



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Tecnologia**  
**Escola de Química**



# **Aplicação de biossensor microbiano na detecção de mercúrio em amostras de sedimento da Baía de Guanabara**

**Juliana Mercadante Santino de Oliveira**

**Fevereiro**  
**2015**

**Juliana Mercadante Santino de Oliveira**

**Aplicação de biossensor microbiano na detecção de mercúrio em  
amostras de sedimento da Baía de Guanabara**

Projeto Final de Graduação apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos.

Orientadoras:

Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc  
Gisele dos Santos Costa, MSc.

**Fevereiro  
2015**

# **Aplicação de biossensor microbiano na detecção de mercúrio em amostras de sedimento da Baía de Guanabara**

**Juliana Mercadante Santino de Oliveira**

Projeto Final de Graduação submetido ao Corpo Docente da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos.

Aprovado por:

---

Andrea Medeiros Salgado, D.Sc. – EQ/UFRJ  
(orientadora- presidente da banca)

---

Gisele dos Santos Costa, MSc.. – EQ/UFRJ  
(orientadora)

---

Claudinei Souza Guimarães, D.Sc. – EQ/UFRJ

---

Vânia Paula Salviano dos Santos, MSc. – EQ/UFRJ

---

Francisca das Chagas Sobral Silva Mihos, MSc. – EQ/UFRJ

**Fevereiro  
2015**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, meus irmãos, minha avó, pelo amor e incentivo em todos os momentos.

A todos os professores que tive durante a graduação pela contribuição em minha formação. Em especial, à professora e orientadora Andrea Medeiros Salgado, pela colaboração, orientação e apoio durante todo o trabalho.

À Gisele, pelo apoio, paciência, aprendizado e principalmente pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado Leandro, que compartilhou comigo este momento, por seu amor, dedicação, companheirismo e grande ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de graduação e do laboratório E-122 pela amizade e apoio ao longo dessa jornada.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

OLIVEIRA, Juliana Mercadante Santino de. **Aplicação de biossensor microbiano na detecção de mercúrio em amostras de sedimento da Baía de Guanabara**. Projeto Final de Graduação – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

A preocupação com a qualidade dos recursos naturais tem crescido à medida em que eles se tornam mais escassos para o consumo. Assim, o monitoramento de compostos tóxicos se faz necessário para avaliar o potencial de toxicidade que estes podem representar para os seres vivos, sendo uma questão de saúde pública. Neste contexto, encontra-se a Baía de Guanabara, um complexo estuarino que recebe efluentes industriais e domésticos não tratados, compostos por matéria orgânica, óleo e outros poluentes, como os metais pesados. A contaminação por metais pesados, particularmente o mercúrio, é um fator de grande relevância para a sociedade, uma vez que este metal apresenta toxicidade extremamente elevada, mesmo em baixas concentrações, devido ao seu potencial de bioacumulação e biomagnificação pelos organismos. Existem técnicas tradicionais para análise de mercúrio que quantificam sua concentração total. No entanto, a determinação do mercúrio biodisponível é de maior importância para a saúde da população, uma vez que a biodisponibilidade é o fator que determina se o poluente está disponível para os organismos. Os biossensores, ferramentas analíticas capazes de detectar seletivamente um analito em amostras complexas, surgem como a possibilidade de avaliar a biodisponibilidade destes poluentes. Assim, este trabalho foi elaborado com o intuito de fornecer uma técnica alternativa para análise de mercúrio em sedimento, levando-se em consideração a sua biodisponibilidade. Desse modo, foi utilizado um biossensor composto pela bactéria geneticamente modificada *Escherichia coli* MC1061, capaz de emitir luz na presença de mercúrio intracelular. As amostras analisadas por este método foram coletadas de quatro localidades distintas: Porto Rio, Porto Niterói, Rio Iguaçu e Rio Meriti. Os sedimentos foram lixiviados com HCl e com água da Baía de Guanabara. Os resultados revelaram que a amostra de Rio Meriti apresentou maior concentração de mercúrio biodisponível. Além disso, não foi observada diferença significativa entre os resultados das duas técnicas de lixiviação, com HCl e com água da Baía de Guanabara. Portanto, pode-se observar que este biossensor é aplicável para detecção de mercúrio biodisponível com a metodologia empregada.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Juliana Mercadante Santino de. **Use of microbial biosensor for detection of mercury in sediment samples from Guanabara Bay.** Final Graduation Project – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

The concern regarding the quality of natural resources has grown as they become more scarce for consumption. Thus, it is necessary to monitor toxic compounds to evaluate the potential toxicity they can represent to living creatures, since it is a matter of public health. In this context, Guanabara Bay is a estuarine complex that receives industrial and domestic untreated effluents, consisting of organic matter, oil and other pollutants, like heavy metals. The heavy metal contamination, particularly by mercury, is a factor of great relevance for the society, since this metal has extremely high toxicity even in low concentrations, due to its potential for bioaccumulation and biomagnification by organisms. There are traditional techniques to analyze mercury that quantify the total concentration. However, the determination of bioavailable mercury is of higher significance to the health of population, since bioavailability is the factor that determines whether the pollutant is available to organisms. Biosensors, analytical tools capable of selectively detect an analyte in complex samples, were born as a possibility to evaluate the bioavailability of the pollutants. This study was elaborated with the aim of providing an alternative technique for mercury analysis of sediment considering the bioavailability. Thus, a biosensor was used, consisting of genetically engineered bacteria *Escherichia coli* MC1061, which is capable of emitting light in the presence of intracellular mercury. The samples analyzed by this method were collected from four distinct locations: Porto Rio, Porto Niterói, Rio Iguaçu and Rio Meriti. The sediments were lixiviated with HCl and with water of Guanabara Bay. The results revealed that Rio Meriti was the sample that presented the highest concentration of bioavailable mercury. In addition, there was no significant difference between the results of the two techniques of lixiviation with HCl and water of Guanabara Bay. Therefore, this biosensor is applicable for detection of mercury bioavailability with the methodology used.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Métodos usados na Quantificação de Mercúrio (Adaptado de Miraconi et al., 2000) .....	11
Tabela 3.2: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta .....	18
Tabela 4.1: Composição dos meios LB Broth e LB Ágar (Adaptado de Costa, 2010).....	22
Tabela 4.2: Composição do meio M9 (Adaptado de Costa, 2010) .....	22
Tabela 4.3: Composição das soluções para crescimento microbiano (Adaptado de Costa, 2010).....	23
Tabela 4.4: Meios de Cultura utilizados no crescimento prévio e no preparo da célula no dia do experimento.....	23
Tabela 5.1: Diluições da suspensão celular para obtenção da curva de peso seco.....	31
Tabela 5.2: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de calibração das soluções sintéticas de mercúrio em água deionizada.....	32
Tabela 5.3: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Rio lixiviada com HCl 1M .....	33
Tabela 5.4: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Niterói lixiviada com HCl 1M .....	34
Tabela 5.5: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Iguaçu lixiviada com HCl 1M.....	34
Tabela 5.6: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Meriti lixiviada com HCl 1M .....	35
Tabela 5.7: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Rio lixiviada com água da Baía de Guanabara.....	37
Tabela 5.8: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Niterói lixiviada com água da Baía de Guanabara .....	37
Tabela 5.9: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Iguaçu lixiviada com água da Baía de Guanabara .....	38
Tabela 5.10: Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Meriti lixiviada com água da Baía de Guanabara .....	38
Tabela 5.11: Equações das curvas de adição padrão para as amostras após lixiviação com HCl 1M ..	42
Tabela 5.12: Equações das curvas de adição padrão para as amostras após lixiviação com água da Baía de Guanabara.....	42
Tabela 5.13: Concentração de mercúrio biodisponível ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de sedimento) para a lixiviação das amostras com HCl 1M e com água da Baía de Guanabara .....	43

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Lista de Figuras

Figura 3.1: Esquema simplificado do ciclo do mercúrio em ambientes naturais (Teixeira, 2008) .....	9
Figura 3.2: Esquema geral de um biossensor (Adaptado de: Bernal et al., 2012) .....	12
Figura 3.3: Distribuição granulométrica dos sedimentos da Baía de Guanabara (Oliveira, 2009) .....	16
Figura 3.4: Ponto de coleta da amostra Porto Rio .....	19
Figura 3.5: Ponto de coleta da amostra Porto Niterói .....	20
Figura 3.6: Ponto de coleta da amostra Rio Iguaçu .....	20
Figura 3.7: Ponto de coleta da amostra Rio Meriti .....	21
Figura 4.1: Esquema de preparo das células para os ensaios luminométricos (Adaptado de Costa, 2010) .....	25
Figura 4.2: Lixiviação das quatro amostras de sedimento em duplicata .....	26
Figura 4.3: Esquema de preparo de soluções das amostras após a lixiviação .....	27
Figura 4.4: Desenho experimental da placa de 96 poços para o ensaio de bioluminescência .....	29
Figura 5.1: Correlação entre Absorvância a 600 nm e Concentração Celular [g/l] .....	31
Figura 5.2: Gráfico da curva de calibração das soluções sintéticas de mercúrio em água deionizada ..	32
Figura 5.3: Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Porto Rio e Porto Niterói lixiviadas com HCl 1M .....	36
Figura 5.4: Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Rio Iguaçu e Rio Meriti lixiviadas com HCl 1M .....	36
Figura 5.5: : Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Porto Rio e Porto Niterói lixiviadas com água da Baía de Guanabara .....	39
Figura 5.6: Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Rio Iguaçu e Rio Meriti lixiviadas com água da Baía de Guanabara .....	39

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATSDR – Agency for Toxic Substance and Disease Registry

CCME – Canadian Council of Ministers of the Environment

COD – Carbono orgânico dissolvido

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

CV – Coeficiente de Variação

DO<sub>600</sub> – Densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm

DPC – Diretoria de Portos e Costas

EMGEPRON – Empresa Gerencial de Projetos Navais

JICA – Japan International Cooperation Agency

MeHg – Metilmercúrio

pH – Potencial Hidrogeniônico

URL – Unidades Relativas de Luz

WHO – World Health Organization

## Sumário

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1	FORMAS E FONTES DE MERCÚRIO.....	5
3.2	MERCÚRIO EM SISTEMAS AQUÁTICOS E SOLOS.....	6
3.3	CICLO BIOGEOQUÍMICO DO MERCÚRIO.....	7
3.4	TOXICIDADE .....	9
3.5	MÉTODOS TRADICIONAIS DE ANÁLISE DE MERCÚRIO.....	10
3.6	BIOSSENSORES .....	12
	<b>3.6.1 Biossensores Microbianos .....</b>	<b>13</b>
	3.6.1.1 Biossensor Microbiano com <i>Escherichia coli</i> MC1061 como componente biológico.....	14
3.7	AMOSTRAS DE SEDIMENTO DA BAÍA DE GUANABARA.....	14
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
4.1	EQUIPAMENTOS E REAGENTES .....	18
	<b>4.1.1 Descontaminação Química dos Materiais.....</b>	<b>18</b>
	<b>4.1.2 Luminômetro como elemento de transdução.....</b>	<b>18</b>
4.2	PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS.....	19
4.3	BIOSSENSOR MICROBIANO COM <i>Escherichia coli</i> MC1061.....	21
	<b>4.3.1 Preparo de meios e soluções.....</b>	<b>21</b>
	4.3.1.1 Meios LB Broth e LB Ágar .....	21
	4.3.1.2 Meio M9 e soluções para crescimento celular .....	21
	4.3.1.3 Solução tampão de citrato 100 mM e Solução de luciferina 1mM.....	23
	<b>4.3.2 Crescimento e peso seco do microrganismo <i>Escherichia coli</i> MC1061 .....</b>	<b>24</b>
	<b>4.3.3 Preparo das células .....</b>	<b>24</b>
4.3	LIXIVIAÇÃO .....	25
4.4	CURVA DE CALIBRAÇÃO E CURVAS DE ADIÇÃO PADRÃO .....	27
	<b>4.4.1 Preparo das soluções sintéticas de mercúrio .....</b>	<b>28</b>
4.5	EXPERIMENTOS DE BIOLUMINESCÊNCIA.....	28
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
5.1	CURVA DE PESO SECO.....	30
5.2	CURVA DE CALIBRAÇÃO EM ÁGUA DEIONIZADA E CURVAS DE ADIÇÃO PADRÃO NA AMOSTRA .....	31
	<b>5.2.1 Curva de calibração em água deionizada .....</b>	<b>31</b>

<b>5.2.2 Curva de adição padrão nas amostras.....</b>	<b>33</b>
5.2.1.1 Lixiviação com HCl.....	33
5.2.1.2 Lixiviação com Água da Baía de Guanabara.....	37
5.3 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO BIODISPONÍVEL .....	40
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por melhorias na qualidade de vida tem proporcionado grandes avanços para sociedade, especialmente na área tecnológica. Por outro lado, a influência crescente do homem sobre o ambiente também tem gerado diversos impactos na natureza.

