage com a água, o íon hidrogênio é liberado, acidificando o meio. As variações de pH no meio aquático estão relacionadas ainda com a dissolução de rochas, absorção de gases da atmosfera, oxidação da matéria orgânica e fotossíntese (VON SPERLING, 1995).

E a acidez de alguns corpos aquáticos facilita a formação de complexos solúveis ($HgCl_2$ e CH_3Hg) enquanto ambiente alcalinos favorecem a formação de complexos voláteis (Hg^0 e $(CH_3)_2Hg$) (STEIN *et al*., 1996).

O mercúrio e seus compostos podem ser biotransformados da forma inorgânica para forma orgânica, esta última é capaz de ser biomagnificada ao longo da cadeia alimentar. Os aspectos relacionados à toxicidade e também ao ciclo biogeoquímico, envolvendo distribuição, bioacumulação, transformação e transporte no ambiente tem chamado atenção da comunidade científica desde os acidentes com a contaminação por mercúrio no Japão, nas décadas de 1950 e 1960, e no Iraque, em 1956 e 1971-72 (BAKIR *et al*., 1973).

As diversas espécies químicas possuem toxicidade elevada e podem causar danos aos seres humanos dependendo da forma química e dos fatores de exposição. Um resumo das espécies é apresentado na Tabela 3.

As diferentes formas apresentadas pelo mercúrio no ambiente, orgânicas e inorgânicas, possuem velocidades distintas de deposição e reações na atmosfera, do mesmo modo, as emissões também podem variar em função da forma química (LOHMAN *et al.*, 2008).

O mercúrio apresenta três estados de oxidação: Hg^{2+} (íon mercúrico, principal forma dissolvida (como sais ou complexos solúveis) nos sistemas aquáticos), Hg^{1+} (íon mercuroso) e Hg^0 (mercúrio metálico ou elementar) que se transformam entre si no meio ambiente através de reações bióticas e abióticas (NIES, 1999; MOREL *et al*., 1998). O Hg^{2+} forma ligações covalentes bastante estáveis com o carbono dando origem a compostos organometálicos lipossolúveis, ao contrário do Hg^{1+}, pouco estável em sistemas naturais, praticamente não se liga ao carbono e ao nitrogênio (BARROCAS, 2003). Já os compostos de mercúrio em suspensão, cujos os exemplos mais comuns são sulfeto (HgS) e seleneto (HgSe) de mercúrio, são insolúveis em água e óleo, mas podem estar presentes como partículas muito pequenas, sólidas em suspensão (WILHELM, 1999).

Tabela 3: Espécies de mercúrio e suas categorias.

Categorias	Espécies Químicas
Espécies Voláteis	Mercúrio elementar (Hg^0) Dimetilmercúrio [$(CH_3)_2Hg$]
Espécies Muito Reativas	Íon Mercúrico (Hg^{2+}) Cloreto Mercúrico ($HgCl_2$)
Espécies Pouco Reativas	Metilmercúrio (CH_3Hg^+) Sulfeto de Mercúrio (HgS)

A forma orgânica metilmercúrio, corresponde de 80% a 95% do teor total de mercúrio encontrado em peixes, sendo o grande responsável pela intoxicação dos seres humanos consumidores de pescado (BISINOTI & JARDIM, 2004).

O mercúrio pode ser incorporado ao longo da cadeia trófica (Figura 3) e, assim, ser bioacumulado e biomagnificado em função de sua longa meia vida nos organismos vivos (640 a 1200 dias), mesmo em regiões onde as águas apresentem níveis considerados normais. As espécies piscívoras são as que apresentam os maiores teores do elemento (YALLOUZ *et al*., 2001). Estudos têm mostrado que o metilmercúrio é a espécie dominante de mercúrio na biota (BLOOM, 1992; KASPER *et al.*, 2007). O metilmercúrio é, em sua maior parte, produzido biologicamente por bactérias, como um mecanismo natural de detoxificação (LACERDA, 2007).

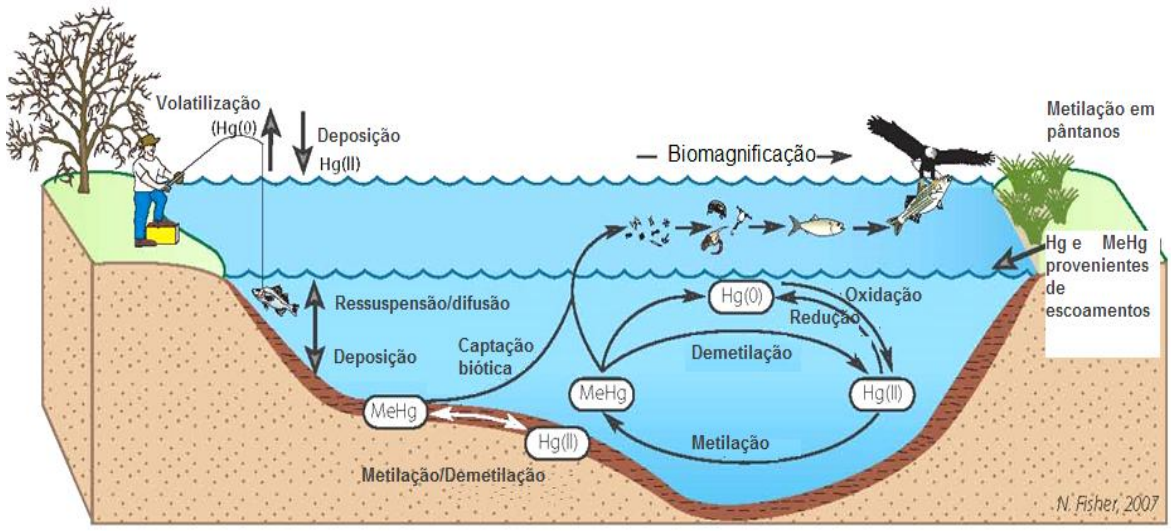

Figura 3: Ciclo do Mercúrio em Ambientes Naturais (Adaptado: FISHER, 2007; NOAA, 2012).

O ciclo do mercúrio é caracterizado pelas várias rotas que este composto pode seguir no ambiente, desde sua liberação do solo como resíduos de rocha, até o seu retorno da água para atmosfera, seja na forma de mercúrio elementar (Hg^0) gasoso ou, em menor extensão, como compostos voláteis (BISINOTI & JARDIM, 2004). A deposição atmosférica (seca ou úmida) é uma importante via de acúmulo de mercúrio, em muitos ecossistemas, essa pode ser a maior fonte de mercúrio. A rota atmosférica envolve a retenção do mercúrio elementar (Hg^0) na atmosfera por períodos longos, sendo possível a circulação através de grandes distâncias (SCHROEDER & MUNTHER, 1998; DASTOOR & LAROCQUE, 2004).

Esta liberação, e o seu retorno, contribuem para o ciclo global do mercúrio (POISSANT *et al.*, 2004). Quando o mercúrio metálico entra em contato com a atmosfera pode ser oxidado pelo ozônio ou outros oxidantes para Hg^{2+}. A forma oxidada é capaz de se complexar com outros íons presentes, como o cloreto, e formar cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), que poderá se depositar na água e no solo, e nestes pode ainda formar outros compostos ou volatilizar retornando a atmosfera, na forma de mercúrio metálico, metilmercúrio ou dimetilmercúrio.

Além da atmosfera, o mercúrio é capaz de ser emitido do solo, através de lixiviação e erosão, para corpos d'água (FOSTIER *et al.*, 2000). Desta maneira, o solo pode ser visto como uma interface entre atmosfera, hidrosfera, biosfera e litosfera, sendo estas interações observadas nas Figuras 2 e 3. A transferência de mercúrio da atmosfera para compartimentos terrestres, como a vegetação, o solo e a água, pode ocorrer por deposição seca ou úmida (precipitação) e depende das condições climáticas (PORCELLA, 1994; POISSANT *et al.,* 2008).

Quando em contato com o solo ou sedimento, é possível ocorrer sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação. O mercúrio elementar (Hg^0) e o íon mercúrico (Hg^{2+}) são geralmente encontrados em solos. O Hg^{2+} apresenta uma alta propensão a formar complexos e é difícil de ser encontrado puro, visto que há uma gama de agentes complexantes em sua matriz. Assim, o mercúrio pode se ligar aos minerais do solo ou adsorver a sólidos inorgânicos ou à matéria orgânica, como por exemplo, ácidos húmicos e fúlvicos (STEINNES, 1995).

Os solos possuem uma elevada capacidade de reter e armazenar mercúrio, principalmente os solos argilosos, devido a forte associação deste com o carbono presente, podendo este acúmulo persistir por muitos anos. A quantidade de mercúrio acumulada dependerá da história de deposição, da idade e das características do solo. São estas que determinam a especiação e as rotas de transformação química que o mercúrio elementar, incluindo a quantidade de matéria de orgânica, a textura e mineralogia do solo e a composição da solução do solo (RENNEBERG & DUDAS, 2001). Além disso, a parcela de matéria orgânica presente nas fases aquosa e sólida, vão influenciar na distribuição e no transporte de mercúrio através de perfis de solo (SEMU *et al.,* 1987).

A composição e o pH do solo será determinante na formação dos complexos com Cl^-, OH^-, NH_3, F^-, SO_4^{-2} NO_3^- sendo dominantes os complexos formados com Cl^- e OH^- (SCHUSTER, 1991). Além disso, a textura e a mineralogia do solo influenciam nas reações do mercúrio com os minerais presentes no solo (KOHUT *et al*., 1995).

Nos sedimentos a distribuição está relacionada com o conteúdo de carbono orgânico, argila, ferro, fósforo, potencial redox e enxofre, dentre outros. Os agentes orgânicos complexantes solúveis em água, tais como humatos e fulvatos, podem quelar as espécies solúveis e insolúveis na água. O *pH ácido* favorece a absorção do mercúrio pelo húmus. No *pH básico* o mercúrio tem maior afinidade pela fração mineral, desfavorecendo a formação do metilmercúrio (BISINOTI, 2005; CANELA, 1995). A formação de complexos orgânicos de mercúrio é em grande parte devida à alta afinidade do mercúrio aos sítios ativos de grupos funcionais contendo enxofre presentes em matéria orgânica. O número de sítios ativos nesses compostos determina a quantidade de mercúrio que pode se ligar (RENNEBERG & DUDAS, 2001). Devido à essa complexação à matéria orgânica e aos minerais do solo, as taxas de lixiviação de mercúrio são baixas (MIERLE & INGRAM, 1991). O estudo de ANDERSON (1979) demonstrou a existência de uma interdependência entre mercúrio e matéria orgânica em solos ácidos. Já em solos ligeiramente ácidos ou neutros, observou-se uma correlação mais forte entre mercúrio e *Fe,* que entre mercúrio e matéria orgânica.

O processo de metilação é mediado por bactérias redutoras de sulfato, ocorrendo preferencialmente em ambientes com alta concentração de material

orgânico e elevadas taxas de decomposição, sendo favorecida por águas ácidas e ricas em carbono orgânico dissolvido (BISINOTI & JARDIM, 2004; BISINOTI, 2005). A Tabela 4 apresenta as transformações mercuriais no ciclo do mercúrio.

Tabela 4: Transformações Mercuriais durante o Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio (Adaptação de BARKAY *et al*., 2003).

Processo	Tipo	Mecanismo
Metilação do Hg (II)	**Biótico**	**Transferência do grupo metil pelas bactérias sulfato-redutoras**
	Abiótico	**Metilação através de compostos orgânicos**
Desmetilação	**Biótico**	**Desmetilação redutora através dos genes *merA* e *merB* Desmetilação oxidativa**
	Abiótico	**Fotodegradação**
Redução do Hg (II)	**Biótico**	**Bactérias redutoras (gene *merA*) e mecanismos pouco conhecidos de algas**
	Abiótico	**Reações fotoquímicas**
Oxidação do Hg^0	**Biótico**	**Oxidação por hidroxiperoxidades de micro-organismos, plantas e animais**
	Abiótico	**Fotoxidação**

O ciclo vai se completando pelas rotas de *precipitação, bioconversão* em formas voláteis ou solúveis, *reinteração* deste na atmosfera ou *bioacumulação* na cadeia alimentar dos compartimentos aquáticos ou terrestres (Figura 2).

No fundo dos oceanos o mercúrio é depositado na forma insolúvel (HgS), podendo permanecer ativo nos sedimentos como substrato para a metilação por cerca de 100 anos, mesmo quando a fonte é eliminada. No entanto, mesmo após a sua deposição como HgS, sendo um produto de baixa solubilidade, uma pequena porção de íons mercúrio proveniente do HgS pode sofrer *redissolução*.

A ampla distribuição do mercúrio na biosfera, mesmo sob condições naturais, faz com que este elemento seja classificado como um poluente global (MASON *et*

al., 1994; MASON *et al*., 1996; ZAGAR *et al*., 2007). O metilmercúrio se encontra listado pelo Programa Internacional de Segurança Química como um dos seis produtos químicos mais tóxicos ao meio ambiente (GILBERT & GRANT-WEBSTER, 1995). Sendo mais um motivo para o estudo do seu comportamento no ambiente por ser este bastante complexo, e fundamental o entendimento do ciclo biogeoquímico, bem como da análise dos seus efeitos tóxicos na saúde humana e na biota (BISINOTI & JARDIM, 2004).

É importante ressaltar que a metilação pode ocorrer tanto em ambientes naturais quanto impactados (COSSA *et al.,* 1994). E o que determinará se o ambiente atua como fonte ou sumidouro é o balanço das reações de metilação e desmetilação. Determinadas condições ambientais ajudam a maximizar os mecanismos de metilação e complexação orgânica de mercúrio, resultando em processos diferenciados de contaminação. As condições favoráveis para metilação, em um ambiente redutor são: anoxia e acidez. (WHO, 1990).

Acredita-se que existam no mínimo duas vias diferentes de desmetilação: a oxidativa e a redutora mediada pelos genes: *merA (observe o esquema na figura 4) e merB* (OREMLAND *et al.* 1991; BARKAY *et al.*, 2003), como pode ser visto na Tabela 4. Consideram-se ainda fatores físicos e químicos como pH, temperatura, condutividade, potencial de oxirredução, oxigênio dissolvido, presença de íons sulfeto e carbono orgânico, quando se busca avaliar a metilação do mercúrio e sua acumulação na biota aquática. A metilação pode ser inibida na presença de elevadas concentrações de Demanda Química de Oxigênio (DQO) devido ao aumento na complexação de Hg com outros ligantes orgânicos, reduzindo a disponibilidade do Hg para as bactérias, particularmente na faixa de pH 5,0-7,5 (BISINOTI & JARDIM, 2004).

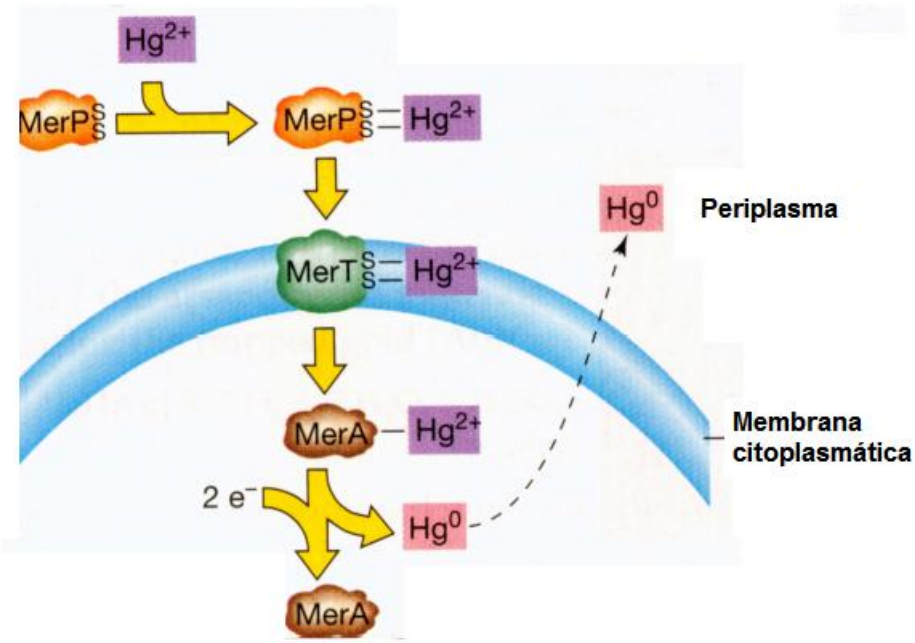

Figura 4: Esquema da resistência bacteriana ao mercúrio baseado no operon *mer A* (adaptado de Brock Biology of Microorganisms, 2002).

3.5 TOXICIDADE

Os efeitos da contaminação com mercúrio procedem de estudos com a população contaminada, normalmente por acidentes de contaminação ambiental que afetaram os alimentos e a água de consumo. Acidentes com contaminação por mercúrio ocorreram em Minamata, Iraque, Niigata, Gana e Canadá (AZEVEDO, 2003). Na década de 1950 e 1960, a atenção global se voltou ao problema da contaminação por esse metal no Japão (poluição de sistemas aquáticos). Um deles na Baía de Minamata, na Costa do Mar Shiranui e o outro na Bacia do Rio Agano.

Embora este acidente tenha ocorrido há mais de 50 anos, ainda é mostrado como exemplo da fragilidade do homem mediante os produtos químicos. A população de uma vila próxima à baía foi contaminada por mercúrio através do consumo de animais marinhos contaminados. Cerca de 3.000 pessoas apresentaram sintomas que foram atribuídos a uma doença que mais tarde foi chamada de “Doença de Minamata” ou “Mal de Minamata”. Na verdade, estima-se que o número de pessoas que foram contaminadas por metilmercúrio seja muito maior (ROSS, 1996; HONDA *et al*., 2006). Ao longo do tempo, foi observado o

aumento considerável do número de bebês recém-nascidos com problemas neurológicos. Essas desordens foram atribuídas à exposição materna ao metilmercúrio durante a gravidez (ETO, 1997; HONDA *et al*., 2006; EKINO *et al*., 2007; LI *et al*., 2009).

A doença de Minamata revelou que a assimilação de metais pesados pelos sistemas biológicos ocorre por diversas vias (MANO *et al.,* 2005). Nas plantas através das raízes e folhas, e nos animais, mediante a ingestão de alimentos e pela via respiratória. Os organismos aquáticos extraem da água o oxigênio dissolvido e os alimentos, estando sempre expostos aos íons existentes no meio. Na época, a concentração de mercúrio nos sedimentos da baía chegou a 2.010 mg /Kg peso seco (HARADA, 1995).

Embora o acidente envolvendo mercúrio de maior repercussão mundial tenha ocorrido no Japão, há relatos de problemas na Suécia, Guatemala, Paquistão, Novo México, Canadá e Iraque. Sendo considerado mais grave o acidente no Iraque, na década de 1970, em que foram registrados cerca de 7 mil casos de envenenamento. A contaminação ocorreu através de sementes tratadas com fungicidas. A causa dessa tragédia que culminou com a morte de mais de 450 pessoas foi o consumo de sementes de trigo contaminadas com metilmercúrio. O uso do metilmercúrio, neste caso, foi para evitar o crescimento de fungos em sementes destinadas ao plantio (BAKIR *et al*., 1973; BARROCAS, 1994; REIS, 2008).

O problema da contaminação por mercúrio, no Brasil, tornou-se bastante conhecido pela comunidade internacional devido à corrida para produção de ouro na região amazônica durante a década de 1980 (VASCONCELLOS, 2010). E durante muitos anos, as elevadas concentrações de mercúrio nesse ecossistema foram relacionadas à atividade garimpeira (MALM *et al*., 1990; LACERDA & PFEIFFER, 1992; HACON *et al.,* 2008). Porém, de acordo com ROULET & LUCOTTE (1995) existe a hipótese de que estão presentes fontes naturais de mercúrio no solo amazônico e, por isso, são detectados níveis elevados de mercúrio na população e na biota da região.

Existem relatos da presença de mercúrio em corpos hídricos (em rios e mares) e de contaminações de alimentos e ambientes. Em ambientes marinhos, têm sido registrados casos de poluição por mercúrio, em decorrência de atividades industriais

nos estados da Bahia, Pernambuco, São Paulo e Rio de Janeiro (FERREIRA *et al.,* 1979; MARINS *et a.l*, 1998 e KEHRIG *et al.,* 1998; REIS, 2008).

Em águas doces encontram-se:

- Estudos em Poconé, no Mato Grosso, que constataram contaminação decorrente da prática do garimpo (CAMARA *et al.,* 1996);

- Estudo que relata a contaminação por mercúrio no rio Botafogo, um dos principais tributários do canal de Santa Cruz, em Recife, Pernambuco, onde uma fábrica de cloro-álcalis lançou grandes quantidades de mercúrio até o ano de 1991 (MEYER *et al.,* 1998);

- Estudo que evidenciou a presença de mercúrio em sedimentos do rio Cubatão (resultados variaram de 1,8 a 21,4 ppm de mercúrio e após a dragagem variaram de 0,015 a 0,93 ppm, no ano de 1998 (AZEVEDO, 2003).

Outro problema de contaminação ocorreu em Canoas (RS), onde a REFAP S.A. processou 3 milhões de metros cúbicos de petróleo contaminado com mercúrio entre 1993 e 1997, originando efetiva degradação ambiental (REIS, 2008). Segundo o Ministério Público, teriam sido lançadas 3,3 toneladas de mercúrio em média nas águas, no ar e no solo. Por decisão judicial, a empresa não pode processar petróleo que contenha teores de Hg > 20 ppb, devolvendo o produto contaminado adquirido ao país de origem com as devidas cautelas para o transporte (ESTADÃO, 2004).

Conforme o estado molecular do mercúrio, a sua toxicidade varia significativamente. O mercúrio metálico, por exemplo, usado na fabricação de amálgamas para o uso odontológico, quando inalado apresenta um elevado poder de toxicidade, pois pode ser convertido à forma metilada nos pulmões. Na forma de vapor, como é liberado na maior parte em garimpos de ouro, é absorvido através do pulmão. Em contato com o sangue, o mercúrio é oxidado pelos eritrócitos, a Hg^{2+} e rapidamente distribuído pelo corpo, podendo se ligar também à albumina e à hemoglobina e acumular no sistema nervoso central (OMS, 1978; JAHANBAKHT, 2002; AZEVEDO, 2003). Os sais mercúricos constituem a forma mais irritante e agudamente tóxica do metal, sendo ainda muito utilizados na indústria como catalisadores. Sua descarga industrial nos rios tem provocado contaminação do ambiente em muitas partes do mundo (MANO *et al*., 2005).

O metilmercúrio é a espécie mais tóxica do mercúrio e o interesse em seu estudo deve-se ao seu potencial de bioacumulação e biomagnificação, e à sua baixa velocidade de eliminação, por ter uma meia-vida longa. Nos humanos, sua meia vida é de cerca de 70 dias (NEATHERY & MILLER, 1975), enquanto nos peixes 1000 dias (AZEVEDO, 2003). Este composto age como inibidor e modificador das atividades protéicas mesmo em baixas concentrações, por se ligar aos grupos sulfidrila das proteínas (GALVÃO & COREY, 1987), e rapidamente se converter em um complexo protéico de grande mobilidade através dos tecidos.

A distribuição pode levar até seis dias, já que são lipossolúveis e se difundem facilmente através das membranas celulares, tendo longo tempo de retenção biológica. O composto pode ser absorvido pela pele, e aproximadamente 100% pelo trato gastrointestinal, sendo a dieta uma das principais vias de exposição ao metilmercúrio (HUGUNIN & BRADLEY, 1975).

Alguns estudos relatam acidentes por intoxicação com metilmercúrio, onde se observa maior suscetibilidade na vida intrauterina (onde pode interferir nos processos de divisão celular, causando danos no sistema nervoso central), por ser uma neurotoxina potente, levando inclusive a má formação cefálica (CANELA, 1995). O estudo descreve ainda que pesquisas realizadas em ratos comprovam que o metilmercúrio exerce ação cancerígena. Nos seres humanos, o metilmercúrio tem um tempo de meia-vida biológico relativamente longo, de 44 a 80 dias (NEATHERY & MILLER, 1975), e sua excreção ocorre via fezes, leite materno e urina. Os principais sintomas associados à toxicidade incluem tremor, vertigem, entorpecimento, dor de cabeça, cãibra, fraqueza, depressão, distúrbios visuais, dispneia, tosse, inflamações gastrointestinais, queda de cabelo, náuseas e vômitos.

A toxicidade do mercúrio vem sendo bastante avaliada atualmente, pois o metal está incluído no rol das substâncias tóxicas persistentes e está sob o monitoramento do *Global Environmental Facility* (GEF), uma organização financeira independente que promove, desde 1991, projetos e programas internacionais voltados para a proteção do ambiente global. O GEF apoia diversos projetos ambientais entre os quais aqueles que envolvem o mercúrio (GRIGOLETTO *et al.,* 2008). No Reino Unido, o Departamento de Meio Ambiente, incluiu o mercúrio em sua lista de poluentes para controle prioritário (COSTLEY *et al*., 1999, 2000).

3.6 ESPECIAÇÃO

Em virtude das diversas espécies de um mesmo elemento apresentar comportamentos diferenciados, como solubilidade, volatilidade e toxicidade distintas, podem causar danos distintos aos seres humanos, dependendo da forma química e dos fatores de exposição para cada espécie.

Desta forma, verifica-se a necessidade de buscar métodos que estejam além da determinação quantitativa dos elementos presentes, ou seja, métodos que sejam capazes de quantificar e identificar as espécies. Muitos estudos tratam da necessidade de técnicas mais sensíveis e precisas para a determinação das espécies em diferentes matrizes amostrais (CANELA, 1995).

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

3.6.1 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

O interesse na determinação quantitativa do mercúrio gerou um progresso expressivo no desenvolvimento de técnicas analíticas para este metal. Isso devido a sua alta toxicidade, baixo teor de mercúrio nas amostras, bem como a sua natureza volátil e associação com outros compostos (REIS, 2008).

Os métodos analíticos para a determinação de mercúrio são selecionados de acordo com a natureza da amostra e a concentração de mercúrio esperada. Em geral, estes métodos obedecem à seguinte metodologia: coleta de amostra, pré-tratamento/ preservação/ estocagem da amostra, liberação do mercúrio da matriz, extração/ purificação/ pré-concentração, separação das espécies de interesse e determinação (MITRA, 1986; CANELA, 1995). As técnicas tradicionais de métodos específicos em química analítica mostram-se altamente sensíveis.

No entanto, estes possuem limites de detecção bastante dependentes do procedimento analítico global, incluindo coleta e preparação da amostra antes da quantificação. A necessidade de se monitorar o mercúrio no meio ambiente levou ao desenvolvimento de técnicas de análise deste elemento, que pode estar presente em concentrações muito baixas nas amostras. A capacidade de se associar a muitos tipos de compostos exige técnicas cada vez mais sensíveis e precisas para determinação das diversas formas mercuriais em diferentes matrizes. A maioria dos métodos descritos na literatura para a determinação de mercúrio é caracterizado por baixos limites de detecção, mas apresentam custos elevados de operação, impossibilitando seu uso em grande escala, o que não é ideal para programas de monitoramento contínuo (BONTIDEAN *et al*., 2004). Baseado na toxicidade de um componente químico, como o mercúrio, sabe-se da importância de um monitoramento contínuo, principalmente após acidentes envolvendo este metal.

Os métodos mais frequentemente utilizados para a quantificação de mercúrio e seus respectivos limites de detecção são encontrados na Tabela 5 (MIRACONI *et al*., 2000).

Tabela 5: Métodos usados na Quantificação do Mercúrio (Adaptado de MIRACONI *et al*., 2000).

Método		Limite de Detecção
Espectrometria de Absorção atômica	Forno de Grafite	1ng/g
	Vapor Frio	0,01 - 1 ng/g
Espectrometria de fluorescência atômica	Vapor Frio	0,001 - 0,01 ng/g
Cromatografia gasosa	Detector de Captura eletrônica	0,01 - 0,05 ng/g
	Detector de Emissão Atômica	0,05 ng/g
	Espectrometria de massa	0,01 - 0,05 ng/g
	Detector de UV	1 ng/mL

As amostras ambientais destinadas às análises de teor de mercúrio apresentam níveis baixíssimos do metal, em geral na faixa de nanogramas do metal por grama de amostra (ng/g). Para isto, são requeridos métodos específicos, que

englobem aspectos como disponibilidade do equipamento, complexidade do processamento das amostras, reprodutibilidade dos resultados, sensibilidade do aparelho e limite de detecção do método empregado (WHO, 1989).

Além disso, verifica-se que a determinação simultânea de mercúrio orgânico e inorgânico é dificultada. Em meios aquosos, por exemplo, a baixa concentração de mercúrio leva a grandes volumes requeridos para as análises. Com isso, etapas de pré-concentração são essenciais para que o detector possa ser sensível às baixas concentrações (HANDBOOK, 2007).

A análise por ativação com nêutrons é um método não destrutivo, específico e com alta sensibilidade. O método consiste na irradiação da amostra com um fluxo de nêutrons, sendo produzidos cinco nuclídeos, mas somente o Hg-197, com meia vida de 65 horas, e o 203Hg, com meia vida de 47 dias, são determinados. Esta técnica é muito lenta e cara (Ministério do Meio Ambiente do Japão, 2004).

O método de absorção atômica convencional utilizando chama, é bastante simples, baseando-se na absorção da radiação pelos átomos de mercúrio em 253,65 nm. No entanto, não apresenta sensibilidade suficiente à determinação de amostras ambientais, onde as concentrações são da ordem de partes por bilhão e os resultados podem ser comprometidos por interferentes espectrais (Ministério do Meio Ambiente do Japão, 2004). Devido à volatilidade do Hg elementar, este pode ser determinado sem a necessidade de chama. Por não utilizar chama, este método é denominado de absorção atômica com vapor frio (CVAAS), tal método é de grande eficácia em diversos tipos de análises (COSTLEY *et al*., 2000; MIRACONI *et al*., 2000). Este método apresenta como principal desvantagem a possibilidade de ocorrência de interferências espectrais em função da presença de NO_2, SO_2 ou O_3 (MORITA *et al*., 1998). O emprego deste método exige a redução do íon mercúrico à forma elementar, empregando cloreto estanoso ($SnCl_2$) como agente redutor (ZENEBON *et al*., 1994), que é carreado por uma corrente de ar ou algum outro gás inerte (TAKASE *et al*., 2002). O vapor de mercúrio é liberado da solução pela passagem de ar, nitrogênio (N_2) ou argônio (Ar), empregando um separador gás-líquido. O mercúrio é, então, arrastado pelo caminho ótico do espectrômetro de absorção atômica, sendo medido por um detector de diodo de silício, onde os seus átomos absorvem radiação UV em 253,65 nm (COSTLEY *et al*., 2000).

A espectrometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS) consiste na detecção do sinal de fluorescência emitido pelo mercúrio e é considerado um método mais sensível do que a CVAAS. Assim como a CVAAS, a CVAFS só detecta mercúrio na forma elementar (Hg0). Substâncias gasosas como CO/CO_2, O_2 e N_2 afetam a sensibilidade do método (Ministério do Meio Ambiente do Japão, 2004).

Para a determinação de mercúrio total, tanto por CVAAS quanto por CVAFS, os compostos de mercúrio são convertidos a íons Hg^{2+} com os mais diversos tipos de agentes oxidantes. Posteriormente, o Hg^{2+} é reduzido a Hg^0, podendo então ser pré-concentrado (ou não) em coluna de ouro (MIRACONI & BUENO, 2000).

A maior parte dos métodos analíticos usados para a determinação de traços de mercúrio requer sua conversão à forma iônica ou elementar. Diferentes métodos têm sido propostos para este pré-tratamento, no qual a ligação organomercúrica deve ser destruída.

Outro método é o de HPLC-ICP-MS, que se baseia na utilização de um espectrofotômetro de massas de plasma indutivamente acoplado a uma coluna de cromatografia líquida de alto desempenho. Tal método permite realizar a detecção e subsequente quantificação de determinadas espécies, através do fracionamento das mesmas (HANDBOOK, 2007). O fracionamento ocorre em uma coluna cromatográfica líquida de alta performance (HPLC), que efetua a separação, em paralelo, entre matriz e espécies e entre as espécies entre si, para que, então, o espectrofotômetro de massas de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) possa detectar as espécies de interesse, promovendo-se, por fim, a quantificação (HANDBOOK, 2007). O cromatógrafo, responsável pelo fracionamento, também permite que sejam obtidos os tempos de residência de cada uma delas. Entretanto, há a necessidade de comparar estes tempos com padrões, ou até mesmo realizar uma análise adicional com espectro de massas, o que permitirá ter certeza sobre cada componente da amostra. Por tal motivo, faz-se necessário o acoplamento (HANDBOOK, 2007), mas não necessita de etapas de pré-concentração. Este método permite limites de detecção para metilHg, EtilHg e Hg^{2+} da ordem de ng/L (VEIGA, 2000).

Existe ainda uma metodologia de isótopos de mercúrio em fase gasosa. Sabe-se que isótopos de mercúrio são compostos extremamente estáveis que estão

presentes em diferentes formas no ambiente. Este número elevado de espécies é decorrente de etapas de fracionamento que ocorrem durante o transporte, o equilíbrio e a transformação do mercúrio (BERGQUIST & BLUM, 2009).

Muitos estudos foram realizados com avaliação dos efeitos dos isótopos de mercúrio em fase gasosa através da avaliação do equilíbrio líquido/gás (ESTRADE *et al.,* 2009; GHOSH *et al.,* 2009), da volatilização do mercúrio para a fase gás (GHOSH *et al.,* 2009), ou associando a redução de mercúrio a Hg^0 e inferindo impactos na fase gasosa (ZHENG *et al.,* 2007). Avaliar os efeitos causados pelos isótopos durante a evaporação da água é de extrema importância. Para isso, o método mais utilizado foi determinado empiricamente em MERLIVAT (1978).

