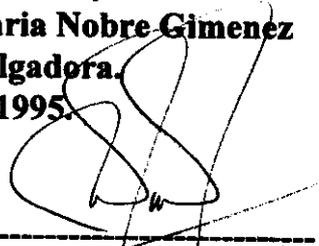


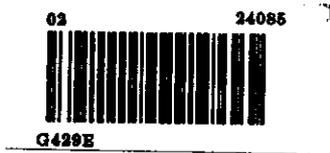
*
Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química

**Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida por Sonia Maria Nobre Gimenez
e aprovada pela comissão julgadora.
Campinas, 26 de janeiro de 1995.**



Wilson de Figueiredo Jardim

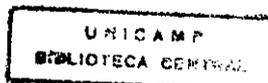
Impl.



*
Orientador Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

**Ensaio de toxicidade aguda usando
E. coli como organismo-teste**

*
Sonia Maria Nobre Gimenez
Tese de Doutorado
1994



A José Alceu (*in memorium*)

Aos meus filhos

Juliana, Camila e Luiz Fernando

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim, pela orientação e pela amizade.

Ao grupo de trabalho orientado pelo Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim (Marco, Tuca, Vera, Raquel, Sandra, Cristina, Rosana, Airton, Roberta, Ana Tereza, Fabiane e Pedro)

À Dra. Cecília de Matos Ulson à Maria Cecília Barison Villares de Oliveira e a Ulisses Moraes de Oliveira pelas discussões da área microbiológica.

À Shirlei Alice Gonçalves e Angêla Von Nowakonski pela cessão das bactérias.

À Cibele Cação Paiva Goveia e Dirce Yano (Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello) pelo plaqueamento e cessão dos microrganismos.

A Antônio Robert Siviero (Laboratório de Hidráulica e Saneamento-UNICAMP) pelo auxílio nos testes de toxicidade aguda com *Spirillum volutans*.

Aos professores Roy E. Bruns e Ronei Poppi pelos ensinamentos de Quimiometria, Celio Pasquini, Jarbas José Rohwedder e Ivo M. R. Junior pelas discussões sobre o trabalho.

À diretoria do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pelas facilidades concedidas durante a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao departamento de Química, pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

Aos meus filhos Juliana, Camila e Luiz Fernando pela compreensão e incentivo.

Aos meus pais José Paulo Nobre e Izabel P. Silva Nobre pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudo.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Em especial aos amigos Edigard, Sonia, Margery, Douglas, Marcia, Cecília, Dulcinéia, Fran, Ester, Fabiana e Dena.

RESUMO

A inibição na respiração microbiana (*E. coli*) foi avaliada através de medidas de CO₂ liberado por esta espécie. Para tais medidas utilizou-se a técnica FIA-Conducométrica a qual permitiu redução do tempo de ensaio quando comparados aos métodos frequentemente utilizados.

Numa etapa preliminar foram realizados ensaios de toxicidade aguda utilizando apenas *E. coli* como organismo-teste. Posteriormente outras bactérias como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram também testadas utilizando-se este método. Buscou-se neste trabalho atingir as seguintes metas:

- a) Um protocolo para teste de antibióticos e outros biocidas com duração máxima de oito horas, incluindo o tempo de incubação.
- b) Adaptação do procedimento (a) para testar novos produtos sintéticos da indústria química e farmacêutica.
- c) Adaptação do procedimento (a) para testar vários tipos de compostos incluindo bactericidas de uso doméstico hospitalar e industrial.

Nos ensaios de sensibilidade aos antibióticos (antibiogramas) foram testados seis antibióticos e quatro cepas da bactéria *E. coli*. Dentre as cepas testadas uma foi a padrão (ATCC 25922) e as outras três foram isoladas de pacientes do HC-UNICAMP, com infecção do trato urinário. Os resultados obtidos foram comparáveis aqueles fornecidos através de procedimentos clássicos tais como difusão em ágar e MS-2 (automatizado). Nos testes com a cepa padrão encontrou-se um fator ($R=1/20$) para a relação entre a concentração mínima inibitória (CIM), obtida da literatura, e os valores de concentração que inibiram cerca de 70 % da atividade microbiana em 120 minutos de ensaio.

As principais vantagens do método proposto, em relação aos métodos atualmente usados, foram a redução do custo e principalmente do tempo necessário para elaboração do antibiograma. Comparando-se o método proposto com o procedimento de difusão em ágar, a redução do tempo foi de aproximadamente 20 horas.

Nesta pesquisa também foram feitos testes de toxicidade aguda com os metais cobre, cádmio e mercúrio. Nos ensaios com cobre e cádmio procurou-se avaliar a atividade destes metais no meio de cultura. Em 180 minutos de ensaio, os tempos de duplicação da população microbiana, frente a adição de $5,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de CdCl₂.2H₂O e CuSO₄.5H₂O, foram 52,4 e 80,3 minutos respectivamente. Para esta concentração total de metal a atividade do cobre no meio de cultura foi de $3,0 \times 10^{-10}$

mol.L⁻¹, enquanto para o cádmio foi de $1,9 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Nos testes de toxicidade usando mercúrio, verificou-se que a glicose presente no meio de cultura ($E^{\circ} = -0,72$ V) reduz os íons Hg²⁺ a mercúrio elementar (Hg⁰) minimizando portanto a toxicidade do íon. Estes testes mostram que a inibição de $5,0 \times 10^6$ µg/L de Hg⁰ foi similar à observada para 10 µg/L de Hg²⁺ após 60 minutos de ensaio.

Foram testados também alguns compostos sintetizados por pesquisadores da área de fitoquímica do IQ-UNICAMP, mostrando deste modo a aplicabilidade do método na avaliação do potencial tóxico de novos produtos.

Nos testes de toxicidade aguda, bactericidas de uso doméstico foram testados frente à bactericidas clássicos tais como hipoclorito e Lysoform (formaldeído). Em geral, a avaliação do potencial tóxico dos bactericidas pode ser obtida em seis horas de ensaio. Nestes experimentos utilizou-se as bactérias *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Enterococcus faecalis*.

Considerando-se as vantagens do método proposto em relação ao tempo de ensaio, custo e microrganismo passíveis de serem avaliados, conclui-se que este procedimento pode substituir os procedimentos clássicos de ensaios de sensibilidade a antibióticos, bem como os métodos frequentemente usados para avaliação do potencial tóxico de desinfetantes de uso doméstico, hospitalar e industrial. Cabe ressaltar também que o método desenvolvido neste trabalho pode ser uma poderosa ferramenta na indústria de fármacos em teste de atividade biológica de novos compostos os quais, através deste método, podem ser avaliados em tempo restrito.

ABSTRACT

Conductimetric-FIA (Flow Injection Analysis) method was used to evaluate the CO₂ concentration involved in microbial respiration.

Preliminary assays were conducted with *E.coli* as test organisms. Later, *Enterococcus faecalis*, *Staphilococcus aureus* and *Salmonella choleraesuis* were also used in this procedure.

Assays were performed to elaborate a protocol related to test antibiotics and other biocides in a short time. This procedure was adapted to test new compounds including synthetic compounds of chemical and pharmaceutical industries. It can also be used to evaluate industrial, domestic and relating to a hospital bactericidal disinfectants.

The sensitivity assay (antibiograms) were tested with six antibiotics and four strains of *E. coli*. The standard strain used was ATCC 25922 and other three strains were obtained from hospital's patients (UNICAMP) with urinary infections

The results obtained were compared with the ones obtained from classical methods (Agar diffusion and automated method MS-2). Using standard strain it was found a factor ($R=1/20$) to minimal inhibitory concentration values obtained from literature (MIC-dilution) when compared with the concentrations values that inhibit 70 % of microbial activity in 120 minutes of assays.

Acute toxicity tests with copper, cadmium and mercury were also carried out, using this method. Doubling time of microbial population was 52,4 and 80,3 minutes when were exposed to $5,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ of cadmium and copper respectively in culture medium. However the activity of copper and cadmium were $3,0 \times 10^{-10}$ and $1,9 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ respectively.

Toxicity tests using mercury showed that glucose ($E^0 = -0,72$ V), present in culture medium, reduces Hg²⁺ ions to elemental mercury (Hg⁰) decreasing the toxicity of this species. This assays showed that inhibition of $5,0 \times 10^6$ ug/L of Hg⁰ was similar to observed to 10 ug/L of Hg²⁺ after 60 minutes of experiments.

Bactericidal disinfectants and compounds synthesized by researches of phytochemical area (UNICAMP) were tested using this procedure. The assays with domestic bactericidal were done using the following strains: *E.coli*, *Staphilococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* and *Enterococcus faecalis*. The time involved in these tests were near 6 hours.

The proposed method is advantageous because reduces the time involved in determination of toxicity and the cost is low when compared with other methods used in hospital routine analysis.

Sumário

	Página
Lista de tabelas	VII
Lista de figuras	X
Lista de siglas, símbolos e abrevaturas	X
Introdução	
Objetivo	8
Capítulo I- Provas de sensibilidade aos antibióticos; Antibiogramas.	9
Materiais e métodos	12
Meios de cultura	13
Equipamentos	14
Determinação do CO ₂	14
Resultados e discussão	17
Escolha do meio de cultura	17
Escolha dos antibióticos	20
Provas de sensibilidade aos antibióticos	21
Conclusões	34
Capítulo II- Ensaio de toxicidade aguda usando <i>E.coli</i> como organismo teste frente aos metais cobre, cádmio e mercúrio. A importância da especiação.	35
Materiais e métodos	37
Reagentes e soluções	37
Determinação da atividade dos metais cobre e cádmio	37
Resultados e discussões	38

Avaliação da atividade do cádmio no meio de cultura, meio de cultura incubado e meio de cultura contaminado com edta	38
Avaliação da atividade do cobre em pH 7,0 e 7,2	40
Titulação de íons fosfato e citrato presentes no meio de cultura	41
Ensaio de toxicidade com metais cobre e cádmio	43
Teste de toxicidade com mercúrio	49
Conclusões	49
Capítulo III- Avaliação do desempenho de desinfetantes de uso doméstico.	52
Materiais e métodos	55
Desinfetantes de uso doméstico	55
Microrganismos	55
Meios de cultura	55
Equipamentos	56
Testes de toxicidade	56
Resultados e discussões	56
Conclusões	67
Capítulo IV- Algumas aplicações do procedimento proposto	70
Avaliação da atividade antimicrobiana da Cabruvina e Duartina	70
Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos com atividade tripanocida	70
Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de própolis	72
Conclusões	73
Conclusão Geral	74

Referências	76
--------------------	----

Apêndice

Lista de tabelas

Tabela I- Alguns ensaios biológicos e os princípios envolvidos na execução dos mesmos	7
Tabela II- Atividade microbiana <i>E.coli</i> ATCC 25922 frente a diversos meios de cultura	18
Tabela III- População microbiana associada às soluções de sulfato de bário	18
Tabela IV- Dados de população microbiana associada à [CO ₂] produzida no ensaio com <i>E.coli</i> em meio meio mínimo	19
Tabela V- Antimicrobianos propostos para provas de rotina	20
Tabela VI- Prova de sensibilidade aos antimicrobianos (organismo teste <i>E.coli</i>). Resultados obtidos pela técnica MS-2, pelo método de difusão em ágar e pelo método FIA	29
Tabela VII- Concentrações de antibióticos empregados Difusão em ágar(quantidade da droga contida no disco), MS-2 e FIA concentrações em mg/L.	29
Tabela VIII- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a gentamicina.	30
Tabela IX- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a cefazolina	30
Tabela X- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a amicacina	30
Tabela XI- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a ampicilina.	31
Tabela XII- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E.coli</i>) frente ao cloranfenicol.	31

Tabela XIII- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a cefalotina	31
Tabela XIV- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a tetraciclina	33
Tabela XV- Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a tobramicina	33
Tabela XVI- Atividade do cádmio no meio de cultura, meiode cultura incubado e meio de cultura contendo edta ($5,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$)	39
Tabela XVII- Atividade do cádmio e do cobre em meio de cultura em função da concentração total do metal.	43
Tabela XVIII- Concentrações de CO ₂ (mM) obtidas em ensaios com <i>E. coli</i> frente ao cádmio (CdCl ₂ .2H ₂ O)	44
Tabela XIX Concentrações de CO ₂ (mM) obtidas durante ensaios com <i>E. coli</i> frente ao cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	44
Tabela XX- Tempo de duplicação da população microbiana (<i>E. coli</i>) frente ao cádmio e cobre	47
Tabela XXI- Volumes dos bactericidas usados nos testes de toxicidade e concenteações dos respectivos princípios ativos	57
Tabela XXII Inibição (%) da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a bactericidas de uso doméstico. Concentrações conforme tabela XXI	58
Tabela XXIII- Concentrações (mg/L) para atingir o MEC ₉₀ para <i>Spirillum volutans</i> em 90 minutos de ensaio	59
Tabela XXIV- Populações microbianas (10^6 ufc/ml) correspondente a diferentes concentrações de CO ₂ .	60
Tabela XXV- Comparações dos resultados obtidos por plaqueamento e FIA condutométrico no ensaio com <i>E. coli</i> frente a 0,2 % v/v dos bactericidas ([CO ₂] inicial $0,54 \text{ mmol.L}^{-1}$).	67
Tabela XXVI- Inibição da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente aos compostos R(a~e)	71

Tabela XXVII- Comparação entre as porcentagens de inibição das amostras (15 mg/L) de própolis após 120 minutos de ensaio	73
--	----

Lista de figuras

Figura 1- Redução de resazurin a resofurin na presença da enzima desidrogenase	3
Figura 2- Esquema de funcionamento do FIA condutométrico	15
Figura 3- Curva de calibração obtida com sistema FIA-condutométrico usando padrões de carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	16
Figura 4- Superfície de resposta de [CO ₂], absorvância e tempo obtidos no ensaio com <i>E. coli</i> em meio mínimo	19
Figura 5a- Resposta microbiana (<i>E. coli X</i>) na presença de ampicilina	23
Figura 5b- Resposta microbiana (<i>E. coli Y</i>) na presença de ampicilina	23
Figura 5c- Resposta microbiana (<i>E. coli Z</i>) na presença de ampicilina	24
Figura 6a- Resposta microbiana (<i>E. coli X</i>) frente ao cloranfenicol	25
Figura 6b- Resposta microbiana (<i>E.coli Y</i>) frente ao cloranfenicol	25
Figura 6c- Resposta microbiana (<i>E.coli Z</i>) frente ao cloranfenicol	26
Figura 7a- Resposta microbiana (<i>E.coli X</i>) frente a tobramicina	27
Figura 7b- Resposta microbiana (<i>E.coli Y</i>) frente a tobramicina	27
Figura 7c- Resposta microbiana (<i>E.coli Z</i>) frente a tobramicina	28
Figura 8- Comparação dos resultados obtidos pelo método FIA-condutométrico e CIM obtidos da literatura	32

Figura 9- Atividade do cobre em meio de cultura incubado (8×10^8 células) e meio de cultura contaminado com edta (5×10^{-6} mol.L ⁻¹)	40
Figura 10- Atividade do cobre em solução de KNO ₃ 0,5 mol.L ⁻¹ e no meio de cultura em pH 7,0 e 7.2	41
Figura 11- Titulação das soluções de citrato ($2,6 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹), fosfato monoácido ($7,3 \times 10^{-2}$ mol.L ⁻¹) e fosfato diácido ($3,1 \times 10^{-2}$ mol.L ⁻¹) com cobre	42
Figura 12- Inibição da respiração microbiana frente ao cádmio conforme tabela XVIII	45
Figura 13- Inibição da respiração microbiana frente ao cobre conforme tabela XIX	46
Figura 14- Concentrações de CO ₂ obtidos para <i>E. coli</i> frente ao níquel	48
Figura 15- Inibição da respiração microbiana frente ao níquel	48
Figura 16- Inibição da respiração microbiana (<i>Salmonella Choleraesuis</i>) frente a desinfetantes de uso doméstico; (a) 0,2 % e (b) 1,0 % v/v	61
Figura 17- Inibição da respiração microbiana (<i>Enterococcus faecalis</i>) frente a bactericidas de uso doméstico; (a) 0,025 % e (b) 0,05 % v/v	62
Figura 18- Inibição da respiração microbiana (<i>Staphilococcus aureus</i>) frente a bactericidas de uso doméstico; (a) 0,05 % e (b) 0,2 % v/v	63
Figura 19- Inibição da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a bactericidas de uso doméstico 0,2 % v/v (a) meio mínimo (b) caldo nutriente	65
Figura 20- Inibição da respiração microbiana (<i>E. coli</i>) frente a bactericidas de uso doméstico 1 % v/v (a) meio mínimo e (b) caldo nutriente	66
Figura 21- Fórmula geral dos compostos testados (X= Cl, H, OCH ₃ , NO ₂ , CH ₃)	71

Lista de abreviaturas e siglas

EC₅₀ - Concentração que inibe 50 % da atividade microbiana.

MEC₉₀ - Concentração que promove perda da motilidade típica em 90 % da atividade microbiana (*Spirillum volutans*).

TCC - Cloreto de tetrazolina

ufc - unidade formadora de colônias

CIM - concentração inibitória mínima

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

FIA - Análise por Injeção em Fluxo

Introdução

As duas últimas décadas presenciaram uma grande mudança social quanto à preocupação com aspectos da preservação ambiental. O impacto de compostos químicos sobre organismos vivos e ambientes em geral tem se tornado um tema de constante debate na comunidade científica. Esta maior conscientização gerou uma demanda por dados toxicológicos que até o momento não pode ser plenamente atendida. Sabe-se hoje que a toxicidade de efluentes industriais, por exemplo, dificilmente pode ser prevista apenas através de análises físico-químicas.

Os ensaios de toxicidade utilizando organismos vivos ainda são uma ferramenta mais realista na avaliação do potencial tóxico do que uma série de dados físico-químicos da matriz em estudo. Alguns ensaios biológicos relacionados principalmente aos problemas ambientais, têm sido desenvolvidos e empregados com objetivo de avaliar e detectar a influência do aporte de efluentes industriais e domésticos, bem como de diferentes substâncias químicas, em ambientes aquáticos. Estes procedimentos utilizam organismos pertencentes à diferentes níveis tróficos do ambiente aquático, como por exemplo, as algas (*Chlorella vulgaris* ou *Selenastrum capricornutum*), os crustáceos ou micro-crustáceos (*Daphnia similis* ou *Ceriodaphnia sp* e *Cheirodom notomelas*) e peixes (*Hemigrammus marginatus* ou *Poecilia reticulata*) (CETESB, 1990; 1991). Para cada grupo taxonômico testado foi determinado o tempo mínimo de exposição. Em média 96 horas de exposição são suficientes para que se manifeste o efeito agudo em peixes. Para o microcrustáceo do gênero *Daphnia* tem sido adotado um intervalo de 24 a 48 horas.

Em função da simplicidade, rapidez e do baixo custo, os ensaios com bactérias, fungos e leveduras têm sido cada vez mais utilizados não só no monitoramento de substâncias químicas e efluentes mas também na avaliação do potencial tóxico de novos compostos. Estes organismos podem responder ao estresse em tempos relativamente curtos. Este estresse pode ser medido e avaliado monitorando-se um ciclo bioquímico vital do organismo, como por exemplo, a atividade enzimática, ATP (Adenosina Trifosfato), bioluminescência e respiração (Simpson e Kobos, 1982, 1983; Dutka et alii, 1983; Jardim e Pearson, 1990; Decool et alii, 1991; Codina et alii 1993). No entanto, uma única espécie ou um único teste pode não representar fielmente o nível global de poluição de um sistema ou a toxicidade de um metal ou determinado composto. Portanto, as melhores respostas estão associadas a uma bateria de testes.

Alguns experimentos englobando diferentes ensaios com bactérias têm sido empregados para avaliar a toxicidade de diversos compostos. Cabe ressaltar que os

procedimentos fundamentados nos ensaios biológicos são distintos no que se refere aos bioensaios e aos testes de toxicidade. Estes testes podem ser classificados em testes de toxicidade aguda e crônica. No teste de toxicidade aguda um estudo experimental com os organismos é feito com objetivo de determinar o efeito que ocorre em um curto período de tempo após administração de uma dose (ou exposição a uma determinada concentração) da substância ou após múltiplas doses. O teste de toxicidade crônica permite avaliar o efeito adverso sobre um organismo exposto a uma substância química com concentrações subletais. O período de tempo envolvido nos testes de toxicidade aguda e crônica varia com a espécie testada (Rand e Petrocelli, 1985).

Os bioensaios são procedimentos usados para estimar a concentração ou atividade biológica de uma substância (vitamina, hormônio, antibiótico) pela medida do efeito destes sobre determinado(s) organismo(s) comparado a um padrão. Ensaios biológicos podem ser utilizados também para avaliar o potencial tóxico de diversos compostos tais como efluentes, desinfetantes e produtos agrícolas como por exemplo pesticidas e herbicidas. Estes ensaios têm sido usados também para avaliar as mudanças ambientais decorrentes principalmente da atividade antrópica. Através deles é possível estudar o efeito tóxico agudo ou crônico causado por substâncias químicas ou diferentes compostos sobre determinados organismos, espécies isoladas ou consórcio de espécies. Portanto, estes ensaios avaliam a sensibilidade ou resistência da espécie testada frente a um agente estressante. Dentre os ensaios utilizados para avaliar os efeitos e riscos à saúde e os ensaios referentes aos efeitos ecológicos, destacam-se o teste de Ames, o Microtox[®] e o teste com *Spirillum volutans*.

O teste de Ames é um exemplo de ensaio que tem por objetivo avaliar a capacidade que determinados compostos possuem de causar mutações de ponto no genoma de cepas de *Salmonella typhimurium* através da reversão da mutação his⁻ para his⁺ na presença ou ausência de sistema de ativação metabólica. Este ensaio requer um tempo superior a 66 horas e tem sido utilizado nos estudos de impacto ambiental para localização e caracterização das fontes poluidoras com possível atividade mutagênica.

O Microtox[®] é um teste de toxicidade aguda que utiliza a bactéria marinha *Photobacterim phosphorium*. Neste ensaio mede-se a redução da quantidade de luz naturalmente emitida por este microrganismo. O tempo envolvido na elaboração do ensaio pode ser fixado em 5, 10 ou 15 minutos.

Ensaios de toxicidade aguda utilizando *Spirillum volutans* têm sido bastante empregado. Este teste baseia-se na perda da motilidade típica em 90 % das bactérias em até duas horas de ensaio (MEC90)

A vantagem do emprego destes ensaios, principalmente os dois últimos, está associada à redução do tempo de resposta quando comparada com testes feitos com peixes e crustáceos.

Outros métodos, baseados em ensaios biológicos, foram propostos para medir a inibição da atividade microbiana. Dorward e Barisas (1984) realizaram testes de toxicidade aguda com poluentes aquáticos utilizando um eletrodo bacteriano. O método envolve medidas potenciométricas do CO₂ liberado por células de *E. coli* imobilizadas numa membrana sintética que recobre um eletrodo sensível a CO₂. Neste ensaio algumas medidas podem ser efetuadas em período de tempo inferior a 15 minutos. No entanto, os interferentes, a baixa sensibilidade e a pouca atividade de alguns compostos tóxicos a baixas concentrações, foram as principais limitações da aplicabilidade do método.

Brower (1991) utilizou como organismo teste o *Bacillus cereus* frente a um composto aceptor de elétrons, o qual muda de cor (azul, resazurina, para rosa, resorufina) em função da redução via uma enzima desidrogenase, resultante da atividade microbiana no meio de cultura (Figura 1). Liu (1983) havia empregado este mesmo procedimento utilizando lodo ativado.

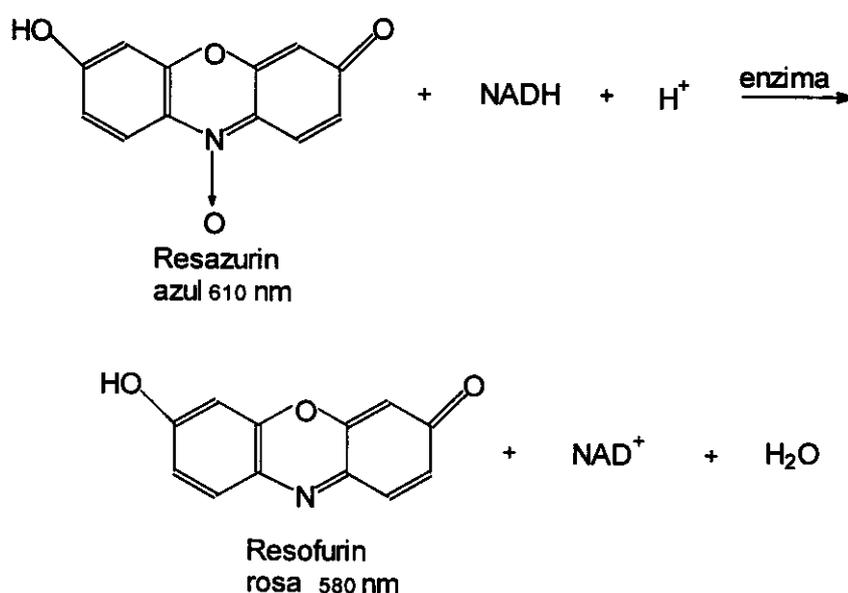


Figura 1- Redução de resazurina à resorufina na presença da enzima desidrogenase.

Através da redução do composto químico, o valor de EC₅₀ pode ser estimado. O período de tempo envolvido no preparo da suspensão bacteriana para este teste é superior a 30 horas. Um dos problemas que surgem não apenas neste, mas também em outros ensaios, é a possibilidade de interação de alguns metais com os compostos presentes no

meio de cultura utilizado, como por exemplo o fosfato. Esta interação pode favorecer a diminuição da atividade do metal resultando portanto em dados de toxicidade incorretos.

Uma vez que os testes diferem na metodologia, microrganismos, reagentes biológicos e tempo de incubação, o grande interesse no uso de vários ensaios está associado à comparação da execução e dos resultados destes com objetivo de especificar cada ensaio. Estudos comparativos de valores de EC₅₀ (Microtox[®]), MEC₉₀ (*Spirillum volutans*) e LC₅₀ (peixes) têm mostrado que existe uma boa correlação entre estes testes (CETESB, 1992).

Sanches et alii, (1988) avaliaram a toxicidade de efluentes industriais do estado de São Paulo empregando os seguintes ensaios; teste de toxicidade aguda com *Photobacterium phosphoreum* (Microtox[®]), *Spirillum volutans*, inibição de crescimento empregando *Pseudomonas fluorescens*, ensaios avaliando desidrogenase usando *Bacillus cereus*, ensaios com *Daphnia similis*, testes de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), *Escherichia coli* WP₂ e ensaios de reversão de mutação usando *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre estes testes o Microtox[®] e o *Spirillum volutans* mostraram alta sensibilidade e boa concordância com os ensaios com *Daphnia similis*, demonstrando que estes testes são potencialmente úteis como indicadores da toxicidade dos efluentes industriais em ambientes aquáticos.

Dutka et alii (1983) avaliaram, através de diferentes testes de toxicidade aguda (Microtox[®], *Spirillum volutans*, inibição da respiração e o ensaio com TTC-desidrogenase (cloreto de tetrazolina), para lodo ativado, usando diferentes compostos químicos e alguns metais. Apesar de apresentarem um número limitado de dados, de um modo geral os testes foram decrescentemente ordenados em termos de sensibilidade por; Microtox[®], *Spirillum volutans*, inibição da respiração e TTC-desidrogenase para lodo ativado. O lodo ativado constitui um consórcio de microrganismos formados por bactérias, fungos, leveduras, protozoários e metazoários. Dentre as bactérias heterotróficas incluem-se as do gênero, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacter* e *Zoogloea*.

Os testes citados anteriormente evidenciam que cada microrganismo utilizado apresenta diferenças em termos de sensibilidade frente a cada composto testado. Por isto, alguns pesquisadores aconselham o uso de uma bateria de testes biológicos para avaliação da toxicidade destes. Em geral, a toxicidade de alguns compostos, bem como de metais, em ambientes aquáticos naturais ou poluídos, sofre a influência do pH, Eh, matéria orgânica, temperatura e pressão hidrostática (Babich e Stotzky, 1986).