A emissão de efluentes industriais e urbanos é um assunto de grande preocupação devido aos seus efeitos para os ecossistemas e, conseqüentemente, para o homem. O aumento das atividades industriais, agrícolas e mineradoras, assim como o crescimento populacional, acarreta em uma maior introdução de contaminantes no ambiente. Esses poluentes podem ser liberados para atmosfera, solos, sedimentos e sistemas aquáticos na forma de, por exemplo, matéria orgânica, poluentes orgânicos e um grande número de compostos metálicos (Boening, 2000).

Os metais estão presentes naturalmente no ambiente. Quanto à sua origem, podem ser classificados em dois grupos: os litogênicos, quando provenientes de fontes geológicas, dependendo do grau de intemperização e do material de origem do solo, ou antropogênicos, quando inseridos na natureza pelo homem (Costa et al., 2004).

Alguns metais possuem um papel fundamental no metabolismo dos seres vivos, sendo considerados nutrientes essenciais. Ferro, cálcio, cobalto, zinco, sódio, potássio, por exemplo, são necessários em reações bioquímicas do corpo humano, plantas, animais e microrganismos (Bruins et al., 2000). Além disso, metais essenciais também podem fazer parte de parede celular de bactérias e atuar na manutenção do equilíbrio osmótico (Hughes & Pool, 1989; Pool & Gadd, 1989). Entretanto, quando em altas concentrações, a maioria dos metais tem efeito tóxico para os organismos vivos (Bontidean et al., 2004).

As plantas podem absorver os metais através de suas raízes, sendo alguns desses elementos essenciais aos processos fisiológicos dos vegetais. Porém, plantas que estão em ambientes contaminados podem acumular metais em altas concentrações, representando um grave risco à saúde do homem e dos animais, quando inseridas na cadeia trófica (Accioly & Siqueira, 2000).

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 em um desequilíbrio nos seus ecossistemas (Dias-Junior et al., 1998).

Neste contexto está a Baía de Guanabara, um complexo estuarino para vários rios e canais que cercam as cidades do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, São Gonçalo, Niterói e outras cidades menores. Essa região apresenta uma longa história de contaminação por matéria orgânica, óleo e um grande número de outros compostos, incluindo 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  $2,2 \times 10^9 \text{ m}^3$  (JICA, 1994).

Nos últimos anos, a despoluição da Baía de Guanabara foi beneficiada por projetos que tiveram como motivação as competições de vela que ocorrerão nos Jogos Olímpicos de 2016. Apesar de não ser possível despoluí-la até lá, esse estímulo promoveu algumas 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 da Pavuna e São Gonçalo, a criação do sistema de coleta e tratamento de esgoto de Alcântara e o programa Sena Limpa. (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).

Desde o início do século XIX, ocorrem modificações na bacia de drenagem da Baía de Guanabara. Como consequências, a renovação e a qualidade das águas têm sido prejudicadas, o que leva à uma elevada taxa de sedimentação, altas concentrações de metais tóxicos e hidrocarbonetos nos sedimentos e alterações nos seres aquáticos. Outra consequência da poluição da Baía é o processo de eutrofização, causado por elevadas concentrações de

nutrientes. A eutrofização altera a qualidade da água, através da redução de oxigênio dissolvido, devido à intensa produção biológica. A baixa oferta de oxigênio acarreta em mortes de peixes e na perda da biodiversidade aquática (Godoy et al., 1998; Branco, 2007).

Dentre os metais pesados, o mercúrio é considerado um dos mais perigosos para a saúde, por apresentar elevada toxicidade mesmo em baixas concentrações e devido ao seu potencial de bioacumulação e biomagnificação (Singh & Mittal, 2012).

Os métodos tradicionais de detecção de mercúrio permitem a quantificação total do metal. Neste trabalho, a adoção de uma abordagem alternativa teve como função fornecer dados específicos, contemplando somente o mercúrio disponível para os componentes biológicos, ou seja, que será efetivamente assimilado por estes sistemas. A motivação para este estudo reside no fato de que a biodisponibilidade é um fator essencial no estudo e na caracterização do potencial tóxico que o metal pesado pode apresentar.

Neste trabalho, empregou-se um biossensor luminescente, para detecção de mercúrio em amostras de sedimento da Baía de Guanabara, uma vez que a metodologia que havia sido desenvolvida anteriormente para este biossensor contemplava somente ensaios com amostras aquosas. Barocas (2004) desenvolveu o biossensor, utilizando como componente biológico uma bactéria geneticamente modificada *Escherichia coli* MC1061 (Virta et al., 1995), capaz de detectar mercúrio biodisponível através da reação da enzima luciferase do vagalume (*Firefly luciferase*), e um luminômetro como transdutor.

## 2. OBJETIVOS

Objetivo geral deste trabalho:

- Avaliar a possibilidade de aplicação de um biossensor luminescente, composto pelo microrganismo *Escherichia coli* MC1061 (Virta et al., 1995) em análises para detecção de mercúrio em amostras de sedimento da Baía de Guanabara. Para isso, foi necessário estabelecer uma técnica capaz de lixiviar o mercúrio das amostras.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Elaboração de uma curva de calibração em água deionizada e de uma curva de adição padrão nas amostras.
- Estabelecimento de uma técnica capaz de lixiviar o mercúrio das amostras.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FORMAS E FONTES DE MERCÚRIO

Apesar de estar presente naturalmente na crosta terrestre, na água, na biota e na atmosfera, o mercúrio é um dos poluentes mais perigosos para a vida. Este metal pode se alojar em diversos compartimentos ambientais, sendo o cinábrio ( $\text{HgS}$ ) e o mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) suas formas mais abundantes. O mercúrio possui três estados de oxidação (0, +1 e +2). Suas formas químicas são classificadas em inorgânicas e orgânicas. As formas inorgânicas dependem das condições redox e se apresentam sob 3 diferentes estados: mercúrio elementar ou metálico ( $\text{Hg}^0$ ), principalmente na forma de vapor, íon mercurioso  $\text{Hg}_2^{2+}$ , pouco estável na natureza e o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ), que é a principal forma dissolvida (como  $\text{HgCl}_2$  e  $\text{HgS}$ ), nos sistemas aquáticos. As formas orgânicas ocorrem quando o mercúrio se liga covalentemente a um radical de carbono, sendo as mais comuns o metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) e o dimetilmercúrio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) (Horvat, 1996; Palmieri et al., 2005; Costa, 2010).

Segundo Wang e colaboradores (2004), as fontes de mercúrio podem ser naturais, antrópicas e de reemissão. A principal fonte de mercúrio é através de emissões gasosas, que podem ter origem natural ou antrópica. As fontes naturais de mercúrio mais importantes são as emissões de vulcões, 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, uma vez que o mercúrio se apresenta como impureza nessas fontes de energia, aterros sanitários, os quais contêm uma infinidade de resíduos contendo mercúrio, e atividades industriais, agrícolas e mineradoras. 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). Já a remissão de mercúrio ocorre através de uma remobilização do mercúrio de atividades antropogênicas anteriores, que estava acumulado ou depositado em compartimentos ambientais (Nriagu & Becker, 2003; Loppi, 2001).

### 3.2 MERCÚRIO EM SISTEMAS AQUÁTICOS E SOLOS

Em sistemas aquáticos, a especiação de mercúrio depende das interações com outros elementos (possibilidade de complexação), solubilidade, pH, temperatura, potencial redox, sorção e dessorção. Esses parâmetros influenciam na rota de transformação que o mercúrio pode seguir (Stein et al., 1996). A forma mais volátil é  $\text{Hg}^0$ , sendo que o dimetilmercúrio também pode volatilizar. Sua volatilidade explica a sua baixa concentração em águas não poluídas (Horvat, 1996).

A acidez de alguns corpos aquáticos facilita a formação de complexos solúveis ( $\text{HgCl}_2$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}$ ) enquanto ambientes alcalinos favorecem a formação de complexos voláteis ( $\text{Hg}^0$  e  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) (Stein et al., 1996).

Assim como ocorre em ambientes aquáticos, são as características do solo que determinam a especiação e as rotas de transformação química que o mercúrio elementar pode seguir. Dentre elas estão a quantidade de matéria 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 do solo, influenciam na distribuição e no transporte de mercúrio através de perfis de solo (Semu et al., 1987).

A composição da solução do solo, como pH e a concentração de espécies com as quais o mercúrio pode formar complexos, como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$   $\text{NO}_3^-$  influenciam na predominância da espécie química de mercúrio, sendo dominantes os complexos formados com  $\text{Cl}^-$  e  $\text{OH}^-$  (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).

O mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) e o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) são geralmente encontrados em solos.  $\text{Hg}^{2+}$  apresenta uma alta propensão a formar complexos e é difícil de ser encontrado puro no solo, visto que há uma gama de agentes complexantes em sua matriz. Assim, o mercúrio pode se ligar a minerais do solo ou se adsorver a sólidos inorgânicos ou à matéria orgânica, como por exemplo, ácidos húmicos e fúlvicos (Steinnes, 1995).

Após o  $\text{Hg}^0$  entrar no solo, parte dele pode ser volatilizada e outra parte pode redistribuída pela matriz, podendo ser incorporada na solução do solo. Além disso, pode sofrer transformações químicas e biológicas. (Schuster, 1991; Hogg et al., 1978).

Experimentos de Anderson (1979) demonstraram 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 ferro do que entre mercúrio e matéria orgânica.

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).

Os hidrocarbonetos presentes no solo interagem com o mercúrio de forma semelhante à interação deste com matéria orgânica. Isso ocorre pois os hidrocarbonetos possuem sítios ativos contendo enxofre, os quais apresentam alta afinidade ao mercúrio (CCME, 1997, *apud* Renneberg & Dudas, 2001).

### 3.3 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO MERCÚRIO

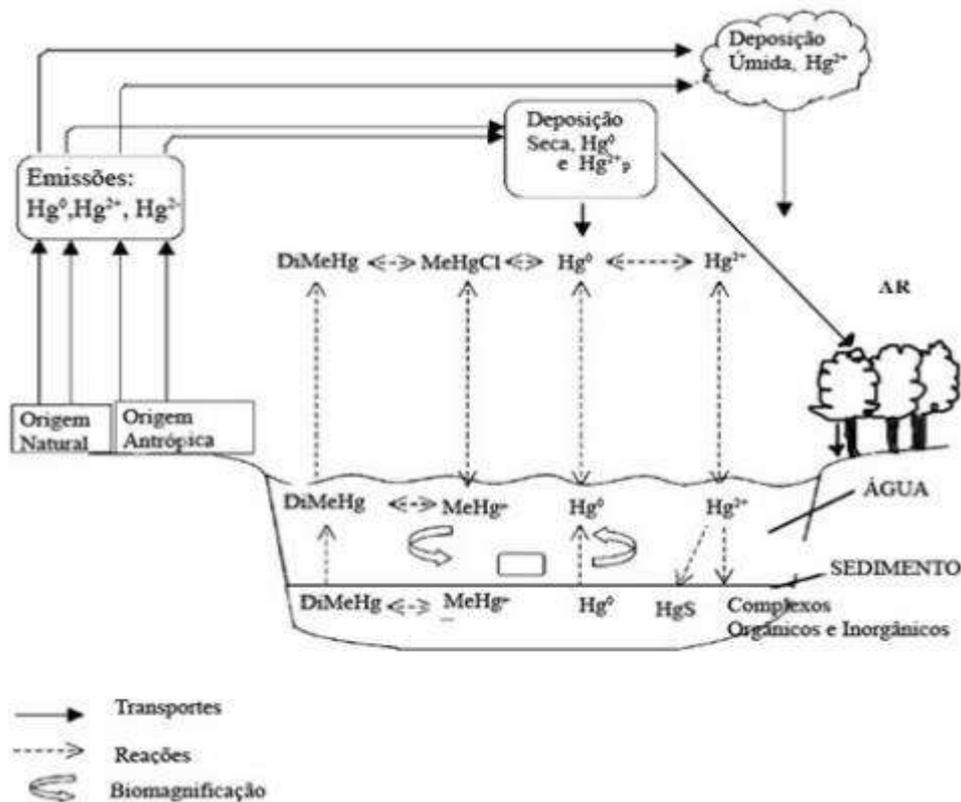
O estudo do comportamento do mercúrio na natureza requer uma análise global do ciclo biogeoquímico (FIGURA 3.1) de forma a permitir uma visão integrada das diversas rotas que este metal pode seguir no ambiente (Bisinoti & Jardim, 2004). Assim, pode-se observar a conversão entre as espécies químicas e o seu fluxo entre o ar, a água, o sedimento, o solo e a biota.

