

REGINA CORRÊA BRANDILEONE

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ADSORÇÃO DE <sup>mercurio(II)</sup>  $\text{Hg}^{2+}$  POR CÉLULAS VIVAS  
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE COM EMPREGO DE TRAÇADOR RADIOATIVO.  
MEDIDA DA ÁREA ESPECÍFICA DAS CÉLULAS.



Dissertação apresentada à Escola  
Politécnica da Universidade de  
São Paulo, para a obtenção do grau de  
" Mestre em Ciências "

Orientação

Dr. Walter Borzani

Dra. Marina Lia Ribeiro Vairo

A meus pais,

o meu reconhecimento pelo esforço e pelo  
afeto com que encaminharam a minha formação

Ao Anthony,

que dá um sentido especial ao meu trabalho

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Walter Borzani, Professor Titular do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pelo exemplo de dedicação e encorajamento constantes ao orientar essa Dissertação.

À Dra. Marina Lia Ribeiro Vairo, Assistente do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pela assistência cuidadosa a todo o planejamento e procedimento experimental.

Ao Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni, Superintendente do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, que tornou possível a execução do presente trabalho.

Ao Dr. José Carlos Barbério, Chefe do Serviço de Radiofarmácia do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, pelas sugestões, pela revisão do texto e por ter colocado à nossa disposição o equipamento da Cadeira de Metodologia e Aplicações de Radioisótopos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Fausto Walter de Lima, Diretor do Departamento de Radioquímica do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, pelas sugestões e por nos facilitar a fase de preparação do material a ser irradiado.

A bióloga Rosana Elda Gregori pelo auxílio prestado na parte experimental e na revisão do texto.

Aos colegas do Grupo Experimental de Bioquímica Industrial pelas discussões feitas durante os seminários.

Ao Centro de Processamento de Dados do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, em especial à matemática Priscila Goldenberg, pela programação em linguagem FORTRAN II das curvas experimentais de adsorção.

À Usina Itaipuara de Açúcar e Alcool S.A., pelo fornecimento do fermento necessário aos ensaios.

À Marilene Fernandes pelo cuidadoso serviço de datilografia e a Lauro Nakagami pela confecção dos desenhos dessa Dissertação.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Maria de Lourdes Guedes Dutra, Euclides Gomes de Lima, Benedito Cândido de Oliveira e Issami Nakamura Okano, pela prestimosa colaboração.

\*\*\*\*\*

## RESUMO

Estudou-se, com auxílio do  $^{203}\text{Hg}$ , a adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de Saccharomyces cerevisiae. Verificou-se a aplicabilidade da lei de Langmuir nas seguintes condições experimentais: temperatura = 0 a  $1^{\circ}\text{C}$ ; concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2 = 0,48$  a  $5,17$  mg/l; concentração de células =  $0,462$  a  $0,684$  g de matéria seca por litro. A partir das equações obtidas, pode-se calcular a área específica das células vivas, bem como o número de centros de fixação de  $\text{Hg}^{2+}$  por unidade de massa de células. Parece haver correlação entre o número de centros de fixação dos íons  $\text{Hg}^{2+}$  e o número de pontos de penetração de glicose nas células vivas.

\*\*\*\*\*

## ABSTRACT

It has been studied the  $\text{Hg}^{2+}$  adsorption by the live cells of Saccharomyces cerevisiae using a radioactive tracer,  $^{203}\text{Hg}$ . The Langmuir's law was obeyed, when the following experimental conditions were established: temperature = 0 to  $1^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{HgCl}_2$  concentration = 0,48 to 5,17 mg/l; cell concentration (as dry matter) = 0,462 to 0,694 g/l. The specific cell surface and the number of  $\text{Hg}^{2+}$  adsorption sites per unit mass of the live cells can be evaluated by this method. It seems to exist a correlation between the number of  $\text{Hg}^{2+}$  adsorption sites and the number of glucose penetration sites in the live cells.

\*\*\*\*\*

## INDICE

	página
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
ETAPAS DO TRABALHO .....	7
MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
A. MATERIAIS USADOS NO TRABALHO EXPERIMENTAL .....	8
1. Levedura .....	8
2. Cloreto de Mercúrio II .....	8
3. Equipamento Especial .....	8
4. Material de Vidro .....	9
B. MÉTODOS UTILIZADOS NAS DIVERSAS FASES DO TRABALHO ...	9
1. Preparo da Levedura .....	9
a. Descascamento .....	9
b. Desagregação e Lavagem .....	9
2. Determinação da Umidade do Fermento Lavado .....	10
3. Determinação da Percentagem de Células Mortas no Fermento Lavado .....	10
4. Preparo do Cloreto de Mercúrio II com Traçador Ra- dioativo $^{203}\text{Hg}$ .....	11
a. Obtenção do Traçador Radioativo $^{203}\text{Hg}$ .....	11
b. Medida de Atividade das Amostras .....	12
c. Descontaminação do Material de Vidro .....	13
5. Verificação da Morte de Células pela Ação do Mercú- rio .....	13
a. Preparo das Suspensões de Células .....	13
b. Preparo das Soluções de $\text{HgCl}_2$ .....	13
c. Preparo das Suspensões Contendo Leveduras e $\text{HgCl}_2$ .....	14

	página
d. Amostragem .....	15
e. Medida da Concentração de Células Viáveis .....	15
6. Determinação do Tempo de Contato entre Células e $^{203}\text{HgCl}_2$ para Atingir o Equilíbrio de Adsorção...	15
a. Equilíbrio de Adsorção .....	15
b. Preparo da Suspensão Contendo Células e $^{203}\text{HgCl}_2$ .....	16
c. Amostragem .....	16
d. Temperatura Durante os Ensaios .....	17
7. Experiências Para Observar a Relação Entre a Morte de Células e o Tempo de Contato com $^{203}\text{HgCl}_2$ .....	17
8. Ensaios de Adsorção .....	18
a. Preparo das Suspensões Contendo Células e $^{203}\text{HgCl}_2$ .....	18
b. Amostragem .....	19
c. Verificação da Aplicabilidade da Lei de Langmuir .....	19
d. Curva Completa de Adsorção .....	19
9. Adsorção de $^{203}\text{HgCl}_2$ e Penetração de Glicose nas Células .....	20
a. Preparo das Suspensões .....	20
b. Amostragem .....	20
c. Dosagem de Glicose .....	21
 RESULTADOS .....	 22
A. UNIDADE DO FERMENTO LAVADO .....	22
B. PERCENTAGEM DE CÉLULAS MORTAS NO FERMENTO LAVADO PELO MÉTODO DE FINK-KUHLES .....	23
C. MORTE DE CÉLULAS POR AÇÃO DO MERCÚRIO .....	23
D. TEMPO DE CONTATO ENTRE CÉLULAS E $^{203}\text{HgCl}_2$ PARA ESTABELECER O EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO .....	30
1. Experiências à Temperatura de $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ ...	30
2. Experiência à Temperatura de $(20,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ ...	38
3. Experiências Realizadas em Banho de Gelo .....	38



	página
E. RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE CONTATO COM $^{203}\text{HgCl}_2$ E MORTE DE CÉLULAS .....	41
F. EXPERIÊNCIA DE ADSORÇÃO .....	52
1. Curvas de Adsorção e Aplicabilidade da Lei de Langmuir .....	52
2. Curva Completa de Adsorção .....	52
G. ADSORÇÃO DE MERCÚRIO E PENETRAÇÃO DE GLICOSE NAS CÉLULAS .....	83
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	85
CONCLUSÕES .....	91
ASSUNTOS A PESQUISAR .....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96
APÊNDICE .....	100
A. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE FINK-KÜHLER PARA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS MORTAS NO FERMENTO .....	100
B. DETERMINAÇÃO DA RETA DE CALIBRAÇÃO DO ANALISADOR MONOCANAL PARA O $^{203}\text{Hg}$ .....	100
C. REAGENTES USADOS NO MÉTODO DE SOMOGYI PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE .....	102
D. MEDIDAS DO Nº DE CÉLULAS POR GRAMA DE LEVEDURA SECA .....	103

## INTRODUÇÃO

O estudo da cinética de processos microbianos, de reconhecida importância, tanto do ponto de vista fundamental como do ponto de vista de suas aplicações práticas, vem sendo objeto de muitos trabalhos, experimentais e teóricos.

Não cabe, nesta Dissertação, uma revisão completa do assunto, mas não deixa de ser útil, para que se possa ter uma idéia das técnicas e dos modelos adotados, examinar alguns trabalhos entre os muitos publicados<sup>(1 a 3)</sup>.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo vem procurando, nestes últimos 15 anos, introduzir um novo parâmetro no estudo da cinética de processos microbianos, qual seja, a área específica do microrganismo, definida pela relação entre a área de superfície de parede celular de uma dada massa de células e essa massa.

Justifica-se, "a priori", a escolha desse novo parâmetro, se levarmos em conta que os fenômenos de troca entre microrganismo e meio se realizam através da parede celular.

Os resultados obtidos nos trabalhos realizados naquele laboratório<sup>(4 a 16)</sup> podem ser assim resumidos:

1. A adsorção de corantes por células mortas obedece às leis de *Freundlich* e de *Langmuir*.
2. É possível medir a área específica de células mortas, bem como a percentagem de células mortas existentes em

uma dada cultura, pela medida da massa de corante adsorvido por uma massa conhecida de células.

3. A adsorção de corantes por células vivas obedece apenas formalmente à lei de *Langmuir*, o que não permite calcular a área específica do microrganismo vivo.

Esses resultados merecem alguns comentários adicionais, para que se possa compreender claramente o presente trabalho.

Considere-se uma suspensão de um dado microrganismo com uma concentração  $X$  de células (geralmente expressa em gramas de matéria seca por litro). Adicione-se, a essa suspensão, uma quantidade conhecida de um dado corante de maneira a produzir, na suspensão, uma concentração de corante igual a  $C_i$ . Mantenha-se a mistura em agitação até que se estabeleça o equilíbrio de adsorção e meça-se a concentração de corante não adsorvido: seja  $C_f$  este valor.

A relação  $(C_i - C_f)/X$ , fixadas as demais condições experimentais, é função da concentração de corante no equilíbrio, segundo mostra a curva indicada na Figura 1<sup>(16)</sup>. No intervalo OM (Figura 1), tudo indica que a adsorção se realiza na forma de camada monomolecular, sendo obedecidas as leis de *Freundlich* (equação "1") e de *Langmuir* (equação "2"):

$$\frac{C_i - C_f}{X} = k \cdot C_f^n \quad "1"$$

$$\frac{C_i - C_f}{X} = \frac{a \cdot C_f}{1 + b C_f} \quad "2"$$

sendo  $k$ ,  $n$ ,  $a$  e  $b$  coeficientes experimentais que devem obedecer às seguintes condições:

$$\begin{aligned} k &> 0 \\ 0 &< n < 1 \\ a &> 0 \\ b &> 0 \end{aligned}$$

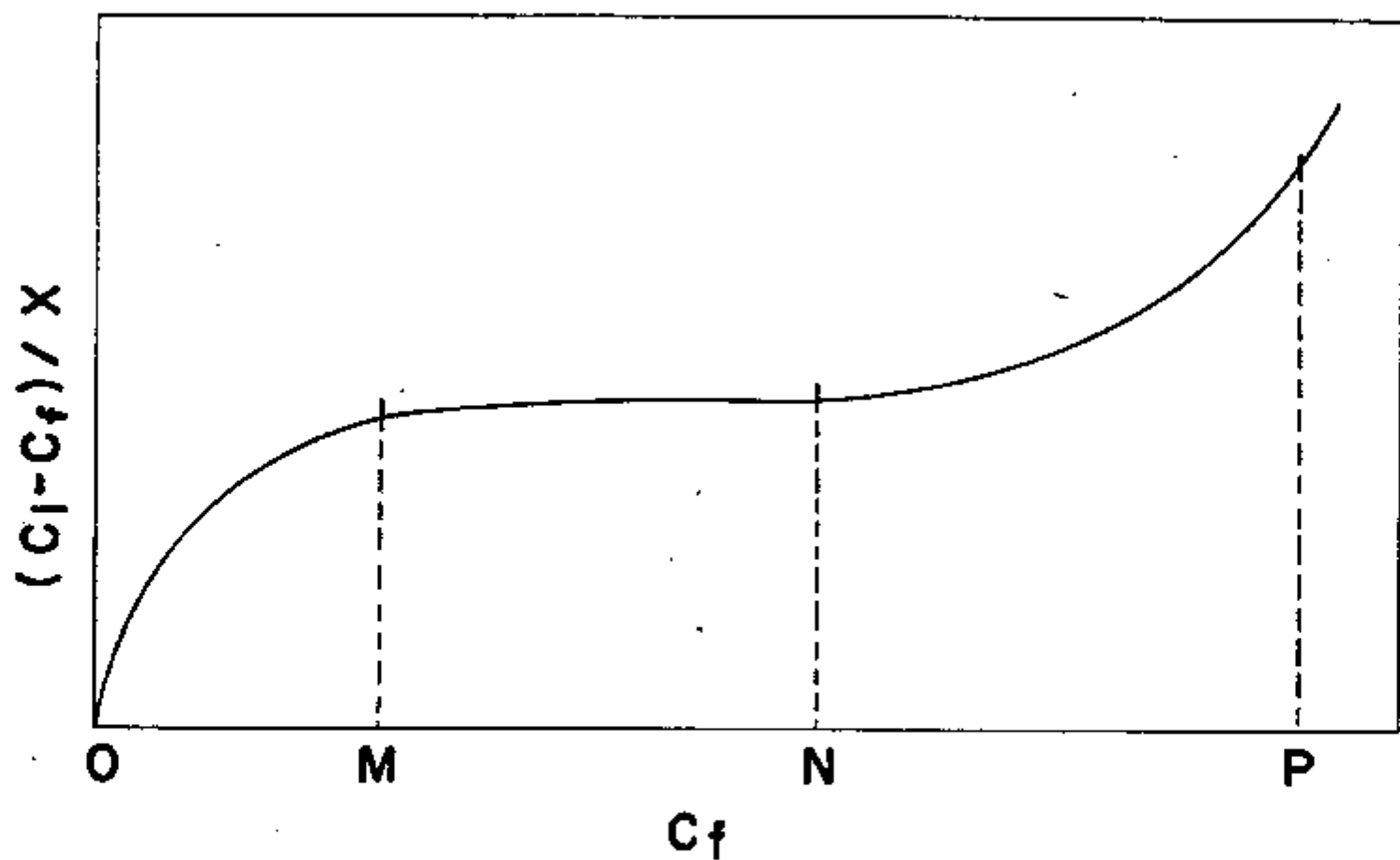


FIGURA 1 - Representação esquemática da curva de adsorção de corante por microrganismos mortos. Ver citações bibliográficas (4 a 16).

$C_i$  = concentração inicial de corante

$C_f$  = concentração de corante no equilíbrio de adsorção

$X$  = concentração de células mortas

Das duas leis citadas, tem particular importância a lei de *Langmuir*, que permite calcular a área específica do microrganismo considerado<sup>(9)</sup> de acordo com a equação "3":

$$A_e = \frac{a}{b} \cdot S \quad "3"$$

sendo  $A_e$  = Área específica desejada

$S$  = Área coberta por uma unidade de massa de corante na forma de camada monomolecular.

O intervalo MN (Figura 1) representa uma fase de transição, mal definida, entre o fenômeno de adsorção em camada monomolecular e o de adsorção em camada multimolecular.

Finalmente, no intervalo NP, em que a curva é típica de um fenômeno de adsorção em camada multimolecular, observa-se obediência apenas formal às duas leis citadas, isto é, as equações "1" e "2" se aplicam porém com  $n > 1$  e  $\frac{b}{a} < 0$ , respectivamente. Destaque-se ainda o fato de que, nesse intervalo NP (Figura 1), há sempre considerável dispersão dos pontos experimentais.

Ao que tudo indica, nas pesquisas até agora realizadas, mesmo trabalhando-se com baixas concentrações de corante, a curva de adsorção desses corantes por células vivas situa-se no intervalo NP (Figura 1) o que não permite o cálculo da área específica das células.

Visando suprir a falha até agora existente, o Instituto de Energia Atômica de São Paulo e o Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, iniciaram um trabalho, com o objetivo de procurar estabelecer um método de medida da área específica de leveduras vivas por adsorção de  $Hg^{2+}$  marcado.

A escolha de um elemento marcado como material a ser adsorvido se justifica se levarmos em conta que é possível, com auxílio de técnicas radiométricas, medir com segurança e com facilidade, va

riações de concentração relativamente pequenas. A utilização do  $Hg^{2+}$  se deve ao fato de ser este um íon que inibe atividades microbianas mesmo em concentrações relativamente baixas e que parece agir por adsorção e por reação com grupos sulfidríla<sup>(17)</sup>.

Finalmente, a escolha de um *Saccharomyces cerevisiae* para a realização dos estudos em apreço se deve basicamente à sua facilidade de obtenção e de manipulação.

\*\*\*\*\*

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Anteriormente a 1958, os trabalhos realizados com a finalidade de estudar quantitativamente, a adsorção de corantes por microrganismos, limitavam-se a medir a massa de corante adsorvido por uma dada massa de células, sem se preocupar com as possíveis correlações existentes entre as variáveis estudadas (18 a 21).

O exame da aplicabilidade de leis físico-químicas ao fenômeno de adsorção de corantes por células microbianas, bem como o estudo de algumas consequências dessa aplicabilidade, foram realizados a partir de 1958, dando origem aos trabalhos já citados anteriormente (4 a 16) e ao artigo de *Finkelstein e Bartholomew* (22).

Parece desnecessário procurar resumir os trabalhos publicados, uma vez que suas conclusões encontram-se resumidas e comentadas na Introdução desta Dissertação.

\*\*\*\*\*

### ETAPAS DO TRABALHO

Em linhas gerais, o presente trabalho foi realizado de maneira a procurar resolver os seguintes aspectos do problema:

1. Determinação das condições experimentais (concentração de células, concentração de  $\text{HgCl}_2$ , tempo de contato, temperatura) que permitissem garantir contato entre  $\text{HgCl}_2$  e células sem provocar a morte destas. O conhecimento dessas condições era indispensável, uma vez que se pretendia estudar a adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de levedura.
2. Determinação de condições experimentais (temperatura, principalmente) que permitissem observar, com segurança, o fenômeno de adsorção do  $\text{Hg}^{2+}$  pelas células vivas.
3. Determinação das condições experimentais (principalmente concentração de células e de  $\text{HgCl}_2$ ) de aplicabilidade da lei de *Langmuir* ao fenômeno em estudo.
4. Cálculo da área específica das células vivas (ou do número de pontos de fixação de íons  $\text{Hg}^{2+}$  na parede celular) a partir das curvas de adsorção obtidas.
5. Verificação de uma aparente competição entre fixação de  $\text{Hg}^{2+}$  na parede celular e penetração de glicose na célula, com vistas a um provável significado fisiológico dos valores obtidos no item 4.

\*\*\*\*\*



## MATERIAIS E MÉTODOS

### A. MATERIAIS USADOS NO TRABALHO EXPERIMENTAL

#### 1. Levedura

A escolha do microorganismo recaiu sobre o *Saccharomyces cerevisiae*, levedura preparada como fermento prensado para panificação e encontrada comercialmente sob a forma de blocos. Em todos os ensaios partiu-se de blocos de 0,5 kg de fabricação da "Usina Itaquara de Açúcar e Alcool".

#### 2. Cloreto de Mercúrio II

O metal pesado escolhido para ser adsorvido pelas células de levedura foi o mercúrio sob a forma de cloreto de mercúrio II p.a. (Reagente E. Merck AG Darmstadt).

Obteve-se o mercúrio sob a forma de traçador radioativo  $^{203}\text{Hg}$  pela irradiação do óxido de mercúrio II p.a. (Reagente E. Merck AG Darmstadt).

#### 3. Equipamento Especial

Os aparelhos especiais usados no decorrer do trabalho foram:

- Agitador mecânico recíproco com controle de temperatura {entre temperatura ambiente e  $(60,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ } e circulação de ar, tipo "Controlled Environment Incubator Shaker", modelo R-25, de fabricação da "New Brunswick Scientific Co. Inc."
- Agitador mecânico rotativo com controle de temperatura {entre temperatura ambiente e  $(60,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ } e circulação de ar, tipo "NBS Gyrotary Shaker", modelo G-25, de fabricação da "New Brunswick Scientific Co., Inc."

- Analisador monocanal de raios gama com detetor de cristal de NaI (Tl), modelo 8725, de fabricação da "Nuclear Chicago Corporation".

#### 4. Material de Vidro

Como o trabalho experimental exigia o emprego de vidraria de precisão, limitou-se, até onde a disponibilidade de material permitiu, ao uso de balões volumétricos e de pipetas volumétricas e graduadas das marcas "Kimax" e "Exax".

Os outros materiais de vidro empregados serão mencionados no decorrer da descrição do procedimento experimental.

### B. MÉTODOS UTILIZADOS NAS DIVERSAS FASES DO TRABALHO

#### 1. Preparo da Levedura

O fermento, antes de ser empregado nas experiências, passa por um tratamento prévio de descascamento do bloco, desagregação e lavagem das células.

##### a) Descascamento

Remove-se, do bloco de 0,5 kg, uma camada periférica com cerca de 1 cm de espessura. Corta-se o restante do bloco em pedaços que são colocados em frascos fechados e previamente secos para conservá-los em geladeira por período não superior a uma semana<sup>(23)</sup>. A finalidade desta operação é evitar que células mortas de levedura, presentes frequentemente na superfície do bloco<sup>(23)</sup>, possam interferir nos resultados.

##### b) Desagregação e Lavagem

Uma quantidade de fermento de massa variável entre 10 g e 50 g, conforme seja a quantidade prevista para o ensaio, é suspensa

em aproximadamente 300 ml de água destilada em um copo de 500 ml; transfere-se a suspensão para um erlenmeyer de 1 litro fechado com rolha de borracha, levando-a ao agitador mecânico recíproco. Mantém-se a agitação a 200 ciclos por minuto (amplitude do movimento = 10,2 cm ) por 2 a 3 horas à temperatura ambiente, após o que, verifica-se ao microscópio se a desagregação dos aglomerados celulares foi satisfatória.

Transfere-se a suspensão para recipientes plásticos com capacidade para 250 ml providos de tampa e centrifuga-se durante 10 minutos a cerca de 1.100.g. Despreza-se o sobrenadante e procede-se a uma nova lavagem das células nos próprios recipientes de centrifugação, ressuspensando a massa centrifugada em água destilada e centrifugando novamente nas mesmas condições. Retira-se o sobrenadante e guarda-se o fermento lavado à temperatura de 5°C a 6°C nos próprios recipientes plásticos usados na centrifugação, por um período não superior a 24 horas.

Essas operações visam a eliminação de substâncias solúveis em água e de bactérias que, nessas condições de centrifugação, permanecem predominantemente no sobrenadante.

## 2. Determinação da Unidade do Fermento Lavado

Em todos os ensaios, procede-se à determinação da unidade do fermento lavado, aquecendo em estufa a 100 - 105°C, durante 3,5 a 4 horas, 1 a 2 g de material em pesa filtro<sup>(24)</sup>.

A concentração celular será sempre expressa em gramas de matéria seca por litro de suspensão.

## 3. Determinação da Percentagem de Células Mortas no Fermento Lavado

Emprega-se o método de coloração com solução de azul de metileno de Fink-Kühles<sup>(25)</sup>, que cora de azul as células mortas.