Codina et alii (1993) empregaram diferentes testes microbiológicos de toxicidade com objetivo de comparar a sensibilidade frente a diversos metais em solução e em efluentes. Estes pesquisadores avaliaram o crescimento (turbidez e contagem em placas) e a respiração (microscopicamente) de *Pseudomonas fluorescens* e *Saccharomyces cerevisiae*. Empregaram também o teste com *Photobacterium phosphoreum* (Microtox®). Este teste foi o mais sensível em detectar a toxicidade do cobre, zinco e mercúrio enquanto que o cromo e o cádmio foram melhor detectados pela inibição do crescimento de *Pseudomonas fluorescens*. Em geral, os valores de EC₅₀ para os metais em solução de efluentes comparados com soluções puras, foram maiores para todos os testes. Esta diferença foi justificada pela presença de compostos orgânicos e inorgânicos na matriz, uma vez que estes reduzem a disponibilidade dos metais no meio.

Reteuna et alii (1989) avaliaram a toxicidade de alguns compostos e metais normalmente encontrados em ambientes aquáticos, utilizando três ensaios com bactérias; o teste Microtox®, o consumo de oxigênio a partir do consórcio de bactérias existente no lodo ativado e a mineralização da glucose por *E.coli*. Destes, o mais sensível para todos os compostos testados foi o ensaio de consumo de oxigênio. Estes pesquisadores concluíram que os dois fatores que justificaram parcialmente a menor sensibilidade estão associados à densidade bacteriana e à especiação dos compostos no meio de cultura.

Estudos comparativos de toxicidade de compostos em soluções puras ou misturas destas são necessários uma vez que, através dos dados obtidos, é possível avaliar o sistema em estudo e esta avaliação servir de guia para seleção de ensaios, com sensibilidade apropriada, para o estudo de outros sistemas.

Blum e Speece (1991) testaram cerca de 100 compostos químicos empregando 3 grupos de bactérias (metanogênicas, heterotróficas aeróbicas e nitrossomonas). De acordo com estes pesquisadores as correlações encontradas entre os dados de toxicidade dos compostos frente aos diferentes microrganismos testados, podem ser utilizados na previsão da toxicidade a outro organismo. Os resultados de EC₅₀ obtidos foram comparados também com dados da literatura (Microtox® e peixes).

Outros ensaios baseados principalmente na atividade enzimática ou biossintética têm sido bastante empregados. Estes ensaios podem ser miniaturizados, automatizados e as medidas podem ser feitas usando espectrofotômetros, leituras em placas, fluorímetros ou cintiladores. Algumas enzimas envolvidas na execução destes são: desidrogenases, ATPase, esterases, fosfatases, ureases, luciferases, β -galactosidase, α -glucosidase e triptofanase (Bitton e Koopman, 1992).

Na tabela I encontra-se um resumo de alguns ensaios. Dentre estes destacam-se o Microtox[®] e o teste com *Spirillum volutans*. A diferença de sensibilidade de cada teste pode ser explicada pelas características de cada ensaio considerando principalmente a espécie empregada, a densidade do inóculo usado e o meio de cultura em função da interação deste com os compostos a serem testados.

Devido principalmente ao baixo custo e à rapidez de execução, os ensaios microbianos estão sendo cada vez mais incluídos nos protocolos para avaliação da toxicidade de efluentes industriais e domésticos em ambientes aquáticos.

Apesar de existir um grande número de ensaios, algumas pesquisas devem ser direcionadas à elaboração e normalização de novos testes de curta duração, que possam ser empregados com espécies mais representativas do sistema em estudo. O Microtox[®] por exemplo, tem sido bastante empregado na avaliação do potencial tóxico de efluentes industriais e de diversos compostos. No entanto, o organismo-teste, *Photobacterium phosphoreum*, é uma bactéria marinha que pode não representar adequadamente a toxicidade dos organismos de muitos ambientes aquáticos interiores onde aportam os efluentes.

Outros ensaios que envolvem contagem de células são bastante laboriosos sendo necessário pesquisar alternativas que diminuam o tempo e o custo envolvido na elaboração destes.

Experimentos envolvendo respirometria, mais precisamente medidas do consumo de O₂ ou produção de CO₂ por microrganismos, foram bastante usadas no passado e alguns ensaios, baseados neste procedimento continuam sendo empregados (Bitton e Dutka, 1986; Guimarães, 1990; Wu, 1990). Dos métodos empregados atualmente, baseados no procedimento dos antigos respirômetros, destaca-se o ensaio da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Este procedimento é utilizado rotineiramente nas análises de águas residuárias e embora possa ser visto como um ensaio de toxicidade é raramente encarado como tal. Os antigos respirômetros usavam um pequeno volume de culturas puras sendo portanto difícil empregá-los nos trabalhos de pesquisas com plantas de tratamentos de efluentes. Dentre outras, esta foi a limitação principal que incentivou os pesquisadores da área a desenvolverem os manômetros automáticos com maior capacidade volumétrica. Em função do tempo envolvido nas análises e da baixa reprodutibilidade, os antigos respirômetros foram parcialmente abandonados.

Tabela I- Alguns ensaios biológicos e os princípios envolvidos na execução destes.

Ensaio / Princípios	Microrganismos	Referências
Ames / Mutações do ponto de genomas de cepas de <i>S. typhimurium</i> através da reversão da mutação his ⁻ para his ⁺ na presença ou ausência da ativação metabólica.	<i>Salmonella typhimurium</i>	Hoffman, G.R. (1982) Valent, G.U. (1990)
ATP / Efeito inibitório sobre adenosina trifosfato (ATP) via determinação da produção de luz resultante da transformação da luciferase à luciferina.	<i>Escherichia coli</i> , lodo ativado	Kennicutt, M.C. (1980)
Consumo de oxigênio / inibição da respiração medida com eletrodo de oxigênio.	lodo ativado	Reteuna, et alii (1989)
Inibição do crescimento / Inibição do crescimento de culturas puras ou misturas destas medidas via absorbância, contagem em placas ou medidas de zona de inibição em meio sólido.	<i>Aeromonas punctata</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Zoogloea ramigera</i> e cepas de <i>Thiotrix</i>	Alsop, G.M. (1980) Anderson, A.C. Abdelghani, A.A. (1980) Codina et alii, (1993), Schuttleworth, K.L. e Unz, R.F. (1991)
Microtox / Inibição da bioluminescência, medidas da quantidade de luz emitida pela bactéria marinha <i>P. phosphoreum</i> .	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Bulich, A.A. (1984) Arbuckle, B.W. e Alleman, J.E. (1992)
Mineralização da glucose / Avaliação do CO ₂ liberado por <i>E.coli</i> na presença da glucose U- ¹⁴ C. O metabolismo é seguido usando cintilador.	<i>Escherichia coli</i>	Reteuna et alii, (1989) Larson, R.J. e Schaeffer, S.L. (1982)
Nitrificação / Inibição de oxidação da amônia a nitrato. Inibição da oxidação de nitrito a nitrato.	<i>Nitrossomonas sp</i> <i>Nitobacter sp</i>	Liang, C.N. Tatatabai, M.A. (1978) Blum, D.J. e Speece, R.E. (1991)
Respiração / Inibição da concentração de CO ₂ produzida pela espécie, medida potenciométricamente com o auxílio de um eletrodo sensível a CO ₂ .	<i>Escherichia coli</i>	Dorward, E.J. e Barisas, B.G. (1984)
Respirometria / Inibição do número de células contadas com auxílio de microscópio a partir da reação destas com verde de malaquita.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bitton et alii, (1984) Codina, et alii (1993)
Teste com <i>Spirillum volutans</i> / Perda da motilidade típica das bactérias.	<i>Spirillum volutans</i>	Coleman, R.N. e Quereshy, A.A. (1985) Dutka et alii (1983)
Teste com elétron acceptor / a enzima desidrogenase reduz resazurina a resofurina	<i>Bacillus cereus</i>	Liu, D. (1983) Brower, H. (1991)

Mais recentemente o resgate destes associado ao emprego de técnicas analíticas proporcionaram principalmente maior precisão, limites de detecção mais baixos para o CO₂, a redução do tempo de execução e do custo dos ensaios (Pasquini e Farias, 1987; Jardim et alii 1990, 1991; Guimarães e Jardim, 1993).

Apesar de não existir um teste de toxicidade ideal, a escolha deste depende do objetivo do projeto de pesquisa e igualmente da execução e dos limites de cada ensaio.

Nesta pesquisa, a inibição da respiração microbiana foi o parâmetro utilizado para avaliar o potencial tóxico do agente estressante. A determinação analítica do produto da respiração (CO₂) foi feita com o auxílio da técnica analítica de Análise por Injeção em Fluxo (FIA). O uso desta técnica permitiu uma maior velocidade analítica com menor limite de detecção do CO₂(aq).

A importância da aplicação deste procedimento tanto no aspecto científico como no campo social, é a adaptação e calibração do mesmo para utilização em antibiogramas, nos testes de avaliação do potencial de novos compostos e em testes de toxicidade de efluentes de diversas origens.

Objetivo

O objetivo principal desta pesquisa é o desenvolvimento de um procedimento para avaliar o potencial antimicrobiano de diferentes antibióticos, através de ensaios de toxicidade aguda, usando *E. coli* como organismo teste. Neste procedimento buscou-se reduzir o tempo e o custo envolvidos na elaboração de antibiogramas, nos testes de toxicidade aguda com metais e na avaliação do potencial tóxico de bactericidas de uso doméstico ou hospitalar. Procurou-se demonstrar que este procedimento pode também ser aplicado na varredura (screening) de novos compostos, principalmente os da indústria farmacêutica.

Capítulo I

Provas de sensibilidade aos antibióticos usando *E.coli* como organismo-teste. Antibiogramas.

As provas de sensibilidade que são usadas nos laboratórios de microbiologia clínica têm por finalidade encontrar o melhor agente antimicrobiano para o paciente. Dentre os testes disponíveis para avaliação da atividade antimicrobiana de uma droga encontram-se as técnicas de diluição, de difusão e os métodos automatizados.

As provas de diluição, macrocaldo ou macrodiluição, geralmente empregam tubos de ensaio de 13 x 100 mm. O meio de cultura indicado é o Mueller-Hinton e o inóculo deve apresentar concentração de 10^5 a 10^6 ufc/ml (unidade formadora de colônia) ou proporcional a 0,5 da escala padrão de Mc Farland (Stainer,1969). Um mililitro da solução com concentração definida do antibiótico é adicionado à solução padronizada de microrganismos. Os tubos, com diferentes concentrações da droga, são incubados à temperatura de 35 °C por um período de 16 a 20 horas. A menor concentração do antibiótico que provoca inibição do crescimento é observada visualmente comparada a um controle.

As provas de diluição, microcaldo ou microdiluição, também utilizam o meio de cultura Mueller Hinton ou este meio suplementado. O agente antimicrobiano é diluído em volumes que variam de 0,05 a 0,2 ml. Nesta prova a densidade final de microrganismos recomendada é de aproximadamente 10^5 ufc/ml. O período de incubação é também de 16 a 20 horas a 35 °C. Após este período avalia-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Ximenes,1973; Matsen,1980). A quantificação desta concentração (CIM) é, portanto de vital importância dentro deste campo.

As provas de diluição de drogas em caldo nutriente foram bastante usadas nas décadas de 60 e 70 sendo gradativamente substituídas pelas provas de microdiluição principalmente em função da praticidade desta. A grande vantagem da técnica de microdiluição é que as bandejas contendo o antimicrobiano, congelado ou liofilizado, podem ser fabricadas comercialmente para serem usadas em laboratórios clínicos.

Atualmente o método de difusão em ágar é o processo mais empregado na avaliação da sensibilidade dos microrganismos aos agentes quimioterapêuticos. Neste método utiliza-se um disco de papel absorvente que mede cerca de 6 mm de diâmetro e contém uma quantidade definida do agente antimicrobiano. Este disco é colocado sobre a superfície do ágar previamente pincelada com uma suspensão microbiana e irá produzir

uma zona concêntrica de inibição do crescimento, se o microrganismo for sensível ao agente. As zonas concêntricas de inibição possuem em geral uma relação linear com a CIM para a maioria dos antimicrobianos avaliados pelas provas de diluição (Jones et alii, 1985; Barry e Thornsberry, 1985). Por meio desta relação, as medidas destas zonas podem ser usadas para prever a resposta "in vivo" dos microrganismos testados.

No método recomendado para prova de difusão em ágar proposto por Bauer e colaboradores em 1966 utiliza-se um único disco para cada antimicrobiano. Este método foi modificado por Rayan e colaboradores em 1970 e proporcionou a transformação de halos de inibição em CIM por meio de uma linha de regressão (Ximenes, 1973; Ryan, 1970). Recomendações da FDA (Food and Drug Administration) também sugerem modificações para o método de Bauer. O método modificado recomenda o uso do meio de cultura Mueller Hinton suplementado com sangue de cavalo ou de ovelha, desfibrinado a 5 % ou ágar Mueller Hinton. Propõe também o uso de placas de Petri de 150 mm e a profundidade do ágar deve ser de 4 a 6 mm. O inóculo utilizado deve ser comparado à turbidez padrão de uma solução de sulfato de bário (0,5 ml de cloreto de bário, BaCl₂, a 1 % e 99,5 ml de solução de ácido sulfúrico, H₂SO₄ 0,36 N, a 1 %) (Matsen, 1985). Após aplicação do disco, as placas são mantidas a 35 °C por 16 a 18 horas quando então avaliam-se os halos de inibição com auxílio de uma régua. De um modo geral, estas recomendações visam a padronização do procedimento.

Ensaio mais precisos que os citados anteriormente utilizam técnicas automatizadas para acompanhar o crescimento microbiano através de amostragem discreta. Dentre estas técnicas encontram-se as que envolvem desde simples detecção turbidimétrica até espectrofotometria com raio laser.

Os sistemas Autobac-1 e Autobac-MTS (Charles Pfizer, Groton, Conn) por exemplo, usam a técnica de dispersão da luz e fornecem dados de CIM comparáveis aos obtidos com os testes de microdiluição e com o método de Bauer-Kirby. Os resultados podem ser fornecidos após um período de incubação de 3 a 5 horas.

O sistema MS-2 (Abbott Laboratories Diagnostic Division, Dallas) usa fotodetectores e diodos emissores de luz que monitoram a turbidez em intervalos de 5 minutos para cada posição da cubeta. O meio de cultura incubado é transferido automaticamente para a cubeta contendo o disco com antibióticos. Este sistema também fornece dados de sensibilidade antimicrobiana em aproximadamente 5 horas de ensaio. O AMS (Vitek Systems, McDonnell Corp, St Louis) é um sistema automático combinado de detecção-enumeração-identificação e provas de sensibilidade antibiótica que utiliza um sistema eletroóptico com diodos emissores de luz. Este equipamento bem como os

anteriormente citados são acoplados a microprocessadores que contribuem para a obtenção mais rápida dos resultados. O Sistema Diferencial III (Science Spectrum, Santa Barbara, Calif.) é um equipamento programável que detecta luz de uma solução bacteriana. A cubeta que contém a amostra é irradiada com um raio laser hélio-neon verticalmente polarizado. Um amplo sistema processador pode converter os dados de CIM aos clássicos resultados "sensível" e "resistente" em até 90 minutos de ensaio (Goldschmidt, 1980).

Avaliando-se as técnicas e os métodos disponíveis observa-se que enquanto as provas de diluição, macro e microdiluição, bem como o método de difusão, Bauer-Kirby ou modificações deste, fornecem os resultados em intervalos de 18 a 24 horas, os métodos automatizados, Autobac-1, Autobac MTS, MS-2, podem fornecer tais informações em períodos de 3 a 6 horas. Quando se avalia a sensibilidade a antimicrobianos utilizando o Sistema Diferencial III este intervalo de tempo pode ser reduzido para 90 minutos. No entanto, o uso destas técnicas automatizadas é restrito a poucos laboratórios e hospitais devido ao alto custo envolvido não só na aquisição e manutenção destes equipamentos mas também na aquisição do material padronizado (kits) necessários para análise de rotina.

Apesar disto, existe a necessidade de se obter resultados mais rápidos na avaliação da sensibilidade microbiana às drogas. Quanto mais demorado for o resultado destas análises, menor a possibilidade de se usá-lo para alterar um tratamento previamente iniciado.

Como se pode observar, técnicas mais rápidas e de baixo custo devem ser desenvolvidas para elaboração de provas de sensibilidade bacteriana aos antibióticos. Estas técnicas seriam destinadas a laboratórios de microbiologia particulares ou subsidiados, mas principalmente para os que não possuem dotações orçamentárias que permitam a aquisição de equipamentos automatizados.

Os objetivos desta pesquisa são: (a) desenvolvimento de uma técnica que atenda plenamente os requisitos citados anteriormente, (b) a elaboração de um protocolo para prova de sensibilidade microbiana às drogas com duração máxima de oito horas e (c) que o procedimento proposto apresente resultados comparáveis aos procedimentos atualmente aceitos e praticados.

Materiais e Métodos:**Reagentes e soluções:**

Padões de carbonato:

Os padões de CO₂ foram preparados a partir da diluição de uma solução estoque de Na₂CO₃ (FISHER) 0,1 mol.L⁻¹ em água deionizada.

Antibióticos:

Descrição dos antibióticos usados na elaboração dos antibiogramas, conforme a bula dos respectivos produtos:

Ampicilina (o produto comercial é a Ampicilina) é o ácido 6[D(-) alfa aminofenilacetamido] penicilâmico, é um antibiótico bactericida semi-sintético, derivado do núcleo fundamental das penicilinas, o ácido 6-amino-penicilâmico, fabricado pelas Indústrias Farmacéuticas Fontoura-Wyeth S.A.

Amicacina (produto comercial - Novamin) é o sal D-estreptamida, O-3 amino-3-deoxi- α -D-glicopiranosil-(1-6)-O-[6 amino-6-deoxi- α -D-glicopiranosil-(1-4)-N¹(4-amino-2-hidroxi-1-oxobutil)-2 deoxi-, (S), sulfato(1:2). É um antibiótico semi-sintético derivado da canamicina fabricado pela Bristol-Meyer Squibb Brasil.

Cloranfenicol (produto comercial - Quemicetina) é a {cloramietina, D-Treo-2,2-dicloro-N-[β -hidroxi- α -(hidroximietil)-4-nitrofenetil] acetamida}, produzido pela Família Carlo Erba S.A.

Cefazolina (produto comercial - Kefazol) a cefazolina sódica é um antibiótico semi-sintético de grupo das cefalosporinas. É o sal de ácido 3{[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-ii)-tio]metil}-7-[2(1H-terazol-1-ii)acetamido]-e-cefen-4-carboxílico. Produzido pela indústria Farmacêutica Eli Lilly do Brasil Ltda.

Gentamicina (produto comercial- Gentamicina) é um antibiótico pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos derivado do actinomiceto *Micromonospora purpurea*. Sulfato de gentamicina C_{1a}, O-3 deoxi-metil-3-(metilamino)- β -1-arabinopiranosil-(1-6)-O-[2,6-diamino-2,3,6-tetradeoxi- α -D-eritro-hexapiranosil-(1-4)]-2 deoxi-D-estreptomicina.

Cefalotina (produto comercial - Keflin) é o sal monossódico do ácido 5-tio-1-azabicíclico [4,2,0] octo-2-eno-2-carboxílico, 3-[(acetílico)-metil]-8-oxo-7-2-[(2-fenil acetil) amino], produzido pela Eli Lilly do Brasil Ltda.

Tetraciclina: (produto comercial tetraciclina) o cloridrato de tetraciclina constitui um antibiótico de largo espectro, o cloridrato de 4-dimetilamino-1,4,4',5,5',6,11,12' a-octaedro, 3,3,10,12', pentahidroxi-6-metil-1,11 dioxotacenocarbonamida, produzido por diferentes espécies de *Streptomyces* (Actinomiceto) ou produzido por outros processos.

Meios de Cultura:

Meio de Cultura Mueller Hinton Broth (Difco). No preparo deste meio 21 g são adicionado a um litro de água destilada e o pH ajustado a 7,2 com KOH. A esterilização do meio foi feita com forno de microondas.

Meio Mínimo líquido: Este meio é recomendado para crescimento de *E.coli* (Stainer,1969). É composto a partir de 7 g de K_2HPO_4 ; 3 g de KH_2PO_4 ; 1 g de $(NH_4)_2SO_4$ e 0,1 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g de citrato de sódio. Estes reagentes foram adicionados a aproximadamente 800 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7,20 com solução de KOH. A solução foi fervida usando-se o forno de microondas e após o resfriamento a aproximadamente 70 °C foram adicionadas cerca de 200 ml de solução previamente fervida contendo 20 g de glicose.

Meio de Cultura Referência: Este meio também é recomendado para crescimento de *E.coli* (Guimarães, 1990). Composição: Cada litro deste meio de cultura contém 1,6 g de K_2HPO_4 ; 1,6 g de KH_2PO_4 1,0 g de NaCl 4.0 g de $(NH_4)_2PO_4$; 0,7 g de $MgSO_4.7H_2O$ e 0,3 g de ácido cítrico. Este meio foi preparado do mesmo modo que o meio mínimo. A concentração final de glicose no meio é de 0,25 % e o pH ajustado para 7,20.

Microrganismos: Na elaboração de antibiogramas foram usados três amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com infecção do trato urinário. Estas cepas foram cedidas pelo Laboratório de Análises Microbiológicas do Hospital das Clínicas (HC) da UNICAMP e serão referenciadas neste trabalho por cepas X, Y e Z. A cepa padrão de *E.coli* ATCC 25922 também foi cedida pelo mesmo laboratório.

Equipamentos:

Banho Maria: Nos ensaios com os antibióticos utilizou-se o Banho Maria modelo 145-FANEM (Dubnoff) com agitador metabólico.

Forno Microondas: Para esterilização dos meios de cultura utilizou-se o Forno de Microondas National, 1420 W de potência.

Potenciômetro: As medidas de pH foram feitas com eletrodo combinado Cole-Parmer acoplado a um pH-metro digital da Procyon modelo PH-10.

Sistema FIA (Análise por Injeção em Fluxo): O funcionamento deste sistema está esquematizado na figura 2.

Bomba Peristáltica: Nos experimentos com sistema FIA utilizou-se a Bomba Peristáltica Ismatec modelo IPS com 12 canais.

Conduvímetero: As medidas de condutância foram feitas com o Conduvímetero da Digimed modelo CD-20.

Registrador: O registrador acoplado ao sistema FIA foi ECB Modelo RB-201

Comutador e celas de difusão: Estes acessórios foram construídos na oficina do IQ-UNICAMP. As membranas de teflon usadas nesta pesquisa foram: Polytubes (produzida pela PULVITEC S.A Ind. Com.); Akros (AKROS Industrial de Plásticos Ltda).

Coluna de Resina: Para manter constante a condutância do fluxo de água deionizada utilizou-se coluna com resina mista (MERCK).

Determinação do CO₂:

A determinação do dióxido de carbono total pelo sistema de análise por injeção em fluxo foi baseado no trabalho de Pasquini e Farias (1987). O esquema de funcionamento do sistema FIA condutométrico é mostrado na figura 2.

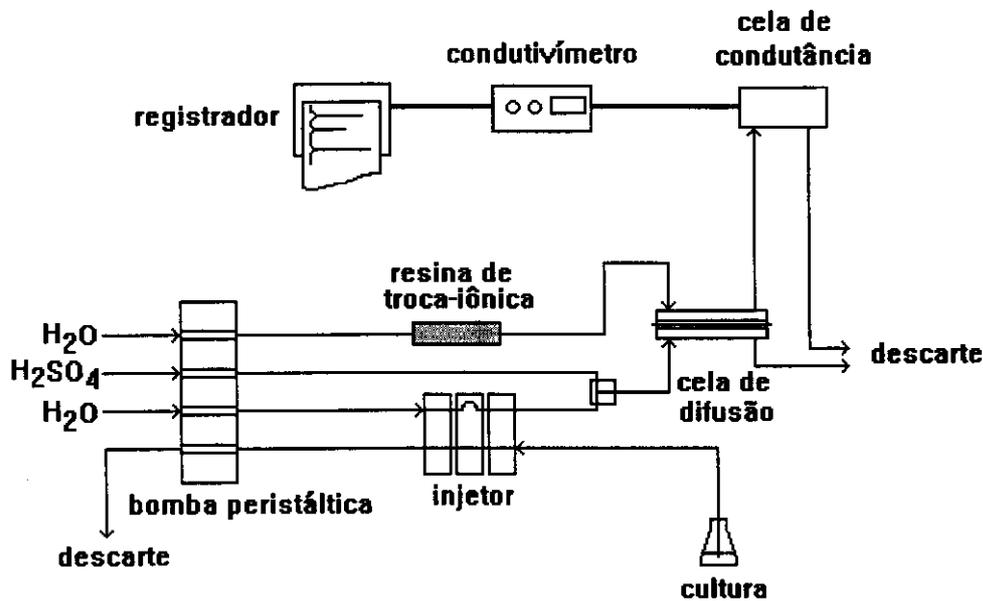


Figura 2- Esquema de funcionamento do sistema FIA-condutométrico

Nos experimentos com este sistema, 100 μ l da amostra de soluções contendo as espécies carbônicas (CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-}) são injetados num fluxo carregador de água deionizada o qual conflui com outro fluxo de ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluído (1 %) deslocando o equilíbrio para formação de CO_2 e H_2O . O gás permeia por uma membrana de Teflon[®] e atinge o fluxo de água deionizada, deslocando o equilíbrio para formação de íons bicarbonato (HCO_3^-), proporcionando o aumento da condutância do fluxo de água deionizada que estava sendo continuamente monitorada. A alteração da condutância deste fluido é proporcional à concentração do CO_2 presente na amostra.

A curva de calibração obtida com soluções deste padrão na faixa de concentração de 100 a 3500 μ mol.L⁻¹ encontra-se na figura 3.

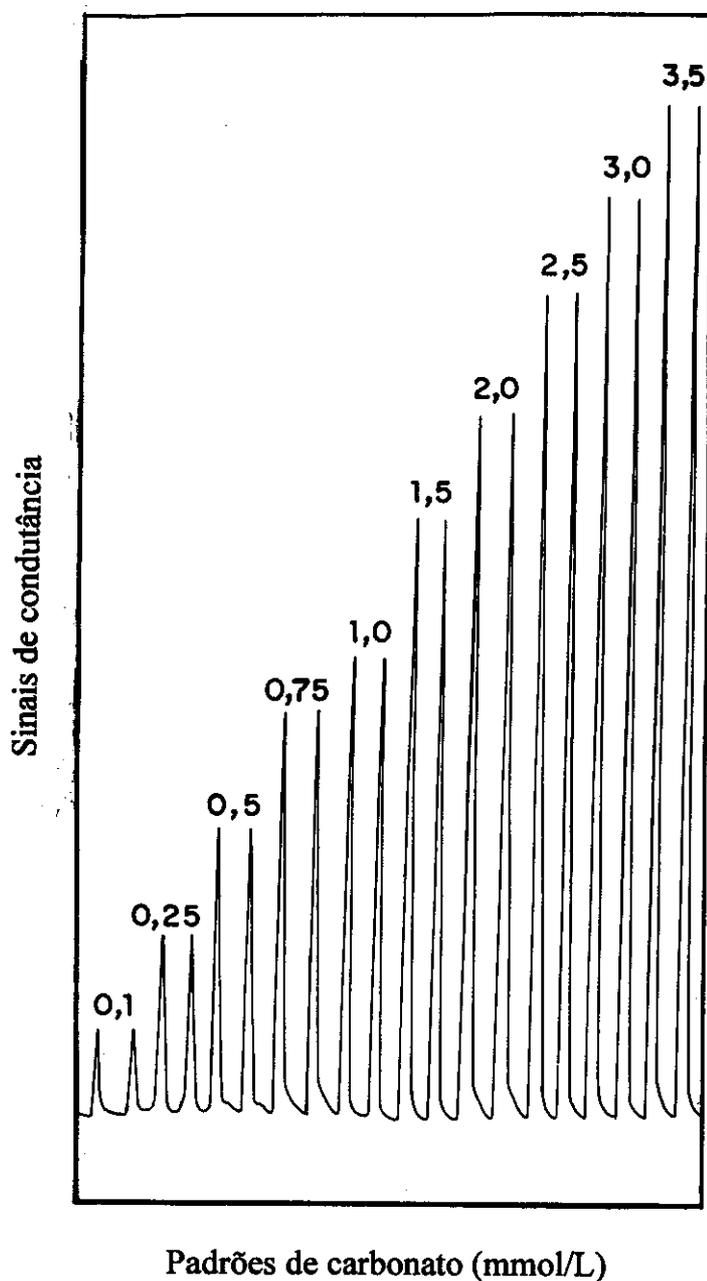


Figura 3- Diagrama - Sinais de calibração obtida com sistema FIA-condutométrico usando padrões de carbonato (Na_2CO_3).