O longo tempo de residência na atmosfera e a mobilidade do mercúrio são alguns dos fatores que o tornam um dos poluentes mais perigosos. O  $Hg^0$  é a principal espécie emitida para a atmosfera, através de fonte biogênica ou antrópica. Devido à sua alta estabilidade, pode ficar retido por meses ou anos, o que possibilita o seu transporte por longas distâncias antes de uma possível redeposição em outro compartimento (Schroeder & Munthe, 1998; Dastoor & Larocque, 2004). Já o íon mercúrico ( $Hg^{2+}$ ) é mais abundante em sedimentos, solo e água, devido à sua solubilidade em água e baixa volatilização (Bisinoti, 2005; Environment Canadá, 2007).

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). Uma vez na superfície terrestre, o mercúrio pode se complexar com outros elementos ou retornar à atmosfera, através de volatilização na forma de mercúrio metálico, metilmercúrio ou dimetilmercúrio. Esta volatilização pode ocorrer a partir do solo, água e vegetação (Fostier et al., 2000).

A emissão de mercúrio do solo para a hidrosfera ocorre através de erosão e lixiviação (Fostier et al., 2000). Além de promover a lixiviação do solo, as chuvas realizam uma lavagem da vegetação, transportando o metal para os corpos d'água (Stein et al., 1996).

A deposição do mercúrio na forma insolúvel (HgS) é responsável pelo estoque deste elemento no fundo dos oceanos, podendo sofrer redissolução apesar de sua baixa solubilidade. Esses sedimentos atuam como substrato para as reações de metilação, que podem ocorrer por via biológica ou química (Azevedo, 2003; Bisinoti & Jardim, 2004; Costa, 2010). A metilação biológica é mediada por bactérias redutoras de sulfato e é favorecida por condições como anoxia, pH ácido, elevadas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) e de matéria orgânica. As BRS também podem participar da desmetilação do mercúrio, na qual o metilmercúrio (MeHg) atua como substrato de carbono (WHO, 1990; Oremland et al., 1991; Bisinoti & Jardim, 2004). A importância do estudo das reações de metilação/desmetilação deve-se ao fato de o MeHg ser a espécie predominante na biota (Bloom, 1992).



**Figura 3.1:** Esquema simplificado do ciclo do mercúrio em ambientes naturais (Teixeira, 2008)

### 3.4 TOXICIDADE

A toxicidade do mercúrio depende de sua espécie química e de sua capacidade de interagir com componentes biológicos. Portanto, o estabelecimento de um método de remediação adequado depende do estudo da especiação e da biodisponibilidade do mercúrio no solo. (Leemarks et al., 2005; Wang et al., 2012).

Geralmente, solos com uma alta concentração de mercúrio biodisponível demandam técnicas de remediação, como lavagem de solo, fitoextração e métodos de eletro-remediação. Quando a biodisponibilidade é baixa, deve-se primeiramente aumentá-la para facilitar a remediação (Wang et al., 2012).

Os compostos organomercuriais, como por exemplo o MeHg, são a forma mais tóxica, devido à sua facilidade de atravessar a matriz lipídica da membrana celular. Assim, sua lipossolubilidade favorece a absorção pela pele (ATSDR, 1999). Após absorvido pelo corpo humano, o MeHg representa uma ameaça para os sistemas cardiovascular e nervoso (Stern,

2005; Hogberg et al., 2005), e apresenta um tempo de meia-vida de 44 a 80 dias (Neathery & Miller, 1975). Sua excreção pode ocorrer através de fezes, urina e leite materno.

O grande interesse da comunidade científica no estudo da ecotoxicidade do MeHg está relacionado à sua capacidade de bioacumulação e biomagnificação (Galvão & Corey, 1987). O mercúrio inorgânico, abundantemente presentes nos sistemas aquáticos, pode ser biotransformado em MeHg, o qual pode ser ingerido e acumulado em organismos aquáticos (Boening, 2000; Barbosa et al., 2003; Bisinoti & Jardim, 2003). A acidez dos corpos aquáticos e elevadas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) favorece a metilação e acumulação do mercúrio em peixes (Gilmour & Henry, 1991; Porcella, 1994). Isso representa um risco para comunidades que vivem em locais de contaminação por mercúrio que consomem peixes em grande quantidade (Harada, 1995; Harada et al., 2001). Além disso, a agricultura também é afetada. Por exemplo, plantações de arroz perto de áreas de mineração de mercúrio podem ter seus solos contaminados e então, o arroz vai acumular MeHg (Zhang et al., 2010). Estudos realizados anteriormente revelam um aumento na concentração de MeHg ao longo da coluna d'água (Porcella, 1994). Logo, espera-se uma concentração maior de MeHg próximo ao sedimento de fundo.

A resolução CONAMA N° 357/2005 estabelece que a concentração máxima de mercúrio total permitida em água salina é de 0,0002 mg/L.

### 3.5 MÉTODOS TRADICIONAIS DE ANÁLISE DE MERCÚRIO

Os métodos tradicionais empregados em análise de mercúrio são baseados na quantificação total do metal. Alguns exemplos são listados na TABELA 3.1.

**Tabela 3.1:** Métodos usados na Quantificação de Mercúrio (Adaptado de Miraconi et al., 2000)

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

Essas técnicas possuem exatidapresentam algumas desvantagens, como necessidade de pré-tratamento da amostra, altos custos com instrumentação e dificuldade de serem empregadas em medições no campo de pesquisa. Além disso, não permitem a determinação do mercúrio biodisponível, que é de maior importância para a saúde da população, uma vez que a biodisponibilidade é o fator que determina se o poluente está disponível para os organismos (Bontidean et al., 2004). O mercúrio biodisponível,  $Hg^{+2}$ , é o substrato para a reação de metilação, que gera o MeHg, forma que é acumulada e biomagnificada ao longo da cadeia trófica (Bisinoti & Jardim, 2004). A distinção entre mercúrio biodisponível e não biodisponível é ainda mais relevante em análises de solo e sedimento devido à capacidade de adsorção dos metais na fase sólida (Vanhala & Ahtiainen, 1994).

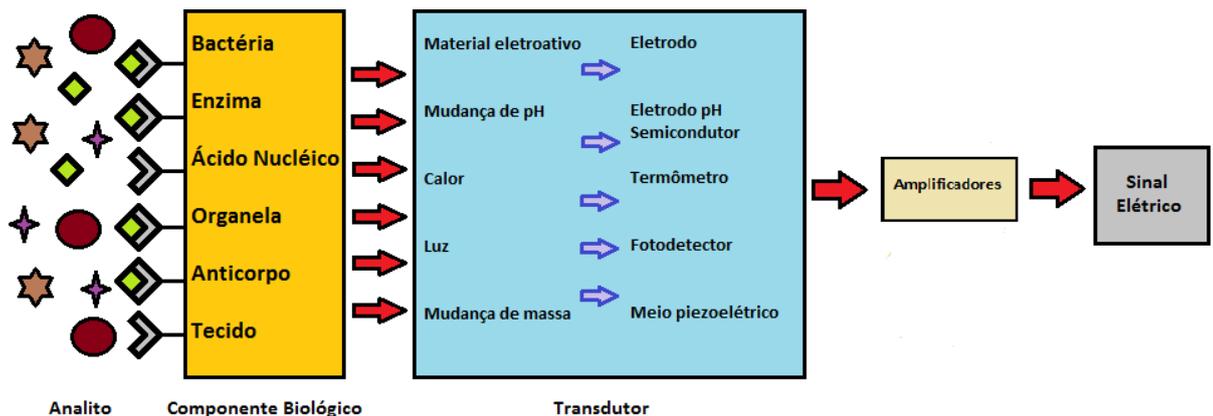
Com uma abordagem alternativa, surgiram os biossensores como um complemento aos métodos tradicionais, já que foram capazes de gerar uma resposta baseada na biodisponibilidade

do analito (Selifonova et al., 1993). Uma comparação entre os dados fornecidos pelo biossensor e os dados obtidos por algum método tradicional permite uma avaliação mais eficiente do potencial risco do poluente no ambiente em estudo.

### 3.6 BIOSSENSORES

Os sensores biológicos são dispositivos constituídos por algum elemento de reconhecimento biológico que está em contato direto com um transdutor de modo a medir seletivamente determinado analito. Dentre os compostos adequados para a construção do biossensor estão microrganismos, enzimas, cofatores, anticorpos, proteínas, tecidos de plantas e animais e organelas (Costa, 2010).

A interação do componente biológico com a substância de interesse ocorre através de uma reação química, a qual gera um sinal que pode ser caracterizado, por exemplo, por uma mudança de voltagem, medidas de absorvância, emissão de fluorescência ou luminescência, variações de massa, entre outros. O elemento de transdução converte a resposta química recebida em um sinal elétrico, proporcional à concentração de analito, que poderá ser quantificado e processado (Salgado, 2001; Costa, 2010).



**Figura 3.2:** Esquema geral de um biossensor (Adaptado de Bernal et al., 2012)

A grande vantagem do biossensor está na especificidade e seletividade do biocomposto ativo em relação ao analito de interesse. Além disso, a seleção do material biológico e do transdutor envolve uma série de fatores, como (Rosatto, 2000, Arya et al., 2008; Salgado, 2001):

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

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o receptor biológico que o proporciona a resposta seletiva, com destaque para os biossensores microbianos, enzimáticos, imunossensores e quimiorreceptores (Costa, 2010).

### **3.6.1 Biossensores Microbianos**

Os sensores microbianos se baseiam no metabolismo de organismos vivos, como bactérias, leveduras e fungos, para medir seletivamente algum analito.

Essa configuração, baseada no uso do microrganismo como um todo, possui algumas vantagens em relação aos sensores que utilizam componentes biológicos isolados, como enzimas purificadas. Dentre elas, estão a menor sensibilidade à inibição por outros compostos, maior tolerância às variações de pH e temperatura, maior tempo de vida útil e menor custo (Yagi, 2007). Entretanto, os sensores microbianos possuem, geralmente, um tempo de resposta maior do que os enzimáticos, além de apresentarem menor seletividade, devido ao grande número de enzimas e processos metabólicos em um microrganismo (Costa, 2010).

A tecnologia de DNA recombinante serve como ferramenta para o projeto dos biossensores bacterianos. O microrganismo pode ser geneticamente modificado a fim de aumentar a sensibilidade de seu sistema sinalizador na presença da substância de interesse. Para isso, utiliza-se genes sinalizadores, preferencialmente aqueles que codificam proteínas facilmente detectáveis. O promotor que controla a expressão do gene inserido é induzido apenas na presença intracelular do analito desejado. Assim, o promotor pode ativar a expressão do gene para que ocorra a síntese das proteínas codificadas por este gene, o que possibilita a quantificação do analito (Lee et al., 1992; Rasmussen et al., 1999; Nivens et al. 2004; Costa, 2010). A maioria dos sistemas regulatórios utilizados em biossensores para detecção de metal

pesado são provenientes de bactérias resistentes a esses elementos tóxicos (Ivask et al., 2002). Singh & Mittal (2012) utilizaram um biossensor com imobilização de *Chlorella* sp. para determinação de mercúrio na presença de íons de prata.

Diversos experimentos de toxicidade empregaram bactérias luminescentes geneticamente modificadas, como Rychert & Mortimer (1991), Virta et al. (1994), Lampinen et al. (1995) e Paton et al. (1995). Alguns dos genes repórteres utilizados nos sensores luminescentes codificam as luciferases procariotas (*lux*) e as luciferases eucariotas (*luc*) (Costa, 2010). Para análises de mercúrio, foram construídos sensores biológicos baseados em bactérias recombinantes com especificidade ao mercúrio inorgânico (Selifonova et al., 1993; Virta et al., 1995) e ao mercúrio orgânico (Ivask et al., 2001).

#### 3.6.1.1 Biossensor Microbiano com *Escherichia coli* MC1061 como componente biológico

O componente biológico adotado no biossensor do presente trabalho foi o microrganismo recombinante *Escherichia coli* MC1061, desenvolvido por pesquisadores finlandeses da University of Turku, (Virta et al., 1995). Através da tecnologia de DNA recombinante, foi inserido nesta bactéria o gene *luc* da luciferase do vagalume (firefly) para torná-la capaz de apresentar uma resposta luminescente na presença  $Hg^{+2}$  intracelular. Desse modo, o mercúrio induz o promotor *mer* (*mer* + R + gene promotor), que controla o gene repórter. A luz produzida pela reação enzimática da luciferase, que tem a luciferina como substrato, é quantificada durante um determinado período de tempo (Ford & Leach, 1998). A resistência da *E.coli* MC1061 ao mercúrio ocorre devido à presença do operon de resistência ao mercúrio, o operon-*mer*. Além disso, possui outros dois genes, que conferem resistência aos antibióticos canamicina e cloranfenicol (Barrocas, 2004; Costa, 2010).

### 3.7 AMOSTRAS DE SEDIMENTO DA BAÍA DE GUANABARA

A Baía de Guanabara é constituída por um dos mais importantes ecossistemas costeiros produtivos, localizada no Rio de Janeiro. Seu território abrange diversos municípios e recebe o aporte de mais de cinquenta rios, como Meriti, Iguaçú, Guapiaçu, Guapimirim, Magé, Estrela, Saracuruna, entre outros. Conseqüentemente, a Baía recebe grandes volumes de efluentes

domésticos e industriais e carece em um tratamento adequado de esgotos sanitários (Kehrig et al., 2011; Amador, 2012).