Misturam-se volumes iguais de suspensão de células e de so

lução de Fink-Kühles, agita-se deixando a seguir a mistura por 20 minutos em repouso. Observa-se ao microscópio, relacionando o número total de células contadas e o número de células azuis.

#### 4. Preparo do Cloreto de Mercúrio II com Traçador Radioativo $^{203}\text{Hg}$

##### a) Obtenção do Traçador Radioativo $^{203}\text{Hg}$

Obtêm-se o mercúrio radioativo pela irradiação do mercúrio natural por uma fonte de neutrons.

A irradiação direta do cloreto de mercúrio II é desaconselhada porque as secções de choque\* para absorção de neutrons térmicos no caso do cloro ( $(31,6 \pm 1,0)$  barns) e no caso do mercúrio ( $(380 \pm 20)$  barns) não apresentam uma diferença suficientemente grande, o que indica que ao mesmo tempo que o mercúrio se ativa, o mesmo acontece com uma parcela do cloro presente. A secção de choque do oxigênio para absorção de neutrons térmicos ( $(0,2 \cdot 10^{-3})$  barns), muitas vezes menor que a do mercúrio, justifica a escolha do óxido de mercúrio II como alvo para irradiação.

O óxido de mercúrio II, encerrado em ampolas de quartzo para evitar volatilização e conseqüente contaminação do reator foi submetido à irradiação em um fluxo de neutrons térmicos ( $10^{11}$  neutrons/ $\text{cm}^2 \cdot \text{seg}$ ) no reator IEAR-1 do Instituto de Energia Atômica de São Paulo.

No decorrer do trabalho experimental, utilizou-se duas amostras, respectivamente com 0,100 e 0,200 g de  $\text{HgO}$ .

Finda a irradiação, guarda-se a ampola contendo o óxido de mercúrio radioativo dentro de uma blindagem de chumbo e espera-se cerca de 10 dias para que os isótopos radioativos de meia vida

---

\* A secção de choque que um dado elemento apresenta para um determinado tipo de reação, traduz a probabilidade da ocorrência desse evento e é expressa em barns ( $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{cm}^2$ ).

mais curta decaíam. O interesse da irradiação se concentra na obtenção do isótopo radioativo  $^{203}\text{Hg}$  que possui uma meia vida de 47 dias e é um emissor  $\beta^-$  (energia de 0,214 MeV) e  $\gamma$  (energia de 0,279 MeV). Abre-se a ampola de quartzo, devidamente mergulhada em banho de gelo com cloreto de sódio para evitar a volatilização do mercúrio, e coloca-se o óxido em um frasco de vidro de 35 ml, dos utilizados como embalagem de penicilina. Transforma-se o óxido em cloreto de mercúrio II adicionando-se, em proporção estequiométrica calculada, um volume adequado de solução 0,1 N de HCl. Completa-se o volume para 20,0 ml com água destilada e conserva-se a solução obtida de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em blindagem de chumbo para impedir a saída das radiações para o meio ambiente.

#### b) Medida de Atividade das Amostras

A medida de atividade das amostras é feita por um analisador monocanal para raios gama, ou cintilador, cujo detetor é um cristal de iodeto de sódio com impurezas de tâlio.

As condições de operação do cintilador foram estabelecidas em função da energia da radiação gama emitida pelo mercúrio-203 e da atividade da amostra, tendo sido conservadas durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A partir da solução original de  $^{203}\text{HgCl}_2$  são preparadas diluições para serem utilizadas nas experiências e na determinação da equação da reta de calibração do cintilador para o referido isótopo radioativo.

Para o traçado das retas de calibração, procede-se à preparação de uma série de diluições da solução original usando material de vidro de precisão de marca "Kimax". Transfere-se as soluções para erlenmeyers com tampa esmerilhada, conservando-as em geladeira. Toma-se amostras com pipetas volumétricas de 5,0 ml e coloca-se em tubos de vidro para contagem, munidos de rolhas de borracha e com capacidade para 13 ml. Faz-se as leituras de atividade das amostras no analisador monocanal.

Aplica-se o método dos mínimos quadrados aos valores obtidos na contagem, determinando para cada experiência, em virtude do decaimento radioativo da amostra, a equação da reta de calibração.

### c) Descontaminação do Material de Vidro

Uma pequena percentagem do isótopo radioativo fixa-se às paredes dos materiais de vidro e sua remoção é impraticável pela simples lavagem. Esse problema afeta diretamente os tubos de contagem que podem apresentar uma radiação de fundo considerável, interferindo na medida de atividade da amostra. Procede-se à descontaminação aplicando o princípio da diluição isotópica, deixando o material mergulhado em uma solução de  $\text{HgCl}_2$  não radioativo, de concentração da ordem de 5 g/l, durante cerca de 24 horas antes da lavagem propriamente dita.

## 5. Verificação da Morte de Células pela Ação do Mercúrio

O ensaio tem a finalidade de determinar a máxima concentração de  $\text{HgCl}_2$  que pode ser utilizada nos ensaios de adsorção sem provocar morte ou inativação nas células de levedura. Consiste em se manter, sob agitação, uma suspensão de fermento lavado contendo  $\text{HgCl}_2$ , ambos em concentrações conhecidas, retirando, periodicamente, amostras e nelas determinando a concentração de células viáveis pelo método de contagem em placa.

### a) Preparo das Suspensões de Células

Mede-se em copo, com precisão de miligrama, uma massa de fermento lavado para ser suspensa em um volume de água destilada esterilizada e quantitativamente transferida para um erlenmeyer tampado com rolha de borracha. Agita-se bem para desagregar as células e homogeneizar a suspensão e transfere-se quantitativamente para um balão volumétrico completando o volume com água destilada esterilizada. As concentrações ensaiadas foram de aproximadamente: 11,500 g/l, 2,880 g/l e 0,288 g/l.

### b) Preparo das Soluções de $\text{HgCl}_2$

O cloreto de mercúrio II foi dissolvido em água destilada de maneira a fornecer soluções de concentrações iguais a 2,500 g/l

e 0,250 g/l.

c) Preparo das Suspensões Contendo Leveduras e  $\text{HgCl}_2$

Nesta série de ensaios, variou-se simultaneamente as concentrações de fermento lavado e de cloreto de mercúrio II.

As suspensões são preparadas em balões volumétricos de 250,0 ml, observando a seguinte sequência: pipeta-se, com pipeta volumétrica, um volume da suspensão adequada de células (item 5.a.) levando-o ao balão volumétrico. Dilui-se com água destilada esterilizada até cerca de 220 ml e adiciona-se um volume conhecido de solução de  $\text{HgCl}_2$  (item 5.b.), completando o volume com água destilada esterilizada, homogeneizando a suspensão e transferindo-a para um erlenmeyer de 500 ml, fechado com rolha de borracha e fixado ao agitador mecânico rotativo a uma temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . O tempo de contato do  $\text{HgCl}_2$  com as células começa a ser contado no instante em que o sal é adicionado à suspensão.

Paralelamente a todos os ensaios, faz-se uma prova em branco, obedecendo a sequência indicada para o preparo da suspensão com exceção da adição de  $\text{HgCl}_2$ .

A Tabela 1 indica, com um sinal (+), as concentrações de células e de cloreto de mercúrio II ensaiadas.

TABELA 1

CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E DE CLORETO DE MERCÚRIO II ENSAIADAS

Concentração de Células (g/l)	Concentração de $\text{HgCl}_2$ (g/l)		
	2,300	0,230	0,023
0,100	(+)		(+)
0,020	(+)		
0,010	(+)	(+)	(+)
0,005	(+)	(+)	(+)

## d) Amostragem

Retira-se a amostra inicial após 3 a 5 minutos e, as seguintes, em intervalos de 30 minutos até completar 3 horas de contato. As amostras de 5,0 ml, retiradas com pipetas volumétricas, são diluídas convenientemente de modo a fornecer uma suspensão final com cerca de 100 células por mililitro, sempre observando as normas de assepsia. Calcula-se que o fermento possua aproximadamente  $10^{10}$  células por grama. Essas diluições são feitas em balões volumétricos com água destilada esterilizada com posterior transferência para erlenmeyers que possuam o dobro de sua capacidade, de modo que se possa agitar satisfatoriamente as suspensões por ocasião de nova tomada de amostra.

## e) Medida da Concentração de Células Viáveis

Em amostras de suspensão, convenientemente diluídas, conta-se o número de células viáveis pela técnica de contagem em placas<sup>(26)</sup>, utilizando o seguinte meio de cultura:

extrato de carne	....	3,0 g/l
peptona	.....	5,0 g/l
glicose	.....	10,0 g/l
agar	.....	20 g/l

De cada amostra inoculam-se 6 placas que, após a solidificação, são invertidas e colocadas em estufa a 30°C, onde permanecem durante 48 horas. Findo o período de incubação, procede-se à contagem das colônias com auxílio de um contador de colônias e os resultados são comparados com os valores obtidos na prova em branco, isto é, na suspensão de células à qual não se adicionou HgCl<sub>2</sub>.

## 6. Determinação do Tempo de Contato entre Células e <sup>203</sup>HgCl<sub>2</sub> para Atingir o Equilíbrio de Adsorção

## a) Equilíbrio de Adsorção

Diz-se que o equilíbrio de adsorção é atingido quando



o número de átomos de substância a ser adsorvida que se fixam na unidade de área da superfície do adsorvente na unidade de tempo é igual ao número dos que se desprendem, dessa unidade de área, no mesmo intervalo de tempo. A partir do momento em que esse equilíbrio dinâmico se estabelece, a concentração, na solução, da substância a ser adsorvida, permanece constante.

Efetuuou-se uma série de ensaios para verificar o tempo necessário, contado a partir da adição de  $^{203}\text{HgCl}_2$  à suspensão de células, para que o equilíbrio de adsorção se estabelecesse.

#### b) Preparo da Suspensão Contendo Células e $^{203}\text{HgCl}_2$

Prepara-se uma suspensão de células em um balão volumétrico de 250,0 ml, suspendendo uma massa conhecida de fermento lavado em água destilada até cerca de 200 ml. Adiciona-se, com pipeta volumétrica, um volume conhecido de solução adequada de  $^{203}\text{HgCl}_2$ . Completa-se o volume com água destilada e transfere-se seu conteúdo para um erlenmeyer de 500 ml que é fixado ao agitador mecânico rotativo regulado para funcionar a uma determinada temperatura. Os trabalhos foram realizados nas seguintes faixas de concentrações: 0,221 a 2,395 g/l para as células e 2,6 a 11,1 mg/l para o  $^{203}\text{HgCl}_2$ .

#### c) Amostragem

As amostras foram retiradas em intervalos de tempo que variaram conforme a informação que se desejava obter. Por exemplo, intervalos de 5 minutos foram adotados para detalhar a primeira hora de experiência, intervalos de 15 a 30 minutos foram utilizados para experiências até 4 horas de contato e intervalos de 60 minutos foram escolhidos para as amostras finais em experiências que se prolongaram por mais de 4 horas.

Toma-se, com pipeta volumétrica, 10,0 ml de suspensão, coloca-se em um tubo de centrifuga de fundo cônico, fechando com rolha de cortiça e centrifuga-se durante 10 minutos a cerca de 1.500.g. A amostra para medida de atividade da solução é retirada do sobrena -

dante com pipeta volumétrica de 5,0 ml e levada a um tubo de contagem munido de rólha de borracha. A medida de contagem obtida no analisador monocanal é transformada em concentração através da equação da reta de calibração determinada no dia da experiência. O resultado representa a concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  que permanece em solução no momento da tomada da amostra. A concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  é obtida pela contagem de atividade de 5,0 ml de suspensão, tomados com pipeta volumétrica e homogeneizados no momento da medida.

#### d) Temperatura Durante os Ensaios

As primeiras experiências foram efetuadas a  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Um único ensaio foi conduzido a  $(22,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Diversas experiências foram realizadas a baixa temperatura, empregando-se, para tanto, um recipiente térmico de "Isopor", fixado à plataforma do agitador rotativo, no qual se colocou o erlenmeyer contendo a suspensão, mergulhado em banho de gelo. Para garantir um trabalho entre  $0^\circ\text{C}$  e  $1^\circ\text{C}$ , a suspensão de células, a solução de  $^{203}\text{HgCl}_2$  e a água destilada para completar os volumes, são mantidos durante 60 minutos mergulhados em banho de gelo, antes de se promover o preparo da mistura de células e  $^{203}\text{HgCl}_2$ . Nas experiências em que esse critério não foi observado, será mencionado simplesmente que o ensaio foi realizado em banho de gelo.

### 7. Experiências Para Observar a Relação Entre a Morte de Células e o Tempo de Contato com $^{203}\text{HgCl}_2$

Com o intuito de verificar uma possível correlação entre a adsorção do mercúrio à parede do microrganismo, sua posterior penetração no interior das células e a ação letal provocada pelo íon do metal pesado, procedeu-se a ensaios reunindo as técnicas descritas nos itens 5 e 6.

O período de observação variou de 2 a 29 horas de contato, sempre à temperatura entre  $0^\circ\text{C}$  e  $1^\circ\text{C}$ . As experiências levadas a efeito durante 2 a 3 horas serviram para testar se, nas condições escolhidas de concentração celular, de concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$ , de tempera-

tura e de tempo de contato, poderia estar ocorrendo morte de células. Com as experiências mais longas, de 7 e de 29 horas, objetivou-se as sociar a penetração de mercúrio nas células com sua morte e determinar quando esse efeito começava a aparecer.

#### 8. Ensaio de Adsorção

O objetivo principal deste trabalho é verificar a aplicabilidade da lei físico-química de adsorção de *Langmuir* ao caso específico de ter-se células vivas de levedura adsorvendo íons de  $Hg^{2+}$  com traçador radioativo  $^{203}Hg$  na forma de  $HgCl_2$ . Comprovada a aplicabilidade da lei, os parâmetros da equação de *Langmuir* serão aplicados no cálculo da área específica e do número de pontos de fixação de  $Hg^{2+}$  nas células vivas de levedura.

##### a) Preparo das Suspensões Contendo Células e $^{203}HgCl_2$

As condições escolhidas para efetuar-se os ensaios de adsorção foram: temperatura entre  $0^{\circ}C$  e  $1^{\circ}C$ , afim de diminuir o fenômeno de penetração de  $Hg^{2+}$  nas células, e 45 a 60 minutos de contato sob agitação. As faixas de concentração adotadas no conjunto de experiências variaram de 0,462 a 0,684 g/l para as células e de 0,48 a 5,17 mg/l para a concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$ .

Procede-se ao ensaio de adsorção fixando a concentração celular e variando a concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$ .

Prepara-se uma suspensão original a partir de 6,0 a 7,5 g de fermento lavado, suspendendo-o em água destilada gelada em um balão volumétrico de 500,0 ml. A suspensão é transferida para um erlenmeyer de 1000 ml para poder ser homogeneizada por ocasião de retirada de amostras.

Coloca-se, em banho de gelo, uma série de balões volumétricos de 50,0 ml com quantidades de água destilada previamente calculadas para facilitar o acerto final do volume dos balões, após a adição dos outros componentes das suspensões.

Toma-se, com uma mesma pipeta volumétrica de 10,0 ml, amostras da suspensão original, colocando-as em cada um dos balões volumétricos.

Paralelamente, deixa-se em banho de gelo, uma solução de  $^{203}\text{HgCl}_2$  de concentração aproximada de 5 mg/l e um frasco conta-gotas com água destilada. Decorridos 60 minutos em banho de gelo, promove-se a adição de  $^{203}\text{HgCl}_2$  às suspensões de células, colocando com pipeta graduada de 20,0 ml, volumes crescentes da solução de  $^{203}\text{HgCl}_2$  nos balões volumétricos e completando o volume com a água destilada contida no frasco conta-gotas. A partir do momento em que se promove a agitação manual das suspensões, começa-se a marcar o tempo de contato. Transfere-se as suspensões, o mais rapidamente possível, para erlenmeyers de 125 ml, previamente adaptados ao recipiente térmico de "Isopor", em banho de gelo, fixado ao agitador mecânico rotativo.

#### b) Amostragem

Após 45 a 60 minutos de agitação, toma-se amostras de 10,0 ml de cada uma das suspensões e transfere-se para tubos de centrífuga mergulhados em banho de gelo. Os tubos são fechados com rolhas de cortiça e centrifugados durante 10 minutos a cerca de 1.500.g para separar as células. Com pipetas volumétricas de 5,0 ml, toma-se amostras dos sobrenadantes para contagem de radioatividade. Essa medida permite calcular a concentração final de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$ , ou seja, a concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  não adsorvido que permanece em solução. As concentrações iniciais de  $^{203}\text{HgCl}_2$  são obtidas pela contagem de 5,0 ml, tomados com pipetas volumétricas, das suspensões devidamente homogeneizadas no momento da medida.

#### c) Verificação da Aplicabilidade da Lei de *Langmuir*

A aplicabilidade da Lei de *Langmuir* aos resultados experimentais foi verificada pelo método dos mínimos quadrados.

#### d) Curva Completa de Adsorção

Com a finalidade de evidenciar a existência de adsor-

ção em camada "única" e de adsorção em camada "múltipla", procedeu-se a outro tipo de ensaio, ampliando a faixa de concentrações iniciais de  $^{203}\text{HgCl}_2$ , que variaram de 0,80 a 12,32 mg/l, e reduzindo a concentração celular para 0,22 a 0,24 g/l.

#### 9. Adsorção de $^{203}\text{HgCl}_2$ e Penetração de Glicose nas Células

O objetivo dessa experiência é verificar se, após a adsorção de mercúrio pelas células, pode haver penetração de glicose nas mesmas, ou seja, se os pontos de penetração de glicose coincidem com os pontos de fixação de  $\text{Hg}^{2+}$  na parede celular.

##### a) Preparo das Suspensões

Prepara-se uma suspensão de células com cerca de 2,4 g/l em balão volumétrico de 250,0 ml. Agita-se e transfere-se a suspensão para um erlenmeyer de 500 ml para homogeneizá-la convenientemente. Duas suspensões de igual concentração celular são obtidas a partir dessa suspensão original, tomando-se 25,0 ml, com pipeta volumétrica, e levando-se a balão volumétrico de 500,0 ml. Um dos balões é completado com água destilada e transferido para um erlenmeyer de 1.000 ml fixado ao agitador mecânico rotativo. Coloca-se água destilada no outro balão até cerca de 450 ml, adicionando-se, em seguida, 20,0 ml de solução de  $^{203}\text{HgCl}_2$  de concentração aproximadamente igual a 125 mg/l. Completa-se o volume com água destilada, agita-se e transfere-se para outro erlenmeyer de 1.000 ml fixado ao agitador mecânico rotativo. Mantém-se a agitação durante 10 minutos, tempo que é suficiente para que o equilíbrio de adsorção se estabeleça para as concentrações indicadas de fermento e de  $^{203}\text{HgCl}_2$  e à temperatura de  $(19,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , que foi a adotada para facilitar a penetração de glicose nas células.

Decorridos os 10 minutos, coloca-se 1,0 ml de solução de glicose preparada para fornecer, nas suspensões, uma concentração aproximadamente igual a 200 mg/l.

##### b) Amostragem

Retira-se amostras de 10,0 ml das duas suspensões, de 15 em 15 minutos durante 90 minutos, para centrifugação. As amostras iniciais são retiradas imediatamente após a adição de glicose às sus-

pensões.

Do sobrenadante das duas suspensões centrifugadas, toma-se 1,0 ml, com pipetas volumétricas, para dosagem da glicose que não penetrou nas células.

Do sobrenadante da suspensão que contém  $^{203}\text{HgCl}_2$ , retira-se 5,0 ml para medida de radioatividade, que irá fornecer a concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  que permanece em solução. A concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  é dada pela contagem de 5,0 ml da suspensão homogeneizada por ocasião da medida.

c) Dosagem de Glicose

A dosagem de glicose foi efetuada pelo método de Somo  
*gyi* (27).

\*\*\*\*\*

RESULTADOS

## A. UMIDADE DO FERMENTO LAVADO

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos na determinação da umidade do fermento lavado, para 38 ensaios.

TABELA 2

## UMIDADE DO FERMENTO LAVADO

Determinação nº	Umidade do fermento lavado (%)	Determinação nº	Umidade do fermento lavado (%)
1	77,0	20	77,7
2	75,2	21	77,5
3	77,5	22	77,6
4	76,8	23	77,4
5	75,5	24	76,6
6	76,2	25	77,9
7	75,1	26	78,0
8	76,5	27	78,8
9	83,7	28	77,1
10	76,4	29	78,2
11	75,4	30	78,0
12	75,8	31	78,2
13	76,7	32	77,8
14	77,2	33	77,3
15	78,5	34	77,2
16	78,0	35	77,1
17	78,3	36	77,9
18	76,9	37	76,0
19	77,7	38	75,8

B. PERCENTAGEM DE CÉLULAS MORTAS NO FERMENTO LAVADO PELO MÉTODO DE FINK-KUHLES

A percentagem de células mortas no fermento lavado, determinada para 8 experiências, apresentou os resultados que figuram na Tabela 3.

TABELA 3

PERCENTAGEM DE CÉLULAS MORTAS NO FERMENTO LAVADO

Determinação nº	Células Mortas no Fermento (%)
1	1,2
2	1,3
3	1,5
4	0,5
5	1,0
6	1,1
7	0,8
8	0,5

C. MORTE DE CÉLULAS POR AÇÃO DO MERCÚRIO

Os resultados de contagem de células em placas, estão representados nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente, para suspensões de concentrações aproximadamente iguais a 2,300 g/l, 0,230 g/l e 0,023 g/l. As Figuras 2, 3 e 4 apresentam a representação gráfica desses resultados.