As determinações das concentrações das amostras avaliadas neste estudo foram feitas por interpolação.

Resultados e Discussão:

Escolha do meio de cultura:

Vários fatores podem atuar como interferentes na elaboração de um antibiograma. Dentre eles destacam-se o meio de cultura, a preparação do inóculo e a solubilização dos agentes antimicrobianos.

A escolha inadequada do meio de cultura para elaboração de antibiogramas ou testes de toxicidade pode trazer resultados imprevisíveis. Considerando-se este fato, procurou-se avaliar o crescimento da bactéria padrão *E.coli* ATCC 25922 nos seguintes meios de cultura: (a) Mueller Hinton (b) Meio Mínimo e (c) Meio de Referência.

O procedimento adotado foi o seguinte: a 100 ml de cada meio de cultura adicionou-se 0,1ml de uma suspensão bacteriana de *E.coli* incubada por aproximadamente 24 horas a 37 °C em Meio Mínimo. A concentração de CO₂ foi monitorada em todos os meios e quando em um deles se observou uma resposta correspondente a cerca de 0,3 mmol.L⁻¹, do padrão de Na₂CO₃, iniciou-se o monitoramento a cada 20 minutos por 3 horas. Nesta fase a concentração de CO₂ no meio Mueller-Hinton era 0,36 mmol.L⁻¹, no Meio Mínimo 0,32 mmol.L⁻¹ e no Meio de Referência 0,25 mmol.L⁻¹. Na tabela II encontram-se os dados, resultantes de triplicatas, referentes a estes ensaios.

Os tempos de duplicação para os primeiros 120 minutos de ensaio foram 29,9; 39,3 e 58,2 minutos para os meios Mueller Hinton, Meio Mínimo e Meio de Referência respectivamente. Como se pode observar, o Mueller Hinton favorece um rápido crescimento quando comparado aos outros dois meios testados. No entanto, este meio quando não incubado já apresenta alta concentração de CO₂ basal o que o torna inviável para ser utilizado pelo procedimento proposto. Além disto, este produto é importado e o seu custo bastante alto quando comparado aos outros meios. Deve-se considerar também que sua composição básica de extrato de carne pode alterar a atividade de alguns antimicrobianos (Ximenes, 1973).

Como o objetivo da pesquisa é propor um procedimento de baixo custo, o Meio Mínimo foi escolhido porque além de preencher este requisito, proporcionou também rápido crescimento bacteriano e a concentração de CO₂ basal do meio é praticamente desprezível.

Baseando-se em análises turbidimétricas procurou-se avaliar a população microbiana correspondente à concentração de CO₂ produzida pela respiração microbiana.

Tabela II- Atividade microbiana *E.coli* ATCC 25922 frente a diversos meios de cultura.

Tempo (min)	[CO ₂] mmol.L ⁻¹		
	Mueller Hinton	Meio Mínimo	Meio de Referência
0	0,36 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,25 ± 0,01
20	0,57 ± 0,03	0,45 ± 0,11	0,30 ± 0,03
40	0,82 ± 0,13	0,74 ± 0,10	0,41 ± 0,04
60	1,41 ± 0,28	1,11 ± 0,08	0,47 ± 0,06
80	2,41 ± 0,29	1,62 ± 0,05	0,59 ± 0,05
100	3,72 ± 0,54	2,09 ± 0,26	0,72 ± 0,11
120	5,28 ± 0,32	2,62 ± 0,11	1,08 ± 0,11
140	6,32 ± 0,18	3,14 ± 0,13	1,48 ± 0,23
160	7,15 ± 0,60	4,24 ± 0,23	2,10 ± 0,16
180	8,02 ± 0,75	5,49 ± 0,43	2,89 ± 0,23

Dados de população bacteriana foram comparados com os obtidos a partir de soluções de sulfato de bário de acordo com o procedimento descrito por Bier (1985). Neste procedimento a turbidez medida à 420 nm com soluções padrão de cloreto de bário, BaCl₂, em ácido sulfúrico, H₂SO₄, são comparadas à turbidez fornecida por diferentes suspensões microbianas. Durante o monitoramento do CO₂ fizeram-se, ao mesmo tempo, leituras de transmitância de acordo com o procedimento anteriormente citado. Os dados médios de triplicatas dos ensaios de avaliação da absorbância, foram inseridos na curva de regressão linear resultante dos dados de população e concentração de sulfato de bário encontrados na tabela III (Bier, 1985). Deste modo, determinou-se a população microbiana correspondente a cada fração de [CO₂] produzida (tabela IV).

Tabela III- Dados de população microbiana associados às soluções de sulfato de bário.

[BaSO ₄]	Absorbância 420 nm	População (10 ⁶ células/ml)
4,8x10 ⁻⁵	0,029	300
9,6x10 ⁻⁵	0,048	600
1,92x10 ⁻⁴	0,106	1200
2,88x10 ⁻⁴	0,156	1800
3,84x10 ⁻⁴	0,210	2400
4,80x10 ⁻⁴	0,263	3000
9,60x10 ⁻⁴	0,488	3600
1,46x10 ⁻³	0,663	4200

A relação tempo versus população microbiana e concentração pode ser observada através da superfície de resposta (figura 4) obtida com os dados encontrados na tabela IV.

Tabela IV- População microbiana associada à concentração de CO₂ produzida no ensaio com *E. coli* em Meio Mínimo.

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

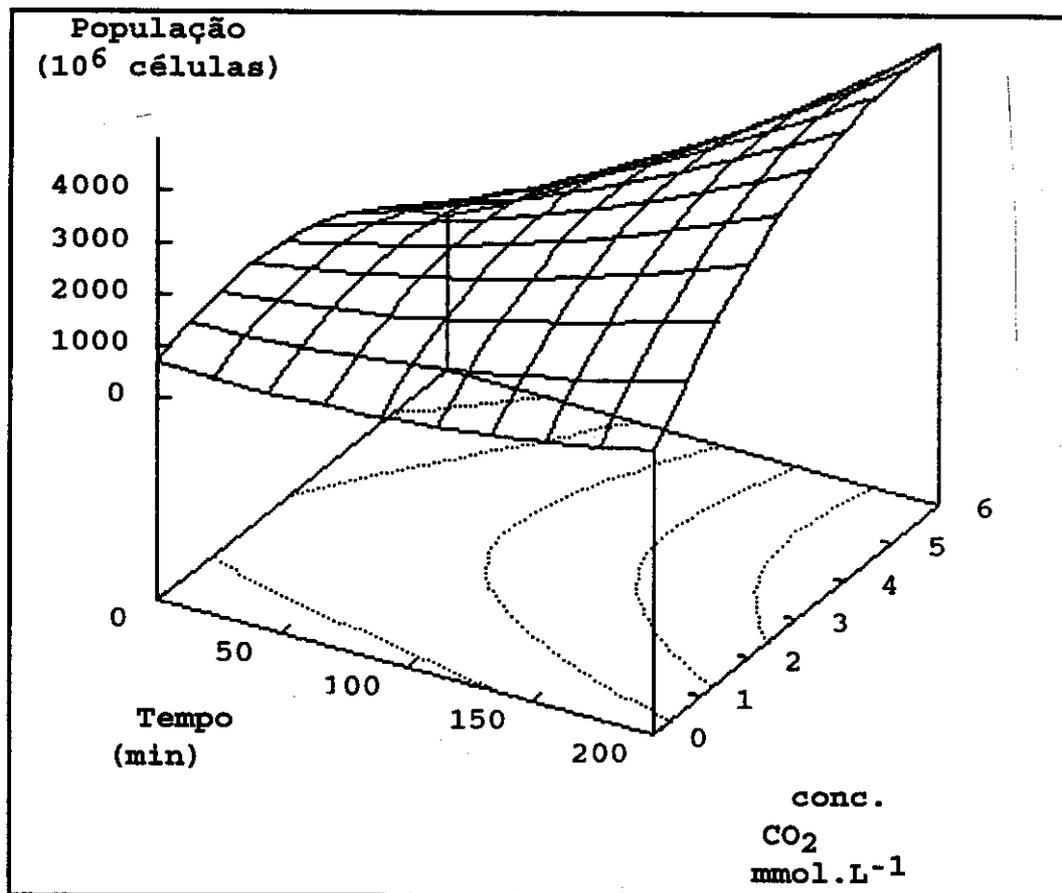


Figura 4- Superfície de resposta de [CO₂], absorbância e tempo (ensaio com *E. coli*).

A superfície de resposta foi obtida com o programa GENU PLOT (IQ-UNICAMP). Após 90 minutos de experimento verificou-se que a proporcionalidade entre concentração de CO₂ e população é mais acentuada. A equação abaixo descreveu este comportamento:

$$f(x,y) = 673,17 - 1,39 x + 479,23 y + 0,0298 x^2 - 123,48 y^2 + 406 xy ,$$

onde x corresponde ao tempo e y à concentração. O coeficiente de correlação foi 0,9986.

Escolha dos antibióticos:

Após definição do meio de cultura a ser usado, procurou-se selecionar os antimicrobianos para os ensaios.

As recomendações da Comissão Nacional de Normas para Laboratórios e o Centro de Controle de Enfermidades sugerem que se agrupem as drogas para provas de sensibilidade para microrganismos gramnegativos e grampositivos (Matsen, 1980). O grupo de microrganismo gramnegativo pode subdividir-se em um grupo para infecções gramnegativas e microrganismos isolados do trato urinário e outro para pseudomonas e grupo não fermentador de microrganismos (tabela V).

Tabela V- Antimicrobianos propostos para provas de rotina.

Organismos grampositivos	Enterobacteriaceas	Outros organismos gramnegativos
Amicacina	Amicacina	Amicacina
Ampicilina	Ampicilina	Carbencilina
Cefalotina	Carbencilina	Colistina
Cloranfenicol	Cefamandol	Gentamicina
Clindamicina	Cefoxitina	Tobramicina
Entromicina	Cefalotina	Cloranfenicol
Gentamicina	Cloranfenicol	Kanamicina
Meticilina, naficilina	Colistina	Sulfonamida
uoxaclina	Gentamicina	Tetraciclina
Penicilina	Tetraciclina	
Tetraciclina	Tobramicina	

Como o organismo teste usado nos ensaios foi a *E. coli*, e visto que esta é classificada como organismo entérico, procurou-se escolher alguns antibióticos que pudessem representar o grupo de antimicrobianos propostos para provas de rotina. Os antibióticos selecionados foram: (a) ampicilina (que representa a classe das penicilinas),

(b) cefalotina e cefazolina (cefalosporinas), (c) gentamicina, tobramicina e amicacina (aminoglicosídeos), (d) cloranfenicol (clorameticina) e (e) tetraciclina (tetraciclina). Estes produtos são todos solúveis em água e no meio de cultura usado. O modo de ação dos antibióticos (a) e (b) está associado à inibição da síntese da parede celular enquanto que para os (c), (d) e (e) associa-se à interferência com a síntese protéica.

Provas de sensibilidade aos antibióticos

Na elaboração das provas de sensibilidade aos antibióticos foram usados somente cepas de *E.coli* como organismo teste frente às drogas citadas. No entanto, outras espécies como *Staphilococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella choleraesuis* podem ser usadas através do método proposto.

A escolha do microrganismo *E. coli* pode ser justificada uma vez que esta representa a classe das enterobacteriaceas e que por sua vez corresponde a maior porcentagem das cepas responsáveis por infecções do trato urinário. Esta bactéria é habitante típico do trato intestinal do homem e de outros animais superiores e, como observado, apresenta crescimento rápido no meio de cultura escolhido, sendo sua manutenção relativamente fácil.

O procedimento adotado para elaboração dos antibiogramas pode ser descrito do seguinte modo: duas ou mais alças de meio de cultura, ágar, inoculado com a bactéria *E.coli*, cepa padrão ou cepas isoladas de pacientes, foram adicionadas a um tubo de ensaio contendo 5,0 ml do meio de cultura Mueller-Hinton. Nesta fase utilizou-se este meio devido ao rápido crescimento proporcionado. No entanto, podem ser usados o meio mínimo ou mistura destes meios. Este tubo foi mantido a 37 °C em banho com agitação por aproximadamente 5 horas. Esta suspensão foi colocada em 1 litro de Meio de Mínimo e em seguida inicia-se o monitoramento da concentração de CO₂. Quando o sinal de condutância da suspensão estava próximo daquele produzido pela solução padrão de Na₂CO₃ 0,30 mmol.L⁻¹ dividiu-se a suspensão em volumes definidos para posterior adição dos antibióticos. Nesta fase a população bacteriana foi de cerca de 8,0 x 10⁸ células/ml. Esta população foi semelhante à usada por Simpson e Kobos (1982, 1983) em ensaios com *E.coli* ATCC 9637 frente aos antibióticos gentamicina, tetraciclina e estreptomycin, usando medidas potenciométricas. Estes pesquisadores concluíram que a suspensão ótima para o ensaio estava em torno de 4,5 x 10⁸ células/ml. Concluíram também que os experimentos realizados com concentração aproximada de 9,0 x 10⁸ não

produziram diferença apreciável quando comparados à concentração citada anteriormente.

No presente trabalho foram usados volumes de 100 ml da suspensão bacteriana em erlenmeyers de 125 ml. Com objetivo de se obter as concentrações definidas dos antimicrobianos, foram adicionadas nestes frascos, alíquotas de soluções concentradas dos antibióticos ou massas dos mesmos. Nesta fase iniciou-se o monitoramento em intervalos de tempo definidos. Para elaboração das provas de sensibilidade microbiana às drogas optou-se por medidas a cada 20 minutos por 3 horas.

No experimento preliminar para elaboração de antibiogramas utilizaram-se as três amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com infecção do trato urinário. Estas cepas foram identificadas como X, Y e Z. Neste trabalho os antibióticos testados foram: ampicilina, amicacina, gentamicina, cloranfenicol e tobramicina. Os resultados obtidos através do método proposto foram comparados com os fornecidos pelo método de difusão em ágar e pela técnica MS-2 usadas no HC-UNICAMP. De acordo com os dados obtidos pela técnica MS-2, a concentração das referidas drogas que causou inibição foi de $6,3 \pm 2,2$ ug/ml enquanto que, para os resultados associados à resistência esta faixa ficou em torno de $18,0 \pm 6,4$ ug/ml.

Considerando-se que (a) o teste proposto é de curta duração, (b) que a população microbiana usada é elevada (aproximadamente 8×10^8) optou-se pela avaliação do potencial antimicrobiano das drogas também em concentrações maiores. As concentrações testadas para todas drogas foram 4; 8; 32 e 64 ug/ml.

Nas figuras 5 (a, b e c) observa-se a resposta das três cepas na presença da ampicilina. Neste gráfico observa-se o comportamento microbiano na presença das drogas, considerando-se a concentração de dióxido de carbono (CO_2) produzido pelas bactérias em função do tempo, comparado ao controle. A cepa de *E. coli* Y mostrou ser mais sensível que as cepas X e Z. Estes dados estão de acordo com os resultados fornecidos pelo HC (técnica MS-2) que classifica as cepas X e Z com resistentes e a cepa Y como sensível. No entanto, para o teste de difusão em ágar, as três cepas foram classificadas como resistentes a esta droga, mostrando deste modo divergência nos resultados internos fornecidos pelo HC. De acordo com a técnica MS-2 a cepa Y é sensível à concentração < 5 ug/ml de ampicilina. No teste de difusão em ágar o disco usado contém 10 ug da droga. Provavelmente a diluição desta no meio não tenha atingido a concentração suficiente para produzir o halo de inibição que classificasse esta cepa como sensível.

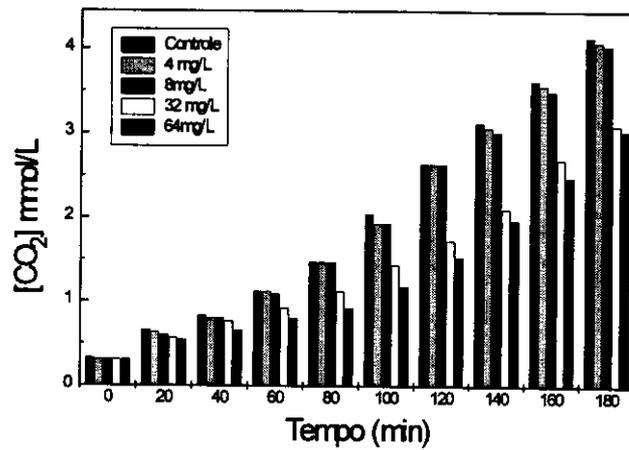


Figura 5 a- Resposta microbiana (*E. coli* X) na presença de Ampicilina.

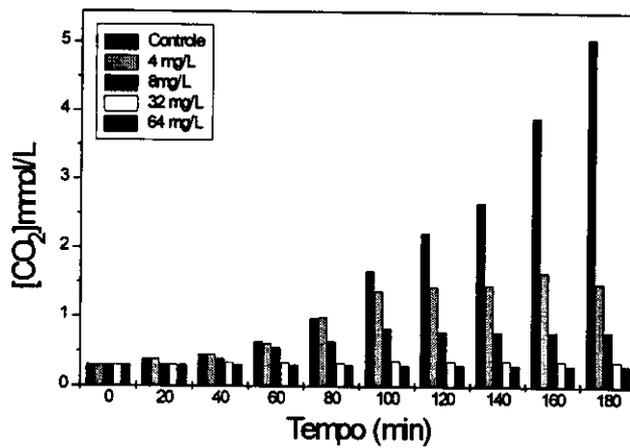


Figura 5 b- Resposta microbiana (*E. coli* Y) na presença de Ampicilina.

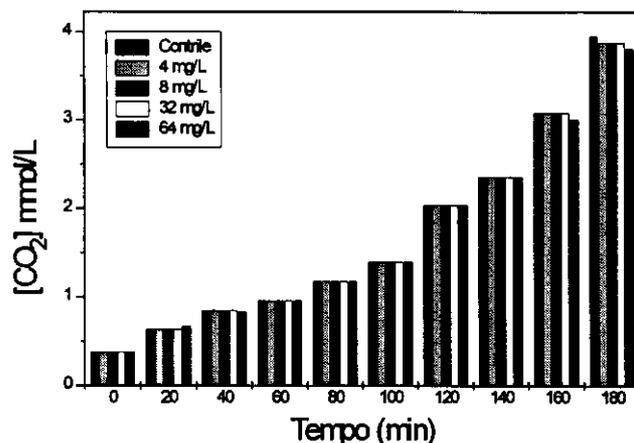


Figura 5 c- Resposta microbiana (*E.coli Z*) na presença de Ampicilina.

Analisando-se a tendência das barras na figura 5 b, verifica-se que através do método proposto obtém-se resultados intermediários de sensibilidade em função da concentração do antimicrobiano testado. Para concentração ≤ 8 ug/ml e ≥ 4 ug/ml infere-se a atividade da espécie enquanto que na presença de concentração > 32 ug/ml e ≤ 64 ug/ml infere-se a total inibição da atividade microbiana. Portanto, a análise quantitativa dos resultados obtidos a partir deste método é mais abrangente quando comparada aos dados fornecidos pela técnica MS-2 e pelo teste de difusão em ágar.

Frente à amicacina, verificou-se que nas concentrações testadas as três cepas foram sensíveis não apresentando nenhum crescimento mesmo quando submetidas à concentração de 4 ug/ml. De acordo com os dados do HC (técnica MS-2) as cepas Y e Z são sensíveis à concentrações < 8 ug/ml havendo portanto concordância com os dados aqui obtidos. No entanto, para a cepa X não houve concordância pois de acordo com esta técnica a espécie é resistente à amicacina. Porém, novamente verifica-se divergência nos resultados emitidos pelo HC pois as três cepas foram classificadas como sensíveis a esta droga pelo teste de difusão em ágar. Os discos empregados neste teste contém 30 ug da droga.

No teste com a gentamicina observaram-se resultados semelhantes aos encontrados para a amicacina. A alta sensibilidade das cepas foi constatada também pelos dois métodos do HC.

Nos ensaios com cloranfenicol observou-se que houve resistência das três cepas quando submetidas às concentrações estudadas (figuras 6 a, b e c). Os resultados do HC confirmam através dos dois métodos que as cepas X e Z são resistentes à esta droga

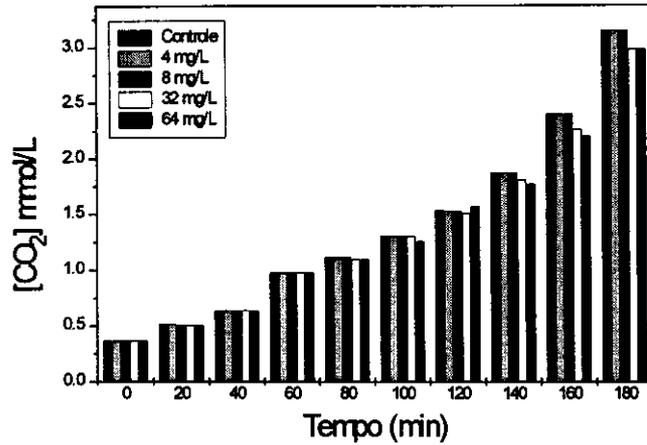


Figura 6 a- Resposta microbiana (*E. coli* X) frente ao Cloranfenicol.

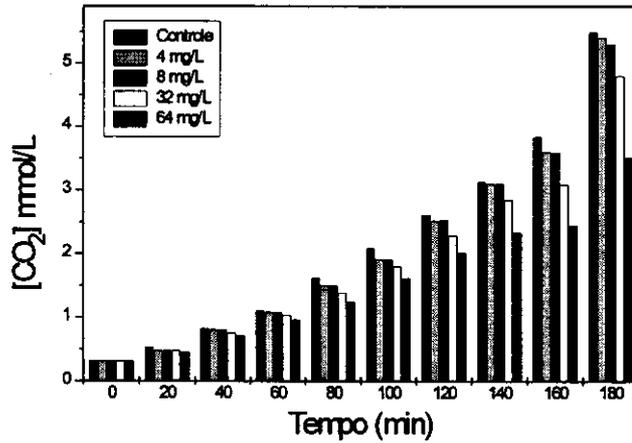


Figura 6 b- Resposta microbiana (*E. coli* Y) frente ao Cloranfenicol.

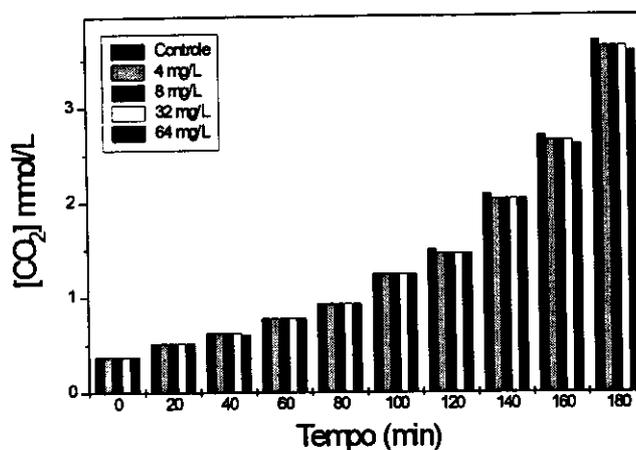


Figura 6 c- Resposta microbiana (*E. coli Z*) frente ao Cloranfenicol.

Como pode ser visto através da figura 6 b uma pequena inibição é observada quando a cepa Y é submetida às concentrações iguais a 32 e 64 ug/ml. Pelo método sugerido, para as concentrações testadas, esta cepa pode ser classificada como resistente. De acordo com os dois métodos (MS-2 e teste de difusão em ágar) esta cepa é sensível ao cloranfenicol. No teste de difusão em ágar o disco usado contém 30 ug do antibiótico.

As três cepas estudadas mostraram também sensibilidade à tobramicina. Porém, mesmo quando submetidas à 64 ug/ml da droga ainda observou-se pequena atividade microbiana. O comportamento das três cepas frente a este antibiótico foi similar como pode ser observado através das figuras 7 (a, b e c). Nestas figuras apresenta-se de uma maneira diferente a produção de CO₂ pelas cepas testadas em relação ao controle.

Os dados obtidos pela técnica MS-2 definem as três cepas como resistentes às concentrações maiores que 12 ug/ml. No entanto, pelo teste de difusão em ágar as cepas X e Z foram classificadas como sensíveis enquanto que a cepa Y foi resistente. Os discos de tobramicina usados no teste de difusão em ágar contém 10 ug da droga. Mais uma vez observa-se discordância nos resultados obtidos do Laboratório de Análises Microbiológicas do HC-UNICAMP.

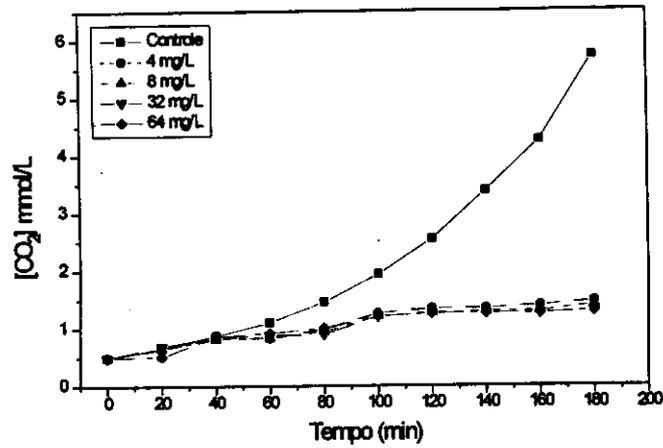


Figura 7 a- Inibição da respiração microbiana (*E. coli* X) frente a Tobramicina.

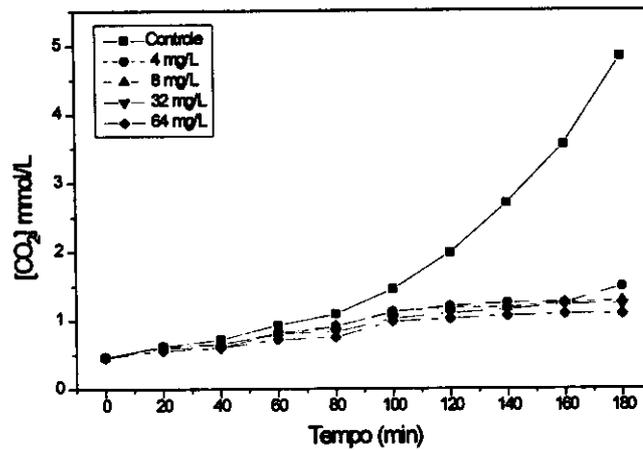


Figura 7 b- Inibição da respiração microbiana (*E. coli* Y) frente a Tobramicina.

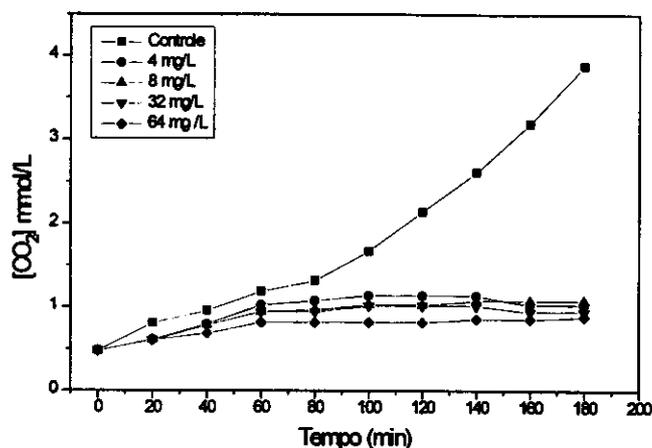


Figura 7 c- Inibição da respiração microbiana (*E. coli* Z) frente a Tobramicina.