A poluição da Baía de Guanabara tem como principais fontes as indústrias presentes ao seu redor, os estaleiros, os portos comerciais, algumas refinarias de petróleo, além de outras atividades. Os impactos desta poluição causam alterações nos ecossistemas aquáticos das áreas estuarinas, como mudanças na qualidade da água e nas velocidades e no padrão de sedimentação (Lima, 2006; Costa, 2010).

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, lama síltica e argila (FIGURA 3.3) 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 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, Iguçu, Sarapuí, Estrela e Irajá) e às atividades de uma refinaria de petróleo na região (De Luca Rebello et al., 1986 *apud* Oliveira, 2009; 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 à 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 atribuídos 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, próximo à entrada, 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. Barbosa e colaboradores (2004) encontraram valores de concentração variando entre 1,0 e 2,  $\mu\text{g/g}$  de sedimento seco no Canal do Fundão. Godoy e colaboradores (1998) relataram uma variação de 0,4 a 11,1  $\mu\text{g/g}$  de sedimento seco na Desembocadura Rio Estrela. Já De Luca Rebello e seus colaboradores (1986) *apud* Oliveira (2009) relataram concentrações entre 0,07 e 9,8  $\mu\text{g/g}$  de sedimento seco na Baía de Guanabara.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Durante a elaboração deste trabalho foram empregados os seguintes 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
- Centrífuga (QUIMIS)
- Luminômetro (Labsystems)

Os reagentes utilizados (HCl PA, HNO<sub>3</sub> PA, Luciferina (sal de sódio), MgSO<sub>4</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, glicose, casamino ácidos, canamicina) foram adquiridos da VETEC e SIGMA de grau PA.

#### 4.1.1 Descontaminação Química dos Materiais

Todos os materiais utilizados na execução deste trabalho foram descontaminados com lavagem em HCl 3M por dois dias e depois, receberam um banho em HCl 0,5M por dois dias. Após isso, foram lavados com água deionizada.

#### 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. Suas medidas são fornecidas em unidades relativas de luz (URL) e são proporcionais à concentração do analito. Seu limite de detecção permite detectar até mesmo pequenas concentrações de analito. O equipamento possui uma bandeja para abrigar uma placa de 96 poços, nos quais são condicionadas as amostras. Cada poço da placa emite uma determinada quantidade de luz, que é refletida de forma a atravessar um filtro de emissão, para atingir o tubo fotomultiplicador. Além disso, o equipamento foi formulado de modo a evitar a interferência entre captação de luz de poços vizinhos (Costa, 2010).

#### 4.2 PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS

No presente estudo, foram utilizados quatro sedimentos, gentilmente cedido pelo Laboratório de Geoquímica Ambiental da Universidade Federal Fluminense. As amostras são provenientes das seguintes localidades: Porto Rio, Porto Niterói, Rio Iguaçu e Rio Meriti. Não foram obtidas informações sobre a composição dos sedimentos, textura, mineralogia, concentração de espécies, como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$   $\text{NO}_3$ , para verificar sua influência na biodisponibilidade do mercúrio.

A tabela 3.2 e as figuras 3.4 a 3.7 são referentes aos dados geográficos dos locais de amostragem.

**Tabela 3.2:** Coordenadas geográficas dos pontos de coleta

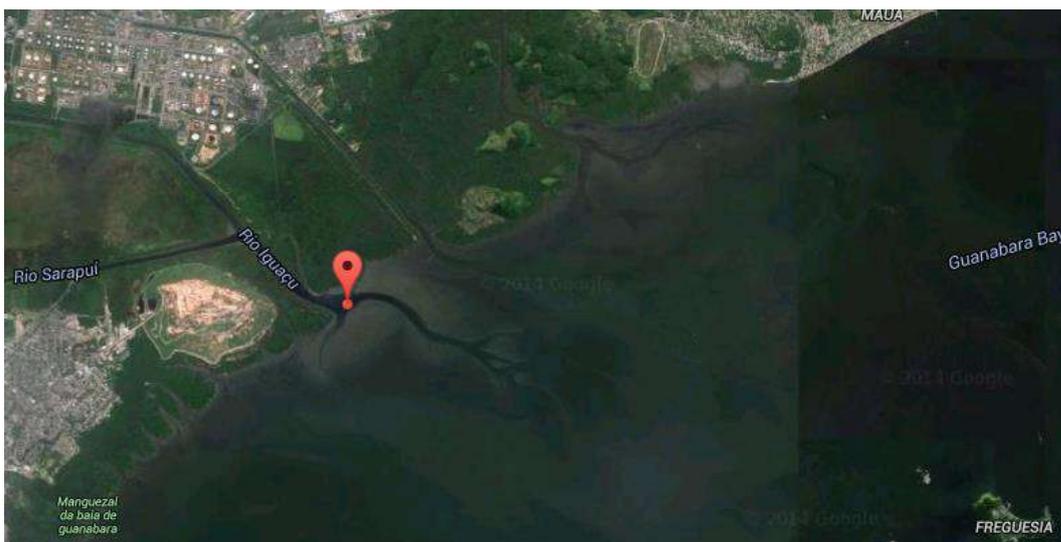
Ponto de coleta	Latitude	Longitude
Porto Rio	22°53'46"S	43°12'38"W
Porto Niterói	22°52'42"S	43°7'7"W
Rio Iguaçu	22°44'53"S	43°14'28"W
Rio Meriti	22°48'11"S	43°16'17"W



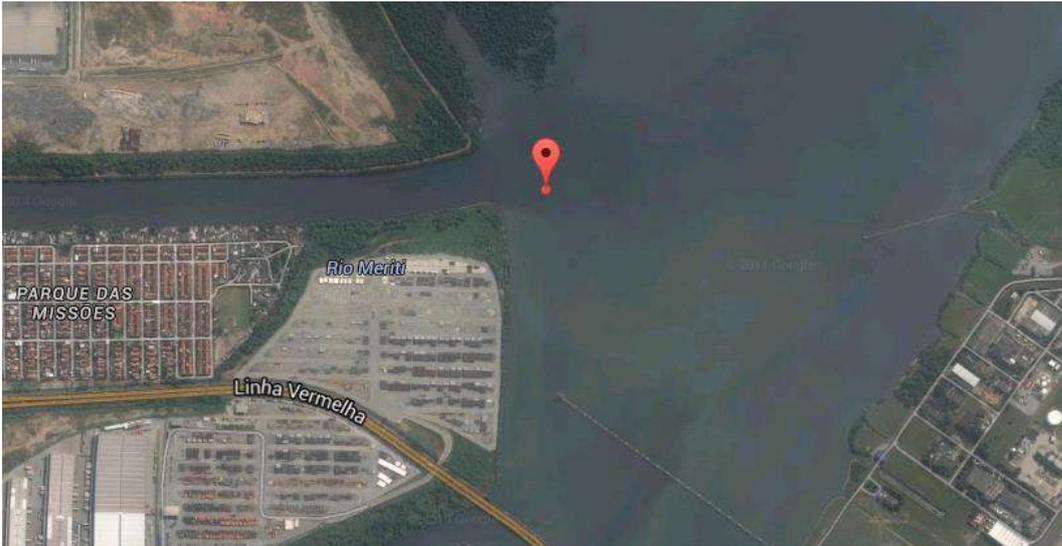
**Figura 3.4:** Ponto de coleta da amostra Porto Rio



**Figura 3.5:** Ponto de coleta da amostra Porto Niterói



**Figura 3.6:** Ponto de coleta da amostra Rio Iguaçú



**Figura 3.7:** Ponto de coleta da amostra Rio Meriti

### 4.3 BIOSSENSOR MICROBIANO COM *ESCHERICHIA COLI* MC1061

#### 4.3.1 Preparo dos meios e soluções

Os materiais e soluções foram esterilizados em autoclave, com aquecimento a 121°C por 25 minutos a 1 atm. Para o crescimento do microrganismo, foram utilizados dois meios de cultura, utilizados por Barrocas (2003), LB Broth e M9 (meio de sais mínimos) e para os experimentos de bioluminescência, somente o M9. O meio sólido de manutenção do microrganismo foi o LB ágar, para crescimento em placas. Os meios LB (*luria-bertani*), considerados meios ricos e complexos, foram adquiridos da Sigma.

##### 4.3.1.1 Meios LB Broth e LB Ágar

Os meios LB Broth e LB Ágar foram preparados com água deionizada e solução do antibiótico canamicina, como apresentado na tabela 4.1.

**Tabela 4.1: Composição dos meios LB Broth e LB Ágar (Adaptado de Costa, 2010)**

<b>Composição dos meios LB Broth e LB Ágar</b>	
LB Broth	10 g
LB Ágar	16 g
Água deionizada	400 mL
Canamicina	1,2 mL

#### 4.3.1.2 Meio M9 e soluções para crescimento celular

As tabelas 4.2 e 4.3 mostram a composição da solução de sais M9 e das soluções estoque de  $\text{MgSO}_4$  **0,1 M**,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  **0,01 M**, glicose **200g/L** e casamino ácidos **100 g/L**. O antibiótico canamicina foi adicionado de forma a assegurar o crescimento de somente os plasmídeos que contiverem os genes de interesse, ou seja, somente as células capazes de emitir luminescência em presença de mercúrio.

**Tabela 4.2: Composição do meio M9 (Adaptado de Costa, 2010)**

<b>Meio M9NO<sub>3</sub></b>	
Água deionizada	500 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	5,7598g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5197g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,7598g
$\text{NaNO}_3$	0,3698g
Canamicina	150 $\mu\text{L}$

**Tabela 4.3:** Composição das soluções para crescimento microbiano (Adaptado de Costa, 2010)

Solução MgSO <sub>4</sub> 0,1 M		Solução Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0,01 M		Solução Glicose 200g/L		Solução Casaminoácidos 100g/L	
Água deionizada	100 mL	Água deionizada	100 mL	Água deionizada	30 mL	Água deionizada	30 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,46g	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,24g	Glicose	6,00g	Casaminoácidos	3,00g

O meio mínimo e sais M9 (M<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>) é utilizado tanto para o crescimento do microrganismo no dia do teste luminométrico quanto no dia anterior, como um crescimento prévio. A tabela 4.4 mostra os volumes utilizados nos meios de cultura em cada caso.

**Tabela 4.4:** Meios de Cultura utilizados no crescimento prévio e no preparo da célula no dia do experimento

Meio de cultura	Crescimento prévio (Volume total: 50 mL)	Preparo da célula no dia do experimento (Volume total: 10 mL)
M9	48 mL	9,6 mL
MgSO <sub>4</sub> 0,1 M	500 µL	100 µL
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0,01 M	500 µL	100 µL
Glicose	500 µL	100 µL
Casamino ácidos	500 µL	100 µL
Canamicina	150 µL	30 µL

#### 4.3.1.3 Solução tampão de citrato 100 mM e Solução de luciferina 1 mM

A luciferina atua como substrato para a enzima luciferase, responsável pela produção de luminescência. Para que esta reação ocorra, é preciso que o pH extracelular esteja ligeiramente ácido, pois somente assim, a luciferina é capaz de atravessar a membrana celulares da *E. coli*. Por isso, prepara-se uma solução tampão de citrato 100 mM com pH 5.

O preparo da solução tampão de citrato 100 mM foi realizado em um balão volumétrico de 500 mL, no qual adicionou-se 14,71 g de citrato de sódio e 400 mL de água deionizada. O pH 5 foi alcançado com uma solução de HCl 1M.

A solução de luciferina foi preparada utilizando-se 25 mg da luciferina, disponibilizada na forma de sal de sódio, e 80 mL de solução tampão de citrato 100 mM. Sua armazenagem foi feita em criotubos, que foram embrulhados com papel alumínio e armazenados em geladeira para preservação da luciferina.

#### **4.3.2 Crescimento e peso seco do microrganismo *Escherichia coli* MC1061**

O monitoramento do perfil de crescimento da cepa é realizado a partir da leitura da densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600}$ ) em espectrofotômetro UV-visível. Inicialmente é realizado o crescimento prévio do microrganismo. Em fluxo laminar, adiciona-se a um erlenmeyer de 250 mL: o meio de cultura M9, as demais soluções (de acordo com a tabela 4.4) e então, o microrganismo. O erlenmeyer é levado à incubadora a 30°C com agitação de 150 rpm por 24h. Vale ressaltar que de acordo com estudo do microrganismo em questão, realizado por Costa (2010), são necessárias onze horas para que atinja a fase estacionária.