Observa-se que à temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ , para as três concentrações celulares, o contato com  $\text{HgCl}_2$  na concentração de 5,1 mg/l não exerceu efeito letal sobre as células durante as três horas de experiência. O cloreto de mercúrio II na concentração de 10,2 mg/l



TABELA 4

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE  $\text{HgCl}_2$  E DO TEMPO DE CONTATO NO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

Tempo de Contato (min)	Número de Células Viáveis por Litro			
	Concentração de $\text{HgCl}_2$ (mg/l)			
	101,7	20,3	10,2	5,1
Prova em Branco	$(6,3 \times 10^{10})$	$(4,6 \times 10^{10})$	$(5,6 \times 10^{10})$	$(6,0 \times 10^{10})$
3	$6,7 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{10}$	$6,3 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$
30	0	$3,9 \times 10^{10}$	$5,6 \times 10^{10}$	$6,2 \times 10^{10}$
60	0	$3,0 \times 10^9$	$5,6 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^{10}$
90	-	$1,3 \times 10^9$	$4,7 \times 10^{10}$	$5,7 \times 10^{10}$
120	-	$1,3 \times 10^9$	$4,5 \times 10^{10}$	$5,9 \times 10^{10}$
150	-	$1,0 \times 10^9$	$3,9 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^{10}$
180	-	$6,7 \times 10^8$	$4,7 \times 10^{10}$	$5,7 \times 10^{10}$

Concentração Total de Células = 2,300 g/l

Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

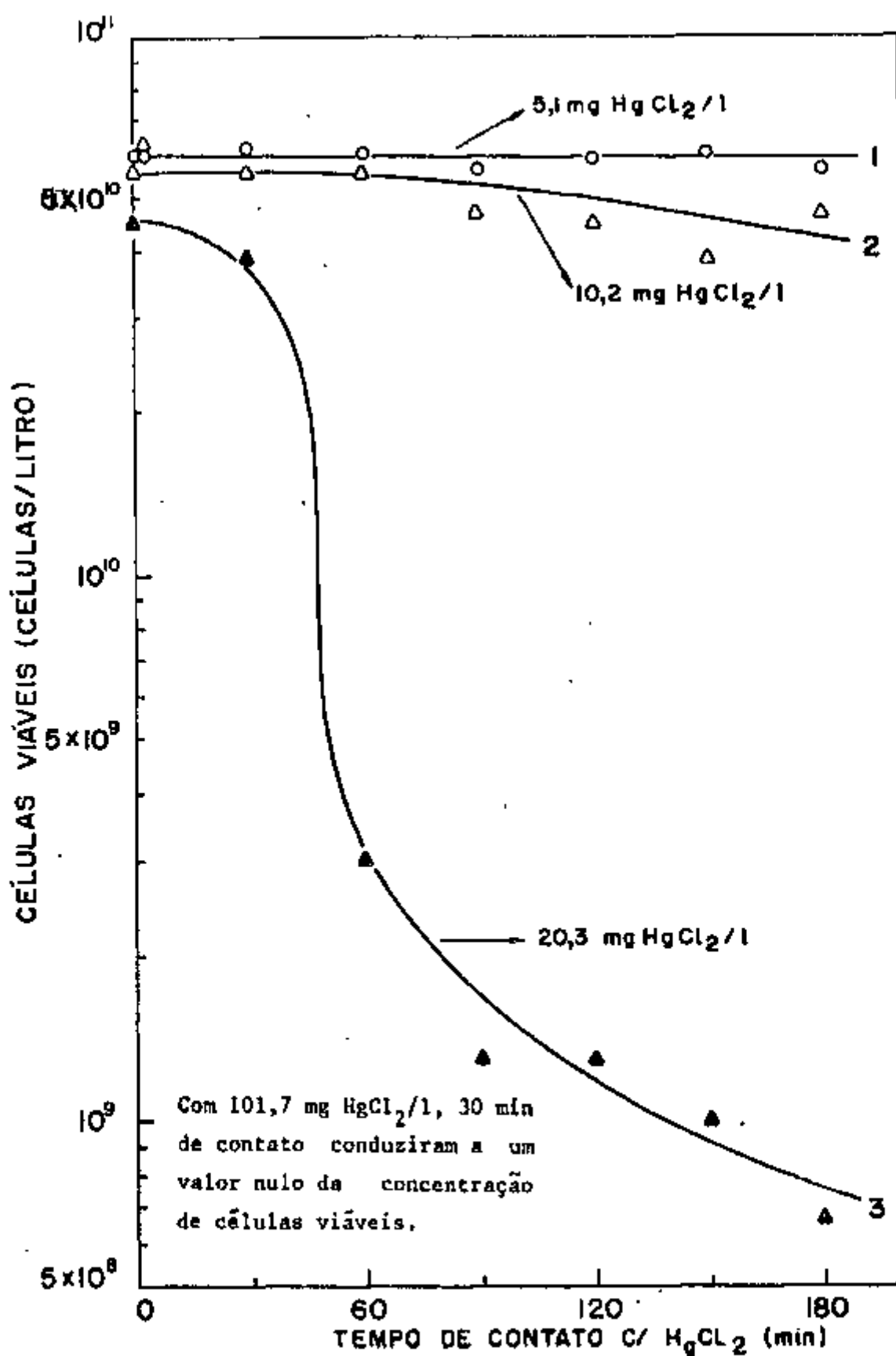


FIGURA 2 - Influência da concentração de HgCl<sub>2</sub> e do tempo de contato na concentração de células viáveis.

Concentração total de células = 2,300 g/l

Temperatura = (30,0 ± 0,5)°C

TABELA 5

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE  $HgCl_2$  E DO TEMPO DE CONTATO NO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

Tempo de Contato (min)	Número de Células Viáveis por Litro	
	Concentração de $HgCl_2$ (mg/l)	
	10,2	5,1
Prova em Branco	$(9,0 \times 10^9)$	$(8,5 \times 10^9)$
3	$8,4 \times 10^9$	$8,8 \times 10^9$
30	$8,2 \times 10^9$	$7,8 \times 10^9$
60	$7,6 \times 10^9$	$8,4 \times 10^9$
90	$2,8 \times 10^8$	$8,8 \times 10^9$
120	$6,7 \times 10^7$	$8,3 \times 10^9$
150	$6,7 \times 10^7$	$8,2 \times 10^9$
180	$1,7 \times 10^7$	$8,4 \times 10^9$
Concentração Total de Células = 0,230 g/l Temperatura = $(30,0 \pm 0,5)^\circ C$		

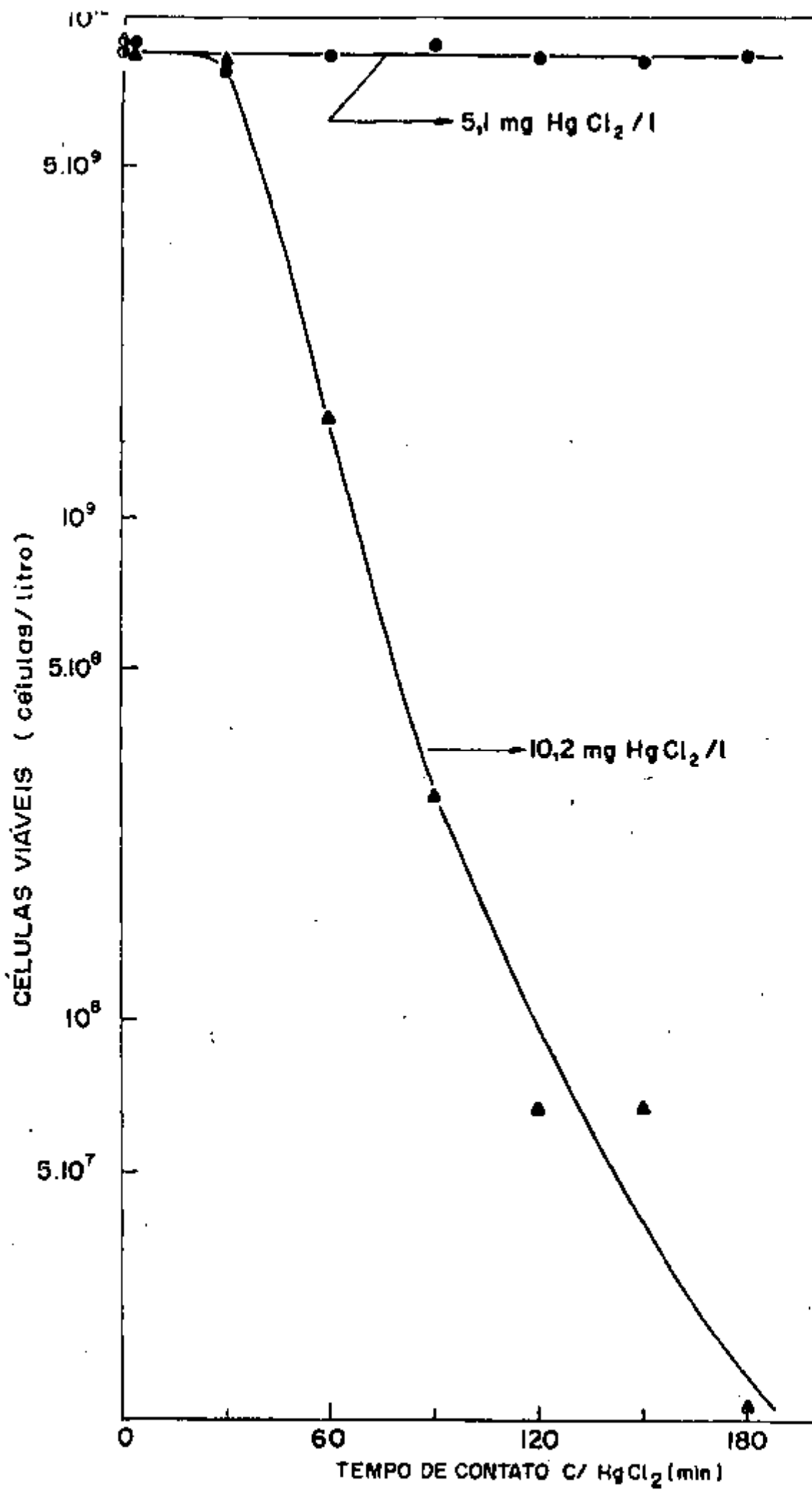


FIGURA 3 - Influência da concentração de  $\text{HgCl}_2$  e do tempo de contato na concentração de células viáveis  
 Concentração total de células =  $0,230 \text{ g/l}$   
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

TABELA 6

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE  $\text{HgCl}_2$  E DO TEMPO  
DE CONTATO NO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

Tempo de Contato (min)	Número de Células Viáveis por Litro		
	Concentração de $\text{HgCl}_2$ (mg/l)		
	101,7	10,2	5,1
Prova em Branco	$(4,6 \times 10^8)$	$(6,9 \times 10^8)$	$(6,9 \times 10^8)$
3	$2,7 \times 10^7$	$6,6 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$
30	0	$5,9 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$
60	0	$3,9 \times 10^8$	$7,4 \times 10^8$
90	0	$5,2 \times 10^8$	$6,6 \times 10^8$
120	0	-	$7,5 \times 10^8$
150	0	-	$6,8 \times 10^8$
180	0	-	$6,2 \times 10^8$

Concentração Total de Células = 0,023 g/l  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

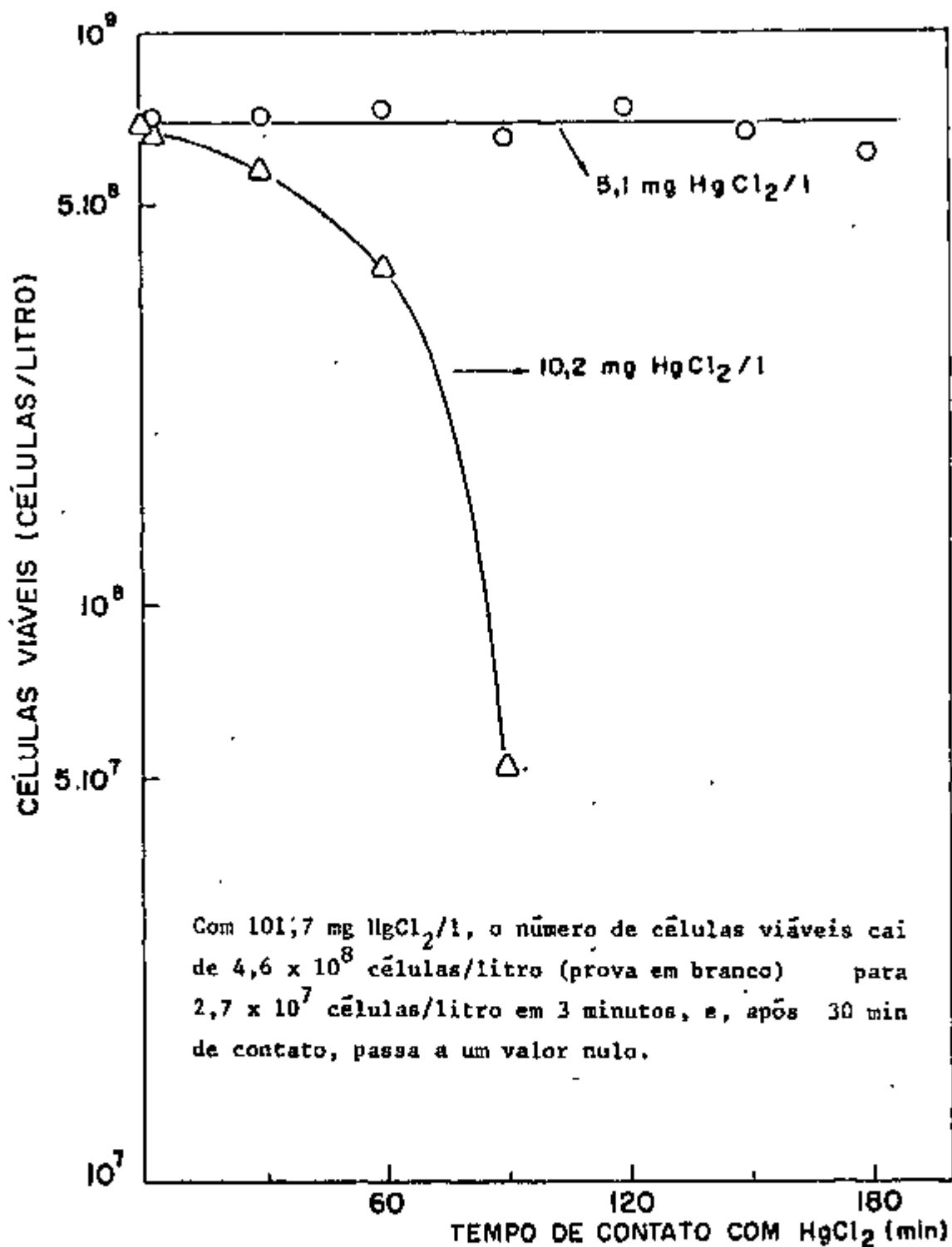


FIGURA 4 - Influência da concentração de HgCl<sub>2</sub> e do tempo de contato na concentração de células viáveis.  
 Concentração total de células = 0,023 g/l  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$

exerce uma pequena influência sobre as leveduras na concentração de cerca de 2,300 g/l, mas nas outras concentrações celulares estudadas, já aparece nitidamente o efeito de morte sobre as células. Na concentração de 20,3 mg/l o  $\text{HgCl}_2$  só foi estudado em relação à concentração de células de aproximadamente 2,300 g/l, apresentando, a partir de 30 minutos de contato, um acentuado efeito de morte sobre as leveduras.

A concentração de 101,7 mg/l revelou efeito imediato sobre as células, tendo sido estudada em relação a concentrações celulares de cerca de 2,300 g/l e de 0,023 g/l.

Conclui-se que, à temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , pode-se proceder aos ensaios de adsorção com concentrações de  $\text{HgCl}_2$  de aproximadamente 5,0 mg/l e concentrações de células dentro de uma faixa de 0,023 a 2,300 g/l, durante 3 horas de contato sob agitação, com segurança de se estar operando com células vivas.

#### D. TEMPO DE CONTATO ENTRE CÉLULAS E $^{203}\text{HgCl}_2$ PARA ESTABELECER O EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO

##### 1. Experiências à Temperatura de $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

Procedeu-se a três séries de experiências usando concentrações fixas de células e variando as concentrações de  $^{203}\text{HgCl}_2$ . As suspensões de células em contato com o  $^{203}\text{HgCl}_2$  foram agitadas durante 4 horas, retirando-se amostras de 30 em 30 minutos.

Na primeira série de experiências, utilizou-se uma concentração de células de 2,395 g/l e concentrações de  $^{203}\text{HgCl}_2$  de 7,12 mg/l, 5,59 mg/l, 4,25 mg/l e 2,93 mg/l. A Tabela 7 indica os valores da concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  que permanece em solução nos diferentes tempos de contato para as quatro suspensões. A representação gráfica dos resultados é feita na Figura 5.

A segunda série de experiências foi feita com uma concentração fixa de células de 1,248 g/l, em contato com  $^{203}\text{HgCl}_2$  em concentra

ções variáveis. Os resultados de concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  que permanece em solução após determinado tempo de contato, são indicados na Tabela 8 e representados graficamente na Figura 6.

A terceira série de experiências foi feita com uma concentração de leveduras de 0,251 g/l e concentrações de  $^{203}\text{HgCl}_2$  variáveis. As concentrações de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução nos diferentes tempos de contato, estão colocadas na Tabela 9 e representadas graficamente na Figura 7.

Pela análise dos resultados obtidos nas experiências realizadas à temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  e representados nas Figuras 5, 6 e 7, pode-se fazer algumas observações.

Para concentrações iniciais de  $^{203}\text{HgCl}_2$  variáveis entre 3 e 7 mg/l, chega-se a resultados muito próximos de concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  no sobrenadante após cerca de 150 minutos de contato com as suspensões de células.

A concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  no sobrenadante, na maior parte dos casos, atinge um valor mínimo e sobe em seguida.

Nos casos de concentrações celulares mais baixas, próximas a 0,25 g/l, as curvas se apresentam com um aspecto diferente das demais, com uma zona em que há indício de formação de um patamar e continuando com uma queda acentuada na concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  no sobrenadante. A princípio, pensou-se que esse comportamento, verificado sistematicamente em vários ensaios, fôsse consequência de uma falha experimental. Uma explicação possível para o fato seria a de que a desagregação celular no fermento lavado não estivesse completa. No início, o mercúrio seria adsorvido pela superfície dos aglomerados celulares que, com a agitação da suspensão por cerca de 60 minutos, iriam se desagregando com um conseqüente aumento da superfície de adsorção. Para verificar essa possibilidade, procedeu-se a um controle microscópico das suspensões durante as fases de desagregação e lavagem das células. Comprovada a dissociação conveniente dos aglomerados celulares, nos ensaios que se seguiram, foi observado o mesmo aspecto



TABELA 7

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)			
	Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ (mg/l)			
	7,12	5,59	4,25	2,93
10	3,48	2,47	1,53	0,88
36	1,40	0,88	0,60	0,41
66	0,78	0,57	0,50	0,44
96	0,71	0,58	0,57	0,49
122	0,70	0,58	0,58	0,51
154	0,71	0,60	0,61	0,53
184	0,72	0,62	0,62	0,54
210	0,73	0,64	0,63	0,56
240	0,74	0,89	0,63	0,56

Concentração de Células = 2,395 g/l  
 Umidade do Fermento = 76,4%  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

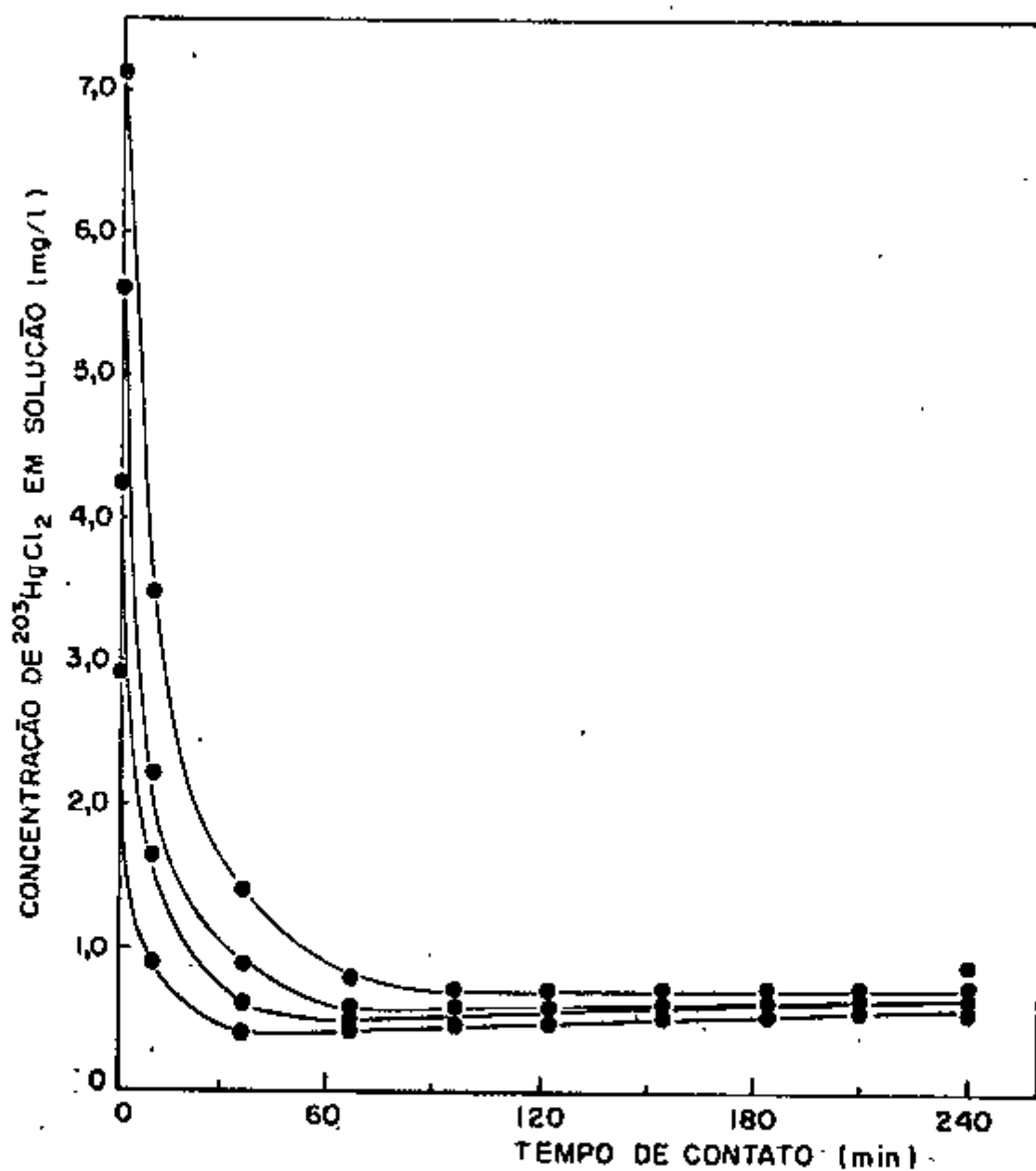


FIGURA 5 - Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução em função do tempo de contato com células de levedura.  
Concentração de células = 2,395 g/l  
Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

TABELA 8

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO  
DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)			
	Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ (mg/l)			
	6,90	5,48	3,86	2,92
15	4,61	3,36	2,20	1,10
39	2,87	2,19	1,26	0,65
63	2,14	1,52	0,84	0,53
93	1,16	0,99	0,70	0,51
120	0,79	0,76	0,56	0,50
150	0,76	0,65	0,59	0,50
182	0,88	0,65	0,58	0,51
212	0,96	0,62	0,58	0,51
242	1,05	0,78	0,58	0,51

Concentração de Células = 1,248 g/l  
 Umidade do Fermento = 75,4%  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

