

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL**

**Teste de Toxicidade Aguda: Monitoração da Respiração
da Bactéria *Klebsiella oxytoca* usando um
Sistema FIA/Conducométrico**

Carolina Rittes Turato Farah

Campinas

2001

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL

**Teste de Toxicidade Aguda: Monitoração da Respiração da
Bactéria *Klebsiella oxytoca* usando um
Sistema FIA/Conduutométrico**

Carolina Rittes Turato Farah

Orientador: José Roberto Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada à
Comissão de pós-graduação da Faculdade de
Engenharia Civil da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Civil, na área de concentração de Saneamento e
Ambiente

Atesto que esta é a versão definitiva
da dissertação/tese.

04/02/2002

Prof. Dr. José Roberto Guimarães
Matrícula: 24.561-5

Campinas, SP

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

| | |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | CB |
| Nº CHAMADA | T/UNICAMP |
| | F221t |
| V | EX |
| TOMBO | 501 48079 |
| PREL | 16.837102 |
| C | <input type="checkbox"/> |
| | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 1100 |
| DATA | 11/04/02 |
| Nº CPD | |

CM00165781-B

BIBID 235725

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

F221t Farah, Carolina Rittes Turato
 Teste de toxicidade aguda: monitoração da respiração da bactéria *klebsiella oxytoca* usando um sistema FIA/Condutométrico .--Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: José Roberto Guimarães.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil.

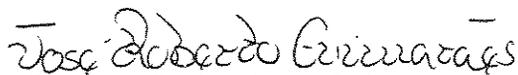
1. Toxicidade - Testes. 2. Escherichia coli. 3. Metais pesados. 4. Tetraciclina. 5. Detergentes. I. Guimarães, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL

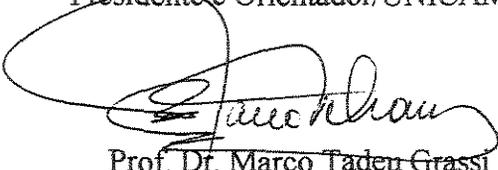
**Teste de Toxicidade Aguda: Monitoração da Respiração
da Bactéria *Klebsiella oxytoca* usando um
Sistema FIA/Conduutométrico**

Carolina Rittes Turato Farah

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:


Prof. Dr. José Roberto Guimarães

Presidente e Orientador/UNICAMP


Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

UFPR


Prof. Dr. Antonio Roberto Siviero

UNICAMP

Campinas, 17 de agosto de 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2001.100

Ao meu marido Farah

Aos meus pais, Turato e Josette

Às minhas filhas, Bárbara e Sofia

Dedico.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Roberto Guimarães (Tuca) pela oportunidade, orientação, estímulo e amizade durante a realização deste trabalho, assim como pela preocupação com seu resultado final, não medindo esforços para o sucesso do projeto.

Aos amigos: Ana Paula, Pina, Cássia Rosa, Marco, Tito, Divanildes, Patrícia, Adriana, Rosiléia, Edmar, Renata, Sandra, Alexandre, Gustavo, Oswaldo, Sérgio, Fábio, Obadias, Ronaldo, Andréa (Química), Daniel (HC) e Noêmia.

À Profa. Eglé Novaes, à Sandra Moraes (Química), à Laís e ao Prof. Beto (Limeira) pela disponibilidade permanente, além dos ensinamentos.

À Marta, à Angela, ao Prof. Edson (Edinho), Prof. Domingos (IB) e Prof. Jardim pelas preciosas sugestões.

Àqueles que, por algum motivo, colaboraram para a realização desse trabalho.

À todos, pelo companheirismo, ajudando a transpor os obstáculos com muito bom humor.

À todos da minha família, que torceram, e torcem, pelo meu sucesso.

Finalmente, à FAPESP por ter acreditado no projeto e pelo apoio financeiro.

Sumário

| | página |
|---|--------|
| LISTA DE FIGURAS | iv |
| LISTA DE TABELAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| RESUMO | xi |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 Objetivos gerais | 4 |
| 2.2 Objetivos específicos | 4 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1 <i>Klebsiella</i> e <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| 3.2 Teste de toxicidade | 11 |
| 3.3 Análise por injeção em fluxo (FIA) | 16 |
| 4 METODOLOGIA | 19 |
| 4.1 Procedimento do teste de toxicidade | 19 |
| 4.1.1 Preparação do meio de cultura e Inoculação da bactéria | 19 |
| 4.1.1.1 Reagentes | 20 |
| 4.1.1.2 Soluções estoque | 20 |
| 4.1.1.3 Organismos teste | 20 |
| 4.1.1.4 Equipamentos e acessórios | 21 |
| 4.1.1.5 Preparação do meio de cultura | 21 |
| 4.1.1.6 Inoculação da bactéria | 22 |
| 4.1.1.7 Ensaio de toxicidade | 22 |
| 4.2 Determinação do CO₂ pelo sistema FIA | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.1 Reagentes..... | 23 |
| 4.2.2 Soluções estoque..... | 23 |
| 4.2.3 Equipamentos e acessórios..... | 24 |
| 4.2.4 Sistema FIA..... | 25 |
| 4.2.4.1 Funcionamento do sistema FIA..... | 25 |
| 4.2.4.2 Quantificação da concentração de CO₂ e Crescimento bacteriano..... | 28 |
| 4.2.4.2.1 Curva de calibração..... | 28 |
| 4.2.4.2.2 Cálculo da concentração de CO₂, do tempo de duplicação (t_D) e da concentração efetiva (EC)..... | 30 |
| 4.3 Preparação das soluções dos compostos avaliados..... | 34 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 5.1 Como minimizar erros..... | 36 |
| 5.1.1 Conservação das soluções padrões utilizadas para a construção da curva de calibração..... | 36 |
| 5.1.2 Concentração de CO₂ no meio de cultura puro..... | 38 |
| 5.2 Desvio padrão apresentado pelo sistema FIA..... | 39 |
| 5.3 Escolha da bactéria..... | 42 |
| 5.4 Padronização do ensaio..... | 43 |
| 5.5 Ensaio com glicose..... | 44 |
| 5.6 Ensaio de toxicidade..... | 45 |
| 5.6.1 Tetraciclina..... | 46 |
| 5.6.2 Metais..... | 49 |
| 5.6.2.1 Mercúrio..... | 51 |
| 5.6.2.2 Cádmiio..... | 54 |
| 5.6.2.3 Cobre..... | 57 |
| 5.6.2.4 Comparação entre os metais..... | 61 |
| 5.6.3 Detergentes hospitalares..... | 63 |
| 5.6.3.1 Laborhex 2..... | 63 |
| 5.6.3.1.1 Características do produto..... | 63 |
| 5.6.3.1.2 Resultados..... | 64 |
| 5.6.3.2 Riodeine Degermante..... | 67 |

| | |
|--|-----------|
| 5.6.3.2.1 Características do produtos..... | 67 |
| 5.6.3.2.2 Resultados..... | 67 |
| 5.6.3.3 Comparação entre os detergentes hospitalares..... | 71 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 72 |
| 7. SUGESTÕES..... | 74 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 75 |
| 9 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA..... | 81 |
| ABSTRACT..... | 82 |
| APÊNDICE..... | 83 |

LISTA DE FIGURAS

| | página |
|---|--------|
| FIGURA 3.1: Resposta hipotética de crescimento de uma mesma bactéria em dois meios de composição diferente..... | 10 |
| FIGURA 3.2: Curva de crescimento bacteriano típico..... | 10 |
| FIGURA 3.3: Esquema do sistema FIA simplificado e forma de registro. (a) Sistema FIA de linha única, onde a amostra (S) é injetada num fluxo carregador (R), movimentado por uma bomba peristáltica (P), detectada em (D) e o descarte (L). (b) Parâmetros usualmente utilizados para caracterizar um sistema FIA de linha única, onde (W) é a largura do pico, (H) a sua altura, (A) sua área, (T) o tempo de residência e (t_b) a largura do pico na base..... | 17 |
| FIGURA 4.1: Esquema do sistema FIA/conducométrico utilizado para a determinação da concentração de CO ₂ em ensaios de toxicidade..... | 26 |
| FIGURA 4.2: Esquema do injetor/comutador de acrílico utilizado no sistema FIA/conducométrico, onde  - alça de polietileno, (a) - posição em que a alça de polietileno é preenchida pela amostra ou padrão, (b) - posição em que o fluxo carregador transporta a amostra ou padrão para a cela de difusão..... | 27 |
| FIGURA 4.3: Esquema da cela de difusão de acrílico utilizado no sistema FIA/conducométrico com ranhura de 0,1 mm de profundidade, 3 mm de largura e 100 mm de comprimento,  - CO ₂ permeando a membrana de teflon..... | 27 |
| FIGURA 4.4: Diagrama resultante de sinais obtidos da curva de calibração do intervalo de concentração entre 0,25 mmol L ⁻¹ a 4,00 mmol L ⁻¹ de CO ₂ no registrador..... | 29 |
| FIGURA 4.5: Altura dos picos registrados (cm) pela concentração da curva de calibração..... | 29 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 4.6: Curva de calibração linearizada..... | 30 |
| FIGURA 4.7: Comportamento da <i>Klebsiella oxytoca</i> frente ao agente estressante tetraciclina..... | 32 |
| FIGURA 4.8: Tempo de duplicação..... | 33 |
| FIGURA 5.1: Altura dos picos de uma série de padrões de CO ₂ | 37 |
| FIGURA 5.2: Diagrama da curva de calibração..... | 41 |
| FIGURA 5.3: Curvas de calibração..... | 42 |
| FIGURA 5.4: Crescimento da bactéria <i>Klebsiella oxytoca</i> em meio de cultura com concentrações diferentes de glicose..... | 45 |
| FIGURA 5.5: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> em relação à variação da concentração de Tetraciclina..... | 47 |
| FIGURA 5.6: Concentração efetiva (EC) de Tetraciclina frente às bactérias <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> | 49 |
| FIGURA 5.7: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> em relação à variação da concentração de Hg ²⁺ | 52 |
| FIGURA 5.8: Concentração efetiva (EC) de Hg ²⁺ frente às bactérias <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> | 53 |
| FIGURA 5.9: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> em relação à variação da concentração de Cd ²⁺ | 55 |
| FIGURA 5.10: Concentração efetiva (EC) de Cd ²⁺ frente às bactérias <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> | 57 |
| FIGURA 5.11: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> em relação à variação da concentração de Cu ²⁺ | 59 |
| FIGURA 5.12: Concentração efetiva (EC) de Cu ²⁺ frente às bactérias <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> | 60 |
| FIGURA 5.13: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> em relação à variação da concentração de Digluconato de chlorhexidina..... | 64 |
| FIGURA 5.14: Concentração efetiva (EC) do princípio ativo do detergente Laborhex 2 frente às bactérias <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> | 66 |
| FIGURA 5.15: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>E. coli</i> em relação à variação da concentração de PVP-I..... | 68 |

FIGURA 5.16: Concentração efetiva (EC) do princípio ativo do detergente Riodeine frente às bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*..... 70

LISTA DE TABELAS

| | página |
|---|--------|
| TABELA 3.1: Algumas características das bactérias <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 6 |
| TABELA 3.2: Meio quimicamente definido para uma bactéria heterotrófica..... | 8 |
| TABELA 3.3: Resumo de alguns métodos para medida do crescimento bacteriano..... | 11 |
| TABELA 4.1: População microbiana associada à concentração de CO ₂ produzida no ensaio com <i>E. coli</i> em Meio Mínimo..... | 31 |
| TABELA 5.1: Aumento da altura dos picos em porcentagem das soluções padrões para cada dia armazenada em relação à preparada no dia..... | 38 |
| TABELA 5.2: Curva de calibração..... | 39 |
| TABELA 5.3: Tempo de duplicação (t _D) da <i>Klebsiella sp</i> | 43 |
| TABELA 5.4: Quantidade de ensaios separados pela duração do crescimento bacteriano do controle..... | 43 |
| TABELA 5.5: Tempo de duplicação (t _D) das bactérias expostas à Tetraciclina..... | 48 |
| TABELA 5.6: Concentração efetiva (EC ₅₀) - Tetraciclina..... | 49 |
| TABELA 5.7: Legislação..... | 50 |
| TABELA 5.8: Tempo de duplicação (t _D) das bactérias frente ao Hg ²⁺ | 52 |
| TABELA 5.9: Concentração efetiva (EC ₅₀) - Hg ²⁺ | 53 |
| TABELA 5.10: Tempo de duplicação (t _D) das bactérias frente ao Cd ²⁺ | 56 |
| TABELA 5.11: Concentração efetiva (EC ₅₀) - Cd ²⁺ | 57 |
| TABELA 5.12: Tempo de duplicação (t _D) das bactérias frente ao Cu ²⁺ | 59 |
| TABELA 5.13: Concentração efetiva (EC ₅₀) - Cu ²⁺ | 60 |
| TABELA 5.14: Comparação dos resultados da EC ₅₀ e IC ₅₀ obtidos em 6 testes de toxicidade ao Hg ²⁺ e Cu ²⁺ (mg L ⁻¹)..... | 61 |
| TABELA 5.15: Tempo de duplicação (t _D) das bactérias frente ao detergente Laborhex 2... | 65 |

| | |
|--|----|
| TABELA 5.16: Concentração efetiva (EC_{50}) – Laborhex 2..... | 66 |
| TABELA 5.17: Tempo de duplicação (t_D) das bactérias frente ao detergente Riodeine..... | 69 |
| TABELA 5.18: Concentração efetiva (EC_{50}) – detergente Riodeine..... | 70 |
| TABELA 5.19: Comparação entre a EC_{50} dos princípios ativos dos detergentes Laborhex2 e Riodeine..... | 71 |

LISTA DE ABREVIATURAS

® - marca registrada

° C - graus Celsius (unidade de temperatura)

μL - microlitro (unidade de volume = 10⁻⁶ L)

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ATCC - Coleção de culturas tropicais americanas

CCT - Coleção de culturas tropicais

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental

CO₂ - dióxido de carbono

CO₃²⁻ - ânion carbonato

E. coli - bactéria *Escherichia coli*

EC - concentração efetiva

ed. - edição

FIA - Análise por Injeção em Fluxo (do inglês "Flow Injection Analysis")

g - grama (unidade de massa)

H₂O - água

H₂CO₃ - ácido carbônico

H⁺ - cátion de hidrogênio

HCO₃⁻ - ânion bicarbonato

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

IC - concentração de inibição

K. pneumoniae - bactéria *Klebsiella pneumoniae*

K₂HPO₄ - fosfato dibásico de potássio

KH₂PO₄ - fosfato monobásico de potássio

LC₅₀ - concentração letal

L - litro (unidade de volume)

MgSO₄ - sulfato de magnésio

min. - minutos

mL - mililitro (unidade de volume = 10⁻³ L)

mm - milímetro (unidade de comprimento = 10⁻³ m)

mmol - milimol (unidade de quantidade de matéria = 10⁻³ mol)

mol - unidade utilizada para indicar quantidade de matéria (corresponde a 6,02 x 10²³)

n. - número

NaCl - cloreto de sódio

Na₂CO₃ - carbonato de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

NH₄H₂PO₄ - sulfato monobásico de amônio

(NH₄)₂SO₄ - sulfato de amônio

p. - página

pH - potencial hidrogeniônico

t_D - tempo de duplicação (unidade de tempo em minutos)

v. - volume

RESUMO

Farah, Carolina Rittes Turato. Teste de toxicidade aguda: monitoração da respiração da bactéria *Klebsiella oxytoca* usando um sistema FIA/conducométrico. Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 86 p. Dissertação de Mestrado.

A caracterização física e química de uma substância ou mesmo de uma mistura de substâncias é muito importante, porém não fornece o potencial tóxico. A utilização de ensaios com organismos, ou seja, a aplicação de testes de toxicidade, pode suprir esta limitação. As bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* foram utilizadas como organismos-teste em testes de toxicidade, sendo esta última utilizada para fins de comparação. A estimulação/inibição do crescimento bacteriano foi quantificada pela medida da sua respiração, ou seja, do CO₂ produzido; que foi medido pelo sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), caracterizado por ser um método simples, que utiliza pequenos volumes de amostra, sensível e rápido na determinação. As bactérias foram expostas ao antibiótico tetraciclina, aos metais pesados Hg²⁺, Cd²⁺ e Cu²⁺ e a 2 detergentes hospitalares. Os resultados foram expressos em termos de EC₅₀ e tempo de duplicação (t_D). A *Klebsiella oxytoca* apresentou-se mais resistente do que a *E. coli*. A sensibilidade encontrada pela *Klebsiella oxytoca* aos metais foi Hg²⁺>Cd²⁺>Cu²⁺ e pela *E. coli*, Hg²⁺>Cu²⁺>Cd²⁺. Conclui-se que existe uma diferença na sensibilidade entre os organismos do mesmo nível trófico e a necessidade da bateria de ensaios.

Palavras Chaves: Toxicidade aguda, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, FIA, metais pesados.

1 INTRODUÇÃO

O homem, para melhorar o seu bem estar, tem utilizado os recursos do ambiente em que vive. Porém, nem sempre os utiliza corretamente, assim contribuindo, às vezes até para sua destruição. O crescimento demográfico juntamente com os processos de produção, onde matérias-primas são transformadas em uma multiplicidade de produtos, são um dos motivos da contaminação ambiental (BARRETTO, 1999).

Face aos problemas trazidos com a industrialização, métodos analíticos físicos e químicos foram desenvolvidos para a caracterização de seus produtos e também dos efluentes gerados por eles, já que de alguma forma serão descartados no ambiente. A caracterização física e química é muito importante, porém não fornece o potencial tóxico, ou seja, a sua toxicidade.

A toxicidade é uma resposta biológica (FERNÁNDEZ-ALBA *et alii*, 2001), ou seja, é a resposta de um organismo a um agente estressante. Os testes de toxicidade utilizam organismos para identificar a concentração que lhe é nociva e, assim poder estimar a concentração segura (NIPPER, 2000), ou a qual não é deletéria ao organismo em questão.

No século XVI, já dizia o alquimista e físico Theophrastus Phillippus Aureolus Bombastus von Hohenheim que "Todas as substâncias são venenosas. Não há nada que não seja venenoso. A dose é o que diferencia um veneno de um remédio". O necessário é a identificação e o controle de substâncias tóxicas em quantidades tóxicas (NIPPER, 2000).

Existem vários sistemas de avaliação da toxicidade e, basicamente 2 tipos de testes, o agudo e o crônico. O que os diferencia é o período de exposição do organismo ao agente tóxico,

sendo curto para o teste agudo e longo, para o crônico; e, portanto, fornecendo respostas rápidas e, demoradas.

Os ensaios toxicológicos podem ser usados para fornecer a toxicidade de compostos químicos que pretendem ser lançados no mercado, para se saber o provável efeito que efluentes, em geral, vão causar ao serem lançados no ambiente, para avaliar a qualidade de águas superficiais, e para verificar a eficiência e monitorar a qualidade do sistema de tratamento de efluentes (REGINATTO, 1998). Nestes últimos exemplos citados, a avaliação da toxicidade é um parâmetro importante pois fornece uma resposta completa considerando todos os constituintes de um efluente, com seus efeitos sinérgicos e antagônicos.

Os organismos comumente utilizados em testes de toxicidade que contribuem para uma avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos dos agentes tóxicos, são: bactérias, algas, moluscos, crustáceos, poliquetos e peixes. A resposta de apenas um teste é insuficiente para se estimar a concentração segura desses agentes tóxicos, pois a sensibilidade entre as espécies de organismos de um determinado ecossistema ao agente tóxico é muito diferente, portanto é recomendável empregar simultaneamente no mínimo 3 espécies de diferentes níveis da cadeia alimentar, a fim de se obter a toxicidade adequada (NIPPER, 2000).

Na Dinamarca, EUA e Suécia, segundo PEDERSEN e PETERSEN (1996), é obrigatória a avaliação toxicológica utilizando ensaios de toxicidade com vários organismos de diferentes níveis tróficos; tanto da substância química individual como da mistura delas, para a descarga do efluente industrial em águas superficiais. No Estado de São Paulo a partir da Resolução SMA-3 de 22/02/2000 que aprova a necessidade do controle ecotoxicológico de efluentes líquidos, começou a se exigir estudos de toxicidade de efluente industrial, considerando no mínimo 3 organismos aquáticos, assim incluindo mais um item ao artigo 18 da Lei n. 997 de 31/03/1976.

Com o intuito de colaborar com mais uma espécie para a realização de testes de toxicidade, este trabalho tem como finalidade propor um teste de toxicidade aguda com a bactéria *Klebsiella oxytoca*, monitorando-se a variação na concentração de CO₂ na suspensão bacteriana,

fruto do processo de respiração dos microrganismos, utilizando-se um sistema FIA/conduutométrico.

Dentre todos os processos bioquímicos que acontecem no interior das células/bactérias, provavelmente a respiração é um dos mais significativos como controle de crescimento da cultura microbiana. A monitoração desse parâmetro, ou seja, a produção de dióxido de carbono (CO_2), fornece de maneira precisa se está havendo o desenvolvimento microbiológico. Diferentemente, quando realizado pelo método mais usual, onde é monitorada a turbidez do meio de cultura, e conseqüentemente são computados tanto as células/microrganismos vivos quanto os mortos.

Dentre os vários métodos analíticos para determinação do dióxido de carbono em meio aquoso os mais importantes são: via alcalinidade, por arraste após acidificação da amostra, manometricamente, utilizando-se eletrodo íon-sensível, dentre outros. No entanto, em trabalhos envolvendo monitoração de crescimento bacteriano é importante a utilização de um método simples, que utiliza pequeno volume de amostra e que seja rápido, o que vem ao encontro do sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) (GUIMARÃES, 1990).

Segundo GIMENEZ (1994), o teste de toxicidade utilizado no presente trabalho possui vantagens com relação ao tempo de ensaio, custo e microrganismos passíveis de serem avaliados. A autora conclui que "este procedimento pode substituir os procedimentos clássicos de ensaios de sensibilidade à antibióticos, bem como os métodos freqüentemente usados para avaliação do potencial tóxico de desinfetantes de uso doméstico, hospitalar e industrial."

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica está dividida em três partes, conforme os assuntos de interesse: *Klebsiella* e *Escherichia coli*, teste de toxicidade e análise por injeção em fluxo (FIA).

3.1 *Klebsiella* e *Escherichia coli*

Como este trabalho é uma proposta de um teste de toxicidade aguda usando a bactéria *Klebsiella oxytoca* e um sistema FIA/condutométrico como ferramenta de monitoração, semelhante àquele utilizado com a bactéria *E. coli* e desenvolvido por GUIMARÃES (1990), um levantamento sobre as características e analogias entre estas bactérias, assim como a revisão de alguns termos, foi considerado necessário.

Na literatura relativa à área ambiental não se encontra disponível muita informação sobre a bactéria *Klebsiella*, diferentemente da área médica; e dentre as suas várias espécies, *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. oxytoca*, a primeira citada é a mais explorada; diferentemente da bactéria *E. coli*, que é largamente estudada.

Na tabela 3.1 é apresentada de uma forma sintetizada algumas características das bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae*). Quando possível, foram descritas características das outras espécies de *Klebsiella*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos estão divididos em gerais e específicos.

2.1 Objetivos Gerais

O presente estudo tem como meta principal a proposta de um teste de toxicidade aguda com a bactéria *Klebsiella oxytoca*, monitorando-se o processo de sua respiração, utilizando-se um sistema FIA/Conduutométrico.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos estão dispostos em itens:

- confecção e montagem do sistema FIA com detecção condutométrica;
- otimização do sistema FIA;
- escolha de uma linhagem de *Klebsiella* sp;
- otimização do meio de cultura em relação à fonte de carbono;
- cálculos do t_D (tempo de duplicação) das culturas;
- cálculos de EC_{50} (concentração efetiva) e,
- comparação entre *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*.

Os gêneros *Escherichia* e *Klebsiella* pertencem ao grupo coliforme da Família das *Enterobacteriaceae*. Coliforme é definido pelo APHA/AWWA/WEF (1995) como bactérias com características gram-negativas, não esporuladas, aeróbias facultativas, que fermentam lactose com a produção de gás, dentro de 48 horas, quando incubada à 35 °C, produzindo colônias vermelhas com brilho metálico dentro de 24 horas sobre meio tipo Endo, contendo lactose.