Após alcançar o estado estacionário, as células foram transferidas para tubos de polipropileno e centrifugadas por 25 minutos a 3500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspensa em cerca de 10 mL de água deionizada. A suspensão foi levada à centrífuga, onde permaneceu por 10 minutos a 3500 rpm. Finalmente, a biomassa foi ressuspensa em 10 mL de meio M9.

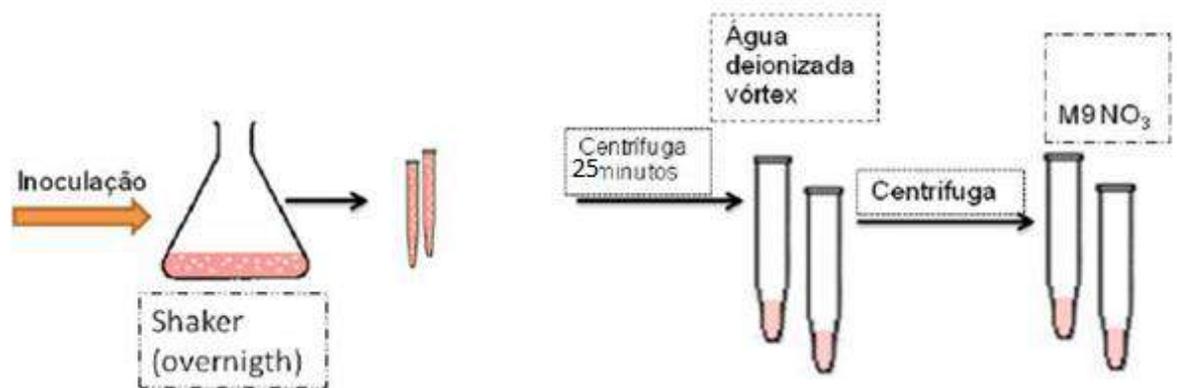
Dessa suspensão celular, retira-se 7 mL para filtração em membrana milipore. Cabe ressaltar que a membrana é pesada antes e depois da filtração em uma balança que elimina toda a umidade da amostra (Balança AG 200, IV2000). Dessa forma, tem-se o valor de massa das células por diferença. A concentração 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 e então, encontrar as suas respectivas concentrações celulares.

#### **4.3.3 Preparo das células**

Para o preparo da suspensão celular, no dia anterior ao do experimento bioluminescente, foi feito o crescimento de um inóculo em 50 mL de meio M9NO<sub>3</sub>, como explicado em 4.2.1,

incubado durante 24 horas, a 150 rpm e 30°C na incubadora. Após essas 24h, ou seja, no dia do ensaio luminométrico, as células foram centrifugadas por 25 minutos a 3500 rpm em centrífuga (QUIMIS), seguida de uma lavagem com 10mL de água deionizada, sendo novamente centrifugadas por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio M9NO<sub>3</sub> (FIGURA 4.1). Essa suspensão concentrada de células foi diluída de 1:33 para a realização dos testes de bioluminescência. As células prontas foram mantidas em gelo até o início dos testes a fim de reduzir atividade microbiana. Este protocolo foi desenvolvido em trabalho anterior, baseado no estudo do microrganismo em questão (Costa, 2010).



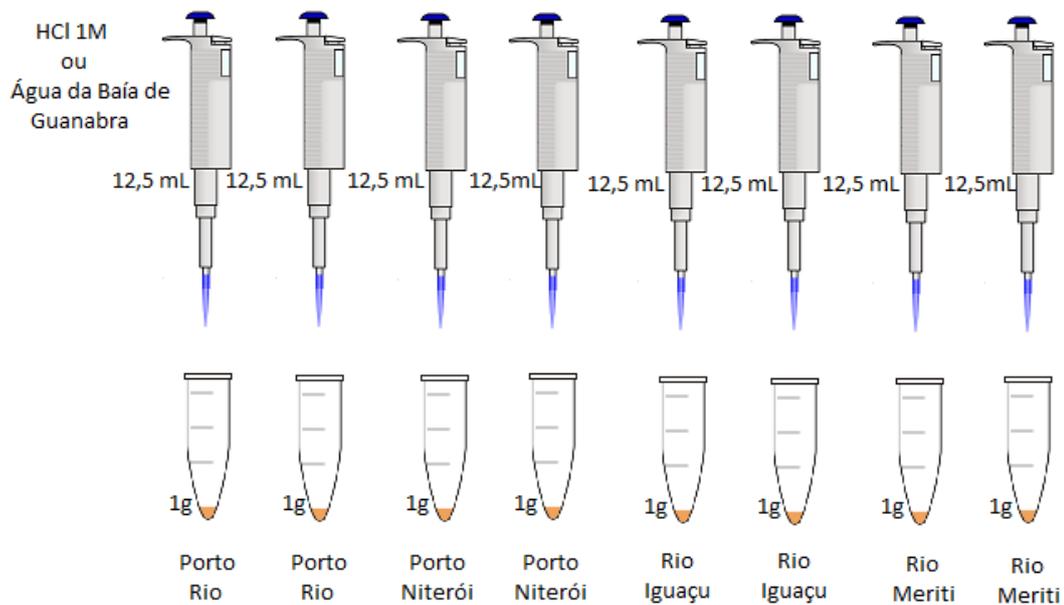
**Figura 4.1:** Esquema de preparo das células para os ensaios luminométricos (Adaptado de Costa, 2010)

#### 4.4 LIXIVIAÇÃO

Foram pesquisados diversos artigos científicos a respeito de detecção de metais pesados em amostras ambientais de solo. Com este levantamento, foi selecionada a técnica de lixiviação utilizada por Ivask e colaboradores (2002), que foi adaptada para este projeto. Então, foi construída uma curva de calibração (água deionizada) e uma curva de adição padrão (com amostras reais) para os bioensaios. Para os experimentos de determinação de bioluminescência, foi utilizado o processo tradicional segundo Barrocas (2003), otimizado por Costa (2010).

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 foi coletada juntamente com o sedimento e foi utilizada por se tratar da mesma localidade do sedimento.

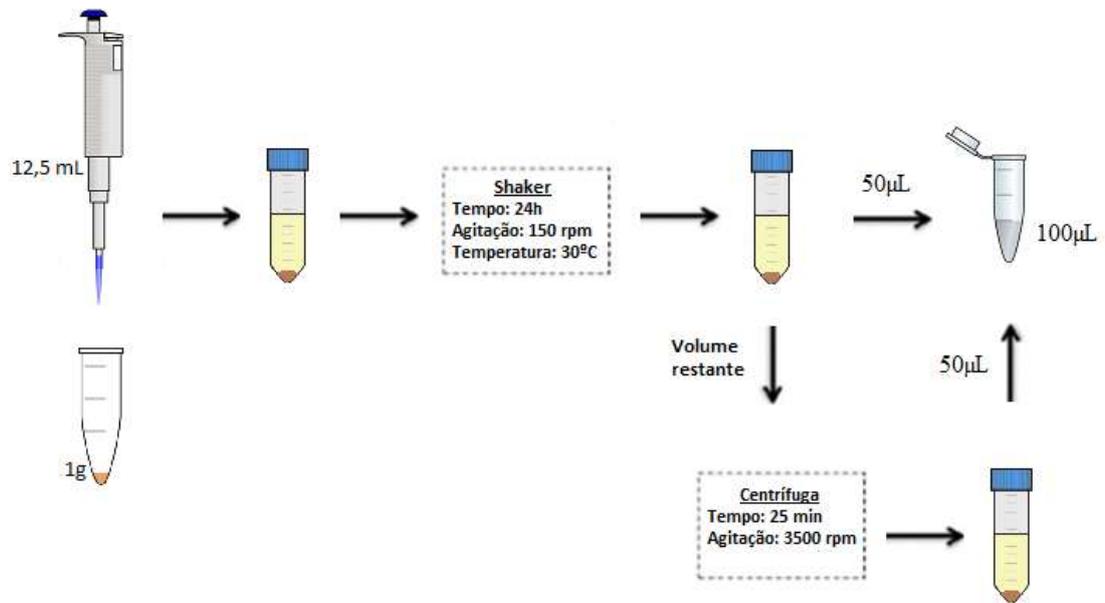
As quatro amostras de sedimento (Porto Rio, Porto Niterói, Rio Iguaçu e Rio Meriti) foram armazenadas em tubos de polipropileno na geladeira. No dia anterior ao do experimento bioluminescente, os tubos foram levados à capela, onde foi coletado 1g de cada amostra em uma balança (Balança AG 200, IV2000), sendo cada um deles armazenado em novo tubo. Em seguida, adicionou-se 12,5 mL de água coletada da Baía em cada tubo (FIGURA 4.2). Esse procedimento foi realizado em duplicata, totalizando 8 tubos, já que são 4 amostras.



**Figura 4.2:** Lixiviação das quatro amostras de sedimento em duplicata

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.

Ao final desta etapa, os 16 tubos de polipropileno, sendo 8 com água da Baía e 8 com ácido, foram levados para agitação a 500 rpm e 30°C por 24h (FIGURA 4.3). Após as 24h, retirou-se 50µL da suspensão de cada tubo, sendo armazenado em 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 eppendorfs com 100µL cada. Abaixo encontra-se o esquema deste procedimento ilustrado para um tubo.



**Figura 4.3:** Esquema de preparo de soluções das amostras após a lixiviação

#### 4.5 CURVA DE CALIBRAÇÃO E CURVAS DE ADIÇÃO PADRÃO

As amostras ambientais são estudadas nos ensaios bioluminescentes para detecção do mercúrio biodisponível, por meio de curvas de calibração (soluções sintéticas de mercúrio + água deionizada) e com adição padrão nas amostras (soluções sintéticas de mercúrio + amostras).

A curva de calibração estabelece a relação entre os valores de bioluminescência fornecidos pelo luminômetro (em URL) e a concentração de mercúrio em condições controladas, pois utiliza-se amostras sintéticas de mercúrio e água deionizada preparadas em laboratório. No entanto, as amostras reais, provenientes da Baía de Guanabara, são complexas e não são conhecidos todos os agentes complexantes que podem interferir na amostra. Assim, para considerar o efeito de matriz, foi elaborada uma curva de adição padrão, na qual adiciona-se quantidades conhecidas de analito (soluções sintéticas de mercúrio) nas amostras. Esta adição é feita na placa de 96 poços, de acordo com o procedimento de Barrocas (2003). Todas as condições foram realizadas em duplicata e os resultados da curva de adição padrão são apresentados em somatório de luz emitida (URL) em cada condição testada.

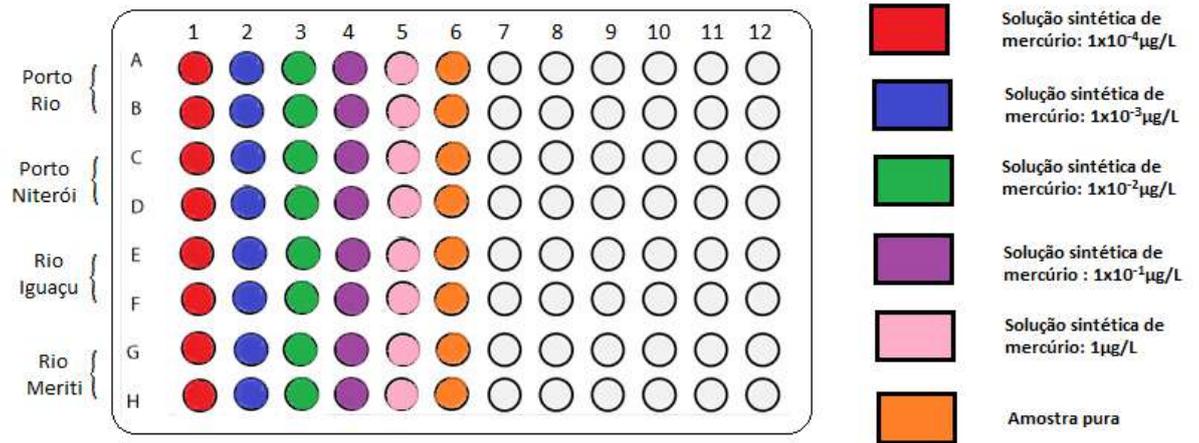
#### 4.5.1 Preparo das soluções sintéticas de mercúrio

As amostras de mercúrio foram preparadas a partir de uma solução padrão de mercúrio (1g/L). Todas as soluções foram preparadas, utilizando solução de HNO<sub>3</sub> 0,0045 M, nas seguintes concentrações finais (µg/L): **0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 e 1**. Esta faixa foi selecionada após os primeiros testes para determinação da curva de calibração, já que proporcionou um perfil linear dos dados.

#### 4.6 EXPERIMENTOS DE BIOLUMINESCÊNCIA

Nos ensaios luminométricos foram utilizadas placas brancas opacas de 96 poços, sendo realizados desenhos experimentais de acordo com a ordem de leitura do aparelho. A metodologia utilizada nos experimentos foi o processo tradicional segundo Barrocas (2003) que envolve a adição das amostras diretamente nos poços das placas de bioluminescência. Nesta metodologia, foram necessárias duas placas: uma para o ensaio de lixiviação água da Baía e outra para o ensaio de lixiviação com ácido.