Considerando-se que mesmo para concentração de 64 $\mu\text{g/ml}$ houve pequena atividade das cepas, estas poderiam, pelo método proposto, serem classificadas como resistentes. No entanto, os valores de inibição da atividade microbiana de 84,3; 86,9 e 87,9 % após 180 minutos de contato das cepas X, Y e Z respectivamente, confirmam a alta sensibilidade destas à tobramicina. Provavelmente o uso de uma concentração maior que 64 $\mu\text{g/ml}$ da droga proporcionaria a inibição total da respiração microbiana das cepas testadas.

Na tabela VI encontram-se os resultados obtidos com a técnica MS-2, difusão em ágar e para o método proposto. A concentração dos antimicrobianos usados em cada método encontram-se na tabela VII.

Os resultados de sensibilidade (S) foram atribuídos, de acordo com o método sugerido, para o sistema em que não se observou produção de CO_2 e, resistente (R) quando mesmo na máxima concentração testada houve pequena produção de CO_2 .

A resposta comparativa analisada sob o ponto de vista qualitativo em termos de sensibilidade e resistência indica uma concordância superior a 75 % para o método proposto em relação aos dois métodos usados no HC-UNICAMP. Concordância maior existe quando se compara o método proposto com o MS-2.

Tabela VI- Prova de sensibilidade a antimicrobianos (organismo teste *E. coli*).

Resultados obtidos pela técnica MS-2, pelo método de difusão em ágar e pelo método FIA.

	Difusão em ágar			Técnica MS-2			Método FIA		
	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
ampicilina	R	R	R	R	S	R	R	S	R
amicacina	S	S	S	R	S	S	S	S	S
gentamicina	S	S	S	I	S	S	S	S	S
cloranfenicol	R	S	R	R	S	R	R	R	R
tobramicina	S	R	S	R	R	R	R	R	R

S- sensível; R- resistente; I- intermediário.

X, Y, Z; cepas de *E. coli*.

Tabela VII- Concentrações de antibióticos empregadas em cada método. Difusão em ágar (quantidade da droga contida no disco), MS-2 e FIA concentrações em mg/L.

	Difusão em ágar			Técnica MS-2			Método FIA		
		ug		X	Y	Z	X	Y	Z
ampicilina		10		>15	<15	>15	64	32	64
amicacina		10		>24	<8	<8	4	4	4
gentamicina		10		=7	<4	<4	4	4	4
cloranfenicol		30		>27	<9	>27	64	64	64
tobramicina		10		>12	>12	>12	64	64	64

Foram realizados também provas de sensibilidade aos antibióticos Gentamicina, Cefazolina, Amicacina, Ampicilina, Cloranfenicol e Cefalotina usando a cepa padrão (*E. coli* ATCC 25922).

Os resultados de inibição da respiração microbiana, expressos em (%) em relação ao controle, encontram-se nas tabelas VIII a XIII.

Tabela VIII- Inibição (%) da respiração microbiana (*E. coli*) frente a Gentamicina.

Tempo	0,5 mg/L	2,5 mg/L	10 mg/L	100 mg/L
0	0	0	0	0
20	6,1 ± 0,2	7,7 ± 0,2	8,0 ± 0,2	26,5 ± 2,6
40	6,5 ± 0,7	12,9 ± 2,4	16,0 ± 3,7	26,8 ± 2,5
60	14,0 ± 0,2	22,7 ± 5,1	29,2 ± 3,5	37,5 ± 2,5
80	13,7 ± 0,9	35,9 ± 1,2	45,7 ± 1,6	52,3 ± 1,5
100	15,0 ± 1,9	51,6 ± 0,4	62,8 ± 5,5	65,6 ± 0,9
120	15,2 ± 2,4	56,7 ± 2,2	70,0 ± 5,4	72,2 ± 1,5
140	18,3 ± 1,8	66,3 ± 0,9	73,4 ± 2,4	77,9 ± 2,1
160	18,3 ± 2,3	70,5 ± 0,7	77,7 ± 2,3	82,8 ± 2,5
180	26,0 ± 5,0	77,9 ± 1,4	81,5 ± 2,2	85,1 ± 1,9

Tabela IX- Inibição (%) da respiração microbiana (*E. coli*) frente a Cefazolina.

Tempo (min)	10 mg/L	20 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
0	0	0	0	0
20	29,1 ± 4,1	33,3 ± 0,0	36,1 ± 2,8	36,6 ± 3,3
40	31,6 ± 3,4	39,1 ± 5,8	40,3 ± 4,6	51,8 ± 3,2
60	33,2 ± 3,5	49,1 ± 4,1	52,1 ± 2,9	64,5 ± 5,4
80	34,3 ± 4,6	54,1 ± 2,8	62,5 ± 2,3	78,9 ± 2,3
100	32,8 ± 3,0	57,3 ± 0,8	71,6 ± 2,6	86,2 ± 0,2
120	35,2 ± 3,8	73,7 ± 4,5	84,0 ± 1,1	92,3 ± 2,3
140	34,5 ± 4,4	75,5 ± 2,0	88,3 ± 0,8	94,3 ± 1,5
160	35,1 ± 0,9	82,1 ± 1,0	91,9 ± 0,5	95,8 ± 0,9
180	42,4 ± 2,3	87,5 ± 3,9	93,1 ± 0,5	96,7 ± 1,0

Tabela X- Inibição (%) da respiração microbiana (*E. coli*) frente a Amicacina.

Tempo (min)	4 mg/L	8 mg/L	32 mg/L	64 mg/L
0	0	0	0	0
20	17,7 ± 4,4	21,1 ± 1,1	29,0 ± 6,1	49,1 ± 5,8
40	18,8 ± 2,8	20,8 ± 0,8	44,7 ± 1,2	86,9 ± 4,3
60	16,7 ± 1,1	24,0 ± 1,6	52,7 ± 0,9	92,9 ± 2,7
80	21,4 ± 1,8	36,0 ± 0,2	57,6 ± 5,4	93,4 ± 0,8
100	26,7 ± 1,6	45,6 ± 1,6	67,4 ± 4,4	95,5 ± 1,8
120	39,7 ± 4,1	56,2 ± 0,9	72,3 ± 5,6	94,4 ± 3,2
140	38,2 ± 1,6	64,0 ± 1,0	76,8 ± 3,2	95,9 ± 2,3
160	42,3 ± 2,2	69,5 ± 1,9	79,7 ± 2,9	97,3 ± 1,5
180	52,8 ± 0,4	70,7 ± 2,1	82,7 ± 1,8	97,7 ± 1,3

Tabela XI- Inibição (%) da respiração microbiana (*E.coli*) frente a Ampicilina.

Tempo (min)	2 mg/L	10 mg/L	50 mg/L	100 mg/L
0	0	0	0	0
20	13,2 ± 2,1	26,1 ± 3,9	45,3 ± 5,5	72,9 ± 4,8
40	19,0 ± 1,9	31,4 ± 3,8	46,5 ± 4,2	73,2 ± 4,8
60	24,3 ± 5,6	33,8 ± 4,6	47,8 ± 4,2	74,5 ± 3,9
80	25,1 ± 4,8	35,9 ± 5,8	52,0 ± 4,7	82,3 ± 3,9
100	25,6 ± 3,7	34,8 ± 3,4	62,1 ± 4,0	85,7 ± 1,1
120	26,8 ± 5,3	35,9 ± 3,9	70,3 ± 5,0	90,2 ± 1,8
140	26,1 ± 2,4	35,5 ± 3,4	78,2 ± 1,0	93,0 ± 1,0
460	27,6 ± 1,1	37,5 ± 5,4	82,9 ± 1,9	94,2 ± 0,4
180	28,2 ± 0,8	37,5 ± 1,3	87,1 ± 0,6	95,7 ± 0,2

Tabela XII- Inibição da respiração microbiana (*E.coli*) frente ao Cloranfenicol.

Tempo (min)	4 mg/L	20 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
0	0	0	0	0
20	12,7 ± 2,2	26,2 ± 5,2	48,2 ± 1,2	80,5 ± 5,5
40	10,1 ± 1,4	33,8 ± 1,0	52,3 ± 1,4	81,7 ± 5,3
60	14,8 ± 5,1	31,6 ± 5,8	60,5 ± 1,9	84,1 ± 5,8
80	15,7 ± 4,8	35,3 ± 4,9	63,0 ± 2,6	85,1 ± 5,1
100	16,3 ± 4,7	49,3 ± 3,3	68,3 ± 5,3	85,6 ± 5,7
120	16,0 ± 5,4	53,6 ± 1,3	73,6 ± 4,9	92,5 ± 5,1
140	16,5 ± 3,5	60,0 ± 3,2	74,4 ± 5,7	93,5 ± 4,8
160	16,3 ± 3,3	65,1 ± 2,1	75,6 ± 4,6	94,0 ± 4,8
180	17,6 ± 3,6	67,2 ± 2,2	78,7 ± 5,1	95,2 ± 3,9

Tabela XIII- Inibição da atividade microbiana (*E. coli*) frente a Cefalotina.

Tempo (min)	10 mg/L	20 mg/L	100 mg/L	200 mg/L
0	0	0	0	0
20	7,4 ± 0,6	7,4 ± 1,4	17,5 ± 2,5	20,0 ± 0,5
40	7,6 ± 0,5	9,5 ± 2,0	17,5 ± 2,4	21,9 ± 3,1
60	11,1 ± 3,8	17,1 ± 0,7	28,9 ± 2,8	37,5 ± 5,8
80	19,1 ± 3,8	19,0 ± 1,7	20,2 ± 2,4	46,3 ± 3,7
100	18,2 ± 2,6	19,9 ± 0,9	33,4 ± 5,0	57,6 ± 4,0
120	16,1 ± 0,5	19,2 ± 1,6	48,8 ± 3,6	71,4 ± 1,3
140	21,1 ± 1,5	28,7 ± 0,9	59,6 ± 3,1	75,3 ± 5,5
160	26,8 ± 6,5	45,2 ± 0,9	64,6 ± 3,6	79,5 ± 1,3
180	38,5 ± 5,8	56,6 ± 4,8	69,9 ± 4,1	84,8 ± 1,4

Através destas tabelas observa-se que cada droga foi testada em diferentes concentrações. Considerando que os dados de diversas concentrações poderiam

confundir a interpretação a nível de antibiograma, procurou-se calibrar o procedimento proposto correlacionando os dados obtidos com os de CIM obtidos da literatura. Este mesmo procedimento foi usado por outros pesquisadores na avaliação do método sugerido por Kirby-Bauer (Ximenes, 1973). Na presente pesquisa comparou-se o valor da concentração necessária para reduzir cerca de 70 % da respiração microbiana para cada antibiótico, após 120 minutos de ensaio, com a CIM obtida da literatura, para a mesma cepa padrão. Para os seis primeiros antibióticos testados o coeficiente de correlação foi de 0,996. O fator médio envolvido entre a concentração usada pelo método proposto e os valores de (CIM) foi de $22,7 \pm 2,32$. Portanto, através desta simples relação matemática é possível transformar em CIM os valores de concentrações usados no procedimento FIA. Como se observa, a concentração usada com o método proposto foi cerca de 20 vezes superior à empregada pelo método de diluição. Apesar do valor ser relativamente alto, cabe ressaltar que o método de diluição não têm sido normalmente usado para elaboração de antibiogramas. Por outro lado este fator poderia ser parcialmente explicado em função da diferença de população microbiana utilizada em cada método. No entanto, quando comparado com o método de difusão em àgar, verifica-se que o procedimento proposto poderia substituí-lo uma vez que o custo e principalmente o tempo de elaboração do antibiograma foram bastante reduzido.

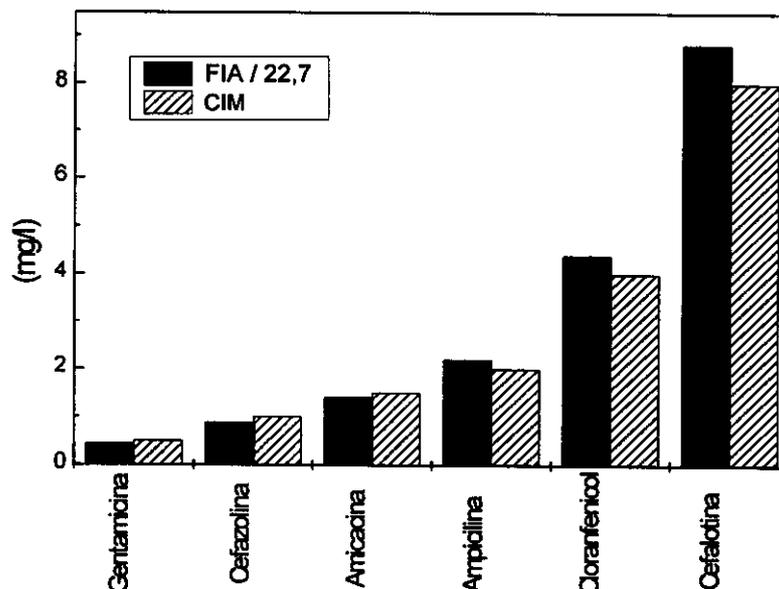


Figura 8- Comparação dos resultados obtidos pelo método FIA-Condutométrico e CIM obtidos da literatura.

Analisando-se a tendência das barras na figura 8, verifica-se que o valor de CIM poderia ser estimado a partir das concentrações de antibióticos usadas para proporcionarem cerca de 70 % de inibição da respiração microbiana, determinadas pelo método FIA-condutométrico.

Foram testados também a Tobramicina e Tetraciclina. Para se obter inibição semelhante no mesmo período de tempo de exposição do microrganismo, observou-se que os dados de inibição (%) para estas drogas não apresentaram boa correlação com os dados de CIM. As concentrações testadas bem como os resultados de inibição da respiração microbiana encontram-se nas tabelas XIV e XV.

Tabela XIV- Inibição da respiração microbiana (*E. coli*) frente a Tetraciclina.

Tempo (min)	0,25 mg/L	0,5 mg/L	5,0 mg/L	25 mg/L
0	0	0	0	0
20	19,4 ± 4,0	23,1 ± 0,6	38,0 ± 0,5	46,1 ± 0,6
40	21,3 ± 2,1	33,6 ± 2,8	40,1 ± 2,2	53,8 ± 3,8
60	22,1 ± 1,2	40,0 ± 0,5	48,8 ± 0,1	67,6 ± 2,5
80	26,8 ± 3,2	44,8 ± 4,5	60,0 ± 4,4	72,4 ± 3,9
100	31,2 ± 1,5	59,8 ± 1,3	73,1 ± 1,9	82,4 ± 2,2
120	36,7 ± 6,9	69,4 ± 1,0	81,7 ± 0,4	87,6 ± 2,8
140	32,6 ± 3,3	74,2 ± 0,7	85,0 ± 0,1	90,5 ± 2,3
160	34,6 ± 1,3	77,9 ± 1,8	87,6 ± 0,2	92,9 ± 1,8
180	41,1 ± 0,6	80,9 ± 1,0	90,9 ± 0,3	94,9 ± 1,2

Tabela XV- Inibição da respiração microbiana (*E. coli*) frente a Tobramicina.

Tempo (min)	4 mg/L	8 mg/L	32 mg/L	64 mg/L
0	0	0	0	0
20	7,3 ± 1,8	18,3 ± 1,6	40,6 ± 1,7	57,6 ± 3,1
40	11,1 ± 1,4	22,8 ± 4,0	41,6 ± 3,1	62,1 ± 3,6
60	13,9 ± 3,0	32,1 ± 0,2	40,7 ± 6,9	61,9 ± 7,2
80	13,6 ± 0,6	34,7 ± 6,1	50,5 ± 6,5	61,9 ± 7,9
100	14,2 ± 0,8	42,7 ± 4,5	53,8 ± 6,0	67,6 ± 5,0
120	15,1 ± 1,3	52,7 ± 1,4	64,4 ± 3,1	71,0 ± 5,2
140	15,7 ± 0,7	64,0 ± 0,6	70,3 ± 1,4	77,6 ± 4,4
160	15,0 ± 1,0	72,6 ± 1,8	76,7 ± 1,0	83,5 ± 2,9
180	15,1 ± 0,9	76,9 ± 1,8	81,5 ± 0,1	88,0 ± 1,7

Os valores de CIM (Jones et alii, 1985) obtidos pelo método de diluição para a Tobramicina e Tetraciclina são 2 e 0,5 mg/L, resultando portanto em um fator de 0,25 e 128 respectivamente quando comparados às concentrações de 0,5 e 64 mg/L observados

pelo presente método. Como se observa, as duas últimas drogas testadas apresentaram fatores discrepantes quando comparados ao fator médio encontrado para as seis primeiras drogas testadas.

Conclusões

Os resultados em termos de sensibilidade e resistência encontrados com o presente método e comparados com os obtidos com os métodos empregados rotineiramente na UNICAMP (Ágar e MS-2), evidenciam a aplicabilidade deste na elaboração de antibiogramas.

A correlação entre as concentrações dos antibióticos empregadas, com o método proposto, usando a cepa padrão ATCC 25922, quando comparadas aos valores de CIM fornecidos pela literatura, mostrou uma boa concordância do método aqui proposto com o método de diluição.

Como citado anteriormente, para uma melhor interpretação dos resultados nos termos usados nos laboratórios de análises microbiológicas fez-se a calibração do método proposto com o método de diluição.

Visto que, a maioria destes laboratórios utilizam o método de difusão em ágar como método padrão para elaboração de antibiogramas, e que por sua vez, este também é calibrado com o método de diluição, conclui-se, em função dos resultados obtidos, que o procedimento proposto poderia substituir tanto o método de difusão quanto o de diluição.

A redução do tempo de elaboração das provas de sensibilidade aos antibióticos bem como a redução do custo de cada ensaio, são os principais fatores que tornam este método viável à implantação em laboratórios microbiológicos particulares ou conveniados.

Cabe ressaltar também que o método desenvolvido neste trabalho pode ser uma poderosa ferramenta na indústria de fármacos podendo ser aplicado também na avaliação da atividade biológica de novos compostos os quais agora podem ser realizados em tempo restrito.

Capítulo II

Ensaio de toxicidade usando *E. coli* como organismo-teste frente aos metais cobre, cádmio e mercúrio. A importância dos estudos de especiação

Alguns metais possuem efeito tóxico sobre as células bacterianas, principalmente como resultado da habilidade destes elementos em desnaturar moléculas de proteínas e inibir a atividade enzimática. No entanto, a atividade biológica dos microrganismos pode mudar o estado de oxidação do metal, favorecer sua volatilização, ou transformá-lo em compostos organo-metálicos, alterando, deste modo sua toxicidade (Izaki, 1977; Jardim e Pearson, 1984; Trevors, 1989). A adsorção dos íons na membrana celular dos microrganismos também deve ser considerada, uma vez que reduz a atividade do elemento no meio. A toxicidade dos metais frente aos microrganismos geralmente está associada ao peso atômico, à eletronegatividade do íon, à estabilidade dos quelatos formados e à competição com outros íons (Kasan, 1993).

A potencialidade tóxica dos metais que atuam como antimicrobianos está associada à disponibilidade de suas espécies no meio, ou seja, à especiação. Os estudos de especiação de um elemento envolvem a determinação das várias formas físico-químicas que constituem a concentração total da espécie numa amostra (Florence, 1986; Barkay et alii, 1987, 1989; Lund, 1990). O grande interesse nestes estudos, principalmente nas pesquisas ambientais, está associado à dependência da toxicidade e da biodisponibilidade com forma química do elemento (Castro, 1986).

A diferença na toxicidade de diferentes espécies de um mesmo metal foi, de certo modo, responsável pelo desenvolvimento dos métodos analíticos que têm por objetivo diferenciar as várias formas deste elemento no sistema em estudo.

Os estudos de especiação, através de determinações analíticas ou previsões via programas ou modelos computacionais, confirmam a necessidade de se avaliar a disponibilidade do metal no meio (Ramamoorthy e Kushner, 1975; Jardim e Pearson, 1984; Cabral, 1992). No entanto, um grande número de ensaios de toxicidade de metais frente a diferentes microrganismos, têm ignorado a necessidade dos estudos de especiação (Sanches et alii, 1988; Dive et alii, 1989; Schneider e Schweisfurth, 1991; Codina et alii, 1993; Perez-Garcia, 1993).

Nos estudos de toxicidade de metais frente à bactérias deve-se considerar também a presença de outros íons no meio, uma vez que a competição destes elementos, como por exemplo no processo de respiração mitocondrial, pode alterar a toxicidade através de

diversos mecanismos que favorecem processos sinérgicos e antagônicos. Neste contexto, Shuttleworth e Unz (1991) avaliaram a influência de alguns metais sobre o crescimento de bactérias filamentosas, isoladas de lodo ativado, com objetivo de determinar os efeitos do cálcio, cobre, níquel e zinco no crescimento destas espécies. Estes pesquisadores concluíram que o cálcio foi mais efetivo que o magnésio em minimizar a toxicidade dos outros metais avaliados. A especiação dos metais em função da complexação pelos compostos presentes no meio de cultura também foi considerada.

Para um mesmo agente estressante, por exemplo o ânion OCl^- , o contra íon pode alterar a toxicidade conforme demonstrado por Tomulka et alii (1993). Usando como organismo-teste a *Photobacterium phosphoreum*, estes pesquisadores verificaram que o hipoclorito de cálcio era cerca de 100 vezes menos tóxico que o hipoclorito de sódio. A menor toxicidade está associada, em parte, a maior absorção do cálcio pelas células microbianas.

Muitos meios de cultura possuem em sua composição os íons fosfato que proporcionam o tamponamento e evitam alterações do comportamento microbiano em função das mudanças de pH. No entanto, a presença deste ânion pode minimizar o efeito tóxico do metal, quando usado em altas concentrações, devido principalmente às reações de precipitação. Brouwer (1991) demonstrou que a porcentagem de inibição causada por 500 mg/L de cobre era inferior à de 10 mg/L do mesmo íon frente ao microrganismo *Bacillus cereus*, devido à presença do sulfato no meio. Portanto, devem ser consideradas todas as possíveis interações dos compostos e íons, cátions e ânions, presentes no meio, para melhor avaliar o potencial tóxico do composto ou elemento em estudo.

O pH também possui um efeito considerável na disponibilidade e portanto na toxicidade dos metais em um determinado meio. Geralmente em meio ácido o metal existe como cátion livre, e em meio alcalino pode ocorrer a formação de hidroxos complexos e precipitado como hidróxido insolúvel. O pH no qual o precipitado ocorre varia entre diferentes metais e entre os estados de oxidação de mesmo elemento. Os hidróxidos dos estados oxidados são menos solúveis que os de estado reduzido e geralmente precipitam em valores de pH menores (Kasan, 1993). Os baixos valores de pH favorecem o aumento da disponibilidade do metal no sistema. Deste modo, verifica-se a necessidade de avaliar a disponibilidade do metal nos valores de pH usados nos experimentos.

Nesta pesquisa avaliou-se, através do método proposto, a toxicidade dos metais Cu, Cd, Hg, considerando a especiação destes elementos no meio de cultura. Nestes experimentos a bactéria *E. coli* foi utilizada como organismo-teste.

Materiais e métodos

Reagentes e soluções

Soluções estoque

Cloreto de cádmio, $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MERCK) com concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ não padronizada.

Sulfato cúprico, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Química moderna) com concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ não padronizada.

Cloreto de níquel, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MERCK) com concentração $1,0 \times 10^4 \text{ mg/L}$ não padronizada.

Sulfato de zinco, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MERCK) com concentração $1,0 \times 10^4 \text{ mg/L}$ não padronizada.

Cloreto de mercúrio, HgCl_2 (QUIMIBRAS) $1,0 \times 10^3 \text{ mg/L}$ não padronizada.

Carbonato de sódio Na_2CO_3 (FISHER) na concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ padrão primário.

Meios de cultura - O meio de cultura usado nos ensaios com metais foi o Meio Mínimo, já descrito no capítulo I.

Organismo teste - Nos experimentos com metais utilizou-se a cepa padrão *E.coli* ATCC 25922.

Determinação do dióxido de carbono total pelo sistema FIA-condutométrico, já descrito no capítulo I.

Determinação da atividade dos metais cobre e cádmio.

A atividade dos metais cobre e cádmio foi avaliada com auxílio de um eletrodo de íon seletivo de Cu (II) (ORION, modelo 94-29) e um eletrodo seletivo de Cd (II) (ORION, modelo 94-48) e com potenciômetro PROCYON, modelo PH-10. Na avaliação da atividade destes metais utilizou-se um eletrodo de referência (dupla junção, ANALION, modelo R 684 E 762)

Resultados e discussões

Avaliação da atividade do cádmio no meio de cultura, meio de cultura incubado e meio de cultura contaminado com edta.

Para os ensaios de toxicidade do cádmio frente à *E.coli*, procurou-se avaliar inicialmente a atividade deste íon no meio de cultura utilizando-se medidas potenciométricas com auxílio de um eletrodo seletivo.

A curva de calibração foi construída a partir dos resultados de atividade deste elemento em solução de KNO_3 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Esta solução possui um pH em torno de 5,70. Este pH está associado ao pH da água usada no preparo da solução. Como o pH do meio de cultura foi ajustado para 7,2 procurou-se testar também a atividade do metal na solução de KNO_3 neste mesmo pH. Visto que, para estes dois valores de pH não houve diferença significativa na atividade do metal, ou seja, não houve hidrólise que pudesse ser quantificada, optou-se por considerar a curva de calibração na solução de KNO_3 com pH original. A concentração do metal em força iônica $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foi considerada igual a atividade. O potencial lido foi levado à curva de calibração e daí extraído o valor de atividade do cádmio (figura 9).

Na tabela XVI encontram-se os resultados da atividade do cádmio no meio de cultura, meio de cultura incubado, meio de cultura contaminado com edta comparados às concentrações do metal adicionadas à solução de KNO_3 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. As diferenças de atividade no meio de cultura, comparadas àquelas obtidas em força iônica $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, estão associada principalmente à reação de complexação com o citrato ($\log K = 3,75$ para força iônica $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e temperatura de 20°C) presente no meio. A concentração deste composto no meio de cultura é cerca de $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Reações de complexação e precipitação, com íons fosfato, também podem ocorrer e dependem da concentração de metal empregada no ensaio.

Alguns meios de cultura possuem em sua composição outros compostos orgânicos como ácido nicotínico, extrato de levedura, extrato de carne e edta (Stainer, 1969; Azevedo e Costa 1973; Manual Difco, 1984). No entanto, do mesmo modo que o citrato ou fosfato, estes compostos também diminuem a atividade do metal. Como pode ser visto através da tabela 1, a adição de $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de edta no meio de cultura reduz a atividade do cádmio, quando comparada ao meio de cultura, principalmente para adições do metal inferiores à $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Portanto, a presença de edta no meio de cultura

diminui a atividade do cádmio até a titulação da fração adicionada. Após a equivalência, a atividade do metal na solução aproxima-se da atividade deste elemento no meio de cultura.

De acordo com Staner et alii (1969), o citrato pode ser substituído por $1,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de edta no meio de cultura. No entanto nos ensaios de toxicidade esta substituição poderia alterar a atividade das espécies no meio uma vez que os complexos formados com citrato e edta possuem comportamento distintos e estão condicionados principalmente ao pH, temperatura e força iônica do meio em estudo.

A adsorção do metal pelas bactérias presentes no meio de cultura incubado também contribui para redução da atividade do metal no meio. Para avaliação da interação do metal com células bacterianas adicionou-se volumes de uma suspensão microbiana concentrada no meio de cultura (25 °C) e monitorou-se o CO₂ até atingir cerca de 0,3 mmol.L⁻¹ (8×10^8 células bacterianas). Nesta suspensão foram adicionados soluções de cádmio e a atividade do metal foi monitorada. A interação do metal com as bactérias reduziu em média cerca de 20 % da atividade do metal para concentrações inferiores a 5×10^{-4} mol.L⁻¹ quando comparado à atividade do metal no meio de cultura não incubado (tabela XVI).

Tabela XVI- Atividade do cádmio no meio de cultura, meio de cultura incubado ($8,0 \times 10^8$ células) e meio de cultura contendo edta ($5,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹).