GROSS e colaboradores (2014) propuseram um modelo aprimorado para a quantificação do mercúrio elementar (Hg^0) na forma isotópica, permitindo a avaliação dos efeitos causados pelos mesmos, baseando este modelo na teoria da cinética dos gases. Neste, a difusão do mercúrio elementar em fase gasosa apresenta limitações de transferência de massa, concentração do isótopo e transporte do metal em solos áridos (WALVOORD *et al.,* 2008) e até mesmo baixa remoção do mercúrio por absorventes de gases de combustão (PAVLISH, 2003). Por isso, associá-la ao fracionamento isotópico colaboraria com o aperfeiçoamento do método, porém esta incorporação não exclui todas as limitações.

Por este motivo, a pesquisa de GROSS e colaboradores (2014) mostrou que as difusividades atômicas dos isótopos de mercúrio no ar são elevadas e podem ser modeladas com a teoria cinética dos gases. Possibilitando o uso dos resultados obtidos na interpretação de sinais de isótopos, em contextos ambientais como industriais, com modelos preditivos para o ciclo biogeoquímico do mercúrio e para a identificação de fontes de mercúrio.

Outro método baseia-se no efeito de cinzas modificadas com HBr na adsorção de mercúrio elementar. De acordo com a Sociedade Federativa Brasileira (2014), as usinas termelétricas são instalações industriais responsáveis pela geração de energia elétrica a partir de energia liberada em forma de calor, que ocorre, em geral, por meio da combustão de óleos ou carvões, que promovem a emissão de vapor. Tal vapor passa por um processo de resfriamento em um condensador, sendo convertido novamente em água, retornando aos tubos da caldeira e dando início a

um novo ciclo. Quando gás natural é utilizado para efetuar a queima, acaba-se formando uma corrente rica em agentes oxidantes, redutores e com mercúrio nas formas particulada, oxidada e elementar; além disso, por ser um combustível fóssil, não se recupera (SONG *et al.,* 2014; SFB, 2014).

SONG e colaboradores (2014) propuseram a utilização de cinzas volantes modificadas com HBr (impregnados nas cinzas) como absorventes para capturar o mercúrio elementar. As cinzas são injetadas na corrente de saída do pré-aquecimento do combustível, para oxidar e absorver o mercúrio. Para que a capacidade de adsorção das cinzas modificadas pudesse ser certificada, utilizou-se, em um reator de leito fixo, uma análise termogravimétrica nas cinzas antes do contato com a corrente de mercúrio e uma análise termogravimétrica acoplada à espectrometria de massas (TG-MS) após o contato com a corrente de mercúrio, elucidando-se o mecanismo de captura de Hg^0 (SONG *et al.,* 2014).

Outro método consiste na extração do ponto nuvem com utilização do *Surfactante Não-iônico Octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114).* Sabe- se que amostras biológicas apresentam um elevado nível de complexidade frente à determinação de quaisquer elementos. Extrações do tipo líquido-líquido e os métodos convencionais de concentração requerem um tempo elevado e grandes volumes de solventes com alta pureza. Além disso, tem-se o problema referente ao tratamento dos solventes utilizados, espécies orgânicas com elevada capacidade poluente (MANZOORI, 2004). A técnica de ponto nuvem vem sendo utilizada para fins de extração, purificação e pré-concentração, fundamentais no tratamento de amostras ambientais contaminadas, sejam estas líquidas (águas) ou sólidas (solos) (EVDOKIMOV & WANDRUSKA, 1998). Está baseada no comportamento dos surfactantes não-iônicos em soluções aquosas, havendo, como consequência, a separação de fases com o aumento da temperatura ou com a adição de um agente, normalmente um sal (SILVA, *et al.,* 2001; QUINA & HINZE, 1999). O Triton X-114, em solução aquosa promove a turbidez do meio quando é promovida elevação da temperatura, em uma estreita faixa, característica demonstrada por qualquer surfactante sob as mesmas circunstâncias, sendo esta temperatura referida como ponto nuvem (VEIGA, 2000).

Os métodos tradicionais de detecção não permitem distinguir poluentes que estão disponíveis para os sistemas biológicos dos inertes ou indisponíveis, uma questão especial em relação aos metais tóxicos. Conforme visto anteriormente a biodisponibilidade é essencial na determinação da toxicidade e do potencial de bioacumulação do metal, bem como na busca por métodos eficientes na remediação. Novas tecnologias a partir do uso de ferramentas analíticas vêm sendo desenvolvidas para serem aplicadas no diagnóstico do meio ambiente.

Neste contexto, surgem sensores específicos, os *biossensores*, como alternativa aos métodos tradicionais, pois permitem determinar diretamente a biodisponibilidade das substâncias químicas e seus efeitos biológicos, e ainda, complementar os métodos tradicionais, gerando novas informações que são fundamentais na avaliação do risco de poluentes (SELIFONOVA *et al*., 1993).

3.7 BIOSSENSORES COMO ELEMENTOS DE DETECÇÃO

Todos os anos centenas de novas substâncias químicas são sintetizadas e liberadas no ambiente, sem que se conheçam adequadamente seus efeitos tóxicos, principalmente os de longo prazo. Há uma continua demanda por novas técnicas analíticas que sejam capazes de avaliar esses potenciais riscos para o ambiente e para a saúde humana (CAROLI, 1996).

A importância de um método que permita a obtenção de resultados confiáveis frente a necessidades relacionadas à eficiência, custo, tomada rápida de resultados e, se possível, dosagem de mercúrio biodisponível são fatores que levaram à pesquisa de um método baseado em biossensores (SINGH & MITTAL, 2012). Os biossensores pertencem a uma área multidisciplinar para a qual não existe uma definição que contemple todas as suas possíveis configurações, por isso pode-se encontrar várias formas de definição para estes na literatura.

Em geral trata-se de uma ferramenta analítica, um sensor químico que usa propriedades de reconhecimento de componentes biológicos com atividade catalítica ou reações de afinidade em contato íntimo, camada sensível, com um transdutor de

sinal. O potencial para aplicação de um biossensor está na habilidade deste em medir a interação de contaminantes com sistemas biológicos através da capacidade de reconhecimento biomolecular (ARYA *et al*., 2008). De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, 2001 *apud* SALGADO, 2001), biossensor é "um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semiquantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução".

Os componentes usados no desenvolvimento de um biossensor incluem:

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

A seleção do material biológico e do transdutor envolve uma série de fatores, visando especificidade, estocagem e estabilidade operacional e ambiental (ROSATTO, 2000; ARYA *et al.,* 2008; SALGADO, 2001). A seleção também depende do analito a ser detectado (MOHANTY & KOUGIANOS, 2006), sendo as variáveis:

- Tipo de amostra,
- Tipo de medida pretendida,
- Faixa de sensibilidade,
- Estabilidade operacional nas condições de medição,
- Reprodutibilidade dos resultados,
- Minimização de interferências e
- Tempo de resposta.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o receptor biológico que proporciona a resposta seletiva, com destaque para os biossensores microbianos, enzimáticos, imunossensores e quimiorreceptores (COSTA, 2010). Entre os compostos adequados para a composição dos biossensores tem-se:

enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de micro-organismos, tecidos de plantas e animais, e organelas, apresentados na Figura 5.

O receptor bioquímico, ao interagir com o analito por meio de uma reação química gera um sinal produzido pela difusão de espécies eletroativas, variação de temperatura, de massa ou viscosidade, da turbidez, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, emissão ou consumo de gases (SILVA, 2009; MELLO & KUBOTA, 2002). Essas alterações são detectadas pelo transdutor escolhido de acordo com a modificação bioquímica produzida pelo biocomponente. O transdutor é usado para converter o sinal químico em um sinal elétrico, que poderá ser processado e reproduzido. Este sinal é proporcional à concentração do analito, permitindo medições quantitativas em tempo real (o sinal pode ser transformado em um formato analógico ou digital). A Figura 5 resume de forma clara o que foi supracitado.

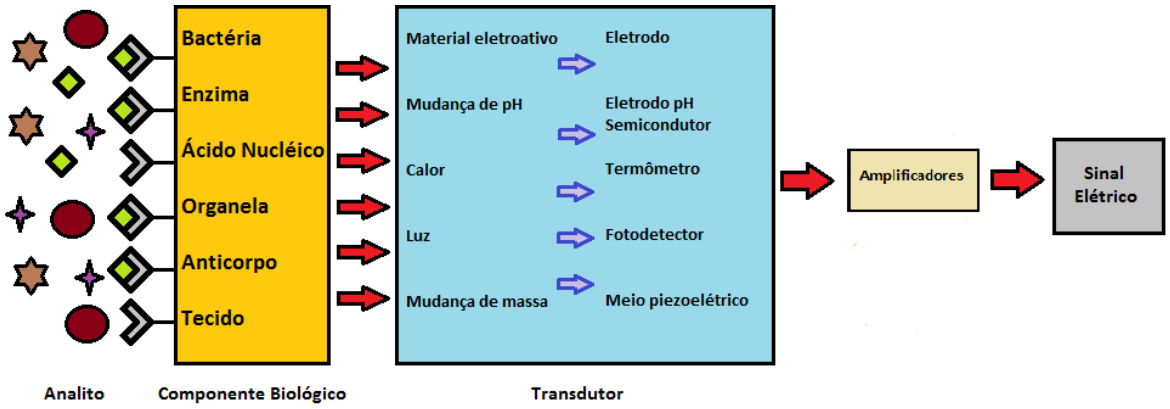

Figura 5: Esquema de Funcionamento de um Biossensor (adaptado de BERNAL *et al.*, 2012).

Tais instrumentos apresentam ainda alguns problemas relacionados à estabilidade e a falta de credibilidade em algumas áreas de aplicação. Estes desafios contribuem para a escassez de instrumentos no mercado. O fundamental é almejar a melhoria na confiança e robustez destes sensores de modo a se obter um biossensor com o desempenho desejado em termos de sensibilidade, alcance dinâmico e reprodutibilidade (SILVA *et al.*, 2009).

Capazes de combinar a especificidade de um biocomponente ativo a um dado analito com a sensibilidade de um transdutor, que converte o sinal biológico em um elétrico, proporcional à concentração do analito e passível de detecção. Isto permite

obtenção de respostas mais rápidas e a geração de menos impactos ambientais (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.,* 2004).

Apresentam características únicas: tamanho, seletividade, especificidade, reprodutibilidade, curto tempo de análise, capacidade de inclusão em sistemas integrados, possibilidade de análises em tempo real, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis (ROSATTO, 2000, SALGADO, 2001; SADANA, 2003; ARYA *et al.,* 2008; MUTLU, 2010).

A utilização de um biossensor na maioria dos casos, não necessita de técnicos ou especialistas podendo em alguns casos dispensar o uso de reagentes, podendo atuar tanto como aparelhos de uso contínuo ou como descartáveis (SILVA, 2009). Biossensores estão sendo desenvolvidos para diferentes aplicações, incluindo monitoramento de qualidade de alimentos, através da detecção de contaminantes, e, particularmente, aplicações médicas, com foco nos ramos clínico e farmacêutico (COLLINGS & CARUSO, 1997).

Diversos biossensores têm sido desenvolvidos na área ambiental, que utilizam genes específicos de resistência bacteriana para análise de metais, mecanismo de resistência desenvolvido ao longo da evolução, que permite a sobrevivência dos micro-organismos na presença destes metais (CAVALCANTI, 2010). Estes novos sistemas de detecção, baseados em sensores microbianos, na sua grande maioria, utilizam a resposta luminescente a um composto tóxico presente no meio poluído (KARUBE & NAKANISHI, 1994). A tecnologia de DNA recombinante (com uso de genes repórteres) é usada para projetar e aperfeiçoar tais sensores microbianos, estes genes produzem respostas fluorescentes ou luminescentes, são bastante atrativos, uma vez que a bioluminescência é um dos métodos de detecção mais sensíveis da atividade metabólica (RODA *et al.*, 2004). Apresentam 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 micro-organismo, 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).

No entanto, a aplicação de biossensores no monitoramento de contaminantes ambientais enfrenta a dificuldade por trabalhar com matrizes complexas (PATON *et al.,* 2009). Devido a isso, não se encontram muitos trabalhos com aplicações genuinamente ambientais na literatura (CAVALCANTI, 2010), 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. Assim como em COSTA e colaboradores (2013) que utiliza um sensor microbiano no estudo de Hg biodisponível em amostras aquosas de chorume. Há ainda, alguns trabalhos referenciados em amostra de solo contaminado por óleo cru, no qual utilizaram um biossensor para naftaleno (VALDMAM, 2004; CAVALCANTI, 2010).

A Tabela 6 apresenta três biossensores encontrados na literatura para detecção de mercúrio em publicações recentes.

Tabela 6: Biossensores detectores de mercúrio mais recentes.

Biossensores	Referências
Biossensor a base de *Chlorella sp*.	SINGH & MITTAL, 2012
Biossensor condutimétrico baseado no sistema tri-enzimático para determinação seletiva de íons de metais pesados	SOLDATKIN *et al.,* 2012
Biosensor de Grafeno-DNA para detecção seletiva de íons Mercúrio	ZHANG *et al.*, 2013

3.7.1 BIOSSENSORES MICROBIANOS

Dentre os biossensores utilizados, os microbianos possuem muitas vantagens sobre aqueles que utilizam componentes biológicos isolados, como enzimas e anticorpos: são menos sensíveis a inibição por solutos e mais tolerantes a valores sub-ótimos de pH e temperatura; possuem uma vida útil mais longa; são mais baratos, pois geralmente, as células são produzidas facilmente, em grandes quantidades e não é necessário o isolamento dos componentes celulares receptores (YAGI, 2007). No entanto, apresentam a desvantagem por terem um longo tempo de

resposta quando comparado aos enzimáticos e por serem menos seletivos, já que um micro-organismo contém inúmeras enzimas.

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

A chave da utilização de bactérias como biossensores reside no fato de que os genes que determinam as proteínas envolvidas se transcrevem, quando um composto contaminante está presente no meio. Desta forma, na presença ou ausência do contaminante no meio, uma propriedade poderá ser medida. A tecnologia molecular disponível atualmente permite também aumentar a sensibilidade do sistema sinalizador frente a um determinado contaminante, mediante o desenho de cascatas reguladoras que multiplicam ou desfazem a expressão do gene empregado como indicador. Além disso, a atividade reguladora pode ser manipulada na direção de ampliar sua resposta frente a variedades estruturais do contaminante (diferentes espécies).

Biossensores baseados neste tipo de elemento biológico são amplamente utilizados no monitoramento de contaminantes químicos no meio ambiente, como é o caso de metais pesados (SELIFONOVA *et al.*, 1993; RAMANATHAN *et al.*, 1997). O uso da engenharia genética tem facilitado, por exemplo, com a utilização de micro-organismos geneticamente modificados, e genes sinalizadores de presença ou ausência de certas enzimas. A utilização destes genes favorece a sensibilidade, ampliando a faixa dinâmica, a seletividade e especificidade destes biossensores. Além disso, são de fácil manipulação e alguns estudos já comprovaram ser ambientalmente seguros (RAMANATHAN *et al.*, 1997). O gene sinalizador é colocado sob o controle de um promotor, muitas vezes proveniente de um gene de resistência à substância que se deseja estudar, o qual é induzido apenas pela presença intracelular desta substância. A sensibilidade é definida pela efetividade da expressão do gene sinalizador (BARROCAS, 2008).

Na construção de biossensores poucos genes sinalizadores são disponíveis. A maioria deles codifica proteínas repórteres facilmente detectáveis. As proteínas repórteres mais comuns incluem as luciferases procariota (lux) e eucariota (luc) e a ainda a proteína verde fluorescente (GFP). Os repórteres que geram respostas fluorescentes ou luminescentes são bastante atrativos, já que a bioluminescência é um dos métodos mais sensíveis da atividade metabólica. A proteína verde fluorescente (*GFP*) foi isolada de uma água viva e, necessita de uma luz de excitação prévia para que emita a luz que é quantificada (LEWIS *et al,* 1998). Outra desvantagem da proteína verde fluorescente 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).

O promotor reage na presença do contaminante e ativa a expressão deste componente, possibilitando sua quantificação. Tais genes sinalizadores e/ou reguladores podem ser nativos de uma célula ou adquiridos por transformação genética. É comum o sistema de regulação transcricional consistir de um gene regulador, que expressa a sua proteína reguladora e a sequência de DNA promotora, que controla a sua expressão, a jusante do gene (NIVENS *et al.,* 2004).

Os genes repórteres que geram respostas fluorescentes ou luminescentes são atrativos devido à quantificação da emissão de luz por um micro-organismo ser medida por um simples luminômetro. Estes sistemas de regulação são elementos que trabalham em conjunto para responder a alterações ambientais e controlar a expressão de um gene ou um operon reforçando a fisiologia celular (NIVENS *et al.,* 2004).

Para análise ambiental foram desenvolvidos muitos biossensores que utilizam genes específicos de resistência bacteriana. Ao longo da evolução, os micro-organismos desenvolveram mecanismos que permitem sua sobrevivência na presença de componentes tóxicos. Essa variedade de biossensores bioluminescentes pode ser observada na Tabela 7. Estes são capazes de detectar as condições gerais de estresse, compostos genotóxicos, oxidantes, metais e orgânicos xenobióticos (DAUNERT *et al.,* 2000).

Tabela 7: Biossensores microbianos recombinantes usando genes *luc* ou *lux* como repórter luminescente (CAVALCANTI, 2010).

Célula Recombinante	Gene Repórter	Unidade Regulatória	Analito
Escherichia coli	luc luxAB luxCDABE	mer	Mercúrio Organomercúrios
Escherichia coli *Staphylococcus aureus*	luc luxAB	ars	Arsenito, arsenato,
Staphylococcus aureus	luc luxAB	cad	Cádmio
Escherichia coli	luc	znt	Zinco
Ralstonia eutrophus	luc	chr	Cromo
Pseudomonas fluorescens	luxCDABE	nah	Naftaleno, salicilato
Escherichia coli *Pseudomonas putida*	luc	xyl	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX)
Pseudomonas putida	luxAB	dmp	Fenóis
Pseudomonas putida	luxCDABE	tod	BTEX
Pseudomonas putida	luxCDABE	sep	Compostos aromáticos
Ralstonia eutrophus	luxCDABE	bph	Bifenilas policloradas
Escherichia coli	luxAB	alkB	Alcanos
Escherichia coli	luxCDABE	tet	Tetraciclinas

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

A reação da luciferase de vaga-lume (*firefly* luciferase - *Photinus pyralis*) apresenta algumas características únicas, quando comparada a outros ensaios. As reações enzimáticas, em sua maioria são medidas pelo consumo de um substrato, ou pela geração de um produto, geralmente um composto estável que pode ser determinado após um tempo específico. Já na reação da luciferase, os produtos

típicos que se acumulam, AMP (adenosina monofosfato), PPi (ânion pirofostato) e CO_2, não são medidos, e sim a luz produzida, que é integrada pela reação durante um determinado período de tempo (FORD & LEACH, 1998). Dessa forma, a emissão de luz é função da quantidade de ATP presente no meio.

Em relação ao mecanismo de funcionamento da *Escherichia coli* MC1061, usada no presente trabalho, esta tem o gene repórter sob o controle de um promotor que é induzido pela presença intracelular de um metal específico, o mercúrio. Utiliza o gene *LucFF* da luciferase do vaga-lume (*firefly)* como gene repórter inserido no transposon 21. O plasmídeo (pT0011) responsável pela detecção do Hg^{2+} contém o gene repórter sob o controle do promotor mer (*merR* + gene promotor), que é induzido por Hg^{2+} dentro da célula (BARROCAS, 2003; COSTA, 2010), como pode ser observado na Figura 6. O sinal de emissão da luz medida por biossensores deste tipo é dependente não só da concentração do substrato indutor, como da estabilidade da enzima luciferase e também da presença de outras substâncias estimulantes ou inibitórias na amostra a ser medida (STICHER *et al.,*1997).

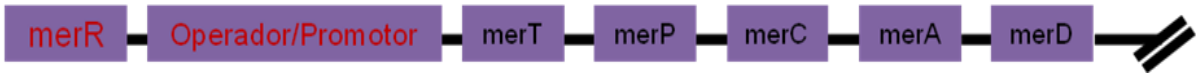

Figura 6: Esquema da inserção do promotor o transposon Tn 21 (Adaptado de BARROCAS, 2003).

Ainda com relação à estirpe MC1061, esta possui ainda dois outros genes que conferem resistência aos antibióticos, que são *kan* = canamicina e *cat* = cloranfenicol. A resistência a canamicina é peculiaridade para esta estirpe em particular, uma vez que o gene que confere a resistência está ativo o tempo todo (BARROCAS, 2003). Enquanto que o gene de resistência a cloranfenicol se encontra localizado a jusante do gene da luciferase do vaga-lume e também está sob o controle do promotor *mer* (VIRTA *et al*., 1995).

No caso da *Escherichia coli* MC1061, a luciferina é o substrato para a reação, que vai atravessar as membranas celulares bacterianas apenas em pH ácido. Assim, apenas a forma protonada de luciferina é facilmente permeável pela membrana celular. Por conseguinte, para um ensaio bem sucedido da reação da luciferase do vaga-lume in vivo, o pH extracelular do meio deve ser ligeiramente ácido. Assim, caso esta condição não seja atingida, a membrana celular funciona

como uma barreira ao transporte da luciferina, e a medida de luminescência será mais dependente da taxa de difusão da luciferina do que do montante de luciferase intracelular (FORD & LEACH, 1998; TAURIAINEN *et al.,* 1999).

3.8 A BAÍA DE GUANABARA

A Baía de Guanabara, segunda maior baía do litoral brasileiro segundo o Instituto Estadual do Ambiente (INEA), possui uma área de cerca de 380km^2, englobando praticamente toda a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, de forma total ou parcial o território político-administrativo de 16 municípios, sendo Cachoeiras de Macacu, Niterói, Nova Iguaçu, Petrópolis, Rio Bonito e Rio de Janeiro, Nilópolis, Belford Roxo, Mesquita, São João de Meriti, Duque de Caxias, Guapimirim, Magé, Itaboraí, Tanguá e São Gonçalo (COELHO, 2007).

O território da Bacia da Guanabara está compreendido na área intertropical, e devido a isso, possui um clima quente e chuvoso tipicamente tropical, a bacia é drenada por cinquenta e cinco rios, sendo os principais o Macacu, Guapiaçu, Guapimirim, (Caceribu, Guaxindiba, Guaraí, Imboassica, Magé, Estrela, Saracuruna, Meriti, Iguaçu e Pavuna (AMADOR, 2012).

A Região Hidrográfica da Baía de Guanabara (RHBG) abriga o maior parque industrial do Estado, apresenta um alto grau de complexidade tanto em sua dinâmica ecológica quanto no que se refere à sociedade que dá vida a este espaço geográfico (PDRH-BG, 2005).

Nela encontram-se 82 km² de importantes áreas de manguezal, 80% das quais dentro da Área de Proteção Ambiental, de Guapimirim, sob a tutela do IBAMA (ECOLOGUS-AGRAR, 2005). A baía é resultante de uma depressão tectônica formada no período Cenozóico, sua topografia acidentada e diversa caracteriza-se por uma grande planície sedimentar (ECOLOGUS-AGRAR, 2005). Sendo principal ecossistema da Bacia Hidrográfica a Mata Atlântica, um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (COELHO, 2007).

A região se encontra inserida na área intertropical, e seu clima é caracterizado por fatores de ordem geográfica (posição, maritimidade, continentalidade e

topografia) e de ordem dinâmica (circulação geral da atmosfera), e grande diversificação tanto de regime de temperatura, quanto de distribuição de precipitação (AMADOR, 1997). O clima da região é tropical úmido, com uma estação chuvosa no verão, de dezembro a abril e outra seca, entre junho e agosto (KJERFVE *et at*., 1997). Entretanto a estação seca é pouco pronunciada, com a variação da precipitação ocorrendo em função do relevo.

A baía possui salinidade alta, e esta decresce da entrada para o interior, devido à influência das descargas fluviais. Enquanto que com a temperatura se observa o contrário, devido à água fria do Oceano Atlântico (CARVALHEIRA, 2012). Os fatores como profundidade, velocidade de corrente e fluxo de água doce proporcionam ao sistema distintos compartimentos. As correntes provenientes do Oceano Atlântico atuam na renovação de oxigênio, na troca e na limpeza das águas da baía. O tempo de renovação de suas águas é de cerca de 10 a 20 dias (WASSERMAN *et al.,* 2000). O canal central é o principal controlador dos processos hidrodinâmicos da baía.

Essa região abriga cerca de 10.000 indústrias ao seu redor, as quais são responsáveis pelo lançamento de 4.800 Kg de metais pesados por dia (WASSERMAN *et al.,* 2000). Além disso, encontram-se instalados 2 portos, 2 bases navais, 32 estaleiros, 2 refinarias e terminais marítimos de petróleo (CARVALHEIRA, 2012).

Os rios da bacia, que atravessam as áreas mais densamente povoadas são vazadouros de esgoto, recebendo ainda grandes contribuições de despejos industriais e lixo. Nesta situação estão incluídos os afluentes da Costa Oeste da Baía, que vão do Canal do Mangue ao Canal de Sarapuí, além dos rios Alcântara, Mutondo, Bomba e Canal do Canto do Rio, na Costa Leste. Esses rios são utilizados basicamente para diluição de despejos, embora o uso que lhes é recomendado seja o de harmonia paisagística e estética (ECOLOGUS-AGRAR, 2005). Os demais rios da bacia são menos degradados. O rio Guapi-Macacu tem a água de melhor qualidade da Bacia, sendo fonte de abastecimento público para os municípios de Niterói e São Gonçalo, com captação no canal de Imuana para a Estação de Laranjal (ECOLOGUS-AGRAR, 2005). A tendência mais preocupante do processo de degradação da Baía tem sido o rápido crescimento de algas. O elevado grau de

eutrofização vem se espalhando das regiões Oeste e Noroeste, altamente urbanizadas, para as demais regiões (ECOLOGUS-AGRAR, 2005).

A Baía de Guanabara é escolhida como objeto de muitos estudos por ser "*emblemática e genuína representante dos frágeis e produtivos ecossistemas costeiros tropicais"* que, resultantes de uma longa evolução, foram submetidos a uma rápida degradação ambiental e social (AMADOR, 2012). A Baía de Guanabara tão impactada, já foi um ambiente ideal para fauna e flora com alta biodiversidade. Ainda existem regiões que não são tão afetadas, mantendo suas características naturais quase preservadas.

A opinião pública passa então a questionar como ficam os responsáveis pelos danos causados ao meio ambiente. Esse fato vem se intensificando nas últimas décadas devido ao crescimento das atividades industriais. Diante dessa situação, melhores padrões de produção e atividades que respeitem os limites de saturação do meio ambiente foram buscados através de ferramentas ambientais (ECOLOGUS-AGRAR, 2005). Este paradigma promoveu uma geração de respostas: o setor produtivo passou a transformar seus processos a fim de demonstrar sua preocupação com o meio ambiente, incorporando ações efetivas para preservá-lo como o reaproveitamento de energia, a seleção de matérias-primas, o desenvolvimento de novos processos e produtos e a reciclagem de resíduos (SANTOS & GUIMARÃES, 2003).

Desta forma, a Baía de Guanabara passa a ser beneficiada por projetos de despoluição como o PDBG que prevê a diminuição da carga de matéria orgânica (DBO) nas águas (estipulando DBO < 5mg/L). Entretanto, sabe-se que o decréscimo da carga orgânica nas águas alteraria o estado de oxirredução do meio, sobretudo das camadas superficiais do sedimento (CARVALHEIRA, 2012). Esse programa abrange programa de saneamento nos municípios do entorno da Baía de Guanabara, com intuito de reverter à degradação ambiental desta Baía, através da implantação de sistemas de esgotamento sanitário; do fortalecimento institucional (melhoria dos serviços por parte das entidades envolvidas) e da promoção das políticas públicas municipais de saneamento. Algumas ações como implantações de oito Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) já foram estabelecidas são elas: ETE Sarapuí, ETE Pavuna, ETIG, ETE São Gonçalo, ETE Penha, ETE Alegria, ETE

Icaraí e ETE Barra. Embora estejam operando abaixo de sua capacidade nominal (GUANABARA LIMPA, 2014).

Atualmente, o Instituto Estadual do Ambiente (INEA) é o órgão responsável por um monitoramento, para acompanhar e medir as alterações no ecossistema da Baía de Guanabara, em função das obras de saneamento e de controle industrial, promovidas pelo PDBG. O monitoramento é um instrumento importante e imprescindível tanto como suporte ao controle das atividades poluidoras, quanto como fonte de informações para o planejamento, devendo ser realizado, preferencialmente, com constância, regularidade e coerência em suas premissas básicas, de modo a favorecer a obtenção de dados históricos que permitam detectar mudanças e tendências na qualidade da água (SANTOS & GUIMARÃES, 2003; ECOLOGUS–AGRAR, 2005).

Os estudos sobre a contaminação com mercúrio na Baía de Guanabara se iniciaram no final da década de 1970. Alguns trabalhos na literatura abordam a questão do mercúrio e do saneamento da região. Os atuais níveis de poluição da Baía de Guanabara são decorrentes de um processo de degradação que se intensificou, principalmente, nas décadas de 1950-1960, com o elevado crescimento urbano verificado, especialmente, na Região Sudeste do Brasil (NETO & FONSECA, 2011). As intervenções nas bacias hidrográficas vêm promovendo mudanças nos ambientes estuarinos, tais como: na qualidade das águas, nos efeitos que alteram as taxas e os padrões de sedimentação e na qualidade desses sedimentos.

Há uma renovação cíclica de suas águas com as águas do mar; no entanto, é receptora de uma significativa bacia hidrográfica, a qual, por sua vez, recebe uma gama variada de lançamentos líquidos e sólidos. Dentre as potenciais fontes poluidoras, encontram-se diferentes segmentos industriais, terminais marítimos de produtos oleosos, dois portos comerciais, diversos estaleiros, duas refinarias de petróleo, entre outras atividades econômicas.

O desenvolvimento industrial e o crescimento populacional trouxeram, além da poluição, questões ambientais de ordem física, tais como a destruição dos ecossistemas periféricos à Baía de Guanabara, os aterros de seu espelho d'água, o uso descontrolado do solo e seus efeitos adversos em termos de assoreamento, sedimentação de fundo, inundações e deslizamentos de terra (AMADOR, 1997).

Como os sedimentos possuem alta capacidade de complexar os poluentes em sua matriz, podem ser utilizados como indicadores da qualidade da água. Isso permite monitorar os impactos da atividade antropogênica sobre o ambiente (RANGEL *et al.,* 2010). A sedimentação estuarina é formada principalmente por areia e lama síltica e é rica em matéria orgânica. Os sedimentos lamosos, que se concentram no interior da Baía, principalmente atrás da Ilha do Governador, possuem altos teores de metais pesados (GODOY *et al*., 2012; MARINO *et al.,* 2011).

A deposição de sedimentos na Baía pode ter origem antropogênica, como efluentes domésticos e industriais, ou em processos naturais, como a ação de correntes e ventos e as águas das chuvas. A contribuição dos organismos aquáticos é através da aglomeração de finas partículas em suspensão, realizada por filtragem (AMADOR, 1997). GODOY e colaboradores (1998) mostraram através de estudos que não há grande variação entre as taxas de sedimentação em diferentes regiões da Baía de Guanabara, sendo os valores de velocidade encontrados variando entre 1 a 2 cm por ano. A alta taxa de sedimentação promove um deslocamento rápido de uma parcela dos contaminantes, dissolvidos ou em suspensão nas águas, o que explica o elevado potencial tóxico dos sedimentos nesta região.

A taxa de sedimentação da região aumentou consideravelmente ao longo dos anos, devido ao aumento do fluxo dos rios, o que acarreta em um maior transporte e distribuição de sedimentos. Isso é atribuído à expansão das atividades humanas ao redor da Baía, como crescimento de indústrias, da população, das atividades portuárias e da construção de aterros (GODOY *et al.,* 1998).

A porção noroeste da Baía representa a principal fonte de emissão de metais pesados, devido à presença de rios bastante poluídos (como Meriti, Iguaçu, Sarapuí, Estrela e Irajá) e às atividades de uma refinaria de petróleo na região (DE LUCA REBELLO *et al.,* 1986; PFEIFFER *et al*., 1980; PFEIFFER *et al.,* 1982; CARVALHO *et al*., 1982; BAPTISTA *et al.,* 2006).

A região nordeste, que possui o mesmo tipo de sedimento que a noroeste, apresenta menores concentrações de metais pesados devido a presença de uma área de proteção ambiental (BAPTISTA *et al.,* 2006).

BAPTISTA NETO e colaboradores (2003) mostraram que rios das áreas de São Gonçalo e Niterói também são importantes cargas de metais pesados para a baía, o que pode ser atribuído ao intenso despejo de esgoto doméstico sem tratamento. Também foram observadas altas concentrações de metais pesados na região do porto do Rio de Janeiro. Já na região sul, próxima à entrada da Baía, tem-se as menores taxas de poluição por metais pesados (BAPTISTA NETO *et al.,* 2006).

Existem estudos na literatura que relatam dados de concentração total de mercúrio em sedimentos da Baía de Guanabara (BARROCAS, 1994). DE LUCA REBELLO e seus colaboradores (1986) relataram concentrações de mercúrio entre 0,07 e 9,8 µg/g de sedimento seco em suas amostras. Godoy e colaboradores (1998) relataram uma variação de 0,4 a 11,1 µg/g de sedimento seco na desembocadura Rio Estrela. Já BARBOSA e colaboradores (2004) encontraram valores de concentração variando entre 1,0 e 2,0 µg/g de sedimento seco no Canal do Fundão.

3.8 CONSIDERAÇÕES DO PRESENTE ESTUDO

O presente trabalho se encontra inserido na categoria dos sensores microbianos bioluminescentes, no qual o biocomponente é o micro-organismo geneticamente modificado *Escherichia coli* MC1061 para detecção de mercúrio biodisponível em amostras da Baía de Guanabara. A tecnologia de DNA recombinante vêm sendo utilizada como ferramenta para pesquisar a biodisponibilidade do mercúrio em amostras ambientais.

A bactéria *E. coli* MC1061 é capaz de detectar mercúrio biodisponível, através da reação da enzima luciferase do vaga-lume (*Firefly luciferase*), respondendo quantitativamente quando exposta ao mercúrio, através de bioluminescência.

A área de estudo foi escolhida em virtude dos atuais níveis de poluição da Baía de Guanabara, resultantes de longa degradação ambiental e social.