TABELA 3.1: Algumas características das bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*.

| Características | <i>Escherichia coli</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
|------------------------------------|--|--|
| Coliformes | Fecais ^a | Totais ^a |
| Morfologia | Bacilo ^{b, c} | Bacilo ^{b, c} |
| Habitat | Intestino grosso humano ^o | Intestino grosso humano ^o , solo ^c |
| Estrutura externa à parede celular | Flagelo | Cápsula |
| Função | Locomoção | Proteção (?) |
| Composição | Proteína ^c | Polissacarídeos, Polipeptídeos ^c |
| Tipo nutritivo | Quimiorganotrófico (heterotrófico) ^{c, d} | - |
| Exigências nutritivas | Simples ^c | Simples ^c |
| Metabolismo | Fermenta lactose com a produção de ácido e gás ^c | Fermenta glicose com a produção de ácido e gás (mais CO ₂ que H ₂) ^c |
| Condições atmosféricas | Anaeróbia facultativa ^a | Aeróbia facultativa ^a |
| Tempo de geração | 15 a 20 minutos ^d | - |
| Temperatura ótima de crescimento | 37 °C ^e | 35 – 37 °C ^c |

Obs.: Fontes: ^a APHA, AWWA, WEF, (1995); ^b MENSA *et alii*, (1994); ^c PELCZAR, REID e CHAN, (1980), ^d PELCZAR, CHAN e KRIEG, (1996); ^e GUIMARÃES, (1990)

A *Klebsiella* sp pertence ao grupo coliforme total, porém alguns ensaios microbiológicos podem positivar para testes de coliforme fecal e, a espécie de *Klebsiella* identificada é a *pneumoniae*. Isto ocorre porque de 30 a 40% da população normal de coliformes das fezes de humanos ou de animais de sangue quente são compostas de *Klebsiella* (APHA/AWWA/WEF, 1992). Esta bactéria é patogênica oportunista que pode dar origem a vários tipos de infecções no homem, como pneumonia e infecções urinária (MENSA *et alii*, 1994). A *E. coli* pertence ao grupo coliforme fecal e a probabilidade de incidência no intestino grosso humano é 100% (para a *Klebsiella*, 40-80%), sendo portanto, considerada indicadora específica de contaminação fecal e de possível presença de enteropatogênicos (AWWA/APHA/WEF, 1995).

No trabalho de GAUTHIER e ARCHIBALD (2001) as bactérias coliformes *Klebsiella* spp, *E. coli*, *Enterobacter* spp e *Citrobacter* spp, foram identificadas no sistema de tratamento de efluentes de 7 fábricas de papel do Canadá, sendo as espécies de *Klebsiella* as predominantes. No estudo se contesta os testes para determinação de coliformes fecais do AWWA/APHA/WEF (1998), pois os mesmos positivam não apenas para os coliformes fecais, mas também para organismos termotolerantes.

A *Klebsiella* sp, largamente distribuída na natureza, pode ser encontrada no solo promovendo fixação biológica de nitrogênio (*K. pneumoniae*), na água, na vegetação e no intestino grosso humano, também aparecendo em ambientes com alta concentração de nutrientes e, sendo predominantes nos efluentes de indústrias de papel, indústrias têxteis e de usinas de açúcar (AWWA/APHA/WEF, 1995). No trabalho de SUGIHARA, YOSHIMURA, MORI *et alii* (2000) da revista "Immunopharmacology" , caracteriza-se a *Klebsiella oxytoca* como sendo uma bactéria do solo.

O fato de algumas bactérias gram-negativas apresentarem alto teor de lipídeos na composição da parede celular e/ou serem capsuladas, confere fatores de virulência ou patogenicidade (PELCZAR, REID e CHAN, 1980). A *Klebsiella* sp, devido a sua cápsula polissacarídea, apresenta estrutura resistente aos desinfetantes e águas sanitárias, podendo reaparecer em grande escala nos sistemas de distribuição de água (AWWA/APHA/WEF, 1995).

Estas bactérias pertencem ao grupo quimiorganotrófico, ou seja, dependem da oxidação de compostos químicos em vez de uma fonte de luz (fototróficos) e necessitam de composto orgânico como fonte de carbono (heterotrófico), no lugar do CO₂ atmosférico (litotrófico). Tanto a *E. coli* como a *Klebsiella* não possuem exigências nutritivas especiais. A *E. coli*, cresce facilmente em meio de cultura simples, enquanto para a *Klebsiella* pode ser usado citrato e glicose como única fonte de carbono, e a amônia como fonte de nitrogênio. Para ambas, a glicose é fermentada com produção de ácido e gás (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

Na tabela 3.2 é apresentado um meio de cultura para bactérias quimiorganotróficas. A mesma tabela contida em outra referência dos mesmos autores (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996), está como meio específico para o cultivo da *E. coli* (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

TABELA 3.2: Meio quimicamente definido para uma bactéria heterotrófica

| Ingredientes | Função | Quantidade |
|--|---|------------|
| Glicose | Fonte de energia e de Carbono | 1 g |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | Fonte de nitrogênio, tampão e íons essenciais | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | Tampão e íons essenciais | 1 g |
| NaCl | Íons essenciais | 5 g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | Íons essenciais | 0,2 g |
| Água | Solvente | 1000 mL |

Fonte: PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996.

A reprodução da maioria das bactérias é a fissão binária: uma célula se divide formando duas e assim sucessivamente, portanto, tendo um crescimento populacional em progressão geométrica. Tempo de geração ou tempo de duplicação é o nome dado ao tempo necessário para que a população duplique. Este tempo não é o mesmo para todas as bactérias e depende da

composição do meio e das condições físicas de incubação. "As bactérias são capazes de crescer numa faixa ampla de condições físicas, podendo utilizar alimentos muito diferentes, mas seu crescimento ótimo requer condições específicas para uma dada espécie. Sob condições ótimas, pode-se facilmente determinar o tempo de geração de uma cultura bacteriana e analisar seu crescimento com o emprego de algumas expressões matemáticas" (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

É exemplificado, na figura 3.1, o comportamento do crescimento de uma mesma bactéria inoculada em meios com composições diferentes. Pode-se deduzir que as bactérias podem crescer nos dois meios. No tempo A, conclui-se que o meio II é mais eficiente, no tempo B, os meios revelam-se ser semelhantes e no tempo C, o meio I é mais eficiente. A escolha entre os meios estará em função do interesse na obtenção de um crescimento rápido - meio II, ou, no rendimento celular - meio I (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

A curva de crescimento de uma cultura bacteriana em um sistema fechado ocorre em 4 fases bem distintas e, está representada na figura 3.2 (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

1. Fase lag: corresponde ao período inicial. Não há aumento no número de bactérias viáveis, mas uma adaptação ao meio. Neste período as células aumentam de tamanho e ficam prontas para a divisão.
2. Fase Logarítmica ou Exponencial: corresponde ao período de crescimento rápido e máximo no número de bactérias viáveis.
3. Fase Estacionária: corresponde ao período onde o número de bactérias viáveis permanece constante. Há um equilíbrio entre o ritmo de reprodução e o ritmo de morte. Motivo: esgotamento de nutrientes essenciais e acúmulo de produtos metabólicos tóxicos.
4. Fase de Declínio ou Morte: corresponde ao período em que o número de bactérias viáveis decresce geometricamente (inverso da fase log). Ocorrem mais mortes do que produção.

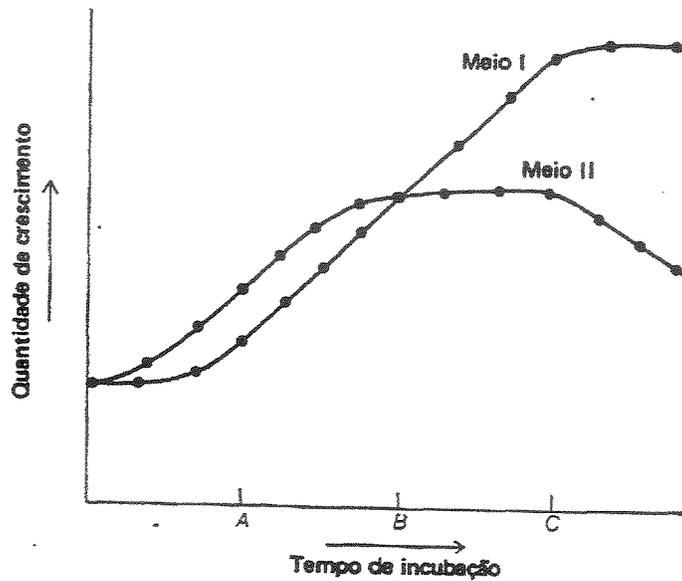


FIGURA 3.1: Resposta hipotética de crescimento de uma mesma bactéria em dois meios de composição diferente

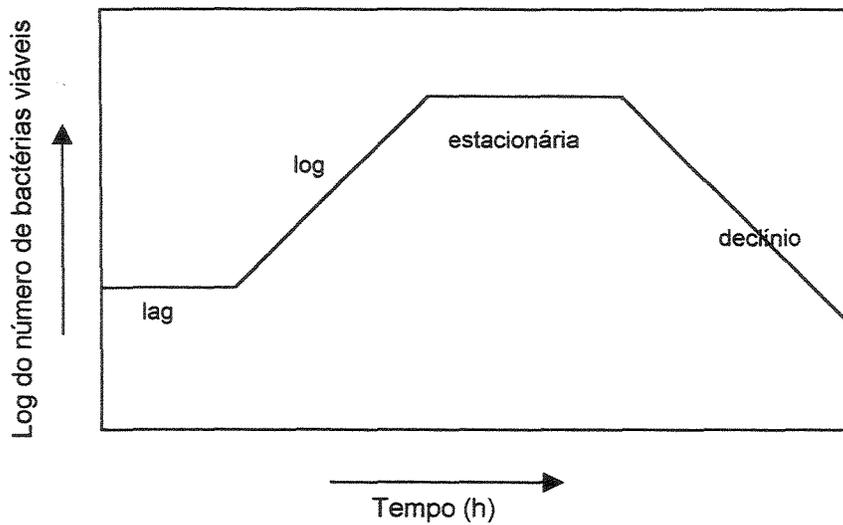


FIGURA 3.2: Curva de crescimento bacteriano típico

Existem vários métodos para avaliar o crescimento bacteriano. A tabela 3.3, enumera alguns deles, apresentando a unidade ao qual ele é expresso e ainda as suas vantagens e limitações.

TABELA 3.3: Resumo de alguns métodos para medida do crescimento bacteriano

| Método | Unidade do crescimento | Vantagens e limitações |
|-----------------------------|---|---|
| Contagem microscópica | Células/mL | Quantificação de células viáveis e mortas |
| Contagem celular eletrônica | Células/mL | Quantificação de células viáveis e mortas |
| Contagem em placa | Unidades formadoras de colônia/mL ou g | Quantificação da população viável |
| Membrana filtrante | Unidades formadoras de colônia/mL ou g | Quantificação da população viável |
| Turbidez | Células/mL (medida indireta) | Quantificação de células viáveis e mortas |
| Conteúdo de nitrogênio | mg de N/mL | Aplicável à espécies livres de qualquer fonte de nitrogênio |
| Massa seca | mg de células/mL | Aplicável somente a suspensões celulares muito densas |
| Produtos metabólicos | Quantidade de produto/mL (medida indireta) | Muito empregada em testes de toxicidade |

Fonte: Montada a partir de PELCZAR, CHAN e KRIEG (1996) e PELCZAR, REID e CHAN (1980) e modificada.

3.2 Teste de Toxicidade

Testes de toxicidade são baseados no uso de material vivo para definir a natureza e o grau de efeitos nocivos produzido por um simples agente tóxico ou por uma mistura de agentes

tóxicos. Nesse tipo de ensaio, certos organismos selecionados são usualmente expostos a um potencial contaminante por um certo período de tempo. Procura-se assim determinar o LC₅₀ (concentração letal), a qual é a concentração da substância tóxica que causa a morte de 50% dos organismos expostos num determinado tempo. Os testes de toxicidade também podem ser feitos para se determinar EC₅₀ (concentração efetiva) a qual difere de LC₅₀ por permitir que se avalie inúmeros parâmetros tais como a imobilidade, a taxa de respiração, a alimentação, a contagem de células do sangue, as taxas de reprodução e de crescimento, dentre outros (GUIMARÃES, 1990).

Os testes de toxicidade são categorizados por subdivisões baseadas na duração do teste, isto é, sobre o período de exposição ou sobre o período de observação, se ambos diferirem. Os dois mais utilizados compreendem a exposição crônica e a exposição aguda (GUIMARÃES, 1990).

Toxicidade crônica é aquela resultante da exposição por um período de tempo muito longo, pelo menos algumas semanas de duração, geralmente numa significativa proporção do tempo de vida do organismo (GUIMARÃES e JARDIM, 1996).

A toxicidade aguda de uma substância num ambiente aquático é normalmente expressa como a concentração da substância na água a qual produz um efeito nocivo em 50% dos organismos num curto período de exposição (GUIMARÃES e JARDIM, 1996).

Os organismos comumente utilizados nos testes de toxicidade são: bactérias (BITTON e DUTKA, 1986), algas (REGINATTO, 1998), fitoplâncton (MUNAWAR e MUNAWAR, 1987), plantas aquáticas, protozoários, corais, anelídeos, moluscos, microcrustáceos e macrocrustáceos, insetos aquáticos (McKEE, 1980), peixes entre outros.

Entre os testes com bactérias, tem-se:

- a) pH de inibição: o método consiste em se observar e correlacionar o crescimento da bactéria *K. pneumoniae* com a variação do pH do meio, que aumenta constantemente (ISHII e YOSHIKAWA, 1993);

- b) ATP: o efeito inibitório sobre a adenosina trifosfato via determinação da produção de luz resultante da transformação da luciferase à luciferina (KENNICUTT, 1980);
- c) Luminescência: a redução da luminescência emitida naturalmente pela bactéria, *Photobacterium phosphoreum*, atualmente denominada de *Vibrio fisheri*, quando em contato com um agente tóxico, pela inibição da enzima luciferase (COLEMAN e QURESHI, 1985);
- d) Respiração: inibição da concentração de CO₂ produzida pela *E. coli* através de medida potenciométrica (DOWARD e BARISAS, 1984) ou FIA/Conducométrico (GUIMARÃES, 1990); ou pela medida do oxigênio dissolvido em um meio enriquecido com cultura nitrificante, na presença de concentrações conhecidas do íon amônio (GERNAEY *et alii*, 1997); e,
- e) entre outros.

A atividade bioquímica de alguns ecossistemas microbianos pode ser avaliada pela produção do CO₂ resultante da respiração. A inibição ou estimulação, causada quando o microrganismo está em contato com algum agente potencialmente tóxico pode alterar a concentração do CO₂ produzido. A monitoração do CO₂ pode ser usada como um parâmetro em teste de toxicidade.

GUIMARÃES (1990) monitorou a inibição do processo de respiração da bactéria *E. coli* quando na presença de substâncias potencialmente tóxicas, como: alguns tipos de sedimentos, metais (cobre, cádmio, níquel e mercúrio), efluentes industriais e lodo de estação de tratamento eletrolítico de esgoto hospitalar. GUIMARÃES (1993) usou o mesmo método para verificar os efeitos sinérgicos e antagônicos entre os componentes de combustível automotivo (metanol, etanol e gasolina) testando os componentes individualmente e depois conjuntamente. Esta espécie é de fácil cultivo em laboratório e mostra uma alta produção de CO₂. JARDIM, MORAES e TAKIYAMA (1997) usaram o mesmo método para avaliar se na fotodegradação de compostos aromáticos clorados, as espécies formadas durante o processo eram mais ou menos tóxicas que as de origem.

Os testes de toxicidade são realizados para avaliar os efeitos causados sobre a biota por uma substância ou pela combinação de várias substâncias. Algumas substâncias podem não ser tóxicas a algumas espécies, mas as mesmas estarão sujeitas a esta toxicidade através da cadeia alimentar (AWWA/APHA/WEF, 1995). O efeito tóxico de uma substância sobre um organismo de determinada espécie não pode ser extrapolado para outras espécies. Para a avaliação mais adequada recomenda-se o uso de uma bateria de ensaios com organismos representantes de diferentes níveis da cadeia alimentar (REGINATTO, 1998; GIMENEZ, 1994).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando uma bateria de testes de toxicidade com organismos de diferentes níveis tróficos no intuito de se verificar a variação de sensibilidade entre os organismos frente a diferentes agentes tóxicos.

Como exemplo da sensibilidade entre organismos de diferentes espécies frente ao mesmo agente estressante, no trabalho de PAWLOWSKY *et alii* (1998) foram realizados testes de toxicidade aguda com quatro organismos aquáticos de níveis diferentes na cadeia alimentar: microcrustáceo (*Daphnia magna*), alga (*Scenedesmus subspicatus*), bactéria (*Photobacterium phosphoreum*) e peixe (*Brachydanio rerio*), para avaliar a toxicidade de um efluente de uma indústria de produção de pesticidas. Dos organismos mais sensíveis para o menos sensíveis ao teste, foram: alga, microcrustáceo, peixe e bactéria.

No trabalho de PEDERSEN e PETERSEN (1996) verificou-se a toxicidade conjunta, ou seja, avaliou-se os efeitos tóxicos de 2 substâncias químicas individuais e a composição de 5, 10, 15 e 20 substâncias químicas, pois numa mistura, qualquer substância poderá contribuir mais ou menos para a toxicidade, classificando-se em toxicidade antagônica, se esta diminuir, sinérgica, se aumentar, ou aditiva, se somar. Para esta pesquisa foram utilizados 5 organismos: alga verde (*Rhaphidocellis subcapitata*), microcrustáceo (*Daphnia magna*), peixe (*Brachydanio rerio*), macrófito (*Lemna minor*) e bactéria (*Vibrio fisheri*).

A toxicidade aguda de 5 pesticidas foi determinada, tanto individualmente, como na mistura, usando a resposta de 3 organismos, a bactéria *Vibrio fisheri*, o invertebrado aquático *Daphnia magna* e o ensaio "MitoScan[®]". Efeitos sinérgicos e antagônicos foram observados entre

a mistura é o pesticida puro. A *Daphnia* foi a mais sensível e a mais capaz de detectar as interações na mistura (FERNÁNDEZ ALBA *et alii*, 2001).

No trabalho de TISLER e ZAGORC-KONCAN (1999), é apontada a importância da medida da toxicidade do efluente com vários organismos, ao lado de determinações químicas. Em seu estudo, 3 amostras compostas de efluentes foram testadas com 2 diferentes espécies de organismos, *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, e a comparação entre as análises químicas e toxicológicas foram as ferramentas para comprovar a principal causa do efeito tóxico inerente a apenas um organismo.

A especiação química é fator que deve ser considerado quando se analisa metais em testes de toxicidade, porque a parte biodisponível ou aquela que se encontra disponível para ser assimilada pelos seres vivos depende das formas físico-química em que o metal está distribuído. Desta forma, a concentração total de um metal fornece pouca informação sobre a sua biodisponibilidade e conseqüentemente sobre sua toxicidade (ALLEN e HASEN, 1996).

A definição de especiação de um elemento, recomendada pela IUPAC, é a distribuição do mesmo entre as espécies químicas no sistema em estudo. Através da análise de especiação química determina-se a atividade do elemento no sistema e a concentração de uma ou mais espécies químicas na amostra (TEMPLETON *et alii*, 2000).

Estudos (BARRETTO, 1994, SILVA, 1996) evidenciam que se deve considerar a especiação do metal para se avaliar o seu verdadeiro impacto em um determinado compartimento do ecossistema, ou seja, saber em quais formas químicas este está presente no sistema, uma vez que a reatividade biológica dos metais está mais relacionada com a atividade do íon livre do que com as formas complexadas.

Um dos resultados mais graves da persistência dos metais é a sua ampliação biológica na cadeia trófica. Como conseqüência deste processo, os níveis de metais nos níveis superiores da cadeia podem alcançar ordens de magnitude superiores aos que se encontram no ar ou na água.

Eles podem fazer com que muitas plantas ou animais cheguem a constituir um perigo para a saúde ao se utilizá-los como alimento (Stocker & Seager, 1981 *apud* BARRETTO, 1994).

3.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

A automação e/ou mecanização de processos em química analítica está diretamente relacionada com as demandas da sociedade moderna. O desenvolvimento de novos produtos na indústria química, as análises clínicas (saúde pública) e mais recentemente o monitoramento da qualidade do meio ambiente, em estudos relacionados ao controle de poluição, provocaram um aumento significativo na demanda de análises "per capita"/ano. Isto fez com que os processos fossem sendo automatizados, o tempo de análise reduzido, e os resultados menos sujeitos a erros humanos. A automação, num sentido mais amplo, possui a capacidade de eliminar, parcial ou completamente, a intervenção humana em um método de análise química.

O processo de análise química por injeção em fluxo foi proposto em 1975 pelo Dr. Jaromir Ruzicka, professor da Universidade Técnica da Dinamarca. Na mesma época, o mesmo esteve no Brasil assessorando a instalação do laboratório de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), saindo daí os primeiros trabalhos publicados desse assunto (REIS, 1996).

Segundo VAN DER LINDEN (1994), a denominação *Análise em Fluxo* é um nome genérico atribuído para todos os métodos analíticos que são baseados na introdução e processamento (tratamento) da amostra num meio o qual esteja fluindo e, *Análise por Injeção em Fluxo* (FIA, do inglês "Flow Injection Analysis") é um processo analítico automático ou semi-automático onde as amostras são inseridas num fluxo carregador, sem a presença de bolhas de ar, que a transporta até o detector. No momento da detecção nem o equilíbrio físico (homogeneização no fluxo) nem o equilíbrio químico (reação completa) são necessariamente alcançados.

Na figura 3.3 é apresentado um sistema FIA simplificado e esquematizado, como também, a sua forma de registro (CLARK *et alii*, 1990). O sistema é fechado, ou seja, quando a amostra é injetada no fluxo carregador, as reações químicas que ocorrem e a detecção são realizadas sem o contato externo, evitando, assim, a perda de analito quando da geração de espécies gasosas (REIS, 1996).

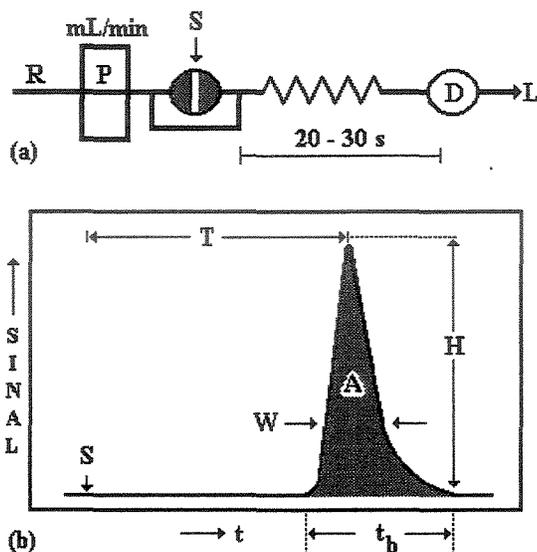


FIGURA 3.3: Esquema do sistema FIA simplificado e forma de registro. (a) Sistema FIA de linha única, onde a amostra (S) é injetada num fluxo carregador (R), movimentado por uma bomba peristáltica (P), detectada em (D) e o descarte (L). (b) Parâmetros usualmente utilizados para caracterizar um sistema FIA de linha única, onde (W) é a largura do pico, (H) a sua altura, (A) sua área, (T) o tempo de residência e (t_b) a largura do pico na base.

Segundo VALCARCEL e LUQUE DE CASTRO (1984) os métodos automáticos de análise podem ser classificados em: (a) Métodos Automáticos Descontínuos; (b) Métodos Automáticos Contínuos; e (c) Métodos Robotizados, dependendo da metodologia empregada.

Nos métodos contínuos, a concentração da espécie de interesse é medida sem a interrupção do fluxo dos reagentes. Os dois tipos de sistemas que podem ser utilizados nos métodos contínuos são os segmentados e os não segmentados. No primeiro, os métodos contínuos segmentados, as amostras são aspiradas sequencialmente e entre elas são incluídas

bolhas de ar que segmentam o fluxo e são eliminadas antes que o fluxo atinja o sistema de detecção (RUZICKA e HANSEN, 1988).

As técnicas de análise em fluxo contínuo apresentam, normalmente, uma alta frequência analítica, baixo consumo de amostras e reagentes, alta precisão e/ou exatidão, alta sensibilidade e baixo custo de equipamentos e operação. Além disso, apresentam uma alta versatilidade, podendo numa mesma amostra serem realizadas várias determinações simultâneas, além da possibilidade de se trabalhar com amostras de alta viscosidade, turvas, que apresentam particulados, etc... (HORVAI e PUNGOR, 1987).

Para aumentar a seletividade na determinação de uma espécie de interesse, usando FIA, inúmeros processos de separação têm sido explorados. Dentre eles, a separação por precipitação, extração por solventes, diálise e difusão. De todas essas técnicas de separação, a difusão através de membranas semi-permeáveis tem sido considerada como altamente seletiva, visto que poucas espécies são geradas como gases à temperatura ambiente, diminuindo consideravelmente o problema de interferentes (MOTOMIZU *et alii*, 1987).