Uma curva de adição padrão foi estabelecida para os experimentos na faixa de  $1,00 \times 10^{-4}$  a 1 µg/L para as soluções de mercúrio (como apresentado em 4.3.1). Adicionou-se 5µL de cada uma dessas soluções sintéticas de mercúrio na placa de acordo com o desenho experimental. Posteriormente, adicionou-se 5 µL da solução resultante da etapa de lixiviação (para cada amostra) nos seus devidos poços da placa. Nos poços destinados às amostras puras (sem adição de solução de mercúrio), foram adicionados 10 µL da respectiva amostra. Então, 50µL da suspensão celular também foram adicionados em todos os poços. O desenho experimental das placas pode ser visualizado na FIGURA 4.4. Os poços em branco não foram utilizados no ensaio.



**Figura 4.4:** Desenho experimental da placa de 96 poços para o ensaio de bioluminescência

A placa foi incubada por 45 min dentro do luminômetro. Após o tempo de incubação, o processo de medição foi iniciado com o equipamento dispensando 100µL de luciferina 1mM, substrato da luciferase, em cada poço da placa, que foi monitorado por 12 segundos (Barrocas, 2003; Costa, 2010). O volume total utilizado em cada poço foi de 160µL.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que o método seja válido, é importante considerar o branco reacional, que representa a resposta do instrumento a impurezas ou interferentes. Para medi-lo, utiliza-se somente água deionizada, sem adição das soluções sintéticas de mercúrio. O maior valor da resposta residual para este biossensor foi de 0,0006, que foi descontado dos valores finais das respostas luminescentes em URL.

Além disso, é preciso considerar a repetibilidade de resultados, que depende da precisão de medição do instrumento e da reprodutibilidade de execução das técnicas pelo operador (Costa, 2010). Para avaliar a precisão de medição do luminômetro, os procedimentos foram realizados em duplicata e a partir dos resultados (em somatório de URL), calculou-se a média, variância, desvio padrão e coeficiente de variação. Assim, pode-se avaliar a dispersão dos valores em relação à média.

### 5.1 CURVA DE PESO SECO

A curva de peso seco do microrganismo permite relacionar a leitura de absorvância com a concentração celular. Assim, pode-se determinar a concentração da suspensão celular utilizada nos ensaios luminométricos a partir do valor de absorvância a 600 nm fornecido pelo espectrofotômetro. Foi obtida a seguinte equação de reta, que foi utilizada em todos os experimentos posteriores para determinação da concentração celular:

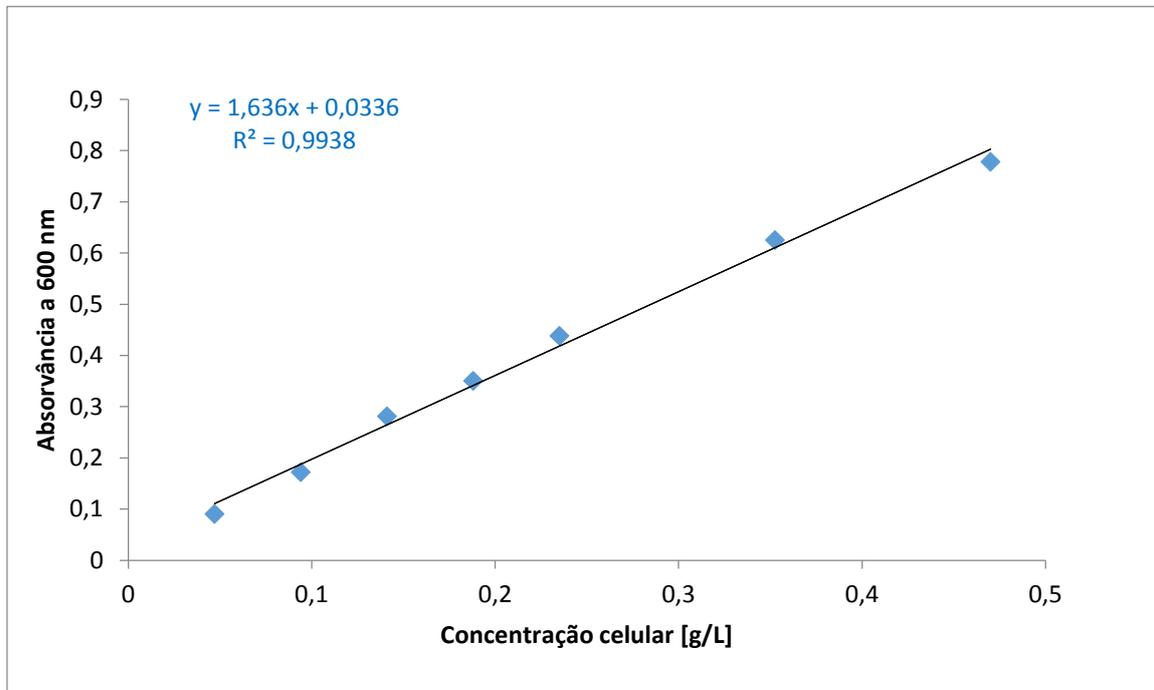
$$\text{Concentração celular [g/L]} = (\text{Abs600nm} - 0,0336) / 1,636$$

$$R^2 = 0,9938$$

A concentração celular utilizada nos ensaios foi de 0,141g/L, com um fator de diluição 1:33, para atingir uma absorvância de 0,2 em 600 nm, de acordo com o planejamento experimental realizado por Costa (2010).

**Tabela 5.1:** Diluições da suspensão celular para obtenção da curva de peso seco

Diluição	Água ( $\mu\text{L}$ )	Células ( $\mu\text{L}$ )	Abs (600nm)	[celular] inicial = 4,57g/L (M9NO3)
01:10	3600	400	0,778	0,470
01:13,3	3700	300	0,625	0,353
01:20	3800	200	0,438	0,235
01:25	3840	160	0,350	0,188
01:33,0	3880	120	0,281	0,141
01:50	3920	80	0,172	0,094
1:100	3960	40	0,090	0,047

**Figura 5.1:** Correlação entre Absorvância a 600 nm e Concentração Celular [g/l]

## 5.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO EM ÁGUA DEIONIZADA E CURVAS DE ADIÇÃO PADRÃO NAS AMOSTRAS

### 5.2.1 Curva de calibração em água deionizada

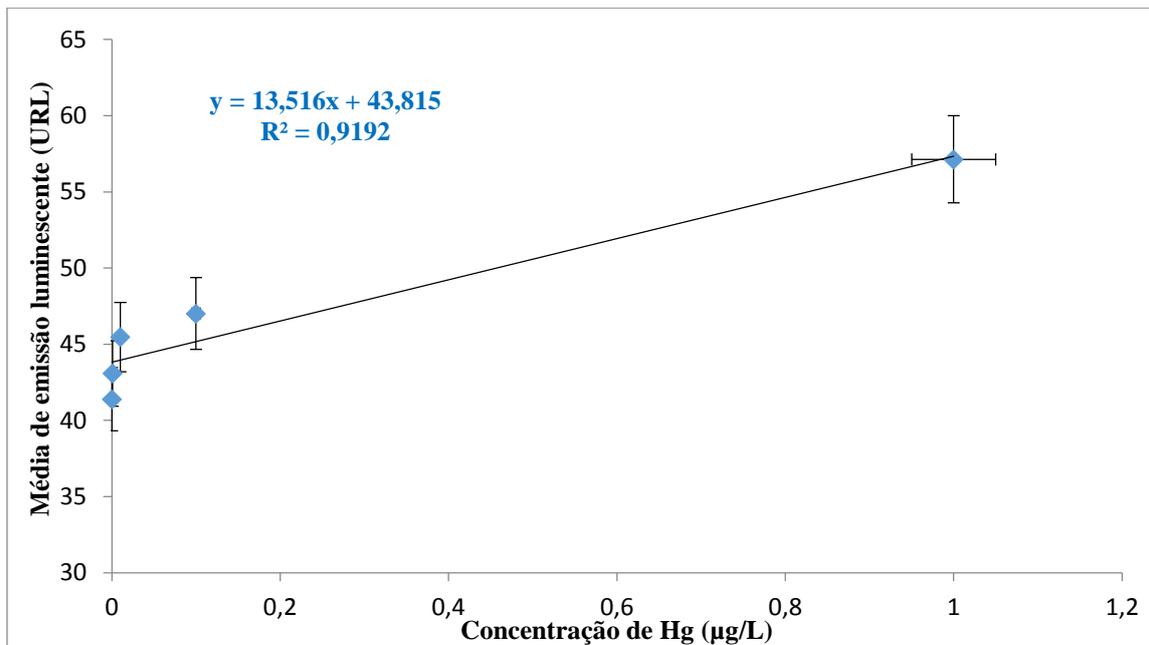
Para obtenção da curva de calibração, adicionou-se as soluções sintéticas de mercúrio (na faixa de  $10^{-4}$  a  $1\mu\text{g/L}$ ) em água deionizada para leitura da emissão luminescente pelo biossensor.

O procedimento foi realizado em duplicata e o valor médio, desvio padrão e coeficiente de variação foram calculados para cada concentração de mercúrio. Os baixos desvios padrão na faixa de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$   $\mu\text{g/L}$  indicaram que os testes possuíam boa repetibilidade. No entanto, o último ponto da curva (para a concentração de  $1\mu\text{g/L}$ ) apresentou valores altos de desvio padrão e coeficiente de variação (acima de 10%), indicando que os dados foram heterogêneos. Assim, a repetibilidade desse ponto não foi considerada boa, o que pode ser devido à diferenças de manipulação durante os ensaios.

A equação de reta obtida para a curva de calibração em água foi:  $y = 13,516x + 43,815$  e o  $R^2 = 0,9192$  (FIGURA 5.2).

**Tabela 5.2:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de calibração das soluções sintéticas de mercúrio em água deionizada

Curva de calibração em água deionizada	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00
Somatório de URL	41,740	43,222	45,033	46,682	54,951
Somatório de URL	41,034	42,937	45,917	47,354	59,312
Média	41,387	43,080	45,475	47,018	57,131
Desvio padrão	0,450	0,201	0,625	0,476	3,084
CV(%)	0,603	0,094	0,858	0,481	16,650



**Figura 5.2:** Gráfico da curva de calibração das soluções sintéticas de mercúrio em água deionizada

Para considerar a interferência de agentes complexantes, a curva de adição padrão planejada foi utilizada em cada amostra de sedimento. Os resultados podem ser visualizados nos itens a seguir.

## 5.2.2 Curva de adição padrão nas amostras

### 5.2.1.1 Lixiviação com HCl

As tabelas deste item apresentam os resultados das análises após a lixiviação com HCl 1M para cada amostra de sedimento. De forma geral, os desvios padrão obtidos foram pequenos, o que indica boa repetibilidade dos ensaios. Além disso, todos os coeficientes de variação estiveram abaixo de 10%, apontando uma homogeneidade nos resultados.

Para a amostra Porto Rio, os valores encontrados para os desvios padrão entre as duplicatas foram baixos. Os coeficientes de variação correspondentes também foram pequenos, sendo o maior deles de 1,859% para o primeiro ponto da curva de adição padrão (com a solução de  $10^{-4}$  µg/L de mercúrio). Esses resultados indicam uma baixa dispersão e boa repetibilidade entre as duplicatas.

**Tabela 5.3:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Rio lixiviada com HCl 1M

Porto Rio	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio (µg/L)					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,454	0,534	0,528	0,511	0,993	0,492
Somatório de URL	0,333	0,462	0,535	0,629	0,948	0,499
Média	0,393	0,498	0,531	0,570	0,971	0,495
Desvio padrão	0,085	0,051	0,005	0,083	0,032	0,005
CV (%)	1,859	0,528	0,004	1,222	0,106	0,005

Os resultados para o sedimento do Porto de Niterói também apresentaram pequenos valores para os desvios padrão e coeficientes de variação. Apesar de o terceiro ponto da curva (com a solução de  $10^{-2}$  µg/L de mercúrio) ter apresentado o maior desvio padrão (0,089) e maior coeficiente de variação (1,557%), ainda assim esses valores foram baixos. Logo, os resultados foram considerados homogêneos e com boa repetibilidade.

Observa-se que o quarto ponto da curva (da solução de  $10^{-1}$   $\mu\text{g/L}$  de mercúrio) apresentou uma média (em URL) menor que o ponto anterior. Isto revela um erro, pois à medida que aumenta a concentração de mercúrio, espera-se que aumente também a média de somatório de URL, já que essas medidas são diretamente proporcionais (como é demonstrado nos gráficos dos itens 5.3.2.1 e 5.3.2.2). Esses erros experimentais são passíveis de ocorrer em análises como essa e podem ser oriundos da pipetagem ou por problemas de mistura das alíquotas dentro do poço da placa de luminescência, já que o volume dessas alíquotas é muito pequeno (5  $\mu\text{L}$ ). Os erros são considerados no resíduo da equação da reta (coeficiente linear).