E a análise de sedimentos, por sua vez, foi selecionada em função destes apresentarem a maior acumulação dos metais. Assim, buscou-se amostras de

sedimento da Baía para realização dos primeiros testes do biossensor para detecção de mercúrio em sedimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Neste primeiro item estão descritos os equipamentos e reagentes utilizados, apresentados na Tabela 8 e as composições dos meios (Tabela 10) utilizados para o crescimento celular (meio de cultivo/manutenção), e para os experimentos de bioluminescência.

Tabela 8: Equipamentos e reagentes.

Equipamentos
Estufa de secagem (QUIMIS)
Placa de aquecimento e agitação (QUIMIS)
Agitador de tubos vortex (QUIMIS)
Espectrofotômetro UV-visível (Q798DRM – QUIMIS)
Espectrofotômetro Hach DR 2000
Balança AG 200- IV2000 – Analisador de Umidade por Infra-vermelho (GEHAKA)
Centrífuga (QUIMIS)
Luminômetro (Luminoskan Ascent 2.4)
Oxímetro (DM – 4P Digimed – Digicrom Analytical 41814)
Medidor de pH (Q400MT – QUIMIS)
Reagentes
* Reagentes utilizados foram adquiridos da VETEC e SIGMA de grau P.A.:
$MgSO_4$, $Ca(NO_3)_2$, Glicose, Casamino ácidos, Luciferina, Citrato de Sódio, LB Broth, LB Ágar, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NH_4NO_3, $NaNO_3$, Monossulfato de canamicina, HNO_3, HCl

4.1.1 DESCONTAMINAÇÂO QUÍMICA DOS MATERIAIS

Todos os materiais aplicados nos testes foram descontaminados utilizando procedimentos de lavagem, ajustados para a sua resistência química específica. Os banhos de descontaminação empregados são descritos na Tabela 9. Após lavagem, os materiais eram armazenados em sacos plásticos duplos até o momento do uso. A descontaminação se faz obrigatória para minimizar a contaminação (pelo metal mercúrio) nos materiais a serem utilizados nos testes bioluminescentes.

Tabela 9: Etapas dos banhos de descontaminação.

Vidrarias/Plásticos	Tempo
Solução detergente (EXTRAN)	12 horas
Solução de ácido nítrico 10% (v/v)	6 a 8 horas
Enxague	15 minutos
Lavagem com água deionizada	5 minutos

4.1.2 LUMINÔMETRO COMO ELEMENTO DE TRANSDUÇÃO

Nos ensaios de bioluminescência, foi utilizado como transdutor o luminômetro Luminoskan Ascent da Labsystems, que é um equipamento capaz de detectar emissões de luz, formulado de modo a evitar a interferência entre captação de luz de poços vizinhos (COSTA, 2010). As medidas são fornecidas em unidades relativas de luz (URL) e são proporcionais à concentração do analito. O limite de detecção permite detectar até mesmo pequenas concentrações de analito.

O equipamento (Figura 7) possui uma bandeja para abrigar uma placa de 96 poços, nos quais são acondicionadas as amostras, cada poço emite uma determinada quantidade de luz, que é refletida de forma a atravessar um filtro de emissão, para atingir o tubo fotomultiplicador.

Figura 7: Equipamento *Luminoskan Ascent* utilizado para Medição da Luminescência. (Adaptado de COSTA, 2010).

4.1.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE BIOLUMINESCÊNCIA

O sinal de emissão da luz medida por biossensores de células inteiras é dependente não só da concentração 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 (STICHER *et al.,* 1997).

Desta maneira, as condições para o micro-organismo selecionado avaliadas em COSTA e colaboradores (2011) foram mantidas: como meio de detecção (M9 NO_3) e tempo de incubação na câmara luminométrica (45 minutos), concentração celular de 0,06g/L, um fator de diluição 1:33,3 (diluição das células).

4.2 COMPONENTE BIOLÓGICO: *E. COLI* MC1061

4.2.1 PREPARO DE MEIOS E SOLUÇÕES

O meios de cultura aplicados neste estudo foram os mesmos já empregados em trabalhos anteriores *COSTA et al.*, 2013 e BARROCAS (2003):

- Ensaios luminométricos – Meio mínimo de sais (Atlas, 1997)
- *Manutenção - LB (LURIA-BERTANI)*

Todas as soluções utilizadas diretamente nos experimentos com o biossensor de mercúrio foram biologicamente descontaminadas, esterilizadas em autoclave e guardadas em local limpo. E a manipulação foi cuidadosa, utilizando-se técnicas assépticas rigorosas.

<u>Protocolo de esterilização:</u>

- ✓ Autoclave a 121°C
- ✓ 25 minutos
- ✓ Pressão de 1 atm.

4.2.1.1 MEIO MÍNIMO DE SAIS

O meio mínimo de sais ($M9NO_3$) é o principal meio utilizado nos experimentos com o micro-organismo em questão. Este foi utilizado em estudo anterior por COSTA (2010) e BARROCAS (2003) para o crescimento prévio e ensaios luminométricos com o biossensor, pode ser observado na Tabela 10.

A composição do meio $M9NO_3$ é basicamente uma mistura de sais inorgânicos (Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NH_4NO_3, $NaNO_3$) acrescidos com fatores de crescimento (glicose e casamino ácidos) preparados em tampão pH 7, elaborado com sais de fosfato (ATLAS, 1997). Ainda é adicionado o antibiótico canamicina em uma concentração final de 30mg/L para seleção positiva do transposon *luc* presente no plasmídio, garantindo o crescimento de somente células capazes de emitirem luz em contato com mercúrio. A Tabela 10 apresenta as quantidades utilizadas nas diferentes etapas. O volume total foi de 50 mL em cada meio de cultivo no crescimento prévio e de 10 mL nos experimentos luminométricos.

Tabela 10: Meio Utilizado para o Experimento Luminométrico.

Meio de cultura	Crescimento prévio (Volume total: 50 mL)	Preparo da célula no dia do experimento (Volume total: 10 mL)
$M9NO_3$ (Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NH_4NO_3, $NaNO_3$)	48 mL	9,6 mL
$MgSO_4$ 0,1 M	500 µL	100 µL
$Ca(NO_3)_2$ 0,01 M	500 µL	100 µL
Glicose - 200g/L	500 µL	100 µL
Casamino ácidos - 100 g/L	500 µL	100 µL
Canamicina - 30mg/L	150 µL	30 µL

4.2.1.2 MANUTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS

O meio *LB* é utilizado para a reconstituição das unidades populacionais ou bactérias liofilizadas (devido sua complexa composição) e o meio *LB* Agar é utilizado para crescimento em placas, a partir de colônias do micro-organismo, conservadas sob refrigeração. As células foram mantidas em placas de Petri contendo meio sólido LB Agar, armazenadas a 5ºC em refrigerador. A composição dos meios utilizados na manutenção celular podem ser observados na Tabela 11.

Repiques semestrais eram feitos para manutenção da viabilidade celular. Neste procedimento micro-organismos foram inoculados em um tudo de ensaio contendo 5 mL de meio LB com canamicina, partindo de uma colônia isolada recém crescida. A cultura foi incubada, e crescida (24 horas) a 30º C até atingir a fase estacionária de crescimento.

Tabela 11: Composição dos Meios de Estocagem das Células (COSTA, 2010).

Constituinte	Quantidade
LB Broth	10 g
Água deionizada	400 mL
Canamicina - 30mg/L	1,2 mL
LB Ágar	16 g
Água deionizada	400 mL
Canamicina - 30mg/L	1,2 mL

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

4.2.1.3 SOLUÇÃO DE D-LUCIFERINA 1 mM (pH = 5,0)

A luciferina, é o substrato para a reação, que vai atravessar as membranas celulares bacterianas em pH ácido. Em um frasco contendo 25mg de luciferina adicionou-se 1 ml de solução tampão de citrato 100mM, e colocado sob agitação (vortex). Em seguida, esta foi transferida para um balão volumétrico contendo 79 mL de solução tampão citrato 100 mM, previamente adicionados. Alíquotas da solução estoque de luciferina foram transferidas para tubo de polipropileno com tampa rosqueada, previamente marcado, usando volumes adequados para os ensaios.

Os tubos foram conservados em congelador (-5º C) envoltos por papel alumínio, pois a luciferina é sensível ao oxigênio e luz, por isso é importante

minimizar sua exposição a estes agentes durante a preparação e o armazenamento da solução.

4.2.1.4 SOLUÇÕES DE MERCÚRIO

As amostras de mercúrio foram preparadas a partir de uma solução padrão de mercúrio (1g/L). Todas as soluções foram preparadas, no dia de cada experimento, utilizando solução de HNO_3 4,5mM. Na Tabela 12 estão descritas as concentrações de mercúrio utilizadas durante todo o trabalho, selecionadas em razão de estudos anteriores, e de valores estabelecidos na Resolução CONAMA n° 357 de 2005, para água salina de 0,2 µg/L ou ppb.

As soluções de mercúrio utilizadas nos testes foram obtidas a partir de diluições de soluções estoque (1g/L da SIGMA). Ressaltando-se o cuidado de evitar contaminação cruzada, utilizando-se sempre os mesmos frascos para os mesmos níveis de concentração (MARINS, 1990).

Tabela 12: Soluções de mercúrio utilizadas no presente estudo.

Soluções de mercúrio	Concentração das amostras de mercúrio (µg/L)
Curva de calibração e adição padrão	0,0001
	0,0001
	0,003
	0,006
	0,009
	0,01
	0,1
	1
	2,99
	10,05
	17,1
	20

4.2.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E CONSTRUÇÃO DA CURVA DE PESO SECO DE *E. COLI* MC1061

4.2.2.1 CURVA DE CRESCIMENTO

O crescimento populacional é definido como o aumento do número, ou da massa microbiana. E a taxa de crescimento é a variação no número ou massa por unidade de tempo. O método utilizado foi o de monitoramento do crescimento microbiano por meio da turbidez, realizando medidas de absorvância em espectrofotômetro. O crescimento foi avaliado através do acompanhamento do micro-organismo bioluminescente repórter*, E. coli* MC1061 (VIRTA *et al.*, 1995).

O acompanhamento do perfil de crescimento da cepa *E. coli* MC1061 se deu da seguinte forma: adicionou-se a quantidade calculada anteriormente a um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio $M9NO_3$ sendo retirada a primeira alíquota para leitura da Densidade Ótica (DO_{600}) no tempo inicial (0 h). O cultivo foi mantido a 30ºC com agitação de 150 rpm, sendo o crescimento celular monitorado em intervalos de 1 hora, pela retirada de alíquotas (2mL) e medida de absorvância destas a 600 nm, até que fosse alcançado um valor máximo estável. Vale ressaltar que de acordo com estudo do micro-organismo em questão, realizado por COSTA (2010), são necessárias onze horas para que se atinja a fase estacionária.

Após o crescimento celular (meio $M9NO_3$, com agitação de 150 rpm a 30°C), foi realizada a leitura da densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) em espectrofotômetro UV-visível. Foi realizado então o cálculo da quantidade (mL) necessária do pré-inóculo para se obter uma DO_{600} inicial de aproximadamente 0,2 em 50 mL de meio $M9NO_3$.

4.2.2.2 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

Após crescimento celular em meio mínimo de sais, por cerca de 16 horas a 30ºC, com agitação de 150 rpm, as células de *E. coli* MC1061 obtidas em estado estacionário, foram centrifugadas por 25 minutos a 3500 rpm. O precipitado obtido foi ressuspendido em um mínimo de água deionizada (cerca de 5 mL) e as células novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e lavadas com água

destilada. A biomassa foi ressuspendida em 10 mL do meio $M9NO_3$ para se obter uma suspensão concentrada de células.

Desta mesma suspensão utilizada para o cálculo da concentração celular, utilizando os três mililitros restantes, várias diluições foram utilizadas para obter cerca de oito leituras de absorbância a 600nm entre 0,02 e 0,2, correspondendo cada leitura à sua respectiva concentração celular.

Dessa suspensão celular, retira-se 7 mL para filtração em membrana Millipore. Cabe ressaltar que a membrana é pesada antes e depois da filtração em uma balança que elimina toda a umidade da amostra (Balança AG 200, IV2000). Dessa forma, tem-se o valor de massa das células por diferença. A concentração da suspensão celular, em g/L, é obtida dividindo-se o valor da massa celular, em g, pelo volume da alíquota (7mL). Com os 3 mL restantes, foram realizadas 7 diluições para se obter 7 leituras de absorvância a 600nm entre 0,02 e 0,2, e, então, encontrar as suas respectivas concentrações celulares. Este procedimento foi feito em duplicata.

4.2.2.3 PREPARO DAS CÉLULAS

O preparo da suspensão celular usada nos ensaios bioluminescentes foi realizado a partir de uma cultura nova (Figura 8), obtida de inóculo crescido em 50 mL de meio $M9NO_3$, com agitação de 150 rpm e 30ºC. A cultura foi centrifugada por 6 minutos a 3500 rpm, sendo o sobrenadante adicionado de 10 mL de água deionizada (para o processo de lavagem), centrifugado por mais 6 minutos, retirando o sobrenadante e adicionando a cultura 10 mL de meio fresco ($M9NO_3$). Este último passo foi repetido, estando as células prontas para os ensaios, e sendo mantidas no gelo até o início dos testes.

As diluições que foram utilizadas para os ensaios luminométricos partiram das obtidas a partir da curva de peso seco. Após obter a suspensão celular concentrada descrita anteriormente (item 4.2.2.3), a mesma foi mantida em gelo a fim de parar a atividade microbiana (Figura 8).

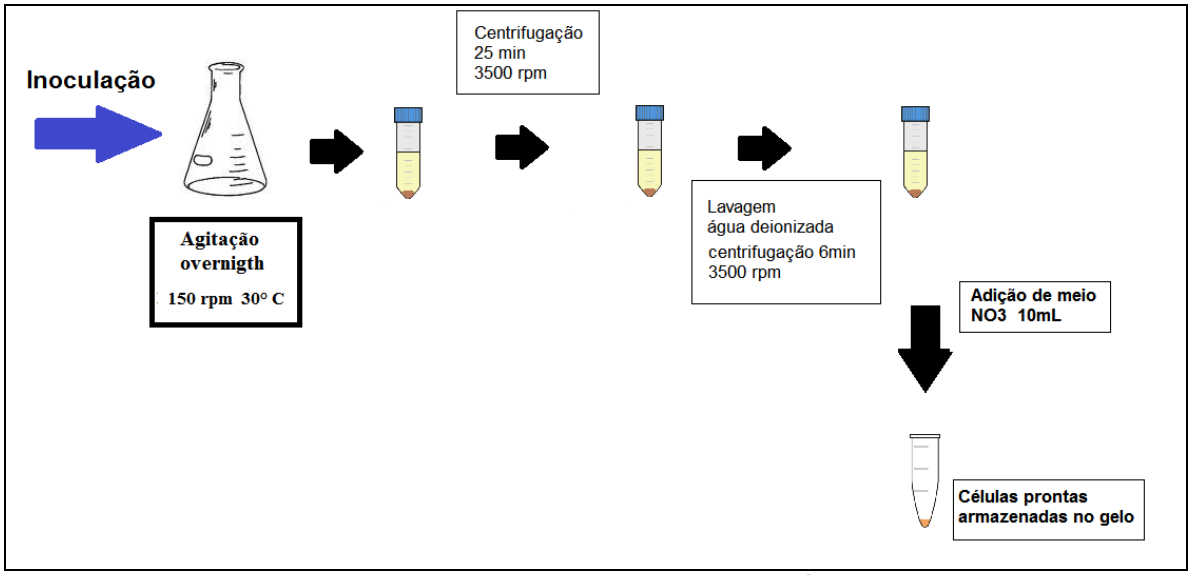

Figura 8: Esquema de Preparo das Células.

4.3.CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para o estudo da sensibilidade do método realizou-se ensaios de detecção da bioluminescência, para diferentes faixas de concentração de mercúrio em soluções aquosas (descrita no item 4.2.1.4, Tabela 12), bem como, com amostras ambientais da Baía de Guanabara diretamente com Hg^{2+}, com limites máximos e mínimos de concentração e linearidade das curvas de calibração.

A obtenção da curva de calibração para o sistema proposto é essencial, pois permitirá correlacionar o sinal bioluminescente lido com a concentração de mercúrio presente nas amostras, considerando os efeitos inibitórios ou interferentes que a amostra real possa apresentar (brancos reacionais, por exemplo).

4.3.1 BRANCOS REACIONAIS

A sensibilidade é um parâmetro muito importante na validação do método. Alguns requisitos são necessários, como por exemplo, obtenção de baixos níveis de resposta do biossensor para o que é considerado como branco reacional (amostra onde o mercúrio não foi adicionado às soluções sintéticas). Esta resposta residual pode ser proveniente de níveis traço de Hg^{2+} nos reagentes ou nos meios utilizados nos ensaios. Desta forma, foram realizados ensaios de leituras de branco reacional com a água deionizada e amostras sintéticas com salinidade (para avaliar a

influência da salinidade nas amostras ambientais da Baía de Guanabara, levando em conta que o UPS da Baía de Guanabara está próximo do UPS do mar = 35 (UPS = unidade prática de salinidade - determinada com base na relação direta entre condutividade elétrica da água do mar e sua salinidade - 35 UPS => 35 partes por mil).

Cabe ressaltar que os valores das leituras dos brancos iniciais (tanto da água como da influência da salinidade) foram descontados dos valores finais em todos os ensaios realizados neste estudo.

4.3.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MERCÚRIO

4.3.2.1 SOLUÇÕES AQUOSAS

Os ensaios luminescentes estão descritos no item 4.4, nos quais placas brancas foram utilizadas, sendo possível a realização de desenhos experimentais, de acordo com a ordem de leitura do aparelho. A adição de 10µL das amostras de mercúrio em soluções aquosas utilizando água deionizada (concentrações definidas como mostra a Tabela 12, para construção da curva de calibração), foi feita diretamente nos poços das microplacas, de acordo com o desenho experimental previamente estabelecido (baseado na ordem de leitura). Esta adição se deu, antes da introdução das alíquotas das amostras celulares (50 µL), armazenadas, no gelo, em tubo de Eppendorf.

Após serem adicionadas as soluções, as placas foram incubadas no interior da câmara do luminômetro à temperatura ambiente por 45 minutos, tempo definido em função do estudo de otimização em COSTA e colaboradores (2013).

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

4.3.2.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE MERCÚRIO UTILIZANDO AMOSTRAS REAIS

Neste estudo, por se trabalhar com amostras complexas, uma curva de adição padrão foi necessária. Nesta etapa, diferentes alíquotas do padrão de mercúrio foram adicionadas nas próprias amostras reais analisadas, segundo diferentes faixas de concentração de mercúrio (Tabela 12). Todas as condições (conforme descrito no item 4.3.2.1) foram feitas em duplicata, e os resultados da curva de calibração são apresentados em somatório de luz emitida (URL) em cada condição testada.

4.3.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SEDIMENTO E MÉTODO DE LIXIVIAÇÃO DE MERCÚRIO EM SEDIMENTOS

A curva de calibração das amostras após a lixiviação foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.2. A metodologia para a lixiviação do mercúrio das amostras de sedimento foi adaptada da técnica utilizada por IVASK e colaboradores (2002). Para os experimentos de determinação de bioluminescência, seguiu-se a etapa descrita no item 4.2.2.3 (COSTA, 2010). Dois tipos de métodos de lixiviação foram testados: com amostra ambiental da Baía de Guanabara e outro com HCl 1M.

Os sedimentos foram lixiviados com água da própria Baía de Guanabara e com HCl 1M a fim de comparar o potencial de lixiviação dos dois métodos. A água da Baía de Guanabara foi coletada juntamente com o sedimento e foi utilizada por se tratar da mesma localidade do sedimento.

As quatro amostras de sedimento (descritas no item 4.6.1) foram armazenadas em tubos de centrífuga do tipo Falcon (50mL) na geladeira. No dia anterior ao experimento bioluminescente, os tubos foram levados à capela, onde foi coletado 1g de cada amostra em uma balança, sendo cada um deles armazenado em novo tubo (para cada tipo de lixiviação). Em seguida, adicionou-se 12,5 mL de água coletada da Baía de Guanabara em cada tubo. Esse procedimento foi realizado em duplicata, totalizando 8 tubos, já que foram usadas 4 amostras (Figura 9).

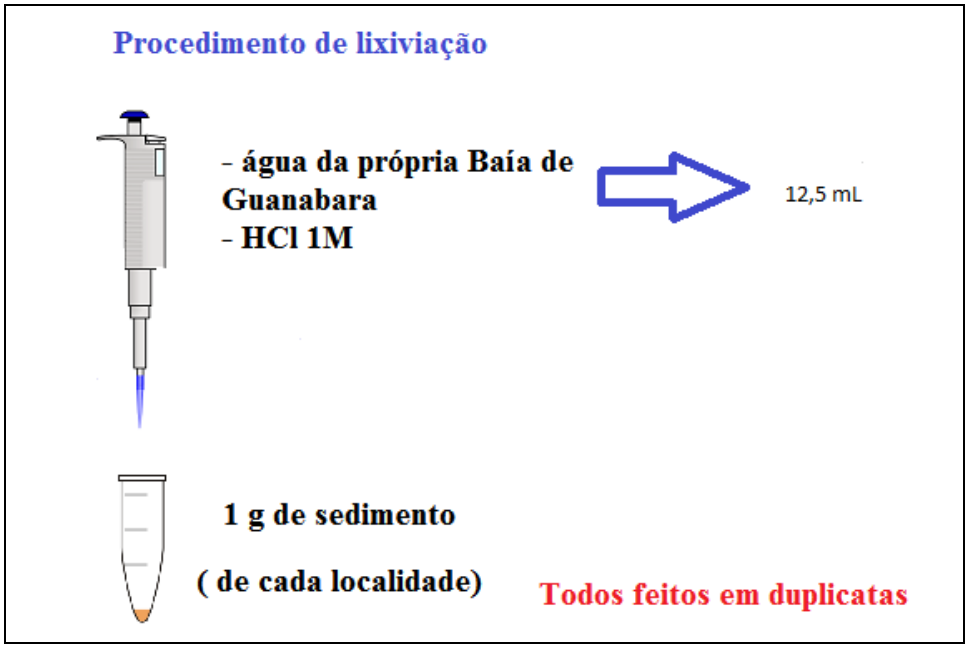

Figura 9: Esquema da lixiviação realizada nas amostras de sedimento.

Repetiu-se o procedimento anterior, também em duplicata, sendo a única diferença na lixiviação com 12,5 mL de HCl 1M, ao invés de água da Baía de Guanabara (Figura 9).

Ao final desta etapa, os 16 tubos de centrífuga tipo falcon (50mL), sendo oito com água da Baía de Guanabara e oito com ácido (HCl 1M), foram levados à incubadora, onde permaneceram sob agitação a 500 rpm e 30ºC por 24 horas. Após as 24 horas, retirou-se 50µL da suspensão de cada tubo, sendo armazenados em tubo tipo Eppendorf.

O volume restante de cada tubo foi centrifugado a 3500 rpm por 25 min, e do sobrenadante obtido retirou-se 50µL para misturar ao que já havia sido coletado anteriormente, tendo-se no final 16 tubos tipo Eppendorf com 100µL cada. A seguir encontra-se o esquema deste procedimento ilustrado para um tubo (Figura 10).

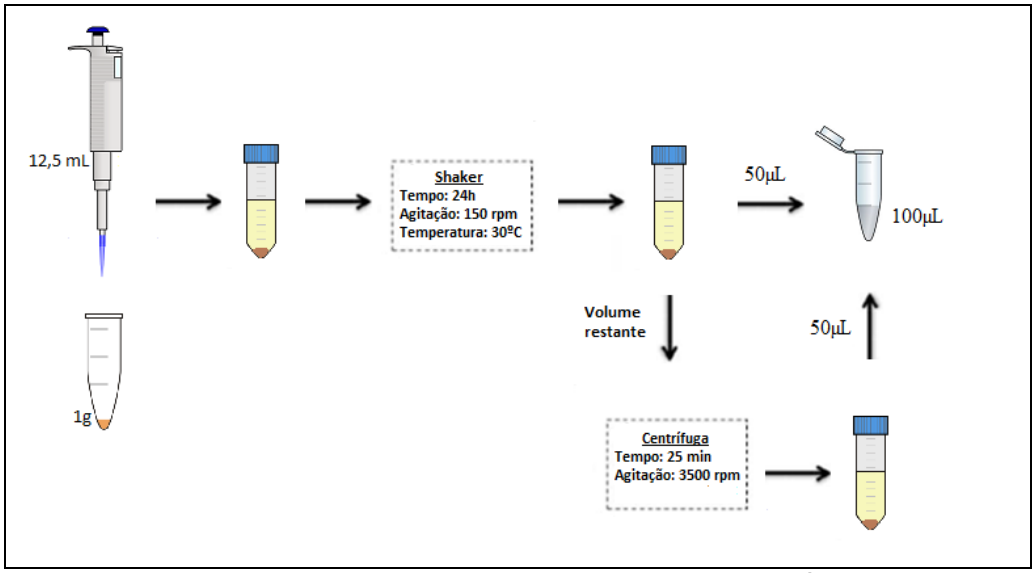

Figura 10: Esquema de preparo de soluções das amostras após a lixiviação.

4.4 EXPERIMENTOS DE BIOLUMINESCÊNCIA

Para os procedimentos de determinação da bioluminescência foram utilizadas placas brancas opacas de 96 poços (Figura 8), sendo possível a realização de desenhos experimentais, de acordo com a ordem de leitura do aparelho.

Neste protocolo é feita a adição diretamente nos poços das microplacas, sendo as soluções de mercúrio (amostras sintéticas ou ambientais - 10 µL) adicionadas aos poços da placa luminométrica, de acordo com o desenho experimental previamente estabelecido (baseado na ordem de leitura de cada amostra). Em seguida eram adicionadas alíquotas das amostras celulares (50 µL), com densidade celular conhecida (COSTA, 2010). As alíquotas das amostras celulares foram adicionadas em seguida sendo antes diluídas 5 vezes visando atingir a concentração celular de trabalho desejada.

Após serem adicionadas as soluções, mercúrio e células, as placas foram incubadas no interior da câmara do luminômetro à temperatura ambiente por 45 minutos (COSTA, *et al.,* 2013) para a produção da luciferase, que, por sua vez, deve ser proporcional ao mercúrio incorporado pelos micro-organismos. Após a etapa de incubação, o processo de medição se iniciou com o aparelho programado para dispensar 100µL de substrato da luciferase em cada poço da placa, a luciferina

1mM, e em seguida inicia-se o monitoramento de cada poço por 12 segundos. O volume total utilizado em cada poço foi de 160µL.

4.5 DETERMINAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM VAPOR FRIO

As amostras sintéticas da curva de calibração foram enviadas a um laboratório independente, no Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da ENSDP-Fiocruz, para análise quantitativa do elemento mercúrio pelo método de espectrometria de absorção atômica com vapor frio, para que fosse ser verificada a validação do método testado no presente estudo.

4.6 ÁREA DE ESTUDO

4.6.1 LOCALIDADE

A Baía de Guanabara apresenta profundidade média de 7 metros e 80% de sua área tem menos de 10 metros de profundidade (NETO & FONSECA, 2011).

As amostras de água foram coletadas de abril/2012 a dezembro/2013, em dois locais da Baía de Guanabara (Figura 10), sendo o primeiro denominado PONTO A (latitude: -22° 53'04.200" S e longitude 43°9'20.880" O) coletado em três pontos na coluna d´água, (superfície, meio e fundo), e o segundo denominado PONTO D (latitude: -22° 49' 42.960" S e longitude: 43° 12' 51.840" O) coletado em dois pontos na coluna d´água, (superfície e fundo), totalizando 5 amostras por mês de coleta (Tabela 13).

As amostras de água foram coletadas em garrafas de *van dorn*, transferidas para tubos de centrífuga tipo falcon (50mL) e mantidas sob refrigeração adequada (5°C) até o experimento luminométrico. O material usado para coleta das amostras de água foi previamente esterilizado para evitar a contaminação biológica das amostras. As amostras, assim como os dados físico-químicos: temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido e salinidade, foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Biogeoquímica, Departamento de Ecologia, IB/ CCS/UFRJ.

As amostras de sedimentos utilizados foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Geoquímica Ambiental da Universidade Federal Fluminense. As amostras de sedimento eram provenientes das seguintes localidades: Porto Rio, Porto Niterói, Rio Iguaçu e Rio Meriti. Não há informações sobre a composição das amostras fornecidas (Tabela 13 e Figura 11).

As amostras ambientais foram estudadas conforme os experimentos descritos no item 4.4, por ensaios de bioluminescência para detecção do mercúrio biodisponível, e por meio das curvas de calibração (água deionizada e adição padrão nas amostras). No caso das amostras de sedimento uma etapa de lixiviação foi realizada para só então se realizar os ensaios de bioluminescência.

Todos os parâmetros foram analisados utilizando-se o software *Excel,* por meio da média, coeficiente de variação e desvio padrão. Algumas análises estatísticas foram utilizadas para tentar verificar uma correlação entre os parâmetros físico-químicos e a concentração de mercúrio biodisponível (com o uso do programa *statistica* 6.0).

Tabela 13: Localização dos pontos de coleta.

Pontos de Coleta	**Coordenadas**	
Coluna d´água	Latidute	Longitude
Ponto A (próximo a Ponte Rio -Niterói)	22° 53'04.200" S	43°9'20.880"O
Ponto D (próximo a Ilha do Governador)	22° 49' 42.960" S	43° 12' 51.840" O
Sedimento	Latidute	Longitude
Rio Iguaçu	22°44'53" S	43°14'28" O
Rio Meriti	22°48'11 S	43°16'17" O
Porto Rio	22°53'46" S	43°12"38" O
Porto Niterói	22°52'42" S	43°7'7" O

Figura 11: Mapa que apresenta os pontos de coleta na Baía de Guanabara.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para desenvolvimento de um biossensor deve se ter em mente a escolha do componente biológico, para que este responda de forma adequada às necessidades para a sua aplicação. Neste capítulo serão apresentados resultados referentes ao biocomponente micro-organismo *Escherichia coli* MC1061, e ainda, a avaliação e aplicabilidade do biossensor microbiano em amostras ambientais (avaliando valores de biluminescência URL, desvios padrão e coeficiente de variação de cada ensaio). Além disso, os valores de análise obtidos com o biossensor serão comparados à metodologia padrão visando atestar sua confiabilidade.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA

Com objetivo de padronizar o componente biológico usado no biossensor microbiano do presente estudo foram realizados experimentos de caracterização da bactéria *E. coli* MC1061.

5.1.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

O perfil de crescimento do micro-organismo *Escherichia coli* MC1061 é apresentado na Figura 12. A partir da curva de crescimento obtida, pode ser observado que as células entram na fase exponencial após aproximadamente sete horas, enquanto que para atingir a fase estacionária foram necessárias em torno de onze horas. O teste da curva de crescimento foi realizado com medição de pontos em intervalos de 1 hora, até alcançar o estado estacionário.

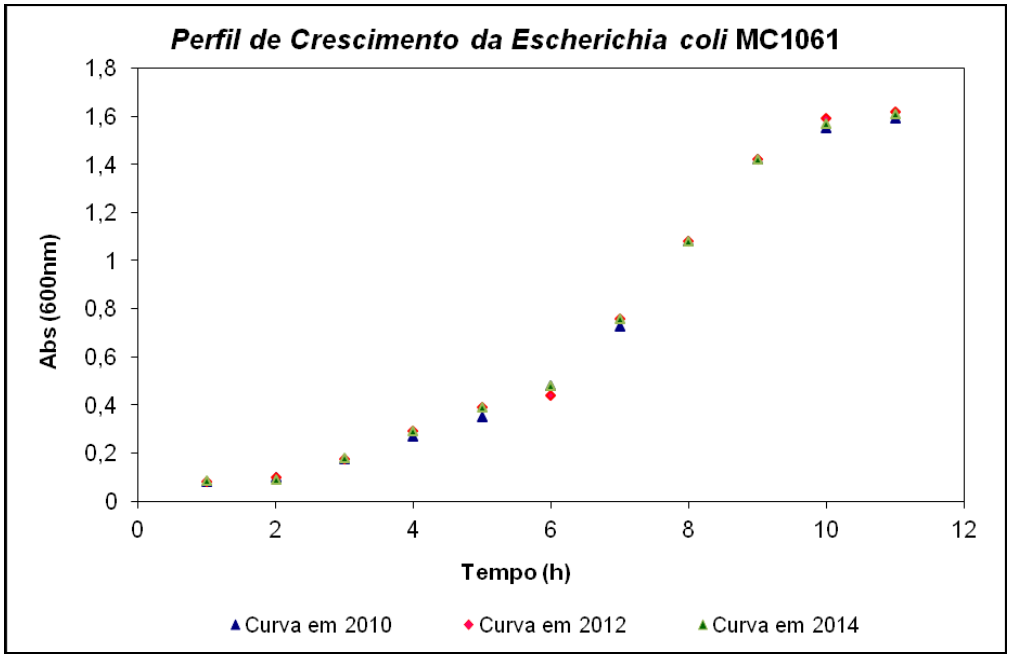

Figura 3: Curva de Crescimento de *Escherichia coli* MC1061 (resultados de três réplicas).

A curva foi avaliada nos anos de 2010, 2012 e 2014, como forma de observar o comportamento do micro-organismo ao longo do tempo, não houve mudança no perfil de crescimento da *Escherichia coli* MC1061. Tal curva foi considerada para a obtenção da densidade celular e determinação do perfil de crescimento das células utilizadas nos experimentos posteriores de bioluminescência.

5.1.2 CORRELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO

Uma curva de peso seco versus absorbância foi obtida, conforme apresentado na Figura 13. Sendo possível, através da equação da reta (Equação 1), correlacionar a leitura da absorbância a 600nm com a concentração (g/L) da suspensão celular:

$$\textbf{Concentração celular [g/L]} = (Abs_{600nm} - 0{,}0336)/\ 1{,}636)$$

(Equação 1)

A equação descrita acima foi utilizada em todos os experimentos posteriores para determinação da concentração celular, nos ensaios luminométricos, nas curvas de calibração com amostras padrão e amostras ambientais.