Conc. (mol.L ⁻¹)	meio de cultura	meio de cultura incubado	meio de cultura contaminado com edta
$1,0 \times 10^{-6}$	$(1,23 \pm 0,12) \times 10^{-8}$	$(9,60 \pm 0,89) \times 10^{-9}$	$(6,49 \pm 0,74) \times 10^{-10}$
$5,0 \times 10^{-6}$	$(2,78 \pm 0,09) \times 10^{-8}$	$(1,86 \pm 0,0) \times 10^{-9}$	$(9,95 \pm 0,12) \times 10^{-9}$
$1,0 \times 10^{-5}$	$(7,41 \pm 0,0) \times 10^{-8}$	$(4,43 \pm 0,36) \times 10^{-8}$	$(4,09 \pm 0,70) \times 10^{-8}$
$5,0 \times 10^{-5}$	$(1,28 \pm 0,16) \times 10^{-7}$	$(1,13 \pm 0,10) \times 10^{-7}$	$(1,23 \pm 0,0) \times 10^{-7}$
$1,0 \times 10^{-4}$	$(8,35 \pm 0,38) \times 10^{-7}$	$(6,46 \pm 0,30) \times 10^{-7}$	$(7,41 \pm 0,0) \times 10^{-7}$
$5,0 \times 10^{-4}$	$(1,90 \pm 0,0) \times 10^{-6}$	$(1,35 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	$(1,83 \pm 0,08) \times 10^{-6}$
$1,0 \times 10^{-3}$	$(2,14 \pm 0,05) \times 10^{-6}$	$(2,11 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	$(2,14 \pm 0,05) \times 10^{-6}$
$5,0 \times 10^{-3}$	$(5,62 \pm 0,13) \times 10^{-6}$	$(5,55 \pm 0,01) \times 10^{-6}$	$(5,62 \pm 0,0) \times 10^{-6}$

Na figura 9 é descrito o comportamento deste metal nas três situações. Os resultados obtidos são médias de triplicatas conforme tabela XVI. A curva guia refere-se

à calibração em função das concentrações analíticas do metal adicionado em solução de KNO_3 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

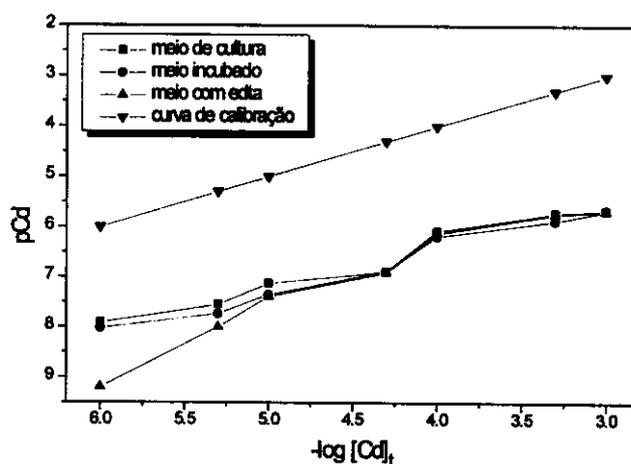


Figura 9- Atividade do cádmio em meio de cultura, meio incubado ($8,0 \times 10^8$ células) e meio contaminado com edta ($5,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).

De modo geral, a atividade do metal em qualquer um destes meios sofreu redução superior à três ordens de magnitude quando comparado à atividade do metal na solução do eletrólito inerte.

Avaliação da atividade do cobre no meio de cultura (pH 7,0 e 7,2)

A influência do pH na caracterização de uma espécie química é bastante significativa. Neste estudo avaliou-se a atividade do cobre no meio de cultura em pH 7,0 e 7,2. Apesar da diferença ser relativamente pequena, verifica-se através da figura 10 a discrepância no comportamento do metal.

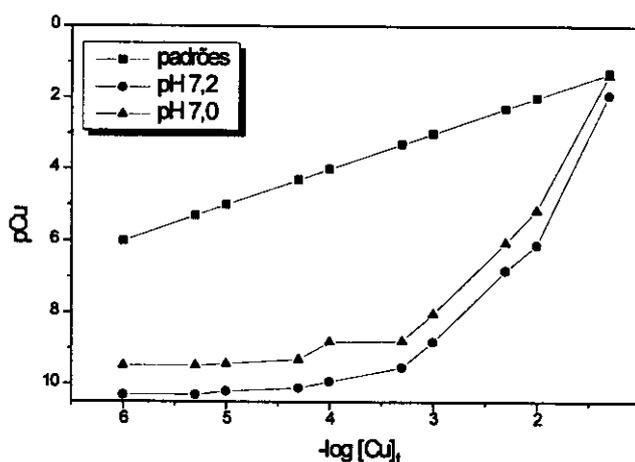


Figura 10- Atividade do cobre em solução de KNO_3 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e no meio de cultura em valores de pH 7,0 e 7,2.

As medidas de atividade para qualquer concentração total de metal foram menores no pH 7,2 devido provavelmente às reações de hidrólise e às reações com diferentes compostos presentes no meio de cultura. Dentre estes destacam-se o citrato, o fosfato e a glucose.

Em função da diferença de atividade do metal no meio de cultura, verifica-se a importância do ajuste do pH neste estudo.

Titulação dos íons fosfato e citrato presentes no meio de cultura

A atividade de cobre também foi avaliada titulando-se separadamente os compostos de fosfato mono-ácido ($7,3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), fosfato di-ácido ($3,1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) e o citrato ($2,6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em pH 7,2.

A pequena diferença de atividade do metal observada na titulação dos sais, mono e diácido, corresponde à diferença de massa adicionada, uma vez que neste pH a concentração da espécie HPO_4^{2-} é igual à concentração da espécie $H_2PO_4^-$ visto que o pK_{a2} do H_3PO_4 é 7,21. Deste modo conclui-se que neste meio a concentração final de HPO_4^{2-} é cerca de $5,2 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

As constantes de estabilidade para Cu-citrato e Cu- HPO_4 para força iônica $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$ são $7,94 \times 10^5$ e $1,20 \times 10^2 \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente (Martell e Smith, 1976). Estes valores de constante de estabilidade ainda que condicionais

à força iônica e à temperatura usadas nos ensaios justificam a ordem de interação obtida, citrato > HPO_4^{2-} (figura 11).

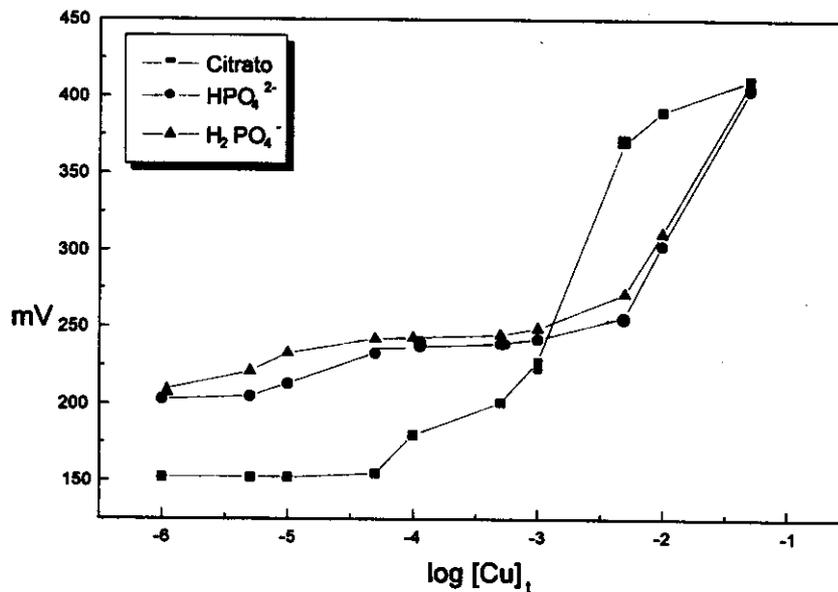


Figura 11- Titulação das soluções de citrato $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, fosfato monoácido $7,3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e fosfato diácido $3,1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ com cobre.

O comportamento do metal neste meio indicou que a maior disponibilidade ocorre a partir da adição de $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Para concentrações superiores a esta, as titulações dos íons citrato e fosfato garantem a maior atividade do metal no meio. A partir deste estudo escolheu-se o intervalo de concentração total de cobre entre 5×10^{-5} e $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ para os ensaios de toxicidade com *E. coli*.

Na tabela XVII encontram-se os valores da atividade do cádmio e do cobre no meio de cultura a pH 7,2.

Tabela XVII- Atividade do cádmio e do cobre no meio de cultura em função da concentração total do metal.

$-\log [M]_t$	pCu	pCd
6,00	10,3	7,91
5,30	10,3	7,55
5,00	10,2	7,13
4,30	10,1	6,89
4,00	9,92	6,08
3,30	9,52	5,72
3,00	8,81	5,67
2,30	6,82	5,25

Através destes dados observa-se que, no meio de cultura, a atividade do cádmio é maior que a do cobre.

Ensaio de toxicidade com metais cobre e cádmio

O cádmio têm sido extensivamente estudado em ensaios de toxicidade. Este metal não possui função biológica sendo seu efeito tóxico atribuído principalmente à complexação dos grupos -SH das proteínas e aminoácidos que proporcionam a inibição da respiração celular (Babich e Stotzky, 1979; Trevors, 1989; Laddaga, 1985).

O cobre também têm sido bastante estudado nestes ensaios. Este elemento participa do processo enzimático de algumas espécies. Nos testes com os metais cobre e cádmio verificou-se a diferença de toxicidade destes íons comparando-se a porcentagem de inibição para cada adição de concentração total dos metais.

A atividade dos metais no meio de cultura mostrou que a disponibilidade do cobre é inferior à do cádmio. No entanto, a análise dos dados das tabelas XVIII e XIX indica que a produção de CO₂ comparada ao controle foi maior para adições do cádmio.

A concentração de cobre que inibiu praticamente toda respiração microbiana está no intervalo entre $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de CuSO₄.5H₂O (63 a 318 mg/l deste metal). Este resultado é concordante com o encontrado por Kaerszman (1992,1993), onde apesar de usar um inóculo menor, cerca de $5,0 \times 10^3$ bactérias (*E.coli* B), verificou que $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ do mesmo sal, inibiram o crescimento microbiano, mesmo após 18 horas de incubação a 37 °C.

Tabela XVIII- Concentrações de CO₂ (mmol.L⁻¹) obtidas em ensaios com *E. coli* frente ao cádmio (Cd Cl₂.2H₂O).

Tempo (min)	controle [CO ₂]	Concentração total de cádmio mol.L ⁻¹			
		5,0 x 10 ⁻⁵	5,0 x 10 ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻³	3,0 x 10 ⁻³
0	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
20	0,72	0,66	0,60	0,56	0,48
40	0,77	0,70	0,70	0,60	0,50
60	1,15	1,02	0,98	0,80	0,58
80	1,45	1,31	1,23	0,93	0,66
100	1,80	1,61	1,61	1,33	0,81
120	2,77	2,42	2,42	1,54	1,02
140	3,47	2,98	2,79	2,01	1,53
160	4,39	3,86	3,45	2,47	1,65
180	5,74	4,96	4,70	3,07	1,80

As avaliações da toxicidade do cádmio e do cobre foram feitas em 180 minutos de ensaio. As concentrações referem-se à concentração analítica adicionada no meio e não à atividade do íon.

Tabela XIX- Concentrações de CO₂ (mmol.L⁻¹) obtidas durante ensaios com *E. coli* frente ao cobre (CuSO₄5H₂O)

Tempo (min)	controle [CO ₂]	Concentração total de cobre mol.L ⁻¹			
		5,0 x 10 ⁻⁵	5,0 x 10 ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻³	3,0 x 10 ⁻³
0	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
20	0,44	0,38	0,38	0,38	0,33
40	0,51	0,49	0,46	0,41	0,33
60	0,72	0,66	0,56	0,46	0,33
80	0,89	0,80	0,66	0,52	0,33
100	1,80	1,02	0,73	0,61	0,33
120	1,38	1,26	0,96	0,63	0,33
140	1,90	1,56	1,19	0,90	0,33
160	2,60	1,94	1,37	0,96	0,33
180	3,19	2,19	1,40	1,05	0,33

A inibição da respiração microbiana, causada pelas adições dos metais cádmio e cobre, após 60 minutos de ensaio, pode ser avaliada através das figuras 12 e 13 respectivamente, onde são apresentados os valores de atividade dos metais no meio de cultura usado, conforme tabela XVII.

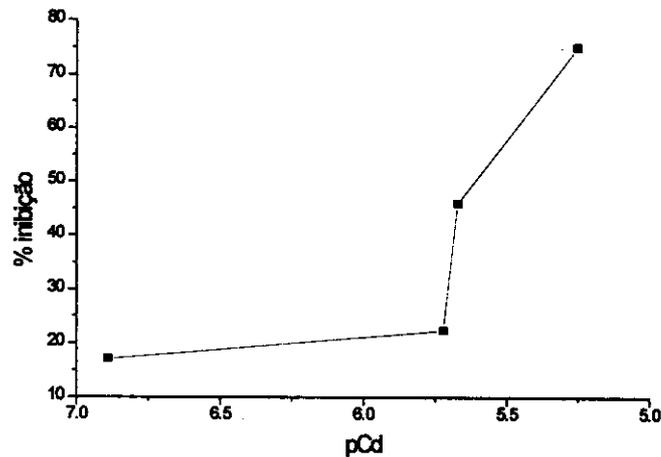


Figura 12- Inibição da respiração microbiana frente ao-cádmio conforme tabela XVIII.

Através das figuras 12 e 13 verifica-se que os valores de EC₅₀ (concentração que inibe 50 % da respiração microbiana) foram obtidos para ambos metais quando a atividade do cádmio e do cobre no meio correspondiam a $2,2 \times 10^{-6}$ e $5,62 \times 10^{-10}$ mol.L⁻¹ respectivamente. Para estes valores de atividade, a concentração total dos metais cádmio e cobre foram $4,22 \times 10^{-4}$ e $5,62 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, respectivamente. Estas concentrações correspondem a 47,4 mg/L de cádmio e 35,7 mg/L de cobre.

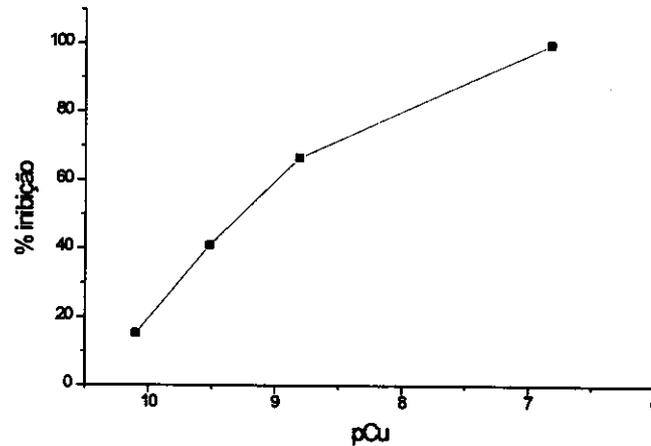


Figura 13- Inibição da respiração microbiana frente ao cobre conforme tabela XIX.

Baseado nestes dados conclui-se que o potencial tóxico do cobre é superior ao do cádmio, como pode ser observado através dos valores de porcentagem de inibição da respiração microbiana encontrados nas tabelas XVIII e XIX. Estes resultados são discordantes dos valores encontrados por Dorward e Barisas (1984) quando usaram medidas do CO₂ produzido por *E coli* B (ATCC 23266), imobilizadas na superfície de um eletrodo sensível à concentração de CO₂. De acordo com estes pesquisadores 40 % de inibição da respiração microbiana foi obtida com 0,3 mg/L de cádmio e 1,1 mg/L de cobre, atribuindo portanto maior toxicidade para o cádmio. Cabe ressaltar que estes pesquisadores não avaliaram a atividade do metal no meio de cultura empregado e que este continha a mesma concentração de citrato que o meio usado na presente pesquisa.

Baseado na equação que descreve o crescimento bacteriano (equação 1) calculou-se os tempos necessários para duplicação da população microbiana frente aos metais cobre e cádmio.

$$N = N_0 \cdot e^{kt}$$

(equação 1)

Nesta equação, N representa a população bacteriana em um determinado tempo e N₀ a população inicialmente presente no inóculo.

Os tempos de duplicação de população ($N = 2N_0$), foram obtidos conforme os dados das tabelas XVIII e XIX e encontram-se na tabela XX.

Tabela XX- Tempo de duplicação da população microbiana (*E. coli*) frente ao cádmio e cobre.

Conc. M_t	pCd	$t_d(\text{Cd})(\text{min})$	pCu	$t_d(\text{Cu})(\text{min})$
$5,0 \times 10^{-5}$	6,89	53,2	10,1	61,5
$5,0 \times 10^{-4}$	5,72	52,4	9,52	80,3
$1,0 \times 10^{-3}$	5,67	62,2	8,81	100,1
$5,0 \times 10^{-3}$	5,25	74,1	6,82	∞

A diferença nos valores tempo para duplicação da população microbiana confirmam a maior toxicidade do cobre quando comparado ao cádmio.

Os testes de toxicidade foram feitos também para os metais zinco e níquel. Embora não tenha sido feito estudo de especiação destes elementos no meio de cultura, observa-se através dos valores de constantes de estabilidade para os complexos formados com o citrato que esta interação irá reduzir a atividade destes metais ($\log K$ para força iônica $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ é igual a 4,98 e 5,40 para o zinco e o níquel respectivamente) (Martell e Smith, 1976).

Nos ensaios com o zinco verificou-se que para as concentrações de 90 e 180 mg/L ($3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a toxicidade foi semelhante, apresentando em média inibição da respiração microbiana em torno de 10 %. Concentrações superiores a 180 mg/L não foram testadas pois já se observava nesta concentração a formação de precipitado. Neste experimento a respiração microbiana foi monitorada durante 180 minutos.

Em geral, na elaboração de um protocolo para ensaios de toxicidade é de fundamental importância fixar a concentração de células microbianas, pois os resultados de toxicidade, como por exemplo EC_{50} , aumentam em função do aumento da população inicial de microrganismos. Nos ensaios com cobre, cádmio e zinco procurou-se avaliar a toxicidade durante durante 180 minutos de ensaio a partir do inóculo contendo cerca de $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CO_2 (a população microbiana nesta fase é cerca de 8×10^8 células). No entanto, através dos dados obtidos no ensaio com níquel, cujo monitoramento foi iniciado quando a concentração de CO_2 estava em torno de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ (9×10^8 células), verificou-se que a quantidade de CO_2 produzida em 90 minutos de ensaio foi suficiente para avaliar a toxicidade do metal. Este mesmo procedimento também foi adotado para os ensaios com mercúrio. O comportamento microbiano observado em função da concentração de CO_2 produzida durante o ensaio com níquel encontra-se na figura 14.

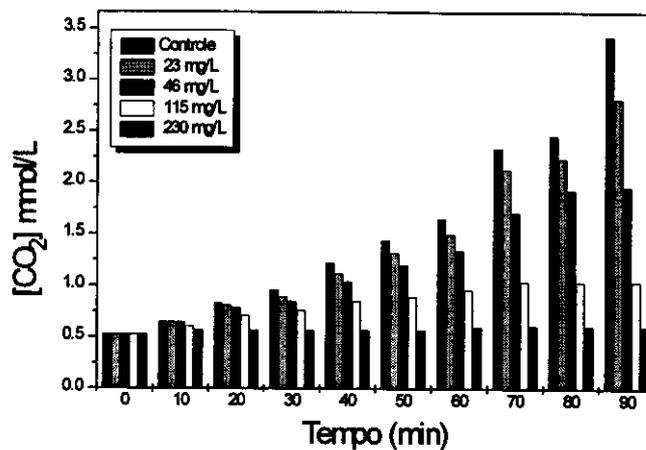


Figura 14- Concentrações de CO₂ obtidas para *E. coli* frente ao níquel.

O valor de EC₅₀ 92,6 mg/L (cerca de $1,57 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de NiCl₂.7H₂O) para o níquel foi estimado após 60 minutos de ensaio (figura 15). Neste ensaio, considerou-se a concentração total de metal.

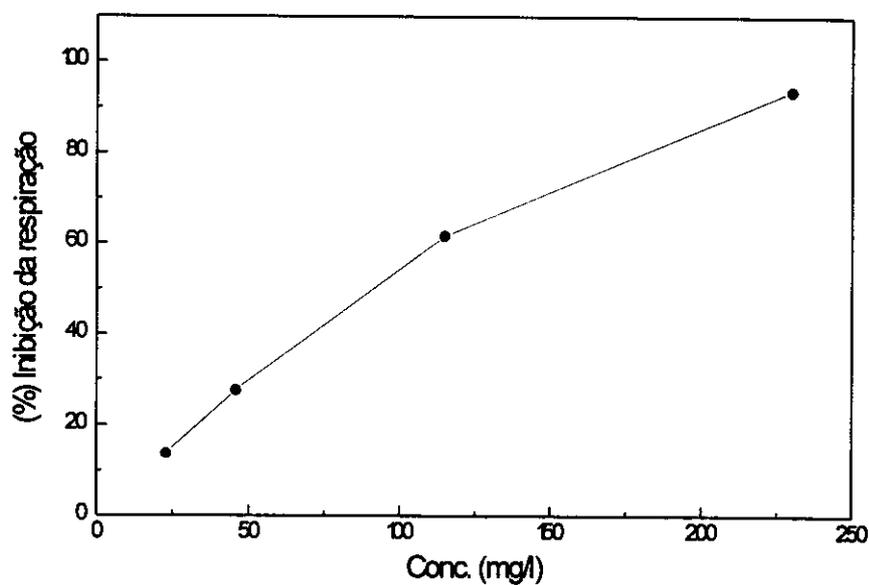


Figura 15- Inibição da respiração microbiana frente ao níquel

Através deste experimento demonstrou-se que a avaliação da toxicidade de metais bem como de outros compostos pode ser feita em tempo ainda menor que aqueles estimados para os ensaios com cobre e cádmio.

Teste de toxicidade com o mercúrio

Apesar de existir um grande número de pesquisas direcionadas ao estudo da toxicidade dos íons mercúrio (Hg^{2+} e Hg_2^{2+}) muito pouco se sabe sobre a toxicidade do metal na sua forma elementar (Hg^0). Deste modo, torna-se difícil avaliar o impacto desta espécie para o ambiente devido ao desconhecimento de sua toxicidade.

No presente trabalho estudou-se a atividade microbiana (*E. coli* ATCC 25922) frente às espécies de mercúrio oxidado (Hg^{2+}) e mercúrio elementar (Hg^0) no meio de cultura. A redução da espécie oxidada foi analisada em diferentes concentrações de glicose e constatou-se que a toxicidade do mercúrio elementar deve ser considerada. A inibição de $5 \times 10^6 \mu\text{g/L}$ de Hg^0 foi similar à observada para $10 \mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} após 60 minutos de ensaio.

O comportamento do Hg^{2+} no meio de cultura (pH 7,2) mostrou que a espécie é intensamente reduzida a Hg^0 em função da glicose presente neste meio ($E^0 = -0,72 \text{ V}$) minimizando portanto a toxicidade do íon. A inibição de $5 \times 10^6 \mu\text{g/L}$ de Hg^0 foi similar à observada para $10 \mu\text{g/L}$ de Hg^{2+} após 60 minutos de ensaio.

Na presença de bactérias ocorre a adsorção tanto da espécie reduzida quanto da oxidada. A adsorção do mercúrio elementar é menos favorecida que a da espécie iônica, nas mesmas condições experimentais.

O experimento foi conduzido a temperatura constante ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). A concentração de CO_2 foi monitorada em intervalos fixos, cada 10 minutos, com o sistema FIA-condutométrico, durante 90 minutos de ensaio. As espécies de Hg^0 e Hg^{2+} foram monitoradas utilizando-se a técnica de Absorção Atômica de Vapor Frio (vide anexo 1).

Conclusões

Na titulação do cádmio em meio de cultura puro e meio de cultura incubado, observou-se que a interação do metal com bactérias reduziu em média cerca de 20 % da atividade do metal principalmente para adições inferiores a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. A atividade deste metal nestes meios, bem como no meio contaminado com $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de edta, foi três ordens de magnitude inferior em cada meio quando comparado à atividade do metal na solução do eletrólito inerte.

A importância do ajuste de pH nos estudos de toxicidade foi evidenciada nos ensaios com cobre em meio de cultura com pH 7,0 e 7,2. Apesar da diferença ser pequena a atividade do metal é bastante reduzida em pH 7,2, devido provavelmente às reações de hidrólise.

Os estudos de especiação dos metais no meio de cultura mostrou que a atividade do cobre é inferior à do cádmio. No entanto no teste de toxicidade com cobre, observou-se que a taxa de CO₂ produzida pelas bactérias (*E. coli*) foi menor quando comparada à produzida no ensaio com cádmio. Nestes experimentos observou-se que o valor de EC₅₀ foi obtido após a adição de 47,4 e 35,7 mg/L de cádmio e cobre respectivamente, após 60 minutos de ensaio.

A maior toxicidade demonstrada pela população microbiana frente ao cobre, quando comparada ao cádmio, poderia ser atribuída ao tempo de duplicação 80,3 e 52,7 minutos respectivamente, para a adição de $5,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ dos compostos usados. No entanto, deve-se salientar que toxicidade do metal está condicionada à sua disponibilidade no meio. Nesta pesquisa observou-se que a atividade do cobre e do cádmio, para adição de $5,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, foram cerca de 7 e 3 ordens de magnitude inferiores respectivamente à concentração total adicionada. Deste modo conclui-se que o potencial tóxico do metal não está diretamente associado à concentração total deste no meio em estudo e sim à sua atividade.

Nos ensaios de toxicidade com mercúrio observou-se que a inibição da respiração microbiana proporcionada pela adição de $5,0 \times 10^6$ µg/L de Hg⁰ foi similar à observada para 10 µg/L de Hg²⁺ após 60 minutos de ensaio. Nestes experimentos observou-se que a glicose presente no meio de cultura proporcionou a redução de Hg²⁺ a Hg⁰ minimizando deste modo a toxicidade do íon.

A rapidez na execução dos ensaios com metais evidencia a possibilidade do uso do procedimento proposto nos testes de avaliação do potencial tóxico de soluções de metais, bem como de efluentes industriais que contenham estas espécies.

Capítulo III

Avaliação do desempenho de desinfetantes de uso doméstico.

Introdução

A avaliação do desempenho de desinfetantes de uso doméstico, hospitalar, ou industrial é bastante complexa. A natureza e o tipo das superfícies a serem tratadas, a concentração e a natureza dos resíduos a ela aderentes, o tipo de microflora contaminante na superfície, a concentração e o período de contato do desinfetante com a superfície, são exemplos de fatores que podem alterar em maior ou menor grau sua eficiência (Leitão, 1984). Em função de tantas variáveis torna-se evidente a necessidade do uso de testes padronizados que proporcionem a avaliação destes produtos.

Os desinfetantes de uso doméstico ou hospitalar, por exemplo, podem ser avaliados através dos seguintes testes "in vitro": (a) Teste do Coeficiente Fenólico (b) Teste de Diluição de Uso e (c) Teste de Suspensão. Para obtenção de dados reprodutíveis e precisos, estes testes são padronizados quanto aos microrganismos testados, meios de cultura, soluções e equipamentos.

O teste do Coeficiente Fenólico foi praticamente o primeiro a ser desenvolvido com a finalidade de avaliar a eficiência dos desinfetantes, sendo ainda hoje bastante utilizado. Este teste foi oficializado pela AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) e FDA (Food and Drug Administration). Baseado no processo de diluição este teste é restrito a desinfetantes hidrossolúveis e sua eficiência é comparada à do fenol (Pelczar et alii, 1980). Os organismos-teste utilizados são: *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Staphilococcus aureus* ATCC 6538 e *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442. Na execução deste prepara-se inicialmente uma solução estoque do desinfetante a ser avaliado. A partir desta são efetuadas diluições subsequentes, calculadas por ensaios preliminares, em que é constatada a destruição do(s) organismo(s) testados após contato por períodos de tempo variáveis entre 5 e 15 minutos. Em geral, o procedimento envolvido no teste do Coeficiente Fenólico exige um período de tempo superior a 48 horas para avaliação de um desinfetante. Este teste representa um índice razoável para análise de derivados fenólicos mas não para os desinfetantes cuja cinética de atividade diferem acentuadamente da cinética do fenol. De acordo com Leitão (1984), as condições do teste são irrealis pois não são comparadas às de uso de um desinfetante, principalmente quando este é aplicado às superfícies. Muitas variações de determinação do Coeficiente Fenólico são conhecidas. Dentre elas o teste de

Rideal-Walker, o método de Ruhle e Brewer, o teste de Chick-Martin e o teste de Garrod (Richards, 1968).