O processo FIA, durante estes 20 anos, evoluiu muito no que diz respeito aos injetores automáticos, também na aquisição e processamento de dados e na determinação multielementar. Porém, apesar destas sofisticções, encontram-se muitos trabalhos que empregam os injetores manuais e, o sinal gerado pelo detector é ainda monitorado com registrador potenciométrico, como feito inicialmente (REIS, 1996).

Sabes-se que o sucesso do processo depende do conhecimento das reações químicas e da otimização das variáveis envolvidas. Este processo utiliza instrumentação de baixo custo, pouca vidraria e baixo consumo de reagente, sendo este último item muito importante "quando é inevitável o uso de um reagente poluente, o emprego deste processo de análise química, diminui o impacto ambiental que pode ser causado pelo mesmo" (REIS, 1996).

4 METODOLOGIA

A metodologia está dividida em procedimento do teste de toxicidade, determinação do CO₂ pelo sistema FIA e preparação das soluções dos compostos avaliados.

4.1 Procedimento do teste de toxicidade

Os testes de toxicidade aguda com a *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli* são baseados na inibição/estimulação da respiração microbiana (medida via CO₂) causada pelos compostos a serem avaliados quanto a sua toxicidade.

4.1.1 Preparação do meio de cultura e Inoculação da bactéria

Este item está subdividido em reagentes, soluções estoque, organismo teste, equipamentos e acessórios, preparação do meio de cultura, inoculação da bactéria e ensaio de toxicidade.

4.1.1.1 Reagentes

Potássio fosfato dibásico p.a.: K_2HPO_4 (Synth)

Potássio fosfato monobásico p.a.: KH_2PO_4 (MERCK)

Cloreto de sódio p.a.: NaCl (Synth)

Sulfato de amônio p.a.: $(NH_4)_2SO_4$ (MERCK)

Sulfato de magnésio p.a.: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (MERCK)

Ácido cítrico p.a.: $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ (MERCK)

Hidróxido de sódio p.a.: NaOH (MERCK)

D-Glucose anidra p.a.: $CH_2OH(CHOH)_4CHO$ (Reagentes ECIBRA[®])

4.1.1.2 Soluções estoque

NaOH 4,0 mol L⁻¹: para 100 mL de solução, são necessários 16 g de NaOH.

4.1.1.3 Organismos teste

Os organismos utilizados foram as bactérias *Klebsiella oxytoca* (CCT0182/CIP79.32) e *Escherichia coli* (ATCC25922/CCT1457). A *Klebsiella oxytoca* foi a escolhida entre as espécies de *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (ATCC13883/CCT0184) e *Klebsiella pneumoniae ssp ozanae* (ATCC11296/CCT4061). As bactérias foram adquiridas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello".

4.1.1.4 Equipamentos e Acessórios

Balança analítica METTLER TOLEDO, MODELO AB204

Agitador magnético NOVA TÉCNICA, modelo NT101

pHmetro ORION, modelo 250A

Forno microondas

Geladeira

Haste de platina

Câmara de fluxo laminar VECO, modelo VLSF-12

Bico de Bunsen

Estufa de cultura bacteriológica FABBE-PRIMAR - modelo 216

Banho-maria Quimis[®] - modelo Q-215

Autoclave SOC. FABBE Ltda. - modelo 103

Erlenmeyers de 1L e 125mL

Tampão de algodão

Cronômetro

4.1.1.5 Preparação do Meio de Cultura

A preparação do meio de cultura foi feita segundo DOWARD e BARISAS, (1984), com apenas uma diminuição de 0,6 g na quantidade de $MgSO_4$ para evitar a formação do precipitado $Mg(NH_4)(PO_4)s$. Para 1 L de meio de cultura:

- 1,6 g de K_2HPO_4 ; 1,6 g de KH_2PO_4 ; 1,0 g de NaCl; 4,0 g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,1 g de $MgSO_4$ e 0,3g de ácido cítrico;
- em um Erlenmeyer de 1 L, com aproximadamente 800 mL de água destilada adicionar os reagentes e homogeneizar;
- ajustar o pH para 7, 2 usando uma solução de NaOH 4 mol L^{-1} ;

- d) aquecer até a ebulição por 15 minutos, para esterilizar o meio e retirar os gases presentes, fechando-o imediatamente com tampão de algodão;
- e) resfriar até aproximadamente 90 °C e adicionar 2,5 g de glicose;
- f) resfriar até temperatura ambiente;
- g) reservar em um Erlenmeyer de 125 mL, 75 mL deste meio e tampar. O restante armazenar em geladeira (não esquecer de mantê-lo sempre tampado).

4.1.1.6 Inoculação da Bactéria

- a) na câmara de fluxo laminar com uma chama, retirar, com o auxílio de uma haste de platina esterilizada na chama, uma porção de bactéria, imobilizada em agar, do tubo de ensaio e colocá-la no Erlenmeyer com os 75 mL de meio de cultura reservado;
- b) colocá-lo na estufa à 37 °C. Após aproximadamente 12 horas o meio inoculado se apresentará turvo (suspensão de bactéria), o que indica crescimento bacteriano;

4.1.1.7 Ensaio de Toxicidade

- a) separar 100 mL do meio de cultura que estava na geladeira, em um Erlenmeyer de 125 mL, pois este atuará como branco, e colocá-los em um banho-maria à 37 °C;
- b) adicionar ao Erlenmeyer de 1 L um volume de suspensão de bactéria que apresente uma concentração de CO₂ de 0,25 mmol L⁻¹
- c) monitorar o crescimento da bactéria através da concentração de CO₂ pelo FIA até que esta atinja aproximadamente 0,50 mmol L⁻¹ de CO₂;
- d) cuidadosamente, transferir alíquotas de 100 mL desta suspensão estoque de bactérias para Erlenmeyers de 125 mL, os quais conterão o agente tóxico em análise;
- e) tampar e colocar no banho-maria a 37 °C e monitorar com o sistema FIA a cada 20 minutos de acordo com a seguinte ordem de análise: primeiramente analisa-se o controle (Erlenmeyer

contendo apenas a suspensão bacteriana); em seguida o branco (Erlenmeyer contendo apenas meio de cultura), as culturas contaminadas e finalmente outro controle.

- f) a concentração de CO_2 nos diversos frascos é obtida por interpolação na curva de calibração (GUIMARÃES e JARDIM, 1996), que estará detalhado no item 4.2.4.2.2;
- g) após o ensaio, os materiais utilizados com os microrganismos devem ser autoclavados ou lavados com detergente hospitalar.

4.2 Determinação do CO_2 pelo sistema FIA

Este item está subdividido em reagentes, soluções estoque, equipamentos e acessórios e sistema FIA.

4.2.1 Reagentes

Água desionizada (Milli-Q):

Ácido sulfúrico concentrado: H_2SO_4 (Synth)

Carbonato de sódio: Na_2CO_3 (Synth)

4.2.2 Soluções estoque

H_2SO_4 0,2 mol L^{-1} : para 1 L de solução, são necessários 11 mL de H_2SO_4 concentrado.

Na_2CO_3 0,1 mol L^{-1} : uma quantidade de Na_2CO_3 foi colocada em uma cápsula de porcelana e aquecida na mufla até 270 °C, e mantida nesta temperatura por 1 hora. Em seguida foi colocada em dessecador para resfriar até a temperatura ambiente. Foram pesados 14,0 g desse sal e avolumado para 1 litro em balão volumétrico com água destilada, desionizada e desgazeificada.

A solução foi transferida para um frasco de polietileno e fechado imediatamente, para evitar a absorção de CO₂ do ar. Toda vidraria utilizada foi calibrada. Para a construção da curva de calibração foram utilizadas as diluições da solução estoque 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 4,00 mmol L⁻¹ de CO₂ (GUIMARÃES, 1990). Este intervalo de concentração é utilizado porque equivale ao crescimento bacteriano representado pela fase log ou exponencial, que corresponde ao período de crescimento rápido e máximo no número de bactérias viáveis.

4.2.3 Equipamentos e Acessórios

Bomba peristáltica ISMATEC, modelo 78017-10 (velocidade 30)

Condutivímetro Analyser - modelo 650

Registrador Cole Parmer - modelo 201 B-1449

Válvula de injeção/comutação (volume da alça de polietileno 100 µL)

Cela de difusão (2 peças de acrílico com ranhura, apresentando profundidade de 0,1 mm; largura de 3 mm e comprimento de 100 mm)

Cela de condutividade constituída de 2 cilindros concêntricos (volume de 50 µL)

Desionizador de água MILLIPORE, modelo Milli-Q Académic

Coluna de troca iônica: aniônica e catiônica

Membrana de Teflon[®] (PTFE), 0,1 mm (made in France)

Condutores de reagentes: sonda de polietileno, CPL medical's com diâmetro interno de 0,8 mm;

tubos de Tygon com diâmetro interno de 1,14 mm

Pipeta automática LABSYSTEMS de volume variável de 200 a 1000 µL

Balões volumétricos de 100mL e 1L

4.2.4 Sistema FIA

Este item está subdividido em funcionamento do sistema FIA e quantificação da concentração de CO₂.

4.2.4.1 Funcionamento do sistema FIA

O sistema FIA utilizado é o mesmo desenvolvido por JARDIM e colaboradores (1990) em testes de toxicidade aguda, porém com uma pequena modificação: a amostra, neste trabalho, foi injetada diretamente no fluxo da solução de ácido sulfúrico, diminuindo, assim, 1 linha do sistema.

O sistema FIA, para o ensaio de toxicidade, é constituído de bomba peristáltica, válvula de injeção/comutação de amostras ou padrões, cela de difusão, cela de condutividade, tubos condutores de reagentes, resinas de troca iônica, condutivímetro, registrador e banho-maria. O esquema está apresentado na figura 4.1.

O sistema utiliza 3 linhas de condução: uma de água desionizada que se constitui no fluxo receptor, outra de H₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹, que se constitui no fluxo carregador, e, por último a linha onde são injetadas as amostras ou padrões.

A condutividade da água desionizada deve apresentar-se constante para o início do ensaio e antes da injeção da amostra. A vazão de cada linha foi aproximadamente 2,26 mL min⁻¹. O banho-maria manteve a temperatura das amostras e padrões à 37 °C. A injeção da amostra ou padrão somente pode ocorrer quando estas preencheram a alça de polietileno de 100 µL. O injetor/comutador, como representado na figura 4.2, possui 2 posições (a) e (b). A posição (a) condiz com a amostra ou padrão preenchendo a alça de polietileno e indo para o descarte. A posição (b), com o ácido carregando (fluxo carregador) a amostra ou padrão para a cela de

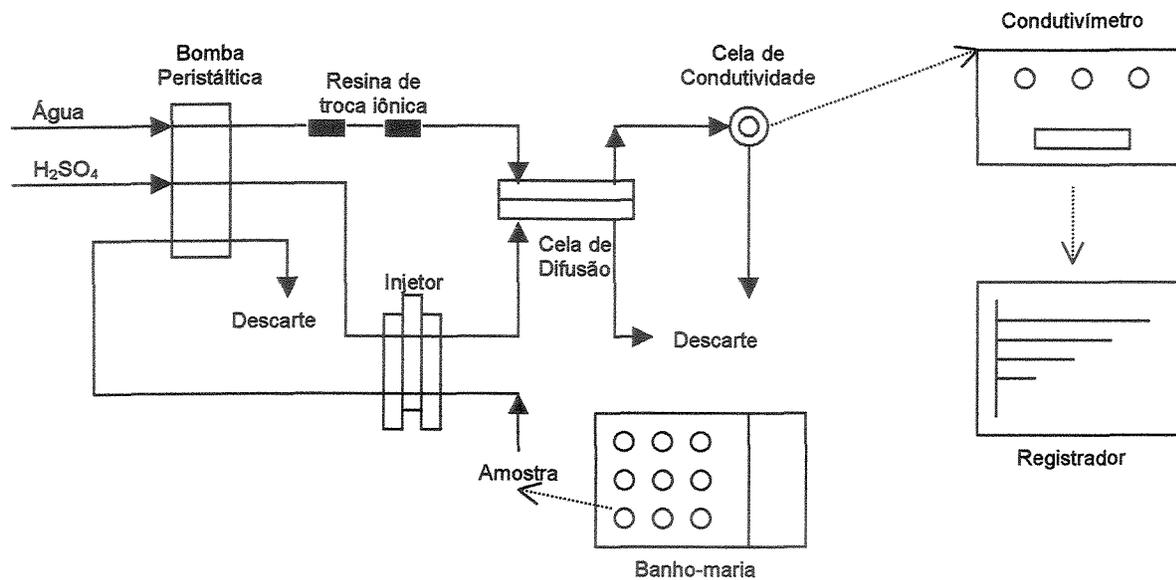
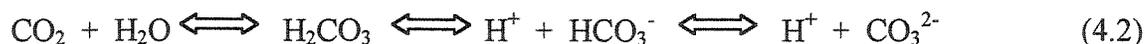


FIGURA 4.1: Esquema do sistema FIA/conducométrico utilizado para a determinação da concentração de CO₂ em ensaios de toxicidade.

difusão, pois nesta posição o ácido é obrigado a passar pela alça de polietileno e transportar, então, a porção injetada. Para se injetar novas amostras, deve-se voltar o injetor para a posição (a), esperar o preenchimento da alça de polietileno e ir para a posição (b).

Entre o injetor/comutador e cela de difusão, há uma difusão da amostra e reações dos compostos carbônicos no meio. O ácido faz com que o equilíbrio da reação da equação 4.2 seja deslocado para a formação do CO₂.



A cela de difusão, como representada na figura 4.3, constitui-se de 2 peças de acrílico com ranhura separadas por uma membrana de Teflon[®]. De um lado desta membrana, passa o fluxo receptor e do outro, o fluxo carregador. Se no fluxo carregador estiver formado CO₂, parte desse gás permeará pela membrana indo para o fluxo receptor (água) deslocando o equilíbrio para a formação de íons bicarbonato, H⁺ e carbonato como representado na reação de equação (4.2).

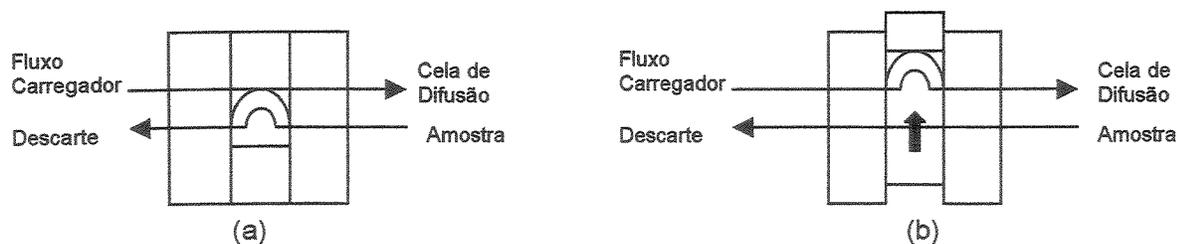


FIGURA 4.2: Esquema do injetor/comutador de acrílico utilizado no sistema FIA/conducométrico, onde  - alça de polietileno, (a) - posição em que a alça de polietileno é preenchida pela amostra ou padrão, (b) - posição em que o fluxo carregador transporta a amostra ou padrão para a cela de difusão.

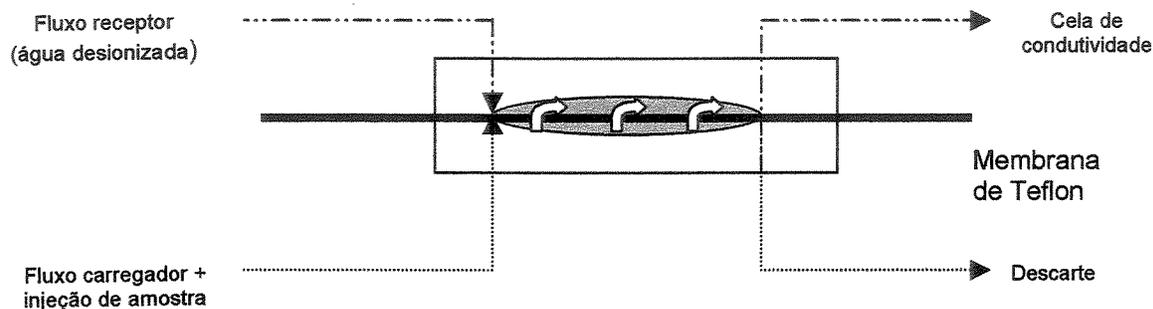


Figura 4.3: Esquema da cela de difusão de acrílico utilizado no sistema FIA/conducométrico com vista superior, com ranhura de 0,1 mm de profundidade, 3 mm de largura e 100 mm de comprimento,  - CO_2 permeando a membrana de teflon.

Como esse último fluxo vem sendo monitorado constantemente em uma cela de condutividade conectada a um condutímetro, a presença desses íons provoca uma alteração nesse parâmetro, a qual é proporcional à concentração das espécies carbônicas na amostra. O registrador recebe a informação e a registra em forma de picos.

No Apêndice, fotos apresentam o sistema Fia/conducométrico usado no teste de toxicidade.

4.2.4.2 Quantificação da concentração de CO₂ e crescimento bacteriano

Este item apresenta-se dividido em curva de calibração, cálculo da concentração de CO₂, do tempo de duplicação e da concentração efetiva.

4.2.4.2.1 Curva de calibração

Para a quantificação da concentração de CO₂ no sistema FIA, faz-se necessária a construção de uma curva de calibração. Como mencionado anteriormente, a condutividade é proporcional à concentração de CO₂ e à intensidade do sinal registrado no registrador em forma de picos. A figura 4.4. é uma reprodução dos sinais obtidos no registrador da curva de calibração denominada de fiagrama.

A partir do fiagrama, é plotada a concentração de cada diluição dos padrões pela altura dos picos registrados e como mostrada na figura 4.5, nota-se que os pontos não estão sobre uma reta, e sim há uma tendência em estabilizar num valor máximo de altura para padrões com altas concentrações.

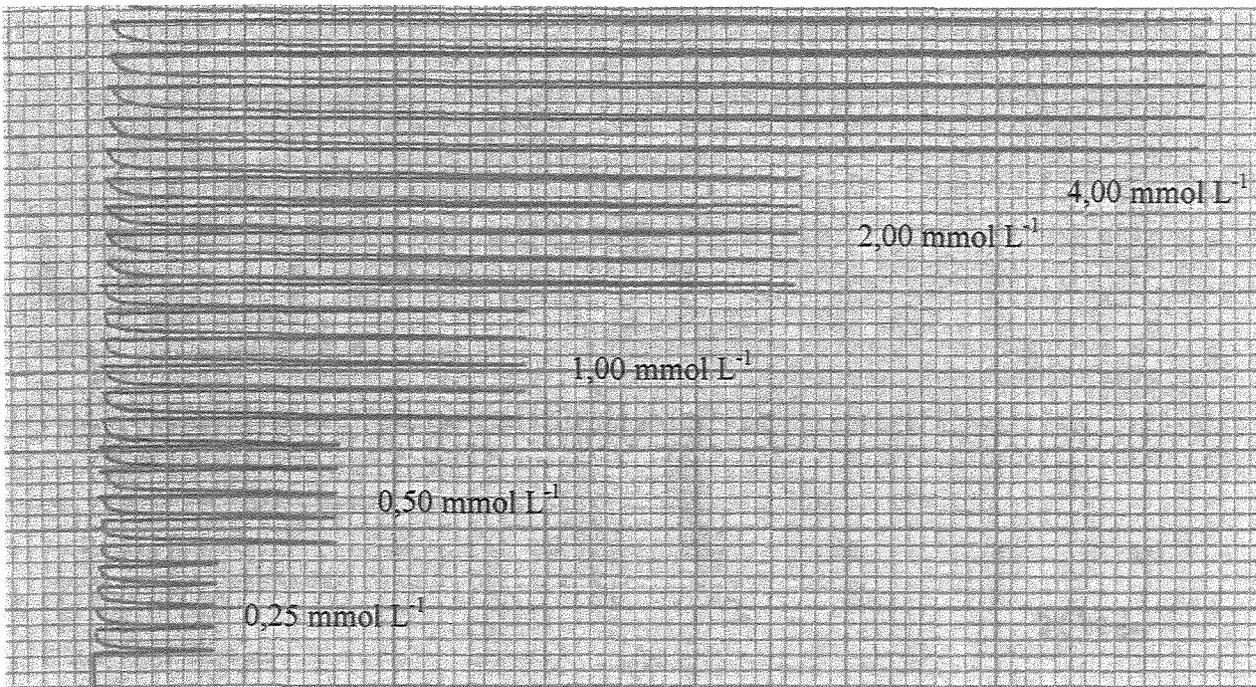


FIGURA 4.4: Diagrama resultante de sinais obtidos da curva de calibração do intervalo de concentração entre 0,25 mmol L⁻¹ a 4,00 mmol L⁻¹ de CO₂ no registrador

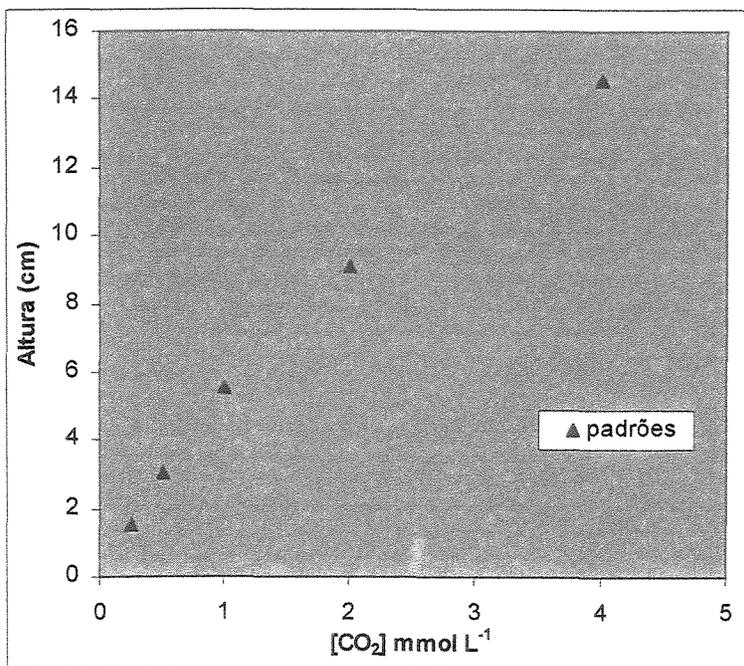


FIGURA 4.5: Altura dos picos registrados (cm) pela concentração da curva de calibração

Linearizando estes resultados por meio de uma regressão de potência, obtém-se uma reta, com coeficientes de correlação, geralmente, próximos à 0,999, como apresentado na figura 4.6.

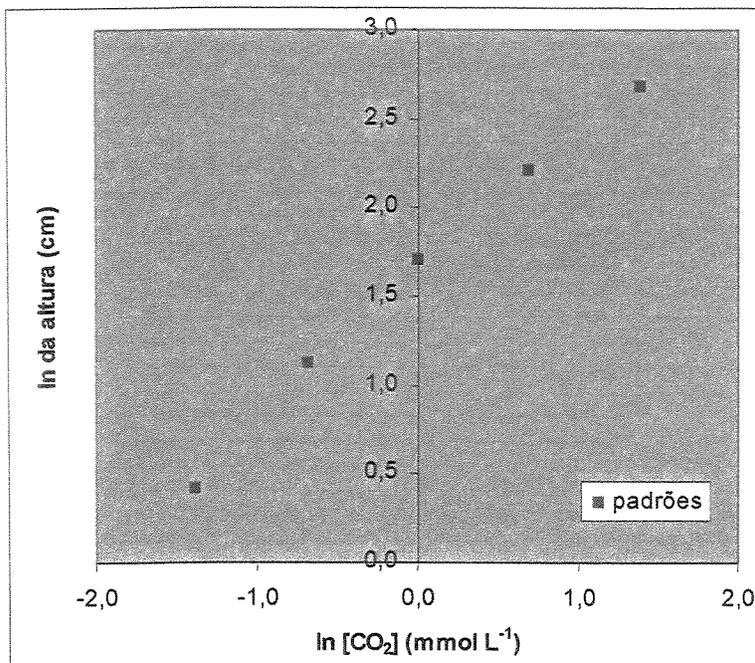


FIGURA 4.6: Curva de calibração linearizada.

As concentrações das amostras são determinadas por interpolação nesta última reta.

4.2.4.2.2 Cálculo da concentração de CO₂, do tempo de duplicação (t_D) e da concentração efetiva (EC)

Os parâmetros calculados para efeito de comparação entre os vários níveis de concentração foram: EC_{50} que é a concentração efetiva que inibe a respiração das bactérias em 50%; e, t_D , que é o tempo de duplicação da concentração de dióxido de carbono no meio de cultura (ou do número de bactérias).