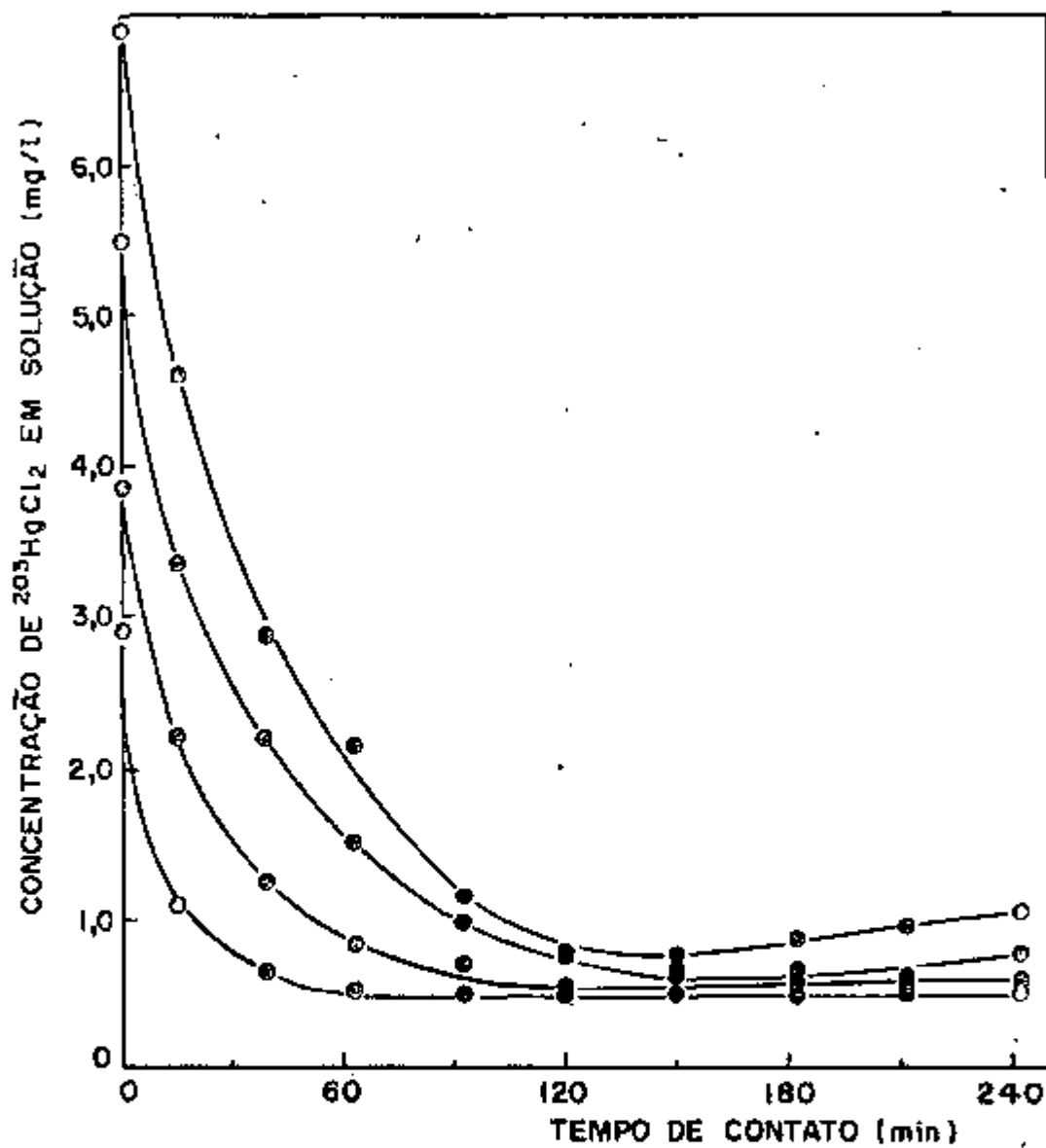


FIGURA 6 - Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução em função do tempo de contato com células de levedura.  
 Concentração de células = 1,248 g/l  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

TABELA 9

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO  
DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)			
	Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ (mg/l)			
	6,94	5,61	4,30	2,62
12	6,45	4,90	3,72	2,36
32	5,72	4,57	3,51	1,85
60	5,61	4,33	3,12	1,73
90	4,36	3,03	2,70	1,61
120	2,48	1,58	2,05	1,31
150	1,29	1,18	1,09	1,05
180	1,38	1,45	1,04	0,93
210	1,64	1,71	1,26	0,83
242	1,94	1,89	1,40	0,77

Concentração de Células = 0,251 g/l  
 Umidade do Fermento = 75,8%  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

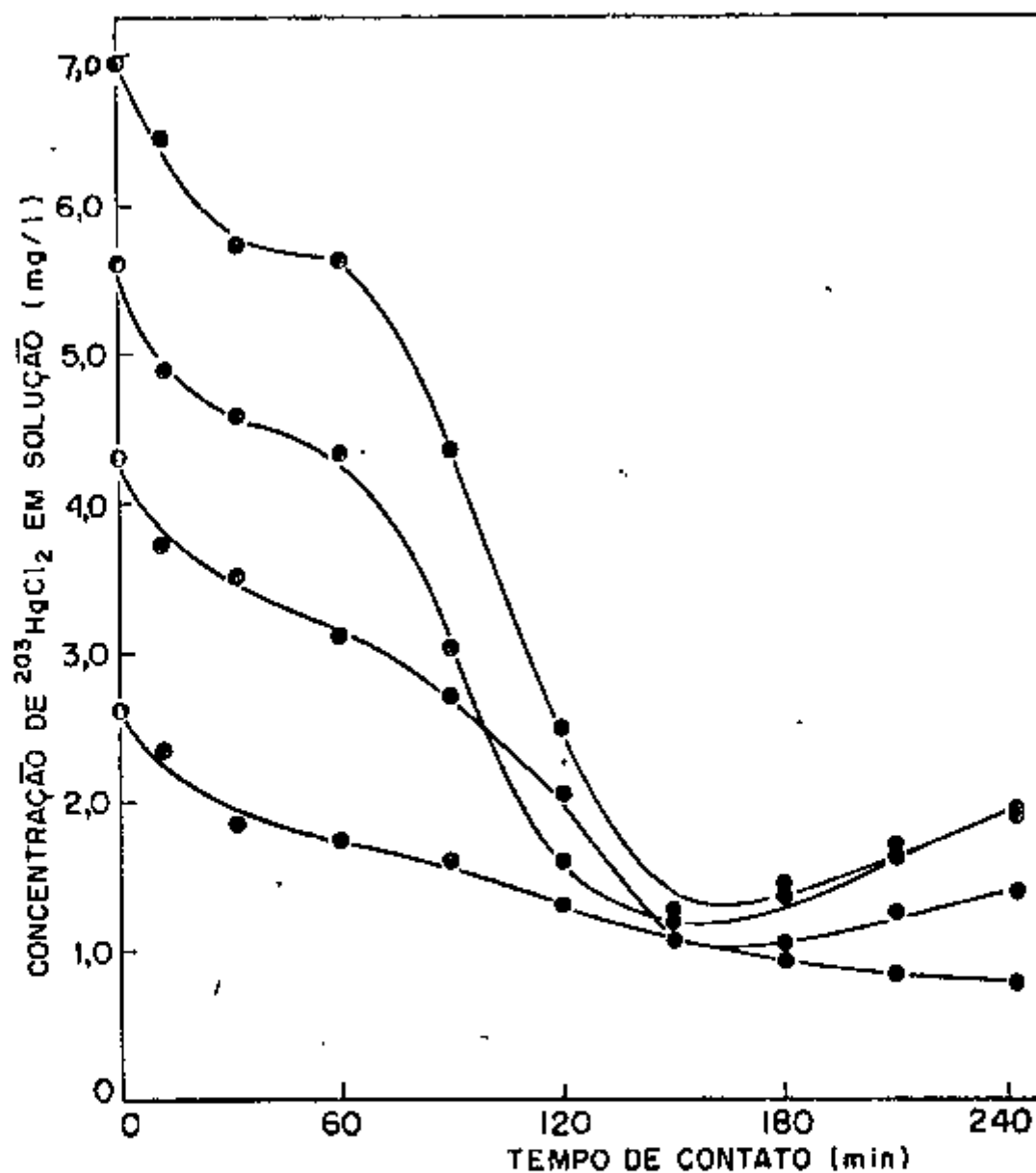


FIGURA 7 - Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução em função do tempo de contato com células de levedura.  
 Concentração de células = 0,251 g/l  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

nas curvas. Uma segunda hipótese foi sugerida para explicar o fato, supondo que dois fenômenos ocorressem simultaneamente: adsorção e penetração do mercúrio nas células. Na primeira hora de contato entre leveduras e  $^{203}\text{HgCl}_2$ , a adsorção seria predominante, embora a penetração já ocorresse. A queda acentuada na concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  no sobrenadante, a partir da primeira hora de contato, seria consequência da penetração do mercúrio nas células. A ocorrência simultânea dos dois fenômenos seria nítida para as concentrações celulares de aproximadamente 0,25 g/l, enquanto que, para as concentrações superiores (cerca de 1,25 e 2,40 g/l) a penetração muito intensa encobriria a adsorção.

## 2. Experiência à Temperatura de $(22,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

A Tabela 10 indica os valores obtidos numa experiência realizada com uma suspensão de células contendo 0,239 g/l em contato com  $^{203}\text{HgCl}_2$  na concentração de 5,62 mg/l. A Figura 8 apresenta a representação gráfica dos resultados.

Observa-se a formação de um patamar entre 15 a 50 minutos de contato entre células e  $^{203}\text{HgCl}_2$ , com posterior queda na concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução.

A diminuição de temperatura favorece o fenômeno de adsorção e retarda a penetração do material na célula, deixando mais nítida a faixa em que predomina a adsorção.

## 3. Experiências Realizadas em Banho de Gelo

Para reduzir ainda mais a velocidade de penetração do íon  $\text{Hg}^{2+}$  nas células, uma série de ensaios foi conduzida mergulhando as suspensões em banho de gelo, sem a preocupação de manter-se uma determinada temperatura, simplesmente para operar-se em temperatura baixa.

Nas Tabelas 11 e 12, faz-se uma comparação dos resultados obtidos à temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  e em banho de gelo para suspensões celulares contendo aproximadamente a mesma concentração de fer

TABELA 10

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)	
	1ª Amostra	2ª Amostra
3	4,82	4,97
5	5,00	5,02
10	4,93	-
16	4,83	4,64
20	4,85	4,60
25	4,69	4,52
30	4,06	4,66
35	4,52	4,69
40	4,82	4,82
45	4,60	4,50
50	4,36	4,29
55	4,87	4,56
60	3,87	4,25
100	4,24	4,10
140	3,70	3,64
180	3,27	3,33
220	2,64	2,48
260	1,59	1,53

Concentração de Células = 0,239 g/l  
 Unidade do Fermento = 76,7%  
 Concentração Inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  = 5,62 mg/l  
 Temperatura =  $(22,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$



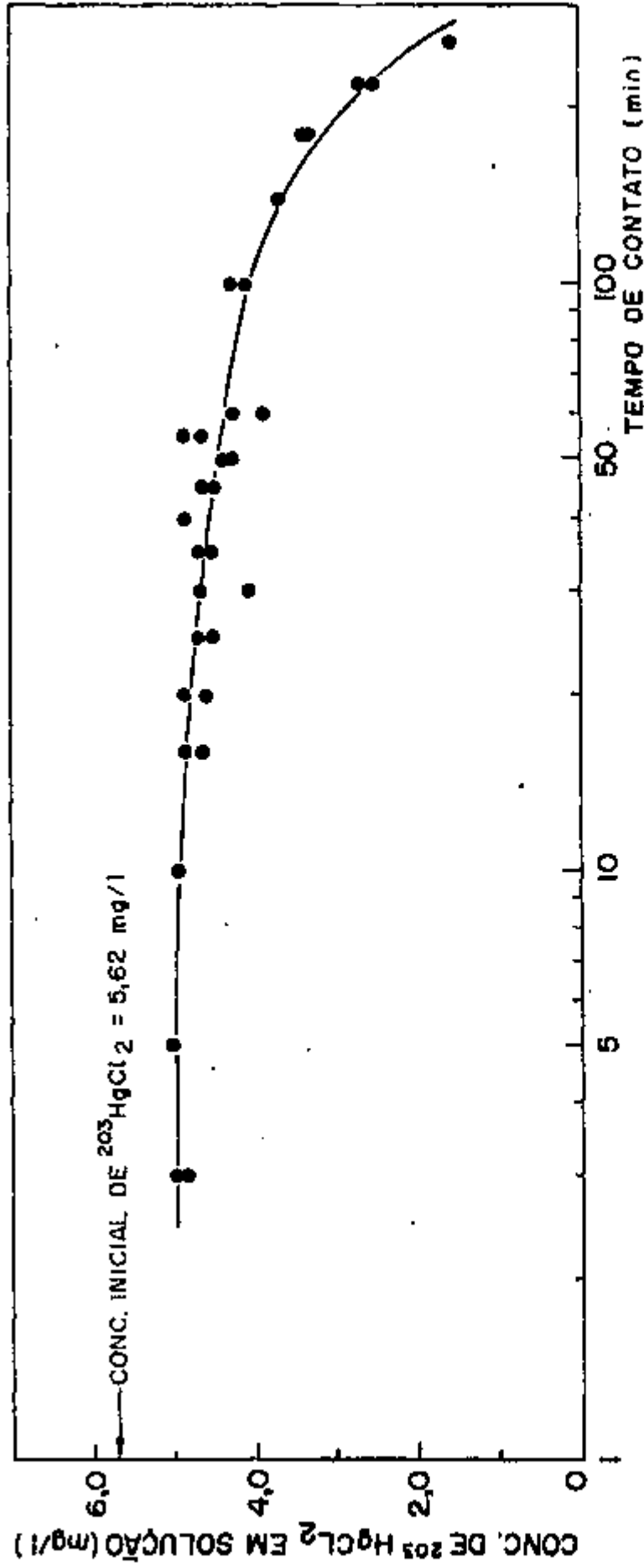


FIGURA 8 - Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução em função do tempo de contato com células de levedura.  
 Concentração de células = 0,239 g/l  
 Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2 = 5,62 \text{ mg/l}$   
 Temperatura =  $(22,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

mento. A Figura 9 apresenta graficamente os resultados das Tabelas 11 e 12, podendo-se observar a formação de um patamar característico do equilíbrio de adsorção no ensaio realizado em banho de gelo.

As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados obtidos com concentrações celulares diferentes em contato com  $^{203}\text{HgCl}_2$  em concentrações aproximadamente iguais a 5 mg/l. Esses resultados estão representados na Figura 10, onde pode-se notar que, para a concentração celular de 0,221 g/l (Curva 1), depois de cerca de 25 minutos de contato, a concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  no sobrenadante permanece praticamente constante até os 180 minutos de observação. A curva 2, para uma concentração de células de 0,874 g/l, mostra que, embora a concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  no sobrenadante decresça ligeiramente a partir de 60 minutos de contato, o patamar característico do equilíbrio de adsorção não é atingido. Isso indica que é provável que, para a concentração celular de 0,874 g/l, a temperatura baixa diminui a penetração do íon  $\text{Hg}^{2+}$  nas células, mas não o suficiente para garantir um patamar de equilíbrio de adsorção.

A Tabela 15 mostra os valores obtidos a uma temperatura variável entre  $0^\circ\text{C}$  e  $1^\circ\text{C}$ , para uma suspensão contendo uma concentração celular de 1,389 g/l e uma concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  de 3,29 mg/l. Os resultados estão representados na Figura 10 (Curva 3) e fazendo-se uma comparação com a curva 2, verifica-se que, conservando a temperatura entre  $0^\circ\text{C}$  e  $1^\circ\text{C}$ , pode-se aumentar a concentração celular sem que o fenômeno de penetração de mercúrio nas células seja aumentado.

Para mostrar que, em baixa temperatura, partindo-se de concentrações celulares próximas e de concentrações iniciais de  $^{203}\text{HgCl}_2$  diferentes, chega-se a valores de concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  no sobrenadante bem distintos, o que não acontecia a  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , as tabelas 16 e 17 apresentam os resultados obtidos em experiências realizadas nessas condições e a Figura 11 os ilustra graficamente.

#### E. RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE CONTATO COM $^{203}\text{HgCl}_2$ E MORTE DE CÉLULAS

A primeira experiência foi realizada em banho de gelo em condi

TABELA 11

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CELULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em solução (mg/l)	
	1ª Amostra	2ª Amostra
4	4,42	4,28
5	3,96	3,92
10	3,67	3,63
16	3,99	3,96
20	3,25	3,42
25	3,35	3,24
30	3,62	3,65
35	3,01	3,04
40	2,92	2,90
45	2,92	3,14
50	2,60	2,68
55	2,47	2,62
60	2,83	2,52
90	1,49	1,61
150	1,01	0,98
180	1,25	1,28
210	1,60	1,80
240	1,60	1,64
300	1,54	1,59

Concentração de Células = 0,463 g/l  
 Unidade do Fermento = 77,2%  
 Concentração Inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  = 4,63 mg/l  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$

TABELA 12

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO  
DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)	
	1ª Amostra	2ª Amostra
7	8,14	8,07
20	7,97	8,06
40	7,94	7,83
61	7,46	8,09
90	7,85	7,18
120	7,89	7,76
150	7,75	7,90
180	7,16	7,78

Concentração de Células = 0,433 g/l  
 Unidade do Fermento = 78,5%  
 Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  = 8,61 mg/l  
 Banho de Gelo

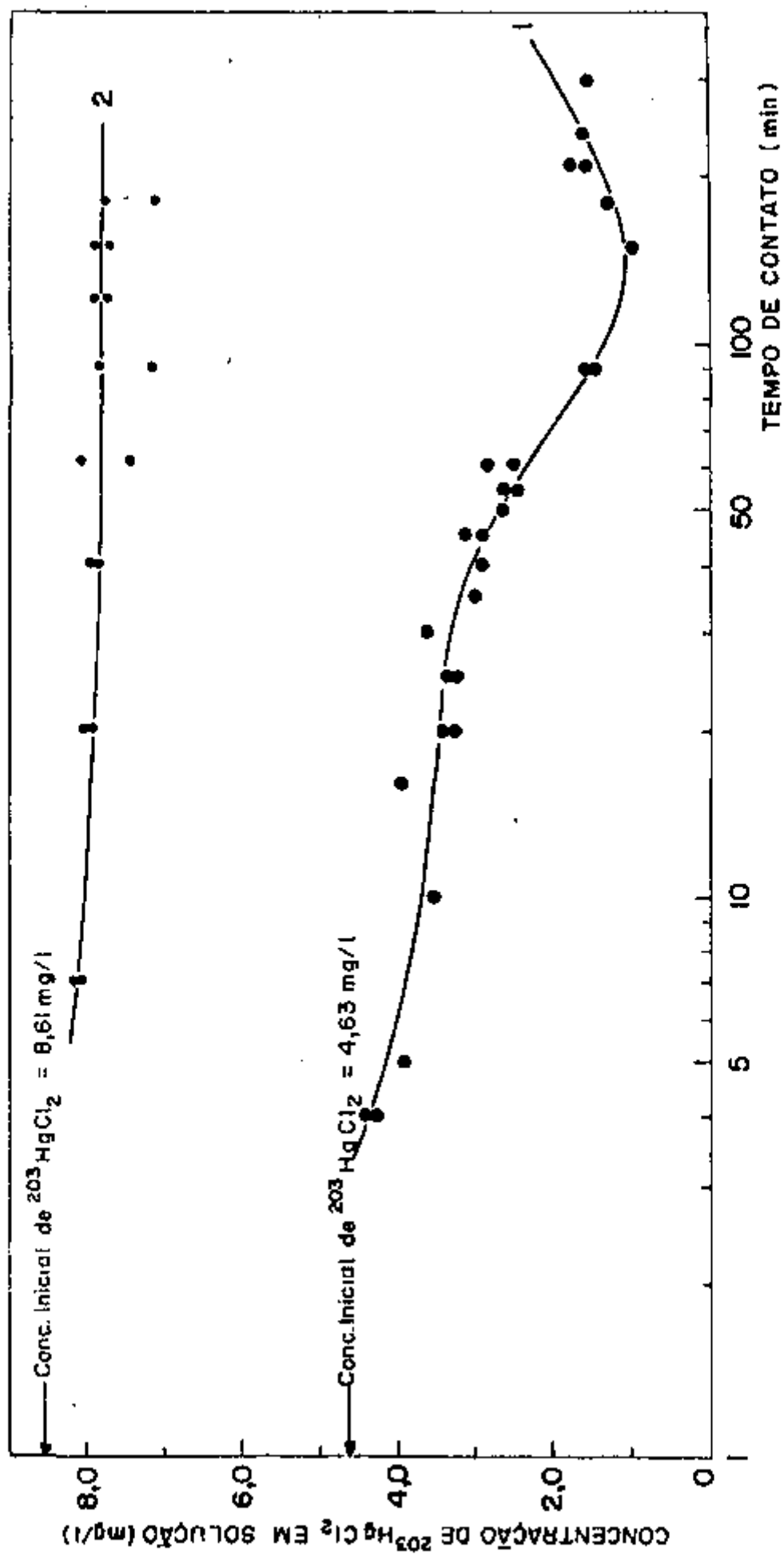


FIGURA 9 - Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução em função do tempo de contato com células de levedura.

Curva 1: Concentração de células = 0,463 g/l. Curva 2: Concentração de células = 0,433 g/l  
 Temperatura =  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$   
 Banho de gelo

TABELA 13

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em solução (mg/l)
9	4,38
25	4,20
49	4,21
76	4,13
98	4,21
121	4,20
148	4,12
Concentração de Células = 0,221 g/l Umidade do Fermento = 78,0% Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ = 4,97 mg/l Banho de Gelo	

TABELA 14

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min).	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em solução (mg/l)
15	3,19
31	2,92
45	2,81
60	2,60
90	2,48
120	2,53
150	2,23
186	2,33
Concentração de Células = 0,874 g/l Umidade do fermento = 78,9% Concentração Inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ = 5,15 mg/l Banho de Gelo	

TABELA 15

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)
15	1,77
29	1,72
44	1,59
60	1,49
89	1,44
119	1,22
148	1,25
180	1,31

Concentração de Células = 1,389 g/l  
 Umidade do Fermento = 76,9%  
 Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  = 3,29 mg/l  
 Temperatura = 0°C a 1°C



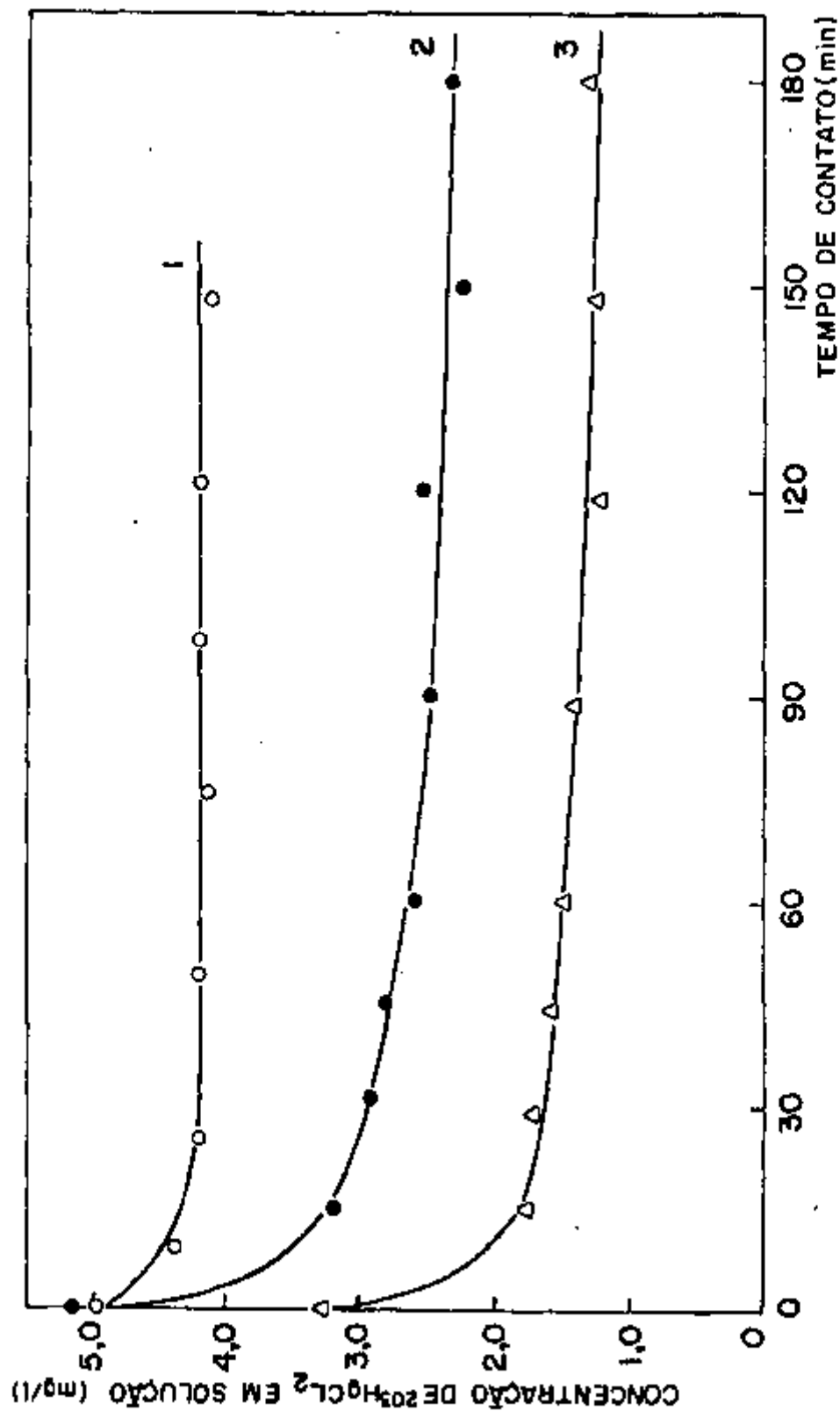


FIGURA 10 - Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução em função do tempo de contato com células de levedura.