O Teste da Diluição de Uso utiliza como organismos-teste *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

No Brasil, até 1983 não existiam orientações por parte de entidades oficiais sobre o teste a ser utilizado para avaliação de desinfetantes. Em 1985, através do Ministério da Saúde, estabeleceram-se oficialmente padrões microbiológicos e posteriormente a metodologia da Diluição de Uso para avaliação dos desinfetantes domésticos e hospitalares (Timenetsky e Alterthum, 1988). Para execução deste teste são empregados 60 cilindros carreadores para cada microrganismo testado. De acordo com o Manual de Saneantes da Fundação Oswaldo Cruz (1992), o desinfetante testado deverá matar os microrganismos em 59 dos 60 cilindros utilizados para conferir um nível de confiança de 95 %. Este método também pode ser empregado para avaliar desinfetantes hospitalares destinados a uso específico como superfícies e utensílios. Nestes casos, além dos microrganismos citados utilizam-se também cepas de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, respectivamente. O tempo envolvido na avaliação de um desinfetante através do procedimento de diluição é superior a 96 horas.

Timenetsky e Alterthum (1988) avaliaram alguns desinfetantes de uso doméstico utilizando o procedimento qualitativo de diluição de uso (10 carreadores) e um procedimento quantitativo adaptado. O produto Kalipto, cujo composto ativo é o quaternário de amônio, o Pinho Bril, Pinho White e Pinho Tok que possuem em suas fórmulas o fenol, são exemplos de produtos que foram testados e que atingiram os padrões de desinfetantes de uso doméstico de acordo com o protocolo proposto.

No Teste de Suspensão, alíquotas de um meio incubado são adicionadas às soluções contendo uma ou mais concentrações do desinfetante. O número de células sobreviventes é determinado após tempos variáveis de exposição. Este teste considera fatores como tempo de exposição, temperatura, pH, natureza e concentração da carga microbiana, presença de matéria orgânica e características da água (composição e dureza). O teste pode ser aplicado a bolores, leveduras e bacteriófagos bem como à cepas grampositivo e gramnegativo tais como *Streptococcus latis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. A suspensão bacteriana considerada ideal para o ensaio deve apresentar uma concentração de aproximadamente 10^{10} células/ml. O desempenho do desinfetante é comparado à ação de produtos de referência como hipoclorito de sódio e cloramina T. As cloraminas são biocidas mais fracas que o hipoclorito (Hoff e Geldreich, 1981). Após determinado período de exposição da suspensão microbiana aos desinfetantes, efetua-se a

inativação destes utilizando-se compostos específicos. Os resultados do teste baseiam-se no número de reduções decimais da população microbiana considerando-se o tempo de exposição e a concentração do desinfetante. No Teste de Suspensão, o tempo envolvido na avaliação do desinfetante é superior a 72 horas.

Andrade e Serrano (1993) utilizaram este teste para avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e valores de pH, usando *Bacillus subtilis*. Através dos dados obtidos a partir de rearranjos de equações e do auxílio do software DERIVE, os pesquisadores obtiveram uma equação que estima o tempo de contato necessário para se obter uma determinada redução decimal do número de esporos, a uma dada concentração do cloro residual livre, em função do valor do pH das soluções.

Modificações dos testes citados, bem como o uso de testes não padronizados são frequentemente utilizados na avaliação do potencial tóxico de diversos produtos classificados como desinfetantes de uso doméstico e hospitalar (Corrêa e Hofling, 1989; Bloomfield et alii, 1991; Bloomfield e Looney, 1992).

A maioria dos testes anteriormente citados baseia-se na avaliação do crescimento da população microbiana, empregando-se procedimentos visuais de observação das suspensões, contagem de células ou ainda análises espectrofotométricas. No entanto, outros parâmetros também podem ser utilizados para avaliar a inibição da atividade de uma suspensão microbiana. A atividade enzimática, o "pool de ATP", a bioluminescência e a respiração são exemplos destes parâmetros. Nesta pesquisa, a inibição da atividade microbiana foi o parâmetro utilizado para avaliar o potencial tóxico de desinfetantes de uso doméstico.

A determinação analítica do produto da respiração microbiana (CO₂), baseado nos antigos respirômetros, foi melhorada com auxílio da Análise por Injeção em Fluxo (FIA) (Pasquini e Faria, 1987). O uso desta técnica permitiu uma maior velocidade analítica com menor limite de detecção do CO₂ (aq) (3 µM). Dados preliminares indicam que o procedimento proposto é de grande valia no campo da ecotoxicologia (Jardim et alii., 1990; Guimarães e Jardim, 1993). No entanto, a aplicação mais importante não apenas do ponto de vista científico, mas principalmente no campo social, é a adaptação deste procedimento para elaboração de antibiogramas, para testes de avaliação da toxicidade de efluentes e de desinfetantes de uso doméstico ou hospitalar.

Neste trabalho a toxicidade de diversos bactericidas de uso doméstico foi avaliada a partir deste método utilizando-se como organismos-teste quatro espécies de bactérias.

Materiais e Métodos

Desinfetantes de uso doméstico

Pinho Bril (cujo princípio ativo é a base de orto-fenil fenol 0,20 %) é fabricado pela Bombril S/A.

Pinho Sol (orto-benzil para-cloro fenol 0,45 %), Colgate-Palmolive Ltda.

Pinho Tok (2-hidroxi-2',4,4-triclorodifenil éter 0,1 % e formol (40 %) 0,2 %), Indústria Gessy Lever Ltda.

Pinho White (2-hidroxi 2',4,4 triclorodifenil éter 0,08 %), Laboratório Beecham Ltda.

Pinho Kleen (alquilenol glicol monoaril éter 0,2 % e cloreto de alquil dimetil benzilamônio 7 %), Adiquima Ind. e Com. de Aditivos Ltda.

Cândida (hipoclorito de sódio, teor de cloro ativo 2,0 à 2,5 %) Indústrias Anhembi S/A.

Lysoform (formol 37 %, 20 ml, dodecilbenzeno sulfonato de sódio 12 %, 6,67 ml), Milana Industrial e Comercial Brasileira de Saneantes Ltda.

Kalípto (quaternário de amônio 0,5 à 0,7 %), Bombril S/A.

Paetê (formaldeído a 40 %, 1,25ml %), Labormax Produtos Químicos Indústria e Comércio S/A.

Microrganismos

Staphilococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Spirillum volutans* ATCC 19554. Estes microrganismos foram cedidos pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello.

Meios de cultura

Meio mínimo: A composição deste meio foi descrita no capítulo 1.

Caldo Nutriente (Difco): 4 g do produto foram diluídas em 1 litro de água destilada e o pH ajustado para 7,20. Este meio foi usado nos ensaios com *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphilococcus aureus*.

Equipamentos

Conforme descritos no capítulo I.

Testes de toxicidade

O procedimento adotado foi o seguinte: o meio de cultura era incubado com o organismo-teste e a concentração do CO₂ neste meio líquido era monitorada até atingir 0,5 mmol.L⁻¹. Nesta fase, dividia-se a solução (100 ml) em erlenmeyers de 125 ml e adicionava-se uma quantidade variável e conhecida do desinfetante. Estes frascos eram mantidos em banho termostático e o CO₂ monitorado em intervalos de tempo definidos, durante aproximadamente uma hora. Todos os testes foram realizados em temperatura mantida à 37 °C com auxílio de um banho (Banho Maria Modelo Fanem).

O teste de toxicidade aguda usando *Spirillum volutans* foi feito com base na Norma CETESB-L5228-12/1988. As leituras foram efetuadas com o microscópio JENA-MED-2 binocular (Karl Veiss) utilizando contraste de fase.

Resultados e Discussão

Num ensaio preliminar com bactericidas de uso doméstico utilizou-se apenas *Escherichia coli* como organismo teste. Os produtos testados foram, Cândida, Lysoform, Kalipto, Paetê e Pinho Sol e procurou-se utilizar concentrações que proporcionassem inibição similar.

Para a realização dos testes com o produto Cândida, avaliou-se inicialmente a concentração da espécie ativa OCl⁻ em meio de cultura. O procedimento adotado foi o seguinte: fez-se uma tomada de 6,25 ml do produto Cândida e completou-se o volume até 50 ml com água destilada. Esta solução foi tratada com excesso de iodeto de potássio (KI) e acidificada com ácido acético (CH₃COOH). Na titulação com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) previamente padronizado (0,097 N) foram gastos 41,7 ml deste padrão (Basset et alii., 1988). O mesmo procedimento foi repetido usando-se o Meio Mínimo, para diluição do produto Cândida. Neste ensaio foram gastos 2,4 ml da solução de Na₂S₂O₃.

O resultado da titulação do OCl⁻ no primeiro experimento indica que a concentração deste no produto é cerca de $2,02 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, que corresponde a 2,4 %, frente a uma concentração nominal do rótulo de 2,0 à 2,5 %. No entanto, na titulação do produto no Meio Mínimo, foram recuperados apenas $0,32 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, indicando que o hipoclorito é reduzido pelos compostos presentes neste meio de cultura. Provavelmente o composto

que mais contribui para esta redução é a glicose, que está presente no meio em concentração de 2 % p/v. Este procedimento demonstrou que o meio de cultura usado favoreceu uma reação antagônica da espécie testada, minimizando em aproximadamente 17 vezes sua atividade. Os outros produtos usados nos testes de toxicidade não puderam, entretanto, ser avaliados de maneira similar.

Após a avaliação da fração ativa do OCI^- em meio de cultura, foram feitos os testes de toxicidade deste e dos demais produtos inicialmente selecionados.

Na tabela XXI encontram-se as concentrações e os respectivos volumes dos produtos adicionados a erlenmeyers contendo 100 ml de meio de cultura inoculado. A população microbiana nesta fase corresponde aproximadamente 5×10^7 bactérias viáveis por ml, gerando uma concentração inicial em torno de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CO_2 no meio.

Foram feitos ensaios com diversas concentrações dos bactericidas de uso doméstico. Na tabela XXII encontram-se as concentrações que proporcionaram, em 90 minutos de ensaio, redução da atividade microbiana superior a 75 % para todos os compostos testados. Conclui-se através destes dados que seria necessário adicionar um volume de Pinho Sol cerca de 120 vezes maior que o volume do produto Cândida para se obter redução semelhante. Para os produtos Lysoform, Kalipto e Paetê esta relação corresponde a 3, 16 e 96 respectivamente. Considerando-se que no meio de cultura a concentração disponível do OCI^- é cerca de 17,4 vezes menor que o valor encontrado no rótulo do composto, verifica-se que a relação em termos de concentração passa a ter aproximadamente a seguinte proporção 1:70:139:348:391 para o princípio ativo dos produtos Cândida, Kalipto, Lysoform, Paetê e Pinho Sol respectivamente.

Observa-se através destes testes a necessidade de se avaliar o comportamento da espécie ativa, em termos de toxicidade, no meio de cultura usado.

Tabela XXI- Volumes dos bactericidas usados nos testes de toxicidade e concentrações dos respectivos princípios ativos.

Cândida	Kalipto	Paetê	Lysoform	Pinho Sol
4,17 ul	67 μl	400 μl	10,8 μl	500 μl
1 mg/L	4 mg/L	20 mg/L	8 mg/L	22,5 mg/L

Tabela XXII- Inibição (%) da respiração microbiana de *E.coli* frente a bactericidas de uso doméstico. Concentrações conforme tabela XXI.

Tempo(min)	Cândida	Kalípto	Paete	Lysoform	Pinho Sol
30	64,5 ± 0,4	58,5 ± 1,4	50,5 ± 3,0	58,4 ± 4,4	58,7 ± 2,4
60	70,9 ± 1,1	70,0 ± 0,3	60,3 ± 0,3	64,0 ± 1,6	61,8 ± 1,4
90	82,3 ± 0,4	80,0 ± 0,5	75,1 ± 1,0	76,9 ± 1,4	76,4 ± 1,8

Os mesmos produtos foram avaliados através de testes de toxicidade aguda usando-se *Spirillum volutans* ATCC 19554 como organismo-teste. O *Spirillum volutans* é uma bactéria aquática de grandes dimensões (1,4-1,7 por 16-28 µm) que apresenta motilidade típica devido à presença de flagelos em cada uma de suas extremidades. Ensaio utilizando esta espécie têm sido aplicados em monitoramento e avaliação da toxicidade de efluentes industriais, águas residuárias, águas superficiais e subterrâneas, extratos de solo e materiais usados em biomedicina. (Sanches et alii, 1992). Apesar deste microrganismo estar sendo usado em vários testes de toxicidade, sabe-se que o mesmo não representa uma classe patogênica de microrganismos (Sanches et alii., 1988; Dutka et all., 1983). No entanto a relativa facilidade na execução do teste justifica o seu emprego. A concentração mínima dos produtos necessária para alterar o movimento típico de 90% destas bactérias à temperatura ambiente (MEC₉₀) foi avaliada após 90 minutos de contato.

Os valores de MEC₉₀ para o princípio ativo do Kalípto e Paetê foram similares às concentrações usadas para inibir mais de 75% da atividade de *E. coli* no mesmo período de tempo. Para o Lysoform e Cândida o MEC₉₀ foi cerca de 2 e 104 vezes superior, respectivamente. Deve-se considerar que não houve interação do OCl⁻ com o meio de cultura usado no bioensaio com *S. volutans*. Para o produto Pinho Sol, 2,0 mg/L foram suficientes para inibir 90% da atividade do *Spirillum volutans*, ou seja, cerca de 11 vezes menor que a concentração usada para *E.coli* no mesmo intervalo de tempo.

Considerando-se os resultados apresentados na tabela XXIII, verifica-se uma grande discrepância, principalmente para os produtos Pinho Sol e Cândida. Estes resultados sugerem que a avaliação de desinfetantes deve ser realizada através de dois ou mais testes e que devem ser considerados os fenômenos que possam interferir na ação antimicrobiana do princípio ativo dos produtos frente aos microrganismos.

Tabela XXIII- Concentrações (mg/l) para atingir o MEC₉₀ para o *Spirillum volutans* e inibição superior a 75% para *Escherichia coli* em 90 minutos.

Inibição	Cândida	Kalípto	Paete	Lysoform	Pinho Sol
<i>E. coli</i> > 75%	1,0	4,0	20,0	8,0	22,5
<i>E. volutans</i> 90%	6,0	3,0	20,0	18,0	2,0

Os resultados da tabela XXIII também evidenciam a necessidade de se avaliar a toxicidade de um mesmo produto frente a diversos microrganismos, para melhor caracterizar seu potencial tóxico.

Após este teste preliminar, avaliou-se a inibição da respiração microbiana utilizando-se quatro diferentes cepas de bactérias (*Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), frente aos produtos classificados como Pinhos (Pinho Sol, Pinho Bril, Pinho Tok, Pinho White e Pinho Kleen).

Diversas concentrações dos produtos foram testadas com objetivo de encontrar àquela que inibisse mais que 75% da atividade microbiana destas cepas em aproximadamente 90 minutos de ensaio.

Nestes testes a adição dos desinfetantes no meio de cultura incubado foi feita quando os níveis de CO₂ estavam em torno de 0,5 mmol . L⁻¹.

A população microbiana presente no controle, para faixa de concentração de CO₂ de 0,5 a 3,0 mmol . L⁻¹, foi avaliada também por plaqueamento.

Os dados obtidos através do plaqueamento bem como os meios de cultura utilizados para cada cepa estudada encontram-se na tabela XXIV.

Para a bactéria *Salmonella choleraesuis* utilizou-se como meio de cultura o Caldo Nutriente pois esta cepa apresentou crescimento lento em meio mínimo.

Tabela XXIV - Populações microbianas (10^6 ufc/ml) correspondentes a diferentes concentrações de CO_2 .

	Caldo Nutriente				Meio Mínimo
	<i>E. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. cholerae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
[CO_2] mM					
0,5	15	21	20	47	45
0,75	34	27	28	72	66
1,00	50	63	70	90	110
2,00	80	81	190	181	151
3,00	140	120	230	243	214

Mesmo em caldo nutriente optou-se por iniciar o experimento com a concentração de CO_2 em torno de $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, uma vez que entre 0,5 e $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ o crescimento ainda era bastante lento. Esta bactéria demonstrou resistência à concentração de 0,2 % v/v dos desinfetantes testados como pode ser observado na figura 16 (a).

Através da figura 16 (b) verifica-se que a atividade microbiana desta cepa sofre mais de 80% de redução quando submetida a 1% dos produtos Pinho Sol, Pinho Tok e Pinho Kleen. No entanto quando submetida à mesma concentração dos produtos Pinho White e Pinho Bril, o crescimento das cepas demonstrou que esta concentração não foi suficiente para proporcionar a inibição inicialmente sugerida.

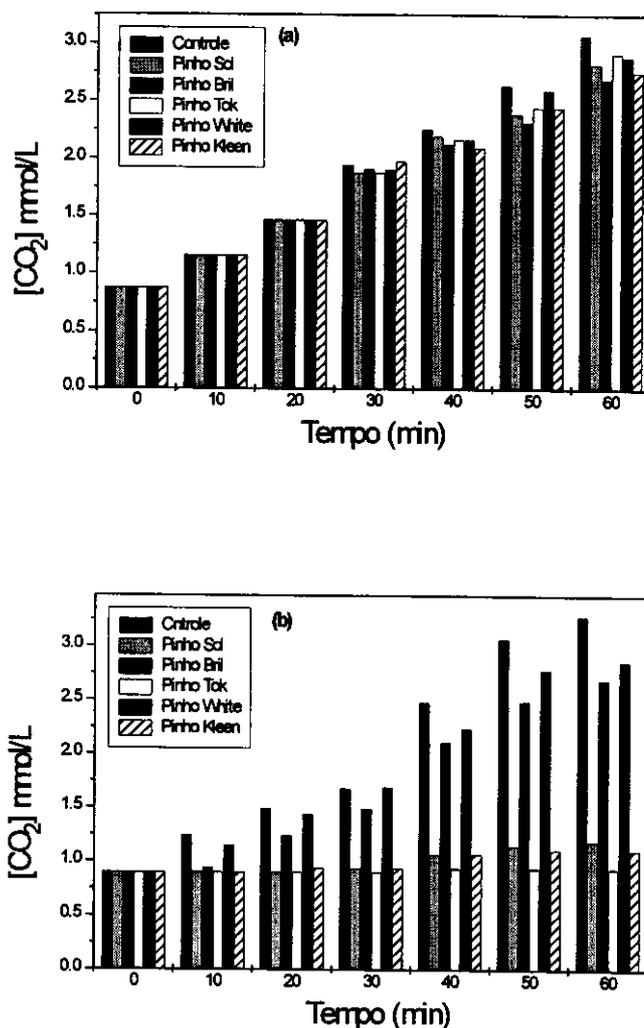


Figura 16- Inibição da atividade microbiana (*Salmonella choleraesuis*) frente a desinfetantes de uso doméstico; (a) 0,2 % e (b) 1,0 % v/v.

A espécie *Enterococcus faecalis* foi a mais sensível a todos os produtos testados. Através das figura 17 pode-se observar que o Pinho Sol é o produto mais tóxico. A concentração de 0,025 % v/v do produto inibe mais de 90 % da atividade microbiana enquanto que para os demais produtos tal inibição foi encontrada quando utilizou-se o dobro desta concentração.

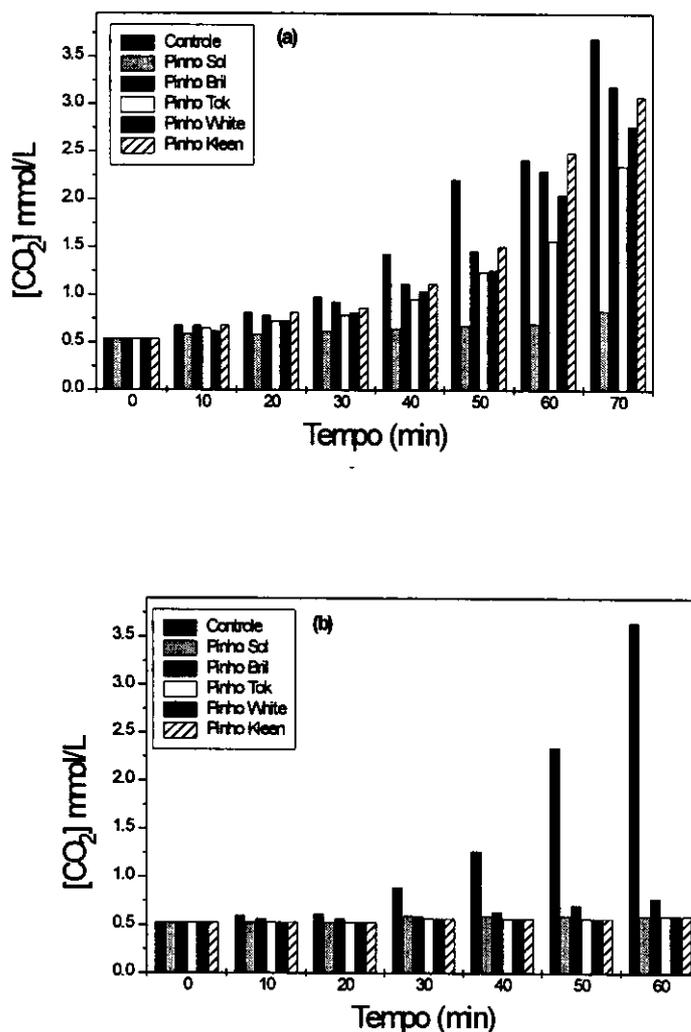


Figura 17- Inibição da atividade microbiana (*Enterococcus faecalis*) frente a bactericidas de uso doméstico; (a) 0,025 % e (b) 0,05 % v/v.

Para o organismo teste *Staphilococcus aureus* verificou-se que 0,2% v/v de todos os produtos inibia mais de 80 % do crescimento. Para a concentração de 0,05% v/v do Pinho Bril houve pequena inibição do crescimento bacteriano enquanto que para os demais produtos esta bactéria apresentou alta sensibilidade (figura 18).

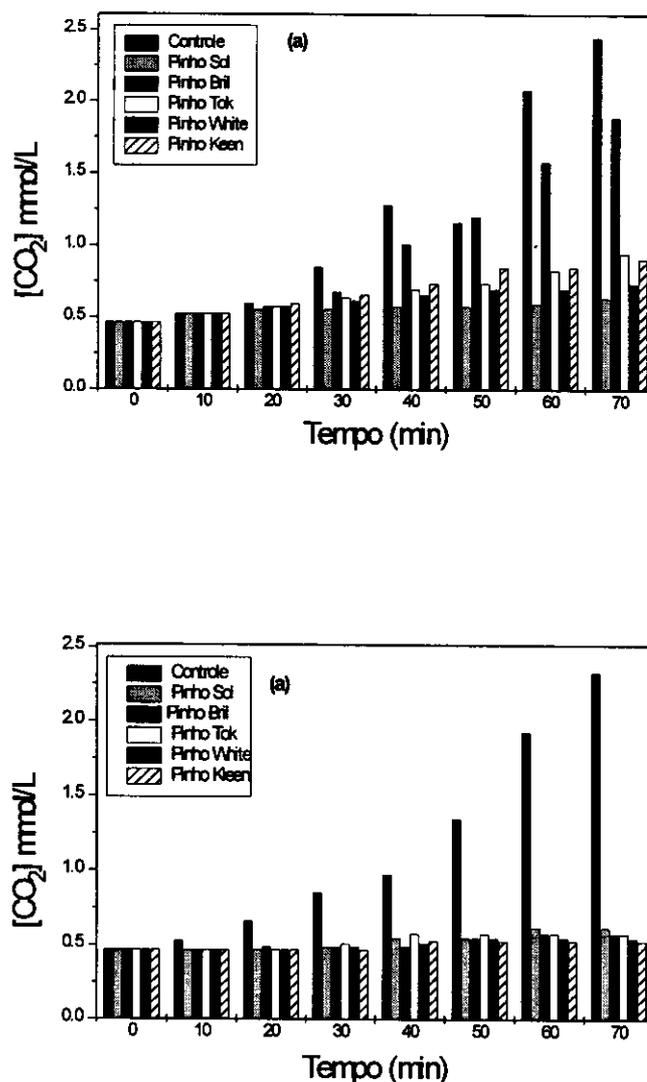


Figura 18- Inibição da atividade microbiana (*Staphylococcus aureus*) frente a bactericidas de uso doméstico; (a) 0,05 % e (b) 0,2 % v/v.

Quando se compara a toxicidade do Pinho Kleen e do Pinho Bril frente à bactéria *Staphylococcus aureus* conclui-se que o princípio ativo a base de quaternário de amônio provoca efeito deletério superior ao do fenólico. Corrêa e Hofling (1989) chegaram a mesma conclusão quando avaliaram a ação antimicrobiana de dois desinfetantes hospitalares, utilizando esta mesma cepa padrão.

De acordo com Pelczar (1980), os compostos fenólicos atuam pela desnaturação das proteínas e por efeitos deletérios às membranas celulares, enquanto que o mecanismo de ação dos desinfetantes catiônicos, além de provocar a desnaturação das proteínas favorece também a inibição enzimática e a lesão da membrana citoplasmática proporcionando o vazamento de constituintes celulares.

Deve-se considerar que o pH também pode ter um efeito marcante na eficácia de um desinfetante. Sabe-se que os desinfetantes aniônicos são mais eficientes em valores de pH baixos, como por exemplo os fracamente ácidos, que atuam principalmente como moléculas não dissociadas. Por outro lado, os desinfetantes catiônicos são mais eficazes em meio alcalino.

Os demais compostos presentes em um desinfetante, o tempo e as condições de estocagem, também podem alterar a ação bactericida do princípio ativo. Compostos fenólicos, por exemplo, quando associados a detergentes aniônicos, aumentam substancialmente, sua atividade microbiana devido a maior solubilidade e, conseqüentemente maior penetração na célula bacteriana (Zanon, 1973; Gélinas, 1982).

A avaliação do princípio ativo dos produtos no meio de cultura é também de grande importância. O trabalho de Zanon (1975) mostra que o poder bactericida dos desinfetantes catiônicos é reduzido na presença de matéria orgânica. No presente trabalho este efeito foi demonstrado através do exemplo da redução do OCl^- pelo meio de cultura.

Nesta pesquisa realizaram-se ensaios com *E. coli* utilizando-se dois diferentes meios de cultura. O objetivo deste experimento era avaliar a possível interação do meio mínimo e do caldo nutriente com os produtos testados.

Nas figuras 19 e 20 observa-se o comportamento das cepas frente às concentrações de 0,2 e 1 % v/v em cada um dos meios de cultura.