Gimenez (1994) relacionou a $[\text{CO}_2]$ produzida pelas bactérias *E. coli* no FIA com a população microbiana (células/mL) medida pela turbidez. Na tabela 4.1 está apresentado os seus resultados. O meio de cultura utilizado, denominado Meio Mínimo, é muito parecido com o utilizado neste trabalho, e, é composto por 7 g de K_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de citrato de sódio e 20 g de glicose resultando em 1 L de meio.

Tabela 4.1: População microbiana associada à concentração de CO_2 produzida no ensaio com *E. coli* em Meio Mínimo

| Tempo (min) | $[\text{CO}_2]$ mmol L^{-1} | Absorbância 420 nm | População (10^6 células/mL) |
|-------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 0 | $0,32 \pm 0,02$ | $0,049 \pm 0,001$ | 824 |
| 20 | $0,45 \pm 0,11$ | $0,061 \pm 0,004$ | 904 |
| 40 | $0,74 \pm 0,10$ | $0,092 \pm 0,002$ | 1112 |
| 60 | $1,11 \pm 0,08$ | $0,128 \pm 0,001$ | 1352 |
| 80 | $1,62 \pm 0,05$ | $0,190 \pm 0,002$ | 1667 |
| 100 | $2,09 \pm 0,26$ | $0,269 \pm 0,040$ | 2295 |
| 120 | $2,62 \pm 0,11$ | $0,305 \pm 0,009$ | 2536 |
| 140 | $3,14 \pm 0,13$ | $0,388 \pm 0,023$ | 3091 |
| 160 | $4,24 \pm 0,23$ | $0,488 \pm 0,013$ | 3760 |
| 180 | $5,49 \pm 0,43$ | $0,569 \pm 0,028$ | 4302 |

O crescimento bacteriano é verificado através do aumento da concentração de CO_2 do controle (suspensão bacteriana sem o agente tóxico) pelo tempo. Na figura 4.7, está exemplificado o crescimento bacteriano do controle, e também das suspensões com concentrações crescentes do antibiótico tetraciclina.

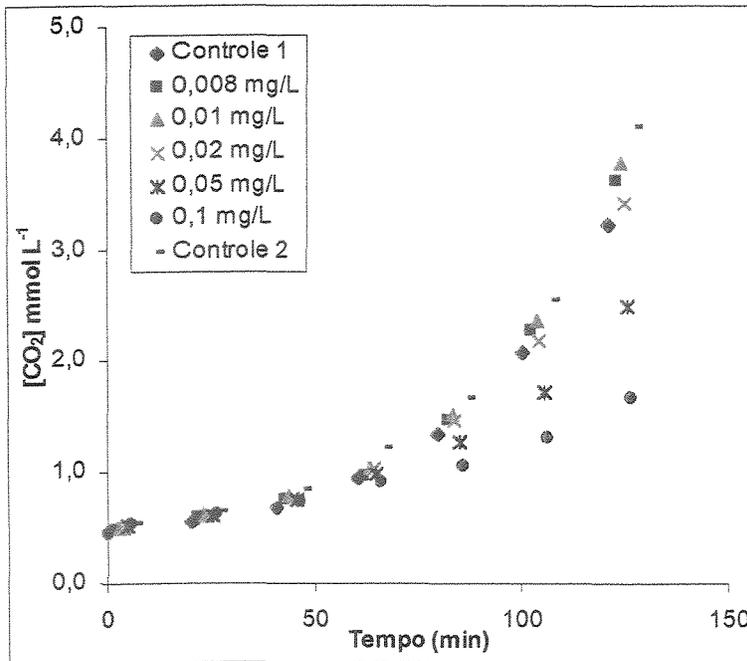


FIGURA 4.7: Comportamento da *Klebsiella oxytoca* frente ao agente estressante tetraciclina

O cálculo do tempo de duplicação (t_D) da população de bactérias é feito através da equação 4.3 (VON SPERLING, 1996):

$$\ln \frac{[Ct]}{[C0]} = kt \tag{4.3}$$

onde Ct é a concentração do CO_2 ($mmol L^{-1}$) num tempo qualquer, $C0$ é a concentração do CO_2 ($mmol L^{-1}$) presente no meio de cultura no início de cada bioensaio, k (min^{-1}) é a constante relacionada com o crescimento bacteriano e t é o tempo expresso em minutos. O tempo de duplicação (t_D) será aquele na qual a concentração (Ct) for igual a 2 vezes a concentração inicial ($C0$). Desta forma, a equação 4.4 ficará:

$$\ln 2 = kt_D \tag{4.4}$$

Note que $(\ln 2)/k$, fornece o tempo de duplicação da biomassa bacteriana (em minutos) nas condições experimentais utilizadas.

Para o cálculo do tempo de duplicação, é necessária a identificação da fase log do crescimento bacteriano. Observando o controle, na figura 4.7, identifica-se esta fase a partir do tempo equivalente a 60 minutos. Na figura 4.8 é apresentado o gráfico do ln da concentração de CO₂ pelo tempo dos 4 últimos pontos participantes da fase log do controle.

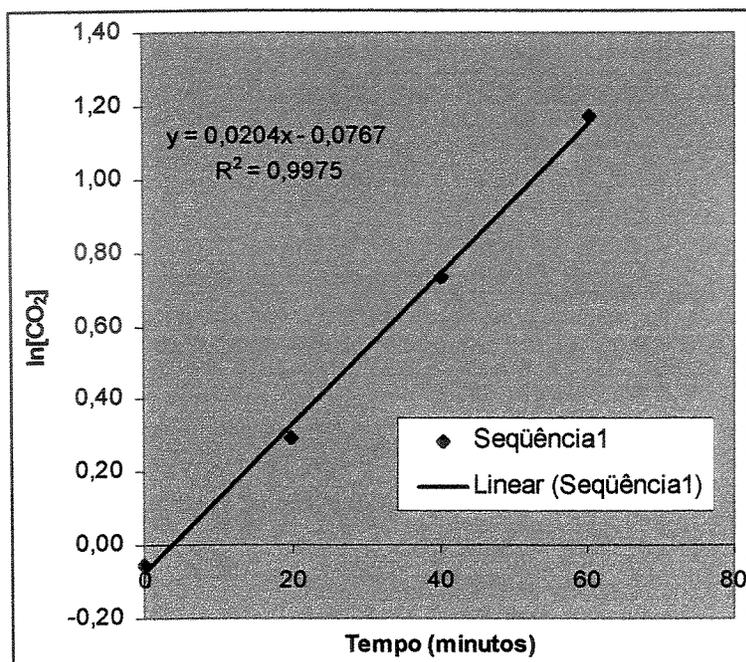


FIGURA 4.8: Tempo de duplicação

A EC₅₀ (concentração efetiva) é retirada do gráfico da porcentagem de inibição pela concentração do agente tóxico à um tempo de exposição pré-determinado. A equação 4.5 apresenta o cálculo da concentração efetiva:

$$EC = \left[\frac{(C - A)}{C} \right] \times 100 \quad (4.5)$$

onde, C é a diferença da concentração final e inicial de CO₂ do controle e; A , a diferença da concentração final e inicial de CO₂ da amostra.

4.3 Preparação das soluções dos compostos avaliados

Neste trabalho foram avaliados o antibiótico tetraciclina, os metais pesados mercúrio, cádmio e cobre e dois detergentes hospitalares. Para cada composto testado, foram feitos ensaios preliminares para se encontrar a faixa de concentração que indicasse de 0 a 100% de inibição das bactérias e, depois feitos ensaios de toxicidade em triplicata.

- **Antibiótico tetraciclina:** os 500 mg de tetraciclina (EMS) contidos numa cápsula, foram dissolvidos e avolumados para 2 litros. Esta solução foi armazenada em tubos de Ependorff de 1,5 mL, protegidos da luz e congelados, para ser utilizada em cada ensaio como substância de referência. O intervalo de concentração utilizado foi de 0,008 a 1 mg L⁻¹ do antibiótico.

- **Metais:**

- Cloreto de mercúrio: foi utilizada solução padronizada já diluída de cloreto de mercúrio (HgCl₂), fornecida pelo Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química/UNICAMP. O intervalo de concentração utilizado foi entre 1 e 100 µg L⁻¹ de Hg²⁺.

- Cloreto de cobre: foi utilizada solução padronizada MERCK de CuCl₂, diluída em balão calibrado para se obter 1 g L⁻¹ de Cu²⁺. O intervalo de concentração utilizado foi entre 1 e 200 mg L⁻¹ de Cu²⁺.

- Cloreto de cádmio: foi utilizada solução padronizada MERCK de CdCl₂, diluída em balão calibrado para se obter 1 g L⁻¹ Cd²⁺. O intervalo de concentração utilizado foi entre 0,25 e 100 mg L⁻¹ de Cd²⁺.

- **Detergentes hospitalares:**

- Laborhex 2

FÓRMULA: Cada 100 mL contém:

Digluconato de chlorhexidina.....2g

Álcool etílico.....2g
Tensoativos, emolientes, umectantes, corante essência qsp.....100 mL

A diluição foi preparada levando-se em consideração o princípio ativo do produto, ou seja, 20000 mg L⁻¹ de digluconato de chlorhexidina. O intervalo de concentração utilizado foi de 0,1 a 5 mg L⁻¹.

- Riodeine Degermante

FÓRMULA: Cada 100 mL de solução contém:

Polivinil Pirrolidona Iodo (PVP-I) (10% de iodo ativo).....10,0 g
Lauril éter sulfato de sódio.....25,0 g
Agentes tensoativos, emolientes e umectantes.....1,1 g
Água deionizada q.s.p.....100,0 mL

A diluição foi preparada levando-se em consideração o princípio ativo do produto, ou seja, 100000 mg L⁻¹ de Polivinil Pirrolidona Iodo (PVP-I). O intervalo de concentração utilizado foi de 5 a 15 mg L⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está subdividido numa parte estatística, ou seja, como minimizar erros; desvio padrão apresentado pelo sistema FIA; e uma parte de ensaios microbiológicos: escolha da espécie de *Klebsiella*, padronização do ensaio, ensaio com glicose e ensaios de toxicidade.

5.1 Como minimizar erros

Algumas considerações são necessárias para se minimizar erros com o tipo de teste de toxicidade proposto no presente trabalho.

5.1.1 Conservação das soluções padrões utilizadas para a construção da curva de calibração

Foi feito um estudo para verificar se as soluções utilizadas para a construção da curva de calibração poderiam ficar estocadas por algum tempo, ou se as mesmas deveriam ser preparadas a cada ensaio. Para isto foram testadas 3 curvas de calibração, com uma única série de padrões, sendo uma preparada no dia do experimento, outra há 24 horas e outra há 48 horas do mesmo. Todas as soluções foram preparadas à temperatura ambiente. As soluções foram armazenadas a 20 °C em frascos de vidro tampados. As curvas de calibração foram feitas na mesma temperatura.

Na figura 5.1 está apresentado um gráfico com as alturas dos picos proporcionadas pelo diagrama das curvas de calibração.

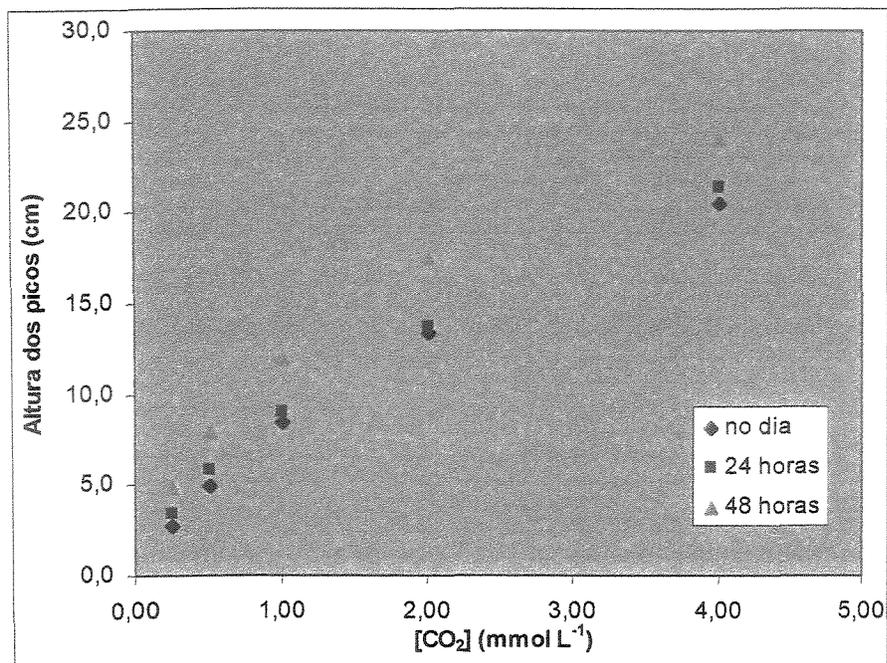


FIGURA 5.1: Altura dos picos de uma única série de padrões de CO₂.

Como pode ser observado, para cada dia na qual a solução foi estocada, houve um aumento na altura dos picos. Na tabela 5.1, está calculado este aumento em porcentagem das soluções preparadas a 24 e 48 horas em relação à altura do pico da solução padrão preparada no dia.

Os cálculos em porcentagem mostram que além de haver um aumento da concentração de CO₂ ao longo do tempo, ele é maior nas concentrações mais baixas. Como há absorção de CO₂ pelas soluções utilizadas para confecção da curva de calibração, sugere-se fazer uma solução padrão a cada ensaio, ou então, retirar as alíquotas sem o contato com o ar.

TABELA 5.1: Aumento da altura dos picos em porcentagem das soluções padrões para cada dia armazenada em relação à preparada no dia.

| [CO ₂] mmol L ⁻¹ | Aumento da altura dos picos em porcentagem | |
|---|--|---------------|
| | após 24 horas | após 48 horas |
| 0,25 | 21,8 | 76,4 |
| 0,50 | 18,2 | 58,6 |
| 1,00 | 7,1 | 41,7 |
| 2,00 | 2,6 | 31,5 |
| 4,00 | 4,2 | 16,8 |

5.1.2 Concentração de CO₂ no meio de cultura puro

Para o ensaio de toxicidade é necessário que o meio de cultura puro esteja isento de CO₂ ou, pelo menos, que seja até 1/4 da concentração de 0,5 mmol L⁻¹, na qual é iniciado o ensaio; apesar desta ser contabilizada e subtraída das amostras. Isto porque quando iniciado o ensaio, a concentração de CO₂ de 0,5 mmol L⁻¹ corresponde a soma das concentrações de CO₂ do meio puro e daquele proveniente da respiração das bactérias, portanto se a [CO₂] do meio puro for muito elevada, um menor número de bactérias estará presente no início do teste e, haverá uma alteração no tempo de ensaio, e conseqüentemente no intervalo de concentração de ensaio de 0,5 a 4,0 mmol L⁻¹ de CO₂ produzido pela respiração microbiana. No intuito de se obter um meio puro, isento ou com um mínimo de CO₂, foi verificado qual reagente poderia ocasionar no seu acréscimo. Para o teste, uma solução de cada reagente acrescentado à água para a preparação do meio de cultura foi injetado no sistema FIA. A resposta obtida pelo fiagrama revelou que o reagente que estava interferindo no aumento de CO₂ do meio de cultura era a base (NaOH) utilizada para acertar o pH, e que, mesmo realizando-se uma fervura do meio, após a adição dessa solução básica, não foi suficiente para o retirar o excesso do CO₂ dissolvido. A solução de NaOH devido a sua característica de absorver CO₂ do ar, não deve ser estocada por muito tempo, ou

então, deve-se retirar volumes da solução estoque sem que haja o contato da solução com a atmosfera.

5.2 Desvio padrão apresentado pelo sistema FIA

Para a obtenção da estimativa de desvio padrão ou do efeito memória apresentado pelo sistema procedeu-se da seguinte forma: cada solução utilizada para a confecção da curva de calibração foi injetada 5 vezes no sistema FIA, no sentido crescente de concentração, e depois, mais 5 vezes no sentido decrescente. Na figura 5.2 está apresentado o fiograma referente ao estudo.

Na tabela 5.2 está apresentada a média e o desvio padrão da altura dos picos encontrados no fiograma para cada concentração dos padrões.

TABELA 5.2: Curva de calibração

| [CO ₂] do padrão | [CO ₂] (mmol L ⁻¹) | | | | | Coeficiente de correlação |
|------------------------------|--|---------|---------|---------|----------|---------------------------|
| | 0,25 | 0,50 | 1,0 | 2,0 | 4,0 | |
| Média sent. cresc. | 1,5±0,0 | 3,1±0,0 | 5,5±0,0 | 9,1±0,0 | 14,5±0,1 | 0,9964 |
| Média sent. decresc. | 1,7±0,0 | 3,2±0,0 | 5,7±0,0 | 9,3±0,0 | 14,7±0,1 | 0,9971 |
| Média sent. cresc. e decresc | 1,6±0,0 | 3,1±0,0 | 5,6±0,0 | 9,2±0,0 | 14,6±0,1 | - |

n=5

Na figura 5.3 está o gráfico com a curva de calibração proporcionada pelo mesmo fiograma.

Como pode-se observar, pela figura 5.2 e tabela 5.2, a altura dos picos relativos às injeções feitas tanto para cada solução padrão como entre os sentidos crescentes e decrescentes não apresentaram desvio padrão. Isto prova a confiabilidade do sistema em relação a repetibilidade das injeções e também que independe a ordem em que são injetados os padrões, ou seja, não há efeito memória.

Os coeficientes de correlação foram da ordem de 0,99. Os coeficientes de correlação encontrados nos ensaios realizados eram, geralmente, dessa ordem e algumas vezes melhores que aqueles aqui encontrados.

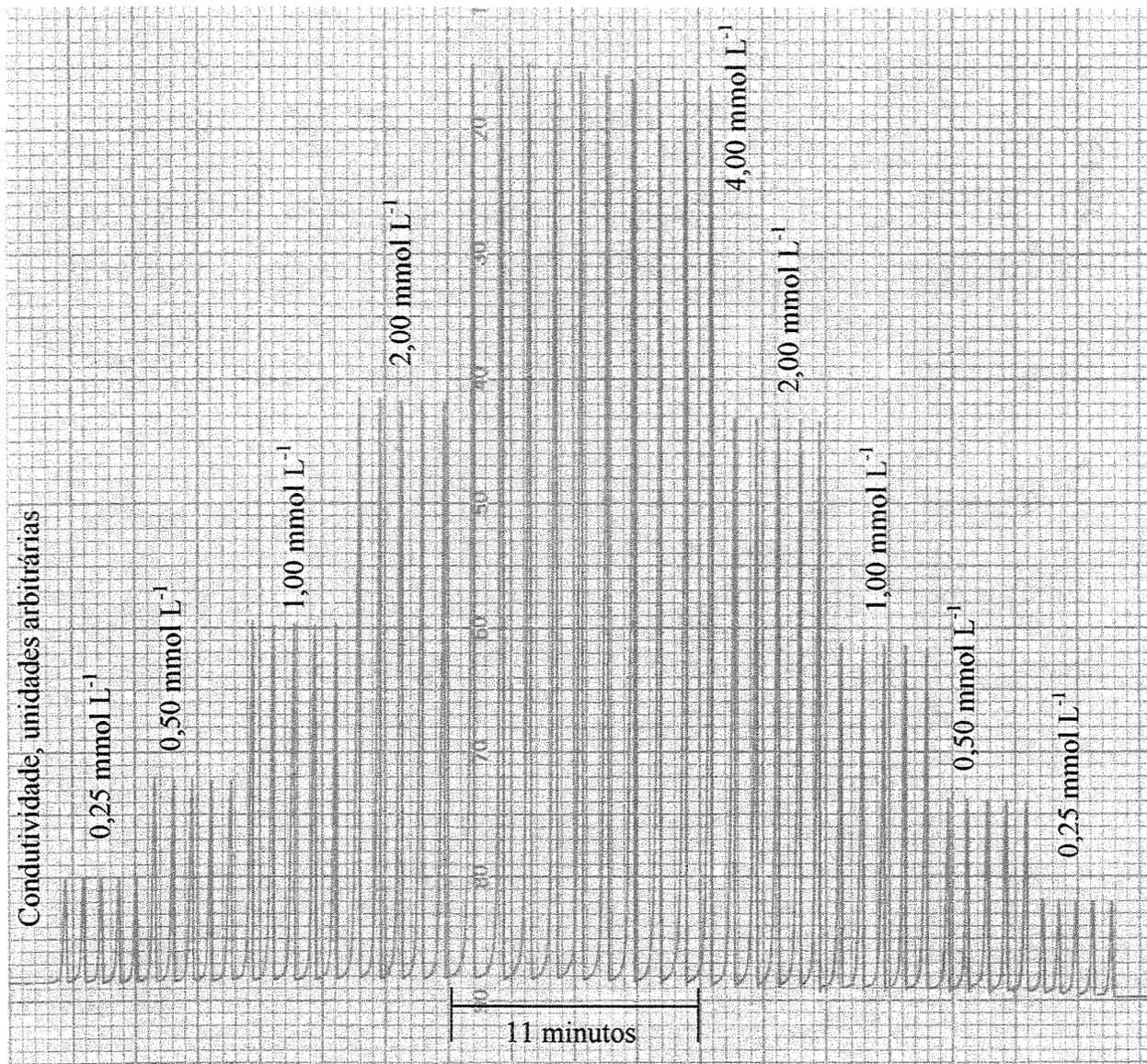


FIGURA 5.2: Diagrama da curva de calibração

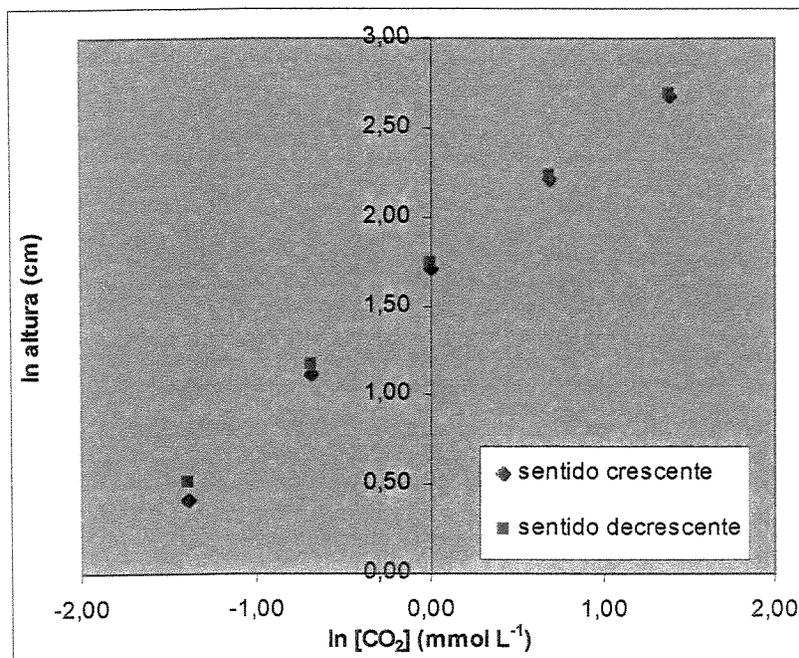


FIGURA 5.3: Curvas de calibração

5.3 Escolha da bactéria

Frente a uma grande variedade de bactérias para a realização dos ensaios de toxicidade, foram testadas 3 espécies diferentes de *Klebsiella*: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae ssp ozanae*. A opção de uma espécie foi baseada no tempo de duplicação, ou seja, àquela que produzisse uma quantidade maior de CO₂ em menor tempo, como também no potencial de patogenicidade. Foi realizado um ensaio em triplicata para cada bactéria. Na tabela 5.3 estão apresentados os tempos de duplicação de cada uma das espécies estudadas.

Observa-se que a variação do tempo de duplicação entre a primeira e a terceira é praticamente inexistente, no entanto a segunda o t_D é aproximadamente 30% mais baixo em relação às outras duas. Contudo, preferiu-se trabalhar com a menos patogênica dentre elas, a *Klebsiella oxytoca* (LEITE, 2000); apesar deste tipo de experimento não oferecer riscos ao seu

operador, se bem realizado, ou seja, se as regras básicas de segurança de um laboratório de microbiologia/química forem obedecidas.

TABELA 5.3: Tempo de duplicação (t_D) da *Klebsiella sp*

| Bactérias | Tempo de duplicação (min.) |
|--|----------------------------|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> CCT0182/CIP79.32 | 31,7±0,54 |
| <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> CCT0184/ATCC13883 | 21,4±0,66 |
| <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozanae</i> CCT4061/ATCC11296 | 31,69±0,55 |

n=3

5.4 Padronização do ensaio

Os tempos de crescimento bacteriano dos controles, ou seja, os tempos que as suspensões bacterianas sem adição de agente estressante levaram da concentração de 0,5 a 4 mmol L⁻¹ de CO₂, nos ensaios realizados, foram variados. Na tabela 5.4 estão apresentados os tempos de duração entre os diversos ensaios realizados.