Curva 1: Concentração de células = 0,221 g/l ; Temperatura: banho de gelo

Curva 2: Concentração de células = 0,874 g/l ; Temperatura: banho de gelo

Curva 3: Concentração de células = 1,389 g/l ; Temperatura:  $0^\circ\text{C}$  a  $1^\circ\text{C}$

TABELA 16

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)
15	3,42
30	3,30
45	2,96
60	2,80
90	2,38
120	2,32
150	2,08
180	1,91

Concentração de Células = 1,128 g/l  
 Umidade do Fermento = 77,7%  
 Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  = 5,21 mg/l  
 Banho de Gelo

TABELA 17

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM CÉLULAS DE LEVEDURA

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)
10	8,00
22	7,71
48	7,13
76	6,85
112	6,58
150	6,22
180	5,96
Concentração de Células = 1,183 g/l Umidade do Fermento = 77,7% Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ = 10,20 mg/l Banho de Gelo	

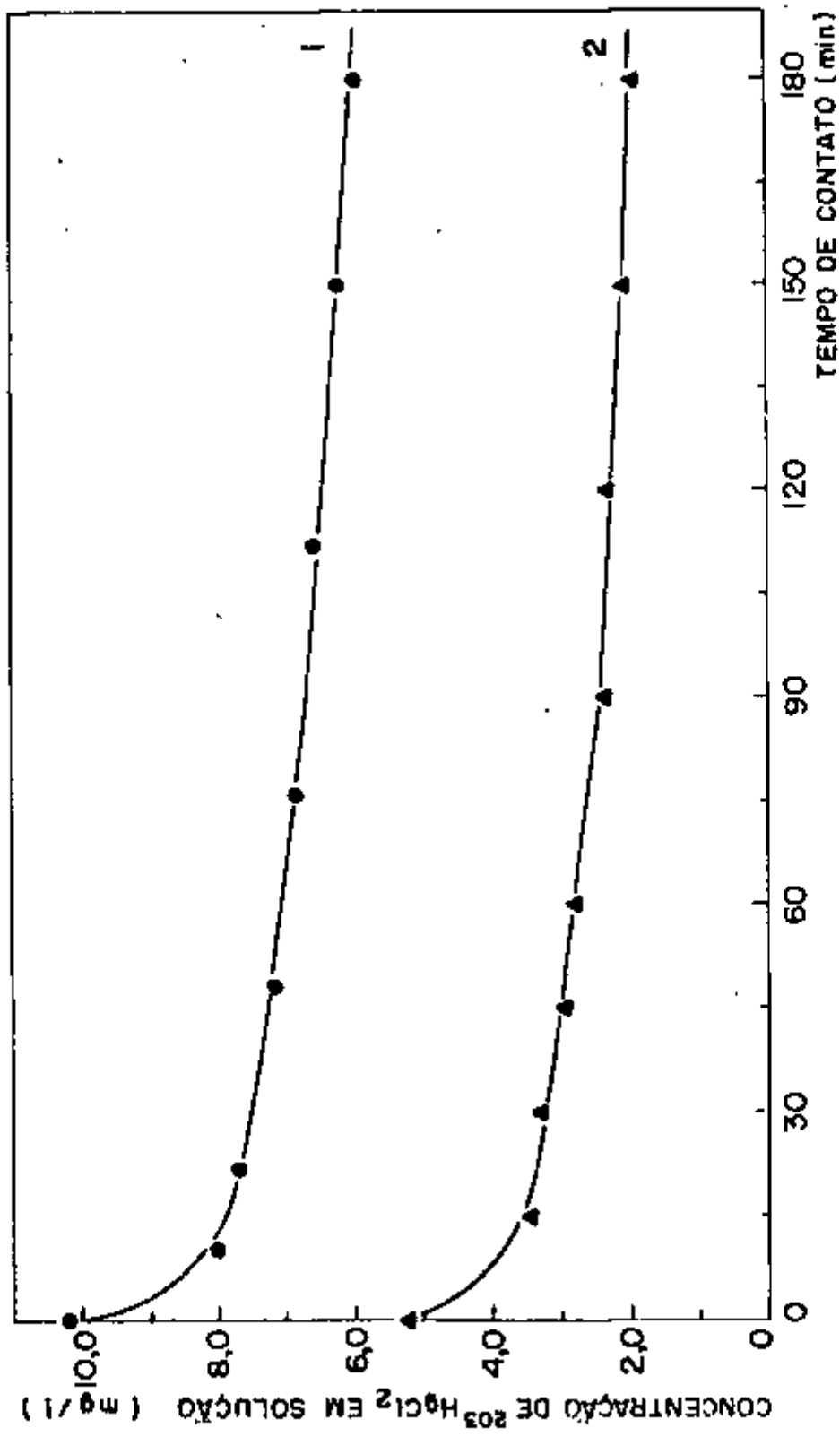


FIGURA 11 - Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução em função do tempo de contato com células de levedura

Curva 1: Concentração de células = 1,183 g/l ; Temperatura : banho de gelo

Curva 2: Concentração de células = 1,128 g/l ; Temperatura : banho de gelo

ções que à temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ , provocavam morte nas células de levedura após cerca de 60 minutos de contato com  $\text{HgCl}_2$ . A Tabela 18 mostra as condições em que se realizou o ensaio e os resultados obtidos de concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução e de concentração de células viáveis em função do tempo de contato.

A segunda experiência foi feita a uma temperatura variável entre  $0^{\circ}\text{C}$  e  $1^{\circ}\text{C}$ , nas condições mais desfavoráveis que seriam usadas nos ensaios de adsorção, para garantir que não estava ocorrendo morte das células durante o tempo de contato adotado com  $^{203}\text{HgCl}_2$ . A Tabela 19 indica as condições do ensaio e os valores obtidos na concentração de células viáveis em função do tempo de contato com  $^{203}\text{HgCl}_2$ .

Os dois últimos ensaios visaram relacionar a penetração do íon  $\text{Hg}^{2+}$  e a morte das células. Foram conduzidos em temperatura entre  $0^{\circ}\text{C}$  e  $1^{\circ}\text{C}$  sendo os resultados apresentados nas Tabelas 20 e 21. Nas sete horas de contato entre leveduras e  $^{203}\text{HgCl}_2$ , no penúltimo ensaio, embora houvesse penetração do íon  $\text{Hg}^{2+}$  nas células, não houve morte das mesmas. A Figura 12 ilustra a experiência descrita na Tabela 21, onde se pode notar, a partir de 6 horas de contato, um decréscimo no número de células viáveis por litro.

## F. EXPERIÊNCIAS DE ADSORÇÃO

### 1. Curvas de Adsorção e Aplicabilidade da Lei de Langmuir

O ajuste da Lei de Langmuir aos pontos experimentais obtidos foi realizado com o Computador do Instituto de Energia Atômica de São Paulo e está indicado nas Tabelas 22 a 31 e graficamente representado nas Figuras 13 a 22.

A Tabela 32 apresenta os valores da relação  $a/b$  (equação "3") determinados para as dez experiências.

### 2. Curva Completa de Adsorção

A possível existência de adsorção em camada única e em

TABELA 18

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)	Células Viáveis por Litro
Prova em Branco	-	$2,7 \times 10^{10}$
9	7,65	-
27	7,25	-
44	7,12	-
57	7,30	$2,9 \times 10^{10}$
88	6,69	-
118	6,43	-
149	6,33	-
174	7,14	$2,8 \times 10^{10}$
Concentração de Células = 0,907 g/l Umidade do Fermento = 77,5% Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ = 9,08 mg/l Banho de Gelo		

TABELA 19

CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO  
DE CONTATO COM  $^{203}\text{HgCl}_2$

Tempo de Contato (min)	Células Viáveis por Litro
Prova em Branco	$1,13 \times 10^{10}$
5	$1,06 \times 10^{10}$
30	$1,14 \times 10^{10}$
60	$1,09 \times 10^{10}$
90	$1,00 \times 10^{10}$
120	$1,15 \times 10^{10}$
Concentração de Células = 0,392 g/l Umidade do Fermento = 77,6% Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ = 3,05 mg/l Temperatura = 0°C a 1°C	

TABELA 20

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)	Células Viáveis por Litro
Prova em Branco	-	$3,10 \times 10^{10}$
6	9,29	$3,25 \times 10^{10}$
19	8,99	$3,15 \times 10^{10}$
40	8,86	$3,40 \times 10^{10}$
60	8,79	$3,35 \times 10^{10}$
101	8,27	$3,15 \times 10^{10}$
141	8,13	$3,60 \times 10^{10}$
180	6,86	$3,25 \times 10^{10}$
240	7,52	$3,05 \times 10^{10}$
330	6,92	$3,05 \times 10^{10}$
420	6,39	$3,25 \times 10^{10}$
Concentração de Células = 1,130 g/l Umidade do Fermento = 77,4% Concentração inicial de $^{203}\text{HgCl}_2$ = 11,12 mg/l Temperatura = 0°C a 1°C		



TABELA 21

CONCENTRAÇÃO DE  $^{203}\text{HgCl}_2$  EM SOLUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em Solução (mg/l)	Células Viáveis por Litro.
Prova em Branco	-	$3,75 \times 10^{10}$
6	8,54	$3,80 \times 10^{10}$
20	7,97	$3,70 \times 10^{10}$
39	7,22	$3,90 \times 10^{10}$
60	6,98	$3,70 \times 10^{10}$
360	4,83	$3,80 \times 10^{10}$
660	3,36	$2,25 \times 10^{10}$
960	2,40	$1,60 \times 10^{10}$
1260	1,63	$1,75 \times 10^{10}$
1620	1,12	$0,80 \times 10^{10}$
1740	1,19	$1,40 \times 10^{10}$

Concentração de Células = 1,171 g/l  
 Umidade do Fermento = 76,6%  
 Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  = 10,49 mg/l  
 Temperatura = 0°C a 1°C

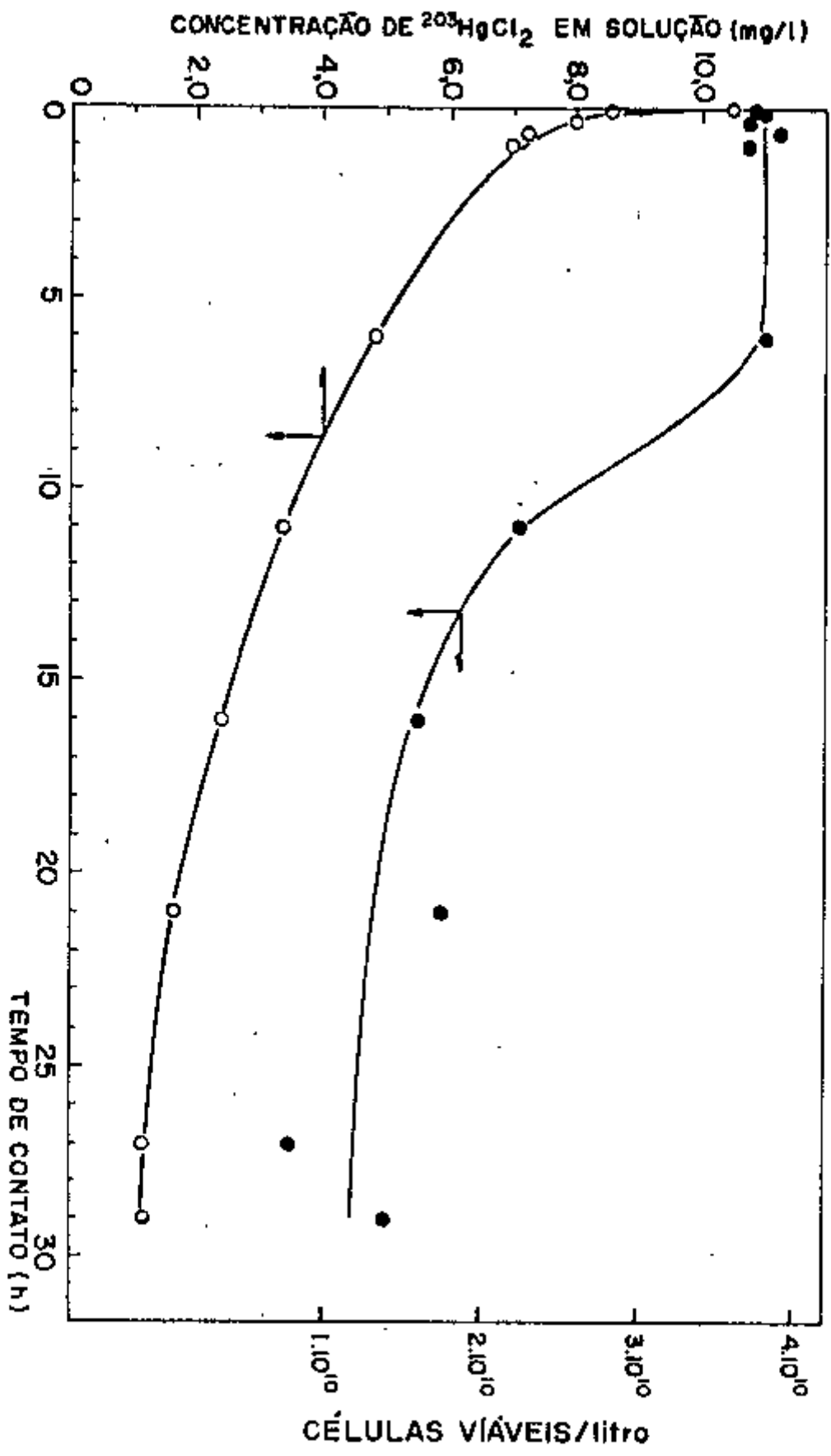


FIGURA 12 - Correlação entre penetração aparente de mercúrio e morte de células.

TABELA 22

EXPERIÊNCIA Nº 1

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
1,27	0,54	1,095
2,28	1,17	1,755
3,29	1,89	2,101
4,12	2,44	2,521
5,17	3,50	2,506

$X$  = Concentração de Células = 0,667 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 77,9%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de *Langmuir*)

$$\frac{0,667}{C_i - C_f} = 0,283 + 0,337 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coeficiente de Correlação = 0,9959

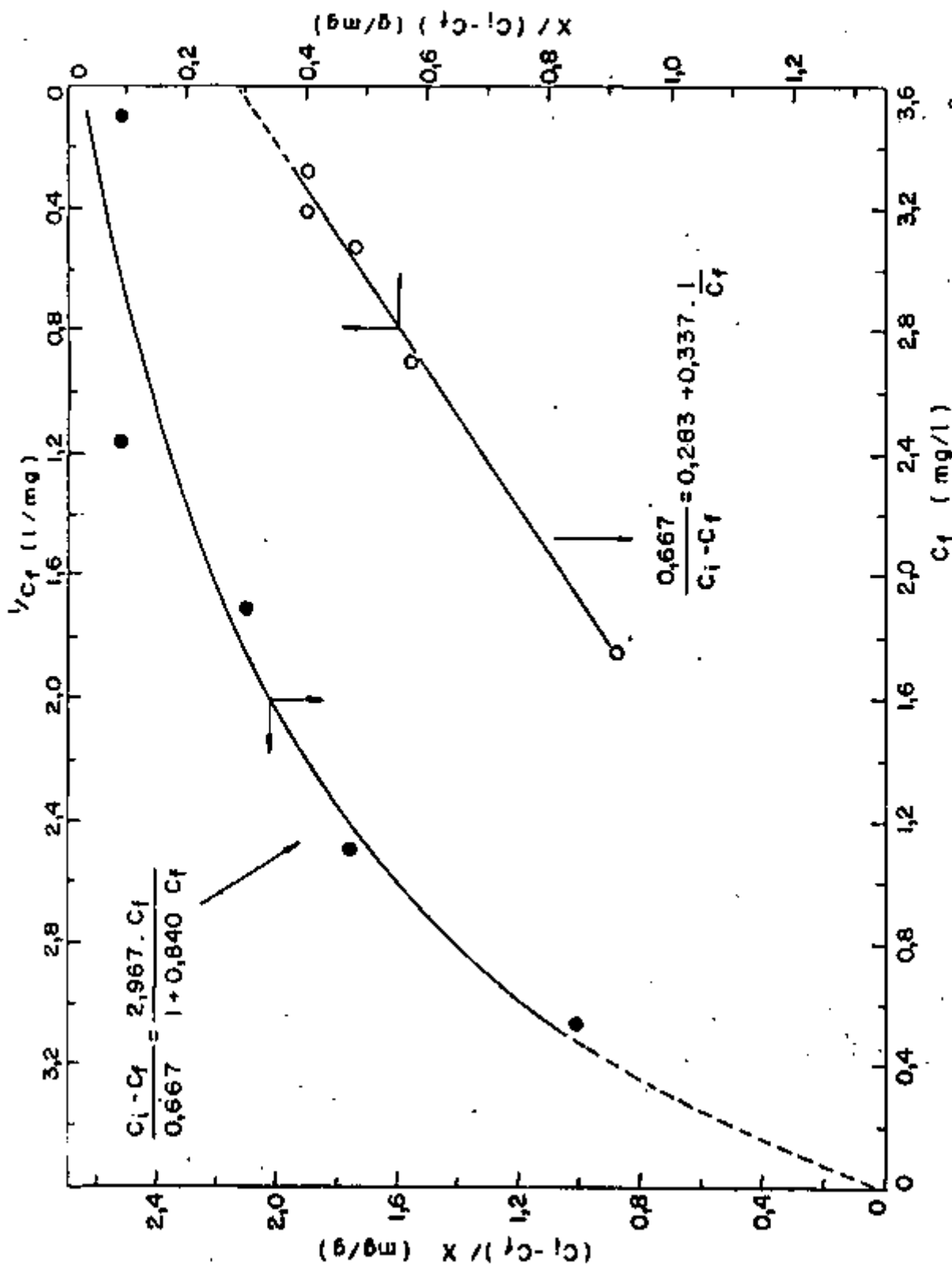


FIGURA 13 - Experiência nº1: Curva de adsorção e aplicação da Lei de Langmuir à adsorção de  $Hg^2$  por células vivas de levedura.  $X$  = Concentração de célula = 0,667 g/l.  $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l).  $C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l).

TABELA 23

## EXPERIÊNCIA Nº 2

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
0,48	0,11	0,559
0,91	0,25	0,997
1,32	0,42	1,359
1,81	0,67	1,721
2,24	1,04	1,812

$X$  = Concentração de Células = 0,662 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Unidade de Fermento = 78,0%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de Langmuir)

$$\frac{0,662}{C_i - C_f} = 0,375 + 0,156 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coefficiente de Correlação = 0,9993

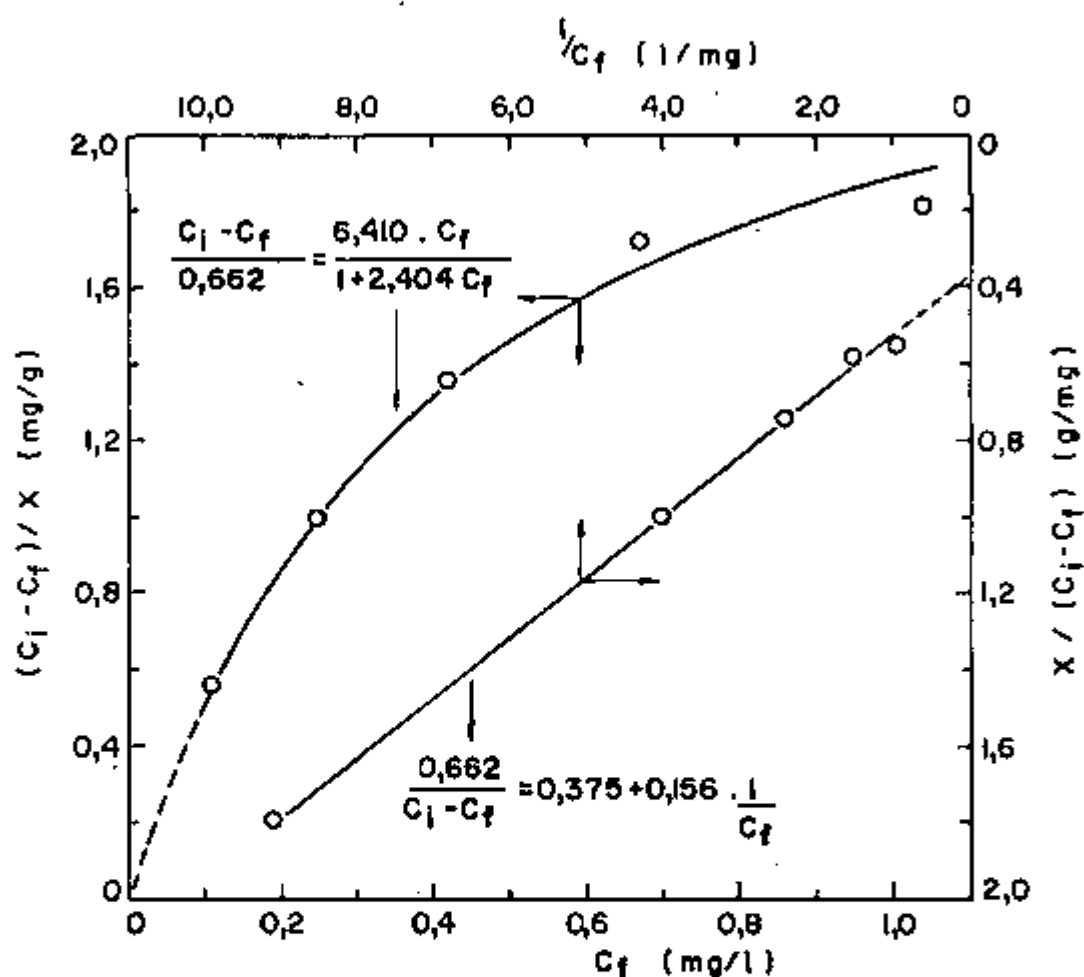


FIGURA 14 - Experiência nº 2 : Curva de adsorção e aplicação da Lei de Langmuir à adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células (g/l).

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l).