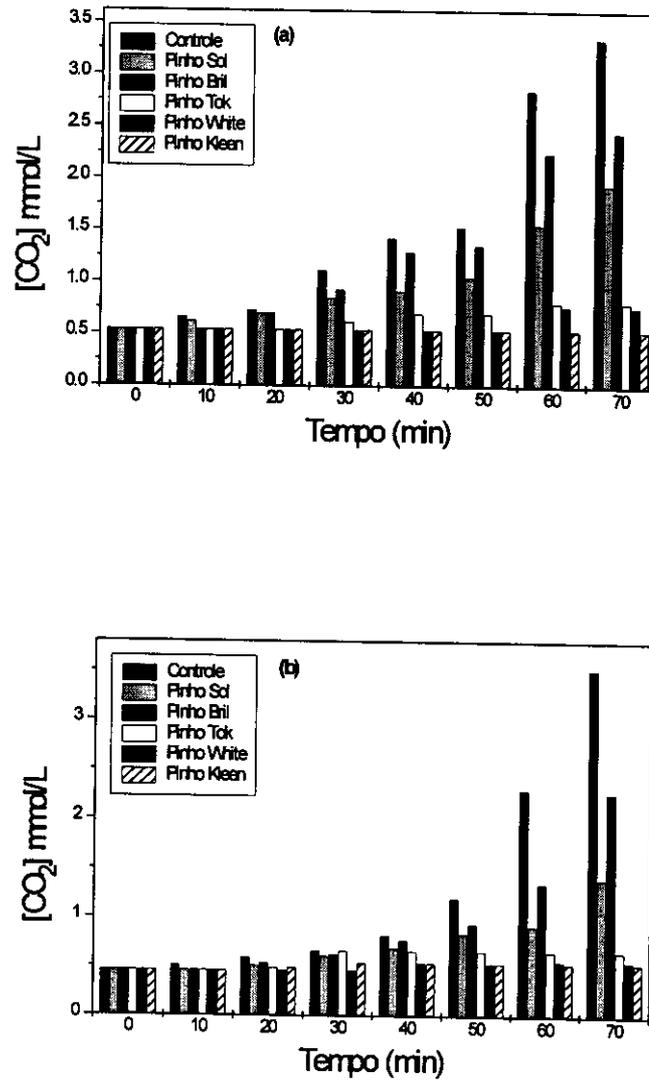


Figura 19- Inibição da atividade microbiana (*E.coli*) frente bactericidas de uso doméstico 0,2 % v/v (a) meio mínimo (b) caldo nutriente.

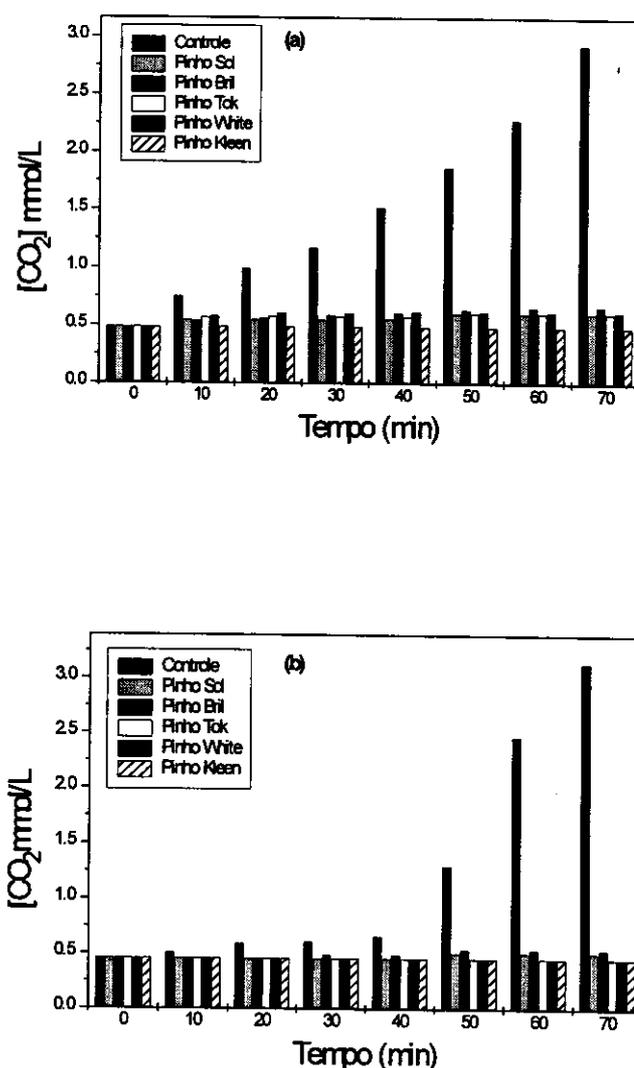


Figura 20- Inibição da atividade microbiana (*E. coli*) frente a bactericidas de uso doméstico 1 % v/v (a) Meio Mínimo (b) Caldo Nutriente.

Analisando-se qualitativamente as figuras, verifica-se que não existe diferença acentuada do comportamento bacteriano frente aos produtos testados. Observa-se também que no ensaio com 0,2 % destes bactericidas os produtos menos tóxicos foram o Pinho Sol e o Pinho Bril. No entanto, para concentração de 1% v/v o efeito tóxico destes é suficiente para inibir mais de 90% a atividade microbiana.

Estes resultados foram confirmados pelo plaqueamento da suspensão microbiana feito durante os testes com 0,2 % v/v dos produtos em meio mínimo .

O procedimento adotado para este experimento foi o seguinte: quando a concentração de CO₂ produzida pela bactéria *E. coli* no controle era de aproximadamente 2,0 mmol.L⁻¹, coletavam-se amostras de todos os frascos para plaqueamento da suspensão microbiana. Os resultados obtidos no plaqueamento, bem como as correspondentes frações de CO₂, encontram-se na tabela XXV. O coeficiente de correlação entre os dados de inibição obtidos pelos dois métodos foi 0,99. Estes dados também confirmam que nestas concentrações os compostos menos tóxicos são o Pinho Bril e o Pinho Sol

Tabela XXV - Comparação dos resultados obtidos por plaqueamento e FIA Condutométrico no ensaio com *E.coli* frente a 0,2 % v/v dos produtos testados ([CO₂] inicial 0,54 mmol.L⁻¹).

Produtos	Plaqueamento		FIA-condutimétrico	
	(x10 ⁶) ufc	% Inibição	[CO ₂] (mmol.L ⁻¹)	% Inibição
Controle	157		1.46	
P. Bril	118	24,8	1.21	17,1
P.Sol	64	59,2	0,49	51,3
P. White	8	94,7	0,21	85,6
P. Tok	4	97,4	0,12	91,8
P. Kleen	1	99,4	0,00	100,0

O comportamento das espécies frente aos desinfetantes testados mostrou a seguinte ordem em termos de sensibilidade *Enterococcus faecalis* > *Staphilococcus aureus* > *Escherichia coli* > *Salmonella choleraesuis* para a maioria dos compostos testados.

Na avaliação da toxicidade dos desinfetantes de uso doméstico com estas cepas observou-se que o o Pinho Bril foi o produto menos tóxico nas menores concentrações usadas.

Conclusões

A avaliação do desempenho de diversos desinfetantes de uso doméstico frente a *E. coli* demonstrou uma grande discrepância na toxicidade dos produtos Pinho Sol e Cândida. Para se observar uma inibição semelhante na respiração microbiana foi necessário adicionar um volume de Pinho Sol cerca de 400 vezes superior ao do produto Cândida.

Nos ensaios comparativos de toxicidade usando *E. coli* e *S. volutans* verificou-se que a discrepância em alguns resultados sugerem que este tipo de teste deve ser feito com mais que um organismo.

Um fator relevante neste estudo foi a possibilidade de aplicação do método FIA-Conducométrico usando-se várias cepas de bactérias, mostrando deste modo a abrangência do procedimento proposto.

Quando se utilizou as cepas *Salmonella Choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, verificou-se que a diferença de sensibilidade confirma a necessidade de se usar mais que um organismo para avaliação destes produtos.

O comportamento dos desinfetantes no meio de cultura também deve ser considerado. Nesta pesquisa observou-se que os experimentos com *E. coli* usando Meio Mínimo e Caldo Nutriente não alteraram o comportamento bactericida dos compostos classificados como Pinhos. No entanto, a redução do poder bactericida do OCI^- (Cândida) neste meio, evidencia a necessidade de se avaliar o comportamento da espécie ativa no meio de cultura usado.

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, e considerando-se a diluição indicada para uso doméstico, conclui-se que todos os desinfetantes, testados pelo procedimento proposto, apresentaram bom desempenho como bactericidas.

Nestes ensaios, usando-se o meio de cultura incubado como ponto de partida do experimento, verificou-se que o tempo envolvido na realização de cada teste foi de aproximadamente uma hora.

O protocolo para execução destes testes pode ser esquematizado do seguinte modo:

- Incubar o Meio Mínimo ou Caldo Nutriente com a bactéria escolhida e monitorar a concentração de CO_2 liberada pela respiração microbiana até aproximadamente $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ (população próxima de $5,0 \times 10^7$ ufc/ml).
- Adicionar quantidades definidas do desinfetante no meio de cultura.
- Monitorar a concentração de CO_2 em intervalos de tempo definidos por aproximadamente 1 hora.
- Avaliar a porcentagem de inibição em relação ao controle.

A rapidez na execução dos testes destaca o método proposto em relação aos métodos oficiais. Deve-se considerar também que o custo de cada análise é bastante baixo uma vez que os reagentes utilizados, no sistema FIA-Conducométrico, são apenas H_2SO_4 diluído e água deionizada.

Apesar de ainda não ter sido feita uma calibração deste método com outros frequentemente utilizados ou aceitos como oficiais, na avaliação do desempenho de desinfetantes, os resultados aqui obtidos, demonstram que o mesmo pode ser considerado como uma alternativa, na avaliação do potencial tóxico de desinfetantes de uso doméstico e hospitalar.

Capítulo IV

Algumas aplicações do procedimento proposto.

Alguns produtos recentemente sintetizados foram avaliados a partir do procedimento proposto.

De um modo geral os compostos testados anteriormente como antibióticos, sais de metais e desinfetantes apresentaram alta solubilidade no meio de cultura. Para os compostos que apresentaram inicialmente baixa solubilidade utilizou-se o solvente DMSO (Dimetil Sulfóxido). Como este produto causa alterações nas proteínas e RNA das células microbianas, o mesmo volume foi adicionado também no controle.

Dentre os compostos testados encontram-se a Duartina (isoflavana), a Cabrevina (isoflavona), e compostos derivados de 3-aminopropano. Estes compostos foram sintetizados no IQ-UNICAMP.

Foi testado também a atividade antimicrobiana de extratos de própolis obtidos de diferentes origens.

Avaliação da atividade antimicrobiana da Cabrevina e Duartina.

Nos ensaios com Cabrevina e Duartina foram testadas as concentrações de 4, 8, 32 e 64 mg/l de cada composto. As massas correspondentes a cada concentração foram solubilizadas em 0,5 ml de DMSO. Estes compostos apresentaram baixa toxicidade pois em 90 minutos de ensaio observou-se apenas cerca 10 % de inibição da respiração microbiana para adição de 64 mg/L.

Avaliação antimicrobiana de compostos com atividade tripanocida.

Um grupo de pesquisa formado por professores, alunos e pesquisadores do IQ-UNICAMP, IB-UNICAMP e FIOCRUZ (RJ) têm avaliado a atividade biológica de compostos derivados de 3-aminopropeno com fórmula geral estrutural 1 (figura 21) Estes compostos possuem atividade tripanocida e foram sintetizados no IQ-UNICAMP.

A pesquisa com estes compostos envolve estudos de citotoxicidade, genotoxicidade, avaliação da atividade tripanocida, atividade inibitória de compostos tripanocidas sobre enzimas de tripanossoma e propriedades físico-químicas destes compostos em sua interação com enzimas.

Informações sobre a toxicidade tanto a nível celular (citotoxicidade e toxicidade aguda) como atividade tripanocida, são importantes no desenvolvimento de novos antichagásicos.

Com o objetivo de obter informações sobre a ação destes compostos a nível de membrana, foram feitos testes de toxicidade aguda, utilizando o sistema FIA-condutométrico, usando *E.coli* ATCC 25922 como organismo teste. Os resultados destes

testes encontram-se na tabela XXVI onde se observa que o composto menos tóxico foi o cloro derivado.

As concentrações que proporcionaram inibição do crescimento bacteriano foram usadas como referência para estudos de citotoxicidade. Estes estudos geralmente são realizados com células, V79 fibroblásticas, de hamster chinês e são bastante laboriosos e lentos. Os compostos testados apresentaram potenciais de citotoxicidade na mesma ordem de toxicidade obtida para *E. coli* ($R-CH_3 > R-NO_2 > R-OMe > R-H > R-Cl$).

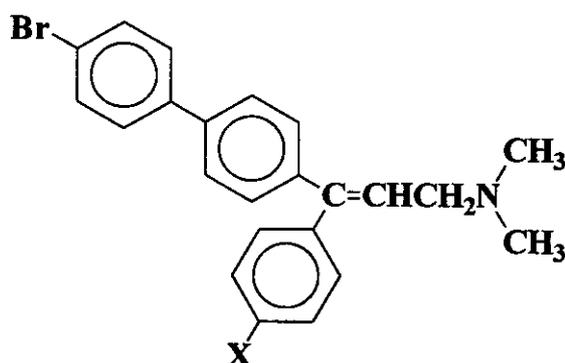


Figura 21- Fórmula estrutural geral dos compostos testados ($X = Cl, H, OCH_3, NO_2, CH_3$)

Tabela XXVI- Inibição da respiração microbiana (*E. coli*) frente aos compostos R(a ~ e).

Composto	EC _{50/60min} (μ molar)
a) R-Cl	49,2
b) R-H	12,8
c) R-OMe	10,7
d) R-NO ₂	5,7
e) R-CH ₃	4,4

A atividade tripanocida dos compostos R(a ~ e) foi avaliada para as três formas do ciclo de vida do parasita *T. cruzi*, amastigota epimastigota e tripomastigota. Os resultados mostraram, através de ID₅₀ (Dose que inibe 50 % de crescimento do parasita), que os compostos R(a ~ e) são mais ativos contra *T. cruzi* que o Nitrofurtoximox, droga atualmente em uso contra a doença de Chagas. A menor toxicidade para o Nitrofurtoximox foi também observada previamente nos testes de toxicidade aguda usando *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. Nestes testes observou-se que esta droga

apresentou inibição inferior a 20 % para estas duas espécies, mesmo quando testada nas maiores concentrações usadas para os compostos R(a ~ e).

Como se observa, o teste de toxicidade aguda, aqui proposto, é de grande valia, uma vez que a rapidez na execução deste é de fundamental importância, não só na avaliação do potencial tóxico de novas drogas como também na aplicação como teste guia para execução de outros ensaios como foi demonstrado.

Atividade antimicrobiana de extratos de própolis.

A própolis é um material resinoso, coletado pelas abelhas, de brotos, flores e exudatos de plantas. Possui inúmeras propriedades biológicas como por exemplo, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiúlcera, imunoestimuladora, hipotensiva e citostática.

Sua composição química é bastante complexa. Os compostos fenólicos constituem mais de 50 % de sua composição e estão provavelmente relacionados a uma parte substancial da sua atividade biológica. Os principais constituintes da própolis se encontram distribuídos nas seguintes classes de compostos: ácidos aromáticos e seus ésteres, alcoois e aldeídos, chalconas e diidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavanóis, diidroflavanóis, cetonas, hidrocarbonetos, terpenóides, vitaminas, elementos minerais, aminoácidos e polissacarídeos (Marcucci, 1994).

Com objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de própolis foram feitos ensaios de toxicidade aguda, utilizando o sistema FIA condutométrico. As etapas que envolveram coleta e extração foram feitas por pesquisadores do IQ- UNICAMP e IQ-USP.

As amostras de própolis utilizadas nos ensaios foram coletadas quatro de diferentes origens. A amostra 1 foi coletada de reflorestamento de eucalipto (Rio Claro, SP.), a amostra 2 de floresta nativa, (Prudentópolis, PR.), a amostra 3 de plantação de cajú (Pacajús, CE) e a amostra 4 de plantações de laranja e cana (Limeira, SP).

Foram obtidos extratos etanólicos destas amostras. O solvente foi evaporado e obtido o extrato para posteriores ensaios de toxicidade.

Nestes ensaios 15 mg/L de cada uma das amostras foram adicionados a um meio de cultura contendo a bactéria *E. coli* (linhagem ATCC 25922).

Os resultados apresentados na tabela XXVII indicam a diferença de inibição da respiração microbiana proporcionada pelos diferentes extratos.

Tabela XXVII- Comparação entre as porcentagens de inibição das amostras (15 mg/L) de própolis após 120 minutos de ensaio.

Amostra de própolis	% de inibição relativa ao controle
1	86,8
2	78,1
3	55,8
4	58,0

Deste modo verifica-se que a aplicabilidade do método é bastante ampla uma vez que outros extratos naturais podem também ser testados em tempo restrito.

Conclusões

Os testes com compostos de atividade antichagásicas mostraram que o procedimento proposto facilitou a avaliação do potencial destes produtos. A partir dos experimentos verificou-se que a rapidez na execução deste ensaio é de fundamental importância na atuação como teste guia para execução de outros ensaios.

A aplicabilidade deste teste de toxicidade aguda foi também evidenciada nos ensaios com extratos de própolis mostrando deste modo que existe a possibilidade do uso deste na avaliação do potencial tóxico de outros extratos naturais.

Conclusões gerais

O procedimento proposto mostrou ser de grande valia principalmente devido à redução do tempo envolvido nas provas de sensibilidade aos antibióticos e nos ensaios de avaliação do potencial tóxico de metais e desinfetantes de uso doméstico e hospitalar. Para ensaios de sensibilidade aos antibióticos os resultados obtidos foram comparáveis àqueles obtidos através de procedimentos clássicos tais como difusão em ágar e pela técnica MS-2

Na elaboração de antibiograma comparou-se o procedimento proposto com o de difusão em ágar e verificou-se que houve redução de tempo de cerca de 28 horas para aproximadamente 8 horas, demonstrando portanto a rapidez na execução deste. De acordo com levantamento realizado por funcionários do laboratório de microbiologia do HC-UNICAMP, atualmente o custo de cada antibiograma é cerca de R\$ 4,0. Para os pacientes que utilizam laboratórios particulares, o preço do antibiograma é geralmente o dobro deste valor. Pelo procedimento proposto aqui proposto, a redução do valor acima citado foi de aproximadamente 70 % para os antibióticos Ampicilina, Amicacina, Cefalotina, Cefazolina, Tetraciclina e Cloranfenicol. Para os antibióticos Tobramicina e Gentamicina a redução foi de aproximadamente 20 % deste valor. No entanto, outros estudos podem ser conduzidos no sentido de otimizar o sistema minimizando o volume de meio de cultura usado em cada ensaio reduzindo deste modo a quantidade de antibiótico e conseqüentemente o custo do antibiograma.

A rapidez na execução dos ensaios com metais frente à *E. coli* também mostrou que o uso deste procedimento será de grande utilidade não só na avaliação do potencial tóxico destes elementos, mas também na avaliação de diferentes efluentes que aportam nos ambientes aquáticos. Abre-se aqui a possibilidade de se explorar este procedimento dentro da ecotoxicologia, aprimorando o manejo de ecossistemas aquáticos e aumentando o banco de dados a respeito da resposta biológica frente aos mais variados tipo de agentes estressantes.

Do mesmo modo, observou-se também a validade da aplicação deste procedimento nos ensaios com bactericidas de uso doméstico. Através destes ensaios, observou-se que o procedimento desenvolvido nesta pesquisa pode ser padronizado utilizando-se também outras bactérias, como por exemplo, *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. choleraesuis*. A possibilidade da padronização do procedimento com outras bactérias mostra que a avaliação do potencial tóxico dos desinfetantes ou mesmo de outros compostos torna-se ainda mais abrangente.

A aplicabilidade do método na avaliação do potencial bactericida ou bacteriostático de extratos naturais, como por exemplo a própolis, bem como de compostos recentemente sintetizados, mostrou também que o procedimento proposto pode ser empregado na avaliação de novas drogas, sendo pois uma ferramenta muito útil dentro da fitoquímica.

Devido à similaridade do metabolismo da *E. coli* e de outros coliformes, tais como *Aerobacter aerogenes* e *Escherichia freundii*, acredita-se que estas espécies também possam ser utilizadas com o mesmo procedimento. A importância do emprego destas está relacionada ao seu *habitat*. As bactérias *Aerobacter aerogenes* encontram-se nos vegetais enquanto que as *Escherichia freundii* encontram-se nos solos. Portanto, pesquisas envolvendo toxicidade de pesticidas fungicidas e acaricidas poderiam utilizar o método como auxiliar na avaliação do potencial tóxico destes compostos frente estas bactérias, para posterior estudo destes praguicidas frente a outros organismos.

Assim, através dos ensaios realizados no presente trabalho, bem como da possibilidade de aplicação do procedimento utilizando outras espécies de bactérias, conclui-se que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados. Finalmente, é importante salientar que o procedimento proposto contribuiu para abertura de um novo campo de trabalho, principalmente na área de toxicologia.

Referências:

- Alsop G.M.; Waggy G.T.; Conway, R.A. (1980) Bacterial inhibition test. J. Water Pollut Control Fed. 52, 2452-2456.
- Anderson, A.C.; Abdelghani, A.A. (1980) Toxicity of selected arsenical compounds in short term bacterial bioassays. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 24, 289-294.
- Andrade, N.J.; Serrano, A.M. (1993) Use of *Bacillus subtilis* spores to calculate the efficiency of sodium hypochlorite concentration an pH values. Rev. Microbiol., São Paulo, 24 (1) 26-32.
- Arbuckle, B.W.; Alleman, J.E. (1992) Effluent toxicity testing using nitrifiers and Microtox. Water Environ. Res., 64 (3) 263-267.
- Azevedo, J.L.; Costa, S.O.P. Meios de Cultura em Exercícios Práticos de Genética. Editora da USP. São Paulo, 1973.
- Babich, H.; Stotzky, G. (1979) Differential toxicities of mercury to bacteria and bacteriophages in sea water and lake wate. Can. J. Microbiol. 25, 1253-1257.
- Babich, H.; Stotzky, G. (1986) Enviromental factors that affect the utility of microbial assays for the toxicity and mutagenicity of chemical pollutants. In: Bitton G., Dutka, B.J. (eds) Toxicity testing using microoganisms. CRC Press, Boca Raton, Fl, Vol II, pp 10-41.
- Barkay, T. (1987) Adaptation of aquatic microbial communities to Hg stress. Appl. Environ. Microbiol. 53 (12) 2725-2732.
- Barkay, T.; Liebert, C. ; Gillman, M. (1989) Environmental significance of the potential for mer (Tn 21) - mediated reducyion of Hg to Hg in waters. Appl. Environ. Microbiol. 55 (5) 1196-1202.
- Barry, A.L.; Thornsberry, C. Susceptibility Testes: Diffusion Test Procedures chapter 102 in Manual of Clinical Microbiology. Fourth ediuton. Lenette, E.H.; Ballows, A.;

- Hausler, J.H.; Shadomy, H. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985. Copyright 1970.
- Basset, J.; Denney, R.C.; Jeffery, G.H. Mendham, J Capítulo X, 125 em *Análise Inorgânica Quantitativa Vogel*. 4ª edição. Editora Guanabara Dois S. A. Rio de Janeiro-RJ (1981).
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Tenckhoff, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. Clin. Path.* 45:493-496.
- Bier, O. Capítulo 24 em *Microbiologia e Imunologia*, 24ª edição. Companhia Melhoramentos São Paulo, São Paulo, 1985.
- Bitton, G.; Dutka, B.J. (1986) Introduction and review of microbial and biomedical toxicity screening procedures. In: Bitton G.; Dutka B.J. (eds) *Toxicity testing using microorganisms*. Vol I CRC Press, Boca Raton, FL, pp1-8.
- Bitton, G.; Koopman, B. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (vol 125), Springer-Verlag, New York, 1992.
- Bitton, G.; Koopman, B.; Wang, H. (1984) Baker's yeast assay procedure for testing heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 80-84.
- Bloomfield, S.F.; Arthur, M.; Looney, E.; Begun, K.; Patel, H. (1991) Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension methods. *Lett. in Appl. Microbiol.*, 13: 233-237.
- Bloomfield, S.F.; Looney, E. (1992) Evaluation of repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. *Journal of Applied Bacteriology*, 73:86-93.

- Blum, D.J.; Speece, R.E. (1991) A data base of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. Res. J.WPCF (63) 198-207.
- Brock, T.D. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1974.
- Brower, H. (1991) Testing for chemical toxicity using bacteria. J. Chem Educ. 68(8) 695-696.
- Bulich, A.A. Microtox - A bacterial toxicity test with several applications. In: Liu, L.; Dutka, B.J. eds. Toxicity screening procedures using bacterial systems. New York, Marcel Dekker, 1984 p. 55-64.
- Cabral, J.P.S. (1992) Starved *Pseudomonas syringae* cells release strong Cu complex compounds. Chem. Speci. Bioaval. 43 (3) 105-107.
- Castro, M.D.L. (1986) Speciation studies by flow injection analysis. Talanta 33(1) 45-50.
- CETESB, Bioensaios Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais. Série Didática, São Paulo, outubro, 1992.
- CETESB, Implementação de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos. Série de Manuais. 17 p., 1991.
- CETESB, Procedimentos para Utilização de testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos. Série de Manuais. 17 p., 1990.
- Codina, J.C.; Pérez-García, A.; Romero, P.; Vicent, A. (1993) A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 25, 250-254.
- Coleman, R.N.; Quereshi, A.A. (1985) Microtox and *Spirillum volutans* testes for assessing toxicity of environmental samples. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35: 443-441.

- Corrêa, I.; Hofling, J.F. (1989) Avaliação da ação antimicrobiana de dois desinfetantes hospitalares. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 20(4) 402-410.
- Decool, A.; Goury, V.; Tybi, A.; Gibaud, S.; Vicente, F.; Darbord, J.C.(1991) Detection of bacterial adenosine triphosphate through bioluminescence, applied to a rapid sterily test of injectable preparation. *Anal. Chim. Acta* 255, 423-425.
- Dive, D.; Robert, S.; Angrand, E.; Bel, C.; Bonnemain, L.B.; Demarque, Y.; Le Du, A.; El Bouhouti, R.; Fourmaux, M.N.; Guery, L.; Hanssens, O.; Murat, M. (1989) A bioassay using the measurement of ciliate protozoan: *Colpidium campylum* Stokes. *Hidrobiol.* 188/189, 181-188.
- Dorward, E.J.; Barisas, B.G. (1984) Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. *Environ. Sci. Technol.* 18(2) 967-972.
- Dutka, B.J.; Nyholm, N.; Ptersen, J. (1983) Comparison of several microbiological toxicity sceening tests. *Water Res.* 17(10) 1363-1368.
- Florence, T.M.(1986) Electrochemical approaches to trace element speciation in waters a review. *Analyst* 111, 489-505.
- Gélinas, P.; Goulet, J. (1982) Heat and light stability of sanitizers. *J. Fd. Prot.* 45(13) 1195-1196.
- Goldschmidt, M.C. Instrumental , automatozación y miniaturización, Capítulo 74 in: *Metodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico.* 8 edición. Sonnenwirth, A.C.; Jarrete, L.; Gradwohls, M.D. St louis Toronto. London 1980. Copyrigh 1980.
- Guimarães, J.R.; Jardim, W.F. (1993) Estudo comparativo da toxidez aguda de combustíveis automotivos utilizando *E. coli*. *Química Nova*, 61(1), 28-31.
- Guimarães, J.R. (1990) Tese de Mestrado. Determinação do Dióxido de Carbono por FIA: Aplicação em Testes de Toxicidade IQ-UNICAMP.

- Hoff, J.C.; Geldreich, E.E. (1981) Comparison of the biocidal efficiency of alternative disinfectants. *J. Amer. Water Works Assn.*, 73(1) 40-44.
- Hoffman, G.R. (1982) Mutagenicity testing in environmental toxicology. *Environ. Sci. Technol.*, 16 (10) 560-574.
- Izaki, k. (1977) Enzymatic reduction of mercurous ions in *Escherichia coli* bearing R factor. *J. Bacteriol.* 131(2) 696-698.
- Jardim, W.F.; Guimarães, J.R.; Allen, H.E. (1991) Flow-injection conductimetry of dissolved inorganic carbon. *Ciencia e Cultura* (6) 454-456.
- Jardim, W.F.; Pasquini, C.; Guimarães, J.R.; Faria, L.C. (1990) Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: Monitoring CO₂ production by Flow Injection Analysis. *Wat. Res.* 24(3), 351-354.
- Jardim, W.F.; Pearson, H.W. (1984) A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria. *Water Res.* 18 (8) 985-989.
- Jardim, W.F.; Pearson, H.W. (1990) Technical note. Toxicity of cupric ions to microorganisms: effect of ATP concentration. *Chemical Spec. Bioaval.* 2(4) 155-156.
- Jones, R.N.; Barry, A.L.; Gavan, T.L.; Washington II, J.A. Susceptibility Testes: Microdilution and Macrodilution Broth Procedures Chapter 101 in: *Manual of Clinical Microbiology*. Fourth edition. Lennete, E.H.; Balows, A.; Hausler Jr. W.J.H.; Shadomy, H. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1985. Copyright 1970.
- Kasan, H.C. (1993) The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 23(1) 79-117.
- Kennicutt, M.C. (1980) ATP as indicator of toxicity. *Water Res.* 14, 225-228.
- Kerzman, G. (1992) Toxicity of first ten MEIC chemical in bacteria. *ATLA* 21,151-155.