**Tabela 5.4:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Niterói lixiviada com HCl 1M

Porto Niterói	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio ( $\mu\text{g/L}$ )					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,372	0,377	0,441	0,387	0,974	0,430
Somatório de URL	0,310	0,378	0,566	0,490	0,979	0,403
Média	0,341	0,377	0,503	0,438	0,976	0,417
Desvio padrão	0,044	0,001	0,089	0,073	0,004	0,019
CV (%)	0,578	0,000	1,557	1,201	0,002	0,088

A amostra Rio Iguaçu apresentou o mais alto desvio padrão (0,112) no segundo ponto da curva (com solução de  $10^{-3}$   $\mu\text{g/L}$  de mercúrio). Porém, seu coeficiente de variação neste ponto foi menor que 10%, sendo de 4,815%, o que indica que os dados foram homogêneos.

**Tabela 5.5:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Iguaçu lixiviada com HCl 1M

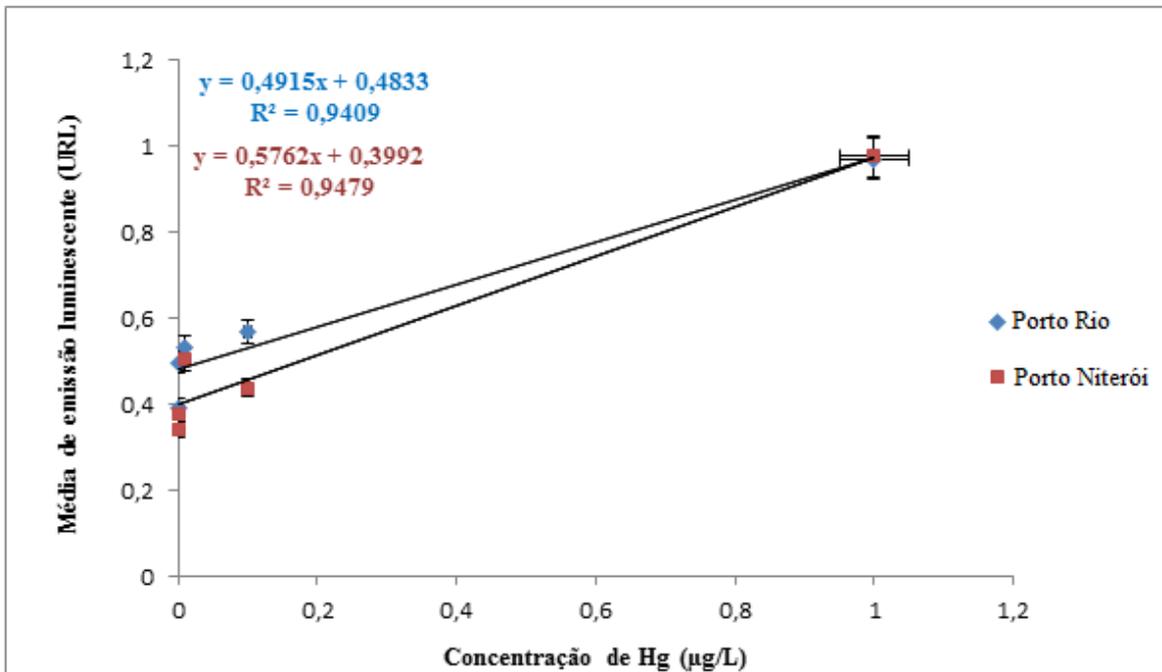
Rio Iguaçu	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio ( $\mu\text{g/L}$ )					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,257	0,337	0,499	0,580	1,486	0,435
Somatório de URL	0,275	0,179	0,506	0,646	1,518	0,501
Média	0,266	0,258	0,502	0,613	1,502	0,468
Desvio padrão	0,012	0,112	0,005	0,047	0,022	0,047
CV (%)	0,057	4,815	0,005	0,361	0,033	0,473

A análise do sedimento do Rio Meriti também indicou boa repetibilidade e baixa dispersão devido a desvios e coeficiente de variação baixos entre as duplicatas. O maior desvio (0,089), obtido no último ponto da curva, e o maior coeficiente de variação (1,010%), no terceiro ponto, tiveram valores baixos.

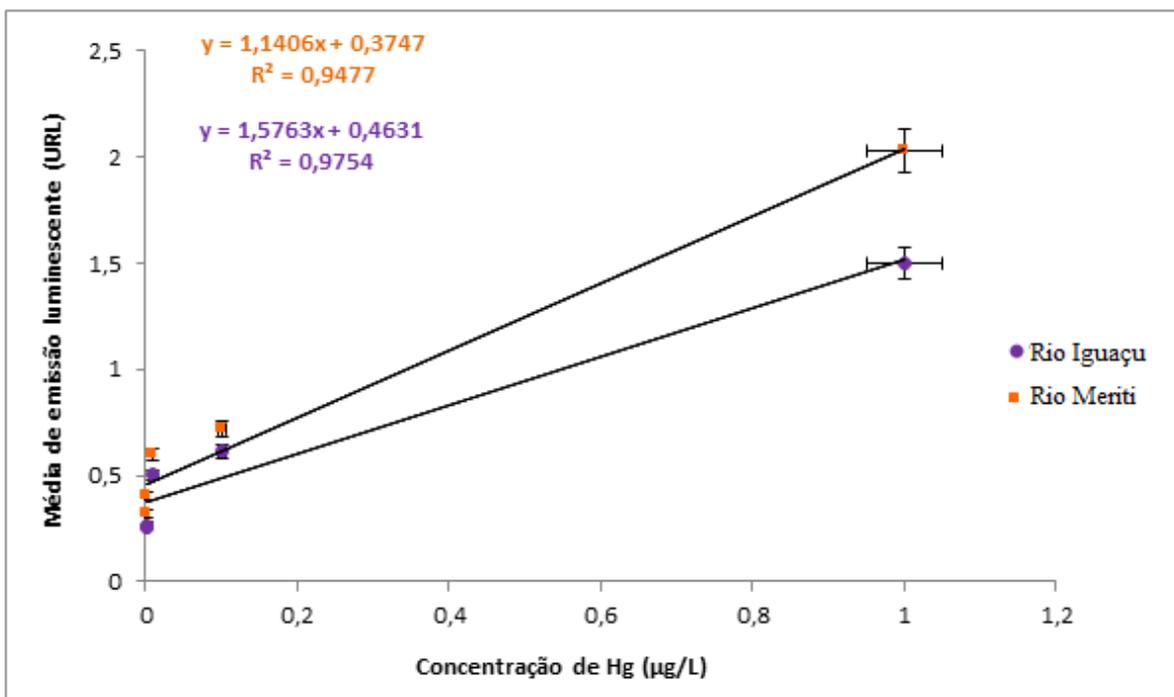
**Tabela 5.6:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Meriti lixiviada com HCl 1M

Rio Meriti	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio ( $\mu\text{g/L}$ )					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,303	0,401	0,543	0,692	2,092	0,492
Somatório de URL	0,340	0,402	0,653	0,744	1,966	0,462
Média	0,322	0,401	0,598	0,718	2,029	0,477
Desvio padrão	0,026	0,000	0,078	0,037	0,089	0,021
CV (%)	0,214	0,000	1,010	0,187	0,389	0,093

Nas figuras abaixo, pode-se visualizar as curvas de adição padrão para a lixiviação com HCl 1 M e suas respectivas equações de reta. As quatro curvas foram divididas em dois gráficos de modo a melhorar sua visualização. Os gráficos das quatro amostras revelam equações da reta com  $R^2 > 0,9$ . A amostra Rio Meriti foi a que apresentou maior  $R^2$  (0,9754).



**Figura 5.3:** Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Porto Rio e Porto Niterói lixiviadas com HCl 1M



**Figura 5.4:** Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Rio Iguaçu e Rio Meriti lixiviadas com HCl 1M

### 5.2.1.2 Lixiviação com Água da Baía de Guanabara

As tabelas a seguir mostram os resultados após lixiviação com água da Baía de Guanabara. Em uma análise geral, os desvios padrão e os coeficientes de variação obtidos foram pequenos, apontando uma homogeneidade nos resultados.

Com os resultados para a amostra Porto Rio, observa-se que os desvios padrão foram pequenos, na faixa de 0,001 a 0,081, indicando boa repetibilidade dos testes. Além disso, os baixos coeficientes de variação (todos abaixo de 10%) caracteriza a homogeneidade dos resultados.

**Tabela 5.7:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Rio lixiviada com água da Baía de Guanabara

Porto Rio	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio ( $\mu\text{g/L}$ )					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,388	0,394	0,459	0,739	1,920	0,498
Somatório de URL	0,306	0,395	0,382	0,625	1,987	0,403
Média	0,347	0,394	0,421	0,682	1,954	0,451
Desvio padrão	0,058	0,001	0,054	0,081	0,047	0,067
CV (%)	0,971	0,000	0,703	0,951	0,114	1,008

O sedimento do Porto de Niterói lixiviado com água da Baía também obteve pequenos desvios e coeficientes de variação. A amostra pura apresentou o maior desvio padrão (0,080) e o maior CV (1,509%). Mesmo assim, esses valores ainda foram baixos e por isso, pode-se considerar boa repetibilidade e resultados homogêneos.

**Tabela 5.8:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Porto Niterói lixiviada com água da Baía de Guanabara

Porto Niterói	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio ( $\mu\text{g/L}$ )					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,351	0,319	0,404	0,605	1,216	0,368
Somatório de URL	0,373	0,301	0,424	0,619	1,212	0,481
Média	0,362	0,310	0,414	0,612	1,214	0,425
Desvio padrão	0,015	0,013	0,014	0,010	0,003	0,080
CV (%)	0,064	0,053	0,047	0,016	0,001	1,509

A amostra Rio Iguaçu apresentou pequenos valores para os desvios padrão e coeficientes de variação. Apesar de o primeiro ponto da curva de adição padrão (com a solução de  $10^{-4}$  µg/L de mercúrio) ter apresentado o maior desvio padrão (0,051) e maior coeficiente de variação (0,730%), ainda assim esses valores são considerados baixos. Assim, os resultados foram considerados homogêneos e com boa repetibilidade.

**Tabela 5.9:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Iguaçu lixiviada com água da Baía de Guanabara

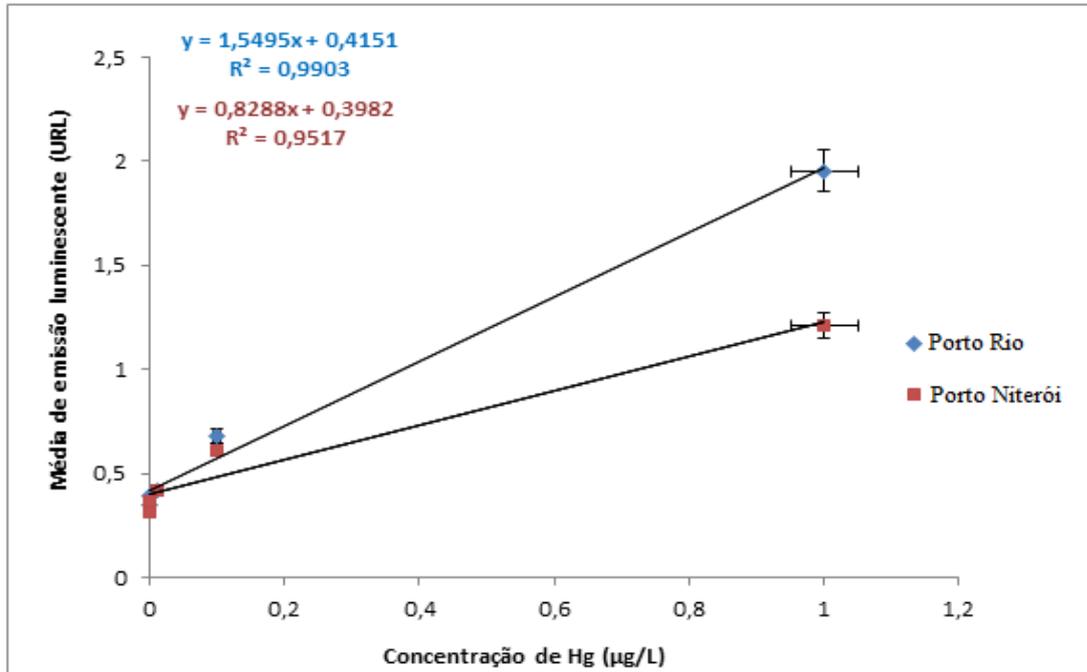
Rio Iguaçu	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio (µg/L)					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,323	0,470	0,421	0,608	0,995	0,479
Somatório de URL	0,395	0,400	0,381	0,646	0,966	0,413
Média	0,359	0,435	0,401	0,627	0,981	0,446
Desvio padrão	0,051	0,049	0,029	0,027	0,021	0,047
CV (%)	0,730	0,563	0,208	0,118	0,043	0,497

Os resultados da amostra do Rio Meriti também indicaram boa repetibilidade e baixa dispersão devido a desvios e coeficiente de variação baixos entre as réplicas. O maior desvio (0,075), obtido no terceiro ponto da curva de adição padrão, e o maior coeficiente de variação (1,798%), no terceiro ponto, tiveram valores baixos.