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

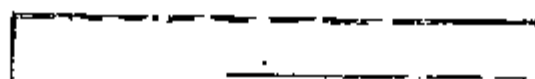


TABELA 24

## EXPERIÊNCIA Nº 3

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
0,78	0,23	0,998
1,04	0,28	1,379
1,53	0,54	1,796
2,05	0,89	2,104
2,58	1,25	2,412

$X$  = Concentração de Células = 0,551 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Unidade do Fermento = 78,8%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de *Langmuir*)

$$\frac{0,551}{C_i - C_f} = 0,290 + 0,147 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coefficiente de Correlação = 0,9684

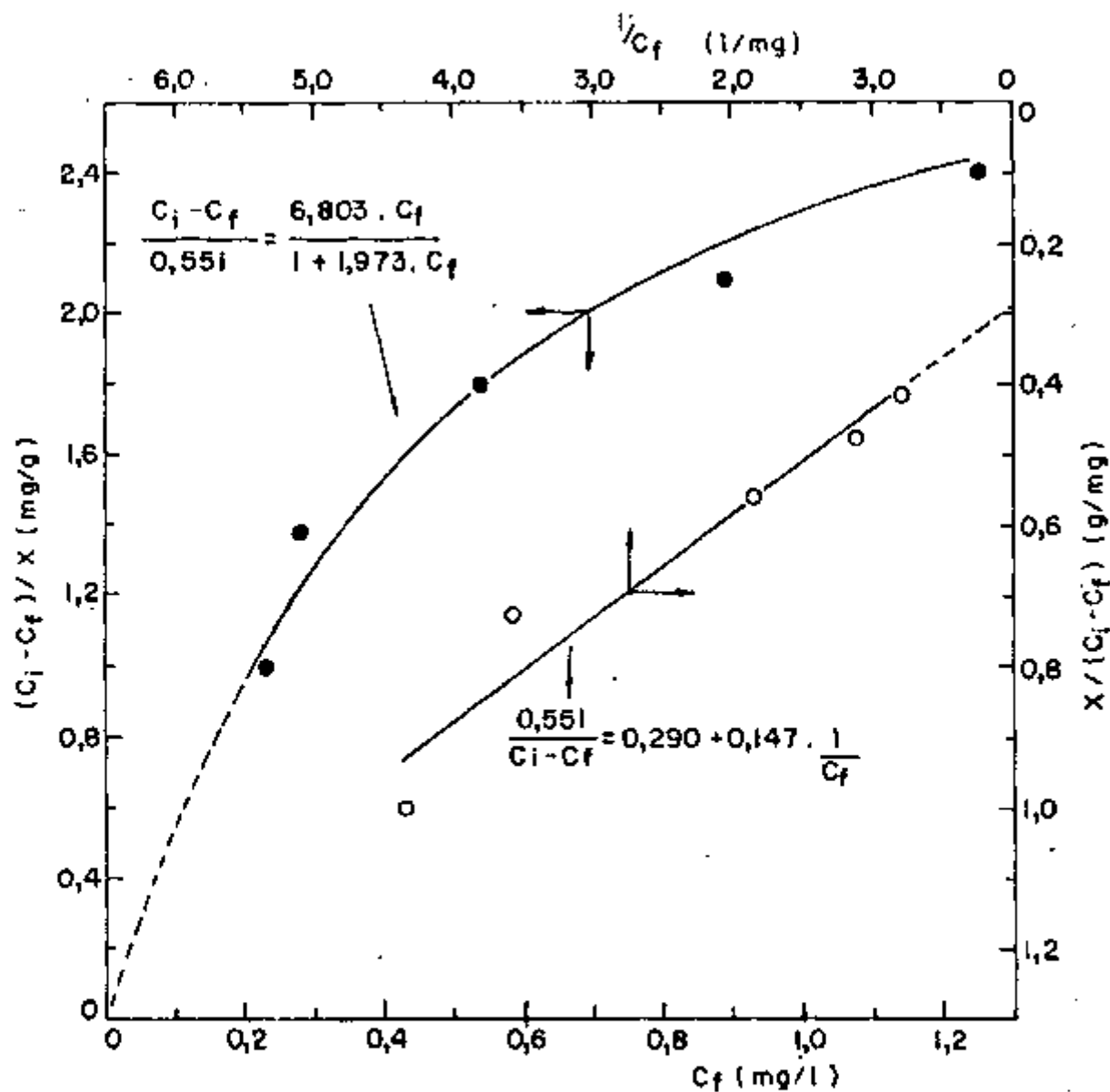


FIGURA 15 - Experiência nº 3: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $Hg^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células = 0,551 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)



TABELA 25

## EXPERIÊNCIA Nº 4

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
1,01	0,34	1,450
1,55	0,67	1,905
2,02	1,03	2,143
2,56	1,48	2,338

$X$  = Concentração de Células = 0,462 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 77,1%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de *Langmuir*)

$$\frac{0,462}{C_i - C_f} = 0,353 + 0,115 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coeficiente de Correlação = 0,9998

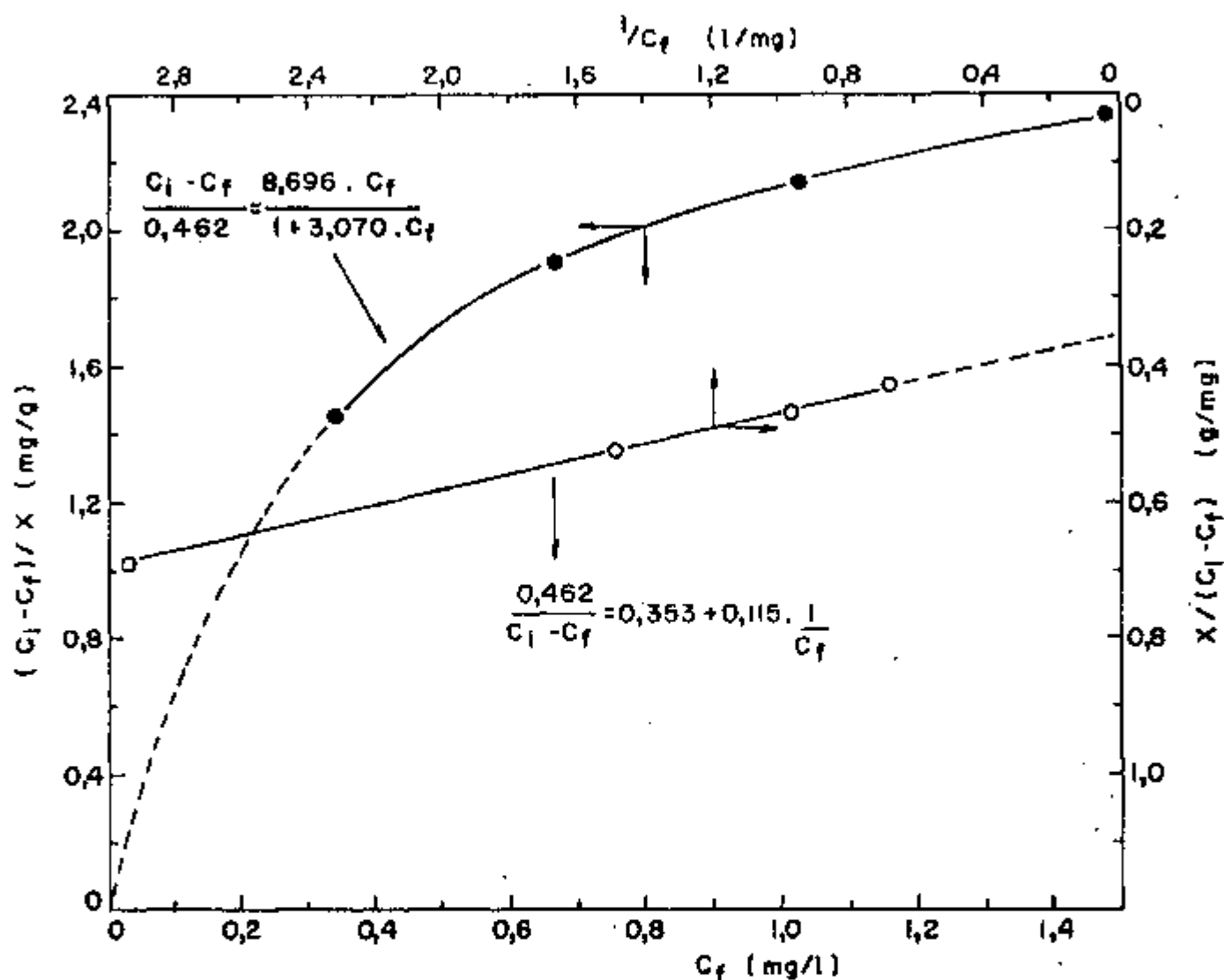


FIGURA 16 - Experiência nº 4: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $Hg^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células = 0,462 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

TABELA 26

## EXPERIÊNCIA Nº 5

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
0,54	0,13	0,624
0,62	0,12	0,761
0,75	0,20	0,837
0,88	0,18	1,065
0,89	0,21	1,035
0,98	0,25	1,096
1,25	0,42	1,263
1,47	0,51	1,461
1,83	0,82	1,537
1,99	0,81	1,796
2,16	1,10	1,613
2,50	1,06	2,191

$X$  = Concentração de Células = 0,657 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Unidade do Fermento = 78,2%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão. (Lei de *Langmuir*)

$$\frac{0,657}{C_i - C_f} = 0,447 + 0,121 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coefficiente de Correlação = 0,9392

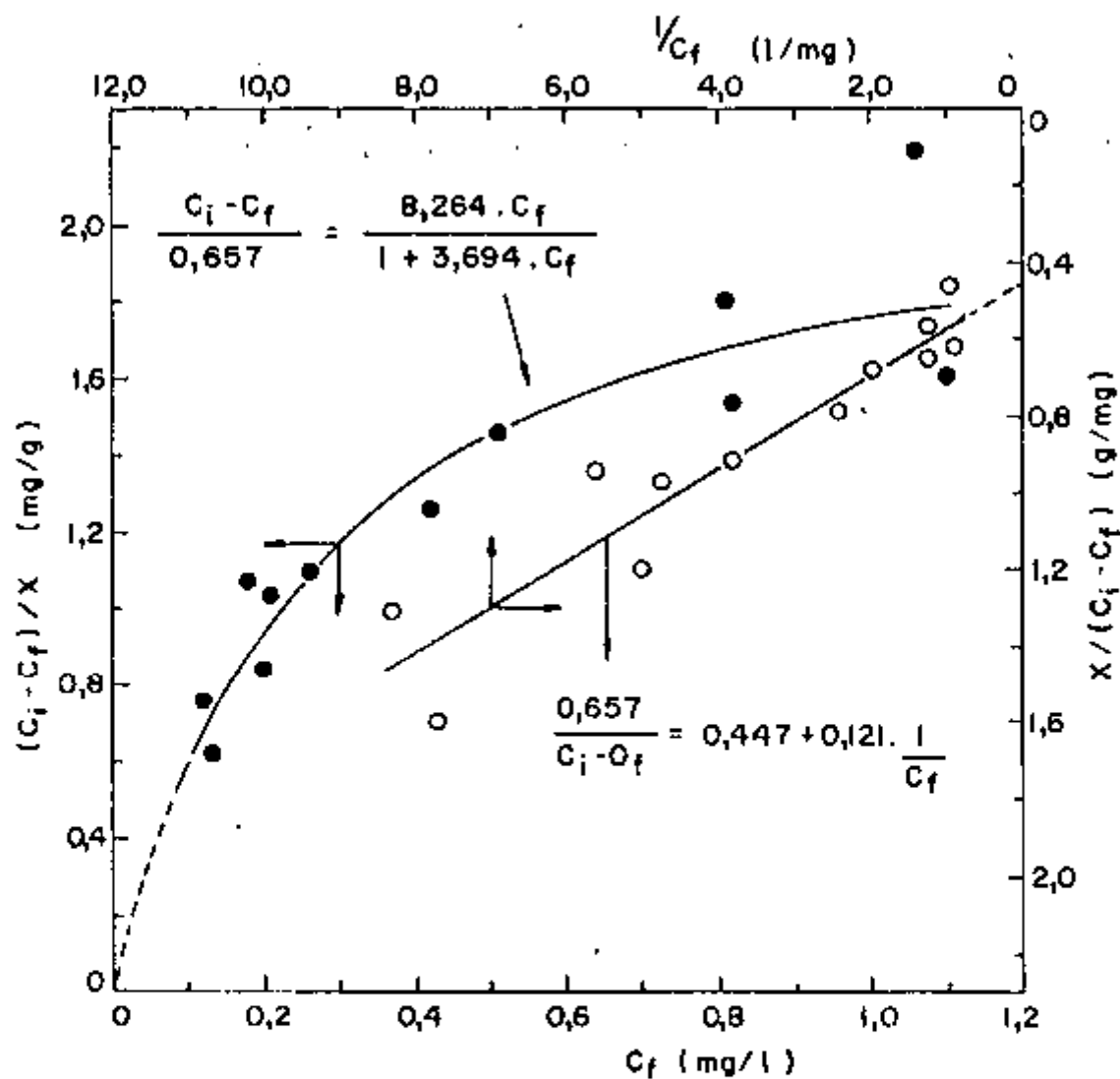


FIGURA 17 - Experiência nº 5: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células = 0,657 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

TABELA 27

## EXPERIÊNCIA Nº 6

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
0,53	0,11	0,633
1,23	0,33	1,356
1,50	0,43	1,612
1,70	0,54	1,748
2,05	0,71	2,019

$X$  = Concentração de Células = 0,664 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 78,0%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de *Langmuir*)

$$\frac{0,664}{C_i - C_f} = 0,303 + 0,141 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coeficiente de Correlação = 0,9998

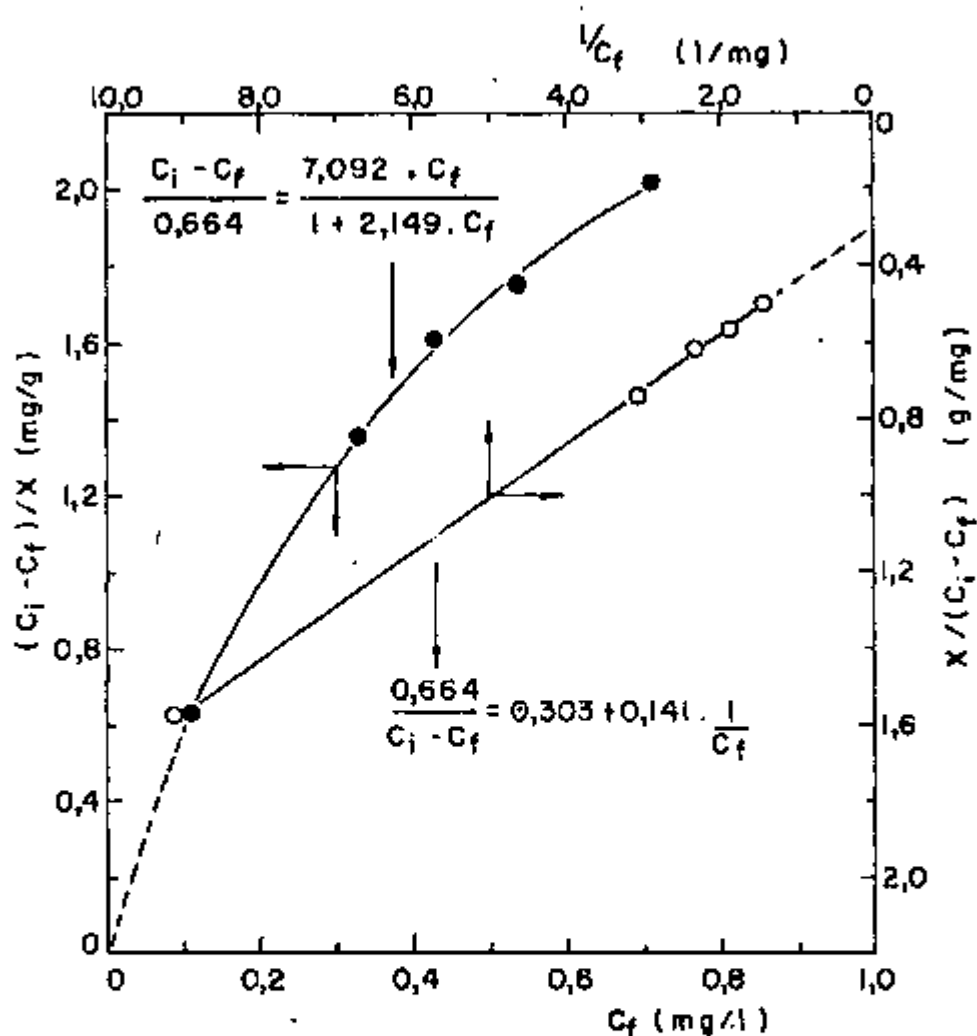


FIGURA 18 - Experiência nº6: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células = 0,664 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

TABELA 28

## EXPERIÊNCIA Nº 7

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
1,06	0,29	1,179
1,29	0,38	1,394
1,54	0,45	1,669
1,81	0,58	1,884
2,05	0,77	1,960

$X$  = Concentração de Células = 0,653 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 78,2%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de Langmuir)

$$\frac{0,653}{C_i - C_f} = 0,263 + 0,167 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coefficiente de Correlação = 0,9820

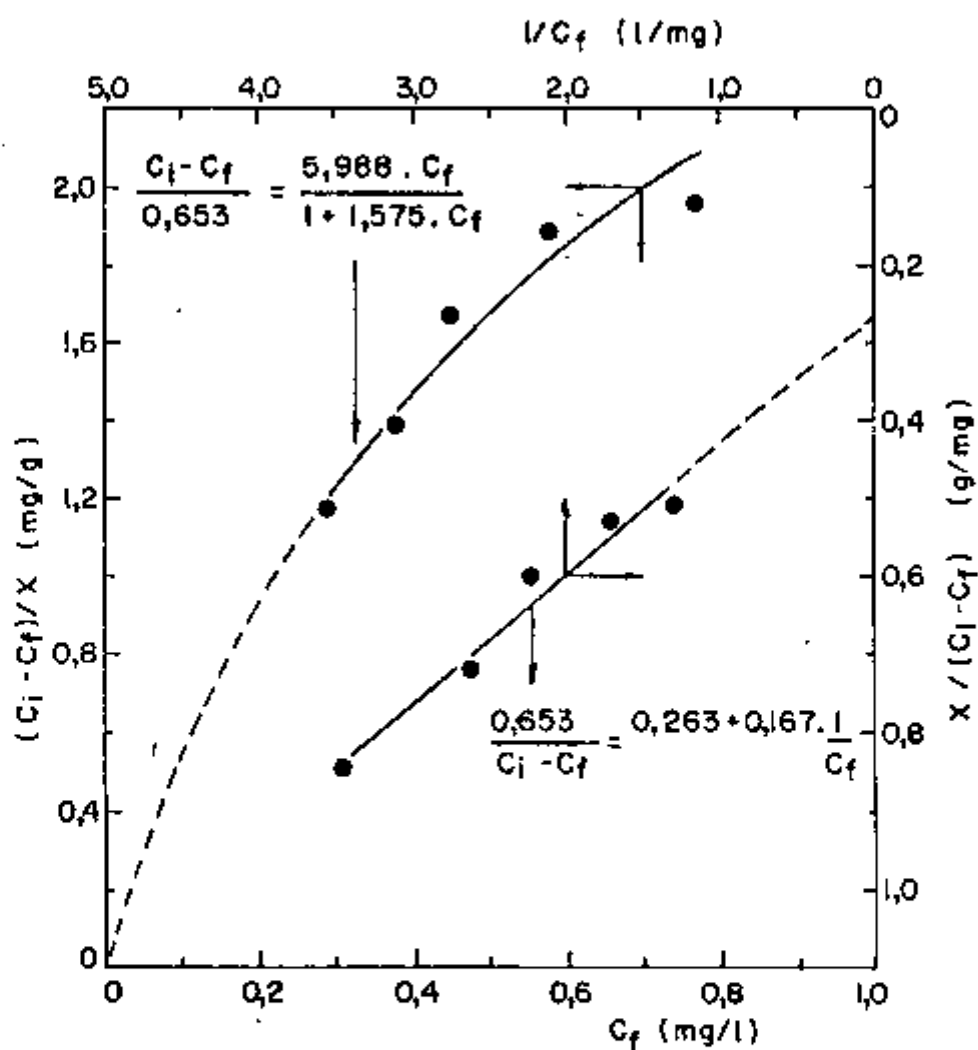


FIGURA 19 - Experiência nº 7: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $Hg^{2+}$  por células vivas de le vedura.

$X$  = Concentração de células = 0,653 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l).