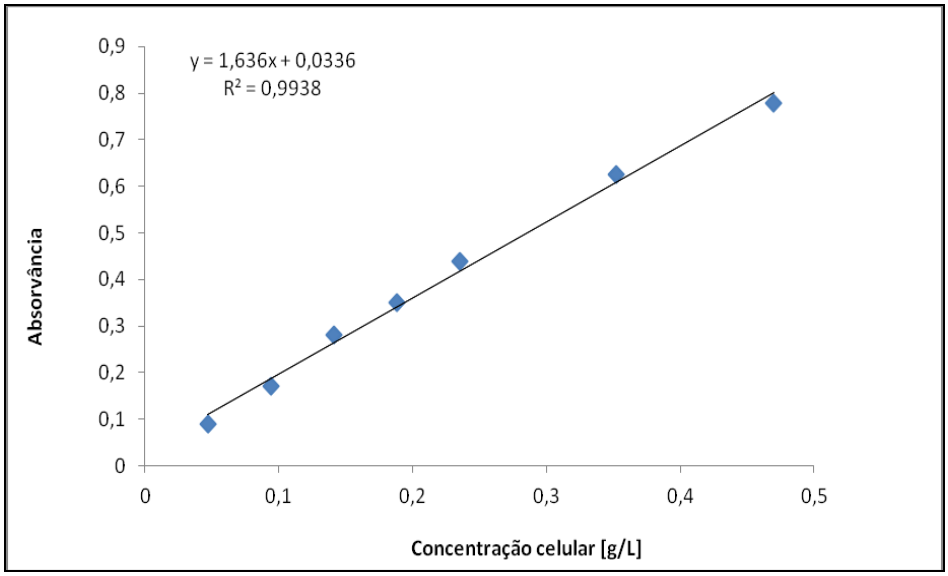

Figura 43: Correlação entre Absorbância (600 nm) e Peso Seco de *Escherichia coli* MC1061**.**

5.2 AMOSTRAS AMBIENTAIS

Os resultados dos ensaios luminométricos com as amostras ambientais (provenientes da Baía de Guanabara) foram obtidos conduzindo-se os experimentos com o biossensor com uma concentração celular de 0,06 g/L, um fator de diluição 1:33,3 (diluição das células) e tempo de incubação para produção da luciferase na câmara luminométrica de 45 minutos (parâmetros otimizados por COSTA *et al.,* 2011).

5.2.1 AMOSTRAS AQUOSAS

Os ensaios de detecção da bioluminescência usando o biossensor de Hg, conforme descrito no item 4.4, foram realizados com amostras aquosas da Baía de Guanabara (pontos A e D), coletadas de abril de 2012 a dezembro de 2013, para diferentes faixas de concentração de mercúrio adicionado em soluções aquosas.

Cabe ressaltar que a metodologia proposta inclui uma bactéria geneticamente modificada *Escherichia coli* MC1061 capaz de detectar o *mercúrio biodisponível* (Hg^{2+}), espécie essencial na determinação da toxicidade e do potencial de bioacumulação do metal. Essa espécie, ao ser metilada, torna-se mais tóxica (metilHg), incorporando-se ao longo da cadeia trófica.A disponibilidade de mercúrio

para os micro-organismos metiladores é determinada pela concentração de íons Hg^{2+} livres (ULRICH *et al.,* 2001).

5.2.1.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Ensaios de detecção da bioluminescência (conforme descrito no item 4.4), para diferentes faixas de concentração de mercúrio (conforme descrito no item 4.3.2), foram realizados para estudo da sensibilidade da medição, avaliação da repetibilidade, alcance dos limites máximo e mínimo de concentração e linearidade das curvas de calibração.

A precisão no experimento foi avaliada pela variabilidade de amostras idênticas analisadas repetidamente, sendo calculadas as variâncias de duplicatas dos URL obtidos em cada experimento. Considerou-se a precisão de medição do equipamento, luminômetro, e da preparação da amostra, incluindo a manipulação (por exemplo, pipetagem de soluções e inóculo usados nas análises do biossensor, centrifugação e decantação de amostras, etc.).

A estatística descritiva foi empregada na determinação dos valores médios para as duplicatas de cada amostra, assim como para a determinação do desvio padrão e o coeficiente de variação para cada ensaio realizado. Neste estudo, só foram considerados resultados cujo coeficiente de variação foi inferior a 10% entre as replicatas.

Cabe ressaltar que os valores das leituras dos brancos iniciais, água deionizada usada nas diluições (conforme descrito no item 4.3.1), foram descontados dos valores finais em todos os ensaios realizados, e o valor médio encontrado em URL como branco para a água deionizada foi 0,000876, sendo esse o valor residual de mercúrio encontrado na água utilizada nas analises, observado na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados dos Ensaios Luminométricos em URL para a água deionizada.

Amostra	URL
URL / Branco	0,000899
URL / Branco	0,000855
URL / Branco	0,000875
Média	0,000876

A influência da salinidade, já que as amostras provêm de água salina, foi verificada nos ensaios de bioluminescência, e o valor médio encontrado como branco de salinidade foi 0,002835, esse valor também foi descontado dos valores finais de todos os ensaios realizados, estando os valores encontrados para salinidade demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados dos ensaios de simulação com salinidade.

S (‰)	URL
Amostra sintética com 35 UPS	0,00278
Amostra sintética com 35 UPS	0,00289
Média URL	0,002835

Nos ensaios para elaboração da curva de calibração com água deionizada dois experimentos independentes foram realizados em duplicata usando concentrações finais de mercúrio de 0,001 a 20 µg/L. Os valores médios de URL obtidos, seus desvios padrões e coeficientes de variação calculados são apresentados na Tabela 16 para duas faixas de concentração de mercúrio. As Figuras 14 e 15 apresentam os gráficos das curvas de calibração e suas respectivas equações da reta e seus R^2 > 0,9.

Tabela 36: Resultados dos Ensaios Luminométricos da curva de calibração com soluções de mercúrio de diferentes concentrações; CV= Coeficiente de Variação.

Curva de Calibração					
	Concentração de Mercúrio (µg/L)				
	0,001	0,003	0,006	0,009	0,010
Média URL	38,70625	41,2983	43,6889	48,0411	52,8732
Desvio padrão	0,334	0,588	0,550	0,857	2,658
CV(%)	0,289	0,837	0,692	1,529	8,358
	Concentração de Mercúrio (µg/L)				
	0,10	2,99	10,10	17,10	20,00
Média URL	55,14815	58,8794	60,0226	67,78305	72,6143
Desvio padrão	0,995	1,054	1,408	0,791	1,281
CV(%)	1,796	1,886	3,301	0,924	2,260

Os valores de luminescência (URL) encontrados foram altos e os desvios padrões indicaram que o teste foi realizado com boa repetibilidade. Uma vez que a água deionizada não apresenta substâncias que possam complexar com o metal estudado, o URL mais alto encontrado foi 72,6143. Isso demonstra que, neste caso,

todo Hg medido é biodisponível, diferente de uma amostra ambiental, na qual a matriz é complexa e o Hg^{2+} poderá formar complexos com diversos agentes complexantes, como matéria orgânica ou sais inorgânicos presentes na coluna d´água (STEIN *et al.*,1996; ULRICH *et al.,* 2001).

Os valores de coeficiente de variação foram menores que 10% em torno da média, indicando uma baixa dispersão e valores homogêneos.

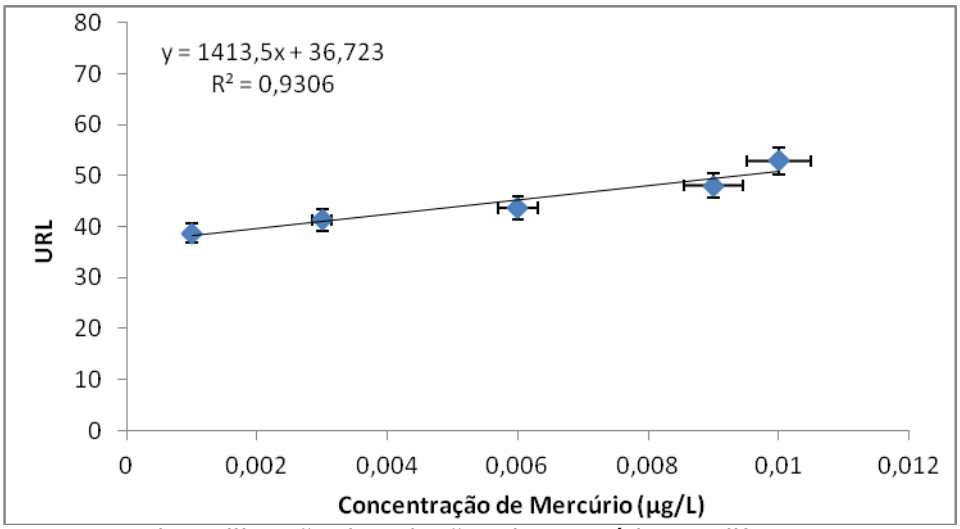

Figura 14: Curva de Calibração de soluções de mercúrio em diferentes concentrações (0,001 a 0,01 µg/L), preparadas em água deionizada.

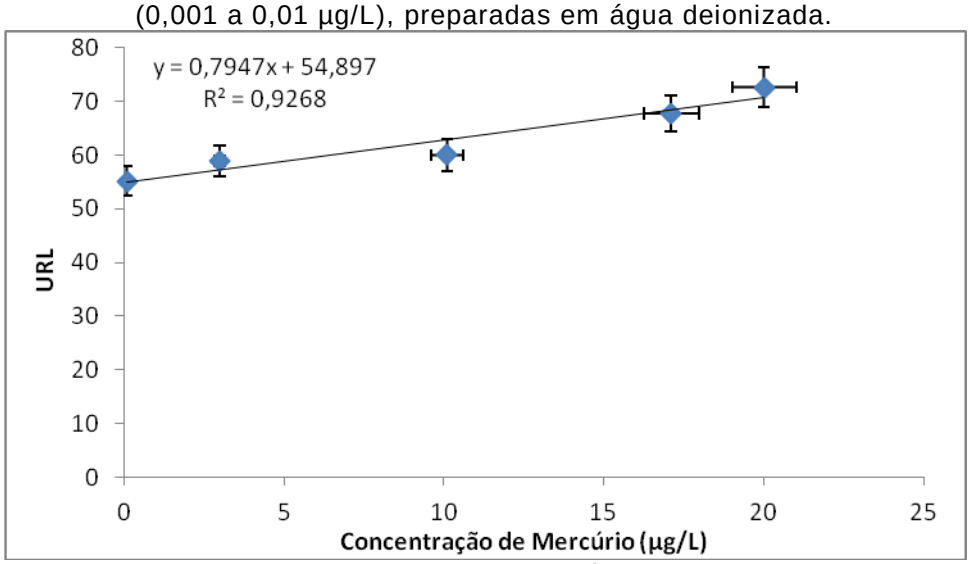

Figura 15: Curva de Calibração de soluções de mercúrio em diferentes concentrações (0,1 a 20 µg/L), preparadas em água deionizada.

Embora as curvas de calibração com a água deionizada tenham apresentado boa repetibilidade e dispersão, a curva estabelecida para o trabalho foi a de 0,001 a 1 µg/L, por ser esta região linear adequada para as amostras ambientais da área de estudo em questão, o que foi observado em ensaios preliminares. Desta forma, uma

nova curva de calibração foi obtida para a região linear, sendo os resultados apresentados na Tabela 17. A equação da reta obtida para a curva de calibração em água foi: y = 12,555x + 44,689, com R^2 = 0,9631, conforme apresentado na Figura 16.

Tabela 47: Resultados dos Ensaios Luminométricos da curva de calibração com soluções de mercúrio (0,001 a 1 µg/L); CV= Coeficiente de Variação.

Água deionizada	Concentração de Mercúrio (µg/L)			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	43,0797	45,4749	47,0177	57,1314
Desvio padrão	0,201	0,625	0,475	3,084
CV(%)	0,094	0,858	0,481	16,650

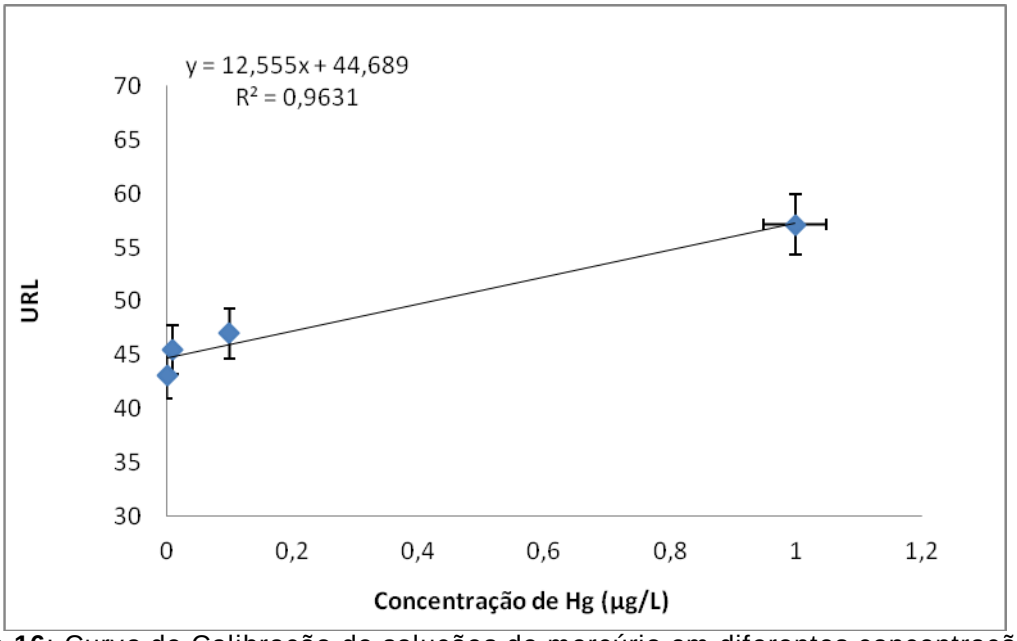

Figura 16: Curva de Calibração de soluções de mercúrio em diferentes concentrações (0, 001 a 1 µg/L), preparadas em água deionizada.

Para considerar a interferência de agentes complexantes, a curva de adição padrão planejada (conforme descrito no item 4.3.2.2) foi utilizada em cada amostra. Os resultados podem ser visualizados nos itens a seguir.

O mercúrio pode interagir com muitos outros elementos (possibilidade de complexação), o que pode variar com a solubilidade, pH, temperatura, potencial redox, sorção e dessorção, pois todos influenciam na rota de transformação que o mercúrio pode seguir. Sendo importante ressaltar como a acidez pode facilitar a

formação de complexos solúveis ($HgCl_2$ e CH_3Hg), e ambientes alcalinos a formação de complexos voláteis (Hg^0 e $(CH_3)_2Hg$) (STEIN *et al.*, 1996).

5.2.1.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MERCÚRIO NAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

As curvas de adição padrão foram elaboradas (conforme descrito no item 4.3.2.2) devido à necessidade de obter curvas de calibração para cada ponto coletado. Este procedimento possibilitou que as características individuais de cada ponto de coleta em cada mês fossem respeitadas.

É importante ressaltar que durante a obtenção da curva de calibração há grande interesse na determinação de uma curva que possa ser utilizada para todas as amostras ambientais, como em COSTA e colaboradores (2013). Entretanto, as medições quantitativas em amostras ambientais são mais complexas que a análise de soluções sintéticas preparadas em laboratório, onde as condições são controladas.

Isso se deve ao fato de que o mercúrio em amostras naturais pode estar presente na forma de diferentes espécies químicas, geralmente em concentrações muito baixas. E dependendo das características físico-químicas do local em estudo, as espécies podem ser instáveis. Deve ser ressaltado que o micro-organismo em questão só detecta a fração de mercúrio biodisponível, possivelmente uma pequena parte de todas as espécies de mercúrio presentes.

Desta forma, nas análises do conteúdo de mercúrio biodisponível nas amostras da Baía de Guanabara, são levados em consideração os possíveis efeitos de matriz que estas amostras ambientais podem apresentar, principalmente em função dos ligantes naturais presentes na amostra, da temperatura, salinidade, condutividade, potencial redox, e pH de cada ponto de coleta. Por conseguinte, foi desenvolvida uma curva de adição padrão para cada ponto amostrado (pontos A e D), para cada mês amostrado, devido ao comportamento diferenciado nos valores em URL.

Assim, para cada dia de coleta realizaram-se cinco curvas de calibração (curvas adição padrão, conforme descrito em 4.3.2.2), com o intuito de obter uma curva de calibração que pudesse ser melhor comparável ao sistema. As análises foram feitas mês a mês, e são apresentadas a seguir. Em todos os ensaios observados pode ser observado que as curvas de adição padrão apresentaram R^2>0,9.

Os resultados dos ensaios de detecção bioluminescente do Hg de amostras de água da Baia da Guanabara para cada mês amostrado são apresentados, ressaltando a importância do estudo da sensibilidade da medição, da repetibilidade, e da linearidade das curvas de calibração, para avaliação da metodologia em questão no desenvolvimento da tecnologia.

Os resultados das análises das coletas dos meses de abril, maio e julho de 2012 podem ser observados na Tabela 18. É importante observar que os desvios padrão obtidos foram pequenos, na faixa de 0,001 a 0,958 URL, indicando boa repetibilidade. O maior valor do coeficiente de variação foi 9,488%, no entanto tal valor ainda é considerado baixo, indicando baixa dispersão e valores homogêneos (< 10%).

As curvas dos pontos A superfície (abril/2012), A meio (maio/2012) e D superfície (julho/2012) apresentaram melhores valor de R^2 (0,9973, 0,9651 e 0,9813, respectivamente, confiabilidade de 95%), significando que os valores experimentais foram mais precisos nestes testes. As equações da reta para os ensaios luminométricos dos meses de abril, maio e julho/2012 podem ser observadas na Figura 17, sendo utilizadas nos cálculos das concentrações de mercúrio biodisponível presente nas amostras (µg/L). Os resultados para estes meses podem ser vistos na Tabela 19.

Observa-se na Tabela 19 que o ponto A superfície de abril/2012 (0,281 µg/l) apresentou maior concentração de mercúrio biodisponível, embora o maior valor de URL (8,54385) neste mês tenha sido no ponto D superfície (que teve a concentração de mercúrio 0,142 µg/l). No mês de Maio/2012, o ponto A superfície (0,184 µg/L) apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível e a maior URL (14,449). Já no mês de Julho/2012, com valores menores que os meses de abril e maio,

os pontos A superfície (0,065 µg/L) e D superfície (0,094 µg/L) foram os que apresentaram a maior concentração de mercúrio biodisponível (o ponto D superfície apresentou o maior URL= 15,85515). Tais diferenças reiteram a necessidade da curva de calibração para cada localidade.

A repetibilidade de todos os ensaios foi considerada boa, uma vez que os coeficientes de variação encontrados foram < 10%, indicando baixa dispersão e dados homogêneos.

Tabela 18: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Abril, Maio e Julho de 2012.

	Abril/2012				**Maio/2012**				**Julho/2012**			
	Concentração de Mercúrio (µg/L)											
	0,0010	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**
Amostra	A fundo											
Média URL	4,179	4,322	5,504	12,02595	5,038	8,066	11,084	21,220	10,2451	12,1712	16,1936	26,9784
Desvio padrão	0,630	0,068	0,590	0,498	0,036	0,001	0,017	0,595	0,094	0,169	0,267	0,013
CV (%)	9,488	0,107	6,331	2,063	0,026	0,000	0,003	1,667	0,087	0,234	0,440	0,001
Amostra	A meio											
Média URL	4,428	5,559	7,807	16,8605	11,256	13,501	15,761	26,927	11,62465	14,3704	17,38545	28,959
Desvio padrão	0,114	0,581	0,219	0,087	0,084	0,016	0,273	0,958	0,079	0,047	0,115	0,033
CV (%)	0,295	6,077	0,615	0,045	0,063	0,002	0,472	4,159	0,053	0,016	0,077	0,004
Amostra	A superfície											
Média URL	6,390	7,073	8,032	17,5473	10,045	11,908	15,495	25,551	11,7712	14,45645	15,4141	25,89715
Desvio padrão	0,173	0,099	0,063	0,874	0,053	0,381	0,681	0,363	0,137	0,441	0,522	0,040
CV (%)	0,468	0,138	0,049	4,362	0,028	1,217	2,994	0,515	0,160	1,346	1,768	0,006
Amostra	D fundo											
Média URL	4,7966	7,3394	8,10265	15,42175	3,5321	7,2017	12,05215	26,68965	10,97605	12,41495	18,02515	29,27605
Desvio padrão	0,210	0,375	0,068	0,719	0,391	0,167	0,067	0,360	0,015	0,422	0,029	0,526
CV (%)	1,162	1,919	0,038	4,535	4,320	0,388	0,037	0,484	0,002	1,436	0,005	0,945
Amostra	D superfície											
Média URL	5,48015	7,69795	9,5463	16,70915	4,5088	6,5732	8,5183	18,308	13,00325	15,26495	16,75965	29,73445
Desvio padrão	0,535	0,133	0,229	0,292	0,603	0,437	0,634	0,274	0,920	0,174	0,440	0,326
CV (%)	5,233	0,231	0,549	1,275	8,076	2,900	4,723	0,410	7,446	0,197	1,153	0,357

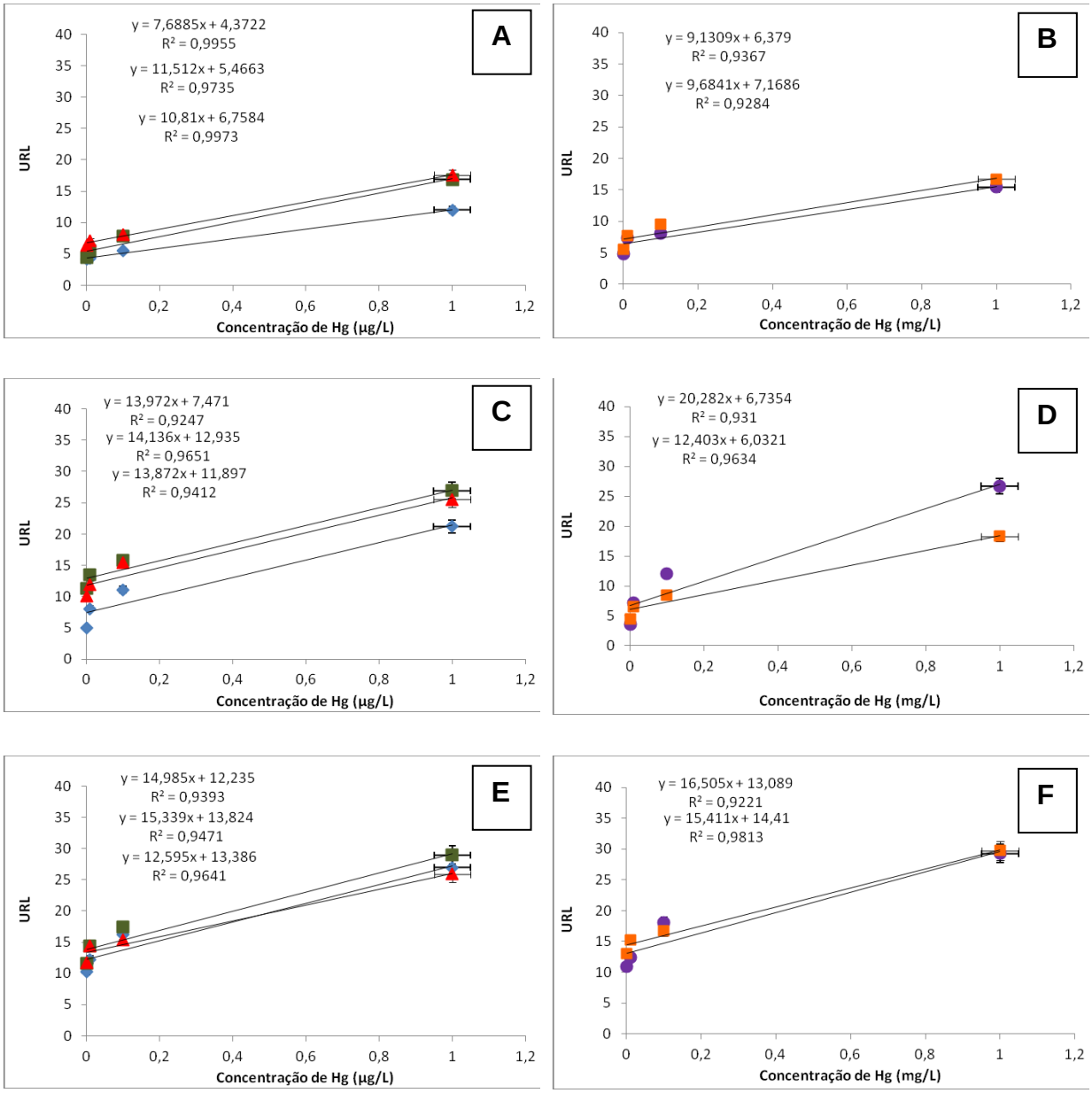

Figura 17: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Abril (A,B), Maio (C.D) e Julho (E,F) de 2012. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Tabela 19: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Abril, Maio e Julho/2012.

Amostras	Média URL	Desvio padrão	CV (%)	Concentração de Mercúrio (µg/L)
Abril/2012				
A fundo	4,515	0,067	0,098	0,019
A meio	5,571	0,675	8,330	0,009
A superfície	9,799	0,049	0,024	0,281
D fundo	6,3882	0,310	1,460	0,001
D superfície	8,54385	0,290	1,010	0,142
Maio/2012				
A fundo	7,812	0,242	0,822	0,024
A meio	12,974	0,819	5,268	0,003
A superfície	14,449	0,264	0,481	0,184
D fundo	6,8532	0,709	7,920	0,006
D superfície	6,4951	0,458	8,399	0,037
Julho/2012				
A fundo	12,49775	0,613	3,002	0,018
A meio	13,97375	0,199	0,298	0,010
A superfície	14,2068	0,473	5,276	0,065
D fundo	13,2881	0,231	0,432	0,012
D superfície	15,85515	0,158	0,157	0,094

Os resultados das análises das coletas dos meses de agosto, setembro e outubro de 2012 podem ser observados na Tabela 20. É importante observar que os desvios padrão obtidos foram pequenos, na faixa de 0,001 a 1,085 URL, indicando boa repetibilidade. O maior valor do coeficiente de variação foi 9,849% no entanto tal valor ainda é considerado baixo, indicando baixa dispersão e valores homogêneos (< 10%).

As curvas dos pontos D superfície (agosto/2012), D fundo (setembro/2012) e D fundo (outubro/2012) apresentaram melhores valores de R^2 (0,9639, 0,9813 e 0,9731 respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos nestes testes. As equações da reta para os ensaios luminométricos para os meses de agosto, setembro e outubro de 2012 podem ser observadas na Figura 18, sendo utilizadas também no cálculo da concentração de mercúrio das amostras. E o cálculo de concentração de mercúrio biodisponível (µg/L) para estes meses podem ser vistos na Tabela 21.

Na Tabela 21 pode ser observado que no mês de agosto o ponto D superfície (0,119µg/L) foi o que apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível e o maior valor de URL (15,8495). Já no mês de setembro todos os pontos estão com mercúrio biodisponível bem maior quando comparados a todos os outros meses amostrados (0,352 a 0,765 µg/L, sendo todos estes valores >0,2 ppb), sendo o ponto D superfície (0,765 µg/L) o que apresentou maior concentração de mercúrio biodisponível. Em outubro observou-se que os pontos A superfície (0,264 µg/L) e D superfície (0,239 µg/L) foram os que apresentaram maior concentração de mercúrio biodisponível, embora o ponto com URL mais alto tenha sido o D fundo (10,37005). Nestes testes a repetibilidade foi considerada boa, pois todos os valores de CV foram < 10% sendo considerados como baixa dispersão e, por isso, valores homogêneos.

Tabela 20: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Agosto, Setembro e Outubro de 2012.

	Agosto/2012				**Setembro/2012**				**Outubro/2012**			
	Concentração de Mercúrio (µg/L)											
	0,0010	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**
Amostra	A fundo											
Média URL	10,42665	13,5403	16,4749	28,45465	5,005	7,455	9,4124	20,51195	6,47295	8,0012	9,59525	17,3589
Desvio padrão	0,072	0,088	0,470	0,478	0,001	0,638	0,597	0,609	0,713	0,775	0,221	0,053
CV (%)	0,050	0,057	1,339	0,804	0,000	5,457	3,786	1,810	7,863	7,498	0,510	0,016
Amostra	A meio											
Média URL	11,2393	14,02155	17,9296	31,37705	6,61605	9,6709	11,07265	22,16605	7,6153	8,1153	10,3079	17,6182
Desvio padrão	0,222	0,007	0,215	0,016	0,497	0,445	0,028	0,139	0,484	0,060	0,197	0,465
CV (%)	0,438	0,000	0,257	0,001	3,734	2,046	0,007	0,088	3,081	0,045	0,375	1,229
Amostra	A superfície											
Média URL	9,787455	13,81635	16,88045	32,42685	7,9305	10,0255	13,289	26,15655	5,6363	7,65765	9,1546	17,0444
Desvio padrão	0,286	0,131	0,158	0,522	0,062	0,029	0,304	0,164	0,392	0,460	1,085	0,505
CV (%)	0,838	0,125	0,148	0,840	0,048	0,008	0,696	0,102	2,725	2,766	9,849	1,495
Amostra	D fundo											
Média URL	10,64625	13,8544	16,71745	29,50835	5,43575	6,89425	9,59425	21,23575	8,87265	10,3732	12,42515	21,6522
Desvio padrão	0,297	0,180	0,273	0,203	0,346	0,017	0,441	0,063	0,073	0,819	0,683	1,822
CV (%)	0,830	0,234	0,444	0,139	2,200	0,004	2,026	0,019	0,060	6,466	3,756	8,778
Amostra	D superfície											
Média URL	11,59545	15,3781	16,44855	30,90705	6,8213	7,0836	9,4336	17,8213	5,783	7,22155	7,6363	13,9805
Desvio padrão	0,060	0,150	0,540	0,090	0,961	0,004	0,491	0,153	0,199	0,241	0,700	0,640
CV (%)	0,031	0,146	1,771	0,026	9,313	0,000	2,551	0,132	0,687	0,803	6,425	2,927

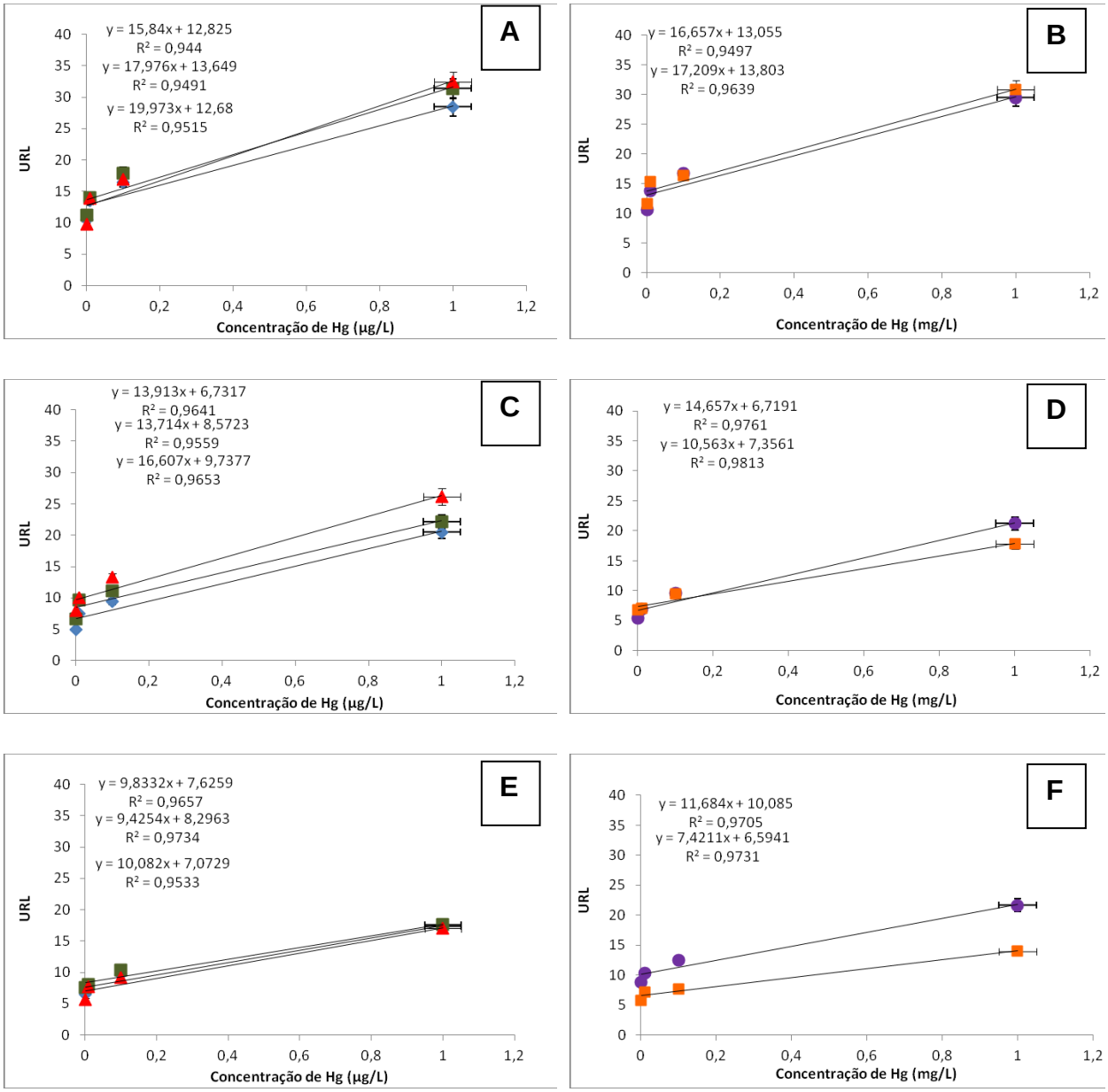

Figura 18: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Agosto (A,B), Setembro (C.D) e Outubro (E,F) de 2012. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Tabela 21: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Agosto, Setembro e Outubro de 2012.