TABELA 5.4: Quantidade de ensaios separados pela duração do crescimento bacteriano do controle.

| Bactérias | Quantidade total de ensaios | Quantidade de ensaios | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------|----------|----------|
| | | 80 min | 100 min. | 120 min. | 140 min. |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 43 | 13 | 19 | 9 | 2 |
| <i>E. coli</i> | 31 | - | 3 | 23 | 5 |

Pode-se observar que a bactéria *E. coli* apresentou um tempo de duração do seu crescimento mais estável, de 120 min., pois constata-se que o mesmo se repetiu em 23 dos 31 experimentos realizados.

Devido a variação do tempo de duração de crescimento encontrado para a *Klebsiella oxytoca*, resolveu-se apresentar o cálculo da concentração efetiva e do tempo de duplicação levando em consideração as concentrações inicial e final de CO₂ monitoradas do controle, ou seja, partindo-se da concentração de 0,5 até 4,0 mmol L⁻¹.

5.5 Ensaio com glicose

Com o intuito de verificar se a fonte de carbono adicionada no meio de cultura estava funcionando como um limitante de crescimento das bactérias, várias concentrações de glicose foram testadas para comprovar essa influência, empregando a *Klebsiella oxytoca*.

Para o ensaio foram utilizadas 7 amostras, sendo uma o meio puro e as outras 6 com concentrações crescentes de glicose. Em cada um destes frascos de amostras com glicose foram adicionados 5 mL de meio de cultura com inóculo e 95 mL de meio de cultura puro.

O início do ensaio deu-se quando estes 5 mL de meio de cultura com inóculo nos 95 mL de meio puro apresentou por volta de 0,5 mmol L⁻¹ de CO₂. A partir desta concentração foi monitorada a concentração de CO₂ a cada 20 minutos até atingir 4 mmol L⁻¹ de CO₂.

Na figura 5.4 pode-se observar o crescimento bacteriano entre as diferentes concentrações de glicose. Nota-se que não houve diferença no crescimento bacteriano entre a menor e a maior concentração de glicose, ou seja, entre as concentrações 0,125 e 2,5 g L⁻¹. Portanto, a concentração de 0,125 g L⁻¹ de glicose é suficiente para se realizar o ensaio de toxicidade, pelo menos de até 2 horas de duração.

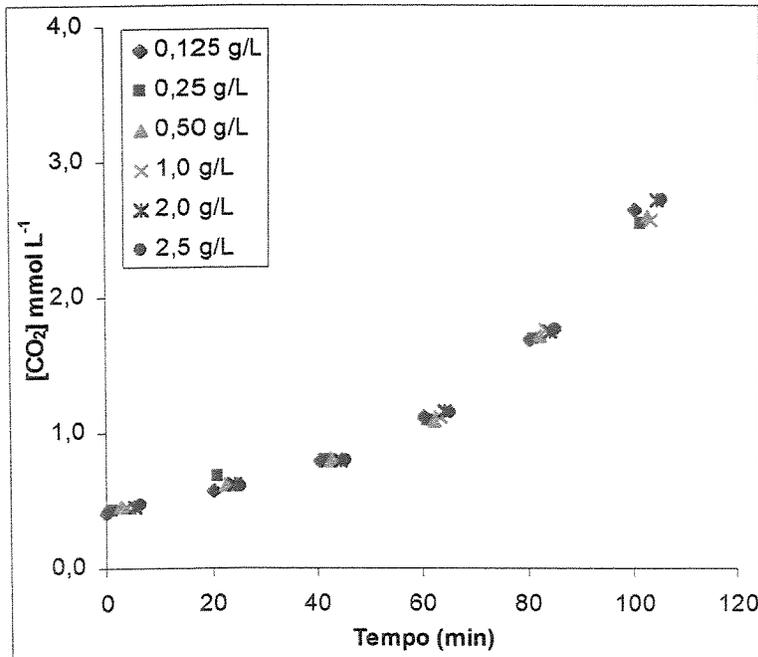


FIGURA 5.4: Crescimento da bactéria *Klebsiella oxytoca* em meio de cultura com concentrações diferentes de glicose

5.6 Ensaios de toxicidade

Foram realizados ensaios de toxicidade com o antibiótico Tetraciclina, com os metais mercúrio, cádmio e cobre, e com 2 detergentes hospitalares utilizando a bactéria *Klebsiella oxytoca*, e para fins de comparação, os mesmos foram avaliados com a bactéria *E. coli*.

Este item apresenta-se subdividido entre os compostos Tetraciclina, metais, e detergentes hospitalares. Para cada ensaio utilizando-se as diferentes bactérias são apresentados gráfico do crescimento microbiano, tabela do tempo de duplicação (t_D), gráfico da concentração efetiva (EC) e tabela da (EC_{50}).

De acordo com o item 5.4, para o cálculo da concentração efetiva e do tempo de duplicação foram levados em consideração as concentrações inicial e final de CO_2 monitoradas do controle, ou seja, partindo-se da concentração de 0,5 até 4,0 mmol L.

5.6.1 Tetraciclina

A Tetraciclina é um antibiótico bacteriostático ativo contra um grande número de organismos Gram-positivos e Gram-negativos e, tem-se mostrado eficaz contra, entre muitos organismos, à *E. coli* e às espécies de *Klebsiella* (infecções respiratórias e urinárias) (EMS, 2000).

Os ensaios com o antibiótico Tetraciclina foram realizados na intenção de utilizá-lo como substância de referência, ou seja, para uma determinada cepa de bactérias, uma concentração específica do antibiótico provocará uma inibição (ou faixa) específica. Se as bactérias forem modificadas geneticamente, ou a cepa se modificar por outros fatores, haverá uma diferença de inibição comparada ao ensaio com a cepa original. Basicamente, o teste é para comprovar se trata-se da mesma bactéria original, a qual iniciou-se os testes de toxicidade.

Na figura 5.5 estão apresentados aumentos da população bacteriana no meio de cultura, em termos de CO₂ evoluído durante o processo de respiração, de 4 ensaios, sendo 2 com *Klebsiella oxytoca* e 2 com a *E. coli*, correspondente às concentrações de Tetraciclina no intervalo de 0,008 a 1,00 mg L⁻¹.

Pode-se observar que, para ambas as bactérias utilizadas, nenhum efeito foi notado durante o tempo de experimento quando submetidas à concentração de até 0,02 mg L⁻¹, ou seja, não houve diferença significativa comparada ao controle. A inibição começou a ser notada a partir da concentração de 0,05 mg L⁻¹, e ser total a partir de 0,5 mg L⁻¹.

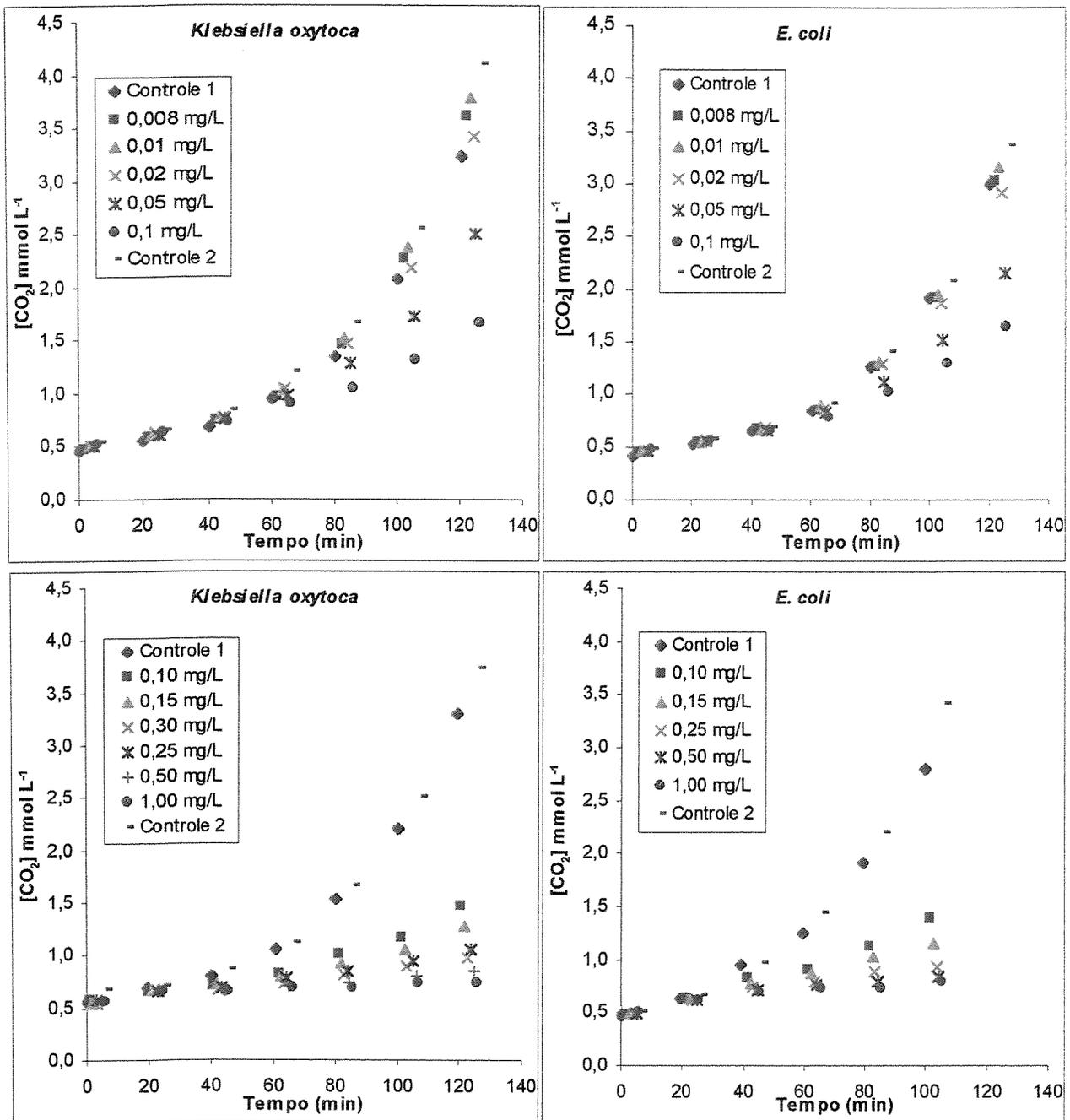


FIGURA 5.5: Crescimento bacteriano da *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* em relação à variação da concentração de Tetraciclina.

Na tabela 5.5 é apresentada a média e o desvio padrão do tempo de duplicação das mesmas bactérias quando expostas ao mesmo composto.

TABELA 5.5: Tempo de duplicação (t_D) das bactérias expostas à Tetraciclina

| Tetraciclina (mg L^{-1}) | Tempo de duplicação (t_D) | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------|----------------|------------|
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | | n | |
| 0 (controle) | 6 | 32,6±2,5 | 7 | 34,0±3,8 |
| 0,008 | 3 | 31,5±0,9 | 2 | 41,6±0,1 |
| 0,01 | 3 | 31,5±1,0 | 2 | 33,7±0,8 |
| 0,02 | 3 | 33,7±1,5 | 2 | 33,6±1,3 |
| 0,05 | 3 | 44,3±1,2 | 2 | 41,8±2,3 |
| 0,10 | 4 | 62,9±7,3 | 6 | 61,5±9,0 |
| 0,15 | 3 | 71,9±16,6 | 3 | 94,5±18,2 |
| 0,25 | 2 | 102,9±0,6 | 2 | 135,4±36,5 |
| 0,50 | 2 | 200,3±27,0 | 2 | 123,4±76,5 |
| 1,00 | 2 | 327,5±175,2 | 2 | 192,1±6,7 |

Pode-se notar, sob o ponto de vista estatístico, que até a concentração de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ o tempo de duplicação foi o mesmo que o do controle e, a partir da concentração $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ esse tempo foi cada vez maior; reafirmando o que foi relatado através da figura 5.5.

Na figura 5.6, estão apresentados os gráficos da concentração efetiva (EC) obtidos para as duas bactérias em estudo e, na tabela 5.6, a média e desvio padrão das EC_{50} encontradas para ambas, ou seja, a concentração de Tetraciclina que inibe 50% do crescimento bacteriano.

Como pode ser verificado pela figura 5.6, as duas bactérias possuem comportamento semelhante frente ao antibiótico. Esta afirmação pode ser comprovada pelo resultado do cálculo da EC_{50} apresentado pela tabela 5.6 de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ de Tetraciclina para ambas.

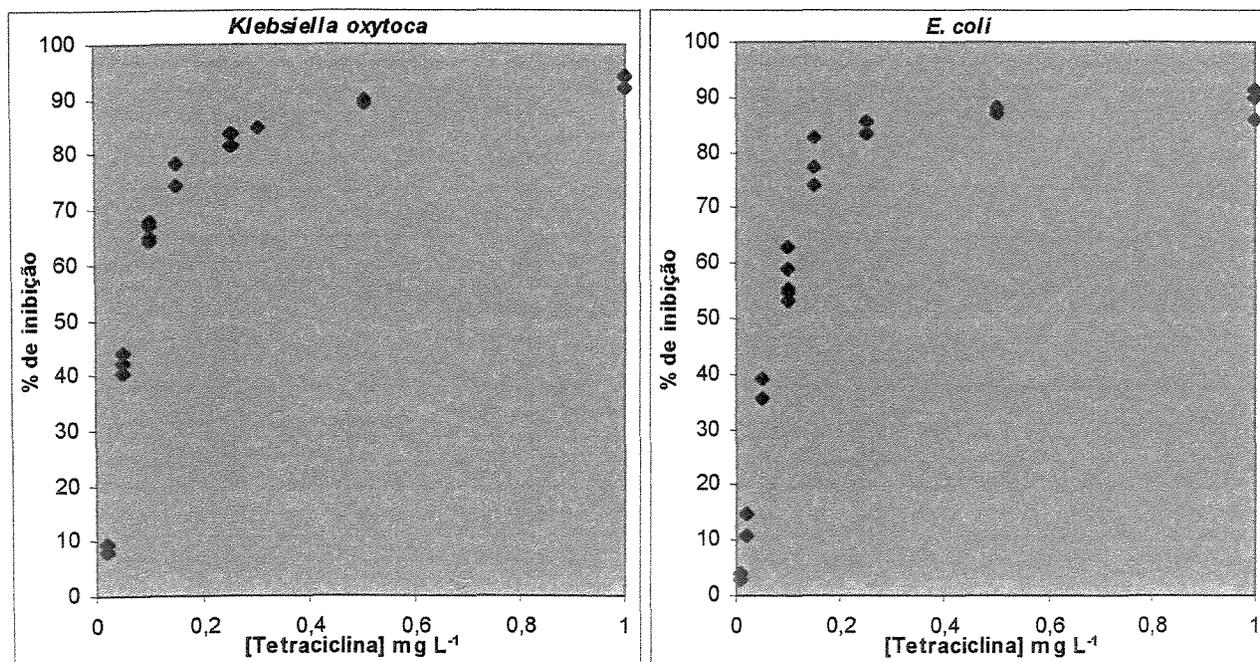


FIGURA 5.6: Concentração efetiva (EC) de Tetraciclina frente às bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*.

TABELA 5.6: Concentração efetiva (EC₅₀) - Tetraciclina

| Bactérias | n | Concentração efetiva (EC ₅₀) mg /L |
|---------------------------|---|--|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 5 | 0,082±0,009 |
| <i>E. coli</i> | 7 | 0,083±0,006 |

5.6.2 Metais

Alguns metais como magnésio, ferro, zinco, manganês, cobalto, cobre e molibdênio são essenciais aos seres vivos, tendo importante papel no metabolismo dos organismos em limitadas concentrações, podendo se apresentarem tóxicos acima destas concentrações. Por exemplo, por um lado, a deficiência de cobre no organismo humano resulta em anemia nutricional em crianças, que necessitam de até 0,1 mg kg⁻¹ diariamente para o crescimento normal (PEREIRA, 1982 *apud* CARRARA, 1997); de outro lado, se consumido em excesso, pode ocasionar irritação e corrosão

da mucosa, danos capilares generalizados, problemas hepáticos e renais e danos ao sistema nervoso central seguida de depressão (SILVA, 1996).

Metais como mercúrio, chumbo, cádmio, cromo e níquel, não possuem função biológica conhecida e se acumulam no corpo dos organismos por um longo período de tempo, comportando-se como compostos tóxicos cumulativos (KLEEREKOPER, 1990 *apud* BARRETO, 1994).

Os metais têm sido muito estudados "devido ao fato de não possuírem caráter de biodegradabilidade, o que determina que permaneçam em ciclos biogeoquímicos globais nos quais as águas naturais são seus principais meios de condução" (JARDIM, 1994 *apud* BARRETO, 1999). Além disso, são bioacumulados nos organismos e biomagnificados na cadeia alimentar.

A Portaria nº. 1469 de 29 de dezembro de 2000, do Ministério da Saúde, estabelece, entre outras coisas, o padrão de potabilidade da água para consumo humano. O Decreto nº. 8468 de 8 de setembro de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio-ambiente, estabelece, através do Artigo 18 e 19A, os padrões de emissão para o descarte de efluentes nas coleções de água e em sistema de tratamento de esgoto, respectivamente. As concentrações dos metais em estudo estão apresentados na tabela 5.7.

TABELA 5.7: Legislação

| Parâmetros | Portaria nº 1469 (VMP*) mg L ⁻¹ | Decreto nº 8468 | |
|------------|---|-----------------|------------|
| | | Artigo 18 | Artigo 19A |
| Mercúrio | 0,001 | 0,01 | 1,5 |
| Cádmio | 0,005 | 0,2 | 1,5 |
| Cobre | 2,0 | 1,0 | 1,5 |

VMP: Valor máximo permitido

No trabalho de GIMENEZ (1994) foi verificada a atividade dos metais no meio de cultura, ou seja, a espécie metálica que possivelmente está mais relacionada com a toxicidade. No

presente trabalho, a especiação não foi considerada. O seu intuito foi propor um teste de toxicidade em tempo restrito com a bactéria *Klebsiella oxytoca* e compará-la com a *E. coli*, ambas sujeitas às mesmas condições.

Os metais mercúrio, cádmio e cobre foram os escolhidos para este o estudo devido ao seu reconhecido potencial tóxico.

5.6.2.1 Mercúrio

A presença do mercúrio no ambiente é devido à indústria, agricultura e garimpo. Sua utilização industrial está na produção eletrolítica de soda e do cloro, em produtos farmacêuticos, pinturas, catalisadores, pesticidas e explosivos (SILVA, 1996).

No homem, mesmo em pequenas concentrações, o mercúrio já provoca efeitos deletérios. Nas intoxicações agudas pode apresentar náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia sangüínea, danos aos rins e usualmente morte dentro de 10 dias. Nas intoxicações crônicas pode ocasionar inflamação da boca e gengivas, dilatação das glândulas salivares, salivação excessiva, perda dos dentes, problemas renais, alterações psicológicas e psicomotoras (SILVA,1996).

Na figura 5.7 estão apresentadas as curvas de crescimento bacteriano, em termos de CO₂, de 2 ensaios realizados, sendo o primeiro com *Klebsiella oxytoca* e um outro com *E. coli*, correspondente às concentrações de Hg²⁺ no intervalo de 1 a 100 µg L⁻¹.

Pode-se observar que, para ambas as bactérias, nenhum efeito foi notado durante todo o tempo do experimento quando submetidas à concentração de até 25 µg L⁻¹, ou seja, não houve diferença significativa comparada ao controle. A inibição foi notada a partir da concentração de 50 µg L⁻¹, sendo mais acentuada para a *E. coli*, e foi total a partir de 75 µg L⁻¹.

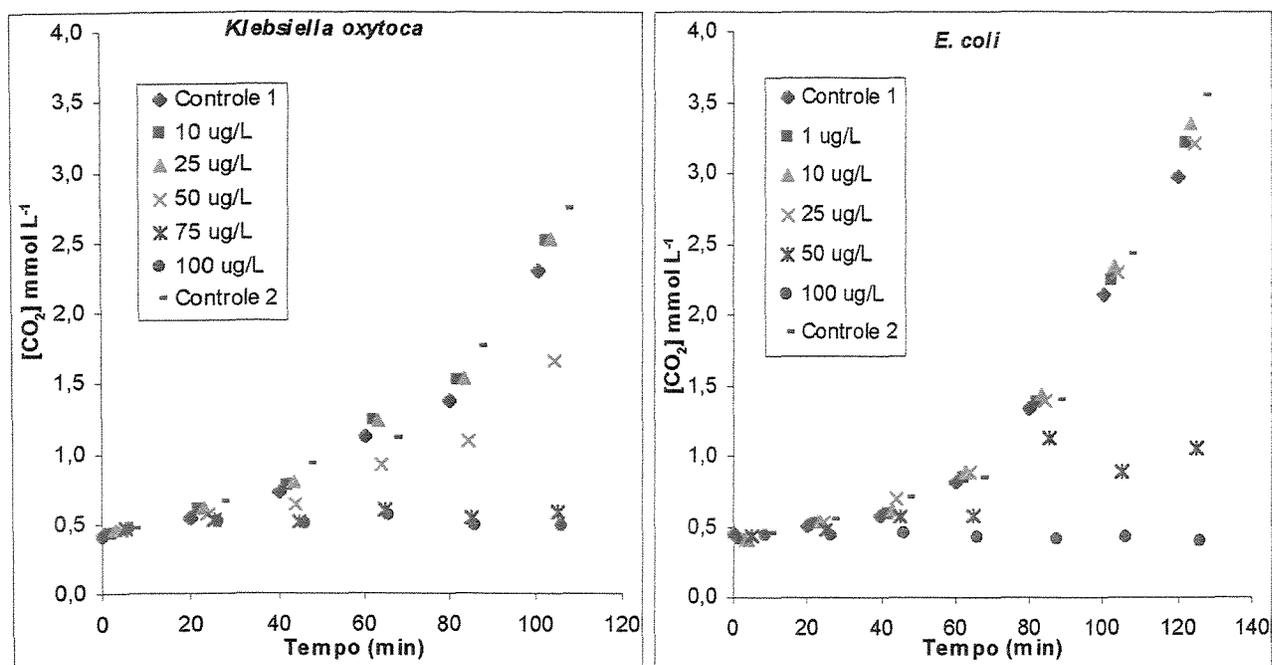


FIGURA 5.7: Crescimento bacteriano da *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* em relação à variação da concentração de Hg^{2+} .

Na tabela 5.8 estão apresentadas as médias e os desvios padrão do tempo de duplicação das mesmas bactérias com o composto, ou seja, Hg^{2+} .

TABELA 5.8: Tempo de duplicação (t_D) das bactérias frente ao Hg^{2+}

| [Hg^{2+}] $\mu g L^{-1}$ | Tempo de duplicação (t_D) | | | |
|------------------------------|-------------------------------|----------|----------------|----------|
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | | n | |
| 0 (controle) | 3 | 33,2±1,8 | 4 | 33,6±3,2 |
| 10 | 2 | 32,2±2,1 | 3 | 31,8±0,9 |
| 25 | 2 | 36,5±2,6 | 3 | 33,1±1,1 |
| 50 | 2 | 43,2±5,9 | 2 | 89,7±1,3 |

Pode-se notar que, para ambas, o tempo de duplicação foi o mesmo ou estatisticamente igual ao de seus respectivos controles para as concentrações de até $25 \mu g L^{-1}$ e, para a concentração de $50 \mu g L^{-1}$, este foi 1,3 vezes maior para a *Klebsiella oxytoca* e 2,7 vezes para a

E. coli. Desta forma, a *E. coli* apresentou tempo 2 vezes maior que o da *Klebsiella oxytoca* e conclui-se portanto que o composto é mais tóxico a ela, nesta concentração.

Na figura 5.8, estão apresentados os gráficos da concentração efetiva obtidos para as duas bactérias em estudo e, na tabela 5.9 estão os resultados da média e o desvio padrão das EC₅₀ encontradas para as duas bactérias.