TABELA 29

## EXPERIÊNCIA Nº 8

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
0,92	0,32	0,907
1,05	0,35	1,051
1,24	0,44	1,201
1,43	0,62	1,216
1,65	0,64	1,516
1,81	0,86	1,426
2,06	0,98	1,621
2,12	1,13	1,486

$X$  = Concentração de Células = 0,666 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 77,8%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de Langmuir)

$$\frac{0,666}{C_i - C_f} = 0,487 + 0,175 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coeficiente de Correlação = 0,9301

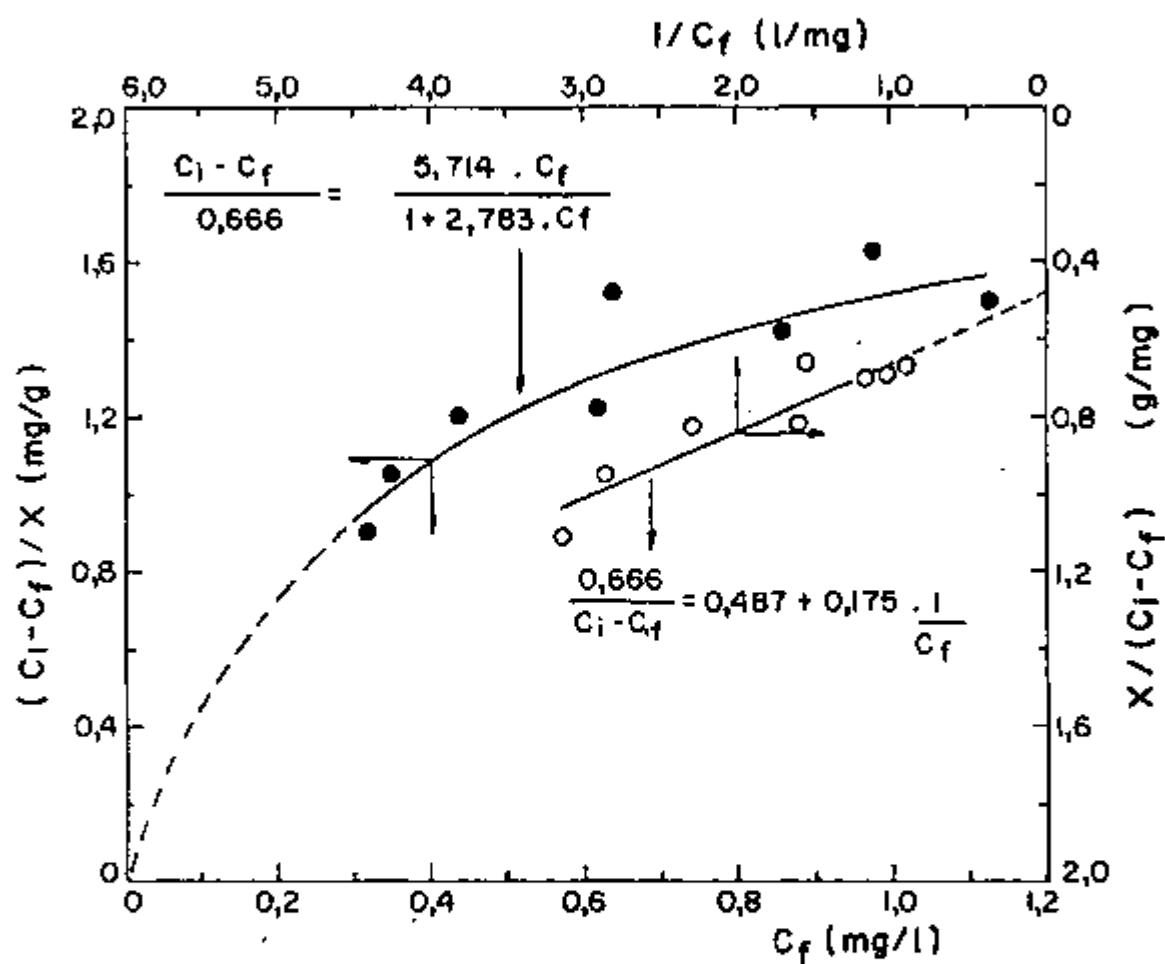


FIGURA 20 - Experiência nº8: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $Hg^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células = 0,666 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

TABELA 30

## EXPERIÊNCIA Nº 9

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
1,05	0,26	1,152
1,32	0,35	1,420
1,46	0,39	1,566
1,69	0,46	1,812
1,85	0,56	1,891
2,05	0,76	1,888
2,27	0,81	2,149
2,46	0,99	2,152

$X$  = Concentração de Células = 0,681 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 77,3%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de *Langmuir*)

$$\frac{0,681}{C_i - C_f} = 0,301 + 0,140 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coeficiente de Correlação = 0,9689

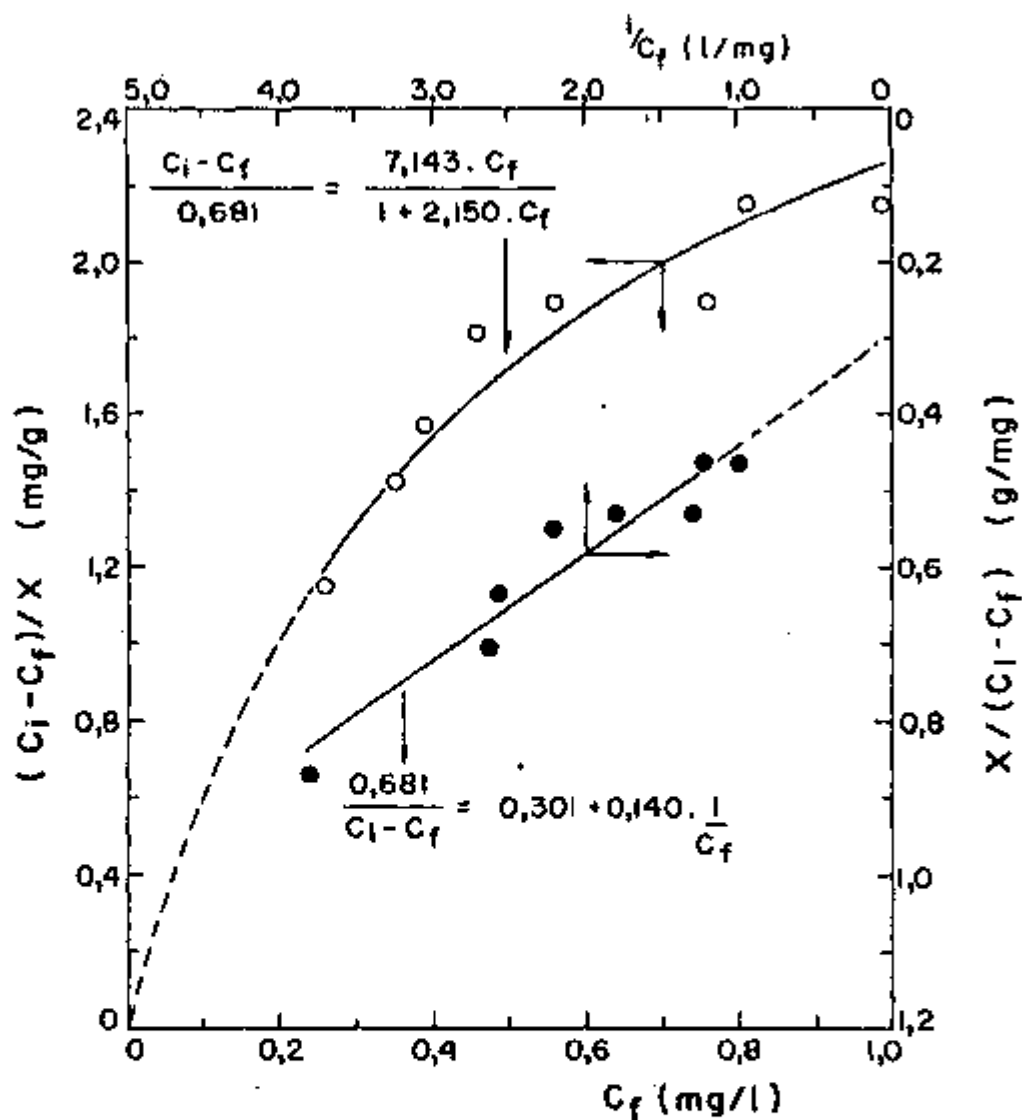


FIGURA 21 - Experiência nº 9: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células = 0,681 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

TABELA 31

EXPERIÊNCIA Nº 10

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
1,09	0,22	1,261
1,50	0,33	1,721
1,71	0,39	1,927
1,93	0,58	1,980
2,05	0,63	2,075
2,44	0,81	2,386
2,62	1,05	2,300

$X =$  Concentração de Células = 0,684 g/l  
 $C_i =$  Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f =$  Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Unidade de Fermento = 77,2%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

Equação da reta de regressão (Lei de Langmuir)

$$\frac{0,684}{C_i - C_f} = 0,314 + 0,098 \cdot \frac{1}{C_f}$$

Coefficiente de Correlação = 0,9662

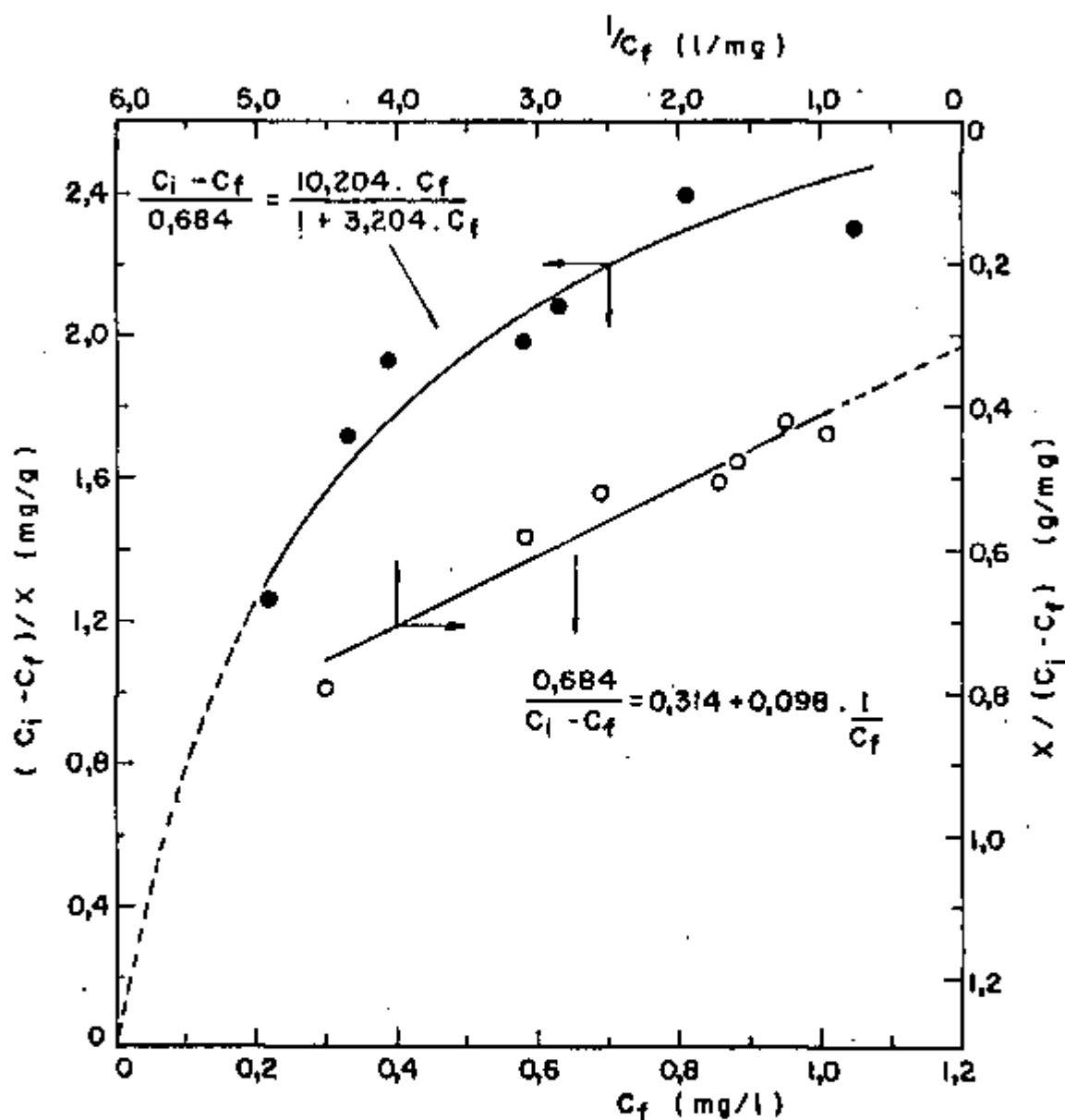


FIGURA 22 - Experiência nº10: Curva de adsorção e aplicação da lei de Langmuir à adsorção de  $Hg^{2+}$  por células vivas de levedura.

$X$  = Concentração de células = 0,684 g/l

$C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

$C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}HgCl_2$  (mg/l)

TABELA 32

VALORES DA RELAÇÃO A/B OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO  
DA EQUAÇÃO DA LEI DE LANGMUIR

Experiência Nº	a/b (mg $^{203}\text{HgCl}_2$ /g células)
1	3,53
2	2,67
3	3,44
4	2,83
5	2,24
6	3,30
7	3,80
8	2,05
9	3,33
10	3,19
Valor médio = 3,04 mg $^{203}\text{HgCl}_2$ /g células Desvio padrão = 0,57 mg $^{203}\text{HgCl}_2$ /g células Desvio padrão relativo = 18,8%	

camada múltipla foi observada experimentalmente em três ensaios, cujos resultados estão indicados nas Tabelas 33, 34 e 35 e, graficamente, na Figura 23.

TABELA 33

PRIMEIRA EXPERIÊNCIA PARA DETERMINAR A CURVA COMPLETA DE ADSORÇÃO

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
0,80	0,31	2,148
1,20	0,57	2,727
1,60	0,87	3,168
1,98	1,11	3,751
2,66	1,98	2,926
3,65	2,77	3,812
4,46	3,17	5,549
5,31	4,28	4,468
6,46	5,44	4,408
7,72	5,87	7,995
8,86	7,88	4,239
10,12	8,00	9,162

$X$  = Concentração de Células = 0,231 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 77,1%  
 Temperatura = 0°C a 1°C



TABELA 34

SEGUNDA EXPERIÊNCIA PARA DETERMINAR A CURVA COMPLETA DE ADSORÇÃO

$C_i$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
0,82	0,35	2,094
1,23	0,56	2,984
1,50	0,95	2,450
2,04	1,24	3,562
2,85	1,99	3,802
3,71	2,88	3,691
4,53	3,48	4,669
5,36	4,22	5,069
6,75	5,47	5,687
7,97	6,66	5,820
9,10	7,94	5,171
10,43	8,60	8,150

$X$  = Concentração de Células = 0,225 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de Equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 77,9%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

TABELA 35

TERCEIRA EXPERIÊNCIA PARA DETERMINAR A CURVA COMPLETA DE ADSORÇÃO

$C_F$ (mg/l)	$C_f$ (mg/l)	$\frac{C_i - C_f}{X}$ (mg / g)
4,68	3,57	4,590
5,78	4,66	4,644
6,43	4,51	7,988
7,15	5,89	5,252
8,83	7,56	5,277
9,61	7,51	8,719
10,78	8,45	9,701
12,32	11,17	4,790

$X$  = Concentração de Células = 0,241 g/l  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 $C_f$  = Concentração de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$   
 Umidade do Fermento = 76,0%  
 Temperatura = 0°C a 1°C

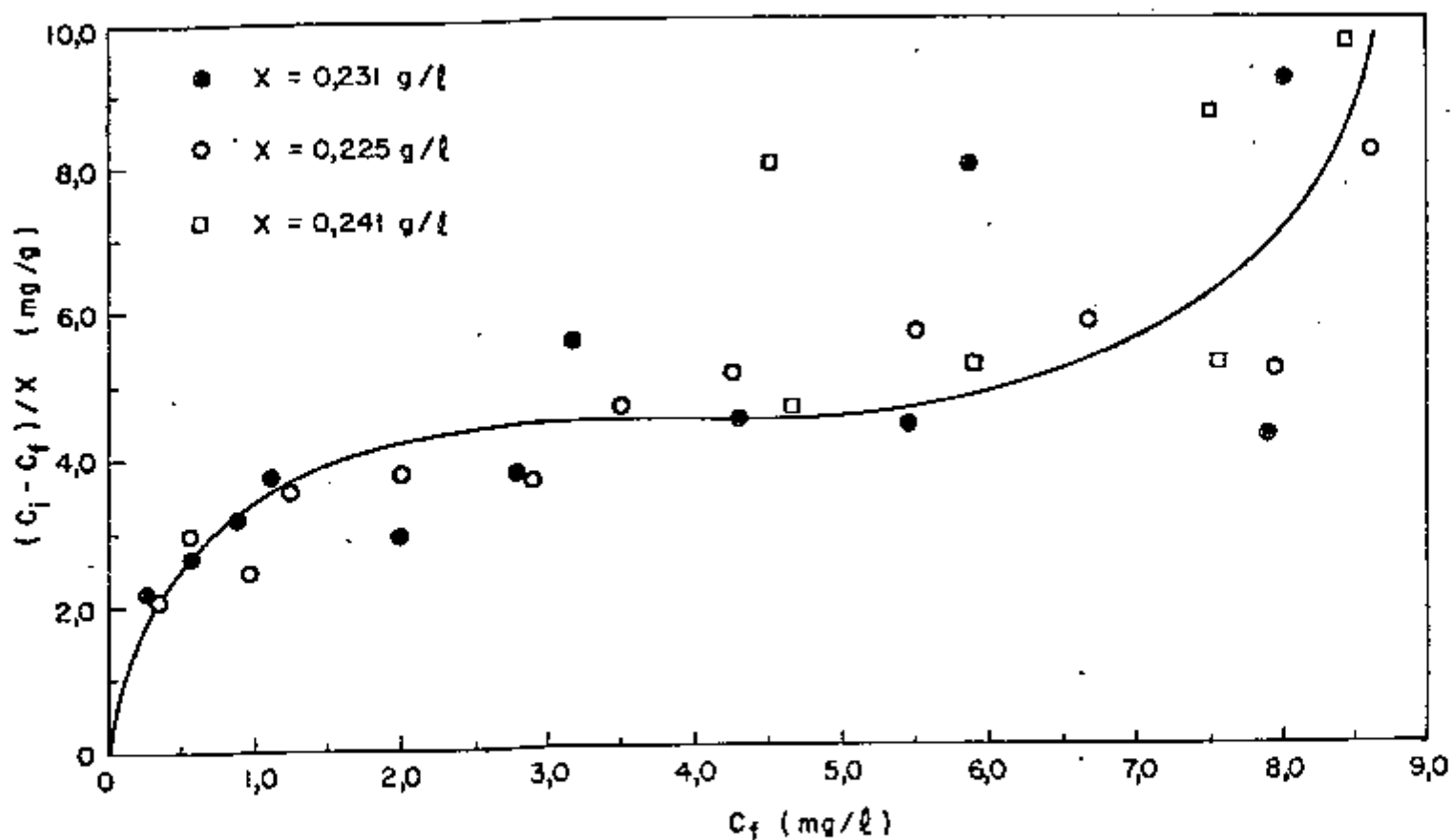


FIGURA 23 - Curva completa de adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de levedura  
 $X$  = Concentração de células (g/l)  
 $C_i$  = Concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)  
 $C_f$  = Concentração final de equilíbrio de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l).

## G. ADSORÇÃO DE MERCÚRIO E PENETRAÇÃO DE GLICOSE NAS CÉLULAS

O ensaio descrito no Ítem B.9. (Materiais e Métodos), conduziu aos valores representados na Tabela 36 e na Figura 24.

TABELA 36

## ADSORÇÃO DE MERCÚRIO E PENETRAÇÃO DE GLICOSE NAS CÉLULAS

Tempo de Contato (min)	Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ em solução (mg/l)	Concentração de Glicose em Solução (mg/l)	
		na suspensão de células contendo $^{203}\text{HgCl}_2$	na suspensão de células sem $^{203}\text{HgCl}_2$
0	5,47		
15	4,70	179	179
29	4,50	180	171
45	4,13	183	163
60	4,18	179	158
75	4,28	183	151
107	4,01	178	138

Concentração de Células = 0,121 g/l  
 Umidade do Fermento = 75,8%  
 Temperatura =  $(19,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$   
 A Glicose foi adicionada decorridos 14 min de contato das células com o  $^{203}\text{HgCl}_2$ .

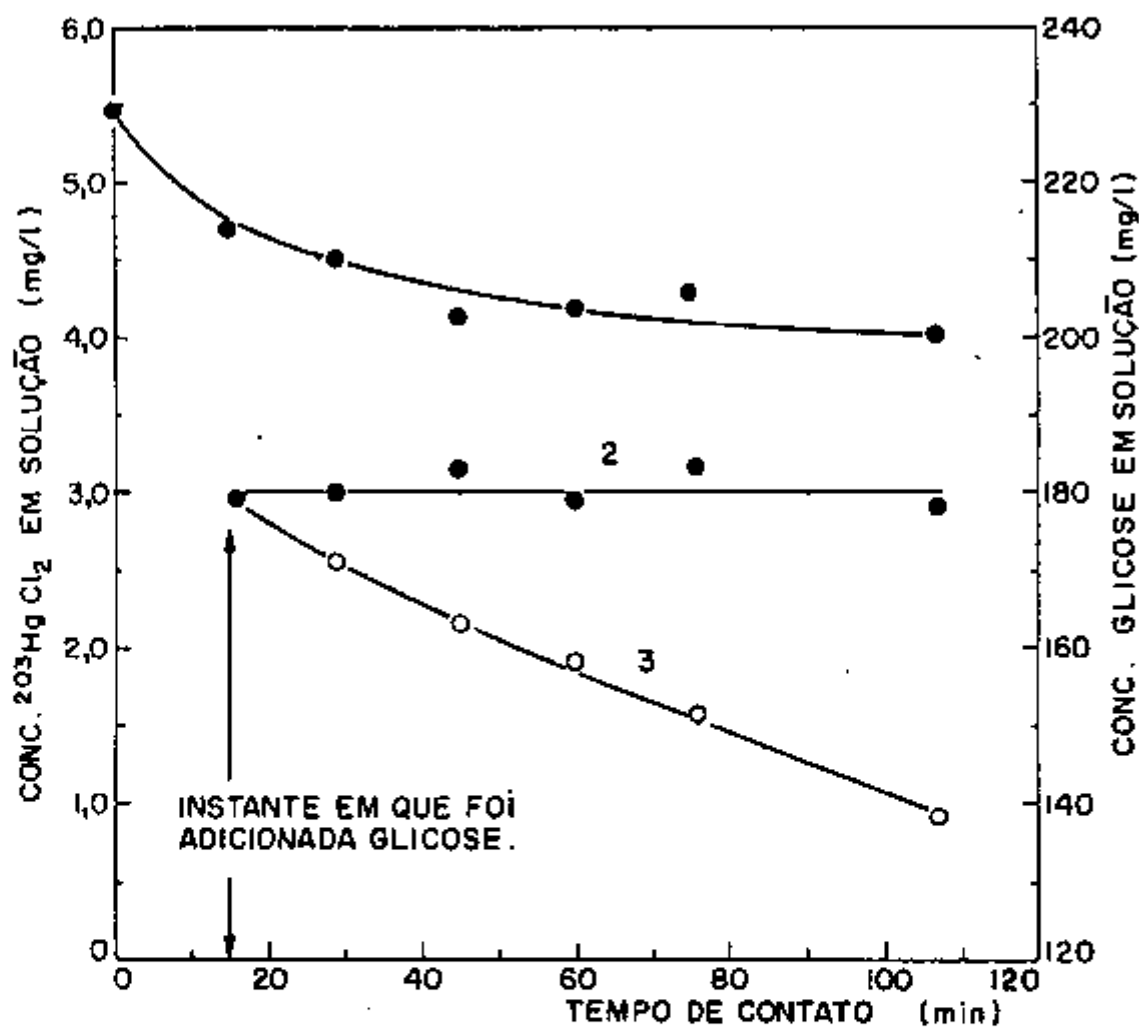


FIGURA 24 - Relação entre adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  pelas células e a penetração de glicose nas mesmas.

Curva 1: Concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução, em função do tempo de contato.

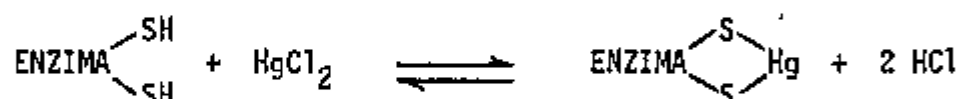
Curva 2: Penetração de glicose nas células em presença de  $^{203}\text{HgCl}_2$ .

Curva 3: Penetração de glicose nas células na ausência de  $^{203}\text{HgCl}_2$ .

Temperatura =  $(19,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

### DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A ação letal do  $\text{Hg}^{2+}$  sobre as células de microrganismos parece ser devida a uma reação do cátion com proteínas indispensáveis à atividade das células. No caso de enzimas com grupamentos sulfidrílica, o mercúrio pode atuar como agente oxidante acarretando uma inibição não competitiva pela reação reversível entre o cátion e grupamentos sulfidrílica de radicais de cisteína<sup>(28,29)</sup>, como indica esquematicamente a equação que segue:



A manifestação do efeito letal é uma função de fatores entre os quais destacam-se, por interessarem mais diretamente a este estudo, a temperatura, as concentrações de células e de  $\text{HgCl}_2$  e o tempo de contato entre o  $\text{Hg}^{2+}$  e o microrganismo.

Pretendia-se, particularmente, determinar em que condições de trabalho podia-se manter em contato levedura e  $\text{Hg}^{2+}$  sem morte das células, a fim de poder estudar o fenômeno objeto desta Dissertação. Os ensaios realizados mostraram que, a  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , e com uma concentração de levedura variável de 0,023 g/l a 2,300 g/l, pode-se garantir que não há morte das células em presença de  $\text{HgCl}_2$  até 5 mg/l durante 3 horas. Operando-se entre  $0^\circ\text{C}$  a  $1^\circ\text{C}$ , com concentração celular de 0,392 g/l a 1,171 g/l e com  $^{203}\text{HgCl}_2$  em concentrações de 3,05 mg/l a 11,12 mg/l, mesmo 6 horas de contato não conduziram a uma redução no número de células viáveis. As experiências realizadas com  $^{203}\text{HgCl}_2$  levaram a resultados que podem ser resumidos como segue:

1. Em suspensões contendo levedura na concentração de

0,907 g/l e  $^{203}\text{HgCl}_2$  na concentração de 9,08 mg/l, mantidas em banho de gelo, mesmo após 174 minutos de contato não houve redução no número de células viáveis.