Amostras	Média URL	Desvio padrão	CV (%)	Concentração de Mercúrio (µg/L)
Agosto/2012				
A fundo	12,987	0,040	0,013	0,010
A meio	13,697	0,267	0,566	0,003
A superfície	12,97375	0,023	0,005	0,015
D fundo	13,78685	0,694	3,764	0,044
D superfície	15,8495	0,185	0,267	0,119
Setembro/2012				
A fundo	12,7568	0,061	0,029	0,433
A meio	14,58085	0,239	0,393	0,438
A superfície	17,77405	0,062	0,022	0,484
D fundo	11,8764	0,154	0,200	0,352
D superfície	15,4401	1,183	9,066	0,765
Outubro/2012				
A fundo	7,75865	0,275	1,054	0,014
A meio	8,5666	0,455	2,739	0,029
A superfície	9,73325	0,888	8,108	0,264
D fundo	10,37005	0,197	0,416	0,024
D superfície	8,3697	0,349	1,452	0,239

Os resultados das análises das coletas dos meses de novembro e dezembro de 2012 podem ser observados na Tabela 22. É importante observar que os desvios padrão obtidos (Tabela 22) foram pequenos, na faixa de 0,001 a 1,085 URL, indicando boa repetibilidade. O maior valor do coeficiente de variação foi 9,171% no entanto tal valor ainda é considerado baixo, indicando baixa dispersão e valores homogêneos (< 10%).

As curvas dos pontos A superfície (novembro/2012) e D fundo (dezembro/2012) apresentaram melhores valores de R^2 (0,9955 e 0,9806 respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos nestes testes. As equações da reta para os ensaios luminométricos para os meses de agosto, setembro e outubro de 2012 podem ser observadas na Figura 19, sendo utilizadas também no cálculo da concentração de mercúrio das amostras. E o cálculo de concentração de mercúrio biodisponível (µg/L) para estes meses podem ser vistos na Tabela 23.

Na Tabela 23 pode ser observado que no mês de novembro o ponto D superfície apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível (0,288 µg/L, sendo maior que o valor estipulado pela CONAMA n° 357/2005). O ponto A meio apresentou um valor alto em comparação com a concentração de mercúrio deste em outros meses (0,153 µg/L), e o mesmo ainda apresentou maior URL dos ensaios de bioluminescência deste mês (16,98875). Já no mês de dezembro observa-se que o ponto D apresentou maiores valores em concentração de mercúrio biodisponível (D fundo 0,181 µg/L e D superfície 0,460 µg/L, duas vezes o valor estipulado pela CONAMA n° 357/2005) os mesmo pontos de coleta também apresentaram maiores valores para URL (> 40). Nestes testes a repetibilidade foi considerada boa, pois todos os valores de CV foram < 10% sendo considerados como baixa dispersão e, por isso, valores homogêneos.

Tabela 22: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Novembro e Dezembro de 2012.

	Novembro/2012				**Dezembro/2012**			
	Concentração de Mercúrio (µg/L)							
	0,0010	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**
Amostra	A fundo							
Média URL	12,96925	16,08545	17,36735	27,99495	21,46825	21,2689	24,28815	30,51565
Desvio padrão	0,031	0,001	0,442	0,002	0,665	0,620	0,014	0,343
CV (%)	0,007	0,000	1,124	0,000	2,060	1,805	0,001	0,386
Amostra	A meio							
Média URL	12,8988	15,1144	18,24125	28,7783	35,60275	38,4547	41,0883	53,8886
Desvio padrão	0,109	0,068	1,012	0,176	0,265	0,504	0,141	0,506
CV (%)	0,093	0,031	5,617	0,108	0,197	0,661	0,048	0,476
Amostra	A superfície							
Média URL	9,627	11,214	12,105	28,127	22,4188	25,64235	28,2776	39,77665
Desvio padrão	0,898	0,087	0,460	1,223	0,131	0,057	0,227	0,113
CV (%)	8,374	0,067	1,748	5,321	0,077	0,013	0,183	0,032
Amostra	D fundo							
Média URL	4,0756	5,89705	8,40015	27,29995	43,54	45,9639	47,938	66,79315
Desvio padrão	0,008	0,043	0,112	0,140	0,578	0,023	0,042	0,020
CV (%)	0,002	0,031	0,148	0,072	0,768	0,001	0,004	0,001
Amostra	D superfície							
Média URL	5,0038	7,2537	7,77925	15,2492	39,323	40,32005	46,82615	57,4074
Desvio padrão	0,109	0,340	1,012	0,242	0,516	0,798	0,432	0,743
CV (%)	0,238	1,595	9,171	0,384	0,678	1,578	0,399	0,961

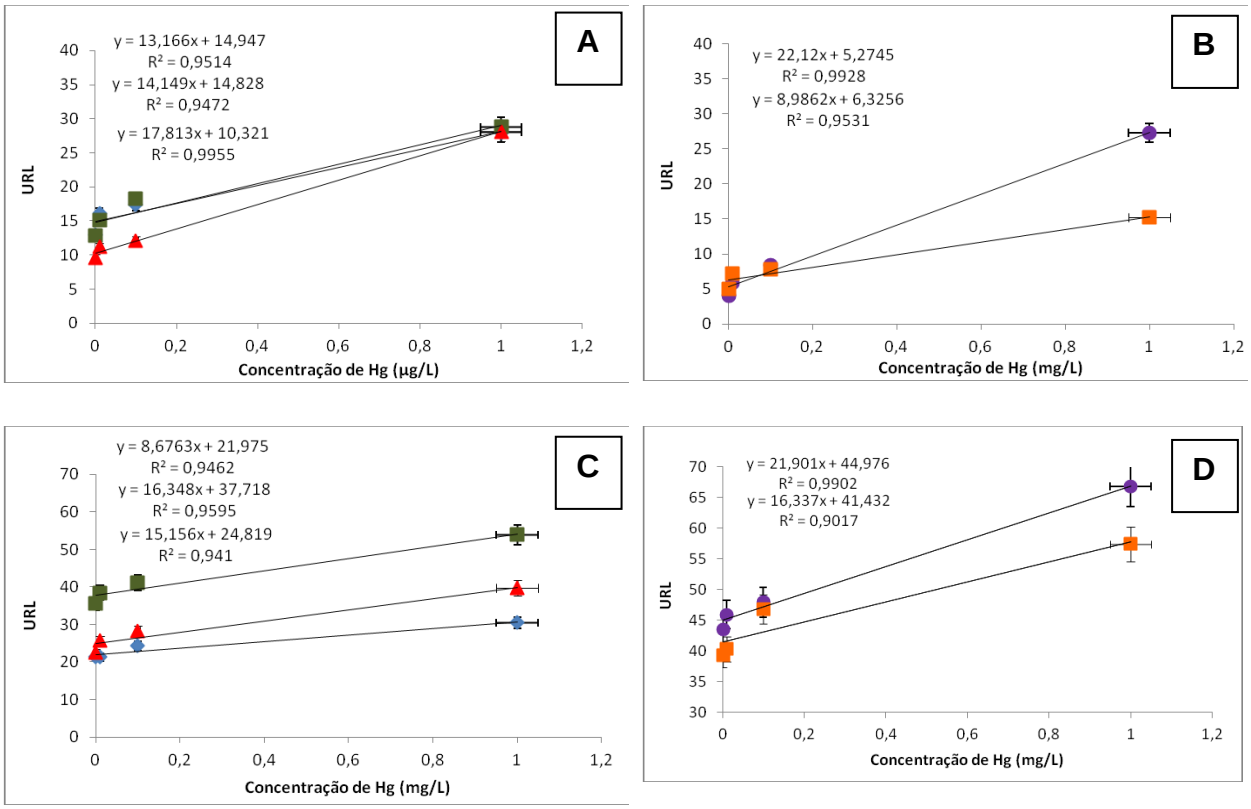

Figura 19: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Novembro(A,B), Dezembro (C.D) de 2012. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Tabela 23: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Novembro e Dezembro de 2012.

Amostras	Média URL	Desvio padrão	CV (%)	Concentração de Mercúrio (µg/L)
Novembro/2012				
A fundo	14,9805	1,560	6,547	0,003
A meio	16,98875	0,668	2,624	0,153
A superfície	11,935	0,522	2,287	0,091
D fundo	6,08555	0,068	0,077	0,037
D superfície	8,9176	0,918	9,441	0,288
Dezembro/2012				
A fundo	22,30565	0,675	2,041	0,038
A meio	38,15875	0,949	2,360	0,027
A superfície	24,9245	0,961	3,815	0,007
D fundo	48,9507	1,128	2,600	0,181
D superfície	41,8286	0,118	0,035	0,460

Os resultados das análises das coletas dos meses de janeiro, fevereiro e março de 2013 podem ser observados na Tabela 24. É importante observar que os desvios padrão obtidos foram pequenos, na faixa de 0,001 a 1,085 URL, indicando boa repetibilidade. O maior valor do coeficiente de variação foi 9,254% no entanto tal valor ainda é considerado baixo, indicando baixa dispersão e valores homogêneos (< 10%).

As curvas dos pontos A superfície (janeiro/2013), A superfície (fevereiro/2013) e A superfície (março/2013) apresentaram melhores valores de R^2 (0,9714, 0,9743 e 0,9846 respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos nestes testes. As equações da reta para os ensaios luminométricos para os meses de janeiro, fevereiro e março de 2012 podem ser observadas na Figura 20, sendo utilizadas também no cálculo da concentração de mercúrio das amostras. E o cálculo de concentração de mercúrio biodisponível (µg/L) para estes meses podem ser vistos na Tabela 25.

Na Tabela 25 observa-se o mês de janeiro, o ponto A meio (0,111 µg/L) e o A superfície (0,127 µg/L) foram os que apresentaram a maior concentração de mercúrio biodisponível. Já em fevereiro observou-se que o ponto A superfície (0,125 µg/L) apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível, enquanto o que apresentou maior valor de bioluminescência foi o ponto D superfície (URL = 10,1478). Em março todos os pontos de coleta apresentaram baixos valores de concentração de mercúrio biodisponível (sendo maior valor no ponto A meio = 0,073 µg/L) e o ponto com maior bioluminescência foi o D superfície (URL = 10,6478). Nestes testes a repetibilidade foi considerada boa, pois todos os valores de CV foram < 10% sendo considerados como baixa dispersão e, por isso, valores homogêneos.

Tabela 24: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2013.

	Janeiro/2013				**Fevereiro/2013**				**Março/2013**			
	Concentração de Mercúrio (µg/L)											
	0,0010	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**
Amostra	A fundo											
Média URL	2,82665	3,55705	5,20855	8,8455	7,52955	9,51055	12,3238	22,0369	2,94165	3,55705	5,34055	9,8455
Desvio padrão	0,046	0,167	0,237	0,018	0,160	0,502	0,004	0,621	0,074	0,167	0,050	0,018
CV (%)	0,076	0,782	1,079	0,004	0,340	2,652	0,000	1,750	0,185	0,782	0,048	0,003
Amostra	A meio											
Média URL	3,5414	4,54395	5,37075	9,7228	4,90195	7,07715	10,55945	20,9723	3,6561	4,14545	5,76575	10,7228
Desvio padrão	0,572	0,102	0,602	0,012	0,048	0,020	0,494	0,009	0,410	0,100	0,170	0,012
CV (%)	9,254	0,230	6,741	0,002	0,048	0,006	2,310	0,000	4,604	0,242	0,503	0,001
Amostra	A superfície											
Média URL	4,50815	5,2264	6,2246	10,7432	5,89855	8,8925	10,70395	20,294	4,80815	5,7264	6,2246	11,7432
Desvio padrão	0,516	0,835	0,168	0,177	0,025	0,040	0,356	0,731	0,091	0,128	0,168	0,177
CV (%)	5,899	9,330	0,453	0,292	0,010	0,018	1,185	2,632	0,174	0,284	0,453	0,267
Amostra	D fundo											
Média URL	4,65405	5,4144	8,6009	16,17565	7,87365	9,35645	10,08585	17,1172	7,47365	9,60645	10,48585	17,6172
Desvio padrão	0,303	0,083	0,266	0,006	0,07	0,06	0,12	0,30	0,630	0,420	0,450	0,400
CV (%)	1,974	0,129	0,821	0,000	0,06	0,04	0,14	0,54	5,390	1,820	1,900	0,933
Amostra	D superfície											
Média URL	4,209	6,49315	9,1148	17,3794	8,36865	10,34455	12,53135	20,74595	8,71865	10,49455	12,8144	21,24595
Desvio padrão	0,275	0,211	0,059	0,080	0,148	0,033	0,227	0,376	0,347	0,462	0,174	0,331
CV (%)	1,803	0,684	0,038	0,036	0,263	0,010	0,410	0,682	1,377	2,037	0,235	0,515

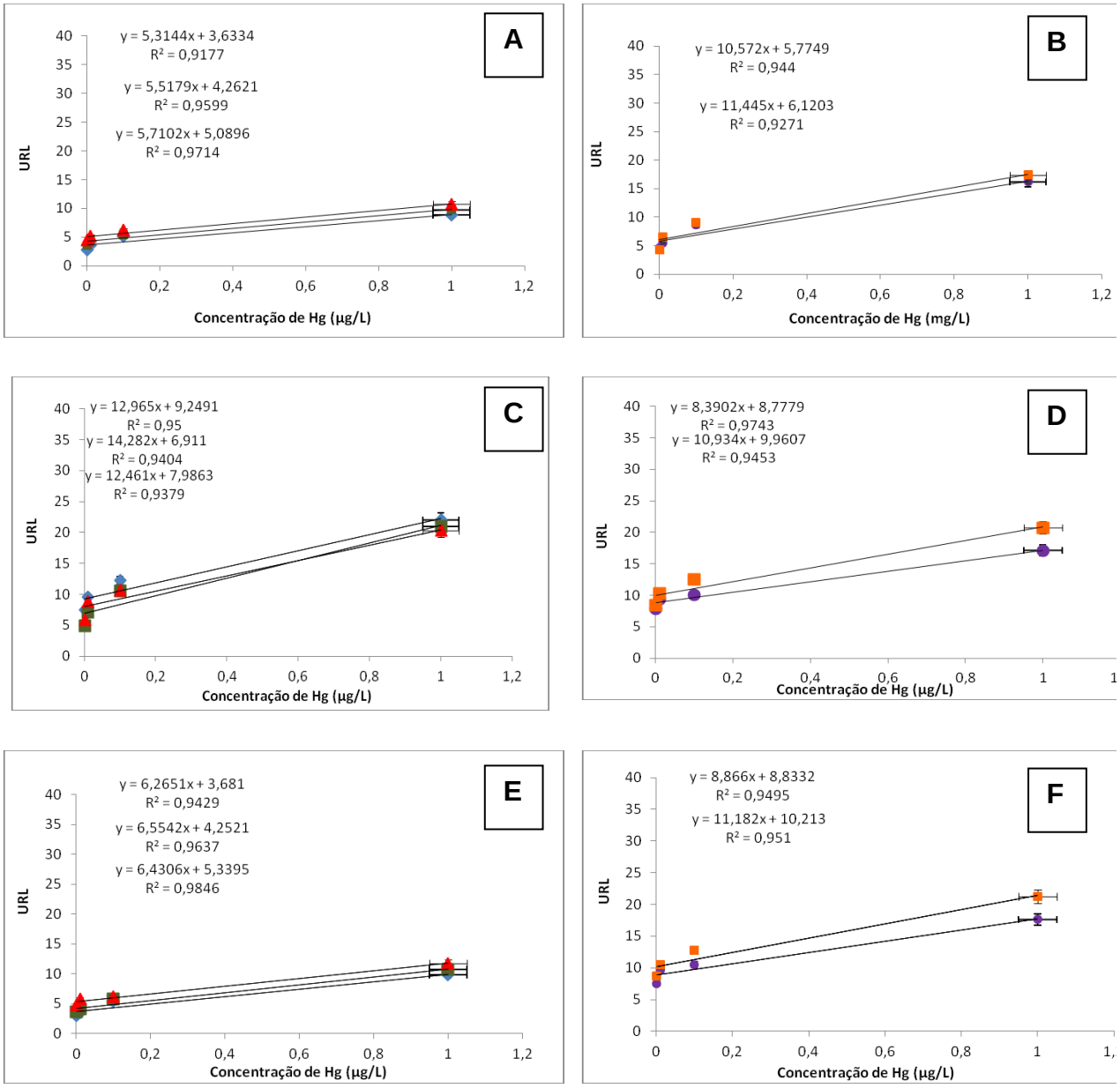

Figura 20: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Janeiro (A,B), Fevereiro (C,D) e Março (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Tabela 25: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2013.

Amostras	Média URL	Desvio padrão	CV (%)	Concentração de Mercúrio (µg/L)
Janeiro/2013				
A fundo	3,756	0,548	8,436	0,023
A meio	4,87285	0,117	0,352	0,111
A superfície	5,8135	0,259	1,301	0,127
D fundo	6,2095	1,27	5,86	0,041
D superfície	6,91665	0,767	9,950	0,070
Fevereiro/2013				
A fundo	9,34765	0,690	5,096	0,008
A meio	7,80885	0,106	0,127	0,063
A superfície	9,54575	1,435	4,113	0,125
D fundo	8,92545	0,844	8,168	0,018
D superfície	10,1478	0,240	0,568	0,017
Março/2013				
A fundo	3,81	0,088	0,205	0,021
A meio	4,7285	0,025	0,015	0,073
A superfície	5,635	0,449	3,571	0,046
D fundo	9,22545	0,137	0,204	0,044
D superfície	10,6478	0,467	2,048	0,039

Os resultados das análises das coletas dos meses de abril, maio e junho de 2013 podem ser observados na Tabela 26. É importante observar que os desvios padrão obtidos (Tabela 26) foram pequenos, na faixa de 0,001 a 1,618 URL, indicando boa repetibilidade. O maior valor do coeficiente de variação foi 9,133% no entanto tal valor ainda é considerado baixo, indicando baixa dispersão e valores homogêneos (< 10%).

As curvas dos pontos D fundo (abril/2013), A fundo (maio/2013) e D fundo (junho/2013) apresentaram melhores valores de R^2 (0,9956, 0,996 e 0,963 respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos nestes testes. As equações da reta para os ensaios luminométricos para os meses de abril, maio e junho de 2013 podem ser observadas na Figuras 21, sendo utilizadas também no cálculo da concentração de mercúrio das amostras. E o cálculo de concentração de mercúrio biodisponível (µg/L) para estes meses podem ser vistos na Tabela 27.

Na Tabela 27 pode ser observado que no mês de abril 3 pontos com alta concentração de mercúrio biodisponível: ponto A superfície (0,213 µg/L), D fundo (0,185 µg/L) e D superfície (0,156 µg/L). Em maio foi o ponto D superfície (0,174 µg/L) que apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível. No entanto, o maior valor de URL encontrado foi no ponto A meio (URL = 7,5992). Já em junho, os pontos A superfície e D fundo (0,165 µg/L e 0,105 µg/L, respectivamente) apresentaram as maiores concentrações de mercúrio biodisponível. Sendo o maior valor de bioluminescência o ponto A superfície (URL = 5,11845). Nestes testes a repetibilidade foi considerada boa, pois todos os valores de CV foram < 10% sendo considerados como baixa dispersão e, por isso, valores homogêneos.

Tabela 26: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Abril, Maio e Junho de 2013.

	Abril/2013				Maio/2013				Junho/2013			
	Concentração de Mercúrio (µg/L)											
	0,0010	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**
Amostra	A fundo											
Média URL	3,67875	4,27235	5,4038	12,02595	3,8814	4,004	4,16725	11,32765	1,9582	3,713	4,85735	10,56875
Desvio padrão	0,488	0,003	0,682	0,498	0,222	0,226	0,020	0,493	0,029	0,101	0,146	0,091
CV (%)	6,480	0,000	8,620	2,064	1,265	1,274	0,009	2,148	0,044	0,272	0,438	0,079
Amostra	A meio											
Média URL	4,62775	5,7144	7,5072	16,8605	6,0298	7,2819	9,10645	17,48735	2,48835	3,54135	5,0375	10,5266
Desvio padrão	0,027	0,376	0,643	0,088	0,007	0,619	0,066	0,719	0,166	0,069	0,033	0,155
CV (%)	0,016	2,476	5,513	0,046	0,001	5,259	0,048	2,957	1,111	0,133	0,022	0,227
Amostra	A superfície											
Média URL	7,09045	7,0231	7,13235	17,5473	4,5791	5,1824	9,2989	17,5758	2,6743	3,0335	6,0727	13,07975
Desvio padrão	0,251	0,028	1,618	0,875	0,362	0,760	0,338	0,542	0,237	0,002	0,051	0,220
CV (%)	0,891	0,012	6,715	4,363	2,858	9,133	1,231	1,671	2,096	0,000	0,044	0,370
Amostra	D fundo											
Média URL	2,6213	3,86425	5,3625	11,42175	4,2328	4,67375	6,5204	11,2656	1,5831	3,29965	5,047385	11,50285
Desvio padrão	0,353	0,089	0,226	0,720	1,02	0,30	0,05	0,42	0,306	0,320	0,050	0,006
CV (%)	4,750	0,207	0,955	4,536	9,066	1,98	0,03	1,60	5,760	3,113	0,035	0,003
Amostra	D superfície											
Média URL	2,9001	2,8928	3,5075	6,70915	3,2129	5,3791	5,8481	12,97305	2,48495	3,36245	5,6061	12,83535
Desvio padrão	0,134	0,074	0,185	0,293	0,296	0,629	0,189	0,829	0,251	0,082	0,428	0,751
CV (%)	0,618	0,191	0,971	1,275	2,722	7,353	0,610	5,300	2,537	0,200	3,267	4,398

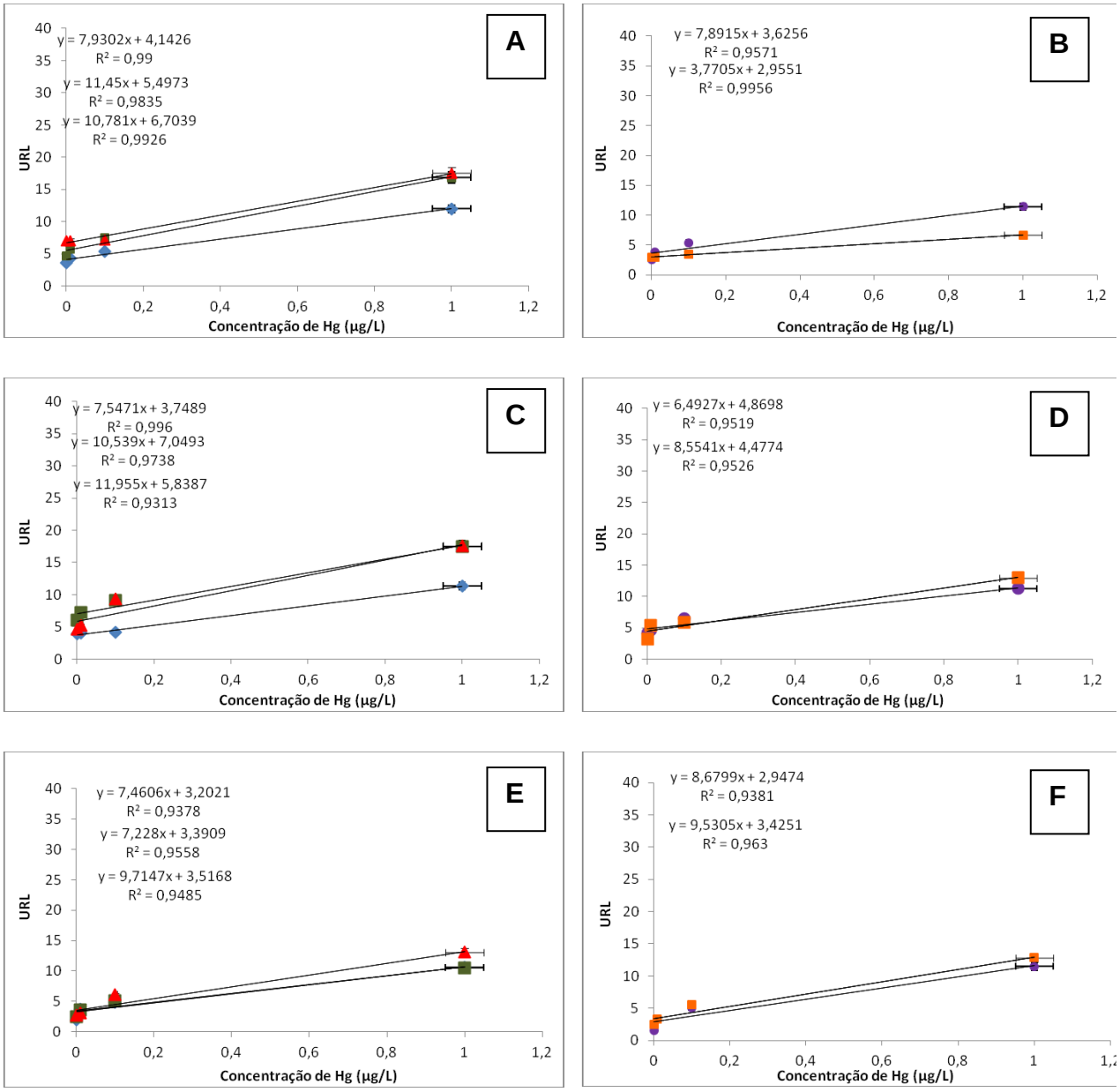

Figura 21: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Abril (A,B), Maio (C,D) e Junho (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Tabela 27: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Abril, Maio e Junho de 2013.

Amostras	Média URL	Desvio padrão	CV (%)	Concentração de Mercúrio (µg/L)
Abril/2013				
A fundo	4,2649	0,4202	4,139	0,015
A meio	5,97085	0,032	0,021	0,041
A superfície	8,9993	0,331	1,220	0,213
D fundo	5,0882	0,119	0,233	0,185
D superfície	3,54385	0,294	2,431	0,156
Maio/2013				
A fundo	3,9281	0,335	3,006	0,024
A meio	7,5992	0,153	0,355	0,052
A superfície	6,7492	0,365	2,321	0,076
D fundo	4,9194	0,15	0,46	0,008
D superfície	5,9678	0,591	8,001	0,174
Junho/2013				
A fundo	3,7948	0,041	0,060	0,079
A meio	3,92675	0,021	0,014	0,074
A superfície	5,11845	0,146	0,688	0,165
D fundo	3,85925	0,065	0,150	0,105
D superfície	3,5229	0,062	0,158	0,010

Os resultados das análises das coletas dos meses de julho, agosto e setembro de 2013 podem ser observados na Tabela 28. É importante observar que os desvios padrão obtidos (Tabela 28) foram pequenos, na faixa de 0,005 a 0,860 URL, indicando boa repetibilidade. O maior valor do coeficiente de variação foi 6,975% no entanto tal valor ainda é considerado baixo, indicando baixa dispersão e valores homogêneos (< 10%). É possível ser observado que no ponto A fundo a concentração aumentava gradativamente, mês a mês, aumentando o interesse no estudo do sedimento para confrontar esses rasultados.

As curvas dos pontos A superfície (julho/2013), D superfície (agosto/2013) e D fundo (setembro/2013) apresentaram melhores valores de R^2 (0,9869, 0,986 e 0,9923 respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos nestes testes. As equações da reta para os ensaios luminométricos para os meses de julho, agosto e setembro de 2013 podem ser observadas na Figuras 22, sendo utilizadas também no cálculo da concentração de mercúrio das amostras. E o cálculo de concentração de mercúrio biodisponível (µg/L) para estes meses podem ser vistos na Tabela 29.

Na Tabela 29 observou-se no mês de julho dois pontos com valores altos de concentração de mercúrio biodisponível: o ponto A superfície (0,320 µg/L) e o D superfície (0,212 µg/L). Sendo o ponto A superfície o maior em URL (6,91505). Em agosto observou-se que todas as amostras testadas apresentaram baixos valores de concentração de mercúrio biodisponível, sendo o menor valor 0,004 µg/L para o ponto D fundo. E o ponto D superfície o que apresentou maior valor em bioluminescência (URL = 15,58645). Já no mês de setembro pode ser observado que o maior valor de concentração de mercúrio biodisponível foi para amostra D superfície (0,181 µg/L). Sendo este ponto o mesmo a apresentar maior valor em bioluminescência (URL = 13,52465). Nestes testes a repetibilidade foi considerada boa, pois todos os valores de CV foram < 10% sendo considerados como baixa dispersão e, por isso, valores homogêneos.

Tabela 28: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Julho, Agosto e Setembro de 2013.

	Julho/2013				**Agosto/2013**				**Setembro/2013**			
	Concentração de Mercúrio (µg/L)											
	0,0010	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**
Amostra	A fundo											
Média URL	1,1111	2,99825	4,39905	10,6134	10,5135	12,4247	16,49785	28,49625	5,785	7,6947	9,47825	20,0655
Desvio padrão	0,145	0,014	0,559	0,860	0,635	0,542	0,653	0,679	0,027	0,098	0,611	0,086
CV (%)	1,880	0,007	7,103	6,975	3,837	2,361	2,587	1,620	0,013	0,124	3,943	0,037
Amostra	A meio											
Média URL	2,3582	3,2092	4,8674	10,28925	10,2166	14,1257	17,1516	31,58415	5,785	7,6947	9,47825	20,0655
Desvio padrão	0,376	0,076	0,180	0,398	0,055	0,076	0,183	0,678	0,027	0,098	0,611	0,086
CV (%)	5,983	0,182	0,669	1,536	0,030	0,041	0,195	1,457	0,013	0,124	3,943	0,037
Amostra	A superfície											
Média URL	3,44045	4,04675	5,5788	13,0473	9,23315	12,24865	16,335	32,2827	5,6612	7,08945	9,33255	22,49175
Desvio padrão	0,244	0,005	0,427	0,168	0,033	0,087	0,241	0,135	0,213	0,126	0,265	0,784
CV (%)	1,725	0,001	3,274	0,216	0,012	0,062	0,355	0,057	0,803	0,223	0,753	2,730
Amostra	D fundo											
Média URL	2,58985	3,62445	4,20935	10,71145	10,53875	13,4534	16,62245	29,7256	5,27385	6,7193	9,16645	25,535
Desvio padrão	0,100	0,430	0,090	0,191	0,070	0,410	0,192	0,143	0,050	0,004	0,057	0,420
CV (%)	0,380	5,221	0,212	0,342	0,050	1,230	0,210	0,060	0,053	0,030	0,028	0,710
Amostra	D superfície											
Média URL	2,28045	3,06445	5,1269	11,40935	13,6231	15,8517	16,55905	29,91275	8,07175	10,59415	13,9573	28,73375
Desvio padrão	0,038	0,087	0,048	0,611	0,124	0,094	0,147	0,179	0,236	0,386	0,028	0,061
CV (%)	0,064	0,249	0,044	3,268	0,112	0,056	0,130	0,107	0,690	1,409	0,006	0,013

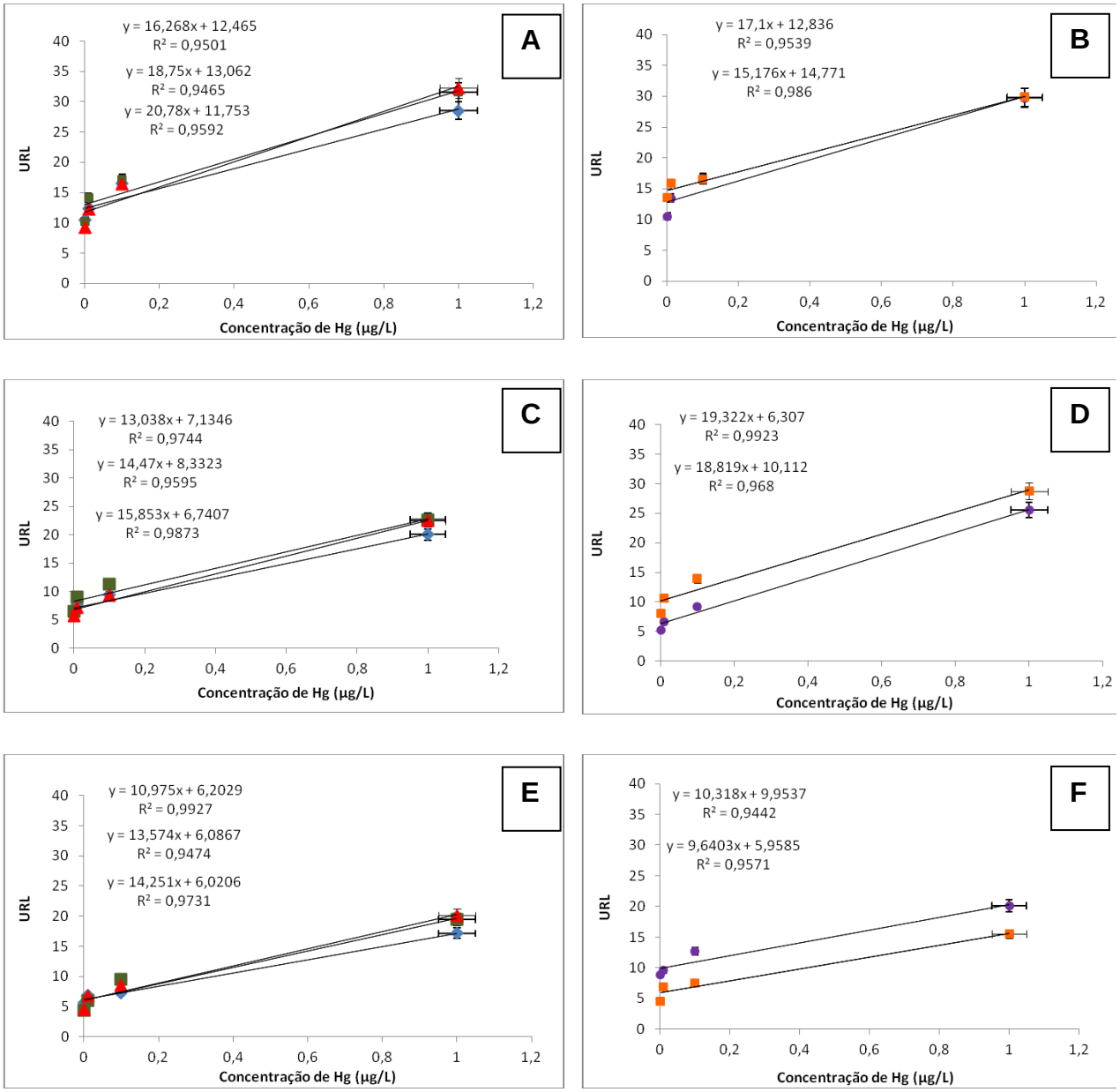

Figura 22: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Julho (A,B), Agosto (C,D) e Setembro (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Tabela 29: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Julho, Agosto e Setembro de 2013.