- Kerzman, G. (1993) Of bacteria and men: Toxicity of 30 MEIC chemicals to bacteria and human ATLA 21, 233-238.
- Laddaga, R.; Silver, M.S. (1985) Cadmium Uptake in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 162 (3) 1101-1105.
- Larson, R.J.; Schaeffer, S.L. (1982) A rapid method for determining the toxicity of chemicals to activated sludge. Water Res. 16, 675-678.
- Leitão, M.F.F. (1984) Avaliação da atividade germicida e desempenho de desinfetantes usados na indústria de alimentos. Bol. SBCTA, Campinas, 18(1)1-16.
- Lee, S.; Suzuki, M.; Kumagai, M.; Ikeda, H.; Tamiya, E.; Karube, I. (1992) Bioluminescence detection system of mutagen using firefly luciferase genes introduced in *Escherichia coli* lysogenic strain.
- Liang, C.N.; Tabatabai M.A. (1978) Effects of trace elements on nitrification in soils. J. Environ. Qual. 7, 291-293.
- Liu, D. (1983) Resazurin reduction method for activated sludge process control. Environ. Sci. Technol. 17, 407-411.
- Lund, W. (1990) Speciation analysis - why and how? Fresenius J. Chem. 337, 557-564.
- Manual Difco, Meios de cultivo Desidratados y Reactivos, 10ª edição, Difco Laboratories, Detroit Michigan USA, 1984.
- Manual de Saneantes, Fundação Oswaldo Cruz (1992). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Métodos para análise microbiológica de saneantes com ação antimicrobiana. Capítulo X. Romão, C.M.C.A.; Miyazaki, N.T.H.; Mota, L.L.F. 46 p. (1992).
- Marcucci, M.C. (1994) Chemical composition, biological properties and pharmaceutical activity. Apidologie (no prelo).

- Martell, A.E. Smith R.M. Critical Stability Constants (vol. 3). Plenum Press, New York, 1976.
- Matsen, M.J. Pruebas de Susceptibility Antimicrobiana: Puebas del Laboratorio en Respaldo Tratamiento Antimicrobiano. Cap. 87 in Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico. Sonnenwirth, A.C.; Jarreti, L. 8 Edición. Gradwohls, M.D. The CV. Mosby Company. St. Louis Toronto. London 1980. Copyright 1980.
- Norma CETESB-L5228 , 12/1992. Teste de toxicidade aguda usando *Spirillum volutans*.
- Pasquini, C.; Faria, L.C. (1987) Flow- Injection determination of ammonia in Kjeldal digests by Gas Diffusion and Conductometry. Anal. Chim. Acta, 193: 19-27.
- Pelczar, M.; Reid, R.; Chan, E.C.S. Antibióticos e outros agentes quimioterápicos, capítulo 24: Microbiologia, volume 1. pag. 518-547, Mac Graw-Hill do Brasil, São Paulo (1980).
- Pelczar, M.; Reid, R.; Cham E.C.S. Controle por Agents Químicos, cap. 23: Microbiologia, vol. 1 pag. 494-516.
- Pérez-Garcia, A.; Codina, J.C.; Cazorla, F.M.; Vicente, A. (1993) Rapid respirometric toxicity test: sensitivity to metals. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50, 703-708.
- Ramamoorthy, S.; Kushner, D.J. (1975) Binding of mercury and others heavy metal ions by microbial growth media. Microb. Ecol. 2, 162-176
- Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. Chronic toxicity tests Chapter 1 in: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications Copyright 1985 Hemisphere Publishing Corporation. United States.
- Reteuna, C.; Vasseur, P.; Cabridenc, R. (1989). Performances of three bacterial assays in toxicity assessment. Hidrobiol. 188/189, 149-153.

- Ribo, J.M.; Yang, J.E.; Huang, P.M. (1989) Luminescent bacteria toxicity assay in the study of mercury speciation. *Hidrobiol* 188/189, 155-162.
- Richards, J.W. (1968) *Introduction to industrial sterilization*, Chapter 13: Chemical disinfection and detergency. 157-163 Academic Press, London and New York (1968).
- Ryan, K.S.; Schoenknecht, F.D.; Kirby, W.M.M. (1970) Disc sensitivity testing. *Hosp. Prac.* 5: 91-100.
- Sanches, S. P.; Paschoal, C.M.R.B.; Furlan, E.V.; Valente, g.v.; Sato M.I.Z. *Bioensaios microbianos aplicados no controle de contaminantes tóxicos ambientais*. Apostila CETESB, São Paulo ,1992.
- Sanches, S.P.; Sato, M.I.Z.; Paschoal, C.M.R.B.; Alves, M.N.; Furlan, E.V. (1988) Toxicity Assessment of industrial effluents from São Paulo state, Brasil, using short-term microbial assays. *Tox. Assess.*, 3:55-80.
- Schneider, S.; Schweisfurth (1991) Species and genera of enterobacteriaceae in river neckar and after river bank filtration and their resistance patterns to antibiotics and heavy metal salts. *Wat. Sci. Tech.* 24(2) 315-320.
- Simpson, D.L.; Kobos, R.K. (1982) Microbial assay of tetracycline with a potentiometric CO₂ gas sensor. *Anal. Lett.* 15: 1345-1359.
- Simpson, D.L.; Kobos, R.K. (1983) Potentiometric Microbiological assay of Gentamicin, Streptomycin and Neomycin with a carbon dioxide gas-sensing electrode. *Anal. Chem.* 55, 1974-1977.
- Stainer, R.Y.; Aldeberg, E.A.; Doudorff, M. *Crescimento e morte de bactérias*. Cap. 15: *Mundo dos Micróbios* Editora Edgard Blucher Ltda USP, São Paulo 1969.
- Shuttleworth, K.L.; Unz, R.F. (1991) Influence of metals and metal speciation on growth of filamentous bacteria. *Water. Res.* 25(10) 1177-1186.

- Thornsberry, C.; Hawking, T.M. Agar dilution susceptibility testing procedure PHS. Atlanta, 1977, Center of Disease Control.
- Timenetsky, J.; Alterthum, F. (1988) Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes domésticos. *Rev. Microbiol.*, 19:46-51.
- Tomulka, K.W.; Mcgree, D; Lange, J.H. (1993) Use of the bioluminescent bacterium *photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water. *Bull. Environ. Sci. Toxicol.*, 51, 538-544.
- Trevors, J.T. (1989) The role of microbial metal resistance and detoxification mechanisms environmental bioassay research. *Hidrobiol.*188/189, 143-147.
- Wu, D.S.S. (1990) Technical note. A respirometer for continuous, in situ, measurements of sediment oxygen demand. *Wat. res.* 24(3) 391-394.
- Ximenes, J.(1973) Importância da padronização de sensibilidade bacteriana (antibiograma) *A Folha Médica* 66, 574-578.
- Valent, G.U. (1990) Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do estado de São Paulo através do teste de Ames. Campinas SP. Tese de Doutorado 134 f. [S.n.], IB-UNICAMP.
- Zanon, V. (1975) Contrôles de infecções hospitalares. *Rev. Paul. Hosp.*, 23 (8) 351-360.
- Zanon, V.; Nogueira, M. (1973) valiação da atividade pseudomonicida dos desinfetantes hospitalares. *Rev. Paul. Hosp.*, 5:211-217.

APÉNDICE

Acute toxicity of Hg⁰ and Hg²⁺ ions to *Escherichia coli*

Wilson F. Jardim^{1,*}, Sonia M.N. Gimenez², Maria C. Canela and Sandra G. Moraes

¹ Instituto de Química, UNICAMP, CP 6154, 13081-970 Campinas (SP), Brazil

² Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, 86057-230 Londrina (PR), Brazil

Abstract

Acute toxicity tests using mercuric ions (Hg²⁺) at the concentration of 10 and 50 µg L⁻¹ were carried out using *Escherichia coli* as the organism test. Toxicity was evaluated by measuring the inhibition in the microbial respiration, at 37°C, within 60 min after the metal spike. It has been shown that mercuric ions are reduced to the much less toxic form of elemental mercury (Hg⁰) by the glucose, which is usually present in the microbial culture medium as a carbon source. Based on this evidence, inhibition in the microbial respiration caused by the presence of 5,000 µg L⁻¹ of Hg⁰ were predicted to be similar to the effect caused by 10 µg L⁻¹ of Hg²⁺ ions. This hypothesis has been proved to be true under the experimental conditions used in the bioassays.

Keywords: Mercury speciation, mercury toxicity, elemental mercury, *Escherichia coli* respiration.

Introduction

Ecological impacts associated with the anthropogenic uses of mercury compounds have been known for decades (UNESCO, 1989; Fitzgerald and Clarkson, 1991; Mitra, 1986). Presently, in most developed societies, mercury input into the environment is under strict control, and the major concern is now related to the recovery of areas impacted in the recent past.

In Brazil, the scenario concerning the use as well as the input of mercury into the environment, specially in the hydrological cycle, is quite different from that seen in many countries. Due to the growing activity of gold extraction (garimpos) in the last decade, the use of elemental mercury has reached the impressive figure of 130 tonnes per year and, according to Lacerda and Solomons (1991), about 1,000–2,000 tonnes of Hg have accumulated so far in the Amazon ecosystem.

In the 'garimpo' areas, elemental mercury is used to separate fine gold particles via amalgamation. The Au–Hg is then burned and mercury is lost to the atmosphere. According to the National Department of Mineral Production (DNPM), each kilogram of gold produced in this type of 'garimpo' corresponds to the emission of 1.7 kg of mercury to the environment, 60% to the atmosphere (by vaporisation) and the remaining 40%, as metallic mercury, is lost during the amalgamation directly into creeks (Martinelli *et al.*, 1988; Lacerda and Pfeiffer, 1992).

Assessing the real impact related to the use of mercury in the Amazon is in its early stage, since

many aspects concerning fundamental aspects of mercury chemistry in the aquatic system have not yet been fully studied. These aspects include adsorption onto particulate and metal mobility (sinks), rate of oxidation-reduction involving the pair Hg⁰/Hg²⁺, methylation and de-methylation rates in tropical environments, and comparative acute toxicity of Hg⁰ and Hg²⁺ species to the biota.

In this paper the acute toxicity of elemental mercury, Hg⁰, compared to that of mercuric ions, Hg²⁺ in aqueous culture medium are investigated. Toxicity was evaluated by measuring the inhibition in the bacterial respiration of *Escherichia coli* cultures. Some aspects of the reduction of Hg²⁺ ions to Hg⁰ due to the glucose present in the culture medium, and the possible consequences that it may bring to the final analysis of the toxicity test are also discussed.

Materials and Methods

Toxicity test

The procedure used to monitor the inhibition in the microbial respiration has been described in details by Jardim *et al.* (1990). The Flow Injection Analysis (FIA) method used to determine the CO₂ concentration in the aqueous culture medium was further discussed by Jardim *et al.* (1991), and a brief description of the experimental procedure is presented below.

The bacterial used in the respirometric acute toxicity test (*Escherichia coli*) was provided by Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello (CCT 0548), originally obtained from the

American Type Culture Collection (ATCC 25922). In the bioassay, the incubated culture medium was contaminated with 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} (as HgCl_2), or $5 \times 10^6 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 . The aqueous CO_2 produced due to the bacterial respiration and trapped in the medium was analysed by FIA with a conductometric detector. The *E. coli* culture medium was prepared by adding 20 g of glucose (D-glucose monohydrated), 7 g of K_2HPO_4 , 3 g of KH_2PO_4 , 1 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g of sodium citrate and 0.1 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ to 1 L of distilled water. The pH of the medium was adjusted to 7.20 using KOH 1M. All the experiments were conducted using a water bath at 37°C .

Determination of CO_2

A small volume (100 μL) of the sample containing the inorganic carbon species (CO_2 , HCO_3^- , and CO_3^{2-}) was injected into a carrier fluid of deionized, CO_2 -free water, which mixed with a diluted acid stream (0.2 mM H_2SO_4). The CO_2 gas formed in the medium diffused through a PTFE membrane towards another deionized water stream continuously flowing through a conductometric detector. The increase in the conductance is proportional to the total CO_2 concentration present in the sample.

In the experiments, the initial bacterial population was set at 8×10^8 cells mL^{-1} , corresponding to an initial concentration of dissolved CO_2 ranging from 0.40 to 0.45 mM under the experimental conditions described.

Mercury determination

Mercury was determined using the Cold Vapour Atomic Absorption (CVAA) technique adapted to FIA described elsewhere (Pasquini *et al.*, 1988). The limit of detection was $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ of mercury using 600 μL of sample at an analytical frequency of 60 samples h^{-1} . The system consists of two carriers containing 5% solution (v/v) of HNO_3 . The addition of a 10% (w/v) solution of SnCl_2 occurs in confluence to promote the reduction of Hg^{2+} ions to the elemental form. Differentiation of Hg^{2+} and Hg^0 species were obtained when the same sample was analysed with and without the reductant. The concentration of elemental mercury was obtained from the difference.

Results and Discussion

In bioassays using aquatic organism, the composition of the extracellular medium is responsible for a large number of processes that control the availability of stressing agent to the organism (Dodge and Theis, 1979; Nor, 1990). In the case of volatile weak acids and bases, pH is the master variable in the culture medium, and any change in this parameter reflects in the toxic response observed. For most metals, complexed and free species, as well as reduced and oxidised forms may present different toxicity to the same test organism. For instance, Babich and Stotzky (1979)

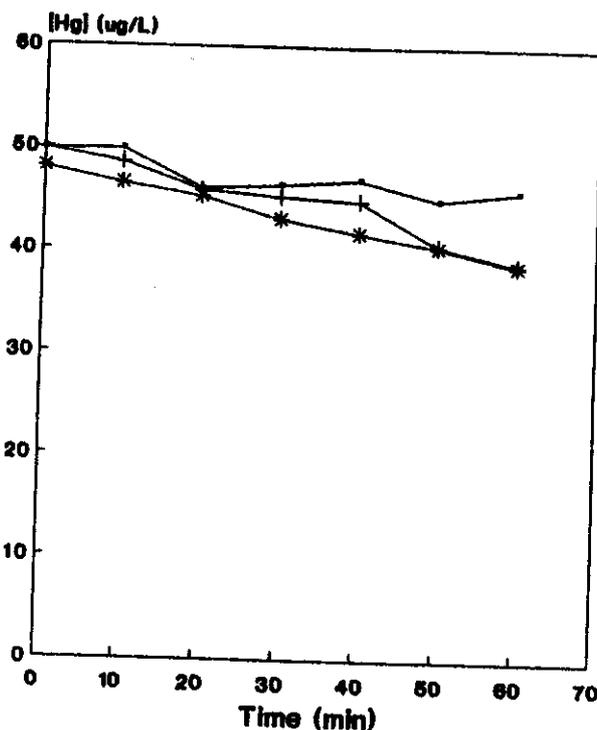


Figure 1 Variation in the concentration of total mercury ($[\text{Hg}^0] + [\text{Hg}^{2+}]$) as a function of time in the culture medium containing 2% (+) and 4% (*) glucose compared to the same medium with no glucose (·). Initial metal concentration of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ supplied as mercuric ions and at 37°C .

compared the toxicity of mercury to bacteria and bacteriophages in marine and fresh waters. Both organisms showed higher resistance to the metal in the presence of chloride when compared to low salinity waters, indicating that complexed species ($\text{HgCl}_3^-/\text{HgCl}_4^{2-}$) were much less toxic than Hg^{2+} ions.

The behaviour of Hg^{2+} species in the culture medium under the experimental conditions used in the bioassays is shown in Figure 1. It is important to mention that values plotted as a function of time refer to the total metal concentration, where $[\text{Hg}] = [\text{Hg}^0] + [\text{Hg}^{2+}]$. It can be seen that, when spiked with $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} ions, the total mercury concentration in the medium remains basically the same over 60 min in the absence of glucose. However, when in the presence of 2% and 4% of glucose, a slight decrease in total mercury concentration was observed in the same interval of time, reaching 38.7 and $38.6 \mu\text{g L}^{-1}$ respectively. In the sugar-free medium, this value was $45.9 \mu\text{g L}^{-1}$. This corresponds to an average loss of 22% in the glucose enriched medium compared to 10% observed in the absence of glucose.

Figure 2 shows the variation in the concentration of the Hg^0 species alone under the same experimental conditions. In the presence of 2% and 4% glucose, the concentration of Hg^0 increases in the first 15 min up to a maximum,

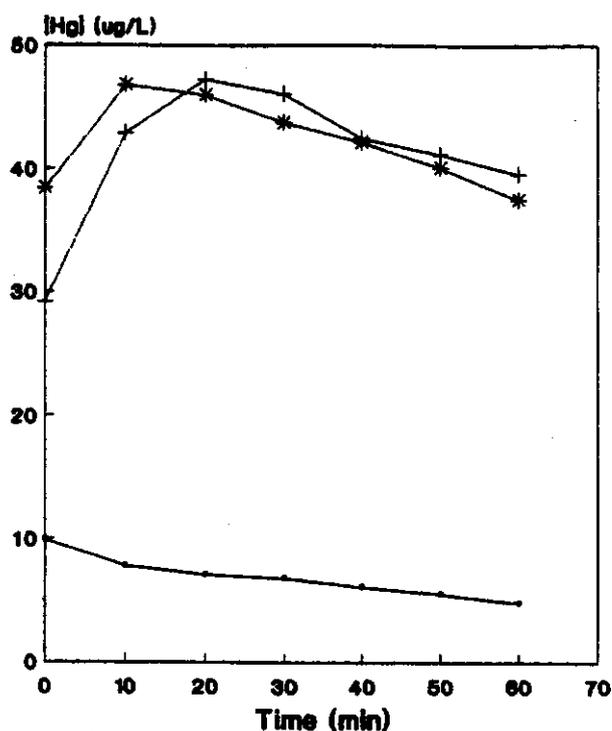


Figure 2 Variation in the concentration of elemental mercury (Hg^0) as a function of time in the culture medium containing 2% (+) and 4% (*) glucose compared to the same medium with no glucose (·). Other conditions as in Figure 1.

showing after this a steady decrease, reaching 38.6 and $37.5 \mu\text{g L}^{-1}$ respectively. This corresponds to an average loss of 24% of the initial concentration, most probably caused by volatilisation of metallic mercury favoured at 37°C , and formed due to the reduction of mercuric ions by the glucose present in the culture medium. As expected, in the absence of glucose, the concentration of Hg^0 is much lower, decreasing from 9.9 down to $4.8 \mu\text{g L}^{-1}$ during the length of the experiment. As expected, when citrate is used instead of glucose, the reduction of mercuric ions was largely inhibited.

Although the data discussed so far are of extreme importance to elucidate some key aspects of mercury aqueous chemistry and their correlated toxic effects on microbial communities, they were obtained in a bacterial-free culture medium. Since particulate matter (bacterial cell walls in this case) can act as strong adsorbent in aqueous medium, possible adsorption of both Hg^0 and Hg^{2+} , species onto the microbes were also investigated. The results obtained using $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} and $5,000 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 are presented in Table 1. Here, the values obtained as a function of time refers to the total concentration of mercury present in the culture medium. As can be seen, the concentration of total mercury present in the medium spiked with $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} decreases from 47.1 to $13.8 \mu\text{g L}^{-1}$ within 60 min, whereas in the presence of $5,000 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 , this variation was not so marked and

Table 1 Total mercury concentration present as dissolved form in the culture medium containing 8×10^8 cells mL^{-1} .

Time (min)	Hg^{2+} ($50 \mu\text{g L}^{-1}$)	Hg^0 ($5 \times 10^6 \mu\text{g L}^{-1}$)
0	47.1	8.4
20	42.0	7.2
40	26.4	8.4
60	13.8	10.3

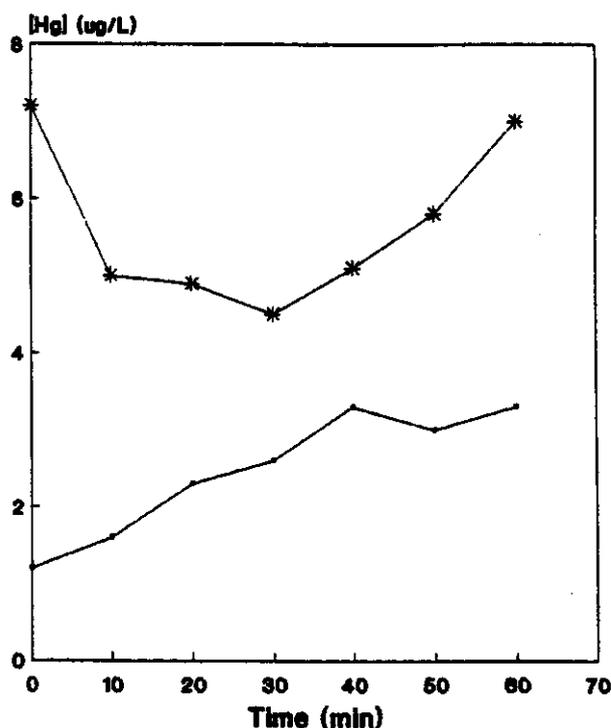


Figure 3 Variation in the concentration of Hg^0 (·) and Hg^{2+} (*) in the culture medium containing 2% glucose, in the presence of bacteria and contaminated with $5,000 \text{ mg L}^{-1}$ of Hg^0 .

the mercury concentration oscillated around $8 \mu\text{g L}^{-1}$ in the aqueous phase. Since mercury speciation was not carried out under these conditions, preferential adsorption of Hg^{2+} and Hg^0 onto *E. coli* cells could not be evaluated.

Another aspect of extreme importance observed in this study concerns the solubilisation followed by oxidation of mercury in the medium contaminated with $5,000 \mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 , as predicted by equations (1) and (2).

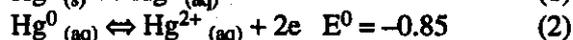


Figure 3 shows the variation in the concentration of both Hg^0 and Hg^{2+} species detected in the microbial culture medium containing bacteria as a function of time. As the concentration of Hg^0 increases from 1.2 to $3.3 \mu\text{g L}^{-1}$ due to the

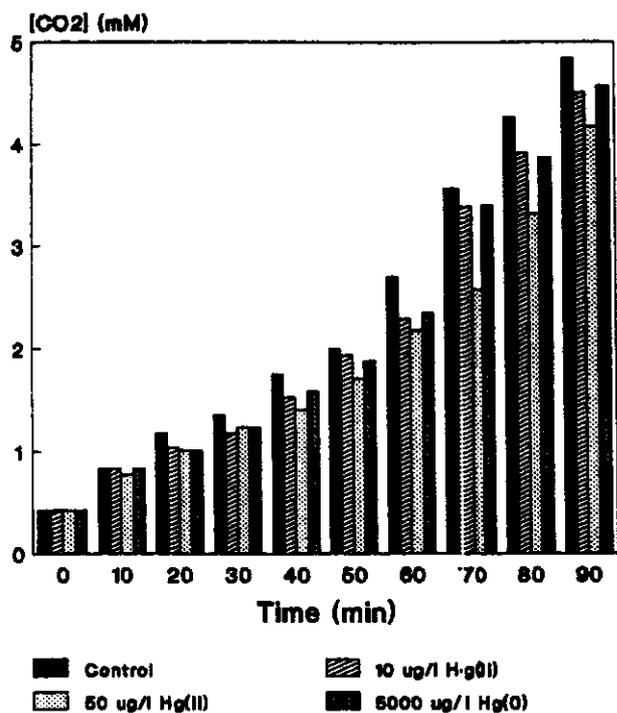


Figure 4 Inhibition in the respiration of *E. coli* cultures contaminated with 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} , and 5,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 compared to the control that received no mercury.

solubilisation of metallic mercury, the concentration of Hg^{2+} ions varies around the value of 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the same interval of time.

Based upon this data, if one assumes that mercuric ions are the major responsible for the inhibition in the respiration of *E. coli*, then the toxic effects observed using 5,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 should be equivalent to the effects observed in a solution containing approximately 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} . Indeed, hypothesis has been proved to be correct as shown in Figure 4.

Bacteria response to the stress caused by 10 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} compared to 5,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 are presented in Figure 4. As expected, the inhibition in the microbial respiration, compared to the control that received no spike of metal, is very similar to the one observed when in the presence of 10 ppb of mercury, but slightly lower than the one observed in the medium with 50 ppb of metal.

Conclusion

It has been shown that glucose ($E^0 = -0.72\text{ V}$), provided as the organic carbon source in microbial culture media is able to reduce Hg^{2+} ions to the much less deleterious elemental form (Hg^0). When citrate is used to replace glucose, no substantial reduction is observed.

Acute toxicity tests using *E. coli* show that the inhibition in the microbial respiration stressed with 5,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^0 were similar to that observed for 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Hg^{2+} after 60 min. This difference in the microbial response was predicted based upon

the aqueous chemistry of the Hg^{2+} species in the presence of glucose acting as reductant in the culture medium.

The reduction of the very toxic Hg^{2+} species to the much less deleterious form of the reduced metal, followed by losses from the culture medium due to volatilisation, poses a totally new situation compared to the initial conditions set in the bioassay, since the toxic species may no longer play an important role under this actual scenario. Consequently, the assessment of mercury impact in the environment, which is heavily subsidised by data from acute toxicity tests, may be much influenced by bias generated under experimental conditions similar to the ones described in this paper.

Acknowledgement

M.C. Canela is grateful to FAPESP for financial support (scholarship No. 91/4282-0).

References

- Babich, H. and Stotzky, G. 1979. Differential toxicities of mercury to bacteria and bacteriophages in sea and in lake water. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 1252–1257.
- Dodge, E.E. and Theis, T.L. 1979. Effect of chemical speciation on uptake of copper by *Chironomus tentans*. *Environ. Sci. Technol.*, **13**, 1287–1288.
- Fitzgerald, W.F. and Clarkson, T.W. 1991. Mercury and monomethylmercury: present and future concerned. *Environ. Health Perspec.*, **96**, 159–166.
- Jardim, W.F., Guimaraes, J.R. and Allen, H.E. 1991. Flow-injection conductimetry of dissolved inorganic carbon. *Ciência e Cultura*, **43**, 454–456.
- Jardim, W.F., Pasquini, C., Guimaraes, J.R. and Faria, L.C. 1989. Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: monitoring CO_2 production by flow injection analysis. *Water Res.*, **24**, 351–354.
- Lacerda, L.D. and Pfeiffer, W.C. 1992. Mercury from gold mining in the Amazon environment – an overview. *Química Nova*, **15**, 155–160.
- Lacerda, L.D. and Salomons, W. 1991. *Mercury in the Amazon: A Chemical Time Bomb?* Special Report, Dutch Ministry of Housing, Physical Planning and Environment.
- Martinelli, L.A., Ferreira, J.R., Forsberg, B.R. and Victoria, R.L. 1988. Mercury contamination in the Amazon: a gold rush consequence. *Ambio*, **17**, 252–254.
- Mitra, S. 1986. *Mercury in the Ecosystem*. Transtech Publications, Switzerland.
- Nor, M.N. 1990. Effects of organic ligands on toxicity of copper and zinc to *Carassius auratus*. *Chem. Speciat. Bioavail.*, **3**, 111–115.
- Pasquini, C., Jardim, W.F. and Faria, L.C. 1988. Adaptation of a cold vapour mercury analyser to flow injection analysis. *J. Automat. Chemistry*, **10**, 188–191.
- UNESCO. 1989. *Mercury – Environmental Aspects*. Environmental Health Criteria 86.

Errata

No artigo encontrado no apêndice considerar a seguinte correção:
onde se lê 5,000 µg/L substituir a unidade por mg/L.