2. Nas condições mais desfavoráveis, no que diz respeito às concentrações de células e de  $^{203}\text{HgCl}_2$ , que foram utilizadas nos ensaios de adsorção (células: 0,392g/l;  $^{203}\text{HgCl}_2$ : 3,05 mg/l), não houve morte de células durante 120 minutos de contato. Cumprido observar que mesmo a percentagem de células mortas determinada pelo método de Fink-Kühles, e da ordem de 1% no fermento lavado, permaneceu inalterada até o fim da experiência.

3. Em um ensaio que se prolongou por 29 horas, em temperatura de  $0^\circ\text{C}$  a  $1^\circ\text{C}$ , concentração de células igual a 1,171 g/l e a concentração inicial de  $^{203}\text{HgCl}_2$  igual a 10,49 mg/l, somente depois de 6 horas de contato, quando a concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução baixou a 4,83 mg/l, começou-se a observar redução no número de células viáveis. Esta experiência parece indicar que a morte dos microorganismos ocorre só depois de haver penetração do cátion nas células. Esses ensaios permitiram estabelecer as condições mais adequadas de trabalho.

As primeiras experiências realizadas com o objetivo de estudar uma possível adsorção do  $\text{Hg}^{2+}$  pelas células vivas de levedura, a  $(30,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , conduziram a resultados (Figuras 5, 6 e 7) que podem ser interpretados supondo que haja, no sistema, o desenvolvimento de dois fenômenos simultâneos: adsorção do  $\text{Hg}^{2+}$  e penetração do cátion nas células. Nas condições dos ensaios representados nas Figuras 5 e 6, a penetração, muito rápida, poderia ter mascarado o fenômeno de adsorção do cátion, enquanto que as curvas da Figura 7 poderiam ser consequência do fato de as novas condições experimentais acarretarem uma penetração mais lenta, surgindo assim uma tendência à formação de um patamar na altura dos 40 minutos.

Observe-se, nas Figuras 5, 6 e 7, que a maioria das curvas mostra, no final dos ensaios, uma elevação da concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  em solução. Este fato, para cuja explicação não foi realizado nenhum

trabalho experimental, poderia, talvez, ser devido a uma alteração da parede celular com conseqüente reversão no sentido do transporte do  $Hg^{2+}$ , tendendo provavelmente ao estabelecimento de um equilíbrio entre o  $Hg^{2+}$  em solução e o  $Hg^{2+}$  combinado com proteínas no interior da célula.

Admitindo como verdadeira a hipótese citada da existência dos dois fenômenos, o de adsorção e o de penetração do cátion, uma redução da temperatura, ocasionando diminuição da velocidade de penetração do cátion na célula e aumento da massa de material adsorvido por unidade da massa de adsorvente, deveria criar condições que permitissem uma observação segura do estabelecimento de um equilíbrio no sistema. As Figuras 8, 9, 10 e 11 confirmam esse fato.

Verificada a formação de um patamar, característico de um fenômeno de equilíbrio no sistema, passou-se à escolha das condições experimentais com o objetivo de se estudar a possível aplicação de leis físico-químicas ao fenômeno de adsorção observado. Tais condições são as seguintes:

- a) concentração de células = 0,462 g/l a 0,684 g/l;
- b) concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  = 0,48 mg/l a 5,17 mg/l;
- c) temperatura = 0°C a 1°C;
- d) tempo de contato = 45 a 60 min.

A aplicabilidade da lei de *Langmuir* foi verificada em dez experiências (Figuras 13 a 22). A Tabela 32 resume os valores da relação a/b (Equação "3") dos parâmetros experimentais determinados nestes ensaios.

Considerando que as experiências de adsorção foram realizadas com amostras diferentes de células, não deve, a nosso ver, causar estranheza o desvio padrão que afeta os resultados experimentais da Tabela 32.

Tres ensaios foram ainda realizados (Figura 23) com a finalidade de verificar, na presença de concentrações iniciais mais elevadas de  $^{203}HgCl_2$ , um possível fenômeno de adsorção em camada múltipla. As curvas obtidas, do tipo das que caracterizem adsorção em ca



mada multimolecular, não podem contudo ser consideradas como uma com provação da existência de camadas superpostas de cátions  $Hg^{2+}$  na pare de celular, uma vez que curvas análogas poderiam ser obtidas se, na presença de concentrações relativamente altas de cloreto de mercúrio II houvesse penetração do cátion nas células.

A partir dos valores da relação a/b, é possível calcular a área específica  $A_e$  das células nas condições experimentais já expos tas (9).

É fato conhecido que a determinação da área específica de um material a partir de ensaios de adsorção conduz a valores que de pendem, entre outros fatores, da substância a ser adsorvida utilizada (30). Por esse motivo, parece lógico que se procure, neste caso, encontrar um possível significado biológico dos valores que podem ser obtidos a partir dos ensaios realizados.

Considere-se, inicialmente, o cálculo da área específica de sejada a partir da equação "3", para o que falta conhecer apenas o valor de S, área coberta por uma unidade de massa de  $Hg^{2+}$  em camada mono-iônica.

Conhecendo-se o raio iônico do mercúrio, igual a  $1,10 \text{ \AA}$  (31 a 33), seu peso atômico e o número de Avogadro, e admitindo que um íon de mercúrio adsorvido "cubra" uma superfície de área igual à do hexágono regular circunscrito à circunferência de raio igual a  $1,10 \text{ \AA}$ , pode-se calcular S chegando-se ao valor:

$$S = 1,26 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mg de } Hg^{2+}$$

O valor da área específica desejada será então, tomando-se para cálculo o valor médio da relação a/b:

$$A_e = 2,84 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{g de células}$$

Considerando-se, finalmente, que em 1 g de levedura seca existem  $2,78 \times 10^{10}$  células (média de 12 determinações, com desvio padrão relativo igual a 18,7%; ver Apêndice), pode-se calcular a área

média de uma célula chegando-se ao resultado  $10,2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$ .

Não tem muito sentido, a nosso ver, comparar esses valores com os obtidos em trabalhos anteriores<sup>(9)</sup> utilizando azul de metileno como substância a ser adsorvida e células mortas de levedura como adsorvente. A morte das células por aquecimento da suspensão deve afetar profundamente a natureza da parede, o que invalida qualquer comparação que se pretenda fazer.

Cumpra todavia destacar que o valor aqui encontrado para a área média de uma célula,  $10,2 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$ , é consideravelmente menor do que o calculado a partir de medidas diretas realizadas em 160 células consideradas como corpúsculos lisos elipsoidais,  $110 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$  (9). Este fato pode ser interpretado como uma demonstração indireta de que o  $\text{Hg}^{2+}$  deve se fixar em pontos ou zonas específicas da parede celular.

Partindo-se da hipótese de que existem na parede celular, "pontos de fixação" de  $\text{Hg}^{2+}$ , e supondo que a retenção dos cátions se verifique na proporção de um cátion por "ponto de fixação", pode-se calcular o número desses "pontos" chegando-se aos resultados:

$$\begin{array}{l} 6,75 \times 10^{18} \text{ "pontos"/g de células} \\ \text{ou} \quad 2,43 \times 10^8 \text{ "pontos"/célula.} \end{array}$$

Procurou-se, finalmente, alguma evidência experimental que permitisse chegar à conclusão da existência de uma possível correlação entre os valores calculados e alguma atividade do microrganismo. Realizou-se então o ensaio de avaliação da velocidade de penetração de glicose em células vivas de levedura em suspensão aquosa em dois casos:

- a) com a levedura viva em presença de  $^{203}\text{HgCl}_2$ ;
- b) na ausência de  $^{203}\text{HgCl}_2$ .

Nas condições do ensaio, já descritas, verificou-se que, enquanto na presença do cloreto de mercúrio II não havia penetração de glicose na célula, na ausência do sal essa penetração se processava

com uma velocidade.

Esse fato parece mostrar que os pontos de penetração da glicose na célula estariam bloqueados por mercúrio adsorvido. Isto, evidentemente, não significa que todos os pontos de fixação do  $Hg^{2+}$  sejam pontos de penetração de glicose, mas os resultados obtidos não deixam de indicar que pode haver uma correlação entre eles. Em outras palavras, frente aos resultados experimentais apresentados, pode-se afirmar, com segurança, que os valores aqui calculados de área específica (ou número de pontos de fixação de  $Hg^{2+}$  por célula) são, do ponto de vista biológico, mais significativos que os calculados em trabalhos já publicados, pelo menos no que se relaciona com o estudo das velocidades de penetração de glicose nas células de levedura.

Obviamente, não se pretende, nesta Dissertação, ter resolvido completamente o problema proposto inicialmente, mas tudo indica que os primeiros passos no sentido desejado já foram percorridos.

\*\*\*\*\*

### CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que, nas condições experimentais descritas:

1. A morte das células de *Saccharomyces Cerevisiae* em contato com íons  $Hg^{2+}$  não ocorre por adsorção, e sim, após a penetração desses íons no interior das células.
2. A ação letal do mercúrio em relação às leveduras varia na dependência das concentrações de células e de  $HgCl_2$ , da temperatura e do tempo de contato. Assim:
  - a) à temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^{\circ}C$ , pode-se manter as células, dentro de uma faixa de concentração de 0,023 g/l a 2,300 g/l, em contato com  $HgCl_2$  em concentração de 5,1 mg/l, durante 3 horas, sem que haja a morte de células;
  - b) com uma diminuição de temperatura o fenômeno de penetração de  $Hg^{2+}$  nas células é dificultado;
  - c) com uma diminuição de temperatura, a concentração de  $HgCl_2$  pode ser aumentada dentro de certos limites, sem provocar morte das células.
3. À temperatura de  $(30,0 \pm 0,5)^{\circ}C$  não é possível individualizar os fenômenos de adsorção dos íons  $Hg^{2+}$  e de penetração dos mesmos nas células. Operando-se em temperatura entre  $0^{\circ}C$  e  $1^{\circ}C$ , o fenômeno de adsorção de  $Hg^{2+}$  pelas células é favorecido e a penetração dos íons é retardada, permitindo que se mantenha um

equilíbrio de adsorção entre 45 e 60 minutos de contato.

4. No caso de adsorção de íons  $Hg^{2+}$  por células vivas de levedura, a lei de adsorção de Langmuir foi obedecida nas seguintes condições:

- concentração de células = 0,462 g/l a 0,684 g/l;
- concentração inicial de  $^{203}HgCl_2$  = 0,48 mg/l a 5,17 mg/l;
- temperatura = 0°C a 19°C;
- tempo de contato = 45 a 60 minutos.

5. A possibilidade de ocorrência de adsorção de  $Hg^{2+}$  em camada única foi constatada, correspondendo ao trecho da curva de adsorção em que há obediência à lei de Langmuir. Com o aumento da concentração de  $^{203}HgCl_2$ , o aspecto das curvas indica que pode estar ocorrendo adsorção em camada múltipla ou que pode estar havendo penetração dos íons nas células.

6. A área específica de células vivas de levedura, calculada a partir dos parâmetros das equações da lei de Langmuir obtidos com base nos ensaios de adsorção de  $Hg^{2+}$ , é igual a  $2,84 \times 10^3$  cm<sup>2</sup>/g de células. A área média de uma célula de levedura viva vale, por sua vez,  $10,2 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>. Este último valor é cerca de 11 vezes menor que o obtido por medidas das dimensões das células ao microscópio.

7. A diferença citada na conclusão anterior parece indicar que a fixação dos íons  $Hg^{2+}$  se dá em pontos ou zonas preferenciais da parede celular.

8. Mais significativo que a área específica calculada é o número de "pontos de fixação" de íons  $Hg^{2+}$  na parede celular. Supondo que cada íon  $Hg^{2+}$  se fixe em um ponto preferencial, esse número vale  $6,75 \times 10^{18}$  "pontos"/g de células.

9. Não ocorre penetração de glicose em células vivas de le

vedura em contato com  $^{203}\text{HgCl}_2$ . Supõe-se que a penetração de glicose não seja possível porque os pontos de penetração de glicose estariam bloqueados por cátions adsorvidos.

10. As áreas calculadas a partir dos ensaios de adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por células vivas de levedura são, do ponto de vista biológico, mais significativas que as calculadas em trabalhos já publicados.

\*\*\*\*\*

### ASSUNTOS A PESQUISAR

O prosseguimento do trabalho, iniciado com esta Dissertação, implicará no exame experimental de diversos tópicos, entre os quais podem ser destacados:

1. Estudo do fenômeno de inibição de penetração de glicose em células vivas de levedura em presença de  $Hg^{2+}$ , com vistas à determinação de uma possível correlação entre o número de "pontos de fixação" de mercúrio e de pontos de penetração da glicose.
2. Localização do  $Hg^{2+}$  na célula, provavelmente por autor radiografia associada à microscopia eletrônica.
3. Determinação do erro experimental que afeta a medida da área específica pela técnica descrita.
4. Estudo da influência de fatores no valor da área específica calculado a partir das curvas de adsorção de  $Hg^{2+}$ .

Os seguintes fatores podem ser citados:

- a) temperatura;
  - b) pH;
  - c) presença de tampão;
  - d) natureza do tampão;
  - e) sal de mercúrio utilizado.
5. Variação da área específica de levedura em diferentes fases de desenvolvimento, tanto em cultura descontínua como em cultura contínua. Estudo de correlações entre as velocidades de assimilação de glicose e as áreas específicas das células.

6. Estudo de correlações entre área específica e velocidades de consumo de oxigênio e de fontes de nitrogênio e de fósforo principalmente.
7. Aplicabilidade do método proposto a outros microrganismos.

\*\*\*\*\*



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORZANI, W., FALCONE, M. e VAIRO, MARINA L.R., "Kinetics of the continuous alcoholic fermentation of blackstrap molasses", *Appl. Microbiol.*, 8, pg. 136 a 140 (1960).
2. LUEDEKING, R. e PIRET, E.L., " A kinetic study of the lactic acid fermentation ", *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 1, pg 393 a 412 (1959).
3. BORZANI, W., CONCONE, B.R.V., VAIRO, MARINA L.R., DOIN, P.A. e KOVACS, J., "Recent Advances in Microbiology", pg.419 a 425, México,(1971).
4. BORZANI, W. e VAIRO, MARINA L.R., "Quantitative adsorption of methylene blue by dead yeast cells", *J.Bacteriol.* 76, pg. 251 a 255 (1958).
5. BORZANI, W. e VAIRO, MARINA L.R., " Quantitative adsorption of crystal violet by dead microorganisms, *J. Bacteriol.* 77, pg. 757-759 (1959).
6. BORZANI, W. e VAIRO, MARINA L.R., " Adsorption of methylene blue as a means of determining cell concentration of dead bacteria in suspensions ", *Stain Technol.*, 35, pg.77 a 81 (1960).
7. VAIRO, MARINA L.R. e BORZANI, W., "Quantitative study of crystal violet adsorption by dead gram-negative bacteria", *J. Bacteriol.*, 80, pg.572 (1960).
8. BORZANI, W. e VAIRO, MARINA L.R., " Adsorption method for deter-

mining the percentage of dead cells in suspensions of Sarcina lutea", J. Bacteriol., 80, pg.574 a 575 (1960).

9. BORZANI, W., " Adsorption method for measuring the specific and average areas of cells ", J.Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 3, pg.235 a 240 (1961).
10. VAIRO, MARINA L.R., "Influence of several factors on the applicability of Freundlich's law to the adsorption of methylene blue by dead yeast cells", Appl. Microbiol., 10, pg.141 a 145 (1962).
11. VAIRO, MARINA L.R. e BORZANI, W., "Precise adsorption method for measuring the percentage of dead bacterial cells", Appl. Microbiol., 10, pg. 500 a 503 (1962).
12. VAIRO, MARINA L.R., " A modified adsorption method for determining percentage of dead yeast cells", Biotechnol. Bioeng., 4, pg. 247 a 254 (1962).
13. BORZANI, W. e VAIRO, MARINA L.R., "Quantitative determination of methylene blue sorption by dead Penicillium chrysogenum" , Biotechnol. Bioeng., 5, pg. 17 a 20 (1963).
14. BORZANI, W. e VAIRO, MARINA L.R., "Evaluation of dead cell fractions in suspensions of Penicillium chrysogenum", Biotechnol. Bioeng., 5, pg.101 a 107 (1963).
15. VAIRO, MARINA L.R. e BORZANI, W., "Sorção de azul de metileno e cristal violeta por células vivas de levedura", Ciência e Cultura, 17, pg.372 a 373 (1965).
16. VAIRO, MARINA L.R., e BORZANI, W., "The influence of relative dye and cell concentrations on the adsorption method for the measurement of the specific areas of microorganisms", J. Ferm. Technol., 48, pg. 329 a 333 (1970).

17. REDDISH, G.F., "Antiseptics, Disinfectants, Fungicides, and Chemical and Physical Sterilization", 2<sup>a</sup> edição, pg. 284 a 287, 466 a 468 (1957).
18. KENNEDY, E.R. e BARBARO, J.F., "Quantitative adsorption of crystal violet", J. Bacteriol., 65, pg. 678 a 680 (1953).
19. BARBARO, J.F. e KENNEDY, E.R., "A quantitative gram reaction" , J. Bacteriol., 67, pg. 603 a 607 (1954).
20. KENNEDY, E.R. e WOODHOUR, A.F., "Quantitative studies of differential staining reactions", J. Bacteriol., 72, pg. 447 a 450 (1956).
21. BARBARO, J.F., KENNEDY, E.R. e COLLINS, R.M., "The effect of the fixative and of chemical treatment of fixed bacteria on the adsorption and retention of dye", J. Bacteriol., 72, pg. 451 a 454 (1956).
22. FINKELSTEIN, H. e BARTHOLOMEW, J.W., "Dye uptake by gram-positive and gram-negative cells as related to adsorption laws", J. Bacteriol., 80, pg. 14 a 17 (1960).
23. BORZANI, W., VAIRO, MARINA L.R. e SCHNEIDERMAN, B., "Conservação de fermento prensado em temperatura baixa, I- Variação da percentagem de células mortas", Engenharia, 184, pg. 346 a 347 (1958).
24. WHITE, J., "Yeast technology", Chapman and Hall, London, pg. 144 (1954).
25. JØRGENSEN, A., "Micro-organisms and Fermentation", Charles Griffin, London, pg. 136 (1948).
26. PELCZAR, M. J. Jr. e REID, R.D., "Microbiology", International Student Edition, pg. 98 a 99 (1965).
27. J. Biol. Chem. 195, pg. 19 (1952).

28. PELCZAR, M. J. Jr. e REID, R.D., "Microbiology", International Student Edition, pg. 296, 318 e 319 (1965).
29. LEHNINGER, A.L., "Biochemistry", 3<sup>a</sup> edição, pg. 81, 162 (1971) .
30. WEISER, H.B., "A Textbook of Colloid Chemistry", 2<sup>a</sup> edição, John Wiley and Sons, Inc. New York, pg. 64 (1949).
31. PAULING, L., Z. Krist. 67, pg.337 (1928).
32. KORDES, E., Z. Phys. Chem., 44, pg. 249, 327 (1939); 48, pg. 91 (1940); Naturwissenschaften, 47, pg. 463 (1960).
33. AHRENS, L., Geochim. Cosmochim. Acta, 2, pg.155 (1952).

\*\*\*\*\*

APÊNDICE

A. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE FINK-KÜHLES PARA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS MORTAS NO FERMENTO

Azul de Metileno .....	200	mg/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	27,2	g/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....	0,071	g/l
O pH da solução é .....	4,6	

B. DETERMINAÇÃO DA RETA DE CALIBRAÇÃO DO ANALISADOR MONOCANAL PARA O  $^{203}\text{Hg}$

A Tabela 37 mostra os resultados obtidos na medida da atividade de amostras de  $^{203}\text{HgCl}_2$ . Essa calibração foi feita para ser utilizada na experiência de adsorção nº1 descrita no Capítulo de RESULTADOS, item F.1.

TABELA 37

DETERMINAÇÃO DA RETA DE CALIBRAÇÃO DO  
ANALISADOR MONOCANAL PARA  $^{203}\text{HgCl}_2$

(Experiência nº1)

Concentração de $^{203}\text{HgCl}_2$ (mg/l)	Contagens por Minuto
12,82	288.704
10,26	232.712
7,69	172.279
5,13	105.464
2,56	51.240
1,28	27.193

A equação da reta de calibração, determinada pelo método dos mínimos quadrados no Computador do Instituto de Energia Atômica de São Paulo, é a seguinte:

$$C = 0,293 + 4,33 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9994)

sendo  $C$  = concentração de  $^{203}\text{HgCl}_2$  (mg/l)

$N$  = número de contagens por minuto

As equações determinadas para as retas de calibração nas outras experiências de adsorção, assim como seus coeficientes de correlação, foram respectivamente:

Experiência de Adsorção nº 2

$$C = 0,005 + 4,57 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9990)

Experiência de Adsorção nº 3

$$C = 0,054 + 4,62 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9998)

Experiência de Adsorção nº 4

$$C = -0,026 + 4,95 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9948)

Experiência de Adsorção nº 5

$$C = 0,020 + 5,07 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9983)

Experiência de Adsorção nº 6

$$C = - 0,015 + 5,26 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9998)

Experiência de Adsorção nº 7

$$C = 0,077 + 5,97 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9999)

Experiência de Adsorção nº 8

$$C = 0,113 + 6,20 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9993)

Experiência de Adsorção nº 9

$$C = 0,036 + 8,68 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9998)

Experiência de Adsorção nº 10

$$C = - 0,048 + 9,53 \times 10^{-5} N$$

(coeficiente de correlação = 0,9995)

C. REAGENTES USADOS NO MÉTODO DE SOMOGYI PARA DETERMINAÇÃO DA CON  
CENTRAÇÃO DE GLICOSE.

<u>Solução 1</u>	NaHCO <sub>3</sub> .....	16 g
	Sal de Rochelle .....	12 g
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	24 g
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	144 g
	H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	800 ml

Solução 2 Dissolver 36 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 10 ml de uma solução de  
CuSO<sub>4</sub> . 5H<sub>2</sub>O de concentração 40 g/l e diluir a  
200 ml.

Solução 3 Dissolver 25 g de  $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 450 ml de água; adicionar 21 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado; juntar uma solução de  $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3g) em 25 ml de água. Homogeneizar e deixar na estufa a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas. Guardar em frasco escuro.

D. MEDIDA DO NÚMERO DE CÉLULAS POR GRAMA DE LEVEDURA SECA

A Tabela 38 indica os resultados obtidos em 12 determinações na medida do número de células viáveis contido em um grama de matéria seca pelo método de contagem de colônias em placas.

TABELA 38

NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE LEVEDURA POR GRAMA DE MATÉRIA SECA

Determinação nº	Células por Grama de Matéria Seca
1	$2,00 \times 10^{10}$
2	$2,01 \times 10^{10}$
3	$2,15 \times 10^{10}$
4	$2,57 \times 10^{10}$
5	$3,44 \times 10^{10}$
6	$2,90 \times 10^{10}$
7	$3,62 \times 10^{10}$
8	$2,95 \times 10^{10}$
9	$3,07 \times 10^{10}$
10	$3,00 \times 10^{10}$
11	$2,89 \times 10^{10}$
12	$2,74 \times 10^{10}$
<p>Média = <math>2,78 \times 10^{10}</math> Células/g  Desvio padrão = <math>0,52 \times 10^{10}</math> Células/g  Desvio padrão relativo = 18,7%</p>	