Amostras	Média URL	Desvio padrão	CV (%)	Concentração de Mercúrio (µg/L)
Julho/2013				
A fundo	2,60205	0,424	6,911	0,013
A meio	3,85265	0,017	0,011	0,093
A superfície	6,91505	0,257	0,952	0,320
D fundo	3,7479	0,130	0,615	0,074
D superfície	4,9195	0,028	0,025	0,212
Agosto/2013				
A fundo	12,70985	0,187	0,270	0,015
A meio	13,4606	0,571	2,615	0,021
A superfície	13,06835	0,798	4,873	0,063
D fundo	12,9068	0,040	0,013	0,004
D superfície	15,58645	0,210	0,325	0,054
Setembro/2013				
A fundo	7,1741	0,020	0,005	0,003
A meio	8,4976	0,576	4,427	0,011
A superfície	8,10115	0,007	0,001	0,086
D fundo	6,75125	0,179	0,477	0,023
D superfície	13,52465	0,652	4,045	0,181

Os resultados das análises das coletas dos meses de outubro, novembro e dezembro de 2013 podem ser observados na Tabela 30. É importante observar que os desvios padrão obtidos (Tabela 30) foram pequenos, na faixa de 0,016 a 0,768 URL, indicando boa repetibilidade. O maior valor do coeficiente de variação foi 7,075 % no entanto tal valor ainda é considerado baixo, indicando baixa dispersão e valores homogêneos (< 10%).

As curvas dos pontos A fundo (outubro/2013), A fundo (novembro/2013) A superfície (dezembro/2013) apresentaram melhores valores de R^2 (0,9927, 0,9957 e 0,9934 respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos nestes testes. As equações da reta para os ensaios luminométricos para os meses de outubro, novembro e dezembro de 2013 podem ser observadas na Figuras 23, sendo utilizadas também no cálculo da concentração de mercúrio das amostras. E o cálculo de concentração de mercúrio biodisponível (µg/L) para estes meses podem ser vistos na Tabela 31.

Na Tabela 31 pode ser observado que no mês de outubro o maior valor de concentração de mercúrio biodisponível foi para amostra A superfície (0,232 µg/L). Sendo que ponto D fundo foi o que apresentou maior valor em bioluminescência (URL = 9,98755). Já em novembro, o ponto A superfície (0,113 µg/L) apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível. Sendo o ponto A meio o que apresentou maior bioluminescência (URL = 8,4812). E em dezembro observou-se que o ponto A superfície (0,212 µg/L) apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível. Sendo o ponto D fundo o que apresentou maior bioluminescência (URL = 18,9086). Nestes testes a repetibilidade foi considerada boa, pois todos os valores de CV foram < 10% sendo considerados como baixa dispersão e, por isso, valores homogêneos.

Tabela 30: Curva de Calibração com amostras ambientais coletadas nos meses de Outubro, Novembro e Dezembro de 2013.

	Outubro/2013				**Novembro/2013**				**Dezembro/2013**			
	Concentração de Mercúrio (µg/L)											
	0,0010	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**	**0,0010**	**0,0100**	**0,10**	**1,00**
Amostra	A fundo											
Média URL	5,70065	6,90275	7,22115	17,18095	6,2106	7,35305	9,62955	26,41195	3,5155	5,8491	7,24245	16,4321
Desvio padrão	0,103	0,016	0,029	0,174	0,374	0,487	0,361	0,516	0,484	0,003	0,247	0,129
CV (%)	0,187	0,004	0,012	0,176	2,258	3,229	1,356	1,009	6,654	0,000	0,842	0,101
Amostra	A meio											
Média URL	4,4047	6,0611	9,5035	19,45775	6,64615	8,58265	11,48805	20,31595	2,05325	3,2979	6,96445	18,1993
Desvio padrão	0,541	0,022	0,291	0,583	0,218	0,064	0,229	0,028	0,023	0,161	0,702	0,274
CV (%)	6,643	0,008	0,894	1,749	0,713	0,048	0,457	0,004	0,025	0,781	7,075	0,411
Amostra	A superfície											
Média URL	4,4839	6,7301	8,54345	20,1579	4,34375	5,20005	9,1862	17,6664	2,12925	4,066	7,14695	29,29925
Desvio padrão	0,456	0,212	0,329	0,119	0,404	0,273	0,117	0,140	0,158	0,011	0,121	0,326
CV (%)	4,639	0,670	1,264	0,070	3,762	1,436	0,150	0,111	1,169	0,003	0,204	0,362
Amostra	D fundo											
Média URL	8,897	9,5595	12,7169	20,10485	4,1200	5,8332	8,5979	18,5428	16,7966	19,3394	21,10265	30,58005
Desvio padrão	0,070	0,123	0,164	0,050	0,080	0,220	0,382	0,150	0,210	0,380	0,768	0,650
CV (%)	0,060	0,165	0,210	0,016	0,140	0,850	1,710	0,120	0,260	0,730	9,412	1,383
Amostra	D superfície											
Média URL	4,60075	6,857	7,55805	15,52865	5,89305	7,7576	9,3287	18,26145	5,48015	7,69795	9,5463	19,20545
Desvio padrão	0,060	0,151	0,228	0,658	0,070	0,328	0,120	0,125	0,535	0,133	0,229	0,240
CV (%)	0,077	0,333	0,687	2,791	0,084	1,383	0,154	0,086	5,233	0,231	0,549	0,300

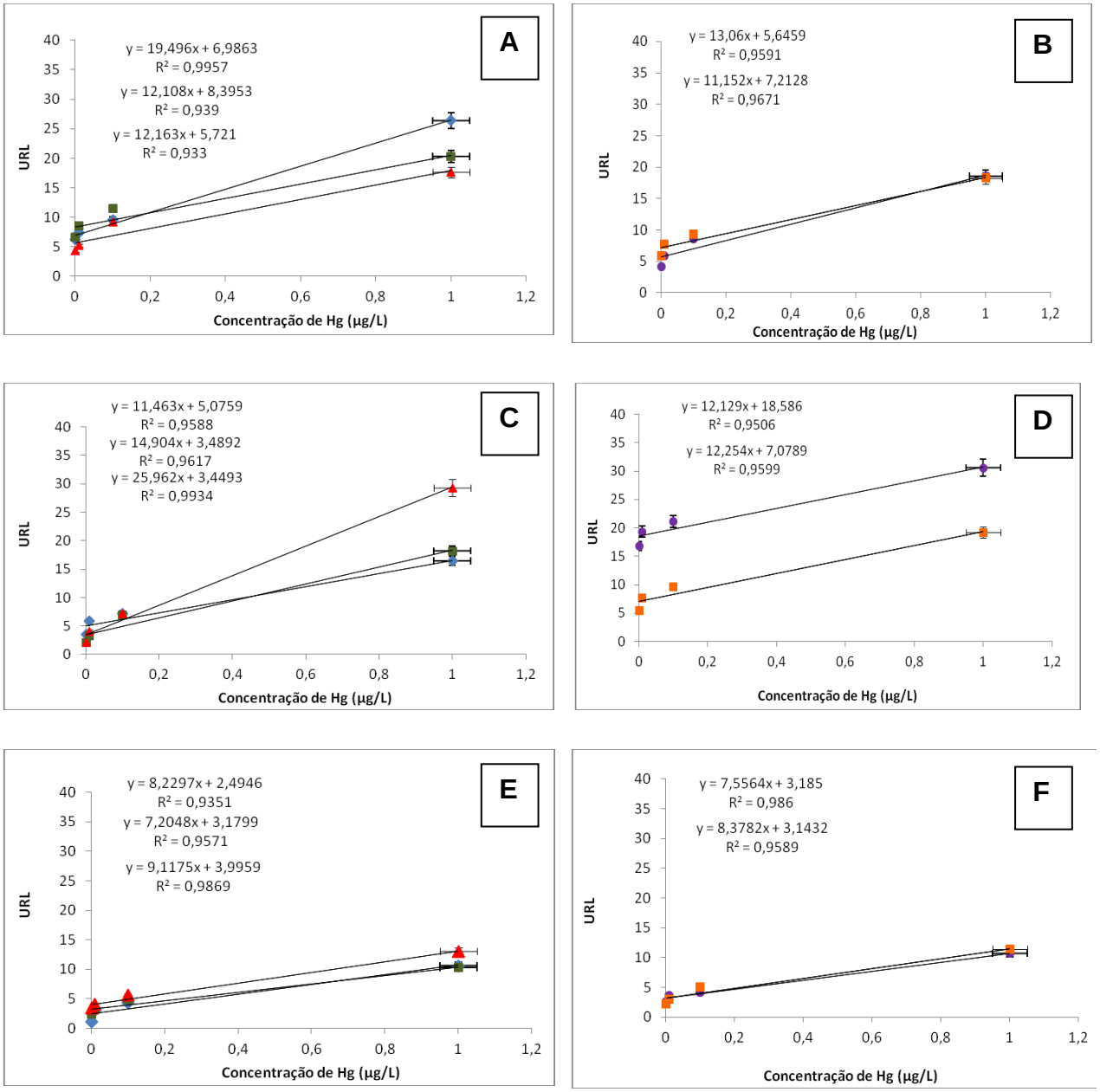

Figura 23: Gráficos das Curvas de Calibração e respectivas equações das retas nos meses de Outubro (A,B), Novembro (C,D) e Dezembro (E,F) de 2013. Pontos A Fundo (Losango Azul), A Meio (Quadrado Verde) e A Superfície (Triângulo Vermelho), Pontos D Fundo (Círculo Roxo) e D Superfície (Quadrado Laranja).

Tabela 31: Concentrações de mercúrio biodisponível nos meses de Outubro, Novembro e Dezembro de 2013.

Amostras	Média URL	Desvio padrão	CV (%)	Concentração de Mercúrio (µg/L)
Outubro/2013				
A fundo	6,510635	0,127	0,294	0,028
A meio	6,25385	0,193	0,662	0,012
A superfície	9,3268	0,267	0,859	0,232
D fundo	9,98755	0,050	0,027	0,003
D superfície	6,38485	0,301	1,415	0,044
Novembro/2013				
A fundo	7,95315	0,013	0,002	0,050
A meio	8,4812	0,410	2,004	0,007
A superfície	7,09475	0,094	0,126	0,113
D fundo	5,8095	0,038	0,025	0,013
D superfície	8,2578	0,245	0,725	0,094
Dezembro/2013				
A fundo	5,667	0,239	1,224	0,052
A meio	3,694	0,386	4,372	0,014
A superfície	8,9606	0,049	0,026	0,212
D fundo	18,9086	0,082	0,037	0,027
D superfície	8,0565	0,128	0,202	0,080

Para uma análise mais detalhada e conjunta dos resultados obtidos na análise das amostras da Baía da Guanabara entre os meses de abril de 2012 a dezembro de 2013 são apresentados os gráficos, Figuras 24 e 25, dos pontos A e D separadamente, com intuito de avaliar a concentração de mercúrio disponível ao longo dos meses. Observou-se a importância da existência de curva de calibração para cada ponto amostrado, já que se percebeu que nem sempre um valor de bioluminescência alto (URL alto) apresentava alto valor de concentração de mercúrio biodisponível.

Nas Figuras 24 e 25 pode ser observado que em muitos meses a concentração de mercúrio biodisponível encontrada foi abaixo da recomendada pela legislação brasileira para fiscalização e gerenciamento de recursos hídricos, a resolução CONAMA n° 357 /2005, na qual o valor é de 0,2 ppb para água salina - classe 1.

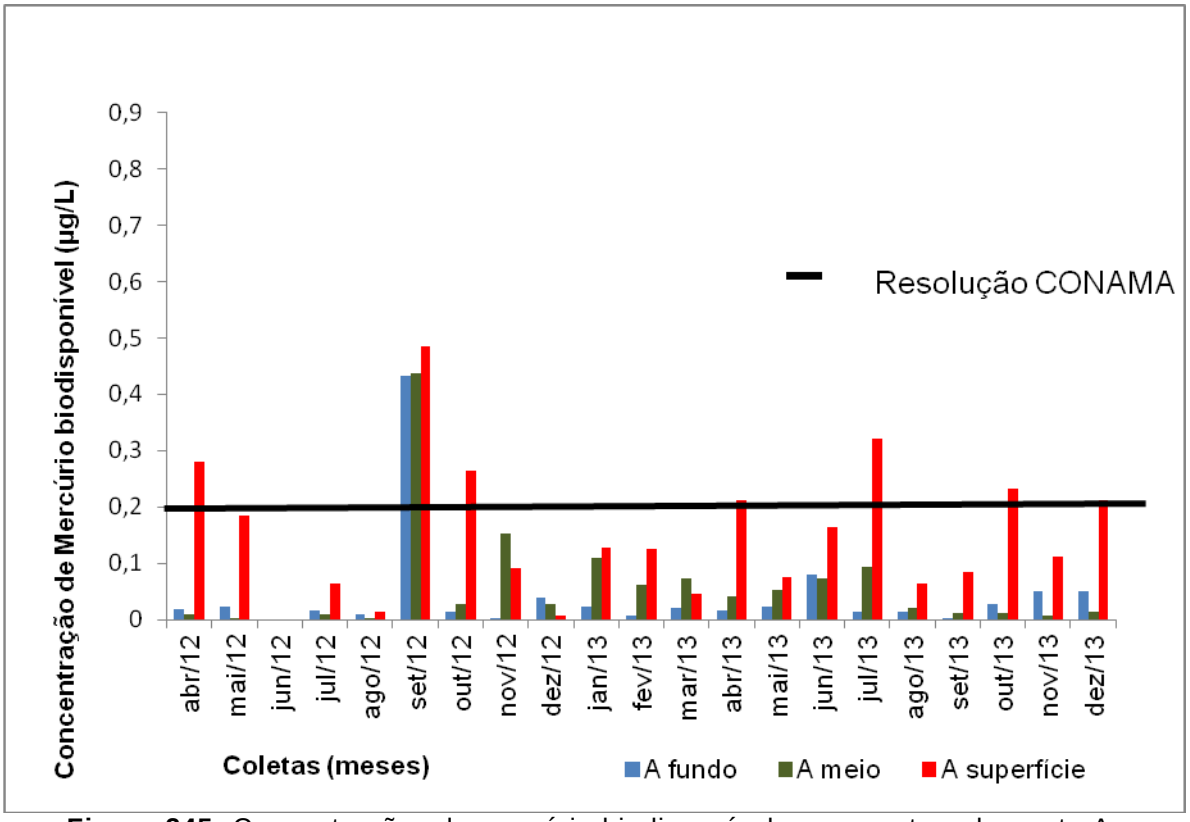

Figura 245: Concentrações de mercúrio biodisponível nas amostras do ponto A.

Em uma análise geral dos resultados do ponto A, observa-se que:

- O ponto A fundo do mês de setembro de 2012 apresenta a maior concentração de mercúrio biodisponível (0,433 µg/L) nesta profundidade.

- O ponto A meio do mês de setembro de 2012 foi o que apresentou o maior valor de concentração de mercúrio biodisponível (0,438 µg/L) nesta profundidade.

- O ponto A superfície apresentou 7 meses (abril, setembro e outubro de 2012, e ainda, abril, julho, outubro e dezembro de 2013) com valores acima de 0,2 µg/L (ou ppb), sendo o mês de setembro de 2012 o que apresentou a maior concentração (0,484 µg/L) de mercúrio biodisponível de todos os meses amostrados.

- Pode-se então dizer que na superfície da localidade A (próximo à ponte Rio - Niterói) há uma incidência de maior concentração de mercúrio biodisponível, e acima do permitido pela legislação, durante o período amostrado.

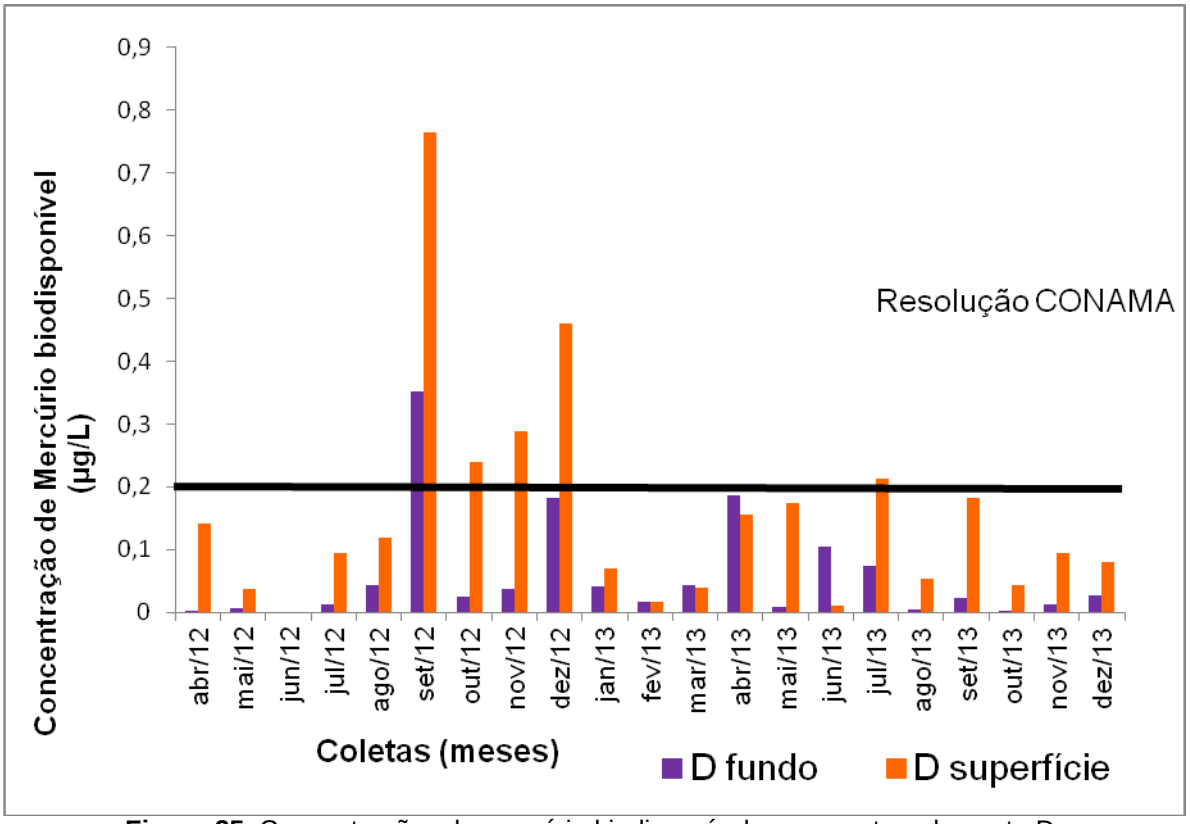

Figura 25: Concentrações de mercúrio biodisponível nas amostras do ponto D.

Em uma análise geral dos resultados do ponto D, observa-se que:

- O ponto D fundo apresentou, em setembro de 2012, o maior valor de concentração de mercúrio biodisponível (0,352 µg/L) nesta profundidade.

- O ponto D superfície apresentou 5 meses (setembro, outubro, novembro e dezembro de 2012 e ainda julho de 2013) com valores acima de 0,2 µg/L (ou ppb), sendo o mês de setembro de 2012 o de maior concentração de mercúrio biodisponível de todos os meses amostrados nesta profundidade (0,765 µg/L).

- Também a superfície do ponto D (localidade próxima à Ilha do Governador) foi a que apresentou a incidência de uma concentração maior de mercúrio biodisponível, acima do permitido pela legislação, durante o período amostrado.

Quando comparados os pontos A e D, aquele que apresenta o maior valor em concentração de mercúrio biodisponível é o ponto D no mês de setembro de 2012, no qual a concentração foi de 0,765 µg/L.

Entretanto, no mês de setembro de 2012, todos os pontos apresentaram valores altos de mercúrio biodisponível: A fundo (0,433 µg/L), A meio (0,438 µg/L), A superfície (0,484 µg/L), D fundo (0,352 µg/L) e D superfície (0,765 µg/L).

Informações a respeito de fatores físico–químicos estudados na região, como também análises que mostram valores acima de 0,2 µg/L, são de fundamental importância para corroborar os resultados obtidos.

Neste contexto é importante ressaltar que é a disponibilidade do mercúrio que permite a entrada na cadeia trófica, e para os micro-organismos metiladores isto é determinado pela concentração de íons Hg^{2+} livres (ULRICH *et al.,* 2001). São os micro-organismos os responsáveis pela ciclagem de mercúrio, sendo capazes de catalisar muitas das transformações entre as diferentes formas de mercúrio. Algumas das principais transformações são a conversão do Hg^{2+} para metilHg e dimetilHg e a redução do Hg^{2+} para Hg^{0} (MIRANDA *et al.,* 2007).

Muitos deles são capazes de desenvolver mecanismos de resistência ao metal (BARKAY, 2003). Na literatura foram encontradas relações entre a concentração de mercúrio e a presença de micro-organismos resistentes a este (MULLER *et al.,* 2001). Dados sobre tais micro-organismos nos pontos de coleta seriam de fundamental importância para ampliar a discussão. Pois não se pode discutir se os valores nos outros pontos foram mais baixos devido a uma alta produtividade de micro-organismos metiladores.

Aparentemente, as maiores taxas de metilação de mercúrio estão relacionadas com pH ácido, baixa salinidade e a presença de matéria orgânica em decomposição em condições redutoras (ULRICH *et al.,* 2001). A microbiota associada a ambientes redutores e com baixa concentração de sulfetos parece ser mais apta a converter o mercúrio inorgânico em metilHg (MIRANDA *et al.,* 2007).

Outros pontos seriam relevantes para ampliar a discussão, como por exemplo, buscar monitoramentos na área de estudo por um período maior de tempo e ainda obter maiores informações com relação à influência da circulação da água e a influência das marés.

Já se sabe que o ponto D, por se encontrar próximo à Ilha do Governador, possivelmente tem menor circulação de água, diferentemente do ponto A, que se

localiza nas proximidades da ponte Rio- Niterói, área que recebe um grande volume de troca de água, promovido pelas correntes de maré (CONVÊNIO PETROBRAS-DPC-EMGEPRON, 2004).

A literatura retrata estudos que mostram a biota da Baía de Guanabara constantemente exposta a uma série de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão (CANELA, 1995). Mesmo nos estudos que apontam áreas com concentrações de mercúrio elevadas, próximas a desembocadura do Rio São João de Meriti (BARROCAS, 1994; WASSERMAN *et al*., 2000), nem sempre a biota reflete tais concentrações elevadas. Existem estudos que revelam que os níveis de mercúrio estão abaixo de 200 ppb, inclusive em peixes (KEHRIG *et al*., 1998; RODRIGUES, 2006; KHERIG *et al*., 2009; RODRIGUES, 2010), sendo estes liberados para consumo, já que o limite é de 500 ppb.

É importante ressaltar que a metodologia do presente estudo mede o mercúrio biodisponível, que é considerado aquele prontamente disponível para os organismos, diferentemente dos métodos analíticos que equipam os órgãos fiscalizadores, os quais determinam limites máximos em concentração total, o que seria um pouco deficiente do ponto de vista ecológico.

Deve ser levado em consideração ainda que em áreas estuarinas os contaminantes metálicos se associam ao material particulado em suspensão, podendo assim, não se encontrarem disponíveis para os organismos na cadeia trófica, e não estando assim disponíveis para serem detectados pelo biossensor (PARAQUETTI *et al.,* 2004). Dados com material particulado em suspensão seriam úteis para mais análises.

KEHRIG e colaboradores (2011) encontraram valores de MetilHg de 0,00028 µg/L dissolvido na coluna d'água da Baía de Guanabara, que a princípio refletem um baixo valor. As baixas concentrações de MetilHg encontradas podem estar relacionadas com a qualidade ambiental da Baía de Guanabara, que indicava que o seu estado era hipereutrófico, com grande quantidade de material particulado em suspensão e elevada produtividade biológica da área estudada. Nesta situação, geralmente o metilmercúrio tende a se complexar fortemente ou adsorver-se ao material particulado em suspensão, diluindo os seus lançamentos no meio e diminuindo o tempo de residência na coluna d'água (PARAQUETTI *et al.,* 2004).

Com relação a todos os dados disponíveis (concentração de mercúrio biodisponível e dados físico-químicos) foi realizado o teste de Shapiro-Wilk (teste W) para analisar a distribuição dos dados. Estes apresentaram uma distribuição não normal e testes não paramétricos foram, então, aplicados, como a Correlação de Spearman.

Neste teste a concentração de mercúrio biodisponível de cada ponto foi correlacionada com os seguintes dados: temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido (OD) e pH, todos obtidos nos dias de cada coleta.

Em relação ao oxigênio dissolvido (OD) pode haver correlação caso o oxigênio seja totalmente consumido, apresentando condições anaeróbias e geração de condições redutoras, provocando assim um aumento da toxicidade de muitos elementos químicos, que tornam-se mais solúveis, como os metais (Balls *et al.,* 1996).

A temperatura por sua vez pode influenciar na metilação uma vez que afeta diretamente a atividade microbiana. Em alguns casos, maiores taxas de metilação são observadas no verão em detrimento de menores taxas durante as estações com baixa temperatura (WINFREY & RUDD, 1990; MIRANDA *et al.,* 2007).

Entretanto, outras variáveis ambientais relacionadas à estação do ano, como por exemplo, uma maior entrada de matéria orgânica nos sistemas aquáticos durante essa época, pode acarretar um aumento da produtividade primária (MIRANDA *et al.,* 2007). Aspecto importante a ser discutido, uma vez que o mercúrio é capaz de reduzir a fotossíntese do fitoplâncton.

Com relação à matéria orgânica, sabe-se que quanto maior a concentração de matéria orgânica na coluna d´água, menores são as taxas de metilação. Isso se deve a associação do mercúrio a complexos orgânicos presentes no material particulado. Após a associação o mercúrio complexado se precipita depositando no sedimento (WINFREY & RUDD, 1990; MIRANDA *et al.,* 2007).

O oposto pode ocorrer nos sedimentos onde as taxas de metilação aumentam com a entrada de matéria orgânica, principalmente na interface sedimento-água. Essa interface apresenta um carbono mais lábil, de modo a ser mais facilmente assimilado pela microbiota metiladora (MIRANDA *et al.,* 2007).

Após observação de todas essas influências na química do mercúrio é possível analisar os resultados das correlações apresentados nas Tabelas 32 a 33 para os pontos A e D.

Tabela 325: Resultados da Correlação de Spearman para o ponto A.

A meio			
2012	**Valid N**	**Spearman R**	**p-level**
Concentração de Hg Biodisponível (µg/L) x pH	8	0,805118	0,015905

A Tabela 32 apresenta os resultados da correlação de Spearman para o ponto A. Observa-se que apenas a variável pH apresentou uma correlação significativa (p-level < 0,05) no ponto A meio para o ano de 2012 (r = 0,805118, correlação fortemente positiva), enquanto que os outros testes para o mesmo ponto não foram significativos. Talvez os fatores mencionados anteriormente, como influência da maré ou atividade microbiana pudessem explicar melhor os resultados destas correlações nos pontos amostrados. As variações de pH no meio aquático estão relacionadas ainda com a dissolução de rochas, absorção de gases da atmosfera, oxidação da matéria orgânica e fotossíntese (VON SPERLING, 1995). Essa correlação significativa com a variável pH é interessante, mesmo não havendo consenso sobre sua influência na metilação. Alguns estudos na década de 90 mostraram que as alterações do pH não afetavam o processo de metilação do mercúrio em sedimento, mas afetavam na distribuição do metilHg entre o sedimento e a coluna d´água (WINFREY & RUDD, 1990; MIRANDA *et al.,* 2007). O que poderia explicar essa correlação ocorrida apenas no ponto A meio.

Tabela 336: Resultados da Correlação de Spearman no ponto D.

D superfície			
2012	**Valid N**	**Spearman R**	**p-level**
Concentração de Hg Biodisponível (µg/L) x Salinidade	8	0,738095	0,036553

A Tabela 33 apresenta os resultados da correlação de Spearman para o ponto D. Pode ser observado que apenas a variável salinidade apresentou uma correlação significativa (p-level < 0,05) no ponto D superfície para o ano de 2012 (r= 0, 0,738095, correlação moderada positiva), enquanto que os outros testes para o mesmo ponto não foram significativos.

Essa correlação significativa com a variável salinidade remete à questão de como os componentes aniônicos dos sais marinhos possuem um efeito na especiação do mercúrio nos sistemas aquáticos, por influenciar na transferência dos grupamentos metil provenientes da metilcobalamina, além de afetar a composição da comunidade microbiana responsável pela metilação, sendo que metilHg formado é menos estável sob condições de alta salinidade que em condições de baixa salinidade (MIRANDA *et al.,* 2007).

Após os questionamentos acerca dos resultados da correlação da concentração de mercúrio com os parâmetros físico–químicos cabe a discussão da importância da determinação das espécies de um elemento e de sua especiação no ambiente a ser estudado, pois são diversos os fatores que influenciam na determinação deste metal.

E ainda, ressaltar a importância de se avaliar a biodisponibilidade, e tratar da toxicidade do metal nos ambientes e seus possíveis efeitos tóxicos nos organismos. O que é essencial para definir normas ambientais aceitáveis, conduzir avaliações de risco ambiental e, mais amplamente, estabelecer políticas ambientais (URE & DAVIDSON, 1995; CAROLI, 1996).

5.2.1.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AMOSTRAS AQUOSAS COM BIOSSENSOR E METODOLOGIA PADRÃO

Com base nos resultados apresentados nos ensaios luminométricos nas amostras aquosas da Baía de Guanabara verificou-se que os desvios padrão obtidos foram baixos, mostrando a boa reprodutibilidade do método empregado. O coeficiente de variação (CV) encontrado, ao longo de todo o estudo, foi sempre inferior a 10%, significando que o procedimento analítico aplicado foi plenamente satisfatório. Esses resultados permitem afirmar que o método com o biossensor microbiano apresentou eficiência e aplicabilidade para ser uma ferramenta biológica sensível de detecção do mercúrio biodisponível.

Para validação da metodologia, amostras da curva de calibração (com a água deionizada) foram enviadas para análise quantitativa do mercúrio pelo método de espectrometria de absorção atômica com vapor frio, em laboratório independente do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da ENSDP-Fiocruz.

Entretanto, a metodologia espectrometria de absorção atômica com vapor frio não apresenta sensibilidade para a faixa de concentração de mercúrio estudada pelo biossensor microbiano. Assim, só foi possível a realização de apenas um dos pontos da curva, na concentração de 1 µg/L, e esta foi correlacionada com a metodologia proposta. Desta forma, a equação da reta da curva de calibração (com água deionizada), y = 12,555x + 44,689, foi utilizada para verificação da quantidade de mercúrio biodisponível (no biossensor) na concentração de 1 µg/L.

O resultado obtido foi de 99% do mercúrio biodisponível na metodologia do biossensor microbiano. E na espectrometria de absorção atômica com vapor frio obteve-se 99% de mercúrio total na amostra sintética utilizada na outra metodologia (os experimentos foram realizados em triplicata nas duas metodologias). E assim, a metodologia proposta apresentou mesmo padrão verificado na metodologia tradicional (Tabela 34).

Tabela 347: Resultados da Comparação dos métodos.

Amostra	Leitura no equipamento de Hg total	Concentração de Hg Total (µg/L)	% de Hg analisado nas amostras
1	0,0004	0,9982	99%
2	0,00039	0,9946	99%
3	0,0004	0,9982	99%
Amostra	**Leitura no equipamento de Hg biodisponível**	**Concentração de Hg biodisponível (µg/L)**	**% de Hg analisado nas amostras**
1	56,9505	0,98	98%
2	57,3122	1,01	100%
3	57,13135	0,99	99%

5.2.2 AMOSTRAS DE SEDIMENTOS

Os resultados dos ensaios luminométricos com as amostras reais de sedimentos (provenientes da Baía de Guanabara) são apresentados, tendo sido conduzidos os experimentos usando o biossensor com uma concentração celular de 0,06g/L, um fator de diluição 1:33,3 (diluição celular), e tempo de incubação para

produção da luciferase na câmara luminométrica de 45 minutos (parâmetros otimizados por COSTA *et al.,* 2011).

5.2.2.1 LIXIVIAÇÃO E CURVA DE CALIBRAÇÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos para as duas metodologias de lixiviação testadas nos sedimentos da Baía de Guanabara.

5.2.2.1.1 LIXIVIAÇÃO COM ÁGUA DA BAÍA DE GUANABARA

A Tabela 35 apresenta a medida da luminescência para a curva de calibração com amostras de sedimento das quatro localidades (Porto do Rio de Janeiro, Porto de Niterói, Rio Iguaçu e Rio Meriti) após lixiviação com água da Baía de Guanabara, de acordo com o procedimento descrito no item 4.3.3. Os desvios padrão obtidos foram pequenos, na faixa de 0,001 a 0,075, indicando boa repetibilidade destes. Observa-se ainda, que o maior valor do coeficiente de variação foi 1,798%, para a amostra do Rio Meriti, mas todos os valores de CV < 10% indicam baixa dispersão e valores homogêneos.

Tabela 35: Curva de calibração com amostras ambientais de sedimento do Porto do Rio de Janeiro e Porto de Niterói lixiviados com água da Baía de Guanabara.