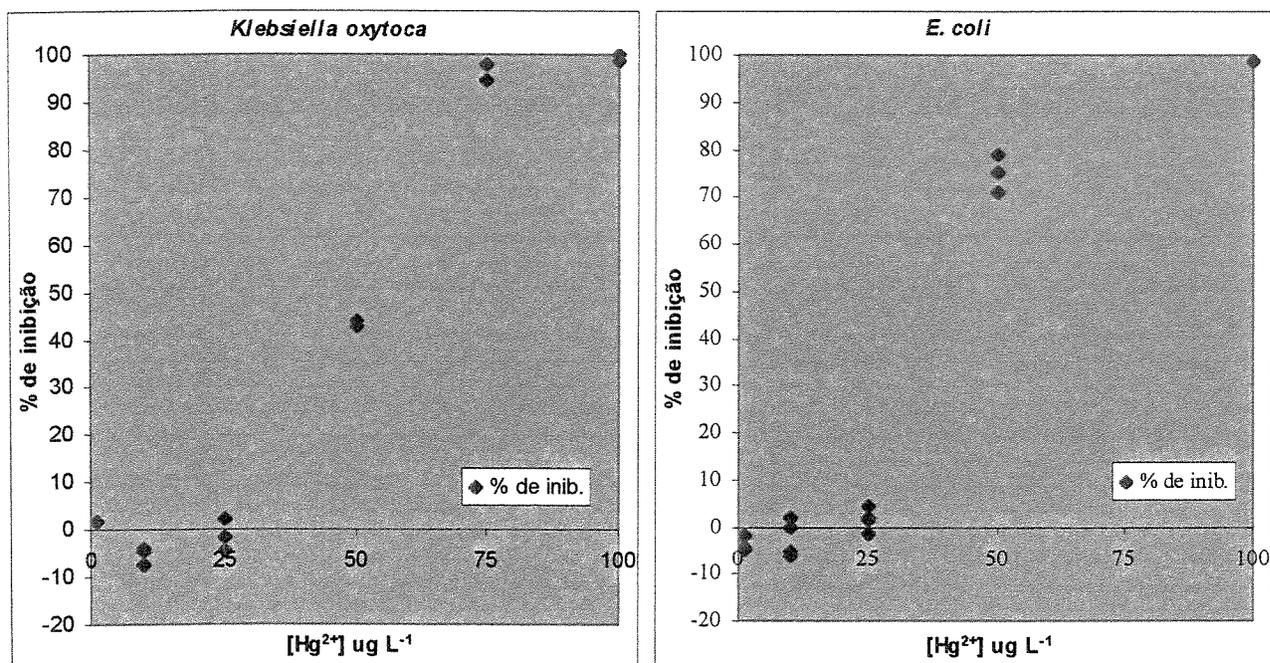


FIGURA 5.8: Concentração efetiva (EC) de Hg²⁺ frente às bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*.

TABELA 5.9: Concentração efetiva (EC₅₀) – Hg²⁺

| Bactérias | n | Concentração efetiva (EC ₅₀) µg L ⁻¹ |
|---------------------------|---|---|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 3 | 56,51±2,14 |
| <i>E. coli</i> | 4 | 49,30±0,49 |

Observa-se pela figura 5.8, que as bactérias tem comportamento semelhantes, em termos de % de inibição, nas concentrações mais baixas ou até 25 µg L⁻¹ e na mais alta de 100 µg L⁻¹, porém na concentração de 50 µg L⁻¹, a % de inibição apresenta-se, para a *Klebsiella oxytoca*, na faixa de 40 a 50%, e para a *E. coli*, entre 70 e 80%. Para o resultado do cálculo da EC₅₀ apresentado pela tabela 5.9 a *E. coli* apresentou-se mais sensível à este composto.

GIMENEZ (1994) estudando o comportamento do Hg^{2+} em meio de cultura semelhante ao utilizado neste trabalho (pH 7,2), constatou que esta forma é intensamente reduzida a Hg^0 em função da glicose presente no meio, minimizando, assim, a toxicidade desta espécie, pois, a inibição da respiração das bactérias para a concentração de $5 \times 10^6 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^0 foi semelhante à encontrada para $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} depois de 60 minutos de ensaio.

5.6.2.2 Cádmio

O cádmio pode ser liberado para o ambiente através da queima de combustíveis fósseis. Ele é utilizado na produção de pigmentos, soldas, equipamentos eletrônicos, lubrificantes, acessórios fotográficos, praguicidas, etc. (SILVA, 1996).

No homem, o cádmio pode ser responsável por vários processos patológicos, como disfunção renal, hipertensão, arteriosclerose, inibição no crescimento, doenças crônicas em idosos e câncer (SILVA, 1996).

Na figura 5.9 estão apresentados os crescimentos bacterianos, em termos de CO_2 , de 2 ensaios realizados, sendo 1 com *Klebsiella oxytoca* e um outro com *E. coli*, correspondente às concentrações de Cd^{2+} no intervalo de 1 a 200 mg L^{-1} .

Pode-se observar que na menor concentração testada de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, o comportamento de ambas as bactérias já é diferente: enquanto para *Klebsiella oxytoca* este se confunde com o controle, para a *E. coli*, demonstra uma pequena inibição. Por causa deste comportamento, foram utilizadas, para cada uma, diferentes intervalos de concentração de agente estressante.

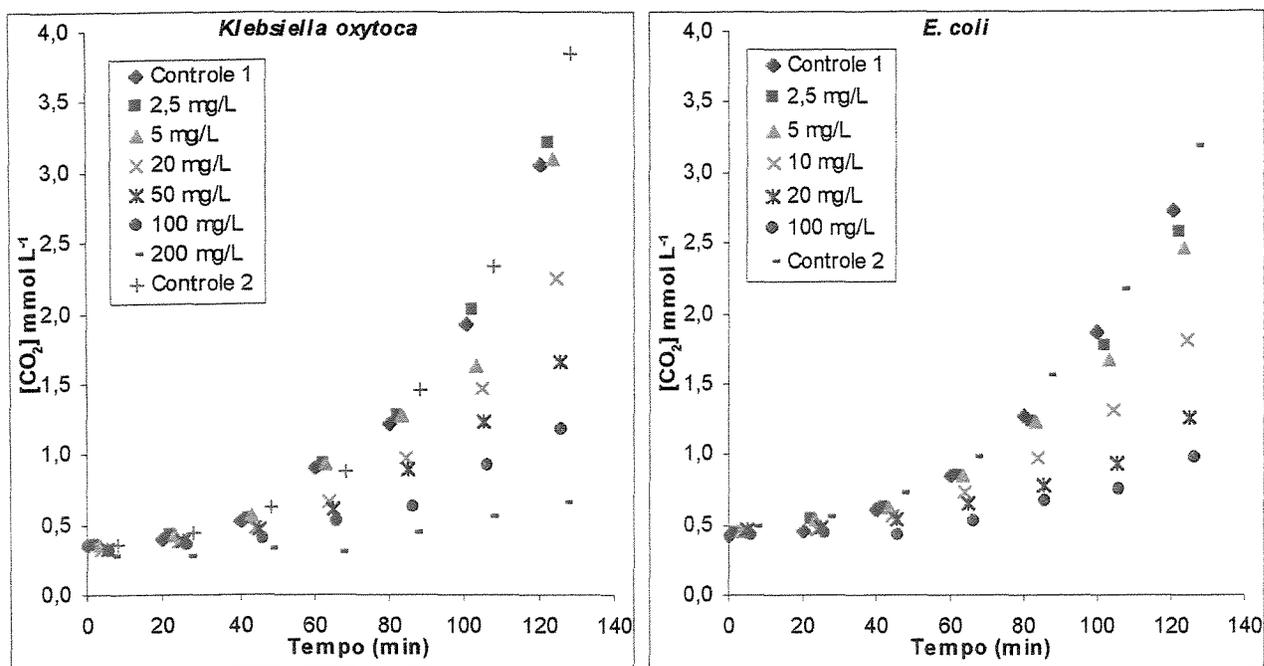


FIGURA 5.9: Crescimento bacteriano da *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* em relação à variação da concentração de Cd²⁺.

Na tabela 5.10 estão apresentados a média e o desvio padrão do tempo de duplicação das mesmas bactérias ao composto. Pode-se observar que até a concentração de 5 mg L⁻¹ esse tempo foi o mesmo ou estatisticamente igual ao do seu respectivo controle para a *Klebsiella oxytoca*, e, para a *E. coli*, já houve um pequeno aumento. Para as concentrações a partir de 10 mg L⁻¹, os tempos apresentaram-se com um aumento gradativo. Na concentração de 100 mg L⁻¹, este foi 2,5 maior que o seu respectivo controle para a *E. coli*, enquanto para a *Klebsiella oxytoca* foi 1,3 vezes maior. Desta forma, a *E. coli* apresentou tempo 1,9 vezes maior que o da *Klebsiella oxytoca* e conclui-se portanto que o composto é mais tóxico a ela, nesta concentração.

TABELA 5.10: Tempo de duplicação (t_D) das bactérias frente ao Cd^{2+}

| [Cd^{2+}] mg L ⁻¹ | Tempo de duplicação (t_D) | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|----------|----------------|-----------|
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | | n | |
| 0 (controle) | 4 | 27,0±2,7 | 4 | 33,7±1,4 |
| 2,5 | 2 | 25,5±0,6 | 4 | 35,6±1,5 |
| 5 | 3 | 28,1±2,8 | 4 | 37,4±2,2 |
| 10 | 1 | 29,7 | 2 | 41,6±6,9 |
| 20 | 3 | 30,5±2,4 | 3 | 53,2±10,5 |
| 50 | 2 | 30,8±0,8 | 1 | 56,8 |
| 100 | 2 | 35,0±1,0 | 2 | 81,3±13,9 |
| 200 | 1 | 72,7 | - | - |

Na figura 5.10, estão apresentados os gráficos da concentração efetiva obtidos para as duas bactérias em estudo e, na tabela 5.11, estão os resultados dos cálculos da média e desvio padrão da EC_{50} encontrados para as mesmas.

Pela figura 5.10, observa-se uma acentuada diferença no comportamento, em termos de % de inibição entre as bactérias, o que pode ser comprovado pela tabela 5.11, na qual a EC_{50} de Cd^{2+} para a *Klebsiella oxytoca* é por volta de 3 vezes maior que para a *E. coli*. Há, portanto, uma sensibilidade maior da *E. coli* à este composto.

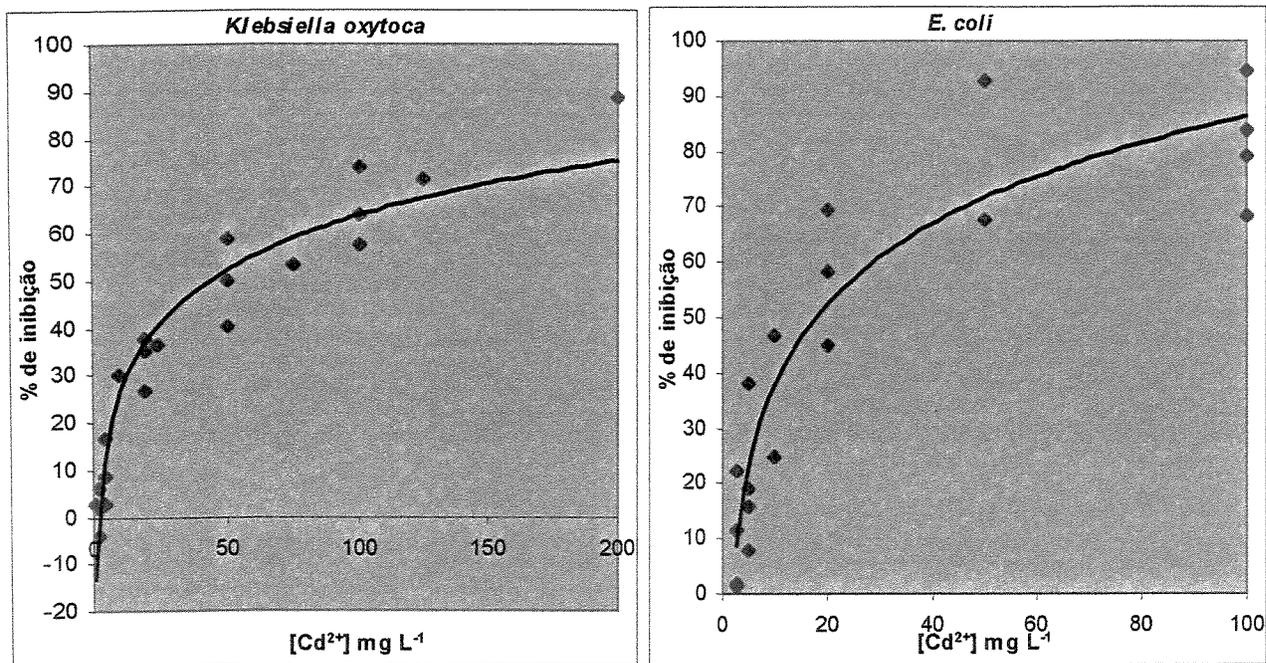


FIGURA 5.10: Concentração efetiva (EC) de Cd^{2+} frente às bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*.

TABELA 5.11: Concentração efetiva (EC_{50}) – Cd^{2+}

| Bactérias | n | Concentração efetiva (EC_{50}) mg L^{-1} |
|---------------------------|---|--|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2 | 57,45±3,43 |
| <i>E. coli</i> | 3 | 17,57±4,33 |

5.6.2.3 Cobre

Os poluentes de cobre provém da corrosão de latão por águas ácidas, efluentes de estações de tratamento de esgoto, de seu uso como algicida aquático, escoamento superficial e pode provocar a contaminação da água subterrânea a partir do seu uso agrícola como fungicida e pesticida, e também acontecer precipitação atmosférica à partir de fontes industriais. Estas fontes industriais incluem mineração, fundição e refinação (SILVA, 1996).

Durante os ensaios com este metal, foi necessário adquirir uma nova cepa da bactéria *Klebsiella oxytoca*. Porém esta cepa mostrou comportamento diferente da anterior no sentido de ser mais resistente. Portanto, outra cepa foi adquirida, e os resultados foram ainda diferentes das duas primeiras. Como dito na metodologia, foram utilizadas cepas padronizadas, às quais não foram cultivadas no laboratório, justamente para que não ocorressem modificações na suas características. GUIMARÃES (1990) em seu trabalho apresenta uma tabela comparativa entre resultados obtidos no teste Microtox® realizado em 4 laboratórios. Como os valores apresentam uma grande dispersão, GUIMARÃES levanta a possibilidade de haver sensibilidades diferentes entre as bactérias utilizadas, podendo umas serem mais resistentes que outras pela própria adaptação aos diferentes agentes tóxicos do seu ambiente de origem.

Na figura 5.11 estão apresentados os dados relativos ao crescimento bacteriano, em termos de CO₂, de 2 ensaios realizados, sendo 1 com *Klebsiella oxytoca* e um outro com *E. coli*, correspondente às concentrações de Cu²⁺ no intervalo de 0,25 a 200 mg L⁻¹.

Através dos intervalos de concentrações utilizados nos testes para cada bactéria, percebe-se que a *E.coli* é muito mais sensível que a *Klebsiella oxytoca* frente ao Cu²⁺, pois enquanto 0,25 mg L⁻¹ do composto já oferece inibição ao crescimento da *E. coli*, para a *Klebsiella oxytoca*, 10 mg L⁻¹ do composto oferece um comportamento semelhante ao do controle.

Na tabela 5.12 estão apresentados a média e o desvio padrão do tempo de duplicação das mesmas bactérias frente ao composto. Pode-se observar que até a concentração de 75 mg L⁻¹ esse tempo foi o mesmo ou estatisticamente igual ao do controle para a *Klebsiella oxytoca*, e para a *E. coli*, a partir da concentração de 0,25 mg L⁻¹ já houve um aumento, provando, assim, a ocorrência de uma sensibilidade maior desta ao composto.

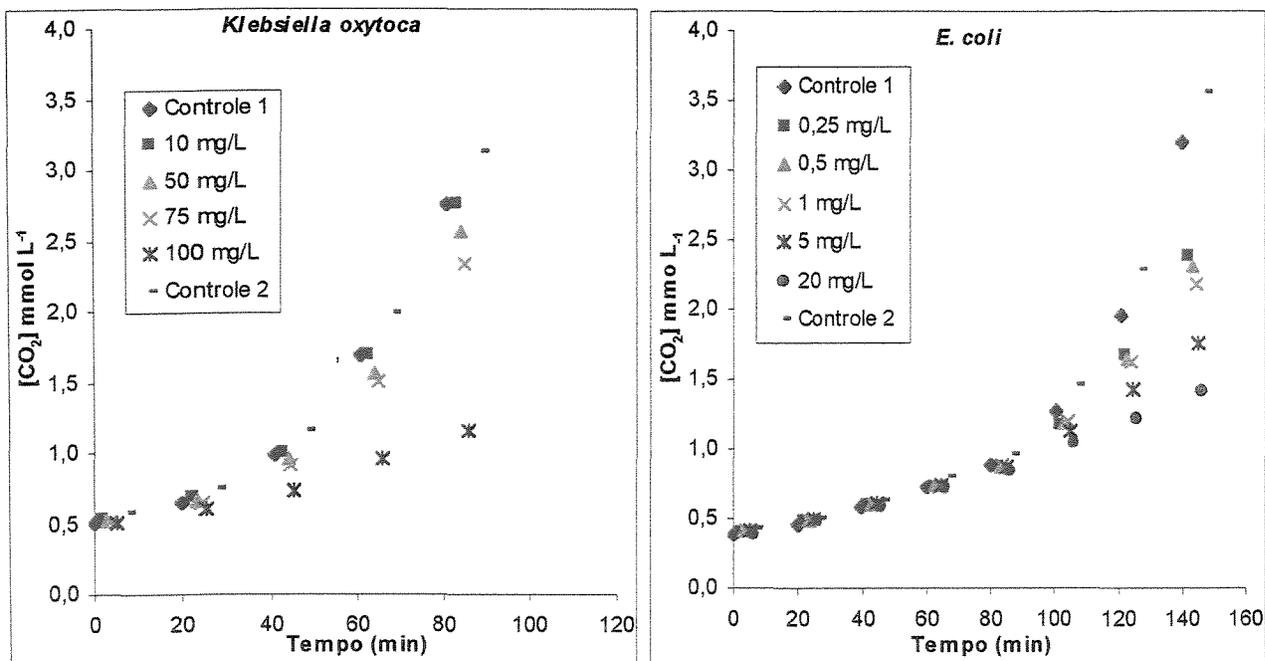


FIGURA 5.11: Crescimento bacteriano da *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* em relação à variação da concentração de Cu²⁺

TABELA 5.12: Tempo de duplicação (t_D) das bactérias frente ao Cu²⁺

| [Cu ²⁺] mg L ⁻¹ | Tempo de duplicação (t_D) | | | |
|--|-------------------------------|------------|----------------|----------|
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | | n | |
| 0 (controle) | 3 | 26,5±1,8 | 4 | 33,5±2,8 |
| 0,25 | - | - | 4 | 42,7±2,6 |
| 0,5 | - | - | 4 | 43,9±2,0 |
| 1 | - | - | 3 | 49,0±2,7 |
| 5 | - | - | 3 | 65,2±5,6 |
| 10 | 3 | 26,5±2,0 | - | - |
| 20 | - | - | 2 | 87,4±9,1 |
| 50 | 3 | 26,9±1,9 | - | - |
| 75 | 2 | 27,2±3,5 | - | - |
| 100 | 2 | 105,9±17,7 | - | - |

Na figura 5.12, estão apresentados os gráficos da concentração efetiva obtidos para as duas bactérias em estudo, e na tabela 5.13 estão os resultados dos cálculos da média e desvio padrão da EC_{50} encontrados para as mesmas.

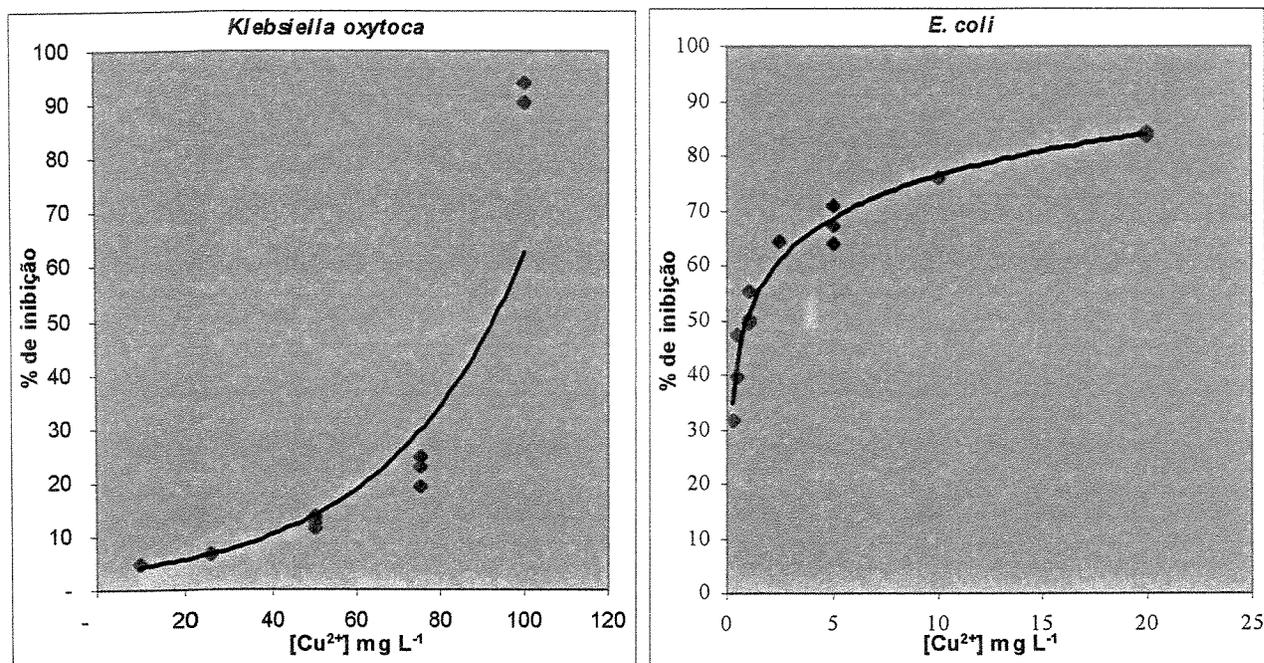


FIGURA 5.12: Concentração efetiva (EC) de Cu^{2+} frente às bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*.

TABELA 5.13: Concentração efetiva (EC_{50}) – Cu^{2+}

| Bactérias | n | Concentração efetiva (EC_{50}) $mg L^{-1}$ |
|---------------------------|---|--|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 4 | 69,41±6,14 |
| <i>E. coli</i> | 3 | 1,78±0,01 |

Pela figura 5.12 percebe-se uma diferença muito acentuada do comportamento, em termos de % de inibição, entre as bactérias, o que pode ser comprovado pela tabela 5.13, na qual a EC_{50} de Cu^{2+} para a *Klebsiella oxytoca* é por volta de 70 vezes maior que para a *E. coli*. Há, portanto, uma sensibilidade maior da *E. coli* à este composto.

5.6.2.4 Comparação entre os metais

Para uma avaliação mais adequada com relação ao efeito tóxico de substâncias em geral, recomenda-se o uso de uma bateria de ensaios com organismos representantes de diferentes níveis da cadeia alimentar. A título de comparação, foram extraídos da literatura alguns dados de testes de toxicidade, onde foram utilizados outros organismos e comparados com os dados do presente trabalho com o objetivo de verificar a sensibilidade das bactérias estudadas aos mesmos agentes tóxicos.

Na tabela 5.14 estão apresentados os resultados de testes de toxicidade deste trabalho e de outros retirados da literatura, utilizando as bactérias *Klebsiella oxytoca*, *E. coli* e *Vibrio fisheri* ou Microtox® e também com o microcrustáceo *Daphnia magna*, quando expostos aos agentes tóxicos Hg^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} .

TABELA 5.14: Comparação dos resultados da EC_{50} e IC_{50} obtidos em 6 testes de toxicidade ao Hg^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} ($mg L^{-1}$)

| Agentes tóxicos | Testes de toxicidade | | | | | |
|-----------------|--|-----------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------------|--|
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> $EC_{50}^{(a)}$ | <i>E. coli</i> $EC_{50}^{(a)}$ | <i>E. coli</i> $EC_{50}^{60(1)(b)}$ | Microtox® (15 min) ^(c) | Microtox® (d) | <i>Daphnia magna</i> (24h) ^(e) |
| Hg^{2+} | $0,0565 \pm 0,002$ | $0,0493 \pm 0,49$ | - | $0,03 \pm 0,01$ | $0,38$ (15 min) ⁽²⁾ | 0,0016 |
| Cd^{2+} | $57,45 \pm 3,43$ | $17,57 \pm 4,33$ | 47,4 | $56,83 \pm 56,51$ | $0,30$ (15 min) | 0,98 |
| Cu^{2+} | $69,41 \pm 6,14$ | $1,78 \pm 0,01$ | 35,7 | $1,29 \pm 1,69$ | $1,02$ (5 min) | 0,022 |

⁽¹⁾ Foi considerada a biodisponibilidade do metal

⁽²⁾ Resultado extrapolado

^(a) este trabalho

^(b) (GIMENEZ, 1994)

^(c) (GREENE *et alii* apud GUIMARÃES (1990)

^(d) (SILLANPÄÄ e OIKARI, 1996)

^(e) (SORVARI e SILLANPÄÄ, 1996)

Como era de se esperar, há uma grande variação entre os resultados para os vários organismos. Como já comentado anteriormente, os agentes tóxicos agem diferentemente sobre as diferentes espécies e, para se determinar a concentração segura, testes diversos devem ser feitos simultaneamente. Além disso os ensaios foram realizados em diferentes condições. Com relação aos organismos da tabela, percebe-se que a *Daphnia magna* é mais sensível que às bactérias frente aos metais.