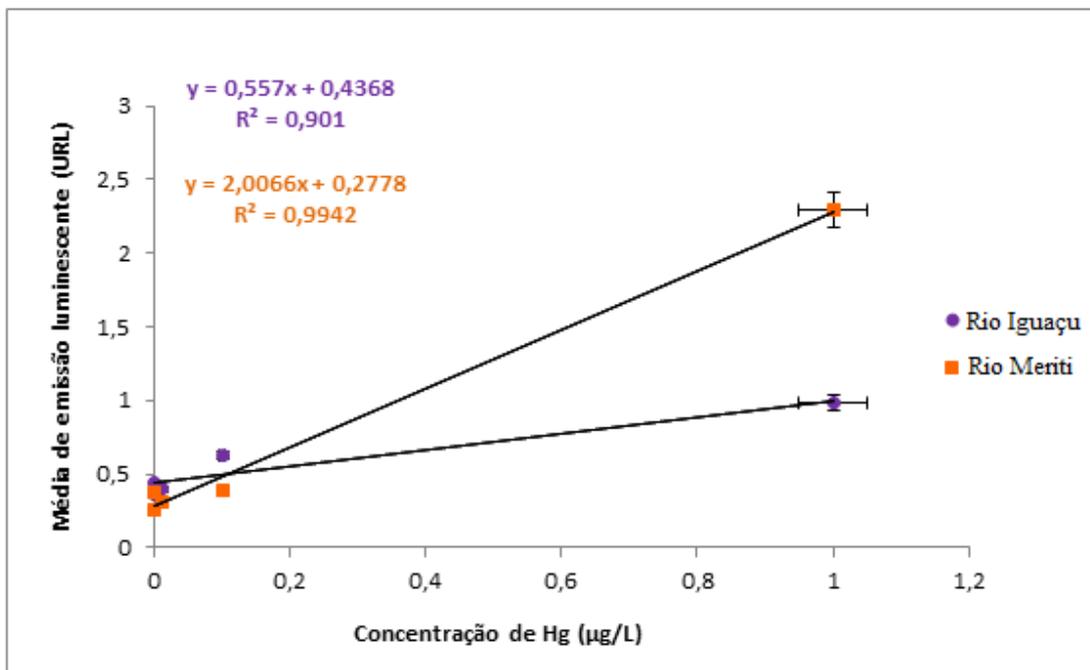
**Tabela 5.10:** Resultados dos ensaios luminométricos da curva de adição padrão com a amostra Rio Meriti lixiviada com água da Baía de Guanabara

Rio Meriti	Curva de adição padrão de soluções de mercúrio (µg/L)					Amostra pura
	0,0001	0,0010	0,0100	0,10	1,00	
Somatório de URL	0,224	0,346	0,257	0,367	2,309	0,466
Somatório de URL	0,293	0,399	0,362	0,401	2,279	0,500
Média	0,259	0,373	0,309	0,384	2,294	0,483
Desvio padrão	0,049	0,038	0,075	0,024	0,021	0,024
CV (%)	0,910	0,386	1,798	0,152	0,019	0,122

Os gráficos das curvas de adição padrão das quatro amostras lixiviadas com água da Baía apresentaram  $R^2 > 0,9$ , sendo novamente a curva da amostra Rio Meriti a que possui o maior valor (0,9942).



**Figura 5.5:** Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Porto Rio e Porto Niterói lixiviadas com água da Baía de Guanabara



**Figura 5.6:** Gráfico das curvas de adição padrão para as amostras Rio Iguaçu e Rio Meriti lixiviadas com água da Baía de Guanabara

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO BIODISPONÍVEL

A concentração de mercúrio biodisponível de cada amostra é calculada através das respectivas equações de reta, substituindo-se a variável  $y$  pela média de somatório de URL. Assim, obtêm-se um resultado para  $x$ , que representa a concentração de mercúrio. Essa concentração de mercúrio calculada diretamente pela equação da reta é fornecida em  $\mu\text{g/L}$ . Através de cálculos analíticos pode-se obter a concentração em  $\mu\text{g/Kg}$  de sedimento, que permite uma melhor análise dos resultados (TABELA 5.13).

Pode-se observar que a curva de calibração (TABELA 5.2) apresenta médias de emissão luminescente maiores do que as curvas de adição padrão. (TABELAS 5.3 a 5.10). Como a emissão luminescente é diretamente proporcional à concentração de mercúrio, a curva de calibração apresenta também uma maior concentração de mercúrio. Isso pode ser observado ao comparar as equações de reta das curva de adição padrão e calibração, visto que a última possui maior inclinação de reta (13,516). Tais fatores podem ser explicados pela ausência de agentes complexantes na curva de calibração, uma vez que é realizada em água deionizada. Já na curva de adição padrão, realizada em complexas amostras ambientais, os possíveis ligantes presentes podem atenuar a emissão de luminescência ao complexar o mercúrio, tornando-o indisponível para o microrganismo do biossensor. Por isso, é importante a elaboração de uma curva de adição padrão.

Pelos resultados de lixiviação com HCl 1M, o sedimento do Rio Meriti foi o que apresentou maior inclinação da reta (1,5763), o que sugere que amostras desta localidade apresentam menos agentes complexantes. Consequentemente, esta amostra possui a maior concentração de mercúrio. Para a lixiviação com água da Baía de Guanabara, também foi a amostra Rio Meriti a que apresentou maior inclinação de reta (2,0066). Isso é confirmado pelos dados em  $\mu\text{g/kg}$  de sedimento (TABELA 5.13), que apontam a amostra Rio Meriti como a mais contaminada por mercúrio, seguida por Porto Niterói, Porto Rio e por último, Rio Iguaçu.

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 (FEEMA, 1995 *apud* Barrocas & Wasserman, 1995) Já os sedimentos de Porto Niterói e Porto Rio apresentaram uma concentração de mercúrio biodisponível consideravelmente menor que a do Rio Meriti (aproximadamente 30% de seu

valor). 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 acarretar em um menor aporte de mercúrio (Convênio Petrobras-DPC-EMGEPRON, 2004).

Estudos anteriores relataram concentrações de mercúrio total em sedimento do Rio Meriti na faixa de 260 a 9760  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de sedimento (FEEMA, 1986 *apud* Barrocas & Wasserman, 1995). Uma comparação desses dados com as concentrações de mercúrio biodisponível encontradas no presente trabalho (1,408  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de sedimento para lixiviação com água da Baía e 1,1247  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de sedimento para lixiviação com HCl, conforme TABELA 5.13), revela uma grande diferença entre os resultados. Isso se deve ao fato de grande parte do mercúrio estar complexado com os diversos ligantes presentes no ambiente, estando assim indisponível para os organismos. Esta grande diferença entre a concentração de mercúrio total e de mercúrio biodisponível aponta a importância da avaliação da biodisponibilidade do mercúrio, a fim de permitir um estudo mais elaborado da ecotoxicidade da amostra de determinado local.

Uma comparação entre as concentrações de mercúrio biodisponível obtidas com a lixiviação com ácido e com a lixiviação com água da Baía leva à conclusão de que não houve diferença significativa entre esses dois métodos. Isto pode ser observado na TABELA 5.13, que mostra que os resultados obtidos foram muito próximos, com baixos valores de desvio padrão e de coeficientes de variações para todas as amostras.

**Tabela 5.11:** Equações das curvas de adição padrão para as amostras após lixiviação com HCl 1M

<b>Lixiviação com HCl 1M</b>	
<b>Localidades</b>	<b>Equações da Reta</b>
<b>Porto Rio</b>	$y = 0,4915x + 0,4833$ $R^2 = 0,9409$
<b>Porto Niterói</b>	$y = 0,5762x + 0,3992$ $R^2 = 0,9479$
<b>Rio Nova Iguaçu</b>	$y = 1,1406x + 0,3747$ $R^2 = 0,9477$
<b>Rio Meriti</b>	$y = 1,5763x + 0,4631$ $R^2 = 0,9754$

**Tabela 5.12:** Equações das curvas de adição padrão para as amostras após lixiviação com água da Baía de Guanabara

<b>Lixiviação com água da Baía de Guanabara</b>	
<b>Localidades</b>	<b>Equações da Reta</b>
<b>Porto Rio</b>	$y = 1,5495x + 0,4151$ $R^2 = 0,9903$
<b>Porto Niterói</b>	$y = 0,8288x + 0,3982$ $R^2 = 0,9517$
<b>Rio Nova Iguaçu</b>	$y = 0,557x + 0,4368$ $R^2 = 0,901$
<b>Rio Meriti</b>	$y = 2,0066x + 0,2778$ $R^2 = 0,9942$

**Tabela 5.13:** Concentração de mercúrio biodisponível ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de sedimento) para a lixiviação das amostras com HCl 1M e com água da Baía de Guanabara

Concentração de mercúrio biodisponível ( $\mu\text{g} / \text{Kg}$ de sedimento)	Porto Rio	Porto Niterói	Rio Iguaçu	Rio Meriti
Lixiviação com HCl 1M	0,335	0,418	0,118	1,125
Lixiviação com água da Baía de Guanabara	0,316	0,439	0,225	1,408
Média	0,326	0,428	0,172	1,266
Desvio padrão	0,013	0,015	0,076	0,200
Coefficiente de variação (%)	0,055	0,055	3,345	3,172

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ 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. Assim, pode-se dizer que o biossensor foi capaz de detectar a presença de mercúrio biodisponível nas amostras de sedimento analisadas através deste método.
  
- ✓ No entanto, não se pode afirmar que este biossensor é capaz de fornecer uma resposta quantitativa a respeito do mercúrio biodisponível em amostras ambientais. Para isto, seria necessário um estudo mais aprofundado, com maior número de amostras, para avaliar se há um nível de confiança satisfatório nos resultados do método testado.
  
- ✓ Os resultados de concentração de mercúrio biodisponível mostram que os dois métodos de lixiviação (com HCl e com água da Baía de Guanabara) 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 consideravelmente maior que as outras amostras. No entanto, os valores obtidos são referentes somente à fração biodisponível do mercúrio. Uma análise quantitativa do mercúrio total das amostras, por exemplo por meio da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica, permitiria um estudo mais aprofundado a respeito da poluição dessas localidades.

## 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.
- AMADOR, E. DA S. **Bacia da Baía de Guanabara: Caracaterísticas 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.
- ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. **Recent advances in cholesterol biosensor.** *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, p.1083–1100, 2008.
- 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.
- 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 Imbuauçu.** X Simpósio Brasileiro de Geofísica Aplicada, Rio de Janeiro, 2003.
- BARBOSA, A. C.; SOUZA, J.; DOREA, J. G.; JARDIM, W. F.; FADINI, P.S. (2003). **Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil.** *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 45,235-46, 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.

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

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

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

BISINOTI, M.C. & JARDIM, W.F. **Production of organic mercury from Hg<sup>0</sup>: experiments using microcosms**. Journal of the Brazilian Chemical Society, 14(2), 244-248, 2003.

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, 169p., 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.

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

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

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.

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, 2010.

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 Research, 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.

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.

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

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, 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.

GILMOUR, C.C. & HENRY, E.A. **Mercury methylation in 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, v. 23, p. 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.

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.

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.

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.

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 luminescent 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.

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

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

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.

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. & 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.

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

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

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.

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

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.

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

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

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

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.

NRIAGU, J. & BECKER, C., **Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: global and regional inventories.** 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 – Pontífica Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2009.

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, v. 38, n.6, p. 1439-1448, 2004.

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.

PETROBRAS-DPC-EMGEPRON (Convênio). **Baía de Guanabara: Monitoramento e prevenção da poluição hídrica.** Relatório técnico preliminar (ago 2001 a mai 2003). 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 Irajá River Estuary.** Environmental Pollution, 4, 193-205, 1982.

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.

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

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

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

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.

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.

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.

SINGH, J. & MITTAL, S. K. ***Chlorella sp.* based biosensor for selective determination of mercury in presence of silver ions.** Sensors and Actuators B: Chemical, 165, 48-52, 2012.

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; p. 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.

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.

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.

VIRTA, M.; KARP, M.; VUORINEN, P. **Nitric oxide donor-mediated killing of bioluminescent *Escherichia coli*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38, 2775–2779, 1994.

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, 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.

YAGI, K. **Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science**. Applied Microbiology and Biotechnology, 73, 1251-1258, 2007.

ZHANG, H.; FENG, X.; LARSEN, 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.