Porto do Rio de Janeiro	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,394	0,420	0,751	1,954
Desvio padrão	0,001	0,054	0,017	0,047
CV (%)	0,000	0,703	0,037	0,114
Porto de Niterói	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,310	0,414	0,612	1,214
Desvio padrão	0,013	0,014	0,010	0,003
CV (%)	0,053	0,047	0,016	0,001
Rio Iguaçu	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,435	0,401	0,627	0,981
Desvio padrão	0,049	0,029	0,027	0,021
CV (%)	0,563	0,208	0,118	0,043
Rio Meriti	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,373	0,309	0,384	2,294
Desvio padrão	0,038	0,075	0,024	0,021
CV (%)	0,386	1,798	0,152	0,019

As curvas do Porto do Rio de Janeiro e do Rio Meriti apresentaram melhores valores de R^2 (0,9831 e 0,9938, respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos neste teste. As equações da reta podem ser observadas na Figura 26, e foram usadas para cálculo de mercúrio nestas amostras, apresentados na Tabela 36.

O cálculo de concentração de mercúrio biodisponível para as regiões testadas pode ser visto na Tabela 36. Observa-se que o Rio Meriti (0,736 µg / Kg de sedimento) apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível e todos os outros apresentaram concentração de mercúrio biodisponível pouco acima de 0,5 µg/ Kg de sedimento.

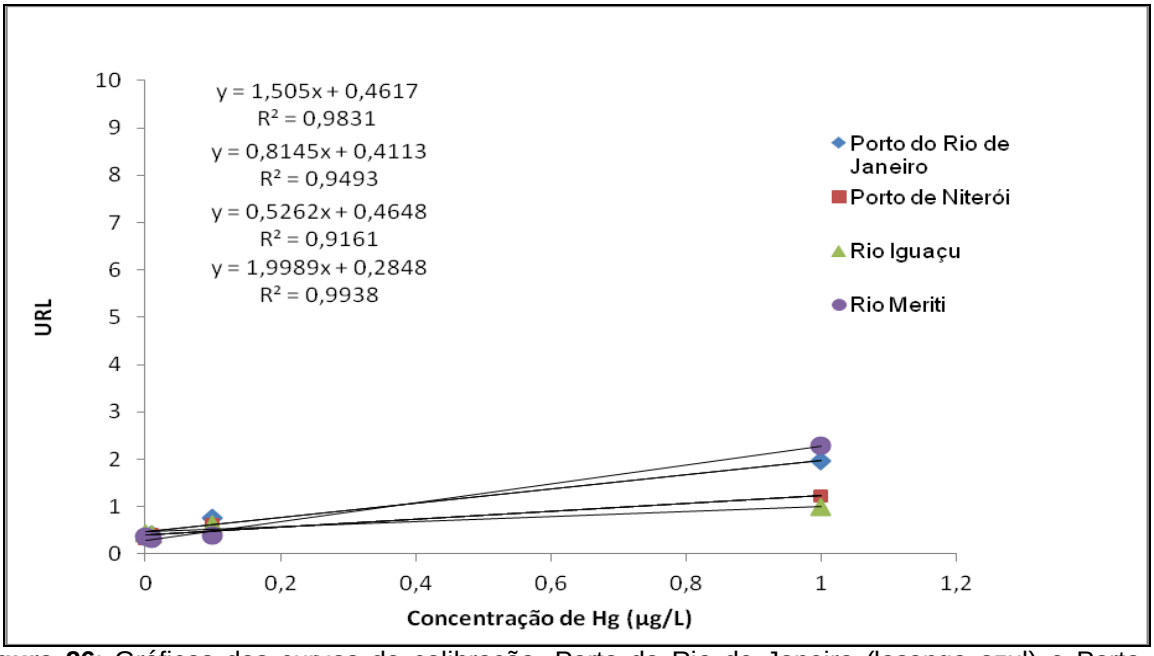

Figura 26: Gráficos das curvas de calibração, Porto do Rio de Janeiro (losango azul) e Porto de Niterói (quadrado vermelho), Rio Iguaçu (triângulo verde) e Rio Meriti (círculo roxo) e as equações da reta, respectivamente.

Tabela 36: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento) no lixiviados com água da Baía de Guanabara.

Localidade	Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento)
Porto do Rio de Janeiro	0,528
Porto de Niterói	0,525
Rio Iguaçu	0,515
Rio Meriti	0,736

5.2.2.1.2 LIXIVIAÇÃO COM HCl 1M

A Tabela 37 apresenta a medida da luminescência para a curva de calibração com amostras de sedimento de quatro localidades (Porto do Rio de Janeiro, Porto de Niterói, Rio Iguaçu e Rio Meriti) após lixiviação com HCl 1M para cada amostra de sedimento, de acordo com o procedimento descrito no item 4.3.3. Os desvios padrão obtidos foram pequenos, na faixa de 0,001 a 0,112, indicando boa repetibilidade destes. Observa-se ainda, que o maior valor do coeficiente de variação foi 4,815%. No entanto, todos os valores de CV < 10% indicam baixa dispersão e valores homogêneos.

Tabela 37: Curva de calibração com amostras ambientais de sedimento do Porto do Rio de Janeiro e Porto de Niterói lixiviados com HCl 1M.

Porto do Rio de Janeiro	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,49775	0,53115	0,5698	0,9706
Desvio padrão	0,051	0,005	0,083	0,032
CV (%)	0,528	0,004	1,222	0,106
Porto de Niterói	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,3773	0,5033	0,4383	0,97625
Desvio padrão	0,001	0,089	0,073	0,004
CV (%)	0,000	1,557	1,201	0,002
Rio Iguaçu	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,25825	0,5021	0,61295	1,50185
Desvio padrão	0,112	0,005	0,047	0,022
CV (%)	4,815	0,005	0,361	0,033
Rio Meriti	**Concentração de Mercúrio (µg/L)**			
	0,001	**0,01**	**0,1**	**1**
Média URL	0,4014	0,59785	0,7178	2,02865
Desvio padrão	0,000	0,078	0,037	0,089
CV (%)	0,000	1,010	0,187	0,389

As curvas do Porto do Rio de Janeiro e do Rio Meriti apresentaram melhores valores de R^2 (0,9964 e 0,9875, respectivamente), significando que os valores experimentais foram mais precisos neste teste. As equações da reta podem ser observadas na Figura 27, e foram usadas para cálculo de mercúrio nestas amostras, apresentados na Tabela 38.

O cálculo de concentração de mercúrio biodisponível para as regiões testadas pode ser visto na Tabela 38. Observa-se que o Rio Meriti (0,957 µg / Kg de sedimento) apresentou a maior concentração de mercúrio biodisponível e todos os outros apresentaram concentração de mercúrio biodisponível acima de 0,6 µg / Kg de sedimento.

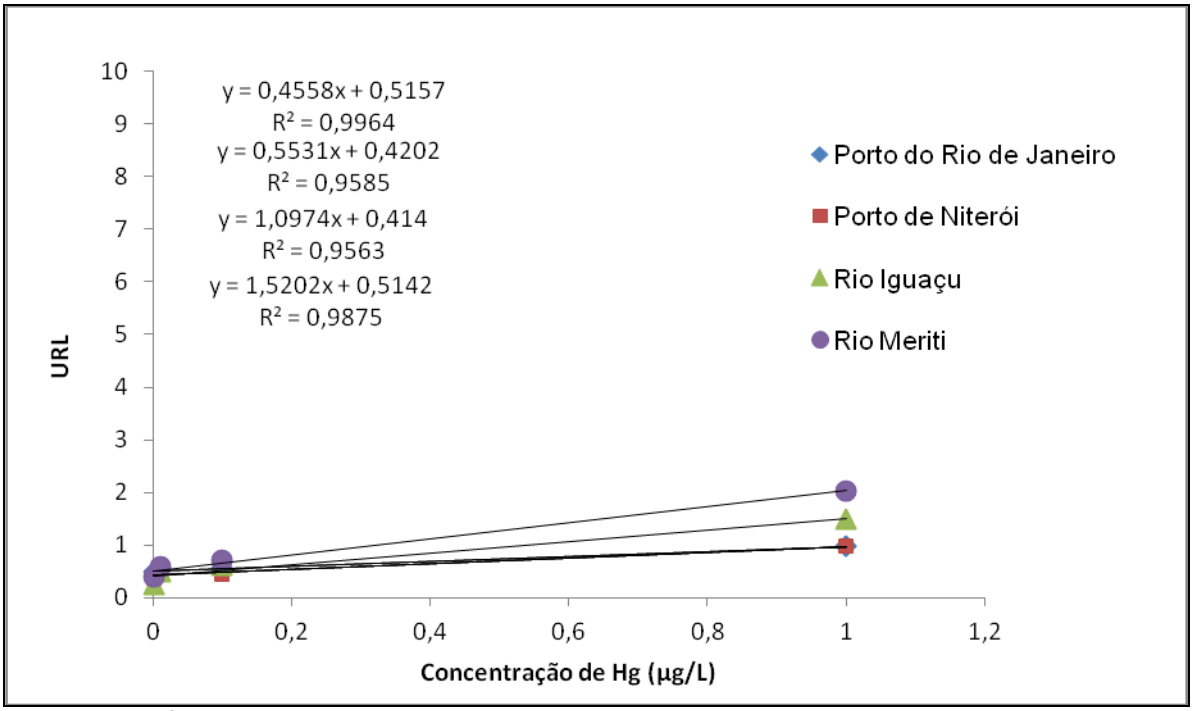

Figura 27: Gráficos das curvas de calibração, Porto do Rio de Janeiro (triângulo azul) e Porto de Niterói (quadrado vermelho) do Rio Iguaçu (triângulo verde) e Rio Meriti (círculo roxo) lixiviados com HCl 1M.

Tabela 38: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de solo) no lixiviados com HCl 1M.

Localidade	Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento)
Porto do Rio de Janeiro	0,694
Porto de Niterói	0,659
Rio Iguaçu	0,675
Rio Meriti	0,957

A Figura 28 apresenta os valores de concentração de mercúrio biodisponível (µg/Kg de sedimento) para as duas metodologias de lixiviação testadas. E ainda a Tabela 39 apresenta uma comparação entre as duas metodologias. É importante ressaltar que a lixiviação com HCl 1M não apresenta agentes complexantes como a amostra ambiental.

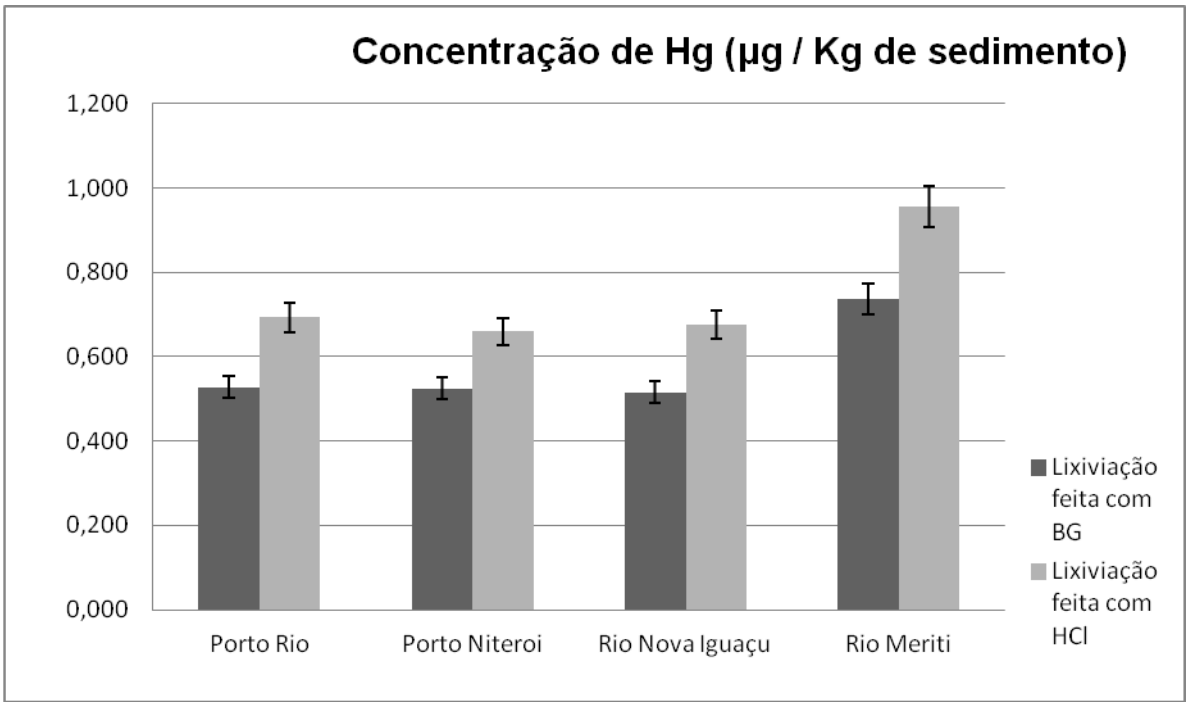

Figura 28: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento).

Tabela 39: Concentração de mercúrio biodisponível (µg / Kg de sedimento).

	Localidades			
	Porto do Rio de Janeiro	**Porto de Niterói**	**Rio Iguaçu**	**Rio Meriti**
Mercúrio (µg / Kg de sedimento) - Lixiviação com amostra da Baía de Guanabara	0,528	0,525	0,515	0,736
Mercúrio (µg / Kg de sedimento) - Lixiviação feita no ácido (HCl)	0,694	0,659	0,675	0,957
Média URL	0,611	0,592	0,595	0,847
Desvio padrão	0,117	0,095	0,113	0,156
CV (%)	2,260	1,520	2,163	2,862

Na Tabela 39 pode ser observado que ao comparar as duas metodologias os desvios padrão estão na faixa de 0,592 a 0,847, indicando boa repetibilidade destes. Observa-se ainda, que o maior valor do coeficiente de variação foi 2,862%, para o Rio Meriti.

Entretanto, todos os valores de CV < 10% indicam baixa dispersão e valores homogêneos. O que significa que estatisticamente as duas metodologias apresentaram resultados similares em relação a concentração de mercúrio biodisponível. Tendo em vista a complexidade das amostras ambientais o mais

adequado seria o uso da lixiviação com a amostra da própria localidade (neste caso da Baía de Guanabara).

O rio Meriti foi o que apresentou a maior concentração de mercúrio (valor médio 0,847 µg/kg de sedimento), sugerindo a amostra Rio Meriti como a mais contaminada por mercúrio. Esse resultado pode ser consequência de anos de atividade de uma indústria de produção de cloro e soda na porção noroeste da Baía de Guanabara, próximo ao Rio Meriti. Essa indústria contribuiu para a poluição na Baía através do despejo de grandes quantidades de mercúrio, que era utilizado como catalisador (BARROCAS, 1994).

A concentração de mercúrio dos outros pontos coletados se apresentaram menores que o Rio Meriti (cerca de 30% menores). Sabe-se que regiões de portos possuem muita movimentação de embarcações, o que leva à poluição de metal pesado proveniente de combustíveis. No entanto, também há uma maior circulação de água devido ao fluxo de maré, que pode contribuir para maior aporte de mercúrio.

Maiores discussões com relação aos locais seriam possíveis caso fossem obtidas mais amostras de sedimentos abrangendo regiões anteriormente estudadas. Além disso, ter maiores informações com relação a influência da circulação da água, influência das marés, composição dos sedimentos, textura, mineralogia, partículas em suspensão, concentração de espécies, como Cl^-, OH^-, NH_3, F^-, SO_4^{-2} NO_3, seriam necessárias para um estudo mais detalhado da biodisponibilidade do mercúrio em sedimentos, já que a distribuição do mercúrio no solo depende do potencial redox, pH, do tipo de solo e outros fatores. As formas metálicas e iônicas apresentam baixa mobilidade e, em grande parte, são adsorvidas por diferentes humatos e minerais.

O que deve ser considerado é que a metodologia proposta também pode ser utilizada para amostras de sedimentos, o que não havia sido testado para esta ferramenta analítica. Para uma avaliação ambiental mais completa é necessário analisar os diferentes compartimentos ambientais, o que geraria mais discussão acerca dos fatores de contaminação e ainda de possíveis medidas para remediação. Como também discussões para definição de normas ambientais aceitáveis, avaliações de risco ambiental e, mais amplamente, o estabelecimento de políticas ambientais.

6. ANÁLISE DE CUSTOS DA TECNOLOGIA PROPOSTA

Atualmente há uma contínua demanda por novas técnicas analíticas, que sejam capazes de avaliar os potenciais riscos para o ambiente e para a saúde humana (CAROLI, 1996).

O desenvolvimento de um método que permita a obtenção de resultados confiáveis frente a necessidades relacionadas à eficiência, custo, tomada rápida de resultados e, se possível, dosagem de mercúrio biodisponível, são fatores que levaram à pesquisa de uma metodologia baseada em biossensores (SINGH & MITTAL, 2012).

Quando comparados aos métodos convencionais de análise, os biossensores se tornam promissores como ferramentas alternativas e complementares aos métodos existentes, sendo o custo operacional um dos fatores determinantes neste aspecto.

Um estudo de custo da tecnologia a ser desenvolvida é necessário em qualquer processo produtivo. Esse estudo leva em conta as condições materiais, como existência e disponibilidade dos recursos materiais utilizados, e ainda, auxilia na previsão de necessidade de mão de obra técnica ou qualificada (SILVA, 2009).

Nesses estudos de estimam-se os custos envolvidos, na qual a análise pode ser feita com diferentes propósitos em diferentes níveis do desenvolvimento de um processo tecnológico para saber a possibilidade da inserção do produto no mercado comercial.

Visando a possível utilização do biossensor do presente estudo como ferramenta complementar a um método analítico, foi necessário avaliar os gastos envolvidos para determinação de mercúrio biodisponível pelo biossensor microbiano bioluminescente, utilizando como biocomponente a *E. coli* MC 1061. E ainda realizar uma análise esboçando uma comparação a uma metodologia já consagrada, como por exemplo, a análise de mercúrio pelo método EPA 245.7, espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio.

A análise foi realizada com base nos equipamentos, serviços e insumos básicos para que um laboratório, já existente, possa fazer análises usando esse biossensor.

O procedimento para uso deste biossensor consiste em cultivar o micro-organismo em meios e soluções específicas e previamente preparadas e deixá-lo crescer até um ponto ideal para uso, o que leva cerca de 24h.

Nessa avaliação foram incluídos os insumos, serviços, como fornecimento de água e de energia elétrica, aparelhagem de laboratório e matéria prima.

Dentre os reagentes estão os sais necessários para preparo de soluções estoque, meios para cultivo do micro-organismo, e a enzima utilizada para a produção da luminescência (luciferina).

Com relação aos reagentes foram contabilizados os valores usados na compra das embalagens, tendo como fonte o site da *Didática SP Artigos e Equipamentos* para laboratórios (dentre as diversas buscas realizadas na internet, este site apresentava valores muito similares aos reagentes do presente estudo quando adquiridos).

Dentre os reagentes, aqueles que apresentaram os maiores custos foram a luciferina e o antibiótico (monossulfato de canamicina), representando cerca de 80% do valor de R$ 4.259,01 aplicado para essa área. Sendo o valor mais expressivo o da luciferina, custando R$ 1715,00 a embalagem. Outros materiais como tubos, placas e alças somaram R$ 1.445,46.

Entretanto, deve ser lembrado que não se usa todo o conteúdo da embalagem do reagente em apenas uma análise, mas sim quantidades menores e específicas. Desta forma foi calculado o quanto seria gasto para cada experimento (nesse momento o experimento foi tratado como uma placa com 96 poços em análise). E o valor encontrado para os 96 poços em análise foi de aproximadamente R$ 203,10.

Nesta avaliação incluiu-se ainda o valor estimado para mão de obra. Através de pesquisas foi avaliado que o salário correspondente a um técnico em química é de dois salários mínimos. Baseado em um salário mínimo de R$ 788,00, (D.O.U. de 30/12/2014), o salário final de um técnico em química seria de R$ 1576,00.

A categoria com os maiores gastos pertence aos equipamentos. Sendo estes considerados como gastos iniciais/investimento.

Dentre os equipamentos envolvidos no procedimento de análise do biossensor, incluem-se os relacionados ao cultivo do micro-organismo, esterilização de materiais e das soluções, levando em consideração apenas os equipamentos mais básicos para o procedimento.

Sendo assim, a maior parte dos aparelhos cotados são aparelhos comuns e necessários a qualquer laboratório que trabalhe com micro-organismos. Isso inclui aparelhos como capela, fluxo laminar e autoclave. O único aparelho específico para essa análise, que não é facilmente encontrado em laboratórios comuns, é o Luminômetro, que realiza a medição da bioluminescência.

Os gastos com equipamento representaram um investimento de R$ 45.797,72. O luminômetro representou 46% desse orçamento seguido do fluxo laminar, usando 22%. Os outros equipamentos os 32% restantes. O gasto com reagentes não chegou a 10% do valor dos equipamentos.

Cabe ressaltar a importância da avaliação de alguns serviços como água e energia elétrica, que são fundamentais para o funcionamento de todos os procedimentos. Com base em dados fornecidos pela Light/RJ e pela CEDAE/RJ chegou-se a um valor estimado para um número fixo de experimentos realizados por mês, visto que a ambas têm sua taxa baseada no consumo de um período de tempo.

Desta forma, estipulou-se a realização de 30 experimentos, ou seja, trinta análises, o que inclui todo o procedimento necessário para a leitura final na placa. O valor aproximado foi de R$ 219,00 com energia elétrica e R$ 20,83 com fornecimento de água. Sendo o custo aproximado por experimento de R$ 7,30 com eletricidade e R$ 0,70 com fornecimento de água (sendo um total de R$ 8,00 para cada experimento).

Com intuito de avaliar as despesas envolvidas em um único experimento, com serviços, mão de obra e reagentes utilizados, sem considerar nenhuma espécie de lucro, o custo de cada análise foi de R$ 263,63, como mostra a Tabela 40. Nesta análise foi incluída o custo de manutenção do micro-organismo.

Tabela 40: Custo de procedimento experimental de Análise usando Biossensor.

Categorias	Valor (R$)
Reagentes	203,10
Mão de Obra	52,53
Insumos e Serviços	8,00
Total	**263,63**

No entanto, a placa luminométrica, na qual o experimento é realizado, contém 96 poços, portanto, pode ser considerado cada poço como uma análise. Desta forma, o valor do custo do experimento foi dividido pelos 96 poços sendo o custo de R$ 2,74 por amostra. O que foi considerado um valor pequeno para análise de mercúrio quando comparado a outras metodologias.

Para comparar a metodologia do biossensor do presente estudo foi realizada análise do preço de mercado em diferentes laboratórios que analisam e quantificam mercúrio. Neste levantamento o valor de mercado encontrado foi utilizado para comparação das metodologias, a qual se tratava da espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (método EPA 245.7 e limite de quantificação de 0,05 µg/L ou ppb). O valor para análise de mercúrio total foi de R$ 39,81 por cada amostra.

Ao comparar os valores que cada metodologia representa por amostras pode ser verificado que o método envolvendo o biossensor apresenta um custo bem menor que o método tradicional (espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio). Sendo o biossensor cerca de 90% mais barato em relação ao outro método.

Desta forma, pode se verificar que a metodologia que envolve biossensores tem um custo bem menor quando comparado as metodologias tradicionais, e ainda, que o investimento nessa tecnologia seria viável para um metal de interesse na saúde pública, como o mercúrio.

Com isso este poderá ser aplicado para fomentar estudos de monitoramentos em amostras ambientais de longo prazo e não apenas em coletas pontuais, como ocorre em casos de acidentes ambientais.

7. CONCLUSÕES

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

A bioluminescência produzida por *Escherichia coli* MC1061 tem sido descrita como uma técnica analítica sensível com potencial de aplicação para detecção de mercúrio biodisponível em amostras de água e sedimento, o que foi comprovado pelos resultados obtidos nesse trabalho, pois os valores de desvio padrão na maioria dos ensaios foram baixos e todos os valores de CV < 10% indicaram baixa dispersão e valores homogêneos.

Dentre as localidades amostradas na área de estudo, no ponto A (próximo a Ponte Rio-Niterói) observou-se que o mês de setembro de 2012 apresentou os maiores valores de mercúrio biodisponível (A fundo = 0,433 µg/L; A meio = 0,438 µg/L e A superfície = 0,484 µg/L). Sendo que a superfície apresentou sete meses com valores acima de 0,2 µg/L (abril, setembro e outubro de 2012, e ainda, abril, julho, outubro e dezembro de 2013). No ponto D (próximo a Ilha do Governador) observou-se que o mês de setembro de 2012 também apresentou os maiores valores de mercúrio biodisponível (D fundo = 0,352 µg/L e D superfície =0,765 µg/L). O ponto A superfície apresentando quatro meses com valores acima de 0,2 µg/L (setembro, outubro e novembro de 2012 e ainda julho de 2013).

As análises de correlação de Spearman apresentaram apenas dois resultados significativos: a variável pH apresentou uma correlação significativa no ponto A meio para o ano de 2012 (correlação fortemente positiva). Não há muito consenso na literatura sobre a influência do pH na metilação do Hg; a variável salinidade apresentou uma correlação significativa no ponto D superfície para o ano de 2012 (correlação moderada positiva). Remetendo à questão de como os componentes aniônicos dos sais marinhos possuem um efeito na especiação do mercúrio nos sistemas aquáticos, além de afetar a composição da comunidade microbiana responsável pela metilação. Concluindo, é importante a avaliação da biodisponibilidade do metal no ambiente.

Na validação foi possível obter 99% do mercúrio biodisponível na metodologia do biossensor microbiano, e 99% do mercúrio na metodologia de espectrometria de

absorção atômica com vapor frio nas amostras da curva de calibração elaboradas usando soluções padrões de Hg. Apresentando assim o mesmo padrão nas duas metodologias para estas amostras. Assegurando a viabilidade técnica.

A metodologia empregada neste trabalho para a extração de mercúrio, baseada na técnica utilizada por IVASK e colaboradores (2002), pode ser utilizada para o biossensor em questão, pois verifica-se o sinal de luminescência nos testes realizados. Os resultados de concentração de mercúrio biodisponível mostram que os dois métodos de lixiviação, com água ou HCl, foram capazes de lixiviar mercúrio biodisponível das amostras de sedimento e, portanto, foi comprovado seu potencial de aplicação. Além disso, não foi observada diferença significativa entre essas técnicas.

A amostra de sedimento do Rio Meriti apresentou uma fração de mercúrio biodisponível maior que as outras amostras (valor médio = 0,847 µg/Kg de sedimento). Para uma avaliação ambiental mais completa é necessário analisar os diferentes compartimentos ambientais, o que geraria mais discussão a cerca dos fatores de contaminação e ainda de possíveis medidas para remediação.

Através de uma análise preliminar de custos pode se verificar que a metodologia que envolve biossensores tem um custo bem menor quando comparado às metodologias tradicionais, e que o investimento nessa tecnologia é viável para um metal de interesse na saúde pública. Podendo ser aplicado no fomento de estudos de monitoramentos em amostras ambientais de longo prazo e não apenas em coletas pontuais, como ocorre em casos de acidentes ambientais. Além de impulsionar discussões para definição de normas ambientais aceitáveis, avaliações de risco ambiental e, mais amplamente, o estabelecimento de políticas ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACHA, D.; IÑIGUEZ, V.; ROULET, M.; GUIMARÃES, J. R. D.; LUNA, R.; ALANOCA, L; SANCHEZ, S. Sulfate-reducing bactéria in floating macrophyte rhizospheres from na Amazonian Floodplain lake in Bolivian and their association with Hg methylation. *Applied Environmental Microbiology,* 71: 7531-7535, 2005.

AGENCY FOR SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY; Toxicological Profile for Mercury", em: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46-c3.pdf

AMADOR, E. DA S. Bacia da Baía de Guanabara: Características Geoambientais, Formação e Ecossistemas. p. 432, 2012.

AMADOR, E. DA S. Baía de Guanabara e Ecossistemas Periféricos : Homem e Natureza. p. 539,1997.

ANDERSON, A. Mercury in soils. In: NRIAGU JO. The Biogeochemistry of Mercury in the Environment. Elsevier, North-Holland: *Biomedical Press*, p. 79–112, 1979.

ANVISA: www.anvisa.gov.br

APLIQUIM: www.apliquim.com.br

ARAGUAY, G., PONS, J., MERKOÇI, A. *Chemical Reviews,* 111: 3433-3458, 2011.

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

ATLAS, R. M. Handbook of Microbiological Media. Boca Raton, Florida, CRC press,1997.

ATSDR. Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile for Mercury. Atlanta: Division of Toxicology, Department of Health and Human Services. p.611, 1999.

AZEVEDO, F. A. Toxicologia do mercúrio. RIMA, São Paulo, Brasil. p.292, 2003.

BAKIR, F.; DAMLUJI, S.F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTHADA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N.Y.; DHAHIR, N.I.; CLARKSON, T.W.; SMITH, J.C.; DOHERTY, R.A. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science,* 181: 230-241, 1973.

BALLS, P. W.; BROCKIE, N.; DOBSON, J.; JONHSTON, W. Dissolved Oxynen and Nitrification in the Upper Forth Estuary During Summer. Patterns and Trends. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 42 : 117-134, 1996.

BAPTISTA NETO, J. A.; GINGELE, F. X.; LEIPE. T.; BREHME, I. Spatial Distribution of Heavy metals in Surficial Sediments from Guanabara Bay: Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Geology*, 49: 1051-1063, 2006.

BAPTISTA NETO, J. A.; SOUZA, G. W.; PINTO, G. F. P., PALMA, R. Processos de Urbanização e Impactos Ambientais ao Longo dos Rios Bomba e Imbuaçu. X Simpósio Brasileiro de Geofísica Aplicada, Rio de Janeiro, 2003.

BARBIERI, J. C. *Desenvolvimento e Meio Ambiente. Vozes,* Petrópolis, RJ, p. 159, 2007.

BARBOSA, A. C.; SOUZA, J.; DOREA, J. G.; JARDIM, W. F.; FADINI, P.S. Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology,* 45: 235-246, 2003.

BARBOSA, M. C.; ALMEIDA, M. S. S.; MARIZ, D. F.; ALMEIDA, J. L. D. S. S. Studies of channel sediments contaminated with organics and heavy metals. *Journal of Hazardous Materials,* 110, 2004.

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

BARROCAS, P. R. . Mercury Geochemistry in sediments of São João de Meriti river: Guanabara bay system, Rio de Janeiro, Brasil. *In*: Dissertação de mestrado. 132p. Universidade Federal Fluminense, Niterói. p.132, 1994.

BARROCAS, P.R.G. & WASSERMAN, J. C. O mercúrio na Baía de Guanabara: uma revisão histórica. *Geochim. Brasil*, 9 (2), 115-127, 1995.

BARROCAS, P.R.G. Assessment of mercury (II) species bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor. Tese de Doutorado. Departamento de Oceanografia, Universidade Estadual da Florida, 2003.

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

BERGQUIST, B. A.; BLUM, J. D. The odds and evens of mercury isotopes: Applications of mass-dependent and mass-independent isotope fractionation. *Elements,* 5: 353−357, 2009.

BERNAL, R. V.; HERRERA-PEREZ, G.; RODRIGUEZ-MIRANDA, E. Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides. *Agricultural and Biological Sciences*, 14: 229-357, 2012.

BIESTER, H.; GOSAR, M.; MULLER, G. Mercury speciation in tailings of the Idrija mercury mine. J. *Geochem. Exploration,* 65 (3): 195-204, 1999.

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

BISINOTI, M.C. Biogeoquímica Aquática do Mercúrio Orgânico na Bacia do Rio Negro, Amazônia. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Campinas: Campinas, p.169, 2005.

BLOOM, N. S. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Canadian Journal Fish Aquat*. *Sci.,* 49: 1010-1017, 1992.

BOENING, D. W., Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. Chemosphere, 40: 1335-1351, 2000.

BONTIDEAN, I.; MORTARIA, A.; LETHA, S.; BROWN, N. L.; KARLSON, U.; MARTIN, M.; LARSEN, M. M.; VANGRONSVELD, J.; CORBERSIERE, P.; CSÖREGI, E.; Biosensors for detection of mercury in contaminated soils. *Environmental Pollution*, 131: 255-262, 2004.

BRANCO, C. W. C. Estratificação térmica em reservatórios de hidrelétricas, Relatório Técnico, UNIRIO, Rio de Janeiro, 2007.

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

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução Normativa nº 430. Estabelece normas e padrões para a qualidade das águas, lançamentos de efluentes nas coleções de águas, e dá outras providências, 2011.

BRUINS, M.R., KAPIL, S., OEHME, F.W. Microbial resistance tometals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 198-205, 2000.

CAMARA, V. M.; SILVA, A. P., PIVETTA, F. Estudo dos níveis de exposição e efeitos à saúde por mercúrio metálico em uma população urbana de Poconé, Mato Grosso, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 12: 69-77, 1996.

CANELA, M. C. Determinação de mercúrio a nível de traço: Aplicação em amostras de interesse ambiental, UNICAMP, 1995.

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

CARVALHEIRA, R. G. *Contaminação por Mercúrio e metas de Despoluição da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro-Rj: Prognóstico de Risco Ecológico Potencial e da Bioacumulação em Peixes*, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, p.138, 2012**.**

CARVALHEIRA, R. G., BIDONE, E. D., & CASTILHOS, Z. C. Contaminação por Mercúrio e as metas de Despoluição da Baía de Guanabara, Bioacumulação em Peixes e do Recurso Pesqueiro. *Geo Amb - UFF*, 1–3, 2009.

CARVALHO, C. N. & SCHORCHER, H. D. Geochemical studies of the river Sarapui (tributary of Guanabara Bay), Rio de Janeiro, Brasil. *Environmental Technology Letters,* 3, 425-432, 1982.

CAVALCANTI, G. D. S. Aplicação de Biossensor Bioluminescente na Detecção do Hpa Naftaleno em Solo Contaminado com Óleo Cru. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p.90, 2010.

CETESB. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. Acesso em 20 nov. 2014. Online. Disponível na Internet http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/ relacao_areas.asp.

COELHO, V. Baía de Guanabara: Uma história de agressão ambiental. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2007.

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

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

COSTA, G. S. Aplicação de Biossensor Bioluminescente na detecção de Hg (II). Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p.93, 2010.