Para as bactérias do estudo, onde pode-se afirmar que as condições ambientais para ambas foram as mesmas, pode-se fazer uma comparação segura. Para os metais analisados, conclui-se que a *Klebsiella oxytoca* é mais resistente do que a *E. coli*. A ordem de sensibilidade encontrada foi $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ para a *Klebsiella oxytoca* e $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+}$, para a *E. coli*. É importante salientar que a ordem de toxicidade, principalmente em relação aos metais Cd^{2+} e Cu^{2+} , não seguem uma mesma ordem para ambas as bactérias. Isso sugere que mesmo para organismos de igual nível trófico pode haver diferença de sensibilidade em relação a um composto específico. Esse efeito também pode ser observado para 2 cepas de um mesmo organismo, ou seja, dependendo da origem da bactéria, a mesma poderá ser mais ou menos resistente em relação a uma substância potencialmente tóxica.

Jardim e colaboradores (1990) verificaram a atividade dos íons Cu^{2+} e Cd^{2+} no meio de cultura usado em teste de toxicidade semelhante ao deste estudo. Para a mesma concentração de 5 mg L^{-1} de cada íon foi obtido atividade do íon Cu^{2+} abaixo de 1 ppb enquanto para o Cd^{2+} foi de 113 ppb, ambos para meio sem bactéria.

Pode-se observar que para a maioria dos organismos apresentados na tabela, o Hg^{2+} mostrou-se ser o mais tóxico entre os metais, depois o Cu^{2+} (exceto para a *Klebsiella oxytoca* e para um dos ensaios com Microtox) e por último o Cd^{2+} .

5.6.3 Detergentes hospitalares

A intenção de se usar detergentes como substâncias a serem testadas foi de mostrar um entre os vários potenciais de utilização do ensaio de toxicidade desenvolvido no presente trabalho. Neste caso ele pode ser usado como um teste de eficiência entre os vários tipos de detergentes, também como um ensaio para se avaliar um padrão de qualidade de um detergente específico (SANTOS *et alii*, 2000), ou até mesmo estimar os danos ambientais que possam ser causados por ele após ser utilizado, quando no corpo receptor, e mesmo o possível impacto desses compostos em estações de tratamento de águas residuárias por processos biológicos.

No presente trabalho foram utilizados dois detergentes hospitalares com princípios ativos diferentes para se poder comparar além da ação de cada detergente, a eficiência deste para cada bactéria testada.

5.6.3.1 Laborhex 2

Este detergente foi fornecido pela farmácia do Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Ele é utilizado para a lavagem de mãos dos profissionais que trabalham no centro cirúrgico.

5.6.3.1.1 Características do produto

Degermante - solução de digluconato de chlorhexidina à 2 % - uso externo.

AÇÃO: Laborhex 2 é uma solução tensoativa de digluconato de chlorhexidina atuando na permeabilidade da parede celular bacteriana, influenciando em grupos enzimáticos intracelulares, causando a destruição dos microrganismos.

USO/INDICAÇÃO: indicado na anti-sepsia e degermação das mãos e braços da equipe cirúrgica, laboratorial, ambulatorial e no preparo pré-cirúrgico da pele de pacientes.

5.6.3.1.2 Resultados

Na figura 5.13 estão apresentadas as curvas características para os crescimentos bacterianos, em termos de CO_2 , de 2 ensaios realizados, sendo 1 com *Klebsiella oxytoca* e um outro com *E. coli*, correspondente às concentrações de digluconato de chlorhexidina no intervalo de 0,1 a 5 mg L⁻¹.

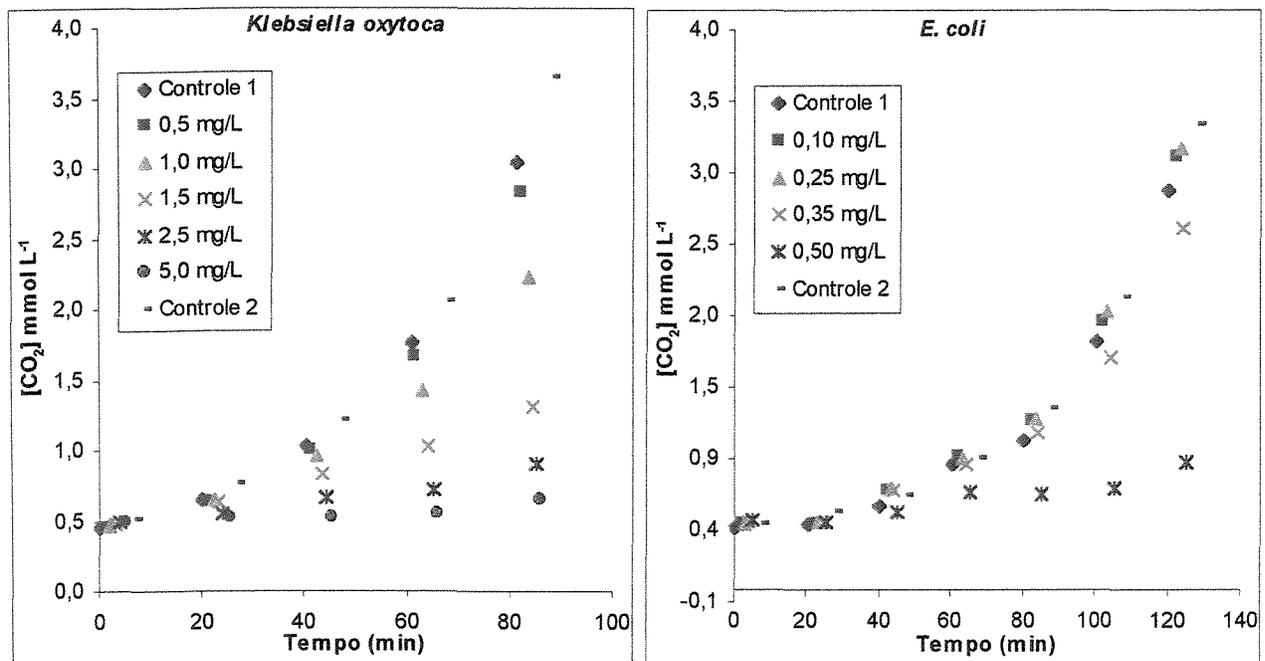


FIGURA 5.13: Crescimento bacteriano da *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* em relação à variação da concentração de Digluconato de chlorhexidina.

Observando-se os intervalos de concentração utilizados nos testes para cada espécie de bactéria, percebe-se que a *E. coli* é muito mais sensível que a *Klebsiella oxytoca* frente ao detergente, pois, enquanto 0,50 mg L⁻¹ do composto é a maior concentração utilizada no ensaio para *E. coli*, inclusive esse teor provocou uma inibição bastante alta, a mesma é a menor para o ensaio com a *Klebsiella oxytoca*; essa última bactéria começa a ser sensível à partir dessa concentração. Por causa deste comportamento, foram utilizadas, para cada uma, diferentes intervalos de concentração de agente estressante.

Na tabela 5.15 estão apresentados a média e o desvio padrão do tempo de duplicação das mesmas bactérias com o detergente.

TABELA 5.15: Tempo de duplicação (t_D) das bactérias frente ao detergente Laborhex 2

| Digluconato de Chlorhexidina (mg L ⁻¹) | Tempo de duplicação (t_D) | | | |
|---|-------------------------------|------------|----------------|-----------|
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | | n | |
| 0 (controle) | 4 | 27,0±1,7 | 4 | 35,5±5,8 |
| 0,1 | - | - | 2 | 34,7±7,3 |
| 0,25 | - | - | 3 | 45,0±18,5 |
| 0,35 | - | - | - | - |
| 0,5 | 3 | 28,0±0,8 | - | - |
| 1 | 4 | 33,0±2,3 | - | - |
| 2,5 | 2 | 112,6±30,1 | - | - |

Analisando os resultados da tabela 5.15, estes reafirmam o verificado na figura 5.13 sobre o comportamento do crescimento bacteriano.

Na figura 5.14, estão apresentados os gráficos da concentração efetiva obtidos para as duas bactérias em estudo e na tabela 5.16 estão os resultados da média e desvio padrão da EC₅₀ encontrados para as mesmas.

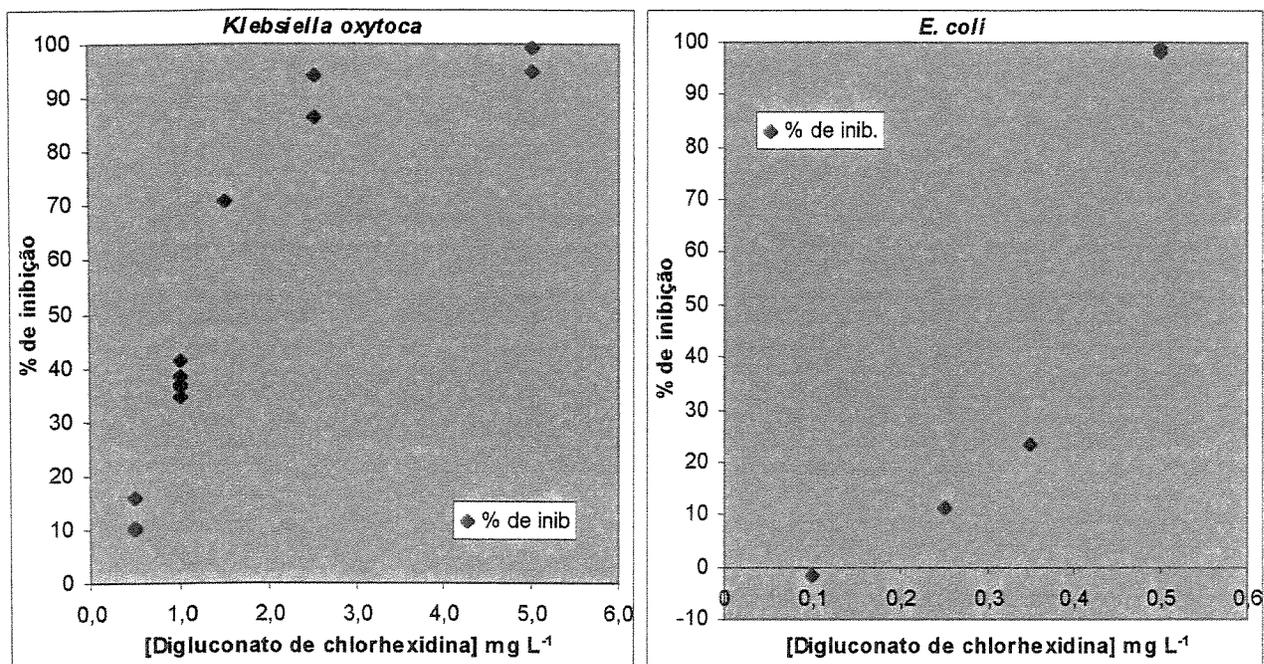


FIGURA 5.14: Concentração efetiva (EC) do princípio ativo do detergente Laborhex 2 frente às bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*.

TABELA 5.16: Concentração efetiva (EC₅₀) - Laborhex 2

| Bactérias | n | Concentração efetiva (EC ₅₀) mg L ⁻¹ |
|---------------------------|---|---|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 4 | 1,55±0,324 |
| <i>E. coli</i> | 3 | 0,32±0,10 |

Pela figura 5.14 nota-se a diferença de sensibilidade entre as bactérias ao produto, pois na concentração que ocorre 100% de inibição para a *E. coli*, não há inibição para a *Klebsiella oxytoca* e, pelo tabela 5.16 o cálculo da EC₅₀, apresenta-se ~ 5 vezes maior para a *Klebsiella oxytoca* que a *E. coli*. Diante deste fato, conclui-se que a bactéria *E. coli* apresentou-se mais sensível ao produto e portanto a *Klebsiella oxytoca* é mais indicada para avaliar a eficiência de detergentes com princípio ativo a base de cloro do que a *E. coli*.

5.6.3.2 Riodeine Degermante

Este detergente foi fornecido pelo Laboratório de Saneamento da Faculdade de Engenharia Civil da UNICAMP. Ele é utilizado para a lavagem das mãos dos usuários do laboratório de análises químicas e principalmente microbiológicas.

5.6.3.2.1 Características do produto

AÇÃO: é um produto à base de polivinil pirrolidona-iodo em solução degermante, um complexo estável e ativo que libera o iodo progressivamente. É ativo contra todas as formas de bactérias não esporuladas, fungos e vírus. O emprego de Riodeine para a prevenção e tratamento de infecções cutâneas não apresenta o inconveniente de irritações da pele e por ser hidrossolúvel não mancha acentuadamente a pele, sendo facilmente removível em água.

INDICAÇÕES E USO: é indicado na degermação das mãos e braços da equipe cirúrgica e na preparação pré-operatória da pele de pacientes. Aconselha-se espalhar o produto na pele e massagear por 2 minutos. Enxaguar com água corrente e repetir a aplicação secando a pele com gaze ou toalha esterilizada.

5.6.3.2.2 Resultados

Na figura 5.15 estão apresentadas as curvas de crescimento bacteriano, em termos de CO₂, de 2 ensaios realizados, sendo 1 com *Klebsiella oxytoca* e um outro com *E. coli*, correspondente às concentrações de PVP-I no intervalo de 1 a 15 mg L⁻¹.

Para se determinar a faixa de concentração ou mesmo do intervalo de inibição para este detergente foram realizados vários experimentos prévios, com várias diluições, pois este detergente é bastante ativo para os microrganismos-teste. Pode-se notar que para uma faixa estreita de concentração foi obtida 0 e 100% de inibição, conforme mostram os dados (concentração) na figura 5.15.

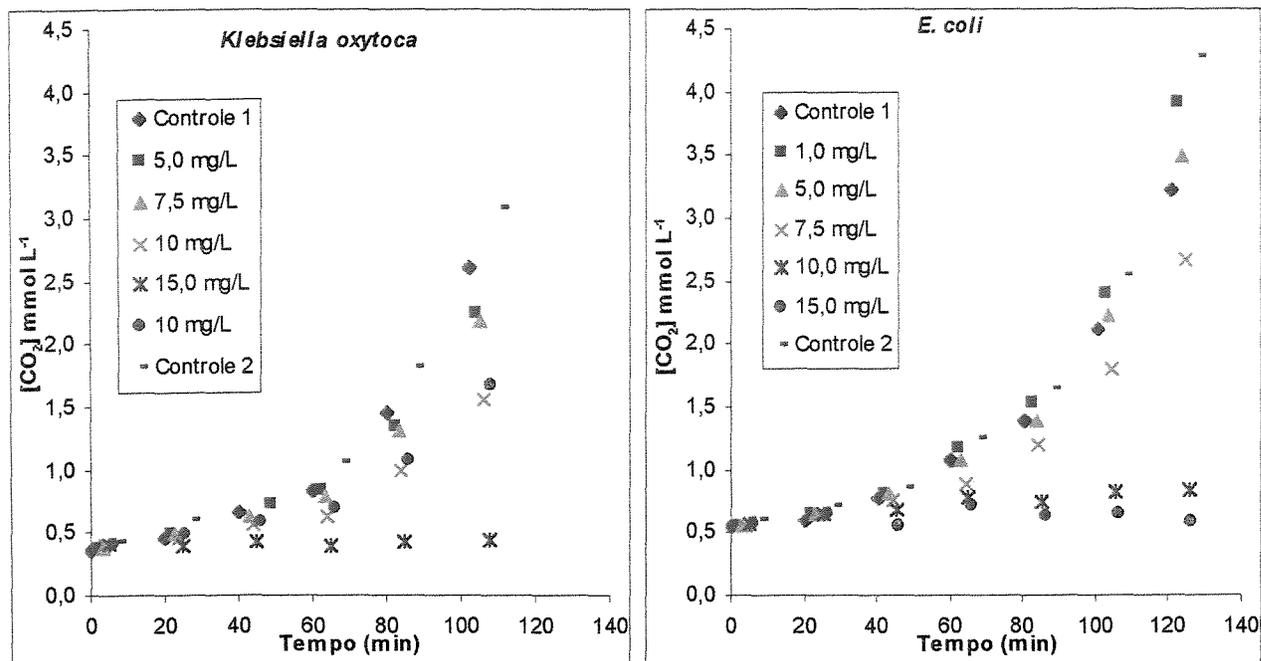


FIGURA 5.15: Crescimento bacteriano da *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* em relação à variação da concentração de PVP-I.

Na tabela 5.17 estão apresentados a média e o desvio padrão do tempo de duplicação das mesmas bactérias com o detergente.

Pelos tempos de duplicação não foi possível uma análise, devido a sua incoerência, ou seja, para os ensaios com *E. coli* praticamente (sob o ponto de vista estatístico) não houve variações desse parâmetro no intervalo de concentração estudado. Enquanto que para o organismo-teste *Klebsiella oxytoca* percebe-se um ligeiro aumento até a concentração de 10 mg L⁻¹, no entanto, considerando-se os desvios padrão não se pode afirmar tal comportamento. Para maior concentração do referido detergente houve um aumento brusco no tempo de

duplicação indicando mais uma vez a dificuldade em se encontrar uma faixa ótima de trabalho, bem como a atividade do composto. Apenas para o teor máximo houve inibição total.

TABELA 5.17: Tempo de duplicação (t_D) das bactérias frente ao detergente Riodeine

| PVP-I (mg L^{-1}) | Tempo de duplicação (t_D) | | | |
|------------------------------|-------------------------------|------------|----------------|----------|
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | <i>E. coli</i> | |
| | n | | n | |
| 0 (controle) | 5 | 27,6±1,4 | 7 | 33,8±1,9 |
| 1 | 2 | 28,4±1,8 | 4 | 33,1±2,5 |
| 5 | 4 | 29,5±1,0 | 4 | 32,8±1,6 |
| 7,5 | 4 | 29,6±2,2 | 3 | 31,9±1,4 |
| 10 | 5 | 31,5±3,0 | 4 | 33,1±0,8 |
| 15 | 3 | 252,2±47,8 | - | - |

Na figura 5.16, estão apresentados os gráficos de onde foram retirados os dados para os cálculos da concentração efetiva obtidos para as duas bactérias em estudo, em relação detergente avaliado, e na tabela 5.18 estão os resultados da média e desvio padrão da EC_{50} encontrados para as duas bactérias.

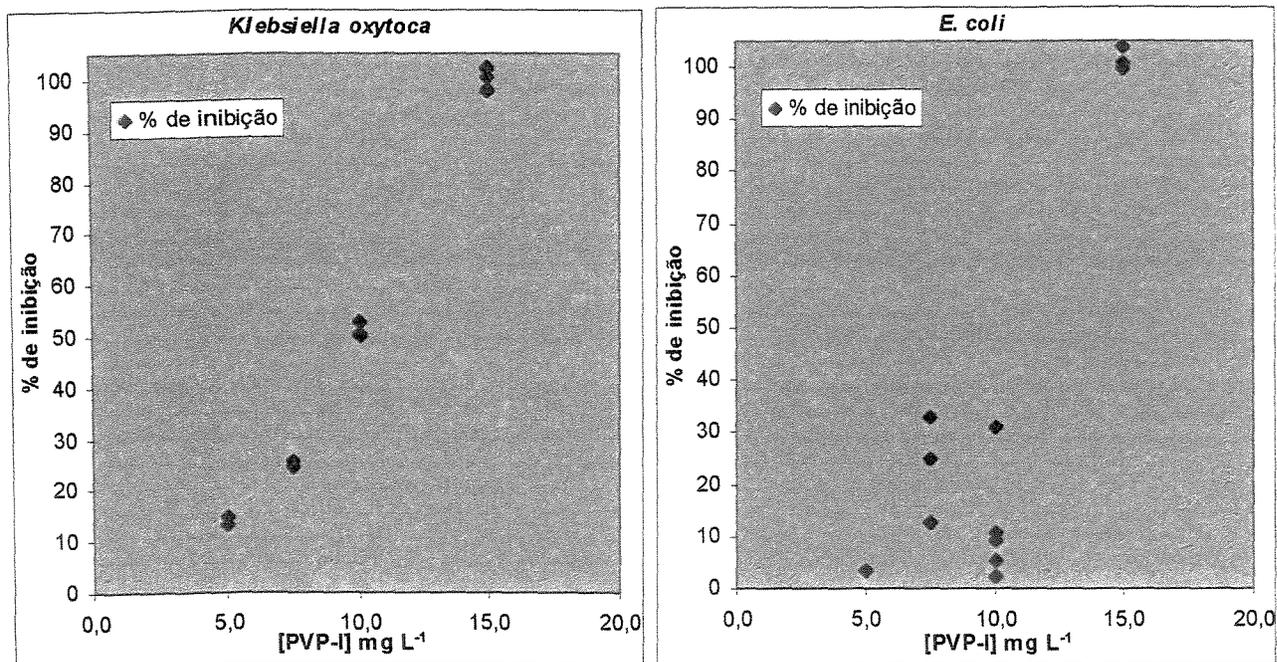


FIGURA 5.16: Concentração efetiva (EC) do princípio ativo do detergente Riodeine frente às bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli*.

TABELA 5.18: Concentração efetiva (EC₅₀) – detergente Riodeine

| Bactérias | n | Concentração efetiva (EC ₅₀) mg L ⁻¹ |
|---------------------------|---|---|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 7 | 11±1,7 |
| <i>E. coli</i> | 7 | 12±2,0 |

Nota-se pela figura 5.16 que os dados obtidos para a *Klebsiella oxytoca* foram melhores, ou mais coerentes que os da *E. coli*, Portanto pela tabela 5.18, pelas EC₅₀ obtidas para as 2 bactérias foram estatisticamente iguais. Conclui-se que a ação bactericida do princípio ativo a base de iodo é igual para as 2 bactérias em estudo.

5.6.3.3 Comparação entre os detergentes hospitalares

Na tabela 5.19 está apresentada a comparação entre a EC₅₀ dos detergentes hospitalares estudados.

TABELA 5.19: Comparação entre a EC₅₀ dos princípios ativos dos detergentes Laborhex 2 e Riodeine

| Bactérias | EC ₅₀ – mg princípio ativo/L | |
|---------------------------|---|----------|
| | Laborhex 2 | Riodeine |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1,55±0,324 | 11±1,7 |
| <i>E. coli</i> | 0,32±0,10 | 12±2,0 |

Com relação ao princípio ativo dos detergentes, nota-se que o Laborhex 2 possui uma ação bactericida superior ao Riodeine.

Com relação às bactérias, percebe-se que a *Klebsiella oxytoca* é mais resistente que a *E. coli* com relação ao Laborhex 2, porém ao Riodeine, ambas apresentaram-se com sensibilidades semelhantes.

6 CONCLUSÕES

Com relação às espécies de *Klebsiella* testadas, qualquer uma delas poderia ser utilizada no trabalho, pois todas produzem CO₂ e se desenvolveram bem no meio de cultura utilizado. Em comparação com a *E. coli*, a *Klebsiella oxytoca* possui uma vantagem. Como seu tempo de duplicação é menor, a resposta do ensaio é obtida mais rapidamente. Nos experimentos realizados, o tempo de exposição determinado não foi considerado, mas o período de monitoração entre a concentração de 0,5 a 4 mmol L⁻¹ de CO₂.

Com relação à concentração de glicose no meio de cultura, pode-se afirmar que uma concentração 20 vezes menor que a que foi utilizada nos ensaios, dessa fonte de carbono, não acarretaria prejuízos à produção de CO₂ pela bactéria *Klebsiella oxytoca*, ou seja, os ensaios de toxicidade não seriam alterados, pelo menos no tempo de exposição proposto.

Com base nos agentes tóxicos testados com a bactéria *Klebsiella oxytoca*, concluiu-se que:

- A utilização da bactéria *Klebsiella oxytoca* como organismo em teste de toxicidade pode colaborar com a bateria de testes, pois foram obtidos EC_{50} com desvios padrões baixos o que confere à bactéria estabilidade e uniformidade das populações.
- A tetraciclina pode ser utilizada como substância de referência, pois a bactéria se mostrou bastante sensível a essa droga, e os ensaios apresentaram um desvio padrão muito baixo, ou seja, pode ser considerada como um padrão nos ensaios, principalmente para confirmar se a

cepa de bactérias não sofreu modificações durante o período de estocagem. E também, o teste proposto possui um potencial de ser utilizado em ensaios de antibiogramas.

- Para todos os metais analisados, a *Klebsiella oxytoca* apresentou-se mais resistente do que a *E. coli*. Para a *Klebsiella oxytoca*, a ordem de sensibilidade aos metais foi $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ e para a *E. coli*, $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+}$.
- Para os 2 detergentes analisados, Laborhex 2 e Riodeine Degermante, a *Klebsiella oxytoca* apresentou-se mais resistente do que a *E. coli*, apenas para o primeiro, no qual o princípio ativo é a base de cloro. Para o Riodeine, o qual é a base de iodo, as 2 bactérias apresentaram sensibilidades semelhantes.

Finalmente, é importante salientar que o ensaio de toxicidade proposto pode ser um teste complementar para a bateria de ensaios de toxicidade de compostos puros ou da mistura deles, como por exemplo águas residuárias. O sistema utilizado no presente trabalho, ou seja, FIA, para determinação e monitoração de CO_2 produzido pelas bactérias, é de baixo custo, de montagem simples, que utiliza um volume bem reduzido de amostra, com operação extremamente simples e finalmente é bastante sensível e possui uma alta frequência analítica.

7 SUGESTÕES

O intuito do presente estudo foi testar a bactéria *Klebsiella oxytoca* no sistema FIA e poder compará-la com a *Escherichia coli*, sob as mesmas condições. Para os próximos trabalhos, sugere-se:

- considerar a especiação química
- considerar a interação dos compostos avaliados no meio de cultura

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, H.E. e HASEN, D.J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environ. Res.**, 68 (1), 42-54, 1996

AWWA/APHA/WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.** 19. ed. Washington, DC: APHA, 1995

AWWA/APHA/WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.** 18. ed. Washington, DC: APHA, 1992.

BARRETO, A. S. **Assimilação de cromo trivalente nas biomassa nanoplanctônica e microplanctônica e sua quantificação no sedimento e sobrenadante: experimento em microcosmo.** São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1994. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1994.

BARRETO, A. S. **Estudo da distribuição de metais em ambiente lótico, com ênfase na assimilação pelas comunidades biológicas e na sua quantificação no sedimento e água.** São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1999. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1999.

BITTON, G., DUTKA, B.J. **Toxicity testing using microorganisms.** Boca Raton, EUA: CRC, 1986. v. 1.

BRASIL. Portaria N. 1469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

CARRARA, S.M.C.M. **Reciclagem e reuso de efluentes gerados em indústrias galvanoplásticas**. Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, UNICAMP, 1997. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

CLARK, G.D. *et alii*. Sample handling and pretreatment using flow injection analysis. **Critical Review Analytical Chemistry**, v. 21, p. 357-375, 1990.

COLEMAN, R.N., QURESHI, A.A. *Microtox*® and *Spirillum volutans* test for assessing toxicity of environment samples. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 443-451, 1985.

DORWARD, E.J. e BARISAS, B.J. Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. **Environmental Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 967-972, 1984.

EMS Indústria Farmacêutica Ltda. "informações retiradas da bula do antibiótico Tetraciclina" 2000

FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., GUIL, L.H., LÓPEZ, G.D., CHISTI, Y. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assesment of rapid biossays. **Analytica Chimica Acta**, v 426, p. 289-301, 2001.

GAUTHIER, F., ARCHIBALDI, F. The Ecology of "Fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems **Water Research**, v. 35, n. 9, p. 2207-2218, 2001.

GERNAEY, K., VERSCHUERE, L., LUYTEN, L., VERSTRAETE, W. Fast and sensitive acute toxicity detection with na enrichment nitrifying culture. **Water Environment Research**, v. 69, n. 6, p. 1163-1169, 1997.

GIMENEZ, S.M.N. **Ensaio de toxicidade aguda usando *E.coli* como organismo-teste.** Campinas: IQ, UNICAMP, 1994. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1994.

GUIMARÃES, J.R. **Determinação do dióxido de carbono por FIA: aplicação em testes de toxicidade.** Campinas: IQ, UNICAMP, 1990. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1990.

GUIMARÃES, J.R., JARDIM, W.F. Estudo comparativo da toxidez aguda de combustíveis automotivos utilizando *Escherichia coli*. **Química Nova**, v. 16, n. 1, p. 28-31, 1993.

GUIMARÃES, J.R., JARDIM, W.F. Teste de toxicidade em tempo restrito. *In*: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 26, 1996, Cidade do México. **Anais...** Cidade do México: AIDIS, 1996. Resumos expandidos em *CD-ROM*.

HORVAL, G., PUNGOR, E. Theoretical backgrounds of flow analysis. **Critical Review Analytical Chemistry**, v. 17, p. 231-264, 1987.

ISHII, R., YOSHIKAWA, K. Microbial bioassay of acute toxicity by the pH inhibition method and comparison of IC₅₀ (pHI) with LD₅₀ for rats and mice. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 5, p. 361-366, 1993.

JARDIM, W.F., MORAES, S.G., TAKIYAMA, M.M.K. Photocatalytic degradation of aromatic chlorinated compounds using TiO₂: toxicity of intermediates. **Water Research**, v. 31, n. 7, p. 1728-1732, 1997.

JARDIM, W.F., PASQUINI, C., GUIMARÃES, J.R., FARIA, L.C. Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: monitoring CO₂ production by flow injection analysis. **Water Research**, v. 24, n. 3, p. 351-354, 1990.

LEITE, D.S. Comunicação pessoal via internet Professor do Instituto de Biologia – UNICAMP, 2000.

KENNICUTT, M.C. ATP as indicator of toxicity. **Water Research**, v. 14, p. 225-228, 1980.

MENSA, J., GATELL, J.M., CORACHÁN, M., ESCOFET, M.C., MARTINEZ, J.A., ZAMORA, L. **Guia de terapeutica antimicrobiana**. 4. ed. Barcelona: MASSONN-SALVAT Medicine, 1994.

McKEE, P.M. Sediment contamination and bioassessment procedures for the ecological evaluation of sediment quality with emphasis on the Great Lakes. Beak Consultants, for Great Lakes Biomnology Lab., Dept. Fish. and Oceans and Dept. of Supply and Services. 1980.

MOTOMIZU, S., TOEI, K., KUWAKI, T., OSHIMA, M. Gas diffusion with tubular microporous poly(tetrafluorethylene) membrane for flow-injection determination of carbon dioxide. **Analitical Chemistry**, v. 59, p. 2939-2932, 1987.

MUNAWAR, M., MUNAWAR, I.F. Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of "in situ" sediment contaminants. **Hydrobiologia**, v. 149, p. 87-105, 1987.

NIPPER, M. Curso sobre "Avaliação de toxicidade de efluentes" promovido pela ABES e FUNDESPA em julho de 2000, São Paulo.

PAWLOWSKY, U, GLOWSKI, A.M.N., FERRANTE, E.M., BOSA, M.N. Aplicação de testes de toxicidade na tratabilidade de efluentes de pesticidas (compact disc). *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19, 1997, Foz de Iguaçu. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 1998. Resumos expandidos em *CD-ROM*.

PELCZAR Jr., M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. São Paulo: MAKRON Books, 1996. v. 1 e v. 2.

PELCZAR, M, REID, R., CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v. 1 e v.2.

PEDERSEN, F., PETERSEN, G.I. Variability of species sensitivity to complex mixtures. **Water Science and Technology**, v. 33, n. 6, p. 109-119, 1996.

REGINATTO, V. **Avaliação do Ensaio de Toxicidade com Alga *Scenedesmus subspicatus* para o Estudo de Efluentes Industriais**. Campinas: IQ, UNICAMP, 1998. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

REIS, B.F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.

RUZICKA, J., HANSEN, E.H. **Flow Injection Analysis**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1988. 498 p.

SANTOS, A.A., NASCIMENTO, A.R., KONDO, M.M., GRASSI, M.T. Avaliação do desempenho de desinfetantes de produção local e caseira da cidade de São Luís (MA), empregando análise por injeção em fluxo. *In*: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas, MG. **Anais...** São Paulo: SBQ, 2000. Livro de resumos.

SÃO PAULO, Resolução SMA-3, de 22 de fevereiro de 2000. Aprova a necessidade de implementar o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo. Diário Oficial [do Estado de São Paulo], São Paulo.

SÃO PAULO, Decreto n. 8.468, de 08 de setembro de 1976 Regulamenta a Lei n. 997, de 31 de maio de 1976, dispondo sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente Diário Oficial [do Estado de São Paulo], São Paulo.

SILLANPÄÄ, M., OIKARI, A. Assessing the impact of complexation by edta and dtpa on heavy metal toxicity using Microtox bioassay. **Chemosphere**, vol. 32, n. 8, p. 1485-1497, 1996.

SILVA, S. T. **Competição entre os processo de complexação e adsorção dos íons Cu²⁺ e Cd²⁺ no rio Atibaia.** Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, 1996. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996.

SORVARI, J., SILLANPÄÄ, M. Influence of metals complex formation on heavy metal end free edta and dtpa acute toxicity determined by *Daphnia magna*. **Chemosphere**, vol. 33, n. 6, p. 1119-1127, 1996.

SUGIHARA, R., YOSHIMURA, M., MORI, M., KANAYAMA, N., HIKIDA, M., OHMORI, H. Prevention of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice by oral administration of AZ-9, a bacterial polysaccharide from *Klebsiella oxytoca*. **Immunopharmacology** v.49, p. 325-333, 2000.

TEMPLETON, D.M., ARIESE, F., CORNELIS, R., DANIELSSON, L, MUNTAU, H., LEEUWEN, H.P.V. e LOBINSKI, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure Appl. Chem.**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.

TISLER, T., ZAGORC-KONCAN, J. Toxicity evaluation of wastewater from the pharmaceutical industry to aquatic organisms. **Wat. Sci. Tech.**, v. 39, n. 10-11, p. 71-76, 1999.

VALCARCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M.D. **Análisis por Inyección en Flujo.** Cordoba: San Pablo, 1984.

VAN DER LINDEN, W.E. Classification and definition of analytical methods based on flowing media. **Pure & Appl. Chem.**, v. 66, n. 12, p. 2493-2500, 1994.

VON SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgostos.** Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. v. 2.

9 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro. **NBR-6023**; referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 1989. 19 p.

BACCAN, N. *et alii*. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 2. ed. São Paulo: E. Blücher /Ed. da UNICAMP, 1979. 259 p.

BRANCO, S.M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1986.

BRASIL. Resolução CONAMA N. 20, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação de águas doces, salobras e salinas. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p. 11356, 30 jul. 1986.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 1991.

CESAR, A., SILVA, S.L.R., SANTOS, A.R. **Teste de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição**. 4. ed. Santos: [Apostila: curso oferecido pela UNISANTA], 1997.

MORITA, T., ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de Soluções, Reagentes & Solventes. Padronização, Preparação e Purificação**. São Paulo: E. Blücher, 1995.

ABSTRACT

Farah, Carolina Rittes Turato. **Test of acute toxicity: monitoring respiration of the *Klebsiella oxytoca* bacterium using a FIA/conduutométrico system.** Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 86p. Dissertação de Mestrado.

The physical and chemical characterization of a substance or of a substance mixture is very important, however it does not supply any information related to the toxic potential. The use of assays with organisms, or either, the application of toxicity tests, can overcome this limitation. The *Klebsiella oxytoca* and *E. coli* bacteria had been used as tests-organism in toxicity tests, this last one used for matching purposes. The stimulation/inhibition of the bacterial growth was quantified by the measure of its respiration of produced CO₂ that it was measured by the system of flow injection analysis (FIA), characterized as a simple method that uses a small amount of sample, is sensitive and fast in the determination. The bacteria had been exposed to the antibiotic tetracycline, the heavy metals Hg²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ and to 2 hospital detergents. The results are expressed in terms of EC₅₀ and duplication time (t_D). The *Klebsiella oxytoca* presented higher resistance than *E. coli*. The sensitivity found for the *Klebsiella oxytoca* to metals was Hg²⁺>Cd²⁺>Cu²⁺ and for *E. coli*, Hg²⁺>Cu²⁺>Cd²⁺. One concludes that there is a difference in sensitivity between organisms of the same trofic level and the necessity of the battery of assays.

Words Keys: Acute Toxicity, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, FIA, heavy metals.

APÊNDICE

A título de ilustração, em seguida, serão mostradas algumas fotos do sistema FIA montado na bancada. Na figura A.1 é apresentado o sistema integral; na figura A.2, aparecem o injetor, a cela de difusão, a cela de condutividade e as resinas de troca iônica; na figura A.3, o objetivo é mostrar a parte do sistema que se mantém em fluxo; na figura A.4, o condutivímetro; na figura A.5, o banho-maria, utilizado para manter as amostras à 37°C e, na figura A.6, o registrador.

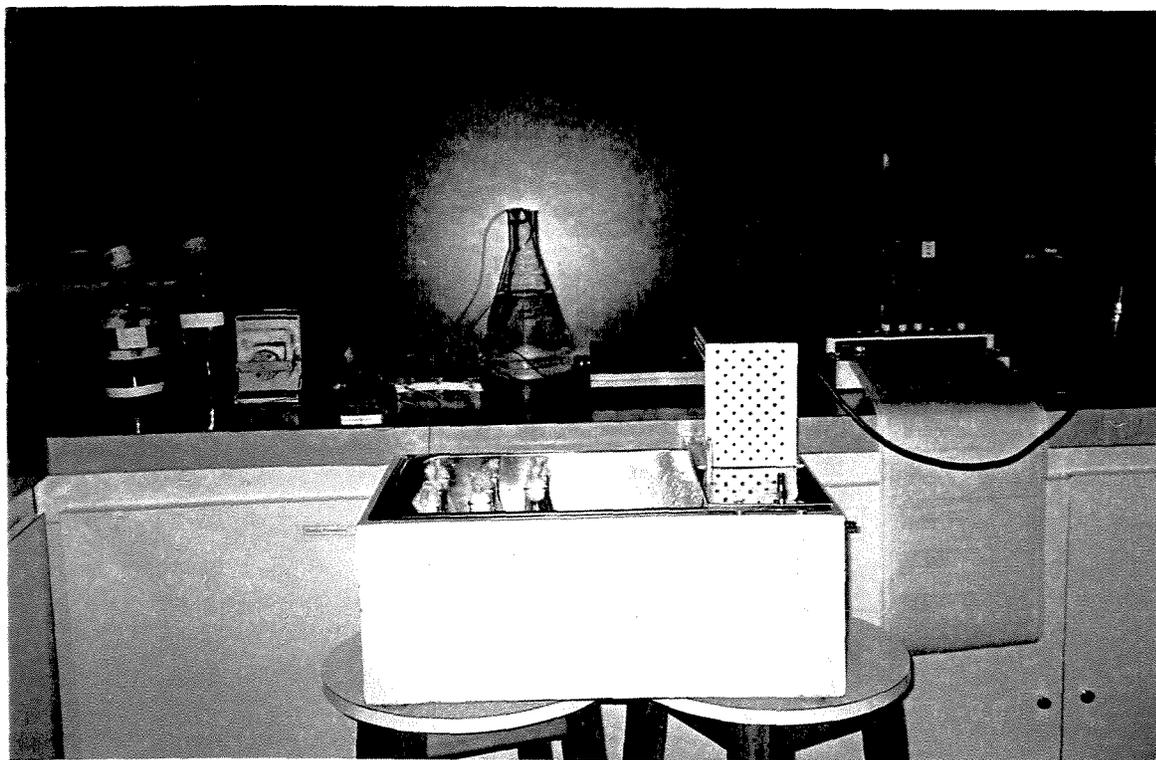


FIGURA A.1: Visão global do Sistema Fia utilizado para o teste de toxicidade.

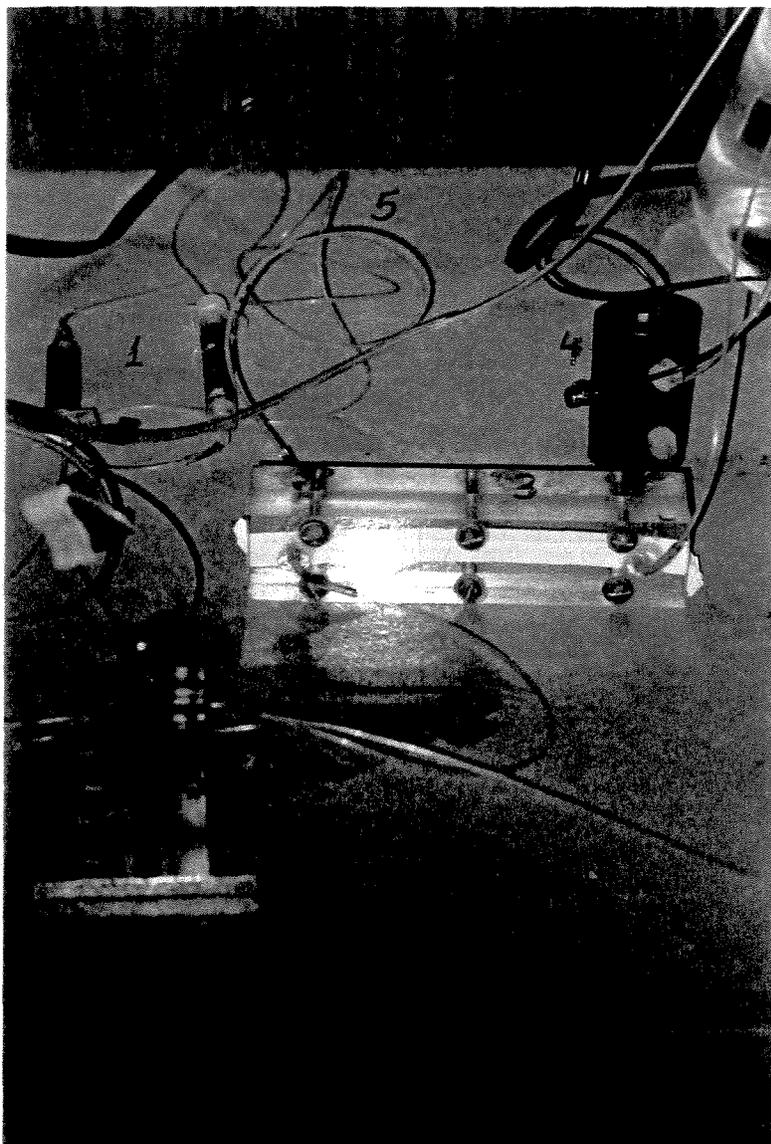


FIGURA A.2: Parte do Sistema FIA: (1) resinas de troca iônica, (2) injetor, (3) cela de difusão, (4) cela de condutividade, (5) tubos condutores de reagentes ou amostras.

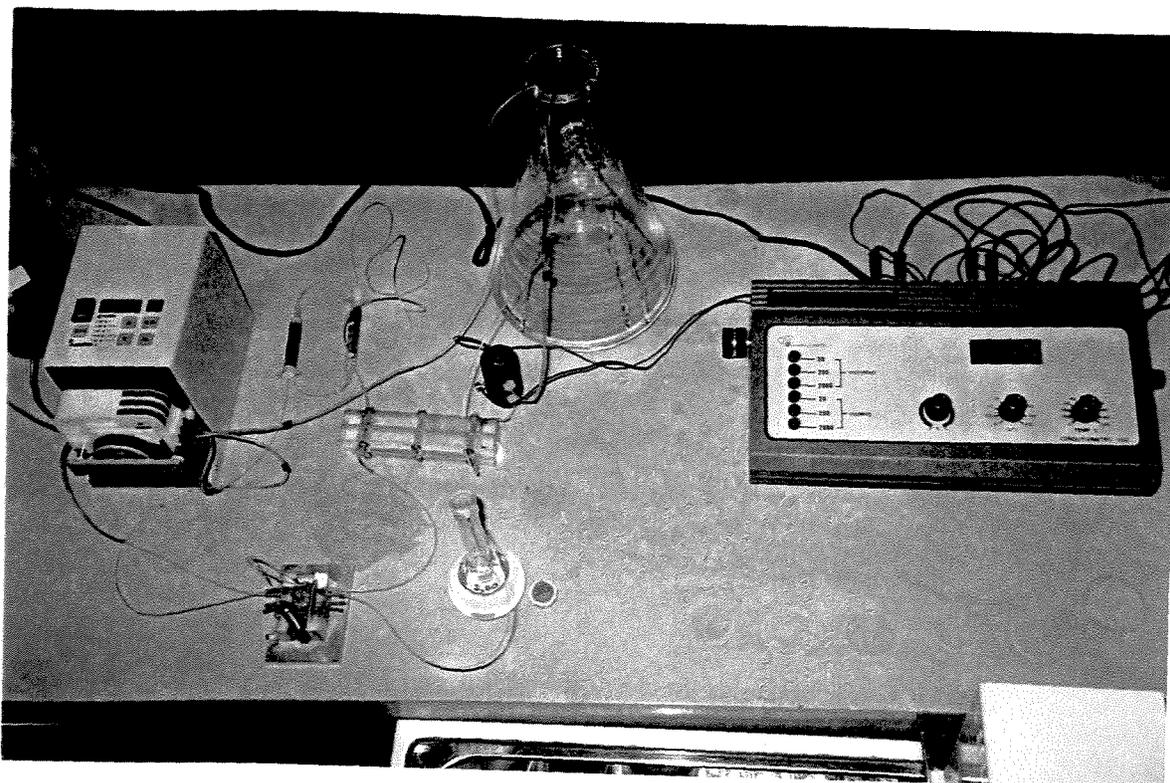


FIGURA A.3: Parte do Sistema Fia.



FIGURA A.4: Condutivímetro: recebe o sinal da cela de condutividade e envia este para o registrador.



FIGURA A.5: Banho-maria utilizado para manter as amostras à 37 °C – temperatura adequada para o crescimento bacteriano.

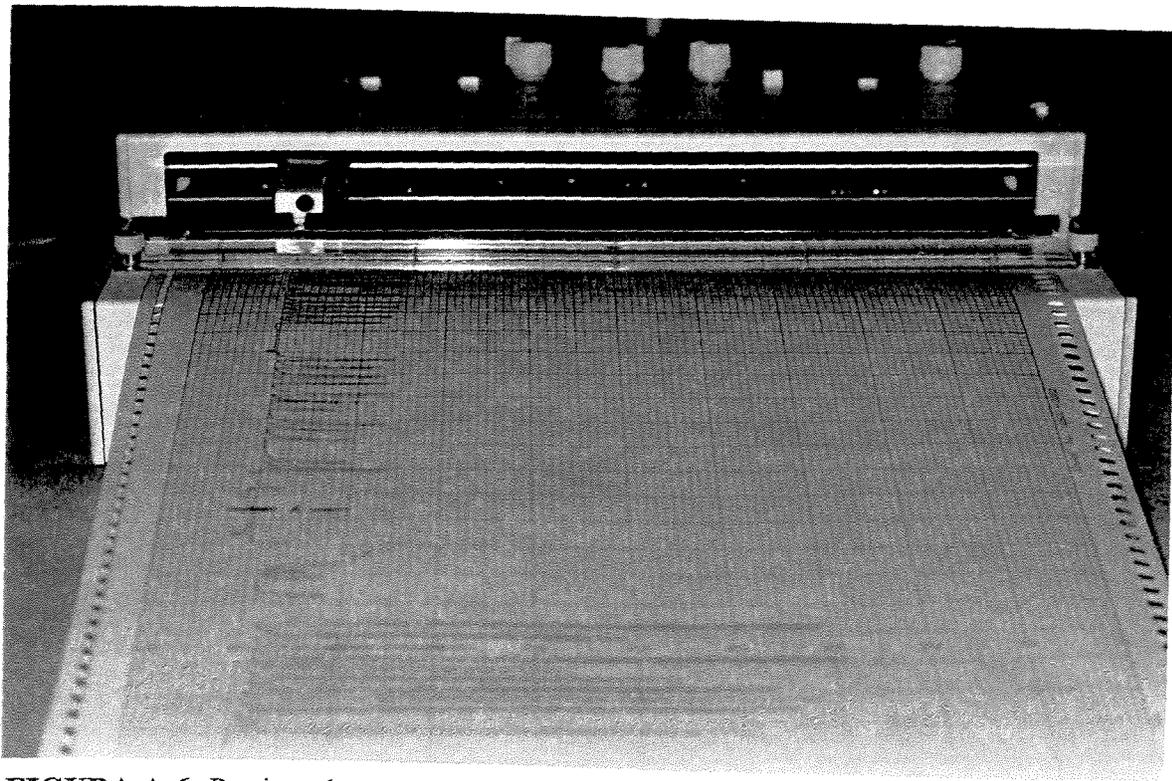


FIGURA A.6: Registrador.