COSTA, G. S.; SALGADO, A. M.; BARROCAS, P. R. G. Advances on Using a Bioluminescent Microbial Biosensor to Detect Bioavailable Hg (II) In Real Samples. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, *1*(3): 44-48, 2013.

COSTA, G. S.; SALGADO, A. M.; BARROCAS, P. R. G. Selection of cultivation medium for Escherichia coli for their application in a biosensor microbiological. In *Book of abstract of the 11th International Chemical and Biological Engineering Conference,* p. 4–5, 2011.

COSTLEY C. T.; MOSSOP K. F.; DEAN J. R.; GARDEN L. M.; MARSHALL J.; CARROLL J.; Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. *Analytica Chimica Acta,* (405): 179–183, 2000.

CRESPO-LOPEZ, M. E.; MACEDO, G. L.; PEREIRA, S.I.; ARRIFANO, G. P.; PICANCO-DINIZ, D. L.; DO NASCIMENTO, J. L.; HERCULANO, A. M. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Researc*h, 60: 212-20, 2009.

CRUZ, C. B. M.; MAYR, L. M.; ARGENTO, M. S. F.; SENNA, C. A. P. de. Transformações ambientais na Baía de Guanabara - uma abordagem com suporte de Geoprocessamento. In: *I Simpósio Estadual de Geoprocessamento do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, 1996.

CUNHA, S. B. DA, & GUERRA, A. J. T. *Avaliação e Perícia Ambiental*. Bertrand Brasil, Rio de Janeiro, RJ, p. 284, 2012.

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*, 41: 1790–1796, 2007.

DASTOOR, A. P. & LAROCQUE, Y. Global circulation of atmospheric mercury: a modeling study. *Atmospheric Environment,* 38, 147–161, 2004.

DE LUCA REBELLO, A.; HAEKEL, W.; MOREIRA, I.; SANTELLI, R.; SCHROEDER, F. The fate of heavy metals in an estuary tropical system. *Marine Chemistry,* 18: 215-225, 1986.

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

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

ECOLOGUS-AGRAR (CONSÓRCIO). *Plano Diretor de recursos Hídricos da Região Hidrográfica da Baía de Guanabara,* p. 190, 2005.

EKINO, S.; SUSA, M.; NINOMIYA, T. Minamata diseases revisited: Na update on the acute and chronic in if a stations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* 262 (1-2): 131-144, 2007.

ENVIRONMENT CANADÁ. Mercury and the environment. Disponível em: http://www.ec.gc.ca/MERCURY/EH/EN/eh-b.cfm. Acessado em janeiro de 2015.

ESTRADE, N.; CARIGNAN, J.; SONKE, J. E.; DONARD, O. F. X. Mercury isotope fractionation during liquid−vapor evaporation experiments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 73: 2693−2711, 2009.

ETO, K. Pathology of Minamata disease. *Toxicology Pathology* 25 (6): 614-623, 1997.

EVDOKIMOV, E.; WANDRUSKA, R. Decontamination of DDT-polluted soil by washing cloud point extraction. 31: 2289-2298, 1998.

FENG, X., STREETS, D., HAO, J., WU, Y., AND LI, G.: mercury emissions from industrial sources in China. *Springer*, New York, USA, chap. 3, 67–79, 2009.

FERREIRA, J. R.; BERGAMIN, F. O. H.; KRUG, J. F.; MENEZES, N. A.; HANSEN, P. E.; JORGENSEN, S. S. Mercury in Water and Fish from the São Vicente Estuary near Santos, Brazil. Ambio, 8: 210-213, 1979.

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

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

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

GEIM, A.K., NOVOSELOV, K.S. *Nature Materials,* 6: 183-191, 2007.

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

GHOSH, S.; SCHAUBLE, E. A.; LACRAMPE COULOUME, G.; BLUM, J. D.; BERGQUIST, B. A. Estimation of nuclear volume dependent fractionation of mercury isotopes in equilibrium liquid−vapor evaporation experi- ments. *Chem. Geol.,* 336: 5 −12, 2013.

GILBERT, S.G. & GRANT–WEBSTER, K. Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure*. Environmental Health Perspectives,* 103(6): 135-142, 1995.

GILMOUR, C.C. & HENRY, E.A. Mercury methylation im aquatic systems affected by acid deposition. Environmental Pollution, 71: 131-169, 1991.

GODOY, J. M.; OLIVEIRA, A. V. ; ALMEIDA, A. C. ; GODOY, M. L. D. P. ; MOREIRA, I. ; WAGENER, A. R. ; FIGUEIREDO J., ALBERTO G. DE . Guanabara bay sedimentation rates based on 210 Pb dating: reviewing the existing data and adding new data. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23: 1265-1273, 2012.

GODOY, J.M.; MOREIRA, I.; BRAGANÇA, M.J.; WANDERLEY, C.; MENDES, L.B.; A study of Guanabara Bay sedimentation rates. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 227: 157-160, 1998.

GONZALEZ-MARTINEZ, M. A.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. TrAC, *Trends Anal. Chem*, 18: 204–218, 1999.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Plano Diretor de Recursos Hídricos da Baía de Guanabara (PDRH-BG). Rio de Janeiro, 2005 COLLINGS, A. F.; CARUSO, F. *Rep. Prog. Phys.* 60: 1397–1145, 1997.

GRAEME, A.K. & POLLACK, C.V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. *Journal of Emergency Medical,* 16: 45–56, 1998.

GRIGOLETTO, J. C.; OLIVEIRA, A. S.; ALBERGUINI, L. B. A.; TAKANAYAQUI, A. M. M.; Exposição ocupacional por uso de mercúrio em odontologia: uma revisão bibliográfica. *Ciência & Saúde Coletiva,* 13: 533-542, 2008.

GROSS, P. K. van; ESSER, B. K.; WILLIAMS, R. W.; HUNT, J. R. Isotope Effect of Mercury Diffusion in Air. American Chemical Society. *Environmental Science & Technology*. 48: 227−233, 2014.

GUANABARA LIMPA. Ampliação dos Sistemas de Tratamento de Esgoto. Disponível em: http://guanabaralimpa.eco.br/pagina-visualiza-conteudo.asp?cod=3497. Acessado em janeiro de 2015.

GUNTER, F. Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental. *EPU, São Paulo, SP,* p. 196, 2012.

GÜRKAN, R.; KIR, U. A fast and reliable method for quantitative determination of total mercury in vegetables. Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Cumhuriyet, Sivas, Turkey. 2014.

HACON, S.; BARROCAS, P.R.G; VASCONCELLOS, A.C.S.; BARCELLOS, C.; WASSERMAN, J. C.; CAMPOS, R.C; RIBEIRO, C.; AZEVEDO-CARLONI, F.B. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 24(7): 1479-1492, 2008.

HANDBOOK OF HYPHENATED ICP-MS APPLICATIONS. First Edition. 2007.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, 25: 1-24, 1995.

HARADA, M.; NAKANISHI, J.; YASODA, E., PINHEIRO, M. d. C. N.; OIKAWA, T., GUIMARÃES, G. d. A.; CARDOSO, B. d. S.; KIZAKI, T.; OHNO, H. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects, Environment Internacional, 27: 285–290, 2001.

HOGBERG, H. T., KINSNER-OVASKAINEN, A.; COECKE, S., HARTUNG, T., BAL-PRICE, A.K. mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an in vitro approach. *Toxicological Sciences*, 113: 95–115, 2010.

HOGG, A.T., STEWART, J.W.B., BETTANY, J.R. Influence of the chemical form of Mercury on its adsorption and ability to leach through soils. *Journal of Environmental Quality,* 7: 440–445, 1978.

HONDA, S.; HYLANDER, L.; SAKAMOTO, M. Recent advances in evaluation of health effects on mercury with special reference to methylmercury: A minireview. *Environmental Health and Preventive Medicine* 11(4): 171-176, 2006.

HORVAT, M. Mercury analysis and speciation in environmental samples. In: Baeyens, W., Ebinghaus, R., Vasiliev, O. Kluwer A. Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances. *Netherlands: Publishers,* p.1-31. 1996.

HUGHES, M.N. & POOL, R.K. Metals and Micro-Organisms. *Chapman and Hall, London*, UK, p. 412, 1989.

HUGUNIN, A.G. & BRADLEY, R.L. Exposure of man to mercury: a review II. Contamination of food and analytical methods. *Journal of Food Science & Technology*, 38(6): 354-386, 1975.

INEA, Instituto Estadual do Meio Ambiente, *Plano Diretor da Baía de Guanabara.* Rio de Janeiro, 2005.

IVASK, A.; HAKKILA, K.; VIRTA, M. Detection of organomercurials with whole-cell bacterial sensors. *Analytical Chemistry*, 73 (21): 5168–5171, 2001.

IVASK, A.; VIRTA, M.; KAHRU, A. Construction and use of specific luminescente recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. *Soil Biology & Biochemistry,* 34: 1439-1447, 2002.

JABLONSKI, S.; AZEVEDO, A. F.; MOREIRA, L. H. A. Fisheries and conflicts in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brasil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 79, 2006.

JAFFREZIC-RENAULT, N.; DZYADEVYCH, S. V. Conductometric mirobiosensores for environmental monitoring, *Sensors,* 8: 2569-2588, 2008.

JAHANBAKHT, S.; LIVARDJANI, F. & JAEGER, A. Na experimental ecotoxicological study and its application to the behavioural study of organic mercury (CH_3HgCl) in the environment: influence of temperature and pH. *Chemosphere*, 49: 1399-1405, 2002.

JICA. Japan International Cooperation Agency. The Study on the Recuperation of the Guanabara Bay Ecosystem, Kokusai Kogyo Co. Ltd.: Tokyo, 1994.

KARUBE, I., NAKANISHI, K. Immobilized cells used for detection and analysis. *Curr. Opin. Biotechnol*., 5: 54-59, 1994.

KASPER, D.; BOTARO, D.; PALERMO, E. F. A.; MALM, O. Mercúrio Em Peixes – Fontes E Contaminação. *Oecol. Bras.,,* 11 (2): 228-239, 2007.

KEHRIG, H. A.; MALM, O. Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na Baía de Guanabara. *Química Nova*, 34: 377-384, 2011.

KEHRIG, H. A.; MALM, O.; MOREIRA, I. Mercury in a widely consumed fish *Micropogonias furnieri* (Demarest. 1823) from four main Brazilian estuaries. *The Science of the Total Environment*, 213: 263-271, 1998.

KINGMAN, A.; ALBERTINI, T., BROWN, L. J. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a US Military population. *Journal of Dental Research,* 77: 461–71, 1998.

KJERFVE, B.; RIBEIRO, C. H. A.; DIAS, G. T. M.; FILIPPO, A. M.; QUARESMA, V. S. (1997). Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. Continental Shelf Research, 17(13): 1609-1643

KOHUT, C.; DUDAS, M. J.; LUTHER, S. M. Investigation of soil Mercury and distribution at the turner valley gas plant. *Alberta Environmental Protection, Alberta Community Development Report,* 1995.

LACERDA L. D. Minamata Livre de Mercúrio. *Ciência Hoje*, 133(23): 25-31, 1997.

LACERDA, L. D.; SANTOS, A. F.; MARINS, R. V. Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. *Química Nova,* 30 (2): 366-369, 2007.

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

LAMPINEN, J.; VIRTA, M.; KARP, M. Comparison of gram-positive and gram-negative bacterial strains cloned with different types of luciferase genes in bioluminescence cytotoxicity tests. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10: 157–166, 1995.

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

LEE, J.S., MIRKIN, C.A. *Analytical Chemical*, 80: 6805-6808, 2008.

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

LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W; QUEVAUVILLER, P.; HORVAR, M. Mercury in environmental samples: Speciation, artefacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 383-393, 2005.

LEERMARKERS M.; BAEYENS W.; QUEVAUVILLE P.; HORVAT M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *Trends in Analytical Chemistry,* 24 (5), 2005.

LEFF, E. Ecologia, Capital e Cultura. Vozes. Petrópolis, RJ, p. 439, 2009.

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

LI, P.; FENG, X.B.; QIU, G.L. Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. *Journal of Hazardous Materials* 168 (2-3): 591-601, 2009.

LIMA, E. C. da R. Qualidade de água da Baía de Guanabara e saneamento: uma abordagem sistêmica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

LOHMAN, K.; SEIGNEUR, C.; GUSTIN, M.; LINDERBERG, S.; Sensitivity of the global atmospheric cycle of mercury to emissions. *Applied Geochemistry,* 23: 454-466, 2008.

LOPPI, S., Environmental distribution of mercury and other trace elements in the geothermal area of Bagnore. Mt. Amiata, Italy, *Chemosphere* 45, 991–995, 2001.

LU, C.H., YANG, H.H., ZHU, C.L., CHEN, X., CHEN, G.N. *Anfewandt Chemie International, Edition* 48: 4785-4787, 2009.

MADIGAN, M. T. Brock Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall/Pearson Education, 10ed, 2002.

MAFFIA, G. M.; DAVIS, J. *Bi-phasic collagen for the extraction of metals from contaminated waters.* 2001. Disponível em: <http://muse.widener.edu/soengr/srprojects2001.htm>. Acesso em: 20 de novembro de 2014.

MAGRINI A., DOS SANTOS M. A. Gestão Ambiental de Bacias Hidrográficas – Rio de Janeiro – ed. TUIG, 2001.

MANO, E. B., PACHECO, É. B. A. V., & BONELLI, C. M. C. Meio Ambiente, Poluição e Reciclagem. Edgard Blucher, São Paulo, SP, p. 182, 2005.

MANZOORI, J. L.; KARIM-NEZHAD G. Development of a cloud point extraction and preconcentration method for Cd and Ni prior to flame atomic absorption spectrometric determination. Analytica Chimica Acta., 521 (2): 173 – 177, 2004.

MARINO, I. K.; GUIZAN, C.S.; BAPTISTA NETO, J. A. Correlação entre dados geofísicos, sedimentológicos e geoquímicos na caracterização dos depósitos quaternários e influência da ação antrópica na Baía de Guanabara, Monografia - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2011.

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

MARINS, R. V.; LACERDA, L. D.; PARAQUETTI, H. H. M.; PAIVA, E. C.;VILLAS-BOAS,R. C. Geochemistry of Mercury in Sediments of a Subtropical Coastal Lagoon, Sepetiba Bay, Southeastern Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 61: 57-64, 1998.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry,* 77: 237–256, 2002.

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

MERLIVAT, L. Molecular diffusivities of $H_2{}^{16}O$, $HD^{16}O$, and $H_2{}^{18}O$ in gases. *J. Chem. Phys.,* 69, 2864−2871, 1978.

MEYER, B. R.; HAGEN, W.; MEDEIROS, C. Mercury in northeastern Brazilian mangrove area, a case study: potencial of the mangrove oyster Crassostrea rhizophorae as bioindicator for Hg. *Marine Biology*, 131: 113-121, 1998.

MEYER, J.C., GEIM, A.K., KATSNELSON, M.I., NOVOSELOV, K.S., BOOTH, T.J., ROTH, S. *Nature* 446, 60-63, 2007.

MIRACONI R. C. C. M.; BUENO M. I. M. S.; JARDIM W. F. Compostos de Mercúrio: Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. Departamento de Química Analítica- Instituto de Química - UNICAMP - CP 6154 - 13081-970 - Campinas – SP. *Química Nova*, 23 (4): 487-495, 2000.

MIERLE, G. & INGRAM, R. The role of humic substances in the mobilization of mercury from watersheds. *Water Air Soil Pollution,* 56, 349–57, 1991.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE DO JAPÃO (Consórcio). Manual de Análises de Mercúrio. Japão, p. 119, 2004.

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

MIRANDA, R. M.; COELHO-SOUZA, S. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; CORREIA, R. R. S.; OLIVEIRA, D. Mercúrio em Sistemas Aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. *Oecol. Bras.*, 11 (2): 24-251, 2007.

MIRRE R. C.; YOKOYAMA L.; PESSOA F. L. P. Reúso de efluentes industriais em refinarias de petróleo usando o método DFA para sistemas regenerativos. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6 (3), 2011.

MITRA, S. Mercury in the Ecosystem. *Trans Tech Publications,* 1986.

MO, Z.H., YANG, L.L., YANG, X.C., CHEN, Z.F. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 37, 1033-1036, 2009.

MOHANTY, S. P.; KOUGIANOS, E. Biosensors: A tutorial review. *Dept. of Comput. Sci. & Eng.,* 35-40, 2006.

MOLISANI, M. M. *et al.* Land-sea mercury transport through a modified watershed, SE Brazil. *Water research,* 41(9): 1929-1938, 2007.

MONTERO-ALVAREZ A. Mercury speciation in Cuban commercial edible fish by HPLC-ICP-MS using the double spike isotope dilution analysis strategy. International Journal of *Environmental Analytical Chemistry,* 94, (1): 36-47. 2014

MOREIRA, J.C.; PIVETTA, M. Global Mercury Pollution and the Role of Gold Mining: An overwiew. *Water, Air, Soil Pollut*, 97: 112-116, 1997.

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

MUTLU, M. Biosensors in Food Processing, *Safety, and Quality Control.* 1ed.: CRC Press, v.15 de *Contemporary Food Engineering,* 2-24 p. ISBN 1439819858/9781439819852, 2010.

NAKASHIMA, L. S., & PRANTERA, M. T. Estudo da Poluição da Baía de Guanabara: Rj Guanabara. *Saúde & Ambiente Em Revista*, 1 (2): 86–96, 2006.

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

NETO, J. A. B.; FONSECA, E. M. DA. Variação sazonal , espacial e composicional de lixo ao longo das praias da margem oriental da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro). *Journal of Integrated Coastal Zone Management,* 11 (1): 31-39, 2011.

NIVENS, D. E.; MCKNIGHT, T. E.; MOSER, S. A.; OSBOURN, S. J.; SIMPSON, M; L.; SAYLER, G. S. Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small, rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 33-46, 2004.

NOAA. National Oceanic and Atmospheric Administration. Report to Congresso n Mercury Contamination in the Great Lakes, 2012.

NOVOSELOV, K.S., GEIM, A.K., MOROZOV, S.V., JIANG, D., KASTNELSON, M.I., GRIGORIEVA, I.V., DUBONOS, S.V., FIRSOV, A.A. *Nature* 438, 197-200, 2005.

NRIAGU, J. & BECKER, C., Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: global and regional inventorie. *The Science of the Total Environment*, 304: 3–12, 2003

OLIVEIRA, A. V. Cronologia da deposição de metais pesados associados aos sedimentos da Baía de Guanabara. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2009.

OMS. Organização Mundial da Saúde. *Mercúrio - Criterios de salud ambiental*. Genebra, 1978.

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

PALMIERI, H. E. L.; NALINI, H. A. J.; LEONEL, L. V.; WINDMOLLER, C.; SANTOS, R. C.; DE BRITO, W. Quantification and speciation of mercury in soils from the Tripuí Ecological Station. Minas Gerais, Brasil. The Science of the Total Environment, 368: 69-78, 2006.

PARAQUETTI, H. H. M. ; AYRES, G. A. ; ALMEIDA, M. D. ; MOLISANI, M. M. ; LACERDA, L. D. . Mercury distribution, speciation and flux in the Sepetiba Bay tributaries, SE Brasil, Water Research, Pergamon Press Londres, 38 (6): 1439-1448, 2004.

PARAQUETTI, H. H. M., LACERDA, L. D., SOARES, T. C. M., ALMEIDA, M. D., COSTA, B. G. B., MOLISANI, M. M., … MONTEIRO, L. H. U. Avaliação Preliminar da Distribuição de Mercúrio no Estuário do Rio cocó, CEARÁ, BRASIL. In *AOCEANO - Associação Brasileira de Oceanografia*, 2008.

PATEL, P. D. TrAC, *Trends Anal. Chem*. 21, 96–115, 2002.

PATON, G. I.; CAMPBELL, C. D.; GLOVER, L. A.; KILLHAM, K. Assessment of bioavailability of heavy metals using lux modified constructs of Pseudomonas fluorescens. Letters in Applied Microbiology, 20, 52–56, 1995.

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, 157: 1643–1648, 2009.

PAVLISH, J. H. Status review of mercury control options for coal- fired power plants. *Fuel Process. Technol.* 2003, 82: 89−165, 2003.

PEREIRA, R.C. & SOARES-GOMES, A. (org) Biologia Marinha. Editora Interciência, Rio de Janeiro, p.382, 2002.

PETROBRAS-DPC-EMGEPRON (Convênio). Baía de Guanabara: Monitoramento e prevenção da poluição hídrica. Relatório técnico preliminar: Baía de Guanabara: Monitoramento e prevenção da poluição hídrica, Rio de Janeiro. 2004.

PFEIFFER, W. C.; FISZMAN, M.; CARBONELL, N. Fate of chromium in a tributary of the Irajá river, Rio de Janeiro. Environmental Pollution, 1, 117-126, 1980.

PFEIFFER, W. C.; FISZMAN, M.; ROCHA, N. C. C. Chromium in water, suspended particles, sediments and biota in the Iraja River Estuary. Environmental Pollution, 4, 193-205, 1982.

PIRRONE, N.; CINNIRELLA, S.; FENG, X.; FINKELMAN, R. B.; FRIEDLI, H. R.; LEANER, J.; TELMER, K. Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. Atmospheric Chemistry and Physics, 10(13), 5951–5964, 2010.

PNUD. Relatório das Nações Unidas para o Desenvolvimento. A água para lá da escassez: poder, pobreza e a crise mundial da água. New York, EUA, 2006.

POISSANT, L. & PILOTE,M.; XIAOHONG Xu & HONG ZHANG; BEAUVAIS, C. Atmospheric mercury speciation and deposition in the Bay St. François wetlands. *Journal of Geophysical Research*, 109: 1-11, 2004.

POISSANT, L.; ZHANGA, H. H.; CANÁRIO, J.; CONSTANT, P. Critical review of Mercury fates and contamination in the Arctic tundra ecosystem. Science of The Total Environment, 400(1-3), 173-211, 2008.

POOL, R.K. & GADD, G.M. Metals: Microbe Interactions. IRL Press, Oxford, UK, 1989.

PORCELLA, D.B. Mercury in the environment: biogeochemistry. In: Watras, C., Huckabee, J.W. Mercury pollution: Integration and synthesis. California: Lewis Publishers, p.3-36, 1994.

PUMERA, M. *Chemical Society Reviews* 39, 4146-4157, 2010.

QUINA, F. H.; HINZE, W. Surfactant-Mediated Cloud Point Extractions: An Environmentally Benign Alternative Separation Approach. Department of Chemistry, Wake Forest University, 38: 4150 – 4168, 1999.

RAMANATHAN, S., ENSOR, M., DAUNERT, S. Bacterial biosensor for monitoring toxic metals. *Trends in Biotechnol*., 15: 500-506, 1997.

RASMUSSEN, L. D.; SORENSEN, S. J.; TURNER, R. R; BARKAY, T. Application of a mer-lux biossensor for estimating bioavailable mercury in soil. Soil Biology & Biochemistry, 32, 639-646, 2000.

REIS, P. C. DOS. *Estudo Da Remoção E Fixação De Mercúrio Usando Hidroxiapatitas Modificadas Como Adsorventes Específicos*. Tese de doutorado. Universidade Federal Do Rio De Janeiro, p 153, 2008.

RENNEBERG A.J., DUDAS M.J. Transformations of elemental mercury to inorganic and organic forms in mercury and hydro-carbon co-contaminated soils. *Chemosphere,* 45: 1103–1109, 2001.

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

RODRIGUES, A.P.C. Avaliação de risco ecológico associado à contaminação mercurial em dois estuários do Estado do Rio de Janeiro: Baía de Guanabara e Baía da Ribeira. Dissertação de Mestrado em Geoquímica Ambiental. Departamento de Geoquímica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

RODRIGUES, A.P.C. Biomarcadores para avaliação de risco ecológico de mercúrio em peixes: sistema costeiro do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Geoquímica Ambiental. Departamento de Geoquímica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

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.; BARCELÓ, D. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Appl. Chem.,* 76, (4): 723–752, 2004.

ROSATTO, S.S. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e silica modificada. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2000.

ROULET, M. & LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralit soils of tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water, air and soil pollution* 80: 1079-1088, 1995.

RYCHERT, R. & MORTIMER, M. Inhibition of bioluminescence in a recombinant *Escherichia coli*. Environmental Toxicology and Water Quality, 6: 415–421, 1991.

SADANA, A. Biosensors: kinetics of binding and dissociation using fractals. 1.ed. *Amsterdam: Elsevier,* I:. 4-8 p. ISBN 0444515127/9780444515124, 2003.

SAGI, E.; HEVER, N.; ROSEN, R.; BARTOLOME, A.J.; PREMKUMAR, J.R.; BELKIN, S. Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains. *Sens. Actuat. B.,* 90: 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. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

SANTOS M. A.; GUIMARÃES M. Introdução ao Estudo das Ciências Ambientais - Ambiente da Águas – Rio de Janeiro. Unigranrio, 2003.

SANTOS, V. P. S. Desenvolvimento de um Método de Detecção de Ácido Benzóico em Refrescos a Base de Guaraná. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2012.

SCHROEDER, W. H. & MUNTHE, J. Atmospheric mercury – an overview. *Atmospheric Environment*, 32: 809–822, 1998.

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

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

SEMU, E., SINGH, B.R., SELMER-OLSEN A.R., Adsorption of mercury compounds by tropical soils II. Effect of soil: solution ratio, ionic strength, pH, and organic matter. *Water Air Soil Pollution*, 32: 1–10, 1987.

SFB, Sociedade Federativa Brasileira. Usina de Carvão, http://www.sfbbrasil.org/usina_carvao.htm. Acesso em 13 de maio de 2014.

SHUSTER, E. The behavior of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption process—a review of the literature. *Water Air Soil Pollution*, 56: 667– 80, 1991.

SILVA, L.M.C. Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de *Agaricus bisporus c*omo biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009.

SILVA, M. A. M.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Determination of noble metals in biological samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, following cloud point extraction. *Spectrochimica Acta Part B*, 56: 1941 – 1949, 2001.

SINGH J.; MITTAL S. K. *Chlorella sp.* based biosensor for selective determination of mercury in presence of silver ions. *Sensors and Actuators B: Chemical. School of Chemistry & Biochemistry,* Thapar University, Patiala, India. 165: 48-52, 2012.

ŠÍPKOVÁ, A.; SZÁKOVÁ, J.; COUFALÍK, P.; et al. Mercury distribution and mobility in contaminated soils from vicinity of waste incineration plant. Plant Soil Environ., 60 (2): 87–92, 2014.

SOLDATKIN, O. O.; KUCHERENKO, I. S.; PYESHKOVA, V. M.; KUKLA, A. L.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; EL'SKAYA, A. V.; DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal íons. *Bioelectrochemistry,* 83: 25-30, 2012.

SONG, N.; TENG, Y.; WANG, J.; LIU, Z.; ORNDORFF, W.; PAN, W-P. Effect of modified fly ash with hydrogen bromide on the adsorption efficiency of elemental mercury*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry,* 2014.

SOUZA, J. R. DE; BARBOSA, A. C. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Química Nova na Escola*, 12, 2000.

STEIN, E.D., COHEN, Y., WINER, A.M. Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Environmental Science and Technology*, 26: 1-43, 1996.

STEINEES, E. Mercury. In: Alloway BJ, editor. Heavy metals in soils. *London Blackie Academic & Professional*, 245– 59, 1995.

STERN, A. H. A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment. *Environmental Research,* 98: 133–142, 2005.

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.,* 63 (10): 4053-4060, 1997.

STILLMAN, J. M. Story of Alchemy and Early Chemistry. *Kessinger Publishing,* 7–9, 2003.

STINE, R., ROBINSON, J.T., SHEEHAN, P.E., TAMANAHA, C.R. *Advanced Materials*, 22: 5297-5300, 2010.

TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, S. A.; GRINBERB, P.; DE CAMPOS, R. C.A. Geração química de vapor em espectrometria atômica. *Química Nova,* 25: 1132-1144, 2002.

TANAKA, Y., ODA, S., YAMAGUCHI, H., KONDO, Y., KOJIMA, C., ONO, A. *Journal of the American Chemical Society* 129: 244-245, 2007.

TANG, L.A.L., WANG, J.Z., LOH, K.P. Journal of the American Chemical Society 132, 10976-10977, 2010 a.

TANG, Z.W., WU, H., CORT, J.R., BUCHKO, G.W., ZHANG, Y.Y., SHAO, Y.Y., AKSAY, I.A., LIU, J., LIN, Y.H. *Small* 6: 1205-1209, 2010b.

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

TEIXEIRA, D. C. Deposição do mercúrio através da serapilheira na Mata Atlântica, Parque Estadual da Pedra Branca, RJ. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Fluminense, 2008.

ULRICH, S. M.; TANTON, T. W.; ABDRASHITOVA, S. A. Mercury in the aquatic environmental a review of factors affeting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31: 241-293, 2001. USEPA. United States Environmental Protection Agency. Mercury and Arsenic Wastes. Noyes Data Corp.(ndc)., 1994.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Compilation of air pollutants emission factors: Stationary point and area sources*, USEPA: Washington, 1995.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. *Global Mercury Assessment.* USEPA: Washington, 2013.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Mercury *Study Report to Congress*, USEPA: Washington 1997.

VAISMAN, A. G.; LACERDA, L. D. Estimated Heavy Metal Emissions to the Atmosphere due to projected Changes in the Brazilian energy Generation Matrix". *Regional Environmental Change*, 3: 140-145, 2003.

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

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

VANHALA, P.T. & AHTIAINEN, J.H. Soil respiration, ATP content, and photobacterium toxicity test as indicators of metal pollution in soil. Environmental Toxicology and Water Quality, 9, 115–121, 1994.

VARGAS-BERNAL, R.; RODRÍGUEZ-MIRANDA, E.; HERRERA-PÉREZ, G. Evolution and Expectations of enzymatic biosensors for pesticides. In: Pesticides – Advances in Chemical and Botanical Pesticides, R.P. Soundararajan (Ed.), InTech, Rijeka, Croatia, p.339, 2012.

VASCONCELLOS, A. C. S. Avaliação da resistência bacteriana ao mercúrio através da quantificação da redução do Hg(II) ao estado elementar. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

VEIGA, M. A. M. S. Determinação de elementos traço por AAS e ICP-MS após extração no ponto nuvem, usanto dietil-ditiofosfato como agente quelante. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2000.

VIRTA, M.; KARP, M.; VUORINEN, P. Nitric oxide donor-mediated killing of bioluminescent *Escherichia coli.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38: 2775–2779, 1994.

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

VOLOTOVSKY, V.; KIM, N. EDTA determination by uréase-based inhibition biosensor, *Electroanalysis*, 10: 61-63, 1998.

VON SPERLING, M. V. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. IN: Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgostos, 1995.

WAKASA, Y. S. CONTAMINAÇÃO MERCURIAL EM SIRIS E CARANGUEJOS DA BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO, 2003.

WALVOORD, M. A.; ANDRASKI, B. J.; KRABBENHOFT, D. P.; STRIEGL, R. G. Transport of elemental mercury in the unsaturated zone from a waste disposal site in an arid region. *Appl. Geochem.,* 23: 572− 583, 2008.

WANG, J.; FENG, X.; ANDERSON, C. W. N.; XING, Y.; SHANG, L. Remediation of Mercury contaminated sites – a review, Journal of Hazardous Materials, 221-222:1-18, 2012.

WANG, K., RUAN, J., SONG, H., ZHANG, J.L, WO, Y., GUO, S.W., CUI, D.X. Nanoscale. *Research Letters* 6: 8, 2011.

WANG, Q.; KIM, D.; DIONYSIOU, D.D.; SORIAL, G.A.; TIMBERLAKE, D. Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems – A literature review. Environmental Pollution, 131: 323-336, 2004.

WARREN, L. A.; HAACK, E. A. Biogeochemical controls on metal behavior in freshwater environments. *Earth-Science Reviews*, 54: 261-320, 2001.

WASSERMAN, J.C.; FREITAS-PINTO, A.A.P.; AMOUROUX, D. Mercury Concentrations in Sediment Profiles of a Degraded Tropical Coastal Environment. *Environmental Technology* 21 (3): 297-305, 2000.

WHO. World Health Organization. *Environmental Health Criteria*. Gênova, 1989.

WHO. World Health Organization. Methylmercury. *Environmental Health Criteria*. Gênova, 1990.

WILHELM, S. M. Design Mercury Removal Systems for Liquid Hydrocarbons. *Hidrocarbon Processing*, April: 61-71, 1999.

WINDMÖLLER, C. C.; SANTOS, R. C.; ATHAYDE, M.; PALMIERI, H. E. L. Distribuição e especiação de mercúrio em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do quadrilátero ferrífero. *Química Nova,* 30 (5): 1088–1094, 2007.

YAGI, K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 73: 1251-1258, 2007.

YALLOUZ, A. V; CAMPOS, C. R.; LOUZADA, A. Níveis de mercúrio em atum sólido enlatado comercializado na cidade do Rio de Janeiro. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21: 11-14, 2001.

ZAGAR, D. Modelling of mercury transport and transformations in the water compartment of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* 107: 64-88, 2007.

ZENEBON, R. O. E.; DE MAIO, F. D.; SAKUMA, A. M. Determinação de mercúrio em águas sanitárias comercializadas em região do sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 28: 127-130, 1994.

ZHANG, H.; FENG, X.; LARSSEN, T.; QIU, G.; VOGT, R. D. In inland China, rice, rather than fish, is the major pathway for methylmercury exposure. *Environ. Health* Perspect. 118: 1183–1188, 2010.

ZHANG, Y.B., TAN, Y.W., STORMER, H.L., KIM, P. *Nature* 438: 201-204, 2005.

ZHAO, X., ZHANG, Q.H., CHEN, D.J., LU, P., *Macromolecules* 43: 2357-2363, 2010.

ZHENG, W.; FOUCHER, D.; HINTELMANN, H. Mercury isotope fractionation during volatilization of Hg(0) from solution into the gas phase. *J. Anal. At. Spectrom.*, 22: 1097−1104, 2007.

ZHYLYAK, G. A.; DZYADEVYCH, S.V.; KORPAN, Y.I.; SOLDATKIN, A.P.; EL'SKAYA A.V. Application of uréase conductometric biosensors for heavy-metal ion determination, *Sens. Actuators B,* 24 (25): 145-148, 1995.